T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MANYETİK NANOPARTİKÜL İÇEREN FOTOTERMAL TEDAVİYE UYGUN TÜMÖR SPESİFİK ÖZELLİKTE BİYOMALZEME GELİŞTİRİLMESİ

Zeynep ÖZCAN

DOKTORA TEZİ

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Üretim Programı

Danışman

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ

Mayıs, 2024

T.C.

YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MANYETİK NANOPARTİKÜL İÇEREN FOTOTERMAL TEDAVİYE UYGUN TÜMÖR SPESİFİK ÖZELLİKTE BİYOMALZEME GELİŞTİRİLMESİ

Zeynep ÖZCAN tarafından hazırlanan tez çalışması 28.05.2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Metalurji ve Malzeme Anabilim Dalı, Üretim Programı **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ
Yıldız Teknik Üniversitesi
Danışman

Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR, Danışman
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Cengiz KAYA, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa _____

Prof. Dr. Serap ACAR, Üye
Yıldız Teknik Üniversitesi _____

Prof. Dr. Zeliha GÖKMEN, Üye
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa _____

Danışmanım Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ sorumluluğunda tarafımca hazırlanan "Manyetik Nanopartikül İçeren Fototermal Tedaviye Uygun Tümör Spesifik Özellikte Biyomalzeme Geliştirilmesi" başlıklı çalışmada veri toplama ve veri kullanımında gerekli yasal izinleri aldığımı, diğer kaynaklardan aldığım bilgileri ana metin ve referanslarda eksiksiz gösterdiğimi, araştırma verilerine ve sonuçlarına ilişkin çarpıtma ve/veya sahtecilik yapmadığımı, çalışmam süresince bilimsel araştırma ve etik ilkelerine uygun davrandığımı beyan ederim. Beyanımın aksinin ispatı halinde her türlü yasal sonucu kabul ederim.

Zeynep ÖZCAN

İmza

Bu çalışma, “Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü’nün FDK-2021-4609” numaralı projesi ile desteklenmiştir.

Aileme

ve

6 Şubat'ta

hayalleri yarım

kalan herkese

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, akademik alanda başarılı bir şekilde ilerleyebilmem için beni teşvik eden, bilgi ve tecrübeleriyle yönlendiren ve her türlü özveriyi gösteren Tez Danışmanım Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Doktora tez çalışmalarımın ilerlemesinde bilgi ve tecrübeleri ile katkıda bulunan Tez İzleme Komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Cengiz KAYA ve Prof. Dr. Elif İlkay ARMUTAK'a içtenlikle teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım kapsamında yapılması gerekli olan testler ve çalışmalar için her türlü desteği sağlayan, İDEA test merkez yöneticisi Uzm. Vet. Hekim Öznur İNAN'a, Tuba ÇETİN'e ve kıymetli IDEA çalışanlarına; tez çalışmalarım kapsamında analizlerin gerçekleştirilmesini sağlayan Doç. Dr. Hasan GÖKÇE'ye, Doç. Dr. Hüseyin SÖZERİ'ye, Prof. Dr. Serap ACAR'a, Dr. Volkan UĞRAŞKAN'a, Kaan ŞENDAL'a; yaptıkları tüm yardımlar için teşekkür ediyorum.

YTÜ Biyoteknoloji Laboratuvar üyeleri olan kıymetli meslektaşlarım Ebru AYDIN, Büşra ÖZTÜRK, Abdullah TORAMAN, Berkay ÇAĞDAŞ ve diğer tüm arkadaşlarıma birlikte yürüdüğümüz bu uzun yolda dostlukları ve yardımları için çok teşekkür ediyorum.

Tez dönemi boyunca moral ve motivasyonumu yüksekte tutan ve beni destekleyen eşime, bana her zaman güvenen ve her koşulda destek veren ailem ile tüm dostlarıma kalpten teşekkür ederim.

Doktora tez çalışmam için FDK-2021-4609 DOP projesi ile destek veren Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü'ne ve doktora sürecimde maddi burs desteği sağlayan "100/2000 YÖK Doktora Bursu" için YÖK'e teşekkür ederim.

Zeynep ÖZCAN

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR v
SİMGE LİSTESİ ix
KISALTMA LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xi
TABLO LİSTESİ xviii
ÖZET xix
ABSTRACT xxi
1 GİRİŞ 1
1.1 Literatür Özeti 1
1.2 Tezin Amacı 6
1.3 Hipotez 8
2 TEORİK BİLGİLER 10
2.1 Fototermal Terapi ve Özellikleri 10
2.2 Kanser Tedavisinde Fototermal Terapinin Önemi 10
2.3 Fototermal Terapide Kullanılan Nanopartiküller 14
2.4 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Fototermal Terapideki Rolü 17
2.5 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri 18
2.5.1 Birlikte Çöktürme Yöntemi 20
2.5.2 Biyosentez Yöntemi 21
2.5.3 Hidrotermal Yöntemi 22
2.5.4 Mikroemülsiyon Yöntemi 23
2.5.5 Sol-jel Yöntemi 24
2.5.6 Termal Ayrışma Yöntemi 25
2.5.6 Solvotermal Yöntemi 26
2.6 Polidopamin Polimerinin Özellikleri ve Önemi 26
2.6.1 Fe_3O_4 Nanoyapıların Modifiye Edilmesinde Polidopamin Polimerinin Önemi 27
2.7 Nanoyapılarda PEG Kullanımı ve Önemi 30
2.8 Vinorelbin ve Antikanser Etkisi 34
3 DENEYSEL SÜREÇLER 38
3.1 Kullanılan Kimyasallar 38
3.2 Kullanılan Cihazlar 41
3.3 Kullanılan Analiz Yöntemleri 42
3.3.1 Morfolojik Analizlerde Kullanılan Yöntemler 43

3.3.2 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu/ Enerji Dağılımlı X-Işın Spektroskobi Analizi (FE-SEM/EDX) 44
3.3.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FT-IR) . 45
3.3.4 X-ışın Kırınım Analizi (XRD) 46
3.3.5 Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analizi (TG/DTA) 46
3.3.6 Zeta Sizer Analizi 46
3.3.7 Titreşimli Numune Manyetometre Analizi 47
3.3.8 Ultraviyole Görünür Spektrofotometre Analizi (UV-vis) 47
3.3.9 Fototermal Etkinlik Analizi 48
3.3.10 İstatiksel Analiz 48

4 Fe_3O_4 NANOPARTİKÜLLEİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 49

4.1 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentezlenmesinde Yapılan Ön Çalışmalar 50
4.2 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentezlenmesinde Yapılan Ön Çalışma Sonuçların İncelenmesi 52
4.3 Nanopartiküllerin Solvotermal Yöntem ile Sentezlenmesi 56
4.4 Solvotermal Yöntemde Sıcaklık - Süre Etkisinin İncelenmesi 58
4.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları 60
4.4.2 Taramalı Geçiş Elektron Mikroskobu Analiz Sonuçları 65
4.4.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analiz Sonuçları 67
4.4.4 X-ışını Kırınım Analiz (XRD) Sonuçları 79
4.4.5 Solvotermal Sentez Yönteminde Üre, Sodyum Sitrat, PVP'in Nanopartikül Üretiminde Etkisi ve Sonuçları 90

5 Fe_3O_4 NANOPARTİÜKÜLLERİN YÜZEY MODİFİKASYONU VE SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ 97

5.1 Polidopamin Enkapsülasyonu, Karakterizasyonu ve Sonuçları 97
5.1.1 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) Analizi ve Sonuçları 100
5.1.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analiz Sonuçları 105
5.2 SH-PEG (Tiyol-Polietilen Glikol) ile Yüzey İşlevselleştirilmesi, Karakterizasyonu ve Sonuçları 107
5.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları 108
5.3 Vinorelbin İlacının Nanoyapıya Yüklenmesi, Karakterizasyonu ve Sonuçları 108
5.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları 110

5.3.2 Vinorelbin İlacına ait Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması . 111
5.3.3 İlaç Yükleme Verimliliğin Hesaplanması 107
5.3.4 Titreşimli Numune Manyetometre Analiz (VSM) Sonuçları .. 107
5.3.5 Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTA) Sonuçları 107

6 FOTOTERMAL ETKİNLİK, İLAÇ SALIM, BİYOUYUMLULUK, ANTİKANSER ÇALIŞMALARI VE SONUÇLARI 124

6.1 Fototermal Etkinlik ile Stabilite Çalışması ve Sonuçları 124
6.2 İlaç Salım Çalışmaları 129
6.2.1 İlaç Salım Çalışması ve Sonuçları 129
6.2.2 Fototermal Etkiye Duyarlı Vinorelbin İlaç Salım Çalışması ve Sonuçları 129
6.3 İlaç Salımlarının Kinetik Model Çalışması 137
6.3.1 Sıfırıncı Derece Kinetik Model Sonuçları 137
6.3.2 Birinci Derece Kinetik Model Sonuçları 137
6.3.3 Hixson Crowell Kinetik Model Sonuçları 137
6.3.4 Hiquchi Kinetik Model Sonuçları 137
6.4 Biyouyumluluk Çalışması 157
6.4.1 Hücre Stoğunun Oluşturulması 157
6.4.2 Sitotoksisite Çalışması ve Sonuçları 157
6.5 Antikanser Etkinlik Çalışması ve Sonuçları 157
6.5.1 Fototermal Etkiye Duyarlı Antikanser Etkinlik Çalışması ve Sonuçların Değerlendirilmesi 157

7 SONUÇ 167

7.1 Gelecek Çalışmalar ve Öneriler 182

KAYNAKÇA 184

EKLER 205

A. Zeta Sizer Cihazından Elde Edilen Veri Dataları 205
B. XRD Kristal Spektrumuna Ait Cihaz Dataları 210

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR 215

SİMGE LİSTESİ

X	Büyütme
dk	Dakika
°	Derece
rpm	Dakikadaki devir sayısı
g	Gram
kV	Kilovolt
MeV	Mega Elektrovolt
m	Metre
ml	Mililitre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mm	Milimetre
ms	Milisaniye
Mw	Molekül Ağırlığı
mol	Mol
M	Molar
nm	Nanometre
sa	Saat
s	Saniye
C	Santigrat
cm	Santimetre
T	Sıcaklık
Count	Sayım
%	Yüzde
W	Watt

KISALTMA LİSTESİ

DTA	Diferansiyel Termal Analiz
DTG	Diferansiyel Termal Gravimetri
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
FE-SEM	Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu
Fe_3O_4	Demir oksit
FDA	Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi
FT-IR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi
NP	Nanopartikül
NIR	Yakın Kızılötesi Işınım
PBS	Fosfat Tuzlu Tampon
PDA	Polidopamin
PDA/Fe_3O_4	Polidopamin/Fe_3O_4
PVP	Polivinilpirolidon
SH-PEG	Tiyol- Polietilen Glikol
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
STEM	Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
TGA	Termogravimetrik Analiz
UV-vis	Ultraviyole ve Görünür Işık Spektroskopisi
VNB	Vinorelbin
VSM	Titreşimli Numune Manyetometresi
XRD	X-Işını Kırınım

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1 Fototermal terapinin etki mekanizması 11
Şekil 2.2 Fototermal yöntemin nanoyapı-lazer etkileşimi 14
Şekil 2.3 Fototermal terapide kullanılan nanoyapılar 15
Şekil 2.4 Fe_3O_4 nanoyapısının modifiye edilerek farklı alanlarda kullanımı 18
Şekil 2.5 Fe_3O_4 nanopartiküllerin birlikte çöktürme yöntemi ile üretilmesi 20
Şekil 2.6 Fe_3O_4 nanopartiküllerin biyosentez yöntemi ile üretilmesi 21
Şekil 2.7 Fe_3O_4 nanopartiküllerin hidrotermal sentez yöntemi ile üretilmesi..... 22
Şekil 2.8 Fe_3O_4 nanopartiküllerin mikroemülsiyon yöntemi ile üretilmesi 23
Şekil 2.9 Fe_3O_4 nanopartiküllerin sol-jel yöntem ile üretilmesi 24
Şekil 2.10 Fe_3O_4 nanopartiküllerin termal ayrışma yöntem ile üretilmesi 25
Şekil 2.11 Fe_3O_4 nanopartiküllerin solvotermal yöntemi ile üretilmesi 26
Şekil 2.12 Poliopamin'in moleküler yapısı..... 27
Şekil 2.13 Nanopartiküllerin geçirgenlik ve tutma etkisinin şematik gösterimi..... 32
Şekil 2.14 Vinorelbin molekülü..... 35
Şekil 2.15 Nanopartiküllere antikanser etkinlik kazandırmak için kullanılan modifikasyon ajanları..... 37
Şekil 3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) cihazına ait görüntü 47
Şekil 3.2 UV-vis cihazına ait görüntü..... 51
Şekil 4.1 Solvotermal ve hidrotermal yöntem; Farklı demir tuzları ile sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait deneysel görüntü 53
Şekil 4.2 Hidrotermal ve solvotermal yöntemle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin kurutma sonrası görüntüsü..... 53
Şekil 4.3 Hidrotermal ve solvotermal yöntem sonrası numune kaplarında depolanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin görüntüsü 53
Şekil 4.4 Solvotermal yöntem ile sentezlenen Fe_3O_4NPlerin üretim aşamaları 56
Şekil 4.5 Sentez reaktörü ve parçaları..... 57
Şekil 4.6 Fe_3O_4NPlerin manyetik etki ile ayrılması: a)Mıknatıslanma öncesi ve b) Mıknatıs yardımıyla manyetik nanopartiküllerin ayrılması..... 58
Şekil 4.7 Solvotermal yöntemle Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentez aşamaları 59
Şekil 4.8 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri a) 20.000X ve b) 50.000X..... 60
Şekil 4.9 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri a-b) 50.000X..... 61

Şekil 4.10 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X 61

Şekil 4.11 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X 62

Şekil 4.12 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X 62

Şekil 4.13 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X 63

Şekil 4.14 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X 63

Şekil 4.15 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri : a) 20.000X ve b) 50.000X 64

Şekil 4.16 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000 X ve b) 50.000X 64

Şekil 4.17 Ticari Fe_3O_4 (20 nm) numunesine ait SEM görüntüleri a) 20.000X ve b) 50.000X 65

Şekil 4.18 Sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait STEM görüntüleri: a) 200.000X, b) 400.000X, c) 800.000X ve d) STEM analizine göre ortalama boyut... 66

Şekil 4.19 Ticari Fe_3O_4 numunesine ait STEM görüntüleri a) 30.000 X, b) 240.000 X, c) 500.000 X, d) STEM analizine göre ortalama boyut 67

Şekil 4.20 160°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 68

Şekil 4.21 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 68

Şekil 4.22 160°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 69

Şekil 4.23 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 70

Şekil 4.24 160°C ve 15 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 70

Şekil 4.25 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 71

Şekil 4.26 180°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 72

Şekil 4.27 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 72

Şekil 4.28 180°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 73

Şekil 4.29 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 74

Şekil 4.30 180°C ve 15 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 74

Şekil 4.31 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 75

Şekil 4.32 200°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 76

Şekil 4.33 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 76

Şekil 4.34 200°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 77

Şekil 4.35 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 78

Şekil 4.36 200°C ve 15 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 78

Şekil 4.37 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu 79

Şekil 4.38 Ticari olarak temin edilen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 80

Şekil 4.39 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 81

Şekil 4.40 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 82

Şekil 4.41 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 82

Şekil 4.42 160°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumları 83

Şekil 4.43 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 83

Şekil 4.44 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 84

Şekil 4.45 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 85

Şekil 4.46 180°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumları 85

Şekil 4.47 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 86

Şekil 4.48 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 87

Şekil 4.49 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu 87

Şekil 4.50 200°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumları 88

Şekil 4.51 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 10.000X, b) 500.00X, c- d)100.000X 90

Şekil 4.52 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında sodyum sitrat ilavesi yapılarak sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 10.000X, b) 500.000X, c- d) 100.000X.....92

Şekil 4.53 Sitrat etkisi ile nanoküme oluşum aşamaları 93

Şekil 4.54 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında PVP ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 1.000X, b) 100.000X, c) 50.000X, d) 100.000X.....94

Şekil 4.55 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre + PVP ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a-b-c) 50.000X ve b)100.000X 95

Şekil 4.56 Nanokümelerin oluşum mekanizması.....96

Şekil 5.1 Nanopartiküllerin PDA ile kaplanmasına ait deneysel çalışma görseli.100

Şekil 5.2 (1:1) PDA/Fe_3O_4NP numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları: a) 25.000X, b) 100.000X c) 250.000X, d) FE-SEM analizi ortalama boyut 101

Şekil 5.3 (2:1) PDA/Fe_3O_4 numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları: a) 100.000X, b) 250.000X, c) 500.000 X, d) FE-SEM analizi ortalama boyut 102

Şekil 5.4 (4:1) PDA/Fe_3O_4 numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları: a) 100.000X, b) 250.000X, c) 500.000X, d) FE-SEM analizi ortalama boyut 103

Şekil 5.5 Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait EDX analiz sonucu 104

Şekil 5.6 PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait EDX analiz sonucu 105

Şekil 5.7 Dopamin hidroklorüre ait FT-IR spektrumu.....106

Şekil 5.8 (1:1), (2:1), (4:1) oranlarında PDA/Fe_3O_4NP içeren nanoyapıların karşılaştırmalı FT-IR spektrumları.....107

Şekil 5.9 PEGilasyon işlemi uygulanan PDA/Fe_3O_4 NPlere ait FT-IR spektrumu 108

Şekil 5.10 Vinorelbin ilacına ait görüntü 109

Şekil 5.11 Vinorelbin ilacının kimyasal yapısı 110

Şekil 5.12 VNB yüklü PEG/PDA/Fe_3O_4 NPlerin FT-IR spekturumu 111

Şekil 5.13 Vinorelbin ilacına ait absorbans-konsantrasyon (kalibrasyon) eğrisi...112

Şekil 5.14 Fe_3O_4 NPye ait VSM analiz grafiği 114

Şekil 5.15 PDA/Fe_3O_4 NPye ait VSM analiz grafiği 115

Şekil 5.16 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPye ait VSM analiz grafiği.....116

Şekil 5.17 VSM analiz sonuçlarının karşılaştırılması.....117

Şekil 5.18 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve (1:1), (2:1) ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4 NP karşılaştırmalı TGA analiz grafiği 119

Şekil 5.19 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve ilaç yüklü nanoyapıların karşılaştırmalı Diferansiyel Termal Gravimetri (DTG) grafiği 122

Şekil 5.20 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve ilaç yüklü nanoyapıların karşılaştırmalı DTA analizi 123

Şekil 6.1 Fototermal etkinlik çalışmasına ait deneysel düzenek 125

Şekil 6.2 Fototermal etkinlik analizi (lazer-nanoyapı etkileşimleri) 126

Şekil 6.3 Fototermal etkinlik çalışmasına ait sonuçlar: Lazer ile 3 ve 5 dakika ışınlama sonrasında oluşan ısınma verimliliği; a-b) Fe_3O_4 NPleri ve c-d) PDA/Fe_3O_4 NPleri 126

Şekil 6.4 Fototermal etkinlik çalışmasına ait sonuçlar: VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin a) 1:1 b) 2:1 c) 4:1 PDA oranlarında 3 dakika ısıtma sonuçları d) 1:1 e) 2:1 f) 4:1 oranlarında 5 dakika ısıtma sonuçları 127

Şekil 6.5 808 nm (1 W/cm²) dalga boyundaki lazer ışını ile 4 döngü boyunca tekrarlanan fototermal stabilite çalışmasına ait grafik 128

Şekil 6.6 İlaç salım çalışması: a) Çalkalamalı inkübatörde ilaç salım çalışması, b) Belirlenen sürelerde salım ortamından alınan numuneler, c) UV-vis spektrofotometre ile absorbans ölçümü 130

Şekil 6.7 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan ilaç salım sonucuna ait grafik 131

Şekil 6.8 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan ilaç salım sonucuna ait grafik 132

Şekil 6.9 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan ilaç salım sonucuna ait grafik 135

Şekil 6.10 VNB/PDA/Fe_3O_4NP pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan ilaç salım sonucuna ait karşılaştırmalı grafik 136

Şekil 6.11 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan fototermal duyarlı ilaç salım sonuçları 139

Şekil 6.12 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının pH: 5.5 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 141

Şekil 6.13 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının pH: 5.5 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 142

Şekil 6.14 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 142

Şekil 6.15 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 143

Şekil 6.16 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 144

Şekil 6.17 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında sıfırıncı dereceden kinetik modeline ait grafik 144

Şekil 6.18 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 146

Şekil 6.19 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 146

Şekil 6.20 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 147

Şekil 6.21 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 148

Şekil 6.22 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 148

Şekil 6.23 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında birinci dereceden kinetik model ine ait grafik 149

Şekil 6.24 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 150

Şekil 6.25 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 151

Şekil 6.26 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 151

Şekil 6.27 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 152

Şekil 6.28 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 152

Şekil 6.29 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik 152

Şekil 6.30 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 153

Şekil 6.31 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 153

Şekil 6.32 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının, pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 154

Şekil 6.33 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 155

Şekil 6.34 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 155

Şekil 6.35 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının, pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik 156

Şekil 6.36 Biyouyumluluk çalışması: a) L929 hücrelerine ait mikroskobi görüntüsü 10.000X ve b) XTT uygulanan hücre pleytine ait görüntü 159

Şekil 6.37 L929 hücre hattında yapılan XTT analiz sonucuna ait grafik (% hücre canlılığı) 160

Şekil 6.38 Antikanser etkinlik çalışması: a) 25T flaska ekilmiş olan MCF-7 hücrelerine ait görüntü ve b) MCF-7 hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (10.000X) 161

Şekil 6.39 MCF-7 hücre hattında yapılan XTT analizin sonucuna ait grafik(% hücre canlılığı) 162

Şekil 6.40 MCF-7 hücre hattında yapılan Fe_3O_4NPlerin antikanser ve fototermal etkinlik karşılaştırmalı % hücre canlılık sonucu 163

Şekil 6.41 MCF-7 hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan VNB ilacının karşılaştırmalı fototermal etkinlik sonucu (% hücre canlılığı) 164

Şekil 6.42 MCF-7 hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan VNB/PDA/Fe_3O_4NP yapıların karşılaştırmalı fototermal etkinlik sonucu (% hücre canlılığı) 165

Şekil 6.43 MCF-7 hücrelerine ait mikroskobik görüntü (20.000X); a) VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin hücreler tarafından içselleştirilmesi, b) Hücrelerde görülen sitotoksik etki 167

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1 Fe_3O_4 nanopartikül üretim yöntemlerinin karşılaştırılması 20

Tablo 2.2 Antikanser ilaçlarının sınıflandırılması ve klinikte kullanımı 36

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar 43

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar 44

Tablo 4.1 Hidrotermal ve solvotermal sentez yöntemlerine ait deneysel parametreler 52

Tablo 4.2 Zeta Sizer boyut analiz sonuçları 54

Tablo 4.3 Solvotermal sentez yöntemiyle gerçekleştirilmiş ön çalışma sonuçlarına ait veriler 55

Tablo 4.4 SEM analizinde kullanılan Fe_3O_4NPlerin sentez parametreleri 60

Tablo 4.5 XRD kristalit boyut analiz sonuçları 89

Tablo 4.6 Sentezlenen Fe_3O_4NPlerin XRD kristal boyut analiz sonuçları 89

Tablo 5.1 Farklı oranlarda PDA kaplanmış Fe_3O_4NP yapıların numune kodları . 99

Tablo 5.2 İlaç yükleme verimliliği (%) 113

Tablo 5.3 VSM analiz verileri 113

Tablo 5.4 Literatür çalışmalarından elde edilen VSM analiz verileri 120

Tablo 6.1 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri 131

Tablo 6.2 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1 pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri 132

Tablo 6.3 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri 133

Tablo 6.4 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri 135

Tablo 6.5 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında fototermal duyarlı ilaç salım sonuçlarının % değerleri 136

Tablo 6.6 Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerine ait R^2 değerleri 157

ÖZET

Manyetik Nanopartikül İçeren Fototermal Tedaviye Uygun Tümör Spesifik Özellikte Biyomalzeme Geliştirilmesi

Zeynep ÖZCAN

Metalurji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı

Üretim Programı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan bir hastalık olup, günümüzde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerle tedavi edilmektedir. Ancak bu yöntemler terapötik faydalar sağlarken, ciddi yan etkiler gösterirler. Bu nedenle, daha az yan etkiye sahip kanser tedavi yöntemlerine ihtiyaç bulunmaktadır.

Son yıllarda nanoteknoloji temelli ilaçların geliştirilmesi umut verici alternatif bir tedavi yaklaşımı olmuştur. Bu yaklaşımlardan biri olan fototermal terapi yöntemi, kızılötesi lazer ışınımıyla etkileşime giren nanoyapıların ürettiği ısı ile ilaç salımını indükleyerek tümör hücrelerine zarar verir ve böylece geleneksel tedavilere göre daha az yan etki göstererek hızlı iyileşme avantajı sunar.

Tez çalışması; Vinorelbin (VNB) yüklü, polidopamin (PDA) kaplı, PEGilasyon uygulanan demir oksit nanopartiküllerin (NPlerin) sentezlenmesi ve karakterize

edilmesi ve ilaç salım, antikanser, fototermal etkinliğinin incelenmesini amaçlamaktadır.

Solvotermal yöntemle sentezlenen Fe_3O_4NPlerin üzerine biyouyumlu ve fototermal dönüşüm verimliliğine sahip olan PDA polimeri kaplanmış, sonrasında PEGilasyon işlemi uygulanmış ve VNB ilacı yüklenmiştir. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin küresel şekilli, 18 nm ortalama boyutunda ve 67,72 emu/g manyetik doygunluk değerinde olduğu belirlenmiştir.

Farklı PDA oranlarına sahip NPlerin ilaç salımları pH 5.5 ve pH 7.4'te incelenmiş, (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB yüklü yapılarının, pH:5.5'te en yüksek oranda (%99) kümülatif ilaç salımı gösterdiği belirlenmiştir. Nanoyapı lazer etkileşimin ilaç salımına olan etkisi, aynı pH koşullarında 15-300 dakika aralığında incelenmiş ve en yüksek salımın (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB yüklü numunenin oluştuğu belirlenmiştir. (1:1) ve (2:1) oranına sahip VNB yüklü PDA/Fe_3O_4 numunelerinin salım profillerinin, Birinci Derece ve Hixson Crowell kinetik modelleri ile uyumlu olduğu bulunmuştur.

Fototermal etkinlik çalışma sonuçları; 5 dakika boyunca lazer ışınlanmasından sonra Fe_3O_4NPlerin ve PDA/Fe_3O_4NPlerin sıcaklığının sırasıyla 37.6°C ve 47.6°C'ye ulaştığı tespit edilmiştir. Tüm NPler L929 fibroblast hücre ortamında %95 oranında hücre canlılığı göstermişlerdir. MCF-7 hücre ortamında lazer uygulanmayan VNB/PDA/Fe_3O_4NPler %83, lazer uygulanan VNB/PDA/Fe_3O_4 NPler ise %41 oranında hücre canlılığı göstermiştir.

Sonuç olarak; tümör bölgesine spesifik özellikte kemoterapi sağlayan yenilikçi ve çok fonksiyonlu nanoyapı geliştirilmiş ve fototermal kanser tedavisinde kullanımın umut vaat edeceği değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fototermal, manyetit (Fe_3O_4) nanopartikül, polidopamin, Vinorelbin, ilaç salımı

ABSTRACT

Development of Tumor-Specific Biomaterials Suitable for Photothermal Therapy Containing Magnetic Nanoparticles

Zeynep ÖZCAN

Department of Metallurgy And Materıals Engıneerıng

Doctor of Philosophy Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Afife Binnaz HAZAR YORUÇ

Chemotherapy, radiation, and surgery treatments are all used to treat cancer, which is defined as the uncontrolled development of abnormal cells. However, despite the therapeutic benefits of these treatment modalities, they are also associated with many serious side effects. Therefore, there is a need for cancer treatment methods with fewer side effects.

In recent years, the development of nanotechnology-based drugs has become a promising approach to alternative treatments. Photothermal therapy, one of these approaches, damages tumor cells by inducing drug release with the heat produced by nanostructures interacting with infrared laser radiation, thus offering the advantage of rapid recovery with fewer side effects than traditional treatment.

The thesis study aims to synthesize and characterize Vinorelbine loaded, Polydopamine (PDA) coated, PEGylated iron oxide nanoparticles and then examine their drug release, anticancer and photothermal activities.

PDA polymer, which is biocompatible and has photothermal conversion efficiency, was coated on Fe_3O_4 NPs synthesized by the solvothermal method, then PEGylation was applied and Vinorelbine drug was loaded. The Fe_3O_4 nanoparticles are spherical in shape and have an average size of 18 nm, and the Ms value was measured as 67.72 emu/g.

Drug releases of NPs with different PDA ratios were examined at pH 5.5 and pH 7.4, and it was determined that the VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) structures showed the highest cumulative drug release rate (99%) at pH: 5.5. The effect of nanostructure laser interaction on drug release was examined under the same pH conditions in the range of 15-300 minutes, and it was determined that the highest release occurred in the VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) sample. The release profiles of VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) and (2:1) samples were found to be consistent with First Order and Hixson Crowell kinetic models.

Photothermal efficiency study results; It showed that after laser irradiation for 5 minutes, the temperature of Fe_3O_4NPs and PDA/Fe_3O_4NPs reached 37.6°C and 47.6°C, respectively. All NPs showed 95% cell viability in L929 fibroblast cell medium. In MCF-7 cell environment, VNB/PDA/Fe_3O_4NPs without laser application showed a cell viability of 83%, and VNB/PDA/Fe_3O_4NPs applied laser showed a cell viability of 41%.

In conclusion; an innovative and multifunctional nanostructure that provides tumor site-specific chemotherapy has been developed and it has been evaluated that its use in photothermal cancer treatment will be promising.

Keywords: Photothermal, magnetite (Fe_3O_4) nanoparticle, polydopamine, Vinorelbine, drug release

1
GİRİŞ

1.1 Literatür Özeti

Kanser, vücudun çeşitli bölgelerine yayılabilen, anormal hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize edilen yaygın ve ciddi bir hastalıktır [1].

Mevcut kanser tedavileri olan radyoterapi, kemoterapi, immünoterapi ve cerrahi yöntemler klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır [2]. Bu yöntemler terapötik faydalar sağlarken, aynı zamanda sağlıklı hücreler üzerinde sitotoksik etki göstermesi bağışıklık sistemini tahrip ederek kanser gelişimini arttırmasının yanı sıra, bireyin diğer hastalıklara karşı daha hassas olmasına neden olmaktadır [3]. Uygulanan yöntemlerden kaynaklanan riskler; sağlıklı doku, organ ve hücrelerde bir çok soruna yol açmaktadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve daha iyi kanser terapötik etkinliği elde edilmesi için belirtilen tedavi yöntemlerine alternatif çok fonksiyonlu, kontrollü veya akıllı ilaç verme sistemlerinin tasarlanmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Bu ihtiyaç doğrultusunda işlevselleştirilmiş, tümör hücresine hedefli, sağlıklı dokuya zarar vermeyen ve pasif hedefleme yeteneğine sahip çok fonksiyonlu kanser tedavisi sağlayan nano biyomalzemelerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır [4]. Son yıllarda kanser tedavilerinde nanoteknoloji tabanlı ilaç geliştirme, alternatif tedavi yöntemi olarak umut vaat etmektedir. Bu kapsamda çeşitli polimerlerin hedeflenebilir ilaç taşıyıcıları olarak kullanılması, antikanser ilaçların verimliliğini ve farmakokinetik özelliklerini arttırırken, yüksek dozaja bağlı yan etkilerini ise azaltmaktadır [5]. Ayrıca, kanser ve tümör tedavisinde kullanılan nanoyapıların geniş yüzey ve hacim oranları sayesinde pasif hedeflemesi (EPR: Enhanced Permeability Retention) sağlanarak kemoterapik ilaçların etkinliği arttırılmaktadır [5], [6]. Ek olarak kontrollü ilaç salımı, hedefe yönelik ilaç dağıtımı ve geliştirilmiş stabilite gibi çeşitli avantajlar sunar [7]. Üstelik nano ilaç dağıtım sistemi, katı tümörlerin geçirgenliğini ve tutma etkisini arttırarak hedeflenen hücrelere spesifik uygulama sağlamasından dolayı kanser tedavisi için büyük umut vaat etmektedir. Bu kapsamda literatürde silika bazlı konjugatlar, inorganik polimerler, seramik

nanomalzemeler, demir oksit ve soy metal (Au vb.) nanopartikülleri gibi çeşitli nanoyapılar kullanılmaktadır [8].

Kullanılan nanoyapılar arasında demir oksit (Fe_3O_4) nanopartikülleri, biyouyumluluğu ve düşük sitotoksisitesi nedeniyle özellikle kanser tanı ve tedavi alanında büyük ilgi görmektedir [9]. Ayrıca, Fe_3O_4 nanopartiküllerin boyutunun sentez yöntemleri ile ayarlanabilir olması ve klinik uygulamalarda yaygın olarak incelenmelerinden dolayı bu nanoyapılar büyük bir öneme sahiptir. Fe_3O_4 nanoyapıları çeşitli alanlarda kullanılabilmektedir [10]. Özellikle tümör ve kanserin erken teşhis ve tedavisinde, manyetik rezonans görüntülemede (MRI: Magnetic Resonance Imaging), kontrollü ilaç sisteminde, fototermal veya gen tedavisi gibi bir çok farklı amaçla kullanılmaktadır [11], [12].

Fe_3O_4 nanopartikülleri Bloch ve Neel'in teorileştirdiği gibi, parçacıkların mıknatıslanma döngüsünün histerezisindeki ihmal edilebilir enerji bariyeri nedeniyle süperparamanyetik davranış sergilerler [9], [13]. Bu özellikleri nedeniyle ilaç dağıtımı, teşhis ve kanser tedavisinde kullanılmaktadır [10].

Fe_3O_4 nanopartikülleri basit sentez yöntemleri ile üretilebilmesine rağmen, bu nanoyapıların en büyük dezavantajı; yüksek yüzey enerjisi ve Van der Waals kuvvetleri nedeniyle toplanma eğiliminin sonucu olarak aglomerasyon oluşturmasıdır. Fe_3O_4 nanoparçacıkları arasındaki manyetik çekim ve oksidasyondan kaynaklanan manyetizma kaybı gibi sorunlar, nanoyapıların polimerler ile işlevselleştirilmesiyle çözülebilmektedir.

Sentezlenen nanoyapıların polimerler ile kaplanması vücut içerisinde kan dolaşımının ve biyouyumluluğun arttırılmasının yanı sıra nanoyapıların tümör üzerinde birikmesini sağlayabilmektedir. Günümüzde yapılan kanser çalışmalarında yenilikçi polimerler olan polipirol, poli(4-stirensülfonat), dopamin ve polianilin gibi yapılarla oluşturulan nanoyapılar öne çıkmaktadır.

Bunlardan biri olan polidopamin, dopaminin oksidasyonu ile kolayca elde edilen bir polimerdir. Spesifik olarak, dopamin, beyinde doğal olarak oluşan tipik bir nörotransmiterdir ve oksidanlar olmadan alkali koşullar altında kendiliğinden polidopamine (PDA) polimerleşebilmektedir [14]. Polidopamin, %40'a kadar fototermal dönüşüm verimliliği, nano ölçekli boyut ve özelleştirilebilir morfoloji, biyouyumluluk gibi avantajlara sahip bir kaplama oluşturabilmektedir [15], [16].

Dopamin veya diğer katekolaminlerin son oksidasyon ürünü olan PDA, ayarlanabilir kalınlıkta çok yönlü kaplamalar hazırlanmasında kullanılmaktadır. PDA katmanları nükleofilik gruplar taşıyan moleküllerle veya metalik katyonlar içeren çözeltilerden elde edilen metalik nanopartiküller ile modifiye edilebilmektedir.

PDA güçlü fizikokimyasal özelliklere sahip, yüksek biyouyumlu ve ilaç yükleme yöntemleri ile modifiye edilebilmesi nedeniyle, ilaç verme ve görüntüleme sistemlerinde, kemoterapi ile diğer tedavilerin kombinasyonunda, fototermal terapi, fotoakustik görüntüleme, MRI ve tümör hedefli ilaç verme sisteminde ilaç taşıyıcısı olarak kullanılmaktadır [15], [16].

Nanoyapıların kullanıldığı bir tedavi olan fototermal terapi (PTT: Photothermal Therapy), NIR (Near Infrared Radiation) lazer ışınımı altında nanoyapıların ürettiği ısı ile ilaç salımını indükler veya tümör hücrelerine oluşan sıcaklık ile zarar verir [17], [18]. Geleneksel tedavilerle karşılaştırıldığında fototermal tedavi, ilaç salımının artmasına olanak tanıyan ve sağlıklı dokulara daha az sitotoksik etki göstererek hızlı iyileşme avantajı sunan minimal invaziv bir tekniktir [19].

Fototermal tedavide kullanılmak üzere karbon, metal ve organik bazlı nanokompozitler dahil olmak üzere bir çok nanoyapı geliştirilmiştir [20]. Bu nanoyapılardan biri olan süperparamanyetik özelliğe ve ısıtma potansiyeline sahip Fe_3O_4 nanopartikülleri son yıllarda özellikle fototermal terapi araştırmalarında kullanılmaktadır.

Fototermal terapi çalışmalarında kullanılan bir polimer olan PDA'nın kaplama kalınlığının ayarlanabilmesi ve %40'lık bir fototermal dönüşüm oranı sergilemesi, bu polimerin NIR lazerle etkileşime giren bir fototermal ajan olarak kullanım potansiyelini gösterir [21]. Ancak ışığın saçılması ve tümör dokularındaki emilimin sınırlı olması nedeniyle katı tümörleri tek başına fototermal terapi kullanarak tamamen yok etmek zordur. Bu amaçla tümör hedeflemede çeşitli modifikasyonlar kullanılmıştır. Polietilen glikol (PEG: Polyethylene glycol) polimerinin kullanımını içeren PEGilasyon, tümör hedeflenmesini ve tutulmasını geliştirmek için yaygın olarak kullanılan bir modifikasyon yöntemidir [22], [23], [24].

Literatürde sunulan bir çalışmada, PDA nanopartiküllerine tümör hedefleme özelliği kazandırmak için PEGilasyon işlemi uygulanmıştır. Çalışma kapsamında

kontrollü ilaç dağıtımı için polidopamin (PDA) nanoparçacık ve polietilen glikol (PEG) hidrojel oluşturularak kemoterapik ve fototermal etkinlik potansiyeli araştırılmıştır. PDA nanoparçacıkları içeren hidrojel $\pi-\pi$ etkileşimi yoluyla 7-etil-10-hidroksikamptotesin (7-Ethyl-10-hydroxycamptothecin: SN38) antikanser ilacı yüklenmiştir. Yapılan ilaç salım çalışmalarında fizyolojik koşullarda minimum salım gösterdiği ve yakın kızılötesi ışığa maruz kaldığında ise salımın arttığı bildirilmiştir. *In vivo* çalışma sonuçlarında, SN38 yüklü PDA nanoparçacık PEG hidrojelinin, kombine bir kemo-fototermal terapi ile tümör büyümesini etkili bir şekilde baskılayabildiğini göstermişlerdir [25]. Özellikle, sentezlenen nanoyapının NIR ışığına maruz bırakıldığı *in vivo* deneylerde, tümör büyümesinin kemoterapötik ve fototermal tedaviler birlikte kullanılarak etkili bir şekilde gerçekleştiği gösterilmiştir [25]. Bu sonuç, PEGilasyon uygulanan PDA nanopartiküllerinin ileri kanser tedavi stratejileri için potansiyelini göstermektedir. Yapılan başka bir çalışmada Liu ve ark., amonyak dopamin molar oranını ayarlayarak, dopamin-melanin kolloidal nanoküreleri 70±2 nm boyutlarında sentezleyerek oluşturulan PDA nanoparçacıkların boyutunun kontrol edilebileceğini bildirmişlerdir. Sentezlenen nanoparçacıkların fototermal etkinliği, HeLa ve 4T1 hücreleri ile 4T1 tümörlerine sahip BALB/c farelerinde *in vivo* çalışmalar yapılarak gerçekleştirilmiştir. I*n vivo* çalışmalar sonucunda tümör azalması ve tümör baskılamasının oluştuğu rapor edilmiştir [26]. Literatürde yapılan diğer bir çalışmada, PDA ile kaplanmış olan süperparamanyetik demir oksit nanopartikül kümelerinden oluşan bir nanoyapı geliştirilmiştir [27]. Geliştirilen nanoyapının manyetik rezonans görüntüleme ve fototermal kanser tedavisinde etkinlikleri araştırılmış ve oluşturulan nanoyapının, MRI için uygun olduğu ve PDA ile enkapsüle edilmesinden dolayı NIR lazer ışınlaması altında kanser hücrelerinin ölümüne neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca harici bir manyetik alan aracılığı ile nanoyapının hücresel alımının artmasının sağlanabileceği, böylece NIR lazer altında kanser hücrelerine karşı önemli ölçüde arttırılmış spesifik fototermal verimlilik elde edilebildiği rapor edilmiştir [27].

Wu ve ark. tarafından yapılan çalışmada ise PDA ile kaplanmış, PEG ile konjuge edilmiş ve yüzeyinde indosiyanin yeşil (ICG; Indocyanine Green) boyası ile adsorbe edilen demir oksit nanoyapılar sentezlenmiştir. Nanoyapılar içinde adsorbe edilmiş boya, serbest boyadan daha yüksek bir fotostabilite ve fototermal

dönüştürme yeteneği sergilemiştir [28]. Çalışma kapsamında fototermal ajan olarak kullanılan ICG'nin PDA ile enkapsülasyonu, elektrostatik etkileşim yoluyla oluşturulmuştur. Oluşan PDA-ICG-PEG nanoyapısına DOX (Doksorubisin) ilacı π-π istifleme ve hidrofobik etkileşim yoluyla yüklenmiştir [28]. Sonuçların fototermal etkinlik gösterdiği bildirilmiştir.

Sonuç olarak PDA ile oluşturulan nanoyapıların, fototermal terapide kullanılması büyük avantajlar sağlamaktadır. Bu avantajlar; biyouyumluluk, kolay ve uygun maliyetli üretim, fototermal etkileşim ve terapötik moleküllerin yüksek verimlilikle nanoyapılara yükleme yeteneği olarak sıralanabilir.

Antikanser ilaç çalışmalarında kullanılan kemoterapik bir ilaç olan VNB yarı sentetik bir vinblastindir. VNB, anti-tümör aktivitesinde, özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır [29]. Güçlü etkiye sahip olmasından dolayı tıp alanında yaygın olarak kullanılan antineoplastik kemoterapi ilacı haline gelmiştir. Vinorelbin tartarat; sinir, solunum, gastrointestinal gibi sistemlerde doza bağlı toksisitelere sahiptir [30], [31]. VNB'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve meme kanseri tedavisinde etkinliği; lökopeni, vezikan aktivitesi, oral formda azalmış biyoyararlanımı ve toksik etkileri nedeniyle sınırlandırılmıştır. Bu sınırlamaların azaltılması ve/veya ortadan kaldırılması mevcut toksik ve yan etkileri en aza indirmek için yenilikçi nanoyapılar, kontrollü ilaç taşıyıcı sistemleri ve mikroküreler gibi çeşitli yöntemler ile araştırmaları yapmaktadırlar [30], [31], [32], [33].

Sonuç olarak; çok işlevli terapötik etkinliğin oluşturulması ve bunların tek bir nanoyapıya entegrasyonu, etkili bir kanser tedavisi için oldukça önemlidir. Kanser tedavisinde ve fototermal terapide kullanılan PDA'nın bölgesel kemoterapi uygulamasında kullanılması gelecek çalışmalar için önemlidir. Uygun boyut ve ayarlanabilir manyetik özelliklere sahip Fe_3O_4 nanopartikülleri, kontrollü ilaç salım özelliği göstermesinden dolayı umut vericidir.

1.2 Tezin Amacı

Günümüzde kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi yöntemlerinin dezavantajları hastanın yaşam kalitesini düşürmektedir. Kemoterapi ve radyoterapide uygulanan ilaçlar, vücuttaki bir çok sağlıklı doku ve hücreyi

etkilemekte, saç ve kaşların dökülmesine, mide bulantısına, enfeksiyon riskine neden olarak bir çok istenmeyen yan etkiler oluşturmaktadır. Bu nedenle yan etkisi minimum olan, sadece kanser hücrelerine veya tümör dokusuna yönelik yeni tedavi yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu ihtiyaç doğrultusunda oluşturulan tez çalışmasında; sağlıklı doku ve hücrelerin, kemoterapi ilaçlarının oluşturduğu zararlı etkilerden korunmasının sağlanması için tümörlü dokuya spesifik özellikte tedavinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Böylece sadece tümörlü bölgeye kemoterapi ilaç etkinliği sağlanarak ve fototermal terapi ile herhangi bir cerrahi operasyon riskli barındırmayan uygulamanın sağlanması gerçekleştirilerek tümör dokusunun vücut içerisinde elimine edilmesi hedeflenmiştir.

Tez çalışmasının temel amacı; tümörlü dokuların tedavisinde kullanıma uygun, ek cerrahi işlem gerekliliğini minimize eden, biyouyumlu olan tümör bölgesine kemoterapik ilaç uygulamasının gerçekleştirilmesine yönelik fotonik özellikte manyetik nanoyapıların geliştirilmesi ve etkinliğinin incelenmesidir. Tümörlü bölgeye spesifik özellikte geliştirilen nanoyapının, NIR lazer etkileşimi ile fototermal ablasyonu sağlanarak sağlıklı hücre ve dokuların zarar görmesinin önlenmesi hedeflenmektedir.

Bu kapsamda yapılacak çalışmalar ile klinik uygulamalarda kullanıma elverişli tedavi yönteminin araştırılması ve geliştirilmesi sağlanarak, kanser tedavisinde kullanılan geleneksel yöntemlere alternatif bir tedavi yönteminin temel adımlarının atılması hedeflenmiştir. Fototermal terapide kemoterapik ilaç uygulaması bölgesel olarak uygulanacağından, kemoterapi tedavisinin yan etkilerin minimize edilmesi de sağlanmış olacaktır.

Belirtilen amaçlar doğrultusunda tez çalışması kapsamında aşağıdaki sunulan adımlar hedeflenmiştir:

1. Fototermal terapi; tümör hücrelerinin sıcaklığının 42-45°C sıcaklık aralığına ulaşılması sonucunda kanser hücrelerinin ölüm mekanizmasını içerir. Bu doğrultuda lazer ile etkileşeme girecek olan lokalize yüzey rezonansına sahip manyetik nanoyapının sentezlenmesi ve fototermal tedavi yönteminde kullanılmak üzere yeni fonksiyonel nanoyapıların sentez koşullarının optimize edilmesi.

2. Nanoyapıların üretiminde solvotermal ve hidrotermal yöntemler kullanılarak sentez koşullarının nanoyapıların boyutuna ve morfolojisine olan etkisinin araştırılması ve optimum parametrelerin belirlenmesi.
3. Nanoyapıda oluşturulması planlanan özellikler; biyouyumluluk, uygun boyut (<100 nm) ve canlı sistemlerde düşük sitotoksisite.
4. 750-1000 nm dalga boylarındaki NIR ışığı, görünür spektrumdaki ışıktan çok daha fazla doku penetrasyon derinliği sağladığı için, bu aralıkta oluşturulan nanoyapının fotonik özellik göstermesi ve minimum sürede istenilen (42-45°C) sıcaklığa ulaşılması ve karakterize edilmesi.
5. Sentezlenen nanoyapının polidopamin ile kaplanarak biyouyumluluğunun arttırılması, aglomerasyonun önlenmesi ve karakterize edilmesi.
6. Yüzey işlevselleştirilmesi için PEGilasyon işleminin uygulanması ve karakterize edilmesi.
7. Güçlü bir antikanser ilacı olan Vinorelbin'in sentezlenen nanoyapıya yüklenmesi ve karakterize edilmesi.
8. Nanoyapıya yüklenen antikanser ilacının yüklenme kapasitesinin, *in vitro* salım testi ile farklı pH'larda incelenmesi ve farklı polimer oranlarının ilaç salımına olan etkisinin belirlenmesi.
9. *In vitro* ilaç salımına ait lazer-nanoyapı etkileşiminin incelenmesi.
10. *In vitro* ilaç salım sonuçlarının Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerine uyumunun ve ilaçların çözünüm profillerinin tanımlanarak belirlenmesi.
11. Sentezlenen nanoyapıların biyouyumluluğun incelenmesi.
12. Elde edilecek nanoyapının antikanser özelliklerinin ve lazer-nanoyapı etkileşiminin hücre ortamında belirlenmesi.

1.3 Hipotez

Kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılan kemoterapi yönteminde, bir veya birden fazla antikanser ilacı birlikte kullanılmaktadır. Bu nedenle tedavi esnasında antikanser ilaçlarının terapötik potansiyelinin yanında sitotoksik etkileri de oluşmaktadır. Bu yan etkileri azaltmak ve terapötik etkinlik verimliliğini arttırmak için son yıllarda nanoteknoloji esaslı, bölgesel hedefli ve kontrollü ilaç verme sistemlerinin geliştirilmesine önem verilmektedir.

Fototermal terapi; NIR esaslı lazer kaynağından belirli dalga boyunda çıkan ışın fotonlarının nanoyapı bünyesinde ısıya dönüştürülmesine dayanan invaziv olmayan bir yöntemdir. Yakın kızılötesi lazer dalga boylarında ısınma potansiyeli gösteren altın, karbon, yarı iletkenler gibi çeşitli nanoyapılar bulunmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalar, bu nanoyapıların yüksek ısınma potansiyeli gösterdiğini ancak toksik etki oluşturma potansiyelleri nedeniyle sınırlı kullanımları olduğunu belirtmektedir. Fototermal tedavide kullanılan mevcut nanoyapıların çoğu, biyolojik ortamda tam olarak parçalanamayan ve uzun süre vücutta kalabilen ağır metallerden oluşan inorganik yapıdadır. Altın ve karbon gibi birçok inorganik nanoparçacıklar yüksek fotonik etki göstermelerine ve *in vivo - in vitro* çalışmalarda sıklıkla kullanılmasına rağmen bu yapıların vücut içinde birikmesi, potansiyel toksisite endişelerini ortaya çıkararak klinik düzeyde kullanılmasının önünde engel olmaktadır [34], [35], [36]. Ayrıca literatürde yapılan çalışmalarda, karbon bazlı nanomalzemelerin pulmoner inflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi birçok sitotoksik etkiye neden olabileceği bildirilmiştir [37].

Bundan dolayı biyouyumluluğu kanıtlanmış manyetik özelliğe ve yüksek ısıma etkinliğine sahip Fe_3O_4 nanoyapıları ümit verici fototermal ajanlar olarak görülmektedir. Fe_3O_4 nanoyapıları tek başlarına kullanılabildikleri gibi diğer farklı malzemelerle kombinasyon halinde de kullanılabilmektedirler. Ayrıca manyetik özellik göstermeleri, yüksek biyouyumluluk ve minimum toksisiteye sahip olmaları gibi birçok avantajları da bulunmaktadır.

Bu nedenlerle tez kapsamında, geleneksel tedavi yöntemlerine alternatif olarak fototermal tedavi yönteminde kullanılmak üzere daha az yan etkiye sahip Fe_3O_4 nanoyapıların sentezlenmesi amaçlanmıştır. Tümör tedavisinde kullanılacak olan nanoyapıların hücre içerisine alımının efektif olması için nano boyutta sentezlenmesi gerekmektedir. Bu nedenle önerilen tez kapsamında üretilecek partikül boyutlarının 100 nm altında olması hedeflenmiştir. Oluşturulacak olan nanoyapı, PDA ile enkapsüle edilecektir. PDA'nın yapısında bulunan melanin, fenolik, amin ve katekol grupları sayesinde NIR lazer ışınımı soğurma yeteneğine sahiptir. Bu özelliği sayesinde nanoyapılarda kullanımı fototermal verimliliği arttırdığı yapılan çeşitli çalışmalar tarafından gösterilmiştir [21], [38], [39], [40], [41], [42]. Literatürde elde edilen sonuçlar, PDA ile yüzey modifikasyonunun biyolojik olarak bozunmayan maddelerin biyouyumluluğunu arttırmak için iyi bir

alternatif olacağını rapor etmiştir [43]. Literatür çalışmaları, PDA'nın yüksek biyouyumluluğu ve kolay yüzey modifikasyonu sağlaması nedeniyle nanoyapıların işlevselleştirilmesinde yaygın şekilde kullanıldığını göstermektedir [44], [14]. PDA ile yüzey modifikasyon işleminin kolaylığı, kimyasal reaktiviteye sahip olmaması gibi avantajlar PDA'nın önemini ortaya koymaktadır [45]. Ayrıca PDA ile yüzey modifikasyonu, nanoyapıların yapısal stabilitesini ve fototermal performans verimliliğini yükseltmektedir [44].

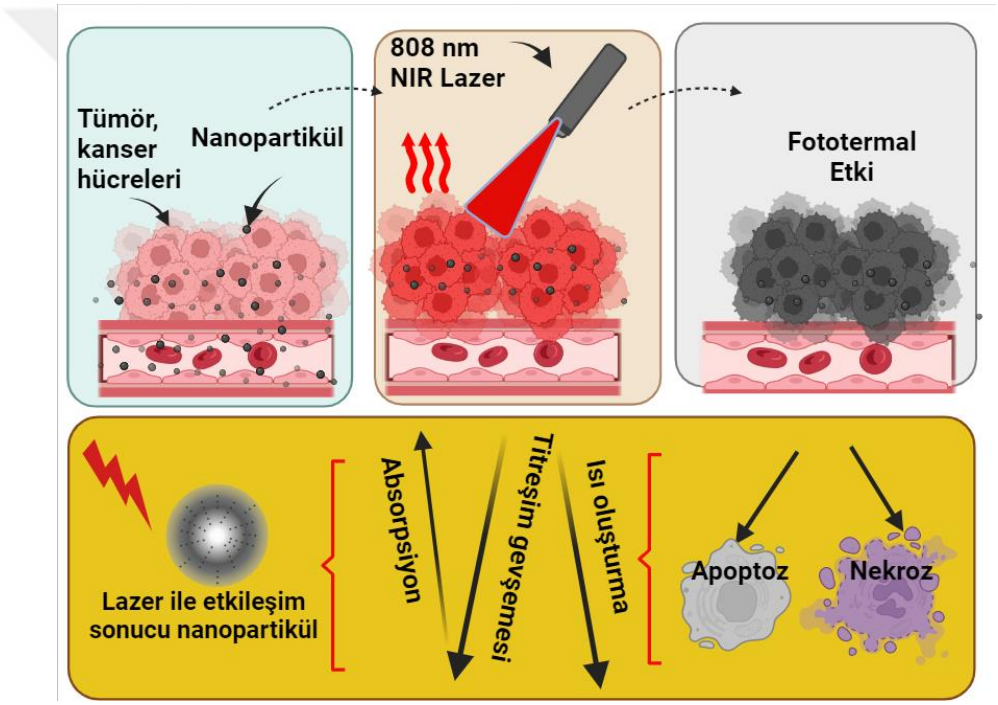
Elde edilen tüm literatür bilgileri sonucunda; PEGilasyon işlemi ile nanoyapıların işlevselleştirilmesi sayesinde, tümöre spesifik özelliğinin kazandırılması ve antikanser ilacı olan VNB nanoyapıya eklenmesi sağlanacaktır. VNB, yarı sentetik bir vinblastindir ve antitümör aktivitesinde, özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde klinik olarak kullanılmaktadır [46]. Güçlü etkiye sahip olmasından dolayı tıp alanında dünyanın en yaygın kullanılan antineoplastik kemoterapi ilacı haline gelmiştir. VNB'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve meme kanseri tedavisinde etkinliği; lökopeni, vezikan aktivitesi, oral formda azalmış biyoyararlanımı ve toksik etkileri nedeniyle sınırlandırılmıştır [30]. Vinorelbin tartarat sinir, solunum ve gastrointestinal sistemde doza bağlı toksisitelere de sahiptir.

Bu sınırlamaların azaltılması, ortadan kaldırılması, mevcut toksik ve yan etkilerin en aza indirilmesi yani klinik kullanım uyumluluğun önemli ölçüde arttırılması amacıyla kanser tedavisinde kullanılmak üzere kemoterapik ve fototermal etkinliğe sahip çok fonksiyonlu bir biyomalzeme geliştirilmesi hedeflenmiştir.

2
TEORİK BİLGİLER

2.1 Fototermal Terapi ve Özellikleri

Fototermal terapi, NIR ışını ve fototermal ajanın etkileşime girmesi sonucu oluşan ısının kanser hücrelerini apoptoza veya nekroza uğratması ile karakterize olan bir kanser tedavi yöntemidir [47]. Şekil 2.1'de sunulduğu üzere fototermal terapi, NIR lazer ışınına maruz kalan kanserli dokuda kısa süreli olarak sıcaklığın 42-45°C sıcaklığa ulaşması sonucu termal ablasyon oluşturur [48], [49].



Şekil 2.1 Fototermal terapinin etki mekanizması

Termal ablasyonda sağlıklı hücreler ile tümör hücreleri oluşan sıcaklığa karşı aynı etkiyi gösterirler. Fakat tümörlerin hipoksik ve düşük pH'lı alanlara sahip olması kanserli hücrelerinin fototermal terapiye karşı daha duyarlı olmasını sağlar [50]. Çünkü normal hücreler artan sıcaklık ile kan damar duvarlarını genişletir ve kan akış hızını arttırarak ısıyı tolere ederler fakat kanserli hücreler normal dokular gibi ısıyı tolere edemezler. Bunun sebebi, tümör dokusunun yüksek proliferasyon, gözenekli membran yapısı gibi bozulan hücre yapısına sahip olmasından kaynaklanır [51].

Bu nedenle tümör hücreleri oluşan sıcaklık ile termal ablasyona uğrarlar. Bunun sonucunda kanser hücrelerinde apoptoz veya nekroz indüklenir. Apoptozun veya nekrozun indüklenmesi sonucunda protein katlanması, hücre yapısının bozulması, hücre içi organellerin parçalanması, mitokondriyal aktivitenin ve hücre çekirdeğinin zarar görmesi gibi etkiler meydana gelir. Böylece tümör dokularında geri dönüşü olmayan hücresel hasar veya protein denatürasyonunun bozunması kanser hücrelerin elimine edilmesini sağlar [51], [52].

Fototermal terapi yönteminde kullanılan yakın kızılötesi radyasyon (NIR) lazeri tarafından belirli dalga boylarında gönderilen ışın, duyarlı yapılar ile etkileşime girer. Lazer ışın enerjisinin fototermal ajan yapıları tarafından absorbe edilmesi ile bu yapıların elektron uyarımı sağlanır ve böylece oluşan enerji, moleküler titreşime sebep olarak ısınmayı sağlar [53], [54].

Günümüzde fototermal terapi çalışmalarında bazı sınırlamalar bulunmaktadır. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için ısınma potansiyeline sahip olan 10-100 nm boyut aralığına sahip nanoyapıların kullanılması oldukça önemlidir. Çünkü bu aralığa sahip olan nanoyapılar, boyutları nedeniyle tümör hücrelerinde spesifik olarak birikme özelliği gösterirler [47], [55].

Fototermal terapide sıcaklığın oluşması için genellikle lazer ışınımından gelen ışığı absorbe ederek ısı üretebilen bakır, demir, karbon, altın, paladyum, molibden gibi nanoyapıların kullanılması büyük bir avantaj sağlamaktadır. Özellikle 10-100 nm boyuta sahip olan fototermal nanoyapılar, geçirgenlik ve tutma etkilerini (EPR) arttırarak tümörlerde bu yapıların birikmesini sağlayarak tümöre spesifik termal ablasyon gerçekleştirirler [56].

2.2 Kanser Tedavisinde Fototermal Terapinin Önemi

Kanser; 80'den fazla türü olan, vücudun farklı bölgelerine yayılma potansiyeli gösteren ve anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesiyle karakterize olan yaygın bir hastalıktır [6].

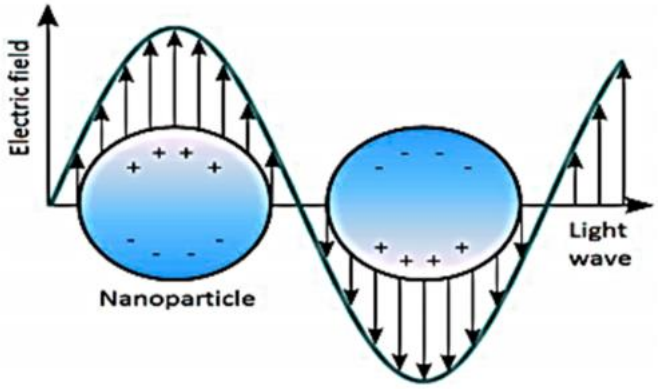
Kanserin ilerleyen yıllarda görülme sıklığının artarak 2040 yılına kadar Dünya genelinde 28 milyon vakaya ulaşılacağı tahmin edilmektedir [57], [58]. Kanserin mevcut tedavisi için tam kapsamlı bir yaklaşım yoktur. Genellikle kemoterapi, radyoterapi, immünoterapi ve cerrahi yöntemler ile kombinasyonları klinikte

yaygın olarak uygulanmaktadır. Her ne kadar bu yaklaşımlar bazı terapötik etkinlikler sağlasa da sağlıklı hücrelere olan sitotoksik etkileri ve bağışıklık sistemini tahrip edilmesinden dolayı kişinin diğer hastalıklara karşı daha hassas olmasına neden olmaktadır. Uygulanan yöntemlerden kaynaklanan riskler; sağlıklı doku, organ ve hücrelerde bir çok soruna yol açmaktadır [3], [6]. Bunun yanı sıra çeşitli kanser türlerine uygulanan cerrahi girişimler de başarısızlıkla sonuçlanmakta böylece metastaz oluşarak kanserin ilerleyişi artmaktadır [1], [59], [60].

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek ve daha iyi bir kanser tedavi etkinliğinin elde edilmesi için, belirtilen tedavi yöntemlerine alternatif çok fonksiyonlu yöntemler ya da akıllı ilaç verme sistemlerinin tasarlanması gerekmektedir [4]. Çok fonksiyonlu işlevselleştirilmiş nanoyapılar sayesinde tümör hücresine hedefli, sağlıklı dokuya zarar vermeyen ve pasif hedefleme sağlayan yöntemlerin geliştirilmesi önem kazanmaktadır [61]. Ayrıca, tümör tedavisinde kullanılan nanoyapılara, geniş yüzey ve hacim oranına sahip olmaları nedeniyle kemoterapötik ilaçlar eklenebilmekte ve nanoyapıların boyut özelliklerinden yararlanılarak pasif hedeflenmenin oluşturulması ile anti kanser ilaçların EPR etkinlikleri arttırılabilmektedir [7], [62].

Nano taşıyıcı sistemler arasında miseller, polimerik nanopartiküller, ilaç-nano konjugatları, dendrimerler, mezo-gözenekli nanopartiküller, altın nanoyapıları ve demir oksit nanopartikülleri gibi inorganik nanoteknolojik malzemeler, fototermal terapi uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadır [63], [8].

Bu nanoyapıların fototermal tedavi yönteminde başarılı kullanımı, kanser tedavisi için son derece umut vericidir. Fototermal terapi, nanoyapı-foton etkileşimi sayesinde hücresel nekroz veya apoptozu indükleyen NIR lazer enerjisine dönüştürülmesi ilkesine dayanmaktadır [64].



Şekil 2.2 Fototermal uygulamada nanoyapı-lazer etkileşimi [65]

Fototermal uygulamasında; gelen lazer ışını ile uyarılan nanopartiküllerin negatif ve pozitif geçirgenlik bölgeleri arasında rezonans Şekil 2.2'de verilmiştir. Nanoyapıların; lokalize yüzey plazmonik rezonans (LSPR: Laser Surface Plasmon Resonance) etkisi ile lazer ışın enerjisini soğurarak ısı enerjisine dönüştürmesi, fototermal tedavi yönteminin prensibini oluşturmaktadır [65], [66]. Nanoparçacıkların serbest elektronları lazer ışınlarının fotonları tarafından uyarılırlar. Foton-elektron uyarılması sonucunda, nanoyapının etrafındaki serbest elektronların titreşim enerjileri artarak elektronlar etrafında elektriksel yük bulutu oluştururlar. Bu elektriksel yük bulutu; elektrik akımın bir kısmını ısı enerjisine dönüştürür [65], [67]. Böylece nanopartiküller kendi LSPR özellikleri ile uyarılarak fototermal tedavi de kullanılan ısı oluşumunu gerçekleştirir [67].

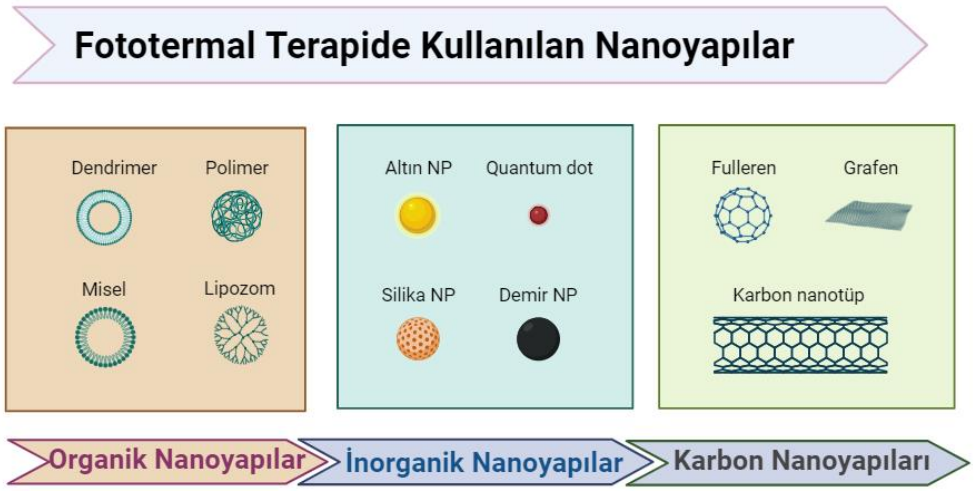
Fototermal terapide ısı oluşma verimliliği, nanopartiküllerin ışık soğurmasına bağlı olarak gerçekleşir. Nanoyapılar hedef hücrelerde birikerek seçici hücre hasarı oluşturur ve 42°C-45°C sıcaklık aralığında tümör dokusunun büyük oranda yok edilmesini sağlarlar [68]. Bu yöntemde, fotonların enerjisi ısı enerjisine dönüşerek kanser hücrelerinde membran ve çekirdek parçalanması gibi termal hasarlar oluştururlar. Bu hasarlar genelde, proteinlerin denatürasyonu veya sentez mekanizmasında bozukluklar, gen ekspresyonundaki değişikliklerin meydana gelmesi sonucunda apoptotik hücre ölümü şeklinde ortaya çıkar [65]. Bu etkileşim, dokularda ışık enerjisinin ısıya dönüşme mekanizması ile oluşmaktadır.

NIR kaynaklı fototermal ısıtma, tümörlü dokunun ablasyonunu sağlamasının yanı sıra aynı zamanda artan sıcaklık sayesinde (42-45°C) nanoyapılara yüklenen ilaçların salınmasını veya ilaç yüklü nano taşıyıcıların hücresel alımını kolaylaştırılmasını da sağlamaktadır [69]. Diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında

fototermal terapide; dalga boyunun kolayca ayarlanabilmesi, odaklanabilmesi ve uzaktan kontrol edilebilmesi sayesinde NIR lazer ışını ideal bir dış uyaran görevi yapmaktadır. Bu odaklanma ve kontrol kolaylığı, sağlıklı dokulara daha az zarar verilerek tümör bölgesine spesifik özellikte tedavi sağlamaktadır [70].

2.3 Fototermal Terapi Kullanılan Nanopartiküller

Son yıllarda fototermal terapi üzerine yapılan çalışmaların artması ile bu alanda çok sayıda farklı nanoyapı geliştirilmesine neden olmuştur. Literatürde; florofor , polimer konjugatları ve diğer organik nanomateryaller [54] dışında genellikle polimerik miseller, lipozomlar, dendrimerler, farklı özellikteki metal nanoparçacıklar [altın (Au), gümüş (Ag) ve paladyum (Pd)], yarı iletken yapılar, karbon bazlı nanomalzemeler (karbon nanotüpler ve grafenler) [71] dâhil olmak üzere, kanser tedavisi için farklı tasarımlara sahip çeşitli ilaç dağıtım sistemleri yoğun olarak araştırılmıştır (Şekil 2.3) [72], [73].



Şekil 2.3 Fototermal terapide kullanılan nanoyapılar

Yapılan çalışmalar, metalik özellikli nanoyapıların güçlü foto fiziksel özelliklere sahip olmaları nedeniyle fototermal uygulamaları için son derece uygun olduklarını göstermektedir [49], [54]. Bu nedenden dolayı metalik özellikli nanoyapılar arasında altın ve demir nanopartiküllerin kombinasyonları sıklıkla araştırılmıştır.

Altın nanoyapıları özellikle, yüksek fototermal verimlik, yüksek soğurma ve ısınma potansiyeli göstermesine rağmen biyolojik olarak parçalanamaması ve vücutta birikim göstermesi nedeniyle kullanımı sınırlandırmaktadır [74], [75].

Karbon bazlı nanoyapıların fototermal terapide kullanımı sonucunda NIR lazer ile etkileşime giren karbon nanoyapılar, kafes yapısında bulunan hibridizasyon formundan dolayı elektronların düşük yörünge durumundan daha yüksek yörüngeye doğru uyarılmasını sağlarlar. Bunun sonucunda, elektronlar tarafından emilen enerji, elektron-foton eşleşmeleri yoluyla gevşer ve emilen lazer enerjisi, tüm kafes yapısının titreşimini sağlayarak, uyarılmış elektronlar sayesinde ısı oluştururlar [76].

Literatürde; grafen oksit, karbon nanoçubuk ve farklı karbon nanoyapılarıda dâhil olmak üzere farklı çeşitlerde karbon temelli nanoyapılar bulunmaktadır [54]. Fakat altın ve karbon gibi birçok inorganik nanoparçacık esaslı materyal, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda umut vaat etmesine rağmen, uzun vadede potansiyel toksisiteler barındırmaktadır [77], [78].

Literatürde yapılan çalışmalarda, karbon bazlı nanoyapıların pulmoner inflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi birçok toksik yanıta neden olabileceği bildirilmiştir [77], [78]. Bundan dolayı biyouyumluluğu yüksek olan NIR dalga boyları ile etkileşim sağlayabilen ve ısınma potansiyeli gösterebilen demir oksit nanoyapıların tümör tedavisinde fototermal ajan olarak kullanılması iyi bir alternatiftir.

Fototermal terapide kullanılan nanoyapılar ile NIR dalga boylarının primer dokudaki emicileri su, hemoglobin, oksihemoglobin ve melanin yapılarıdır. Bu bileşenlerin absorpsiyonu, dokuyu fototermal doku hasarına götürür [79]. Bu aşamada önem kazanan husus; 750-1000 nm aralıktaki NIR dalga boyu ile etkileşime girebilecek özellikte olan nanoyapının kullanılmasıdır. Bundan dolayı tümörlü doku içerisinde ışığı emen nanoyapıların kullanılması gerekmektedir.

Bunların yanı sıra tümöre yönelik fototermal terapide kullanılması için ideal bir nanoyapının sahip olması gereken özellikler; nanoyapının 100 nm boyutunun altında olması, sulu çözeltilerde iyi çözünebilirlik özelliği göstermesi, fototermal verimlilik sağlaması, 750-1000 nm NIR dalga boylarında ışığa tepki vermesi ve sitotoksisitesinin minimum olmasıdır.

2.4 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Fototermal Terapideki Rolü

Demir oksit nanopartikülleri, genellikle maghemit (γ-Fe_2O_3) veya manyetit (Fe_3O_4) bileşimlerinden oluşan yapılardır. İnsan vücudunda kalp, dalak ve karaciğer gibi organlarda doğal olarak demir yapıları bulunmaktadır. Demir oksit nanoyapıları yüksek biyouyumluluk sergilemektedir. Ayrıca, Amerika Gıda ve İlaç İdaresi (FDA: Food and Drug Administration) tarafından manyetik nanopartikül içeren Feridex klinik kullanımı onaylanmıştır [61].

Demir oksit nanoparçacıkları, boyutları 2 ile 20 nm boyut arasında süperparamanyetik özellik gösteren malzemelerdir. Yani bir dış manyetik alan olmadığında, mıknatıslanması sıfırdır ve harici bir manyetik kaynak ile mıknatıslanabilir. Bu özellik, çözelti içerisinde manyetik nanopartiküllere stabilite sağlar [12]. Fe_3O_4 nanopartikülleri; yüksek biyouyumluluk, minimum toksisite ve süperparamanyetik özelliğe sahip olmasından dolayı farklı alanlarda kullanılabilmektedirler [80]. Bunun dışında Fe_3O_4 nanopartiküllerinin farklı üretim yöntemleri ile sentezlenebilirler ayrıca yönteme ait demir tuzu, sıcaklık, süre gibi çeşitli parametreler ile nanoyapı boyutu kontrol edilebilir [81].

Fe_3O_4 nanoyapıların üretim yöntemleri ile boyutlarının ayarlanabilmesi, manyetik özellik göstermesi ve yüksek biyouyumluğa sahip olmaları nedeniyle oldukça geniş kullanım alanlarına sahiptirler. Bu kullanım alanları arasında inflamatuar, kanser gibi hastalıkların teşhis ve tedavisinde, manyetik rezonans görüntülemede (MRI), kontrollü ilaç salım sistemlerinin oluşturulmasında, fototermal ve fotodinamik terapi gibi farklı uygulamalarda kullanılmaktadır (Şekil 2.4) [82].



Şekil 2.4 Fe_3O_4 nanoyapısının modifiye edilerek farklı alanlarda kullanımı

Fe_3O_4 nanoyapıları EPR etkisi yoluyla kanser hücrelerinde birikmesi sağlanarak spesifik kemoterapi uygulaması ve NIR etkileşimi sonucu oluşan ısı ile doğrudan tümörü termal ablasyonu sağlayabilir [48]. Dheyab ve ark. altın kaplamalı Fe_3O_4 nanoyapıları sentezleyerek fototermal terapi etkinliğini meme kanseri hücrelerinde incelemişlerdir. NIR ışığıyla etkileşime giren ve altın kaplamalı Fe_3O_4 nanoyapıları ile tedavi edilen hücrelerde yüksek antikanser etkinlik gösterilmiştir [83].

Zhang ve diğerleri tarafından yapılan çalışmada, glikoz oksidaz (GOx) ve polidopamin (PDA) kaplı Fe_3O_4 nanoyapıları geliştirilmiştir [84]. Geliştirilen bu yapının *in vivo* deneylerle antikanser etkinliği incelenmiştir. Balb/c farelerine uygulan fototermal terapi sonucunda seçici antikanser etkinlik ve anlamlı tümör baskılanmasının gerçekleştiğini açıklamışlardır. Fe_3O_4 nanopartikülleri, fototermal ajan olarak veya farklı maddelerle kombinasyon halinde kullanılabilir. Fototermal terapide kullanılan çeşitli nanoyapılar arasında öne çıkan Fe_3O_4 nanopartiküllerini diğer manyetik yapılardan ayıran en önemli özelliği, manyetizma ve NIR absorpsiyon ikili fonksiyonuna sahip olmasıdır [84].

Fe_3O_4 nanoyapılarının MRI kontrast ajanları olarak insan vücudunda kullanımı onaylanmıştır. Belirtilen özellikleri ve sitotoksik etkisinin bulunmaması nedeniyle Fe_3O_4 nanoyapıları; ilaç dağıtımı, manyetik hipertermi, fotodinamik terapi ve

fototermal ablasyon yoluyla kanser tedavilerinde kullanılmak için iyi bir adaydır [85]. Tez çalışması kapsamında, tümörlerin fototermal terapi yoluyla yok edilmesi için Fe_3O_4 nanopartikülleri kullanılarak çok fonksiyonlu bir nanoyapı üretimi gerçekleştirilecektir.

2.5 Fe_3O_4 Nanopartiküllerinin Sentez Yöntemleri

Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezlenmesinde kullanılan birçok üretim yöntemi bulunmaktadır. Bu üretim yöntemleri genel olarak kimyasal veya fiziksel yöntemleri içermektedir.

Fiziksel yöntemler yukarıdan aşağı yaklaşımını ile Fe_3O_4 nanopartiküllerin üretilmesini sağlamaktadır. Bu yöntemler; mekanik bilye öğütme, püskürtme, sprey proliz, lazer ablasyon ve elektro spreyleme yöntemleri olmak üzere oldukça çeşitlidir [86], [87]. Bu yöntemlerin dezavantajı, boyutun geniş bir dağılım göstermesi ve boyut kontrolünün zor olmasıdır. Bundan dolayı boyut ve şekil kontrollü nanopartiküllerin üretiminde daha çok kimyasal yöntemler kullanılmaktadır.

Kimyasal yöntemler; temel olarak aşağıdan yukarıya yaklaşımına göre NPlerin sentezlenmesi atomlar veya moleküllerin bir araya getirildiği kimyasal reaksiyon ile oluşur. Kimyasal yöntemlerin fiziksel yöntemlere göre avantajları; çeşitli uygulamalarda kullanılmak amacıyla istenilen boyut, morfoloji, bileşim gibi özelliklere sahip parçacıkların üretilmesinin sağlamasıdır [88], [89]. Literatürde birçok kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemler; birlikte çöktürme, sol-jel, poliol, solvotermal, hidrotermal, mikroemülsiyon tekniği, kimyasal buhar biriktirme yöntemleri olup, Fe_3O_4 nanoyapıların sentezinde kullanılmaktadır [86], [87], [90].

Bu üretim yöntemlerinin birbirlerine göre bazı avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Fe_3O_4 nanopartikül üretim yöntemleri Tablo 2.1'de karşılaştırılmalı olarak verilmiştir [88].

Tablo 2.1 Fe_3O_4 nanopartikül üretim yöntemlerinin karşılaştırılması [88]

Sentez Yöntemi	Reaksiyon Sıcaklığı (°C)	Reaksiyon Süresi	Boyut Dağılımı	Şekil Kontrolü
Birlikte Çöktürme	20-150	Dakika	Nispeten dar	İyi değil
Biyosentez	Oda Sıcaklığı	Saatler-Günler	Geniş	Kötü
Hidrotermal	150-220	Saatler-Günler	Oldukça Dar	Çok iyi
Mikroemülsiyon	20-80	Saatler	Dar	İyi
Solvotermal	150-220	Saatler	Oldukça Dar	Çok iyi
Sol-Jel	Oda Sıcaklığı	Saatler-Günler	Dar	İyi
Termal Ayrışma	100-400	Saatler	Dar	Çok İyi

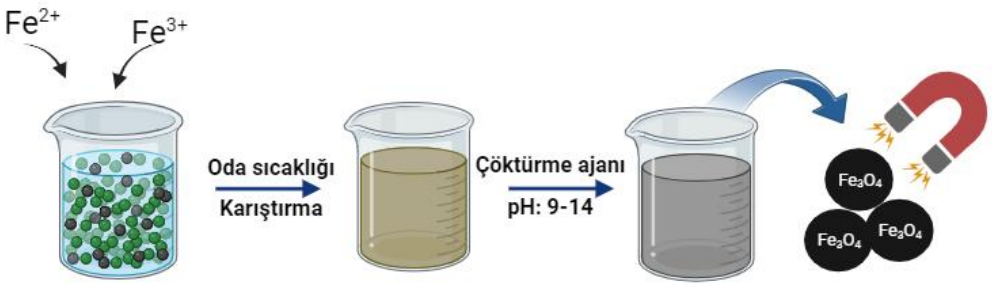
Fe_3O_4 nanopartiküllerin kimyasal üretim yöntemleri bir sonraki bölümlerde ayrıntılı olarak ele alınmaktadır.

Mevcut üretim yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları değerlendirilerek tez çalışması kapsamında; solvotermal ve hidrotermal sentez yöntemlerinin kullanımına karar verilmiştir. Bu yöntemlerin seçilmesinin temel sebebi, Fe_3O_4 üretimi için sentez kolaylığı ve morfolojik olarak küçük boyutlu partiküller elde edilebilmesine olanak sağlamasıdır.

2.5.1 Birlikte Çöktürme Yöntemi

Birlikte çöktürme yöntemi, oda sıcaklığında baz çözeltisi veya demir içeren çözeltilerin kullanıldığı bir tekniktir (Şekil 2.5) [88]**.** Bu yöntemle Fe_3O_4NPlerinin sentezlenmesi için öncül olarak klorür, sülfat, nitrat ve asetoasetat gibi demir tuzları ve çöktürme ajanı olarak NH_4OH, NaOH veya KOH gibi bazlar kullanılmaktadır [86].

Bu yöntemde reaksiyon hızı, baz çözeltisinin türü ve konsantrasyonu, sıcaklık, demir içeren çözeltilerin konsantrasyonu gibi parametreler Fe_3O_4 nanopartiküllerin boyut, manyetik özellik ve kristallik oranının kontrol edilmesini sağlar [91].



Şekil 2.5 Fe_3O_4 nanopartiküllerin birlikte çöktürme yöntemi ile üretilmesi

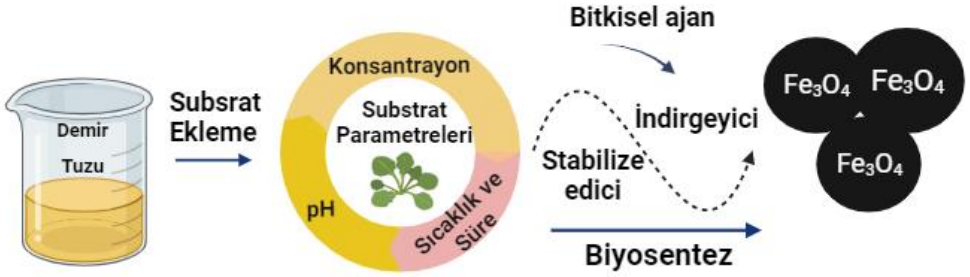
Sentezde kullanılan sıcaklık ve süre, reaksiyon için oldukça önemlidir [92]. Birlikte çöktürme yönteminin dezavantajı, bu teknikle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin küçük parçacık boyutlarında üretilebilmesinden dolayı topaklanma eğilimi yani aglomerasyon göstermesidir [93].

Ayrıca sentezlenen nanopartiküllerdeki demir hidroksit oranının yüksek olmasından kaynaklı olarak bu sentez sonucu elde edilen nanoyapının manyetikliğinin düşük olmasına sebep olur. Bu sorunun giderilmesi amacıyla ayrıca yüksek sıcaklıklarda tavlama işlemi yapılarak nanoyapıların oksitlenmesi sağlanmalıdır [92], [94].

2.5.2 Biyosentez Yöntemi

Biyosentez yöntemi ya da yeşil sentez olarak bilinen bu yöntem aşağıdan yukarı yaklaşıma sahiptir ve en büyük avantajı biyouyumluluğu yüksek Fe_3O_4 nanopartiküllerin üretilmesini sağlamasıdır. Bu sentez yönteminde genellikle çeşitli bitki yaprakları, kökleri, çiçekleri, gövde kısımları, tohumları veya kabukların özleri kullanılmaktadır [95].

Bitkilerde bulunan biyolojik bileşikler, ikincil metabolitler (alkaloitler, flavonoidler ve fenolik asitler), proteinler, amino asitler, vitaminler sentez sırasında Fe_3O_4 nanopartiküllerin oluşmasında çöktürücü, indirgeyici veya stabilite edici ajanlar olarak görev alırlar [96]. Ayrıca sentez sırasında kullanılan bitki kaynaklarına göre doğal bazlı stabilizatörler demir tuzu çözeltisini hidrolize eder ki, bu durum biyomoleküller tarafından indirgenerek Fe_3O_4 nanopartiküllerinin oluşumunu sağlar (Şekil 2.6) [97].



Şekil 2.6 Fe_3O_4 nanopartiküllerin biyosentez yöntemi ile üretilmesi

Sentezde kullanılan bitki kaynaklı stabilizatörler genellikle bitki özleri gibi polifenolik bileşiklerinden oluşur ve termodinamik stabilitenin arttırılması amacıyla nanopartiküllerin sentezinde görev alırlar [95], [96]. Çalışmalardan

bazılarında; metabolitlerin indirgeyici, sınırlayıcı, stabilite edici ajanlar olarak sentezde rol alması sonucunda Fe_3O_4 nanopartiküllerin aglomerasyonunun engellendiği gösterilmiştir [98], [99]

Biyosentez yönteminde Fe_3O_4 nanopartiküllerin oluşması sırasıyla; aktivasyon, termodinamik stabilite ve sonlandırma aşamalarından oluşmaktadır [103]. Fe_3O_4 nanopartiküllerin boyutu ve morfolojisi; demir tuzu ve bitki ekstraktlarının konsantrasyonu, reaksiyon süresi ve sıcaklığı, pH'ı gibi parametrelerden etkilenmesinden dolayı, Fe_3O_4 nanopartiküllerin kontrollü boyut ve morfolojide sentezlenmesini zorlaştırır [95], [100].

2.5.3 Hidrotermal Yöntemi

Hidrotermal yöntem; sulu ortamda çözündürülmüş demir tuzları karışımının reaktör içerisindeki bir teflon kaba konularak suyun kaynama sıcaklığının üzerinde ısıtılmasına dayanır [101].

Şekil 2.7'de sunulduğu üzere, reaktöre konulan teflon kap içerisindeki demir tuzu çözeltisinin oluşan basınç ve sıcaklıktan dolayı çökmesi ile kristalin büyümesi sağlanır. Bu yöntemde genellikle su-etanol çözeltisi, yüksek sıcaklık ve yüksek basınç koşulları kullanılır [102].



Şekil 2.7 Fe_3O_4 nanopartiküllerin hidrotermal sentez yöntemi ile üretilmesi

Sonuç olarak reaksiyon basıncının, atmosfer basıncının üstüne çıkması sonrasında yüksek sıcaklığın ve basıncın etkisi ile nanokristallerin oluşumu sağlanır [101].

Literatürde yapılan çalışmada Cabuil ve ark. [103], hidrotermal işlemin kobalt ferrit nanoparçacıkları üzerindeki etkisini incelemişler ve artan sıcaklığın nanoparçacıkların boyutunu arttırdığını gözlemlemişlerdir [103].

Şekil ve boyut, nanometreden birkaç yüz nanometreye kadar sentez parametreleri yardımıyla ayarlanabilmektedir. Ayrıca hidrotermal sentez yönteminde, organik çözücülere veya ilave reaksiyon gibi işlemlerin kullanılmasına gerek yoktur [104].

2.5.4 Mikroemülsiyon Yöntemi

Mikroemülsiyon yöntemi genellikle su ve yağ gibi birbirine karışmayan sıvıların yüzey aktif madde ile stabilite edildiği bir yöntemdir. Su ve yağ arasındaki arayüzde polar başlı veya hidrofobik kuyruklu yüzey aktif maddeler kullanılır (Şekil 2.8) [105].

Bu yöntemde yağ damlacıklarının su içerisinde dağıtılması sonucunda karışımda bulunan yüzey aktif maddeler su ve yağ arayüzünün stabilite edilmesini sağlayarak sürekli fazda asılı kalan küçük ve tek biçimli damlacıkların oluşumu sağlanır [106]. Yüzey aktif maddelerin hidrofobik kuyrukları oluşan yapıda merkeze doğru, hidrofilik kafalar ise çevredeki çözücüden kaynaklı olarak dışarı doğru yönlendirilir [107].



Şekil 2.8 Fe_3O_4 nanopartiküllerin mikroemülsiyon yöntemi ile üretilmesi

Bu yöntemde, kullanılan yüzey aktif maddelerin konsantrasyonu kritik bir noktaya ulaştığı zaman, damlacıkların oluşması ile misel yapılarını ortaya çıkarır. Misel, yüzey aktif madde moleküllerinin hidrofilik katmanı ile hidrofobik bir çekirdekten oluşan küresel morfolojiye sahip olan yapılardır [108].

Bu yöntemle yüzey aktif madde konsantrasyonu, yağın suya oranı, pH, süre ve sıcaklık gibi sentez parametreleri kullanılarak Fe_3O_4 nanopartiküllerinin boyutu ile bileşimi kontrol edilebilir ve yüksek manyetizasyona sahip nanoyapılar sentezlenebilir [108]. Ayrıca, reaksiyonun genellikle oda sıcaklığında

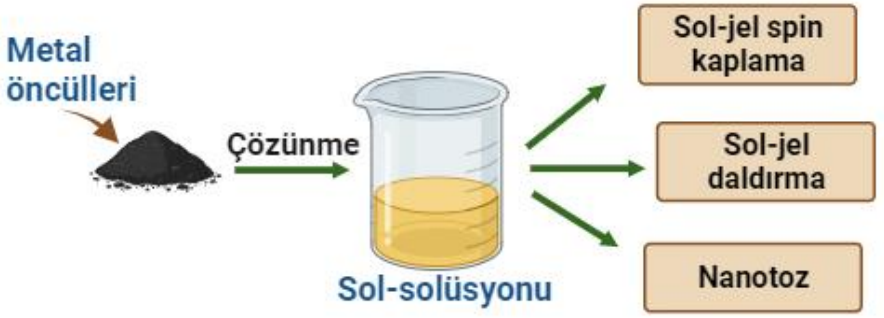
gerçekleştirilmesi, yüksek sıcaklık veya farklı kimyasallar gerektirmemesi nedeniyle diğer yöntemlere kıyasla avantaj sağlar [87], [107].

Mikroemülsiyon yönteminin bir dezavantajı, sentezde kullanılan yüzey aktif maddenin, nanopartikül özelliklerinin etkilenmesi sonucunda ayrılmasının ve saflaştırılmasının zor olmasıdır [109].

2.5.5 Sol-jel Yöntemi

Sol-jel yönteminde; "sol" metal alkoksitlerin veya alkoksit öncüllerinin bir çözelti içerisinde hidrolizini ve yoğunlaşmasını ifade eder. Bu yöntemde çözelti içerisinden solventin uzaklaştırılması, kurutulması ya da jelleştirilmesi sonucunda demir oksit nanoparçacıkları üretilir (Şekil 2.9) [110].

Bu yöntem genellikle oda sıcaklığında gerçekleşir, yaygın çözücü olarak su kullanılır ve kullanılan öncüller asit veya baz tarafından hidrolize uğrar. Fe_3O_4 nanopartiküllerin boyutunu ve morfolojisini reaksiyon hızı, sıcaklık, öncüllerin yapısı ve pH gibi parametreler etkiler [111].



Şekil 2.9 Fe_3O_4 nanopartiküllerin sol-jel yöntemi ile üretilmesi

Sol-jel işlemi sırasında sol fazının yapısı; jelin özelliğini, şeklini, boyutunu ve gözenekliliğini belirler. Bu yöntem tek tip boyuta sahip Fe_3O_4 nanopartikül üretilmesini sağlar [112]. Ayrıca yöntemin basitliği, nanopartikül morfolojisinin kontrolü gibi avantajlara sahiptir [112], [113].

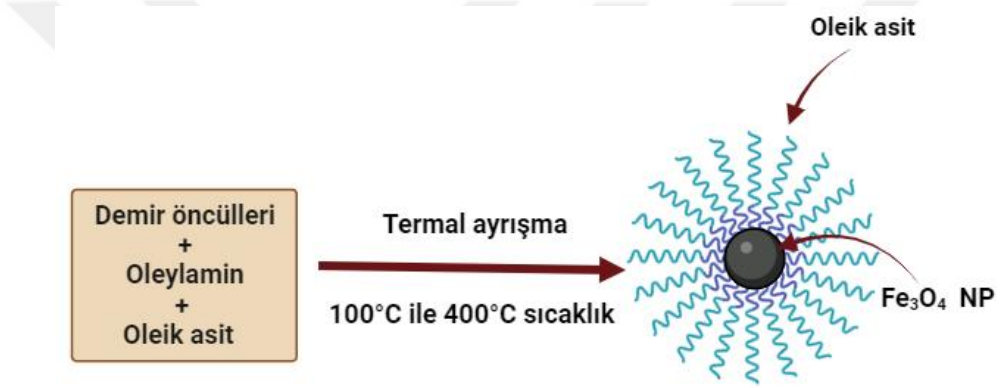
Fakat bu yöntemle tek tip boyutlu Fe_3O_4 nanopartikül sentezlenmesine rağmen genellikle tehlikeli kimyasal kullanımı gerekmesinden dolayı büyük miktarlarda üretilmesi pahalı, zor ve ekonomik değildir [88].

2.5.6 Termal Ayrışma Yöntemi

Termal ayrışma, yüksek kaynama noktasına sahip sulu olmayan solventlerin kullanıldığı bir yöntemdir [114].

Bu yöntemde yüzey aktif madde olarak oleik asit, heksadesil amin, oleyamin ve yağ asitleri kullanılmaktadır [87], [114]. Demir öncüllerinden metal karboniller veya metal asetil asetonatla yüzey aktif maddeler kullanılarak hazırlanan karışım 100-400°C arasında sıcaklık koşulunda tutularak Fe_3O_4 nanopartiküllerinin üretilmesi sağlanır (Şekil 2.10) [115], [116].

Demir (III) asetil asetonat gibi demir öncüllerin oktil eter içinde termal olarak parçalanması sonucunda Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenir [117].



Şekil 2.10 Fe_3O_4 nanopartiküllerin termal ayrışma yöntemi ile üretilmesi

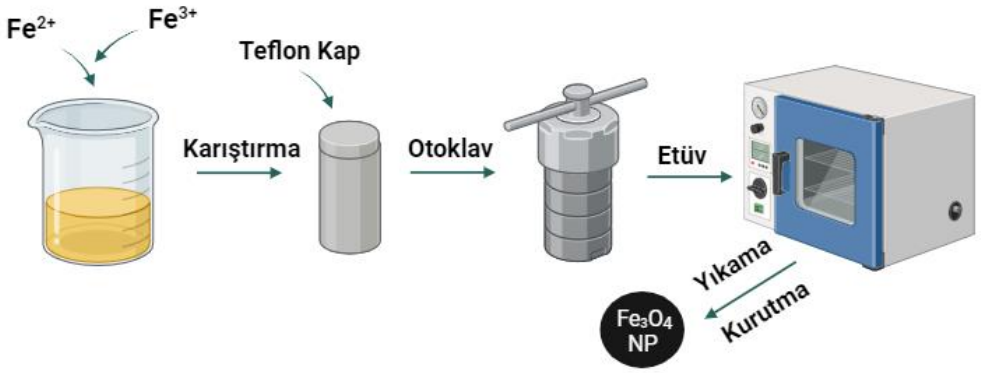
Termal ayrışma yöntemi, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin boyut kontrollü sentezlenmesinde kullanılan bir yöntem olmasına rağmen, yüksek sıcaklıklarda işlem yapılması ve zehirli kimyasalların kullanılması bu yöntemi sınırlandırmaktadır [116].

2.5.7 Solvotermal Yöntemi

Solvotermal yöntem, malzemenin yüksek buhar basıncı altında 130°C ile 250°C arasında değişen sıcaklıklarda paslanmaz çelik bir otoklav içerisinde kapalı teflon kapta gerçekleştirildiği kimyasal bir tekniktir (Şekil 2.11) [90]. Solvotermal yöntem hidrotermal sentez yöntemine benzer olmasına rağmen; hidrotermal yöntemde öncül olarak sulu ortamın, solvotermal yöntem de ise organo metalik bileşiklerin kullanılması aralarındaki önemli farkı oluşturmaktadır [118].

Bu yöntem, manyetit nanoyapılarının şekil kontrollü, tek boyut dağılımlı ve yüksek kristalin oranına sahip olarak hazırlanması için kullanılmaktadır. Ayrıca

dislokasyon içermeyen nanopartikülleri elde edildiğinden, bu yaklaşımla sentezlenen nanoyapılar, diğer yöntemlere kıyasla daha homojen kristalliğe sahip olurlar [118].



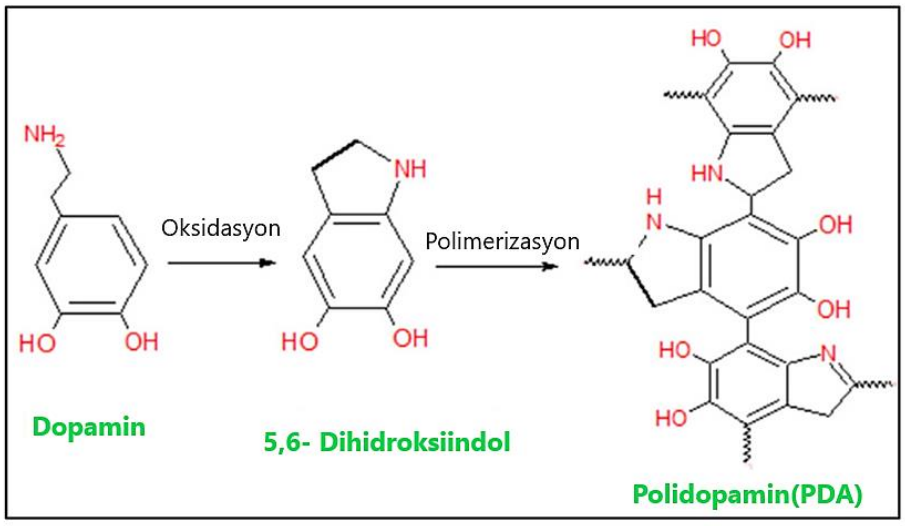
Şekil 2.11 Fe_3O_4 nanopartiküllerin solvotermal yöntemi ile üretimi

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde; Lin ve arkadaşları, solvotermal ve hidrotermal yöntemler ile içi boş Fe_3O_4 nanopartiküllerini elde etmişlerdir [119]. İçi boş manyetit küreleri sentezlemek için başlangıç maddesi olarak demir klorür, indirgeyici ajan olarak etilen glikol ve amonyum asetat kullanmışlardır. Hazırlanan çözelti teflon astarlı paslanmaz çelik bir otoklav içerisinde 8-24 saat boyunca 200°C sıcaklığa kadar ısıtarak içi boş kürelerin yüzeyinde demir iyonları olacak şekilde manyetit nanoyapıları elde etmişlerdir [119].

Tian ve arkadaşları ise solvotermal yöntem kullanarak 1 nm'ye kadar ince tek boyut dağılımına sahip manyetik nanopartiküllerini solvotermal yöntem kullanarak sentezlemişlerdir [120].

2.6 Polidopamin Polimerinin Özellikleri ve Önemi

Polidopamin, dopaminin oksidasyonu ile kolayca elde edilen bir polimerdir, dopamin veya diğer katekolaminlerin son oksidasyon ürünü olan polidopamin (PDA) hemen hemen tüm malzemelerin yüzeyinde ayarlanabilir kalınlıkta kaplamaların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Şekil 2.12) [121], [122]. PDA, farklı malzemeler üzerinde kolayca biriktirilebilen biyouyumlu polimerik bir malzemedir [123]. PDA'nın yüzeyinde bulunan katekol ve karboksilik gruplar, spesifik moleküllerin bağlanmasını veya geçiş metal iyonlarının yüklenmesini sağlayarak, PDA'nın çeşitli alanlarda kullanılmasına olanak tanır [124], [121].



Şekil 2.12. Polidopamin'in moleküler yapısı [122]

PDA polimeri nükleofilik gruplar taşıyan moleküllerle veya metalik katyonlar içeren çözeltilerden elde edilen metalik nanopartiküller ile modifiye edilebilir [125]. PDA'nın katekol bölgeleri hem geçiş metallerinin bağlanması hem de belirli moleküllerle kovalent bağlanması için redoks aktivitesi gösterir. PDA polimerinin Mn^{2+}, Cu^{2+}, Fe^{3+} gibi metal iyonlarına karşı güçlü indirgeme özelliği göstermesi, hibrit malzemelerin ve PDA kaplı nanoyapıların sentezlenmesini sağlar. PDA'nın fizikokimyasal özellikleri, biyouyumluluğu ve ilaç yükleme yöntemleri ile modifiye edilebilmesi sebebiyle, ilaç salımı ve görüntüleme sistemlerinde, kemoterapi ile diğer tedavilerin kombinasyonunda, fototermal terapide kullanılmasına olanak sağlar [125]. Böylece PDA, NIR lazer ışınlaması ile fototermal stabilite ve fototermal dönüşüm verimliliği göstererek[45], [126] fototermal terapi ve kemoterapi kombinasyonu sinerjistik etkiye dayalı olarak olarak antitümör etkinlik potansiyeli sağlar.

2.6.1 Fe_3O_4 Nanopartiküllerinin Modifiye Edilmesinde Polidopamin Polimerinin Önemi

Fe_3O_4NPler, çeşitli ilaçların tümör hücrelerine taşınması için yaygın olarak kullanılır [127]. Ayrıca Fe_3O_4NPlerin fototermal ajanların içselleştirilmesini arttırarak tümör ablasyon etkisini de geliştirir [49]. Son on yılda fototermal terapi üzerine yapılan çalışmaların artması ile bu alanda çok sayıda nanoyapı geliştirilmiştir. Yapılan çalışmalar metalik özellikli nanoyapıların güçlü foto

fiziksel özelliklerine sahip olmaları nedeniyle fototermal uygulamalar için son derece uygun olduklarını göstermektedir [127], [49].

Fe_3O_4 nanopartiküllerin basit sentez yöntemleri ile üretimleri yapılabilmesine rağmen, bu nanoyapıların en büyük dezavantajı; yüksek yüzey enerjisi ve Van der Waals kuvvetleri nedeniyle toplanma eğilimi göstererek aglomerasyon meydana gelmesidir. Bunun dışında Fe_3O_4 nanoparçacıkları arasında manyetik çekimin olması, oksidasyona uğramasından kaynaklı olarak manyetizma kaybının oluşması gibi sorunlar, nanoyapıların işlevselleştirilmesiyle çözülebilmektedir [54]. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kaplanması veya kapsüllenmesiyle nanoyapının yüzey enerjisi dolaylı olarak azalır ve böylece aglomerasyon önlenebilir. Aynı zamanda polimerler Fe_3O_4 nanopartiküllerinin etrafında koruyucu bir tabaka oluşturarak nanoyapıların uzun süre havaya maruz kaldığında manyetik özelliklerinin ve kimyasal stabilitesinin korunmasını sağlar [121], [123].

Son yıllarda yapılan çalışmalarda selüloz, aljinat, kitosan, polietilen glikol (PEG), PDA gibi polimerler, Fe_3O_4NPlerin kaplanmasında veya kapsüllenerek çekirdek-kabuk, kabuk-çekirdek-kabuk, çok çekirdekli, Janus tipi veya hibrit nanoyapılar oluşturulmuştur [124], [128].

Fe_3O_4NP'lerin PDA ile modifikasyonu çalışmaları sonucunda, fototermal dönüşüm verimliliğinin ve NIR emiliminin arttırıldığı gösterilmiştir. Ayrıca, PDA'nın fonksiyonel grupları sayesinde Fe_3O_4NPlerin yüzeyine ilaç yüklenmesi de mümkündür [123], [129].

Basit sentez yöntemleri ile Fe_3O_4NPlerin PDA ile kaplanması mümkündür. Liu ve ark., oda sıcaklığında su, etanol ve amonyak içeren karışım ile dopaminin oksidasyonu ve kendi kendine polimerizasyonu yoluyla dopamin-melanin kolloidal nanoküreleri elde etmişlerdir [26].

Başka bir çalışmada Shi ve ark. [130], çok fonksiyonlu kanser tedavisi için PDA kaplı Fe_3O_4NPleri kullanarak mezogözenekli silika nanopartikülleri sentezlemişlerdir. MRI görüntüleme sisteminde kullanılan bu nanoyapı; MRI, termal görüntüleme ve ksenogreftlenmiş tümör dokularında uygulanmış fototermal terapide başarılı sonuç sergilemiştir [130].

Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıklarının fototermal etkisi, kanser tedavisi için hem *in vitro* hem de *in vivo* deneylerle araştırılmıştır [127]. Küresel, altıgen ve tel benzeri

morfolojilerde sentezlenen Fe_3O_4 nanoparçacıklarının, yakın kızılötesi (NIR) lazer ışınlaması sonucu fototermal etkinlik gösterdikleri belirlenmiştir. Fe_3O_4 nanoparçacıkları, homojen dağılımın sağlanması amacıyla su içinde karboksil sonlu polietilen glikol ve fosfolipid ile kaplanmıştır. Yüzey işlevli Fe_3O_4 nanoparçacıkların özofagus kanseri hücreleri tarafından alınabildiği, hücre yapısına ve canlılığına sitotoksik etki göstermediği belirlenmiştir. Bununla birlikte, 808 nm'de ışınlama ile özofagus kanser hücresi canlılığının etkili bir şekilde baskılandığı, hücresel organeller NIR lazerle aktive edilmiş Fe_3O_4 nanoparçacıkları ile inkübe edildiğinde ise sitotoksik etki gösterdiği bildirilmiştir. Fare özofagus tümör büyümesinin, Fe_3O_4 nanoparçacıklarının fototermal etkisi ile önemli ölçüde inhibe edildiği ve tümörün etkili bir şekilde azalması ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Fototermal tedaviden sonra tümör dokusunun büyümediği, hücrelerin önemli ölçüde büzüştüğü ve bazı hücrelerin parçalandığı ortaya çıkarılmıştır [127].

Jędrzak ve ark. [131], hepatosellüler karsinomun (HCC:Hepatocellular Carcinoma) *in vitro* tedavisi için PDA kaplı Fe_3O_4NPleri ve PAMAM (Poli-amidoamin) dendrimerleri içeren çok fonksiyonlu bir nanoyapı sentezlemişlerdir. Bu yapının hepatoselüler karsinomun kemoterapik ve fototermal tedavisinde kullanımının etkin olduğunu göstermişlerdir [131].

Wu ve ark. yapmış oldukları çalışmada, PDA ile kaplanmış olan Fe_3O_4NPlerden oluşan bir nanoyapı geliştirmişlerdir [27]. Geliştirilen nanoyapısının manyetik rezonans görüntüleme ve fototermal kanser tedavisinde etkinliklerini araştırmışlardır. Oluşturulan nanoyapının MRI kullanımı için uygun olduğunu ve nanoyapılara uygulanan PDA kaplamasının NIR soğurma yeteneğine sahip olmasından dolayı fototermal dönüşüm kabiliyeti göstererek NIR lazer etkileşimiyle kanser hücrelerinin ölümünde etkili olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca harici bir manyetik alan aracılığı ile geliştirilen nanoyapının NIR lazer etkileşimiyle kanser hücrelerine karşı önemli ölçüde arttırılmış lokal fototermal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir [27].

L. Sen ve ark. tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, *in situ* polimerizasyon yöntemiyle Fe_3O_4 nanoyapıları PDA ile enkapsüle edilerek çekirdek-kabuk nanoyapısı oluşturulmuştur. PDA polimeri kızıl ötesi lazer için absorpsiyon, yüksek floresan verimliliği ve biyomoleküllerin daha fazla işlevselleştirilmesi gibi çeşitli avantajlar sağlamıştır. PDA enkapsüle Fe_3O_4 nanoyapıların; hücre içi mRNA

tespiti, çoklu görüntüleme ve fototermal terapide terapötik ajanlar olarak kullanılabileceği yapılan çalışma ile gösterilmiştir [132].

Jin ve ark. [133], PDA kaplı Fe_3O_4 NPleri sentezleyerek yüzeyinin PEG ile modifiye edilmesi sonucunda çok işlevli gözenekli nanoyapısı sentezlemişlerdir. Bu nanoyapının, MRI ve fototermal terapi uygulamasında kullanımını ve terapötik ajan olarak potansiyelini incelemişlerdir. Fe_3O_4 NPlerin gözenekli yapısı ve PDA yüzeyindeki fonksiyonel gruplar sayesinde *in vitro* deney çalışmalarında başarılı anti tümör etkinlik sonuçları bildirilmiştir [133].

Liu vd. ark.; manyetik nanopartikülleri PDA ile kapladıktan sonra oluşan nanoyapıları tümöre yüksek afiniteye sahip bir protein ile konjuge etmişlerdir [134]. Geliştirilen nanoyapının; tümör büyümesi üzerindeki fototermal etkinliğini SW620 (Human colon adenocarcinoma; insan kolon adenokarsinom) hücreleri üzerinde araştırmışlardır. Sentezlenen nanoyapının başarılı fototermal etkinlik sonucu gösterdiğini rapor etmişlerdir [134].

Fe_3O_4 NPlerin PDA kaplanması ile oluşturulan nanoyapılara ait çeşitli çalışmalardan elde edilen sonuçlar; bu nanoyapıların MRI görüntüleme, ilaç taşıma ve terapötik ajan olarak fototermal terapi uygulamalarında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [123], [129].

Özet olarak; fototermal kanser tedavisi için manyetik alan hedefleme yeteneğine sahip çok fonksiyonlu nanoyapıların oluşturulmasında kullanılan Fe_3O_4NPlerin PDA ile kaplanmasına ait çalışmalar, bu yapıların biyomedikal alanında kullanımın gelecek vadettiğini göstermektedir [135], [136]. PDA'nın güçlü yapısal ve fizikokimyasal özelliklerinden dolayı tümör hedefli ilaç salım çalışmaları ve fototermal terapide kullanılması gibi birçok avantaj sağlamaktadır [125].

2.7 Nanoyapılarda PEG Kullanımı ve Önemi

Günümüzde yapılan kanser tedavi çalışmalarında kullanılan polietilen glikol (PEG) polimerinin oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır [137]. PEG ve türevleri fonksiyonel gruplarına göre, spesifik biyomoleküllere karşı reaktivite sağlayabilir, biyokonjugasyon ve hedefe yönelik ilaç salımı sistemlerinde kullanılabilirler. PEG ve türevlerinin protein konjugasyonu ile nanoyapıların yüzeyine eklenmesi ile yapılan PEGilasyon işlemi, biyomedikal uygulamalar için

günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. PEGilasyon işlemi nanoyapıların protein çözünürlüğünün artmasını, immünojenitenin azalmasını, renal klirensin önlenmesini sağlar [47]. Ayrıca ilaç salım çalışmalarında kullanılan PEG'ler ilacın etkinliğini, enzimatik ve kimyasal bozunmayı önler. PEG polimerinin değiştirilen fonksiyonel gruplara sahip olması, çeşitli çalışmalar için spesifikliğin sağlanması açısından oldukça önemlidir [138].

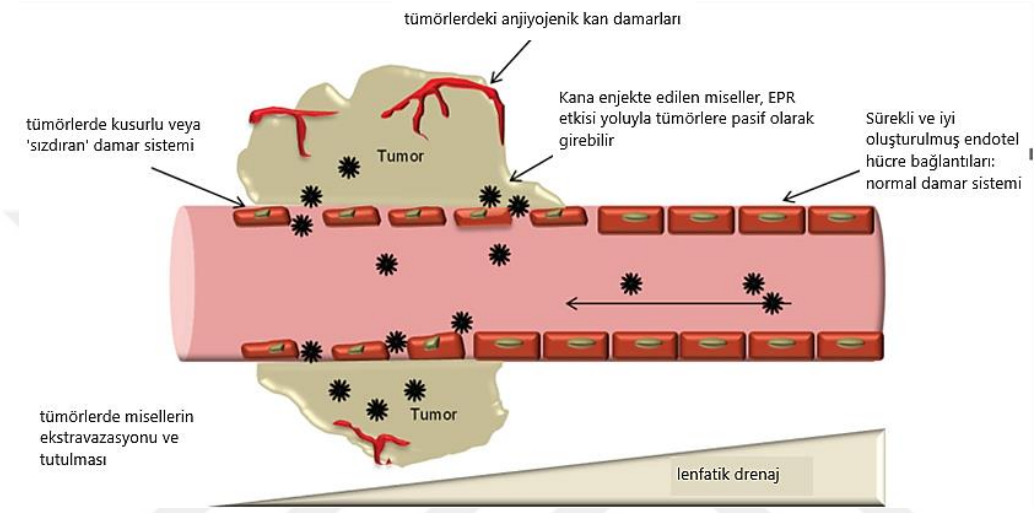
Yaygın olarak, tiyol gibi fonksiyonel bir gruba sahip olan SH-PEG, kontrollü ilaç salımı ve stabil disülfit bağlarının oluşturulmasında kullanılır. PEG'in yapısında bulunan tiyol grubu (-SH) ile modifiye edilen nanoyapılar farklı moleküllere bağlanma yeteneği, moleküller arasında kovalent bağlantılar oluşturma veya çapraz bağlanma özelliği kazandırır. Aynı zamanda nanoyapıların yüzeyinin modifiye edilmesi, biyouyumluluğun ve stabilitenin gelişmesini sağlar [40], [139].

SH-PEG, biyouyumluluğunun yüksek olmasından dolayı çeşitli biyoteknoloji, ilaç dağıtımı ve farmasötik uygulamalarda sıklıkla kullanılır. SH-PEG nanoyapıların kontrollü ilaç salımında; ilaç moleküllerinin çözünürlüklerinin ve biyoyararlanımlarının arttırılmasına yardımcı olur [40], [139], [140]. Ayrıca PEG modifikasyonu nanoyapıların, dolaşım sistemindeki kan proteinleri ve opsoninler tarafından tanınmaya karşı koruyarak nanoyapıların mononükleer fagosit sistemi tarafından fagositozunu önler [40], [139], [140].

Nanoyapılarda kullanılan PEG, hücre yüzeylerinde bulunan reseptörlerle etkileşime girerek, EPR etkisi yoluyla tümörler içinde birikme özelliği gösterir. Bu durum nanoyapılara tümöre spesifik özellik kazandırır [140], [141]. PEG kullanılarak NPlerin tümöre hedeflendirilmesi genel olarak aktif veya pasif özellikte olabilir. Aktif hedefleme biyolojik hedefleme olarak da bilinmekte olup, nanoyapı yüzeyinin tümör hücrelerinde aşırı olarak eksprese edilen proteinler tarafından spesifik olarak tanınabilen bir peptit veya bir antikor ile modifiye edilmesi ile sağlanır [142].

Pasif hedefleme ise geçirgenlik ve tutma etkisine (EPR) dayanmaktadır [142]. Pasif hedefleme, tümör dokusunda bulunan kanser hücrelerinin özelliklerine dayanır. Tümör dokusu artan besin ve oksijen ihtiyacının karşılanması için anormal hızla büyüyerek endotel hücrelerinin geniş aralıklarla düzensiz bir şekilde oluşmasına sebep olur [142]. Endotel hücrelerinde meydana gelen bu düzensiz büyüme nitrik oksit, matriks metalloproteinazlar ve vasküler endotelyal büyüme

faktörü gibi vasküler geçirgenlik faktörlerinin üretimi, tümör kan damarlarını son derece geçirgen hale getirir [142], [143], [144]. Ayrıca büyüyen tümör hücrelerinin lenf damarlarına doğru genişlemesi lenfatik drenajı zayıflatır böylece artan vasküler geçirgenlik ve zayıf lenfatik drenaj kan plazma bileşenlerinin veya nanoparçacıkların tümör dokularına sızmasına ve orada tutulmalarına olanak tanır. Bundan dolayı NPler, küçük boyutları sayesinde tümör bölgesinde EPR etkisi sonucu birikirler (Şekil 2.13) [142], [143], [144].



Şekil 2.13 Nanopartiküllerin geçirgenlik ve tutma etkisinin (EPR) şematik gösterimi [144]

Küçük boyutlu NPler, arttırılmış geçirgenlik ve tutma (EPR) etkisi sayesinde tümörlerde sağlıklı dokulara göre daha fazla oranda birikirler çünkü küçük boyut daha iyi hücresel alım gösterir. Ancak nanopartiküller çok küçük olursa kan dolaşımında böbrek tarafından kolayca uzaklaştırılırlar.

Tüm bu faktörler göz önüne alındığında etkili bir nanoyapının 10-100 nm boyut aralığında olması gerekmektedir [145]. Normal dokularla karşılaştırıldığında tümör dokularında bol miktarda düzensiz kan damarının bulunması, nanopartiküllerin tümör kan damarlarından içeri sızmasını kolaylaştırır. Ayrıca tümör dokusunda lenfatik drenaj sisteminin bozukluğu, tümöre giren nanoyapıların uzaklaştırılamaması nedeniyle tümörde birikmesine yol açmaktadır [146]. Dolayısıyla nanoyapılarda kullanılan PEG; biyouyumluluğu, stabiliteyi, aktif hedeflemeyi veya EPR etkisi ile tümör dokularında nanoyapıların birikmesini sağladığından, yüzey modifikasyonu için kullanımı oldukça önemlidir [146].

Literatürde yapılan bir çalışmada Xue ve ark. PEGilasyon uygulanan demir oksit nanopartiküllerinin biyolojik dağılımını incelenmişlerdir. PEG katmanının, 14 ve 22 nm boyutunda sentezlenen küresel manyetik nanopartiküllerinin yarı ömrünün belirlenmesinde anahtar bir role sahip olduğunu göstermişlerdir [147].

Yapılan bir diğer çalışmada PEGilasyon, PDA nanoparçacıklarına tümör hedeflendirme özelliği kazandırılması için kullanılmıştır [25]. Bu çalışmada, 7-etil-10-hidroksikamptotozinin (SN38) antikanser ilacı, p-π etkileşimleri yoluyla PDA-PEG nanoparçacıklarına yüklenmiştir. Sentezlenen nanoyapının *in vivo* deneylerde NIR ışığına maruz kaldıktan sonra, SN38 yüklü nanopartiküllerin kemoterapötik ve fototermal tedavisinde tümör büyümesini baskıladığı gözlenmiştir [25].

Sun ve ark. yaptığı çalışmada, PEGilasyon uygulanan bir PDA kabuğu içeren ve ICG ile DOX yüklenmiş manyetik nanoyapı sentezlemişlerdir [148]. Manyetik olarak yönlendirilebilen sistem; fototermal terapi, fotodinamik terapi ve kemoterapiyi birleştirmek için kullanılmıştır. *In vitro* deneysel çalışmalar için HeLa hücreleri kullanılarak hücre canlılığı, apoptoz ve hücre alım verimliliğini incelemişlerdir [148]. Elde edilen sonuçlar, antikanser etkinlik çalışmalarında tümöre spesifiklik kazandırılmasında PEG'in önemini ortaya koymuştur.

Yapılan bir diğer çalışmada ise DSPE-PEG (Distearoilfosfatidiletanolamin-Polietilen glikol) miselleri içine kapsüllenmiş doksorubisin (DOX) içeren nanoyapı sentezlenmiş, daha sonra da PDA ile konjuge edilmiştir. [149]. Birçok kanserle ilişkili proteazomlara afinitesi olan monoklonal antikor bortezomibin (Btz), DOX ve PDA ile oluşturulan nanoyapı, NIR aracılı fototermal terapi ve pH aracılı kemoterapötik ilaç salımı çalışmalarında kullanılmıştır [149]. PDA'nın ve PEG'in antikanser etkinliğini arttırdığı yapılan çalışma ile gösterilmiştir.

Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, siklik peptiti tümörü hedefleyen çok fonksiyonlu bir nanoteranostik ajan elde etmek için PEG ile demir oksit nanopartiküllerine konjuge edilmiştir [150]. Yapılan çalışma sonucunda araştırmacılar, MRI görüntüleme ve *in vivo* fototermal terapötik etkinlik elde etmişlerdir [150].

Litaratürde yapılan bir diğer çalışmada, demir oksit nanoyapıları PDA ile enkapsüle edilmiş, PEGilasyon uygulamasının ardından DOX ile yüklenmiştir. Ortaya çıkan

nanoyapı, kemoterapi ve fototermal terapi kombinasyonunun tümör hücrelerinin ablasyonu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğunu göstermiştir [41].

Literatürde yapılan çalışmalar incelendiğinde; nanoyapılara uygulanan PEGilasyon işleminin, tümör hedeflemesi ve tutulumun arttırılmasında yaygın olarak kullanılan bir modifikasyon yöntemi olduğu gözlenmiştir [23]. PEG ve türevlerinin nanoyapıya eklenmesi, biyouyumluluğun arttırılması ile aktif veya pasif hedeflemenin gerçekleştirilmesini sağlamaktadır.

Bu tez çalışmasında sentezlenecek olan PDA kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzeyi SH-PEG molekülü ile modifiye edilerek tümör dokusuna hedeflendirilmesi sağlanacaktır. Sonuç olarak; nanoyapının PDA ile enkapsüle edilip PEGilasyon işlemi ile modifiye edilmesi tümöre spesifiklik sağlamasının yanı sıra stabilite ve biyouyumluluğu geliştireceği öngörülmektedir.

2.8 Vinorelbin ve Antikanser Etkisi

Antikanser ilaçları, kanser hücrelerinin büyümesinin ve yayılmasının önlenmesinde kanser tedavilerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Kanserli dokunun kemoterapi tedavisinde kullanılan bu ilaçlar genellikle farklı mekanizmalara etki eden çeşitli alt gruplara ayrılmıştır [151]. Vinka alkaloidleri, taksanlar, podofillotoksinler ve kamptotekan analogları gibi gruplar, antikanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaç gruplarıdır (Tablo 2.2) [151], [152].

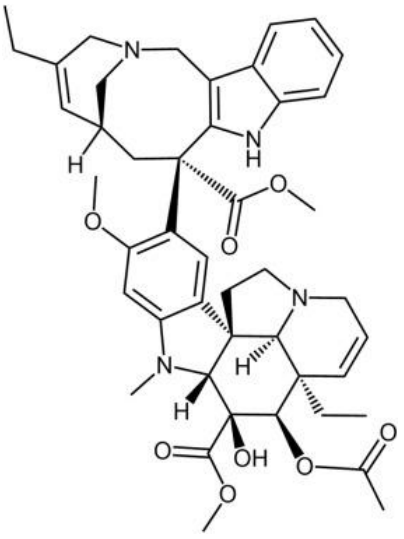
Vinka alkaloidleri, deniz salyangozu bitkisinden (Catharanthus rosea) üretilir ve kanser hücrelerinin mikrotübül yapılarını bozarak etki eder. Taksanlar grubunda olan ilaçlar Pasifik porsuk ağacının (Taksus) kabuğundan yapılır ve Vinka alkoidleri gibi bu grup ta, kanser hücrelerinin mikro tübül yapılarına etki ederek kanserin gelişimini durdurmaya yardım olurlar [153].

Podofilotoksinler, Podophyllum bitkisinin kökü ve izole edilen lignin bileşiminden oluşur. Kamptotekan analogları, Asya "Mutlu Ağacından (Camptotheca acuminata) elde edilirler. Podofillotoksinler ve Kamptotekan analogları, kanser hücrelerinde topoizomeraz inhibitörlerine etki ederler [152].

Tablo 2.2 Antikanser ilaçlarının sınıflandırılması [152].

İlaç Grubu	**Molekül Türleri**
Vinka alkaloidleri	Vincristin Vinblastin Vinorelbin
Taksanlar	Paklitaksel Dosetaksel
Podofillotoksinler	Etoposide Tenisopide
Kamptotekan analogları	İrinotekan Topotekan

Vinka alkaloidleri gurubuna ait olan Vinorelbin (VNB), yarı sentetik bir vinblastindir (Şekil 2.14). 1989 yılında, Fransız Pierre Fabre ilaç şirketi ilk olarak enjeksiyonluk Vinorelbin tartarat, yani VNB'yi üretmiştir [154]. VNB, ticari adı ile Navelbine, anti-tümör aktivitesine sahip ve özellikle küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ile ilerlemiş meme kanserinin tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca Vinka alkaloidleri hematolojik ve lenfatik neoplazmaların tedavisinde de klinik kullanım için onaylanmıştır (Vincristine, Vinblastine, Vinorelbine, Vindesine ve Vinflunine) [155]. 1994 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde terapötik kullanım için lisans onayı almıştır [156], [46].



Şekil 2.14 Vinorelbin molekülü [157]

VNB klinikte meme kanseri ve küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde farklı ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanır [155],[158]. VNB kanser hücrelerinde sürekli olan mitotik bölünmeye etki ederek kanser hücrelerinin kontrolsüz

büyümesini engeller. Kanser hücrelerinin kontrolsüz büyümesi, aşırı aktif hücre döngüsüne yol açan proliferatif mekanizmaların bozulmasıyla ilişkilidir. Bu bağlamda hücre yapısı bileşenleri olan mikrotübüller, hücre büyümesi ve bölünmesini sağlarlar [158]. VNB, mikrotübüle bağlanarak bu hızlı büyüme üzerinde durdurucu etki göstermesi sonucunda kanser hücrelerinin çoğalmasını yavaşlatır [153]. VNB, hücrelerin apoptozunu indükler ve mitotik düzenini bozarak tümör baskılayıcı gen p53'ün uyarılmasına ve çeşitli sinyal yolaklarının aktivasyonunun engellenmesine veya inaktivasyonuna neden olur [159].

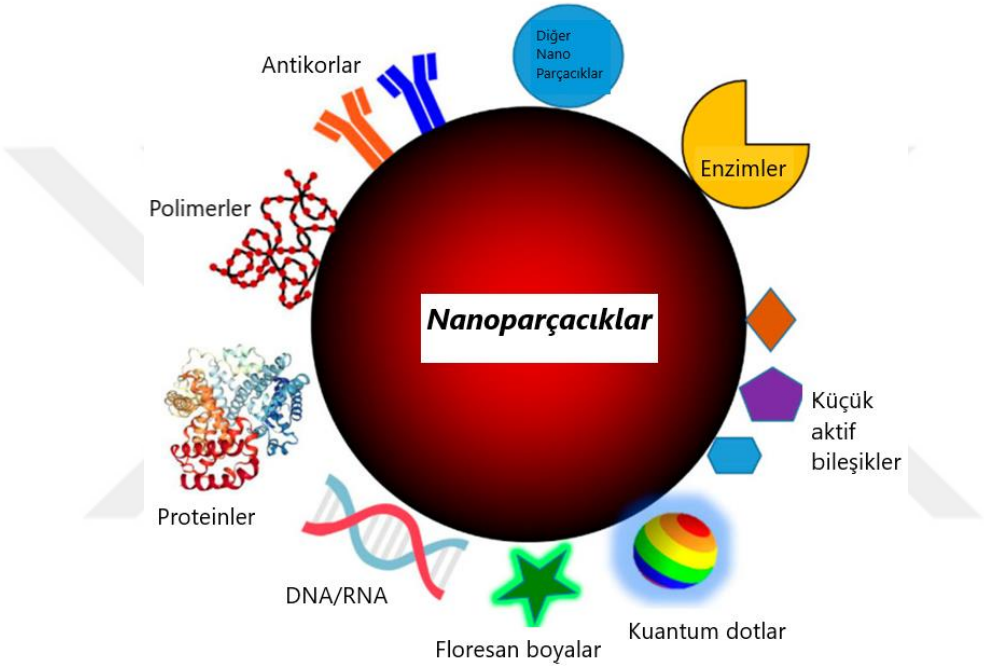
Yapılan faz II klinik araştırmalarında Vinorelbin'in, mikrotübüle olan güçlü afinitesi nedeniyle ilerlemiş meme kanseri hastalarında başarılı sonuçlarının olduğu gösterilmiştir [160].

Bu özelliklerinden dolayı VNB Dünya'nın en yaygın kullanılan antineoplastik kemoterapi ilacı haline gelmiştir. VNB, oral alımdan sonra vücut içerisinde hızla emilir. Biyoyararlanım oranı %33 ile %43 aralığında olmasına rağmen 70 yaşından büyük veya daha genç hastalarda oral kullanımın farmakokinetiğinde farklılıklar gözlenmemiştir. Oral VNB için önerilen doz ilk 3 hafta (faz 1) için haftalık 60 mg/m^2 sonrasında haftalık 80 mg/m^2'dir [161]. Uygulamanın ilk fazında şiddetli nötropeni ile karşılaşılırsa, tedaviye haftalık 60 mg/m^2'lik dozlarla devam edilir [161]. VNB'nin enjekte edilebilir olan formu da klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır [156],[154].

Bununla birlikte, intravenöz uygulanması sonrasında VNB, enjeksiyon bölgesinde genellikle venöz tahrişe ve flebit yapının oluşumuna neden olmaktadır. VNB'nin küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve meme kanseri tedavisinde kullanımı sonrasında ortaya çıkan yan etkiler genellikle; lökopeni, vezikan aktivitesi, oral formda azalmış biyoyararlanımı ve toksik etkiler şeklinde meydana gelmektedir [30]. Ayrıca VNB tedavi sonrasında sinir, solunum ve gastrointestinal sistemde doza bağlı toksisiteler gibi yan etkilerde oluşmaktadır [30]. Bu yan etkilerin azaltılması, ortadan kaldırılması ve klinik kullanım uyumluluğunun önemli ölçüde arttırılması için çoğu araştırmacı lipozomlar, kontrollü ilaç taşıyıcı sistemleri ve çeşitli nanoyapılar gibi yöntemler ile enkapsülasyon araştırmaları yapmaktadırlar [30].

Bu amaçla kullanılan nanoyapılar, nano boyutun etkisinden dolayı kanser tedavisinde kullanılan ilaçların yan etkilerinin azaltılması için umut verici bir

potansiyel göstermektedir [1], [162]. NPlerin en önemli özelliklerinden biri; terapötik ilaçların işlevsel hale getirilebilir, istenmeyen etkilerin önlenmesini sağlayabilir ve sinerjistik tümör tedavisi için kullanılabilecek çeşitli nanokompleksler oluşturulabilir olmalarıdır [163], [164]. İnorganik nanoyapılar, organik nanoajanlar, kemoterapötik ilaçlar ve diğer biyomoleküller kullanılarak kanser tedavisi için birçok fonksiyonel biyomalzeme geliştirilmiştir (Şekil 2.15) [60]. Bunun dışında birden fazla işlevi birleştiren hibrit sistemler ve nanoyapılar da kullanılmaktadır [165].



Şekil 2.15 Nanoyapılara antikanser etkinlik kazandırmak için kullanılan modifikasyon ajanları [60]

Nanopartiküller, ilaçların kapsüllenmesi ile kan dolaşımdaki ilacın dozunun korunmasını ve ilacın tümöre hedeflenmesini sağlayarak istenen amaca yönelik etki sağlarlar. Yapılan bir çalışmada polimerik NP ilaç taşıma sisteminin geliştirmesi amaçlanarak VNB'nin kapsüllenmesinin antikanser aktivitesini arttıracağı ve kanser dışı hücrelerde inflamasyonu azaltılacağı hipotezi araştırılmıştır [30]. Çapı 215 ± 1.3 nm ve yüksek kapsülleme verimliliğine sahip (%89,76 ± %1,75) olan VNB, kopolimer NPler ile kapsüllenerek sentezleniştir. VNB içermeyen kopolimer NPler sitotoksik özellikte olmadıkları için sitokin salımını indüklememiştir. Ayrıca VNB'nin kopolimer NPlerde kapsüllenmesinin, insan alveolar epitelyal tip I benzeri hücrelerde IL-6 ve IL-8'in sitokinlerinin salımını sırasıyla %61 ve %80 oranında azalttığı bildirilmiştir

[30]. Bu sonuçlar, VNB'nin polimerik NPlerde kapsüllenmesinin sadece küçük hücreli akciğer kanseri tedavisini iyileştirmekle kalmayıp, aynı zamanda yan etkileri azaltarak hastanın yaşam kalitesini de iyileştireceğini göstermektedir [30].

Fototermal terapide ısı iletimi ve kontrollü ilaç salımı, birlikte kullanılmasının hedefe yönelik tümör tedavisinde kemoterapiden daha iyi etkinlik gösterdiği literatürde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ayrıca, kemoterapötik ilaçların fototermal tedaviden sonra kalan canlı kanser hücrelerini yok etme kapasitesi, aynı anda fototermal terapi ile non-invazif tümör ablasyonu gerçekleştirmesi ve tümör nüksü riskini azaltması; iyi bir çözüm olarak görülmektedir [166].

Tez kapsamında; sentezlenecek demir oksit nanopartiküllerin yüzeyi biyouyumlu bir polimer olan PDA ile enkapsüle edilecek, ardından biyouyumlu olan SH-PEG ile modifiye edilecek ve anti kanser ilaç olan Vinorelbin bu nanoyapıya yüklenecektir. Hazırlanan nanoyapının boyut etkisinden yararlanılarak tümöre pasif hedeflenmesi sağlanacaktır böylece Vinorelbin ilacının nanoyapıya yüklenmesi sonucunda oluşan nanoyapının 100 nm boyutundan küçük olması EPR etkisi ile kansere spesifik ilaç salımının gerçekleşmesini sağlanacağı öngörülmektedir. Nanoyapının EPR etkisi ile fototermal terapi uygulamasının birlikteliği sonucunda çoklu terapötik etkinlik sağlanması hedeflenmiştir.

3
DENEYSEL SÜREÇLER

Tez çalışması kapsamında; polidopamin kaplı manyetik özellikli demir oksit nanopartiküllerin (Fe_3O_4NP) hazırlanması ve antikanser ilaç olan Vinorelbinin bu nanoyapıya yüklenmesi (VNB/PDA/Fe_3O_4NP) amaçlanmaktadır. Hazırlanan nanoyapılar ile kemoterapi ve fototermal terapiyi birlikte içeren çok fonksiyonlu kanser tedavisinin gerçekleştirilebilmesi hedeflenmektedir. Deneysel çalışmalar; kemoterapi ve fototermal tedavileri entegre ederek kanser tedavisinde kullanılmak üzere uygun özelliklere sahip biyomalzeme geliştirilmesini, geliştirilen nanoyapıların karakterize edilmesini, biyouyumluluk, antikanser ve fototermal etkinliklerinin incelenmesini amaçlamaktadır.

Deneysel çalışmalar temel olarak üç bölüm halinde planlanmış olup aşağıda sunulmuştur;

1. Fe_3O_4NPlerin sentezlenmesi, karakterizasyon çalışmaları ve sonuçların değerlendirilmesi (Bölüm 4)
2. Fe_3O_4NPlerin yüzey modifikasyonları (PDA kaplanması ve PEGilasyon) ve antikanser ilacın nanoyapıya yüklenmesi, karakterizasyon çalışmaları ve sonuçların değerlendirilmesi (Bölüm 5)
3. İlaç salım özelliklerinin incelenmesi, ilaç salımına ait kinetik modellerin belirlenmesi, biyouyumluluk, fototermal ve antikanser etkinliğin incelenmesi ve sonuçların incelenmesi (Bölüm 6)

Bu kapsamda öncelikle Fe_3O_4NPlerin sentezine dair literatür çalışmaları incelenmiş ve değerlendirilmiştir. Literatür verilerinin değerlendirilmesi sonucunda solvotermal ve hidrotermal sentez yöntemleri en uygun sentez yöntemi olarak belirlenmiştir. Bu tercihin temel sebebi; sentez parametrelerinin değiştirilmesiyle şekil ve boyut kontrolünün etkin bir şekilde sağlanabilmesidir.

Hidrotermal ve solvotermal yöntemler kullanılarak Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezlenmesine yönelik olarak ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ön çalışmalar kapsamında farklı demir tuzları ile çöktürme ajanları, sıcaklık ve süre açısından etkileri incelenmiştir.

Elde edilen ön çalışma analiz verileri göre; $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ demir tuzları ile NH_4OH çöktürme ajanının kullanıldığı 200°C sıcaklık ve 12 saat süre koşullarında gerçekleştirilen solvotermal yönteme ait, Zeta Sizer boyut ölçüm sonucu 153,4 nm olarak bulunmuştur. Elde edilen bu sonucun; diğer sonuçlara göre en küçük nanoyapı boyutuna sahip olmasından dolayı, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezlenmesinde kullanılmasına ve parametrelerin optimize edilmesine karar verilmiştir. Optimum sentez koşulları (süre, sıcaklık, çöktürme ajanları) belirlendikten sonra farklı oranlarda polidopamin ile Fe_3O_4 nanopartikülleri enkapsüle edilmiş, ardından oluşan nanoyapının yüzeyine tiyol polietilen glikol (SH-PEG) kimyasal olarak bağlanmıştır. Antikanser ilaç olan Vinorelbin, hidrofobik etkileşimler aracılığıyla PDA yüzeyine adsorbe edilmiştir. Sentezlenen nanoyapılar Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM; Scanning Electron Microscope), Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskobu (STEM; Scanning Transmission Electron Microscope), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM; Field Emission Scanning/Transmission Electron), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu/ Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskobi Analizi (FE-SEM/EDX; Scanning Electron Microscope-Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy), X-Işını Difraktometresi (XRD; X-Ray Diffraction), Fourier Dönüşümü Kızılötesi (FT-IR; Fourier Transform Infrared Spectroscopy), Titreşimli Örnek Magnetometresi (VSM; Vibrating Sample Magnetometer), Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTA; Thermogravimetry and Differential Thermal Analysis) ve Ultraviyole ve görünür ışık spektrofotometre (UV-vis; Ultraviolet and Visible Light Spectrophotometer) analiz yöntemleri kullanılarak karakterize edilmiştir. Elde edilen karakterizasyon verileri kullanılarak sentezlenen ve hazırlanan nanoyapıların optimum özellikleri belirlenmiştir. Optimum özellikleri sağlayan nanoyapıların, *in vitro* ilaç salımı farklı pH koşullarında (pH: 5.5 ve 7.4) incelenmiştir. Ayrıca 808 nm dalga boyunda 1W çıkış gücüne sahip kızılötesi lazer kullanılarak fototermal ilaç salım, ısınma verimlilikleri ve stabilitesi araştırılmıştır. Yapılan *in vitro* ilaç salım sonuçları Sıfır Derece (Zero order), Birinci Derece (First order), Higuchu ve Hixson-Crowell modellerinin matematiksel eşitliklere uyumu değerlendirilmiştir.

Nanoyapının sitotoksisite ve antikanser etkinlik özellikleri L929 ve MCF-7 hücre hatları kullanılarak XTT ((2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-

Tetrazolium-5-Carboxanilide) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Fototermal terapinin antikanser hücre hattındaki etkisi araştırılmıştır. Sentezlenen VNB/PDA/Fe_3O_4NP, kemoterapi ve fototermal terapiyi birleştirerek sinerjik güçlü bir etki göstermiştir. Bu nedenle hazırlanan nanoyapının çok fonksiyonlu kanser tedavisi için etkili bir terapötik ajan olarak önemli potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Bu bölümde; deneysel çalışmalar kapsamında kullanılan kimyasallar, cihazlar ve analiz yöntemlerinin özellikleri sunulmuştur.

3.1 Kullanılan Kimyasallar

Bu bölümde deneysel çalışmalar kapsamında sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin ve yüzey modifikasyonunda kullanılan kimyasal malzemeler hakkında bilgi verilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar

Kimyasal Adı	**Kimyasal Formül**	**Molar Kütle (g/mol)**	**Marka**	**Cas No**
Demir (II) Klorür Tetrahidrat	$FeCl_2.4H_2O$	198.81	Sigma-Aldrich	13478-10-9
Demir (III) Klorür Hekzahidrat	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	270.30	Sigma-Aldrich	10025-77-1
Demir (II) Sülfat Heptahidrat	$FeSO_4.7H_2O$	278.01	Sigma-Aldrich	7782-63-0
Dopamin Hidroklorür	$(HO)_2C_6H_3CH_2$ $CH_2NH_2 \cdot HCl$	189.64	Sigma-Aldrich	62-31-7
Tris Hidroklorür (Tris-HCl)	$C_4H_{11}NO_3$	157.60	Merck	1185-53-1
Tiyol-Polietien Glikol	SH-PEG	Saflık ≥ 95%	Biopharma	68865-60-1
Amonyum Hidroksit	NH_4OH	35.05	Sigma-Aldrich	1336-21-6
Amonyum Asetat	CH_3COONH_4	77.08	Sigma-Aldrich	631-61-8
Sodyum Asetat Trihidrat	$CH_3COONH_4.3H_2O$	136.08	Sigma-Aldrich	6131-90-4
Amonyak	NH_3	17.03	Sigma-Aldrich	7664-41-7
Etilen Glikol	$C_2H_6O_2$	62.07	Merck	107-21-1
Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi	PBS (Phosphate Buffer Saline)	239.30	Thermo Fisher Scientific	003002

Tablo 3.1 Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar (devamı)

Vinorelbin Tartarat	$C_{53}H_{66}N_4O_{20}$	1079.11	Avrupa Farmakopi (Europ.Pharmacop. Ph. Eur)	Cat No: Y0000463
Etanol	CH_3CH_2OH	46.07	Merck	64-17-5
Hekzan	C_6H_{14}	86.178	Sigma Aldrich	110-54-3
Üre	NH_2CONH_2	60.06	Merck	57-13-6
Sodyum Sitrat	$HOC(COONa)(CH_2COOH)_2$	214.11	Sigma Aldrich	18996-35-5
Polivinilpirolidon	C_6H_9NO	10.000	Sigma Aldrich	9003-39-8

Hücre kültürü çalışmalarında; DMEM F-12 (Gibco), XTT Tuzu (2,3-Bis-(2 Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide, Chem Cruz), Phenazine methosulfate (PMS, Chem Cruz), L929 ve MCF-7 hücre hattı (ATTC), Tripsin %0,25 EDTA (Gibco) kullanılmıştır.

3.2 Kullanılan Cihazlar

Tez çalışması kapsamında Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezlenmesinde ve yüzey modifikasyonunda kullanılan cihazlar Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2 Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	**Marka/Model**
Etüv	Jp Selecta/2005141
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph Instruments/Mr Heistandard
Ultra Pure Su Cihazı	Ultra Pure Water/Direct-Q 3uv
Hassas terazi	And/Gr-200
pH-metre	Inolab/Ph 730
Vakumlu Etüv	Nüve-EV 018
Çalkalamalı İnkübatör	Microtest
Santrifüj Cihazı	Nüve/NF800R
Vorteks	Stuart-Vortex Mixer Sa8

3.3 Kullanılan Analiz Yöntemleri

Bu bölümde sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ve bu nanopartiküller kullanılarak hazırlanan nanoyapıların karakterizasyonu için kullanılan teknikler açıklanmıştır.

3.3.1 Morfolojik Analizlerde Kullanılan Yöntemler

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM; Scanning Electron Microscopy) analizi numunelerin yüzey morfolojisinin yüksek çözünürlükte incelenmesi amacıyla kullanılan bir görüntüleme tekniğidir [167].

SEM analizi, yüzeyin ayrıntılı olarak üç boyutlu görüntüsünü sağlayarak malzemelerin mikro yapısı, topografyası ve bileşiminin incelemesine olanak tanır. SEM cihazı temel olarak; bir elektron tabancası, dedektör, lens sistemi, kollektör, katot ışın tüpü ve diğer elektronik aksanları içerir [168].

SEM analizinde görüntü alınacak nanopartiküllerin ve nanoyapıların özelliklerine göre farklı tekniklerle numuneler hazırlanabilmektedir. Elektron mikroskopisinde numune hazırlığı her zaman kritik bir süreçtir. Özellikle elektriksel iletkenlik özelliğine sahip olmayan numuneler, analiz sırasında ortaya çıkan ısıdan cihazın hasar görmesinin engellenmesi için iletken bir tabaka ile kaplanmaktadır. Kaplama işlemi, incelenecek numune üzerinde ince bir metal tabakası oluşturarak görüntünün elde edilmesini sağlar [169].

SEM analizinde morfolojik görüntü elde edilmesinde rol oynayan diğer parametrelerden biri olan ivme gerilimi (kV), elektron ışınının enerjisini ifade eder ve daha yüksek voltajda daha iyi penetrasyon sağlar. Ancak bu durum numuneye de zarar verebilir. SEM analizinde önemli olan bir diğer parametre ise dedektör seçimidir. Kullanılan farklı dedektörler farklı sinyalleri yakalarlar. Örneğin; ikincil elektron (SE) dedektörleri genellikle yüzey görüntüleme için kullanılırken, geri saçılan elektron (BSE) dedektörleri bileşim bilgisi sağlarlar. Bu parametreler dışında büyütme, numunenin eğimi, çözünürlük oranı, çalışma mesafesi gibi farklı birçok faktör SEM analizinin performansı için önemlidir [168].

Alan Emisyon Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) analizi, bir örnek yüzeyinin yüksek çözünürlükteki detaylarını araştırmak için kullanılan elektron mikroskopi tekniklerinden biridir.

FE-SEM cihazında kullanılan düşük voltajlı elektron kaynağı sayesinde yüksek çözünürlüklü görüntülerin elde edilmesi sağlanır [167]. FE-SEM, nanoyapıların yüzey morfolojisini, inorganik ve organik malzemelerin katman ve yapılarını, partikül boyutlarının detaylı olarak incelenmesini sağlar. FES-EM analiz cihazının çalışma prensibi; yüksek enerjili elektron demeti kullanılarak numunenin yüzeyinin taranmasına ve böylece yansıyan elektron sinyallerinin toplanmasına dayanır. Bu sayede numune hakkında yüksek çözünürlükte detaylı görüntüler elde edilir [169].

Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskopi yöntemi olan STEM analizi nanopartiküllerin karakterizasyonu hakkında ileri bilgiler elde edilmesini sağlar [170]. Bu yöntem ile oldukça küçük alanlarda element analizi yapılmasının yanı sıra NPlerde iç yapılarla birlikte elementel haritalama ve dağılımın elde edilmesi de sağlanır [171].

Deneysel çalışmalar kapsamında elde edilen nanoyapıların morfolojik analizi; Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM, Zeiss EVO LS 10), Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM, Thermo Scientific, Apreo 2S LoVac) ve Taramalı Transmisyon Elektron Mikroskobu (STEM, Phillips XL, 30 ESEM-FEG/EDAX) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküllerin ortalama boyutları ImageJ programı kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.2 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu/ Enerji Dağılımlı X-Işın Spektroskopi Analizi (FE-SEM/EDX)

FE-SEM/EDX analizi, numunenin elementel bileşimini belirlemek amacıyla kullanılan tekniklerden biridir. Bu teknik, malzemenin içinde bulunan elementlerin tespitini ve miktarlarının değerlendirilmesini sağlar [172].

EDX; örnek üzerine düşen X-ışınlarının, örnek içindeki atomlardan çıkarak karakteristik enerji seviyelerine sahip X-ışınları üretmesi prensibine dayanır. EDX, bu karakteristik enerji seviyelerini analiz ederek nanoyapı içerisinde bulunan elementlerin belirlenmesini sağlar [169].

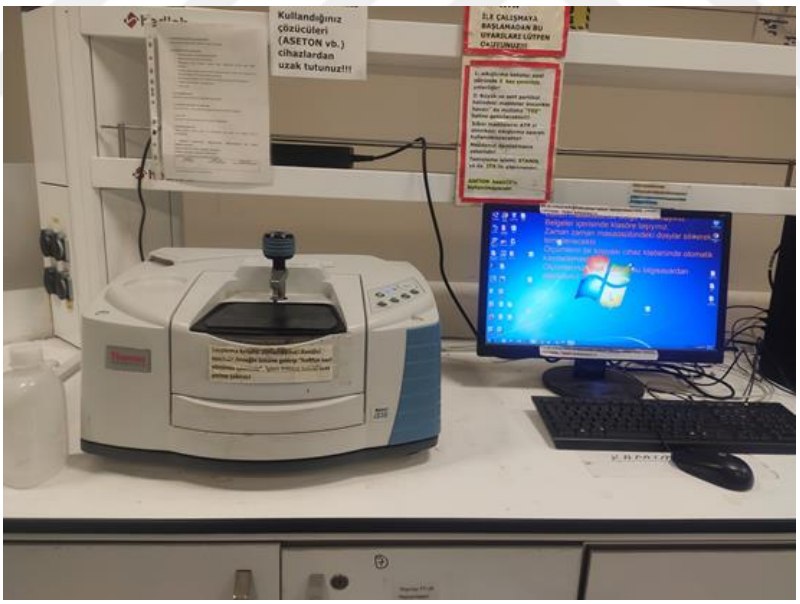
Nanoyapıların elementel bileşiminin incelenmesi amacıyla enerji dağılımlı X-ışını spektrometresi (EDX) ile donatılmış Zeiss EVO LS 10 alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (FE-SEM) kullanılarak EDX analizi yapılmıştır.

3.3.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi Analizi (FT-IR)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) analizi, malzemenin içindeki kimyasal bağları, fonksiyonel grupları ve moleküler yapıları tespit etmek için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca, nanoyapıların yüzeyindeki fonksiyonel grupları, malzemenin reaktivitesini ve yüzey etkileşimlerinin belirlenmesi sağlar. Bu analiz yöntemi, bir örneğin belirli dalga boylarındaki ışığı emmesi veya yayması sonucunda moleküler grupları ve bağları hakkında bilgi sağlar (Şekil 3.1) .

FT-IR cihazının çalışma prensibi 4 adımdan oluşmaktadır.

1. Işıma: Analiz edilecek olan örnek cihazın kızılötesi ışını (IR) ile ışınlanır.
2. Emilim: Örnekteki moleküler gruplar, kızılötesi ışığı belirli dalga boylarında absorbe eder.
3. Dedektör Algısı: Dedektör, absorbe edilen ışığı algılar ve bu bilgi bir spektrum olarak kaydedilir.
4. Fourier Dönüşümü: Elde edilen veri, Fourier dönüşümü ile dalga boylarına ayrılır ve bir spektrum oluşturulur.



Şekil 3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) cihazına ait görüntü

Analiz sonucunda elde edilen spektrum, örnekteki moleküler grupların kimyasal bağ yapıları hakkında bilgi verir. Özellikle, sentezlenen nanopartiküllerin FT-IR analizi, bu nanopartiküllerin yüzey özellikleri, kaplama malzemeleri, kimyasal bağ yapıları ve moleküler özelliklerinin anlaşılmasında kritik bir rol oynar [173].

FT-IR analizi, sentez sürecinde kullanılan reaktanların ve kaplama maddelerinin etkileşimlerini değerlendirmek ve nanopartikül özelliklerini detaylı bir şekilde karakterize etmek için önemlidir.

Bu nedenle, sentezlenen nanoyapıların, nanoyapılara uygulanan modifikasyonların ve ilaç yüklenen nanoyapıların spektrumları FT-IR cihazında (Thermo, Nicolet Is 10) 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında ölçülerek belirlenmiştir.

3.3.4 X-ışını Kırınım Analizi (XRD)

X-ışını Kırınım (XRD) analizi, malzemenin atomik düzeninin, kristal yapısının, kristal boyutunun ve kristal yöneliminin tespit edilmesinde kullanılan bir tekniktir [174].

XRD analizinde, numuneye gönderilen X ışını malzeme içerisinde atom ve kristal yapı ile etkileşime girmesi sonucunda, X ışınları belirli açılarda farklı yoğunluklarda saçılır ve bir desen oluşturur. Oluşan bu desen, numunenin kristal yapısının, atomik aralıklarının ve malzemenin içsel yapılarının belirlenmesini sağlar (Şekil 3.2) [169], [175]. XRD analizi, nanopartiküllerin olası kristal yapılarını, kristal fazlarını ve bu yapıların düzenliliğini değerlendirir.

Tez çalışması kapsamında; sentezlenen nanopartiküllerin XRD analizi, sentezlenen nanopartiküllerin kristal yapısı, fazları ve kristallik derecesinin belirlenmesi amacıyla Cu-Kα radyasyonu (λ=0.15418 nm) ve 10° ila 90° arasında 2θ değerleri kullanılarak PANalytical, Xpert Pro cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.5 Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analizi (TG/DTA)

TG/DTA analizi, numunenin termal davranışlarının karakterize edilmesi, kimyasal ve fiziksel değişimlerinin tespit edilmesi, malzeme veya bileşenlerin termal kararlılığı, bozunma sıcaklıkları, nem içeriği gibi özelliklerinin incelenmesi için kullanılan bir karakterizasyon yöntemidir [176].

Bundan dolayı nanopartiküllerin belirli sıcaklık aralıklarında meydana gelen termal ve ağırlık değişikliklerini incelemek amacıyla Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTA) yapılmıştır. Nanoyapıların termal bozunma davranışının araştırılması, 30-1000°C sıcaklık aralığında ve azot atmosferi altında Perkin Elmer, Diamond TG/DTA cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.3.6 Zeta Sizer Analizi

Zeta sizer analizi, NPlerin boyutunu, yüzey yükünü (zeta potansiyel) ve dispersiyon özelliklerini belirlemek için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, sıvı ortamda partiküllerin birbirleriyle olan etkileşimlerini lazer ışığı saçarak ve bu ışığın dağılımını ölçerek partikül boyutunu ve dağılımını (Polydispersity Index-PDI) belirlemeye olanak tanır [167].

PDI değeri, Polidispersite İndeks olarak adlandırılmaktadır ve ölçümü yapılan numunenin boyut dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Bu kapsamda PDI ifadeleri 3 gruba ayrılır.

1. PDI değeri 0.3'ten küçük ise ölçümü yapılan numune yüksek düzeyde monodispers yapıya sahiptir.
2. PDI değeri; 0.4-0.5 aralığında ise ölçümü yapılan numune orta düzeyde monodispers yapıya sahiptir.
3. PDI değeri 0.5'ten büyük ise ölçümü yapılan numune yüksek düzeyde polidispers yapıya sahiptir [177].

Zeta Sizer cihazı ile ölçülen bir diğer değer olan zeta potansiyeli, numunenin içerisinde bulunan parçacıkların arasındaki etkileşimin miktarı ile parçacığın içinde bulunduğu dispersant parçacığının yüzeyine belirli bir uzaklıkta olan yüktür. Zeta potansiyeli ölçümleri, numunenin kararlılığını değerlendirmek için kullanılır [177], [178].

Sentezlenen nanoyapıların Zeta analizi ile boyutlarının belirlenmesi amacıyla, Zeta Sizer (Malvern Zetasizer MPT-2) cihazı ve DTS-1070 küveti kullanılarak ölçümler alınmıştır.

3.3.7 Titreşimli Numune Manyetometre Analizi (VSM)

Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM, Vibrating Sample Magnetometer) malzemenin manyetik özelliklerinin incelenmesi amacıyla kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem malzemenin manyetik alan içindeki davranışını ölçerek, malzemenin manyetik özelliklerinin karakterize edilmesini sağlar [179].

VSM analizi ile bir malzemenin manyetik alan karşısındaki mıknatıslanma eğrisi belirlenir ve bu eğri, malzemenin doyma manyetizasyonunu, koersitiv alanını ve manyetik histerizis döngüsünü gösterir [174].

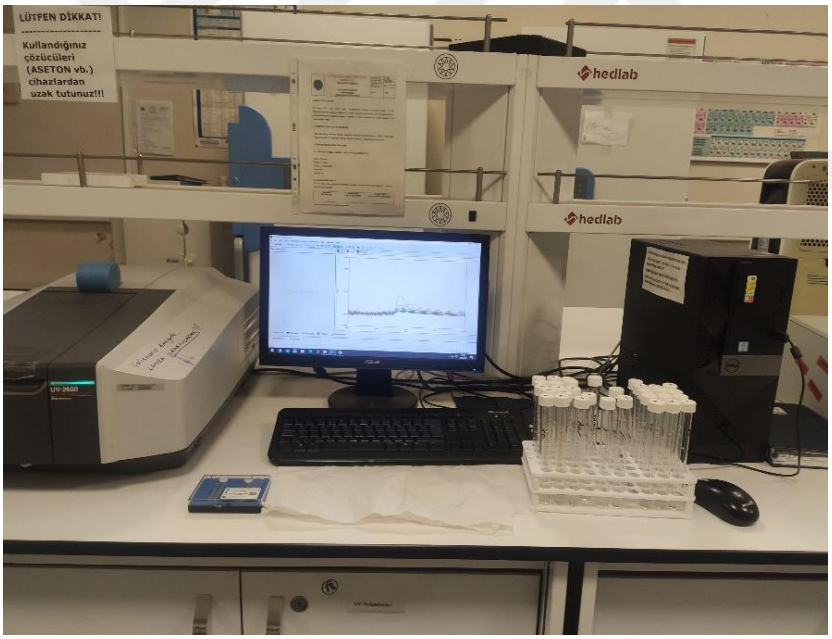
Sentezlenen ve modifiye edilen nanoyapıların manyetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, 298°K'de alan kaynaklı mıknatıslanma ölçümleri kullanılarak VSM analizi (Lake Shore, Model 7410) gerçekleştirilmiştir.

3.3.8 Ultraviyole ve Görünür Işık Spektrofotometre Analizi (UV-Vis)

UV-vis spektrofotometre; numunenin 200 ile 800 nanometre arasında analiz edilen numunenin ışığı emme yeteneğini ve absorpsiyon özelliklerini ölçmek için kullanılan bir analiz yöntemidir.

Bu yöntem, bir numune içindeki bileşenlerin miktarının belirlenmesi veya kimyasal tepkimelerin tespiti amacıyla yaygın olarak kullanılır [169].

Tez çalışması kapsamında; VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin *in vitro* ilaç salım çalışmalarında salınan kümülatif ilaç miktarların tespit edilmesi amacıyla 200-800 nm dalga boyu aralığına sahip olan UV-vis spektrofotometre (Shimadzu Scientific Instruments, UV-1800) cihazı kullanılarak ölçümler alınmıştır (Şekil 3.3).



Şekil 3.2 UV-vis cihazına ait görüntü

Ayrıca Vinorelbin ilacının kalibrasyon eğrisinin oluşturulmasında, ilaç yükleme kapasitesinin tespit edilmesinde ve ilaç salım kinetik modellerinin Sıfır Derece (Zero Order), Birinci Derece (First Order), Higuchu ve Hixson-Crowell oluşturulması amacıyla da UV-Vis spektrofotometre analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.9 Fototermal Etkinlik Analizi

Tez kapsamında fototermal etkinlik çalışmaları 808 nm dalga boyuna ve 1W çıkış gücüne sahip olan kızılötesi lazer (NIR, Near Infrared Laser, model GLP-808, Changchun New Industries Optoelectronics Technology Co.,Ltd.,P.R China) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

NIR lazer uygulama sonrası oluşan sıcaklık değişimleri kızılötesi termal görüntüleme kamerası kullanılarak (Ti27; Fluke Corporation, Everett, WA, ABD) kaydedilmiştir.

3.3.10 İstatiksel Analiz

Origin Pro 8.5 (Origin Lab, MA, ABD) programı kullanılarak istatistiksel analizler ve grafikler oluşturulmuştur. 0,05'ten küçük bir p değeri ($*p < 0,05$, $n=4$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir

4

Fe_3O_4 NANOPARTİKÜLLERİNİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi için literatürde birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemler; birlikte çöktürme, termal ayrışma, mikroemülsiyon, biyosentez, kolloidal sentez, hidrotermal ve solvotermal gibi oldukça çeşitlidir.

Literatür çalışmalarının incelenmesi sonucunda, Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi için en uygun yöntemler olarak hidrotermal ve solvotermal sentez yöntemleri belirlenmiştir. Bu seçimin temel nedeni; solvotermal ve hidrotermal yöntemlerin, sentez parametreleri ile daha iyi şekil ve boyut kontrolü sağlamalarıdır.

Tez çalışması kapsamında; kanserli dokuların fototermal tedavisinde kullanılacak olan nanoyapının, EPR etkisi sağlayarak tümöre spesifik özellikte olması amacıyla 100 nm'nin altında olması hedeflenmiştir. Bundan dolayı boyutun kontrol edilebilmesi oldukça önemlidir. Bu amaçla belirlenen yöntemler ile boyutun 100 nm altında olması için Fe_3O_4 NPlerin ön sentez çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.1 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentezlenmesinde Yapılan Ön Çalışmalar

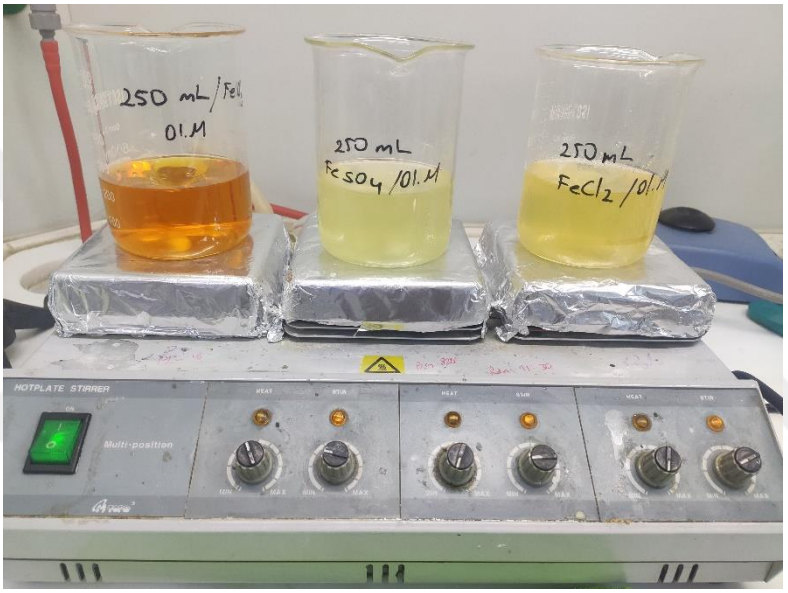
Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi başlangıç olarak hidrotermal ve solvotermal yöntemlerle yapılmıştır. Hidrotermal yöntem, su esaslı bir çözücü ortamında gerçekleşen kimyasal bir sentez yöntemidir. Bu yöntem, yüksek sıcaklık ve basınç gerektiren iki önemli proses koşulunu içermektedir. Sentez işlemi, yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklı sızdırmaz çelik silindir kaplarda veya otoklavlar içinde gerçekleştirilmektedir.

Deneysel çalışmalarda kullanılan bir diğer üretim yöntemi, solvotermal sentez yöntemidir. Bu yöntemde nanopartiküllerin boyut dağılımı ve kristalliği, proses parametrelerinin ayarlanmasıyla kontrol edilebilir [89].

Sentezin başlangıcında öncül malzeme, genellikle bir çözücü içinde (örneğin, n-bütil alkol, etilen glikol gibi) çözülür [118]. Reaksiyonlar, solventin kaynama

noktasının üzerindeki sıcaklıkta ve belirli bir basınç altında otoklav içerisinde gerçekleştirilir. Hidrotermal yöntem ile solvotermal yöntem, işlem basamakları açısından benzerlik gösterir.

Hidrotermal ve solvotermal sentez yöntemi için Tablo 4.1'de belirtilen demir tuzları belirli oranlarda tartılmıştır. Sentez yöntemine göre solvotermal yöntemde etilen glikol, hidrotermal yöntemde distile su kullanılarak demir tuzları manyetik karıştırma altında çözündürülmüştür (Şekil 4.1). Farklı çöktürücü ajanlar büret yardımı ile hazırlanan karışımın üzerine eklenmiştir. Karışım homojen hale gelene kadar karıştırılmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.1 Solvotermal ve hidrotermal yöntem : Farklı demir tuzları ile sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait deneysel görüntü

Homojen hale gelen karışım reaktör kabına konulmuştur. Belirlenmiş olan süre ve sıcaklıklarda etüvde reaksiyon işlemi uygulanmıştır. Bu süreçte etüvün kapağının açılmaması sağlanarak sıcaklık muhafaza edilmiştir.

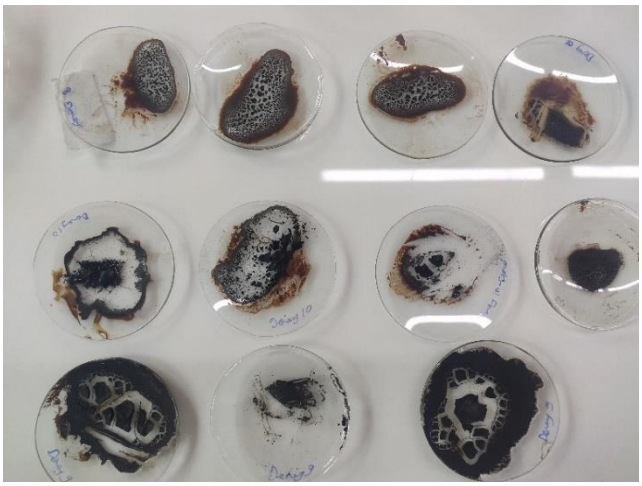
Tablo 4.1'de sunulan parametreler kullanılarak Fe_3O_4 nanopartikülleri reaksiyon süresi, sıcaklık, çöktürme ajanları gibi parametrelerin ve en uygun üretim koşullarının belirlenebilmesi amacıyla hidrotermal ve solvotermal yöntemlerle sentezlenmiştir.

Tablo 4.1 Hidrotermal ve solvotermal sentez yöntemlerine ait deneysel parametreler

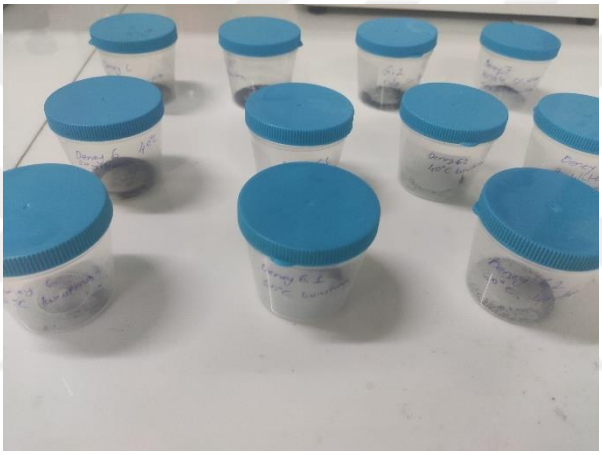
Deney Adı	**Başlangıç Malzemesi**	**Çöktürme Ajanı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (saat)**
Deney 1-H/Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	180	24
Deney 2-H/Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	24
Deney 3-H/Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	200	24
Deney 4-H/Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	180	24
Deney 5-H/Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	24
Deney 1-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	200	12
Deney 2-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	200	18
Deney 3-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	$NaAc.3H_2O$	180	16
Deney 4-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	24
Deney 5-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	12
Deney 6-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	24
Deney 7-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4Ac NH_4OH	200	12
Deney 8-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4Ac	200	16
Deney 9-S/Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	12

4.2 Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentezlenmesinde Yapılan Ön Çalışma Sonuçlarının İncelenmesi

Hidrotermal ve solvotermal yöntemleriyle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin deneysel çalışmaların tamamlanmasının ardından örneklere yıkama ve kurutma işlemleri uygulanmış ve sonrasında Zeta Sizer cihazı kullanılarak boyut analizi yapılmıştır (Şekil 4.2-4.3).



Şekil 4.2 Hidrotermal ve solvotermal yöntemle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin kurutma sonrası görüntüsü



Şekil 4.3 Hidrotermal ve solvotermal yöntem sonrası numune kaplarında depolanmış Fe_3O_4 nanopartiküllerinin görüntüsü

Fe_3O_4 nanopartikül boyutlarına ait Zeta Sizer sonuçları Tablo 4.2'te sunulmuştur. Analizlere ait cihaz verileri, Zeta Sizer Cihazına Ait Veri Dataları başlığı altındaki EK-A bölümünde detaylı olarak sunulmuştur. Her iki sentez yönteminin boyuta olan etkilerinin araştırılması amacıyla nanopartiküller incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda literatür bilgisi kullanılarak 180-200°C sıcaklık ve 12,16, 18 ve 24 saat sentez süreleri esas alınarak çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Tablo 4.2 Zeta Sizer boyut analiz sonuçları

Deney Adı	**BaşlangıçMalzemesi**	**Çöktürme Ajanı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (saat)**	**Boyut (nm)**	**PDI**
Deney 1-H Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	180	24	3624	0,409
Deney 2-H Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	24	2973	0,347
Deney 3-H Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	200	24	1713	0,946
Deney 4-H Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	180	24	1405	0,341
Deney 5-H Hidrotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	24	1337	0,343
Deney 1-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	200	12	2973	0,347
Deney 2-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	NH_4Ac	200	18	3164	0,449
Deney 3-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$	$NaAc.3H_2O$	180	16	1713	0,946
Deney 4-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	24	3614	0,449
Deney 5-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeSO_4.7H_2O$	NH_4OH	180	12	1959	0,535
Deney 6-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	24	815	0,218
Deney 7-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4Ac NH_4OH	200	12	207,5	0,230
Deney 8-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4Ac	200	16	177,2	0,178
Deney 9-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH_4OH	200	12	153,6	0,212

Literatürde Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezi üzerinde çeşitli tuzların veya çöktürme ajanlarının etkisiyle ilgili benzer çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalar, farklı demir tuzu ve çöktürme ajanlarının konsantrasyonu, reaksiyon pH'ı, demir tuzlarının eklenme sırası, karışım hızı gibi parametreleri içermekte olup, oluşan demir oksit nanopartiküllerinin özelliklerini etkileyebileceği gösterilmiştir [180], [181]. Fe_3O_4 nanopartikül sentezinde kullanılan $FeCl_3$ ve $FeCl_2$ gibi farklı demir tuzlarının kullanımı, sentezlenen demir oksit nanopartikül özelliklerini etkilemektedir [182]. $FeCl_3$'ün yüksek çözünürlüğe sahip olması, daha hızlı bir reaksiyon oluşmasına neden olur. Bu hızlı reaksiyon sonucunda büyük ve polidispers boyutlarda nanopartiküllerin oluşumu ortaya çıkar [181]. Buna karşılık, Fe_3O_4 nanopartikül sentezinde öncül olarak reaksiyona ikincil bir demir tuzunun eklenmesi, reaksiyonun kimyasal dengesini veya kinetiğini değiştirir. Böylece reaksiyona eklenen $FeCl_2$ demir tuzu, reaksiyon koşullarını ve demir oksit

oluşumunu etkiler. Bu değişiklik, daha homojen boyutlu ve düşük PDI'lı nanopartiküllerin sentezlenmesine olanak sağlar.

Fe_3O_4 manyetit nanopartiküllerin oluşması için, Fe^{2+}/Fe^{3+} oranı 1/2 ve reaksiyon pH 9'un üzerinde olmalıdır [183], [180]. Çünkü demirli tuz iyonlarının reaksiyona katılımını pH:9 ve üzerinde gerçekleşir, eğer daha düşük bir reaksiyon pH'ı kullanılırsa, reaksiyona sadece demir tuzunun iyonları katılacak ve bunun sonucunda goetit [FeO(OH)], akaganeit (β-FeOOH) ve diğer demir oksihidroksitlerin oluşumu gerçekleşecektir [183], [184]. Oksihidroksitin türü, reaksiyon sırasında pH değerinden etkilenir ve farklı alkali çöktürme ajanlarının oluşturduğu pH değerleri ile Fe^{2+}/Fe^{3+} iyon oranları farklı oluşum mekanizmalarının gerçeklemesini sağlar [183].

Çeşitli demir tuzlarının kullanıldığı çalışmalar, farklı çekirdek oluşum mekanizmaları ve büyüme hızları üzerinde etkili olur. Bu büyüme mekanizmaları kullanılan Fe tuzlarının çekirdek oluşumu için farklı çekirdeklenme (nucleation) süreçlerine veya reaksiyon hızlarının oluşumuna neden olur [185], [186]. Böylece farklı boyutlarda ve dağılımlarda nanopartiküllerin sentezlenmesine yol açar. Bu bağlamda, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve $FeCl_2$ kullanılarak yapılan bir çalışmada, yüksek çözünürlüğe sahip ve daha düşük çözünürlüğe sahip tuzların kullanımı, farklı büyüme kinetiklerine ve sonuç olarak farklı boyutlarda nanopartiküllerin sentezlenmesine neden olduğu gösterilmiştir [180].

Tablo 4.3 Solvotermal sentez yöntemiyle gerçekleştirilmiş ön çalışma sonuçlarına ait veriler

Deney Adı	**Başlangıç Malzemesi**	**Çöktürme Ajanı**	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (saat)**	**Boyut (nm)**	**PDI**
Deney 6-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH4OH	200	24	815	0,218
Deney 8-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH4Ac	200	16	177,2	0,178
Deney 9-S Solvotermal	$FeCl_3.6H_2O$ $FeCl_2.4H_2O$	NH4OH	200	12	153,4	0,409

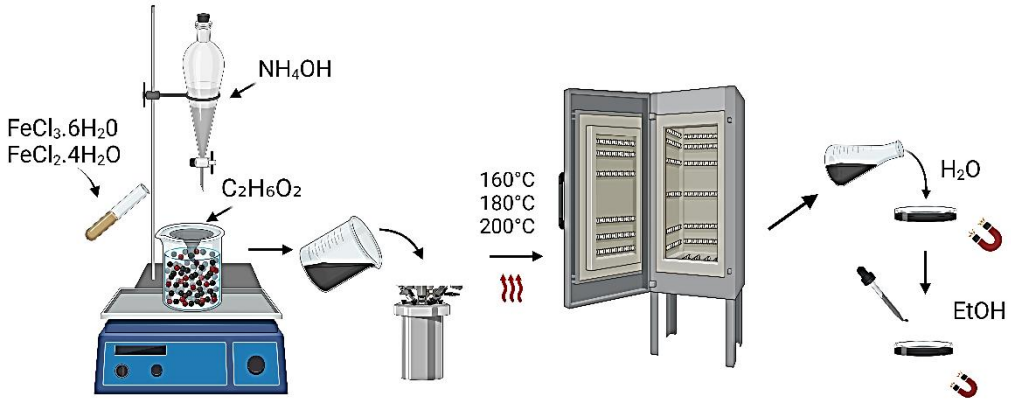
Elde edilen verilerin değerlendirilmesi sonucunda sentez yöntemi olarak Tablo 4.3'te sunulan sentez yöntemlerinden Deney 9-S kodlu çalışmanın deneysel koşullarının kullanılmasının uygun olacağı belirlenmiştir. Bu kapsamda; başlangıç maddeleri olarak $FeCl_3.6H_2O$ ile $FeCl_2.4H_2O$ tuzları ve çöktürme ajanı olarak NH_4OH kullanılmasına karar verilmiştir.

Tablo 4.3'te sunulan 200°C'de yapılan çalışmalara ait Zeta Sizer boyut analiz verilerine göre; 12 saat sonunda 153,4 nm; 16 saat sonunda 177,2 nm ve 24 saat sonunda ise 815 nm boyut değerleri ölçülmüştür. 200°C gibi sıcaklıklar, düşük bir sıcaklığa göre daha hızlı bir çekirdeklenme oluşumuna yol açmaktadır [183]. Bu durum daha fazla çekirdeklenmeyi sağlayarak daha kısa bir büyüme aşamasına ve dolayısıyla daha küçük nanopartiküllerin oluşumuna yol açar, ayrıca artan süre ise aglomerasyonu arttırabilmektedir [185], [187].

Tez kapsamında sıcaklığın boyuta olan etkisinin de araştırılması amacıyla 160°C, 180°C ve 200°C sıcaklıklarda, 3, 6, 9, 12, 15 ve 18 saat sürelerde Deney 9-S parametreleri kullanılarak sentez yapılması planlanmıştır.

4.3 Nanopartiküllerin Solvotermal Yöntem ile Sentezlenmesi

Fe_3O_4 nanoyapıların sentezi için Tablo 4.3'te sunulan veriler temel alınarak solvotermal yöntem seçilmiştir. Proses parametreleri olarak 160°C, 180°C, 200°C sıcaklık ve 3, 6, 9, 12, 15, 18 saat süreleri belirlenmiş olup, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin boyutu üzerindeki etkileri incelenmiştir. Tümör sistemlerinde efektif olarak kullanılabilmesi için nanopartiküllerin 100 nm boyutundan küçük sentezlenmesi hedeflenmiştir. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi için kullanılan solvotermal yöntemin aşamaları Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.4 Solvotermal yöntemi ile sentezlenen Fe_3O_4NPlerin üretim aşamaları

$FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ demir tuzları 2:1 mol oranında etilen glikol içerisinde hazırlanmış ve manyetik karıştırıcı kullanılarak çözündürülmüştür. Homojen hale gelen karışımın üzerine NH_4OH büret yardımı ile eklenerek 800 rpm'de karıştırılmıştır.

Bu esnada turuncu çözelti renginin siyaha dönüşmesi gözlenmiştir. Renk değişimi oluşumunun ardından çözelti homojen hale gelene kadar 30 dk boyunca karıştırılmıştır. Homojen hale gelen karışım reaktör kabına yerleştirilmiş (Şekil 4.5) 160°C, 180°C, 200°C sıcaklıklarda ve 3, 6, 9, 12, 15 ve 18 saatlik sürelerde etüv içerisinde reaksiyon işlemi uygulanmıştır.



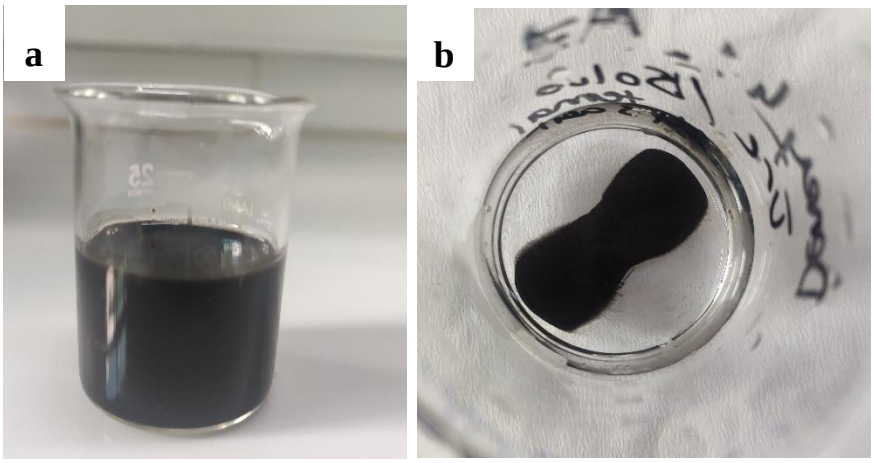
Şekil 4.5 Sentez reaktörü ve parçaları

Bu süreçte etüvün kapağı açılmamış ve sıcaklık muhafaza edilmiştir. Reaksiyon sonrası oluşan karışım, oda sıcaklığına soğuyana kadar bekletilmiş, reaktör oda sıcaklığına soğuduktan sonra teflon kap açılarak içerisindeki karışım behere aktarılmıştır.

Bir süre bekletildikten sonra beherin alt kısmına mıknatıs temas ettirilerek çöktürülen Fe_3O_4 nanopartikülleri manyetik etki ile ayrıştırılmış ve geriye kalan sıvı atık dökülmüştür.

Manyetik olarak toplanan Fe_3O_4 nanopartikülleri mıknatıs kullanılarak iki aşamalı yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Birinci aşamada reaksiyona girmeyen fazla ürünlerin uzaklaştırılması amacıyla distile su ile 3 kez yıkama işlemi yapılmış ve oluşan nanopartiküller manyetik olarak ayrıştırılmıştır (Şekil 4.6).

Bu işlemin ardından etanol ile 3 kez tekrar yıkama işlemi uygulanmış, elde edilen nanopartiküller vakumlu etüvde 55°C sıcaklıkta kurutulmuştur.



Şekil 4.6. Fe_3O_4NPlerin manyetik etki ile ayrılması: a) Mıknatıslanma öncesi, ve b) Mıknatıs yardımıyla manyetik nanopartiküllerin ayrılması

Kurutma işleminin ardından nanopartiküller, deney kodları yazılmış numune kaplarına alınarak karakterizasyon çalışmaları için saklanmıştır. Deneysel çalışmalar sonucu elde edilen nanopartiküller; SEM, STEM, FT-IR ve XRD yöntemleri ile incelenmiştir. Bu yöntemler aracılığıyla nanopartiküllerin fiziksel ve kimyasal özellikleri detaylı bir şekilde karakterize edilmiştir. Analiz sonuçları değerlendirildikten sonra uygun özelliklere sahip nanoyapılar belirlenerek yüzey modifikasyon işlemlerine geçilmiştir.

4.4 Solvotermal Yöntemde Sıcaklık - Süre Etkisinin İncelenmesi

Solvotermal sentez yöntemi, nanopartiküllerin üretilmesinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde öncü olarak Fe (III) tuzu kullanılmıştır. Fe^{3+} iyonları ve hidroksil grupları arasındaki reaksiyon, demir hidroksit kolloidal çözeltisinin oluşumunu göstermektedir. Demir hidroksit kolloidal çözelti oluşum reaksiyonu reaksiyon (4.1)'e göre ilerlemektedir:

$$Fe^{3+} + 3OH^- \rightleftharpoons Fe(OH)_3 \quad (4.1)$$

Reaksiyon karışımında Fe^{3+} ile Fe^{2+} iyonlarının bir arada bulunması, reaksiyon (4.2)'ye göre Fe_3O_4 (manyetit) oluşumunu sağlamaktadır:

$$2Fe(OH)_3 + Fe(OH)_2 \rightleftharpoons Fe_3O_4 + 4H_2O \quad (4.2)$$

Solvotermal yöntemde çekirdeklenmenin ilk aşaması, heterojenliğin ortaya çıkmasıyla başlamaktadır. Bu oluşum mekanizması; ortamdaki amonyağın buharlaşması sonucunda oluşan gaz kabarcıklarının, heterojen çekirdeklenmeyi oluşturmasına dayanır. İkinci aşamada; çözeltideki katı partiküller oluştuktan sonra,

partikülün yüzey polarizasyonu nedeniyle büyümeyi seçici olarak etkileyebilecek başka bir mekanizma aktif hale gelir. Bu mekanizmada; reaksiyon sırasında ısının nanoparçacıkların yüzeyinde üretilmesi nedeniyle yerel sıcaklık gradyanı, reaksiyon (4.2)' de açıklanan hidroksit-oksit dönüşümünü oluşturmaktadır [5].

Solvotermal sentez yönteminde etilen glikol kullanılması; sulu çözeltilerdeki hızlı çekirdeklenmenin aksine, partikül yüzeyinde daha az hidroksil grubu ve çözeltide daha yüksek viskozite oluşturmaktadır. Bundan dolayı etilen glikol içinde agregasyon, kinetik olarak daha yavaş oluşmaktadır. Böylece nanoyapıların daha düşük enerjili bir ara yüzey konfigürasyonu ve monodispers bir yapı oluşmasını sağlamaktadır [120]. Solvotermal yöntemde; sıcaklık ve çözelti bileşimi gibi doğrudan kontrol edilebilen koşulların yanında, reaksiyon ortamının basıncı, kap dolum seviyesi, solvent tipi ve reaksiyon sıcaklığı gibi diğer parametreler de nanopartikül oluşumuna etki etmektedir [7]. Bu sebeple deneysel çalışmalarda kullanılan kap doldurma seviyesi sabit tutulduğundan, sentez sırasında reaksiyon kabında oluşan basınç, reaksiyonun sıcaklığı ve süresine göre oluşmaktadır.

Fe_3O_4 nanopartikülleri bölüm 4.3'te belirtildiği şekilde sentezlenmiştir. Sentez şeması Şekil 4.4'te sunulmuştur.



Şekil 4.7 Solvotermal yöntemle Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentez aşamaları

Sentezleme işleminin ardından numuneler etüv içerisinde kurutulmuştur. "Bölüm 3.3 Analiz Yöntemlerinde açıklanan SEM, STEM, XRD ve FT-IR analizleri kullanılarak sentezlenmiş olan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

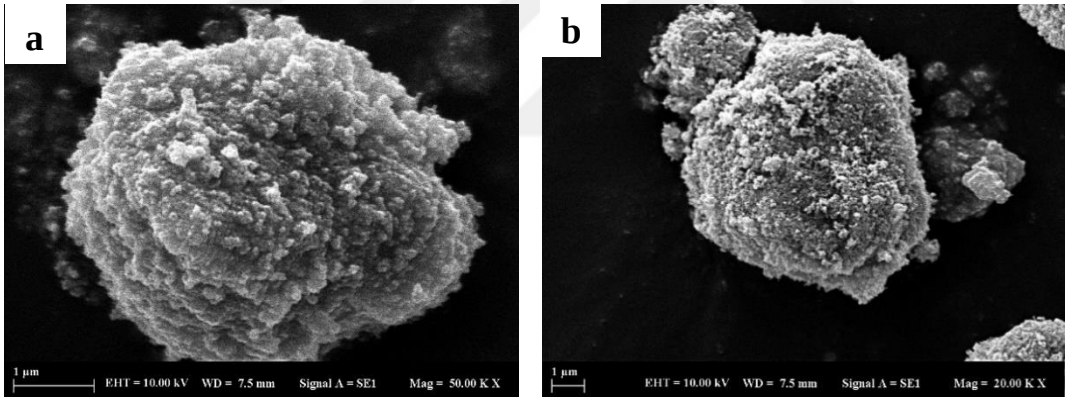
4.4.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analiz Sonuçları

Sentezlenen nanoyapıların morfolojisini ve boyutunu incelemek amacıyla Zeiss EVO LS 10 SEM cihazı kullanılmıştır.

Tablo 4.4 SEM analizinde kullanılan Fe_3O_4NPlerin sentez parametreleri

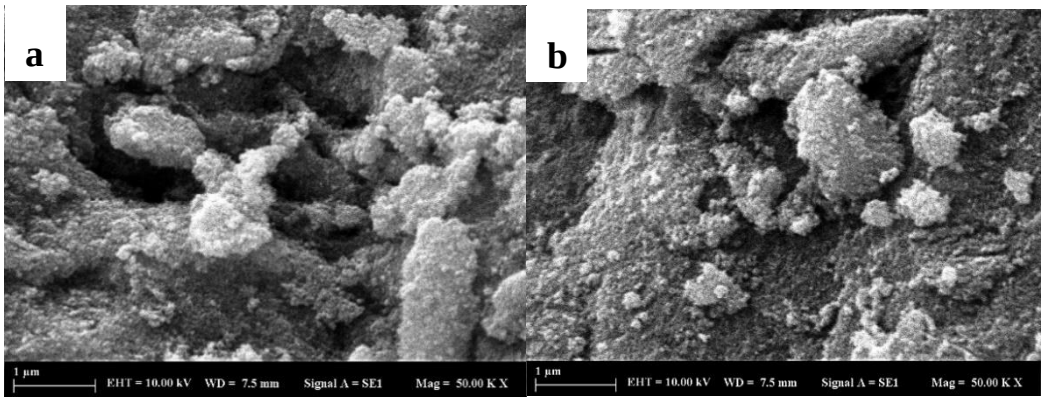
Sıcaklık (°C)	**Süre (saat)**
160	6
	12
	18
180	6
	12
	18
200	6
	12
	18

160, 180 ve 200°C sıcaklıkta sentezlenmiş olan numunelerin SEM analizleri yapılmış ve elde edilen sonuçlar aşağıda sunulmuştur (Şekil 4.8- 4.17).



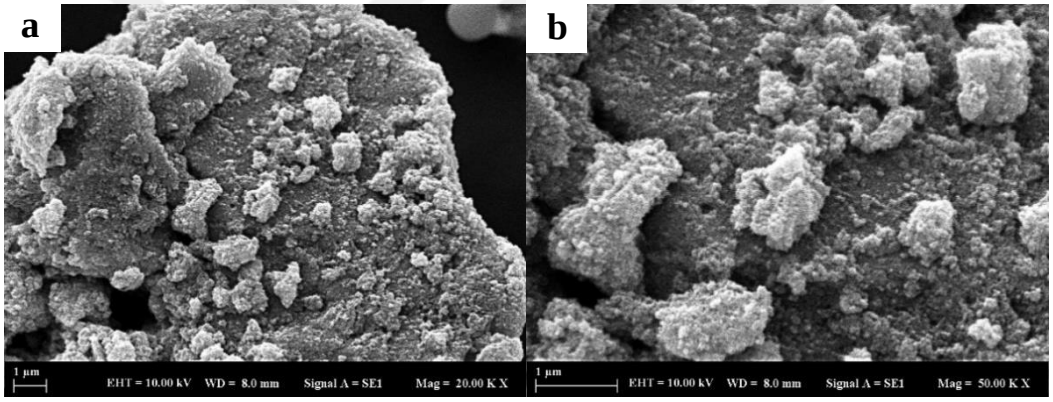
Şekil 4.8 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

160°C ve 6 saat boyunca sentezlenen NPlerin SEM sonuçlarına göre sıcaklığın nanoyapıların sentezlenebilmesi için yetersiz geldiği görülmüştür. Şekil 4.8'de sunulduğu üzere nanopartiküllerin topak halinde olduğu ve aglomerasyon yapısı gösterdiği tespit edilmiştir.



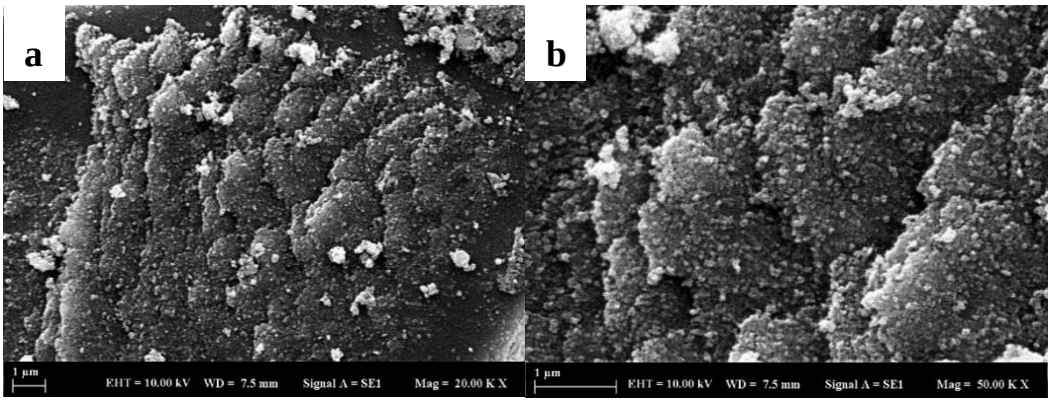
Şekil 4.9 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a-b) 50.000X

160°C ve 12 saat boyunca sentezlenen NPlerin aglomere olmuş yapısı Şekil 4.9'da görülmektedir. Sıcaklığın ve sürenin sentez oluşumu için yetersiz geldiği tespit edilmiştir.



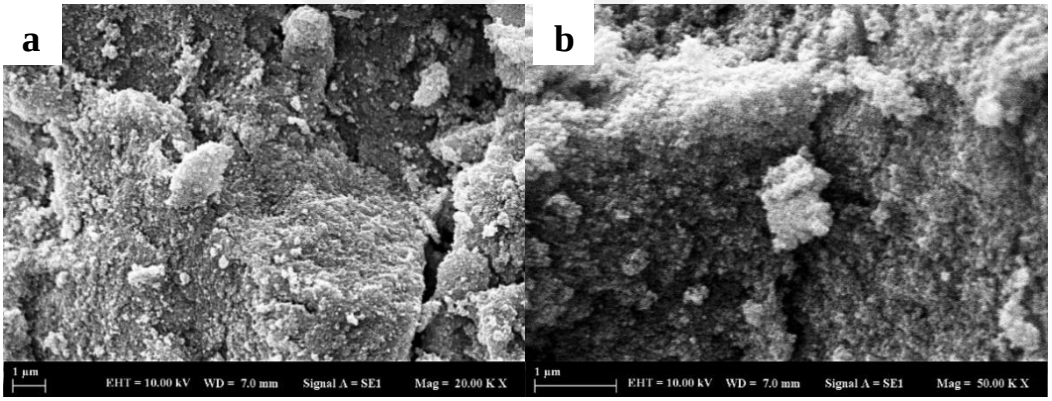
Şekil 4.10 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

160°C sıcaklıkta 18 saat boyunca sentezlenen numunelerin, 6 ve 12 saat boyunca sentezlenen numunelere göre küresel geometriye daha yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.10). Fakat artan süre ile aglomerasyonun arttırdığı görülmüştür. 160°C sıcaklıkta yapılan çalışmaların SEM analiz sonuçlarına göre; nano boyutta yeterince küresel nanoyapı oluşturulamadığı tespit edilmiştir.



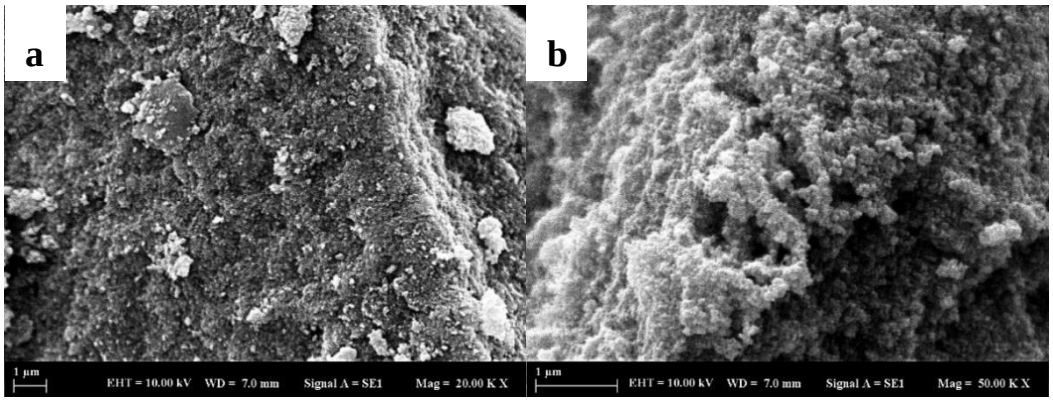
Şekil 4.11 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

180°C sıcaklıkta 6 saat boyunca sentezlenen numunelerin SEM analiz sonuçları nanoyapıların oluştuğunu göstermiştir. Sentezlenen yapıların küresel morfolojiye ve nano boyuta sahip olduğu tespit edilmiş ancak aglomerasyon oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.11).



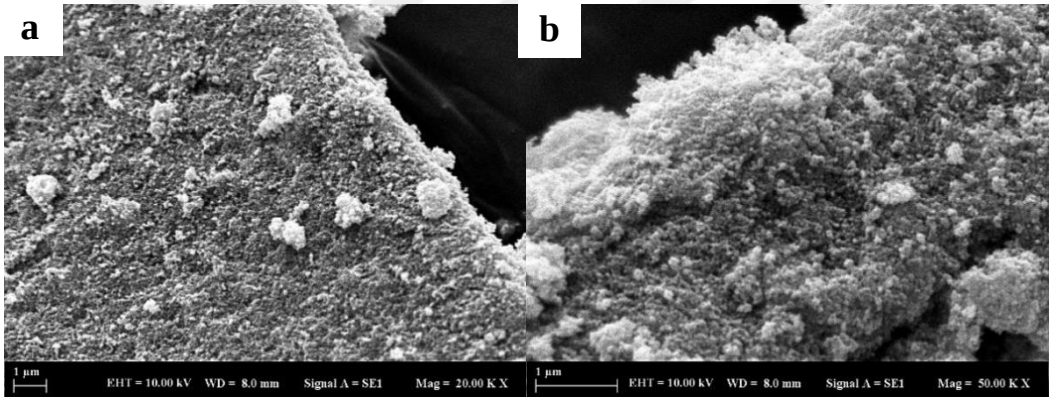
Şekil 4.12 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

180°C ve 12 saat boyunca sentezlenen NPlerin SEM analiz sonuçları, 6 saat reaksiyon süresi kullanılan numunelere benzer yapıların oluştuğunu göstermiştir. Sentezlenen yapıların küresel morfolojiye ve nano boyuta sahip olduğu ancak aglomerasyon oluştuğu gözlenmiştir (Şekil 4.12).



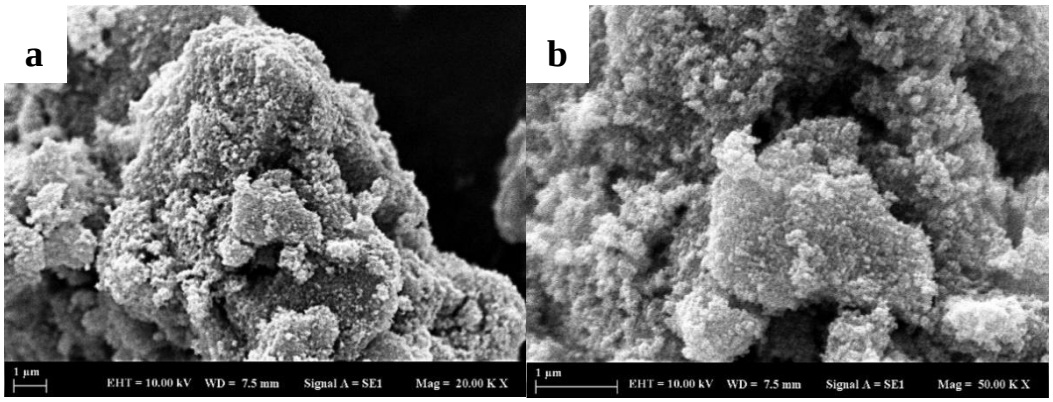
Şekil 4.13 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

180°C sıcaklık ve 18 saat koşullarında sentezlenen numunelerin SEM analiz sonuçları, nanoyapıların oluştuğunu göstermiştir (Şekil 4.13). 20.000X ve 50.000X büyütmelerde incelenen yapıların küresel morfolojiye sahip oldukları görülmüştür.



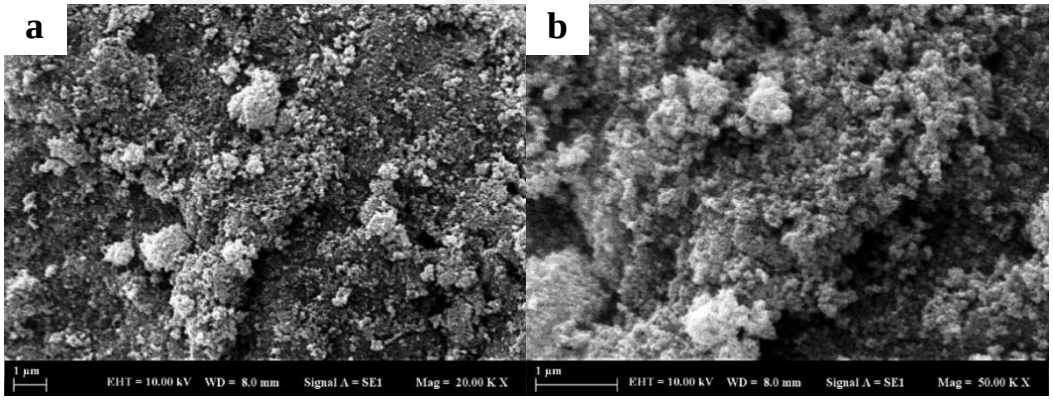
Şekil 4.14 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

200°C ve 6 saatte sentezlenen Fe_3O_4 numunesinin SEM görüntüsü Şekil 4.14'te sunulmuştur. Oluşan yapıların küresel ve nano boyutlu olduğu görülmüştür. 160 ve 180°C sıcaklıklarda yapılan sentez çalışmalarında en iyi nanopartikül oluşumunun 200°C ve 6 saat sonrasında oluştuğu görülmüştür.



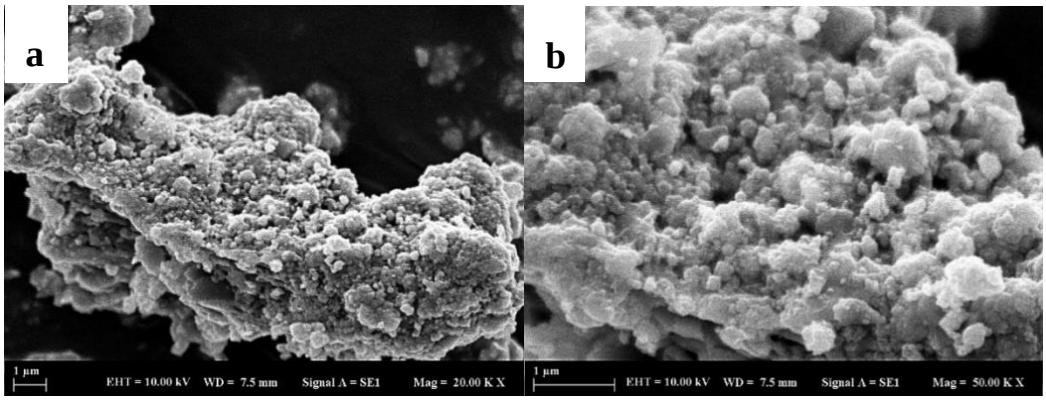
Şekil 4.15 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüsü Şekil 4.15'te sunulmuştur. Aynı sıcaklıkta 6 saat boyunca sentezlenen yapıyla benzer morfolojiye sahip olduğu görülmüştür. Fakat reaksiyon süresinin artması nanopartiküllerde kümeleşme oluşumunun ortaya çıkmasına sebep olmuştur.



Şekil 4.16 200°C 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 20.000X ve b) 50.000X

200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüsü Şekil 4.16'da sunulmuştur. Aynı sıcaklıkta 6 ve 12 saat boyunca sentezlenen numunelerle benzer morfolojiye sahip olduğu tespit edilmiş, ancak aglomerasyonun oluştuğu görülmüştür. Literatürle tutarlı olarak artan süreyle aglomerasyonun arttığı görülmüştür [185], [187]. Solvotermal yöntem ile 200°C sıcaklıkta nano boyuta sahip Fe_3O_4 NPlerin üretilebildiği gösterilmiştir**.**

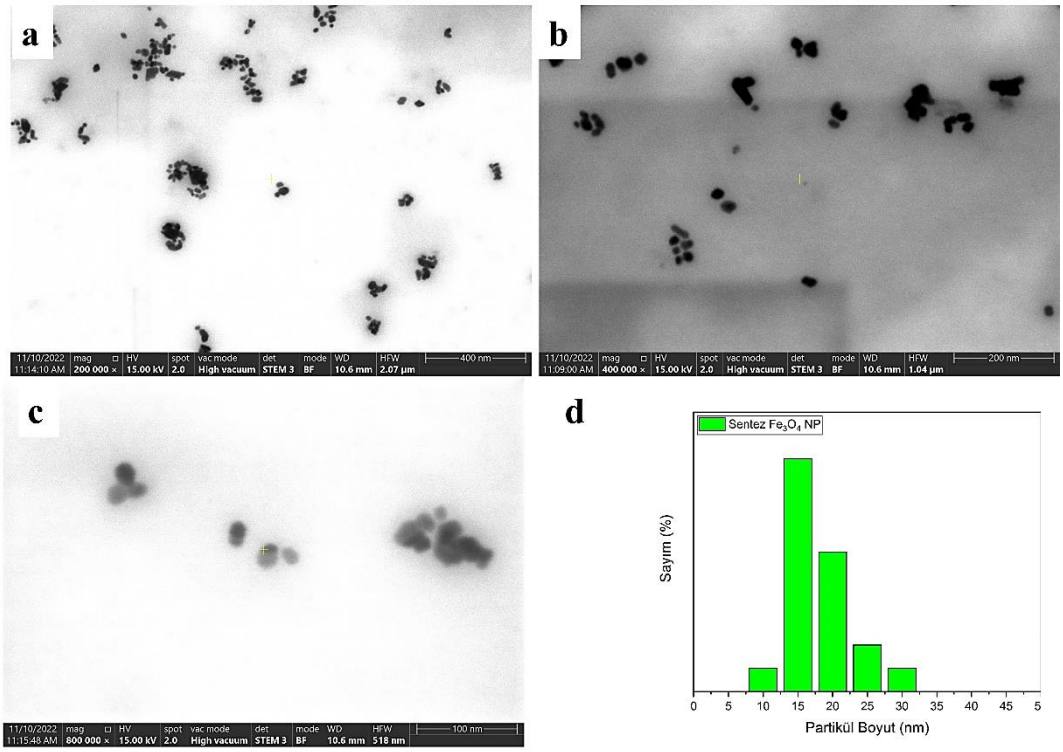


Şekil 4.17 Ticari Fe_3O_4 (20 nm) numunesine ait SEM görüntüleri:
a) 20.000X ve b) 50.000X

Ticari olarak temin edilen Fe_3O_4 (20 nm) nanopartikülleri solvotermal yöntem ile sentezlenen nanoyapının karakterize edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Bu amaçla analiz sonuçları ticari nanoyapı ile karşılaştırılmıştır. Ticari nanopartikülün SEM analiz sonuçları; laboratuvar ortamında sentezlenmiş NPlerden daha yoğun aglomerasyona sahip olduğunu ve farklı morfolojiler barındırdığını tespit edilmiştir (Şekil 4.17).

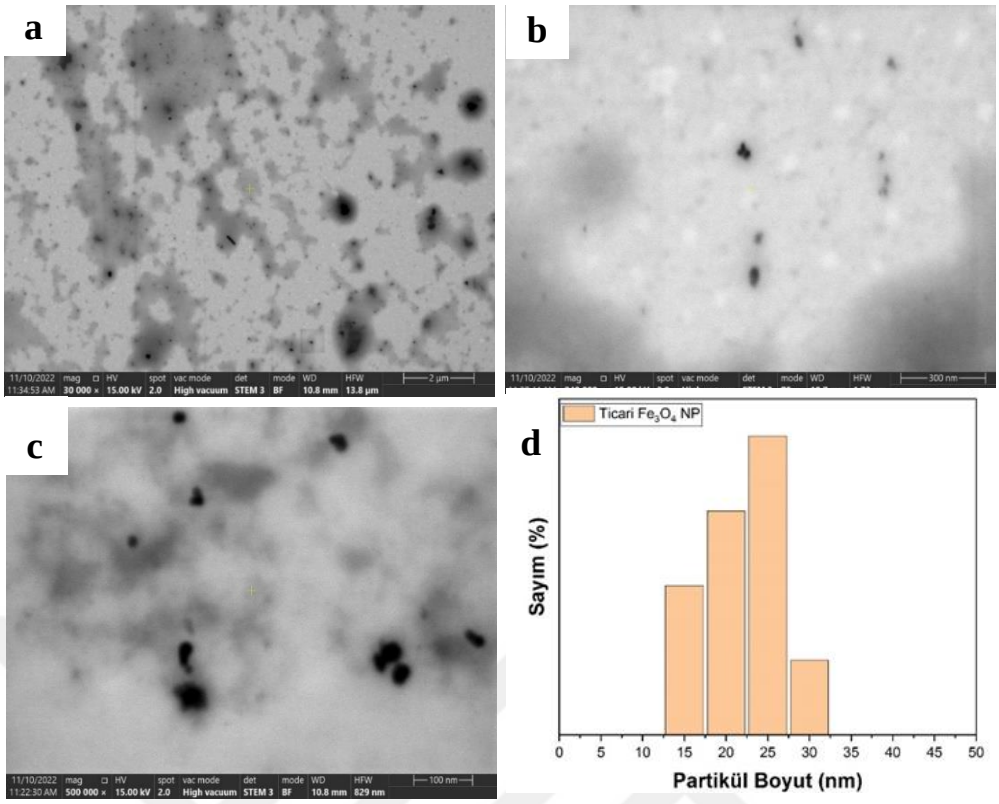
4.4.2 Taramalı Geçirimli Elektron Mikroskopi (STEM) Analiz Sonuçları

SEM sonuçlarına göre uygun boyutta olduğu tespit edilen 200°C'de 6 saat boyunca sentezlenen ve ticari olarak temin edilen ve ortalama boyutu 20 nm olan Fe_3O_4 NPlerinin boyut ve morfolojisi STEM (Phillips XL, 30 ESEM-FEG/EDAX) yöntemi ile daha detaylı incelenmiştir. Her bir numune hekzan içerisinde dağıtılmış, bakır kaplı karbon gridlerin üzerine damlatılarak oda sıcaklığında kurutulması sağlanmış ve kurutma sonrası analiz gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 Sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait STEM görüntüleri:
a) 200.000X, b) 400.000X, c) 800.000X ve d) STEM analizine göre ortalama boyut

Analiz sonuçlarına göre sentezlenen Fe_3O_4 NPlerin küresel morfolojide ve ortalama 18±3 nm boyuta sahip olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.18). Sentezlenen Fe_3O_4 numunesinin ortalama boyutunun belirlenmesi amacıyla Image J programı kullanılmıştır. Elde edilen sayısal değerler kullanılarak ORIGIN Pro analiz programı ile ortalama boyut grafiği çizilmiştir (Şekil 4.18-d).

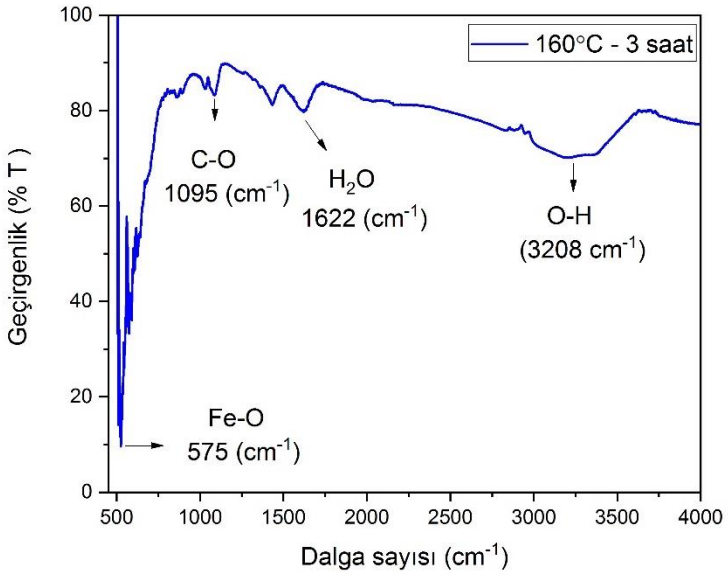


Şekil 4.19 Ticari Fe_3O_4 numunesine ait STEM görüntüleri:
a) 30.000X, b) 240.000X, c) 500.000X ve d) STEM analizine göre ortalama boyut

Ticari Fe_3O_4 numunesine ait STEM analiz sonucu ve ortalama boyutu Şekil 4.19'da sunulmuştur. Analiz sonuçları incelendiğinde, küresel morfolojiye ve ortalama 23 nm boyuta sahip tanelerin bulunduğu belirlenmiştir. Analiz incelemeleri sırasında NPlerin çevresinde çözünme görülmüştür. XRD analiz sonucuna göre çözünmenin, hidrazin hidrat bileşiği kaynaklı olabileceği tespit edilmiştir.

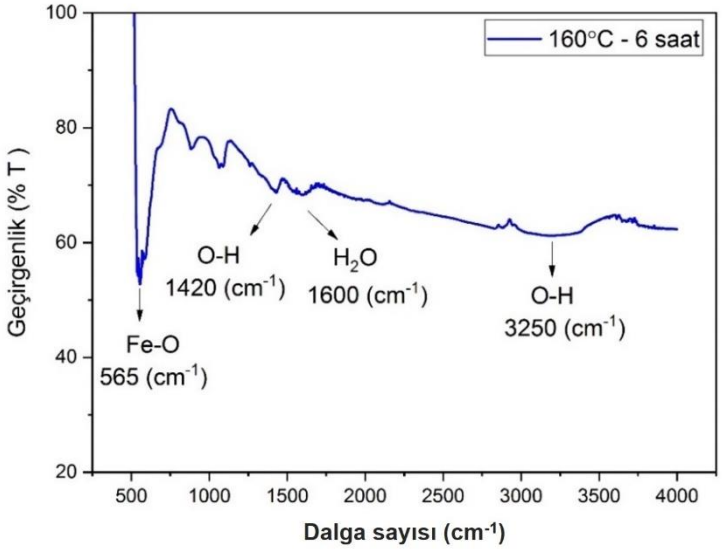
4.4.3 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) analizi, sentezlenen yapılardaki fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla kullanılmıştır. Karakterizasyon çalışmalarında Thermo Scientific Nicolet IS 10 FT-IR ATR (Attenuated Total Reflectance) cihazı kullanılmıştır. Sentezlenen nanoyapıların sahip olduğu fonksiyonel grupların tespiti 400-4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında gerçekleştirilmiştir. Analiz sırasında cihaz tarafından gönderilen IR ışınlarının nanoyapılar tarafından absorbe edilmesi sonucunda oluşan absorbsiyon bantları ile nanoyapının fonksiyonel grupları belirlenmiştir. Elde edilen veriler Origin Pro programı ile incelenmiştir.



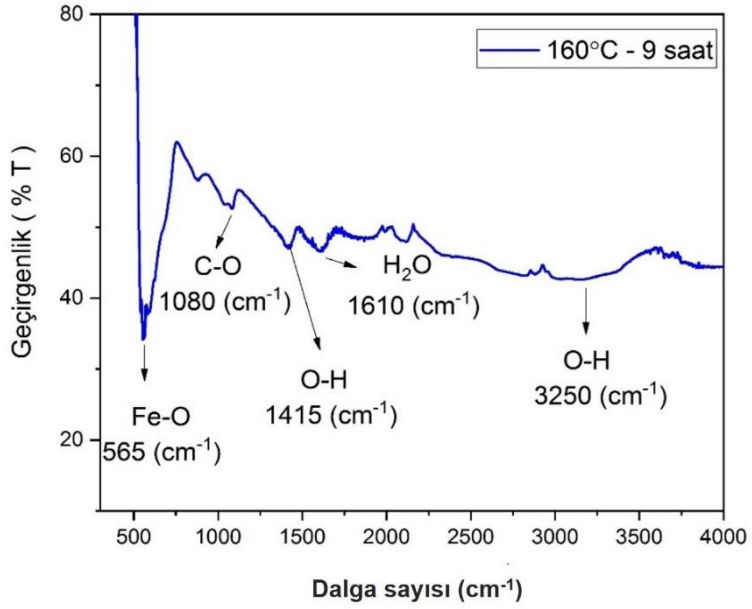
Şekil 4.20 160°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

160°C ve 3 saat solvotermal işlem sonrası oluşan demir oksit nanopartiküllerinin FT-IR analizi Şekil 4.20'de verilmiştir. 3 saatlik işlem süresi, öncü çözeltinin tamamının demir okside dönüşmesi için yeterli olmamıştır. Bundan dolayı çözücülerin karakteristik pikleri olan 1095 cm^{-1}'deki C-O ve 3208 cm^{-1}'deki O-H bağları görülmektedir [188], [189]. Ancak yetersiz işlem süresine rağmen 575 cm^{-1}'deki karakteristik Fe-O pikinin oluşması [189], demir oksit sentezinin kısmen başarılı olduğunu göstermektedir.



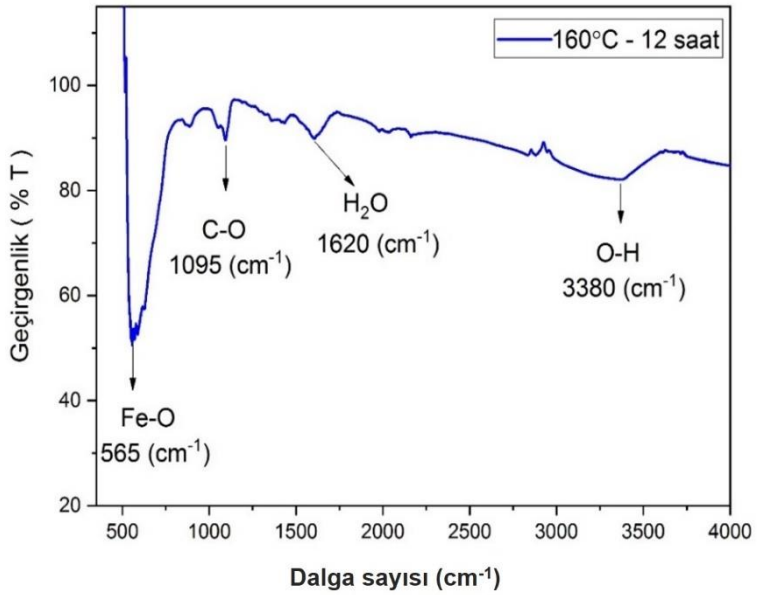
Şekil 4.21 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

160°C sıcaklıkta 3 saat süreyle gerçekleştirilen reaksiyon sonucunda oluşan nanopartiküllerin FT-IR analizinde olduğu gibi 6 saatlik işlem sonucunda da demir oksidin karakteristik piki olan 565 cm^{-1}'deki Fe-O bandı elde edilmiştir (Şekil 4.21). Solvotermal sentez yönteminde çözücü olarak kullanılan etilen glikol ve çekirdeklendirici olarak kullanılan amonyum hidroksit kalıntılarına ait 1420 cm^{-1} ve 3250 cm^{-1} pikleri sırasıyla O-H gerilme ve bükülme bağları ile gösterilmiştir [188], [189]. Sürenin artması ile birlikte 3 saatlik işleme göre O-H bağının belirginsizleştiği ve O-H bağ şiddetinin azaldığı görülmüştür.



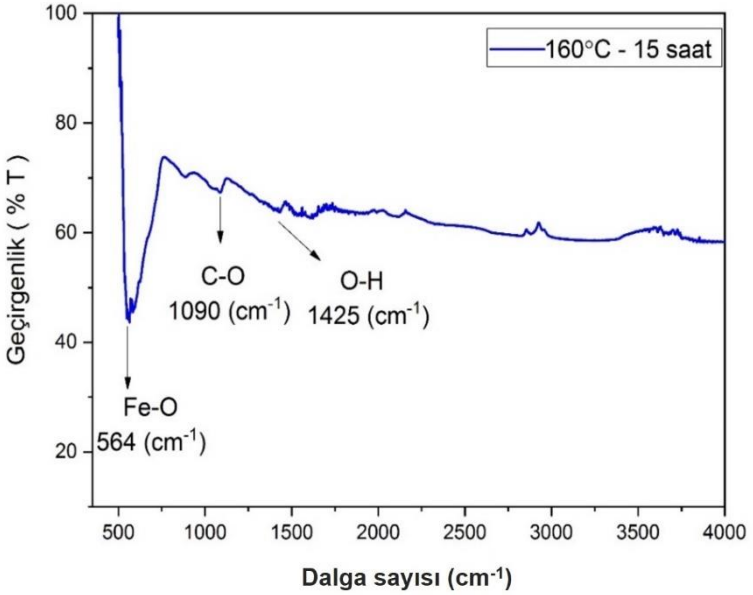
Şekil 4.22 160°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

160°C sıcaklıkta 9 saat boyunca yapılan reaksiyon sonucunda oluşan nanopartiküllerin FT-IR analizi, demir oksidin karakteristik piki olan 565 cm^{-1} dalga boyundaki Fe-O bandını göstermiştir (Şekil 22). Solvotermal sentez yönteminde çözücü olarak kullanılan etilen glikol ve çekirdeklendirici olarak kullanılan amonyum hidroksit kalıntıları 1415 cm^{-1} ve 3250 cm^{-1} değerlerinde O-H gerilme ve bükülme bağları ile gösterilmiştir. 1610 cm^{-1} ve 1080 cm^{-1}'de sırasıyla C-O ve H_2O pikleri görülmüştür (Şekil 4.22).



Şekil 4.23 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

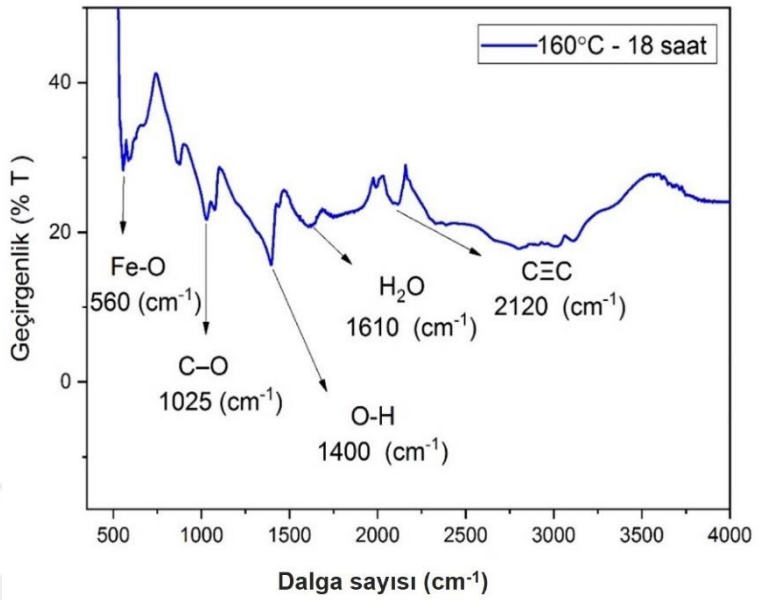
160°C'de 12 saat boyunca yapılan reaksiyon sonucunda oluşan nanopartiküllerin FT-IR analizinde demir oksitin karakteristik piki olan 565 cm^{-1}'deki Fe-O bandı elde edilmiştir (Şekil 4.23). İşlem süresi artışı ile demir oksit karakteristik piklerinde şiddet artışı olurken, çözücü ve çekirdeklendirici olarak kullanılan malzemelerin piklerinde azalma görülmektedir.



Şekil 4.24 160°C ve 15 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine FT-IR spektrumu

FT-IR analizinde yine demir oksitin karakteristik piki olan 564 cm^{-1}'deki Fe-O

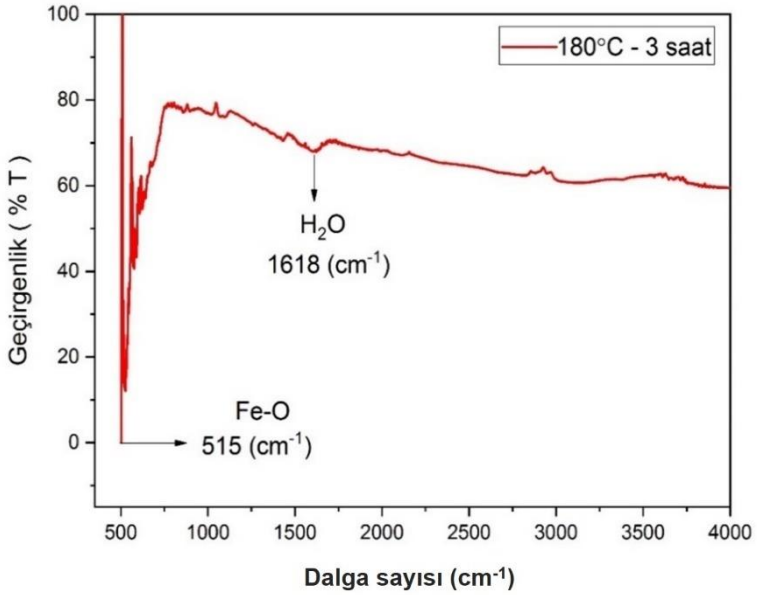
bandı görülmüştür (Şekil 4.24). 1090 cm^{-1}'de C-O bandı ve 1425 cm^{-1}'de O-H bandı görülmüştür.



Şekil 4.25 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine FT-IR spektrumu

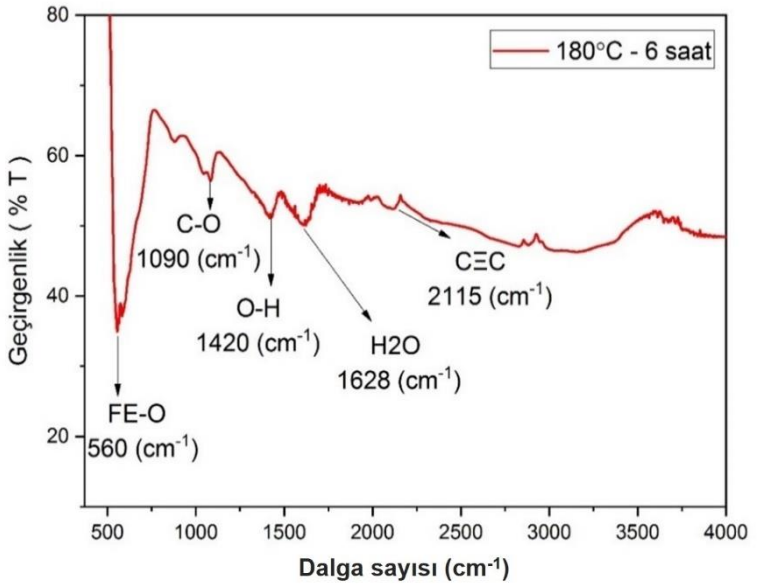
Solvotermal yöntem ile 160°C sıcaklıkta 15 ve 18 saatlik reaksiyon süreleri sonunda elde edilen numunelerin FT-IR analizlerine ait sonuçlar; demir oksit piklerinin varlığını göstermiştir. Reaksiyon süresinin uzamasından kaynaklı olarak C-O ve O-H bağları görülmüştür (Şekil 4.25).

160°C'de farklı sürelerde yapılan sentezlere ait numunelerin FT-IR sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde; Fe-O pikinin farklı koşullarda sentezlenen numunelerin tamamında oluştuğu görülmüştür. Süre artışı ile sentez kapsamında kullanılmış olan etilen glikol ve NH_4OH'den gelen piklerin ise şiddetlerinde azalma görülmüştür.



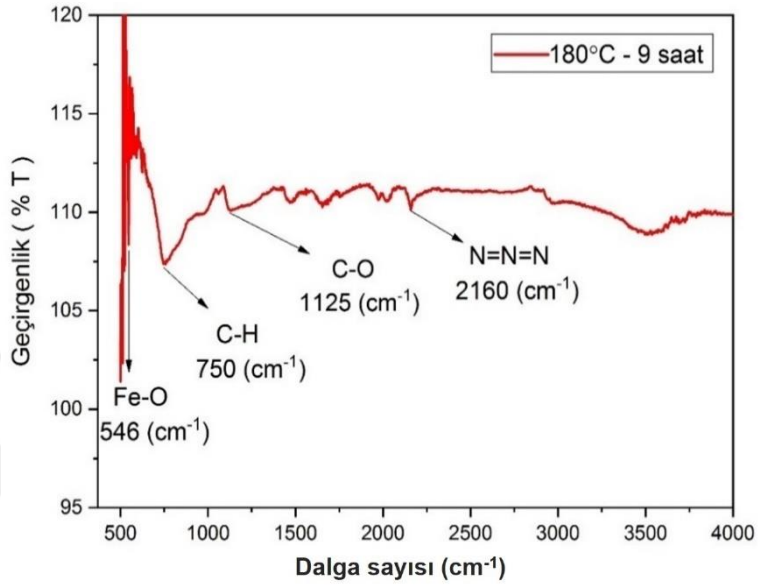
Şekil 4.26 180°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

Solvotermal yöntem ile 180°C ve 3 saat boyunca sentezlenen numunelerin FT-IR analiz spekturumu Şekil 4.26'de verilmiştir. 160°C sıcaklıkta elde edilmiş olan numunelere kıyasla 180°C'de üretilen partiküllerin demir oksit pik şiddeti daha yüksek bulunmuştur. 510-570 cm^{-1} aralığında oluşan Fe-O bağlarının şiddetleri bu değişimi kanıtlamaktadır. 3 saatlik süreyle 180°C'de yapılan sentez sonucunda elde edilmiş olan numunede ise 515 cm^{-1}'de Fe-O bağı görülmüştür.



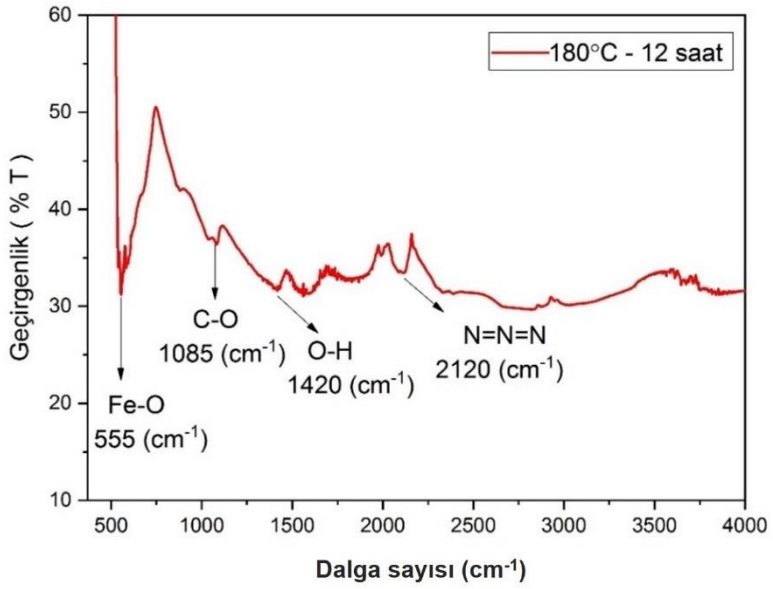
Şekil 4.27 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

180°C'de 6 saatlik reaksiyon sonucunda sentezlenen nanoyapının FT-IR analizleri Şekil 4.27'de verilmiştir. Demir oksitin karakteristik Fe-O piki 560 cm^{-1}'de görülmüştür. Etilen glikol ve çöktürücü olarak kullanılan NH_4OH'dan gelen 1090 cm^{-1}'de C-O piki, 1420 cm^{-1}'de O-H piki ve 2115 cm^{-1}'de C=C pikleri görülmüştür.



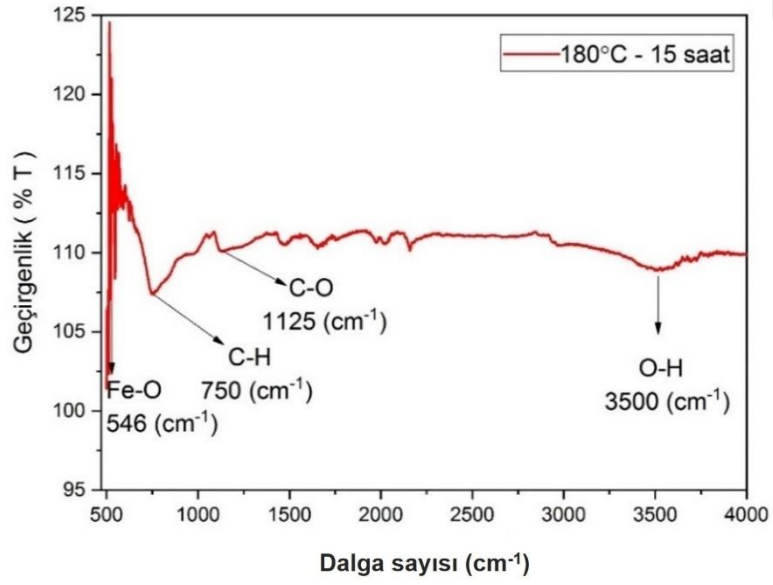
Şekil 4.28 180°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

180°C ve 9 saatlik solvotermal sentez sonrası üretilen partiküllerin FT-IR analizleri Şekil 4.28'de verilmiştir. 750 cm^{-1}'de C-H ve 1125 cm^{-1}'de oluşan C-O bağı, çözücü ve çekirdeklendirici olarak kullanılan malzemelerin partikül içeriğinde bulunmaya başladığını göstermektedir. Karbon bağlarının artışı, demir oksit partiküllerinin topaklanmasında ayrı bir dezavantaj olarak görülmektedir. 546 cm^{-1}'de karakteristik Fe-O piki oluşmuştuğu görülmüştür.



Şekil 4.29 180°C ve 12 saat koşullarından sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

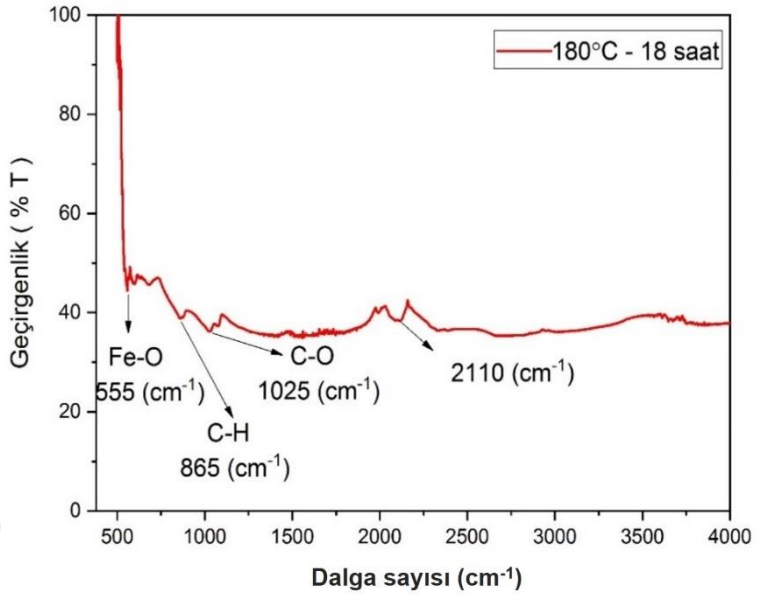
180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen nanoyapının FT-IR analizi (Şekil 4.29), 1085 cm^{-1}'de oluşan C-O bağındaki şiddet artışı ile 555 cm^{-1}'de oluşan Fe-O bağındaki şiddet artışını göstermiştir.



Şekil 4.30 180°C ve 15 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

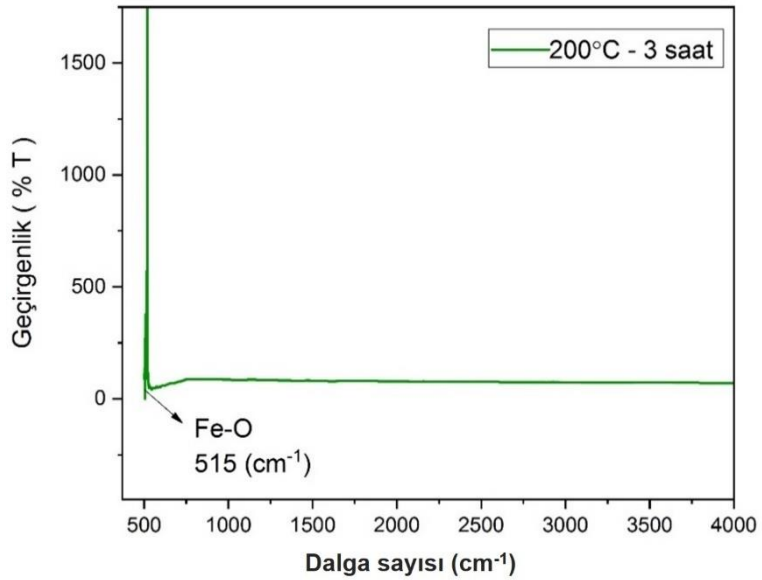
180°C'de 15 saat koşullarında sentezlenen nanoyapının FT-IR analizi (Şekil 4.30), 1125 cm^{-1}'de oluşan C-O bağındaki şiddet artışı ile 546 cm^{-1}'de oluşan Fe-O bağındaki şiddet artışının azaldığını göstermektedir. 3500 cm^{-1}'de görülen O-H

bandının yetersiz kurutmadan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.



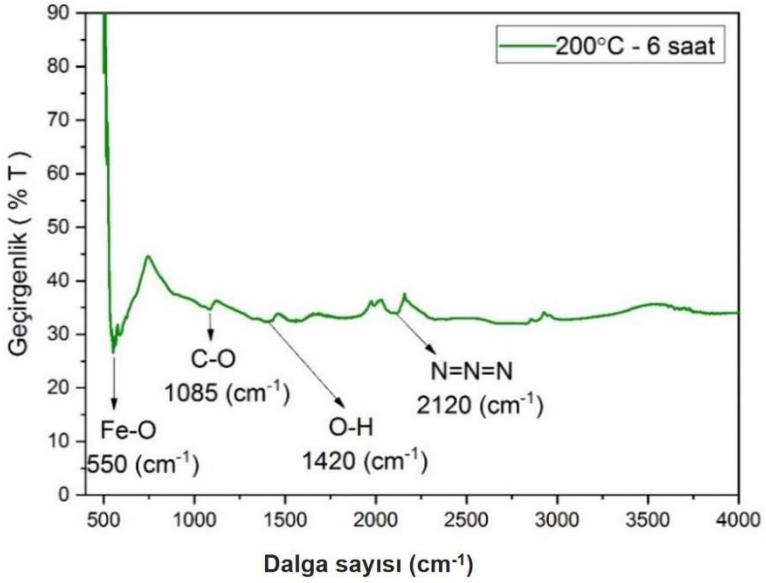
Şekil 4.31 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen nanoyapının FT-IR analizi (Şekil 4.31), 555cm^{-1}'de oluşan Fe-O bağındaki şiddetinin azaldığını göstermiştir. 18 saat boyunca 180°C'de gerçekleştirilen sentez sonucunda üretilen partiküllerde demir oksit miktarı, en düşük seviyelerde elde edilmiştir. Bu nedenle 18 saatin üzerinde sentez süresi kullanımının, nanopartikül üretim verimliliğinde azalmaya neden olacağı sonucuna varılmıştır. 180°C ve farklı sürelerde sentezlenen nanoyapıların FT-IR analizine göre artan süreyle birlikte demir oksitin karakteristik piki olan Fe-O bağının şiddetinin azaldığı görülmüştür.



Şekil 4.32 200°C ve 3 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

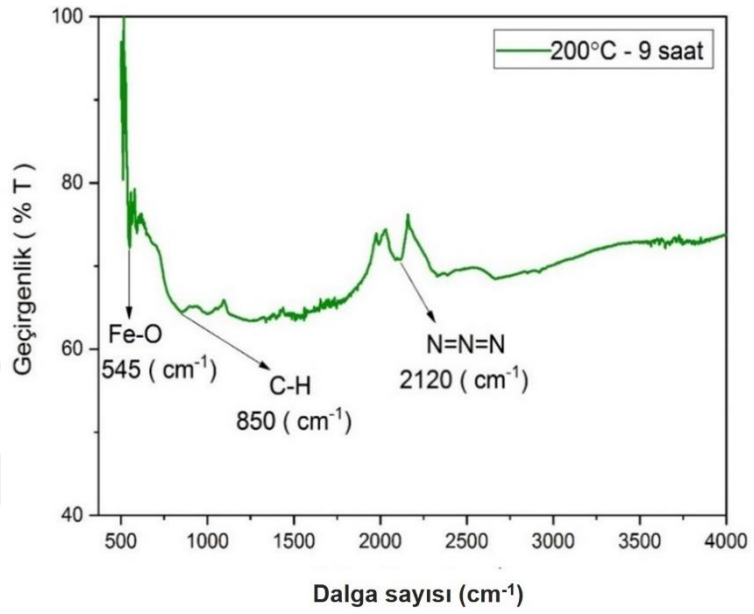
200°C sıcaklık ve 3 saat koşullarında sentezlenen nanoyapının FT-IR analizi (Şekil 4.32), demir oksidin karakteristik Fe-O bandı olan 515 cm^{-1} değerini göstermiştir. Oluşan pikin şiddetinin zayıf olmasında, sürenin yetersizliğinin etkin olduğu değerlendirmesi yapılmıştır.



Şekil 4.33 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

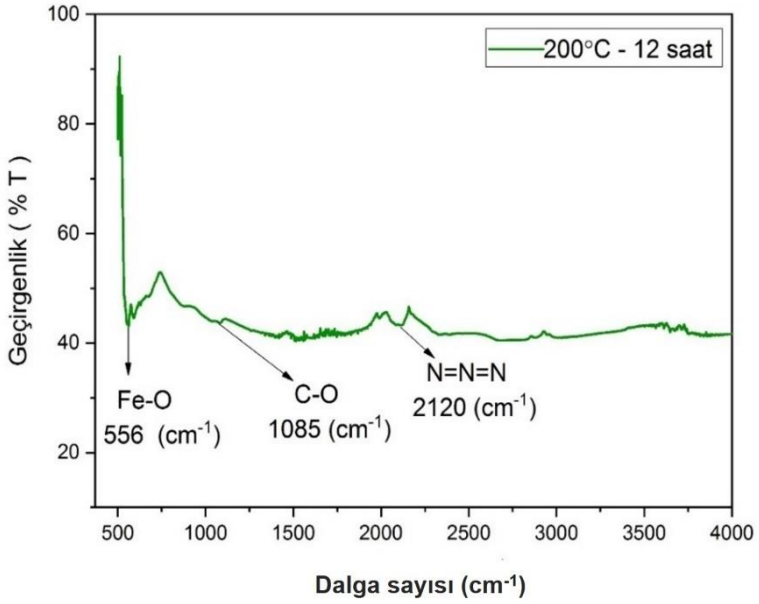
200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında sentezlenen partiküllerin FT-IR analizleri Şekil 4.33'de verilmiştir. Daha önceki 3 saatlik sentez sonucuyla kıyaslandığında,

6 saat süresinde oluşan Fe-O pikinin şiddeti ve derinliği artmıştır. FT-IR analizlerinde görülen karbon bağ piklerinin, 160°C ve 180°C sıcaklıkta elde edilen numunelerde daha çok azaldığı görülmüştür. Bu azalma, 200°C'nin ideal sentez sıcaklığı olduğunu doğrulamaktadır.



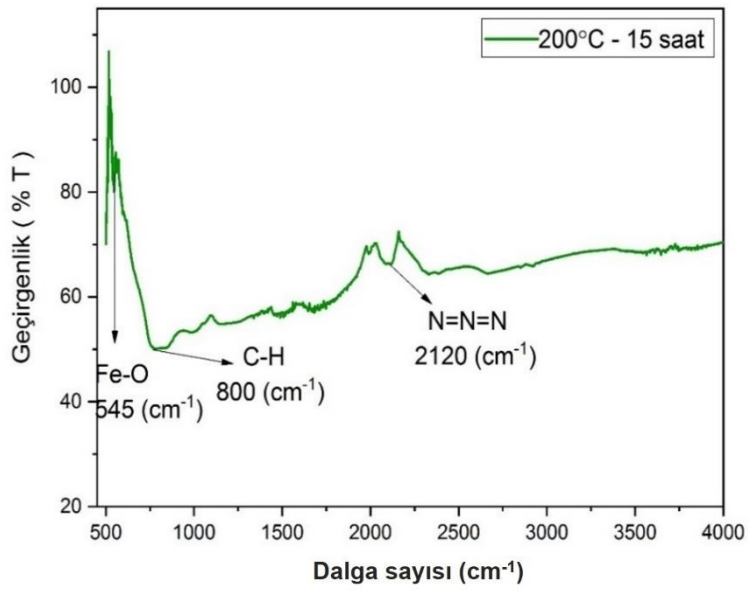
Şekil 4.34 200°C ve 9 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

Etilen glikolün çözücü ve amonyum hidroksitin çekirdeklendirici olarak kullanıldığı 200°C ve 9 saat koşullarında üretilen partiküllerin FT-IR analizleri Şekil 4.34'de verilmiştir. Kullanılan solventlerden kaynaklı olarak 850 cm^{-1}'de C-H piki ve 2120 cm^{-1}'de N=N=N piki oluşmuştur. Demir oksidin karakteristik Fe-O piki ise 545 cm^{-1}'de oluşmuş olup, şiddetinde azalma görülmüştür.



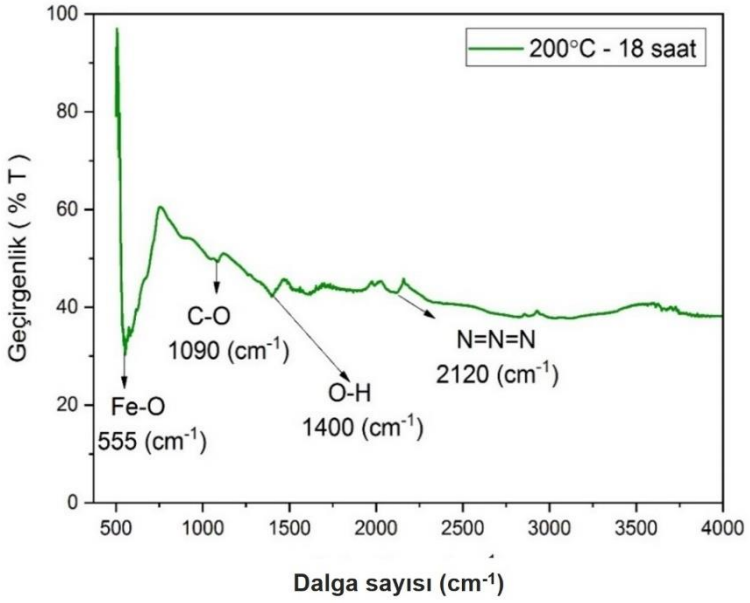
Şekil 4.35 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

Şekil 4.35'de 200°C sıcaklık ve 12 saat süreyle sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spekturumu sunulmuştur. 556 cm^{-1}'deki demiroksite ait karakteristik Fe-O piki, 800 cm^{-1}'de C-H piki ve 2120 cm^{-1}'de N=N=N pikleri görülmüştür.



Şekil 4.36 200°C ve 15 saat koşullarında sentezlenmiş Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

Şekil 4.36'da sunulan FT-IR grafiği; 545 cm^{-1}'de Fe-O piki, 800 cm^{-1}'de C-H piki ve 2120 cm^{-1}'de N=N=N piklerinin oluştuğunu göstermiştir.



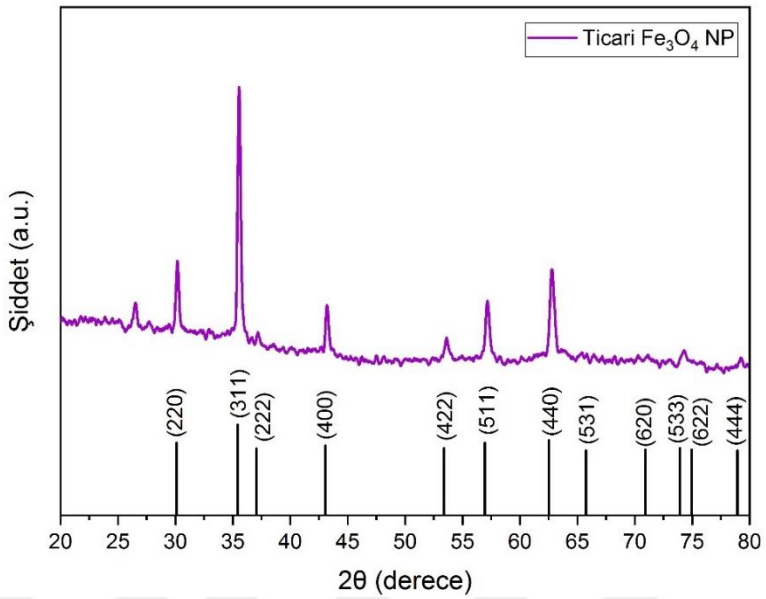
Şekil 4.37 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait FT-IR spektrumu

Şekil 4.37'de verilen FT-IR spekturumunda; 555 cm^{-1}'de Fe-O, 1090 cm^{-1}'de C-O, 1400 cm^{-1}'de O-H ve 2120 cm^{-1}'de N=N=N piklerinin oluştuğu tespit edilmiştir. 200°C'de sentezlenen numunelerin FT-IR analiz sonuçları, demir oksidin karakteristik Fe-O piklerinin 6, 12 ve 18 saat boyunca sentezlenmiş numunelerde oldukça benzer çıktığını göstermiştir.

4.4.4 X-ışını Kırınım Analiz (XRD) Sonuçları

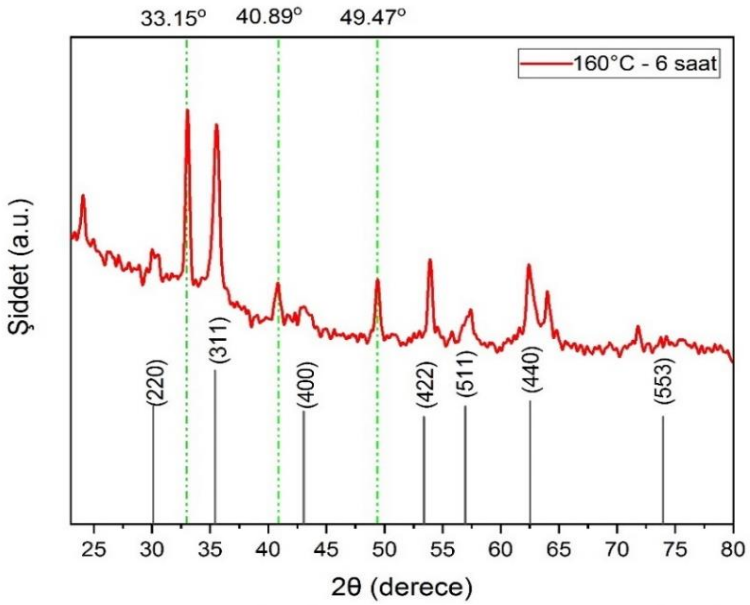
Tez çalışması kapsamında sentezlenen nanoyapıların kristal yapısını belirlemek amacıyla, Cu-Kα radyasyonu (λ=0.15418 nm) ve 10° ila 90° aralığında 2θ değerleri kullanılarak PANalytical Xpert Pro cihazı kullanılarak XRD analizi yapılmıştır. Cihazın partiküllerin üzerine gönderdiği X ışınlarının numune üzerine çarparak kırılması sonucu oluşan ışınlar yardımı ile partiküllere ait veriler elde edilmiştir. Elde edilen datalar cihazın sahip olduğu High Score yazılım programı ile değerlendirilerek içerdiği kristal düzlemler tespit edilmiştir. Elde edilen veriler "EK-XRD Cihazına Ait Veri Dataları" kısmında sunulmuştur. XRD grafikleri Origin Pro programı ile analiz edilerek çizilmiştir. Manyetik demir oksit üretimi için solvotermal yöntem ile yapılan 160°C, 180°C ve 200°C'deki sıcaklıklarda üretilen partiküllerin XRD analizleri ICDD database içinde bulunan manyetit demir oksit ve hematit demir oksit partiküllerinin datakartları karşılaştırmalı olarak çizilerek kristallenme oranları ve kristal düzlem şiddetleri karşılaştırılmıştır. "EK-

XRD Cihazına Ait Veri Dataları" kısmında manyetit ve hematit demir datakartlarının (ICDD database) detayları sunulmuştur.



Şekil 4.38 Ticari olarak temin edilen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Şekil 4.38'de sunulan ticari Fe_3O_4 numunesine ait XRD spekturumu referans manyetit yapısı ile karşılaştırılmıştır. XRD faz analiz sonucuna göre %82.9 manyetit ve %17.1 hidrazin hidrat yapısının oluştuğu tespit edilmiştir.

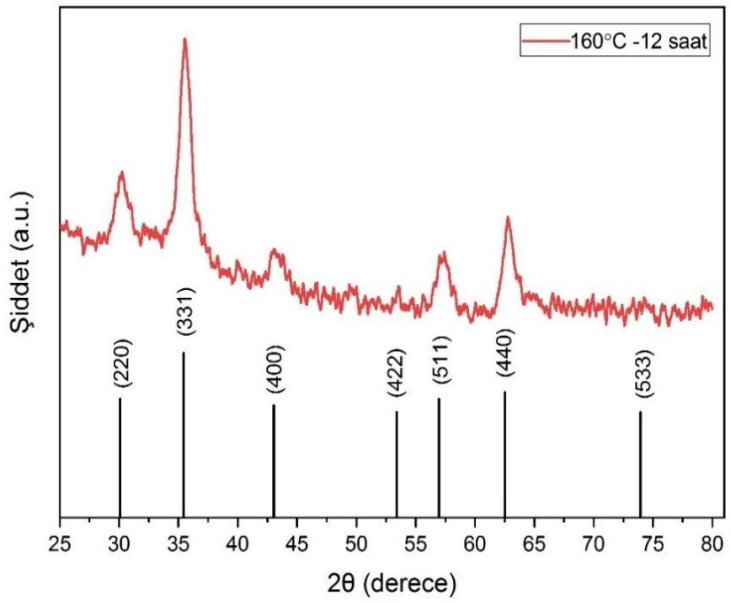


Şekil 4.39 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

160°C sıcaklık ve 6 saat boyunca solvotermal yöntem ile sentezlenen partiküllerin XRD analizi Şekil 4.39'da verilmiştir. Manyetit demir oksitlerin karakteristik pikleri (220), (311), (400), (422), (511), (440) ve (553) düzlemlerinde 2θ değerleri sırasıyla 30.09, 35.42, 43.05, 53.39, 56.94, 62.51 ve 73.94 derecelerine denk gelmektedir.

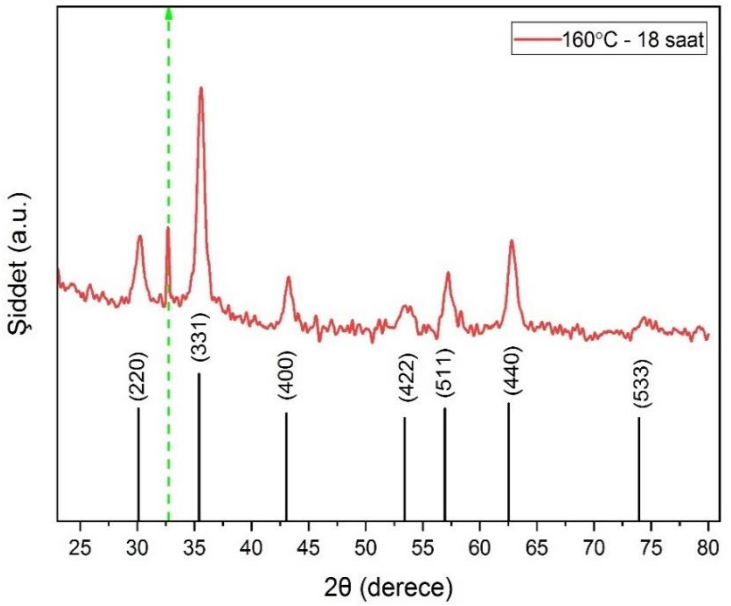
Sentezlenen nanopartiküllerin XRD analizinde karakteristik manyetit piklerinin yanında hematit piklerine ait olan 2θ değerleri sırasıyla 33.15, 40.89, ve 49.47 derecelerin varlığı görülmüştür.

XRD faz analizi sonucuna göre %57 hematit ve %43 manyetit yapısının oluşumu tespit edilmiştir.



Şekil 4.40 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Şekil 4.40'da sunulan XRD spekturumuna göre sentezlenen nanopartiküllerin manyetit demir oksitlerin karakteristik piklerine ait olan (220), (311), (400), (422), (511), (440) ve (553) düzlemlerinde 2θ değerleri sırasıyla 30.09, 35.42, 43.05, 53.39, 56.94, 62.51 ve 73.94 dereceleri tespit edilmiştir. XRD faz analizine göre %31.1 hematit ve % 68,9 manyetit yapısının oluşumu görülmüştür.

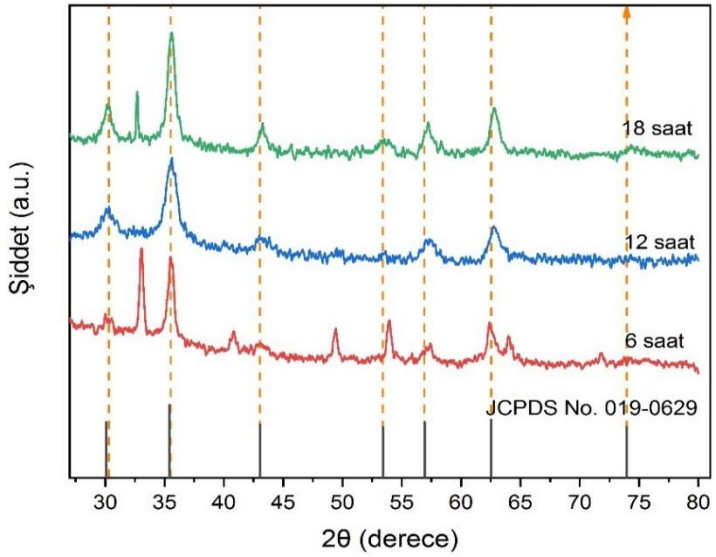


Şekil 4.41 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Şekil 4.41'de 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu sunulmuştur. Sıcaklık sabit tutularak işlem süreleri uzatıldığında

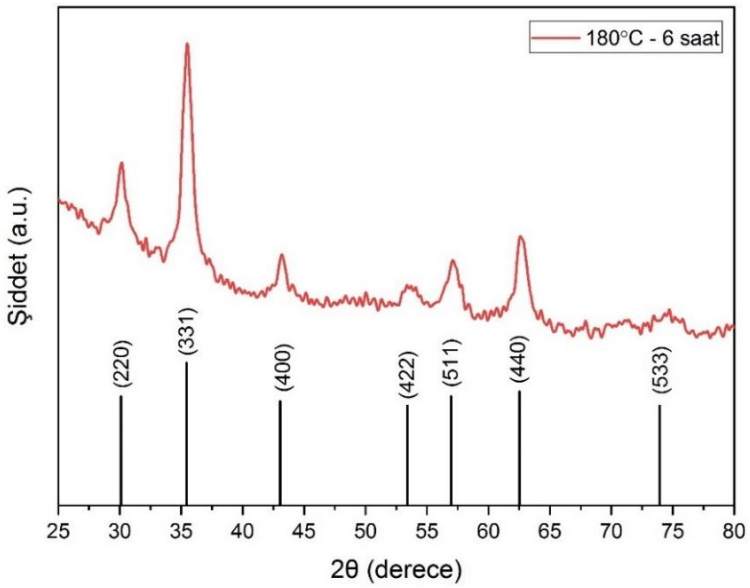
karakteristik hematit piklerinin azaldığı ve manyetit piklerinin artış gösterdiği görülmüştür.

XRD faz analizine göre %61.1 demir oksit hidroksit, %8.0 hematit ve %30,8 manyetit yapısının oluştuğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.42 160°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumu

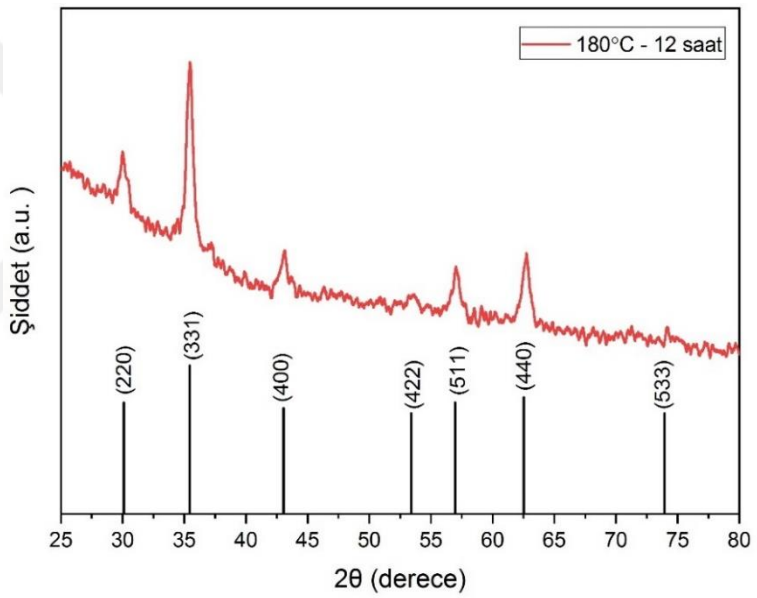
Şekil 4.42'de 160°C sıcaklıkta farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD sonuçları karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.



Şekil 4.43 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

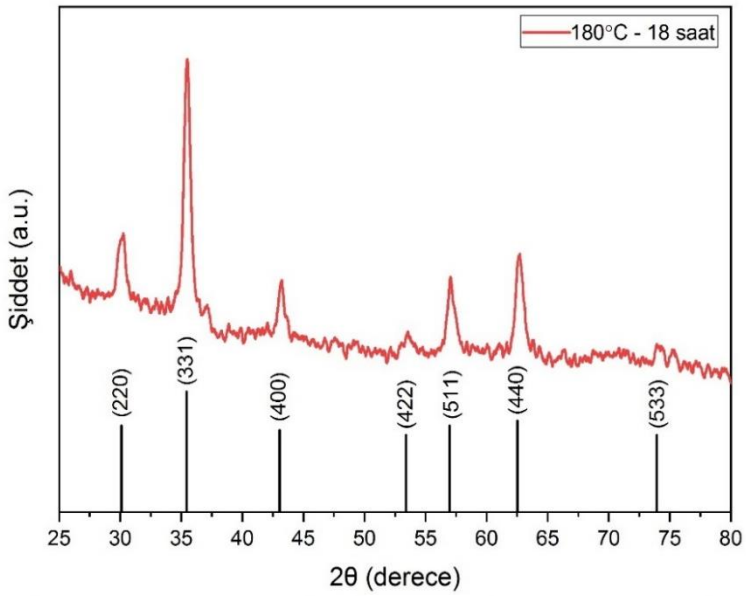
Şekil 4.43'te 180°C sıcaklık ve 6 saat reaksiyon sonrasında üretilen nanopartiküllerin XRD analiz sonucu verilmiştir. 160°C sıcaklıkta sentezlenen nanopartikül analiz sonucuna göre sentez sıcaklığı 180°C'ye çıkarıldığında hematit düzlem pikinin oldukça azaldığı ve (311) düzleminde manyetit yapısına ait karakteristik pik şiddetlerinde artış olduğu görülmüştür. Sıcaklığın arttırılması ile çözücü ve çekirdeklendirici olarak kullanılan maddelerin reaksiyona katılarak manyetit demir oksit oluşumunu desteklediği belirlenmiştir.

XRD faz analiz sonucuna göre %93.5 manyetit ve %6.5 hematit yapısının oluştuğu tespit edilmiştir. 160°C'de yapılan sentez çalışmalarından elde edilen veriler ile karşılaştırıldığında, 180°C'de sentezlenen nanopartiküllerde hematit oranının oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir.



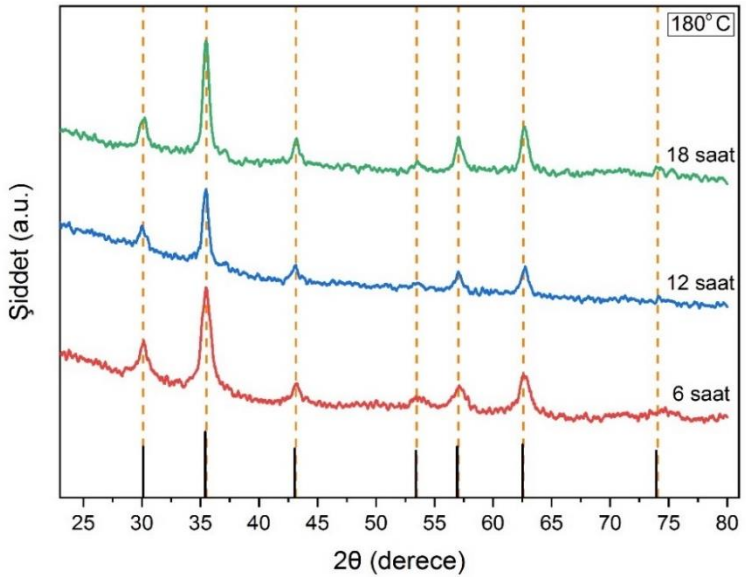
Şekil 4.44 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Şekil 4.44'de verilen XRD analiz sonucuna göre, manyetit demir oksit nanopartiküllerine ait (220), (311), (400), (511) ve (440) düzemlerinde bulunan piklerin belirgin şekilde oluştuğu tespit edilmiştir. XRD faz analiz sonucuna göre %55.3 maghemit ve %44.6 manyetit yapısının oluştuğu belirlenmiştir.



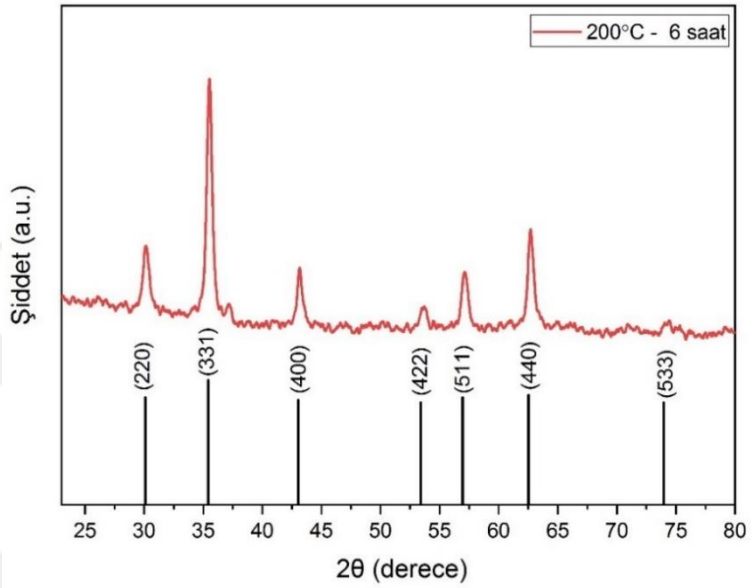
Şekil 4.45 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Şekil 4.45'te 180°C sıcaklık ve 18 saat koşullarında sentezlenen nanopartiküllerin XRD analizi sunulmuştur. 160°C sıcaklıkta sentezlenen nanopartiküllerde görülen hematit piklerin oluşmadığı görülmüştür. Yapılan analiz sonucunda (220), (311), (400), (511), (440) düzlemlerinde manyetit yapısına ait karakteristik olan pikler tespit edilmiştir. Tespit edilen bu piklerin; sıcaklık artışı ile daralmaya başlaması mikron boyuttan nano boyuta geçen nanopartikül miktarında artış olduğunu göstermektedir. XRD faz sonucuna göre %80.6 manyetit ve %19.4 hematit yapısının oluştuğu tespit edilmiştir.



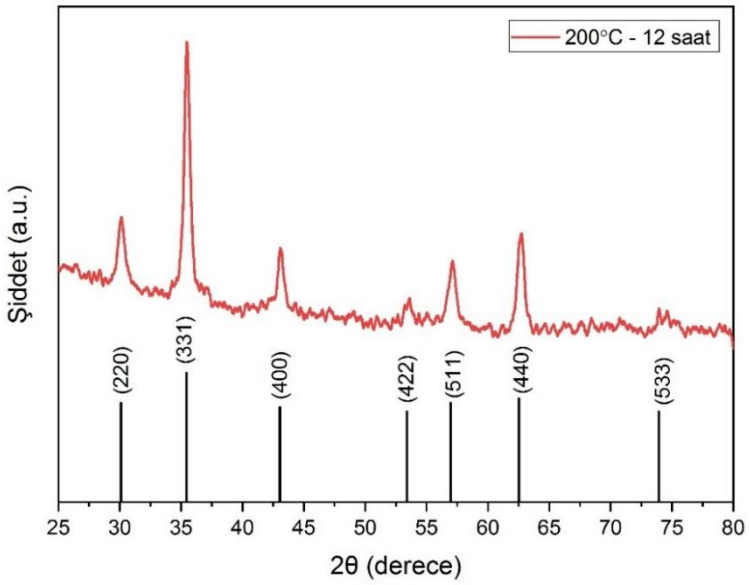
Şekil 4.46 180°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumları

160°C sıcaklıkta sentezlenen nanopartiküllerde tespit edilen hematit piklerin; 180°C sıcaklıkta oldukça azaldığı tespit edilmiştir. Buna karşın 180°C sıcaklıkta artan süreyle birlikte (311) düzleminde manyetit yapısına ait karakteristik pik yüzdesinin arttığı görülmüştür. Şekil 4.46'da artan süreyle (311) düzleminde bulunan pik uzunluğunun daralmaya başlaması mikron boyuttan nano boyuta geçen partikül miktarında artış olduğunu göstermektedir.



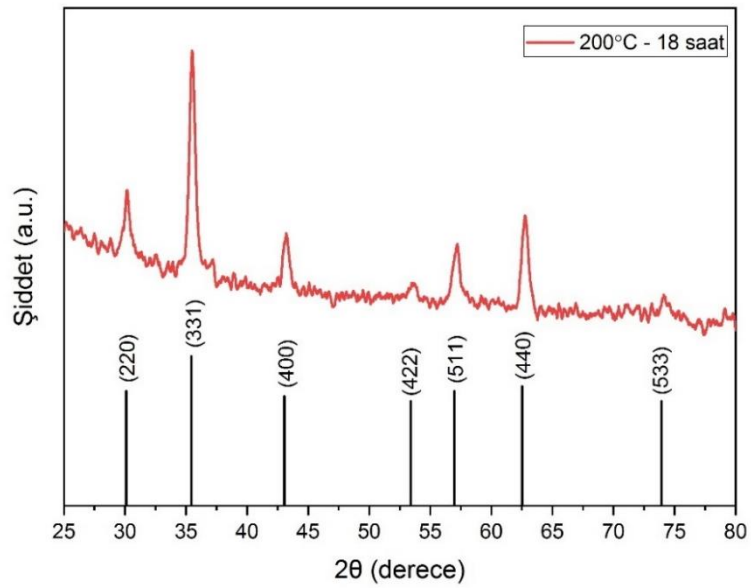
Şekil 4.47 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

Sentez reaksiyonunun sıcaklığı 200°C'ye çıkarıldığında nanopartiküllerin tamamen manyetit yapısına dönüştüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.47). Bu sonuç; manyetit demir oksit nanopartiküllerin solvotermal yöntemle üretilmesi için en uygun sıcaklığın 200°C'de olduğunu göstermiştir. 160 ve 180°C sıcaklıklarda sentezlenen numunelere ait XRD pikleri ile karşılaştırıldığında, 200°C'de daha ince ve uzun piklerin oluştuğu görülmüş olup, bu değişim ile partikül boyutlarının küçüldüğü ve artık (kalıntı) malzemelerin tamamen dönüştüğü anlaşılmıştır. XRD faz analiz sonucuna göre %99.9 manyetit yapısının oluştuğu tespit edilmiştir.



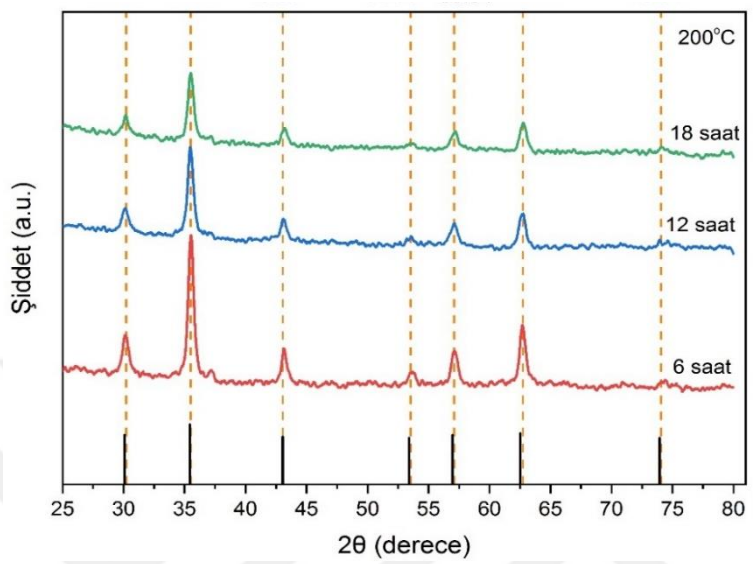
Şekil 4.48 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

200°C sıcaklıkta 6 ve 12 saat süreler boyunca yapılan sentez çalışmalarından elde edilen numunelere ait XRD faz analiz sonuçları birbirine oldukça benzer özellik göstermektedir (Şekil 4.48). Partiküllerin tamamen manyetit demir oksitlere dönüştüğü manyetit yapısına ait olan karakteristik (220), (331), (400), (422), (511), (440) ve (533) düzlemlerinde bulunan spektrumlarını birebir karşıladığı tespit edilmiştir. XRD faz analiz sonucuna göre %99.9 manyetit yapısının oluştuğu belirlenmiştir.



Şekil 4.49 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD spektrumu

200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesinin XRD spektrumu referans manyetit yapısı ile aynı özellikleri göstermektedir (Şekil 4.49). XRD faz analiz sonucuna göre %99.9 manyetit ve %0,1 hematit yapısının oluştuğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.50 200°C ve farklı sürelerde sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait XRD spektrumları

Analiz sonuçları değerlendirildiğinde; referans manyetit yapısına ait olan karakteristik (220), (331), (400), (422), (511), (440) ve (533) düzlemleriyle 200°C sentezlenen nanopartiküllerin benzer olduğu ve %99 oranında manyetit yapısı tespit edilmiştir. Bundan dolayı manyetit demir oksit nanopartiküllerinin üretilmesi için en uygun sıcaklığın 200°C sıcaklık olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.50).

4.4.1.1 XRD Analizi ile Kristal Boyutunun Hesaplaması

Solvotermal yöntem ile sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kristal boyutu, XRD analizi ile elde edilen verilerin Scherrer denklemi kullanılarak hesaplanmıştır.

Scherrer denklemi, XRD spektrumundaki pik genişliği ve difraksiyon açısı arasındaki ilişkiyi temsil eder. Scherrer denklemi aşağıdaki gibi formüle edilmiştir [14].

$$D = K * \lambda / (\beta * \cos\theta) \quad (4.1)$$

D: Ortalama kristal boyutu (nm)

K: Scherrer sabiti (genellikle 0.9 olarak kabul edilir)

λ: Kullanılan X-ışını dalga boyu (nm)

β: Pik genişliği (radyan) (tam genişliğin yarı maksimum değeri-Full Width at Half Maximum, FWHM)

θ: Difraksiyon açısı (°)

Scherrer denklemi, XRD spektrumunda görülen pikin genişliği ile kristal boyutu arasındaki ilişkiyi verir. Bu kapsamda XRD sonucunda elde edilen veriler ile ORIGIN Pro programı kullanılarak FWHM değerleri oluşturulmuş, daha sonra denklem (4.1) kullanılarak kristal boyut hesaplanmıştır. Elde edilen veriler STEM analiz sonuçları ile kıyaslanmıştır.

Tablo 4.5 XRD kristalit boyut analiz sonuçları

Nanopartikül	**STEM (nm)**	**XRD (nm)**
Ticari NP	23 (±3)	26 (±3)
Sentez NP	18 (±3)	18 (±3)

Tablo 4.5'te sunulan boyut analiz sonuçlarına göre ticari ve sentezlenen nanopartiküllere ait verilerin birbirleriyle uyumlu olduğu görülmüştür. 160,180 ve 200°C sıcaklıklarda ve 6, 12, 18 saat süre koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin XRD kristal boyut analiz sonuçları Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.6 Sentezlenen Fe_3O_4 NPlerin XRD kristal boyut analiz sonuçları

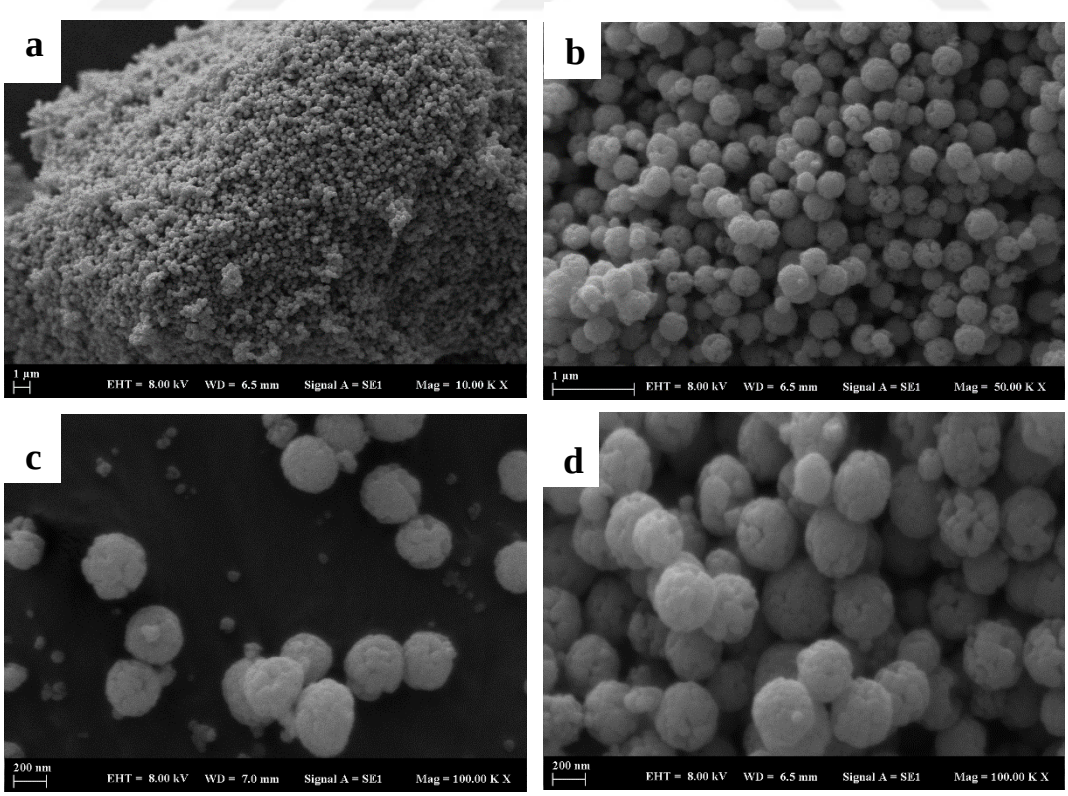
Sıcaklık (°C)	**Süre (saat)**	**Kristalit Boyut (nm)**
160	6	14 (±3)
	12	17 (±3)
	18	21 (±3)
180	6	16 (±3)
	12	17 (±3)
	18	22 (±3)
200	6	18 (±3)
	12	28 (±3)
	18	48 (±3)

4.4.5 Solvotermal Sentez Yönteminde Üre, Sodyum Sitrat ve PVP'in Nanopartikül Üretiminde Etkisi ve Sonuçları

Tez çalışması kapsamında solvotermal sentez yöntemi ile üretilen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin özelliklerine üre, sodyum sitrat ve Polivinilprolidon (PVP) etkisi incelenmiştir. Üre, sodyum sitrat ve PVP'nin nanoyapı üretiminde kullanım nedenleri aşağıda sunulmuştur:

1. Literatürde genellikle nanoyapıların sentezinde partiküllerin topaklaşmasının yani aglomerasyonun azaltılması veya önlenmesi amacıyla kullanılmaları,
2. Elektrostatik stabilizasyon maddesi olarak tercih edilmeleri,
3. İndirgeme maddesi olarak tercih edilmeleri.

Yukarıda sunulan gerekçelerle Bölüm 4.3'te sunulan solvotermal sentez yöntemi kullanılarak çöktürme ajanın eklenmesinden sonra her bir deneme için sırasıyla üre, sodyum sitrat ve PVP eklenerek 200°C sıcaklık ve 6 saat süreyle reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.3'te ayrıntıları belirtildiği şekilde yıkama ve kurutma işlemleri uygulanmış, ardından Zeiss EVO LS 10 SEM cihazı kullanılarak morfoloji analizi yapılmıştır.



Şekil 4.51 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 10.000X, b) 500.000X, c- d) 100.000X

200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre ilavesi yapılarak sentezlenen nanoyapıların içi boş nanokümeler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4.51). 100 nm'den küçük partiküllerin bir araya gelerek 200-400 nm boyut aralığına sahip içi boş nanokümeler oluşturduğu belirlenmiştir. Literatür bilgisine göre Ostwald olgunlaşma sürecinin nanokümelerin veya nanokürelerin oluşumunda etkili olması nedeniyle içi boş nanokümelerin oluştuğu düşünülmüştür [191].

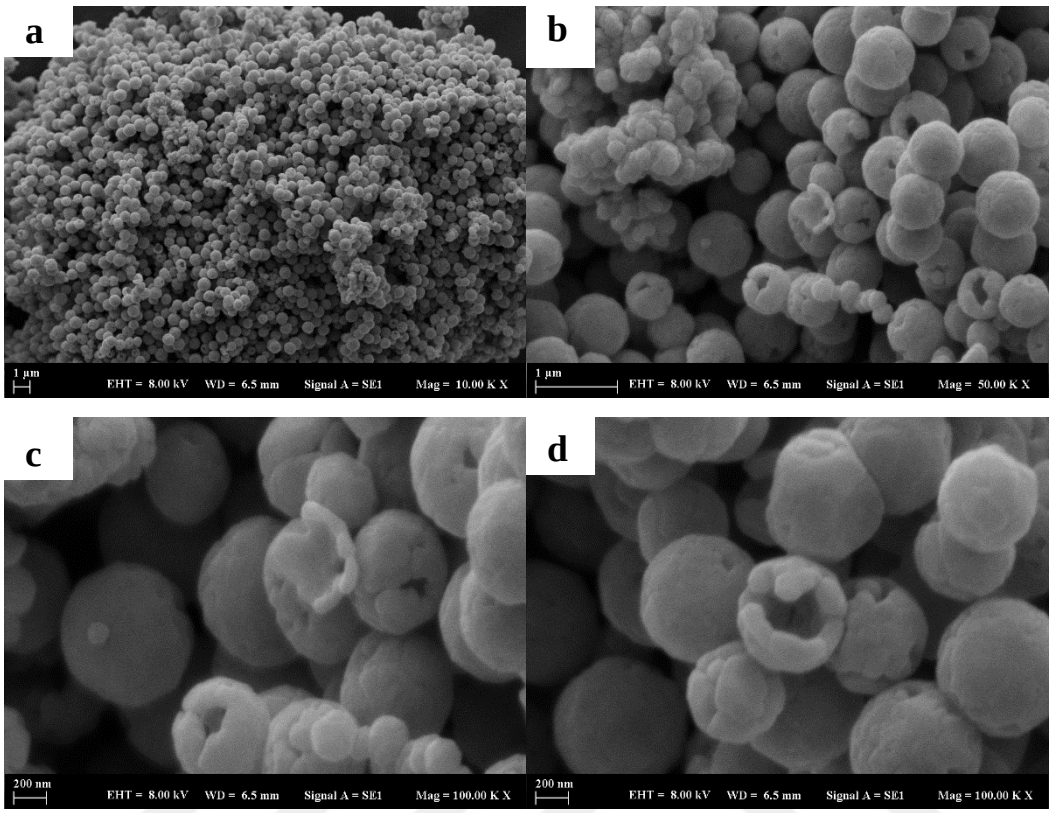
Nanokümelerin oluşumunda etkin olan Ostwald olgunlaşması; reaksiyon sırasında oluşan partiküller başlangıçta homojen ve monodispers boyuta sahipken, reaksiyon sürecinde kimyasal ajanların kullanılmasıyla homojen dağılım ve monodispersitede oluşan değişimi ifade eden süreci tanımlar [192].

Ostwald olgunlaşmasında reaksiyon sırasında oluşan küçük partiküllerin boyutları sabit kalırken, daha büyük partiküllerin boyutlarının artması ile termodinamik stabilite artarken ve enerjinin azaltılması sağlanır. Partiküllerin boyutlarının küçülmesi, yüzey alanı ve yüzey enerjilerinin daha yüksek olmasına neden olur. Bu durumdan dolayı termodinamik açıdan enerjinin azaltılması amacıyla sistem kararlı hale geçer [191]. Böylece küçük nanokristal yapıları bir araya gelerek daha büyük nanoyapılarının oluşumunu gerçekleştirir. Nanokristaller tarafından oluşturulan içi boş çekirdek/kabuk nanoyapıları (üç boyutlu küreler), başlangıçtaki katı kürelerin içsel yoğunluk değişimleri nedeniyle ortaya çıkar [193].

Literatürde, solvotermal yöntem ve üre kullanımı, 160°C sıcaklık ve 15 saat ile 200°C sıcaklık ve 15 saat süre koşullarında incelenmiştir. Çalışmanın sonuçlarında, sıcaklık arttıkça nanokümelerin yerine nano tabakaların oluştuğu bildirilmiştir. Bu durumun sebebi olarak; aglomerasyona neden olan Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşimlerin artması gösterilmiştir [194].

Yapılan farklı bir çalışmada sentez reaksiyonunda kullanılan üre miktarının oluşan mikroyapılar üzerindeki etkisi incelenmiştir [195]. Üre kullanılmadan yapılan sentez işlemi sonucunda elde edilen mikroyapılara ait morfolojinin belirsiz ve farklı boyutlarda agregatlardan oluştuğu bildirilmiştir. Üre ilavesi ile yapılan sentez işlemi sonucunda içi boş mikroyapıların elde edildiği gösterilmiştir. Ayrıca üre miktarındaki artışın mikroyapıya etkisini incelemişlerdir. Bu inceleme sonucunda ise reaksiyonda kullanılan üre miktarı arttıkça içi boş mikrokürelerin ve dış kabukların gevşek bir yapıda oluştuğu, dış kabuğun giderek inceldiği belirtilmiştir.

İçi boş mikroküre lerin oluşumunda reaksiyona eklenen üre miktarıyla ilişkili olduğunu rapor edilmiştir [195].



Şekil 4.52 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında sodyum sitrat ilavesi yapılarak sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a) 10.000X, b) 500.000X, c-d) 100.000X

Şekil 4.52'de sunulan 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında sodyum sitrat ilavesi yapılarak sentezlenen Fe_3O_4 partiküllerinin, küresel şekilli ve 100 nm boyuta sahip nanoyapılar olduğu ve bu nanoyapıların birleşerek içi boş nanokümeler oluşturduğu görülmüştür. 100 nm boyuta sahip olan nanopartiküller bir araya gelerek 700-800 nm boyuta sahip olan içi boş nanokümeler oluşturduğu belirlenmiştir.

Literatürde nanoprob olarak kullanılması amacıyla solvotermal yöntem ve sodyum sitrat kullanılarak Fe_3O_4 nanokümelerin sentezlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan çalışmada solvotermal yöntemde kullanılan etilen glikol hem çözücü hem de indirgeyici olarak görev yapar. Reaksiyona eklenen sodyum sitrat ise nanokristal aglomerasyonu elektrostatik olarak stabilize edilmesini sağlar. Ayrıca demir iyonlarının alkali koşullarda hidrolizinin gerçekleşmesinde indirgeyici bir ajan olarak kullanılır. Sodyum sitratın nanoküme oluşumu üzerindeki etkisi iki aşamalı olarak açıklanmaktadır. Birinci aşamada aşırı doymuş bir çözelti içinde öncelikle

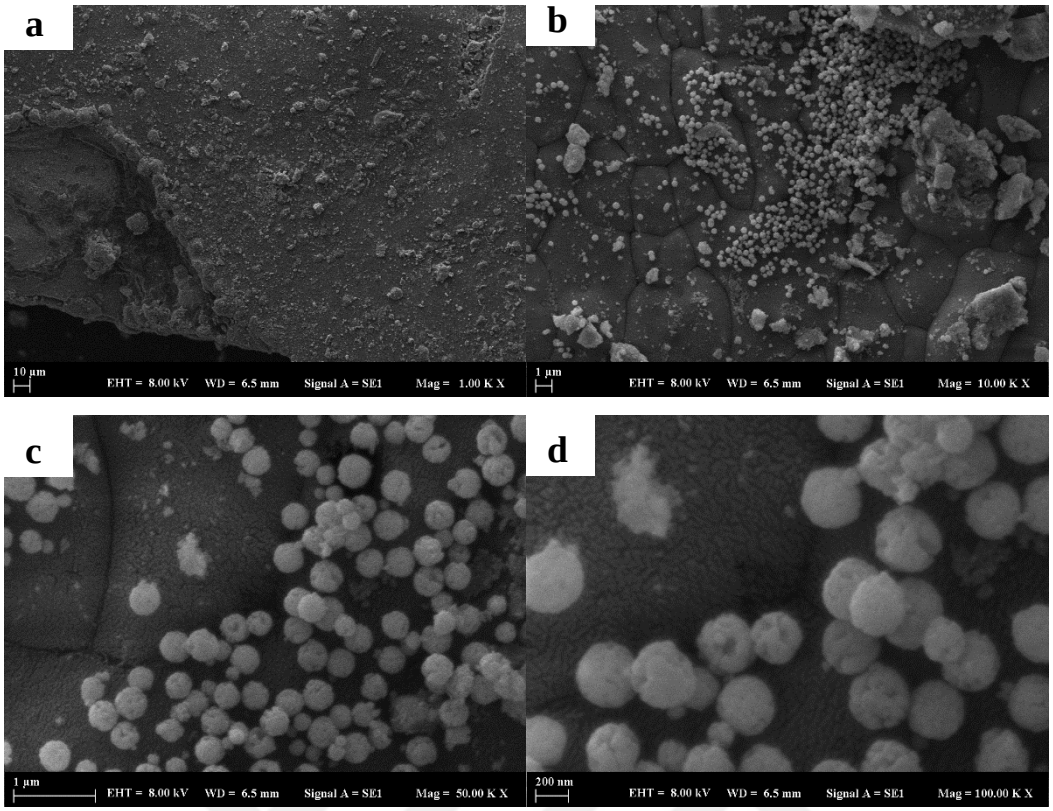
birincil nanokristallerin çekirdeklenmesi meydana gelir, ikinci aşamada bu çekirdeklerin bir araya gelerek daha büyük ikincil nanoyapılar halinde toplanması gerçekleşir [196]. Öncelikle birincil nanokristal yapılarının sodyum sitrat molekülleri tarafından stabilize edilerek oluşmasından sonra nanokristallerin küçük boyutlarından dolayı yüksek yüzey enerjisi gösterirler. Böylece oluşan bu nanokristaller reaksiyon içerisinde sodyum sitrat tarafından indirgenirler. Bu oluşum sonrası, nanokristallerin toplanmasıyla nanokürelerin oluşumunu sağlanır [196].



Şekil 4.53 Sitrat etkisi ile nanoküme oluşum aşamaları [196]

Bir çalışmada sodyum sitrat kullanımın nanoküme oluşumuna etkisi araştırılmıştır (Şekil 4.53). Çalışmada amonyak ve sodyum sitrat çöktürme ajanları kullanılmıştır. Sıcaklığın artması ile amonyak kaynağının hidrolizi sonucunda NH_4^+ iyonları pH'ın bazik değerinin artmasını sağlar böylece nanoyapıların çökmesine neden olur. [196]. Amonyak hidroliz reaksiyonunun ilerlemesi sonucunda oluşan bazik çözelti, aşırı doygunluk düzeyine ulaştığında nanokristallerin heterojen çekirdeklenmeye başlarlar [197]. Daha sonra oluşan bu çekirdeklenmiş demir-hidroksil nanokristallerin küresel şekilli olarak toplanmaya başlaması sonucunda küresel Fe_3O_4 nanoküme yapısına dönüştüğü rapor edilmiştir [197].

.



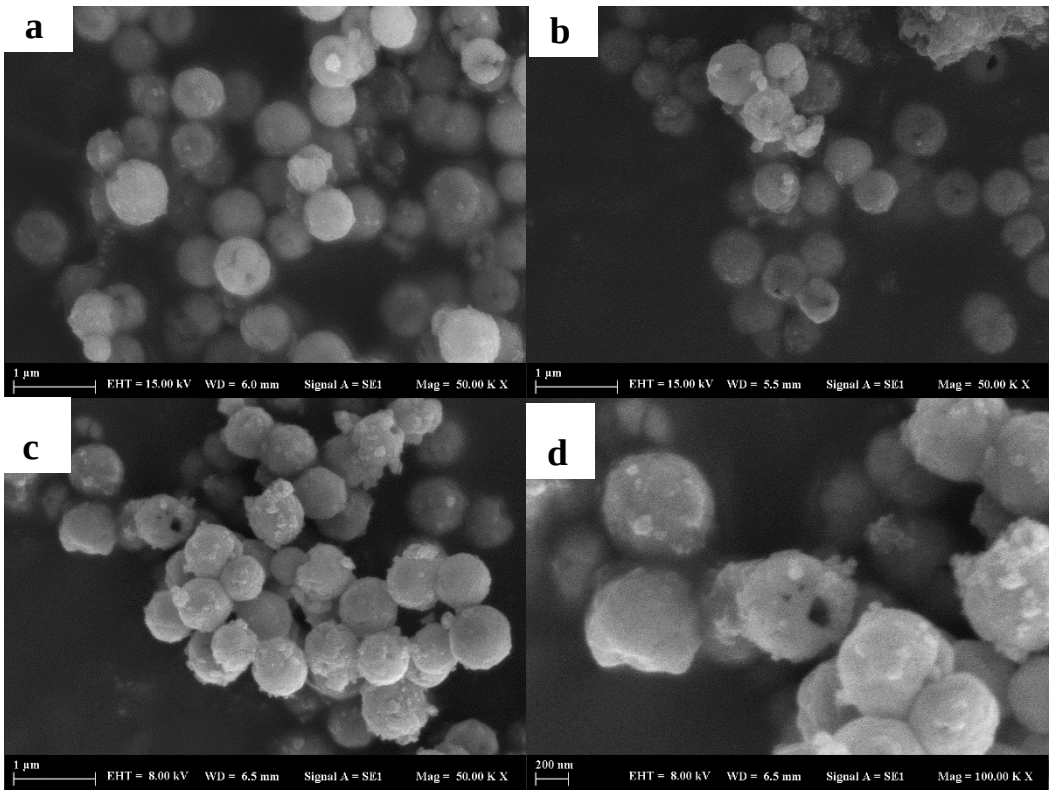
Şekil 4.54 200°C sıcaklık ve 6 saat PVP ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunelerine ait SEM görüntüleri: a) 1.000X, b) 100.000X, c) 50.000X ve d) 100.000X

Şekil 4.54'te gösterildiği gibi, 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında PVP ilavesi yapılarak sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerin içi boş nanokümeler oluşturduğu görülmüştür. SEM görüntüleri 100 nm boyutundan küçük nanopartiküllerin bir araya gelerek 350-450 nm boyut aralığına sahip içi boş nanokümeler oluşturduğunu göstermiştir. Oluşan nanokümeler PVP etkisinden dolayı heterojen bir dağılım göstermektedir.

Literatürde nanoküme oluşumuna PVP'nin etkisi incelenmiştir [194]. Yapılan çalışmada; demir klorür heksahidrat, PVP ve üre varlığında solvotermal yöntemle nanokürelerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Fe_3O_4 nanokürelerinin, ortalama 392 nm boyuta sahip olduğu bildirilmiştir. Araştırma sonucunda, içi boş Fe_3O_4 nanoküreleri antikanser ilacı DOX ile yüklenerek antikanser etkinlik çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edildiği rapor edilmiştir [198].

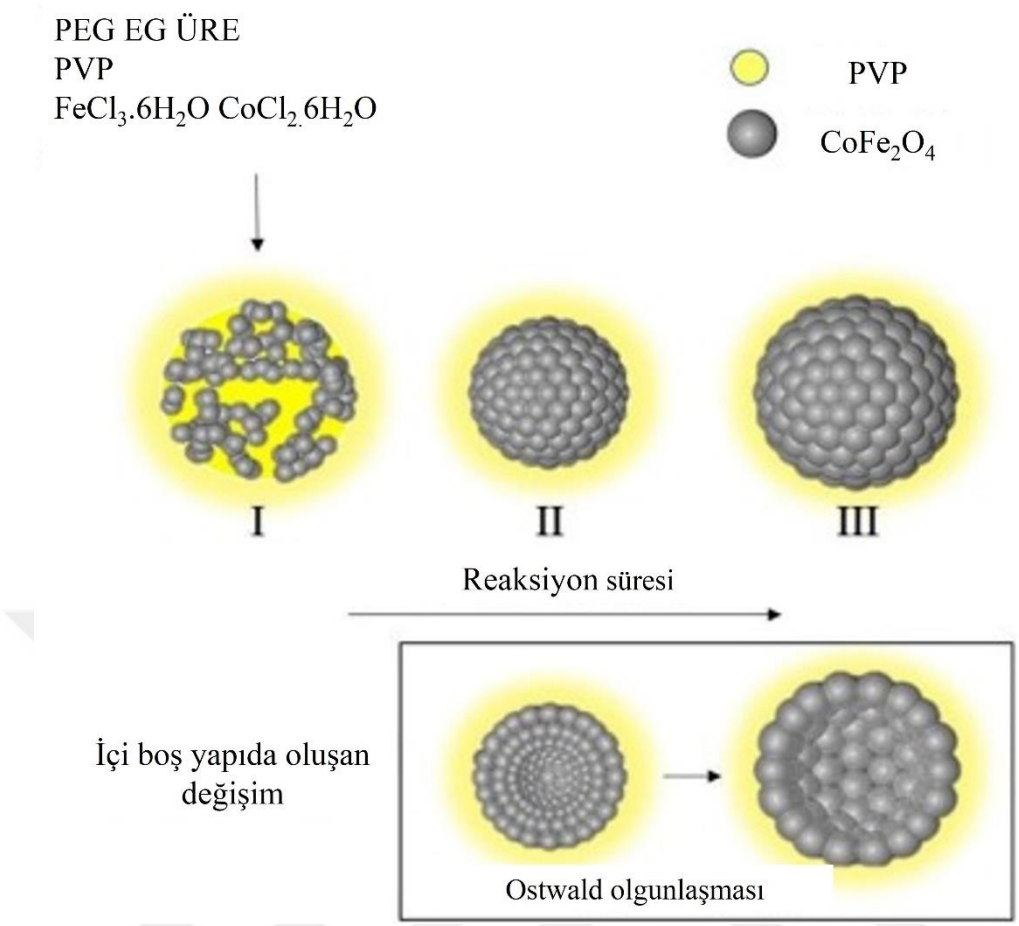
.

Nano kümenin PVP etkisi ile oluşum mekanizması, demir tuzunun öncelikli olarak etilen glikol tarafından indirgenmesi ve sıcaklığın artmasıyla birlikte nanokristal yapıların oluşumuna dayanmaktadır. Çöken nanokristal yapıların PVP ile etkileşimi sonucunda nanokristal yapıları yavaş yavaş bir araya gelerek küresel olarak birleşmeleri sonucunda nanokümeleri oluştururlar [199]. Böylece sentez yönteminde PVP'nin kullanılması ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin stabilize edilmesinin yanı sıra nanoküme oluşumu da sağlamaktadır.



Şekil 4.55 200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre + PVP ilavesi ile sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait SEM görüntüleri: a-b-c) 50.000X ve b) 100.000X

200°C sıcaklık ve 6 saat koşullarında üre ve PVP ilavesi yapılan sentez sonrasında 50 nm boyuta sahip Fe_3O_4 nanopartiküllerin küresel içi boş nanokümeleri oluşturduğu görülmüştür. 50 nm boyuta sahip olan bu nanopartiküller bir araya gelerek 650-850 nm boyuta sahip içi boş küresel nanokümelerin SEM analiz sonucu Şekil 4.55'te sunulmuştur.



Şekil 4.56 Nanokümelerin oluşum mekanizması [200]

Literatürde yapılan bir çalışmada üre ve PVP'nin nanoküme oluşumuna olan etkisi araştırılmıştır [200]. Yapılan çalışmada kobalt demir nanokümeleri farklı miktarlarda PVP'nin kullanıldığı solvotermal yöntemle üretilmiştir. Solvotermal yöntemde kullanılan PVP miktarının artması sonucunda kobalt demir nanokümelerin iç boşluk hacminin PVP miktarındaki artış ile arttığı bildirilmiştir (Şekil 4.56). Ayrıca PVP kullanımının, oluşan kobalt demir nanoküme dispersiyon stabilitesine etki ederek aglomerasyonu önlediği rapor edilmiştir. Bu durum tez kapsamında yapılan bu çalışma ile benzerlik göstermektedir [200]. SEM çalışmalarından edilen görüntüler incelendiğinde; oluşan nanokümelerde aglomerasyonu görülmemesi bu durumu destelemektedir. Literatürde yapılmış olan çalışmaya göre nanokümenin oluşum mekanizması; reaksiyon sisteminde demir tuzları ve etilen glikol sıcaklığının artmasıyla birlikte demir tuz yapısında bulunan suyun ortaya çıkması ile açıklanmıştır. Çözeltide bulunan ürenin ayrışması ile ortaya çıkan amonyak (NH_3), çözeltinin pH'ının alkali olmasına neden olmaktadır. Reaksiyon süresi arttıkça, demir ve kobalt iyonları ayrışmaya

uğrar. Ardından Ostwald olgunlaşma sürecine göre oluşan nanokristal yapılarının çözünmesi sonucunda nanoküme yapıları oluşur [200].

Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentez çalışmalarına ait değerlendirme sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

- Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezlenmesi amacıyla solvotermal ve hidrotermal yöntemleri farklı süreler ve sıcaklıklarda incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre solvotermal yöntem, en uygun sentez yöntemi olarak belirlenmiştir. Bu üretim yöntemi için optimum sentez parametrelerinin belirlenmesi amacıyla sıcaklık ve sürenin etkileri incelenmiştir.
- Fe_3O_4 nanopartiküllerine yapılan analizler sonucunda en uygun süre ve sıcaklık olarak 200°C ve 6 saat değerleri belirlenmiştir.
- Oluşan boyutun ortalama 18±3 nm olduğu SEM ve STEM analizleri ile belirlenmiştir.
- Fe_3O_4 nanopartiküllerin özelliklerine üre, sodyum sitrat, PVP ve üre + PVP'nin etkisi incelenmiş ve değerlendirilmiştir.
- Yapılan çalışma sonucunda nanokümelerin oluşumu analiz edilmiştir. Literatür incelemesi yapılarak nanokümelerin oluşum mekanizması belirlenmiştir.
- XRD ve FT-IR sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; 200°C'de 6 saat boyunca gerçekleştirilen sentez reaksiyonun %99.9 oranında manyetit yapısı oluşturduğu gösterilmiştir.
- Hedeflenen boyut ve morfolojiye sahip Fe_3O_4 nanopartiküllerine yüzey modifikasyon işlemleri gerçekleştirilecektir.

5
FE_3O_4 NANOPARTİKÜLLERİN YÜZEY MODİFİKASYONU VE SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.bölümde sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin karakterizasyon sonuçlarına göre; hedeflenen <100 nm boyutta ve küresel morfolojide oluşturulduğu doğrulanmıştır.

Bu bölümde karakterizasyon işlemleri tamamlanan Fe_3O_4 nanopartiküllerinin yüzey modifikasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu kapsamda uygulanan modifikasyon ve karakterizasyon işlemleri aşağıda sunulmuştur:

1. Fe_3O_4 nanopartikülleri polidopamin polimeri ile kaplanmıştır. Ardından polimer kaplama oranlarının ilaç salım ve fototermal etkinliğine olan etkisinin incelenmesi amacıyla farklı oranlarda polimer oranı kullanılmıştır.
   - Farklı polimer oranlarının kullanılmasıyla oluşturulan PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerinin karakterizasyonu FT-IR analiz yöntemi kullanılarak incelenmiştir.
   - FT-IR analizi ile kaplama işleminin doğrulanması sonucunda oluşan nanoyapının FE-SEM analizi ile morfoloji analizi gerçekleştirilmiştir. Image J programı kullanılarak ortalama boyutu incelenmiştir.
2. Karakterizasyon işlemleriyle polimerin nanopartiküllerin yüzeyine kaplanması doğrulandıktan sonra PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerine PEGilasyon işlemi uygulanmıştır.
   - PEGilasyon işlemi uygulanan PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerinin karakterizasyonu FT-IR analizi ile değerlendirilmiştir.
3. PEGilasyon işlemi uygulanan PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerine antikanser ilaç olan Vinorelbin yüklenmesi gerçekleştirilmiştir.
   - Vinorelbin ilacının nanoyapıya eklenmesinin doğrulanması amacıyla FT-IR analizi gerçekleştirilmiştir.
   - Oluşan nanoyapıdaki ilaç içeriği UV-vis analizi kullanılarak hesaplanmıştır.
   - VSM analizi (Titreşimli Numune Manyetometre Analizi) kullanılarak Fe_3O_4 NP, PDA/Fe_3O_4 NP ve VNB/PDA/Fe_3O_4 NP yapıların manyetiklik ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

– Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analiz (TG/DTA) çalışmaları Perkin Elmer, Diamond TG/DTA cihazı ile yapılmıştır. Nanoyapıların termal bozunma davranışı 30-1000°C sıcaklık aralığında azot atmosferi altında incelenmiştir.

5.1 Polidopamin Enkapsülasyonu, Karakterizasyonu ve Sonuçları

Bölüm 4'te detayları sunulan yöntemle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin polidopamin ile kaplanması amacıyla karakterize edilmiş olan Fe_3O_4NPlerinden 100 mg tartılmış ve tartılan nanopartiküller 50 ml tris tamponu (10 mM, pH:8.5) içerisinde dağıtılmıştır. Polidopamin oranının ilaç salımına olan etkisinin araştırılması amacıyla yukarıda bahsedilen çözelti üç ayrı beherde hazırlanmıştır. Hazırlanan beherlere eklenen maddeler aşağıda sunulmuştur;

1.Beher ; hazırlanan çözeltide 100 mg oranında bulunan Fe_3O_4NPlerinin üzerine 100 mg dopamin hidroklorür eklenmiştir ve oluşan bu nanoyapı VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) olarak kodlanmıştır.

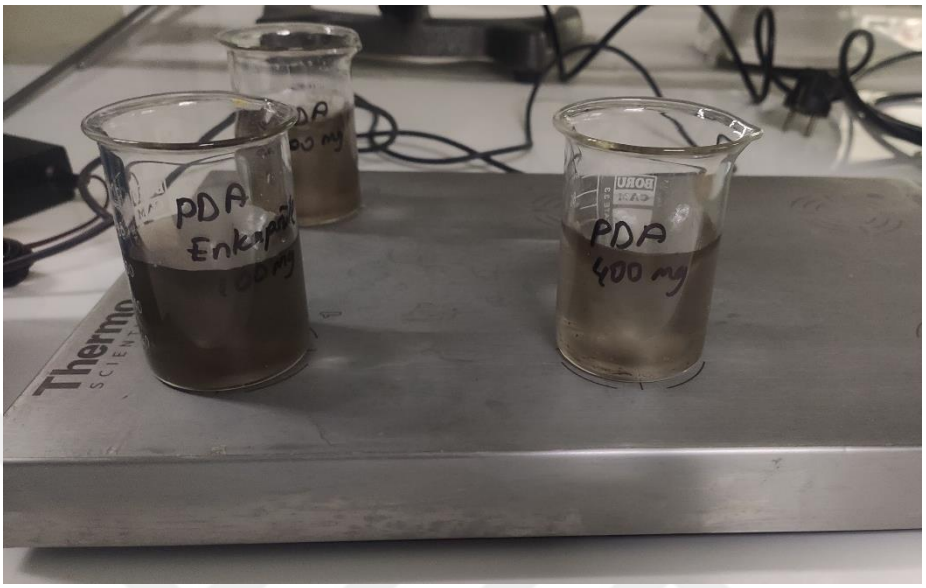
2.Beher; hazırlanan çözeltide 100 mg oranında bulunan Fe_3O_4NPlerinin üzerine 200 mg dopamin hidroklorür eklenmiştir ve oluşan bu nanoyapı VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) olarak kodlanmıştır.

3.Beher; hazırlanan çözeltide 100 mg oranında bulunan Fe_3O_4NPlerinin üzerine 400 mg dopamin hidroklorür eklenmiştir ve oluşan bu nanoyapı VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) olarak kodlanmıştır. Hazırlanan nanoyapıların PDA/Fe_3O_4NPlerin (mg/mg) numune kodları Tablo 5.1'de sunulmuştur.

Tablo 5.2 Farklı oranlarda PDA kaplanmış Fe_3O_4NP yapıların numune kodları

PDA/Fe_3O_4 NP (mg/mg)	**Numune Kodu**
1:1	VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1)
2:1	VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1)
4:1	VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1)

.

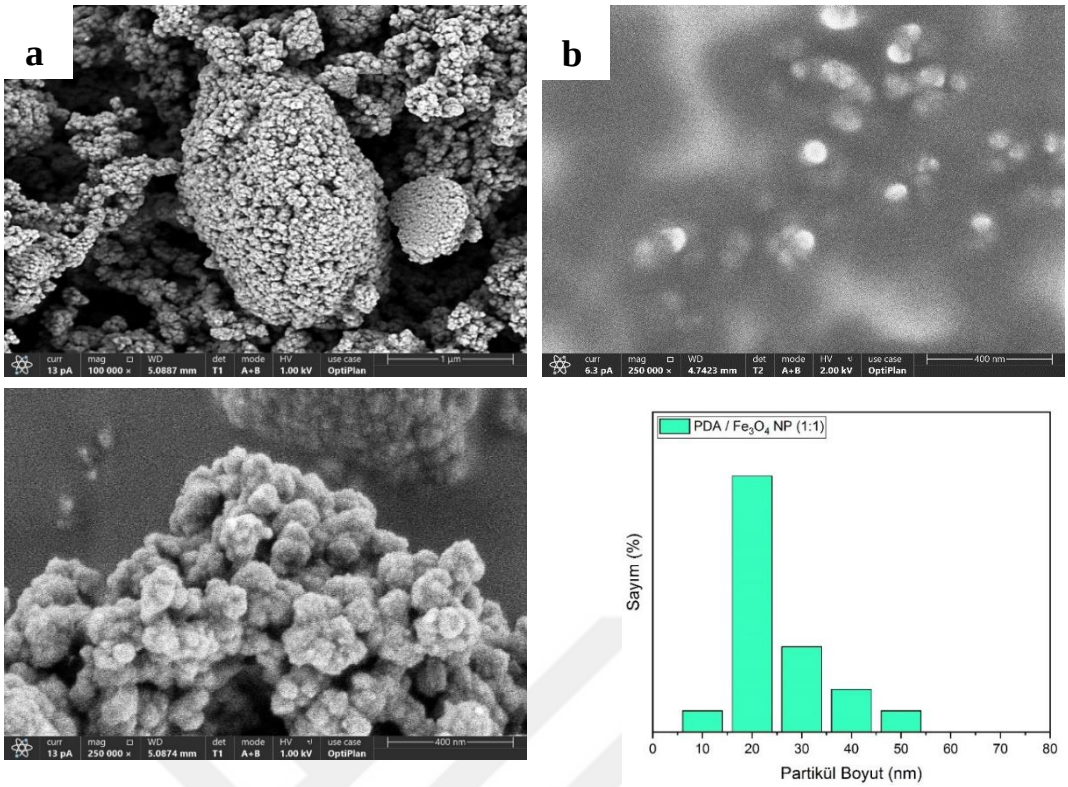


Şekil 5.1 Nanopartiküllerin PDA ile kaplanmasına ait deneysel çalışma görseli

Dopamin hidroklorür yukarıda bahsedildiği gibi (1:1), (2:1) ve (4:1) oranlarında eklendikten sonra oda sıcaklığında 1000 rpm hızında 15 saat boyunca karıştırma işlemi uygulanmıştır (Şekil 5.1). Bu aşamadan sonra elde edilen PDA ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartikülleri mıknatıs kullanılarak çözeltiden ayrıştırılmıştır. Ardından, üç kez distile su ile yıkanarak reaksiyona girmemiş maddelerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. PDA/Fe_3O_4 nanoyapıları vakumlu etüvde 55°C sıcaklıkta kurutulmuştur. Elde edilen PDA kaplı Fe_3O_4 nanoyapıların morfolojisi FE-SEM analizi ile fonksiyonel grupların türü ise FT-IR analizi yapılarak belirlenmiştir.

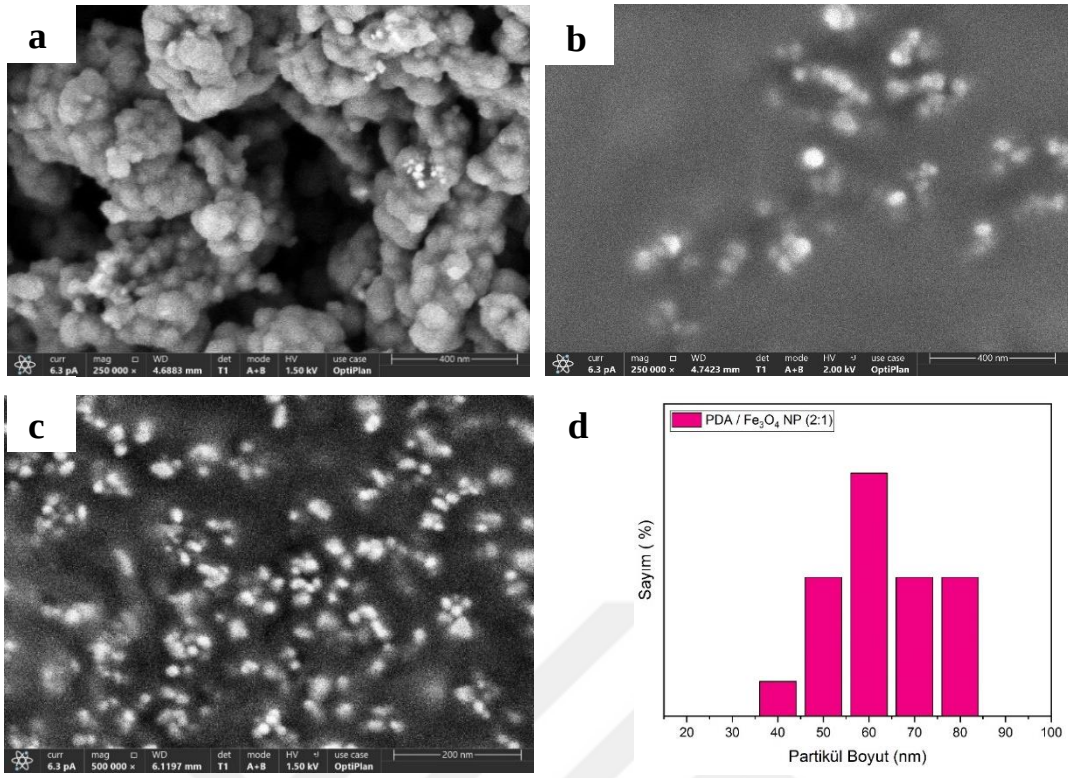
5.1.1 Alan Emisyonlu Taramalı Elektron Mikroskobu (FE-SEM) Analiz Sonuçları

Fe_3O_4 nanopartikülleri PDA ile (1:1), (2:1) ve (4:1) farklı ağırlık oranları kullanılarak enkapsüle edilmiştir. Artan polimer oranının ilaç salım etkinliğine ve fototermal ısınma verimliliğine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu kapsamda oluşturulan PDA/Fe_3O_4 NP'lerin morfoloji ve boyut analizi FE-SEM analizi ile gerçekleştirilmiştir.



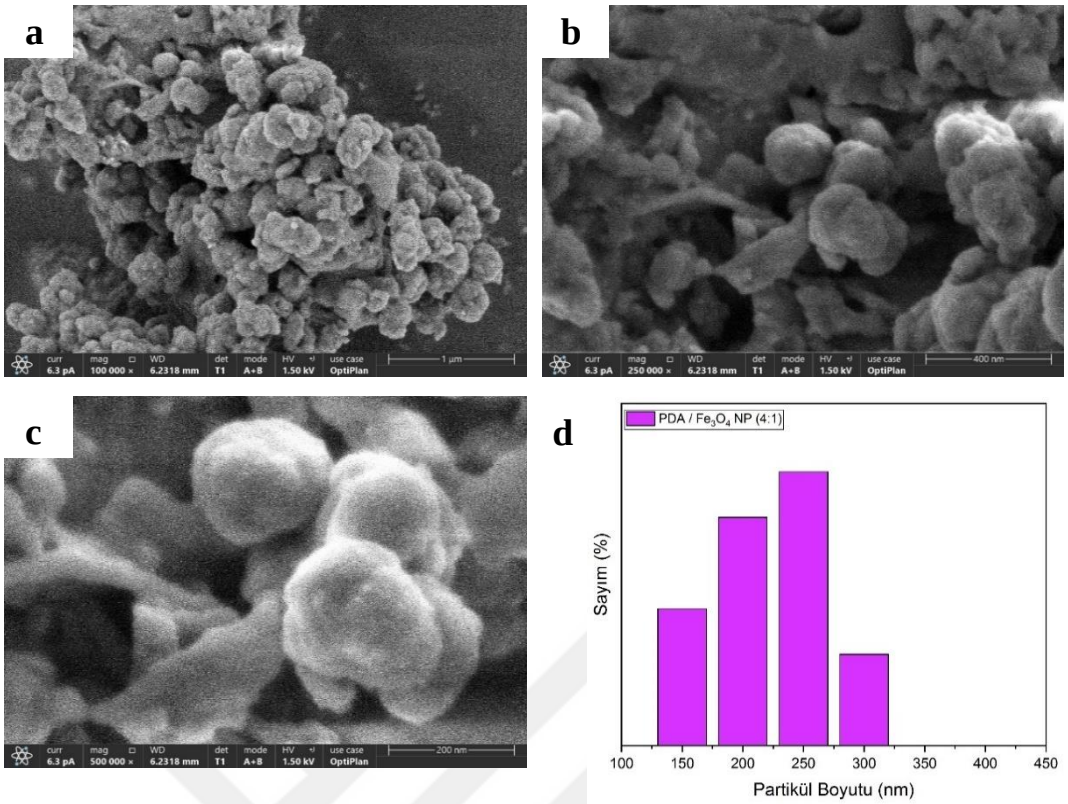
Şekil 5.2 PDA/Fe_3O_4 (1:1) numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları: a) 25.000X, b) 100.000X, c) 250.000X ve d) FE-SEM analizi ortalama boyut

PDA/Fe_3O_4 (1:1) numunesine ait FE-SEM sonuçları incelendiğinde yapıların küresel morfolojide olduğu görülmüştür (Şekil 5.2). Daha önceki çalışmalarda STEM analizi yapılmış olan NPlerin üzerine PDA ile enkapsülasyon işlemi uygulanmıştır. Böylece Fe_3O_4 NPlerinin üzerine kaplanan PDA polimerinin kalınlığının bulunması amaçlanmıştır. Çıplak Fe_3O_4 NPlerin ortalama boyut değeri 18 nm iken, PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 NPlerin ortalama boyut değeri 28 nm (Şekil 5.2-d) olarak belirlenmiştir. Bu nedenle Fe_3O_4 NPlerin üzerine 10 nm PDA polimeri ile kaplama yapıldığı düşünülmektedir.



Şekil 5.3 PDA/Fe_3O_4 (2:1) numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları:
a) 100.000X, b) 250.000X, c) 500.000X, d) FE-SEM analizi ortalama boyut

PDA/Fe_3O_4 (2:1) numunesine ait FE-SEM sonuçları incelendiğinde, yapıların küresel morfolojide olduğu görülmüştür (Şekil 5.3). Çıplak Fe_3O_4 NPlerin ortalama boyutu 18 nm iken, PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 NPlerin (2:1) ortalama boyutunun 61 nm (Şekil 5.3-d) olduğu görülmüştür. Böylece Fe_3O_4 NPlerin üzerine 43 nm PDA polimeri ile kaplama yapıldığı düşünülmektedir.



Şekil 5.4 PDA/Fe_3O_4 (4:1) numunesine ait FE-SEM analiz sonuçları:
a) 100.000X, b) 250.000X, c) 500.000X ve d) FE-SEM analizi ortalama boyut

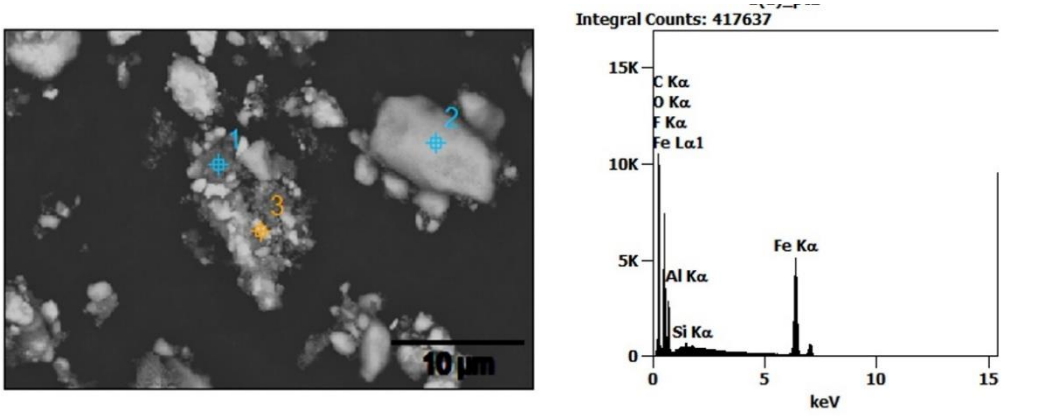
PDA/Fe_3O_4 (4:1) numunesine ait FE-SEM sonuçları incelendiğinde, yapıların diğer oranlarda olduğu gibi küresel morfolojide olduğu görülmüştür (Şekil 5.4). Çıplak Fe_3O_4 NPlerin ortalama boyutu 18 nm iken, PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 NPlerin (4:1) ortalama boyutunun 225 nm olduğu görülmüştür. Böylece Fe_3O_4 NPlerin üzerine 207 nm PDA ile kaplama yapıldığı düşünülmektedir. Ayrıca 4:1 oranında kullanılan PDA oranının yapıda çok fazla polimer olmasından kaynaklı olarak aglomerasyonu arttırdığı görülmüştür.

Farklı oranlarda kullanılan PDA'nın enkapsülasyon ve ilaç salımına olan etkileri araştırılmış ve sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

5.1.1.1 PDA/Fe_3O_4 NPlerin FE-SEM/EDX Sonuçları

Malzemenin kantitatif bileşenlerinin analiz edilmesi amacıyla EDX, EDS veya EDAX olarak bilinen enerji dağıtıcı X-ışını spektroskopisi kullanılmaktadır. EDX analizi, malzemenin elementel bileşiminin tespit edilmesini sağlayan nicel bir tekniktir.

Sentezlenen Fe_3O_4 NPlerin PDA kaplama sonrası ve öncesi EDX analizi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Böylece nanoyapının elementel bileşimi yapılan analiz sonrası doğrulanmıştır.



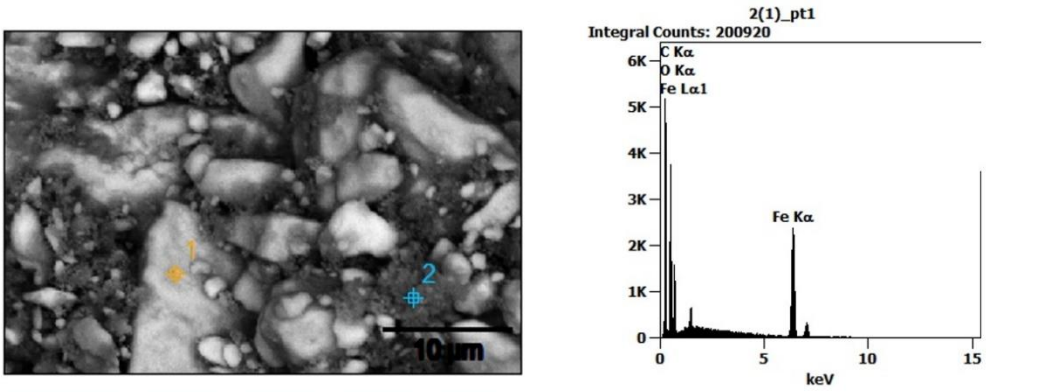
% Ağırlık	C-K	N-K	O-K	Fe-K
1. Nokta	29.02		20.37	50.12
2.Nokta	28.29		24.01	46.03

% Atom	C-K	N-K	O-K	Fe-K
1.Nokta	52.47		27.65	19.49
2.Nokta	49.68		31.65	17.38

Şekil 5.5 Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait EDX analiz sonucu

Fe_3O_4 NPlerin EDX analiz sonucu Şekil 5.5'te sunulmuştur. Elementel analiz sonucuna göre elde edilen değerler nanopartiküllerde karbon, oksijen ve demirin elementlerini göstermektedir.

Yapıdaki demir atomları ağırlıkça %50.12 ve atomsal olarak %46.03 olarak tespit edilmiştir. Analiz verilerine göre, nanopartiküllerde bulunan karbon, oksijen ve demirin varlığı, Fe_3O_4 NPlerin oluşumunu desteklediği belirlenmiştir [201]. Literatürde yapılan bir çalışmada birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenen Fe_3O_4 NPlerin FE-SEM/EDX analizini gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda %28.2 demir atomu, %27.59 karbon atomu ve %44.17 oksijen atom ağırlığı tespit edilmiştir [202]. Fe_3O_4 NPlerin EDX analizinde tespit edilen karbon, oksijen ve demirin varlığının, yapılan çalışmalar [202], [203] ile benzerlik göstermektedir.



% Ağırlık	C-K	N-K	O-K	Fe-K
1. Nokta	27.82		19.34	51.43
2.Nokta	38.80	11.35	24.22	25.46

%Atom	C-K	N-K	O-K	Fe-K
1.Nokta	51.49		26.88	20.48
2.Nokta	53.68	13.46	25.16	7.57

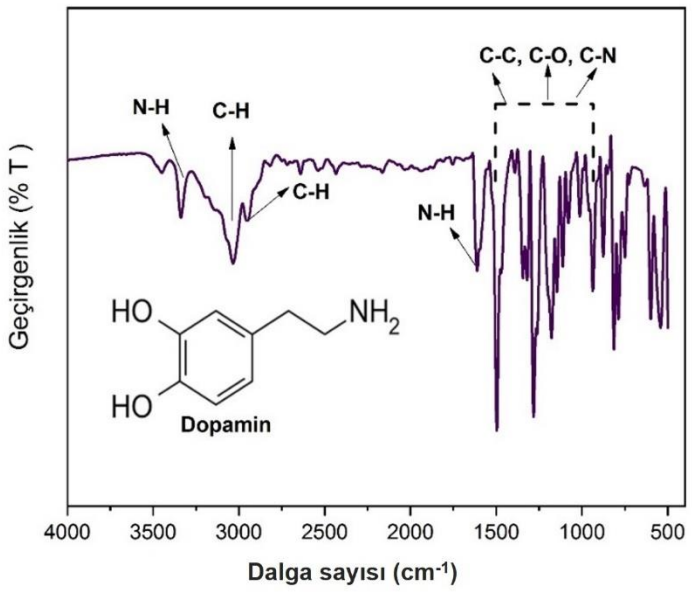
Şekil 5.6 PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerine ait EDX analiz sonucu

PDA/Fe_3O_4 nanopartikülüne ait EDX analiz sonucuna göre; ağırlıkça %51.43 ve atom yüzdesine göre %25.46 oranlarında demir elementi tespit edilmiştir (Şekil 5.6). Ayrıca karbon, azot ve oksijen elementlerine ait pikler görülmüştür.

5.1.2 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları

Fe_3O_4 NPlerin enkapsülasyonu için farklı miktarlarda (100, 200 ve 400 mg) dopamin hidroklorür polimeri kullanılmıştır. Elde edilen nanoyapıların yüzey modifikasyonunun doğrulanması ve oluşan kimyasal bağların tespit edilmesi amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. PDA'nın kimyasal yapısı FT-IR analizini içeren literatür çalışmaları ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmiştir. FT-IR analizi yapılan dopamin hidroklorürün FT-IR spektrumu Şekil 5.7'te gösterilmiştir.

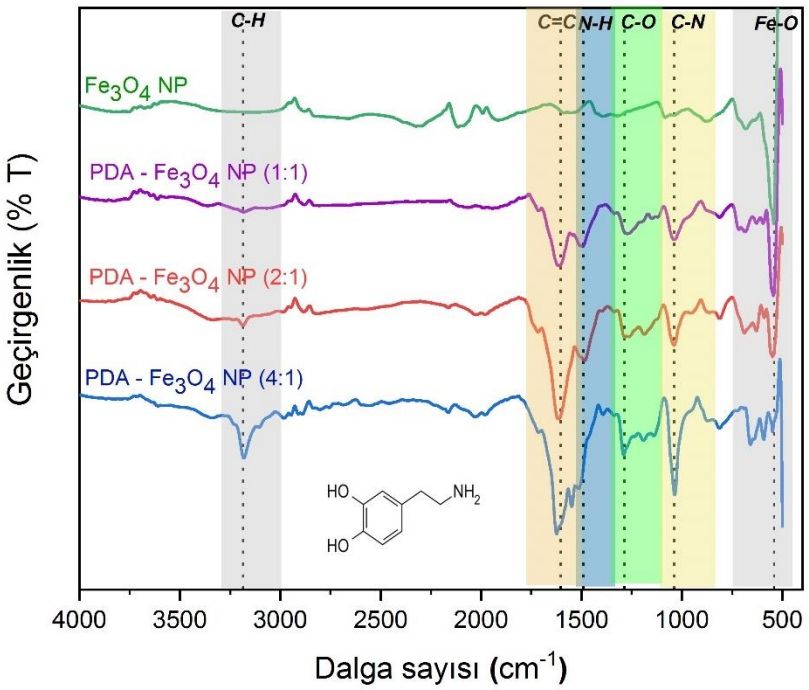
Hem dopamin hidroklorür hem de PDA için 1500 cm^{-1}'e yakın bir tepe noktası, her iki yapıda ortak olan aromatik bölgeleri göstermektedir [204]. 1200-1500 cm^{-1} bölgesi C–C, C–O ve C–N piklerini ve 3000 cm^{-1} bölgesi C-N ve C-O piklerini ifade etmektedir [204].



Şekil 5.7 Dopamin hidroklorüre ait FT-IR spektrumu

FT-IR analizi yapılan dopamin hidroklorüre ait karakteristik pikler; 3335 cm^{-1} (amin NH uzaması), 3038 cm^{-1} (aromatik CH uzaması) ve 2961 cm^{-1} (alkil CH uzaması) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, 1618 cm^{-1} (amin NH bükülmesi) ve 1285 cm^{-1} (aromatik C=C uzaması) pikleri de yer almıştır [205], [206]. PDA'nın yapısında 3173 cm^{-1}'de O-H ve 1598 cm^{-1}'de N-H bağlarına ait pikler bulunmaktadır. Bu durum, PDA'nın başarılı oksidatif polimerizasyonunu göstermektedir [207].

Nihai ürünün kimyasal bileşimini doğrulamak için Fe_3O_4NP, PDA ve PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR spektrumları elde edilmiştir.



Şekil 5.8 (1:1), (2:1) , (4:1) oranlarında PDA/Fe_3O_4 içeren nanoyapıların karşılaştırmalı FT-IR spektrumları

Şekil 5.8'de sunulan FT-IR analiz sonuçlarına göre Fe_3O_4 NPlerin güçlü absorpsiyon bantları; 587 cm^{-1}'de ve 1620 cm^{-1}'de elde edilen Fe-O ve H-O-H ve gruplarına ait gerilme titreşimleri olarak görülmüştür [148]. Polimer oranının arttıkça PDA piklerinin şiddetlerinde artış oluştuğu belirlenmiştir.

PDA/Fe_3O_4 NPlerin FT-IR spektrum absorpsiyon bantları incelendiğinde 1520 cm^{-1}'de N-H esneme bandı görülmüştür. Elde edilen sonuçların, Xupeng Mu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada elde ettikleri PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR sonuçları ile benzer olması, Fe_3O_4 üzerinde PDA'nın varlığını doğrulamıştır [208]. PDA/Fe_3O_4 NPlerin, 1259 cm^{-1}'de oluşan yeni pikin , C–O birimlerinin esneme titreşimini temsil ettiği ve bu pikin, Feng, Jinghua ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarıylada benzerlik göstermektedir [209].

Litarürde Xue ve arkadaşlarının yapmış olduğu Fe_3O_4NP ve PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR sonuçları 584 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1}'de gösterilmiştir, bu sonuçlar FT-IR analizinden elde edilmiş olan 587 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1}'de bulunan Fe-O ve H-O-H ve gruplarına ait gerilme titreşimleri sonuçlarıyla benzerdir [148]. PDA'nın güçlü ve geniş absorpsiyon bantları, aromatik halkaların gerilme titreşimi ve fenol bileşiklerinin C-O gerilmesinden kaynaklanan 1700-1000 cm^{-1} aralığında gözlenmiştir [210], [211].

Yan, W., arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada Fe_3O_4NPlerin FT-IR analiz sonuçlarında demir oksit nanoyapılarına ait karakteristik Fe–O pikinin 586 cm−[1]'de oluştuğu belitrilmiştir. PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR analizinde PDA'nın benzen halkasındaki C=C titreşiminin sırasıyla 1608 cm^{-1} ve 1274 cm^{-1}'de oluştuğu ayrıca fenolik grubuna ait olan C–O germe titreşiminin 1274 cm^{-1}'de tespit edildiği bildirilmiştir [210].

Bu sonuçlar tez çalışması kapsamında elede edilen sonuçlar ile benzerlik göstermektedir. Litarürde elde edilen PDA/Fe_3O_4 NPlerin FT-IR sonuçları ile tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların benzer olması, Fe_3O_4 NPlerin yüzeyindeki PDA'nın varlığını kanıtlamıştır [208], [209].

5.2 SH-PEG (Tiyol-Polietilen Glikol) ile Yüzey İşlevselleştirilmesi, Karakterizasyonu ve Sonuçları

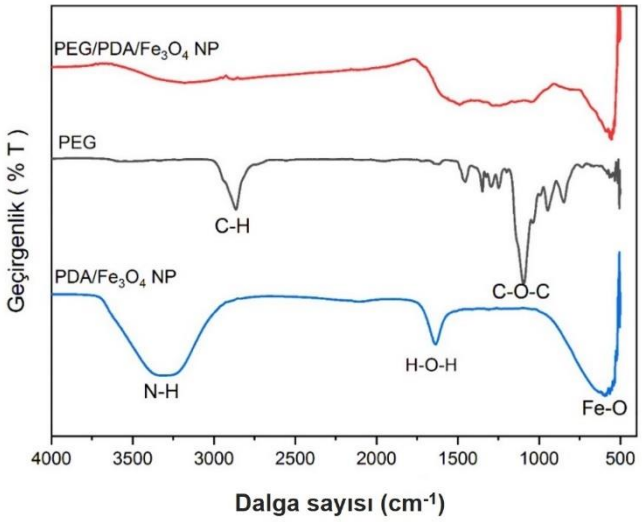
PDA enkapsüle Fe_3O_4 nanoyapıların tiyol- polietilen glikol (SH-PEG) ile yüzey modifikasyonu için; 50 ml tris tamponu (10 mM, pH:8.5) içerisine 50 mg PDA enkapsüle Fe_3O_4 nanoyapıları eklenerek 10 dakika boyunca karıştırılmıştır.

Karışımın üzerine 100 mg SH-PEG eklenerek 5-10 dakika boyunca çözeltinin homojen hale gelmesi sağlanmıştır. Çözeltiye amonyum hidroksit (NH_4OH, %28) eklenerek 70 dakika boyunca oda sıcaklığında, 2000 rpm hızında karıştırma işlemine devam edilmiştir.

Bu işlemin ardından PEG ile modifiye edilmiş PDA ile kaplanmış Fe_3O_4 nanopartikülleri mıknatıs kullanılarak çözeltiden ayrıştırılmıştır ve reaksiyona girmemiş partiküllerden arındırmak için distile su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. Elde edilen nanoyapılı manyetik nanopartiküller vakumlu etüvde 45°C sıcaklıkta kurutulmuş ve FT-IR analizi ile PEGilasyon işlemi doğrulanmıştır.

5.2.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları

SH-PEG ile yüzey işlevselleştirilmesi uygulanan PDA ile enkapsüle edilmiş olan Fe_3O_4 NPlerin yüzeyinde oluşan bağ ve kimyasal yapıları FT-IR ile incelenmiştir.

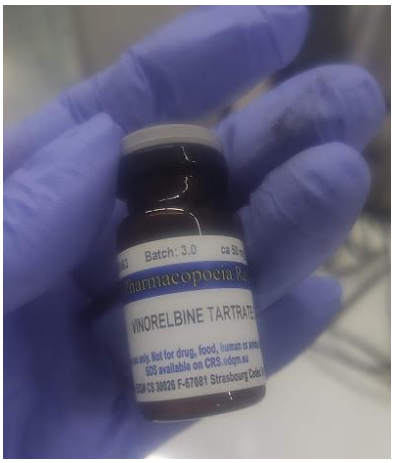


Şekil 5.9 PEGilasyon işlemi uygulanan PDA/Fe_3O_4 NPlere ait FT-IR spektrumu

FT-IR analiz sonuçlarına göre; 1150 cm^{-1} ve 2890 cm^{-1}'de oluşan pikler sırasıyla C-O-C ve C-H gruplarının SH-PEG'den gelen gerilme titreşimlerini temsil etmektedir (Şekil 5.9). SH-PEG'in FT-IR spekturumunda 1500 cm^{-1} ve 1000 cm^{-1}'de görülen bant yapıları, PDA kaplanan nanoyapıların SH-PEG ile yüzey modifikasyonunu doğrulamaktadır [28], [212]. Aynı şekilde PDA enkapsüle nanoyapılarında bulunan N-H pikinin, SH-PEG ile modifikasyon sonrası kaybolması yüzeyin PEGilasyon uygulamasını göstermektedir.

5.3 Vinorelbin İlacının Nanoyapıya Yüklenmesi, Karakterizasyonu ile Sonuçların İncelenmesi

Karakterize edilen PEGilasyon uygulanan ve PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 nanoyapısına Vinorelbin ilacının yüklenmesi amacıyla; VNB ilacı hassas terazide 25 mg olarak tartılmıştır. Ardından 25 mg PEGilasyon işlemi uygulanan ve PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 NPleri 25 ml fosfat tamponu (pH: 8) içerisine eklenerek çözündürülmüştür (Şekil 5.10).



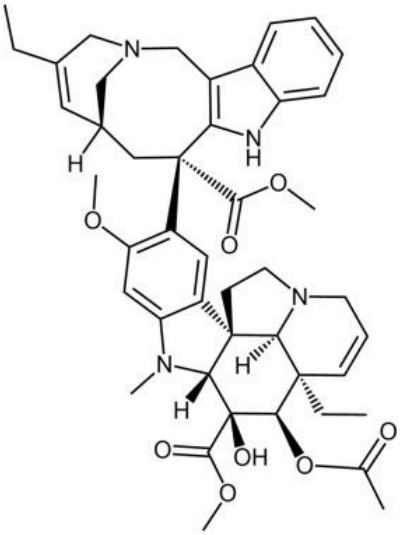
Şekil 5.10 Vinorelbin ilacına ait görüntü

Hazırlanan karışıma 25 mg VNB eklenerek çözelti 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Ardından santrifüj işlemi uygulanarak oluşan son nanoyapı mıknatıs yardımıyla ayrıştırılmış ve 3 kez distile su ile yıkanmıştır. Oluşan nanoyapı 45°C sıcaklıkta vakumlu etüvde kurutulmuştur.

Vinorelbin ilacının nanoyapıya yüklenmesinin tespit edilmesi amacıyla FT-IR analizi yapılmıştır. Ayrıca yapılan modifikasyon ve ilaç yükleme sonrası NPlerin manyetik özellikleri Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM) analizi ile değerlendirilmiştir. Termogravimetrik ve nanoyapıların termal bozunma davranışının araştırılması amacıyla Diferansiyel Termal Analizi (TG/DTA) Perkin Elmer, Diamond TG/DTA cihazı ile azot atmosferi altında 30-1000°C sıcaklık aralığında gerçekleştirilmiştir.

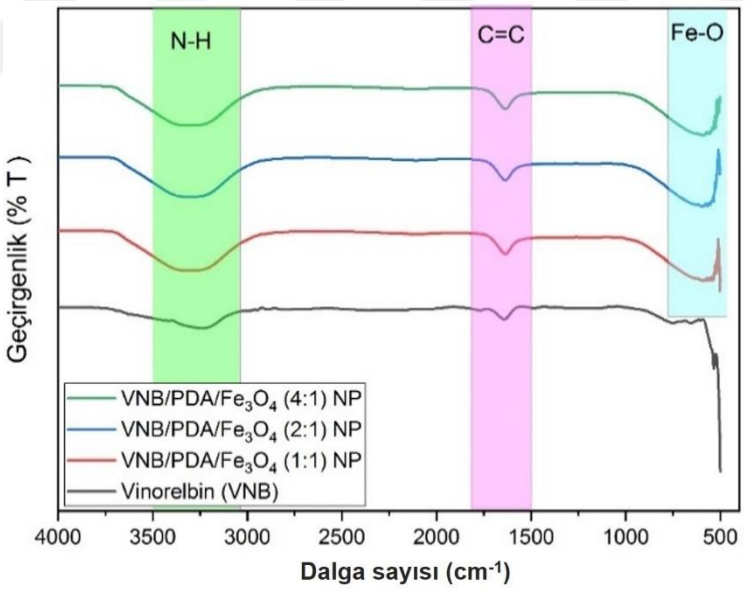
5.3.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopi (FT-IR) Analiz Sonuçları

PEGilasyon işlemi uygulanan PDA ile enkapsüle edilen NPlere VNB antikanser ilacının yüklenmesinin doğrulanması amacıyla oluşturulan nanoyapı FT-IR analizi ile değerlendirilmiştir. VNB ve VNB yüklü nanoyapılar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.



Şekil 5.11 Vinorelbin ilacının kimyasal yapısı [157]

VNB ilacınnın kimyasal yapısı Şekil 5.11'de sunulmuştur [157]. İlaç yüklemesi sonrası oluşturulan son nanoyapı VNB/PEG/PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR analiz sonucu Şekil 5.12'de gösterilmiştir. VNB'nin FT-IR spektrumunda bulunan 3500-3000 cm^{-1} dalga boyu aralığındaki karaktersitik N-H piki, NPlere VNB ilacının yüklendiğini göstermektedir



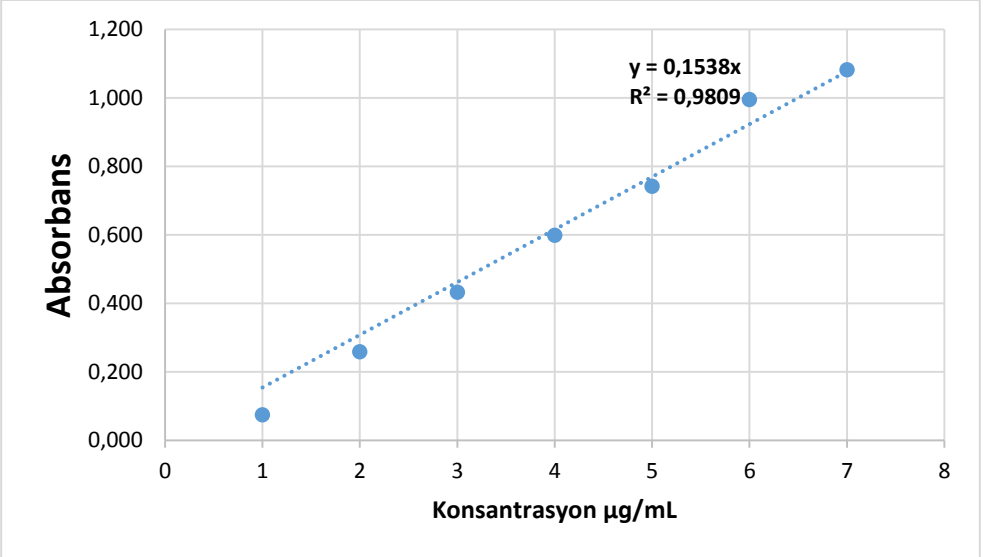
Şekil 5.12 VNB yüklü PEG/PDA/Fe_3O_4 NPlere ait FT-IR spekturumu

VNB, 1573 cm^{-1}'de C-C ve 3500-35000 cm^{-1}'de N-H grubu içermesinden dolayı güçlü bir pik sergilemiştir [213]. Bu sonuç, VNB yüklü NPlerin başarılı bir şekilde nanoyapıya yüklendiğini doğrulamaktadır.

5.3.2 Vinorelbin İlacına Ait Kalibrasyon Eğrisinin Oluşturulması

Vinorelbin ilacının zamana bağlı salımına ait kalibrasyon eğrisi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan VNB çözeltileri kuvars küvetlere alınmıştır ve 200-800 nm dalga boyları arasında UV-vis cihazı ile absorbans ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Vinorelbin ilacı literatür ile uyumlu olarak 268nm dalga boyunda maksimum absorbans değeri göstermiştir [33]. Elde edilen absorbans değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisinin (Şekil 5.13) oluşturulmasının ardından kümülatif ilaç salımları hesaplanmıştır.



Şekil 5.13 Vinorelbin ilacına ait absorbans-konsantrasyon (kalibrasyon) eğrisi

UV-vis spektrofotometre ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak y=mx değeri excell yardımıyla oluşturulmuştur ve eşitlik (5.1)'de sunulmuştur:

$$y = 0{,}153x \quad (R^2 = 0{,}9952) \qquad (5.1)$$

5.3.3 İlaç Yükleme Verimliliğinin Hesaplanması ve Sonuçların İncelenmesi

İlaç yükleme verimliliğinin hesaplanması; sentez sırasında reaksiyona giren ilaç miktarının hangi oranda nanoyapıya yüklendiğinin tespit edilmesi amacıyla incelenmiştir.

Bu amaçla; PDA/Fe_3O_4NPlere Vinorelbin ilacı yüklemesi sonrasında ilaç yüklü nanopartiküllere 1000 rpmde 10 dakika boyuna santrifüj işlemi uygulanmış, ardından nanopartiküller çözelti içerisinden mıknatıs yardımı ile toplanmıştır.

Geride kalan çözeltilerin süpernatantları depolanmıştır. Daha sonra VNB ilacının yükleme verimliliğinin belirlenmesi amacıyla UV-vis spektrofotometre cihazı ile 268 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmıştır. UV-vis cihazının sıfırlama işlemi PDA/Fe_3O_4NP çözeltisi kullanılarak yapılmıştır. Böylece PDA/Fe_3O_4NPlerin absorbansı ihmal edilerek reaksion sonrası sadece kalan ilacın absorbansı ölçülmüştür.

VNB ilacının PDA/Fe_3O_4NPlere ilaç yüklenme verimliliği (% İYV) [214], standart bir eşitlik (5.2) kullanılarak hesaplanmıştır ve yükleme verimliliğinin yaklaşık olarak %99 olduğu bulunmuştur.

$$\%\mathbf{İYV} = \frac{(\text{Başlangıç İlaç miktarı} - \text{Süpernatantta kalan ilaç miktarı})}{\text{Toplam ilaç miktarı}} \text{ X } 100 \qquad (5.2)$$

Bu formülde, %İYV, yüklenen ilacın toplam ilaç miktarına olan oranını ifade eder. İlacın ne kadarının nanopartiküller içerisine başarılı bir şekilde yüklendiğini gösteren bir verimlilik ölçüsüdür.

Tablo 5.2 İlaç yükleme verimliliği (%)

Nanopartikül	**İlaç Yükleme Verimliliği (%)**
VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1)	99,6705
VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1)	99,5385
VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1)	99,5475

İlaç yükleme verimlikleri hesaplanan NPlere ait veriler Tablo 5.2'te sunulmuştur. Yapılan ilaç yükleme çalışması sonucunda tüm yapılara **%99** verimlilikle ilaç yüklemesi gerçekleştirildiği tespit edilmiştir.

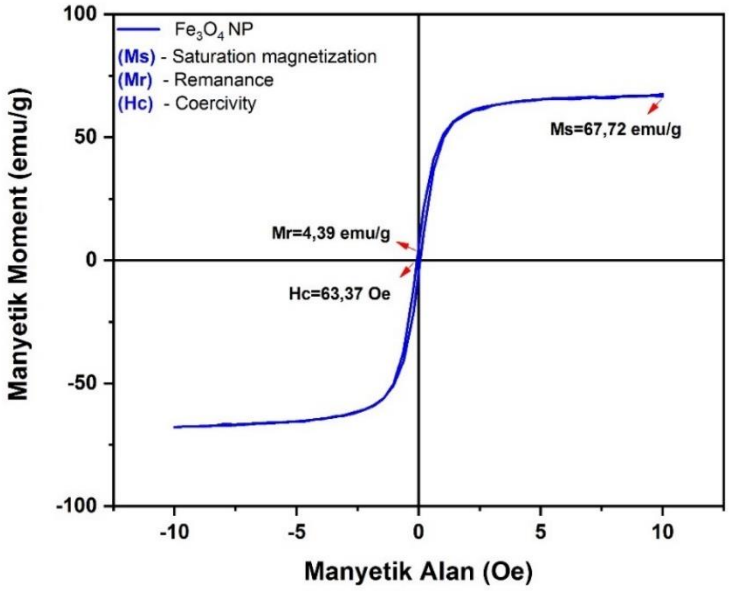
5.3.4 Titreşimli Numune Manyetometre Analiz (VSM) Sonuçları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ve modifiye edilen nanoyapıların manyetik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla, 298°K'de alan kaynaklı mıknatıslanma ölçümleri kullanılarak VSM analizi (Lake Shore, Model 7410) gerçekleştirilmiştir. VSM analizi sonucunda elde edilen veriler Tablo 5.2'de sunulmuştur.

Tablo 5.3 VSM analiz verileri

Nanopartikül	Ms (emu/g)	Mr (emu/g)	Hc (Oe)
Sentez Fe_3O_4	67,72	4,39	63,37
PDA/Fe_3O_4	65,62	6,68	95,13
VNB/PDA/Fe_3O_4	60,40	4,65	60,56

VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerinin VSM analizi, PDA/Fe_3O_4NPler ve sentezlenen Fe_3O_4NPler ile birlikte karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.



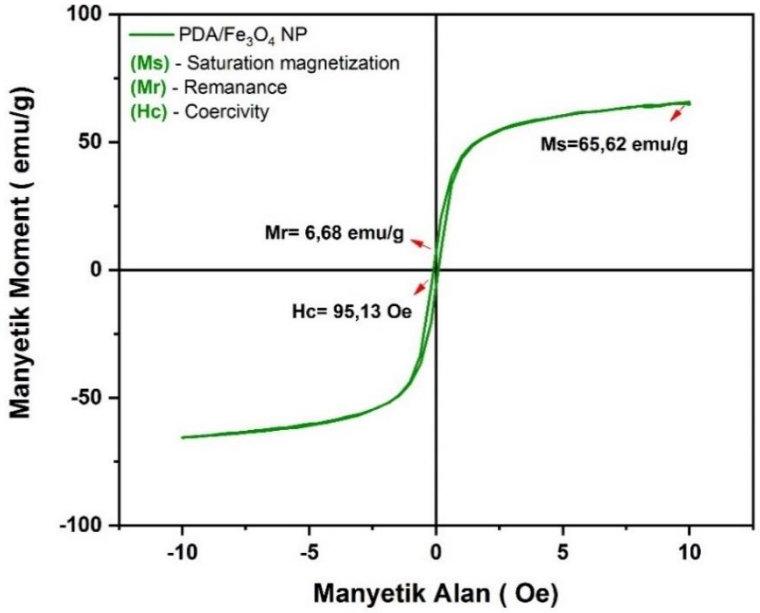
Şekil 5.14 Fe_3O_4NPye ait VSM analiz grafiği

Şekil 5.14'te sentezlenen Fe_3O_4NPnin VSM analiz sonucunda Ms: 67,72 emu/g, Hc: 63,37 Oe ve Mr: 4,39 emu/g olarak tespit edilmiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmalar 67 emu/g değerinin bildirilen manyetizasyon değerleri ile tutarlı olduğunu göstermektedir [118], [215]. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin manyetik özelliklerinin araştırıldığı literatür çalışmaları incelendiğinde; Li ve ark., solvotermal yöntemle sentezledikleri Fe_3O_4 nanopartiküllere VSM analizi yapmışlar ve analiz sonucunda Ms: 69.641 emu/g ve Mr: 0.8 emu/g değerlerini tespit etmişlerdir[118]. Bu değerler analiz sonucunda bulunan Ms: 67,72 emu/g sonuçlarının literatür ile uyumlu olduğunu göstermiştir.

Farklı bir çalışmada A. K. Singh ve ark.; Fe_3O_4 nanoparçacıklarını demir tuzunun farklı oranlarını ve piperidin (C_6H_5N) ajanını kullanarak sentezlemişlerdir. VSM analizi sonucunda en yüksek değer olarak Ms: 45.15 emu/g ve Mr: 2,13 emu/g

verilerini rapor etmişlerdir. VSM analizi sonucunda elde edilen Ms: 67,72 emu/g, ve Mr: 4,39 emu/g değerlerinin literatürde bildirilen sonuçlara yakın olduğu görülmüştür [216].

Diğer bir çalışmada Panda ve ark., Fe_3O_4 nanoparçacıklarını 12.4 nm boyutunda sentezlemişler ve VSM analizi sonucunda Ms değerini Ms: 67.8 emu/g olarak bulmuşlardır. Nanoyapının süperparamanyetik özelliğe sahip olduğunu rapor etmişlerdir [215]. Bu sonuç; tez kapsamında sentezlenen Ms: 67,72 emu/g değeriyle benzerlik göstermektedir.



Şekil 5.15 PDA/Fe_3O_4NPye ait VSM analiz grafiği

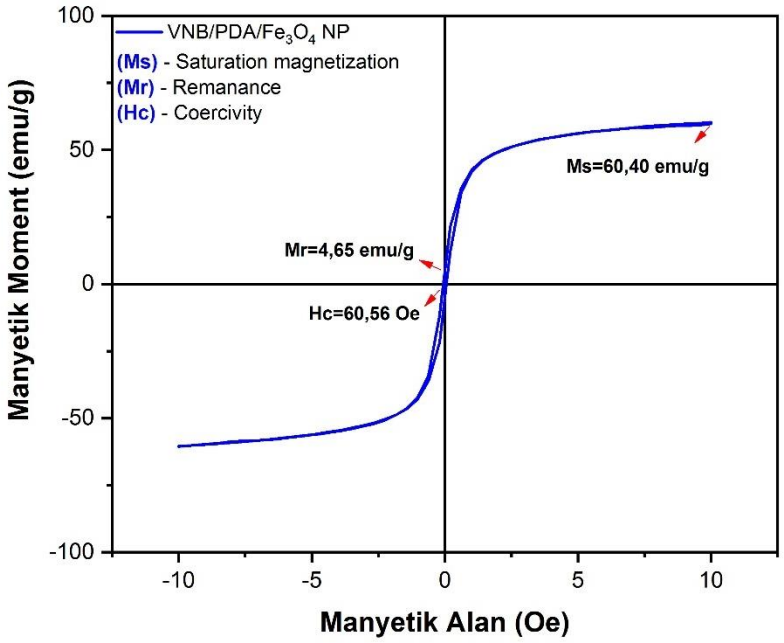
PDA/Fe_3O_4 NPye ait VSM analizi sonucunda Ms: 65,62 emu/g, Hc: 95,13 Oe ve Mr: 6,68 emu/g değerleri tespit edilmştir (Şekil 5.15). Elde edilen Ms değerlerinin, literatürde yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu olduğu ve literatürde bildirilen aralık içinde olduğu görülmüştür [217], [218].

Wang ve ark., PDA ile kaplanan Fe_3O_4 nanoyapılarını solvotermal yöntem kullanarak üretmişlerdir. PDA kaplı Fe_3O_4 nanoyapısını güneş buharlaştırılmasında kullanılmak amacıyla incelenmiştir. PDA kaplı Fe_3O_4 nanoyapısının yüksek güneş enerjisi emme kapasitesi göstererek %69,93-%85,47 oranında yüksek buharlaşma verimliliği gösterdiğini bildirmişlerdir [217]. Yapılan çalışmada VSM analiz sonucuna göre Fe_3O_4NPlerin Ms:60,02 emu/g ve PDA kaplı Fe_3O_4 nanoyapısının Ms değerinin 42,20 emu/g ile 54,57 emu/g arasında değiştiğini rapor etmişlerdir [217]. Yapılan farklı bir çalışmada atık sudaki ağır

metallerin ayrıştırılmasında kullanılmak üzere 13 nm ve 15 nm boyuta sahip PDA kaplı Fe_3O_4NPleri yeşil sentez yöntemi kullanarak elde edilmiştir. Yapmış oldukları VSM analiz çalışma sonuçlarında Fe_3O_4 NPlerin manyetik doygunluk değeri Ms:55,87 emu/g olduğunu ve PDA kaplı Fe_3O_4NPlerin manyetik doygunluk değerinin Ms:44,7 emu/g olduğunu bildirmişlerdir [218].

Si, Jingyu ve ark., çekirdek/kabuk yapısına sahip küresel PDA/Fe_3O_4 NPlerini sentezlemişlerdir. VSM analiz sonucunda nanoyapının süperparamanyetik özellik gösterdiğini ve ölçülen manyetik doygunluk değerini Ms:43 emu/g olarak bildirmişlerdir. Çalışmada yapılan sitotoksisite analizi ile nanoyapıların düşük sitotoksisite ve yüksek biyouyumluluk gösterdiğini açıklamışlardır. Ayrıca sentezlenen bu nanoyapıların süperparamanyetik özellikte ve biyouyumlu yapıda olmasından dolayı katalizör çalışmalarında veya ilaç dağıtımında kullanılabileceğini rapor etmişlerdir [219].

Yapılan çalışmalarda gösterildiği üzere Fe_3O_4NPlerinin PDA polimeri ile kaplanması sonrasında Ms değerinde bir düşüş oluşmuştur. Bu durum, Fe_3O_4 NP etrafının PDA polimeri tarafından kaplanmasından kaynaklanmaktadır [218], [220].



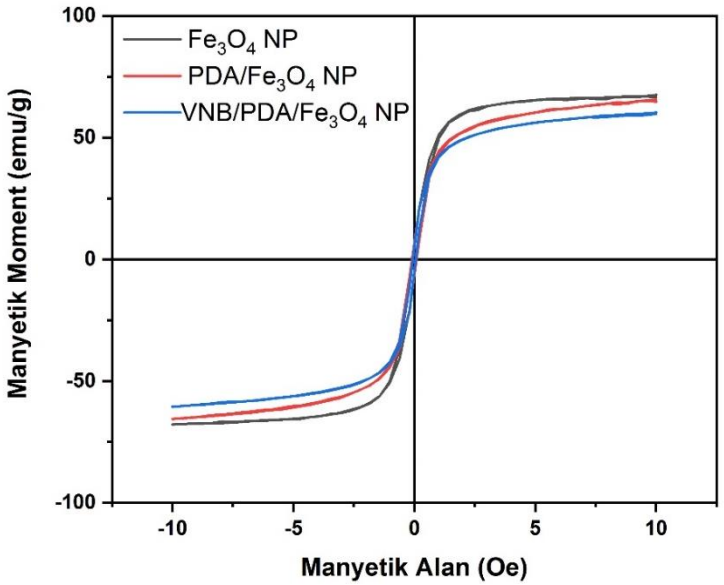
Şekil 5.16 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPye ait VSM analiz grafiği

VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin VSM analiz sonucunda; M_S: 60,40 emu/g, Hc: 60,56 Oe ve Mr: 4,65 emu/g değerleri tespit edilmştir (Şekil 5.16).

Literatürde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde; Oroujeni ve ark., kontrollü ilaç salımı oluşturmak amacıyla Fe_3O_4NPlerin yüzeyini PDA ile kaplamış ve ardından 6-tiyo-β-siklodekstrin ilacını nanoyapıya yüklemişlerdir. Elde edilen nanoyapının hidrofobik bir ilaç olan diklofenak (DCF) ile etkileşimlerini de araştırmışlardır. VSM analizi sonucunda çıplak Fe_3O_4NPlerin manyetik doygunluk değeri Ms:76 emu/g iken, 6-tiyo-β-siklodekstrin ilacı yüklü nanoyapı olan β-CD-PDA/Fe_3O_4NPlerin Ms:66 emu/g değeri gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca çıplak Fe_3O_4 NPlerin yüzeyinin manyetik özelliğe sahip olmayan bir kaplama malzemesi veya polimer ile modifiye edilmesi sonrasında Ms değerinin azaldığını rapor etmişlerdir [220].

Yapılan farklı bir çalışmada, küresel morfolojiye sahip olan Fe_3O_4NPleri solvotermal yöntemle sentezlendikten sonra PDA polimeri ile yüzey kaplaması uygulanmıştır. Daha sonra sentezlenen nanopartiküllerin yüzeyine, polietilen glikol (PEG) polimeri kullanarak yüzey işlevselleştirilmesi gerçekleştirmişler ardından %24 oranında Doksorubisin (DOX) ilacı yüklemişlerdir. VSM analizi sonucunda, ilaç yüklü nanoyapının Ms:37,8 emu/g değeri gösterdiğini bildirmişlerdir. Sonuç olarak; oluşturulan nanoyapının anti-tümör etkisi gösterdiğini rapor etmişlerdir [133].

H. Hashemi ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kanser tedavisinde kullanılmak üzere Fe_3O_4NPleri L‑DOPA polimeri ile kaplamışlar ardından Taksan ilacını yüklerek sentezlenen nanopartiküllerin antitümör incelemişlerdir. Sentezledikleri Fe_3O_4 NPleri ve ilaç yüklü L‑DOPA kaplı Fe_3O_4 NPlerin manyetik doygunluk değerlerinin sırasıyla Ms:65 emu/g ve Ms: 57 emu/g olduğunu rapor etmişlerdir [221]. Tez çalışmasında Fe_3O_4NPnin ve VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin VSM analizden elde edilen manyetik doygunluk sonuçları sırasıyla Ms:67,72 emu/g, Ms:60,40 emu/g değerleri yapılan bu çalışma ile oldukça benzer olduğu görülmüştür.



Şekil 5.17 VSM analiz sonuçlarının karşılaştırılması

Şekil 5.17'te sunulan grafikte, VSM analizi yapılan nanoyapıların eğrileri karşılaştırmaları olarak verilmiştir. VSM analiz sonucunda Ms (emu/g) değerinin yüzey modifikasyonu sonucunda azaldığı görülmüştür.

Tablo 5.3 Literatür çalışmalarından elde edilen VSM analiz sonuçları

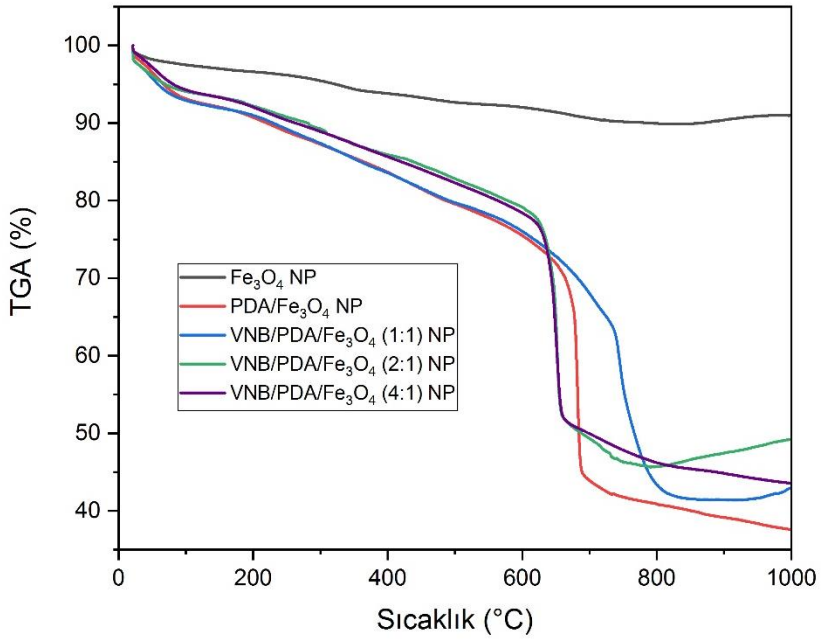
Literatür	**Fe_3O_4NP (Ms: Manyetik Doygunluk)**	**PDA/ Fe_3O_4NP (Ms: Manyetik Doygunluk)**	**İlaç Yüklü NP (Ms: Manyetik Doygunluk)**
Tez çalışması	67,72 emu/g	65,62 emu/g	60,40 emu/g
[118]	69.64 emu/g	-	-
[133]	-	-	37,80 emu/g
[211]	67.80 emu/g	-	-
[212]	45.15 emu/g	-	-
[213]	60,02 emu/g	42-54 emu/g	-
[214]	55,87 emu/g	44,70 emu/g	-
[215]		43 emu/g	-
[216]	76 emu/g	-	66 emu/g
[217]	65 emu/g	57 emu/g	-

Tablo 5.3'te literatürde yapılan VSM analiz sonuçları sunulmuştur. Literatürde yapılan çalışmalar ile elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır ve PDA kaplama kaplama sonrası Ms değerlerinde azalma görülmüştür. Literatürde bu durumun nedeni; manyetik nanopartikülün çevresinde kaplanan polimerin nanoyapının

çevresini sarmasından dolayı Ms değerinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir [218], [220].

5.3.5 Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analizi (TG/DTA) ve Sonuçların İncelenmesi

Nanoyapıların termal bozunma davranışının araştırılması kapsamında, azot atmosferi altında 30-1000°C sıcaklık aralığında Perkin Elmer, Diamond TG/DTA cihazı ile 1:1, 2:1 ve 4:1 oranlarında oluşturulan ilaç yüklü Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4 NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin Termogravimetrik ve Diferansiyel Termal Analizi (TG/DTA) analizleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 5.18 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3ONP ve (1:1), (2:1) ve (4:1) oranlarına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4 NP karşılaştırmalı TGA analiz grafiği

Fe_3O_4 NPlerin 1000°C'ye kadar yapılan TGA analizi sonucunda toplam kütle kaybının %8.17 oranında oluştuğu görülmüştür (Şekil 5.18). Bu durum, nanoyapının yüzeyinde bulunan su moleküllerinin ya da kurutma sonrası oluşan kimyasal kalıntıların, safsızlıkların sıcaklığın etkisi ile kütle kaybına neden olmuştur. Ayrıca elde edilen eğrilerde belirgin bir eğim olmamasının, nanopartiküllerin demir oksit nanoyapısı olmasından kaynaklanmıştır.

Literatürde yapılmış benzer çalışmalar incelendiğinde; yapılan bir çalışmada, Fe_3O_4NP ve PDA kaplı Fe_3O_4 NPlerin TGA ölçümleri 30°C ile 1000°C arasında gerçekleştirilmiştir [217]. TGA analizine göre, PDA kaplı Fe_3O_4

NPlerin oda sıcaklığından 150°C'ye kadar olan ilk aşamada oluşan ağırlık kaybı, polimer tarafından emilen su moleküllerinin nanopartiküllerinden ayrılması olarak açıklanmıştır. Ayrıca PDA kaplı Fe_3O_4 nanopartikül yapısında 100°C-450°C sıcaklık aralığında ikinci bir ağırlık azalmasının oluşma sebebi olarak, PDA polimerinin ayrışmasının oluştuğu rapor edilmiştir. Üçüncü ağırlık azalmasının ise 450°C-600°C sıcaklık aralığında nanopartiküllerde bulunan safsızlıkların ayrılması sonucunda oluştuğu rapor edilmiştir. PDA kaplı Fe_3O_4 nanoyapısının TGA analizi boyunca toplam ağırlık azalmasının % 31,5 oranında gerçekleştiği bildirilmiştir, Bu sonucun, tez çalışması kapsamında elde edilen %32,3 kütle kaybı ile benzer olduğu görülmüştür [217]. Tez kapsamında analizi yapılan PDA/Fe_3O_4NPlerin termogram eğrisi incelendiğinde 150°C'ye kadar oluşan hafif eğrinin su moleküllerinden buharlaşmasından kaynaklanmıştır. 678°C sıcaklıkta % 61.266 oranında bir kütle azalması görülmüştür bu durum PDA polimer zincirlerinin bozunmasından veya ayrışmasından kaynaklanmaktadır. Literatürde verilen analiz sonuçları ile tez kapsamında elde edilen sonuçlar ile benzer olması yapılan çalışmamızı destelemektedir.

VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin (1:1) oranına sahip olan ilaç yüklü nanoyapının TGA analizinde 744°C sıcaklıkta toplam %55 oranında kütle kaybı belirlenmiştir. VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin (2:1) oranına sahip nanoyapılarının TGA analizinde ise iki aşamalı bir kütle kaybı görülmüştür. Birinci aşamada 550°C'ye kadar olan sıcaklıkta %16,8 oranında kütle kaybı, ikinci aşamada 550°C'den 1000°C sıcaklığa kadar olan sıcaklık aralığında %32,3 oranında kütle kaybı gözlenmiştir. Toplam kütle kaybı %49.1 olarak belirlenmiştir. (4:1) oranına sahip VNB/PDA Fe_3O_4NPlerin termogram eğrisinde yine iki aşamalı kütle kaybı oluştuğu gözlenmiştir. 550°C sıcaklığa kadar %18,50 oranında ve 550°C'den 1000°C sıcaklık aralığında ise %37,34 oranında kütle kaybı oluşmuştur. Toplam kütle kaybı %55,84 olarak belirlenmiştir.

Diğer bir çalışmada, desolvasyon yöntemi kullanılarak VNB yüklü BSA nanopartikülleri hazırlanmıştır. Hazırlanan nanoyapının termal özellikleri TGA analizi ile incelenmiştir. TGA analizine göre VNB ilacında, 36°C ile 180°C sıcaklık aralığında meydana gelen su kaybı nedeniyle ağırlık azalması oluştuğu tespit edildiği belirtilmiştir. 200°C ile 233°C sıcaklık aralığında oluşan ağırlık azalmasının, buharlaşma ve ilacın ayrışması nedeniyle oluştuğu rapor edilmiştir.

Yaklaşık 250°C sıcaklıktan sonra hızlı bir şekilde ağırlık azalmasının ise VNB yüklü nanopartiküllerin ayrışmasına ait olduğu bildirilmiştir [33].

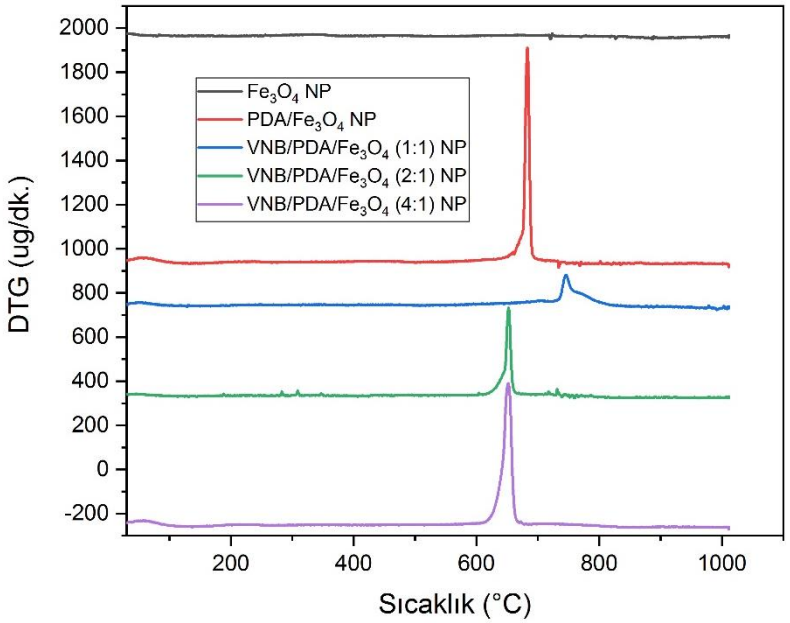
Yapılan diğer bir çalışmada, PDA kaplı Fe_3O_4NPlerine β-siklodekstrin ilacı yüklenmiştir, ardından PDA kaplı Fe_3O_4NPler ile ilaç yüklü olan nanoyapının TGA analizi yapılmıştır [220]. 150°C sıcaklıkta her iki nanoyapı için elde edilen ağırlık kaybının, yüzeyde bulunan su gibi uçucu bileşenlerden kaynaklı olduğu bildirilmiştir. PDA kaplı Fe_3O_4NPlerin 200°C ve 700°C sıcaklık aralığında %11 oranında oluşan ağırlık kaybının PDA polimerin bozunmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. İlaç yüklü β-CD-PDA-Fe_3O_4NPlerin ağırlık kaybının 200°C ile 1000°C sıcaklık arasında %13,4 olduğu bildirilmiştir [220].

PDA ve PDA kaplı Fe_3O_4NPlerin karşılaştırmalı TGA analizinin yapıldığı farklı bir çalışmada, PDA'nın iki aşamalı termal bozunma süreci gösterdiği rapor edilmiştir [218]. Bu süreçte ilk ağırlık kaybının 140°C'nin altında oluştuğu ve bu durumun, polimer matrisinde bulunan su moleküllerinin buharlaşmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. İkinci ağırlık kaybının ise 120°C ve 650°C sıcaklık aralığında %87 oranında gerçekleştiği, gerçekleşen yüksek kütle kaybına ise polimer zincirinin bozunmasının neden olduğu belirtilmiştir. Sıcaklığın 800°C'ye yükseltilmesi ile PDA polimerinde yaklaşık %99,8 oranında ağırlık kaybı oluştuğu ifade edilmiştir. PDA kaplı Fe_3O_4NPlerin TGA analizinde ise, 200°C sıcaklık değeri altında %7 oranında bir kütle azalması görülmüştür. Görülen bu azalmanın nanoyapıda bulunan ve/veya emilen fiziksel, kimyasal suyun uzaklaşmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. Fe_3O_4NPlerin yüzeyinde bulunan PDA'nın 230°C sıcaklıkta bozunmaya başladığı ve 500°C sıcaklıkta %59 oranında ağırlık kaybının gerçekleştiği, 500°C ve 900°C arasında önemli bir ağırlık değişiminin görülmediği rapor edilmiştir [218].

Benzer bir çalışmada, Fe_3O_4NP'ler ve PDA kaplı Fe_3O_4NPler TGA yöntemi ile analiz edilmiştir. 0-150°C sıcaklık aralığında nanoyapının yüzeyinde adsorbe edilmiş olan su ve diğer uçucu bileşenlerin ayrıldığı, 150-800°C arasında ise PDA kaplı Fe_3O_4 NPlerden PDA polimerinin bozunması sonucunda %12,6 kütle kaybı oluştuğu rapor edilmiştir [222].

Nanoküme morfolojisine sahip olacak şekilde sentezlenen PDA kaplı Fe_3O_4 NPlerin TGA analizinin yapıldığı bir çalışmada, %17,65'lik bir ağırlık kaybı elde edildiği belirtilmiştir. Elde edilen ağırlık kaybının, stabilize edici ligand olarak

kullanılan oleylamine yapısının termal ayrışmasından kaynaklandığı açıklanmıştır [223]. Literatür ve tez çalışması kapsamında yapılan TGA çalışmalarının sonuçları değerlendirildiğinde; Fe_3O_4NPler ve ilaç yüklü nanoyapılarda yaklaşık 150°C-200°C sıcaklık aralığında oluşan ağırlık kaybının, nanoyapının yüzeyinde bulunan ve/veya absorplanmış su moleküllerinin ayrılmasında kaynaklandığı, 200°C ile 700°C sıcaklık aralığında görülen ağırlık kaybının ise PDA polimerinin ayrışmasından oluştuğu belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların literatür ile uyumlu olduğu sonucuna ulaşılmıştır.



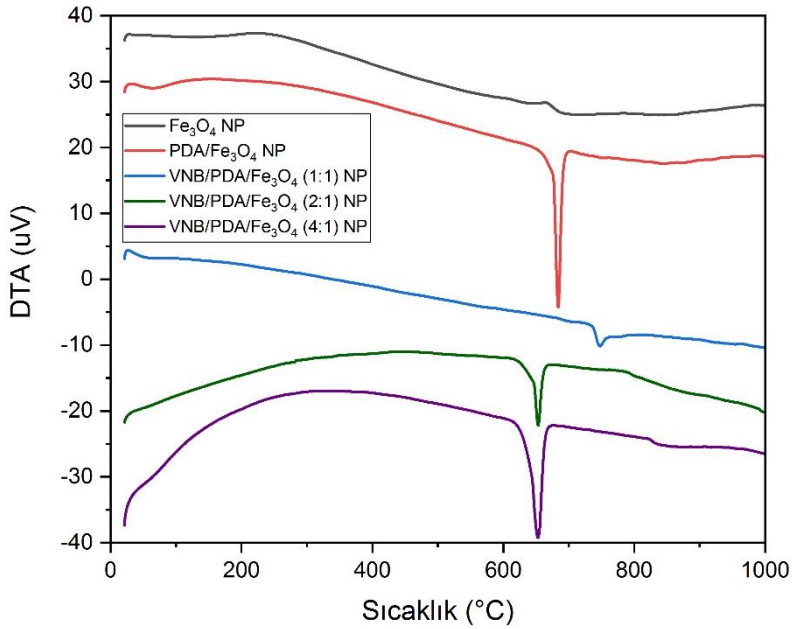
Şekil 5.19 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve ilaç yüklü nanoyapıların karşılaştırmalı Diferansiyel Termal Gravimetri (DTG) grafiği

Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve ilaç yüklü nanoyapıların karşılaştırmalı Diferansiyel Termal Gravimetri (DTG) analizlerine ait grafik Şekil 5.19'da verilmiştir. DTG analizinin esas amacı; ağırlık kaybının en fazla hangi sıcaklıkta oluştuğunu gözlemlemektir. Bu amaçla Diferansiyel Termal Analiz tekniğinde, örnek ve referans madde arasındaki sıcaklık farkı, uygulanan sıcaklığın fonksiyonu olarak incelenmektedir. Özetle, ısıtma veya soğutma sırasında, numune ve referans malzeme arasında oluşan sıcaklık farkı ölçülmektedir. DTG analizi ile, TGA analizinden elde edilen kütle değişimlerinin oluştuğu sıcaklık değerleri belirlenebilmektedir. Böylece oluşan ağırlık kaybının hızı, sıcaklığın veya sürenin fonksiyonu olarak elde edilebilmektedir.

DTG analizi grafiğinde Fe_3O_4NPlerin düz bir çizgi şeklinde görünen eğrisi, numunede bozunma olmadığını göstermektedir. Bu durum, nanoyapının 1000°C sıcaklığa kadar kararlı olduğunu ve herhangi bir bozunmaya uğramadığını göstermektedir.

PDA/Fe_3O_4NPlerin DTG analiz sonucunda keskin olan derin bir pik görülmüştür. Bu pik, PDA yapısında 678°C'de oluşan kütle kaybına ait sıcaklıktır. Bu sıcaklık, PDA'nın ana polimer zincirlerinin bozunduğunu göstermektedir.

İlaç yüklü nanoyapıların DTG sonuçları incelendiğinde; VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerde artan polimer oranına paralel olarak pik şiddetinde artış olduğu görülmüştür. Bu durum, polimer oranı arttıkça bozunma reaksiyonun şiddetinde artış olduğunu göstermektedir. İlaç yüklü olmayan PDA/Fe_3O_4NPlerinde oluşan derin pik şiddeti bu durumu desteklemektedir.



Şekil 5.20 Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve ilaç yüklü nanoyapıların karşılaştırmalı DTA analiz grafiği

Diferansiyel Termal Analizi (DTA), kütle ve faz değişimi veya kimyasal reaksiyon sonucu oluşa enerji değişimlerinin tespit edilmesinde kullanılan bir tekniktir.

DTA analizi sonucunda endotermik reaksiyonların oluştuğu görülmüştür. Analizi yapılan nanoyapıların oda sıcaklığından 200°C sıcaklığa kadar oluşan eğimlerin yapıda bulunan su moleküllerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir. DTA analizinde

geniş ve yataya doğru uzayan pikler; yapının amorfluğunu, derin ve şiddetli pikler ise; kristalin yapıyı göstermektedir.

Elde edilen piklerin derinlik ve şiddeti, nanoyapının kristalin yapıda olduğunu ortaya koymuştur. İlaç yüklü nanoyapılarda polimer oranı arttıkça sıcaklık pikinin şiddetinin arttığı, en şiddetli pikin ise PDA/Fe_3O_4NPlerde oluştuğu görülmüştür.

6
FOTOTERMAL ETKİNLİK, İLAÇ SALIM, BİYOUYUMLULUK, ANTİKANSER ÇALIŞMALARI ve SONUÇLARI

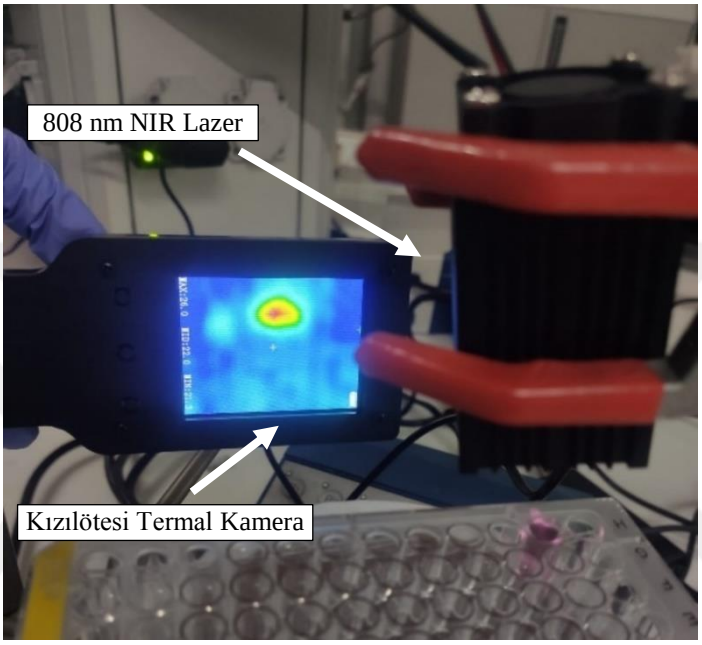
Bu bölümde; 5. Bölümde detaylı bir şekilde karakterizasyon sonuçları verilen VNB yüklü PEGilasyon işlemi uygulanan ve PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 nanoyapısının fototermal etkinlik, stabilite, ilaç salım, biyouyumluluk ve antikanser etkinlikleri incelenmiş ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

Bu kapsamda yapılan çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

1. Fototermal etkinlik ve stabilitenin tespit edilmesi amacıyla; 808 nm dalga boyunda ve 1 W/cm² gücünde kızılötesi (NIR) lazer kullanılarak nanoyapı lazer etkileşimi incelenmiştir. Bu amaçla numuneler 5 dakika süreyle 808 nm dalga boyunda ve 1 W/cm² gücünde NIR lazeri ile ışınlama yapıldıktan sonra, bir sonraki ışınlamadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulmuş ve bu işlem 4 döngü boyunca tekrar edilerek ısınma verimliliğindeki artış ya da azalış tespit edilmiştir.
2. İlaç salım çalışmaları pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında 50 saat boyunca incelenmiştir. Böylece kullanılan pH değerleri ile, sırasıyla tümör mikroçevresi ve sağlıklı doku ortamlarının simüle edilmesi sağlanmıştır. İlaç salım çalışmaları tamamlandıktan sonra salım profilleri matematiksel modeller kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla salım profillerinin; Sıfırıncı derece, Birinci derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerine uyumu incelenmiştir.
3. Biyouyumluluk çalışması, L929 hücre hattında XTT [2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl] yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Nanoyapıların sitotoksik olmayan değer aralıkları tespit edildikten sonra antikanser çalışması gerçekleştirilmiştir. Antikanser etkinlik çalışması için MCF-7 meme kanseri hücre hattı kullanılmıştır. Biyouyumluluk çalışması sonucunda elde edilen veriler kullanılarak antikanser etkinlik aralığı belirlenmiştir. Ayrıca kanser hücre hattında fototermal etkinlik çalışması gerçekleştirilmiştir.

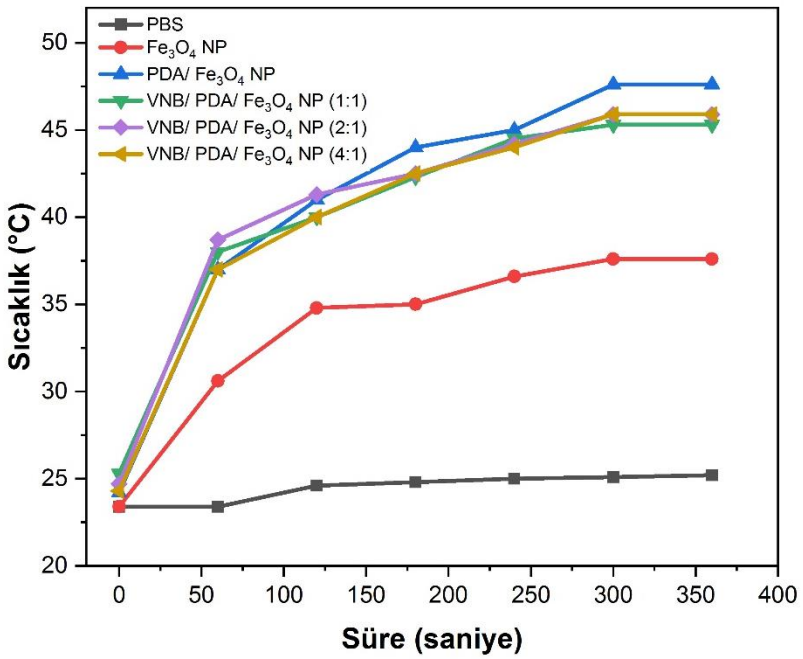
6.1 Fototermal Etkinlik ile Stabilite Çalışmaları ve Sonuçları

Fototermal etkinliğin belirlenmesi; VNB yüklü PEGilasyon uygulanan PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4 nanoyapısının fototermal etkinliği; 0.1 mg/ml konsantrasyonundaki (toplam 1 ml hacminde) Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerine 808 nm (1W/cm²) NIR lazerine maruz bırakılmış ve bu işleme 5 dakika boyunca devam edilmiştir. Kontrol olarak PBS kullanılmıştır.



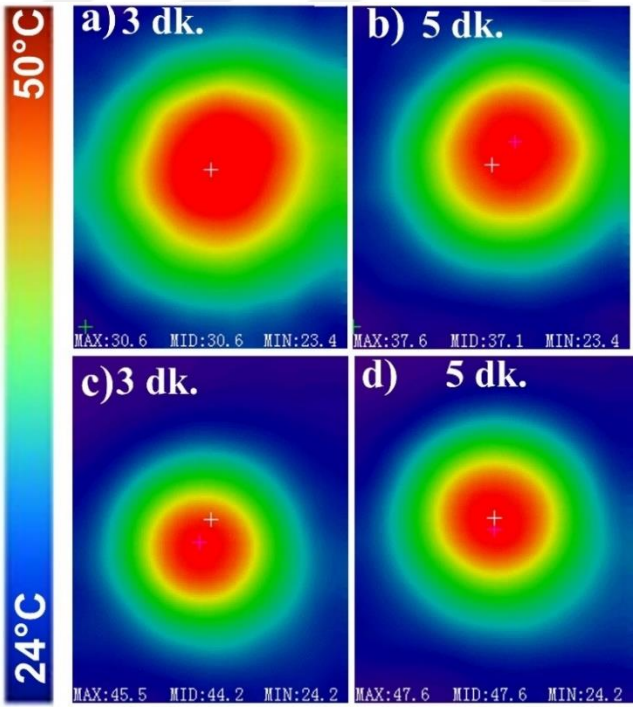
Şekil 6.1 Fototermal etkinlik çalışmasına ait deneysel düzenek

Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP ve VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin fototermal etkinlik performansı kızılötesi termal kamera yardımıyla belirlenmiştir (Şekil 6.1).



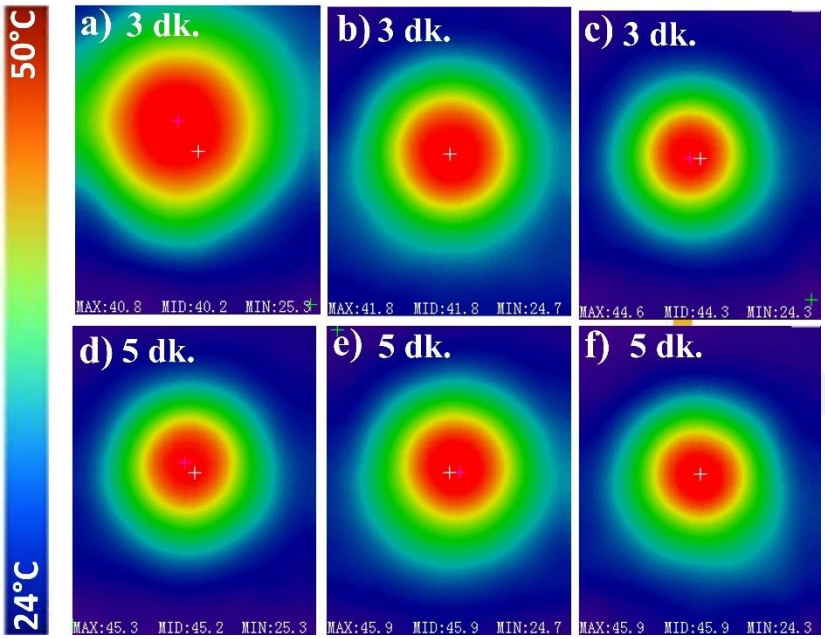
Şekil 6.2 Fototermal etkinlik (lazer-nanoyapı etkileşimleri) analiz grafiği

Fototermal etkinlik çalışmasına ait ısınma verimlilikleri karşılaştırmalı olarak Şekil 6.2'de sunulmuştur. Çalışma sonucunda, fosfat tampon tuzu (PBS, kontrol) çözeltisinin sıcaklığında hafif bir artış gözlenmiştir.



Şekil 6.3 Fototermal etkinlik çalışmasına ait sonuçlar: Lazer ile 3 ve 5 dakika ışınlama sonrasında oluşan ısınma verimliliği; a-b) Fe_3O_4NPleri ve c-d) PDA/Fe_3O_4NPleri

Şekil 6.3 (a-b)'de sunulan Fe_3O_4NPlerin fototermal etkinlik çalışmasına ait ısınma verimlilikleri incelendiğinde; 3 dakika boyunca lazer etkileşimine maruz kalan nanoyapının 30.6°C sıcaklığa ulaştığı ve 5 dakika sonra sıcaklığın 37.6°C'ye yükseldiği tespit edilmiştir. PDA/Fe_3O_4NPlerin 3 dakika boyunca lazer ışınlanmasından sonra ısınma sıcaklığı 45.5°C'ye, 5 dakika sonra 47.6°C'ye ulaşmış ve bu sıcaklığı geçmemiştir. Bu hızlı sıcaklık artışının, PDA/Fe_3O_4 NPlerin yapısında bulunan PDA polimerinden kaynaklı olduğu görülmüştür. Çünkü PDA polimeri yapısında bulunan fenolik, amin, katekol gibi grupları sayesinde NIR ışığını emme özelliğine sahiptir. Bu özellik, PDA/Fe_3O_4NPlerin daha yüksek NIR ışığını absorbe etme yeteneği sağlar.

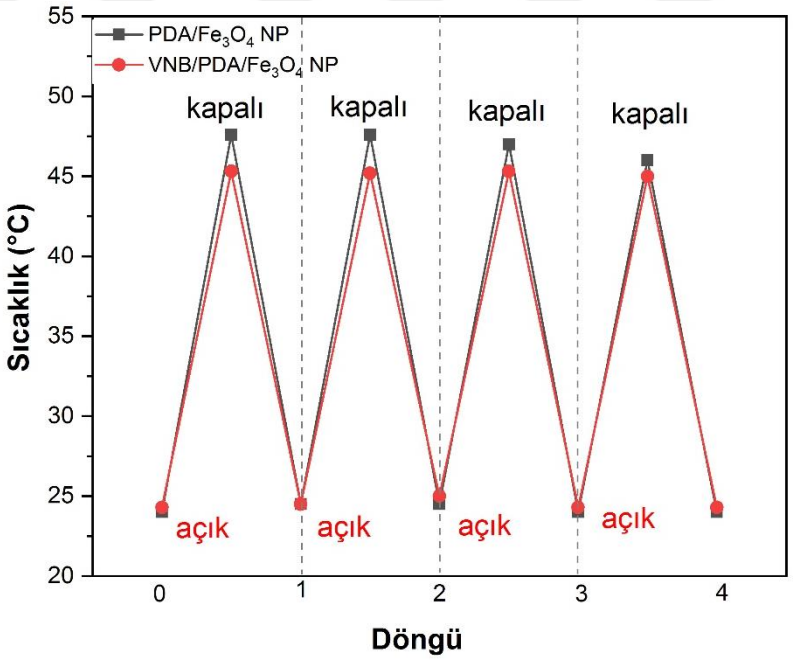


Şekil 6.4 Fototermal etkinlik çalışmasına ait sonuçlar: VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin a) 1:1, b) 2:1, c) 4:1 PDA oranlarında 3 dakika ısıtma sonuçları; d) 1:1, e) 2:1, f) 4:1 oranlarında 5 dakika ısıtma sonuçları

Şekil 6.4'te görüldüğü üzere; (1:1), (2:1) ve (4:1) oranlarında PDA/Fe_3O_4 içeren VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin 5 dakikalık lazer ışınımının ardından sıcaklıklarının 45,3°C ile 45,9°C arasında değiştiği görülmüştür. İlaç yüklü nanoyapıların tümü 3 dakikada 40°C'lik bir ısınma sıcaklığına ulaştığı ve maksimum sıcaklığın yaklaşık 46°C olarak belirlenmiştir. Bu bulgular, sentezlenen nanoyapıların fototermal terapi uygulaması için umut verici potansiyele sahip olduğunu göstermiştir.

Fototermal stabilite çalışması; fototermal etkinlik çalışması ile ısınma etkinlikleri tespit edilen nanoyapıların fototermal stabilite özellikleri belirlenmiştir. Bu kapsamda tekrarlı lazer etkileşiminin nanoyapıların ısınma verimliği üzerindeki etkisi incelenmiştir.

Bu amaçla; 0.1 mg/ml (toplam 1 ml hacminde) konsantrasyonda PDA/Fe_3O_4NP ve VNB/PDA/Fe_3O_4NP içeren çözeltiler, 808 nm (1 W/cm²) NIR lazeri ile 5 dakika boyunca ışınlandıktan sonra, bir sonraki ışınlamadan önce oda sıcaklığına kadar soğutulmuştur. Bu işlem 4 döngü boyunca tekrar edilmiş, her bir ısınma ve soğumadaki sıcaklık değişimleri kızılötesi termal kamera kullanılarak ölçülmüştür. Ardından nanoyapıların fototermal stabilitesi, NIR lazer ile 5 dakika etkileşim sonrasında dört döngü boyunca soğutma işlemi uygulanarak değerlendirilmiştir. [224].



Şekil 6.5 808 nm (1 W/cm²) dalga boyundaki lazer ışını ile 4 döngü boyunca tekrarlanan fototermal stabilite çalışmasına ait grafik

PDA/Fe_3O_4 ve VNB/PDA/Fe_3O_4NP yapılarına ait fototermal stabilite çalışma sonuçları (Şekil 6.5); dört döngü boyunca NIR lazer ışınlamasının ardından, NPlerin fototermal stabilitesinde çok düşük düzeyde bir azalma oluştuğunu göstermiştir.

Bu sonuçlar; 4 döngü boyunca lazer ile ışınlama yapılan nanoyapıların fototermal stabiliteye sahip olduğunu göstermiştir. Fototermal stabilite, ilaç yüklü nanoyapılarda fototermal etkinliğin sağlanması için oldukça önemlidir [224].

6.2 İlaç Salım Çalışmaları

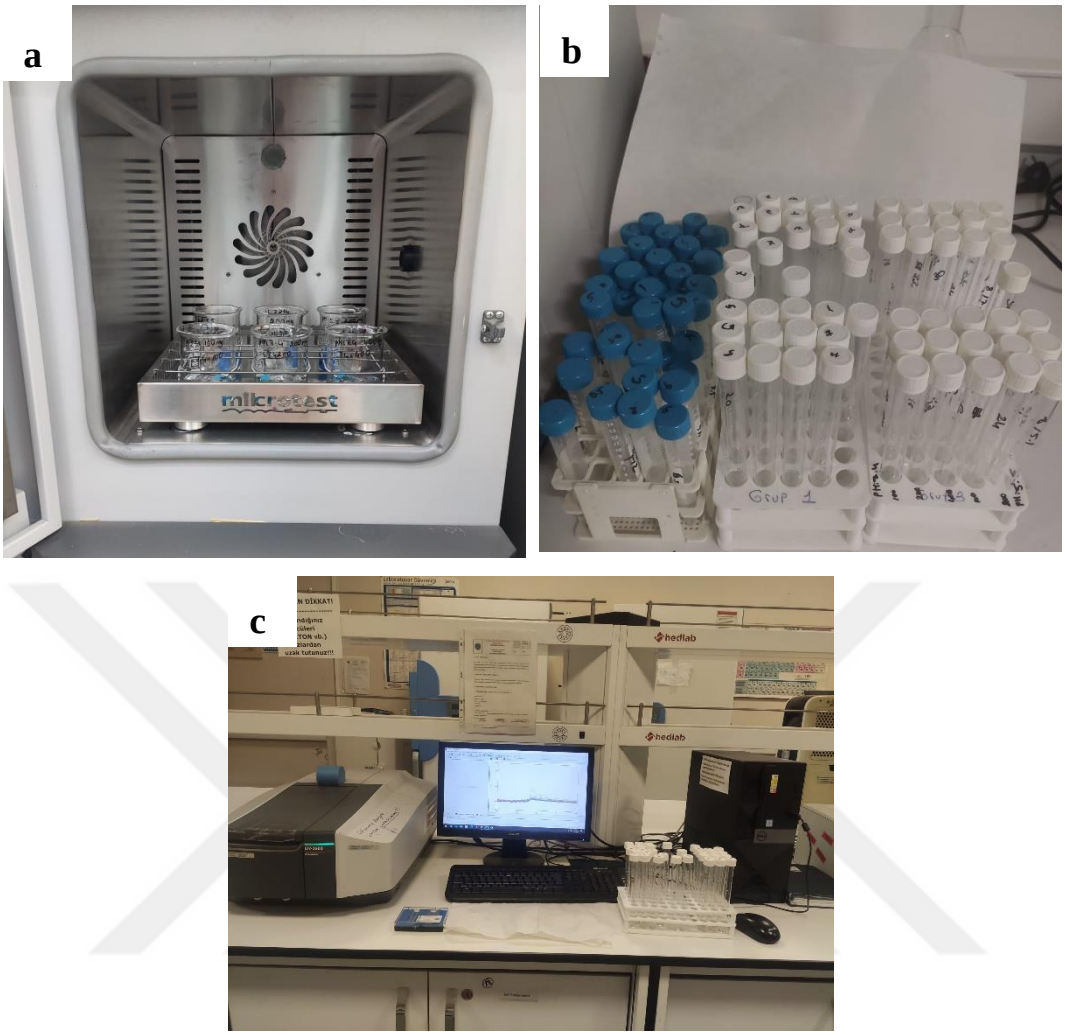
Nanoyapıların in vitro ilaç salım performanslarının incelenmesi amacıyla VNB/PDA/Fe_3O_4 numunesi 1 mg/ml konsantrasyonunda üç farklı diyaliz kapsülüne konulmuştur. Şekil 6.6 (a)'da gösterildiği gibi hazırlanan diyaliz kapsülleri, 80 ml hacminde pH:7.4 fosfat tamponu ve pH:5.5 sitrat tamponu içerisinde 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm hızında çalkalamalı etüv içerisine yerleştirilmiştir. Şekil 6.6 (b)'de gösterildiği gibi belirli zaman aralıklarında (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 30, 36, 48, ve 50 saat) 3 ml hacminde salım ortamından numune alınmış ve UV-vis spektrofotometre ile analiz edilmiştir [Şekil 6.6 (c)]. Kümülatif ilaç salımın hesaplanması için 6.1, 6.2 ve 6.3 eşitlikleri kullanılmıştır [225].

$$\text{İlaç Konsantrasyonu } (\mu g/ml) = [(\text{Absorbans}) \pm \text{Kesişme}] / \text{Eğim} \quad (6.1)$$

$$\text{Serbest Bırakılan İlaç Miktarı } (mg/ml) = \text{Konsantrasyon} \times \text{Çözünme Banyosu Hacmi} \times \text{Dilüsyon Faktörü} / 1000 \quad (6.2)$$

$$\text{Kümülatif Salım Yüzdesi } (\%\ ağ.) = \text{Çekilen Numune Hacmi } (ml) / \text{Banyo Hacmi } (V) \times [P^{*}\ (t-1) + Pt]^{**} \quad (6.3)$$

*****Pt = t zamanındaki salım yüzdesi
*** ***P (t – 1) = t zamanından önceki salım yüzdesi

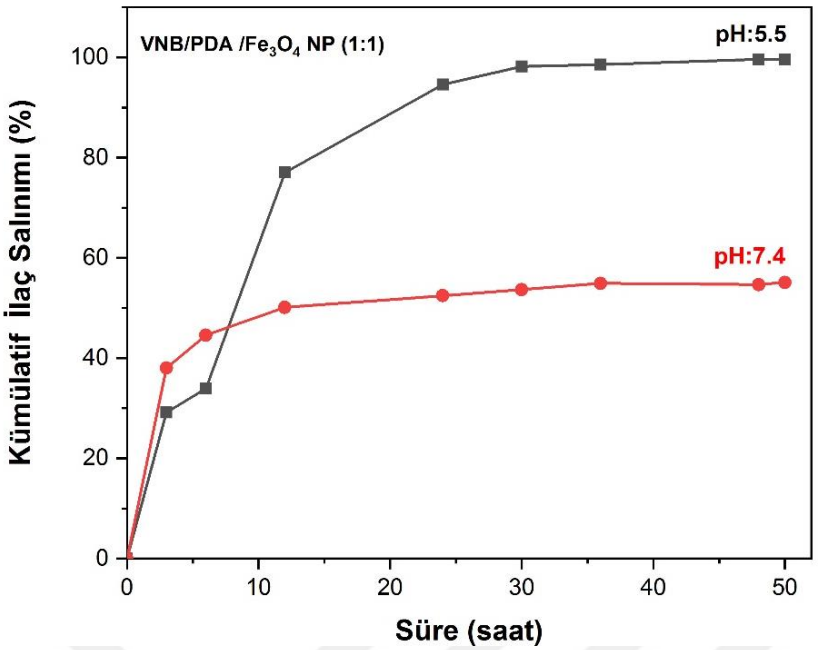


Şekil 6.6 İlaç salım çalışması: a) Çalkalamalı inkübatörde ilaç salım çalışması, b) Belirlenen sürelerde salım ortamından alınan numuneler, c) UV-vis spektrofotometre ile absorbans ölçümü

Şekil 6.6'da ilaç salım çalışmasına ait deneysel çalışmalar gösterilmiştir. Belirlenen her süre için salım ortamından numune alınmıştır. Alınan numuneler analiz yapılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

6.2.1 İlaç Salım Çalışması ve Sonuçları

1:1, 2:1 ve 4:1 polimer oranlarına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4 nanoyapıların pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında elde edilen ilaç salımlarına ait sonuçlar aşağıda sunulmuştur.



Şekil 6.7 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım sonucuna ait grafik

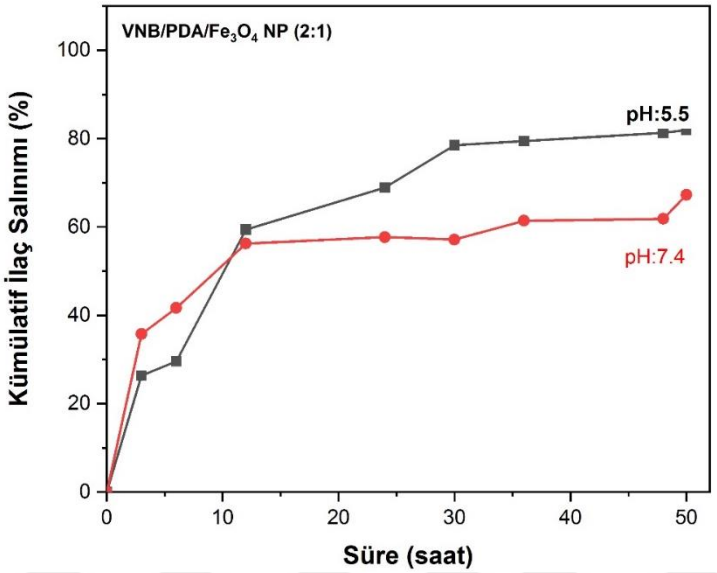
Şekil 6.7'de sunulan VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1), pH:5.5 ve pH:7.4'de yapılan ilaç salım sonuçları incelediğinde pH 5.5 koşullarında ilaç salımın daha yüksek olduğı tespit edilmiştir. Tablo 6.1'de kümülatif ilaç salım sonuçlarının % değerleri sunulmuştur.

Tablo 6.1 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri

Süre (saat)	**pH:5.5**	**pH:7.4**
0	0	0
0,5	21,58042	24,64336
1	27,15087	31,31503
2	27,01136	34,45787
3	29,13164	35,76101
4	29,86171	37,92832
5	31,16993	40,84458
6	33,91661	41,66573
12	77,04266	56,25245
24	84,56853	57,71789
30	98,1993	57,15261
36	98,56853	61,41678
48	99,59126	61,85332
50	99,63636	67,2743

İlaç salım sonuçları; ilk 12 saat içerisinde ilacın % 77'lik oranda, 30 saat sonra ise % 98 oranında salındığı belirlenmiştir. % 98 salım oranı, ilacın neredeyse tamamına yakının salındığını göstermiştir.

Buna karşılık pH:7.4 koşullarında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışmasında; ilk 12 saatte % 56 ve 50 saat sonra ise % 67 oranlarında salım değerleri tespit edilmiştir.



Şekil 6.8 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım sonucuna ait grafik

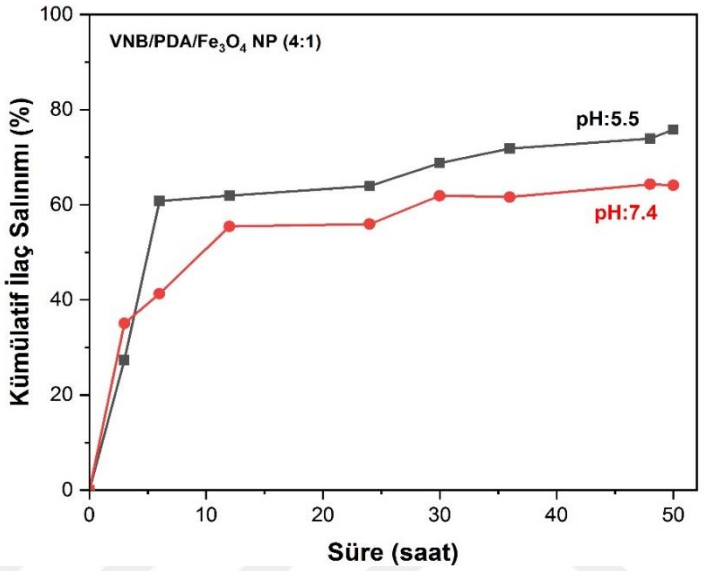
VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) oranında hazırlanmış olan nanoyapının pH:5.5 ve pH:7.4'de yapılan ilaç salım sonuçları (Şekil 6.8) sunulmuştur.

Tablo 6.2 VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri

Süre (saat)	**pH:5.5**	**pH:7.4**
0	0	0
0,5	22,6993	24,64336
1	22,21381	31,31503
2	23,11731	34,45787
3	26,33636	35,76101
4	27,07465	37,92832
5	27,52448	40,84458
6	29,57028	41,31923
12	59,38584	55,47488
24	68,91241	55,93342
30	78,52115	61,90699
36	79,43177	61,64126
48	81,32038	64,30839
50	81,91801	64,12168

İlaç salım çalışmalarından ait elde edilen veriler Tablo 6.2'de sunulmuştur. Salım sonuçları, ilk 12 saat içerisinde ilacın %59'luk kısmının salındığını göstermiştir. İlaç salımın 30 saatte %78 oranına ulaştığı, 50 saat sonunda ise ilacın % 81'lik oranında salındığı hesaplanmıştır.

Buna karşılık pH:7.4 koşullarında yapılan ilaç salım çalışması; ilk 12 saate % 55 ve 50 saat sonunda ise % 64 salım oranlarının oluştuğunu göstermiştir.



Şekil 6.9 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1), pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım sonucuna ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) oranında hazırlanmış olan nanoyapının pH:5.5 ve pH:7.4'de yapılan ilaç salım sonuçları (Şekil 6.9); VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1), (2:1) nanoyapılarının düşük pH koşullarında ilaç salım değerlerinin daha yüksek olduğunu göstermiştir.

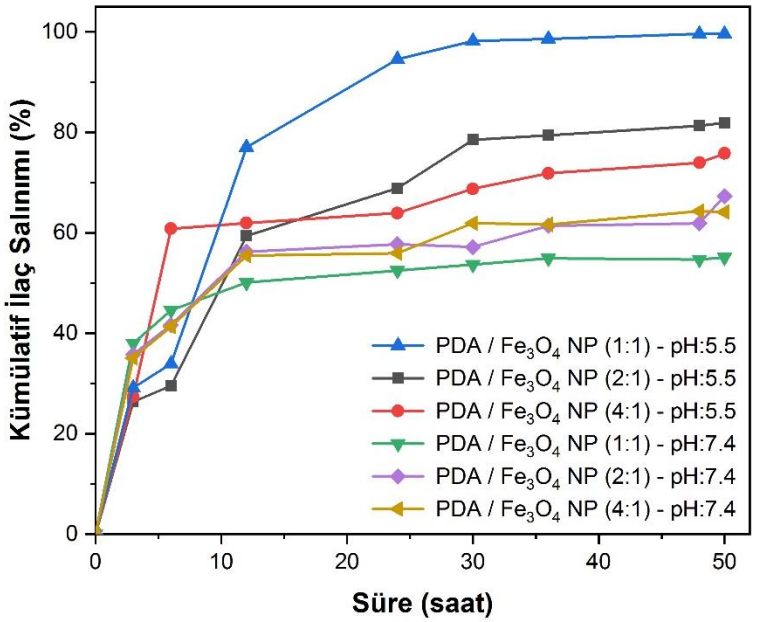
Tablo 6.3 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri

Süre (saat)	**pH:5.5**	**pH:7.4**
0	0	0
0,5	24,58741	13,37063
1	24,58706	34,78252
2	25,92552	36,85157
3	27,37483	37,99003
4	28,65647	39,87832
5	30,1458	40,21801
6	60,81031	44,58392
12	61,93759	50,09965
24	63,93889	52,46066
30	68,75017	53,66883

Tablo 6.3 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında ilaç salım % değerleri (devamı)

36	71,85297	54,90997
48	73,93889	54,66883
50	75,79266	55,09965

Tablo 6.3'de sunulmuş olan salım sonuçları; ilacın ilk 12 saat içerisinde %61, 30 saat sonunda %68 ve 50 saat sonunda ise % 75'lik oranlarındada salındığını ortaya koymuştur. Buna karşılık pH:7.4 koşullarında yapılan ilaç salım çalışmasına göre; ilk 12 saate % 50 ve 50 saat sonunda ise % 55 salım değerleri elde edilmiştir.



Şekil 6.10 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan ilaç salım çalışma sonuçlarının karşılaştırması

Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında elde edilmiş ilaç salım sonuçları Şekil 6.10'da verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; pH:5.5 koşullarında 50 saatte salım oranlarının (%99, %81 ve %75), pH:7.4 değerlerine (%67, %64 ve % 55) göre oldukça yüksek olduğu görülmüştür. Bu sonuç; tasarlanan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin tümöre spesifik özellikte olduğunu göstermektedir. Çünkü pH:5.5 değeri tümör mikroçevresini taklit edilmesi amacıyla kullanılmıştır.

Tablo 6.4 VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında ilaç salım %değerleri

Süre (saat)	pH:5.5			pH:7.4		
	1:1	2:1	4:1	1:1	2:1	4:1
0,5	21,58042	22,6993	24,58741	24,64336	24,64336	13,37063
1	27,15087	22,21381	24,58706	31,31503	31,31503	34,78252
2	27,01136	23,11731	25,92552	34,45787	34,45787	36,85157
3	29,13164	26,33636	27,37483	35,76101	35,76101	37,99003
4	29,86171	27,07465	28,65647	37,92832	37,92832	39,87832
5	31,16993	27,52448	30,1458	40,84458	40,84458	40,21801
6	33,91661	29,57028	60,81031	41,66573	41,31923	44,58392
12	77,04266	59,38584	61,93759	56,25245	55,47488	50,09965
24	84,56853	68,91241	63,93889	57,71789	55,93342	52,46066
30	98,1993	78,52115	68,75017	57,15261	61,90699	53,66883
36	98,56853	79,43177	71,85297	61,41678	61,64126	54,90997
48	99,59126	81,32038	73,93889	61,85332	64,30839	54,66883
50	99,63636	81,91801	75,79266	67,2743	64,12168	55,09965

Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH:5.5'te kümülatif ilaç salım sonucuna (Tablo 6.4) göre; 24.cü saatte salım oranı %84, VNB/PDA/Fe_3O_4 (2:1) NPlerin salım oranı %68 ve VNB/PDA/Fe_3O_4 (4:1) NP'lerin salım oranı % 63 olarak hesaplanmıştır. Toplam 50 saatlik kümülatif ilaç salım çalışması sonucuna göre; VNB/PDA/Fe_3O_4 (1:1) NPlerin 50.ci saat sonucunda salım oranı % 99, VNB/PDA/Fe_3O_4 (2:1) NPlerin salım oranı %81 ve VNB/PDA/Fe_3O_4 (4:1) NPlerin salım oranı % 75 olarak hesaplanmıştır.

pH:5.5 değerindeki ilaç salım sonuçlarına göre; kümülatif ilaç salımı %99 olan VNB/PDA/Fe_3O_4 (1:1) yapısının ilaç salımında en verimli yapı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca polimer oranı arttıkça ilaç salım hızının azaldığı görülmüştür. Bu sonuç, polimer kalınlığındaki artışın, ilaç salım hızını yavaşlattığını göstermektedir. Çünkü nanoyapıdaki daha kalın bir polimer katmanının, ortam koşullarında degrade olması ve bozunması için daha fazla süre gerekmektedir.

Elde edilen sonuçlar, VNB ilacının PDA polimerinden salımının pH'a bağlı olduğunu, en hızlı salımın pH:5.5'te ve en yavaş salımın pH:7.4'te olduğunu göstermiştir. Bundan dolayı VNB ilacının asidik ortama sahip olan kanser dokusunda etkinliğinin daha yüksek olacağı öngörülmektedir.

Benzer bir çalışmada Aliabadi ve ark., Fe_3O_4 NPleri biyouyumlu polimer kullanarak kapladık sonra 5-Fluorourasil (5-FU) ilacı yüklemişlerdir [226]. Tez çalışması kapsamındaki ilaç salım sonuçlarına benzer şekilde, düşük pH değerinde

daha yüksek ilaç salımı elde etmişlerdir. Bu durumun, amin gruplarının protonlanması sonucunda artan polimer zincirlerinin daha büyük itme gücüne sebep olmasından kaynaklandığını ve asidik koşullar altında ilaç salımının arttığını bildirmişlerdir. Literatür ile benzer şekilde PDA'nın yapısında bulunan katekol ve amin gruplarından dolayı düşük pH koşullarında amin grubunun protonlanmasının, düşük pH'da yüksek ilaç salımına sebep olduğu düşünülmektedir [227].

6.2.2 Fototermal Etkiye Duyarlı Vinorelbin İlaç Salım Çalışması ve Sonuçları

İlaç salımın incelenmesi amacıyla hazırlanan deneysel çalışma planı, fototermal etkiye duyarlı ilaç salımının tespit edilmesi amacıyla tekrar oluşturulmuştur. Bu kapsamda 3 farklı diyaliz kapsülüne yerleştirilen VNB/PDA/Fe_3O_4 nanoyapıları, 80 ml pH:5.5 sitrat ve pH: 7.4 fosfat tamponu içinde, 37°C sıcaklıkta ve 150 rpm hızında çalkalamalı etüve yerleştirilmiştir. Lazer ışınının ilaç salımına olan etkisinin incelenmesi amacıyla 15, 30, 45, 60, 120, 240 ve 300 dakika sürelerde diyaliz kapsüllerine 5 dakika boyunca lazer ışını tutulmuş, ardından salım ortamından numune alınmıştır. 300 dakika boyunca 5 kere lazer ile ışınlama yapılmış ve her lazer ışınlaması sonrası numune alınmıştır. Daha sonra alınan sıvı yerine aynı miktar ve pH değerinde taze tampon çözeltisi eklenmiştir. Fototermal etkiye duyarlı ilaç salımının belirlenmesi amacıyla toplanan numuneler UV-vis spektrofotometre cihazı ile analiz edilmiştir.

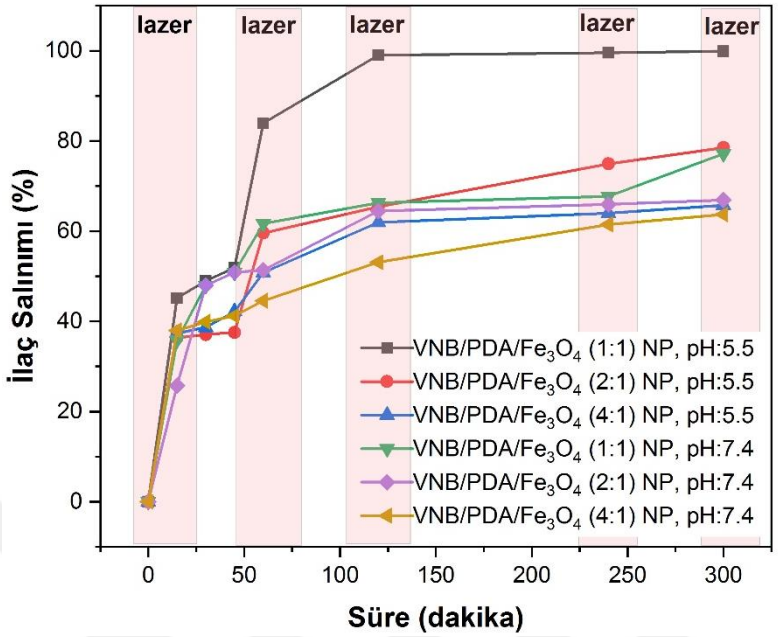
VNB ilacına ait oluşturulan kalibrasyon eğrisi ve UV-vis cihazı ile ölçülen absorbans değerleri kullanılarak, nanoyapılardaki ilaç içeriği ve kümülatif ilaç salım miktarları hesaplanmıştır.

Tablo 6.5 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında fototermal duyarlı ilaç salım sonuçlarının % değerleri

Süre (dk)	pH:5.5			pH:7.4		
	1:1	2:1	4:1	1:1	2:1	4:1
15	49,16113	36,33636	37,37483	35,76101	25,76101	37,99003
30	49,86170	37,07465	38,65647	47,92832	47,92832	39,87832
45	51, 9911	37,52448	42,14580	50,84458	50,84458	41,21801
60	83,91663	59,57028	50,81031	61,66573	51,31923	44,58392
120	99,04267	65,38584	61,93759	66,25245	64,47488	53,09965
240	99,56859	74,91241	63,93889	67,71789	65,93342	61,46066
300	99,3210	78,52115	65,75017	77,15261	66,90699	63,66883

Fototermal etkiye duyarlı ilaç salım çalışmalarına ait elde edilen sonuçlar Tablo 6.5'te sunulmuştur. Sonuçlar, 5 dakika boyunca 5 kez lazer ile ışınlama

yapıldığında 120 dakika sonrasında % 99 oranında ilaç salımı oluştuğunu göstermiştir. Daha önce yapılan ilaç salım çalışmasına benzer şekilde ilaç salımının düşük pH'larda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 6.11 VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında yapılan fototermal duyarlı ilaç salım sonuçları

Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4 (1:1) NPlerin pH:5.5'te kümülatif ilaç salım sonucuna (Tablo 6.5) göre; 120 dakikada salım oranı %99, VNB/PDA/Fe_3O_4 (2:1) NPlerin salım oranı %65 ve VNB/PDA/Fe_3O_4 (4:1) NPlerin salım oranı % 61 olarak hesaplanmıştır. pH 7.4 koşullarında yapılan salım çalışması sonucuna göre; VNB/PDA/Fe_3O_4 (1:1) NPlerin 120.dakikada salım oranı % 66, VNB/PDA/Fe_3O_4 (2:1) NPlerin salım oranı %64 ve VNB/PDA/Fe_3O_4 (4:1) NPlerin salım oranı % 53 olarak hesaplanmıştır. Lazer ile etkileşim sonucunda en yüksek ilaç salımı 120.dakikada %99 salım ile VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısında elde edilmiştir (Şekil 6.11).

6.3 İlaç Salımında Kinetik Model Çalışması

İlaç salımına ait kinetik modeller; ilaçların çözünüm profillerinin tanımlanması amacıyla matematiksel eşitlikler kullanılarak değerlendirilmesini sağlarlar [228], [229]. İlaçların çözünüm profilleri, kinetik model eşitliği seçildikten sonra modelin parametrelerine bağlı olarak değerlendirilir. Böylece analiz edilen ilacın, süreç içerisinde vücuttan salım davranışını tanımlamak amacıyla kullanılır.

İlaç salım modelleri arasında Sıfırıncı derece, Birinci derece, Higuchi, Hixson-Crowell, Korsmeyer-Peppas, Baker-Lonsdale, Weibull, Hopfenberg ve regresyon gibi bir çok model bulunmaktadır [230]. Bu modeller; ilacın vücutta yayılma, metabolize olma, emilim, dağılım ve salım profillerinin belirlenmesinde kullanılırlar. Bu amaçla, modellere ait matematiksel eşitlikler yardımıyla elde edilen veriler kullanılarak korelasyon katsayısı (R^2) değeri kullanılır [229]. R^2 değerinin 1 sayısına yakın olması, kinetik modele uygun olduğunu gösterir [231].

Çalışmalar kapsamında elde edilen ilaç salım sonuçları kullanılarak Sıfırıncı derece, Birinci derece, Hixson Crowell ve Hiquchi matematiksel modelleri yardımıyla ilaç salım kinetikleri incelenmiştir.

6.3.1 Sıfırıncı Derece Kinetik Model Sonuçları

Sıfır Dereceli Kinetik Model; ilacın konsantrasyonundan bağımsız olarak, ilacın salımını zaman içerisinde sabit bir hızda gerçekleştiği durumu ifade etmektedir [231]. Bu durum, birim zaman başına sabit miktarda ilacın salındığını ve zamanla ilaç konsantrasyonunda doğrusal bir azalmaya yol açtığı anlamına gelir. Özellikle hepatik toksisiteye sahip ilaçlar bu gruba girmektedir [232].

Bir ilacın Sıfır Dereceli ilaç salım kinetiğine sahip olması genellikle iki durumda ortaya çıkar. Bunlardan birincisi; ilaç içerisinde birden fazla reaktanın bulunması ve bunlardan bir tanesinin konsantrasyonunun diğerinden çok daha yüksek olması durumunda ortaya çıkmaktadır. İkinci durum ise; ilaç içerisinde çok küçük bir yüzey alanının veya aktif bölgenin bulunması durumudur. Bu durum genellikle küçük ve aktif bir bölgenin doyması nedeniyle ortaya çıkmaktadır [233]. Özellikle antibiyotikler, kalp ve kan basıncı düzenleyicileri, ağrı kontrolü sağlayan ve antidepresanlar gibi ilaç grupları sıfırıncı kinetik modele uygun ilaç gruplarıdır [231]. Cisplatin gibi ilaçlar, verilen dozda hızla vücuda giriş yapar ve daha sonra böbrekler yoluyla atılır. İlacın vücuttan atılması, dozaj artışına paralel artan bir hızla gerçekleşmez. Bu nedenle, Cisplatin gibi ilaçlar sıklıkla Sıfır Derece kinetiği takip ederler [233].

Sıfırıncı Dereceden kinetik modele ait (6.4 ve 6.5) eşitlikleri aşağıda sunulmuştur [229].

$$Q_0 - Q_t = K_0 t \qquad (6.4)$$

Denklem (6.4)'ün yeniden düzenlenmesi şu şekildedir:

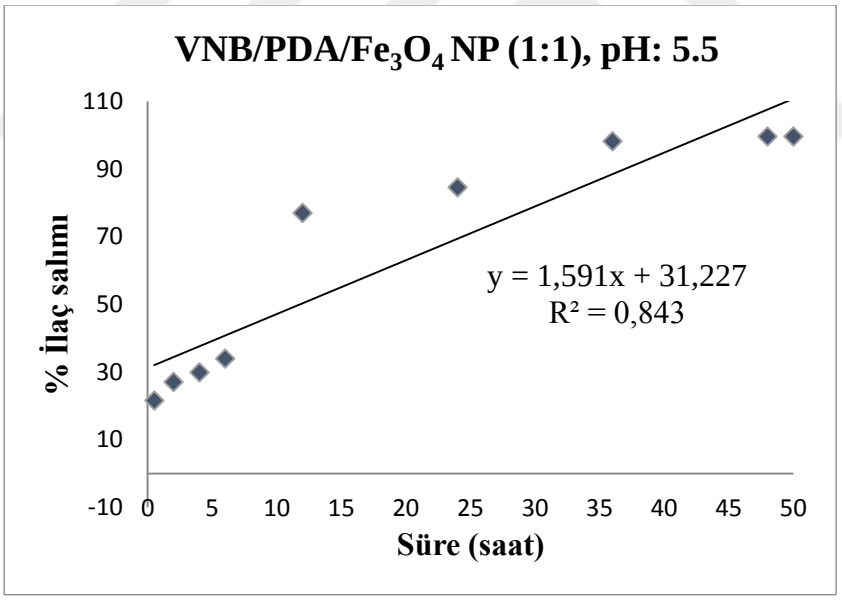
$$Q_t = Q_0 + K_0 t \qquad (6.5)$$

Q_t: t zamanındaki çözünen ilaç miktarı

$Q_{0:}$ çözeltideki ilk ilaç miktarı

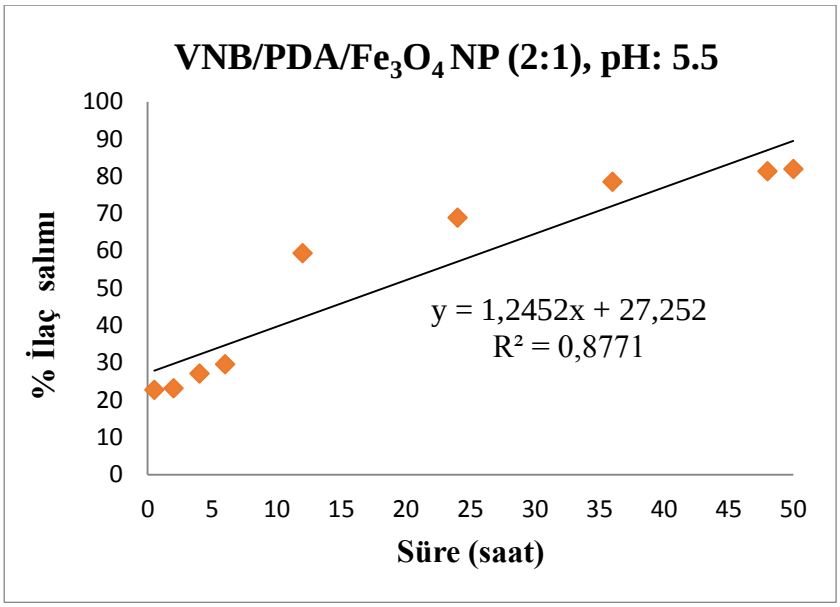
K_0: konsantrasyon/zaman biriminde ifade edilen sıfırıncı derece salım sabiti

İlaç salım çalışmalarından elde edilen veriler, Sıfırıncı Dereceden kinetik modelde incelenmesi amacıyla yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılmış ve grafikler oluşturulmuştur. Yapılan çalışma sonucunda elde edilen korelasyon değerleri (R^2) incelenmiştir. R^2 değerinin 1 sayısı veya 1 sayısına en yakın değerlerde çıkması, ilaç yüklü nanoyapının incelenen modele uygunluğunu ortaya koymaktadır. Bu kapsamda, VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1), (2:1) ve (4:1) yapılarının pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında incelenen ilaç salım davranışı, bu koşullar altında değerlendirilmiştir.



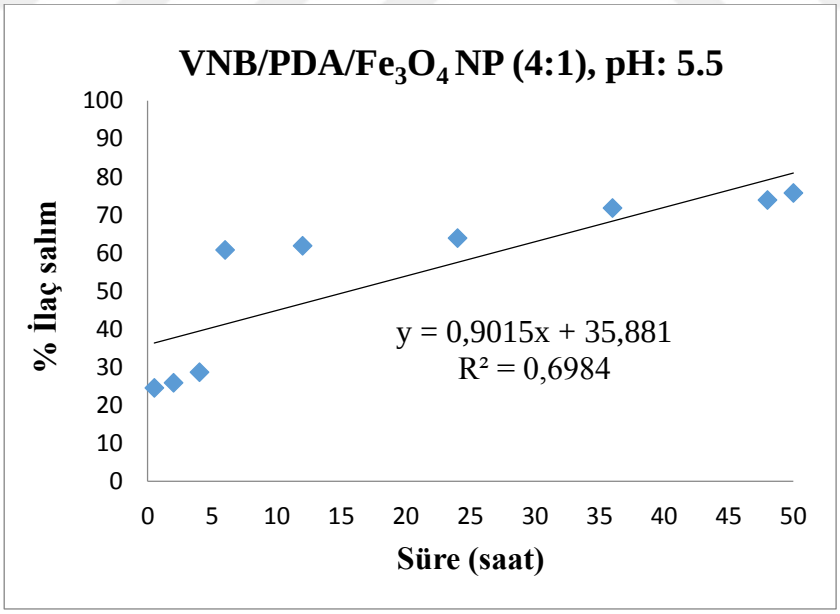
Şekil 6.12 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.12'de VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısın pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Sıfırıncı Dereceden kinetik model incelemesine ait grafik sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,843$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.13 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.13'te VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Sıfırıncı Dereceden kinetik model incelemesine ait grafik sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8771$ değeri elde edilmiştir.

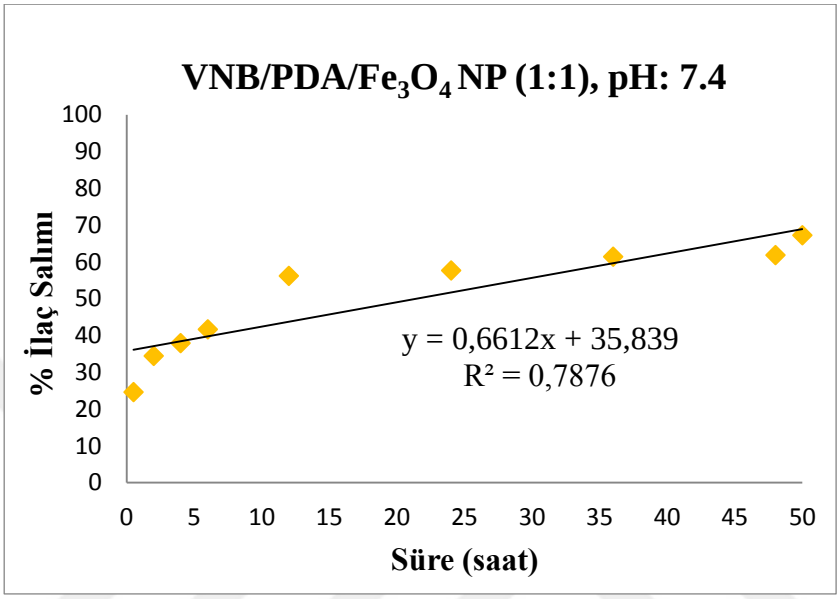


Şekil 6.14 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.14'te VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Sıfırıncı Dereceden kinetik model incelemesine ait grafik

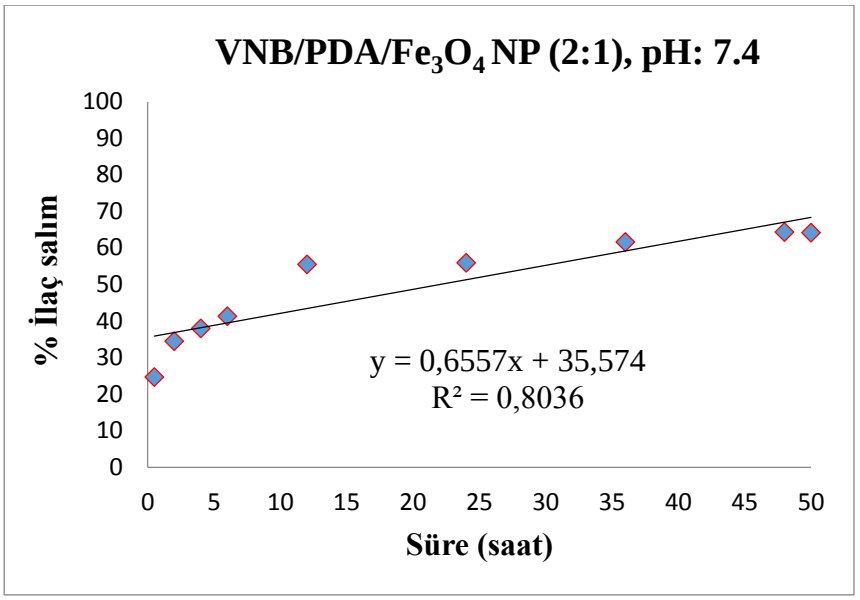
sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,6984$ değeri elde edilmiştir.

pH:5.5 koşullarında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışmalarının, Sıfırıncı Dereceden kinetik model yapısına uygun olmadığı görülmüştür. Elde edilen korelasyon katsayılarının 1 sayısından uzak olduğu tespit edilmiştir.



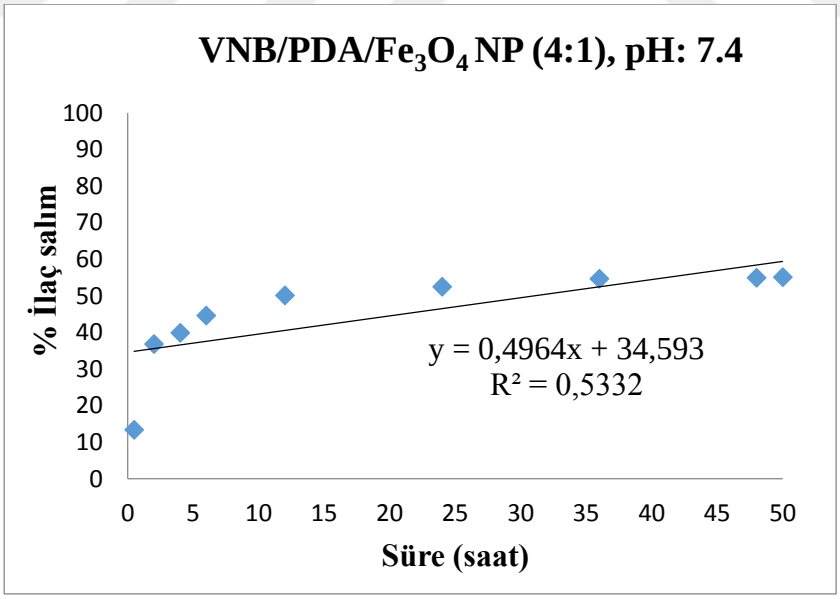
Şekil 6.15 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.15'te VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Sıfırıncı Dereceden Kinetik Model incelemesine ait grafik sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,7876$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.16 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.16'te VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1), pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Sıfırıncı Dereceden kinetik model incelemesine ait grafik sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda R^2 = 0,8036 değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.17 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Sıfırıncı Dereceden kinetik modeline ait grafik

Şekil 6.16'te VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak sıfırıncı dereceden kinetik model incelemesine ait grafik

sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.4 ve 6.5) eşitlikleri kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,5332$ değeri elde edilmiştir.

pH:7.4 koşullarında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışmalarının, Sıfırıncı Dereceden kinetik model yaklaşımına uygun olmadığı görülmüştür. Elde edilen korelasyon kat sayılarının 1 sayısından oldukça uzak olduğu görülmüştür.

Sonuç olarak; VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarıının Sıfırıncı Dereceden kinetik model yaklaşımına uygun olmadığı tespit edilmiştir.

6.3.2 Birinci Derece Kinetik Model Sonuçları

Birinci Derece kinetik model ilacın zamana göre gerçekleşen salım hızını logaritmik fonksiyonlar ile ifade etmektedir. [229]. Birinci Derece kinetik model, ilaçların emiliminin veya eliminasyonunun açıklanması amacıyla kullanılmaktadır [229]. Birinci Dereceden kinetik model (6.6) eşitliği aşağıda sunulmuştur.

$$\text{Log } C_t = \text{Log } C_0 - k * t / 2.303 \qquad (6.6)$$

C_0: ilacın başlangıç konsantrasyonunu

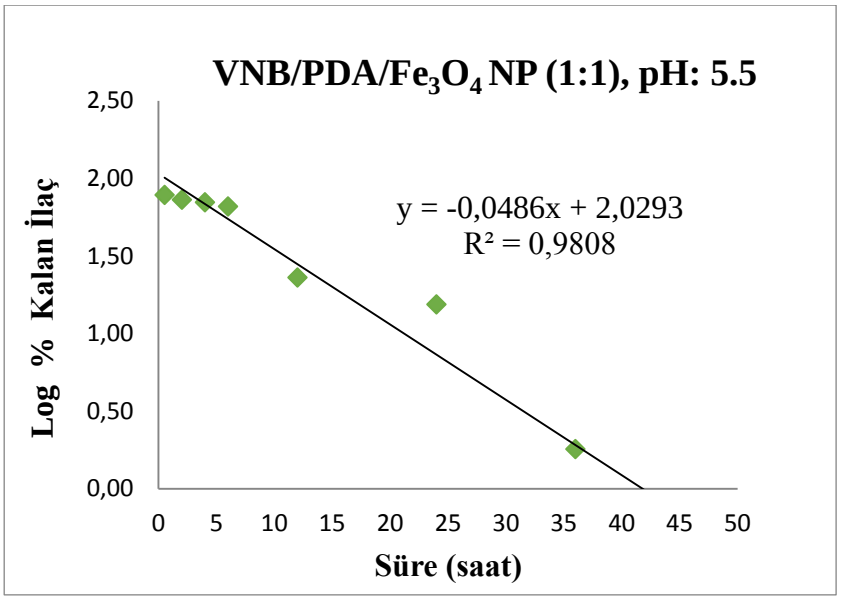
C_t: t zamanında çözeltideki ilaç konsantrasyonu

k, t zaman biriminde ifade edilen birinci derece salım hız sabiti

Birinci Derece kinetik model; *in vitro* salım ortamı ile salım ortamında bulunan ilaç arasındaki konsantrasyon gradyanının zaman karşısında salınan ilaç yüzdesinin logaritmik olarak elde edilmesini sağlar [234], [235]. Birinci derece kinetik model, ilacın salım hızının ilacın konsantrasyonuyla ilişkili olduğunu açıklar.

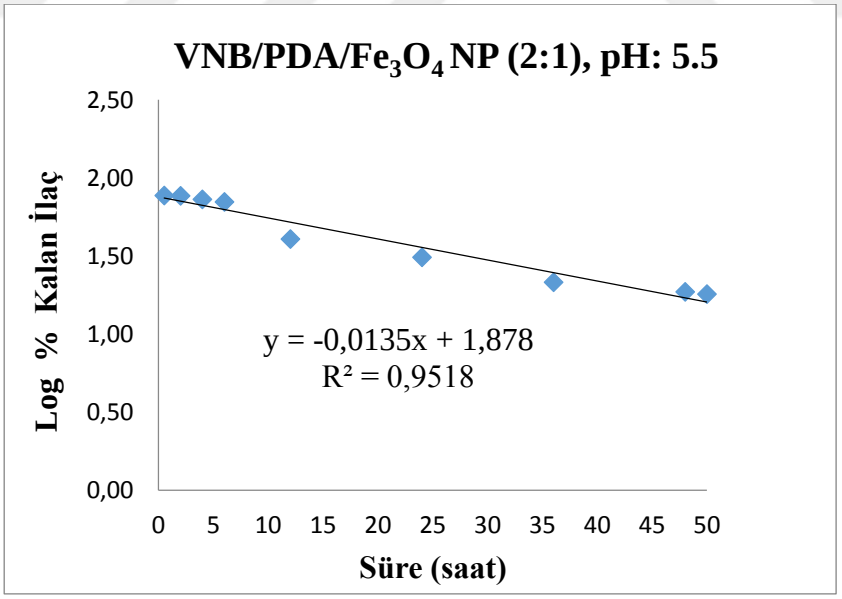
In vitro ilaç salımı çalışmalarından elde edilen veriler, Birinci Dereceden kinetik modele uygunluğunun incelenmesi amacıyla yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak hesaplanmış ve grafikleri oluşturulmuştur.

Çalışma sonucunda elde edilen eşitliğin korelasyon değerleri (R^2) incelenmiştir. R^2 değeri 1 veya 1 sayısına sayısına ne kadar yakın olursa ilaç yüklü nanoyapının incelenen modele o kadar uygun olduğu sonucu ortaya çıkmaktadır.



Şekil 6.18 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Birinci Dereceden kinetik modeline ait grafik

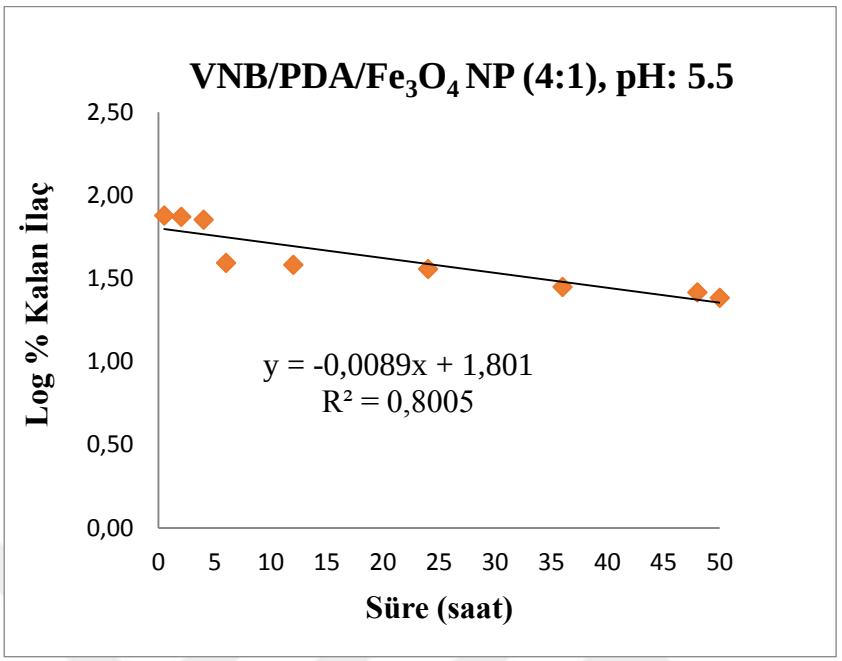
VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.18'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9808$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.19 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Birinci dereceden kinetik model ine ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.19'da

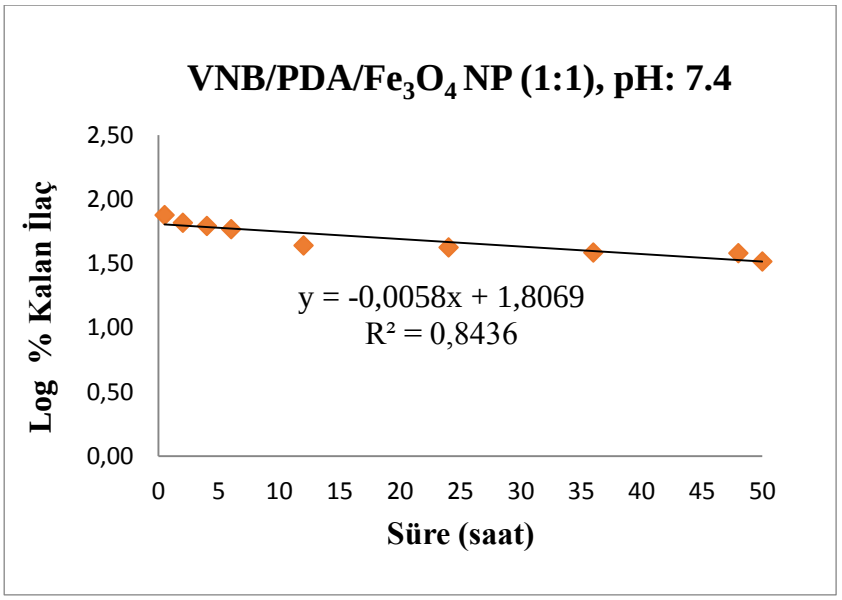
sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9518$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.20 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Birinci Dereceden kinetik modeline ait grafik

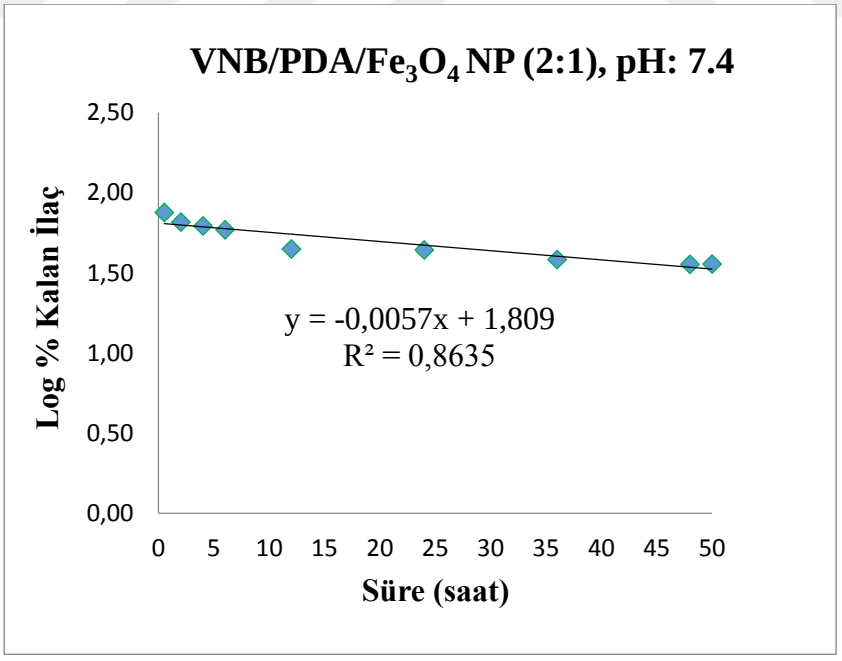
VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.20'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8005$ değeri elde edilmiştir.

pH:5.5 koşullarında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışma sonuçlarının, birinci dereceden kinetik modele uygun olduğu görülmüştür. Elde edilen korelasyon kat sayılarının 1 sayısına oldukça yakın olduğu tespit edilmiştir. Modele en çok uyan yapıların, VNB/PDA/Fe_3O_4 (1:1) ve (2:1) nanoyapıları olduğu görülmüştür.



Şekil 6.21 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Birinci Dereceden kinetik modeline ait grafik

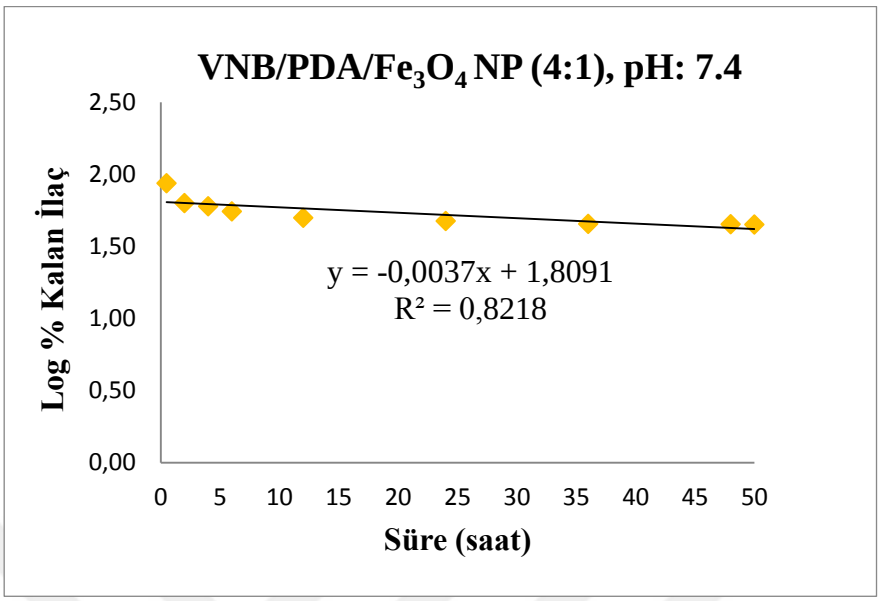
VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.21'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8436$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.22 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Birinci Dereceden kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.22'de

sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8635$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.23 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Birinci Dereceden kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak birinci dereceden kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.23'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.6) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8218$ değeri elde edilmiştir.

VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH:5.5 koşullarında elde edilen R^2=0.90 değeri nedendiyle birinci dereceden kinetik modele uygun olduğu tespit edilmiştir.

6.3.3 Hixson Crowell Kinetik Model Sonuçları

Hixson Crowell kinetik modeli, zamanın bir fonksiyonu olarak ilacın çözünme hızını küp kök yasası ile ifade etmektedir [235], [236]. Bu model, eşit büyüklükte ve katı şeklinde partiküllerden oluşan ilacın küp köküne dayalı olarak çözünme hızını açıklar [236]. *In vıtro* salım ortamında bulunan ilacın çözündüğünde şeklinin değişmediğini ve yüzey alan ağırlığının salım ortamında 3/1 oranında sabit olarak azaldığı varsayılır. [237].

Hixson Crowell kinetik modeli özellikle monodispers yapıda bulunan, küresel şekile sahip malzemeler ve ilaçlar için uygundur. Bu kinetik modele uyan ilaç salımıi; ilacın yüzeyinde gerçekleşir ve salım ortamında bulunan sıvı, ilaç yüzeyin tüm bölgelerine aynı derecede etki etmektedir [228]. Salım ortamında çözünen

ilacın salımı yavaş bir hızda gerçekleşir. Bu kinetik model (6.7) eşitliği ile ifade edilir [237].

$$W_0^{(1/3)} - Wt^{(1/3)} = K_{HC} * t \qquad (6.7)$$

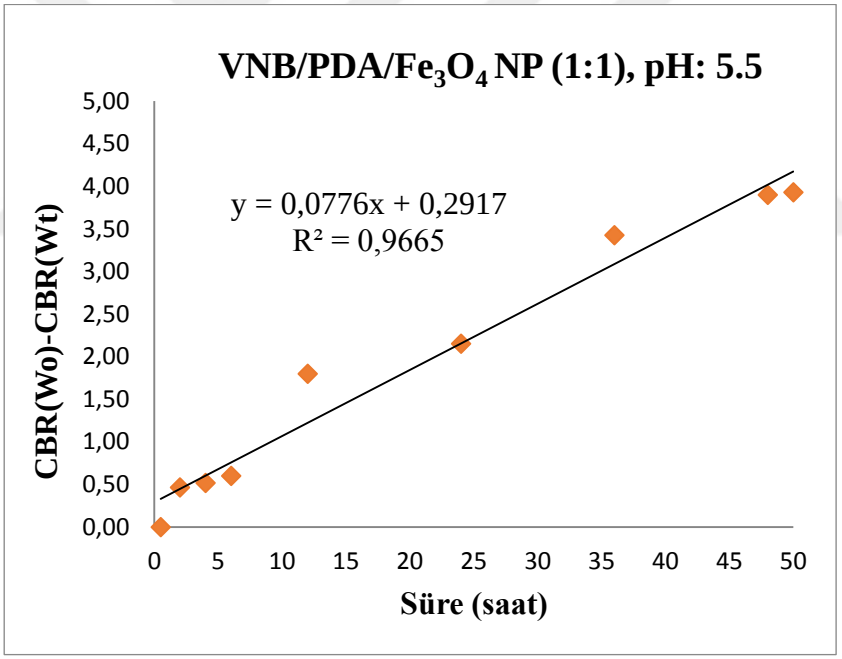
W_0: farmasötik dozaj formundaki ilacın başlangıç miktarı

Wt: t zamanında farmasötik dozaj formundaki kalan ilaç miktarı

K_{HC}: yüzey hacim ilişkisini tanımlayan Hixson-Crowell sabiti

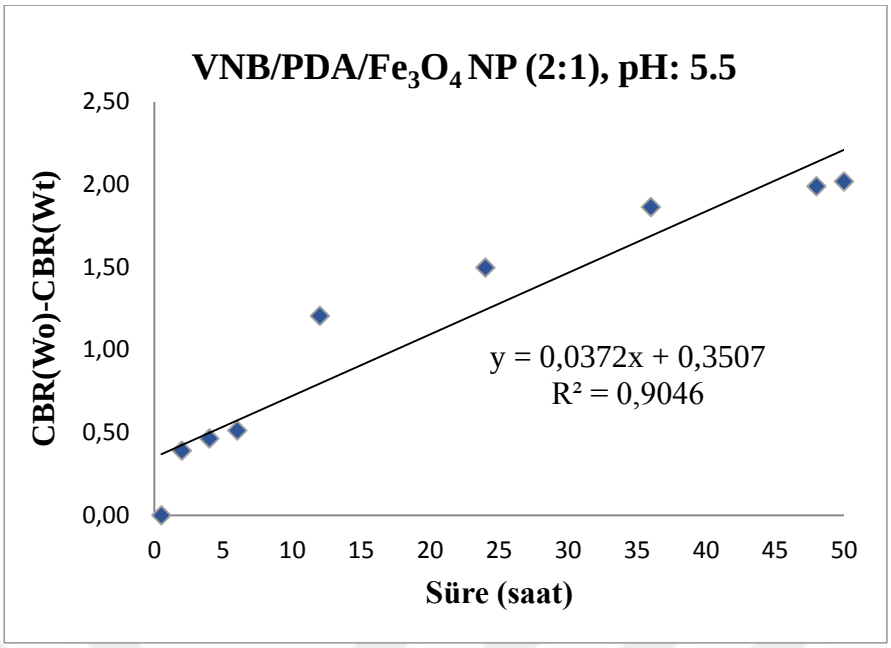
In vitro ilaç salım çalışması sonucunda elde edilen veriler, Hixson Crowell kinetik modelinde (6.7) eşitliği kullanılarak incelenmiştir.

Bu kapsamda VNB/PDA/Fe_3O_4 NP 1:1, 2:1 ve 4:1 yapıları pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında Hixson Crowell kinetik model uyumu incelenmiş ve ilaç salım davranışı değerlendirilmiştir.



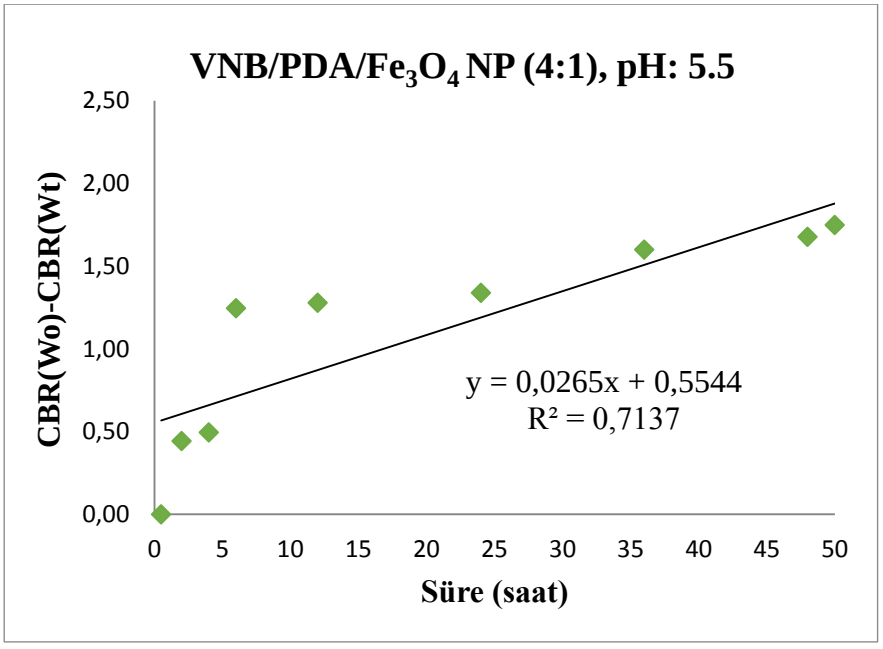
Şekil 6.24 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.24'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9665$ değeri elde edilmiştir.



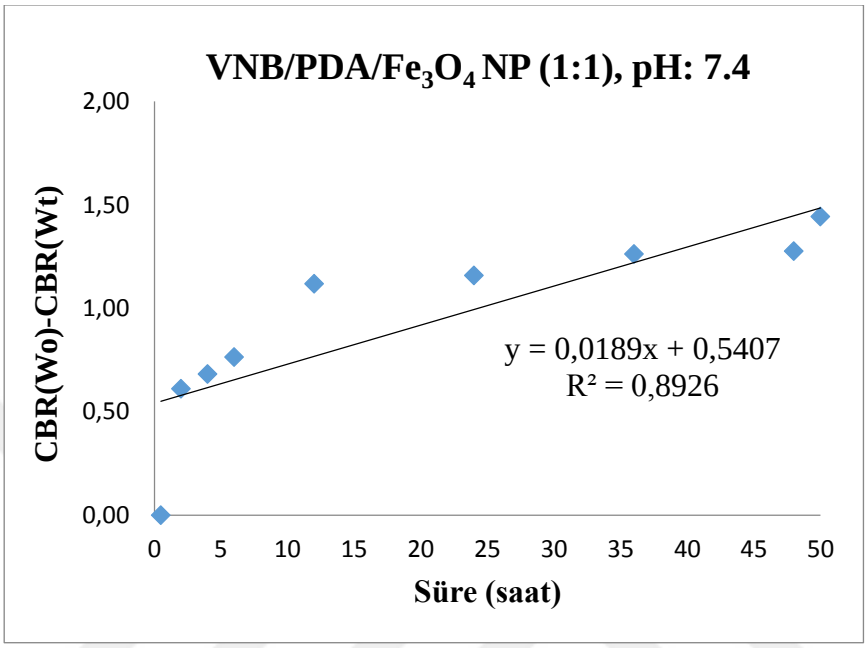
Şekil 6.25 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda in vitro salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.25'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9046$ değeri elde edilmiştir.



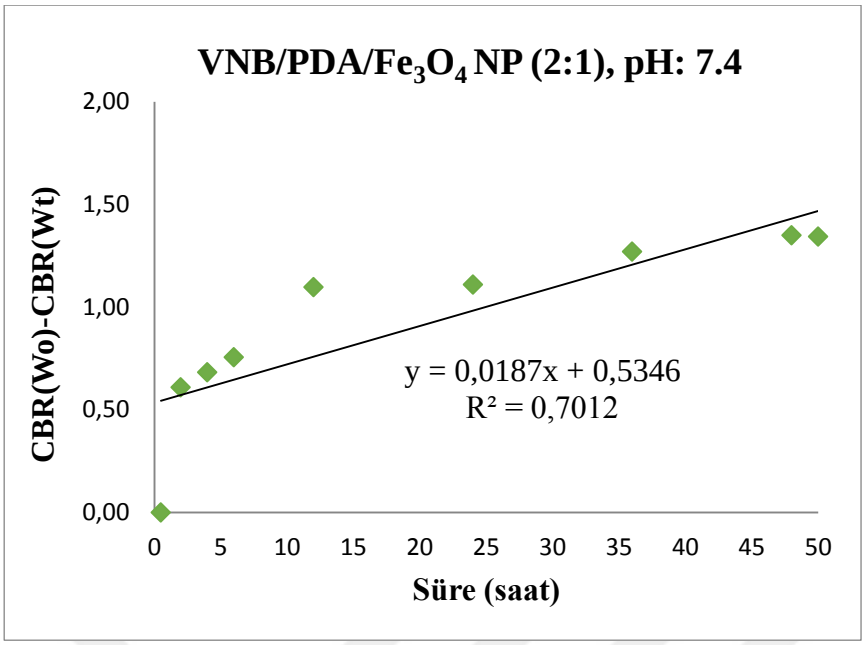
Şekil 6.26 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1) yapısının pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.26'da sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,7137$ değeri elde edilmiştir.



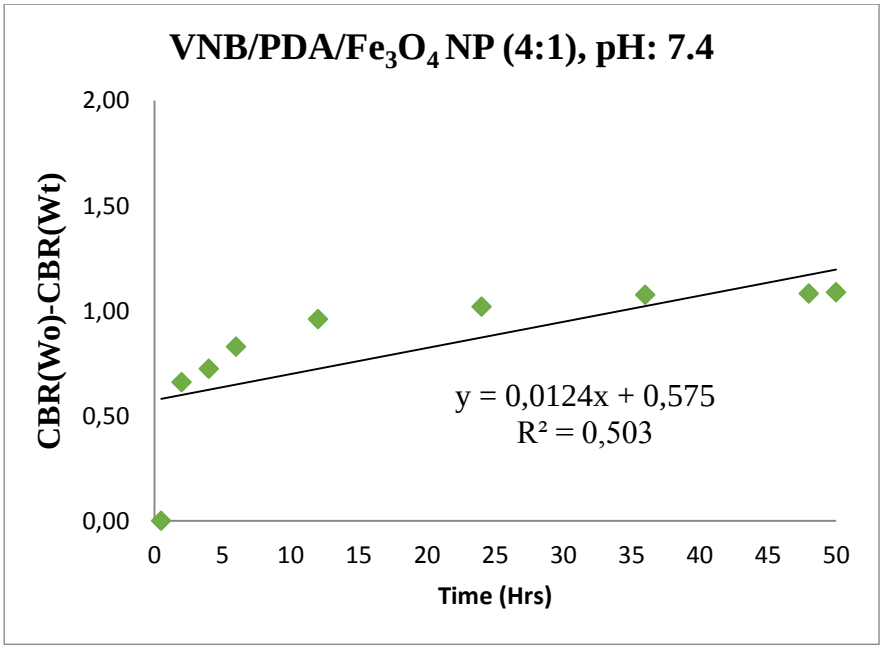
Şekil 6.27 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1), pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.27'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8926$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.28 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.28'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,7012$ değeri elde edilmiştir.



Şekil 6.29 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Hixson Crowell kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Hixson Crowell kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.29'da sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.7) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0{,}503$ değeri elde edilmiştir.

pH:7.4 koşullarında yapılan *in vitro* ilaç salım çalışmalarından elde edilen sonuçların, Hixson Crowell kinetik modeline uygun olmadığı görülmüştür. Elde edilen korelasyon katsayılarının, VNB/PDA/Fe_3O_4 NP'lerin PDA oranı arttıkça azaldığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak; VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5 koşullarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait R^2 değerleri yaklaşık 0.90 civarında elde edilmiş olup, Hixson Crowell kinetik modelini desteklemekte olduğu tespit edilmiştir. Bu durum, hazırlanan nanoyapıdaki ilacın tek bir birim veya tüm birimlerinin boyut, şekil, yüzey ve hacim özellikleri açısından aynı olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. Bu kinetik modele uyumlu olan VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) ve (2:1) yapılarında pH:5.5 koşulunda çözünmenin yüzeyde gerçekleştiği ve difüzyonun yavaş bir hızda oluştuğu değerlendirmesi yapılmıştır.

6.3.4 Higuchi Kinetik Model Sonuçları

Higuchi kinetik modeli, salınan ilacın kümülatif miktarı ile zamanın karekökü arasında doğru bir orantı olduğunu ifade etmektedir [229].

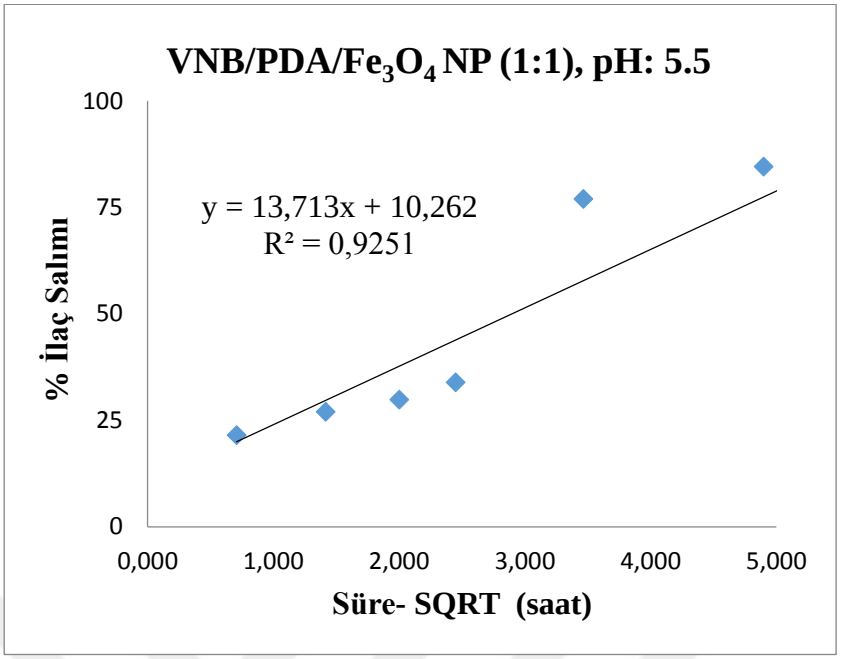
Bu kinetik modelde başlangıçtaki ilaç konsantrasyonu, ilaç çözünürlüğünden yüksektir ve ilaç difüzyonu sadece bir boyutta gerçekleşmektedir. İlaç matrisinin şişmesi ve çözünürlüğü ihmal edilebilir düzeyde olmasından dolayı ilaç difüzyonunun sabit olduğu ifade edilir. Bu modele ait olan (6.8) eşitliği aşağıda sunulmuştur [238], [239].

$$mt = K_H\sqrt{t} \qquad (6.8)$$

mt: t süresi içinde salınan ilaç miktarı

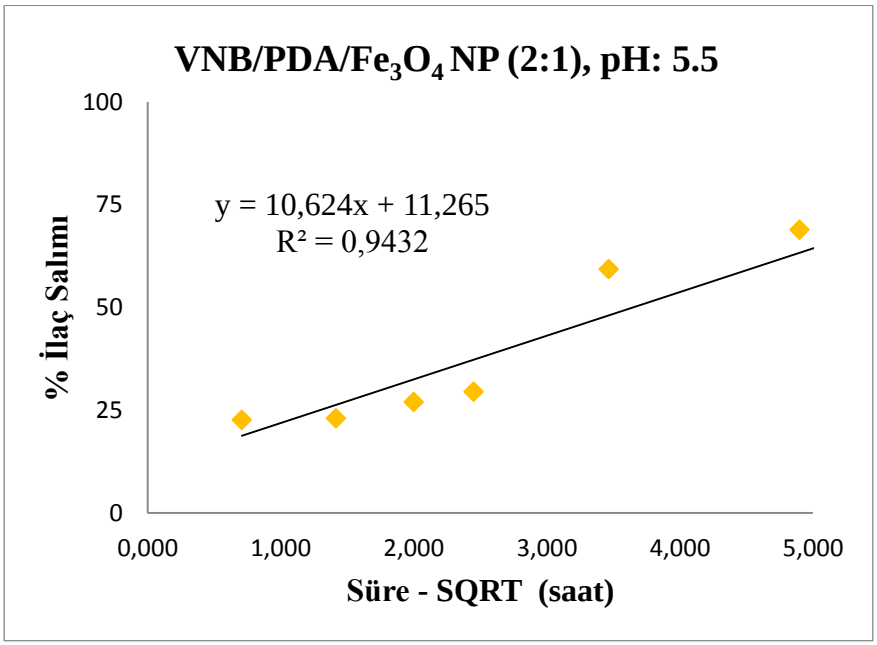
K_H: Higuchi çözünme sabiti

In vitro ilaç salımı çalışmalarından elde edilen veriler, Higuchi kinetik modele uygunluğunun incelenmesi amacıyla yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak hesaplanmış ve grafikleri oluşturulmuştur.



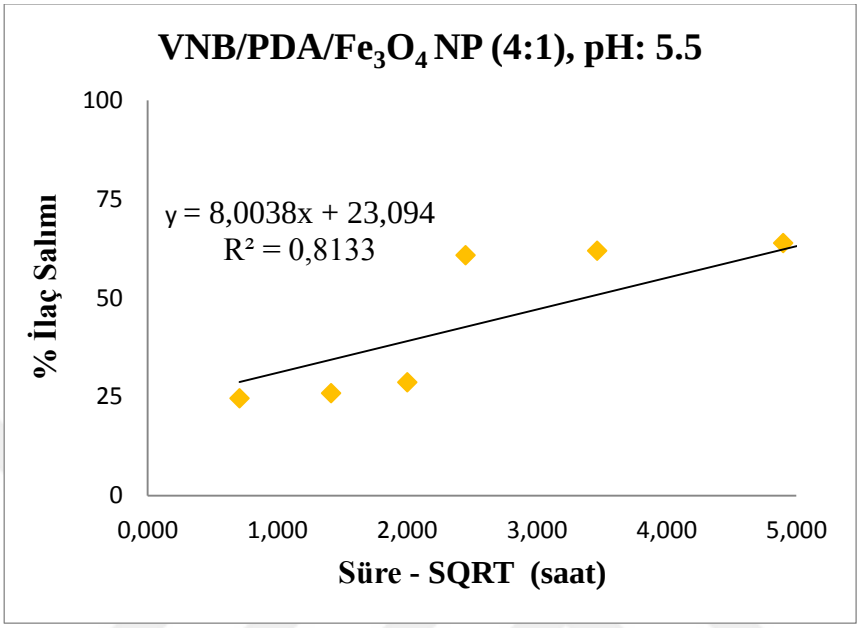
Şekil 6.30 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1), pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1), pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.30'da sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9251$ değeri elde edilmiştir.



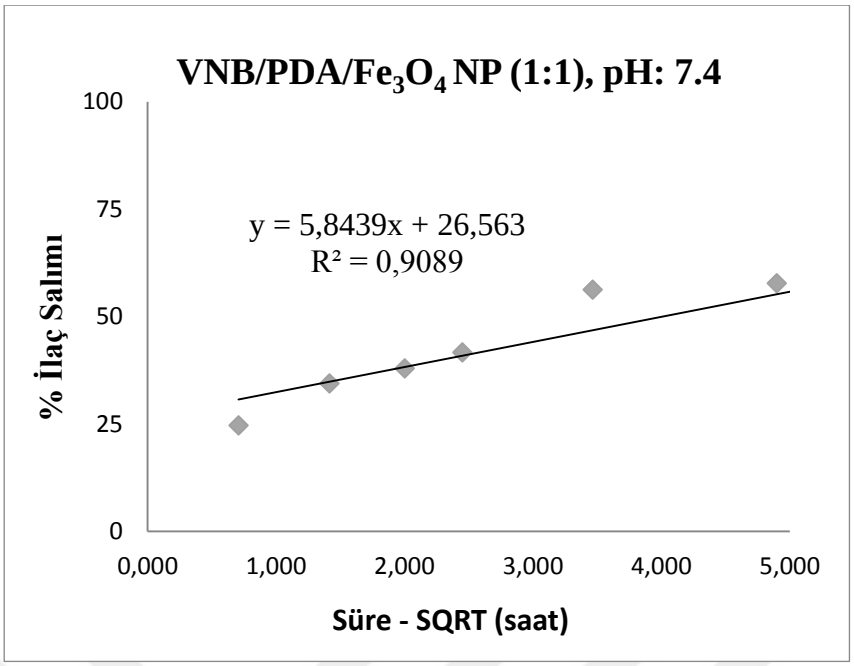
Şekil 6.31 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1), pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.31'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9432$ değeri elde edilmiştir.



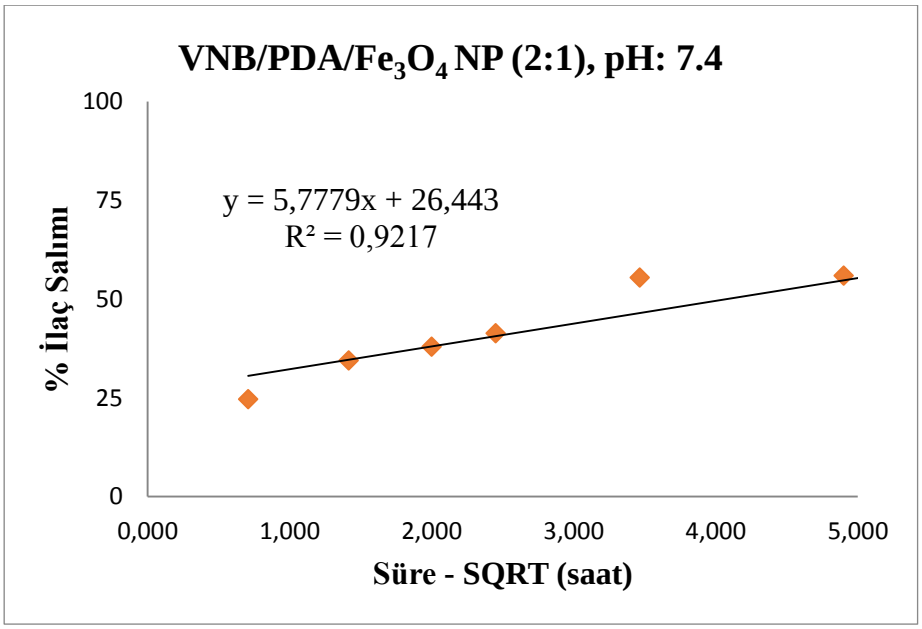
Şekil 6.32 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 5.5 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (4:1), pH: 5.5 koşulunda *in vitro* salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.32'de sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,8133$ değeri tespit edilmiştir.



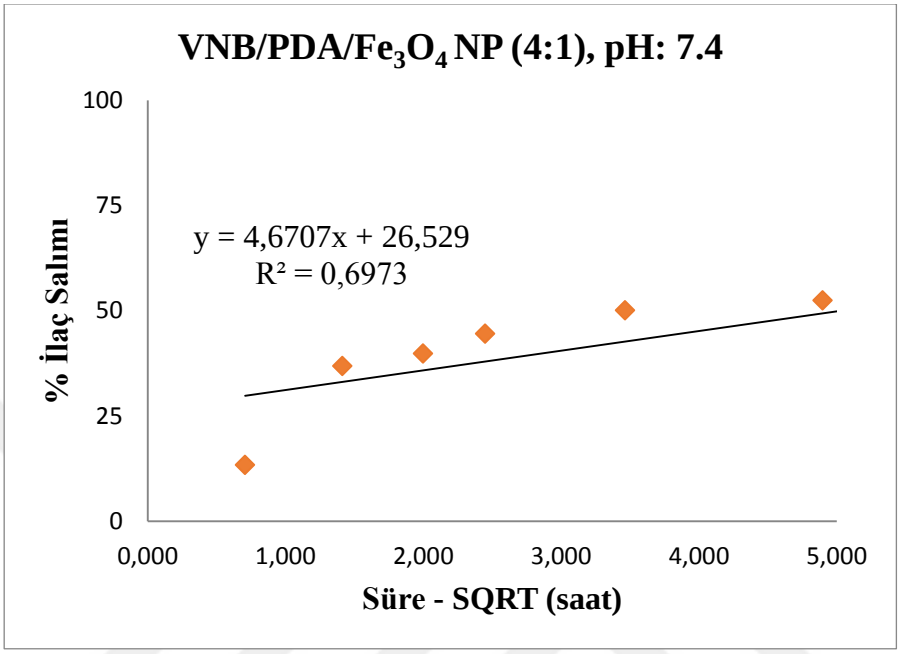
Şekil 6.33 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (1:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda ilaç salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.33'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda $R^2 = 0,9089$ değeri tespit edilmiştir.



Şekil 6.34 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (2:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4NP (2:1) yapısının pH: 7.4 koşulunda ilaç salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.34'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda R^2 = 0,9217 değeri tespit edilmiştir.



Şekil 6.35 VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1) yapısının pH: 7.4 ortamında Higuchi kinetik modeline ait grafik

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP (4:1), pH: 7.4 koşulunda ilaç salım değerleri kullanılarak Higuchi kinetik model incelemesine ait grafik Şekil 6.35'te sunulmuştur. Yukarıda verilen (6.8) eşitliği kullanılarak yapılan hesaplama sonucunda R^2 = 0,6973 değeri tespit edilmiştir.

VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin farklı PDA oranları ve pH koşullarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarına ait Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerine ait R^2 değerleri Tablo 6.6'da karşılaştırmalı olarak sunulmuştur.

Tablo 6.6 Sıfırıncı Derece, Birinci Derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerine ait R^2 değerleri

VNB/PDA/Fe_3O_4 NP		Sıfırıncı Derece Kinetik Model (R^2)	Birinci Derece Kinetik Model (R^2)	Hixson Crowell Kinetik Model (R^2)	Hiquchi Kinetik Model (R^2)
pH	**PDA Oranı**				
pH:5.5	1:1	0,8430	**0,9808**	**0,9665**	0,9251
	2:1	0,8771	**0,9518**	**0,9046**	0,9432
	4:1	0,6984	0,8005	0,7137	0,8133
pH:7.4	1:1	0,7876	0,8436	0,8926	0,9089
	2:1	0,8036	0,8635	0,7012	0,9217
	4:1	0,5332	0,8218	0,5030	0,6973

Sonuç olarak; VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5 ve pH:7.4 koşullarında yapılan *in vitro* salım çalışmalarında, R^2 değerleri 0.90 civarında çıkan en yüksek iki korelasyon katsayısı ile iki farklı modeli desteklediği gösterilmiştir.

6.4 Biyouyumluluk Çalışması

Bir maddenin ya da malzemenin hücre hasarına veya ölümüne neden olma potansiyeli sitotoksisite olarak adlandırılır [240].

Sitotoksisite testleri, bir maddenin veya malzemenin hücrelerin üzerinde sitotoksik etki gösterip göstermemesi veya hücre çoğalması üzerinde etkisinin olup olmadığının tespit edilmesini sağlayarak, maddenin veya malzemenin biyouyumluluğuyla ilgili bilgiler sağlar.

Sitotoksisite analizi için literatürde metabolik aktiviteye dayalı ATP analizi veya hücre proliferasyon ölçümlerinin yapıldığı farklı bir çok test yöntemleri bulunmaktadır [241]. Bu yöntemler; XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl), MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide], WST-1, [(((4-[3-4-iodophenyl]-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzene disulfonate))], MTS [(5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4,5-dimethylthiazoly)-3-(4-sulfophenyl) tetrazolium, inner salt], Nötr Kırmızı ve Alamar mavisi gibi oldukça çeşitlidir. Analizin temel amacı; hücrelerdeki metabolik aktivite veya membran bütünlüğü gibi canlı hücrelere özgü hücresel fonksiyonların tespit edilmesine dayanmaktadır. Yapılan testlerin sonucunda ortaya çıkan hücre canlılığındaki azalma toksik bir etkiyi gösterirken, hücre canlılığındaki artış ise koruyucu veya uyarıcı etkiyi ifade etmektedir [242].

6.4.1 Hücre Stoğunun Oluşturulması

Biyouyumluluk çalışmasıyla; nanoyapıların hücreler üzerinde oluşturacağı sitotoksitesinin tespit edilmesi için fare fibroblast hücre hattı (L929) kullanılmıştır.

Bu amaçla L929 hücre hattının stoğu oluşturulmuştur. Hücre kültüründe kullanılacak olan besiyeri, biyogüvenlik kabininde aseptik teknik kullanılarak hazırlanmıştır. DMEM F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12) içerisine %10 FBS (Fetal Bovine Serum) eklenmiştir ardından %0,5 penisilin-streptomisin antibiyotiği eklenerek stok besiyeri oluşturulmuştur. Hazırlanan stok besiyeri 50 ml'lik falkonlar içerisine aktarılarak +4°C'de muhafaza edilmiştir.

-80°C'den alınan L929 hücre hattı 37°C sıcaklıktaki su banyosu içerisinde çözündürülmüş, ardından besiyeri bulunan 15 ml'lik falkon içerisinde alınarak 1000 rpm hızında 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış ve dipte kalan pellette bulunan hücrelerden 1 µl alınarak tripan mavisi yardımıyla hücrelerin sayımı yapılmıştır. Bu işlemin ardından stok besiyeri kullanılarak 25T'lik steril flasklara hücrelerin ekimi gerçekleştirilmiştir. Ardından 37°C sıcaklıkta ve % 5 CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Belirli zaman aralıklarında konfluentlik durumları mikroskop yardımıyla incelenmiştir. Yeterli konfluentliğe ulaşan L929 hücreleri XTT testinde kullanılması amacıyla pasajlanarak çoğaltılması sağlanmıştır.

6.4.2 Sitotoksisite Çalışması ve Sonuçların İncelenmesi

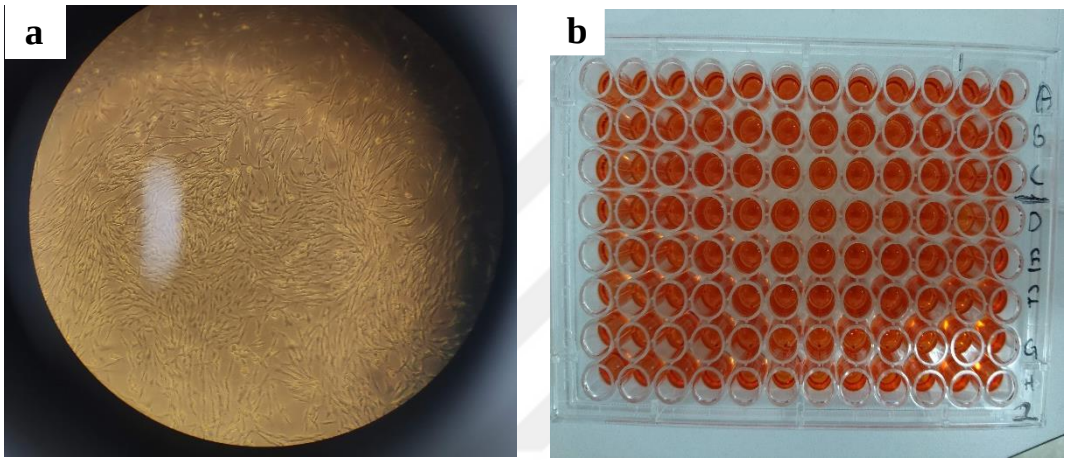
Sitotoksisite analizi için XTT (2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl), yöntemi kullanılmıştır. Bu test hücrelerin metabolik aktivitesini ölçerek hücre canlılığı hakkında bilgi sağlar [241].

Metabolik olarak canlı hücreler sarı tetrazolyum tuzunu [sodyum 3'-[1-(fenilaminokarbonil)-3,4-tetrazolyum]-bis(4-metoksi6-nitro)] benzen sülfonik asit hidrat turuncu bir formazan yapısına indirger [242]. Bu formazan yapısının, çözündürmeye gerek kalmadan çoklu pleyt okuyucuda absorbansı ölçülebilir. Analiz sonucunda oluşan renk değişikliği hücrelerin metabolik aktivitesini, canlılığını, çoğalmasını veya sitotoksisitesini gösterir [31].

XTT metodu ile sitotoksisite tayini için pasajı yapılan L929 hücreleri her kuyucukta $0,01x10^6$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleyte ekimi yapılmıştır. Ekilen

hücreler pleytin yüzeyine tutunmaları ve konfluent hale gelmeleri için 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir.

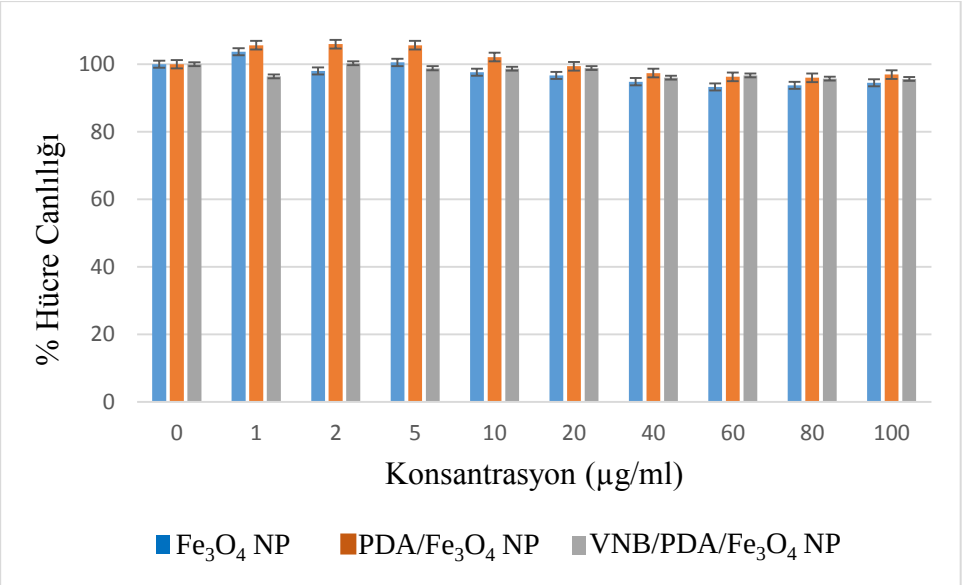
Konfluent olduğu görülen hücrelere 5 tekrarlı olacak şekilde her bir kuyucuğa 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml Fe_3O_4 NP, PDA/Fe_3O_4 NP, VNB/PDA/Fe_3O_4 NP yapıları eklenmiştir. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atılmıştır. Ardından DMEM F-12 besiyeri içerisine XTT tuzu ve fenazin metosülfat (PMS; Phenazine methosulfate) eklenerek hazırlanan karışım şırınga yardımı ile sterilize edilmiştir. Daha sonra 100 µl olarak her bir kuyucuğa bu karışım eklenmiştir [Şekil 6.36 (b)].



Şekil 6.36 Biyouyumluluk çalışması: a) L929 hücrelerine ait mikroskopi görüntüsü 10.000X ve b) XTT uygulanan hücre pleytine ait görüntü

Hazırlanan pleytler 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edildikten sonra mikroplaka okuyucu ile 450 nm dalga boyu kullanılarak absorbans ölçümü yapılmıştır. Ölçüm sonuçlarından elde edilen absorbans değerleri deneyde kullanılan konsantrasyonlar aşağıda sunulan (6.9) eşitliği kullanılarak % canlılık değerleri hesaplanmış ve sitotoksisite grafikleri oluşturulmuştur [243].

$$\%\ Canlılık = \text{Ölçülen } absorbans \times Kontrol\ absorbansı \times 100 \qquad (6.9)$$



Şekil 6.37 L929 hücre hattında yapılan XTT analiz sonucuna ait grafik (% hücre canlılığı)

Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin çeşitli konsantrasyonlarını (1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml) uygulanarak 24 saat boyunca yapılan XTT analiz sonucunda uygulanan nanopartikül ve nanoyapıların sitotoksik etki göstermedikleri tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyonda hücre canlılığının %95 oranında olduğu incelenmiştir.

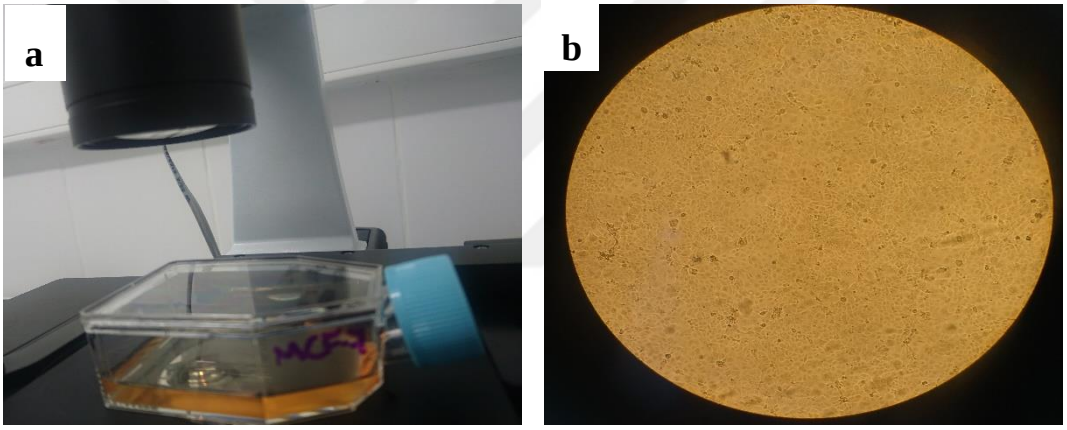
Literatürde Fe_3O_4 NPler ile yapılan sitotoksisite çalışmalar incelendiğinde, 100 µg/ml oranı gibi yüksek konsantrasyonda hücreler üzerinde ciddi bir sitotoksik etki görülmemiştir. Ankawar ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, Fe_3O_4NPleri Glia (D54MG, G9T/VGH, SF126, U87, U251 ve U373) ve meme hücre hatlarında (MB157, SKBR3 ve T47D) 72 saat boyunca MTS analizi ile incelemişlerdir [243]. Yapılan MTS hücre canlılığı analiz sonuçlarına göre 10 µg/ml konsantrasyonda Fe_3O_4 NPlerin uygulandığı tüm hücre hatlarında herhangi bir sitotoksik etki görülmemiştir, 100 µg/ml konsantrasyonunda Fe_3O_4NPlerin uygulandığı hücre hatlarında ise ortalama olarak hücre canlılığının %10–25 oranında azaldığını rapor etmişlerdir [243].

Genel olarak Fe_3O_4NPlerin tek başına hücre canlılığında sitotoksik etki göstermeyen biyouyumlu yapılar olduğu bilinmektedir. Aynı zamanda PDA kaplı Fe_3O_4NPlerin de sitotoksisite göstermemesi, kullanılan bu polimerin iyi bir uyumluluğa sahip olduğunu göstermektedir.

Tez çalışması kapsamında hazırlanan nanoyapıların biyouyumluluğunun yüksek olması da gelecek *in vivo* çalışmalar için oldukça umut vadetmektedir.

6.5 Antikanser Etkinlik Çalışması ve Sonuçların İncelenmesi

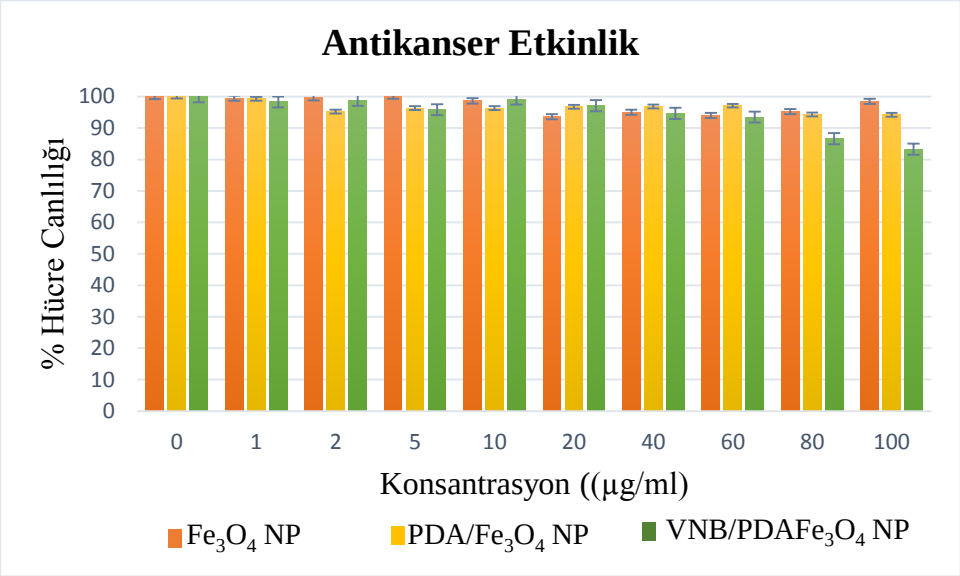
Antikanser etkinlik çalışması; nanoyapıların kanser hücre hattı üzerinde oluşturacağı etkinliğin tespit edilmesi amacıyla uygulanmıştır. Antikanser etkinliğin tespit edilmesinde XTT metodu ve MCF-7 (meme adenokarsinoması) hücre hattı kullanılmıştır. Bölüm 6.4.1'de bahsedildiği gibi flaska ekilen MCF-7 hücreleri konfluent hale geldiklerinde tripsin kullanılarak pasajlanmıştır. Bu amaçla MCF-7 hücreleri her kuyucukta $0{,}01x10^6$ hücre olacak şekilde 96 kuyucuklu pleytlere ekilmiştir. Ekilen hücrelerin pleyt yüzeyine tutunmaları ve konfluent hale gelmeleri için 37°C sıcaklıkta ve %5 CO_2'li inkübatörde inkübe edilmiştir.



6.38 Antikanser etkinlik çalışması: a) 25T flaska ekilmiş olan MCF-7 hücrelerine ait görüntü ve b) MCF-7 hücrelerine ait mikroskop görüntüsü (10.000X)

Konfluent olan hücrelerin üzerine 5 tekrarlı olacak şekilde her bir kuyucuğa belirlenen oranlarda 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NP eklenmiştir. Ardından 24 saat ve 37°C'de inkübe edildikten sonra hücrelerin üzerindeki besiyeri atılmıştır. DMEM F-12 besiyeri içerisinde XTT tuzu ve Fenazin Metosülfat (PMS) eklenerek hazırlanan karışım şırınga yardımı ile sterilize edildikten sonra 100 µl olarak her bir kuyucuğa eklenmiştir (Şekil 6.38). Hazırlanan pleytler 4 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvde inkübe edilerek ardından mikroplaka okuyucu ile 450 nm dalga boyu kullanılarak absorbans ölçümü yapılmıştır.

Ölçüm sonuçlarından elde edilen absorbans değerleri yukarıda sunulan % canlılık formülü (6.9) eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır.

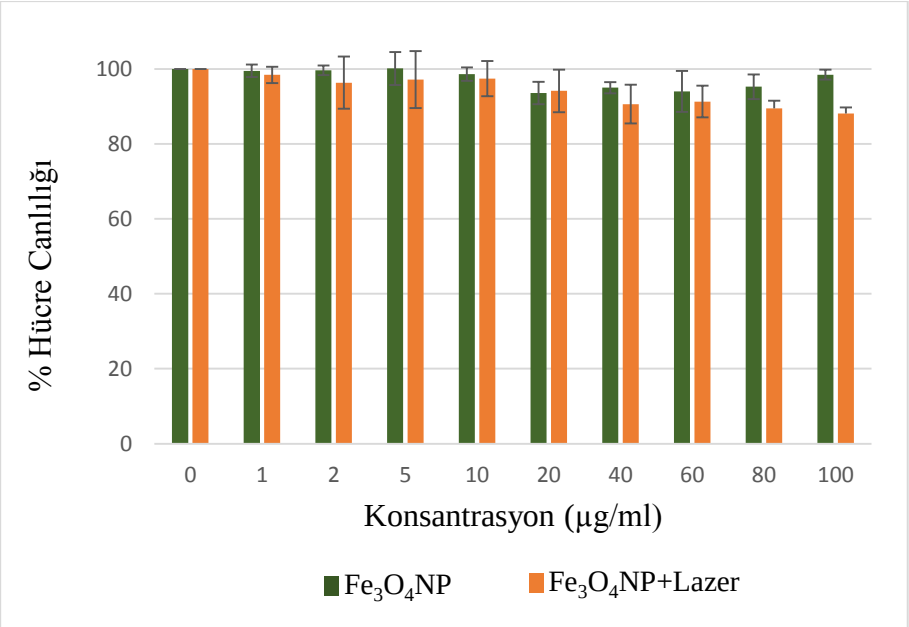


Şekil 6.39 MCF-7 hücre hattında yapılan XTT analiz sonucuna ait grafik (% hücre canlılığı)

MCF-7 hücre hattında incelenen Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin 60 µg/ml konsantrasyonuna kadar antikanser etkinlik göstermediği tespit edilmiştir (Şekil 6.39). Bu konsantrasyondan sonra sadece VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin antikanser etkinlik gösterdiği belirlenmiştir. Özellikle 100 µg/ml'lik konsantrasyonda %83 oranında hücre canlılığı görülmüştür.

6.5.1 Fototermal Etkiye Duyarlı Antikanser Etkinlik Çalışması ve Sonuçların İncelenmesi

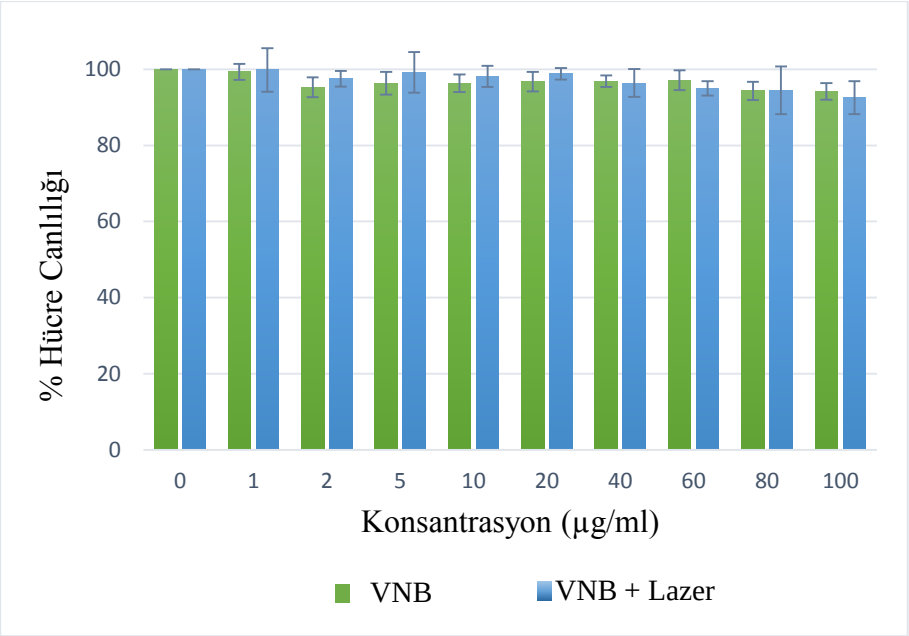
Fototermal etkinlik çalışmasında Bölüm 6.5'te sunulan işlem basamakları uygulanmış ve pleytlere MCF-7 hücreleri ekilerek konfluent hale geldikten sonra her bir kuyucuğa belirlenen oranlarda 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml olacak şekilde Fe_3O_4NP, VNB, VNB/PDA/Fe_3O_4NP (1:1) yapıları eklenmiştir. Ardından her bir gruba 5 dakika boyunca 808 nm dalga boyunda 1 W/cm^2 çıkış gücüne sahip olan NIR lazer ışını uygulanmıştır. Bu işlemden sonra 24 saat 37°C'de inkübe edilen hücrelerin üzerindeki besiyeri atılmıştır. Bölüm 6.5.2'de açıklandığı şekilde çoklu pleyt okuyucuda absorbanslar ölçülerek deneyde kullanılan konsantrasyonlar (6.9) eşitlik yardımıyla % canlılık değerleri bulunmuş, lazer-nanoyapı etkileşimlerine ait grafikler oluşturulmuştur. Fototermal etkinlik ve antikanser çalışma sonuçları birlikte değerlendirilmiştir.



Şekil 6.40 MCF-7 hücre hattında yapılan Fe_3O_4NPlerin antikanser ve fototermal etkinlik karşılaştırmalı % hücre canlılık sonucu

Fe_3O_4NPler MCF-7 hücre hattında 5 dakika boyunca lazer ile ışınlanmıştır. Fototermal etkinliğin tespit edilmesi amacıyla aynı özelliğe sahip diğer hücre grubu ışınlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılmalı olarak incelenmiş ve ilgili grafik Şekil 6.40'ta sunulmuştur.

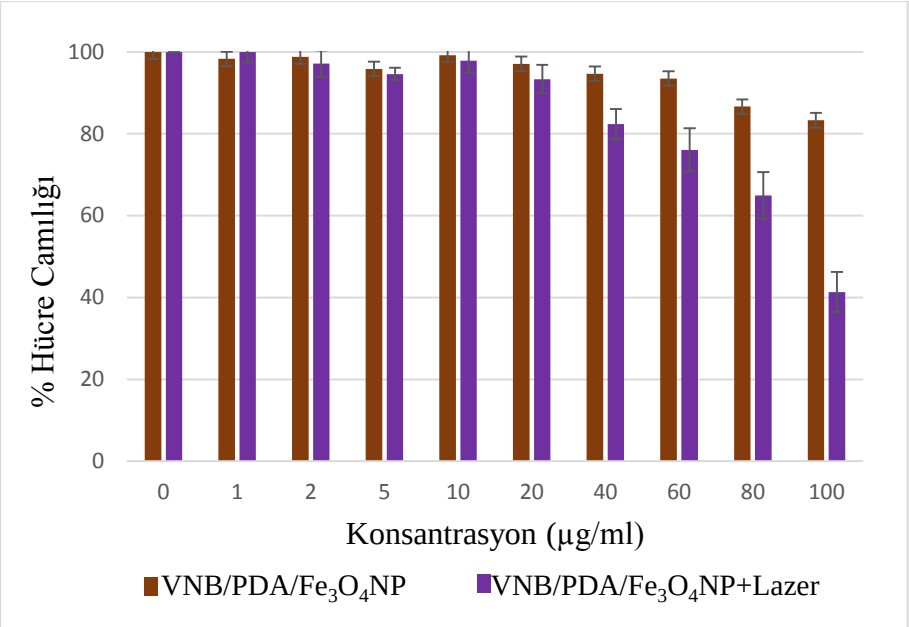
Lazer ile etkileşime giren en yüksek konsantrasyon değeri uygulanan 100 µg/ml hücre grubu, %88'lik hücre canlılığı göstermiştir. Lazer ile etkileşime girmeyen hücre grubunda ise hücre canlılığı L929 hücre hattında olduğu gibi sitotoksik etki göstermemiştir.



Şekil 6.41 MCF-7 hücre hattında çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan VNB ilacının karşılaştırmalı fototermal etkinlik sonucu (% hücre canlılığı)

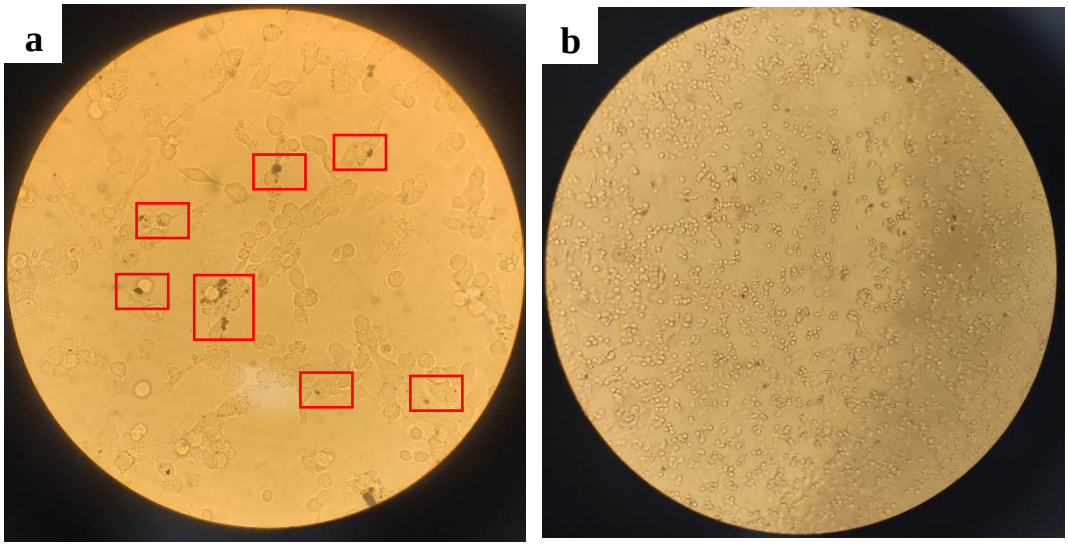
MCF-7 hücrelerine VNB ilacı ve VNB ilacı uygulanan farklı bir gruba 5 dakika boyunca NIR lazer ışını uygulanmıştır. Böylece lazer ile etkileşimin hücreler üzerindeki etkisi incelenmiştir (Şekil 6.41).

Çalışma sonuçları hem lazer uygulanan hem de uygulanmayan gruplarda önemli bir sitotoksik etkinin oluşmadığını göstermiştir. Hücre canlılığın yaklaşık % 93 olduğu görülmüştür.



Şekil 6.42 MCF-7 hücre ortamına çeşitli konsantrasyonlarda uygulanan VNB/PDA/Fe_3O_4NPye ait karşılaştırmalı fototermal etkinlik sonucu (%hücre canlılığı)

MCF-7 hücre ortamına uygulanan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin lazer uygulanan ve uygulanmayan hücre gruplarına etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir (Şekil 6.42). Sonuçlar; lazer uygulanan grupta hücre canlılığının %41 oranına düştüğünü ve yüksek oranda antikanser etkinlik sağlandığını göstermiştir.



Şekil 6.43 MCF-7 hücrelerine ait mikroskobik görüntü (20.000X): a) VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin hücreler tarafından içselleştirilmesi ve b) Hücrelerde görülen sitotoksik etki

Şekil 6.43 (a)'da VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin hücreler tarafından içselleştirilmesi gösterilmektedir. Uygulanan nanoyapılar invert mikroskopta 20.000X ile incelenmişlerdir. İçselleştirilen nanoyapılar hücrelerin içerisinde siyah noktalar şeklinde görülmüştür.

Ayrıca hücre dışında herhangi bir nanoyapı bulunmaması sentezlenen nanoyapının hücreler tarafından içselleştirildiğini kanıtlamıştır. Şekil 6.43 (b)'de sunulan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin fototermal etkinlik sonucunda hücreler üzerinde oluşan sitotoksik hasarı gösterilmiştir. Hücrelerin morfolojik yapılarının bozulduğu tespit edilmiştir.

Bu durum ilaç yüklü nanoyapının hem kemoterapik ve fototermal etki sonucunda güçlü bir etki gösterdiğini kanıtlamıştır. Çünkü tek başına uygulanan Fe_3O_4NPler ve VNB ilacının hücreler üzerinde sitotoksisite oluşturmazken, VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin antikanser etkinlik göstermesinin sebebi tasarlanan yapının sinerjik etki oluşturmasından kaynaklanmaktadır.

7
SONUÇ

Kanser, hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile karakterize olan dünya çapında ciddi ve yaygın bir hastalık türüdür. Günümüzde kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi gibi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Fakat bu kanser tedavi yöntemlerinin birçok ciddi ve yaygın yan etkileri bulunmaktadır. Bundan dolayı bu yan etkilerin azaltabileceği ya da minimize edilebileceği etkin yeni kanser tedavilerine ihtiyaç bulunmaktadır. Bu ihtiyaç doğrultusunda kanser tedavilerine alternatif olarak kullanılabilecek yeni yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Son yıllarda ortaya çıkan fototermal terapi, kanser yöntemlerine alternatif olarak kullanılabilecek nanoteknolojik bir tekniktir.

Fototermal terapi; NIR lazer ışınlaması ile tümör hücrelerinin ablasyonunu sağlamaktadır [66]. Fototermal terapi, geleneksel kanser tedavilerine kıyasla daha fazla penetrasyon derinliği sağlayarak normal dokuların korunmasını, hızlı iyileşmesini ve düşük komplikasyon oranı gibi birçok avantaj sunan minimal invaziv bir yöntemdir [244]. Günümüzde karbon bazlı nanokompozitler [245], metal bazlı nanomalzemeler [246], [247] ve organik nanopartiküller [248] olmak üzere fototermal terapi için birçok farklı nanoyapılar geliştirilmiştir.

Son on yılda fototermal terapi üzerine yapılan çalışmaların artması ile bu alanda çok sayıda nanoyapı geliştirilmiştir. Bu amaçla farklı tasarımlara sahip çeşitli ilaç dağıtım sistemleri fototermal tedavi için araştırılmıştır [64]. Yapılan çalışmalar metalik özellikli nanoyapıların güçlü foto fiziksel özelliklerine sahip olmaları nedeniyle fototermal uygulamaları için son derece uygun olduklarını göstermektedir. Metalik özellikli nanoyapılar arasında altın ve demir nanopartiküller ve kombinasyonları sıklıkla araştırılmaktadır. Altın yüksek soğurma ve ısınma potansiyeli göstermesine rağmen biyolojik olarak parçalanamadan uzun süre vücutta kalabilmektedir [36], [77]. Bu durum vücutta birikim göstermesi nedeniyle kullanımını sınırlandırmaktadır. Altın ve karbon gibi birçok nanoparçacık esaslı materyal, hem *in vivo* hem de *in vitro* çalışmalarda umut vaat etmesine rağmen, uzun vadeli potansiyel toksisiteleri bulunmaktadır [36], [77], [78], [249]. Literatürde yapılan çalışmalarda, karbon bazlı nanoyapıların ise

pulmoner inflamasyon ve reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi birçok toksik yanıta neden olabileceği bildirilmiştir [77], [78].

Dopamin beyinde doğal olarak bulunan tipik bir nörotransmiter olup, ek oksidanlar olmaksızın alkali koşullar altında kendiliğinden polidopamine polimerize olabilmektedir [124]. PDA yüksek biyouyumluluğa, biyobozunurluğa sahip olmasının yanı sıra NIR lazer ışınlaması ile fototermal stabilite ve fototermal dönüşüm verimliliği sergiler [45], [126]. Fe_3O_4NPler çeşitli ilaçların tümör hücrelerine taşınması için yaygın olarak kullanılmıştır [127]. Ayrıca Fe_3O_4NPler fototermal ajanların içselleştirilmesini arttırarak lokal tümör ablasyon etkisinide geliştirebilir [49].

Yukarıda açıklanan nedenler göz önüne alaınarak tez çalışması kapsamında, antikanser etkinliğin kontrollü bir biçimde sağlanabileceği bir nanoyapı tasarlanmıştır. Bu tasarımda; Fe_3O_4NPlerin fototermal terapide kullanılması amacıyla polidopamin ile kaplanması, tümöre spesifik özellik kazandırılması amacıyla PEGilasyon işleminin uygulanması ve oluşan nanoyapıya VNB ilacının yüklenmesi amaçlanmıştır. Böylece tasarlanan nanoyapının, alternatif kanser tedavisinde klinik uygulamalar için umut veren bir alternatif olması hedeflenmiştir.

Bu hedef doğrultusunda yenilikçi nano biyomalzeme hazırlanmış ve ardından karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları değerlendirildikten sonra ise uygun nanoyapıların *in vitro* ilaç salım davranışı, antikanser ve fototermal etkinlikleri incelenmiştir.

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmaların sonuçları aşağıda özetlenmiştir:

- Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezi için ön çalışmalar yapılmış ve sonuçlar değerlendirildikten sonra solvotermal sentez yöntemi ile 18 nm ortalama boyuta sahip nanopartiküllerin üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Proses parametreleri olan sıcaklık (160°C, 180°C, 200°C) ve süre (6, 12, 18 saat) değiştirilerek sentezlenen Fe_3O_4 nanopartikülleri Zeta Sizer, XRD, FT-IR, STEM, FE-SEM ve SEM yöntemleri ile incelenmiştir.
- Tümör sistemlerinde <100 nm boyutunun kanser tedavisinde etkin kullanım sağladığı bilinmektedir [213], [250]. Bu nedenle nanopartiküllerin boyutu 100 nm altında olacak şekilde sentezlenmesi hedeflenmiştir.

- XRD ve STEM analiz sonuçları; 200°C sıcaklık ve 6 saat reaksiyon süresi kullanılarak solvotermal yöntemle sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküllerinin %99.99 saflıkta ve 18 nm ortalama boyutunda olduğunu göstermiştir. Referans olarak kullanılan ticari Fe_3O_4 nanopartiküllerinin ise 20 nm ortalama boyuta sahip olduğu, %82.9 Fe_3O_4 ve %17.1 hidrazin hidrat içerdiği belirlenmiştir.
- Solvotermal yöntem ile 200°C sıcaklıkta ve 6 saat süre reaksiyon süresi boyunca sentezlenen nanopartiküllerin yüzeyi farklı oranlarda PDA polimeri ile enkapsüle edilmiştir. Ardından hazırlanan PDA enkapsüle Fe_3O_4 nanopartikülleri FT-IR ve FE-SEM yöntemleri ile analiz edilmiştir. PDA'nın kimyasal yapısı, FT-IR analizini içeren literatür çalışmaları göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Litarürde Xue ve arkadaşlarının yapmış olduğu FT-IR analizinde, Fe_3O_4NP ve PDA/Fe_3O_4NP'lerin sırasıyla 584 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1} dalga boylarında pikler verdiği gösterilmiştir [148]. Bu sonuçların, çalışma kapsamında FT-IR analizinden elde edilmiş olan 587 cm^{-1} ve 1620 cm^{-1} dalga boyundaki pik değerleriyle benzer olduğu görülmüştür. Literatür çalışmaları, PDA'nın güçlü ve geniş absorpsiyon bantlarının, aromatik halkaların ve fenol bileşiklerinin C-O gerilmelerinden kaynaklanan 1700-1000 cm^{-1} aralığında olıştuğunu göstermiştir [148], [211]. Çalışma kapsamındaki FT-IR spekturumunda da aynı aralıkta pikler elde edilmiş olup, PDA enkapsülasyonun başarılı bir şekilde gerçekleştiği doğrulanmıştır.
- SH-PEG ile kaplanmış PDA enkapsüle Fe_3O_4 nanopartiküllerin kimyasal yapısı FT-IR yöntemi ile incelenmiş, 1150 cm^{-1} ve 2890 cm^{-1} dalga boylarında oluşan piklerin sırasıyla C-O-C ve C-H gruplarına ait olduğu ve SH-PEG'den gelen gerilme titreşimlerini temsil ettiği belirlenmiştir [212]. SH-PEG'in FT-IR spekturumunda 1000 cm^{-1} ve 1500 cm^{-1} dalga boylarında görülen değerler, PDA enkapsüle Fe_3O_4NPlerin SH-PEG ile yapılan yüzey modifikasyonunu doğrulamaktadır [28]. Aynı şekilde PDA enkapsüle NPlerde bulunan NH pikinin SH-PEG ile modifikasyon sonrası kaybolması, yüzeye PEGilasyon işleminin uygulandığını göstermektedir.
- Elde edilen son nanoyapıya antikanser ilaç olan VNB eklenmiş ve kimyasal yapısı FT-IR yöntemi ile incelenmiştir. VNB/PEG/PDA/Fe_3O_4 NPlerin FT-IR spektrumları; 1573 cm^{-1} dalga boyunda C-C yapısına ait pik göstermiş ve

3500-3000 cm^{-1} dalga boyu aralığında VNB ilacının karakteristik N-H grubunu içermesinden dolayı güçlü bir pik sergilemiştir [32]. Bu sonuç, VNB ilacının SH-PEG kaplanmış nanopartikül yüzeylerine başarılı bir şekilde yüklendiğini doğrulamaktadır.

- Hazırlanan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin fototermal etkinliği, farklı süreler (1-15 dakika) ve 808 nm dalga boyunda NIR ışını uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Isınma etkinliği, kızılötesi dijital termal kamera kullanılarak kaydedilmiştir. VNB/PDA/Fe_3O_4 nanoyapısının, lazer etkisi ile 5 dakika içerisinde 42-45°C sıcaklık aralığına ulaştığı tespit edilmiştir.
- VNB/PDA/Fe_3O_4 nanopartiküllerinin fototermal etkinlik koşulunun belirlenmesinin ardından nanopartiküllerin ilaç salım verimliliği incelenmiştir. Bu incelemeyi gerçekleştirmek için ilaç salım testi yapılmıştır. Bu test kapsamında; tümör mikroçevresini ve normal vücut dokusunu temsil etmesi amacıyla salım ortamı pH değerleri 5.5 ve 7.4 seçilerek farklı sürelerde (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, 24, 30, 36, 48 ve 50 saat) salınan ilacın miktarları belirlenmiştir. Salınan ilaç miktarları UV-vis spektrofotometre ve kalibrasyon eğrisi kullanılarak belirlenmiştir. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5'te 24.cü saatte ilaç salım sonuçları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %84, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %68 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %63 olarak hesaplanmıştır. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH:5.5'te 50.ci saatte ilaç salım sonuçları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %99, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %81 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %75 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, VNB ilacının PDA polimerinden salım miktarının pH değerine bağlı olduğunu, en hızlı salımın pH:5.5'te ve en yavaş salımın pH:7.4'te gerçekleştiğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre, asidik ortama sahip olan kanser dokusunda VNB ilacının etkinliğinin daha yüksek olacağı öngörülmektedir.
- Fototermal uygulamanın ilaç salımına etkisinin incelendiği çalışmalar, NIR lazer uygulamasının ilaç salımını arttırdığını göstermiştir. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5'te 120.dakikada kümülatif ilaç salım miktarları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %99, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %65 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için % 61 olarak hesaplanmıştır.

- VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:7.4'te 120.dakikada kümülatif ilaç salım miktarları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %66, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %64 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %53 olarak hesaplanmıştır. 120.dakikada en yüksek ilaç salımı %99 salım miktarı ile (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP yapısında elde edilmiştir.
- 120.dakikada en yüksek ilaç salımı (%99) gösteren (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinin biyouyumluluk (in vitro sitotoksisite) ve antikanser etkinlik davranışları incelenmiştir. Bu kapsamda L929 hücre hattında biyouyumluluk çalışması gerçekleştirilmiştir. 100 µg/ml nanoyapı konsantrasyonunda hücre canlılığının %95 olduğu belirlenmiştir. Bu değer, nanoyapının sitotoksik etki oluşturmadığını göstermiş olup, nanoyapıların biyouyumlu olduklarını ortaya koymuştur.
- Antikanser etkinliğin incelenmesi amacıyla MCF-7 hücre hattı kullanılmıştır. Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDAFe_3O_4NP yapılarının 60 µg/ml konsantrasyona kadar antikanser etkinlik göstermediği tespit edilmiştir. Sadece VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin 100 µg/ml konsantrasyonda %83 oranında hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir
- Ayrıca NIR lazer-nanoyapı etkileşiminin antikanser etkinlik incelemesi, hücre kültür ortamında da gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında, lazer uygulanan ve uygulanmayan VNB/PDA/Fe_3O_4NPler MCF-7 hücre hattında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuçlar; lazer uygulanan grupta hücre canlılığının %41, lazer uygulanmayan grupta ise hücre canlılığı %83 olduğunu göstermiştir.

Yukarıda verilmiş olan sonuçlar; tez kapsamında sunulmuş olan amaç ve hipotezi doğrulamıştır.

Gerçekleştirilen çalışmalara ait sonuçların değerlendirmeleri, "Deneysel Çalışmalar" kapsamındaki 4 ana başlık temel alınarak aşağıda sunulmuştur:

1. Fe_3O_4NPlerin Sentezi, Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler
2. Fe_3O_4NPlerin Yüzey Modifikasyonları (PDA, PEGilasyon, İlaç Yükleme) Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler
3. İlaç Salım Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Öneriler
4. Biyouyumluluk ve Antikanser Etkinlik Çalışma Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler

1. Fe_3O_4NP'lerin Sentez Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Öneriler

Tez kapsamında fototermal terapi uygulamasında kullanılması amacıyla Fe_3O_4NPlerin seçilme nedeni; yüksek biyouyumluluk, NIR lazer etkileşimi sonucunda ısı üretebilme ve harici bir manyetik alan altında yönlendirilebilme yeteneğine sahip olmalarıdır. Fe_3O_4NPler taşıdıkları bu özelliklerinden dolayı özellikle kanser, ilaç, MRI gibi çeşitli sağlık alanlarında yaygın olarak kullanım alanı bulmuşlardır. Ayrıca NIR dalga boyları ile etkileşim sağlayabilen ve ısınma potansiyeli gösterebilen Fe_3O_4NPlerin tümör tedavisinde fototermal ajan olarak kullanılması iyi bir alternatiftir. Günümüzde sıklıkla araştırılan Fe_3O_4 nanoyapıları, diğer oksit ve saf metal esaslı manyetik malzemelere göre üstün biyouyumluluğa sahiptir.

Fe_3O_4NPler literatürde farklı yöntemler kullanılarak üretilebilmektedir. Bu üretim yöntemlerinin her birinin diğerine göre avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Bu kapsamda literatür incelemeleri yapılarak nanoyapıların boyut ve morfolojisinin kontrol edilebileceği koşulların belirlenmesi hedeflenmiştir.

Bu hedef doğrultusunda öncelikle literatür çalışmaları temel alınarak Fe_3O_4NPlerin sentezine yönelik ön çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucunda, hidrotermal ve solvotermal sentez yöntemlerinde, şekil ve boyut kontrolünün sentez parametrelerinin değiştirilmesiyle etkin bir şekilde sağlanabildiği belirlenmiştir. Bu nedenle, hidrotermal ve solvotermal yöntemler kullanılarak Fe_3O_4 nanopartiküllerinin sentezlenmesine yönelik çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Ön çalışmalar kapsamında; farklı demir tuzları ile çöktürme ajanlarının, sıcaklık ve süre açısından nanopartikül boyutuna etkileri incelenmiştir. Elde edilen ön çalışma verilerine göre; $FeCl_3.6H_2O$ ve $FeCl_2.4H_2O$ demir tuzları ile NH_4OH çöktürme ajanının kullanıldığı 200°C sıcaklık ve 12 saat süre koşullarında gerçekleştirilen solvotermal sentezlenmiş nanopartiküllerin boyut değeri, 153.4 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuç; ön sentez çalışmaları içinde en küçük boyut değerini vermiştir. Bu nedenle, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin solvotermal yöntem ile sentezlenmesinde bu ön çalışmaya ait parametrelerin kullanılmasına ve deneysel koşulların optimize edilmesine karar verilmiştir.

Solvotermal sentez yönteminde sıcaklığın boyuta olan etkisinin araştırılması amacıyla 160°C, 180°C ve 200°C sıcaklık ile 6,12 ve 18 saat süre koşulları

kullanılarak sentez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sentez çalışmaları sonucunda optimum koşullar olarak, 200°C sıcaklık ve 6 saat sentez süresi elde edilmiştir. Optimum koşullarda sentezlenen nanoyapılar XRD, STEM, FT-IR ve SEM analiz yöntemleri ile incelenmiştir. İnceleme sonuçlarına göre nanopartiküllerin ortalama 18 nm boyutunda ve küresel morfolojiye sahip olduğu belirlenmiştir.

Bu sonuç, tez çalışmasının ana hedefinde ve literatürde de belirtilen hücre alımının belirlenmesinde önemli rol oynayan 100 nm değerinin altındaki boyuta ulaşıldığını doğrulamıştır. 10-100 nm boyut aralığındaki nanoyapıların kanser hücreleri için optimum boyut olduğu literatürde yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu aralıkta bulunan nanoyapılar, vücuttaki retikülo endotelyal sistemden kaçabilirler ve küçük kılcal damarların içerisine girebildikleri için vücutta daha uzun dolaşım süresi gösterirler. Ayrıca 10-100 nm aralığında boyuta sahip olan nanoyapılar geçirgenlik ve tutma etkisi de (EPR) gösterirler. Böylece, hedeflenen bölgede nanoyapıların spesifik olarak birikmesi ile tümöre spesifik özellik sağlanır. Ayrıca nanoyapı boyutları 10 nm'den küçük olduğunda, hücre içi organel hasarına neden olarak toksik etki gösterirler. Nanoyapının boyutu 200 nm'den büyük olduğunda ise dalakta birikme ve yoğunlaşma etkisi gösterirler ve immün sistem aracılığıyla fagositik hücreler tarafından yakalanırlar.

Bu sebeplerden dolayı tez kapsamında, tümöre spesifik özellik kazandırılması amacıyla nanoyapılarda boyut hedeflemesi yapılmış ve çalışmalar sonucunda ortalama 18 nm boyutuna sahip olan Fe_3O_4NPler başarıyla sentezlenmiştir. Sentezlenen Fe_3O_4NPlerin EDX elementel analizi ile yapıdaki demir atomları ağırlıkça %50.12 olarak tespit edilmiştir. EDX spektrumunda karbon pikinin varlığı, sentezde kullanılan etilen glikol gibi organik kimyasallardan kaynaklanmaktadır.

XRD ve FT-IR analiz sonuçları; sentez çalışmaları için en uygun sıcaklığın 200°C olduğunu göstermiştir. 160°C, 180°C ve 200°C sıcaklıklarda sentezlenen Fe_3O_4NPlerin XRD spektrumları karşılaştırıldığında; artan sıcaklıkla birlikte (311) düzleminde bulunan pikin daha ince ve uzun olduğu görülmüştür. Bu özelliğin, nanopartikül boyutunun daha küçük ve kristallik oranının daha yüksek olmasından kaynaklandığı şeklinde değerlendirilmiştir.

Ticari Fe_3O_4 NPlerin XRD analiz sonucu, içeriğinde %17.1 oranında hidrazin hidrat bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca ticari ürünün SEM analiz sonuçları; tez

kapsamında sentezlenmiş Fe_3O_4NPlerden daha yoğun aglomerasyona sahip olduklarını ve farklı morfolojik yapılar içerdiğini ortaya koymuştur.

Fe_3O_4 nanopartiküllerinin solvotermal sentez yöntemi ile üretiminde üre, sodyum sitrat ve polivinilprolidon (PVP) ajanlarının boyuta etkileri, SEM analizi kullanılarak incelenmiştir. SEM analiz sonuçları; üre, sodyum sitrat ve polivinilprolidon ajanlarının nanoküme oluşumuna neden olduğunu göstermiştir. Nanoküme oluşumu, "Ostwald olgunlaşması" mekanizmasıyla açıklanmaktadır. Bu mekanizma temelde üç aşama içermektedir: 1. reaksiyon sisteminde bulunan demir tuzları ve etilen glikol varlığında sıcaklığın artmasıyla birlikte kristalleşme oluşması sonucunda demir tuz yapısında bulunan suyun ortaya çıkması, 2. çözeltide bulunan ürenin ayrışması ve 3. çözeltinin pH'ının alkali değere ulaşması.

Sıcaklığın ve sürenin artması, nanopartikülün boyutunu ve aglomerasyonu etkilemektedir. Gelecekte yapılacak çalışmalarda sıcaklık, süre ve farklı demir tuzu konsantrasyonu kullanılması ile nanoyapı boyutu ve şeklinin değiştirilebileceği öngörülmektedir. Deneysel çalışmalar kapsamında Fe_3O_4NPlerin solvotermal sentez yöntemi kullanılarak üretimi detaylı olarak incelenmiştir. Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen bilgilerin, boyut ve morfoloji kontrolünün sağlanması hususunda gelecekte yapılacak olan çalışmalara yol gösterici olacağı düşünülmektedir.

2. Fe_3O_4NPlerin Yüzey Modifikasyonu (PDA Kaplanması ve PEGilasyon), Antikanser İlacın Nanoyapıya Yükleme Sonuçların Değerlendirilmesi ve Öneriler

Fe_3O_4NPlerin morfoloji ve boyut kontrolünün sağlanmasının yanında ortaya çıkan diğer önemli bir konu Fe_3O_4NPlerin enkapsüle edilmesidir. Fe_3O_4NPler manyetik özellikte olmalarından dolayı yüzey enerjileri yüksektir ve hava ile oksitlenebilirler, bu nedenle topaklanma eğilimi gösterebilirler. Bunun dışında Fe_3O_4NPlerin fototermal terapide kullanılması amaçlandığı için hem biyouyumlu olan hem de NIR lazer etkileşimini arttırabilecek PDA polimeri ile kaplanması planlanmıştır. Sentezlenen nanoyapıların polimerler ile kaplanması, polimerin özelliğine göre değişmekle birlikte, genellikle vücut içerisinde kan dolaşımı ile antikanser konjugatlarının tümörde birikmesini sağlamaktadır [251]. Bugüne kadar yapılan çalışmalar; yenilikçi polimerlerden polipirol, poli-(3,4-etilendioksitiyofen):poli(4-stiren sülfonat), dopamin-melanin ve polianilin ile oluşturulan nanoyapıların

fototermal etkinlik gösterdiği ve ısınma verimliliğini arttırdığı bildirilmiştir [252], [26], [253], [244]. Bu nedenle Fe_3O_4NPlerin enkapsüle edilmesi için PDA kullanılması hedeflenmiştir. Fe_3O_4NPlerin enkapsüle edilmesinde kullanılacak olan PDA, PDA/Fe_3O_4 (kabuk/çekirdek) yapısında kabuk görevi görecektir. Dopamin yüzeyindeki karboksil grupları (COO-NH_2-), Fe_3O_4NPler ile iyon çiftleri oluşturabilir ve böylece kabuk/çekirdek şeklinde PDA kaplı Fe_3O_4NPler elde edilebilirler. Fe_3O_4NPlerin yüzeyinin kaplanmasında kullanılan dopamin hidroklorür polimerizasyon süreci; dopamin monomerinin konsantrasyonu, ortamın pH değeri, kullanılan tampon ve oksidasyon maddelerinin türü gibi parametrelerden etkilenir. Bu parametrelerden biri olan Tris-HCl tamponu (pH: 8.5), dopamin hidroklorün oksitlenmesi sonucu PDA polimerizasyonu oluşturur. Bu polimerizasyon, Tris-HCl tamponunun birincil amini ile dopamin-kinon ara ürünü arasındaki kovalent bağ sayesinde Tris-HCl tamponunun dopamin yapısına dahil edilmesine yol açar. Böylece çözeltide genellikle koyu kahverengi bir renk değişiminin oluşumu gözlenir. Çalışmalar kapsamında oluşturulan PDA kaplamasının varlığı; FE-SEM ve FT-IR analizleri ile doğrulanmıştır.

(1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip numuneye ait FE-SEM sonuçları; yapıların küresel morfolojide olduğunu göstermiştir. STEM analizine göre; Fe_3O_4NP'lerin ortalama boyutu 18 nm iken, PDA ile enkapsüle edilmesinden sonra oluşan PDA/Fe_3O_4NPlerin boyutunun ortalama 28 nm olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç; Fe_3O_4NPlerin üzerine ortalama 10 nm kalınlığında PDA polimeri kaplandığını göstermektedir.

(2:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip numuneye ait FE-SEM ve STEM analiz sonuçları; nanoyapıların küresel morfolojide ve ortalama boyutun 18 nm olduğunu göstermiştir. PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4NPlerin ortalama boyutunun 61 nm olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç; Fe_3O_4 nanoyapının yüzeyine yaklaşık 43 nm kalınlığında PDA polimeri kaplandığını göstermiştir.

(4:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip numuneye ait FE-SEM ve STEM analiz sonuçları nanoyapıların küresel morfolojide ve ortalama boyutun 18 nm olduğunu göstermiştir. PDA ile enkapsüle edilen Fe_3O_4NPlerin ortalama boyutunun 225 nm olduğu görülmüştür. Böylece Fe_3O_4NP'lerin üzerine 207 nm PDA kaplandığı düşünülmektedir. Ayrıca, yapıdaki PDA polimer miktarının artması nedeniyle aglomerasyonun arttığı tespit edilmiştir.

Fe_3O_4NPlerin enkapsülasyonu için farklı miktarlarda (100, 200 ve 400 mg) PDA polimeri kullanılmıştır. Oluşan kimyasal bağların tespit edilmesi amacıyla elde edilen nanoyapılar ile PDA polimerine FT-IR analizi yapılmıştır. PDA'nın kimyasal yapısı, FT-IR analizini içeren literatür çalışmaları göz önüne alınarak değerlendirilmiştir. Hem dopamin hidroklorür hem PDA için 1500 cm^{-1} değerine yakın bir pikin varlığı, her iki yapıda da ortak olan aromatik bölgeleri göstermektedir [204].

PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR spektrumunda, 1520 cm^{-1} dalga boyunda N-H esneme bandı görülmüştür. Elde edilen sonuçların, Xupeng Mu ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada elde ettikleri PDA/Fe_3O_4NPlerin FT-IR sonuçları ile benzer olması, Fe_3O_4 üzerinde PDA'nın varlığını doğrulamıştır [208]. PDA/Fe_3O_4NPlere ait spektrumda görülen 1259 cm^{-1} dalga boyundaki yeni pikin, C–O birimlerinin esneme titreşimini temsil ettiği ve bu pikin, Feng, Jinghua ve arkadaşlarının çalışma sonuçlarıyla benzerlik gösterdiği görülmüştür [209]. PDA'nın güçlü ve geniş absorpsiyon bantları, aromatik halkaların gerilme titreşimi ve fenol bileşiklerinin C-O gerilmesinden kaynaklanan 1700-1000 cm^{-1} aralığında bulunmuş olup, literatürdeki çalışmalarla [148], [211] benzerdir. Literatürde yapılmış olan PDA/Fe_3O_4NPlere ait FT-IR sonuçları [208], [209] ile tez çalışması kapsamında elde edilen sonuçların benzer olması, Fe_3O_4NPlerin yüzeyindeki PDA'nın varlığını kanıtlamıştır.

PEGilasyon işlemi sonrası oluşan PDA/Fe_3O_4NPlere ait literatür esaslı FT-IR analiz sonuçları; 1150 cm^{-1} ve 2890 cm^{-1} dalga boylarında oluşan piklerin sırasıyla C-O-C ve C-H gruplarının PEG'den gelen gerilme titreşimlerini temsil etmektedir [212]. SH-PEG'in FT-IR spekturumunda 1500 cm^{-1} ve 1000 cm^{-1} dalga boylarında görülen pikler, PDA enkapsüle NPlerin SH-PEG ile yüzey modifikasyonunu doğrulamaktadır [28]. Aynı şekilde PDA enkapsüle nanopartiküllerde bulunan NH pikinin SH-PEG ile modifikasyon sonrası kaybolması, yüzeye PEGilasyon uygulamasının yapıldığını göstermektedir. Tez çalışması kapsamında üretilmiş olan PEGilasyon uygulanmış PDA/Fe_3O_4NPlere ait FT-IR analiz sonuçları; yukarıda verilmiş olan litertür çalışmalarıyla benzer değerlerde (Şekil 5.8) elde edilmiştir.

PEGilasyon işlemi sonrası PDA/Fe_3O_4NPlere VNB ilacı konjuge edilmiş ve VNB yüklü PDA/Fe_3O_4NPler FT-IR analizi ile incelenmiştir (Şekil 5.9). VNB'nin FT-IR spektrumunda 3000-3500 cm^{-1}'de bulunan karaktersitik N-H piki, nanopartiküllere

VNB ilacının yüklendiğini belirgin şekilde göstermekte olup, literatür çalışması [32] ile de benzerdir. Bu sonuç, VNB ilacının nanoyapıya başarılı bir şekilde yüklendiğini göstermektedir (Şekil 5.12). Ayrıca ilaç yükleme verimliliği de hesaplanmış, tüm yapılara %99 verimlilikle ilaç yüklemesinin gerçekleştirildiği tespit edilmiştir (Tablo 5.2).

İlaç yüklü nanoyapılar oluşturulduktan sonra VSM (Titreşimli Numune Manyetometre) analizi ile nanoyapıların karşılaştırmalı olarak manyetik özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan Fe_3O_4NPlerin VSM analizinde; Ms: 67,72 emu/g, Hc: 63,37 Oe ve Mr: 4,39 emu/g olarak tespit edilmiştir (Tablo 5.3). Literatürde yapılan benzer çalışmalarda elde edilen değerlerle tutarlı olduğu görülmüştür [118], [215].

PDA/Fe_3O_4NP'ye ait VSM analizine göre; M_S: 65,62 emu/g, Hc: 95,13 Oe ve Mr: 6,68 emu/g değerleri tespit edilmştir. Elde edilen Ms değerinin, literatürde yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu olduğu ve literatürde bildirilen aralık içinde bulunduğu görülmüştür [211], [217].

VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin VSM analizine göre; Ms:60,40 emu/g , Hc: 60,56 Oe ve Mr:4,65 emu/g değerleri tespit edilmiştir. Ms: 60,40 emu/g değerinin yüzey modifikasyonundan dolayı azaldığı görülmüş olup, litertürde de [216] benzer sonucun bulunduğu belirlenmiştir.

Hazırlanan Fe_3O_4NPlere 1000°C'ye kadar uygulanan sıcaklıkta yapılan TGA analizi sonucunda, toplam kütle kaybının %8.17 oranında olduğu görülmüştür. Bu durum, nanoyapının yüzeyinde bulunan su molekülleri ya da safsızların giderilmiş olduğunu ifade etmiştir [218].

PDA/Fe_3O_4NPlerin termogram eğrisi incelendiğinde, 150°C'ye kadar olan eğrinin su moleküllerinden kaynaklandığı görülmüştür (Şekil 5.18). 678°C sıcaklıkta %61.27 oranında bir kütle azalması görülmüştür. Bu durum, PDA polimer zincirlerinin bozunması veya ayrışmasından kaynaklandığını ifade etmektedir [217], [218], [220]. VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin TGA analizinde 744°C sıcaklıkta; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinde toplam %55 oranında ve (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinde ise iki aşamalı bir kütle kaybı görülmüştür. Birinci aşamada 550°C'ye kadar olan sıcaklık aralığında %16.8 oranında kütle kaybı ve ikinci aşamada 550°C-1000°C sıcaklık aralığında %32.3 oranında kütle kaybı görülmüştür. Toplam kütle kaybı

%49.1 olarak hesaplanmıştır. (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinin termogram eğrisinde yine iki aşamalı kütle kaybı görülmüştür. 550°C sıcaklığa kadar %18.505 oranında ve 550°C-1000°C sıcaklık aralığında ise %37.34 oranında kütle kaybı oluşmuştur. Toplam kütle kaybı %55.84 olarak hesaplanmıştır.

TGA analizinden elde edilen kütle değişimlerinin oluştuğu sıcaklık değerleri, Diferansiyel Termal Gravimetri (DTG) analizi ile elde edilmiştir (Şekil 5.19). DTG analizi, TGA analizinden elde edilen kütle değişimlerinin oluştuğu sıcaklık değerlerinin bulunmasını sağlamaktadır. Oluşan ağırlık kaybının hızı, sıcaklığın ve sürenin fonksiyonu olarak elde edilmiştir. DTG analizinden elde edilen sonuçlar; Fe_3O_4NP numunelerinde bozunma oluşmadığını göstermektedir. Bu durum, yapının 1000°C sıcaklığa kadar kararlı olduğunu ve herhangi bir bozunmaya uğramadığını ortaya koymuştur [217], [220]. VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin artan polimer oranlarıyla birlikte pik şiddetinde artış görülmüştür. Bu sonuç, polimer oranı arttıkça bozunma reaksiyonun şiddetinin arttığını göstermektedir. İlaç yüklenmemiş PDA/Fe_3O_4NP yapılarında oluşan derin pik şiddeti, bu durumu desteklemektedir [220].

Sonuç olarak; PDA/Fe_3O_4NPler başarılı bir şekilde hazırlanmıştır. Oluşan yapı, SH-PEG ve VNB kullanılarak modifiye edilmiştir. İlaç yüklü nanoyapıların *in vitro* ilaç salım ve antikanser etkinlik davranışlarına ait incelemeler gerçekleştirilmiştir.

3. Fototermal Etkinlik, Stabilite ve İlaç Salım Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Öneriler

Fototermal etkinlik ve stabilitenin belirlenmesi amacıyla; 808 nm dalga boyunda ve 1 W/cm² gücünde NIR lazer ile nanoyapı-lazer etkileşimi incelenmiştir. Bu amaçla PBS, Fe_3O_4NP, (1:1), (2:1) ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranlarında VNB/PDA/Fe_3O_4NPlere 5 dakika boyunca NIR lazer uygulanması sonucunda nanoyapılarda oluşan sıcaklık, kızılötesi termal kamera yardımıyla tespit edilmiştir.

Fe_3O_4NPlerin fototermal etkinlik çalışmasına ait ısınma verimlilikleri incelendiğinde; 3 dakika boyunca NIR lazer etkileşimine maruz kalan nanoyapının 30.6°C sıcaklığa ulaştığı ve 5 dakika sonra sıcaklığın 37.6°C'ye yükseldiği tespit edilmiştir. PDA/Fe_3O_4NPlerin 3 dakika boyunca NIR lazer uygulamasından sonra ısınma sıcaklığı 45.5°C'ye, 5 dakika sonra 47.6°C'ye yükselmiştir (Şekil 6.2).

(1:1), (2:1) ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranlarına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerine 5 dakika NIR lazer uygulanmasının ardından nanoyapıların sıcaklıklarının 45.3°C ile 45.9°C arasında değiştiği görülmüştür. İlaç yüklü nanoyapıların tümü 3 dakikada 40°C'lik bir ısınma sıcaklığına ulaşmış ve sıcaklığın maksimum 46°C'ye yükseldiği görülmüştür. Bu bulgular, sentezlenen nanoyapıların, fototermal terapi uygulamasında kullanımı için umut verici potansiyele sahip olduklarını göstermiştir.

Fototermal stabilite analizi için, fototermal etkinliği en yüksek çıkan ilaç yüklü nanoyapı ve PDA/Fe_3O_4NPler karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, 808 nm dalga boyunda ve 1 W/cm² gücünde NIR lazeri ile 5 dakika süreyle uygulama yapılmış ve bir sonraki lazer uygulamasından önce oda sıcaklığına kadar numune soğutulmuştur. Bahsedilen işlem 4 kez tekrar edilerek ısınma verimliliğindeki değişiklikler analiz edilmiştir. PDA/Fe_3O_4NP ve VNB/PDA/Fe_3O_4NP yapılarına ait fototermal stabilite çalışmalarının sonuçlarına göre; dört döngü boyunca NIR lazer uygulanmasının ardından nanoyapıların fototermal stabilitesi tutarlı kalmış ve yalnızca ihmal edilebilir bir azalma gözlemlenmiştir.

Nanoyapıların fototermal etkinlikleri incelendikten sonra, pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında 50 saat boyunca ilaç salım davranışları incelenmiştir. Salım ortamında kullanılan pH 5.5 değeri tümör mikro çevresini, pH 7.4 değeri ise sağlıklı doku ortamlarının simüle edilmesi amacıyla kullanılmıştır. Tümör dokusu ile diğer fizyolojik dokular arasında önemli bir pH farkı oluşmaktadır. Bu pH farkından dolayı ilaç salım çalışmaları iki farklı pH koşulunda gerçekleştirilmiştir. (1:1), (2:1) ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerinde polimer oranının ilaç salımına olan etkileri pH 5.5 ve pH 7.4 koşullarında incelenmiştir. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5'te 24.cü saatte ilaç salım sonuçları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %84, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %68 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %63 olarak hesaplanmıştır. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4 NPlerin pH:5.5'te 50.ci saatte ilaç salım sonuçları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %99, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %81 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %75 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar, VNB ilacının PDA polimerinden salım miktarının pH değerine bağlı olduğunu, en hızlı salımın pH:5.5'te ve en yavaş salımın pH:7.4'te gerçekleştiğini göstermiştir. Bu sonuçlara göre, asidik ortama sahip olan kanser dokusunda VNB ilacının

etkinliğinin daha yüksek olacağı öngörülmektedir. Benzer bir çalışmada Aliabadi ve ark., Fe_3O_4NPleri biyouyumlu olan PDA polimeri kullanarak kapladıktan sonra antikanser ilaç yüklenmek amacıyla sentezlemişlerdir. Bu durumun, PDA'nın amin gruplarının protonlanması sonucunda polimer zincirlerinde daha büyük itme gücü oluşturmasından kaynaklandığını ve asidik koşullar altında ilaç salımının arttığını bildirmişlerdir. PDA'nın yapısında bulunan katekol ve amin gruplarının düşük pH koşullarında amin grubunun protonlanması yüksek ilaç salımına sebep olmaktadır [226], [227]. Bu çalışmalarda, tez kapsamında elde edilen ilaç salım sonuçlarına benzer şekilde düşük pH değerinde daha yüksek ilaç salımı elde edildiği görülmüştür.

Fototermal etkinliğin ilaç salımına olan etkisinin incelenmesi amacıyla lazer-ilaç salım ilişkisine ait çalışmalar yapılmıştır. Farklı polimer oranlarına sahip olan VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:5.5'te 120.dakikada kümülatif ilaç salım miktarları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %99, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %65 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için % 61 olarak hesaplanmıştır. VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin pH:7.4'te 120.dakikada kümülatif ilaç salım miktarları; (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %66, (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %64 ve (4:1) PDA/Fe_3O_4 oranı için %53 olarak hesaplanmıştır. 120.dakikada en yüksek ilaç salımı %99 salım miktarı ile (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP yapısında elde edilmiştir. Bu sonuç; NIR lazer uygulamasının ilaç salım hızını oldukça arttırdığını göstermiştir. İlaç salım hızının artmasının nedeni; artan sıcaklık etkisiyle birlikte Fe_3O_4NPlerin toplam ısınma miktarına bağlı olarak yüzeyinde bulunan PDA polimerinin bozunması sonucunda nanoyapıdan ilacın daha kolay ayrılmasından kaynaklanmaktadır. Sonuç olarak; ilaç salımında lazer kullanılması, nanoyapıda yüklü olan ilacın salımını arttırmakta ve belirli süreler içerisinde yüksek salım oranı oluşturmaktadır.

İlaç salım çalışmaları tamamlandıktan sonra salım profilleri matematiksel modeller kullanılarak tespit edilmiştir. Bu amaçla; Sıfırıncı Derece, Birinci derece, Hixson Crowell ve Hiquchi kinetik modellerinin uygunluğu analiz edilmiştir. İlaç salım kinetik modelleri, matematiksel fonksiyonlar kullanılarak ilaçların çözünüm profillerinin tanımlanmasını ve değerlendirilmesini sağlamaktadır [228], [229]. İlaç kinetik model çalışması sonucunda, en yüksek korelasyon katsayısı (R^2) değerinin, Birinci Derece kinetik modelin kullanıldığı (1:1) ve (2:1) PDA/Fe_3O_4

oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerinde elde edildiği (R^2:0,9808 ve 0,9518) tespit edilmiştir. Sentezlenen nanoyapının Birinci Dereceden ilaç salım kinetik modeline uygun olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç, kinetik modele uyan ilaç yüklü nanoyapı için ilacın çözünme davranışının doğrudan ilacın konsantrasyonuyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Benzer şekilde Hixson Crowell modeline uyan (1:1) ve (2:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerinde de korelasyon katsayısı değerleri (R^2) sırasıyla 0,9665 ile 0,9032 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, kinetik modele uyan nanoyapıdan ilacın çözünmesinin yüzeyde gerçekleştiğini ifade etmektedir.

4. Biyouyumluluk, Antikanser Etkinlik, Fototermal Duyarlı Antikanser Çalışma Sonuçlarının Değerlendirilmesi ve Öneriler

Biyouyumluluk çalışması L929 hücre hattı ve XTT yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. L929 hücre ortamına Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin 1, 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 µg/ml konsantrasyonları eklendikten sonra 24 saat boyunca bekletilmiş ve sonrasında XTT analizi yapılmıştır. Numunelerin sitotoksik etki göstermediği tespit edilmiştir (6.37). Literatürde Fe_3O_4NPler ile yapılan hücre kültürü çalışmaları incelendiğinde, 100 µg/ml oranı gibi yüksek konsantrasyonun hücreler üzerinde sitotoksik etki oluşturmadığı görülmüştür. Ankawar ve ark. yapmış olduğu bir çalışmada, Fe_3O_4NPleri Glia (D54MG, G9T/VGH, SF126, U87, U251 ve U373) ve meme hücre hatlarında (MB157, SKBR3 ve T47D) 72 saat boyunca MTS analizi (5- (3-karboksimetoksifenil) -2- (4,5-dimetil-tiyazol) -3- (4-sülfofenil) ile incelemişlerdir [243].Yapılan MTS hücre canlılığı analiz sonuçlarına göre; 10 µg/ml konsantrasyonda Fe_3O_4NPlerin uygulandığı hücre hatlarında herhangi bir sitotoksik etki oluşmadığı bildirilmiştir. 100 µg/ml konsantrasyonunda Fe_3O_4NPlerin uygulandığı hücre hatlarında ise ortalama olarak hücre canlılığının %10-%25 oranında azaldığını rapor etmişlerdir [243]. Çalışmaların verileri genel olarak değerlendirildiğinde; Fe_3O_4NP yapıların tek başına hücre canlılığında sitotoksik etki göstermediği, biyouyumlu yapılar olduğu ve literatürle [88], [243], [254], [255], [256] uyumlu olduğu ortaya konulmuştur. Aynı zamanda PDA kaplı olan Fe_3O_4NPlerin sitotoksisite göstermemesi, nanoyapıda kullanılan PDA ve SH-PEG polimerlerinin biyouyumlu yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu tez çalışması

kapsamında sentezlenen nanoyapıların biyouyumluluğunun yüksek olması, gelecek *in vivo* çalışmaları için oldukça önemli bir umut vadetmektedir.

MCF-7 hücre hattında incelenen Fe_3O_4NP, PDA/Fe_3O_4NP, VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerinin 60 µg/ml konsantrasyonuna kadar antikanser etkinlik göstermediği, 100 µg/ml konsantrasyonda VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinin %83 oranında hücre canlılığı gösterdiği belirlenmiştir. Kanser hücre hattında lazer-nanoyapı etkileşiminin tespit edilmesi amacıyla Fe_3O_4NP, VNB ve VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunelerine NIR lazer uygulamasıyla hücre ortamında fototermal etkinlik incelemeleri yapılmıştır. VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin lazer uygulanan ve uygulanmayan hücre gruplarına etkisi karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Sonuçlar; lazer uygulanan grupta hücre canlılığının %41 oranına düştüğünü ve yüksek oranda antikanser etkinlik sağlandığını göstermiştir. Bu durum, ilaç yüklü nanoyapının kemoterapik ve fototermal uygulama sonucunda güçlü bir etki gösterdiğini kanıtlamıştır. Çünkü tek başına uygulanan Fe_3O_4NPler ve VNB ilacı hücreler üzerinde etki oluşturmazken, VNB/PDA/Fe_3O_4NPlerin antikanser etkinlik göstermesinin sebebi, tasarlanan yapının sinerjik etki oluşturmasından kaynaklanmaktadır.

7.1 Gelecek Çalışmalar ve Öneriler

Tez çalışması kapsamında 18 nm boyutunda sentezlenen Fe_3O_4NPler PDA ile kaplandıktan sonra PEGilasyon işlemi uygulanmış ve VNB ilacı yüzeyine konjuge edilmiştir. Sentezlenen nanoyapılar SEM, STEM, FE-SEM, EDX, FT-IR, XRD, TGA, DTA, Zeta Sizer, VSM, UV-vis analiz yöntemleri ile incelenmiştir. Karakterize edilen nanoyapıların ilaç salım özellikleri, kinetik model uyumları, fototermal etkinlikleri, biyouyumlulukları ve antikanser etkinlikleri incelenmiştir.

İlaç salım çalışmaları sonucunda, (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinin, Birinci dereceden ve Hixson Crowell kinetik modeline uyumlu olduğu belirlenmiş olup, pH:5.5'te (tümör mikro çevresinde) yüksek ilaç salımı sergilediği görülmüştür. Ayrıca fototermal duyarlı ilaç salımı ve hücre kültür ortamındaki çalışmaların sonuçları, yüksek antikanser etkinlik gösterdiğini doğrulamıştır.

Tez çalışması kapsamında yapılmış olan çalışmalar ile kanser tedavisine alternatif olabilecek yenilikçi ve çok fonksiyonlu nanoyapı geliştirilmesi sağlanmıştır. Bu

nedenle gelecek çalışmalarda, MCF-7 hücre ortamında fototermal duyarlı antikanser etkinlik gösteren (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP numunesinin uygulandığı hücre çalışmalarında; hücresel ölüm mekanizmaları daha detaylı incelenebilecektir. Böylece oluşan hücre ölümünde, apoptoz veya nekroz gibi hangi yolakların aktif edildiği tespit edilerek hücre ölüm mekanizması aydınlatılabilecektir. Ayrıca farklı hücre hatları kullanılarak MDA-MB-157, T47D, SK-BR-3, A549 gibi hücre hatları üzerinde antikanser etkinlikleri değerlendirilebilecektir.

In vivo fare tümör modellerine (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP nanoyapıları uygulanarak tümörlerin fototermal etkinliği incelenebilecektir.

Tez çalışmasından elde edilen sonuçlar; optimize edilmiş (1:1) PDA/Fe_3O_4 oranına sahip VNB/PDA/Fe_3O_4NP nanoyapısının *in vivo* model üzerinde çalışılarak elde edilecek verilerin değerlendirilmesi sonrasında sağlık sektöründe uygulanma potansiyelinin bulunduğunu göstermektedir. Böylece ülkemizin biyomalzemeler ürün skalasına katma değeri yüksek yeni bir ürün eklenme potansiyeli ortaya çıkabilecektir.

KAYNAKÇA

[1] M. Ferrari, "Cancer nanotechnology: opportunities and challenges," *Nat. Rev. Cancer 2005 53*, vol. 5, no. 3, pp. 161–171, Mar. 2005, doi: 10.1038/nrc1566.

[2] M. Arruebo *et al.*, "Assessment of the Evolution of Cancer Treatment Therapies," *Cancers 2011, Vol. 3, Pages 3279-3330*, vol. 3, no. 3, pp. 3279–3330, Aug. 2011, doi: 10.3390/CANCERS3033279.

[3] Z. Cheng, M. Li, R. Dey, and Y. Chen, "Nanomaterials for cancer therapy: current progress and perspectives," *J. Hematol. Oncol. 2021 141*, vol. 14, no. 1, pp. 1–27, May 2021, doi: 10.1186/S13045-021-01096-0.

[4] M. N. Hafeez, C. Celia, and V. Petrikaite, "Challenges towards Targeted Drug Delivery in Cancer Nanomedicines," *Process. 2021, Vol. 9, Page 1527*, vol. 9, no. 9, p. 1527, Aug. 2021, doi: 10.3390/PR9091527.

[5] M. A. Raheem *et al.*, "Advances in nanoparticles-based approaches in cancer theranostics," *OpenNano*, vol. 12, p. 100152, Jul. 2023, doi: 10.1016/J.ONANO.2023.100152.

[6] E. Pérez-Herrero and A. Fernández-Medarde, "Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 93. Elsevier B.V., pp. 52–79, Jun. 01, 2015. doi: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.

[7] S. Campbell and N. Smeets, "Drug Delivery: Polymers in the Development of Controlled Release Systems," pp. 1–29, 2019, doi: 10.1007/978-3-319-92067-2_20-1.

[8] C. Y. Zhao, R. Cheng, Z. Yang, and Z. M. Tian, "Nanotechnology for cancer therapy based on chemotherapy," *Molecules*, vol. 23, no. 4. MDPI AG, p. 826, Apr. 04, 2018. doi: 10.3390/molecules23040826.

[9] S. A. Kulkarni, P. S. Sawadh, P. K. Palei, and K. K. Kokate, "Effect of synthesis route on the structural, optical and magnetic properties of Fe3O4 nanoparticles," *Ceram. Int.*, vol. 40, no. 1, pp. 1945–1949, Jan. 2014, doi: 10.1016/J.CERAMINT.2013.07.103.

[10] A. V. Samrot, C. S. Sahithya, J. Selvarani A, S. K. Purayil, and P. Ponnaiah, "A review on synthesis, characterization and potential biological applications of superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *Curr. Res. Green Sustain. Chem.*, vol. 4, p. 100042, Jan. 2021, doi: 10.1016/J.CRGSC.2020.100042.

[11] X. Wang *et al.*, "The application of Fe3O4 nanoparticles in cancer research: a new strategy to inhibit drug resistance," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 80, no. 4, pp. 852–860, Mar. 2007, doi: 10.1002/JBM.A.30901.

[12] S. Hasany, N. Abdurahman, A. Sunarti, and R. Jose, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Chemical Synthesis and Applications Review," *Curr.*

Nanosci., vol. 9, no. 5, pp. 561–575, Aug. 2013, doi: 10.2174/15734137113099990085.

[13] J. Sahadevan *et al.*, "Magnetic property of Fe2O3 and Fe3O4 nanoparticle prepared by solvothermal process," *Mater. Today Proc.*, vol. 58, pp. 895–897, Jan. 2022, doi: 10.1016/J.MATPR.2021.11.420.

[14] R. Mrowczynski, "Polydopamine-Based Multifunctional (Nano)materials for Cancer Therapy," *ACS Applied Materials and Interfaces*, vol. 10, no. 9. American Chemical Society, pp. 7541–7561, Mar. 07, 2018. doi: 10.1021/acsami.7b08392.

[15] Y. Liu, K. Ai, and L. Lu, "Polydopamine and its derivative materials: Synthesis and promising applications in energy, environmental, and biomedical fields," *Chem. Rev.*, vol. 114, no. 9, pp. 5057–5115, May 2014, doi: 10.1021/CR400407A/ASSET/IMAGES/LARGE/CR-2013-00407A_0043.JPEG.

[16] K. Shimizu and S. Takeoka, "Photothermal switch of drug release from polydopamine-modified nanosheets," *MRS Commun.*, pp. 1–7, Apr. 2023, doi: 10.1557/S43579-023-00357-Y/FIGURES/4.

[17] J. J. Hu, Y. J. Cheng, and X. Z. Zhang, "Recent advances in nanomaterials for enhanced photothermal therapy of tumors," *Nanoscale*, vol. 10, no. 48. Royal Society of Chemistry, pp. 22657–22672, Dec. 28, 2018. doi: 10.1039/c8nr07627h.

[18] D. de Melo-Diogo, C. Pais-Silva, D. R. Dias, A. F. Moreira, and I. J. Correia, "Strategies to Improve Cancer Photothermal Therapy Mediated by Nanomaterials," *Advanced Healthcare Materials*, vol. 6, no. 10. Wiley-VCH Verlag, May 24, 2017. doi: 10.1002/adhm.201700073.

[19] E. Asadian, M. Jannesari, and M. A. Shahbazi, "Application of infrared waves in cancer therapy," *Electromagn. Waves-Based Cancer Diagnosis Ther. Princ. Appl. Nanomater.*, pp. 151–237, Jan. 2023, doi: 10.1016/B978-0-323-99628-0.00006-X.

[20] J. Chen *et al.*, "Nanomaterials as photothermal therapeutic agents," *Progress in Materials Science*, vol. 99. Elsevier Ltd, pp. 1–26, Jan. 01, 2019. doi: 10.1016/j.pmatsci.2018.07.005.

[21] S. M. Honmane, M. S. Charde, S. S. Salunkhe, P. B. Choudhari, and S. N. Nangare, "Polydopamine surface-modified nanocarriers for improved anticancer activity: Current progress and future prospects," *OpenNano*, vol. 7, p. 100059, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.onano.2022.100059.

[22] M. Poorhossein, F. Pishbin, A. Ataie, and M. Akrami, "Designing a multifunctional nanoplatform based on PEGylated cobalt ferrite magnetic nanoparticles containing capecitabine for cancer theranostics," *Ceram. Int.*, vol. 49, no. 2, pp. 2705–2714, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.09.251.

[23] Y. Fang *et al.*, "Cleavable PEGylation: a strategy for overcoming the 'PEG dilemma' in efficient drug delivery," *Drug Delivery*, vol. 24. Taylor and Francis Ltd, pp. 22–32, Nov. 01, 2017. doi: 10.1080/10717544.2017.1388451.

[24] G. Pasut and F. M. Veronese, “State of the art in PEGylation: The great versatility achieved after forty years of research,” *J. Control. Release*, vol. 161, no. 2, pp. 461–472, 2012, doi: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.10.037.

[25] X. Wang *et al.*, “Multi-responsive photothermal-chemotherapy with drug-loaded melanin-like nanoparticles for synergetic tumor ablation.,” *Biomaterials*, vol. 81, pp. 114–124, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.037.

[26] Y. Liu, K. Ai, J. Liu, M. Deng, Y. He, and L. Lu, “Dopamine-Melanin Colloidal Nanospheres: An Efficient Near-Infrared Photothermal Therapeutic Agent for In Vivo Cancer Therapy,” *Adv. Mater.*, vol. 25, no. 9, pp. 1353–1359, Mar. 2013, doi: 10.1002/adma.201204683.

[27] M. Wu, D. Zhang, Y. Zeng, L. Wu, X. Liu, and J. Liu, “Nanocluster of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (dopamine) for magnetic field-targeting, highly sensitive MRI and photothermal cancer therapy,” *Nanotechnology*, vol. 26, no. 11, p. 115102, 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/11/115102.

[28] M. Wu *et al.*, “Magnetite nanocluster@poly(dopamine)-PEG@ indocyanine green nanobead with magnetic field-targeting enhanced MR imaging and photothermal therapy in vivo,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 141, pp. 467–475, May 2016.

[29] “Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy - PubMed.” Accessed: Nov. 28, 2021. [Online]. Available: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7803948/

[30] A. Cryer, P. Ruenraroengsak, T. Tetley, and A. Thorley, “Encapsulation of vinorelbine in polymeric nanoparticles improves efficacy in cancer cells and reduces inflammation in non-cancer cells,” in *European Respiratory Journal*, European Respiratory Society (ERS), Sep. 2016, p. OA1527. doi: 10.1183/13993003.congress-2016.oa1527.

[31] C. L. Li *et al.*, “Encapsulation of vinorelbine into cholesterol-polyethylene glycol coated vesicles: Drug loading and pharmacokinetic studies,” *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 63, no. 3, pp. 376–384, Mar. 2011, doi: 10.1111/j.2042-7158.2010.01227.x.

[32] X. Zhao *et al.*, “Reductive lipid nanoparticles loaded with vinorelbine inhibit chemotherapy-induced invasion of cancer cells by modulating ENPP2,” *Nano Res.*, 2023, doi: 10.1007/s12274-023-6030-2.

[33] Y. Li *et al.*, “A Novel Active Targeting Preparation, Vinorelbine Tartrate (VLBT) Encapsulated by Folate-Conjugated Bovine Serum Albumin (BSA) Nanoparticles: Preparation, Characterization and in Vitro Release Study.,” *Materials*, vol. 5, no. 11. pp. 2403–2422, Nov. 2012. doi: 10.3390/ma5112403.

[34] X. Wang, C. Wang, L. Cheng, S.-T. Lee, and Z. Liu, “Noble Metal Coated Single-Walled Carbon Nanotubes for Applications in Surface Enhanced Raman Scattering Imaging and Photothermal Therapy,” *J. Am.*, vol. 134, no. 17, pp. 7414–7422, May 2012, doi: 10.1021/ja300140c.

[35] F. Zhou, D. Xing, Z. Ou, B. Wu, D. E. Resasco, and W. R. Chen, "Cancer photothermal therapy in the near-infrared region by using single-walled carbon nanotubes," *Biyomedikal Derg.*, vol. 14, no. 2, p. 021009, 2009, doi: 10.1117/1.3078803.

[36] B. Jang *et al.*, "Gold nanorods for target selective SPECT/CT imaging and photothermal therapy in vivo.," *Quant. Imaging Med. Surg.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–11, 2012, doi: 10.3978/.issn.2223-4292.2012.01.03.

[37] A. Nel, "Toxic Potential of Materials at the Nanolevel," *Science (80-.).*, vol. 311, no. 5761, pp. 622–627, Feb. 2006, doi: 10.1126/science.1114397.

[38] Y. Li *et al.*, "Targeted polydopamine nanoparticles enable photoacoustic imaging guided chemo-photothermal synergistic therapy of tumor," *Acta Biomater.*, vol. 47, pp. 124–134, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.10.010.

[39] M. Farokhi, F. Mottaghitalab, M. R. Saeb, and S. Thomas, "Functionalized theranostic nanocarriers with bio-inspired polydopamine for tumor imaging and chemo-photothermal therapy," *J. Control. Release*, vol. 309, pp. 203–219, 2019, doi: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2019.07.036.

[40] Z. Zhu and M. Su, "Polydopamine Nanoparticles for Combined Chemo- and Photothermal Cancer Therapy," *Nanomaterials*, vol. 7, no. 7. 2017. doi: 10.3390/nano7070160.

[41] P. Xue *et al.*, "PEGylated polydopamine-coated magnetic nanoparticles for combined targeted chemotherapy and photothermal ablation of tumour cells," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 160, pp. 11–21, Dec. 2017, doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.09.012.

[42] K. C. L. Black, J. Yi, J. G. Rivera, D. C. Zelasko-Leon, and P. B. Messersmith, "Polydopamine-enabled surface functionalization of gold nanorods for cancer cell-targeted imaging and photothermal therapy," *Nanomedicine*, vol. 8, no. 1, pp. 17–28, Dec. 2013, doi: 10.2217/nnm.12.82.

[43] S. Hong *et al.*, "Attenuation of the in vivo toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification," *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 793–801, Jul. 2011, doi: 10.2217/nnm.11.76.

[44] Y. Li *et al.*, "Polydopamine-coated gold nanostars for near-infrared cancer photothermal therapy by multiple pathways," *J. Mater. Sci.*, vol. 54, no. 18, pp. 12036–12048, Sep. 2019, doi: 10.1007/s10853-019-03774-4.

[45] R. Ge *et al.*, "Fe3O4@polydopamine composite theranostic superparticles employing preassembled Fe3O4 nanoparticles as the core," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 35, pp. 22942–22952, Sep. 2016, Accessed: Apr. 21, 2021. [Online]. Available: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.6b07997

[46] M. R. Valerio *et al.*, "Oral vinorelbine and capecitabine as first-line therapy in metastatic breast cancer: a retrospective analysis," *Futur. Sci. OA*, vol. 7, no. 10, p. FSO750, 2021.

[47] R. Malekzadeh *et al.*, "Nanoarchitecture-based photothermal ablation of cancer: A systematic review," *Environ. Res.*, vol. 236, p. 116526, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.envres.2023.116526.

[48] T. Vangijzegem *et al.*, "Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 1. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15010236.

[49] J. Estelrich, M. A. Busquets, and M. Antònia Busquets, "Iron oxide nanoparticles in photothermal therapy," *Molecules*, vol. 23, no. 7, p. 1567, 2018, doi: 10.3390/molecules23071567.

[50] K. Ahmed, Y. Tabuchi, and T. Kondo, "Hyperthermia: an effective strategy to induce apoptosis in cancer cells," *Apoptosis*, vol. 20, pp. 1411–1419, 2015.

[51] D. Klein, "The tumor vascular endothelium as decision maker in cancer therapy," *Front. Oncol.*, vol. 8, p. 367, 2018.

[52] N. Fernandes, C. F. Rodrigues, A. F. Moreira, and I. J. Correia, "Overview of the application of inorganic nanomaterials in cancer photothermal therapy," *Biomater. Sci.*, vol. 8, no. 11, pp. 2990–3020, 2020.

[53] H. S. Jung, P. Verwilst, A. Sharma, J. Shin, J. L. Sessler, and J. S. Kim, "Organic molecule-based photothermal agents: an expanding photothermal therapy universe," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 47, no. 7, pp. 2280–2297, 2018.

[54] Z. Wang *et al.*, "Photothermal-based nanomaterials and photothermal-sensing: An overview," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 220, p. 114883, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.bios.2022.114883.

[55] E. A. Hussein, M. M. Zagho, G. K. Nasrallah, and A. A. Elzatahry, "Recent advances in functional nanostructures as cancer photothermal therapy," *Int. J. Nanomedicine*, pp. 2897–2906, 2018.

[56] H. Sun, Q. Zhang, J. Li, S. Peng, X. Wang, and R. Cai, "Near-infrared photoactivated nanomedicines for photothermal synergistic cancer therapy," *Nano Today*, vol. 37, p. 101073, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.nantod.2020.101073.

[57] A. Pusta, M. Tertis, I. Crăciunescu, R. Turcu, S. Mirel, and C. Cristea, "Recent Advances in the Development of Drug Delivery Applications of Magnetic Nanomaterials," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 7. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15071872.

[58] H. Sung *et al.*, "Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries," *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 71, no. 3, pp. 209–249, 2021.

[59] P. Parhi, C. Mohanty, and S. K. Sahoo, "Nanotechnology-based combinational drug delivery: an emerging approach for cancer therapy," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 17–18, pp. 1044–1052, Sep. 2012, doi: 10.1016/J.DRUDIS.2012.05.010.

[60] M. Magro, A. Venerando, A. Macone, G. Canettieri, E. Agostinelli, and F. Vianello, "Nanotechnology-Based Strategies to Develop New Anticancer Therapies.," *Biomolecules*, vol. 10, no. 5, May 2020, doi: 10.3390/biom10050735.

[61] T. T. Dongsar, T. S. Dongsar, M. A. S. Abourehab, N. Gupta, and P. Kesharwani, "Emerging application of magnetic nanoparticles for breast

cancer therapy," *Eur. Polym. J.*, vol. 187, p. 111898, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.111898.

[62] X. Q. Zhang, X. Xu, N. Bertrand, E. Pridgen, A. Swami, and O. C. Farokhzad, "Interactions of nanomaterials and biological systems: Implications to personalized nanomedicine," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, no. 13. pp. 1363–1384, Oct. 2012. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.005.

[63] F. M. Kievit and M. Zhang, "Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy," *ACS Yayınları*, vol. 1, no. 10, pp. 853–862, Oct. 2011, doi: 10.1021/ar2000277.

[64] J. B. Vines, D. J. Lim, and H. Park, "Contemporary polymer-based nanoparticle systems for photothermal therapy," *Polymers*, vol. 10, no. 12. MDPI AG, p. 1357, Dec. 07, 2018. doi: 10.3390/polym10121357.

[65] S. Unser, I. Bruzas, J. He, and L. Sagle, "Localized surface plasmon resonance biosensing: Current challenges and approaches," *Sensors (Switzerland)*, vol. 15, no. 7. MDPI AG, pp. 15684–15716, Jul. 02, 2015. doi: 10.3390/s150715684.

[66] D. Jaque *et al.*, "Nanoparticles for photothermal therapies," *Nanoscale*, vol. 6, no. 16, pp. 9494–9530, Jul. 2014, doi: 10.1039/C4NR00708E.

[67] M. Kim, J. H. Lee, and J. M. Nam, "Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications," *Advanced Science*, vol. 6, no. 17. John Wiley and Sons Inc., Sep. 01, 2019. doi: 10.1002/advs.201900471.

[68] A. C. V. Doughty, A. R. Hoover, E. Layton, C. K. Murray, E. W. Howard, and W. R. Chen, "Nanomaterial applications in photothermal therapy for cancer," *Materials*, vol. 12, no. 5. MDPI AG, Mar. 01, 2019. doi: 10.3390/ma12050779.

[69] H. Gong *et al.*, "Near-Infrared Absorbing Polymeric Nanoparticles as a Versatile Drug Carrier for Cancer Combination Therapy," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 23, no. 48, pp. 6059–6067, Dec. 2013, doi: 10.1002/adfm.201301555.

[70] X. Yang *et al.*, "Near-Infrared Light-Triggered, Targeted Drug Delivery to Cancer Cells by Aptamer Gated Nanovehicles," *Adv. Mater*, vol. 24, no. 21, pp. 2890–2895, Jun. 2012, doi: 10.1002/adma.201104797.

[71] B. Tian, C. Wang, S. Zhang, L. Feng, and Z. Liu, "Photothermally enhanced photodynamic therapy delivered by nano-graphene oxide," *ACS Nano*, vol. 5, no. 9, pp. 7000–7009, Sep. 2011, doi: 10.1021/nn201560b.

[72] Y. Xia *et al.*, "Gold nanocages: From synthesis to theranostic applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 44, no. 10, pp. 914–924, Oct. 2011, doi: 10.1021/ar200061q.

[73] W. Fang, S. Tang, P. Liu, X. Fang, J. Gong, and N. Zheng, "Pd Nanosheet-Covered Hollow Mesoporous Silica Nanoparticles as a Platform for the Chemo-Photothermal Treatment of Cancer Cells," *Small*, vol. 8, no. 24, pp. 3816–3822, Dec. 2012, doi: 10.1002/smll.201200962.

[74] J. B. Vines, J.-H. Yoon, N.-E. Ryu, D.-J. Lim, and H. Park, "Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy," *Front. Chem.*, vol. 7, p. 167,

2019.

[75] R. M. Cabral and P. V Baptista, “The chemistry and biology of gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: promises and challenges,” *Nano Life*, vol. 3, no. 03, p. 1330001, 2013.

[76] K. Qi, B. Sun, S. Liu, and M. Zhang, “Research progress on carbon materials in tumor photothermal therapy,” *Biomed. Pharmacother.*, vol. 165, p. 115070, 2023.

[77] A. Nel, T. Xia, L. Mädler, and N. Li, “Toxic potential of materials at the nanolevel,” *Science*, vol. 311, no. 5761. American Association for the Advancement of Science, pp. 622–627, Feb. 03, 2006. doi: 10.1126/science.1114397.

[78] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve, and M. Mahmoudi, “Toxicity of nanomaterials,” *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 6, pp. 2323–2343, Feb. 2012, doi: 10.1039/c1cs15188f.

[79] A. J. Welch and M. J. C. Van Gemert, “Overview of optical and thermal laser-tissue interaction and nomenclature,” in *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*, Springer Netherlands, 2011, pp. 3–11. doi: 10.1007/978-90-481-8831-4_1.

[80] Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, and J. Dobson, “Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 36, no. 13. IOP Publishing, p. R167, Jul. 07, 2003. doi: 10.1088/0022-3727/36/13/201.

[81] K. Woo *et al.*, “Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles,” *Chem. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 2814–2818, Jul. 2004, doi: 10.1021/cm049552x.

[82] A. Figuerola, R. Di Corato, L. Manna, and T. Pellegrino, “From iron oxide nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications,” *Pharmacological Research*, vol. 62, no. 2. Academic Press, pp. 126–143, Aug. 01, 2010. doi: 10.1016/j.phrs.2009.12.012.

[83] M. A. Dheyab, A. A. Aziz, M. S. Jameel, P. M. Khaniabadi, B. Mehrdel, and B. M. Khaniabadi, “Gold-coated iron oxide nanoparticles as a potential photothermal therapy agent to enhance eradication of breast cancer cells,” in *Journal of Physics: Conference Series*, IOP Publishing, 2020, p. 12003.

[84] T. Zhang *et al.*, “Glucose oxidase and polydopamine functionalized iron oxide nanoparticles: combination of the photothermal effect and reactive oxygen species generation for dual-modality selective cancer therapy,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 13, pp. 2190–2200, Mar. 2019, doi: 10.1039/C8TB03320J.

[85] K. M. Krishnan, “Biomedical nanomagnetics: A spin through possibilities in imaging, diagnostics, and therapy,” *IEEE Trans. Magn.*, vol. 46, no. 7, pp. 2523–2558, Jul. 2010, doi: 10.1109/TMAG.2010.2046907.

[86] H. Al-Madhagi, V. Yazbik, W. Abdelwahed, and L. Alchab, “Magnetite Nanoparticle Co-precipitation Synthesis, Characterization, and Applications: Mini Review,” *Bionanoscience*, vol. 13, no. 2, pp. 853–859,

2023, doi: 10.1007/s12668-023-01113-1.

[87] A. Setia, A. K. Mehata, Vikas, A. K. Malik, M. K. Viswanadh, and M. S. Muthu, “Theranostic magnetic nanoparticles: Synthesis, properties, toxicity, and emerging trends for biomedical applications,” *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 81, p. 104295, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.104295.

[88] L. S. Ganapathe, M. A. Mohamed, R. M. Yunus, D. D. Berhanuddin, R. Mohamad Yunus, and D. D. Berhanuddin, “Magnetite (Fe3O4) nanoparticles in biomedical application: From synthesis to surface functionalisation,” *Magnetochemistry*, vol. 6, no. 4, p. 68, Dec. 2020, doi: 10.3390/magnetochemistry6040068.

[89] J. Shan *et al.*, “Recent progress in Fe3O4 based magnetic nanoparticles: from synthesis to application,” *Mater. Sci. Technol.*, vol. 32, no. 6, pp. 602–614, 2016.

[90] W. Wu, Z. Wu, T. Yu, C. Jiang, and W. S. Kim, “Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications,” *Science and Technology of Advanced Materials*, vol. 16, no. 2. Institute of Physics Publishing, Apr. 01, 2015. doi: 10.1088/1468-6996/16/2/023501.

[91] N. D. Kandpal, N. Sah, R. Loshali, R. Joshi, and J. Prasad, “Co-precipitation method of synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles,” 2014.

[92] W. M. Daoush, “Co-precipitation and magnetic properties of magnetite nanoparticles for potential biomedical applications,” *J. Nanomed. Res*, vol. 5, no. 3, p. 118, 2017.

[93] S. Lin, K. Lin, D. Lu, and Z. Liu, “Preparation of uniform magnetic iron oxide nanoparticles by co-precipitation in a helical module microchannel reactor,” *J. Environ. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 1, pp. 303–309, 2017.

[94] K. Petcharoen and A. Sirivat, “Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method,” *Mater. Sci. Eng. B*, vol. 177, no. 5, pp. 421–427, 2012.

[95] Y. P. Yew *et al.*, “Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe3O4 nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review,” *Arab. J. Chem.*, vol. 13, no. 1, pp. 2287–2308, 2020.

[96] M. Yusefi *et al.*, “Green Synthesis of Fe(3)O(4) Nanoparticles Stabilized by a Garcinia mangostana Fruit Peel Extract for Hyperthermia and Anticancer Activities.,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 16, pp. 2515–2532, 2021, doi: 10.2147/IJN.S284134.

[97] M. Herlekar, S. Barve, and R. Kumar, “Plant-mediated green synthesis of iron nanoparticles,” *J. Nanoparticles*, vol. 2014, 2014.

[98] P. Kuppusamy, M. M. Yusoff, G. P. Maniam, and N. Govindan, “Biosynthesis of metallic nanoparticles using plant derivatives and their new avenues in pharmacological applications–An updated report,” *Saudi Pharm. J.*, vol. 24, no. 4, pp. 473–484, 2016.

[99] V. V Makarov *et al.*, “‘Green’ nanotechnologies: synthesis of metal

nanoparticles using plants," *Acta Naturae (англоязычная версия)*, vol. 6, no. 1 (20), pp. 35–44, 2014.

[100] B. A. Eldeeb, W. M. A. El-Raheem, and S. Elbeltagi, "Green synthesis of biocompatible Fe3O4 magnetic nanoparticles using Citrus Sinensis peels extract for their biological activities and magnetic-hyperthermia applications," *Sci. Rep.*, vol. 13, no. 1, p. 19000, 2023, doi: 10.1038/s41598-023-46287-6.

[101] X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, and Y. Li, "A general strategy for nanocrystal synthesis," *Nature*, vol. 437, no. 7055, pp. 121–124, Sep. 2005, doi: 10.1038/nature03968.

[102] K. Nejati and R. Zabihi, "Preparation and magnetic properties of nano size nickel ferrite particles using hydrothermal method," *Chem. Cent. J.*, vol. 6, pp. 1–6, 2012.

[103] V. Cabuil, V. Dupuis, D. Talbot, and S. Neveu, "Ionic magnetic fluid based on cobalt ferrite nanoparticles: Influence of hydrothermal treatment on the nanoparticle size," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 10, no. 323, pp. 1238–1241, May 2011, doi: 10.1016/J.JMMM.2010.11.013.

[104] A. V. Rane, K. Kanny, V. K. Abitha, and S. Thomas, "Methods for Synthesis of Nanoparticles and Fabrication of Nanocomposites," in *Synthesis of Inorganic Nanomaterials*, Elsevier, 2018, pp. 121–139. doi: 10.1016/b978-0-08-101975-7.00005-1.

[105] S. Majidi, F. Z. Sehrig, S. M. Farkhani, M. S. Goloujeh, and A. Akbarzadeh, "Current methods for synthesis of magnetic nanoparticles.," *Artif. cells, nanomedicine, Biotechnol.*, vol. 44, no. 2, pp. 722–734, 2016, doi: 10.3109/21691401.2014.982802.

[106] J. N. Solanki and Z. V. P. Murthy, "Controlled size silver nanoparticles synthesis with water-in-oil microemulsion method: a topical review," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 50, no. 22, pp. 12311–12323, 2011.

[107] T. Koutzarova, S. Kolev, C. Ghelev, D. Paneva, and I. Nedkov, "Microstructural study and size control of iron oxide nanoparticles produced by microemulsion technique," *Phys. status solidi c*, vol. 3, no. 5, pp. 1302–1307, 2006.

[108] X. Liang, X. Jia, L. Cao, J. Sun, and Y. Yang, "Microemulsion synthesis and characterization of nano-Fe3O4 particles and Fe3O4 nanocrystalline," *J. Dispers. Sci. Technol.*, vol. 31, no. 8, pp. 1043–1049, 2010.

[109] T. Lu, J. Wang, J. Yin, A. Wang, X. Wang, and T. Zhang, "Surfactant effects on the microstructures of Fe3O4 nanoparticles synthesized by microemulsion method," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 436, pp. 675–683, 2013.

[110] D. Chaudhari and G. Panda, "A brief overview on iron oxide nanoparticle synthesis, characterization, and applications," *Mater. Today Proc.*, 2023.

[111] J. Xu *et al.*, "Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles by sol–gel method," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 309, no. 2, pp. 307–311, 2007.

[112] M. Srivastava, S. Chaubey, and A. K. Ojha, "Investigation on size dependent

structural and magnetic behavior of nickel ferrite nanoparticles prepared by sol–gel and hydrothermal methods," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 118, no. 1, pp. 174–180, 2009.

[113] O. M. Lemine *et al.*, "Sol–gel synthesis of 8 nm magnetite (Fe3O4) nanoparticles and their magnetic properties," *Superlattices Microstruct.*, vol. 52, no. 4, pp. 793–799, 2012.

[114] N. Jović Orsini, B. Babić-Stojić, V. Spasojević, M. P. Calatayud, N. Cvjetićanin, and G. F. Goya, "Magnetic and power absorption measurements on iron oxide nanoparticles synthesized by thermal decomposition of Fe(acac)3," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 449, pp. 286–296, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.10.053.

[115] R. Hufschmid *et al.*, "Synthesis of phase-pure and monodisperse iron oxide nanoparticles by thermal decomposition," *Nanoscale*, vol. 7, no. 25, pp. 11142–11154, 2015.

[116] I. Roy, "Therapeutic applications of magnetic nanoparticles: recent advances," *Mater. Adv.*, vol. 3, no. 20, pp. 7425–7444, 2022.

[117] T. K. O. Vuong *et al.*, "Synthesis of high-magnetization and monodisperse Fe3O4 nanoparticles via thermal decomposition," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 163, pp. 537–544, 2015.

[118] S. Li, T. Zhang, R. Tang, H. Qiu, C. Wang, and Z. Zhou, "Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 379, pp. 226–231, Apr. 2015, doi: 10.1016/J.JMMM.2014.12.054.

[119] X. Lin, G. Ji, Y. Liu, Q. Huang, Z. Yang, and Y. Du, "Formation mechanism and magnetic properties of hollow Fe3O 4 nanospheres synthesized without any surfactant," *CrystEngComm*, vol. 14, no. 24, pp. 8658–8663, Dec. 2012, doi: 10.1039/c2ce26296g.

[120] Y. Tian, B. Yu, X. Li, and K. Li, "Facile solvothermal synthesis of monodisperse Fe3O4 nanocrystals with precise size control of one nanometre as potential MRI contrast agents," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 8, pp. 2476–2481, Feb. 2011, doi: 10.1039/c0jm02913k.

[121] R. Batul, T. Tamanna, A. Khaliq, and A. Yu, "Recent progress in the biomedical applications of polydopamine nanostructures," *Biomater. Sci.*, vol. 5, no. 7, pp. 1204–1229, 2017.

[122] N. Abounahia, H. Qiblawey, and S. J. Zaidi, "Progress for Co-Incorporation of Polydopamine and Nanoparticles for Improving Membranes Performance.," *Membranes (Basel).*, vol. 12, no. 7, Jun. 2022, doi: 10.3390/membranes12070675.

[123] G. Siciliano *et al.*, "Polydopamine-Coated Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: From Design to Applications.," *Nanomater. (Basel, Switzerland)*, vol. 12, no. 7, Mar. 2022, doi: 10.3390/nano12071145.

[124] A. Postma, Y. Yan, Y. Wang, A. N. Zelikin, E. Tjipto, and F. Caruso, "Self-polymerization of dopamine as a versatile and robust technique to prepare polymer capsules," *Chem. Mater.*, vol. 21, no. 14, pp. 3042–3044, Jul. 2009, doi: 10.1021/CM901293E.

[125] V. Ball, “Polydopamine Nanomaterials: Recent Advances in Synthesis Methods and Applications,” *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 6, no. AUG, p. 109, Aug. 2018, doi: 10.3389/fbioe.2018.00109.

[126] N. Liao *et al.*, “Poly (dopamine) coated superparamagnetic iron oxide nanocluster for noninvasive labeling, tracking, and targeted delivery of adipose tissue-derived stem cells,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, pp. 1–13, Jan. 2016, doi: 10.1038/srep18746.

[127] M. Chu *et al.*, “Near-infrared laser light mediated cancer therapy by photothermal effect of Fe3O4 magnetic nanoparticles,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 16, pp. 4078–4088, May 2013, doi: 10.1016/J.BIOMATERIALS.2013.01.086.

[128] S. Bagheri and N. M. Julkapli, “Modified iron oxide nanomaterials: functionalization and application,” *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 416, pp. 117–133, 2016.

[129] Z. Dong *et al.*, *Polydopamine Nanoparticles as a Versatile Molecular Loading Platform to Enable Imaging-guided Cancer Combination Therapy*, vol. 6, no. 7. Ivyspring International Publisher, 2016, p. 1031. doi: 10.7150/THNO.14431.

[130] M. Shi *et al.*, “Polydopamine-coated magnetic mesoporous silica nanoparticles for multimodal cancer theranostics,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 7, no. 3, pp. 368–372, 2019.

[131] A. Jędrzak *et al.*, “Magnetite nanoparticles and spheres for chemo-and photothermal therapy of hepatocellular carcinoma in vitro,” *Int. J. Nanomedicine*, pp. 7923–7936, 2020.

[132] L. Sen Lin *et al.*, “Multifunctional Fe3O4@polydopamine core-shell nanocomposites for intracellular mRNA detection and imaging-guided photothermal therapy,” *ACS Nano*, vol. 8, no. 4, pp. 3876–3883, Apr. 2014, doi: 10.1021/nn500722y.

[133] Z. Jin *et al.*, “Preparation of doxorubicin-loaded porous iron oxide@ polydopamine nanocomposites for MR imaging and synergistic photothermal–chemotherapy of cancer,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 208, p. 112107, 2021.

[134] J. Liu *et al.*, “Fabrication of multifunctional ferric oxide nanoparticles for tumor-targeted magnetic resonance imaging and precise photothermal therapy with magnetic field enhancement,” *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 43, pp. 8554–8562, Nov. 2017, doi: 10.1039/c7tb01959a.

[135] A. Jin, Y. Wang, K. Lin, and L. Jiang, “Nanoparticles modified by polydopamine: Working as ‘drug’ carriers,” *Bioactive Materials*, vol. 5, no. 3. KeAi Communications Co., pp. 522–541, Sep. 01, 2020. doi: 10.1016/j.bioactmat.2020.04.003.

[136] H. Li, D. Yin, W. Li, Q. Tang, L. Zou, and Q. Peng, “Polydopamine-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and therapy,” *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 199, p. 111502, Mar. 2021, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2020.111502.

[137] J. Wang, J. Yao, N. Sun, and C. Deng, “Facile synthesis of thiol-polyethylene

glycol functionalized magnetic titania nanomaterials for highly efficient enrichment of N-linked glycopeptides," *J. Chromatogr. A*, vol. 1512, pp. 1–8, 2017, doi: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.020.

[138] M. J. Roberts, M. D. Bentley, and J. M. Harris, "Chemistry for peptide and protein PEGylation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 54, no. 4, pp. 459–476, 2002, doi: https://doi.org/10.1016/S0169-409X(02)00022-4.

[139] V. P. Torchilin, "Multifunctional nanocarriers," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 14, pp. 1532–1555, 2006, doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.009.

[140] A. S. Karakoti, S. Das, S. Thevuthasan, and S. Seal, "PEGylated inorganic nanoparticles," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 50, no. 9, pp. 1980–1994, 2011.

[141] E. Harrison *et al.*, "A comparison of gold nanoparticle surface co-functionalization approaches using Polyethylene Glycol (PEG) and the effect on stability, non-specific protein adsorption and internalization," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 62, pp. 710–718, 2016.

[142] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review," *J. Control. Release*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.

[143] S. Raj *et al.*, "Specific targeting cancer cells with nanoparticles and drug delivery in cancer therapy," *Semin. Cancer Biol.*, vol. 69, pp. 166–177, 2021, doi: https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.11.002.

[144] A. M. Jhaveri and V. P. Torchilin, "Multifunctional polymeric micelles for delivery of drugs and siRNA," *Front. Pharmacol.*, vol. 5 APR, p. 88656, Apr. 2014, doi: 10.3389/FPHAR.2014.00077/BIBTEX.

[145] F. Danhier, O. Feron, and V. Préat, "To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 148, no. 2, pp. 135–146, 2010, doi: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.027.

[146] V. Torchilin, "Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 3, pp. 131–135, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.addr.2010.03.011.

[147] W. Xue *et al.*, "Effects of core size and PEG coating layer of iron oxide nanoparticles on the distribution and metabolism in mice," *Int. J. Nanomedicine*, pp. 5719–5731, 2018.

[148] L. Sun, Q. Li, L. Zhang, Z. Xu, Y. Kang, and P. Xue, "PEGylated Polydopamine Nanoparticles Incorporated with Indocyanine Green and Doxorubicin for Magnetically Guided Multimodal Cancer Therapy Triggered by Near-Infrared Light," *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 1, no. 1, pp. 325–336, Jan. 2018, doi: 10.1021/acsanm.7b00176.

[149] R. Zhang *et al.*, "Smart micelle@polydopamine core-shell nanoparticles for highly effective chemo-photothermal combination therapy," *Nanoscale*, vol. 7, no. 46, pp. 19722–19731, Dec. 2015, doi: 10.1039/c5nr04828a.

[150] J. Wang *et al.*, "MR/SPECT Imaging Guided Photothermal Therapy of Tumor-Targeting Fe@Fe3O4 Nanoparticles in Vivo with Low Mononuclear

Phagocyte Uptake," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 31, pp. 19872–19882, Aug. 2016, doi: 10.1021/acsami.6b04639.

[151] L. Falzone, S. Salomone, and M. Libra, "Evolution of Cancer Pharmacological Treatments at the Turn of the Third Millennium.," *Front. Pharmacol.*, vol. 9, p. 1300, 2018, doi: 10.3389/fphar.2018.01300.

[152] J. Valentová, L. Lintnerová, N. Miklášová, B. Oboňová, and L. Habala, "Analogues of Anticancer Natural Products: Chiral Aspects.," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 6, Mar. 2023, doi: 10.3390/ijms24065679.

[153] Z. Cheng, X. Lu, and B. Feng, "A review of research progress of antitumor drugs based on tubulin targets," *Transl. Cancer Res.*, vol. 9, no. 6, p. 4020, 2020.

[154] D. R. Budman, "Vinorelbine (Navelbiner): A third-generation Vinca alkaloid," *Cancer Invest.*, vol. 15, no. 5, pp. 475–490, 1997.

[155] Z. M. Taher *et al.*, "Anticancer molecules from Catharanthus roseus," *Indones. J. Pharm.*, vol. 30, no. 3, p. 147, 2019.

[156] P. Dhyani *et al.*, "Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine," *Cancer Cell Int.*, vol. 22, no. 1, p. 206, 2022, doi: 10.1186/s12935-022-02624-9.

[157] E. González-Burgos and M. P. Gómez-Serranillos, "Vinca Alkaloids as Chemotherapeutic Agents Against Breast Cancer," *Discov. Dev. Anti-Breast Cancer Agents from Nat. Prod.*, pp. 69–101, Jan. 2021, doi: 10.1016/B978-0-12-821277-6.00004-0.

[158] E. Martino *et al.*, "Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, vol. 28, no. 17, pp. 2816–2826, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.06.044.

[159] F. Pellegrini and D. R. Budman, "Tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development," *Cancer Invest.*, vol. 23, no. 3, pp. 264–273, 2005.

[160] M. A. Altinoz, A. Ozpinar, E. E. Alturfan, and I. Elmaci, "Vinorelbine's anti-tumor actions may depend on the mitotic apoptosis, autophagy and inflammation: hypotheses with implications for chemo-immunotherapy of advanced cancers and pediatric gliomas," *J. Chemother.*, vol. 30, no. 4, pp. 203–212, 2018.

[161] V. Bartsch, "[Oral vinorelbine: pharmacology and treatment outcome in non-small cell bronchial carcinoma and breast carcinoma]," *Onkologie*, vol. 29 Suppl 1, no. SUPPL. 1, pp. 1–28, 2006, doi: 10.1159/000091889.

[162] M. E. Gindy and R. K. Prud'homme, "Multifunctional nanoparticles for imaging, delivery and targeting in cancer therapy," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 6, no. 8, pp. 865–878, Aug. 2009, doi: 10.1517/17425240902932908.

[163] G. Chen, I. Roy, C. Yang, and P. N. Prasad, "Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy," *Chem. Rev.*, vol. 116, no. 5, pp. 2826–2885, Mar. 2016, doi: 10.1021/ACS.CHEMREV.5B00148.

[164] J. Y. Choi, R. K. Thapa, C. S. Yong, and J. O. Kim, "Nanoparticle-based combination drug delivery systems for synergistic cancer treatment," *J. Pharm. Investig. 2016 464*, vol. 46, no. 4, pp. 325–339, May 2016, doi: 10.1007/S40005-016-0252-1.

[165] P. Xue, K. K. Y. Cheong, Y. Wu, and Y. Kang, "An in-vitro study of enzyme-responsive Prussian blue nanoparticles for combined tumor chemotherapy and photothermal therapy," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 125, pp. 277–283, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.COLSURFB.2014.10.059.

[166] Z. Zhu and M. Su, "Polydopamine Nanoparticles for Combined Chemo- and Photothermal Cancer Therapy," *Nanomater. 2017, Vol. 7, Page 160*, vol. 7, no. 7, p. 160, Jun. 2017, doi: 10.3390/NANO7070160.

[167] S. Mahmood, U. K. Mandal, B. Chatterjee, and M. Taher, "Advanced characterizations of nanoparticles for drug delivery: investigating their properties through the techniques used in their evaluations," *Nanotechnol. Rev.*, vol. 6, no. 4, pp. 355–372, 2017.

[168] P. Echlin, C. E. Fiori, J. Goldstein, D. C. Joy, and D. E. Newbury, *Advanced scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. Springer Science & Business Media, 2013.

[169] D. Titus, E. J. J. Samuel, and S. M. Roopan, "Nanoparticle characterization techniques," in *Green synthesis, characterization and applications of nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 303–319.

[170] A. Ponce, S. Mejía-Rosales, and M. José-Yacamán, "Scanning transmission electron microscopy methods for the analysis of nanoparticles," *Nanoparticles Biol. Med. Methods Protoc.*, pp. 453–471, 2012.

[171] J. Liu, "Scanning transmission electron microscopy and its application to the study of nanoparticles and nanoparticle systems," *Microscopy*, vol. 54, no. 3, pp. 251–278, 2005.

[172] S. Nallusamy and A. M. Babu, "X-ray Differaction and FESEM analysis for mixture of hybrid nanoparticles in heat transfer applications," *J. Nano Res.*, vol. 37, pp. 58–67, 2016.

[173] M. Ma, Y. Zhang, W. Yu, H. Shen, H. Zhang, and N. Gu, "Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 212, no. 2–3, pp. 219–226, 2003.

[174] Y. Zheng, Y. Cheng, F. Bao, and Y. Wang, "Synthesis and magnetic properties of Fe3O4 nanoparticles," *Mater. Res. Bull.*, vol. 41, no. 3, pp. 525–529, 2006.

[175] M. Gumustas, C. T. Sengel-Turk, A. Gumustas, S. A. Ozkan, and B. Uslu, "Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems," *Multifunct. Syst. Comb. Deliv. Biosensing Diagnostics*, pp. 67–108, Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-323-52725-5.00005-8.

[176] T. N. Lan, T. H. Hai, T. T. Kieu, and N. Q. Hien, "MAGNETIC NANOPARTICLES: COMPUTER SIMULATIONS, CHEMICAL SYNTHESES, AND BIOMEDICAL DIAGNOSISES," *Nanotechnol. Res. J.*, vol. 5, no. 3/4, p. 297, 2012.

[177] R. Tantra, P. Schulze, and P. Quincey, “Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential measurement results and reproducibility,” *Particuology*, vol. 8, no. 3, pp. 279–285, 2010.

[178] J. D. Clogston and A. K. Patri, “Zeta potential measurement,” *Charact. nanoparticles Intend. drug Deliv.*, pp. 63–70, 2011.

[179] R. K. Wardani, K. Dahlan, S. T. Wahyudi, and S. G. Sukaryo, “Synthesis and characterization of nanoparticle magnetite for biomedical application,” in *AIP Conference Proceedings*, AIP Publishing, 2019.

[180] G. Gnanaprakash, S. Mahadevan, T. Jayakumar, P. Kalyanasundaram, J. Philip, and B. Raj, “Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles,” *Mater. Chem. Phys.*, vol. 103, no. 1, pp. 168–175, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2007.02.011.

[181] F. N. Sayed and V. Polshettiwar, “Facile and Sustainable Synthesis of Shaped Iron Oxide Nanoparticles: Effect of Iron Precursor Salts on the Shapes of Iron Oxides,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. 1, p. 9733, 2015, doi: 10.1038/srep09733.

[182] H. Iida, K. Takayanagi, T. Nakanishi, and T. Osaka, “Synthesis of Fe3O4 nanoparticles with various sizes and magnetic properties by controlled hydrolysis,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 314, no. 1, pp. 274–280, 2007, doi: https://doi.org/10.1016/j.jcis.2007.05.047.

[183] G. Perez *et al.*, “Alkali concentration effects on the composition, morphology and magnetic properties of magnetite, maghemite and iron oxyhydroxide nanoparticles,” *Solid State Sci.*, vol. 106, p. 106295, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2020.106295.

[184] J.-P. Jolivet, E. Tronc, and C. Chanéac, “Iron oxides: From molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility,” *Comptes Rendus Geosci.*, vol. 338, no. 6–7, pp. 488–497, 2006.

[185] L. Vayssieres, C. Chanéac, E. Tronc, and J. P. Jolivet, “Size tailoring of magnetite particles formed by aqueous precipitation: an example of thermodynamic stability of nanometric oxide particles,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 205, no. 2, pp. 205–212, 1998.

[186] J. Baumgartner *et al.*, “Nucleation and growth of magnetite from solution,” *Nat. Mater.*, vol. 12, no. 4, pp. 310–314, 2013, doi: 10.1038/nmat3558.

[187] S. P. Schwaminger, C. Syhr, and S. Berensmeier, “Controlled synthesis of magnetic iron oxide nanoparticles: magnetite or maghemite?,” *Crystals*, vol. 10, no. 3, p. 214, 2020.

[188] H. Xiang *et al.*, “Characterization and synthesis of Fe3O4@C nanoparticles by in-situ solid-phase method,” *Mater. Res. Express*, vol. 8, no. 2, p. 25016, Feb. 2021, doi: 10.1088/2053-1591/abe21f.

[189] H. S. Chae, S. H. Piao, and H. J. Choi, “Fabrication of spherical Fe3O4 particles with a solvothermal method and their magnetorheological characteristics,” *J. Ind. Eng. Chem.*, vol. 29, pp. 129–133, 2015, doi: https://doi.org/10.1016/j.jiec.2015.02.027.

[190] S. Sun and H. Zeng, “Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles,”

J. Am. Chem. Soc., vol. 124, no. 28, pp. 8204–8205, Jul. 2002, doi: 10.1021/JA026501X/ASSET/IMAGES/MEDIUM/JA026501XN00001.GIF.

[191] C. Cheng, F. Xu, and H. Gu, "Facile synthesis and morphology evolution of magnetic iron oxide nanoparticles in different polyol processes," *New J. Chem.*, vol. 35, no. 5, pp. 1072–1079, May 2011, doi: 10.1039/C0NJ00986E.

[192] Z. Zhang, Z. Wang, S. He, C. Wang, M. Jin, and Y. Yin, "Redox reaction induced Ostwald ripening for size- and shape-focusing of palladium nanocrystals," *Chem. Sci.*, vol. 6, no. 9, pp. 5197–5203, Aug. 2015, doi: 10.1039/C5SC01787D.

[193] T. Gong, D. Yang, J. Hu, W. Yang, C. Wang, and J. Q. Lu, "Preparation of monodispersed hybrid nanospheres with high magnetite content from uniform Fe3O4 clusters," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 339, no. 1–3, pp. 232–239, 2009.

[194] S.-W. Cao and Y.-J. Zhu, "Surfactant-Free Preparation and Drug Release Property of Magnetic Hollow Core/Shell Hierarchical Nanostructures," *J. Phys. Chem. C*, vol. 112, no. 32, pp. 12149–12156, Aug. 2008, doi: 10.1021/jp803131u.

[195] L. Chen *et al.*, "Effects of citric acid and urea on the structural and morphological characteristics of BiVO4 synthesized by the sol–gel combustion method," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 76, no. 3, pp. 562–571, 2015, doi: 10.1007/s10971-015-3806-1.

[196] J. Kim *et al.*, "Scalable Solvothermal Synthesis of Superparamagnetic Fe3O4 Nanoclusters for Bioseparation and Theragnostic Probes," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 49, pp. 41935–41946, Dec. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b14156.

[197] S. Mishra *et al.*, "Facile Hydrothermal Synthesis of Hollow Fe3O4 Nanospheres: Effect of Hydrolyzing Agents and Electrolytes on Electrocapacitive Performance of Advanced Electrodes," *Int. J. Metall. Met. Phys.*, vol. 2, no. 1, pp. 1–15, Sep. 2017, doi: 10.35840/2631-5076/9207.

[198] F. Wang *et al.*, "Template-free construction of hollow mesoporous Fe3O4 nanospheres as controlled drug delivery with enhanced drug loading capacity," *J. Mol. Liq.*, vol. 347, p. 118000, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.118000.

[199] R. Lamouri and K. H. Kim, "Polyvinylpyrrolidone-assisted Solvothermal Synthesis of Fe_3O_4 Nanoclusters," *J. Magn.*, vol. 28, no. 3, pp. 234–238, 2023.

[200] Y. Yuan *et al.*, "Effects of polyvinylpyrrolidone content on structure and microwave absorption properties of cobalt ferrite," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 506, p. 166791, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2020.166791.

[201] D. Mishra, R. Arora, S. Lahiri, S. S. Amritphale, and N. Chandra, "Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method," *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces*, vol. 50, no. 5, pp. 628–631, 2014, doi: 10.1134/S2070205114050128.

[202] G. Amo-Duodu, E. Kweinor Tetteh, S. Rathilal, and M. N. Chollom, "Synthesis and characterization of magnetic nanoparticles: Biocatalytic effects on wastewater treatment," *Mater. Today Proc.*, vol. 62, pp. S79–S84, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.matpr.2022.02.091.

[203] P. L. Hariani, M. Faizal, and D. Setiabudidaya, "Synthesis and properties of Fe3O4 nanoparticles by co-precipitation method to removal procion dye," *Int. J. Environ. Sci. Dev.*, vol. 4, no. 3, p. 336, 2013.

[204] D. Mallinson, A. B. Mullen, and D. A. Lamprou, "Probing polydopamine adhesion to protein and polymer films: microscopic and spectroscopic evaluation.," *J. Mater. Sci.*, vol. 53, no. 5, pp. 3198–3209, 2018, doi: 10.1007/s10853-017-1806-y.

[205] N. Mehwish, M. Xu, M. Zaeem, and B. H. Lee, "Mussel-Inspired Surface Functionalization of Porous Albumin Cryogels Supporting Synergistic Antibacterial/Antioxidant Activity and Bone-Like Apatite Formation," *Gels*, vol. 8, no. 10. 2022. doi: 10.3390/gels8100679.

[206] A. Thakur, S. Ranote, D. Kumar, K. K. Bhardwaj, R. Gupta, and G. S. Chauhan, "Synthesis of a PEGylated Dopamine Ester with Enhanced Antibacterial and Antifungal Activity," *ACS Omega*, vol. 3, no. 7, pp. 7925–7933, Jul. 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b01099.

[207] M. Müller and B. Kessler, "Deposition from dopamine solutions at Ge substrates: an in situ ATR-FTIR study.," *Langmuir*, vol. 27, no. 20, pp. 12499–12505, Oct. 2011, doi: 10.1021/la202908b.

[208] X. Mu *et al.*, "EGFR-targeted delivery of DOX-loaded Fe3O4@ polydopamine multifunctional nanocomposites for MRI and antitumor chemo-photothermal therapy," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 12, p. 2899, Apr. 2017, doi: 10.2147/IJN.S131418.

[209] J. Feng *et al.*, "Designed Core–Shell Fe3O4@Polydopamine for Effectively Removing Uranium(VI) from Aqueous Solution," *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 106, no. 1, pp. 165–174, Jan. 2021, doi: 10.1007/S00128-020-02883-0/FIGURES/6.

[210] X. Cao *et al.*, "Calcium ion assisted fluorescence determination of microRNA-167 using carbon dots–labeled probe DNA and polydopamine-coated Fe3O4 nanoparticles," *Microchim. Acta*, vol. 187, no. 4, p. 212, 2020, doi: 10.1007/s00604-020-4209-8.

[211] R. Zheng *et al.*, "Polydopamine-Coated Magnetic Composite Particles with an Enhanced Photothermal Effect," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 7, no. 29, pp. 15876–15884, Jul. 2015, Accessed: Nov. 29, 2021. [Online]. Available: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acsami.5b03201

[212] M. Anbarasu, M. Anandan, E. Chinnasamy, V. Gopinath, and K. Balamurugan, "Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe3O4 nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications," *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.*, vol. 135, pp. 536–539, Jan. 2015, doi: 10.1016/J.SAA.2014.07.059.

[213] W. Yu, R. Liu, Y. Zhou, and H. Gao, "Size-Tunable Strategies for a Tumor Targeted Drug Delivery System.," *ACS Cent. Sci.*, vol. 6, no. 2, pp. 100–116,

Feb. 2020, doi: 10.1021/acscentsci.9b01139.

[214] M. Dahiya, R. Awasthi, K. Dua, and H. Dureja, "Sorafenib tosylate loaded superparamagnetic nanoparticles: Development, optimization and cytotoxicity analysis on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 79, p. 104044, 2023, doi: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104044.

[215] R. N. Panda, N. S. Gajbhiye, and G. Balaji, "Magnetic properties of interacting single domain Fe3O4 particles," *J. Alloys Compd.*, vol. 326, no. 1, pp. 50–53, 2001, doi: https://doi.org/10.1016/S0925-8388(01)01225-7.

[216] A. K. Singh, O. N. Srivastava, and K. Singh, "Shape and Size-Dependent Magnetic Properties of Fe3O4 Nanoparticles Synthesized Using Piperidine," *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 12, no. 1, p. 298, 2017, doi: 10.1186/s11671-017-2039-3.

[217] Q. Wang, Y. Qin, F. Jia, S. Song, and Y. Li, "Recyclable Fe3O4@Polydopamine (PDA) nanofluids for highly efficient solar evaporation," *Green Energy Environ.*, vol. 7, no. 1, pp. 35–42, 2022, doi: https://doi.org/10.1016/j.gee.2020.07.020.

[218] B. Davodi, M. Jahangiri, and M. Ghorbani, "Magnetic Fe3O4@ polydopamine biopolymer: Synthesis, characterization and fabrication of promising nanocomposite," *J. Vinyl Addit. Technol.*, vol. 25, no. 1, pp. 41–47, 2019.

[219] J. Si and H. Yang, "Preparation and characterization of bio-compatible Fe3O4@Polydopamine spheres with core/shell nanostructure," *Mater. Chem. Phys.*, vol. 128, no. 3, pp. 519–524, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2011.03.039.

[220] M. Oroujeni, B. Kaboudin, W. Xia, P. Jönsson, and D. A. Ossipov, "Conjugation of cyclodextrin to magnetic Fe3O4 nanoparticles via polydopamine coating for drug delivery," *Prog. Org. Coatings*, vol. 114, pp. 154–161, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.porgcoat.2017.10.007.

[221] H. Hashemi-Moghaddam, S. Zavareh, E. M. Gazi, and M. Jamili, "Assessment of novel core–shell Fe3O4@poly l‐ DOPA nanoparticles for targeted Taxol® delivery to breast tumor in a mouse model," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 93, pp. 1036–1043, 2018, doi: https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.005.

[222] F. Zafar *et al.*, "Enhancement of GAD Storage Stability with Immobilization on PDA-Coated Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles," *Catalysts*, vol. 9, no. 11. 2019. doi: 10.3390/catal9110969.

[223] M. Wu, D. Zhang, Y. Zeng, L. Wu, X. Liu, and J. Liu, "Nanocluster of superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with poly (dopamine) for magnetic field-targeting, highly sensitive MRI and photothermal cancer therapy," *Nanotechnology*, vol. 26, no. 11, p. 115102, Mar. 2015, doi: 10.1088/0957-4484/26/11/115102.

[224] K. Liu *et al.*, "New anti-tumor strategy based on acid-triggered self-destructive and near-infrared laser light responses of nano-biocatalysts integrating starvation–chemo–photothermal therapies," *Cancer*

Nanotechnol., vol. 13, no. 1, p. 11, 2022, doi: 10.1186/s12645-022-00117-y.

[225] A. R. Chandrasekaran, C. Y. Jia, C. S. Theng, T. Muniandy, S. Muralidharan, and S. A. Dhanaraj, "Invitro studies and evaluation of metformin marketed tablets-Malaysia," *J. Appl. Pharm. Sci.*, vol. 1, no. 5, pp. 214–217, 2011.

[226] M. Aliabadi and H. Shagholani, "Synthesis of a novel biocompatible nanocomposite of graphene oxide and magnetic nanoparticles for drug delivery," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 98, pp. 287–291, 2017.

[227] Q. Huang, J. Chen, M. Liu, H. Huang, X. Zhang, and Y. Wei, "Polydopamine-based functional materials and their applications in energy, environmental, and catalytic fields: State-of-the-art review," *Chem. Eng. J.*, vol. 387, p. 124019, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.cej.2020.124019.

[228] P. Trucillo, "Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release," *Process. 2022, Vol. 10, Page 1094*, vol. 10, no. 6, p. 1094, May 2022, doi: 10.3390/PR10061094.

[229] S. Dash, P. N. Murthy, L. Nath, and P. Chowdhury, "Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems.," *Acta Pol. Pharm.*, vol. 67, no. 3, pp. 217–223, 2010.

[230] A. BERGAL, G. AKYÜZ, M. ANDAÇ, O. ANDAC, and A. Elmas, "Mathematical modelling of drug release," *Res. Eng. Struct. Mater.*, vol. 6, no. 4, pp. 327–350, 2020, doi: 10.17515/resm2020.178na0122.

[231] M. Barzegar-Jalali, "Kinetic analysis of drug release from nanoparticles," *J. Pharm. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 1, pp. 167–177, 2008.

[232] M.-L. Laracuente, M. H. Yu, and K. J. McHugh, "Zero-order drug delivery: State of the art and future prospects," *J. Control. Release*, vol. 327, pp. 834–856, 2020, doi: https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.09.020.

[233] C. S. Borowy and J. V Ashurst, "Physiology, Zero and First Order Kinetics.," in *Stat Pearls Publishing LLC.*, Treasure Island (FL), 2023. doi: Bookshelf ID: NBK499866.

[234] I. S. Bayer, "Controlled Drug Release from Nanoengineered Polysaccharides," *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 5. 2023. doi: 10.3390/pharmaceutics15051364.

[235] N. S. Heredia *et al.*, "Comparative statistical analysis of the release kinetics models for nanoprecipitated drug delivery systems based on poly (lactic-co-glycolic acid)," *PLoS One*, vol. 17, no. 3, p. e0264825, 2022.

[236] R. Gouda, H. Baishya, and Z. Qing, "Application of mathematical models in drug release kinetics of carbidopa and levodopa ER tablets," *J. Dev. Drugs*, vol. 6, no. 02, pp. 1–8, 2017.

[237] M. P. Paarakh, P. A. Jose, C. M. Setty, and G. V Peterchristoper, "Release kinetics–concepts and applications," *Int. J. Pharm. Res. Technol.*, vol. 8, no. 1, pp. 12–20, 2018.

[238] D. Wojcik-Pastuszka, J. Krzak, B. Macikowski, R. Berkowski, B. Osiński, and W. Musiał, "Evaluation of the Release Kinetics of a Pharmacologically Active Substance from Model Intra-Articular Implants Replacing the Cruciate Ligaments of the Knee.," *Mater. (Basel, Switzerland)*, vol. 12, no.

8, Apr. 2019, doi: 10.3390/ma12081202.

[239] J. Siepmann and N. A. Peppas, “Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse,” *Int. J. Pharm.*, vol. 418, no. 1, pp. 6–12, 2011, doi: https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051.

[240] T. Groth, P. Falck, and R.-R. Miethke, “Cytotoxicity of biomaterials—basic mechanisms and in vitro test methods: a review,” *Altern. to Lab. Anim.*, vol. 23, no. 6, pp. 790–799, 1995.

[241] A. Sukumaran, V. K. Sweety, B. Vikas, and B. Joseph, “Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials,” A. Sukumaran and M. A. Mansour, Eds., Rijeka: IntechOpen, 2023, p. Ch. 1. doi: 10.5772/intechopen.111822.

[242] N. W. Roehm, G. H. Rodgers, S. M. Hatfield, and A. L. Glasebrook, “An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT,” *J. Immunol. Methods*, vol. 142, no. 2, pp. 257–265, 1991.

[243] B. Ankamwar *et al.*, “Biocompatibility of Fe3O4 nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells,” *Nanotechnology*, vol. 21, no. 7, p. 75102, 2010, doi: 10.1088/0957-4484/21/7/075102.

[244] L. Zou *et al.*, “Current Approaches of Photothermal Therapy in Treating Cancer Metastasis with Nanotherapeutics,” *Theranostics*, vol. 6, no. 6, p. 762, 2016, doi: 10.7150/THNO.14988.

[245] Z. Liu, J. T. Robinson, S. M. Tabakman, K. Yang, and H. Dai, “Carbon materials for drug delivery & cancer therapy,” *Mater. Today*, vol. 14, no. 7–8, pp. 316–323, Jul. 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70161-4.

[246] P. K. Jain, X. Huang, I. H. El-Sayed, and M. A. El-Sayed, “Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine,” *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 1578–1586, Dec. 2008, doi: 10.1021/AR7002804.

[247] Z. Bao, X. Liu, Y. Liu, H. Liu, and K. Zhao, “Near-infrared light-responsive inorganic nanomaterials for photothermal therapy,” *Asian J. Pharm. Sci.*, vol. 11, no. 3, pp. 349–364, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.AJPS.2015.11.123.

[248] H. Zhu, P. Cheng, P. Chen, and K. Pu, “Recent progress in the development of near-infrared organic photothermal and photodynamic nanotherapeutics,” *Biomater. Sci.*, vol. 6, no. 4, pp. 746–765, 2018.

[249] J. T. Robinson *et al.*, “Ultrasmall reduced graphene oxide with high near-infrared absorbance for photothermal therapy,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 133, no. 17, pp. 6825–6831, May 2011, doi: 10.1021/ja2010175.

[250] Z. Wang, “Caveolae-mediated delivery of therapeutic nanoparticles across blood-endothelial barrier,” *Austin J. Anal. Pharm. Chem.*, vol. 1, no. 4, 2014.

[251] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, “The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect,” *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, no. 3. Elsevier, pp. 136–151, Mar. 18, 2011. doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.

[252] L. Cheng, K. Yang, Q. Chen, and Z. Liu, "Organic stealth nanoparticles for highly effective in vivo near-infrared photothermal therapy of cancer," *ACS Nano*, vol. 6, no. 6, pp. 5605–5613, Jun. 2012, doi: 10.1021/nn301539m.

[253] K. Yang, H. Xu, L. Cheng, C. Sun, J. Wang, and Z. Liu, "In Vitro and In Vivo Near-Infrared Photothermal Therapy of Cancer Using Polypyrrole Organic Nanoparticles," *Adv. Mater.*, vol. 24, no. 41, pp. 5586–5592, Nov. 2012, doi: 10.1002/ADMA.201202625.

[254] D. Chen *et al.*, "Biocompatibility of magnetic Fe_3O_4 nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells.," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 7, pp. 4973–4982, 2012, doi: 10.2147/IJN.S35140.

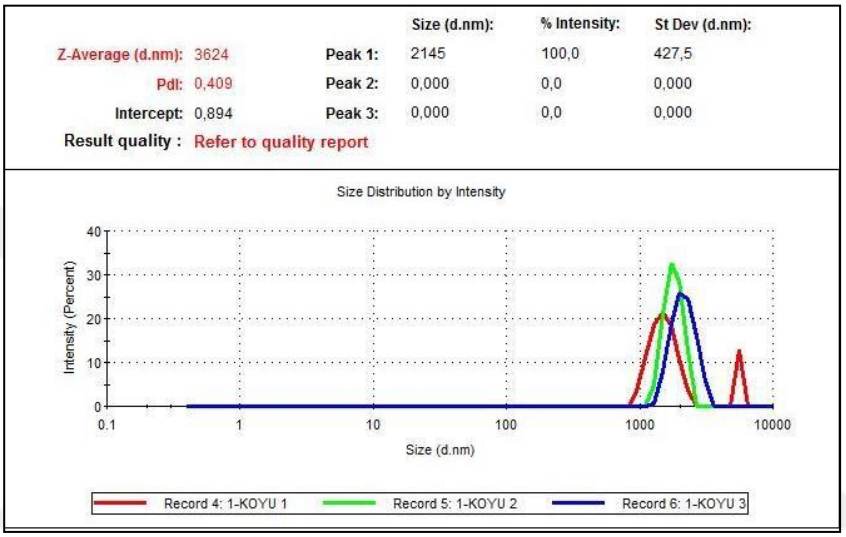
[255] D. Chen *et al.*, "Biocompatibility of magnetic Fe3O4 nanoparticles and their cytotoxic effect on MCF-7 cells," *Int. J. Nanomedicine*, pp. 4973–4982, 2012.

[256] A. Hanini, A. Schmitt, K. Kacem, F. Chau, S. Ammar, and J. Gavard, "Evaluation of iron oxide nanoparticle biocompatibility," *Int. J. Nanomedicine*, pp. 787–794, 2011.

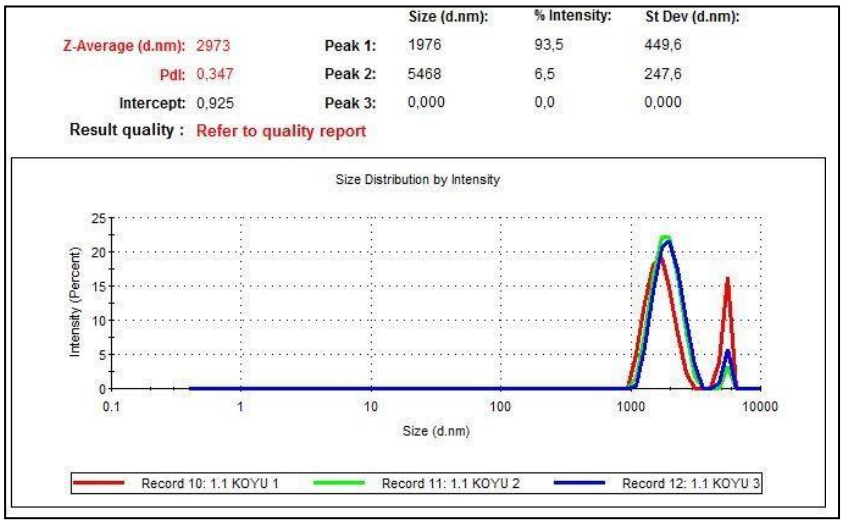
A
EK

Ek A.1 Zeta Sizer Cihazından Elde Edilen Veri Dataları

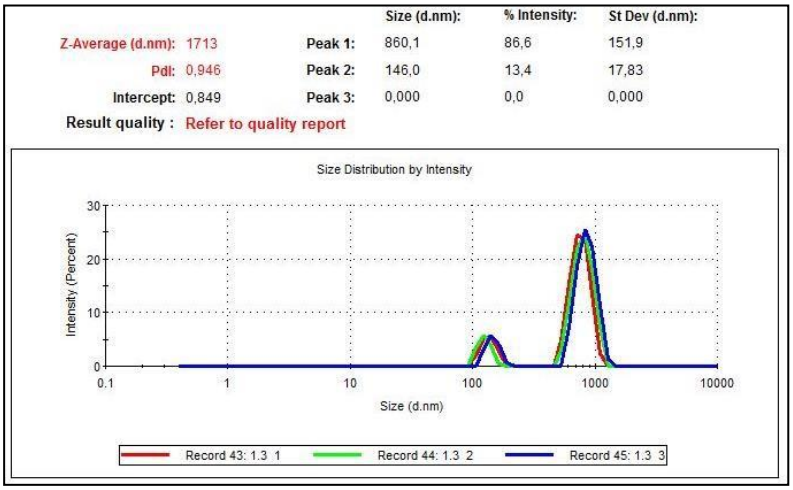
Bölüm 4 Tablo 4.2'de Zeta Sizer sonuçlarının veri dataları aşağıda sırasıyla sunulmuştur.



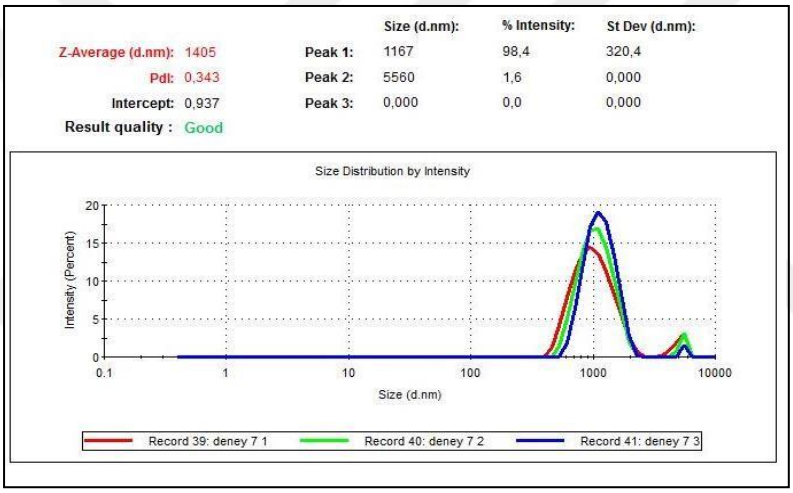
Şekil A.1 Deney 1-H, Hidrotermal yönteme ait Zeta Sizer sonucu



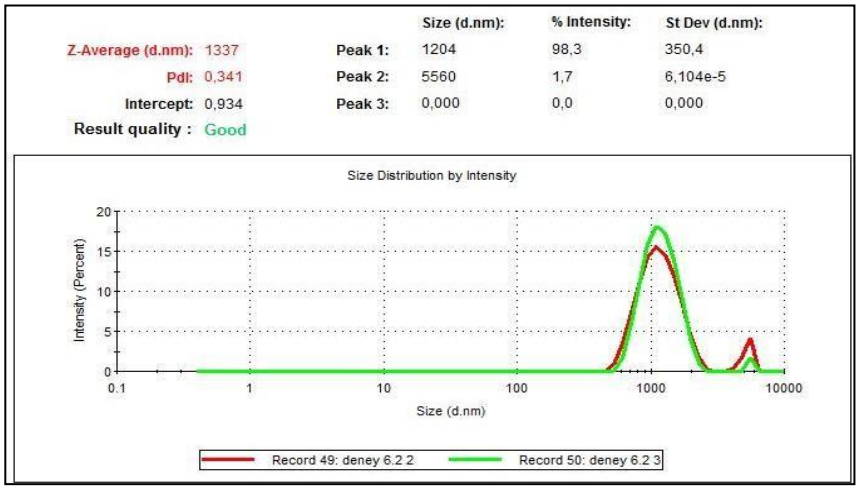
Şekil A.2 Deney 2-H, Hidrotermal yönteme ait Zeta Sizer sonucu



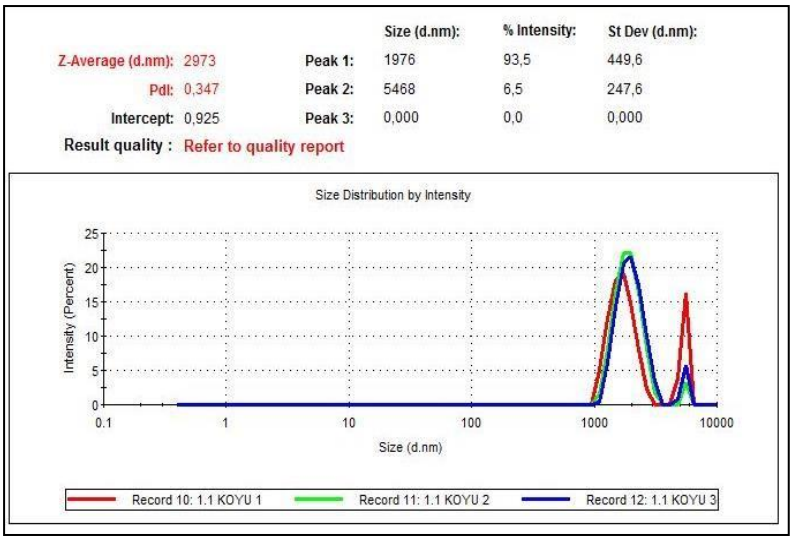
Şekil A.3 Deney 3-H, Hidrotermal yönteme ait Zeta Sizer sonucu



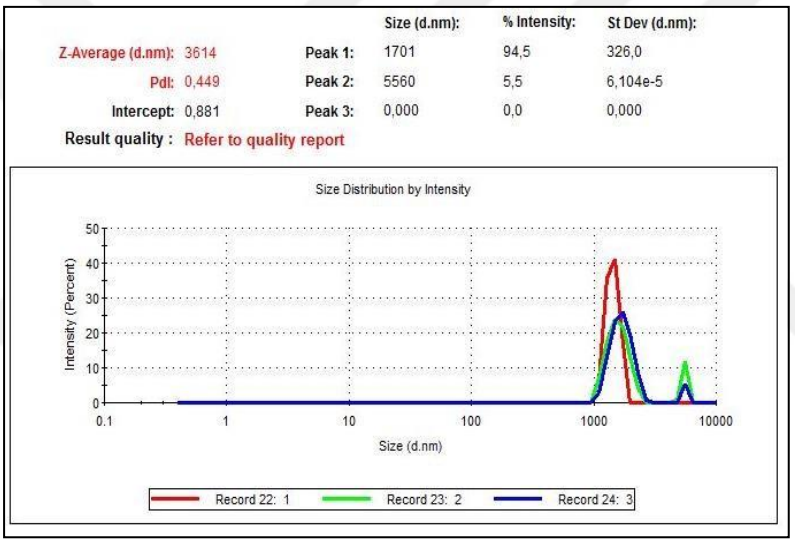
Şekil A.4 Deney 4-H, Hidrotermal yönteme ait Zeta Sizer sonucu



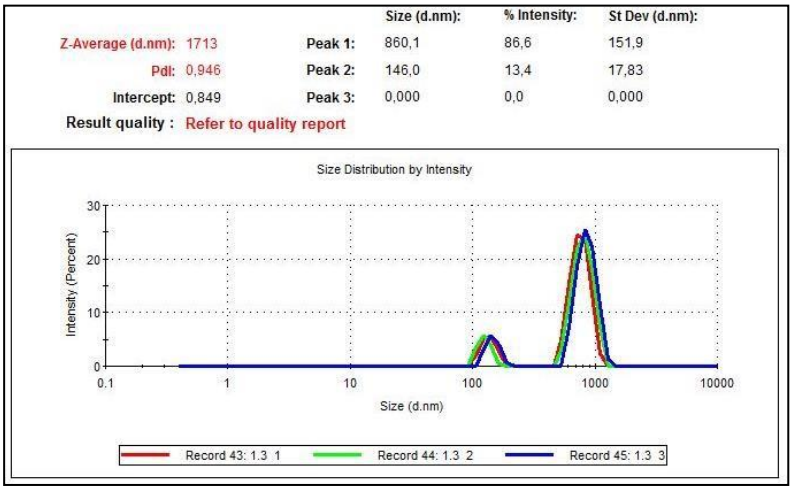
Şekil A.5 Deney 5-H, Hidrotermal yönteme ait Zeta Sizer sonucu



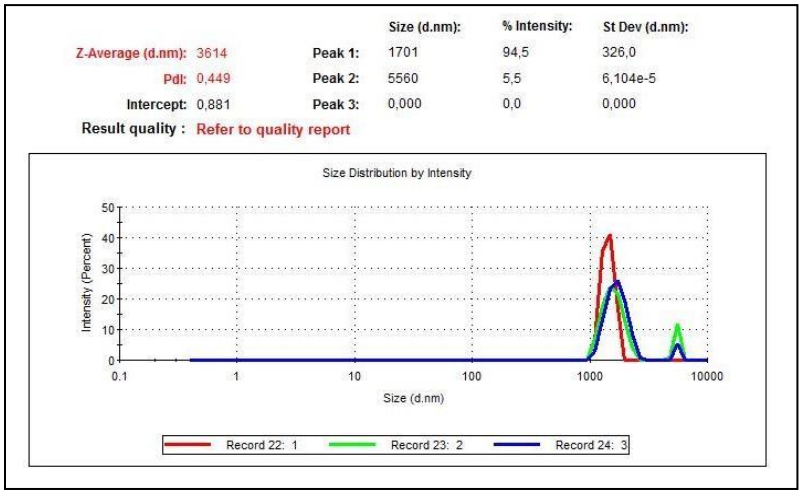
Şekil A.6 Deney 1-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



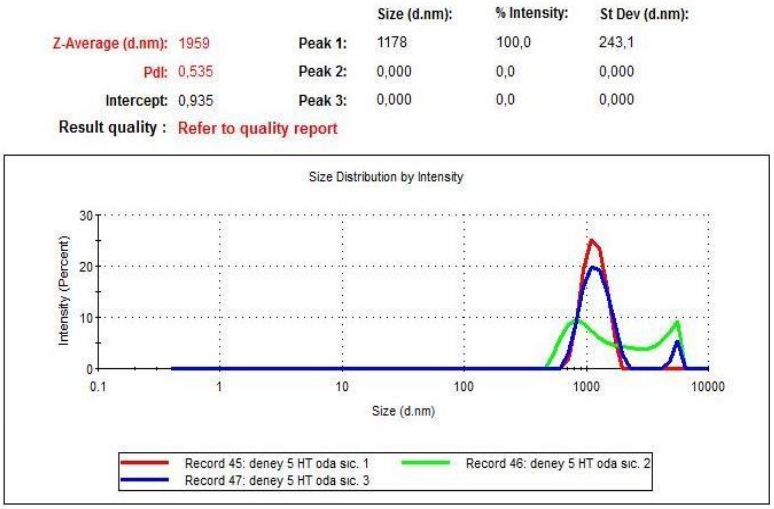
Şekil A.7 Deney 2-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



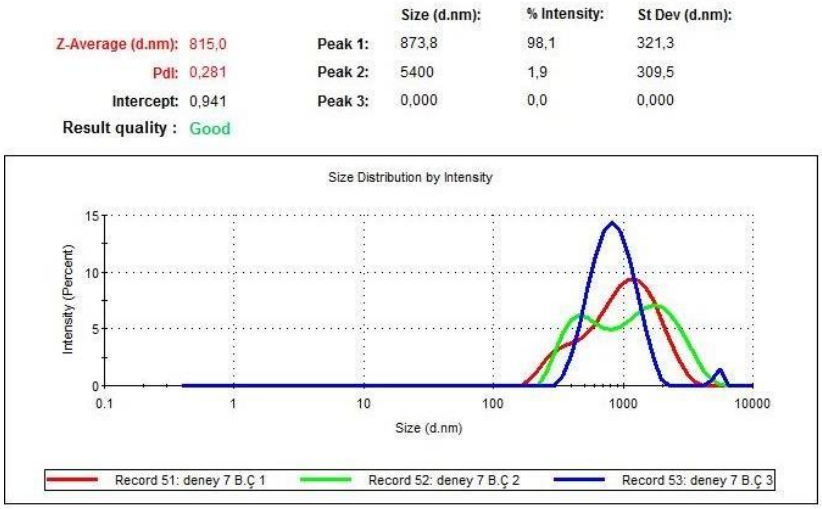
Şekil A.8 Deney 3-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



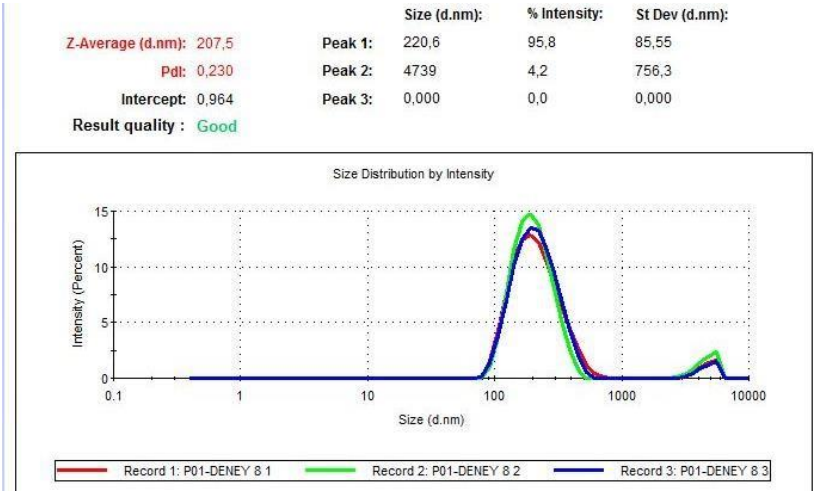
Şekil A.9 Deney 4-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



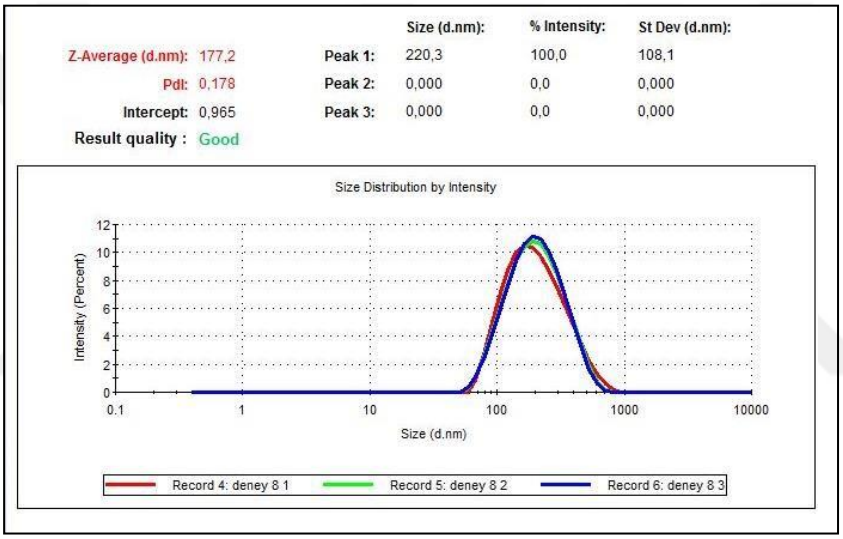
Şekil A.10 Deney 5-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



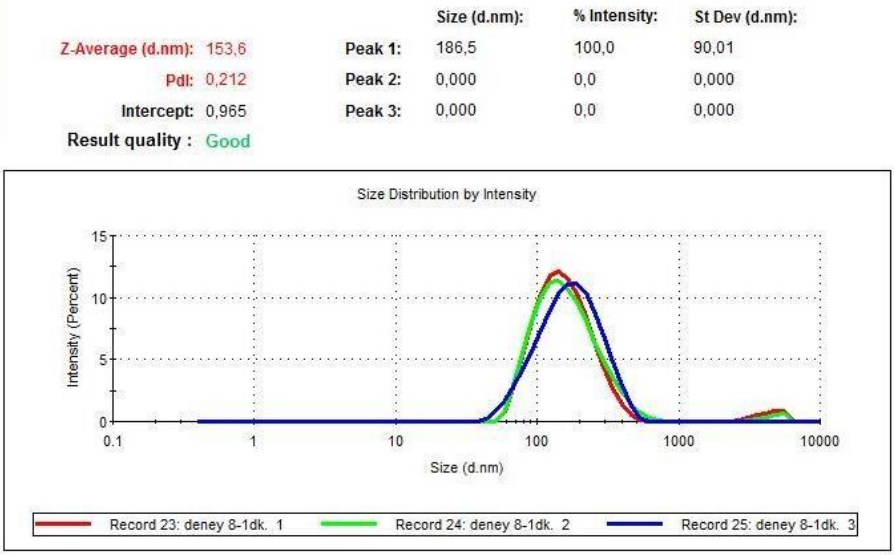
Şekil A.11 Deney 6-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



Şekil A. 12 Deney 7-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



Şekil A. 13 Deney 8-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu



Şekil A. 14 Deney 9-S, Solvotermal yöntem ait Zeta Sizer sonucu

B
EK

Ek B.1 XRD Kristal Spektrumuna Ait Cihaz Dataları

Tez çalışması kapsamında sentezlenen nanoyapıların kristal yapısını belirlemek amacıyla, Cu-Kα radyasyonu (λ=0.15418 nm) 10° ila 90° 2θ aralığında X-ışını kırınımı PANalytical, Xpert Pro cihazı kullanılarak XRD analizi yapılmıştır. Bölüm 4'te sunulan XRD kristal faz spektrumları ait cihaz veri dataları aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

19-0629 Quality: Quality Data

Fe +2 Fe2 +3 O4
Iron Oxide
Magnetite, Syn

Rad:CuKa1 Lambda:1.54056 Filter:Beta filter used d sp:
Cut off: Int: I/Icor:4.9
Ref:, 5 31, (1967)

Sys:Cubic S.G.:Fd-3m
a:8.396 b: c:
α: β: γ: Z:8 mp:
Ref2
Dx:5.197 Dm:5.197 SS/FOM: F26=59.2(0.0129,34) Volume[CD]:591.86
εα: ηωβ:2.42 εγ: Sign: 2V:
Ref3

Color:Black

a=8.3967 refined in 1975. To replace 00-011-0614. Other data 00-025-1376. See 00-026-1136. Sample obtained from the Columbian Carbon Co., New York, NY, USA. See 20596 (PDF 01-072-2303); 27898 (PDF 01-074-1909); 29129 (PDF 01-075-0449); 31157 (PDF 01-075-1610); 36314 (PDF 01-076-1849); 30860 (PDF 01-075-1372); 65338 (PDF 01-079-0416); 65339 (PDF 01-079-0417); 65340 (PDF 01-079-0418); 65341 (PDF 01-079-0419); 68181 (PDF 01-080-0389); 68182 (PDF 01-080-0390) and 75627 (PDF 01-082-1533). Spectrographic analysis showed the following major impurities: 0.01 to 0.1% Co, 0.001 to 0.01% Ag, Al, Mg, Mn, Mo, Ni, Si, Ti and Zn. Pattern taken at 25 C. Opaque mineral optical data on specimen from Braastad, Norway: RR#2R#e=20.1, Disp.=16, VHN#1#0#0=592, Color values=.311, .314,

26 reflections in pattern. Wavelength 1.54056 was used to calculate the diffraction angles.

2θ	Int.	h	k	l	2θ	Int.	h	k	l	2θ	Int.	h	k	l	2θ	Int.	h	k	l
18.2693	8	1	1	1	73.9481	10	5	3	3	118.7358	2	6	6	4					
30.0946	30	2	2	0	74.9601	4	6	2	2	122.1185	6	9	3	1					
35.4223	100	3	1	1	78.9287	2	4	4	4	128.0319	8	8	4	4					
37.0518	8	2	2	2	86.7017	4	6	4	2	138.6512	4	10	2	0					
43.0519	20	4	0	0	89.6171	12	7	3	1	143.2351	6	9	5	1					
53.3909	10	4	2	2	94.4254	6	8	0	0	144.8483	4	10	2	2					
56.9425	30	5	1	1	102.2243	2	6	6	0										
62.5146	40	4	4	0	105.2187	6	7	5	1										
65.7431	2	5	3	1	106.2049	4	6	6	2										
70.9239	4	6	2	0	110.2688	4	8	4	0										

Şekil B.1 Demir oksit (manyetit) yapısının XRD referans değerleri

33-0664 Quality: Quality Data

Fe2 O3
Iron Oxide
Hematite, Syn

Rad:CuKa1 Lambda:1.5406 Filter:Monochromator crystal used d sp:Diffractometer
Cutoff: Int:Diffractometer I/Icor:2.4
Ref:, 18 37, (1981)

Sys:Rhombohedral S.G.:R-3c
a:5.0356±0.0001 b: c:13.7489±0.0007
α: β: γ: Z:6 mp:
Ref2
Dx:5.27 Dm:5.27 SS/FOM: F30=69.1(0.0111,39) Volume[CD]:301.93
εα:2.94 ηωβ:3.22 εγ: Sign:- 2V:
Ref3

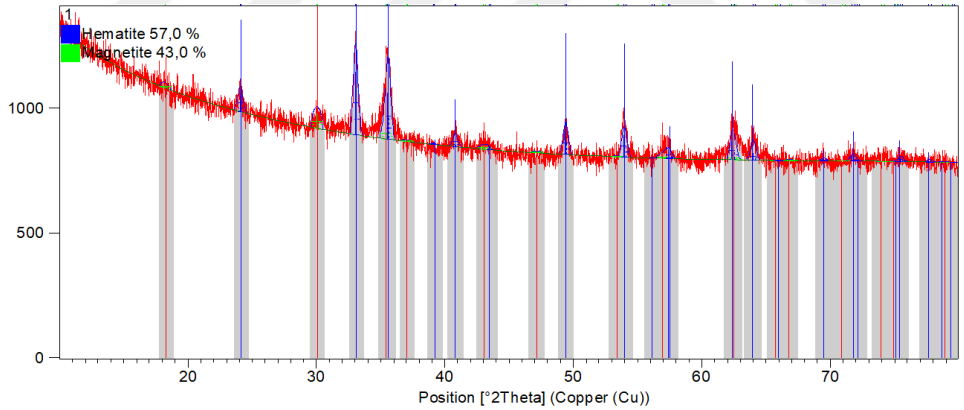
Color:Dark reddish brown

Pattern reviewed by Syvinski, W., McCarthy, G., North Dakota State Univ., Fargo, North Dakota, USA, \ITICDD Grant-in-Aid\RG (1990). Agress well with experimental and calculated patterns. 1350-1360$DE Sample from Pfizer, Inc., New York, USA, heated at 800 C for 3 days. Additional weak reflection [indicated by brackets] was observed. Also called: crocus mantis. To replace 00-013-0534 and validated by calculated pattern 00-024-0072. Also called: venetian red. Opaque mineral optical data on specimen from Elba, R#1R#0=30.2, RR#2R#e=26.1, Disp.=16, VHN=1038 (mean at 100, 200, 300), Color values=1 .299, .309, 29.8, 2 .299, .309, 25.7. Also called: ferrite. Also called: indian red. Also called: crocus. See ICSD 64599 (PDF 01-079-0007).

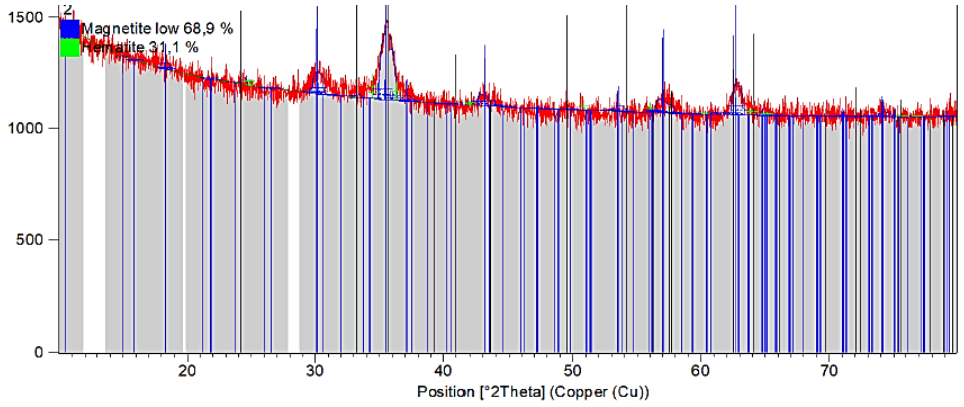
45 reflections in pattern. Wavelength 1.54056 was used to calculate the diffraction angles.

2 θ	Int.	h k l	2 θ	Int.	h k l	2 θ	Int.	h k l	2 θ	Int.	h k l
24.1378	30	0 1 2	63.9892	30	3 0 0	91.3424	2	0 4 2	117.7534	1	3 0 12
33.1522	100	1 0 4	66.0260	1	1 2 5	93.7123	7	2 1 10	118.6924	3	2 0 14
35.6112	70	1 1 0	69.5987	3	2 0 8	95.2357	1	1 1 12	122.4255	6	4 1 6
39.2756	3	0 0 6	71.9352	10	1 0 10	95.6594	3	4 0 4	125.9235	1	2 3 8
40.8544	20	1 1 3	72.2601	6	1 1 9	102.2815	4	3 1 8	128.7517	3	4 0 10
43.5177	3	2 0 2	75.4282	8	2 2 0	104.9104	1	2 2 9	131.8709	5	1 2 14
49.4791	40	0 2 4	77.7272	4	3 0 6	106.6188	5	3 2 4	133.2345	3	3 3 0
54.0892	45	1 1 6	78.7577	2	2 2 3	107.0211	4	0 1 14	144.4475	4	3 2 10
56.1504	1	2 1 1	80.7085	5	1 2 8	108.0860	5	4 1 0	147.9610	4	2 4 4
57.4275	5	1 2 2	82.9369	5	0 2 10	111.5139	2	4 1 3			
57.5885	10	0 1 8	84.9134	7	1 3 4	113.5897	2	0 4 8			
62.4490	30	2 1 4	88.5389	7	2 2 6	116.0399	5	1 3 10			

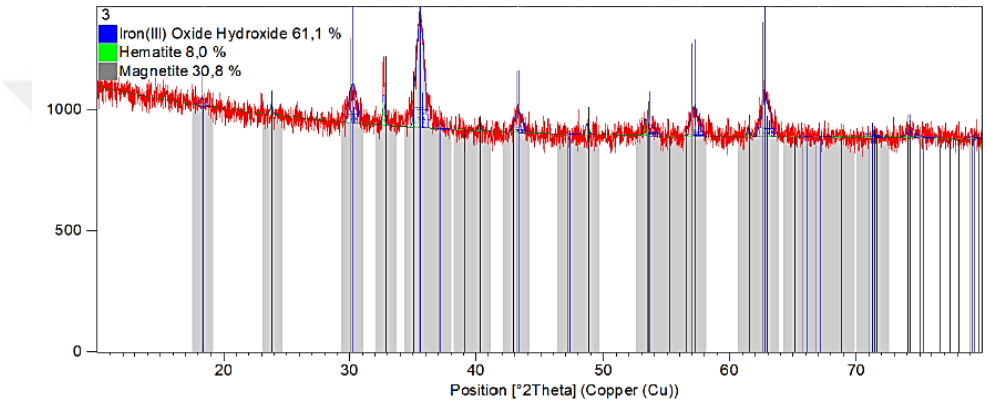
Şekil B.2 Hematit yapısının XRD referans değerleri



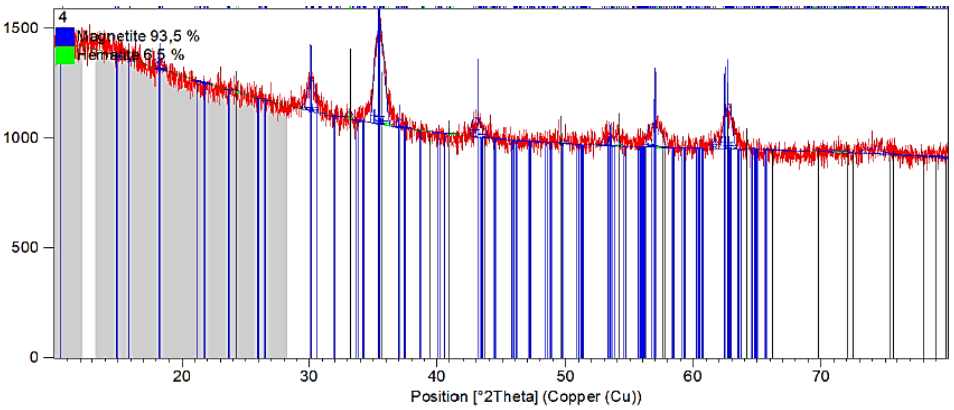
Şekil B.3 160°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



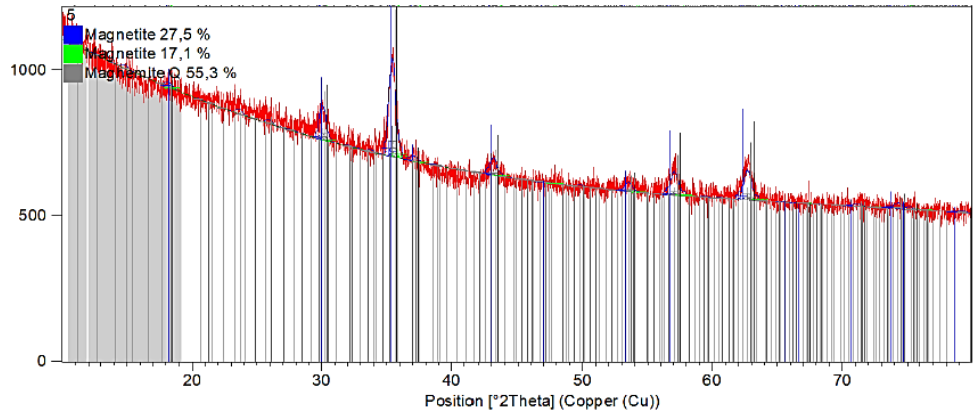
Şekil B.4 160°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



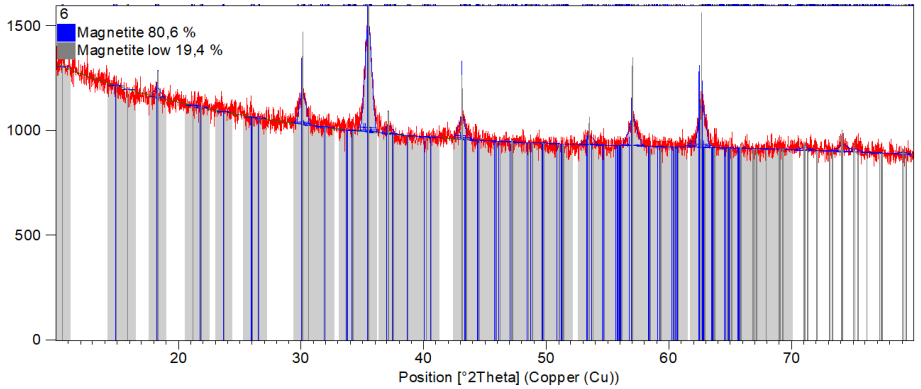
Şekil B.5 160°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



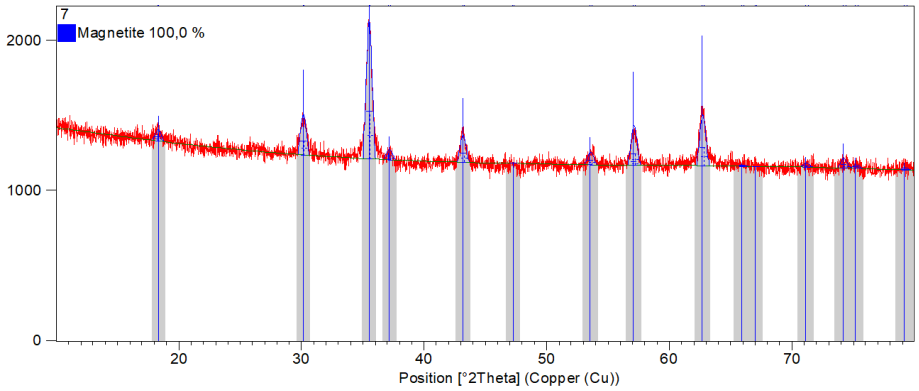
Şekil B.6 180°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



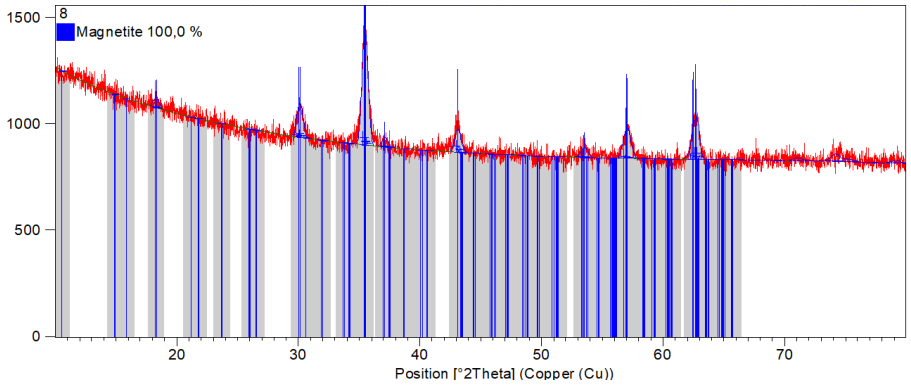
Şekil B.7 180°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



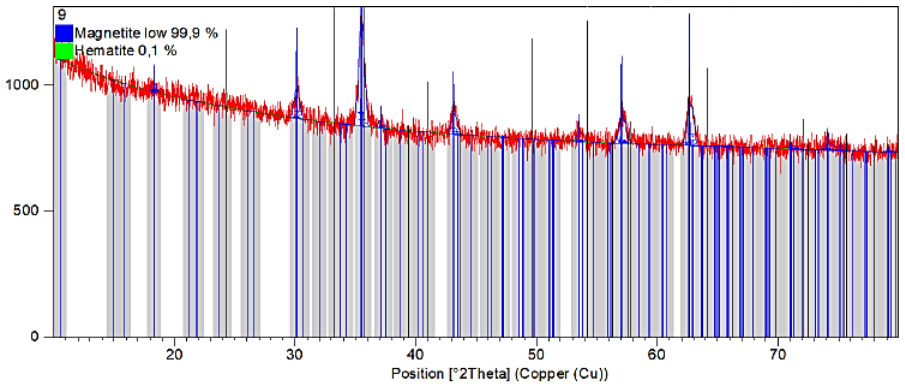
Şekil B.8 180°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



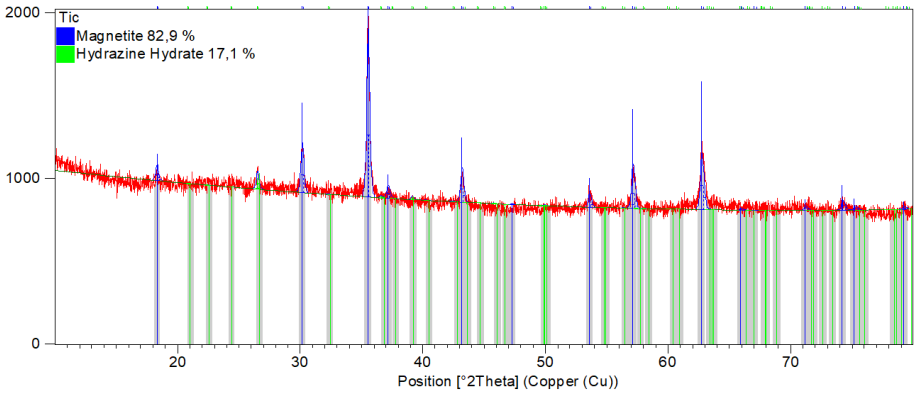
Şekil B.9 200°C ve 6 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



Şekil B.10. 200°C ve 12 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



Şekil B.11 200°C ve 18 saat koşullarında sentezlenen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu



Şekil B.12 Ticari olarak temin edilen Fe_3O_4 numunesine ait XRD kristal spektrumu

TEZDEN ÜRETİLMİŞ YAYINLAR

Konferans Bildirileri

[1] Özcan Z, Hazar Yoruç A.B., 'Fe$_3$O$_4$ Nanopartiküllerin Solvotermal Sentezi: Sıcaklık ve Süre Etkileri', 12. Uluslararası Bilimsel Çalışmalar Kongresi (UBCAK), vol.1, ISBN: 978-625-6861-52-7, sayfa 345-353, 2023 **(Tam metin bildiri)**

Makaleler

[1] Özcan Z, Hazar Yoruç A.B., 'Vinorelbine-Loaded Multifunctional Magnetic Nanoparticles as Anticancer Drug Delivery Systems: Synthesis, Characterization, and in vitro Release Study', Beilstein J Nanotechnol., 2024 Feb., 28;15:256-269. doi: 10.3762/bjnano.15.24., PMID: 38440320; PMCID: PMC10910576.

Projeler

1. Proje Adı: ''Manyetik Nanopartikül İçeren Fototermal Tedaviye Uygun Tümör Spesifik Özellikte Biyomalzeme Geliştirilmesi'' Yıldız Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinatörlüğü DOP Projesi.

Proje Yürütücü: Prof. Dr. Afife Binnaz Hazar Yoruç

Proje Kodu: FDK-2021-4609

Proje Başlangıç ve Bitiş Tarihi: 04.08.2021-04.02.2024

Sorumlu Araştırmacı: Zeynep (KAYA) Özcan

Ödüller

1. 100/2000 YÖK, Öncelikli Alanlar Bursu: Optik, Elektrooptik ve Fotonik