

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ
OLOMOUCINE'İN AuFe NANOPARÇACIKLARA
KONJUGASYONU VE ¹³¹I İLE İŞARETLENEREK
TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* OLARAK
KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

Gökhan TAKAN

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi : 08.08.2014

Bornova-İZMİR

2014

Gökhan TAKAN tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan "Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü Olomoucine'in AuFe Nanoparçacıklara Konjugasyonu ve ¹³¹I ile İşaretlenerek Terapötik Etkinliğinin *İn Vitro* Olarak Kanser Hücreleri Üzerinde İncelenmesi" başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.08.2014 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK
Raportör Üye : Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE
Üye : Prof. Dr. Serhan SAKARYA

İmza





EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum "Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörü Olomoucine'in AuFe Nanoparçacıklara Konjugasyonu ve ¹³¹I ile İşaretlenerek Terapötik Etkinliğinin *İn Vitro* Olarak Kanser Hücreleri Üzerinde İncelenmesi" başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08/08/2014

Gökhan TAKAN

ÖZET**SİKLİN BAĞIMLI KİNAZ İNHİBİTÖRÜ OLOMOUCINE'İN AuFe NANOPARÇACIKLARA KONJUGASYONU VE ¹³¹I İLE İŞARETLENEREK TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* OLARAK KANSER HÜCRELERİ ÜZERİNDE İNCELENMESİ**

TAKAN, Gökhan

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Ağustos 2014, 98 Sayfa

Siklin bağımlı kinazlar (CDK), hücre döngüsünün ve RNA transkripsiyonun önemli bir düzenleyicisidir. İnsan kanser hücrelerinde farklı şekillerde de olsa bu enzim grubunun aktivitesinin değiştiği bilinmektedir. Bu yüzden kanser tedavisinde bu enzim grubunun hedeflenmesi son 10 yılda üzerinde çalışılan bir konudur.

Bu çalışmada, hücre döngüsünde düzenleyici göreve sahip Siklin Bağımlı Kinaz (Cyclin-dependent Kinase, CDK) enzim ailesinin inhibitörü olan Olomoucine'in manyetik özelliğe sahip AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. AuFe nanoparçacıklar mikroemülsiyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Nanoparçacıkların karakterizasyonu SEM, TEM, DLS, EDX, XRD ve VSM analizleri ile yapılmıştır. XRD analizi sonucunda nanoparçacıkların karakteristik demir-altın motifine sahip olduğu gösterilirken TEM analizi ile nanoparçacıkların ortalama 6 nm boyutunda oldukları tespit edilmiştir. Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonunda sisteamin hidroklorür ve CDI (1,1'-karbonildiimidazol) ara molekül olarak kullanılmıştır. Konjugasyon verimi ise HPLC analizi ile %67,60 olarak bulunmuştur.

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile iyodinasyonunda iodojen yöntemi kullanılmıştır. Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlenme verimleri sırasıyla $\%93,27 \pm 5,08$ ve $\%85,5 \pm 7,08$ 'dir.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda A549 ve MCF7 hücre hatları kullanılmıştır. Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine için IC_{50} değerleri A549 hücrelerinde sırasıyla 17,96 ve 18,49 $\mu\text{g}/\text{mL}$ iken MCF7 hücre hattında ise sırasıyla 21,31 ve 21,29 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bulunmuştur. Örneklerin A549 hücreleri üzerindeki bağlanma düzeyinin MCF7 hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bunun yanında, manyetik alan uygulanan örneklerde inkorporasyonun arttığı görülmüştür. Proliferasyon ve hücre migrasyonu çalışmaları ile Olomoucine'in proliferasyon hızını düşürücü etkisi görülmektedir. A549 hücre hattında Olomoucine'in apoptotik etkisi görülürken MCF7 hücrelerinde 24 saat sonunda apoptoza uğrayan hücreye rastlanmamıştır.

CDK inhibitörü Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu sonrasında Olomoucine'in proliferasyon hızını düşürücü etkisinde kayıp olmadan, AuFe nanoparçacıkların sahip olduğu manyetik özelliği sayesinde Olomoucine'in istenilen bölgeye hedeflenmesi sağlanmıştır.

Elde edilen tüm sonuçlar değerlendirildiğinde, AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in, kanser tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmasına yönelik umut verici bir çalışma ortaya konulmuştur.

Anahtar sözcükler: CDK, Olomoucine, AuFe nanoparçacıklar, ^{131}I , manyetik ilaç hedefleme

ABSTRACT**RADIOLABELLING OF AuFe NANOPARTICLE CONJUGATED
CYCLIN DEPENDENT KINASE INHIBITOR OLOMOUCINE
WITH ¹³¹I AND EVALUATION OF THERAPEUTIC EFFICACY ON
CANCEROUS CELLS**

TAKAN, Gökhan

MSc Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emin İlker MEDİNE

August 2014, 98 pages

Cyclin-dependent kinases (CDKs) are critical regulators of cell cycle regulation and RNA transcription. Activity of these enzyme family is breakdown in human cancer cells broadly. Hence, CDK inhibition in cancer treatment is popular subject in last decade.

In this study, Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor Olomoucine was conjugated to magnetic AuFe nanoparticles. AuFe nanoparticles were synthesized by microemulsion (water in oil) method. SEM, TEM, DLS, EDX, XRD and VSM techniques were utilized to characterize of AuFe nanoparticles. Analysis results show that nanoparticles give iron-gold pattern and average size of particles are about 6 nm. Cysteamine hydrochloride and CDI (1,1'-carbonyldiimidazole) were used as a linker molecule for conjugating Olomoucine to AuFe nanoparticles. The conjugation yield was 67.6% as determined by HPLC.

Iodination of Olomoucine and Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles with ¹³¹I were performed by the iodogen method. Radiolabelling yield of Olomoucine and Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles are $93.27\% \pm 5.08$ and $85.5\% \pm 7.08$ respectively.

A549 and MCF7 cell lines were used for *in vitro* studies. IC₅₀ value of Olomoucine and Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles for A549 cell line is 17.96 and 18.49 µg/mL respectively, whereas 21.31 µg/mL and 21.29 µg/mL for MCF7 cell line. Incorporation ratio of Olomoucine and Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles are vary by cell lines but incorporation on A549 cell line is slightly greater than MCF7. Applying external magnetic field enhancing incorporation rate on both cell lines for Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles. By the proliferation and cell migration assays antiproliferative effect of Olomoucine was shown. Olomoucine inducing apoptosis in A549 cells after 24h incubation but there is not any significant apoptotic effect in MCF7 cells. Conjugation of CDK inhibitor Olomoucine to AuFe nanoparticles is not reducing the toxicity of Olomoucine. Also magnetic nanoparticles lead to target Olomoucine effectually to tumor cells on external magnetic field.

All these results obtained shows that Olomoucine conjugated AuFe nanoparticles are promising therapeutic agent for cancer treatment.

Keywords: CDKs, Olomoucine, AuFe nanoparticles, ¹³¹I, magnetic drug targeting

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca tüm bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tez danışmanım Doç. Dr. Emin İlker Medine'ye, enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Perihan Ünak'a, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan başta Ar. Gör. Özge Kozguş Güldü olmak üzere Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'ndaki tüm araştırma görevlileri ve arkadaşlarıma, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında eğitim hayatıma destekte bulunan TÜBİTAK'a

Teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| ÖZET | vii |
| ABSTRACT | ix |
| TEŞEKKÜR | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xix |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xxiii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ | xxiv |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 3 |
| 2.1 Kanser | 3 |
| 2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri | 4 |
| 2.3 Nanoteknoloji | 5 |
| 2.3.1 Manyetik kontrollü ilaç hedefleme | 6 |
| 2.3.2 Demir nanoparçacıklar | 7 |
| 2.3.3 Altın nanoparçacıklar | 9 |
| 2.3.4 AuFe nanoparçacıklar | 10 |
| 2.4 CDK İnhibisyonu ve Kanser Tedavisi | 12 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 2.4.1 Siklin bağımlı kinazlar (CDK's, cyclin-dependent kinases) | 12 |
| 2.4.2 Hücre döngüsü hedefli tedavide farmakolojik kaygılar | 16 |
| 2.4.3 Olomoucine | 18 |
| 2.5 Radyoaktif İyot İzotopları | 20 |
| 2.6 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler | 23 |
| 2.6.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC) | 23 |
| 2.6.2 Kağıt elektroforezi | 24 |
| 2.6.3 Lipofilite | 25 |
| 2.7 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu | 26 |
| 2.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM, scanning electron microscope) | 26 |
| 2.7.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM, transmission electron microscope) | 28 |
| 2.7.3 X-Işını difraktometresi (XRD, X-Ray diffraction) | 29 |
| 2.7.4 Titreşen örnek magnetometresi (VSM, vibrating sample magnetometer) | 30 |
| 2.7.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, fourier transform infrared spectroscopy) | 31 |
| 3. MATERYAL VE METOD | 33 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar..... | 33 |
| 3.1.1 Kullanılan kimyasallar..... | 33 |
| 3.1.2 Kullanılan cihazlar..... | 34 |
| 3.2 AuFe Nanoparçacıkların Sentezi | 36 |
| 3.2.1 AuFe nanoparçacıklarda yüzey modifikasyonu | 38 |
| 3.2.2 Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklar ile konjugasyonu | 39 |
| 3.2.3 Olomoucine'in nanoparçacıklara bağlanma veriminin belirlenmesi..... | 40 |
| 3.2.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi..... | 41 |
| 3.2.5 Yapısal analiz çalışmaları..... | 42 |
| 3.3 ¹³¹ I ile İşaretleme Çalışmaları..... | 42 |
| 3.3.1 İodojen yöntemi..... | 42 |
| 3.3.2 Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ¹³¹ I ile işaretleme si | 43 |
| 3.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler | 44 |
| 3.4.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi | 44 |
| 3.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi..... | 45 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 3.4.3 Lipofilite tayini | 46 |
| 3.4.4 Stabilite tayini | 46 |
| 3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları | 46 |
| 3.5.1 Sitotoksosite çalışmaları | 47 |
| 3.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi | 49 |
| 3.5.3 Proliferasyon çalışmaları..... | 50 |
| 3.5.4 Hücre migrasyon çalışmaları | 51 |
| 3.5.5 Apoptosis çalışmaları..... | 51 |
| 3.5.6 İstatistik Analizler | 52 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA | 53 |
| 4.1 AuFe Nanoparçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi..... | 53 |
| 4.1.1 SEM analiz sonuçları | 53 |
| 4.1.2 TEM analiz sonuçları | 54 |
| 4.1.3 DLS analiz sonuçları..... | 55 |
| 4.1.4 EDX analiz sonuçları | 56 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.1.5 XRD analiz sonuçları..... | 57 |
| 4.1.6 VSM analiz sonuçları | 58 |
| 4.2 Olomoucine'in AuFe Nanoparçacıkları İle Konjugasyon Verimi..... | 59 |
| 4.3 Yapısal Analiz Çalışmaları | 60 |
| 4.3.1 FTIR sonuçları | 60 |
| 4.4 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları | 62 |
| 4.4.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar | 62 |
| 4.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi ile elde edilen sonuçlar | 65 |
| 4.4.3 Lipofilite sonuçları | 66 |
| 4.4.4 Stabilite sonuçları | 66 |
| 4.5 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları | 67 |
| 4.5.1 Sitotoksosite sonuçları..... | 67 |
| 4.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi sonuçları..... | 70 |
| 4.5.3 Proliferasyon sonuçları | 72 |
| 4.5.4 Hücre migrasyonu sonuçları | 73 |
| 4.5.5 Apoptosis sonuçları | 77 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---------------------------|--------------|
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 80 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 83 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 98 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1 Türkiye Kanser İnsidansları Verileri | 4 |
| 2.2 Olomoucine'in moleküler yapısı | 18 |
| 2.3 Sık kullanılan radyoaktif iyot izotoplarının nükleer üretim reaksiyonları..... | 20 |
| 2.4 ^{131}I 'in bozunum şeması..... | 22 |
| 2.5 İodojen'in moleküler yapısı..... | 22 |
| 2.6 TLRC yönteminde şeritlerin küvetlere yerleştirilmesi | 24 |
| 2.7 SEM cihazının şematik yapısı | 27 |
| 2.8 TEM cihazının şematik yapısı | 29 |
| 2.9 VSM cihazının şematik yapısı | 31 |
| 3.1 AuFe nanoparçacıkların sentez şeması..... | 37 |
| 3.2 AuFe nanoparçacıklar | 38 |
| 3.3 Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlenmesi..... | 43 |
| 3.4 MCF7 ve A549 hücrelerinin inkübasyonu | 47 |
| 3.5 MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde sitotoksosite çalışmaları..... | 48 |
| 3.6 MCF7 ve A549 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması | 50 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.1 AuFe nanoparçacıkların SEM görüntüleri | 53 |
| 4.2 AuFe nanoparçacıkların TEM görüntüleri | 54 |
| 4.3 AuFe nanoparçacıkların boyut histogramı | 55 |
| 4.4 AuFe nanoparçacıkların boyut dağılımı | 56 |
| 4.5 AuFe nanoparçacıkların EDX diagramı | 57 |
| 4.6 AuFe nanoparçacıkların XRD diagramı | 58 |
| 4.7 AuFe nanoparçacıkların VSM diagramı | 59 |
| 4.8 Olomoucine'in farklı konsantrasyonlarına ait kromatogram | 59 |
| 4.9 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine | 62 |
| 4.10 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine ve AuFe nanoparçacıkların FTIR spektrumu | 62 |
| 4.11a TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I 'e ait kromatogram | 64 |
| 4.11b TLRC-1 banyo çözeltisinde yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait kromatogram | 64 |
| 4.11c TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I -Olomoucine'e ait kromatogram | 64 |
| 4.11d TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e ait kromatogram | 64 |
| 4.12a TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I 'e ait kromatogram | 65 |
| 4.12b TLRC-2 banyo çözeltisinde yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait kromatogram | 65 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.12c TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I -Olomoucine'e ait kromatogram | 65 |
| 4.12d TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e ait kromatogram..... | 65 |
| 4.13a TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I 'e ait kağıt elektroforezi kromatogramı..... | 66 |
| 4.13b TLRC-1 banyo çözeltisinde yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait kağıt elektroforezi kromatogramı..... | 66 |
| 4.13c TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I -Olomoucine'e ait kağıt elektroforezi kromatogramı..... | 66 |
| 4.13d TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e ait kağıt elektroforezi kromatogramı..... | 66 |
| 4.14 ^{131}I -Olo ve ^{131}I -AuFe-Olo'ya ait stabilite çalışması sonuçları | 67 |
| 4.15 MCF7 ve A549 hücre hatlarında Olomoucine'in konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri..... | 68 |
| 4.16 MCF7 ve A549 hücre hatlarında AuFe-Olo'nun konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri..... | 68 |
| 4.17 MCF7 ve A549 hücre hatlarında AuFe'nin konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri | 69 |
| 4.18 MCF7 ile A549 hücre hatlarında ^{131}I -Olo, ^{131}I -AuFe-Olo, ^{31}I -MA-AuFe-Olo ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi..... | 72 |
| 4.19 ^{131}I -Olo, ^{131}I -AuFe-Olo, ^{31}I -MA-AuFe-Olo ve ^{131}I 'in MCF7 ile A549 hücre hatlarında bağlanma etkinliğinin değişimi..... | 72 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.20 MCF7 ve A549 hücrelerinde Olo ve AuFe-Olo'nun proliferasyon hızına etkisi | 73 |
| 4.21 MCF7 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu | 75 |
| 4.22 A549 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu | 76 |
| 4.23 MCF7 ve A549 hücre hatlarında hücre migrasyonu değerleri | 77 |
| 4.24a MCF7 hücrelerinde AuFe-Olo'nun apoptotik etkisi | 78 |
| 4.24b MCF7 hücrelerinde Olomoucine'in apoptotik etkisi | 78 |
| 4.25a A549 hücrelerinde AuFe-Olo'nun apoptotik etkisi..... | 79 |
| 4.25b A549 hücrelerinde Olomoucine'in apoptotik etkisi..... | 79 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.1 Olomoucine'in protein kinazlar üzerindeki IC ₅₀ değerleri | 19 |
| 2.2 Sık kullanılan radyoaktif iyot izotoplarının temel özellikleri..... | 21 |
| 3.1 HPLC yönteminde kullanılan kromatografik koşullar | 40 |
| 4.1 AuFe nanoparçacıkların elementel kompozisyonu..... | 56 |
| 4.2 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in FTIR incelemesi | 61 |
| 4.3 ¹³¹ I ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen R _f değerleri | 63 |
| 4.4 ¹³¹ I ile işaretli örneklerin TLRC-3 çözeltilisinde hesaplanan işaretlenme verimleri..... | 63 |
| 4.5 Olomoucine ve AuFe-Olo'ya ait IC ₅₀ değerleri..... | 70 |
| 4.6 MCF7 ve A549 hücre hatlarında ¹³¹ I-Olo, ¹³¹ I-AuFe-Olo, ³¹ I-MA-AuFe-Olo ve ¹³¹ I'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi | 71 |
| 4.7 MCF7 ve A549 hücre hatlarında yüzde hücre migrasyonu değerleri..... | 74 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------|---|
| CDK | Siklin Bağımlı Kinaz |
| TLRC | İnce Tabaka Radyokromatografi Yöntemi |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| Rt | Alıkonma Süresi |
| Rf | Alıkonma Mesafesi |
| SEM | Scanning Electron Microscopy |
| TEM | Transmission Electron Microscopy |
| VSM | Vibrating Sample Magnetometer |
| EDX | Energy-dispersive X-ray Spectroscopy |
| XRD | X-ray Diffraction |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| DLS | Dynamic Light Scattering |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| CDC | Centers for Disease Control and Prevention |
| AuFe | Hibrid altın demir nanoparçacıklar |
| IARC | The International Agency for Research on Cancer |
| TÜİK | Türkiye İstatistik Kurumu |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

- AuFe-OLO Altın demir nanoparçacıklara konjuge Olomoucine
- MA-AuFe-OLO Manyetik alan uygulanmış Olomoucine konjuge demir altın nanoparçacık

1.GİRİŞ

Siklin bağımlı kinazlar (CDKs, cyclin-dependent kinases), aktivitesi siklin partnerlerinin bağlanması ile değişen serin/threonin protein kinaz grubuna ailesine ait olan hücre döngüsünde önemli bir enzim grubudur. Bu heterodimerik yapıdaki enzimler, çeşitli uyarıcı cevaplar oluşturacak şekilde substratlarını fosforilleyerek hücreyi transkripsiyon ve hücre döngüsünü seviyesinde düzenlerler (Malumbres and Barbacid, 2005). Kanser hücrelerinde, CDK'ların ve bunların düzenleyicilerinin ekspresyonunun değişmesi (aşırı siklin ekspresyonu veya inhibitör ekspresyonunun azalması) ile CDK regülasyonunda sorun görülür ve bu olay hücrede aşırı bölünme ile sonuçlanır (Sherr, 1996; Hall and Peters, 1996). CDK regülasyonu ve aktivitesindeki anormallikler viral enfeksiyon, iskemi, travmatik beyin hasarı ile Alzheimer, Parkinson ve Nieman-Pick hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülmektedir. Hücre döngüsü ve transkripsiyonel aşamalarındaki düzenleyici rolünün önemi sebebiyle CDK'ların inhibisyonu kanser tedavisinde farklı bir yaklaşım olarak görülmektedir (Cook et al., 2005; Shapiro, 2006).

Olomoucine [2-(2-hidroksietilamino)-6-benzilamino-9-metil pürin] birçok CDK türüne etki edebilen pürin temelli bir inhibitördür. 35 farklı kinaz üzerinde yapılan denemeler sonucunda Olomoucine'in CDK1, CDK2, CDK5 ve erk1 (MAPK3, Mitogen-activated protein kinase 3) üzerinde spesifik inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Vesely et al., 1994). Yapılan ek çalışmalar sonucunda, Olomoucine'in aynı zamanda spesifik CDK4 inhibitörü olduğu belirlenirken CDK6 üzerinde zayıf da olsa inhibisyon etkisi olduğu görülmüştür (Vesely et al., 1994; Meijer et al., 1997).

Kanser tedavisinde uygulanan yöntemin başarısı, tedavi sırasında tümörler üzerindeki maksimum toksik etki ve sağlıklı hücreler üzerinde minimum zarar ile ölçülür. Terapötik yöntemin, kanser hücreleri üzerinde belirgin olarak etkin olması beklenirken bu etkinin sağlıklı hücreler üzerinde minimum seviyede görülmesi istenilmektedir. Spesifikliğin ve hedef hücrelerde absorblanmanın artırılması ile tedavi sırasında kanser hastalarının maruz kaldığı etkiler en alt seviyeye çekilmeye çalışılmaktadır.

Hedeflenmiş bölgesel terapi kullanılarak, tümör bölgesinde daha yüksek ilaç konsantrasyonu sağlamak mümkündür. Bu sebeple kanser tedavisinde ilaç taşıma metotlarının uygulanabilmesi için manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi amaçlanmıştır. Manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi kullanılmasıyla; yan etkilerin giderilmesi, sitotoksik ilaçların sistem içindeki dağılım miktarının azalması ve ihtiyaç duyulan doz miktarının azaltılması sağlanabilir (Chunfu et al., 2004; Häfeli, 2004).

Bu tez çalışmasında; mikroemülsiyon yöntemi ile demir oksit (Fe_3O_4) çekirdeklerin etrafının altın tabakası ile kaplanması sonucu manyetik özellikteki hibrid AuFe nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Sentez ürünü nanoparçacıkların karakterizasyonu için SEM (scanning electron microscopy), TEM (transmission electron microscopy), EDX (energy-dispersive X-ray spectroscopy), XRD (X-ray diffraction), VSM (vibrating sample magnetometer) ve DLS (dynamic light scattering) analizleri yapılmıştır. Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu sistemin hidroklorürü ve CDI (1,1'-karbonildiimidazol) ile sağlanmıştır. FTIR (fourier transform infrared spectroscopy) analizi ile incelenen konjugasyon ürününün bağ yapısı hakkında bilgiler elde edilmiştir. AuFe nanoparçacıklara Olomoucine'in konjugasyon verimi HPLC (high performance liquid chromatography) ile incelenerek % bağlanma verimi hesaplanmıştır. AuFe-Olo'nun iyodinasyonu ^{131}I kullanılarak iodojen yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Radyoışaretleme işleminin kalite kontrolü TLRC (thin layer radiochromatography) yöntemi ile çeşitli banyo çözeltileri kullanılarak yapılmıştır. AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in hücre düzeyinde etkileri MCF7 (insan meme adenokarsinoma epiteli) ve A549 (insan akciğer karsinoma epiteli) hücre hatlarında incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in sitotoksikite, hücre düzeyinde bağlanma etkinliği, proliferasyon hızı, hücre migrasyonu ve apoptosis çalışmaları yapılmıştır.

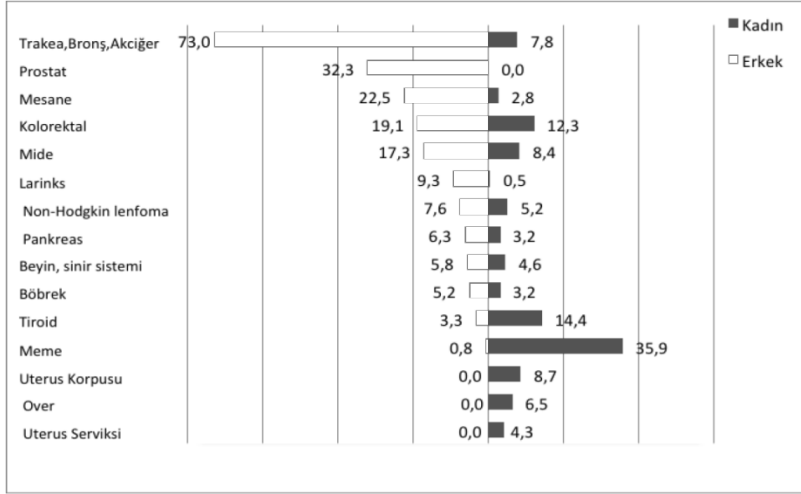
Bu tez çalışması ile siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan Olomoucine'in manyetik özellikteki AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu ile Olomoucine'in kanser hücrelerine manyetik alan altında hedeflenebilirliği incelenmiştir. Böylece Olomoucine'in proliferasyon hızını düşürücü etkisinin manyetik yönlendirme ile kanser hücreleri üzerine etkin bir şekilde hedeflenmesi planlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kelime anlamı olarak kanser, bir organ veya dokudaki hücrelerin düzensiz olarak bölünüp çoğalmasıyla beliren kötü urlara denir. Genel anlamda ise kanser vücudumuzun çeşitli bölgelerindeki hücrelerin kontrolsüz çoğalması ile oluşan 100'den fazla hastalık grubunu belirtir. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen, hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalması ile başlar. Tedavi edilmez ise ciddi rahatsızlıklara, hatta ölüme dahi neden olabilir.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) verilerine göre; dünya genelinde yılda 12,7 milyon insan kansere yakalanırken, 6,7 milyon insan kanser kaynaklı hastalıklar sonucu hayatını kaybetmektedir. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı'nın verilerine göre ise, 2008 sonu itibarıyla, Türkiye'de kanser insidansı, yüz binde erkeklerde yaklaşık 280, kadınlarda ise yaklaşık 172 olarak hesaplanmıştır. Bu ülkemizde her yıl yeni 170 bin kanser teşhisi konulduğu anlamına gelmektedir. Bu kanserli hastaların 2/3 ü erkek olup, 1/3 ü kadınlardan oluşmaktadır. Bu oranlama dünyada da bu verilere benzerlik gösterecek şekildedir. Tüm dünyada kanser istatistikleri konusundaki tahminler için Dünya Sağlık Örgütü Uluslararası Kansere Araştırma Ajansı (The International Agency for Research on Cancer, IARC) tarafınca yayımlanan Globocan verileri kullanılmaktadır. Bu verilere göre, dünya kanser insidansı, erkeklerde 202'lerde, kadınlarda ise 164'lerdedir. Avrupa ortalamasına bakıldığında erkeklerde 335'lerde iken, kadınlarda ise 250 seviyelerindedir. Türkiye'de toplam ölümlerin içinde kanserden kaynaklanan ölümlerin oranı 2000 yılı için yapılan hastalık yükü çalışmasında % 13,1 oranında hesaplanmıştır. 2002 yılı TÜİK (Türkiye İstatistik Kurumu) verilerine göre de kansere bağlı ölüm % 12-16 arasındadır. TÜİK 2009 yılı verileri incelendiğinde kansere bağlı ölümlerin % 20'lere çıktığı görülmektedir. 2009 verilerine göre, ülkemiz de ölüm nedenleri sırasında 2. sırada yer alan kanser hastalığının, hem dünyada hem de ülkemizde 2015 yılından itibaren 1. sıradaki ölüm nedeni olacağı düşünülmektedir.



Şekil 2.1 Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı –
Türkiye Kanser İnsidansları Verileri

2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavisinde kullanılan güncel yöntemleri aşağıdaki gibidir:

- Cerrahi müdahale
- Radyasyon terapi
- Kemoterapi
- Biyolojik tedavi (immünoterapi)
- Hormonal terapi
- Manyetik ilaç hedefleme

Tedavinin seçimi tümör dokularının ve komşu dokuların muhtemel bölümlerinin kesip çıkarılması, birleştirilmiş kemoterapi, immünoterapi, radyasyon tedavisi veya bunların bir kombinasyonunu içerebilir. Başarılı bir tedavi için kanser hücrelerinin tamamen yok edilmesi zorunludur. Bu sebeple, cerrahi müdahale ile kesip çıkarma yöntemi uygulanabilir tedavi seçimidir. Ancak, doku çevresi, içeriği ve bölgesine bağlı olarak her zaman cerrahi müdahale mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda radyasyon terapi ve kemoterapi gerekli olur. Fakat bu tedavilerin uygulanması sırasında şiddetli zorluklar gözlenmiştir (Lübbe et al., 2001). Kemoterapi kanser tedavisi için en yaygın yöntemdir. Kemoterapik ilaçlar çok etkili olmalarına rağmen, bu ajanların tedavi sırasında minimum sistematik yan etki gösterecek şekilde istenilen bölgeye hedeflenmesi kemoterapideki en büyük

sorundur (Widder et al., 1978). Kemoterapötik ajanların hedeflenmesinde ana faktör normal ve kanserli hücreler arasındaki biyokimyasal farklılıklardır. Bu farklılıklardan yola çıkılarak planlanan ilaç hedefleme yöntemleriyle kemoterapi sırasında kemoterapötik ajanların etkin dozu azaltılabilir ve ajanlardan kaynaklı toksisitenin önüne geçilebilir (Sudimack and Lee, 2000).

2.3 Nanoteknoloji

Gün geçtikçe nanoteknolojinin gelecek açısından önemi artmaktadır. Nanoteknoloji ile beraber, atomik boyuttaki materyaller hakkında bilgi edilebilmiş ve bu bilgiler doğrultusunda atomik boyuttaki atomların sahip olduğu farklı özelliklerden yararlanılmaya başlanmıştır. Nanoyapılar olarak belirtilen materyaller 1-100 nm arasında boyutlara sahiptirler. Bu materyaller, moleküler seviyedeki yapıların fiziksel ve kimyasal özellikleri üzerinde kontrol sağlanabilecek metotlar ile tasarlanmıştır. İletişim, mühendislik, kimya, fizik, robotik, biyoloji ve tıp alanında nanoteknolojiden faydalanılmaktadır.

1970'lerde kontrollü ilaç ulaştırma sistemlerinin geliştirilmesiyle nanoteknoloji üzerindeki ilgi artmıştır (Jeong et al., 1999). İlaç hedefleme ile ilaç molekülleri veya genler istenilen hücre gruplarına seçimli olarak gönderilirler. Buradaki amaç, arzulanan bölgelere uygun dozda ilaç molekülünün gönderilmesiyle sağlıklı hücre gruplarının tedavi sırasında yan etkilerden korunmasıdır (Tran et al., 2009).

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemin başarısı, tümörler üzerindeki öldürücü etkisine ve uygulama sırasında sağlıklı hücreler üzerinde minimum zarar vermesine bağlı olarak ölçülür. Terapötik yöntemin kanser hücreleri üzerinde belirgin olarak etkin olması beklenilmektedir. Spesifiklik ve hedef hücrelerde absorblanmanın artması ile tedavi sırasında kanser hastalarının maruz kaldığı etkiler en alt seviyeye çekilmeye çalışılır. Kanser ilaçlarında temel hedef, yaşam süresini arttırmak ve yaşam kalitesinin devamının sağlanmasıdır. Bu yüzden ilaç hedeflemede manyetik özellikli nanoparçacıklar kullanılmaktadır (Safari and Zarnegar, 2013).

2.3.1 Manyetik kontrollü ilaç hedefleme

Moleküler biyoloji ve nanoteknolojideki gelişmeler ile birlikte geleneksel hastalık tedavisinde kullanılan ilaçların ve terapötik ajanların nanoparçacıklar ile konjugasyonu yönünde gelişmeler yaşanmıştır (Ferrari, 2005; Sanvicens and Marco, 2008; Farokhzad and Langer, 2006). Hastalık teşhisinde doku seçimli görüntüleme sistemlerinin geliştirilmesi nanoteknoloji ile sağlanmıştır. Aynı zamanda, nanoboyuttaki yapıların tanıdığı tedavi verimini artırma ve istenmeyen yan etkilerin azaltılması gibi imkanlar sunan fiziksel özellikleri (özel ilaç salınım özellikleri, düşük immünojenite vb.) ile nanoparçacıklar ilaç taşıyıcı olarak geliştirilmektedirler (Torchilin, 2006; Boyd, 2008). Bu özgün görüntüleme ve tedavi imkanları ile nanoboyuttaki materyallerin akılcı kombinasyonu sonucu gerçek zamanlı ilaç tedavisi izleme ve *in vivo* görüntüleme yöntemleri geliştirilmektedir (Torchilin, 2006; Sun et al., 2008).

Terapi ilaçları damar yoluyla verildiğinde vücut içerisinde genel dağılıma sebep olur. Bu sebeple hedeflenmiş hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde zarar verici şekilde yan etki gösterir (Chunfu et al., 2004).

Bölgesel kanser tedavisi yaklaşımları ile kemoterapik ilaçların sisteme taşınması, bölgesel etkinliği sağlamanın bir yoludur. Bölgesel terapi kullanılarak, tümör bölgesinde daha yüksek ilaç konsantrasyonu sağlamak mümkündür. Bu sebeple kanser tedavisinde ilaç taşıma metotlarının uygulanabilmesi için manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi amaçlanmıştır. Manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi kullanılmasıyla; yan etkilerin giderilmesi, sitotoksik ilaçların sistem içindeki dağılım miktarının azalması ve ihtiyaç duyulan doz miktarının azaltılması amaçlanır (Chunfu et al., 2004; Häfeli, 2004).

Manyetik ilaç hedefleme, insan vücudunda doğru bölgeye, doğru dozda, istenilen zamanda, tedavi edici ilaçların ulaştırılması için manyetik parçacıkların ve manyetik alanın kullanılmasıdır.

Manyetik ilaç iletimi son 20 yıldır hareketli bir çalışma alanıdır. Windder ve arkadaşları tarafından amaçlanan manyetik hedeflemenin genel düşüncesi, bir

manyetik alan etkisinde kalan ilaçla kaplı maddenin enjekte edilmesi ve sonrasında hedef bölgeye ilaç matriksini yönlendirmek için harici olarak bir mıknatısın kullanılmasına dayanmaktadır. Hedeflemenin etkisi manyetik alan şiddetine ve parçacıkların dolaşımdaki kalma süresine bağlıdır (Rudge et al., 2000).

Manyetik ilaç taşıyıcılar, farmasötik ajanların istenilen bölgede spesifik dağılım göstermesi için geliştirilmektedir. Bu parçacıklar demir ve aktif karbon içerebilir. Manyetik ilaç taşıyıcılar yüksek manyetik hassaslığı sebebiyle manyetik alanın fiziksel etkisiyle hedeflenen alana gönderilebilir. Manyetik ilaç taşıyıcıların damar duvarlarına herhangi bir zararı da gözlenmemiştir (Häfeli et al., 2001, 2003; Häfeli, 2004).

Yaklaşık 40 yıldır *in vitro* teşhislerde nanoparçacıkların uygulamaları kullanılmaktadır. Büyük bir yüzey alanının hacme oranı ile ilgili yararlı faktörlerin olması ve her yerde olan dokulara ulaşabilme kabiliyeti sebebiyle bu parçacıklar tercih edilir. Son on yılda artmış olan araştırma ve geliştirmeler nano boyuttaki manyetik parçacıklar alanında gözlenmiştir (Smith et al., 2010).

Manyetik uyumlu mikrosferlerin geliştirilmesi, bu alana yeni bir güç getirmektedir. Manyetik sıvılara bağlı parçacıklar uygulanan manyetik alan etkisiyle kısıtlı erişime sahip anatomik bölgelerde ilaçları konsantre etmek, hücre ve moleküllerden uzaklaştırmak için kullanılabilir. Bunun yanında manyetik parçacıkların antikorlar, lektinler, peptitler, proteinler, nükleik asitler veya hormonlarla modifikasyonu bu uygulamaları daha etkili ve yüksek seçici yapar. Bu iki avantajın birleşimi, manyetik mikrosfer uygulamalarını moleküler ve hücre biyolojisinde, artmakta olan temel bilim ve klinik çalışmalarda oldukça başarılı yapar (Lübbe et al., 2001; Häfeli et al., 2003).

2.3.2 Demir nanoparçacıklar

Uygun yüzey kimyasına sahip süper manyetik demir oksit nanoparçacıklar manyetik rezonans görüntüleme kontrast ajanı, doku iyileştirmede, biyolojik sıvıların detoksifikasyonunda, hipertermi, ilaç taşıma, kök hücre izleme, hücre ayırma ve hücre izolasyonu gibi *in vivo* uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır

(Mahmoudi et al., 2011; Gamarra et al., 2008; Mohammad et al., 2010; Qian, 2002; Brähler et al., 2006; Mahmoudi et al., 2010; Garcia-Bennett et al., 2011; Xu et al., 2004; Sokolov et al., 2003; Kemmner et al., 1992; Kronick and Gilpin, 1986; Alexiou et al., 2002; Casula et al., 2010).

Nanoparçacıklar bazı materyaller ile birleştirildiğinde eşsiz kimyasal, optik, elektronik, manyetik ve mekanik özelliklere sahip olur. Manyetik parçacıkların yüksek manyetizasyon doygunluğu ve manyetik hassaslığı farmasötik ve medikal uygulamalar için büyük bir kazançtır. Örneğin mükemmel bir manyetik doygunluğa ($\sim 78 \text{ emu/g}$) sahip olan Fe_3O_4 manyetit nanoparçacıkları diğer birçok materyale (demir, nikel ve kobalt vb.) oranla güçlü ferromanyetik davranışları, nispeten düşük toksisitesi ve oksidasyona duyarlılığın az olması nedeniyle bu uygulamalar için tercih edilir. Bu manyetit nanoparçacıkları pH= 9-10 da amonyum hidroksit varlığında Fe(II) ve Fe(III) klor tuzlarının çökmesi ile üretilebilir ve apolar çözücülerde oleik asit ile kolaylıkla kararlı hale getirilebilir (Asmatulu et al., 2005).

Yakın zamanda, çeşitli süpermanyetik demir oksit nanoparçacıkların erken klinik denemeleri ile deneysel aşamadaki çalışmalarını yürütülmektedir ve medikal görüntüleme ile beraber terapötik uygulamalarda kullanılan çeşitli formülasyonlar geliştirilmiştir (Sun et al., 2008; McCarthy and Weissleder, 2008; Laurent et al., 2008). Örneğin: Combidex® lenf nodülü metastazının görüntülenmesinde, Ferumoxytol® demir değişim tedavisinde (iron replacement therapy), Feridex IV® karaciğer ve dalağın görüntülenmesinde, Lumiren® bağırsak görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Bonnemain, 1998; Wang et al., 2001; Harisinghani et al., 2003; Singh et al., 2008). Süpermanyetik demir oksit nanoparçacıkların sahip oldukları fizikokimyasal özellikler sonucu pasif hedefleme gerçekleştirilebilirken bu taşımanın verimi biyoligand moleküller ile yapılan hedeflemelere kıyasla daha azdır. Biyoaktif moleküllerin süpermanyetik demir oksit nanoparçacık yüzeyine konjugasyonu sonucu hedef spesifikliğini arttırmaktadır (Sun et al., 2008; McCarthy and Weissleder, 2008; McCarthy et al., 2007; Lee et al., 2007). Biyoaktif moleküllerin demir nanoparçacıklar ile konjugasyonu sonucu ilaç moleküllerinin sağlıklı dokular yerine kanserli bölgelerde spesifik olarak birikmesi hedeflenir iken kontrast ajanlarının görüntüleme sırasında spesifik bölgelerde ışımaya yapması

sağlanır (Pankhurst et al., 2003; Tartaj et al., 2003; Goya et al., 2008; Sun et al., 2008).

Süpermanyetik demir oksit nanoparçacıklar üzerindeki boyut ve şekil gibi parametrelerde değişim ile farklı kaplama materyali ve yüzey modifikasyonları sonucu hücresele düzeyde hedefleme sağlanabilir.

Tüm bu biyomedikal uygulamalarda demir nanoparçacıklar yüksek manyetizasyon değeri, 100 nm'den küçük boyut ve uygun parçacık boyutu dağılımı göstermelidir. Aynı zamanda, nanoparçacıklar üzerinde yapılan yüzey modifikasyonları biyo-uyumlu olmalı ve toksik etki göstermemelidir. Yüzey üzerindeki hedeflenebilir moleküller sayesinde ise parçacıkların istenilen dokularda birikimi sağlanır. Süpermanyetik demir oksit nanoparçacıkların sahip oldukları manyetik özellikler ile manyetik alanda yönlendirilebilirler. Bu sayede nanoparçacıklara konjuge edilen ilaç, protein, enzim, antikor veya nükleotidler arzu edilen doku, tümör veya organa spesifik olarak gönderilebilir (Chastellain et al., 2004).

2.3.3 Altın nanoparçacıklar

Altın nanoparçacıklar en stabil metal nanoparçacıklardır ve farklı şekillerde bir araya gelmeleri, taneciklerin bireysel olarak davranışları, boyutla değişkenlik gösteren elektronik yapısı, manyetik ve optik karakteristikleri (kuantum boyutu etkisi) gibi özelliklerinden dolayı oldukça dikkat çekicidirler.

Kemoterapide günümüzdeki en büyük problem etkili ve terapötik olarak seçimli olan ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesidir (Allen and Cullis, 2004). Aktif ve pasif hedefleme yaklaşımları dendrimer, lipozom, metal nanoparçacıklar, polimer miseller ve veziküller gibi nanotaşıyıcılar ile gerçekleştirilmektedir (Crampton and Simanek, 2007; Lee et al., 2005; Peer et al., 2007; Brannon-Peppas and Blanchette, 2004).

İlaç taşıma sistemi olarak altın nanoparçacıkların kullanılması oldukça yaygınlaşmaktadır. Altın nanoparçacıkları sahip oldukları eşsiz özellikleri sonucu

ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesinde yeni bir kapı açmıştır. 1-10 nm boyutlarındaki nanoparçacıkların elektronik yapılar gösterdiği belirlenmiştir (Alivisatos, 1996). Nanoparçacıkların yapısal çeşitliliği sayesinde parçacık yüzeyine çeşitli hedefleyici ajanlar ve/veya kemoterapik maddeler bağlanabilir. Ek olarak, elde edilen çekirdek toksik etki göstermezken, biyouyumlu ve inerttir (Tsoli et al., 2005; Connor et al., 2005; Bhattacharya and Mukherjee, 2008a).

Altın nanoparçacıkların fonksiyonel olasılıklarının çeşitliliği ilaç hedefleme sistemlerinin dizaynında farklı yaklaşımlara imkan tanımaktadır. Hidrofobik ilaçlar kovalent olmayan etkileşimler ile ilaç salınımı için yapısal modifikasyonlara gerek duyulmayacak şekilde altın nanoparçacıklara bağlanabilir (Park et al., 2009). Benzer şekilde, yıkılabilir bağlar aracılığı ile altın nanoparçacıklara kovalent olarak bağlanan ilaçlar hedef hücrelere ulaştırılır ve iç veya dış uyarıcılar sonucu parçacıktan salınırlar (Hong et al., 2006).

İlaç taşıma sistemlerinin verimli bir şekilde kullanılabilmesi için hücre ile hedeflemede kullanılan parçacık arasındaki ilişki detaylıca bilinmelidir. Yük, boyut ve yüzey özellikleri hücresel absorpsiyonu ve moleküllerin hücre içindeki davranışlarını etkilerler (Cho et al., 2008; Ferrari, 2008). Hidrofobiklik, parçacık boyutu ve yük nanoparçacıkların hücre içine alınmasını etkileyen önemli parametrelerdir (Jiang et al., 2008; Zhu et al., 2008). Yapılan çalışmalar sonucunda hücre içine parçacıkların alınması için en uygun boyut aralığının 20-50 nm olduğu gösterilirken, apoptosis ise 40-50 nm boyutundaki parçacıklar ile etkili olarak sağlanabildiği de belirtilmiştir (Perrault et al., 2009).

2.3.4 AuFe nanoparçacıklar

Son 10 yılda bakır oksit, demir oksit, çinko oksit ve alüminyum oksit gibi metalik nanoparçacıkların biyomedikal uygulama alanında olası kullanımı üzerine geniş çalışmalar yapılmıştır (Bystrzejewski et al., 2007; Bhattacharya and Mukherjee, 2008b; Gupta and Gupta, 2005; Ansari and Husain, 2011; Ansari et al., 2011). Bunlardan en popüler olan parçacık tipi AuFe'dir. Demir oksit çekirdeği ve altın nano-kabuklardan oluşan bu hibrid nanoparçacıklar, görüntüleme çalışmaları ve ilaç taşıma sistemlerinde kullanılmak üzere yoğun beklenti doğurmuştur.

Metal parçacıkların biyolojik ortamlarda kullanılması için yüzey üzerindeki işlemlerin dikkatli bir şekilde yerine getirilmesi gerekmektedir. Genel olarak bu problem yüzey polimerler ile kaplanarak aşılımaya çalışılmıştır (Thanh and Green, 2010). Ancak, bu esnek yapıdaki polimerlerin metal çekirdeklerini tam olarak koruyamadığı ve sonucunda yıkım sonrası serbest radikallerin oluştuğu görülmüştür (Hoskins, Cuschieri, et al., 2012). Oluşan bu serbest radikallerin hücresel strese sebep olduğu ve bu olayın hücre ölümü ile sonlandığı belirtilmiştir (Minotti and Aust, 1987; Gren et al., 1987). 2012 yılının başlarında, manyetik rezonans görüntüleme yönteminde kontrast ajanı olup klinik olarak kullanılan Feridex®'in hastalarda serbest radikaller kaynaklı beklenmeyen yan etkiler göstermesi üzere kullanımdan kaldırılmıştır.

Modern nanoteknolojideki gelişmeler sonucu metalik alaşım nanoparçacıkların üretilmesine olanak sağlanmıştır. Alaşım nanoparçacıklar, iki veya daha fazla metalik bileşikten oluşmaktadır. Metallerin tek tek sahip oldukları özellikleri ile farklı karakteristiklerde nanoparçacıklar kombine edilebilmektedir.

İki veya daha fazla metalin oluşturduğu nanoparçacıklar aynı zamanda hibrid nanoparçacıkları da kapsamaktadır. Hibrid nanoparçacıklar, bir metal çekirdek ve bu çekirdeğin farklı bir metalle kaplandığı nanoparçacıkları ifade eder. Bu alanda altın kaplı demir oksit nanoparçacıklar önemli bir yere sahiptir (Goon et al., 2009; Zhang et al., 2010; Smolensky et al., 2011). Dış yüzeydeki altın kabuk sayesinde yapı daha kararlı hale gelirken, altın kabuğunun etrafının çeşitli polimer ile kaplanması sonucu biyolojik ortamdaki dayanıklılığı daha da arttırılabilir. Demir oksit etrafının altın ile kaplanması, çekirdeğin dış ortamdan izole edilmesini ve serbest radikal oluşmasını engeller (Hoskins, Cuschieri, et al., 2012). Bu da nanoparçacıkların stabilitesini ve biyolojik ortamlardaki inertlik süresini arttırır. Ayrıca, altın kaplı demir nanoparçacıklarda agregatlaşma ve oksidasyon miktarının çıplak demir nanoparçacıklara göre daha az olduğu görülmüştür. Kolloidal altın parçacıklar eşsiz yüzey plazmon rezonansları ile bilinirler. Bu olay sırasında, uygun dalga boyundaki ışık fotonu ile uyarılan nanoyapılarda ışık absorbe edilir ve sonrasında saçılır. Bu absorpsiyon sırasında ışığın enerjisi termal enerjiye çevrilir ve sonuç olarak parçacık ısınır (Jain et al., 2007). Manyetik ve rezonans

özelliklerinin tek bir nanoparçacıkta toplanması biyomedikal uygulamalarda büyük potansiyel sunmaktadır. Bu teknik sayesinde, hücreler ile etkileşime geçebilecek tanıyıcı roldeki biyomoleküllerin ve ilaç maddelerinin biyo-uyumlu taşıyıcılar yardımıyla bir arada istenilen hücre veya doku hattına aktarımı gerçekleştirilebilir.

Altın kabuğun amin ve tiyol gruplarına karşı sahip olduğu afinite sayesinde nanoparçacıkların yüzeyinin organik moleküller ile işlenmesi kolaylaşmaktadır (Daniel and Astruc, 2004). Tüm bu özellikleri sayesinde altın kaplı demir nanoparçacıklar görüntüleme, ilaç taşıma ve hedeflemede kullanılması planlanmaktadır.

2.4 CDK İnhibisyonu ve Kanseri Terapisi

2.4.1 Siklin bağımlı kinazlar (CDKs, cyclin-dependent kinases)

Siklin bağımlı kinazlar, aktivitesi siklin partnerlerinin bağlanması veya yan gruplarının aktivasyonu ile değişen serin/threonin protein kinaz grubuna ailesine ait olan, 30-40 kDa molekül ağırlığına sahip olan hücre döngüsünde önemli bir enzim ailesidir. Bu heterodimerik kompleksler farklı uyarıcı cevaplar oluşturacak şekilde çeşitli substratları fosforilleyerek transkripsiyon ve hücre döngüsünü düzenlerler (Malumbres and Barbacid, 2005). Memelilerde yaklaşık 13 tip CDK'nın varlığı bilinmektedir. Bunlar arasında % 40-75 arasında yapısal benzerlik vardır. Aynı zamanda diğer serin/threonin protein kinazların katalitik bölgeleriyle de benzerlik bulunmaktadır (Pines, 1994; Nigg, 1995). Hücrenin normal döngüsünün devam edip etmediğinin kontrolü için CDK aktivitesi üzerinden birçok denetleme mekanizması vardır.

Mayalarda proses tek bir CDK (bölünen mayalarda CDK1, tomurcuklanan mayalarda CDC28) üzerinden yürürken gelişmiş ökaryotlarda hücre döngüsünde farklı tipte CDK'nın kullanıldığı görülmüştür (Nasmyth, 1993; Müller, 1995).

Siklin bağımlı kinazlar, hücre döngüsündeki rolleri ve transkripsiyon seviyesinde regülasyonlarına göre işlev açısından iki gruba ayrılmış, katalitik kinaz alt birim ve düzenleyici siklinden oluşan heterodimerik komplekslerdir (Meyerson

et al., 1992; Sausville, 2002). Hücre döngüsü mekanizmasında rol oynayan CDK'lerden siklinD bağımlı kinaz 4 ve siklinE bağımlı kinaz2 sırasıyla retinoblastoma proteini (Rb) fosforiller ve G1'den S fazına geçmeyi tetikler (Sherr, 1994). siklinA bağımlı kinaz2 ve 1 ile siklinB bağımlı kinaz1 S fazındaki işlemlerde ve G2'den M fazına geçiş için gereklidir (Pines, 1994). CDK'lar, CDK aktifleştirici kinaz (CAK) tarafından pozitif regülasyon ile denetlenir (Harper and Elledge, 1998). Aynı zamanda, endojen Cip/Kip veya INK4 (inhibitor of cdk4) ile negatif regülasyon da bulunmaktadır (Sherr and Roberts, 1995; Morgan, 1995).

Siklin seviyeleri transkripsiyon ve protein devinimi ile düzenlenir. Siklinlerin transkripsiyonel kontrolü tam olarak anlaşılammıştır. D-tipi siklinlerin ekspresyonu sitokinler tarafından indüklenir. Böylece büyüme faktörleri hücre döngüsü işlemini başlatabilir (Matsushime et al., 1991). Tomurcuklanan mayalarda erken G1 siklin-CDK kompleksleri, geç siklinlerin sentezlenmesini destekler, benzer durum daha gelişmiş ökaryotlarda da görülebilir (Nasmyth, 1993; Müller, 1995). Siklin gen transkripsiyonunun regülasyonuna ek olarak, siklin protein seviyeleri de aynı zamanda kontrol edilir. Örneğin, a-tipi ve b-tipi siklinlerin hızlı yıkımı hücrenin mitozdan çıkması için gereklidir ve bu işlem ubiquitinleme işlemi ile yapılır (Irniger et al., 1995; Murray, 1995).

Monomerik CDK'lar ile siklin bağı CDK'ların enzimatik ölçümlerinin kıyaslanması sonucu siklin bağı formun 40000 kat kinaz aktivitesine sahip olduğu görülmüştür (Connell-Crowley et al., 1993). Bu sonuçtan CDK'ların etkin şekilde kinaz etkisi göstermesi için siklin grubunun bağlanması şart olduğu görülmektedir.

siklinA-CDK2'nin kristal yapısının çözülmesi sayesinde aktivasyon işlemi ve diğer siklin-CDK etkileşimleri hakkında bilgi elde edilmiştir. siklinA-CDK kompleks yapısı monomerik CDK2 ile kıyaslandığında, siklinA'nın bağlanması CDK2'de belirgin yapısal değişikliklere sebep olmaktadır (Russo et al., 1996). Tüm CDK'ların regülasyonu siklin ailesiyle desteklenir; siklin A (CDK1, CDK2), siklin B1-B3 (CDK1), siklin D1-D3 (CDK2, CDK4, CDK5, CDK6), siklin E (CDK2, CDK7). Hücre döngüsü mekanizmasında geçiş fazlarının CDK/siklin kompleksleriyle düzenlendiği düşünülmektedir; G1/S geçişinde (CDK2/ siklin E,

CDK3/ bilinmeyen siklin, CDK4/ siklin D1-D3, CDK6/siklin D3), S fazında (CDK2/siklin A), G2/M geçişinde (CDK1/ siklin B) (Meyerson et al., 1992).

Kanser hücrelerinde, CDK'ların ve bunların düzenleyicilerinin ekspresyonunun değişmesi (aşırı siklin ekspresyonu veya inhibitör ekspresyonunun azalması) ile CDK regülasyonunda sorun görülür ve hücrede aşırı bölünme ile sonuçlanır (Sherr, 1996; Hall and Peters, 1996). Transkripsiyonel regülasyonda görev alan CDK'lar ise (siklinH-cdk7 ve siklinT-cdk9) yeni oluşturulmuş RNA dizilerinin başlatılması ve uzatılmasını RNA polimeraz II'nin karboksil terminal gruplarını fosforilleyerek düzenler (Prelich, 2002; Meinhart et al., 2005). Bunun gibi hücre döngüsü ve transkripsiyonel aşamalarda düzenleyici rolü sebebiyle CDK'lar kanser ilaçlarının araştırılmasında umut verici olarak görülmektedir. Bu yüzden tümör hücrelerinin bölünmesinin engellenmesi veya yavaşlatılmasında CDK aktivitesinin regülasyonu büyük önem taşımaktadır (Cook et al., 2005; Shapiro, 2006). Ek olarak, CDK4'deki mutasyon sonucu, INK4 ailesinden olan CDK inhibitörlerine karşı duyarsızlık oluşması kalıtsal melanomalarda görülmüştür. Bu gözlemler birçok tümör model sistemleri ile yapılan deneyler ile tekrarlanmıştır. CDK regülasyonu ve aktivitesindeki anormallikler viral enfeksiyon, iskemi, travmatik beyin hasarı ile Alzheimer, Parkinson ve Nieman-Pick hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklarda görülmüştür. Bu geniş çaplı hastalıklar nedeniyle terapötik amaçlı küçük moleküler yapıdaki CDK inhibitörlerinin araştırılmasına başlanılmıştır.

CDK4 veya siklinD1'deki mutasyonlar meme, akciğer, pankreas, gastrointestinal, boyun, karaciğer ve prostat kanserlerinde görülmektedir. CDK6 mutasyonu ise lenfoma, sarkoma ve gliomalarda görülür. CDK2 mutasyonu kanser hücrelerinde nadiren görülür. CDK1'in anormal aktivasyonu meme, kolon, prostat, oral ve akciğer kanserlerinde görülür (Malumbres and Barbacid, 2009; Malumbres and Barbacid, 2001).

CDK1, CDK4, CDK11 hücre döngüsü mertebesinde etki ederlerken, CDK7 ve CDK-aktive edici kinaz (CAK) transkripsiyon mekanizmasının düzenleyicisidir. CDK8 ve CDK9 ise RNA polimeraz II transkripsiyonunun kontrolü üzerinde etkisi olduğu düşünülmektedir.

Kullanılan ilk CDK inhibitörü olan staurosporine, geniş yelpazede birçok kinaza etki edebilmektedir (Lawrie et al. 1997). Meijer ve arkadaşları pürinlerin özellikle CDK2 başta olmak üzere CDK üzerinde etkili olduğunu gösterdiler (Brachwitz et al., 2003). Ayrıca, pürin izoesterleri ve biaril pürinlerin de inhibitör etki gösterdiği görülmüştür (Popowycz et al., 2009; Trova et al., 2009).

Flavopiridol (Sanofi-Aventis), SNS032 (Roche), ve Seliciclib (1, R-roscovitine, CYC202 (Cyclacel) klinik denemelerde incelenmektedir. Diğer ilaç adaylarından olan AZD5438 (Astra Zeneca) ve AT519 (Astrex) hakkında da çeşitli yayınlar bulunmaktadır (Wyatt et al., 2008).

2,6,9-trisubstituted pürin analogları (Olomoucine ve Roscovitine) ve purvalanoller bazı CDK'larda inhibitör etkisi göstermektedir. Bu inhibitörler, hedeflenmiş CDK'nın ATP bağlanma bölgesini yarışmalı olarak inhibe ederler (Gray et al., 1998).

Yaklaşık 24 CDK inhibitörü şu an geliştirilme ya da klinik aşamasındadır. Bu moleküller pürinler, alkaloidler, bütirolaktonlar ve flavonoidler olarak sınıflandırılabilir (Chang et al., 1999; Rizzolio et al., 2010). Bu moleküllerde yapısal farklılıklar bulunmasına rağmen genel olarak CDK'nın ATP bağlanan aktif katalitik bölgesini inhibe eder (Davies et al., 2002; Knockaert et al., 2002). CDK'lar ile çoğu protein kinazın katalitik bölgesinin sekans benzerlikleri nedeniyle inhibitörlerin spesifikliğı temel endişe nedenidir. Ek olarak, intrasellüler iletim ve tümör hücrelerine dağılım konusunda da zorluklar bulunmaktadır. Bu yüzden, uygun CDK inhibitörünün geliştirilmesi terapötik ilaçların üretiminde etkili bir yol olabilir.

Bu zamana kadar hiçbir CDK inhibitörü ticari kullanım için izin almamıştır. Flavopiridol ve CY-202'nin, faz II ile faz III çalışmaları devam etmektedir. CY-202 mikromolar seviyesindeki dozlarda CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK7 ve CDK9 üzerinde etkindir (King et al., 1995). Her ne kadar Flavopiridol'ün tedavisi geç kronik lenfositik lösemi üzerinde etki gösterse de CDK inhibitörlerin hakkındaki başlangıç hedefleri tutturulamamıştır.

2.4.2 Hücre döngüsü hedefli tedavide farmakolojik kaygılar

Basit olarak hücre döngüsü, bir sonraki olayın meydana gelmesi için bir önceki olayın gerçekleşmesi gerektiren ve sınırlı süreler içerisinde regüle edilen seri olaylardan meydana gelir.

Farmakolojik olarak hücre döngüsünü tüm periyotları boyunca kapsamak için ilaç bileşeninin, etki mekanizması süresince uygun farmakokinetik ve güvenlik özellikleri göstermelidir. Uzun süreli intravenöz enjeksiyon ile klinik olarak bu özellikler elde edilebilir. Uzun süreli intravenöz enjeksiyon etkili bileşikler veya etkisi kısıtlı bileşiklerde oldukça işe yarar. İdeal olarak, sağlıklı dokularda toksik olmadığı tahmin edilen CDK inhibitörlerinin oral yoldan alınmasının sorun teşkil etmemesi gerekir ve uygulama sırasında uygun süre boyunca tüm hücrelerde farmakodinamik özelliklerini göstermelidir. pan-CDK inhibitörlerinin uygulama süresi için gerekli vakit bu inhibitörlerin hücre döngüsünde farklı noktalarda etki gösterdiği için tahmin edilmesi zordur. CDK inhibitörlerinin sitotoksik (cisplatin, 5 fluorouracil, doxorubicin ve paclitaxel vb.) ilaçlar ile birleşmesini konu alan birçok çalışma bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre, hücrelere eş zamanlı etki edildiğinde veya hücreler belirli fazlarda yakalandığında CDK inhibisyonu daha iyi terapötik etki göstermektedir (Kelland, 2007). Bu tarz kombinasyonların toksisite gibi problemler sebebiyle uygulanması zordur. CDK inhibitörlerinin klinik denemelerinde farmakolojik inhibisyon için ek moleküler bilgilerin elde edilmesi gerekmektedir.

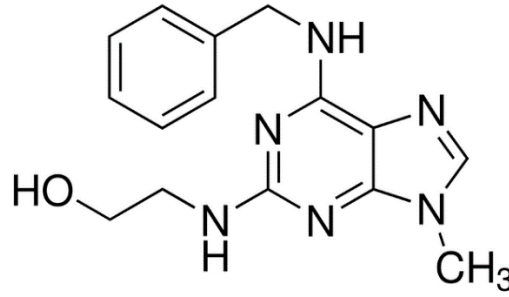
Genetiği değiştirilmiş fareler üzerinde yapılan çalışmalardan çıkan sonuçlara göre, hücre döngüsünün farklı fazlarında hücre döngüsü ile alakalı CDK'ların ardışık olarak etki göstermesini destekleyen bilgiler elde edilmemiştir (Fesquet et al., 1993; Solomon et al., 1993; Mäkelä et al., 1994). CDK2, CDK4 ve CDK6 gibi bilinen interfaz kinazlarının dengeleyici özellikleri bu sonucun elde edilmesine sebep olmuş olabilir. Bir diğer interfaz CDK'sı olan CDK3 bu modellerde doğal yolla oluşan mutasyon sebebiyle inaktive olduğu için hücre döngüsünde rol oynamamaktadır. Ek olarak, bu çalışmaların sonunda bu CDK'lardan her birinin farklı hücre tiplerinde diğer CDK'lar tarafından telafi edilemeyen görevleri olduğu görülmüştür.

Örneğin, CDK2'nin genetik olarak silinmesi sonucu hücrede bariz anormallikler gözlemlenmemiştir ve CDK2 geni olmayan yaşayan fareler görülmüştür (Berthet et al., 2003; Ortega et al., 2003). Bu fareler ilk mayotik fazda takılı kalmışlardır ve CDK2'nin embriyo hücrelerinde önemli role sahip olduğu görülmüştür. CDK4 geninin silinmesi ile hipofiz endokrin hücreleri ve olgun pankreatik β hücrelerinde proliferasyon hızı azalmaktadır. Ancak, CDK4 ve CDK6 genlerinin birlikte silinmesi sonucu 16,5. embriyonik günden sonra kısa süre içinde yok olan hematopoetik prekürsörlerin proliferatif potansiyellerinde düşüş görülmüştür (Malumbres et al., 2004). Benzer olarak, CDK6 geninin silinmesi sonucu akyuvar hücrelerinin sayısı azalır. Bu fare modellerinde diğer hücre tiplerinde farklılık görülmemiştir (Fisher and Morgan, 1994). Benzer şekilde CDK2 ve CDK4 genlerinin silinmesi ile embriyonik kardiomyositlerin proliferasyonları etkilenir (Berthet et al., 2003; Barrière et al., 2007). Bu iki etki tekli silinme olaylarında görülmemektedir. Tüm interfez CDK'ların (CDK2, CDK4 ve CDK6 ile diğer tüm fare modellerinde de silinmiş olan CDK3 dahil olacak şekilde) silindiği durumlarda organogenesis oluşur ancak 12,5. embriyonik günde erken hematopoetik etki sonucu mutant embriyolar ölmüştür (Santamaría et al., 2007). Genetik modellemelere göre, tek bir CDK tipinin spesifik inhibisyonu sınırlı toksik etki gösterirken, çoklu CDK inhibisyonunda toksisite artmaktadır. Belirli onkogenik aktivite ve hücre tiplerinde tek bir CDK ailesinin inhibisyonu kanserden ve çeşitli onkogenik aktivitelerden korumayı sağlayabilir (Yu et al., 2006; Landis et al., 2006; Malumbres and Barbacid, 2006).

CDK inhibitörlerin hakkındaki cevaplanmamış en önemli soru hangi CDK'nın hedefleneceğidir. Spesifiklik ile etki arasındaki ilişki her bir hücre tipi için genetik bilgi göz önüne alınarak değerlendirilmelidir.

2.4.3 Olomoucine

Neredeyse hücrel kontrol mekanizmalarının tamamı, protein kinazların yapısındaki proteinlerin serin, threonin ve tirozin bölgelerine fosfat gruplarının kovalent olarak bağlanması ile gerçekleştirilir. Protein kinazların sahip oldukları bu önemli görevin sonucunda hücrel döngülerin farmakolojik olarak kontrol edilmesi için inhibitör moleküllerin geliştirilmesi hedeflenmiştir (Hidaka and Kobayashi, 1992). İlk olarak, p16 (INK4, CDK4/siklin D1-D3 inhibitörü) ve p21'in (CIP1, SDI1, WAF1, CDK'ların genel inhibitörü) kanser ile direkt bağlantısı oldukları düşünüldüğü için tümör supresörü olarak düşünülmüştür (El-Deiry, 1993; Gu et al., 1993; Kamb et al., 1994). Kanser hücrelerinde CDK'ların regülasyon görevlerini yerine getirememeleri sebebiyle kanser müdahalesinde kullanmak için kimyasal CDK inhibitörlerinin araştırılması amaçlanmıştır.



Şekil 2.2 Olomoucine'in moleküler yapısı

Olomoucine [2-(2-hidroksietilamino)-6-benzilamino-9-metilpürin] ilk olarak, sitokin 7-glukoziltransferaz inhibitörü olarak dizayn edilmiştir (Parker et al., 1986). Bu molekülün sahip olduğu beklenmeyen özelliklerinin ortaya konmaya başlanmasıyla, CDK1 ile Olomoucine'in beraber co-kristallendirme çalışmaları yapılmıştır ve hücrel etkileri incelenmeye başlanmıştır (Glab et al., 1994; Abraham et al., 1995; Schulze-Gahmen et al., 1995). Olomoucine'in kinazlar üzerindeki etkisi 35 farklı kinaz üzerinde yapılan denemeler ile incelenmiştir ve kısıtlı sayıda kinaz üzerinde etki ettiği görülmüştür. Bu araştırmanın sonucunda Olomoucine'in CDK1, CDK2, CDK5 ve erk1 (MAPK3, Mitogen-activated protein kinase 3) üzerinde spesifik inhibisyon etkisi gösterilmiştir (Vesely et al., 1994). İlerleyen çalışmalarda ise Olomoucine'in aynı zamanda spesifik CDK4 inhibitörü olduğu belirlenmiştir (Meijer et al., 1997). Olomoucine/CDK2 co-kristal

analizlerinin sonucunda Olomoucine'in pürin halkasının CDK2 üzerinde ATP bağlanma bölgesi dışında bir yere bağlanarak inhibisyon etkisi gösterdiği belirtilmiştir (Schulze-Gahmen et al., 1995). CDK1 üzerinde ise Olomoucine 'in ATP bağlanma bölgesinde yarışmalı inhibisyon yaptığı ve afinitesinin ATP'ye göre daha fazla olduğu bildirilmiştir (Vesely et al., 1994). CDK'ların Olomoucine'in ile inhibisyonu sonucu, birçok tümör hücre hattından G1/S ile G2/M geçişinde duraklattığı ve apoptosisi tetiklediği *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda görülmüştür (Havlíček et al., 1997a; Chang et al., 1999).

Çizelge 2.1 Olomoucine'in protein kinazlar üzerindeki IC₅₀ değerleri

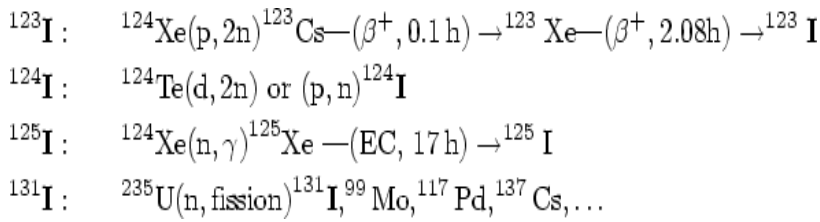
| İnhibe Olan Kinaz Tipi | IC ₅₀ | Kaynak |
|--|------------------|-----------------------------|
| CDK1/siklin B | 7 µM | (Azevedo and Leclerc, 1997) |
| MAPK3 (Mitogen-activated protein kinase 3, erk1) | 30 µM | (Azevedo and Leclerc, 1997) |
| CDK2/siklin A | 7 µM | (Vesely et al., 1994) |
| CDK2/ siklin E | 7 µM | (Vesely et al., 1994) |
| CDK5/p35 | 3 µM | (Vesely et al., 1994) |
| p44 MAP kinaz | 25 µM | (Vesely et al., 1994) |
| CDK6/siklinD3 | > 1 mM | (Vesely et al., 1994) |
| CDK4/siklinD | > 250 µM | (Alessi et al., 1998) |

Bir pürin temelli bileşik olan Olomoucine'in çeşitli bitki, tek hücreli ve hayvan hücresinde etkileri izlenmiştir. Tek hücreli alglerde G1/S geçişini inhibe ettiği, mezofil protoplastları G1 fazında duraklattığı ve denizyıldızı, *Xenopus* ve fare oositlerinin olgunlaşmalarını geciktirdiği görülmüştür (Glab et al., 1994; Abraham et al., 1995). Çeşitli tümör hücre hatlarının gelişimleri Olomoucine ile G1/S geçişinde durdurulmuştur (Schutte et al., 1997). Moleküler seviyede ise, DNA sentezine direkt etki *in vitro* olarak *Xenopus* ekstraktlarında görülmüştür (Vesely et al., 1994). Ek olarak, CTLL-2 hücre hatlarından elde edilmiş CDK1 ve CDK2 kinazlarının Olomoucine ile *in vitro* inhibisyonu gösterilmiştir. Bu sonuca göre

deneysel olarak G1/S ve G2/M'de gözlemlenen takılı kalma durumu hakkında bir açıklama yapılabilmektedir (Abraham et al., 1995). Akciğer tümörlerinde Olomoucine tarafından hücre döngüsü bloke edilirken, MDA-MB231 (insan meme kanseri) hücrelerinde ise CDK5 ekspresyonuna bağlı olarak Olomoucine'in yeterli inhibisyon etkisi gösteremediği belirtilmiştir (Goodyear and Sharma, 2007; Havlıcek et al., 1997b). Çizelge 2.1'de Olomoucine'in çeşitli protein kinazlar üzerindeki IC₅₀ değerleri gösterilmiştir.

2.5 Radyoaktif İyot İzotopları

İyot VIIA halojen grubuna ait metalik bir elementtir. Atom numarası 53 olan doğal iyodun 74 nötronu bulunur ve kütle numarası 127'dir. Yapay iyot izotopları 74 nötrondan az veya daha fazlasını içerecek şekilde oluşturulmuştur. İyodun bilinen 33 tane radyoaktif izotopu vardır (Pfennig et al., 1981). Bu izotoplardan ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I ve ¹³¹I günümüzde görüntüleme, tedavi ve *in vitro* çalışmalarda kullanılmaktadır. Ek olarak, ^{120m}I, ^{120g}I ve ¹²¹I gelecek vadede pozitron yayıcı iyot izotoplarıdır. Sıklıkla kullanılan radyoizotopların ticari üretiminde izlenen nükleer reaksiyonlar Şekil 2.3'de gösterilirken, Çizelge 2.2'de bu radyoizotopların bazı özellikleri belirtilmiştir (Vértes et al., 2011).



Şekil 2.3 Sık kullanılan radyoaktif iyot izotoplarının nükleer üretim reaksiyonları

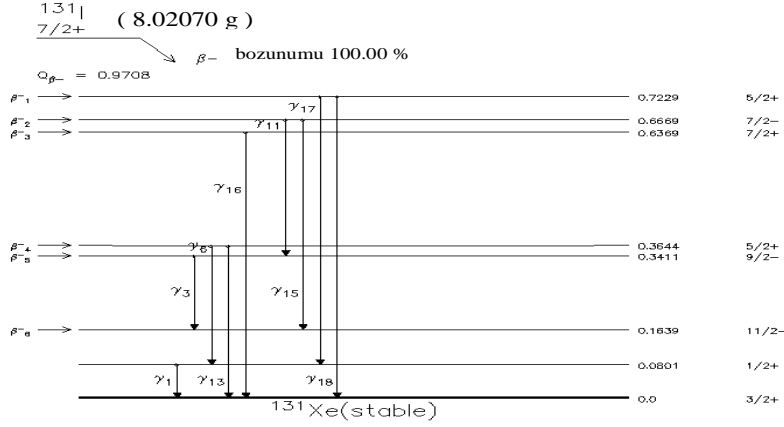
¹³¹I kararlı bir izotop olan ¹²⁷I izotopundan 4 nötron fazladır. Nötronca zengin ¹³¹I negatron bozunumuna gider. Böylece kararlı ¹³¹Xe oluşur. ¹³¹I ve ¹³¹Xe arasında transfer olan enerji temel basamakta 971 keV'dir. ¹³¹I'nin bozunumu sırasında birkaç β geçişi mümkündür. Çoğu durumda yalnızca maksimum enerjisi 507 keV olan β ışını salınır ve bu enerji β ile ν- arasında paylaşılır. Kalan 364 keV uyarılmış ¹³¹Xe çekirdeğinden temel düzeye geçiş sırasında γ ışını olarak salınır. ¹³¹I β ışınması nedeniyle terapi için uygun bir radyonüklid olmakla birlikte görüntüleme çalışmalarında da kullanılabilir. ¹³¹I'nin yarı ömrü 8 gündür. Bu süre

kullanılmak istenen radyofarmasötiği ticari olarak hazırlamak için uygun bir raf ömrüdür. ^{131}I β salınımından doğan yüksek radyasyon dozundan dolayı görüntüleme için kullanılmaz. Bunun yanında tiroid kanserlerinin tedavisinde yüksek dozda kullanılmaktadır. ^{131}I 'in avantajları şu şekilde sıralanabilir; ekonomiktir, 364 keV'lik γ radyasyonu ideal bir görüntüleme radyonüklidine göre yüksek olmakla birlikte organ görüntüleme için kullanılabilir ve γ ışınları pahalı olmayan sintilasyon dedektörleri ile dedekte edilebilir (Yurt, 1998; Kowlsky and Perry, 1987).

Çizelge 2.2 Sık kullanılan radyoaktif iyot izotoplarının temel özellikleri

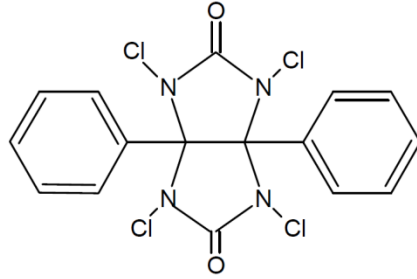
| İzotop | Üretim | Bozunum Tipi | Yarı Ömür | Spesifik Aktivite (GBq/ μmol) | Kullanım Alanı |
|------------------|-----------------|---------------------|-----------|---|---------------------------|
| ^{123}I | siklotron | EC | 13,2 saat | >600 | görüntüleme |
| ^{124}I | siklotron | EC/ β^+ (25%) | 4,18 gün | >30 | görüntüleme |
| ^{125}I | nükleer reaktör | EC | 59,4 gün | >90 | <i>in vitro</i> ve terapi |
| ^{131}I | nükleer reaktör | β^- | 8,04 gün | 110 | görüntüleme ve terapi |

Radyoışaretlemede kullanılan radyoiodot genellikle NaI formunda temin edilir. İşaretlemede I^+ 'un elektrofilik yer değiştirme reaksiyonunu verebilmesi için I^+ 'un uygun bir yükseltgeyici ajan ile yükseltgenmesi gerekmektedir. Radyoiodotun yükseltgenmesinde iodojen, kloramin-T (CAT), enzimatik yöntem ve elektrolitik metod gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.



Şekil 2.4 ^{131}I 'in bozunum şeması

İdojen (1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenilglükoril) radyoışaretlemede yükseltgeyici ajan olarak kullanılan ticari bir üründür. İdojen ile iyodinyonda kimyasal olarak -1 değerli iyodür şeklinde bulunan radyoaktif iyodu yükseltgeyerek, yükseltgenirken elektrofilik yer değiştirme ile radyoaktif iyot bağlanacak moleküle takılmasını sağlar.



Şekil 2.5 İdojen'in moleküler yapısı

İdojen yönteminde, İdojen klorofom veya diklorometan gibi bir organik çözücünde çözülür ve bu çözücünün çeşitli yollarla buharlaştırılmasıyla camın çeperinin İdojen kalıntıları ile kaplanması sağlanır. Daha sonra tüpün içine işaretlenecek örnek ve radyoaktif solüsyonu eklenir ve 15–20 dakikalık inkübasyon sonrası işaretleme tamamlanmış olur. İdojen metodunun en önemli uygulama alanı halkalı yapı içeren maddelerin radyoiodinasyonudur. İşaretleme verimi, dış şartlar ve işaretlenecek molekülün doğasına bağlı olacak şekilde % 90 - % 100 arasındadır (Medine, 2008).

2.6 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler

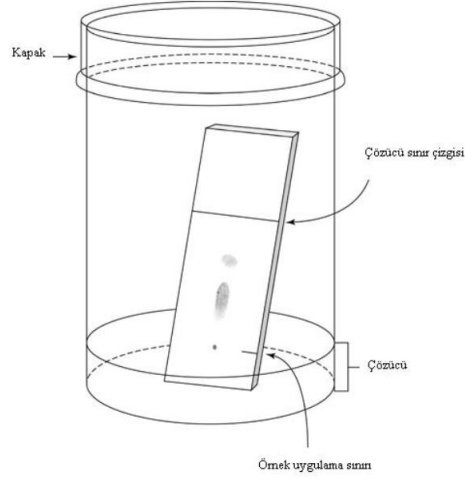
2.6.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Kromatografi, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir dolgu materyali üzerinde, çözgen molekülleri ile numune örneği arasındaki etkileşimlere bağlı olarak değişik hızlarla hareket etmeleri temeline dayanır.

İnce tabaka kromatografisi basit, ucuz, hızlı olması açısından oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Genellikle bir maddedeki mevcut bileşenleri belirlemek, ayırmak ve maddenin saflığını tayin etmek üzere kullanılır. Tıbbi bitkilerin bileşenlerinin analizi, ilaç analizleri, su ve yiyecek analizleri gibi analiz türleriyle gıda, ilaç, adli tıp, boya gibi geniş bir alanda etkindir

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olan absorban, cam, alüminyum ya da plastik plaklara ince bir tabaka halinde (genellikle 0,1-5 mm kalınlığında) kaplanmış olarak kullanılır. Absorban madde olarak silika jel, poliamid ve selüloz kullanılabilir.

İnce tabaka kromatografisinde, cam, alüminyum veya plastik gibi maddelerden yapılmış levhalar üzerine silikajel, selüloz, poliamid ve alüminyum oksit gibi materyallerin ince bir tabaka halinde (genellikle 0,1-5 mm kalınlığında) kaplanmasıyla elde edilen şeritler kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak ise tek veya karışım halindeki sıvı kimyasallar kullanılır. Hareketli faz ağzı iyi kapanan kromatografi tankı içine konulur ve tankın içinin çözücü buharı ile iyice doyması sağlanır. Tank içinde buhar doygunluğu istenilen seviyede olmazsa, kromatografisi yapılan numune içindeki maddelerin ayrılması yeterli olmadığı belirtilmiştir (Medine, 2008).



Şekil 2.6 TLRC yönteminde şeritlerin küvetlere yerleştirilmesi

Kromatografisi yapılacak numunenin yaklaşık $5 \mu\text{L}$ 'lik bir kısmı mikro pipet, kapiler boru veya enjektör yardımıyla tabakanın alt kenarından belirlenen bir uzaklıktaki uygulama noktasına damlatılır ve damlanın kuruması beklenir. Daha sonra kromatografi kağıtları tank içerisine dikkatlice yerleştirilerek hareketli fazın tabaka üzerinde yükselmesi sağlanır. Analiz edilecek numunelerin iyi bir şekilde birbirlerinden ayrılması için çözücü buharı ile doymuş tank kullanılmasının yanı sıra kromatografi kağıdını tank içine düzgün bir şekilde yerleştirmek de önemlidir.

R_f Değeri (Retention Factor); kromatogram üzerindeki her maddenin çözücü ile sürüklenme miktarı, birbirinden farklıdır. Maddenin sürüklendiği noktanın başlangıç noktasına uzaklığının toplam yürütme mesafesine oranına R_f değeri (alıkonma değeri) denir.

Yürütme işlemi sonunda kromatografi kağıdı tank içerisinden çıkartılıp çözücünün buharlaşması beklenir ve radyokromatogram tarayıcı cihazı ile kromatograma ait piklerin R_f değerleri ve yüzde miktarları görüntülenir.

2.6.2 Kağıt elektroforezi

Elektroforez sulu bir çözelti içinde çözülmüş veya süspansiyon halindeki küçük elektrik yüklü parçacıkların yüklerine bağlı olarak, uygulanan bir elektrik akımının etkisiyle göç etmesi prensibine dayanır.

Çözeltide bulunan bir iyon elektrik alan altında sabit hızla hareket eder. Bu hız uygulanan elektrik alanının şiddeti ve iyonun hareketlilik katsayısına bağlıdır. Aynı çözelti içinde bulunan fakat hareketlilik katsayısı farklı olan iki iyonun elektrik alan altında alacakları yol farklı olacaktır. Dolayısıyla yüklü iyonların elektrik alan altındaki göçlerinden yararlanılarak molekülleri ayırmak, özelliklerini ve konsantrasyonlarını belirlemek mümkündür (Kobayashi et al. 1994; Şensoy 2007).

Elektroforez cihazı güç kaynağı ve elektrik akımını ileten bir çözeltiyi içeren tanktan oluşmaktadır. Elektroforez işlemine başlamadan önce tank içerisine konulan çözelti hazırlanır ve kromatografi kağıtları bir süre çözelti içinde bekletilerek doymuş hale gelmesi sağlanır. Daha sonra kromatografi kağıtları bir ucu anot diğer ucu katot tarafına gelecek şekilde yatay olarak tank üzerine yerleştirilir. Numune anot tarafına damlatılır ve 1 saat boyunca 250V akım uygulanır. Bu süre sonunda kromatografi kağıtları kurutulur, radyokromatogram tarayıcıda taranarak kromatograma ait piklerin R_f değerleri ve yüzde miktarları görüntülenir.

2.6.3 Lipofilite

Lipofilite maddenin yağda çözünme eğiliminin ölçüsüdür ve lipid / su oranı şeklinde partiyon katsayısı olarak ifade edilir. Bu katsayı ne kadar büyükse; maddenin lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur (Coenen et al., 2006). Kimyasal bileşikler için yağ, petrol, lipid ve hekzan, toluen, oktanol gibi apolar çözümlerde çözünme yeteneğini gösterir (Theobald and Britain, 1989; Özyüncü, 2009).

Lipofilite ölçümleri, ilacın biyolojik aktivitesini belirleyerek ilacın fizikokimyasal özellikleri ile yapısını ilişkilendirmede kullanılmaktadır. Düşük dağılma katsayılı moleküller, sudan lipid membran içine yavaş yavaş dağılırken yüksek lipofilik olan moleküller, lipid membranın ilk tabakasına çabucak dağılırken burada tutulmaktadır. Deneysel olarak, ilaç moleküllerinin lipofilitesini tayin etmek için, kullanılan en yaygın sistem oktanol/su sistemi olduğu bilinmektedir (Özçelik, 2006).

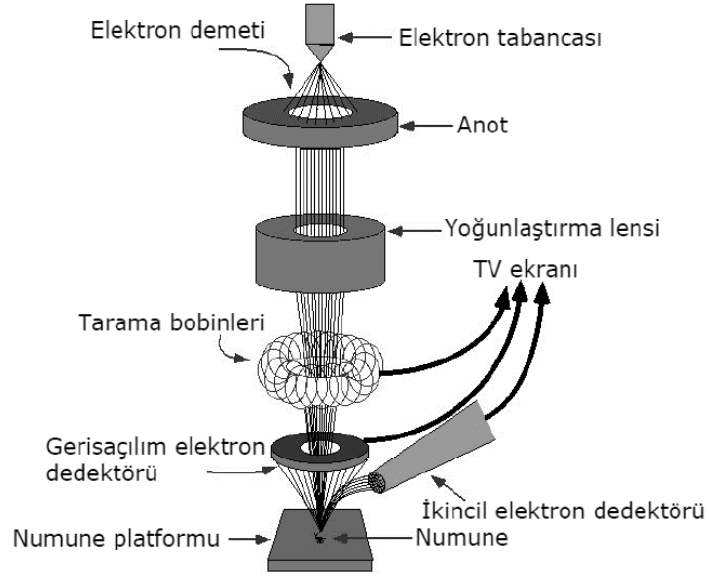
Lipofilite ölçümleri, ilacın biyolojik aktivitesini tayin etmek için onun fizikokimyasal özellikleri ve yapısını ilişkilendirmede yararlanır. Yapılan çalışmalar iyonların dağılma katsayılarının ($\log P_{oct}$) 2'den daha düşük olması gerektiğini göstermektedir. Düşük dağılma katsayılı moleküller, sudan lipit membran içine yavaş yavaş dağılacaklar, eğer alıcı, membranın içinde ya da ötesindeyse zaman aralıklarında ona ulaşmada düşük ihtimale sahip olacaklardır. Tersine, yüksek lipofilik olan moleküller, lipit membranın ilk tabakasına çabucak dağılacaklar fakat burada tutulacaklardır. $\log P_{oct}$ 'nin çok yüksek değerlerinden, ilaç absorpsiyonu ve protein bağlamadaki ters etkiler yüzünden kaçınılmalıdır (Medine, 2008).

2.7 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

2.7.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM, scanning electron microscope)

Taramalı Elektron Mikroskobu yüksek çözünürlüklü resim oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromanyetik lenslerle inceltiren elektron demeti ile incelenecek malzemeyi analiz etme imkanı sunar. İlk olarak 1935 yılında Max Knoll tarafından tasarlanmış ve denenmişken, ilk ticari SEM 1965 yılında üretilmiştir.

SEM ile yüksek çözünürlüklü yüzey resmi oluşturularak malzeme analizi yapılması sağlanır. SEM'de görüntünün oluşumunu sağlamak için, analizi yapılacak numune üzerine elektron demeti gönderilir. Numuneyi oluşturan atomlar ile elektronlar arasındaki çeşitli etkileşimler sonucunda oluşan; ikincil elektronlar, geri saçılan elektronlar ve karakteristik x-ışınları dedektörler tarafından tespit edilir. Elde edilen verilerin işlenmesi ile görüntü oluşturulur.



Şekil 2.7 SEM cihazının şematik yapısı

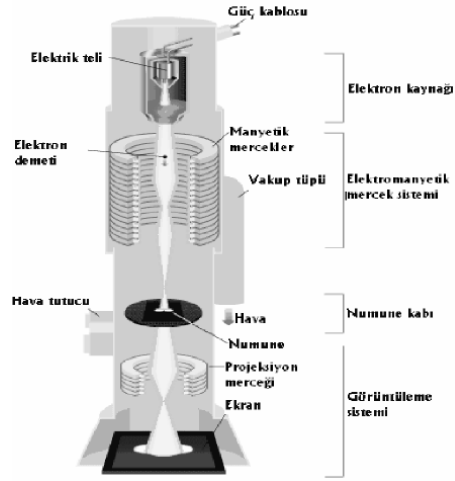
SEM genel yapı olarak üç temel kısımdan oluşur. Bu kısımlar; optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemidir. Optik kolon kısmında; elektron demeti oluşturmak için elektron tabancası, elektron demetini hizalamak için anot plakası, ince elektron demeti oluşturmak için yoğunlaştırma lensi, yoğunlaşmış demeti numune üzerine odaklamak için tarama bobinleri vardır. Görüntüleme sisteminde ise görüntü gösterimi için; geri saçılan elektron dedektörü ve ikincil elektron dedektörü bulunmaktadır.

Yüksek enerjili demet elektronları numune atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları oluşur. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır ve Auger Spektroskopisinin çalışma prensibini oluşturur. Yine yörünge elektronları ile olan girişimler sonucunda yörüngelerinden atılan veya enerjisi azalan demet elektronları numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanırlar. Bu elektronlar ikincil elektron olarak tanımlanır. İkincil elektronlar numune odasında bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir. İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesinde kullanılır (Klein et al., 2012).

2.7.2 Geçirimli elektron mikroskobu (TEM, transmission electron microscope)

Geçirimli elektron mikroskobu olarak isimlendirilen TEM 1982’de ilk defa ticari olarak Siemens tarafından piyasaya sürüldü. Geçirimli elektron mikroskobu, atom seviyesinde görüntü elde edilebilen hassas bir yöntem ve cihazdır. Bu yöntemin “taramalı elektron mikroskobu (SEM)” yönteminden farkı, TEM’de elektron demetinin örnek malzemenin içinden geçerek yol almasıdır. Elektron demeti kaynaktan yayıldıktan sonra mercekler aracılığı ile örneğe odaklanır. Örneğe gelen elektron demeti malzemenin içinden geçerek, malzemenin yapısına göre değişkenlik gösterecek şekilde farklı geçiş özelliklerine bağlı olarak görüntü sunar. Bu yöntemde elektron demeti incelenmek istenen örneğin içinden geçirildiğinden, örnek preparatlarının çok ince formda hazırlanması gerekmektedir. Analizi yapılacak preparat aşırı ince hazırlandığında ise malzemenin temel özellikleri hakkında bilgi elde edilemeyebilmektedir. Geçirimli elektron mikroskobunda, elektronların preparat içinden geçip gidebilmesi için malzemenin kalınlığı birkaç yüz nanometreyi geçmemelidir. Bununla birlikte, bir başka sorun da preparattan geçen elektron demetinin çok kısa sürede soğurulmasıdır. Bu sorunların çözümü için yüksek voltajlı elektron mikroskobu geliştirilmiştir (Ronan, 2005).

Bu yöntemde kullanılan elektron demetindeki elektronların enerjisi 100-500 kV mertebesinde değişmektedir. Yüksek enerjili elektron demeti, bir takım manyetik mercek sistemlerinden geçtikten sonra preparat üzerine odaklanır, malzemenin içinden geçen ışınlar tekrar manyetik mercek sistemlerinden geçer ve ekrana yansıtılır.



Şekil 2.8 TEM cihazının şematik yapısı

TEM mikroskobu günümüzde kullanılan en güçlü elektron mikroskobudur. Kolay bir kullanımının olmasıyla beraber görüntüleme kararlılığı ve 100-500 kV faz aralığı ile birçok araştırma laboratuvarının birinci tercihidir. Cihaz 0,14 nm'ye kadar gösterim gücüne sahiptir. Bu yöntemde, elektronların dağılımına bakılarak malzemenin manyetik yapısı hakkında bilgi elde edilir (Rose, 2008).

2.7.3 X-ışını difraktometresi (XRD, X-ray diffraction)

X-ışınları 1895 yılında Wilhelm Conrad Röntgen tarafından keşfedilmiştir. X-ışınları difraksiyonunun keşfini takiben 1913 yılında Max von Laue malzeme analizinin başlıca iki alanını geliştirmiştir. X-ışınları spektrometresi tekniklerindeki gelişmeler 1950'li yılların başlarında teorik fizikçiler için önemli bilgiler sağlamış ve kristal örgüdeki atomik düzenlenmeler bu teknikle elde edilmiştir. X-ışınları difraksiyonu genelde kristalli malzemelerde kullanılır.

Kırınım deseni kristal düzlemleri arasındaki ilişkileri ve kristalleşmenin derecesini belirlemek için kullanılır (Jenkins, 2010). X-ışını sistemleri özellikle metal analizlerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Numune yüksek enerjiye sahip X-ışını ile bombardımana maruz bırakılır. Numunedeki belli elementler X-ışınıni absorbe eder ve tekrar daha düşük enerji ile X-ışınıni geri verir. X-ışını atomda bir boşluk oluşturarak bir elektronu dışarı çıkarır ve atom etrafında bir elektron halkası oluşturur ve diğer halkalardaki elektronlarla bu atomdaki

boşluklar doldurularak atom tekrar eski kararlılığına kavuşur. Her seferinde bir elektron alınır ve atom daha az enerjili bir ortama doğru hareket eder ve ortaya çıkan radyasyon, ilk ve son enerji durumlarına göre belli bir dalga boyu ile yayılır. Yayılan radyasyonun enerjisi, açığa çıkan her elementin analiz edilmesini sağlamaktadır (Avşar, 2006).

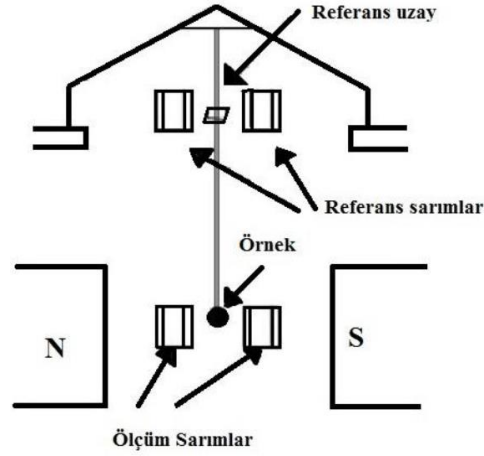
X-ışınları kırınım deseninde, üç parametre ile gerekli olan bilgiler elde edilebilir. Bu parametreler;

- en yüksek kırınımın yeri,
- pik yoğunlukları
- kırınım açısının bir fonksiyonu olarak şiddetin dağılımıdır.

Elde edilen bu üç parametre ile; zor-zorlanma, kristalleşme ve materyalde kristal düzlemleri ile örgü parametreleri gibi değerler hesaplanabilir. Ayrıca numunenin kimyasal bileşimini tespit ederek, numune içindeki her bir elementin yüzdesi de bulunabilir.

2.7.4 Titreşen örnek magnetometresi (VSM, vibrating sample magnetometer)

VSM ile mıknatıslanma ölçme metodu, Foner tarafından geliştirilmiştir ve çalışma prensibi, titreştirilen örnek yanındaki sarımlarda meydana gelen akı değişimlerinin ölçülmesine dayanır. Düşük sıcaklıkta, yüksek manyetik alan çalışmalarında basitliği, ölçüm kolaylığı, kabul edilebilir duyarlılığı nedeniyle bu yöntem çok başarılı olmuştur. Numune, uzun bir çubuğun bir ucundayken, çubuğun diğer ucunda ise titreştirici vardır. Salınarak örnekten gelen manyetik alan, sarımlarda değişen elektromanyetik kuvvet meydana getirir. Çubuğun üst ucunda da sarımlar mevcuttur ki bu sarımlar çubuğun üst ucundaki referans uzayının titreşiminden meydana gelen elektromanyetik kuvvet değerini kayıt eder ve örnekten gelen ile referanstan gelen elektromanyetik kuvvet arasındaki potansiyel fark örneğin manyetik momenti ile ilişkili bir değerdir (Foner, 1959).



Şekil 2.9 VSM cihazının şematik gösterimi

2.7.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR, fourier transform infrared spectroscopy)

FTIR cihazı, Fransız matematikçi Sean Fourier'in (1786-1830) geliştirdiği ve Fourier transformasyonu (dönüşümü) olarak adlandırılan bir matematiksel işleme göre bir örneğe gönderilen kızılötesi ışınların absorpsiyonunun yorumlanması prensibine dayanır.

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) incelenmek istenen örnek makromolekülleri fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu spektroskopik teknik, boyama, işaretleme gibi ek maddelerin kullanımını içeren uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, örneğe zarar vermeden hızlı, hassas ve etkin sonuçların göreceli olarak daha ucuz bir biçimde elde edilmesi sağlaması bakımından diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır.

FTIR spektroskopisi, elde edilen parmak izi benzeri bilgiler ışığında moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesi ve dolayısıyla farklı doku yapılarının ayırt edilmesine olanak sağlamaktır. Bu teknik kullanılarak, doku ve hücrelerde lipit, protein, DNA, RNA gibi biyomoleküllerdeki fiziksel, örneğin yapısal, değişimlerin izlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler, öncelikle doğru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların bant

pozisyonu, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilebilir (Griffiths and Haseth, 2007).

FTIR spektrumlarından kimyasal konsantrasyon, kompozisyon, konformasyon ve içerilen fonksiyonel gruplar gibi pek çok kalitatif ve kantitatif bilgi elde etmek mümkündür. Örneğin, değişik makromoleküllere ait fonksiyonel grupların konsantrasyonları aynı spektrumdan sinyal şiddeti ya da daha hassas olarak bant alanı hesaplanarak Beer-Lambert yasasına uygun olarak elde edilebilir. Buna ilaveten, bir örnekteki moleküllerin kompozisyonu sinyal şiddeti ya da ilgili bantların alanlarının oranlarının hesaplanması ile (doymamış lipidlerin doymuş lipidlere ya da lipidlerin proteinlere oranı gibi) hızla analiz edilebilir. Temel olarak lipidlerden kaynaklanan CH_2 simetrik ve antisimetrik titreşimlerinin bant genişlikleri sistemin dinamiğini görüntülemek için kullanılabilir. Bant pozisyonlarındaki kaymalar ise yapısal değişimlere işaret eder. Örneğin, $3000\text{-}2800\text{ cm}^{-1}$ bölgesindeki C-H gerilme bant pozisyonundaki kaymalar lipidlerin düzen/düzensizliklerinde olan değişimler hakkında, 1730 cm^{-1} civarında görülen C=O gerilme bandının bant pozisyonundaki değişimler ise bu fonksiyonel grup etrafındaki hidrojen bağlanması hakkında bilgi verir. Bunun yanı sıra, kontrole karşı olarak yapılan ölçümlerde ana protein bantlarının (amid I) frekans değerlerindeki kaymalar ise proteinlerin yapılarında oluşabilecek değişimleri işaret eder. FTIR spektroskopisinin diğer önemli bir avantajı ise protein ikincil yapılarında oluşan bu değişimlerin 1650 cm^{-1} ve 1550 cm^{-1} civarında gözlenen sırasıyla amid I ve amid II ana protein bantları kullanılarak detaylı olarak incelenebilmesidir (Skoog et al. 1981).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- MCF7 insan meme (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- A549 insan akciğer (karsinoma) epiteli (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi)
- Hegzadesiltrimetilamonyum bromür $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{N}(\text{Br})(\text{CH}_3)_3$ (Sigma Aldrich)
- Altın (III) klorür hidrat $\text{HAuCl}_4 \cdot \text{aq}$ (Sigma Aldrich)
- Olomoucine (Sigma Aldrich)
- Oktan $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ (Sigma Aldrich)
- N-Oktanol $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$ (Merck)
- Sodyumbor hidrür NaBH_4 (Merck)
- Sisteamin hidroklorür $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{HCl}$ (Sigma Aldrich)
- 1,1'-Karbonildiimidazol $\text{C}_7\text{H}_6\text{N}_4\text{O}$ (Sigma)
- Demir (II) sülfat heptahidrat $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Fluka)
- Kloroform CHCl_3 (Merck)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Lonza)
- L-Glutamine (Lonza)
- Essential amino acid (Lonza)
- Sodyum prüvat (Lonza)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Penisilin/streptomisin (Lonza)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- PBS (Amresco)
- Tripsin EDTA (Lonza)
- Şişe üstü 500 ml, 70 mm Diatemer Selüloz asetat filtre (Corning)
- pH = 7 Tamponu (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0,9 NaCl çözeltisi)
- Triton X100 (Sigma)

- İyot-131 (¹³¹I) (Şifa Hastanesi, Türkiye)
- İodojen, 1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenil-glikoluril (Sigma Aldrich)
- Metanol (CH₃OH) (Merck)
- Etanol (C₂H₅OH) (Merck)
- N-bütanol (CH₃(CH₂)₃OH) (Merck)
- Asetik asit (CH₃COOH) (Merck)
- İzopropil alkol (CH₃CH(OH)CH₃)(Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Diklorometan (CH₂Cl₂) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Amonyak (NH₃) (Merck)
- Dimetilsülfoksit (CH₃)₂SO (Merck)
- ITLC-SG Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck)
- Sintilasyon kokteyli (Sigma Aldrich)
- Elektroforez Kağıdı (Whatman 1)
- 1.17-1.21 Tesla NdFeB mıknatısları (Mega Hand)
- Cell Counting Kit - 8 (WST-8) (Sigma Aldrich)
- Dead END Fluorometric TUNEL System (Promega)
- BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce)

3.1.2 Kullanılan cihazlar

- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Kağıt Elektroforezi (Gelman) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetleri (Sigma) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscans Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO2 inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Mettler) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı.)
- TEM (Transmission Electron Microscopy) (JEOL JEM 2100F HRTEM) (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı)

- SEM (Scanning Electron Microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- XRD (Phillips X'Pert Pro) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (Cryogenic Limited PPMS) (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Merkez Laboratuvarı)
- Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı (Agilent Cary 660) (Celal Bayar Üniversitesi, Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi)
- DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS)

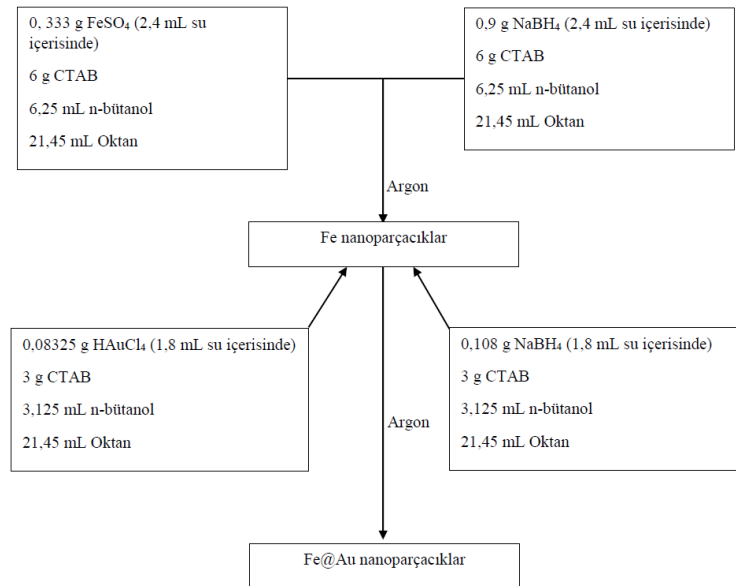
3.2 AuFe Nanoparçacıkların Sentezi

Nanoparçacıkların sentezi mikroemülsiyon metoduna göre gerçekleştirilmiştir. Mikroemülsiyon, sıvı içindeki fazların yüzey aktif maddelerin oluşturduğu arayüzey filmleri sayesinde birbirlerine karışmadan stabil olarak kaldığı iki sıvının, termodinamik olarak kararlı izotropik çözeltilerdir (Langevin, 1992). Yağ içinde su mikroemülsiyonlarında, su fazı mikro damlalar olarak (genel olarak 1-50 nm çapında) monolayer haldeki yüzey aktif maddeler ile devamlı hidrokarbon fazlar tarafından sarılırlar. Ters miselin boyutu, suyun yüzey aktif maddenin mol oranına göre belirlenir (Paul and Maulik, 2001). İstenilen reaktifleri içeren iki mikroemülsiyon çözeltisinin karıştırılmasıyla, mikrodamlalar sürekli olarak çarpışır, bir araya gelir ve ayrılır. Son olarak ise misel içinde istenilen forma kavuşurlar (Gupta and Gupta, 2005). Aseton veya etanol gibi çözügenlerin mikroemüsyona eklenmesiyle oluşan çökelekler, karışımın filtre edilmesi veya santrifüj ile uzaklaştırılabilir.

Mikroemüsyon yöntemi ile metalik kobalt, kobalt/platin alaşımları ve altın kaplı kobalt/platin veya altın kaplı demir nanoparçacıklar sentezlenebilmektedir. Burada hegzadesiltrimetilamonyum bromür ters misellerin elde edilmesini sağlarken, 1-bütanol yardımcı yüzey aktif maddeyi, oktan ise yağ fazını oluşturur (O'Connor et al., 1999).

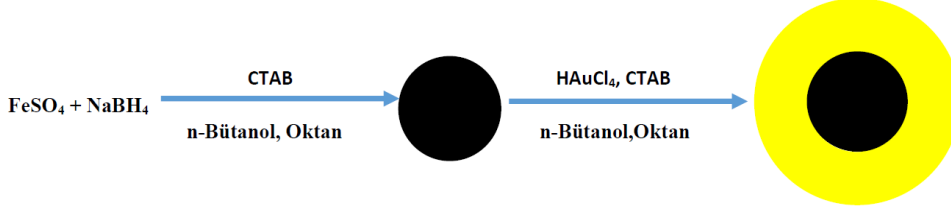
Sentez sırasında kullanılan tüm sulu çözeltiler 20 dakika argon gazı geçirilerek oksijensiz hale getirildiler. Ters misel çözeltisinin elde edilmesinde hegzadesiltrimetilamonyum bromür (CTAB), n-bütanol ve oktan kullanılmıştır.

Reaksiyon Şekil 3.1’de kısaca özetlemiştir. A çözeltisinde, 2,4 mL su içinde çözülmüş 0,33 g FeSO_4 , 6 g CTAB, 6,25 mL n-bütanol ve 21,45 mL oktan bulunmaktadır. B çözeltisi ise, 2,4 mL su içinde çözülmüş 0,9 g NaBH_4 , 6 g CTAB, 6,25 mL n-bütanol ve 21,45 mL oktandan oluşmaktadır. FeSO_4 (A çözeltisi) ve NaBH_4 (B çözeltisi) içeren misel çözeltileri argon gazı altında ultrasonikatör (saniyede 3 titreşim, güç %10 olacak şekilde) ile oda sıcaklığında 1 saat karıştırıldı. NaBH_4 , FeSO_4 ’ı indirgeyerek demir çekirdeklerini oluşturdu. Çözeltilerin karıştırılması ile beraber koyu yeşilden siyah renge dönüşüm görüldü. Bir saat sonra nanoparçacıkların oluşmasıyla beraber önce; 1,8 mL su içinde çözülmüş 0,08 g HAuCl_4 , 3 g CTAB, 3,12 mL n-bütanol ve 21,45 mL oktan içeren C karışımı sonra da 1,8 mL su içinde çözülmüş 0,11 g NaBH_4 , 3 g CTAB, 3,12 mL n-bütanol ve 21,45 mL oktandan oluşan D karışımı ortama ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında argon gazı altında ve karanlık ortamda 2 saat manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Böylece Au (III) NaBH_4 tarafından Au (0)’a indirgendi ve demir nanoparçacıkların etrafının altın ile kaplanması sağlandı. Buradaki HAuCl_4 miktarı demir nanoparçacıklar üzerine kaplanan altın çeperin kalınlığını etkilemektedir. Reaksiyon sonrasında altın kaplı demir nanoparçacıkları içeren çözelti metanol ile yıkılarak ortamda kalan maddeler uzaklaştırıldı.



Şekil 3.1 AuFe nanoparçacıkların sentez şeması

Sentez sonrasında nanoparçacıklar metanol içerisinde çözüldü. Çözelti içindeki nanoparçacık miktarının tayini için, darası alınmış 5 farklı tüpün içine 1 mL altın kaplı demir nanoparçacık çözeltisi eklendi ve 37°C’de etüv içinde üst faz uçuruldu. Tüplerin tekrar tartılması ile elde edilen değerlerin ortalaması alındı ve nanoparçacıkların miktarı $7,5 \pm 0,19$ mg/mL olarak bulundu.



Şekil 3.2 AuFe nanoparçacıklar

3.2.1 AuFe nanoparçacıklarda yüzey modifikasyonu

AuFe nanoparçacıklarının Olomoucine ile konjugasyonu için nanoparçacıkların yüzeylerinin modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu sebeple, altın moleküllerinin tiyol grupları ile kolayca bağlanma özelliğinden yararlanılarak parçacıkların dış yüzeyindeki altın katmanının etrafının amin grupları ile kaplanması amaçlanmıştır (Lu et al., 2007).

AuFe nanoparçacıklarının yüzeylerinin amin grupları ile modifikasyonunda sisteaminhidroklorür kullanılmıştır. 10 mg AuFe nanoparçacıkları 5 mL suda çözüldü. Parçacıkların homojen hale gelmesi için vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma derişimi 0,2 M olacak şekilde 0,22 g sisteaminhidroklorür eklendi ve tekrar vorteks ile karıştırıldı. Nanoparçacıklar üç boyutlu karıştırıcı ile karıştırılarak 24 saat karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bağlanmamış sisteaminhidroklorürü uzaklaştırmak için amin grupları ile kaplanmış nanoparçacıklar 5 kez santrifüj edildi. Yıkama sonrası elde kalan nanoparçacıklar kurutuldu.

3.2.2 Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklar ile konjugasyonu

N, N'-karbonildiimidazol (CDI) ilk olarak peptit sentezinde amid bağı ajanı olarak kullanılan karbonilleyici bir bileşiktir. Hidroksil içeren moleküllerle reaksiyona giren CDI, N-nükleofiller ile tepkimeye girerek N-alkil karbamat bağı oluşturabilecek imidazolil karbamatlar oluşturur.

Hedef molekülün pI veya pK_a değerlerinin 1 üstündeki pH seviyelerindeki reaksiyon koşullarında bağlanma veriminin yüksek olduğu görülmüştür. CDI ile moleküllerin aktivasyonunda dikkat edilmesi gereken birkaç kısıtlama bulunmaktadır. İlk olarak, CDI sulu ortamlarda oldukça kararsızdır. Bu yüzden aktifleştirme işlemi susuz çözümlerde gerçekleştirilmelidir. Eğer ortamda tolere edilebilir miktardan fazla su bulunuyor ise CDI çabucak CO₂ ve imidazole bozunur. Ortamda görülen hava kabarcıkları CO₂ çıkışını belirtirken, ortamda su varlığının seviyesini ve CDI'nin yıkıma uğradığının da göstergesidir. Çözgen içinde % 0,1'den az olan su miktarı genel olarak reaksiyon için kabul edilebilir aralıktadır. Daha yüksek miktardaki su oranı reaksiyon verimini azaltır. İkinci bir kısıtlama ise aktifleştirme reaksiyonun yanıcı maddelerden izole olacak şekilde çeker ocağın içinde gerçekleştirme zorunluluğudur. Birçok CDI ile aktifleştirme protokolünde kullanılan çözümlerin yanıcı ve toksik olması bunun en büyük sebebidir (Hermanson, 2010).

Kullanılan metot Beauchamp et al. (1983)'dan türetilmiştir. Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklarla konjugasyonunda ilk aşama Olomoucine'in CDI ile aktivasyonudur. 500 µg (1,68 µmol) Olomoucine 0,5 mL dimetilsülfo oksit (DMSO) içinde çözüldü. 1,31 mg CDI (Olomoucine'in mol sayısının 5 katı olacak şekilde) karışıma eklendi ve vortekslendikten sonra 2 saat manyetik karıştırıcı ile oda sıcaklığında karıştırıldı. DMSO'nun argon gazı ile uçurulması sonucu aktive edilmiş Olomoucine elde edildi.

Aktifleştirilmiş Olomoucine'in sistemin hidroklorür ile modifiye edilmiş AuFe nanoparçacıkların konjugasyonunda ortam pH'sının 10 olması için 0,1 M Na₂CO₃ kullanılmıştır. Bu reaksiyonda, yüksek pH ve oda sıcaklığının reaksiyon hızında pozitif yönde etkisi vardır.

Modifiye AuFe nanoparçacıklar 5 mL 0,1 M sodyum karbonat tamponunda (pH 10) çözüldü ve aktifleştirilmiş Olomoucine ilave edildi. Karışım hafifçe vortekslelendikten sonra 24 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 24 saat sonrasında reaksiyona girmeyen Olomoucine santrifüj ile uzaklaştırıldı. Üst faz, Olomoucine'in nanoparçacıklara bağlanma veriminin belirlenmesi için saklandı.

3.2.3 Olomoucine'in nanoparçacıklara bağlanma veriminin belirlenmesi

AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine'in bağlanma verimi Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu SCL-10AVP) ile belirlenmiştir. Olomoucine'in 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 0,003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında bilinen 6 farklı konsantrasyonuna ait pik alanları 290 nm'de PDA dedektörü ile tespit edilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Çalışma oda sıcaklığında, 1 mL/dakika akış hızı ve 290 nm dalga boyu koşullarında Nucleodur 100-5 RP-C18 (Macherey-Nagel) (250 x 4.6 mm I.D) kolon kullanılarak yapılmıştır.

Çizelge 3.1 HPLC yönteminde kullanılan kromatografik koşullar

| | |
|------------|----------------------------|
| Kolon | RP-C18 (250 x 4,6 mm I.D) |
| Akış hızı | 1 mL/dakika |
| Dalga boyu | 290 nm |
| Mobil faz | Asetonitril : su (80 : 20) |

Olomoucine'in 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 0,003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında bilinen 6 farklı konsantrasyonuna sahip çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltilerin 10 μL 'sine ait pik alanları 290 nm de tespit edilerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu.

Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu sonrasında reaksiyona girmeyen Olomoucine'i içeren üst faza ait pik alanı değeri kalibrasyon grafiğinde değerlendirilerek % bağlanma verimi hesaplanmıştır.

3.2.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

Manyetik parçacıkların yüzey morfolojisinin ve boyutlarının tespit edilmesi için SEM (Scanning Electron Microscope) (Phillips XL-30 S FEG) görüntüleri alınmıştır. Bu çalışmada görüntü alınabilmesi için örneklerin kuru olması zorunluluğu nedeniyle manyetik parçacıklar kolay uçabilen bir çözelti (metanol) içerisinde dağıtıldı. Mikropipet yardımıyla alınan örnekler ölçümün yapılacağı SEM cihazına ait çelik tabakalar üzerine yapıştırılan alüminyum bantlara kondu. Yaklaşık 5 dakika sonra metanolün uçması ile alüminyum bantlar üzerinde kuruyan örneklerin görüntüleri alındı. SEM analizi ile paralel olarak gerçekleştirilen EDX (Energy Dispersive X-Ray Analysis) analizi sonucunda nanoparçacıkların yüzdesel olarak atomik bileşenleri hesaplandı.

TEM (Transmission Electron Microscope) (JEOL JEM 2100F) ile alınan görüntüler sonucunda Fe nanoparçacıkların Au nanoparçacıkları ile kaplanması ve parçacıkların boyutları hakkında daha detaylı bilgiler elde edilmiştir. SEM yöntemindekine benzer şekilde hazırlanan örnekler bakır gridler üzerine damlatıldı. Metanolün uçması beklendikten sonra TEM görüntüleri elde edildi ve AuFe nanoparçacıklarının boyutları belirlendi.

AuFe parçacıklarının XRD (X-Ray diffractometer) (Phillips X'Pert Pro) analizi yapıldı. X-ışını kırınımı ile parçacıkların kristal yapısı dedekte edildi. Örnekler kolime edilmiş monokromatik x-ışını kaynağı ile ışınlandı. Kırınım açısı ve kırılan x-ışınlarının şiddeti örneğin bilinen çeşitli fazların desenleri ile karşılaştırılabilir desenler elde edildi.

AuFe parçacıklarının manyetik özellikleri VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (Cryogenic Limited PPMS) cihazı ile incelendi. Analiz öncesinde altın kaplı demir manyetik parçacıklar 300 mg olarak tartıldı. Bu çalışmada kuru örneklerin tartımı yapıldı. Örneğin manyetik momenti 0,1 emu/g duyarlılık ile -

3000 ve +3000 Gauss arasında uygulanan manyetik alan aralığında ölçüldü. Daha sonra Gauss'a karşı elde edilen moment (emu) değerleri örnek miktarına bölünerek emu/g değeri bulundu. Gauss'a karşı emu/g grafikleri çizilerek manyetik parçacığın manyetik doygunluğa ulaştığı nokta emu/g cinsinden tespit edildi.

AuFe nanoparçacıkların ortalama parçacık boyutu DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) analizi ile incelenmiştir. Agregatlaşmaya müsait olan AuFe nanoparçacıkların boyut analizi sentezden kısa süre sonra yapılmıştır. Analiz öncesinde metanol içinde saklanmış AuFe nanoparçacıklar 10 dakika sonikatör yardımıyla homojenize edildikten sonra 0,22 µm'lik filtreden geçirildi. Filtre edilen örneklerin ortalama boyut analizi 3 tekrarlı olarak incelendi.

3.2.5 Yapısal analiz çalışmaları

Olomoucine konjuge AuFe nanoparçacıkların yapısal analizi Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (Agilent Cary 660) cihazı ile incelendi.

AuFe nanoparçacıkları ve Olomoucine ile konjuge AuFe nanoparçacıkları içeren çözeltilerin çözücüleri uzaklaştırılarak sudan arındırılması sağlandı. Toz haline getirilen örnekler kızılötesi bölgede absorpsiyonu olmayan KBr ile pellet haline getirildi. Daha sonra bu pelletlere pres yardımıyla 0,5 mm kalınlığında ve 1 cm çapında tablet formu verilerek örnekler analize hazır hale getirilmiştir.

3.3 ¹³¹I ile İşaretleme Çalışmaları

Olomoucine ve AuFe-Olomoucine'in ¹³¹I ile işaretleme çalışmaları iodojen yöntemine göre yapılmıştır.

3.3.1 İodojen yöntemi

İodojen, (1,3,4,6-tetrakloro-3α,6α-difenil-glikoluril) suda çözünmeden sulu çözeltilerde heterojen olarak iyodun yükseltgenmesini sağlayarak hızlı iyodinasyonu sağlar. Bu yöntemde yan reaksiyonlar ihmal edilebilir düzeydedir.

iodojen kloroform veya diklorometanda çözüldükten sonra çözgenin uçurulmasıyla, iyodinasyonun yapılacağı kabın duvarlarında tabaka oluşturur. İyodinasyon yapıldıktan sonra katı fazdaki iodojen'in bulunduğu kaptan reaksiyon çözeltisi ayrılarak reaksiyon sonlandırılır. Önceden hazırlanmış tüplerin 0-5 °C'de altı ay muhafaza edilebileceği rapor edilmiş olmakla birlikte bu çalışmada kullanılan tüm tüpler taze olarak hazırlanmıştır.

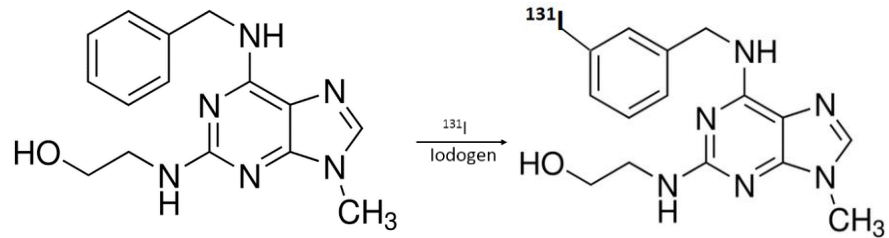
250 µg iodojen cam tüp içinde 250 µL diklorometanda çözüldü. Oda sıcaklığında diklorometanın uçurulmasıyla iodojen'in cam tüpün çeperinde ince bir film tabakası şeklinde kaplanması sağlanmıştır.

3.3.2 Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ¹³¹I ile işaretlenmesi

3.3.2.1 Olomoucine'in ¹³¹I ile işaretlenmesi

Olomoucine'in 1mg/mL çözeltileri dimetilsülfo oksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Bu çözeltiler stok olarak -20°C'de saklandı.

25 µL Olomoucine 75 µL bidistile saf su ve 100 µCi/20 µL ¹³¹I çözeltisi iodojen tüpüne konuldu. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra, reaksiyonu sonlandırmak için çözelti iodojen tüpünden alındı. İşaretlenme verimi TLRC ve kağıt elektroforezi yöntemleri ile çeşitli banyolar kullanılarak hesaplandı.



Şekil 3.3 Olomoucine'in ¹³¹I ile işaretlenmesi

3.3.2.2 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ¹³¹I ile işaretlenmesi

367 µg Olomoucine içeren AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine 1,5 mL su içinde çözüldü. Bu stok çözültiden 25 µL alınarak, 75 µL bidistile saf su ve 100 µCi/20 µL ¹³¹I çözültisi ile beraber iodojen tüpüne konuldu. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 20 dakika beklenildi. Daha sonra, reaksiyonu sonlandırmak için çözülti iodojen tüpünden alındı. İşaretlenme verimi TLRC yöntemi ile 1. ve 2. banyolar kullanılarak hesaplandı.

3.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler

3.4.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi

İnce tabaka radtokromatografisi için 1,2 x 10 cm'lik parçalara ayrılmış selüloz kaplı plastik şeritler kullanıldı. Şeritlerin tabanından 1 cm yukarısına işaretli çözültüler mikro pipet yardımıyla damlatıldı. Şeritlerin üzerine damlatılan örnekler kuruduktan sonra ağzı kapalı olan küvetlere şeritlerdeki uygulama noktası çözgene değmeyecek şekilde konuldu. Çözgen şeridin üst noktasının 1-2 cm altına kadar yürüdüktan sonra şeritler küvetten çıkartıldı ve kuruması için bekletildi. Kuruyan şeritler kontaminasyondan korunmak için bantla kaplandı. Şeritlerdeki aktivitenin sayımı için radyokromatogram tarayıcı cihaz (Bioscan 2000) kullanıldı. Bu cihaz iyon odası şeklinde tasarlanmıştır. İyon odasının orta kısmında bir anot ve bunu çevreleyen bir katot bulunmaktadır. Oda içerisi %90 argon ve % 10 metan karışımında oluşan P10 gazı ile doludur. Radyoaktif çekirdekten salınan beta ve gama ışınları P10 gazını iyonlaştırır ve anot ile katot arasında voltaj farkı oluşturur. Oluşan bu fark sayaca bağlı olan elektronik bir sistemle sayılır ve bilgisayar ortamında kromatogram olarak görüntülenir (Şensoy, 2007). Tarama işlemine başlamadan önce piklerin R_f değerlerinin cihaz tarafından belirlenebilmesi için örnek ile ilgili bilgiler cihaza ait WinScan2 programına kaydedilir. Bu bilgilerden bazıları tarama süresi, damlatma noktası ve yürütme işleminin sonlandırıldığı noktanın kromatografi kağıdına olan uzaklığıdır. Programın verdiği kromatogramda y-ekseni sayım değerini, x-ekseni ise kromatografi kağıdındaki mesafeyi vermektedir.

Şeritlerdeki aktiviteler sayıldıktan sonra örneklerin taşınma mesafeleri çözücünün yürüdüğü mesafeye bölünerek R_f değerleri ve işaretlenme yüzdeleri program tarafından belirlendi.

Kalite kontrol çalışmalarında işaretli bileşiklerin bağlanma verimini elde etmek için deneyler en az 5 kez tekrarlandı.

Kullanılan TLRC Banyo Çözeltileri:

TLRC-1: n bütanol:su:asetik asit (4:2:1)

TLRC-2: kloroform:asetik asit (9:1)

TLRC-3: diklorometan:metanol (9:1)

TLRC-4: izopropil alkol:n bütanol:0.2N NH_4OH (2:1:1)

TLRC-5: n bütanol:etil alkol:0,2N NH_4OH (5:2:1)

TLRC-6: izopropil alkol:n bütanol:0,2N NH_4OH (4:2:1)

3.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi

Kağıt elektroforezi çalışmalarında Gelman elektroforez cihazı kullanıldı. Elektroforez işlemi Whatman kağıtları (Whatman 1) kullanılarak yapıldı. Kağıtlar 1,2 x 20 cm boyutlarında kesildikten sonra anot, katot ve uygulama yapılacak olan noktalar işaretlendi. Daha sonra kağıtlar elektroforez kabı içerisindeki banyo çözeltisinde ıslatıldı. Kağıtlar elektroforez kabına yerleştirildikten sonra orta noktasına kapiler yardımıyla ^{131}I -Olomoucine, ^{131}I -AuFe-Olo, yükseltgenmiş iyot ve ^{131}I örnekleri damlatıldı. TLRC-1 (n bütanol:su:asetik asit 4:2:1) çözeltisi içinde 250 V'luk gerilim altında 90 dakika elektroforez işlemi uygulandı. Süre sonunda kağıt şeritler elektroforez kabından çıkarılarak kurutuldu. Kurutulan kağıtlar radyokromatogram tarayıcı cihazına yerleştirildi ve radyokromatogram tarayıcıda taranarak kromatograma ait piklerin R_f değerleri belirlendi. Elde edilen grafiklerden işaretli bileşiklerin yükü hakkında bilgi elde edildi.

3.4.3 Lipofilite tayini

^{131}I ile işaretlenmiş Olomoucine'in lipofilitesinin tayini için 100 μL işaretli bileşikten alınarak içerisinde 300 μL n-oktanol ve 300 μL fosfat tamponu çözeltisi (pH 7) bulunan tüpe ilave edildi. 15 dakika oda sıcaklığında karıştırmanın ardından 2500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında alt faz (su) ve üst faz (oktanol) ayrılarak aktiviteleri Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayıldı. n_{oktanol} 'ün n_{su} 'ya oranı ile log P (log ($n_{\text{oktanol}}/n_{\text{su}}$)) değerleri hesaplandı. Denemeler her bir örnek için 5 kez tekrar edildi.

3.4.4 Stabilite tayini

Bu çalışma ^{131}I ile işaretlenmiş Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in stabilitesini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Örnekler 100 μCi ^{131}I ile iodojen tüplerinde işaretlendikten sonra ayrı tüplere alındı ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. 0, 30, 60, 240. dakikalarda ve 24. saatte işaretli örneklerin işaretleme verimi TLRC-1 ve TLRC-2 banyo çözeltileri kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi.

3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

Çalışmada kullanılan MCF7 meme (adenokarsinoma) epiteli American Type Culture Collection'dan (Rockville, MD, ABD), A549 akciğer (karsinoma) epiteli Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilmiştir.

MCF7 hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda; A549 hücreleri Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda üretildi.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrıldılar ve çalışmada

kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80 °C de dondurulup, -190 °C sıvı azot içinde stoklandı.

Hücre kültürü çalışmalarında AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine iki farklı grupta çalışıldı. Gruplardan birisinin çalışıldığı kuyucukların altına eşit büyüklükte ve eşit manyetik akım yoğunluğuna (1,17-1,21 Tesla) sahip NdFeB mıknatısları konularak manyetik alan uygulanırken diğer grubun çalışıldığı kuyucukların altına manyetik alan uygulanmadı. Bu şekilde manyetik alan uygulamanın etkisi incelendi.



Şekil 3.4 MCF7 ve A549 hücrelerinin inkübasyonu

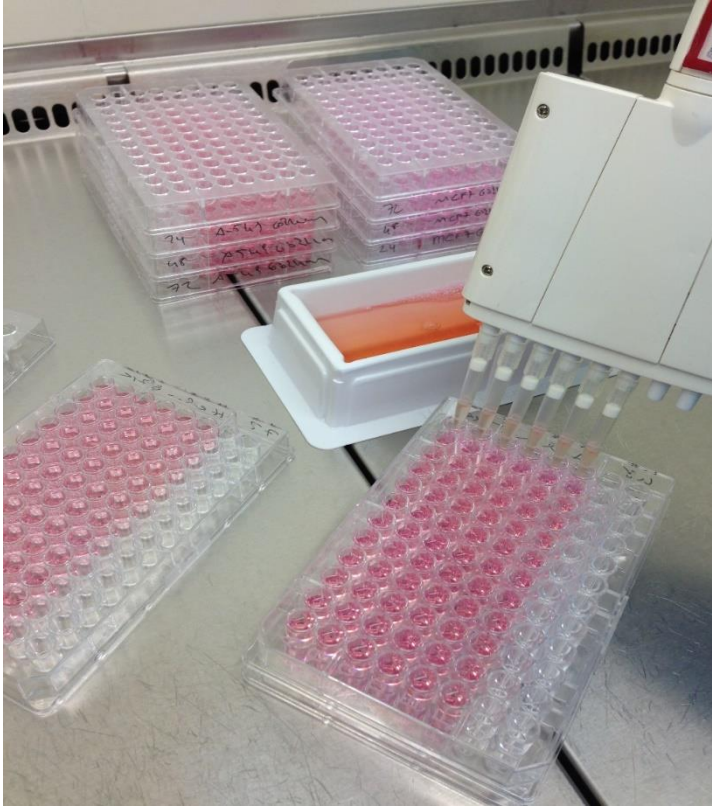
3.5.1 Sitotoksisite çalışmaları

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine'in sitotoksisite çalışmaları MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Çalışmada IC₅₀ (%50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı) değerleri WST-8 testi ile kolorimetrik olarak belirlendi. Hücre süspansiyonu, 96

kuyucuklu mikrolatelerde her bir kuyucuğa 5×10^5 hücre/ml olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı konsantrasyonda Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine çözeltisi eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37°C % 5 CO₂ ortamında 24, 48 ve 72. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 µl WST solüsyonu eklendi ve dört saat inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % sitotoksisite değerleri hesaplandı.

$$\% \text{ sitotoksisite} = 1 - \left(\frac{\text{ölçülen optik densite değeri}}{\text{kontrol değeri}} \right) \times 100$$



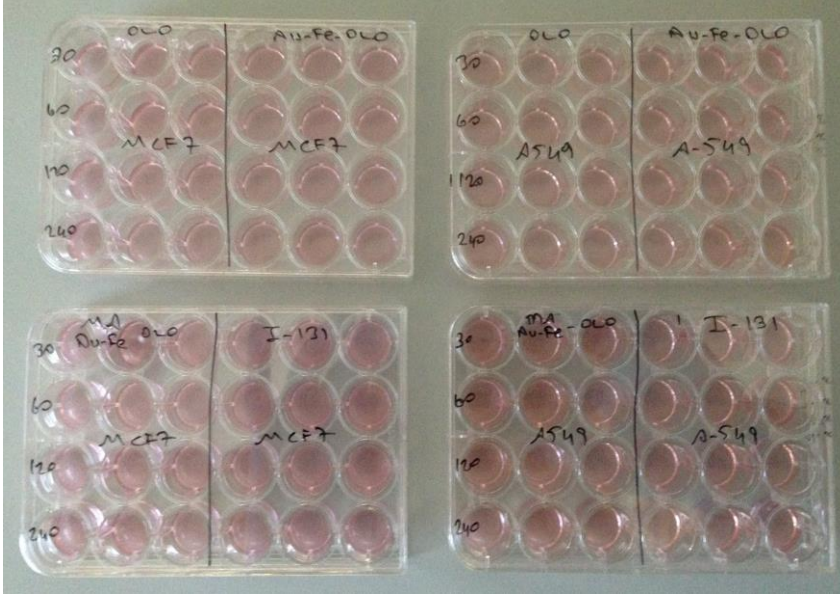
Şekil 3.5 MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışmaları

3.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi

Bu çalışmada, Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in çeşitli hücre hatlarındaki tutulumunu araştırmak amacıyla, MCF7 ve A549 hücrelerinin ekimi yapıldı. Hücreler yeteri kadar çoğaldıktan sonra 24'lük plakalara alındı. Bu çalışmada 30. dakika, 60. dakika, 120. dakika ve 240. dakika olmak üzere 4 farklı zaman parametresi denendi. Kuyucuk başına 1 µg Olomoucine kullanılırken, 1 µg AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine kullanılmıştır. Radyoaktivite miktarı ise kuyucuk başına 1,5 µCi olacak şekilde örneklerin işaretlemeleri gerçekleştirildi. İşaretli örnekler besiyer ile karıştırıldı. Kuyucuklardaki ölü hücreleri uzaklaştırmak için hücreler üzerindeki besiyerler atıldı ve her bir kuyucuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2'şer kez yıkandı. Son yıkamanın ardından her bir kuyucuğa 0,5 mL ¹³¹I işaretli örnekleri içeren besiyerler ilave edildi ve 37°C de inkübe edildi. Bileşiğin etkisini incelemek amacıyla, aynı prosedür sadece ¹³¹I kullanılarak da gerçekleştirildi ve elde edilen veriler ¹³¹I kontrol grubu ile değerlendirildi.

30. dakika, 60. dakika, 120. dakika ve 240. dakikalarda, sırasıyla hücreler üzerindeki ¹³¹I işaretli örnekleri içeren besiyerler atıldı ve hücreler PBS ile 2'şer kez yıkandı. Son yıkama sonrasında her bir kuyucuğa 200'er µL Ripa tampon çözeltisi eklenerek pipet yardımıyla hücreler kuyucuk yüzeyinden kaldırılarak hücreler süspanse edildi.

¹³¹I işaretli örneklerin hücrelerdeki tutulumunu tespit etmek için, her bir kuyucuktaki hücre süspanسیونundan 100'er µL alınarak ependorflara konuldu. Ependorflara 900'er µL sintilasyon sıvısı eklendikten sonra radyoişaretli örnekler Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacında sayıldı. Ripa tamponu ile yüzeyden kaldırılmış hücreleri içeren çözültiden 25'er µL'sinde protein analizi Multimode Mikroplaka Okuyucu cihazı kullanılarak Bicinchoninic asit yöntemi ile 562 nm de tespit edildi. Protein sonuçları kullanılarak hücre başına düşen aktivite değerleri hesaplandı. Kontrol grubu sayımları ile bu değerler oranlanarak % bağlanma değerleri tespit edildi.



Şekil 3.6 MCF7 ve A549 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması

3.5.3 Proliferasyon çalışmaları

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine'in MCF7 ve A549 hücreleri üzerindeki proliferasyon çalışmaları WST-8 testi kullanılarak yapılmıştır.

Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikroplatelerde her bir kuyucuğa 10^5 hücre/ml olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 μ l hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı konsantrasyonda Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine çözeltisi eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Ayrıca kalibrasyon grafiği oluşturmak için hücre sayısı bilinen MCF7 ve A549 hücreleri kuyucuklara eklendi.

Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37°C % 5 CO_2 ortamında 24, 48 ve 72. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 μ l WST-8 solüsyonu eklendi ve dört saat inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD) spektrofotometre kullanılarak okundu. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen hücre sayıları kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak hesaplandı.

3.5.4 Hücre migrasyonu çalışmaları

MCF7 ve A549 hücreleri ile gerçekleştirilen hücre migrasyonu çalışmasında, Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in mekanik hasarla oluşturulan yara bölgesindeki hücre migrasyonu etkinliği, zaman ve konsantrasyon parametreleri kullanılarak değerlendirilmiştir. 24'lük plakada hazırlanmış olan MCF7 ve A549 hücrelerinin mevcut besiyerleri mikropipet ile çekilerek yeni besiyeri ilave edilmiştir. Kuyucuk başına 1 µg örnek olacak şekilde fosfat tamponu ile çözülen Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine, kuyucuklara uygulandıktan sonra, kuyucuk tabanı pipet ucu yardımıyla tek bir seferde çizilerek mekanik hasar ile yara oluşturulmuştur. Kontrol grubu olarak sadece besiyer kullanılmıştır. 1, 4, 8, 10, 24, 36, 48, 60 ve 72. saatlerde 24'lük plakada bulunan hücreler invert mikroskopla görüntülenerek fotoğrafları çekilmiştir. Elde edilen görüntülerde Image J programı ile kareleme yapılmıştır. Görüntülerdeki karelenmiş alandaki kapanma, kontrol grubu ile kıyaslanarak değerlendirilmiştir.

3.5.5 Apoptosis çalışmaları

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in apoptotik etkisi MCF7 ve A549 hücre hatlarında Tunnel yöntemi ile çalışılmıştır.

Her bir grupta en az 300 hücre değerlendirilmiştir. Hücrelerin ekimi chamber slide'a yapıldı. 24 saatin sonunda yüzeye tutunan hücrelerin besiyerleri değiştirilerek her bir hücreye yukarıda belirtilen IC₅₀ değerlerinde örnekleri içeren besiyerler ilave edildi. 24 saat sonra chamber slide'ın kuyucukları üzerindeki besiyer atıldı ve hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Chamber slide'ın üzerindeki plastik kısım çıkarılarak uzaklaştırıldı ve çalışmaya hücrelerin üzerinde bulunduğu lamlar ile devam edildi. Hücrelerin üzerinde bulunduğu lamlar cam şale içerisinde önceden hazırlanmış olan % 4' lük paraformaldehidin PBS içindeki (pH 7,4) çözeltisine aktarılarak +4°C' de 25 dakika bekletildi. Ardından, hücrelerin daha geçirgen hale gelmesi için lamlar PBS ile hazırlanmış % 0,2 Triton-X' çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletildi. Lamlar PBS ile 5'er dakika süreyle 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra lamlar üzerine 100 µl equilibration tamponu eklendi ve 10 dakika

bekletildi. Bu sırada rTdTinkübasyon tamponu hazırlandı: 90 µl equilibration tamponu, 10 µl nükleotit karışımı ve 2 µl rTdT enzimi. 5-10 dakikanın sonunda, lamlarda bulunan fazla sıvı uzaklaştırıldı ve yerine nükleotid karışımı eklendi ve üzerine lamel kapatıldı. 37°C de nemli etüvde 60 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 2XSSC içinde, reaksiyonun durması için 15 dakika bekletildi. Lamlar PBS içerisinde 5 dakika boyunca yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Lamların kurumamasından sonra üzerine propidyum iyodid damlatılarak üzerine lamel kapatıldı ve floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreleri ile inceleme yapıldı.

3.5.6 İstatistik Analizler

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre için iki ayrı denemede toplam altı tekrar yapıp, ortalama bağlanma değerleri ile standart sapmaları hesap edilmiştir. Her bir parametre seviyesi için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken bağlanma değerleri arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir. Sitotoksitesite çalışması sonucunda IC₅₀ değerlerinin tespit edilebilmesi için nonlineer regresyon analizi yapılmıştır.

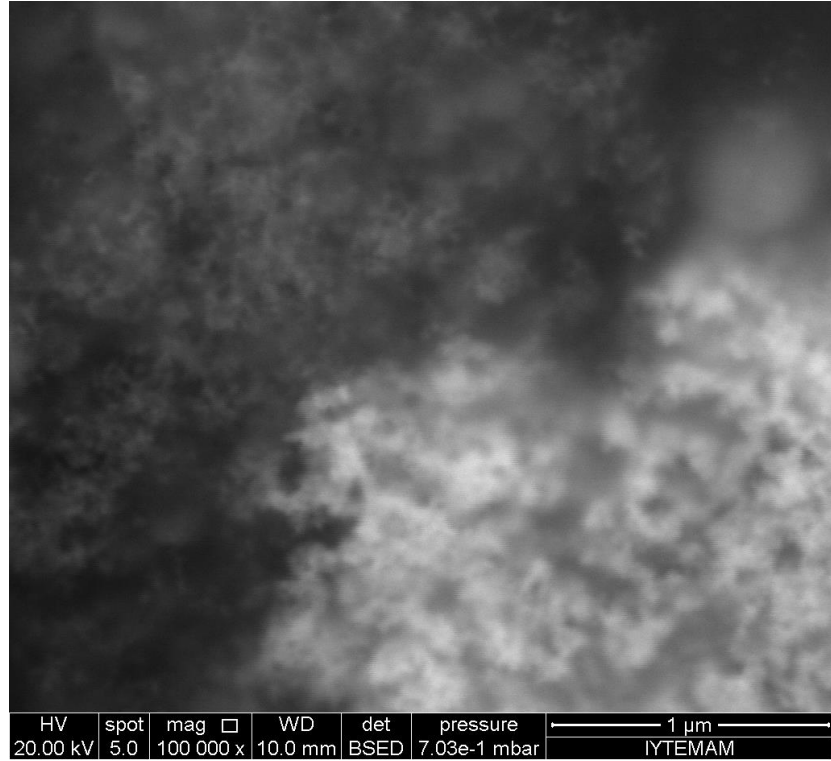
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 AuFe Nanoparçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi

4.1.1 SEM analiz sonuçları

AuFe nanoparçacıkların yüzey morfolojisi ve boyut analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleri alınarak incelenmiştir. Analiz sonucunda ortalama 10 nm çapında nanoparçacıkların varlığı gözlemlenmiştir.

Parçacıkların yüzey morfolojisine ve boyut dağılımına ait daha detaylı bilgiler yüksek çözünürlüğü sayesinde TEM analizi ile belirlenmiştir.

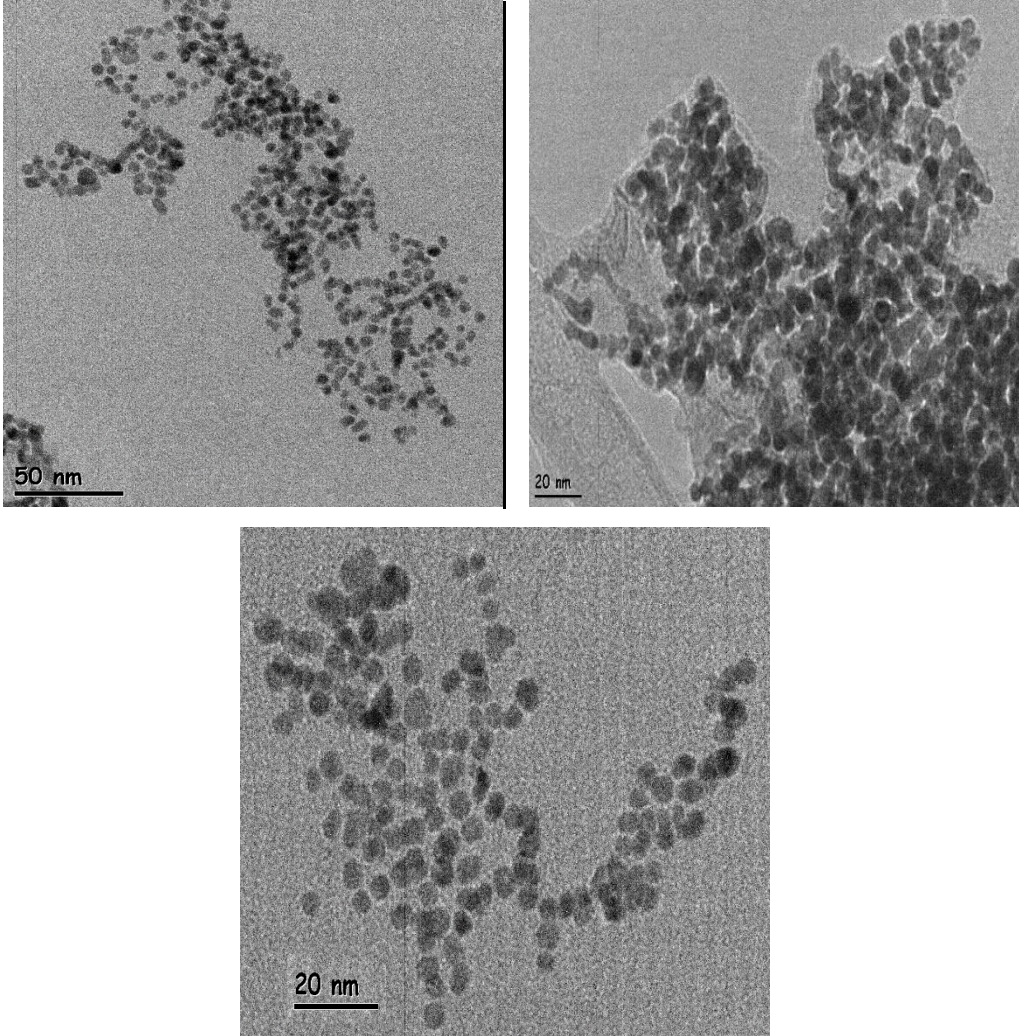


Şekil 4.1 AuFe nanoparçacıkların SEM görüntüsü

4.1.2 TEM analiz sonuçları

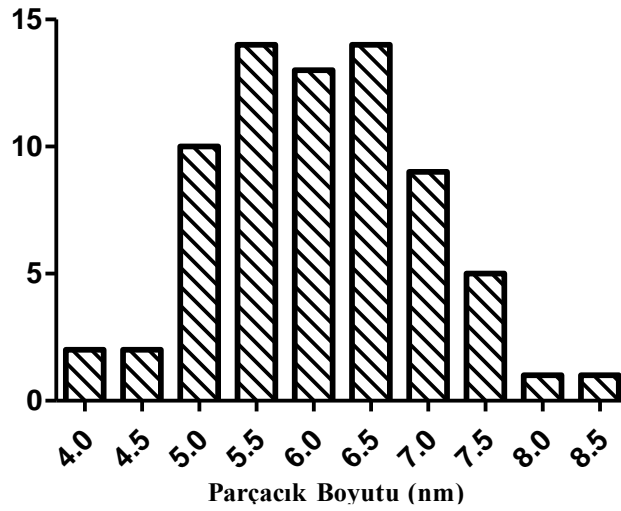
AuFe nanoparçacıkların boyut analizi ve yüzey özelliklerinin incelenmesi Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda TEM JEOL JEM 2100F HRTEM cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

TEM analizinin sunduğu yüksek çözünürlükte görüntü alabilme avantajı sayesinde, SEM analizine kıyasla AuFe nanoparçacıklara ait fiziksel özellikler hassas olarak belirlenmiştir. Demir çekirdeklerinin altın tabakasıyla başarı ile kaplandığı elde edilen görüntülerde görülmektedir. Aynı zamanda, sentezlenen AuFe nanoparçacıkların homojen boyut dağılımına sahip olduğu da belirlenmiştir.



Şekil 4.2 AuFe nanoparçacıkların TEM görüntüleri

Elde edilen TEM görüntülerinin GraphPad programı ile istatistiksel analizi yapılması sonucunda ortalama $6,03 \pm 0,87$ nm boyutunda olduğu tespit edilmiştir. Farklı gruplar tarafından mikroemülsiyon yöntemi ile sentezlenen AuFe nanoparçacıkların boyutlarının 5-40 nm arasında değiştiği görülmektedir (Carpenter et al., 2000; Iglesias-Silva et al., 2010; Jafari et al., 2010; Chatterjee et al., 2011). Nanoparçacıkların boyutlarında görülen çeşitlenme su ve yüzey aktif madde olarak kullanılan CTAB'nin mol oranlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Mikroemülsiyon ortamında su oranının artması ile parçacık boyutunun arttığı belirtilmiştir (Dabrowiak et al., 2012; Maleki et al., 2012). Mikroemülsiyon yönteminde parçacık boyutlarının çeşitlilik göstermesi dezavantaj olarak belirtilirken, yapılan bu çalışmada parçacıkların homojen boyut dağılımı gösterdiği tespit edilmiştir (Lu et al., 2007).



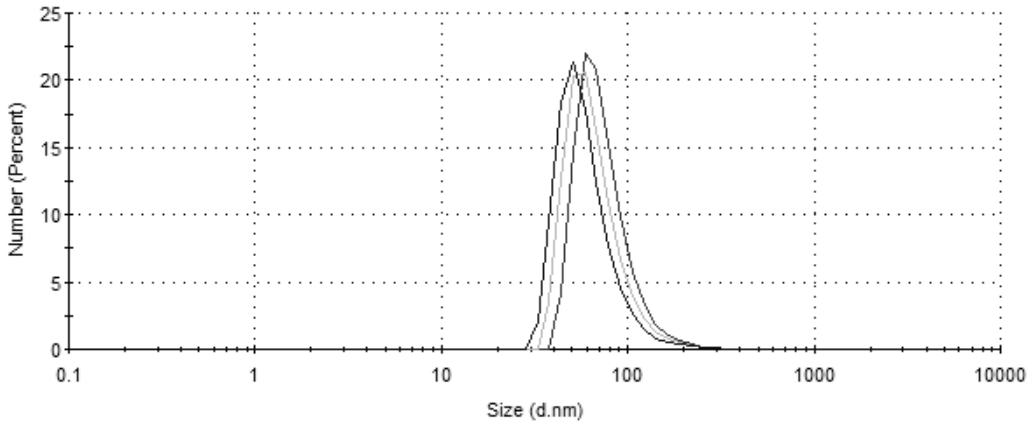
Şekil 4.3 AuFe nanoparçacıkların boyut histogramı

4.1.3 DLS analiz sonuçları

AuFe nanoparçacıkların ortalama parçacık boyutu Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) analizi ile incelendi. Analiz sonucunda ortalama parçacık çapı $74,63 \pm 28,16$ olarak bulunmuştur. Parçacık boyutlarının çözelti içerisinde çeşitlendiğinin bir göstergesi olan PdI (Polydispersity Index) değeri analizde 0,188 olarak bulunmuştur. PdI değerinin 0,2'den düşük olması çözeltinin

monodispers olduğunun göstergesidir ve boyut analizinin doğru sonuç vermesinde önemli bir parametredir.

DLS analizi ile bulunmuş olan ortalama parçacık boyutu AuFe nanoparçacıkların agregatlaşması sonucu beklenenden yüksek çıkmıştır. Bu yüzden AuFe nanoparçacıkların boyutlarının belirlenmesinde TEM analizi ile elde edilen sonuçlar dikkate alınmıştır.



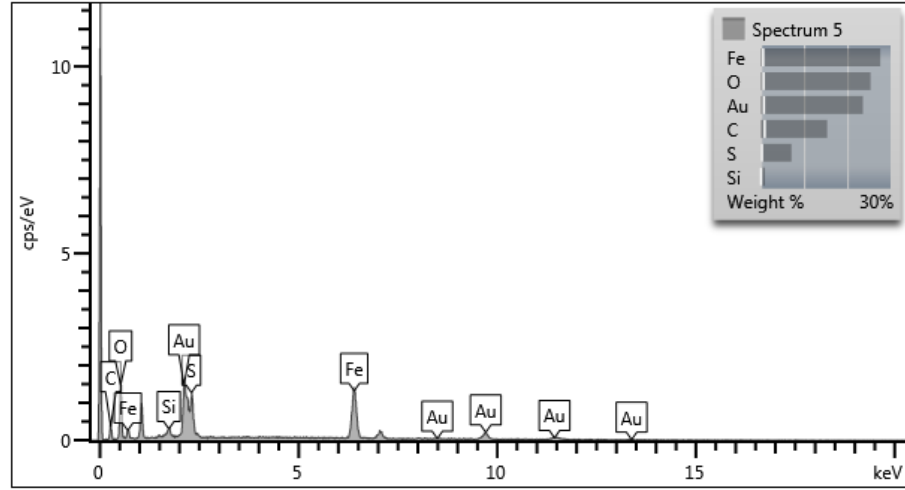
Şekil 4.4 AuFe nanoparçacıkların boyut dağılımı analizi

4.1.4 EDX analiz sonuçları

EDX analizi (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) örneklerin kimyasal karakterizasyonu veya elementel analizinde kullanılan analitik bir yöntemdir. Üzerine elektronların gönderildiği örneklerden salınan karakteristik X-ışınlarının dedeksiyonundan sonra AuFe nanoparçacıklarına ait elementel kompozisyon yüzdesel olarak belirlendi.

Çizelge 4.1 AuFe nanoparçacıkların elementel kompozisyonu

| Element | Wt% | Atomik % |
|---------|-------|----------|
| C | 15,37 | 34,26 |
| O | 25,37 | 42,45 |
| Si | 0,95 | 0,91 |
| S | 7,12 | 5,95 |
| Fe | 27,61 | 13,23 |
| Au | 23,58 | 3,20 |
| Toplam | 100 | 100 |

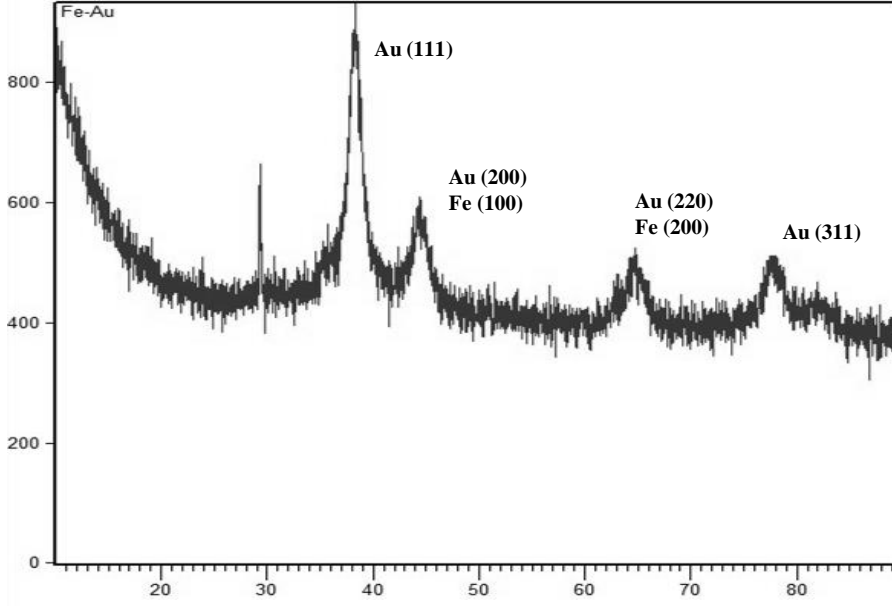


Şekil 4.5 AuFe nanoparçacıkların EDX diagramı

4.1.5 XRD analiz sonuçları

AuFe nanoparçacıkların yapısal kompozisyonu İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde XRD (X-Ray diffractometer) (Phillips X'Pert Pro) analizi ile incelendi. Difraktogramda görülen $2\theta = 38.14^\circ$, 44.36° , 64.58° ve 78.30° kırınım pikleri sırasıyla Au (111), Au (200)-Fe (110), Au (220)-Fe (200) ve Au (311) düzlemlerine denk gelmektedir (Islam et al., 2013).

Motifteki pikler, referans fcc (face-centered cubic) altın motifini verirken, bcc (body-centered cubic) demir motifine ait piklerin altın motifi ile baskılandığı görülmektedir. Demir çekirdekten kaynaklı olabilecek Fe_3O_4 'e ait kırınım pikleri, sentezlenen Au@ Fe_3O_4 nanoparçacıklara ait difraktogramda görülmemektedir. Ek olarak, görülen piklerin altın piklerine ait olduğu literatür incelemesiyle görülmüştür. Böylece demir oksit çekirdeğinin altın ile kaplanmasının başarı ile gerçekleştirildiği düşünülmektedir (Carpenter et al., 2000; Kayal and Ramanujan, 2010; Maleki et al., 2012).

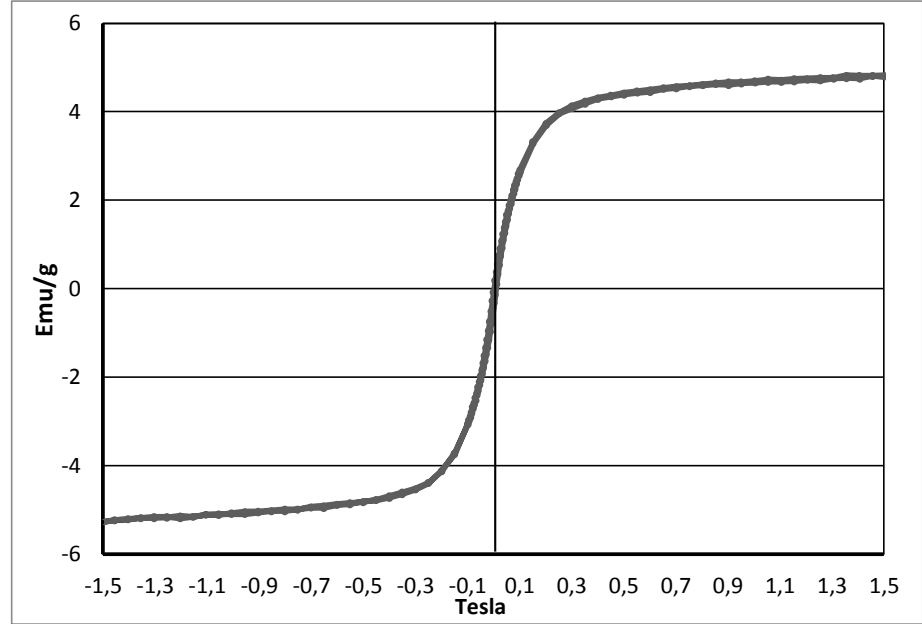


Şekil 4.6 AuFe nanoparçacıkların XRD diagramı

4.1.6 VSM analiz sonuçları

AuFe nanoparçacıkların manyetik özellikleri Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda VSM Cryogenic Limited PPMS cihazı ile incelenmiştir. Şekil X'de verilen grafikten AuFe nanoparçacıkların manyetizasyon değeri 5,27 emu/g olarak bulunmuştur.

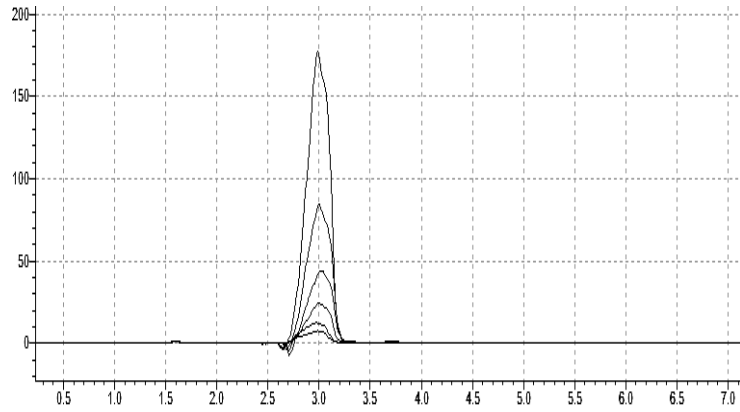
Mikroemülsiyon yöntemi ile AuFe nanoparçacıkların sentezini gerçekleştiren diğer gruplar tarafından elde edilen sonuçlara göre AuFe nanoparçacıkların 10-20 emu/g aralığından manyetizasyon değerine sahip olduğu bildirilmiştir (Iglesias-Silva et al., 2010; Rudakovskaya et al., 2010; Islam et al., 2013). Kullanılan demir/altın oranının veya parçacık boyutunun arttırılması ile AuFe nanoparçacıkların manyetizasyon değerlerinin arttırılması mümkündür (Maleki et al., 2012).



Şekil 4.7 AuFe nanoparçacıkların VSM diagramı

4.2 Olomoucine'in AuFe Nanoparçacıkları İle Konjugasyon Verimi

AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen Olomoucine'in bağlanma verimi kromatografik olarak Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu SCL-10AVP) ile belirlenmiştir. Olomoucine'in 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ve 0,003 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ arasında bilinen 6 farklı konsantrasyonuna ait pikler Şekil 4.4'de gösterilmiştir.



Şekil 4.8 Olomoucine'in farklı konsantrasyonlarına ait kromatogram

Konjugasyon sonrasında santrifüj edilen çözeltide nanoparçacıkların üstünde kalan çözeltinin 10 μl 'sinin pik alanı 947136 bulundu. Kalibrasyon grafiğinde bu

değere denk gelen madde miktarı 0,32 µg/10 µL olarak hesaplandı. Santrifüj sonrası nanoparçacıkların üstünde kalan çözeltinin toplam hacmi 5 mL olduğundan konjuge olmayan Olomoucine 162 µg/5 mL bulunmuştur.

Konjugasyonda kullanılan Olomoucine miktarı ile santrifüj sonrası nanoparçacıkların üstünde kalan çözeltideki Olomoucine miktarı oranlanarak AuFe nanoparçacığa 500 µg Olomoucine'in bağlanma verimi % 67,60 olarak bulundu. Böylece 10 mg AuFe nanoparçacık üzerine 338 µg Olomoucine'in konjuge edildiği tespit edilmiştir.

4.3 Yapısal Analiz Çalışmaları

4.3.1 FTIR sonuçları

Kırmızı ötesi (infrared) ışınması, elektromanyetik spektrumda görünür bölge ve mikro dalgalar arasında bulunur ve dalga boyu 0,8-500 µm (dalga sayısı 12500-20 cm⁻¹) olan ışımadır. 0,8-2,5 µm (12500-4000 cm⁻¹) bölgesine yakın kırmızı ötesi, 2,5-25 µm (4000-400 cm⁻¹) bölgesine kırmızı ötesi ve 25-500 µm (400-20 cm⁻¹) bölgesine uzak kırmızı ötesi denir. Bazı kaynaklarda kırmızı ötesi ışınmanın sınırı 2,5-15 µm (4000-666 cm⁻¹) olarak verilir. Kırmızı ötesi spektrumları her iki sınır içinde de kaydedilebilir. Yakın kırmızı ve uzak kırmızı ötesi bölgeleri organik yapı analizinde pek yararlı değildir.

Kırmızı ötesi spektrumları iki türlü bilgi verir;

- Organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar bulunur,
- İki organik bileşiğin aynı olup olmadığı tespit edilir.

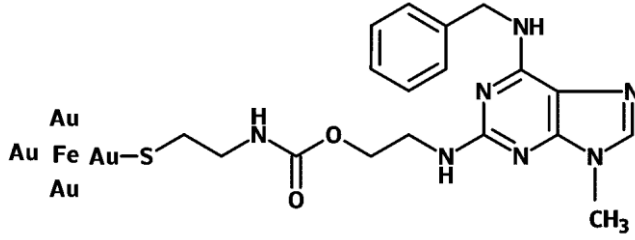
AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in yapısal analizi Celal Bayar Üniversitesi Deneysel Fen Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde FTIR (Fourier Transform Infrared Spectroscopy) (Agilent Cary 660) cihazı ile incelendi. AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in yapısındaki fonksiyonel gruplar Çizelge 4.2'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.2 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in FTIR incelemesi

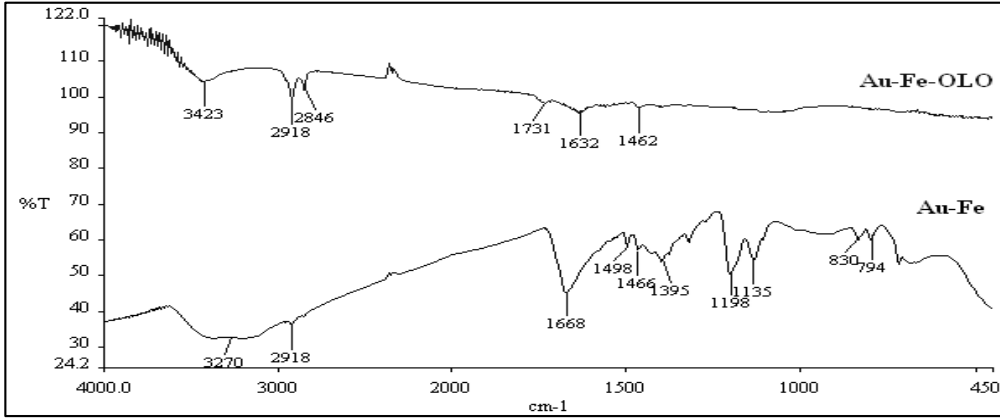
| Pik | Gerilim | Açıklama |
|-----------|--------------------|--|
| 3400–3500 | N-H | Primer amin |
| 2925 | -CH ₂ - | Metilen köprüsü |
| 2850 | -CH ₂ - | Metilen köprüsü |
| 1735 | C=O | Ester |
| 1625 | N-H | 3400-3500 arasındaki primer amin pikini doğrular |
| 1450 | C=C | Aromatik halkadaki C-C gerilimi |

Şekil 4.10'da AuFe nanoparçacıklar ve Olomoucine konjuge AuFe nanoparçacıklara ait FTIR spektrumları verilmiştir. AuFe nanoparçacıklara ait spektrumda 3270 cm^{-1} (O-H gerilimi), 1668 cm^{-1} (H-O-H) parçacıkların yüzeyinde suyun absorblanmasından kaynaklanan pikler bulunmaktadır. IR spektrumlarında parmak izi bölgesi olarak adlandırılan $1500\text{-}500\text{ cm}^{-1}$ bölgesinde görülen pikler, bileşiklerin analizinde her ne kadar kesin sonuçlar vermese de 1395 cm^{-1} (C-C) gibi yüzey aktif ajan CTAB'den kaynaklanan bu bölgedeki piklerin nanoparçacıkları yıkama işleminin arttırılmasıyla bertaraf edildiği literatürde belirtilmektedir (Islam et al., 2013).

FTIR spektrumunda AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'e ait pikler Çizelge 4.2'de belirtilmiştir. Şekil 4.9'de AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in molekül yapısı 2 boyutlu olarak gösterilmiştir. AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in molekül yapısının FTIR spektrumunda tanımlanan piklerle örtüştüğü görülmektedir. Bu da Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonunun başarıyla gerçekleştirildiği sonucunu vermektedir.



Şekil 4.9 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine



Şekil 4.10 AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine ve AuFe nanoparçacıkların FTIR spektrumu

4.4 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

4.4.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Kalite kontrol çalışmaları için yapılan ince tabaka radyokromatografisi (TLRC) deneyleri sonucunda elde edilen R_f ve % verim değerleri aşağıda Çizelge 4.3'de verilmiştir. Olomoucine'in ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlenme verimlerinin belirlenmesi için 6 farklı banyo çözeltisi kullanılmıştır.

Kullanılan TLRC banyo çözeltileri:

TLRC-1: n bütanol:su:asetik asit (4:2:1)

TLRC-2: kloroform:asetik asit (9:1)

TLRC-3: diklorometan:metanol (9:1)

TLRC-4: izopropil alkol:n bütanol:0.2N NH₄OH (2:1:1)

TLRC-5: n bütanol:etil alkol:0,2N NH₄OH (5:2:1)

TLRC-6: izopropil alkol:n bütanol:0,2N NH₄OH (4:2:1)

Çizelge 4.3 ¹³¹I ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen R_f değerleri

| Banyo Çözeltisi | R _f | | | |
|-----------------|------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------|
| | ¹³¹ I | Yükseltgenmiş ¹³¹ I | ¹³¹ I-Olo | ¹³¹ I-AuFe- Olo |
| TLRC-1 | 0,49±0,07 | 0,01±0,05 | 0,96±0,11 | 0,06±0,01 |
| TLRC-2 | 0,05±0,02 | 0,04±0,01 | 0,93±0,03 | 0,03 |
| TLRC-3 | 0,04±0,01 | 0,04±0,05 | 0,95±0,05 | 0,04±0,02 |

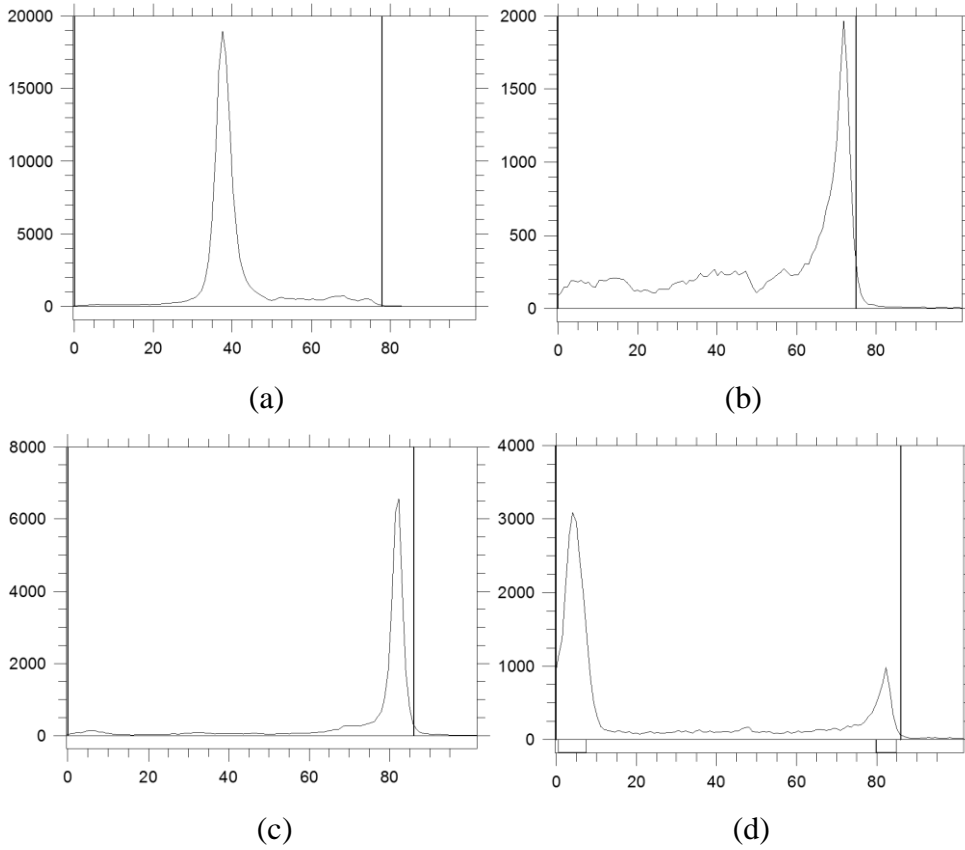
Çizelge 4.4 ¹³¹I ile işaretli örneklerin TLRC-1 çözeltisinde hesaplanan işaretlenme verimleri

| | ¹³¹ I-Olomoucine | ¹³¹ I-AuFe-Olo |
|-----------|-----------------------------|---------------------------|
| Verim (%) | 93,24±5,08 | 85,59±7,08 |

TLRC-4, TLRC-5 ve TLRC-6 banyo çözeltilerine ait kromatogramlar incelendiğinde ¹³¹I ve ¹³¹I işaretli bileşiklerin R_f değerlerinin birbirine çok yakın olduğu, dolayısıyla bu çözeltilerin sonuçların değerlendirilmesinde yeterince ayırt edici bilgiler vermediği görülmüştür. TLRC-1 ve TLRC-2 banyo çözeltilerine ait kromatogramlardan elde edilen sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde ise

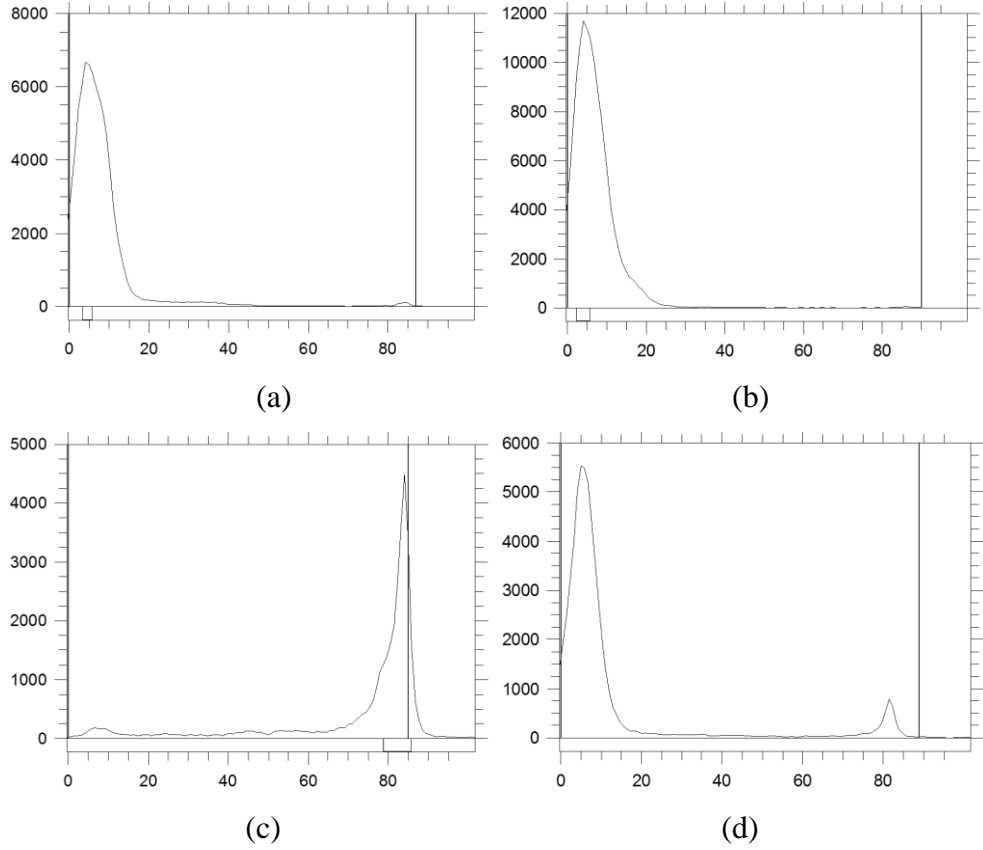
Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlendiği tespit edilmiştir. Çizelge 4.3 incelendiğinde TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -Olo'nun farklı R_f değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Aynı zamanda TLRC-1 banyo çözeltisi kullanılan iodojen miktarı ile iyodun başarılı bir şekilde yükselttiğini göstermektedir.

TLRC-1 banyo çözeltisinde yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -AuFe-Olo'nun R_f değerleri birbirine çok yakın olduğu için ^{131}I -AuFe-Olo'nun değerlendirilmesinde TLRC-2 banyo çözeltisinden elde edilen R_f değerleri dikkate alınmıştır. TLRC-2 banyo çözeltisinde yükseltgenmiş ^{131}I 'in R_f değeri 0,86 iken ^{131}I -AuFe-Olo'nun R_f değeri 0,03 olarak tespit edilmiş ve bu sonuçlar doğrultusunda AuFe-Olo'nun ^{131}I ile işaretlendiği gösterilmiştir.



Şekil 4.11 TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Olomoucine (c) ve ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e (d) ait kromatogramlar

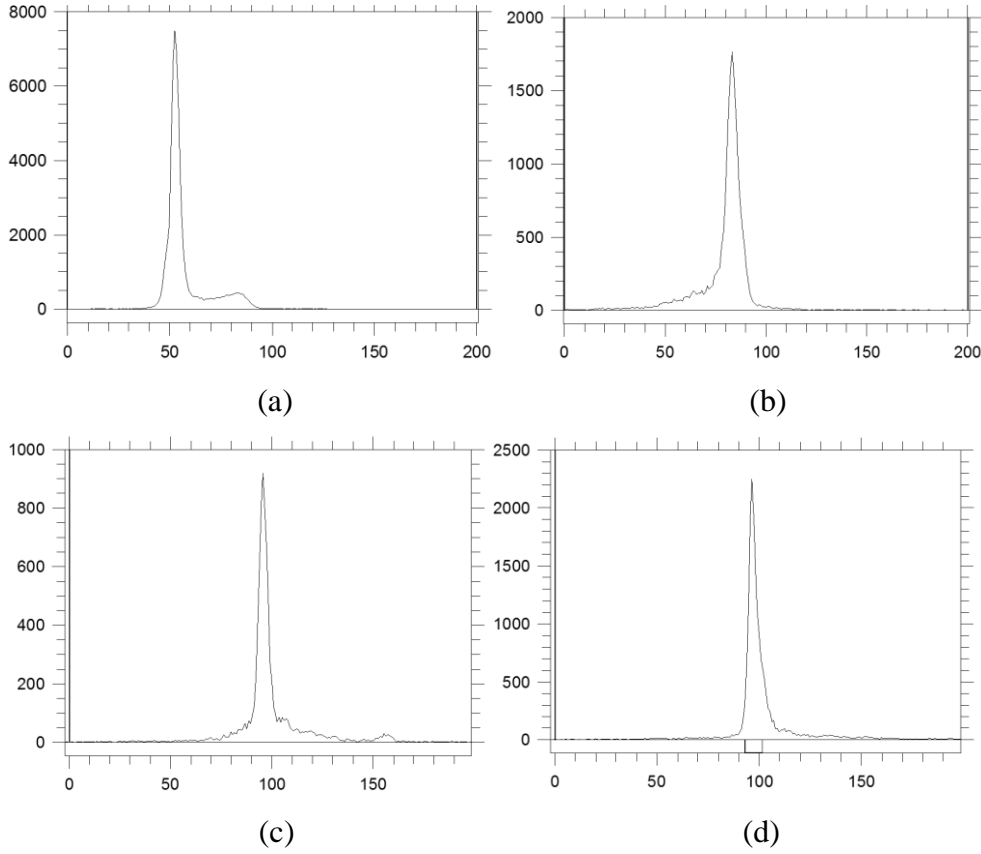
^{131}I 'in iodojen ile yükseltgenmesi %100'e yakın değerlerde sağlanırken, Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlenme verimi sırasıyla $93,27 \pm 5,08$ ve $85,50 \pm 7,08$ olarak bulunmuştur.



Şekil 4.12 TLRC-2 banyo çözeltisinde ^{131}I (a), yükseltmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Olomoucine (c) ve ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e (d) ait kromatogramlar

4.4.2 Kağıt elektroforezi yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Elektroforez kromatogramlarında işaretli örneklerin uygulama noktası 10. cm'dir. 0-10 cm arası pozitif kutup iken 10-20 cm arası negatif kutuptur. Negatif yüklü ^{131}I ve yükseltmiş ^{131}I pozitif kutup boyunca taşınırken, ^{131}I işaretli Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in uygulama noktasında kaldığı kromatogramlardan görülmekte olup bu örneklerin yüksüz olduğu tespit edilmiştir.



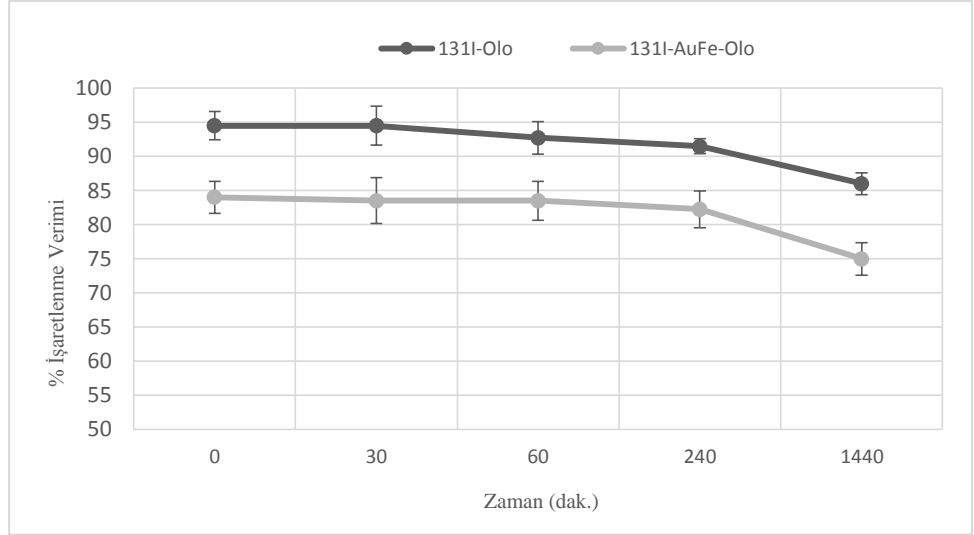
Şekil 4.13 TLRC-1 banyo çözeltisinde ^{131}I (a), yükseltgenmiş ^{131}I (b), ^{131}I -Olomoucine (c) ve ^{131}I -AuFe-Olomoucine'e (d) kağıt elektroforezi kromatogramları

4.4.3 Lipofilite sonuçları

Olomoucine'in teorik lipofilite değeri ChemAxon ve ALOGPS programları ile sırasıyla 1,58 ve 1,18 olarak hesaplanmıştır. Olomoucine'in deneysel lipofilite değeri ise $0,37 \pm 0,03$ olarak bulunmuştur.

4.4.4 Stabilite sonuçları

Şekil 4.14'de Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in ^{131}I ile radyoışartleme kararlılığının zamana göre değişimi gösterilmiştir. Grafikte görüldüğü üzere, ^{131}I -Olo ve ^{131}I -AuFe-Olo'nun radyoışartlenme veriminde 240 dakika boyunca kayda değer bir değişiklik görülmezken, 1440 dakika sonunda iki örnekte de radyoışartlenme veriminde yaklaşık %10 düşüş belirlenmiştir.

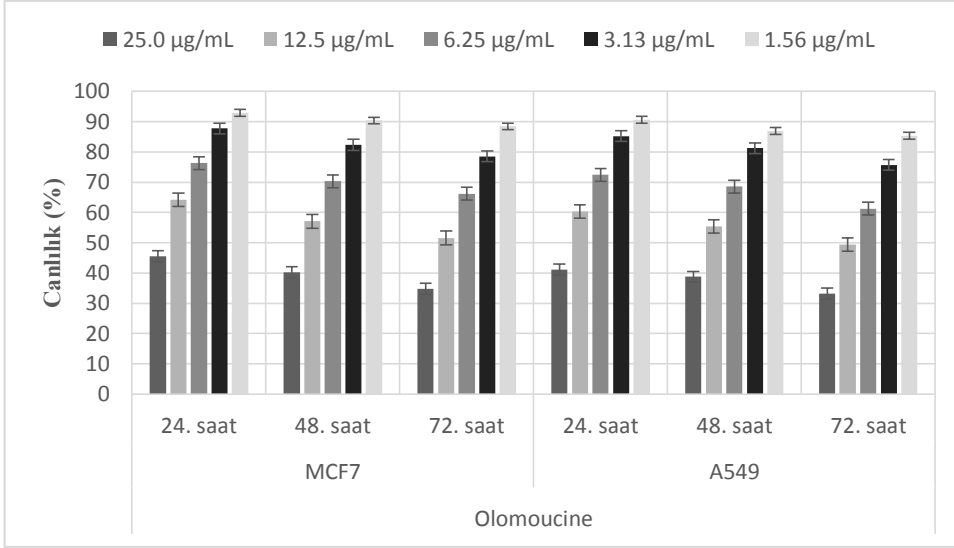


Şekil 4.14 ^{131}I -Olo ve ^{131}I -AuFe-Olo'ya ait stabilite çalışması sonuçları

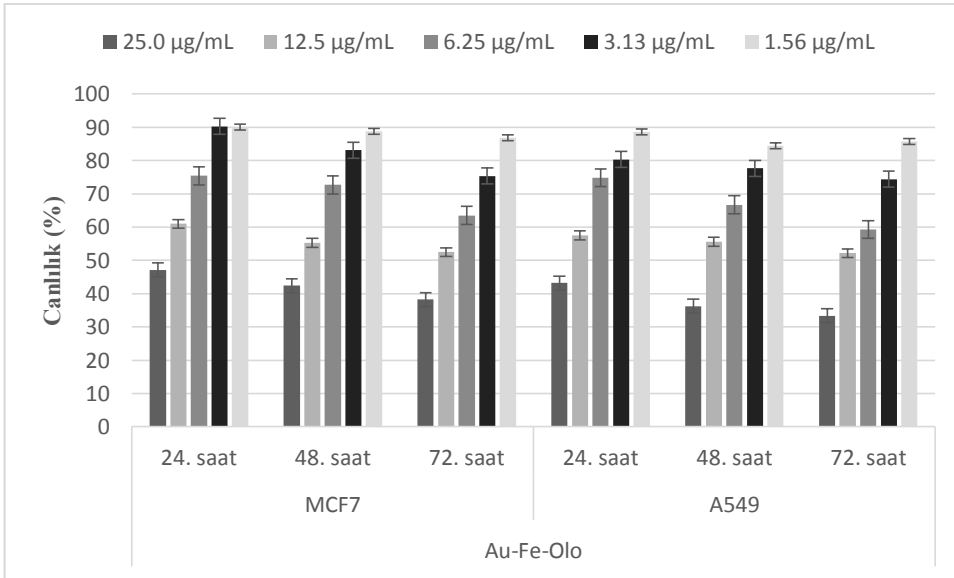
4.5 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

4.5.1 Sitotoksosite sonuçları

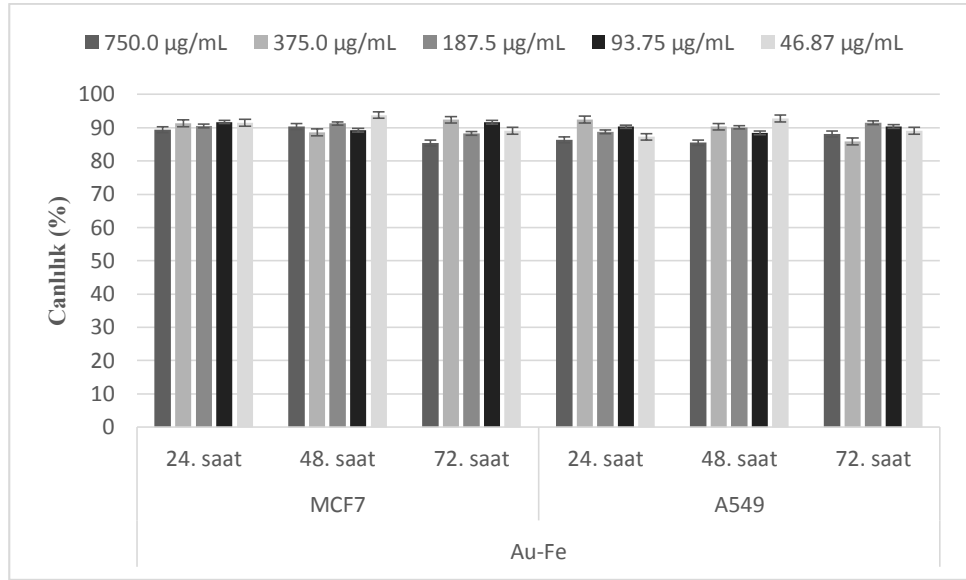
Olomoucine, AuFe ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in farklı konsantrasyonları kullanılarak MCF7 ve A549 hatları üzerinde sitotoksosite çalışması yapılmıştır. Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Şekil 4.17'de sitotoksosite çalışması sonucunda MCF7 ve A549 hücrelerinde 24, 48 ve 72 saatlerde belirlenen % canlılık değerleri verilmiştir. Olomoucine'in 1,56 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin 72 saat içerisinde belirgin sitotoksik etkisi bulunmazken, 25 $\mu\text{g/mL}$ Olomoucine 24 saatte hücrelerde canlılık oranlarını %50'ye indirmektedir. AuFe nanoparçacıklara konjuge edilen 25 $\mu\text{g/mL}$ Olomoucine ise yine 24 saatte canlılık oranını yarıya indirmektedir. İki hücre hattı karşılaştırıldığında Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine örneklerinin A549 hücre hattı üzerinde MCF7 hücrelerine kıyasla az da olsa sitotoksitesinin fazla olduğu görülmektedir. Bunun yanında AuFe nanoparçacıkların iki hücre hattında da herhangi bir sitotoksik etkisi gözlenmemiştir.



Şekil 4.15 MCF7 ve A549 hücre hatlarında Olomoucine'in konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri



Şekil 4.16 MCF7 ve A549 hücre hatlarında AuFe-Olo'nun konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri



Şekil 4.17 MCF7 ve A549 hücre hatlarında AuFe'nin konsantrasyona ve zamana bağlı % canlılık değerleri

Olomoucine ve AuFe-Olo'nun MCF7 ve A549 hücre hatları üzerindeki IC_{50} değerleri Çizelge 4.5'de verilmiştir. Bu sonuçlara göre, A549 hücre hattında 24 saat sonunda elde edilen IC_{50} değerleri Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine için sırasıyla 17,96 µg/mL ve 18,49 µg/mL iken bu değerler MCF7 hücre hattı için 21,31 µg/mL ve 21,29 µg/mL'dir.

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge edilmiş Olomoucine'in IC_{50} değerlerinin birbirlerine çok yakın olması nanoparçacık konjugasyonunun sonrasında Olomoucine'in sitotoksitesinde herhangi bir farklılığa yol açmadığını göstermiştir. Böylece, yapılan çeşitli çalışmalar ile vücut içerisinde inert olduğu gösterilmiş olan manyetik özellikteki altın kaplı demir nanoparçacıklara Olomoucine'in terapötik olarak etkinliği azaltılmadan konjuge edilerek hedeflenmesi konusunda umut vermiştir (Jafari et al., 2010; Hoskins, Min, et al., 2012; Jenkins et al., 2013). Başka gruplar tarafından yapılan sitotoksite çalışmaları sonucunda Olomoucine'in MCF7 ve A549 hücreleri için IC_{50} değerleri sırasıyla 16,36 µg/mL ve 38,78 µg/mL olarak belirtilmiştir (Martínez-Urbina et al., 2010; Sun et al., 2013).

Çizelge 4.5 Olomoucine ve AuFe-Olo'ya ait IC₅₀ değerleri

| Zaman | Olomoucine | | AuFe-Olo | |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | MCF7 | A549 | MCF7 | A549 |
| 24.saat | 21,31 µg/mL | 17,96 µg/mL | 21,29 µg/mL | 18,49 µg/mL |
| 48.saat | 16,48 µg/mL | 15,38 µg/mL | 17,18 µg/mL | 14,25 µg/mL |
| 72.saat | 12,99 µg/mL | 11,40 µg/mL | 13,56 µg/mL | 11,62 µg/mL |

4.5.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi sonuçları

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in MCF7 ve A549 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi incelenmiştir.

- Olo: Olomoucine
- AuFe-Olo: Altın Demir parçacıklara konjuge Olomoucine
- MA-AuFe-Olo: Manyetik alan uygulanmış Olomoucine konjuge AuFe nanoparçacıklar

Çizelge 4.6 incelendiğinde ¹³¹I-Olo'nun MCF7 ve A549 hücrelerindeki bağlanma değerlerinin benzer olduğu ve zamana bağlı olarak tutulum miktarlarının arttığı gözlenmiştir. ¹³¹I-Olo'nun 240. dakika sonunda MCF7 ve A549 hücrelerindeki bağlanma değerleri sırasıyla % 25,89 ve % 26,11 olarak tespit edilmiştir. Bunun yanında her iki hücre hattında ¹³¹I'in bağlanma düzeyinin oldukça düşük, % 1 mertebelerinde olduğu ve zamanla değişmediği görülmektedir.

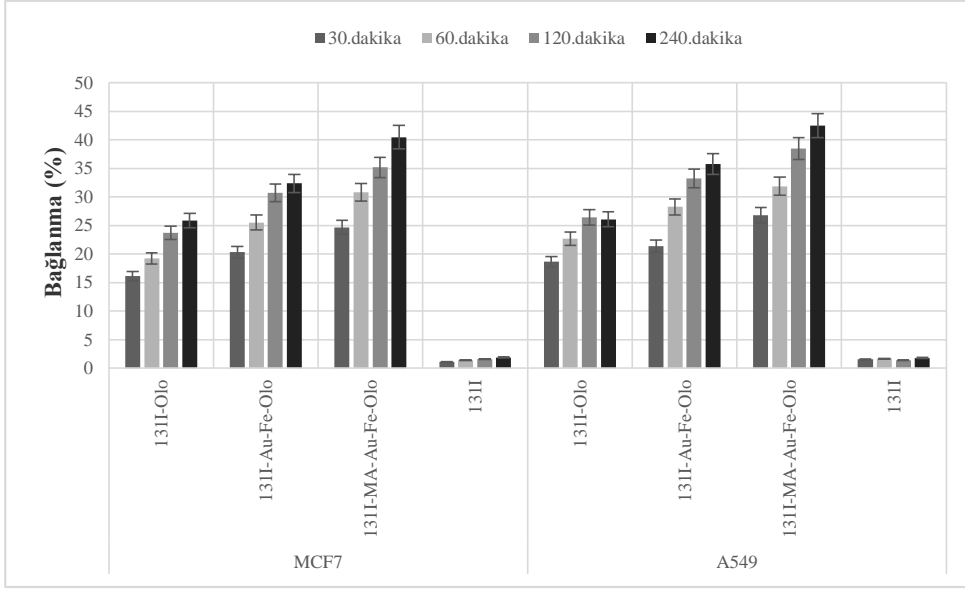
Şekil 4.19'da verilen grafikten elde edilen veriler değerlendirildiğinde manyetik alan uygulanan ¹³¹I işaretli AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in her iki hücre hattında da en yüksek tutulumlara sahip olduğu ve zamanla tutulumun arttığı görülmektedir. Manyetik alan uygulanan ve uygulanmayan ¹³¹I-AuFe-Olo örnekleri birbiri ile kıyaslandığında manyetik alan uygulamasının MCF7 ve A549 hücrelerinde hücre bağlanma düzeyini 1,2 kat arttırdığı tespit edilmiştir. ¹³¹I-MA-AuFe-Olo ile ¹³¹I-Olo'nun hücre tutulumları

karşılaştırıldığında ise her iki hücre hattında bu oranın 1,6'ya çıktığı görülmektedir. Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde manyetik alan uygulanması hücre bağlanma düzeylerini daha yüksek düzeylere çıkaracak ve ilaç etkinliğini arttırmada önemli bir rol oynayacaktır.

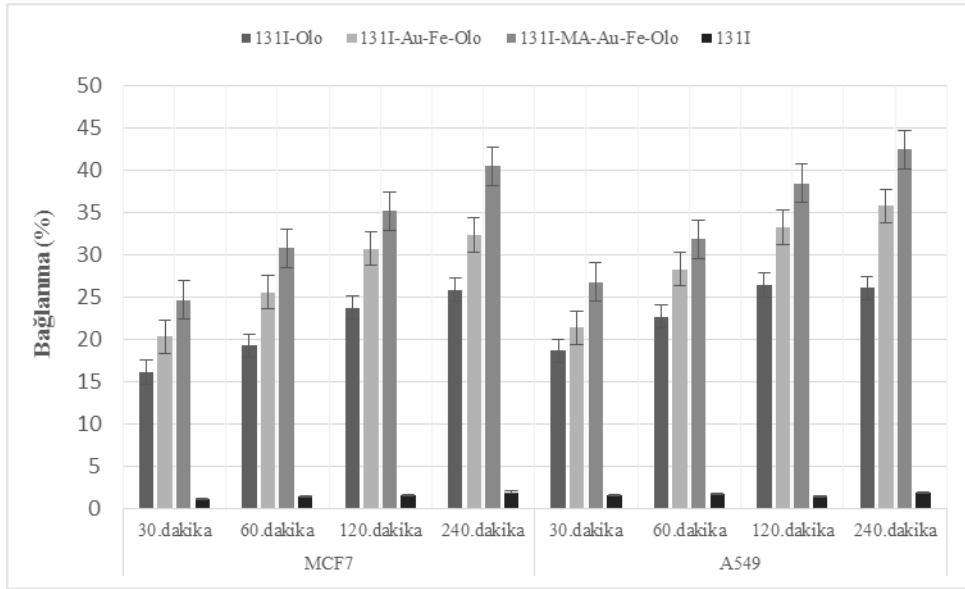
Çizelge 4.6 MCF7 ve A549 hücre hatlarında ^{131}I -Olo, ^{131}I -AuFe-Olo, ^{31}I -MA-AuFe-Olo ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi

| <u>MCF7</u> | % Bağlanma | | | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|
| | 30.dakika | 60.dakika | 120.dakika | 240.dakika |
| ^{131}I -Olo | 16,12±1,91 | 19,24±2,14 | 23,75±3,51 | 25,89±2,97 |
| ^{131}I -AuFe-Olo | 20,32±2,02 | 25,55±3,55 | 30,77±3,48 | 32,38±3,33 |
| ^{131}I -MA-AuFe-Olo | 24,69±2,56 | 30,82±3,38 | 35,19±3,78 | 40,5±4,32 |
| ^{131}I | 1,13±0,12 | 1,39±0,16 | 1,58±0,74 | 1,9±0,23 |
| <u>A549</u> | % Bağlanma | | | |
| | 30.dakika | 60.dakika | 120.dakika | 240.dakika |
| ^{131}I -Olo | 18,66±2,11 | 22,7±2,36 | 26,43±2,84 | 26,11±3,15 |
| ^{131}I -AuFe-Olo | 21,37±2,89 | 28,29±3,19 | 33,26±3,56 | 35,79±3,99 |
| ^{131}I -MA-AuFe-Olo | 26,81±2,34 | 31,9±3,8 | 38,46±3,8 | 42,52±4,15 |
| ^{131}I | 1,55±0,2 | 1,68±0,18 | 1,39±0,35 | 1,78±0,26 |

^{131}I -Au-Fe-Olo'nun hücre düzeyindeki bağlanma etkinliği incelendiğinde her iki hücredeki tutulum değerlerinin zamanla arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.18). ^{131}I -AuFe-Olo'nun bağlanma düzeyleri ^{131}I -Olo ile karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farkın olduğu ve 240. dakikada MCF7 hücrelerinde yaklaşık % 7, A549 hücrelerinde yaklaşık % 10 daha yüksek tutulumların olduğu görülmektedir.



Şekil 4.18 MCF7 ile A549 hücre hatlarında ^{131}I -Olo, ^{131}I -Au-Fe-Olo, ^{131}I -MA-Au-Fe-Olo ve ^{131}I 'in bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi



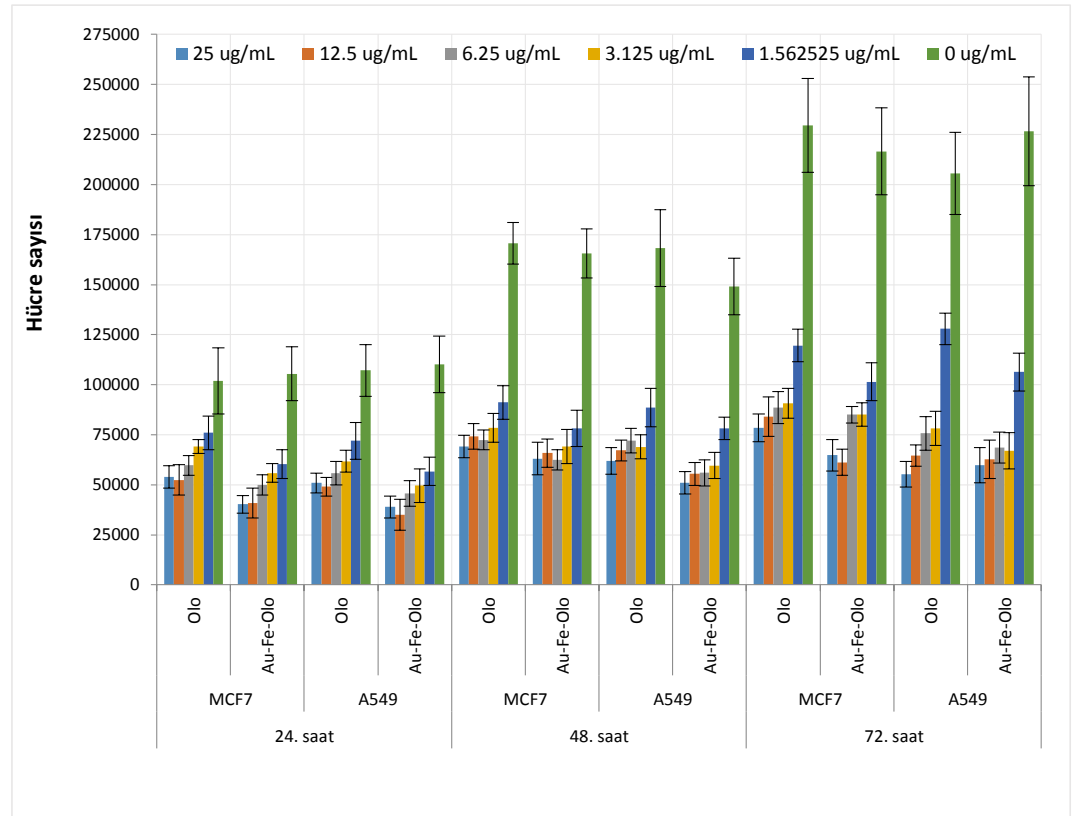
Şekil 4.19 ^{131}I -Olo, ^{131}I -Au-Fe-Olo, ^{131}I -MA-Au-Fe-Olo ve ^{131}I 'in MCF7 ile A549 hücre hatlarında bağlanma etkinliğinin değişimi

4.5.3 Proliferasyon sonuçları

Olomoucine ve AuFe-Olo'nun farklı konsantrasyonlarının MCF7 ve A549 hücre hatları üzerindeki proliferasyon hızına etkileri zamana bağlı olarak incelenmiştir.

Şekil 4.20’de görüldüğü üzere iki hücre hattında da AuFe-Olo ve Olomoucine’in kontrol gruplarına kıyasla proliferasyon hızını 24 saatte %40, 48 saatte %55 ve 72 saat sonunda ise % 70 seviyelerinde düşürdükleri belirlenmiştir. Olomoucine’in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu sonrasında antiproliferatif etkisinin %15 arttığı görülmektedir.

A549 hücrelerinde Olomoucine ve AuFe-Olo’nun proliferasyon hızını düşürücü etkisinin arttığı söylenebilir. Akciğer kanserlerinde CDK4’ün görevini tam olarak yerine getiremediği bilinmektedir. Bu sebeple, spesifik CDK4 inhibitörü olan Olomoucine’in bu hücre hatlarında hücre bölünmesini inhibe ederek proliferasyon hızını azalttığı söylenebilir (Wan et al., 2013).



Şekil 4.20 MCF7 ve A549 hücrelerinde Olo ve AuFe-Olo’nun proliferasyon hızına etkisi

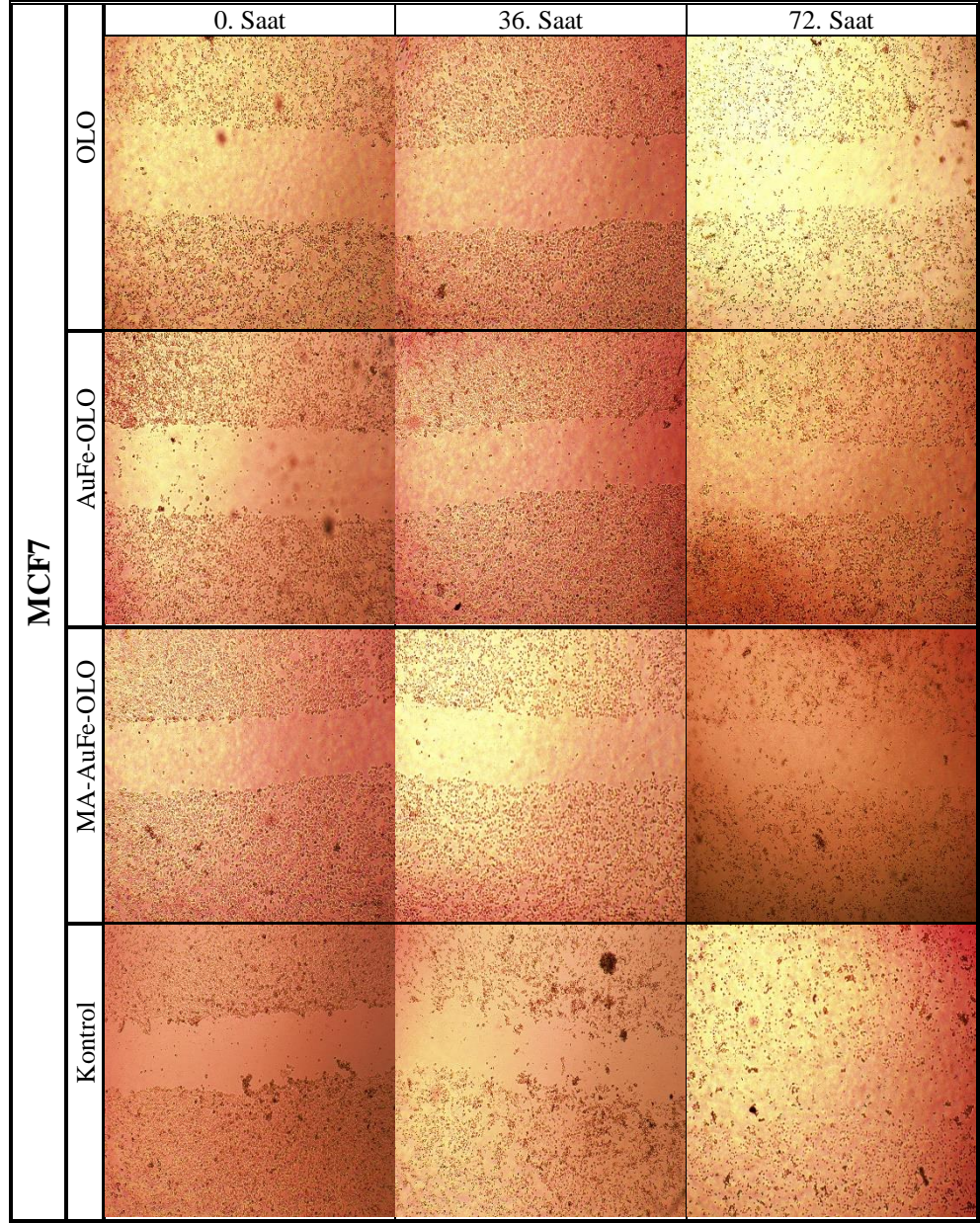
4.5.4 Hücre migrasyonu sonuçları

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine’in MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde hücre migrasyon hızı incelenmiştir. Olomoucine konjuge manyetik AuFe nanoparçacıkların hücreler üzerinde manyetik alan ile

hedeflenebilirliği inkübasyon sırasında kuyuların altına yerleştirilen NdFeB mıknatısları yardımı ile araştırılmıştır. Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde hücre migrasyonu sonuçları Çizelge 4.7 ve Şekil 4.23'de verilmiştir.

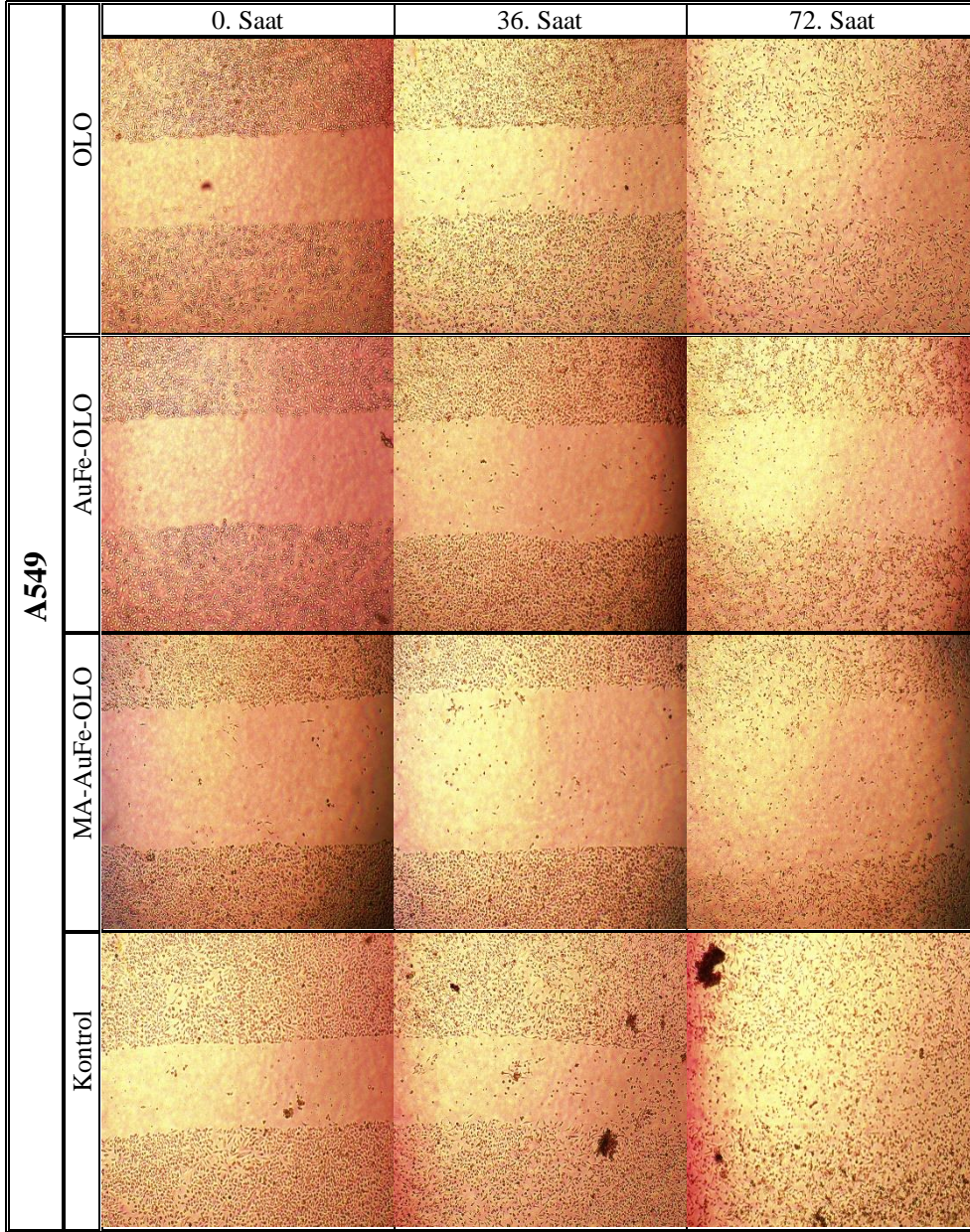
Çizelge 4.7 MCF7 ve A549 hücre hatlarında yüzde hücre migrasyonu değerleri

| MCF7 | % Hücre migrasyonu | | | |
|---------|--------------------|------------|-----------|-------------|
| | Kontrol | Olo | AuFe-Olo | MA-AuFe-Olo |
| 1.saat | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 |
| 4.saat | 2,89±0,10 | 0,00 | 0,83±1,18 | 2,05±1,45 |
| 8.saat | 5,84±2,55 | 0,00 | 0,83±1,18 | 2,05±1,45 |
| 10.saat | 10,52±2,39 | 0,76±1,07 | 2,32±2,06 | 2,05±1,45 |
| 24.saat | 18,17±2,98 | 1,45±1,03 | 3,63±2,59 | 2,05±1,45 |
| 36.saat | 25,02±3,55 | 1,45±1,03 | 5,29±0,41 | 2,09±2,55 |
| 48.saat | 34,72±3,39 | 3,16±1,03 | 5,29±0,41 | 2,50±1,05 |
| 60.saat | 40,61±8,29 | 3,16±1,03 | 8,65±1,15 | 2,86 |
| 72.saat | 54,02±8,55 | 3,52±0,66 | 7,50 | 2,86 |
| A549 | % Hücre migrasyonu | | | |
| | Kontrol | Olo | AuFe-Olo | MA-AuFe-Olo |
| 1.saat | 0,71±1,00 | 1,85±2,62 | 0,00 | 0,00 |
| 4.saat | 3,92±0,42 | 5,09±4,58 | 3,18±0,11 | 1,45±0,32 |
| 8.saat | 5,03±1,16 | 5,79±4,55 | 3,18±0,11 | 1,45±0,32 |
| 10.saat | 7,13±0,86 | 7,87±2,29 | 3,69±0,66 | 1,45±0,32 |
| 24.saat | 11,02±4,26 | 11,57±7,53 | 4,74±1,41 | 5,46±0,20 |
| 36.saat | 19,96±4,13 | 12,27±7,09 | 6,88±0,69 | 5,16±0,46 |
| 48.saat | 30,64±2,86 | 16,55±8,04 | 7,39±0,51 | 5,60±0,83 |
| 60.saat | 37,09±2,91 | 17,59±7,20 | 7,39±0,51 | 5,60±0,83 |
| 72.saat | 45,31±3,64 | 18,52±8,51 | 7,91±1,12 | 7,61±1,29 |



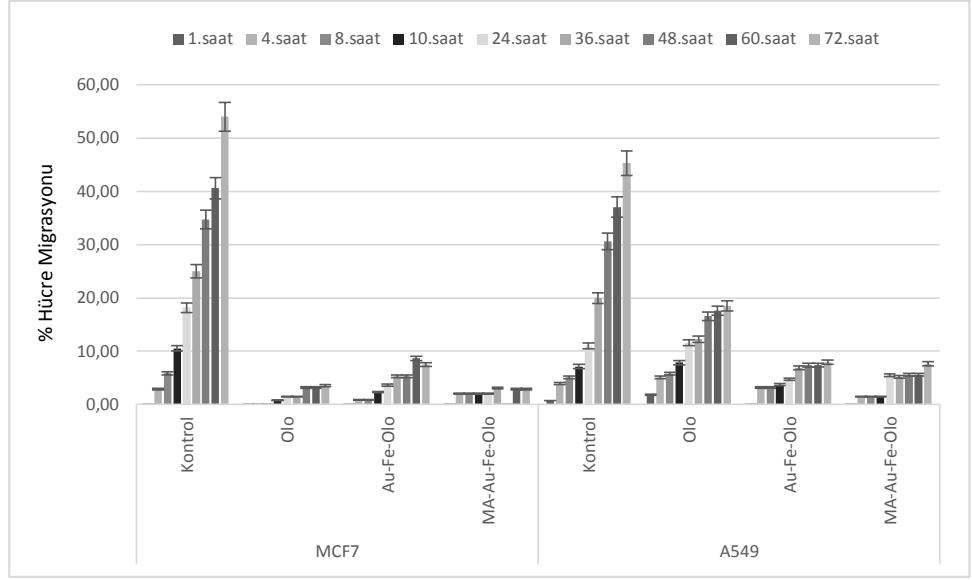
Şekil 4.21 MCF7 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu

Çizelge 4.7’de görüldüğü üzere kontrol MCF7 hücrelerinde 72 saat sonunda %54,02 kapanma gerçekleşirken aynı zaman aralığında Olomoucine ve AuFe-Olo bulunan hücrelerde sırasıyla %3,51 ve %7,50 kapanma görülmüştür. Manyetik alan uygulanan AuFe-Olo’nun bulunduğu hücrelerde ise %2,86 kapanma bulunmuştur.



Şekil 4.22 A549 hücre hattında zamana bağlı hücre migrasyonu

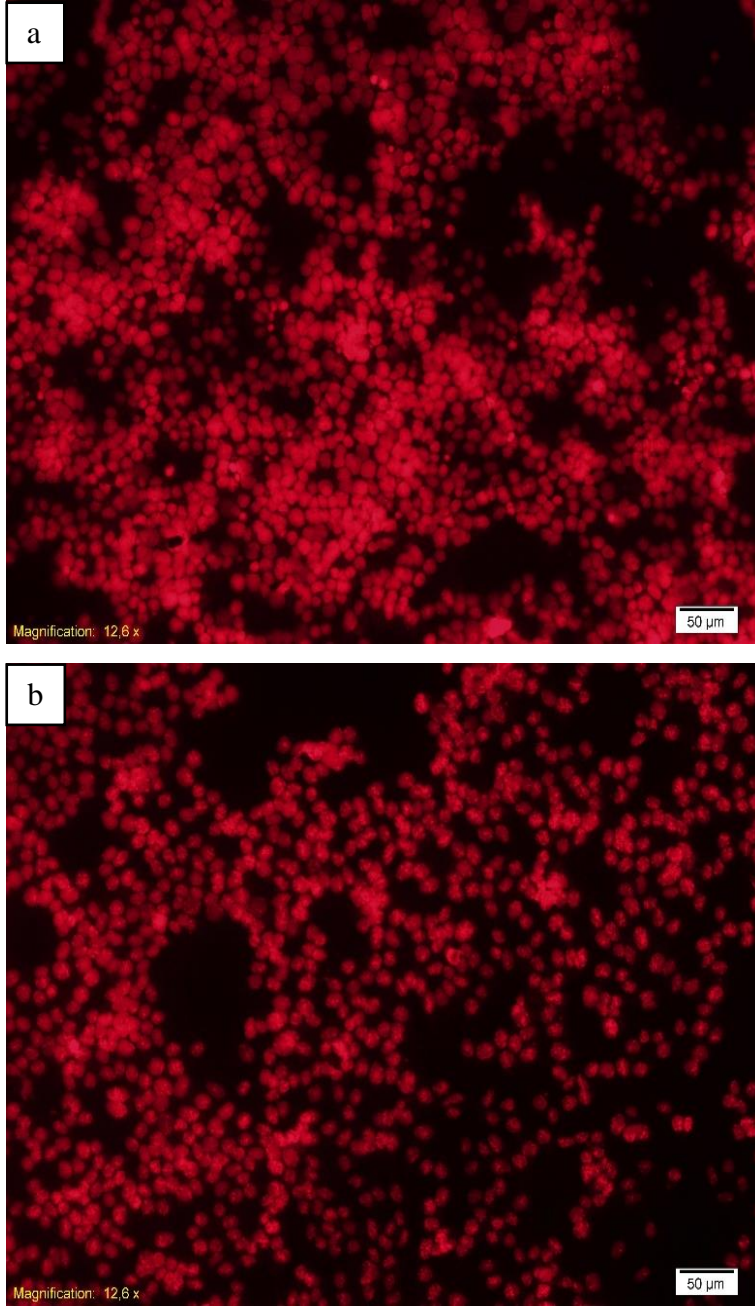
A549 hücre hattında ise kontrol gruplarında 72 saat sonunda %45,3 kapanma varken Olomoucine, AuFe-Olo örneklerinde sonuçlar sırasıyla %18,52 ve %7,91 olarak hesaplanmıştır. AuFe-Olo içeren hücrelere manyetik alan uygulanması sonucu %7,61 kapanma tespit edilmiştir.



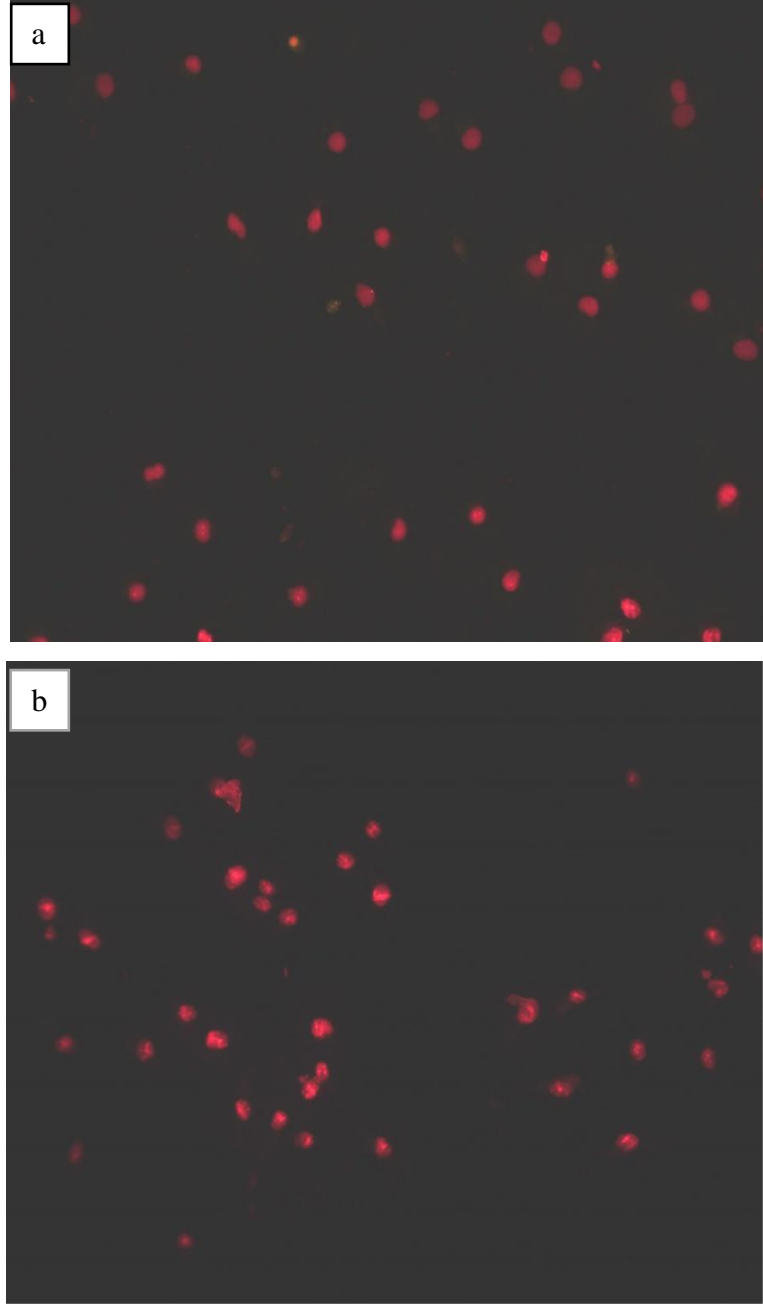
Şekil 4.23 MCF7 ve A549 hücre hatlarında hücre migrasyonu değerleri

4.5.5 Apoptosis sonuçları

MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde yapılan apoptosis çalışmasında hücelere IC_{50} değerinde örnekler verilip 24 saat inkübasyon sağlanmıştır. Boyama işlemi sonunda, sadece Olomoucine'e maruz bırakılmış A549 hücrelerinde apoptosis görülmüştür. Bu hücrelerde apoptosise uğrayan hücre oranı %16,71 olarak hesaplanmıştır. Diğer hücrelerde ise Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in apoptosisi tetiklediğine dair bir gösterge bulunmamaktadır. Şekil 4.23 ve Şekil 4.24'de apoptosis çalışması sırasında elde edilen görüntüler verilmiştir.



Şekil 4.24 MCF7 hücrelerinde Olomoucine (a) ve AuFe-Olo'nun (b) apoptotik etkisi



Şekil 4.25 A549 hücrelerinde Olomoucine (a) ve AuFe-Olo'nun (b) apoptotik etkisi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında, mikroemülsiyon yöntemi ile demir çekirdeğinin etrafı altın tabakası ile kaplanarak manyetik özellikteki hibrid nanoparçacıklar ($\text{Au}@\text{Fe}_3\text{O}_4$) sentezlenmiştir. Parçacıkların karakterizasyonu SEM, TEM, VSM, XRD ve DLS analizleri ile yapılmıştır.

Parçacıkların ortalama boyutu $6,03 \pm 0,87$ nm olarak bulunmuştur. DLS analizi sonucu elde edilen ortalama parçacık boyutu agregatlaşma sonucu diğer yöntemler ile belirlenen boyutlardan farklılık göstermektedir. DLS analizinde 0,188 olarak belirlenen PDI değeri ise parçacıkların istenilen şekilde monodispers olduğunu belirtmektedir.

XRD analizi sonucu elde edilen diagramda AuFe nanoparçacıklarda arzu edilen şekilde bcc demir motifine ait piklerin fcc altın motifi ile baskılandığı görülmektedir. Bu da sentez sırasında demir çekirdeğin başarıyla altın tabakasıyla kaplandığı sonucunu vermektedir.

AuFe nanoparçacıkların VSM analiz sonuçlarına göre manyetizasyon değeri 5,27 emu/g olarak tespit edilmiştir. Benzer çalışmalarda elde edilen manyetizasyon değerlerinden düşük olan bu sonuç parçacık boyutu veya kullanılan demir/altın oranının arttırılması ile istenilen değerlere çekilebilir.

AuFe nanoparçacıkların Olomoucine ile konjugasyonunda ara molekül olarak sisteamin hidroklorür ve CDI (1,1'-karbonildiimidazol) kullanılmıştır. Konjugasyon işlemi FTIR analizi ile doğrulanmıştır. Olomoucine'in parçacıklara konjugasyonunun verimi HPLC analizi ile %67,60 olarak belirlenmiştir. Konjugasyon reaksiyonunda pH, zaman, madde miktarı ve sıcaklık gibi parametrelerin veya ara molekül olarak kullanılan ajanların değiştirilmesi verimin arttırılmasını sağlayabilir.

İyodinasyon işlemlerinde iodojen yöntemi kullanılmıştır. İşaretleme işlemi sonrası kalite kontrol çalışmalarında TLRC, elektroforez, lipofilite ve stabilite çalışmaları yapılmıştır. Olomoucine'in ^{131}I ile işaretlenmesi yüksek verimle

gerçekleştirilirken AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in işaretlenme verimi nispeten daha düşüktür. Radyoişaretleme sonrasında 37°C inkübasyon altında 4 saat içerisinde bağlanma etkinliğinde bir değişim görülmezken, 24 saat sonrasında %10 verim kaybı belirlenmiştir.

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in terapötik etkinliği *in vitro* olarak MCF7 ve A549 hücre hatlarında çalışılmıştır. Bu kapsamda sitotoksosite, hücrelere tutunma etkinliği, proliferasyon hızı, hücre migrasyonu ve apoptosis çalışmaları yapılmıştır.

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine için sitotoksosite çalışması yapılmış ve WST-8 analizi ile hücrelerdeki IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir.

Yapılan inkorporasyon çalışmaları sonucunda, iki hücre hattında da tüm zaman parametreleri boyunca manyetik alan uygulanmış hücrelerde AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine diğer örneklerle kıyasla daha yüksek bağlanma yüzdesine sahiptir.

Olomoucine ve AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in MCF7 ve A549 hücre hatlarında proliferasyon hızını düşürücü etkisi gösterilmiştir. A549 hücrelerinde MCF7'ye kıyasla bölünme hızında düşüş daha fazla belirlenmiştir. Akciğer kanserlerinde sıklıkla görülen CDK4 enzimidaki aktivite kaybı bu durumun sebebi olabilir.

Hücre migrasyonu çalışmalarına göre MCF7 ve A549 hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla Olomoucine ve AuFe-Olo'nun hücre migrasyon hızında 4-5 kat düşüş bulunmaktadır. AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine içeren hücrelerde manyetik alan uygulanması ile hücre migrasyon hızında düşüş gözlemlenmiştir.

AuFe nanoparçacıklara konjuge Olomoucine'in manyetik alan altında MCF7 ve A549 hücreleri üzerinde tutulumunun arttığı görülürken, hücre

migrasyonu ve proliferasyon çalışmaları sonucunda manyetik alan altında hedeflenen Olomoucine'in antiproliferatif etkisinin arttırıldığı tespit edilmiştir.

Olomoucine A549 hücrelerinde apoptosisi tetiklerken, MCF7 hücre hattında apoptosise uğrayan hücreye rastlanmamıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla, Olomoucine'in AuFe nanoparçacıklara konjugasyonu ile Olomoucine manyetik özelliğe sahip bir molekül haline getirilmiş ve manyetik alan yardımı ile hedef bölgeye yönlendirilerek etkinliği arttırılmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçların CDK inhibitörlerinin daha etkili bir şekilde kullanılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abraham, R., Acquarone, M., Andersen, A., Asensi, A., Bellé, R., Berger, F. and Verlhac, M.**, 1995, Cellular effects of olomoucine, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Biology of the Cell*, 83(2-3), pp.105–120.
- Alessi, F., Quarta, S., Savio, M., Riva, F., Rossi, L., Stivala, L. A. and Prospero, E.**, 1998, The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Olomoucine and Roscovitine Arrest Human Fibroblasts in G1 Phase by Specific Inhibition of CDK2 Kinase Activity. *Experimental Cell Research*, 245(1), pp.8–18.
- Alexiou, C., Schmidt, A., Klein, R., Hulin, P., Bergemann, C. and Arnold, W.**, 2002, Magnetic drug targeting: biodistribution and dependency on magnetic field strength. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 252, pp.363–366.
- Alivisatos, A.P.**, 1996, Semiconductor Clusters, Nanocrystals, and Quantum Dots. *Science*, 271(5251), pp.933–937.
- Allen, T.M. and Cullis, P.R.**, 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5665), pp.1818–22.
- Ansari, S. A. and Husain, Q.**, 2011, Designing and surface modification of zinc oxide nanoparticles for biomedical applications. *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 49(9), pp.2107–15.
- Ansari, S. A., Husain, Q., Qayyum, S. and Azam, A.**, 2011, Immobilization of *Kluyveromyces lactis* β galactosidase on concanavalin A layered aluminium oxide nanoparticles—Its future aspects in biosensor applications. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 70(3-4), pp.119–126.
- Asmatulu, R., Zalich, M. A., Claus, R. O. and Riffle, J. S.**, 2005, Synthesis, characterization and targeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magnetic fields. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 292, pp.108–119.
- Azevedo, W. and Leclerc, S.**, 1997, Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of ...*, 786, pp.771–786.
- Barrière, C., Santamaría, D., Cerqueira, A., Galán, J., Martín, A., Ortega, S. and Barbacid, M.**, 2007, Mice thrive without Cdk4 and Cdk2. *Molecular oncology*, 1(1), pp.72–83.
- Berthet, C., Aleem, E., Coppola, V., Tessarollo, L. and Kaldis, P.**, 2003, Cdk2 Knockout Mice Are Viable. *Current Biology*, 13(20), pp.1775–1785.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bhattacharya, R. and Mukherjee, P.**, 2008, Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), pp.1289–306.
- Bonnemain, B.**, 1998, Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physicochemical characteristics and clinical applications. A review. *Journal of drug targeting*, 6(3), pp.167–74.
- Boyd, B.J.**, 2008, Past and future evolution in colloidal drug delivery systems. *Expert opinion on drug delivery*, 5(1), pp.69–85.
- Brachwitz, K., Voigt, B., Meijer, L., Lozach, O., Schächtele, C., Molnár, J. and Hilgeroth, A.**, 2003, Evaluation of the first cytostatically active 1-aza-9-oxafluorenes as novel selective CDK1 inhibitors with P-glycoprotein modulating properties. *Journal of medicinal chemistry*, 46(5), pp.876–9.
- Brähler, M., Georgieva, R., Buske, N., Müller, A., Müller, S., Pinkernelle, J. and Bäuml, H.**, 2006, Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging. *Nano letters*, 6(11), pp.2505–9.
- Brannon-Peppas, L. and Blanchette, J.O.**, 2004, Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 56(11), pp.1649–59.
- Bystrzejewski, M., Cudzilo, S., Huczko, A., Lange, H., Soucy, G., Cota-Sanchez, G. and Kaszuwara, W.**, 2007, Carbon encapsulated magnetic nanoparticles for biomedical applications: thermal stability studies. *Biomolecular engineering*, 24(5), pp.555–8.
- Carpenter, E. E., Kumbhar, A., Wiemann, J. A., Srikanth, H., Wiggins, J., Zhou, W. and O'Connor, C. J.**, 2000, Synthesis and magnetic properties of gold–iron–gold nanocomposites. *Materials Science and Engineering: A*, 286(1), pp.81–86.
- Casula, M. F., Floris, P., Innocenti, C., Lascialfari, A., Marinone, M., Corti, M. and Sangregorio, C.**, 2010, Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents Based on Iron Oxide Superparamagnetic Ferrofluids. *Chemistry of Materials*, 22(5), pp.1739–1748.
- Chang, Y.-T., Gray, N. S., Rosania, G. R., Sutherlin, D. P., Kwon, S., Norman, T. C. and Schultz, P. G.**, 1999, Synthesis and application of functionally diverse 2,6,9-trisubstituted purine libraries as CDK inhibitors. *Chemistry & Biology*, 6(6), pp.361–375.
- Chastellain, M., Petri, A. and Hofmann, H.**, 2004, Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 278(2), pp.353–60.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chatterjee, S., Bandyopadhyay, A. and Sarkar, K.**, 2011, Effect of iron oxide and gold nanoparticles on bacterial growth leading towards biological application. *Journal of nanobiotechnology* 9(1), 34.
- Cho, K., Wang, X., Nie, S., Chen, Z. G. and Shin, D. M.**, 2008, Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), pp.1310–6.
- Chunfu, Z., Jinquan, C., Duanzhi, Y., Yongxian, W., Yanlin, F. and Jiajü, T.**, 2004, Preparation and radiolabeling of human serum albumin (HSA)-coated magnetite nanoparticles for magnetically targeted therapy. *Applied radiation and isotopes: including data, instrumentation and methods for use in agriculture, industry and medicine*, 61(6), pp.1255–9.
- Connell-Crowley, L., Solomon, M. J., Wei, N. and Harper, J. W.**, 1993, Phosphorylation independent activation of human cyclin-dependent kinase 2 by cyclin A in vitro. *Molecular biology of the cell*, 4(1), pp.79–92.
- Connor, E. E., Mwamuka, J., Gole, A., Murphy, C. J. and Wyatt, M. D.**, 2005, Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 1(3), pp.325–7.
- Cook, S. J., Wakelam, M., Buckley, C. D., Simmons, D., Collins, I. and Garrett, M. D.**, 2005, Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(4), pp.366–373.
- Crampton, H.L. and Simanek, E.E.**, 2007, Dendrimers as drug delivery vehicles: non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers. *Polymer international*, 56(4), pp.489–496.
- Daniel, M.-C. and Astruc, D.**, 2004, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical reviews*, 104(1), pp.293–346.
- Davies, T. G., Pratt, D. J., Endicott, J. A., Johnson, L. N. and Noble, M. E. M.**, 2002, Structure-based design of cyclin-dependent kinase inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 93(2), pp.125–133.
- El-Deiry, W.**, 1993, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75(4), pp.817–825.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Farokhzad, O.C. and Langer, R.**, 2006, Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), pp.1456–9.
- Ferrari, M.**, 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges. *Nature reviews. Cancer*, 5(3), pp.161–71.
- Ferrari, M.**, 2008, Nanogeometry: beyond drug delivery. *Nature nanotechnology*, 3(3), pp.131–2.
- Fesquet, D., Labbé, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F. and Cavadore, J. C.**, 1993, The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *EMBO Journal*, 12(8), pp.3111–3121.
- Fisher, R.P. and Morgan, D.O.**, 1994, A novel cyclin associates with M015/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell*, 78(4), pp.713–724.
- Foner, S.**, 1959, Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 30(7), p.548.
- Gamarra, L. F., Pavon, L. F., Marti, L. C., Pontuschka, W. M., Mamani, J. B., Carneiro, S. M. and Amaro, E.**, 2008, In vitro study of CD133 human stem cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*, 4(4), pp.330–9.
- Garcia-Bennett, A., Nees, M. and Fadeel, B.**, 2011, In search of the Holy Grail: Folate-targeted nanoparticles for cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 81(8), pp.976–84.
- Glab, N., Labidi, B., Qin, L.-X., Trehin, C., Bergounioux, C. and Meijer, L.**, 1994, Olomoucine, an inhibitor of the cdc2/cdk2 kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Letters*, 353(2), pp.207–211.
- Goodyear, S. and Sharma, M.C.**, 2007, Roscovitine regulates invasive breast cancer cell (MDA-MB231) proliferation and survival through cell cycle regulatory protein cdk5. *Experimental and molecular pathology*, 82(1), pp.25–32.
- Goon, I. Y., Lai, L. M. H., Lim, M., Munroe, P., Gooding, J. J. and Amal, R.**, 2009, Fabrication and Dispersion of Gold-Shell-Protected Magnetite Nanoparticles: Systematic Control Using Polyethyleneimine. *Chemistry of Materials*, 21(4), pp.673–681.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Goya, G., Grazu, V. and Ibarra, M.**, 2008, Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy. *Current Nanoscience*, 4(1), pp.1–16.
- Gray, N. S., Wodicka, L., Thunnissen, A. M., Norman, T. C., Kwon, S., Espinoza, F. H. and Schultz, P. G.**, 1998, Exploiting chemical libraries, structure, and genomics in the search for kinase inhibitors. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5376), pp.533–8.
- Griffiths, P.R. and Haseth, J.A. De.**, 2007, *Fourier Transform Infrared Spectrometry (Google eBook)*, John Wiley & Sons.
- Gu, Y., Turck, C.W. and Morgan, D.O.**, 1993, Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature*, 366(6456), pp.707–10.
- Gupta, A.K. and Gupta, M.**, 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), pp.3995–4021.
- Häfeli, U.O.**, 2004, Magnetically modulated therapeutic systems. *International journal of pharmaceutics*, 277(1-2), pp.19–24.
- Häfeli, U.O.**, 2003, Radiolabeling of magnetic targeted carriers (MTC) with indium-111. *Nuclear Medicine and Biology*, 30(7), pp.761–769.
- Häfeli, U. O., Roberts, W. K., Pauer, G. J., Kraeft, S.-K. and Macklis, R. M.**, 2001, Stability of biodegradable radioactive rhenium (Re-186 and Re-188) microspheres after neutron-activation. *Applied Radiation and Isotopes*, 54(6), pp.869–879.
- Hall, M. and Peters, G.**, 1996, Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. *Advances in cancer research*, 68, pp.67–108.
- Harisinghani, M. G., Barentsz, J., Hahn, P. F., Deserno, W. M., Tabatabaei, S., van de Kaa, C. H. and Weissleder, R.**, 2003, Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *The New England journal of medicine*, 348(25), pp.2491–9.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J.**, 1998, The role of Cdk7 in CAK function, a retro-retrospective. *Genes & Development*, 12(3), pp.285–289.
- Havlíček, L., Hanus, J., Veselý, J., Leclerc, S., Meijer, L., Shaw, G. and Strnad, M.**, 1997, Cytokinin-derived cyclin-dependent kinase inhibitors: synthesis and cdc2 inhibitory activity of olomoucine and related compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 40(4), pp.408–12.
- Hermanson, G.T.**, 2010, *Bioconjugate Techniques*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hidaka, H. and Kobayashi, R.**, 1992, Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 32, pp.377–97.
- Hong, R., Han, G., Fernández, J. M., Kim, B., Forbes, N. S. and Rotello, V. M.**, 2006, Glutathione-mediated delivery and release using monolayer protected nanoparticle carriers. *Journal of the American Chemical Society*, 128(4), pp.1078–9.
- Hoskins, C., Cuschieri, A. and Wang, L.**, 2012, The cytotoxicity of polycationic iron oxide nanoparticles: common endpoint assays and alternative approaches for improved understanding of cellular response mechanism. *Journal of nanobiotechnology*, 10(1), p.15.
- Hoskins, C., Min, Y., Gueorguieva, M., McDougall, C., Volovick, A., Prentice, P., Wang, Z., Melzer, A., Cuschieri, A. and Wang, L.**, 2012, Hybrid gold-iron oxide nanoparticles as a multifunctional platform for biomedical application. *Journal of nanobiotechnology* 10(1), 27.
- Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C. and Nasmyth, K.**, 1995, Genes involved in sister chromatid separation are needed for b-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell*, 81(2), pp.269–277.
- Islam, M. R., Bach, L. G., Nga, T. T. and Lim, K. T.**, 2013, Covalent ligation of gold coated iron nanoparticles to the multi-walled carbon nanotubes employing click chemistry. *Journal of Alloys and Compounds*, 561, pp.201–205.
- Jain, P.K., El-Sayed, I.H. and El-Sayed, M.A.**, 2007, Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*, 2(1), pp.18–29.
- Jafari, T., Simchi, A. and Khakpash, N.**, 2010, Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron–gold core–shell nanoparticles coated with polyglycerol. *Journal of Colloid and Interface Science* 345(1), 64–71.
- Jenkins, R.**, 2000, X-ray Techniques: Overview. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. 13269-13288. Ed: by R. A. Meyers. John Wiley and Sons Ltd., Chichester.
- Jenkins, J. T., Halaney, D. L., Sokolov, K. V, Ma, L. L., Shipley, H. J., Mahajan, S., Loudon, C. L., Asmis, R., Milner, T. E., Johnston, K. P. and Feldman, M. D.**, 2013, Excretion and toxicity of gold-iron nanoparticles. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine* 9(3), 356–65.
- Jeong, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G. and Kim, S. W.**, 1999, New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 62(1-2), pp.109–114.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jiang, W., Kim, B. Y. S., Rutka, J. T. and Chan, W. C. W.,** 2008, Nanoparticle-mediated cellular response is size-dependent. *Nature nanotechnology*, 3(3), pp.145–50.
- Jork H., Funk W., Fischer W., Wimmer H.,** 1990, Thin Layer Chromatography Volume 1a, Germany.
- Kamb, A., Gruis, N., Weaver-Feldhaus, J., Liu, Q., Harshman, K., Tavtigian, S. and Skolnick, M.,** 1994, A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264(5157), pp.436–440.
- Kayal, S. and Ramanujan, R.V.,** 2010, Anti-Cancer Drug Loaded Iron–Gold Core–Shell Nanoparticles (Fe@Au) for Magnetic Drug Targeting. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 10(9), pp.5527–5539.
- Kemmner, W., Moldenhauer, G., Schlag, P. and Brossmer, R.,** 1992, Separation of tumor cells from a suspension of dissociated human colorectal carcinoma tissue by means of monoclonal antibody-coated magnetic beads. *Journal of Immunological Methods*, 147(2), pp.197–200.
- King, R. W., Peters, J. M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. and Kirschner, M. W.,** 1995, A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell*, 81(2), pp.279–288.
- Klein, T., Buhr, E. and Georg Frase, C.,** 2012, *Advances in Imaging and Electron Physics Volume 171*, Elsevier.
- Knockaert, M., Greengard, P. and Meijer, L.,** 2002, Pharmacological inhibitors of cyclin-dependent kinases. *Trends in Pharmacological Sciences*, 23(9), pp.417–425.
- Kobayashi, M., Kitaoka, Y., Tanaka, Y. and Kawamoto, K.,** 1994, Electrophoretic behaviour and infrared spectra of dihydroxyboryl compounds in aqueous di- and tricarboxylic acids: paper electrophoresis as a tool for determining the chemical states of a substance in solution. *Journal of chromatography. A*, 678(2), pp.351–358.
- Kommareddi, N. S.,** 1996, Synthesis of Superparamagnetic Polymer-Ferrite Composites Using Surfactant Microstructures. *Chemistry of materials*, 8(3), 1996, pp. 801-809
- Kowalsky, R.J. and Perry, J.P.,** 1987, Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice, USA, 13-15, 123-147.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kronick, P. and Gilpin, R.W.**, 1986, Use of superparamagnetic particles for isolation of cells. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 12(1-2), pp.73–80.
- Landis, M. W., Pawlyk, B. S., Li, T., Sicinski, P. and Hinds, P. W.**, 2006, Cyclin D1-dependent kinase activity in murine development and mammary tumorigenesis. *Cancer cell*, 9(1), pp.13–22.
- Langevin, D.**, 1992, Micelles and Microemulsions. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43(1), pp.341–369.
- Laurent, S., Forge, D., Port, M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L. and Muller, R. N.**, 2008, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. *Chemical Reviews*, 108(6), pp.2064–2110.
- Lee, C. C., MacKay, J. A., Fréchet, J. M. J. and Szoka, F. C.**, 2005, Designing dendrimers for biological applications. *Nature biotechnology*, 23(12), pp.1517–26.
- Lee, J.-H., Huh, Y.-M., Jun, Y., Seo, J., Jang, J., Song, H.-T. and Cheon, J.**, 2007, Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-sensitive molecular imaging. *Nature medicine*, 13(1), pp.95–9.
- Lu, A.-H., Salabas, E.L. and Schüth, F.**, 2007, Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 46(8), pp.1222–44.
- Lübbe, A.S., Alexiou, C. and Bergemann, C.**, 2001, Clinical applications of magnetic drug targeting. *The Journal of surgical research*, 95(2), pp.200–6.
- Mahmoudi, M., Hosseinkhani, H., Hosseinkhani, M., Boutry, S., Simchi, A., Journeay, W. S. and Laurent, S.**, 2011, Magnetic resonance imaging tracking of stem cells in vivo using iron oxide nanoparticles as a tool for the advancement of clinical regenerative medicine. *Chemical reviews*, 111(2), pp.253–80.
- Mahmoudi, M., Simchi, A. and Imani, M.**, 2010, Recent advances in surface engineering of superparamagnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 7(S2), pp.S1–S27.
- Mäkelä, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J. and Weinberg, R. A.**, 1994, A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature*, 371(6494), pp.254–7.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Maleki, H., Simchi, A., Imani, M. and Costa, B. F. O.**, 2012, Size-controlled synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their surface coating by gold for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 324(23), pp.3997–4005.
- Malumbres, M., Sotillo, R., Santamaría, D., Galán, J., Cerezo, A., Ortega, S. and Barbacid, M.**, 2004, Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 118(4), pp.493–504.
- Malumbres, M. and Barbacid, M.**, 2009, Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9(3), pp.153–66.
- Malumbres, M. and Barbacid, M.**, 2006, Is Cyclin D1-CDK4 kinase a bona fide cancer target? *Cancer cell*, 9(1), pp.2–4.
- Malumbres, M. and Barbacid, M.**, 2005, Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in biochemical sciences*, 30(11), pp.630–41.
- Malumbres, M. and Barbacid, M.**, 2001, To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 1(3), pp.222–31.
- Martínez-Urbina, M. A., Zentella, A., Vilchis-Reyes, M. A., Guzmán, A., Vargas, O., Ramírez Apan, M. T., Ventura Gallegos, J. L. and Díaz, E.**, 2010, 6-Substituted 2-(N-trifluoroacetyl amino)imidazopyridines induce cell cycle arrest and apoptosis in SK-LU-1 human cancer cell line. *European journal of medicinal chemistry* 45(3), 1211–9.
- Matsushime, H., Roussel, M. F., Ashmun, R. A. and Sherr, C. J.**, 1991, Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle. *Cell*, 65(4), pp.701–713.
- McCarthy, J. R., Kelly, K. A., Sun, E. Y. and Weissleder, R.**, 2007, Targeted delivery of multifunctional magnetic nanoparticles. *Nanomedicine (London, England)*, 2(2), pp.153–67.
- McCarthy, J.R. and Weissleder, R.**, 2008, Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), pp.1241–51.
- Medine, İ.**, 2008, 125/131I İşaretli urasil'in glukuronid sentezi ve manyetik özellik kazandırılarak yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulması. Doktora tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü
- Meijer, L., Borgne, A., Mulner, O., Chong, J. P. J., Blow, J. J., Inagaki, N. and Moulinoux, J. P.**, 1997, Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *European Journal of Biochemistry*, 243(1-2), pp.527–536.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Meinhart, A., Kamenski, T., Hoepfner, S., Baumli, S. and Cramer, P.,** 2005, A structural perspective of CTD function. *Genes & development*, 19(12), pp.1401–15.
- Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C. and Tsai, L. H.,** 1992, A family of human cdc2-related protein kinases. *The EMBO journal*, 11(8), pp.2909–17.
- Minotti, G. and Aust, S.D.,** 1987, The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *The Journal of biological chemistry*, 262(3), pp.1098–104.
- Mohammad, F., Balaji, G., Weber, A., Uppu, R. M. and Kumar, C. S. S. R.,** 2010, Influence of Gold Nanoshell on Hyperthermia of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs). *The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces*, 114(45), pp.19194–19201.
- Morgan, D.O.,** 1995, Principles of CDK regulation. *Nature*, 374(6518), pp.131–4.
- Murray, A.,** 1995, Cyclin Ubiquitination: The destructive end of mitosis. *Cell*, 81(2), pp.149–152.
- Müller, R.,** 1995, Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends in genetics : TIG*, 11(5), pp.173–8.
- Nasmyth, K.,** 1993, Control of the yeast cell cycle by the Cdc28 protein kinase. *Current Opinion in Cell Biology*, 5(2), pp.166–179.
- Nigg, E.A.,** 1995, Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 17(6), pp.471–80.
- O'Connor, C. J., Seip, C. T., Carpenter, E. E., Li, S. and John, V. T.,** 1999, Synthesis and reactivity of nanophase ferrites in reverse micellar solutions. *Nanostructured Materials*, 12(1-4), pp.65–70.
- Ortega, S., Prieto, I., Odajima, J., Martín, A., Dubus, P., Sotillo, R. and Barbacid, M.,** 2003, Cyclin-dependent kinase 2 is essential for meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Nature genetics*, 35(1), pp.25–31
- Özyüncü, S.,** 2009, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})^{3+}$ İle Radyoışaretli D-Penisilamin Bağlı Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 88s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. and Dobson, J.**, 2003, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), pp.R167–R181.
- Park, C., Youn, H., Kim, H., Noh, T., Kook, Y. H., Oh, E. T. and Kim, C.**, 2009, Cyclodextrin-covered gold nanoparticles for targeted delivery of an anti-cancer drug. *Journal of Materials Chemistry*, 19(16), p.2310.
- Parker, C.W., Entsch, B. and Letham, D.S.**, 1986, Inhibitors of two enzymes which metabolize cytokinins. *Phytochemistry*, 25(2), pp.303–310.
- Paul B.K. and Moulik S.P.**, 2001, Uses and applications of microemulsions, , *Current Science*, 80,990
- Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R. and Langer, R.**, 2007, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nature nanotechnology*, 2(12), pp.751–60.
- Perrault, S. D., Walkey, C., Jennings, T., Fischer, H. C. and Chan, W. C. W.**, 2009, Mediating tumor targeting efficiency of nanoparticles through design. *Nano letters*, 9(5), pp.1909–15.
- Pfennig G., Klewe-Nebenius H. and Seelman-Eggebert W.**, 2006, In chart of the nuclides. Kernforschungszentrum Karlsruhe, 7th edition.
- Pines, J.**, 1994, Protein kinases and cell cycle control. *Seminars in Cell Biology*, 5(6), pp.399–408.
- Popowycz, F., Fournet, G., Schneider, C., Bettayeb, K., Ferandin, Y., Lamigeon, C. and Joseph, B.**, 2009, Pyrazolo[1,5-a]-1,3,5-triazine as a purine bioisostere: access to potent cyclin-dependent kinase inhibitor (R)-roscovitine analogue. *Journal of medicinal chemistry*, 52(3), pp.655–63.
- Prelich, G.**, 2002, RNA polymerase II carboxy-terminal domain kinases: emerging clues to their function. *Eukaryotic cell*, 1(2), pp.153–62.
- Qian, Z.M.**, 2002, Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacological Reviews*, 54(4), pp.561–587.
- Rizzolio, F., Tuccinardi, T., Caligiuri, I., Lucchetti, C. and Giordano, A.**, 2010, CDK inhibitors: from the bench to clinical trials. *Current drug targets*, 11(3), pp.279–290.
- Ronan, C. A.**, 2005, Bilim Tarihi, Dünya Kültürlerinde Bilimin Tarihi ve Gelişimi, TÜBİTAK Popüler Bilim Kitapları

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rose, H.H.**, 2008, Optics of high-performance electron microscopes. *Science and Technology of Advanced Materials*, 9(1), p.014107.
- Rudakovskaya, P. G., Beloglazkina, E. K., Majouga, A. G. and Zyk, N. V.**, 2010, Synthesis and characterization of terpyridine-type ligand-protected gold-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Mendeleev Communications* 20(3), 158–160.
- Rudge, S., Kurtz, T., Vessely, C., Catterall, L. and Williamson, D.**, 2000, Preparation, characterization, and performance of magnetic iron–carbon composite microparticles for chemotherapy. *Biomaterials*, 21(14), pp.1411–1420.
- Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massagué, J. and Pavletich, N. P.**, 1996, Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature*, 382(6589), pp.325–31.
- Safari, J. and Zarnegar, Z.**, 2013, Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society*.
- Santamaría, D., Barrière, C., Cerqueira, A., Hunt, S., Tardy, C., Newton, K. and Barbacid, M.**, 2007, Cdk1 is sufficient to drive the mammalian cell cycle. *Nature*, 448(7155), pp.811–5.
- Sanvicens, N. and Marco, M.P.**, 2008, Multifunctional nanoparticles--properties and prospects for their use in human medicine. *Trends in biotechnology*, 26(8), pp.425–33.
- Sausville, E.A.**, 2002, Complexities in the development of cyclin-dependent kinase inhibitor drugs. *Trends in Molecular Medicine*, 8(4), pp.S32–S37.
- Schulze-Gahmen, U., Brandsen, J., Jones, H. D., Morgan, D. O., Meijer, L., Vesely, J. and Kim, S. H.**, 1995, Multiple modes of ligand recognition: crystal structures of cyclin-dependent protein kinase 2 in complex with ATP and two inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins*, 22(4), pp.378–91.
- Schutte, B., Nieland, L., van Engeland, M., Henfling, M. E. R., Meijer, L. and Ramaekers, F. C. S.**, 1997, The Effect of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor Olomoucine on Cell Cycle Kinetics. *Experimental Cell Research*, 236(1), pp.4–15.
- Shapiro, G.I.**, 2006, Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(11), pp.1770–1783.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sherr, C.J.**, 1996, Cancer cell cycles. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5293), pp.1672–7.
- Sherr, C.J.**, 1994, G1 phase progression: Cycling on cue. *Cell*, 79(4), pp.551–555.
- Sherr, C.J. and Roberts, J.M.**, 1995, Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & development*, 9(10), pp.1149–63.
- Singh, A., Patel, T., Hertel, J., Bernardo, M., Kausz, A. and Brenner, L.**, 2008, Safety of ferumoxytol in patients with anemia and CKD. *American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation*, 52(5), pp.907–15.
- Skoog, D.A.**, West, D.M., 1981, Principles of Instrumental Analysis II. Ed.
- Smith, C.-A. M., Fuente, J. de la, Pelaz, B., Furlani, E. P., Mullin, M. and Berry, C. C.**, 2010, The effect of static magnetic fields and tat peptides on cellular and nuclear uptake of magnetic nanoparticles. *Biomaterials*, 31(15), pp.4392–4400.
- Smolensky, E. D., Neary, M. C., Zhou, Y., Berquo, T. S. and Pierre, V. C.**, 2011, Fe₃O₄@organic@Au: core-shell nanocomposites with high saturation magnetisation as magnetoplasmonic MRI contrast agents. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 47(7), pp.2149–51.
- Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R. and Richards-Kortum, R.**, 2003, Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Research*, 63(9), pp.1999–2004.
- Solomon, M.J., Harper, J.W. and Shuttleworth, J.**, 1993, CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *EMBO Journal*, 12(8), pp.3133–3142.
- Sudimack, J. and Lee, R.**, 2000, Targeted drug delivery via the folate receptor. *Advanced drug delivery reviews*, 41(2), pp.147–162.
- Sun, C., Lee, J.S.H. and Zhang, M.**, 2008, Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 60(11), pp.1252–65.
- Sun, J., Lv, X.-H., Qiu, H.-Y., Wang, Y.-T., Du, Q.-R., Li, D.-D., Yang, Y.-H. and Zhu, H.-L.**, 2013, Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of pyrazole derivatives coupling with a thiourea moiety as novel CDKs inhibitors. *European journal of medicinal chemistry* 68, 1–9.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Şensoy, S.**, 2007, Tc-99m (V) DMSA Radyofarmasötığının Üretim Ve Kalite Kontrol Parametrelerinin Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 24-25s.
- Tartaj, P., Morales, M. a del P., Veintemillas-Verdaguer, S., Gonz lez-Carre o, T. and Serna, C. J.**,2003, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 36(13), pp.R182–R197.
- Thanh, N.T.K. and Green, L.A.W.**, 2010, Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications. *Nano Today*, 5(3), pp.213–230.
- Theobald, A.E. and Britain, P.S. of G.**, 1989, *Radiopharmaceuticals using radioactive compounds in pharmaceutics and medicine*,
- Torchilin, V.P.**, 2006, Multifunctional nanocarriers. *Advanced drug delivery reviews*, 58(14), pp.1532–55.
- Tran, P.A., Zhang, L. and Webster, T.J.**, 2009, Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine. *Advanced drug delivery reviews*, 61(12), pp.1097–114.
- Trova, M. P., Barnes, K. D., Barford, C., Benanti, T., Bielaska, M., Burry, L. and Friedrich, T. D.**, 2009, Biaryl purine derivatives as potent antiproliferative agents: inhibitors of cyclin dependent kinases. Part I. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(23), pp.6608–12.
- Tsoli, M., Kuhn, H., Brandau, W., Esche, H. and Schmid, G.**, 2005, Cellular uptake and toxicity of Au55 clusters. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 1(8-9), pp.841–4.
- Vértes, A., Nagy, S., Klencsár, Z., Lovas, R. G. and Rösch, F.**, 2011, *Handbook of Nuclear Chemistry*, Boston, MA: Springer US.
- Vesely, J., Havlicek, L., Strnad, M., Blow, J. J., Donella-Deana, A., Pinna, L. and Meijer, L.**, 1994, Inhibition of Cyclin-Dependent Kinases by Purine Analogues. *European Journal of Biochemistry*, 224(2), pp.771–786.
- Wang, Y.X., Hussain, S.M. and Krestin, G.P.**, 2001, Superparamagnetic iron oxide contrast agents: physicochemical characteristics and applications in MR imaging. *European radiology*, 11(11), pp.2319–31.
- Widder, K.J., Senyei, A.E. and Scarpelli, D.G.**, 1978, Magnetic Microspheres: A Model System for Site Specific Drug Delivery in Vivo. *Experimental Biology and Medicine*, 158(2), pp.141–146.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wyatt, P. G., Woodhead, A. J., Berdini, V., Boulstridge, J. A., Carr, M. G., Cross, D. M. and Woolford, A. J.-A.**, 2008, Identification of N-(4-piperidinyl)-4-(2,6-dichlorobenzoylamino)-1H-pyrazole-3-carboxamide (AT7519), a novel cyclin dependent kinase inhibitor using fragment-based X-ray crystallography and structure based drug design. *Journal of medicinal chemistry*, 51(16), pp.4986–99.
- Xu, H.H.K., Smith, D.T. and Simon, C.G.**, 2004, Strong and bioactive composites containing nano-silica-fused whiskers for bone repair. *Biomaterials*, 25(19), pp.4615–26.
- Yu, Q., Sicinska, E., Geng, Y., Ahnström, M., Zagozdzon, A., Kong, Y. and Sicinski, P.**, 2006, Requirement for CDK4 kinase function in breast cancer. *Cancer cell*, 9(1), pp.23–32.
- Yurt, F.**, 1998, Benzodiazepin (diazepam) ve cyclopyrrolone (Zopiclone) grubu farmasötiklerin I-131 ile işaretlenmesi. Doktora tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 26.s.
- Zhang, Q., Ge, J., Goebel, J., Hu, Y., Sun, Y. and Yin, Y.**, 2010, Tailored synthesis of superparamagnetic gold nanoshells with tunable optical properties. *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 22(17), pp.1905–9.
- Zhu, Z.-J., Ghosh, P. S., Miranda, O. R., Vachet, R. W. and Rotello, V. M.**, 2008, Multiplexed screening of cellular uptake of gold nanoparticles using laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of the American Chemical Society*, 130(43), pp.14139–43.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gökhan TAKAN

Doğum Yeri: Ödemiş / İZMİR

Doğum Yılı: 01.05.1989

Öğrenim Durumu:

Lise: İzmir Atatürk Lisesi (2003 - 2007)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü (2007 - 2012)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2013 -)