

**ALTIN KAPLI MAGNETİK NANOPARTİKÜLLER İLE
HÜCRE TRANSFEKSİYONU**

**GOLD COATED MAGNETIC NANOPARTICLES FOR CELL
TRANSFECTION**

İLKNUR ILGIN DOĞAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2011

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI** 'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan 
.....
Prof. Dr. Tülin Kutsal

Üye (Danışman) 
.....
Prof. Dr. Erhan Bişkin

Üye 
.....
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

Üye 
.....
Yrd. Doç. Mustafa Türk

Üye 
.....
Yrd. Doç. Sinan Eğri

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adil Denizli
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ALTIN KAPLI MAGNETİK NANOPARTİKÜLLER İLE HÜCRE TRANSFEKSİYONU

İlknur Ilgın Doğan

ÖZ

Gen terapi son yıllarda genetik bozuklukların ve kanserin tedavisinde potansiyel yöntem olarak önemli ilgi çeken yaklaşımlar arasındadır. Hedef geni taşıyan plazmid DNA'nın aktarımı için hem viral hemde viral olmayan vektörler kullanılır. Viral vektörler çok etkindirler ancak ciddi yan etkileri vardır. Farklı formdaki viral olmayan vektörler çok daha emniyetlidirler ancak transfeksiyon etkinlikleri düşüktür. Devam eden çeşitli çalışmalarda daha etkin viral vektörlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Gen transferini fiziksel yöntemlerle de yapmak mümkündür. Ancak bunların da sınırlamaları vardır. Sunulan çalışmada geliştirilmiş bir stratejik yaklaşımın geliştirilmesi amaçlanmıştır. Burada farklı materyallerden (esas olarak polimerler) üretilen nanopartiküllerin benzeri, pozitif yüklü nanopartiküller kullanılarak ve ilave olarak da magnetik güç uygulanarak plazmid DNA taşıyan nanopartiküllerin hedef hücreler tarafından alımı sağlanmıştır.

Bu çalışmada önce yaklaşık 90 nm boyutlu "manyetit" (Fe_3O_4) nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu manyetit nanopartiküllerin manyetik özelliklerini tümüyle kaybetmeden altın ile kaplanması sağlanmıştır. Altın yüzeylere pozitif yük kazandırmak amacıyla, bu altın kaplı nanopartiküller "kendiliğinden yerleşen tek tabaka" ("self-assembled monolayers"-SAMs) oluşturmak amacıyla bu kabiliyete sahip iki uçlarında iki farklı fonksiyonel grup taşıyan (SH ve NH_2) moleküller ile etkileştirilmiştir. Bu moleküllerin SH gruplarıyla altın yüzeylere tek tabaka oluşturacak şekilde yerleşmeleri diğer uçlarındaki NH_2 grupları nedeniyle pozitif yük sağlamaları öngörülmüştür. Yüzey yükleri optimize edilmiştir. Bu nanopartiküllerin transfeksiyon verimlerinin araştırılması için yeşil florasan protein (GFP) ekprese eden plazmid DNA (PEGFP- N_2) kullanılmıştır. Plazmid DNA standart moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak *E. Coli* bakterisinde çoğaltılmış ve saflaştırılmıştır. Farklı miktarlarda nanopartiküller plazmid DNA ile etkileştirilerek konjugatlar oluşturulmuştur. Bu konjugatların ve uygulanan manyetik alanın

hücrelere sitotoksitesini araştırılmıştır. Bu konjugatların hücre transfeksiyon etkinlikleri ve buna uygulanacak manyetik kuvvetlerin etkileri hücre kültür ortamlarında hücre hatları kullanılarak araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Gen terapi; Plazmid DNA aktarımı, viral olmayan vektörler; altın kaplı manyetit nanopartiküller; kendiliğinden tek tabakalar; transfeksiyon, Manyetik kuvvetler.

Danışman: Prof.Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik A.B.D. ; Prof.Dr. Tülin Kutsal, Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik A.B.D.

GOLD COATED MAGNETIC NANOPARTICLES FOR CELL TRANSFECTION

İlknur Ilgın Doğan

ABSTRACT

Gene therapy is attracting significant attention recently as a potential method for treating mainly genetic disorders and cancer through different approaches. Both viral and non-viral vectors have been used for delivery of plasmid DNA carrying the target gene. Viral vectors are very effective, however they can cause serious side effects. Non-viral vectors in different forms are much more safe, but their transfection efficiencies are low. Development of more efficient non-viral vectors have been aimed. Gene transfer is also possible by physical means. However they do also exhibit limitations. This study attempts to develop a combined strategy in which both positively charged nanoparticle similar to existing nanoparticles are used which made of different materials (mainly polymers) and in addition magnetic forces is applied to increase the uptake of nanoparticles carrying the plasmid DNA by the target cells.

In this study, “magnetite” (Fe_3O_4) nanoparticles with about 90 nm in diameter were synthesized. These magnetic nanoparticles were coated with a gold layer without losing their magnetic properties. These gold coated nanoparticles were interacted with “self-assembled monolayers”-SAMs forming molecules carrying two different functional groups (SH and NH_2). These molecules were assembled on the gold surface as SAMs via SH groups while NH_2 groups give the positive charge to the nanoparticles. Surface charges were optimized. In order to obtain the transfection yield of these nanoparticles plasmid DNA (PEGFP-N₂) expressing green fluorescence protein was used. Plasmid DNA were purchased and multiplied in *E.Coli* and then purified by using standart molecular biological techniques. Conjugates were formed by interacting of different amounts of nanoparticles with plasmid DNA. Cytotoxicity of conjugates and applied magnetic force were investigated. Cell transfection efficiencies of these conjugates and the effects of the magnetic forces were investigated in cell culture media using cell lines.

Keywords: Gene therapy; Plasmid DNA delivery; Nonviral vectors; Gold coated magnetite nanoparticles; Self-assembling monolayers; transfection; magnetic forces.

Advisor: Prof.Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Bioengineering Division
Prof.Dr. Tülin Kutsal, Hacettepe University, Bioengineering Division;

TEŞEKKÜR

Kendisiyle alıŐma fırsatı vererek önümde yeni ufuklar aan, tecrübeleriyle yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Erhan Bişkin'e,

Tez jürimde yer alarak bana destek olan sayın hocam Prof. Dr.Tülin Kutsal'a,

Tez süresince çalıŐmalarımnda bilfiil yeralan ve bütün olanaklarını benimle paylaşan sayın hocam Yrd. Doç. Mustafa Türk'e,

Tüm deneyim ve bilgilerini her ihtiyacım olduğunda benimle paylaşan ablam Filo'ya,

Hücre çalışmalarında yardımları ve sorunlara getirdikleri çözümler ile bana destek olan Sedat'a,

alıŐırken keyif aldığım eğlendiğim canım çalışma arkadaŐım Ayfer'e,

Her ihtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Zeynep, Nihan, Ebru, Burcu, GüneŐ, Gökhan, Araz, İlyas'a,

Manevi desteklerini uzakta olsalar da benden esirgemeyen arkadaşlarım Burcu elen ve Asya kıza,

Beni sürekli motive eden kankeytam iko'ya (Aybükcü),

Bana her zaman destek olan ve sabır gösteren çok sevgili Ufuk'a,

Hayatım boyunca hep yanımda olan ve beni gönülden destekleyen canım aileme,

Sonsuz TeŐekkürler;

İlknur İlgın DOĞAN

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZ	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Manyetizma ve Manyetik Nanopartiküller	3
2.1.1 Manyetizma	4
2.1.2 Ferroakışkanlar	9
2.1.3 Manyetik Nanopartiküller	11
2.1.3.1 Demir oksitler	12
2.1.3.2 Manyetit.....	14
2.1.4 Manyetik Nanopartikülleri Sentezleme Metotları	16
2.1.4.1 İkili Çöktürme Yöntemiyle Manyetit Sentezi.....	16
2.1.5 Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller.....	19
2.1.5.1 Manyetik Nanopartiküllerin Altınla Kaplanma Metodları ve Bunların Uygulama Alanları	20
2.2 Gen Terapi	25
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR.....	36
3.1. Manyetit (Fe ₃ O ₄) Nanopartikül Sentezi.....	36
3.1.1. Kullanılan maddeler.....	36
3.1.2. Yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırmalı ikili çöktürme yöntemi ile manyetit üretimi	37

3.2. Altın kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Üretimi	38
3.2.1. Kullanılan maddeler	38
3.2.2. Sitrat İndirgeme Ajantıyla Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ...	38
3.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin Katyonik Hale Getirilmesi	40
3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	41
3.5. “Nanopartikül” – “Plazmid DNA” Etkileşimi	43
3.5.1. <i>E.Coli</i> hücrelerinde plazmidin çoğaltılması	43
3.5.2. Plazmid DNA ‘nın ticari ürünle saflaştırılması	44
3.5.2.1. Kullanılan çözeltiler	44
3.5.2.2. Saflaştırma protokolü	45
3.5.3. “ <i>plazmid</i> ” – “partikül” etkileşimini saptamada uygulanan analiz yöntemleri ...	47
3.5.4. Nanopartikül, Plazmid DNA, Nanopartikül / Plazmid DNA Konjugatlarının Zeta Potansiyel Yükleri ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi	48
3.6. Sitotoksitite Testleri	48
3.6.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Partiküllerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması	48
3.6.2. Uygulanan Manyetik Alanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması	49
3.7. Transfeksiyon Çalışmaları	52
3.7.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Floresan Boya ile İşaretlenmesi ve Hela Hücrelerine Aktarılması	52
3.7.2. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül/Plazmid DNA Konjugatlarının Hela Hücrelerine Aktarılması	53
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR	56
4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	56
4.1.1. Zeta Sizer İle Boyut Analizi	56
4.1.2. FTIR Analizi	57
4.1.3. X Işını Kırılması Analizi	58
4.1.4. Manyetometre ile Manyetik Özelliklerin Belirlenmesi	59

4.1.5. AFM ile Görüntüleme Sonuçları	60
4.2. Altın Kaplı Manyetit (Fe ₃ O ₄ /Au) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	63
4.2.1. Zeta Sizer İle Boyut Analizi.....	63
4.2.2. FTIR Analizi.....	67
4.2.3. X Işını Kırılması Analizi.....	69
4.2.4. Manyetometre ile Manyetik Özelliklerin Belirlenmesi.....	70
4.2.5. AFM ile Görüntüleme Sonuçları	71
4.2.6. ESR Analizi	75
4.2.7. UV/Vis Absorpsiyon Spektrumu Analizi	82
4.3. Katyonik Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	86
4.3.1. Zeta Sizer ve Potansiyel Analizi	86
4.3.2. UV/Vis Absorpsiyon Spektrumu Analizi	88
4.4. Nanopartikül - pDNA Etkileşimi	89
4.4.1. Nanopartikül, pDNA ve Bunlarla Oluşturulan Konjugatların Zeta Potansiyel ve Boyut Analizi.....	89
4.4.2. Nanopartikül - pDNA Etkileşimini Gösteren Elektropherez Analizi	92
4.5. Sitotoksitite Testleri	93
4.5.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Partiküllerin ve pDNA ile Oluşturulan Konjugatların Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri	93
4.5.2. Uygulanan Manyetik Alanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi.....	95
4.6. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Ekspresyon	97
4.6.1. Floresan Boya ile İşaretli Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hela Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyon	97
4.6.2. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül/Plazmid DNA Konjugatlarının Hela Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyon	100
5.SONUÇLAR	104
6.KAYNAKLAR.....	111
EKLER	120
EK 1- ESR spektrumundan g değerinin hesaplanması	120

EK 2- Turbofect (ticari tranfe ksion ajanı) ile genel transfe ksion protokolü ...	121
ÖZGEÇMİŞ	122

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1.1 Manyetizma özelliklerine göre spin durumları.....	5
Şekil 2.1.2. Manyetik alan gücüne karşı mıknatıslık eğrisi	8
Şekil 2.1.3 Partikül boyuna bağlı giderilme mıknatıslığı. Dsp; süperparamanyetik partikül çapı, Ds; tek domain partikül çapı.....	9
Şekil 2.1.4 Bazik yüzey aktif maddeyle etkileşmiş ferro akışkan taneciği. a; Partikül yüzeyine toplanan TMAOH'a ait negatif yükler (Scherer and Figueiredo, 2005) b; Negatif yük etrafına toplanan karşıt yüklü iyonlar (Chun et al., 2005).	11
Şekil 2.1.3.1. Manyetit ve maghemite ait X ışını kırınımı spektrumları (Legodi and De Waal, 2007).	14
Şekil 2.1.3.2.1. Manyetitin kristal yapısı (Banerjee and Maskowitz, 1985).	14
Şekil 2.1.3.2.2. Manyetit (FeO.Fe ₂ O ₃) spin dizilimi (a) ve iyonlar arası elektron transferi ile değiş tokuş etkileşimi (b) (Elliott, 1998).....	15
Şekil 2.2. Plazmid DNA yapısı ve hücre içindeki konumu	26
Şekil 3.1.2 Manyetit sentezi için deney düzeneği. (1) Vana, (2) Termoçift, (3) Demir Çözeltisi ve NaOH Çözeltisi için besleme ağızı, (4) Reaktör, (5) Mekanik Karıştırıcı (6) Geri Soğutucu, (7) Su banyosu ve (8) Elektrikli Isıtıcı.....	37
Şekil 3.5.2.2. <i>E.Coli</i> saflaştırma prosedürü.....	45
Şekil 3.6.2 Transfeksiyon amaçlı kullanılacak yüzeyi işlenmemiş (A) yüzeyi işlenmiş (B) mıknatıslar	50
Şekil 3.7.2 pEGFP-N2 gen haritası	54
Şekil 4.1.1 90 nm boyutundaki manyetik nanopartiküllerin zeta boyut grafiği.....	57
Şekil 4.1.2 FTIR spekturumu; Manyetit nanopartikül (Fe ₃ O ₄)	57
Şekil 4.1.3 Manyetit nanopartikülün (Fe ₃ O ₄) X-RD spekturumu	58
Şekil 4.1.4 Manyetit (Fe ₃ O ₄) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri	59
Şekil 4.1.5 AFM ile alınan topografi sonucu ve histogramı	62
Şekil 4.1.6 Manyetit nanopartiküllerin MFM de analizi.....	63
Şekil 4.2.1 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetik nanopartikülün zeta sizer cihazı ile elde edilmiş boyut (A) ve potansiyel yük (B) grafiği	67
Şekil 4.2.2 FTIR spekturumu; Altın kaplı manyetit nanopartikül (Fe ₃ O ₄ /Au)	68

Şekil 4.2.3. Altın kaplı manyetit (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerinin X-ışınları kırılması (X-RD) analizi ile ilgili spektrumları.....	69
Şekil 4.2.4 Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri.	70
Şekil 4.2.5.1 Altın kaplı manyetit nanopartiküller için AFM ile alınan topografi sonucu ve XY eksenine göre profili	73
Şekil 4.2.5.2 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerinin MFM de analizi	74
Şekil 4.2.6.1 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu	75
Şekil 4.2.6.2 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu.....	77
Şekil 4.2.6.4 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün boyutlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu	81
Şekil 4.2.7.1 Faklı sitrat derişimlerinde sentezlenen Fe_3O_4/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları	84
Şekil 4.2.7.3 Faklı manyetit nanopartikül miktarları kullanılarak sentezlenen Fe_3O_4/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları	85
Şekil 4.2.7.4 Faklı boy manyetit nanopartikül kullanılarak sentezlenen Fe_3O_4/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları	86
Şekil 4.3.1 Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak partikülün boyut (A) ve zeta potansiyel grafiği (B).....	88
Şekil 4.3.2 Altın kaplı manyetit nanopartikülün (yeşil) ve katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülün (kırmızı) UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi	89
Şekil 4.4.1.En yüksek yük yoğunluğuna sahip partikül/pDNA konjugatının boyut (A) ve zeta potansiyel (B) grafikleri	91
Şekil 4.2.2. GFP plasmitinin ve partiküllerle oluşturulan konjugatlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri.....	93
Şekil 4.5.1.1 Genel toksisite sınırını belirlemede kullanılan partikül miktarlarının hücre canlılığı üzerine etkisi; 1, 2, 3, 4, 5 numaralı sütunlar sırasıyla 5, 10, 20, 30, 40 $\mu g/ml$ partikül konsantrasyonunun hücrelerde kullanımındaki sitotoksisiteyi vermektedir.....	94
Şekil 4.6.1.1 HeLa hücrelerinin floresan mikroskop fotoğrafları. A) Sadece floresan boya ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, B) Manyetik alan uygulanmamış partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, C) 30 dak. Manyetik alan uygulanmış partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 30 dak. yönlendirilmiş manyetik alan uygulanmış	

partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri. Yeşil olanlar floresan işaretli partikülleri içersine almış hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskobun FITC filitresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir. 98

Şekil 4.6.1.2. İkili boyama ile boyanmış HeLa hücrelerinin floresan mikroskop fototğrafları. A) Patikül ile etkileştirilmemiş HeLa hücreleri (kontrol grubu), B) Manyetik alan uygulanmadan partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, C) 10 dk. yüzeyi işlenmemiş mıknatısla manyetik alan uygulayarak partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 10 dk. yönlendirilmiş manyetik alan uygulayarak partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri. Mavi olan hücre çekirdekleri (Hoesth ile boyanmış) canlı hücreleri, Kırmızı olan hücre çekirdekleri (Propodium ile boyanmış) ölü veya hücre zarı hasar görmüş hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskobun 480-520nm filitresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir. 100

Şekil 4.6.2.1 Gen aktarımı sonucu HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri, A) Kültüre edilmiş HeLa hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü, B) Ticari transfeksiyon ajanı kullanılmış pozitif kontrol grubu, C) Sadece GFP-pDNA ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 1:8 pDNA/partikül oranında manyetik alan uygulanmadan yapılan transfeksiyon denemesi, E) 1:8 pDNA/partikül oranında 15 dak manyetik alan uygulayarak yapılan transfeksiyon denemesi, F) 1:10 pDNA/partikül oranında 5 dak manyetik alan uygulayarak yapılan transfeksiyon denemesi. Yeşil hücreler GFP-pDNA (yeşil floresan proteini) ekspresyonu yapan hücreler. Fotoğraflar Floresan mikroskobun FITC filitresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir..... 101

Şekil 4.6.2.2 Transfeksiyon sonrası GFP gen ekspresyonunun günlere göre etkinliği 103

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.3 Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri (Blum, 1997; Sorensen, 2001).....	11
Çizelge 2.1.3.1 A. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri	12
Çizelge 2.1.3.1 B. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri	13
Çizelge 3.5.2.1. Qiagen® plazmid saflaştırma tampon çözeltileri.....	44
Çizelge 4.1.1 Farklı santrifüj hızlarında elde edilen partikül çap değerleri	56
Çizelge 4.1.2. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik Pikler	58
Çizelge 4.1.5 Çıplak manyetit için AFM analiz özellikleri	61
Çizelge 4.2.1 Farklı H ₂ SO ₄ , tri sodyum sitrat, farklı partikül miktarında ve ortalama partikül çapı farklı manyetit (Fe ₃ O ₄) ile üretilen Fe ₃ O ₄ /Au nanopartiküllerin özellikleri.....	64
Çizelge 4.2.2. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin (Fe ₃ O ₄ /Au) FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.	67
Çizelge 4.2.5 Altın kaplı manyetit nanopartiküller için AFM analiz özellikleri	72
Çizelge 4.2.6.1 Manyetit (Fe ₃ O ₄) ve altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri	76
Çizelge 4.2.6.2 Manyetit (Fe ₃ O ₄) ve tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri.....	78
Çizelge 4.2.6.3 Manyetit (Fe ₃ O ₄) ve manyetit (Fe ₃ O ₄) nanopartikülünün, farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri	80
Çizelge 4.2.6.4 Manyetit (Fe ₃ O ₄) ve manyetit (Fe ₃ O ₄) nanopartikülünün farklı boyutlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri	82
Çizelge 4.2.7 Farklı parametrelerde sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin özellikleri	83
Çizelge 4.3.1 Denenen 2-aminoethantiyol çözeltileri ve elde edilen zeta potansiyel sonuçları.....	87
Çizelge 4.4.1 Katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülün, plazmid DNA'nın, partikül/pDNA konjugatlarının büyüklükleri ve zeta potansiyel yükleri	89

Çizelge 4.5.2.1 Manyetik alan uygulama zamanına ve kullanılan mıknatısa göre manyetik partiküllerin toksisitesini gösteren tablo (SD ± 2 olarak alınmıştır.).	95
Çizelge 4.5.2.2 farklı mıknatıslarla 10 dak manyetik alan uygulanmış farklı oranlarda partikül/ plazmid DNA komplekslerinin toksisitesini gösteren tablo (SD ± 2 olarak alınmıştır.).....	96
Çizelge 4.6.1.1 FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 30 dk manyetik alan uygulaması sonucu Hela hücrelerine girme yüzdeleri (%)... 97	97
Çizelge 4.6.1.2 FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 10 dk manyetik alan uygulaması sonucu Hela hücrelerinde meydana getirdikleri nekrozun yüzdeleri (%).....	99
Çizelge 4.6.2 Partikül miktarına bağlı transfeksiyon verimi	103

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
Au- Fe ₃ O ₄	: Altın kaplı manyetit
bp	: Baz çifti
E.Coli	: Escherichia Coli
ESR	: Elektron Spin Rezonans
Fe ₃ O ₄	: Manyetit
FTIR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
GFP	: Yeşil Floresan Protein
g	: Spektroskopik yarıllma çarpanı
HNO ₃	: Nitrik asit
Hr	: Rezonans alanı
HAuCl ₄ .3H ₂ O	: Altın tuzu
HeLa	: İnsan servikal karsinoma hücreleri
HCl	: Hidroklorikasit
Kb	: Kilobaz (çifti)
L929	: Fare bağ dokusu fibroblast benzeri hücreleri
LB	: Luria Broth Besi Yeri
NaOH	: Sodyum hidroksit
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromid
MOPS	: Morfolino Propan Sulfonik Asit
MFM	: Manyetik Force (Kuvvet) Mikroskobu
oc	: Açık halkasal
pDNA	: Plazmid DNA
sc	: Süpersarmal
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TMAOH	: Tetrametil Amonyum Hidroksit
UV	: Ultra Viyole
XRD	: X Işını Kırınımı
VSM	: Titreşimli Manyetometre
WST	: Water soluble Tetrazolium salts
ΔH	: Yarı eğri genişliği

1.GİRİŞ

Gen terapisi sistik fibrosis, parkinson hastalığı gibi genetik hastalıklara, kanser tedavisinden kemoterapiye alternatif bir tedavi yoludur. Gen terapisinde ve genetik modifikasyonlarda gen transferi söz konusudur (Anderson, 2000). Vücuttaki hedef hücrelere genetik materyalin yollanmasıyla, gen terapi düzgün çalışan gen fonksiyonlarını korumayı, bozuk genlerin fonksiyonlarını baskılamayı ya da geliştirmeyi, son olarak da bazı genlerin fizyolojik fonksiyonlarını tamamen değiştirmeyi amaçlamaktadır.

Genetik bilgi genellikle özel olarak tasarlanmış dairesel plazmid DNA' ya (pDNA) yüklenir. Sonraki adımda bu pDNA'nın hedef hücrelere aktarımıdır. Bunun için taşıyıcı olarak viral ve/veya nonviral vektörler olmak üzere 2 tür taşıyıcı sistem kullanılır. pDNA'lar negatif yüklüdür, dolayısıyla negatif yüklü hedef hücrelere ve hücre çekirdeğine girme olasılıkları çok düşüktür. Buna ilave olarak, özellikle *in vivo* uygulamada pDNA'ların kararlılıkları oldukça düşüktür, başka bir ifadeyle "Nuclease" enzimleri iyi korunmayan DNA'yı kolaylıkla degrades eder ve kan dolaşımına verildiğinde karaciğer tarafından hızla yakalanıp elimine edilir. Dolayısıyla pDNA'lar hedef hücrelere aktarılması için "taşıyıcılara", gen terapisinde kullanılan terimle "vektörlere" gereksinim vardır.

Genlerin viral vektörler aracılığıyla aktarılmasının en etkin yöntem olduğu ispatlanmıştır. Bununla birlikte, viral vektörlerin kullanımını potansiyel toksisite, mutagenез ve karsinogenез önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Katyonik lipidler, lipozomlar, polipeptidler, yüzey aktif maddeler, katyonik suda çözünen polimerler, nanopartiküller vb. nonviral vektörler olarak değerlendirilmektedir (Mc Allister, 2002). Nonviral vektörler hücre bariyerlerinden daha etkin geçebilmeleri, toksik olmamaları, immünojenite göstermemeleri gibi özellikleri sebebiyle transeksiyonda daha etkilidir. Bu tür avantajları dolayısıyla proje kapsamında nonviral vektör olarak altın kaplı manyetik nanopartiküller tercih edilmiştir.

Çeşitli fiziksel yöntemlerin kıyaslaması yapıldığında manyetik nanopartiküllerin kullanılmasıyla magnet yardımcı transeksiyonun (Manyetofeksiyon) daha hızlı bir metot olduğu öngörülmüştür. Gen transferinde, manyetik nanopartiküllerin toksik olmaması, basit deneysel ihtiyaçlara gerek duyması ve etkili olması nedeniyle bu partiküller özellikle tercih sebebi olmaktadır. Hücre içinde manyetik

nanopartiküllerin korozyonunun, oksitlenmesinin önlenmesi ve kararlı bir formda kalması için polietilenimin (PEI), dietilaminoetil-dekstran (DEAE-dekstran) gibi katyonik polimerlerle modifiye edilmeleri mümkündür (Plank C and Schillinger 2003). Fakat bu uygulamalar sonucunda manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliklerinde azalma meydana gelmektedir. Bu sebeple altın kaplamanın hem basit bir sentez prosedürü olması hem de altının kimyasal fonksiyonelliğe sahip olması manyetik nanopartikülleri kaplamada altının en çok tercih edilen metal olmasını sağlar. Altın kaplama sayesinde manyetik nanopartiküllerin oksitlenmesi ve korozyona uğraması önlenirken manyetik özelliklerini de devam ettirebilmektedir.

Sunulan tez kapsamında sayılan bu özellikler nedeniyle altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin sentezi ve bu partiküllerin negatif yüklü pDNA ile etkileşebilmesi için katyonik özellik kazandırılması ve bunun sonucunda manyetik özellikleri yardımıyla hedef hücrelere pDNA transfeksiyonu amaçlanmıştır. Çalışma kapsamında öncelikle manyetit nanopartiküller grubumuzun önceki deneyimlerinden yararlanılarak önceden optimize edilmiş yöntemle sentezlenmiştir. Çekirdeği oluşturacak manyetit nanopartikül yapısı karakterize edilmiştir. Daha sonra manyetit çekirdek üzerine sitrat indirgeme ajanı ile altın kaplama yöntemiyle altın kabuk oluşumu sağlanmıştır ve yöntemde kullanılan tüm malzemelerin yapı için optimizasyonu sağlanmıştır. Sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllere pozitif yük kazandırmak için kullanılmış olan 2-aminoetantiyol moleküllerinin altın kabuk yüzeyine kendiliğinden yerleşen tek tabaka şeklinde oluşumu sağlanmış ve karakterize edilmiştir. Sentezlenen katyonik altın kaplı manyetit partiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT ile belirlenmiş ve hücre çalışmalarında kullanılacak maksimum partikül miktarı tespit edilmiştir. Hücre çalışmalarında kullanılmak üzere literatüre en uygun yük yoğunluğuna sahip katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin farklı miktarları pDNA ile etkileştirilmiş ve hücreye ne oranda girdiği araştırılmıştır. Partiküllerin hücre içine girmesinde uygulanan manyetik alanın etkinliği ve hücre canlılığı üzerine etkileri de araştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Manyetizma ve Manyetik Nanopartiküller

Nanopartiküller kataliz, manyetizma ve elektronik gibi pek çok alanda sahip oldukları dikkat çekici özelliklerinden dolayı çalışılmıştır (Tu ve Denizot, 2007). Endüstriyel uygulamalarda; manyetik motor kapakları, banka çeklerindeki manyetik mühürler, manyetik kayıt ortamı, manyetik rezonans fark ortamı gibi ve biyomedikal uygulamalarda; kanser tedavisinde kullanılan teröpatik ajanlar gibi birçok alanda kullanımları geniş yer kaplamaktadır (Tardaj, 2003) .

Her olası uygulama farklı özellikler gerektirmektedir. Biyomedikal uygulamalarda oda sıcaklığında süperparamanyetik özellik gösteren nanopartiküller tercih edilir. Dahası biyolojik uygulamalarda, tıbbi teşhis ve tedavide kullanılacak manyetik partiküllerin su, nötr pH' da ve fizyolojik tuz koşullarında kararlı olması gereklidir (Tardaj, 2003) .

Biyomedikal uygulamalarda boyu 100 nm' den küçük partikülleri kullanmanın en önemli avantajları; ligantların yüzeye kolaylıkla tutturulmasını sağlayacak yüksek etkinlikteki yüzey alanları, yüksek kararlılıkta düşük çökme hızları ve gelişmiş dokusal difüzyon göstermeleridir (Portet, 2001). Çok yüksek manyetik özelliğe sahip nikel ve kobalt gibi maddeler, oksitlenme hassasiyetleri ve toksisite göstermeleri nedeniyle biyolojik uygulamalarda çok ilgi çekmezler (Tardaj, 2003) .

Sonuç olarak, uygulamalara getirdikleri kolaylıklar ve kazandırdıkları özellikler sebebiyle biyomedikal alanlarda kullanımları araştırılan ve hızla yaygınlaşan manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı alanlar şunlardır: (Tardaj, 2003); in-vivo teşhis amaçlı manyetik rezonans görüntüleme (Sun, 2000) , in-vivo tedavi amaçlı kontrollü ilaç uygulamaları (Miller, 2002, Jain, 2005), hipertemi (Müller-Schulte D. Ve Brunner, 1995) , gen tedavisinde taşıyıcı vektör, yönlendirme ve tetikleme ajanı olarak kullanımları (Güven, 2008; Muthana, 2008) , in-vitro teşhis ve tedarik amaçlı çeşitli biyolojik moleküllerin izolasyonu ve saflaştırılması (Safarik ve Safarikova, 2004; Gao, 2005; Xu, 2004).

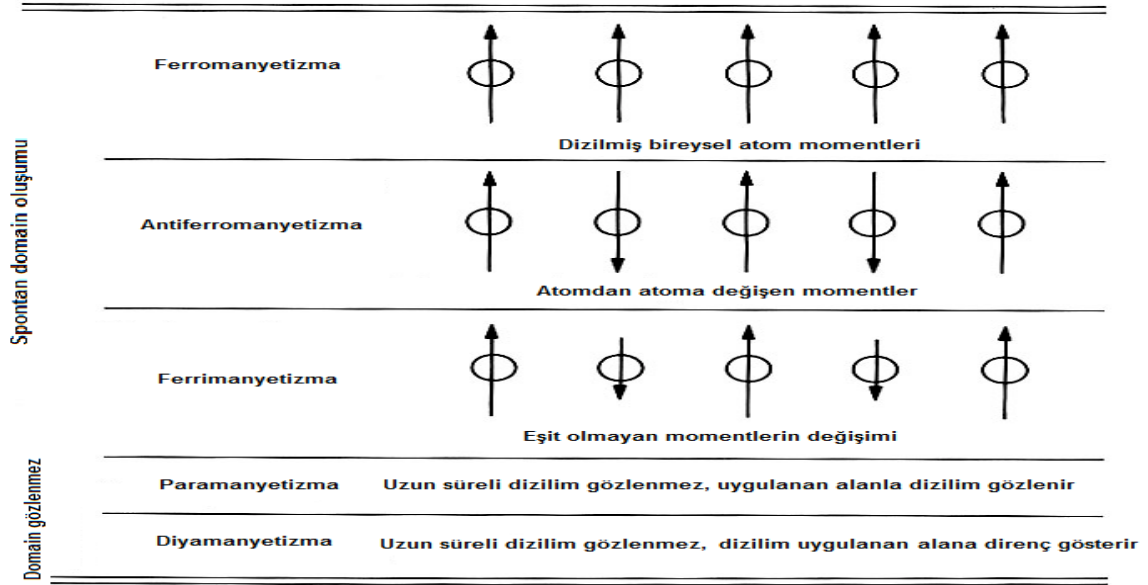
Günümüzde manyetik nanopartiküller rutin olarak hedef organlar (akciğer ve karaciğer) ve lenf nodülleri için kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. Yeni

gelişmeler moleküler görüntüleme ve hücre izleme üzerine odaklanmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyine fonksiyonellik kazandırılması zor bir iştir. Diğer bir zorluk ise kan dolaşımında uzun bir süre nanopartiküllerin gizli dolaşması ve ilişkili ligantların tümör hücrelerinde spesifik internalizasyonu kolaylaşabilir (Laurent, 2008; Semiz 2008) .

2.1.1 Manyetizma

Manyetizma, elektrik yüklerinin hareketinden oluşmaktadır. Bütün materyaller manyetik özellik gösterirler fakat çoğunun etkisi çok küçüktür. Bir atomun elektronları, spin yada spin ve orbital hareketleri sebebiyle manyetik bir moment kazanır. Kendi çevresinde dönüş hareketi yapan yüklü bir küreciğe benzer davranışı ve atom çekirdeği etrafındaki dolaşma hareketi elektronların manyetik özellik kazanmasına neden olur (Harris, 2002) . Yörüngede dönen bir elektronun uygulanan manyetik alana cevabı maddenin spin konfigürasyonu ile belirlenmektedir. Her birimin manyetik momenti elektron spinlerinin, elektronlar arası süper değişken etkileşimlere bağlı olarak kendiliğinden sıralanmaları sonucunda ortaya çıkar (Ozaki, 2000) . Böylece manyetik dipollerin yönlenmesiyle mıknatıslanma oluşur. Manyetik alan arttıkça dipollerin yönlenme derecesi artar ve harika dizilime ulaşıncaya doyumluk mıknatıslığı sağlanır (Ozaki, 2000; Harris, 2002; Sayar 2004; Semiz 2008) . Maddeler manyetizma özelliklerine göre 5 sınıfa ayrılırlar (Şekil 2.1.1) :

- ❖ Ferromanyetizma
- ❖ Antiferromanyetizma
- ❖ Ferrimanyetizma
- ❖ Paramanyetizma
- ❖ Diyamanyetizma



Şekil 2.1.1 Manyetizma özelliklerine göre spin durumları.

Ferromanyetizma:

Ferromanyetik maddeler, manyetik alan etkisi ortadan kalksa dahi mıknatıstık karakterlerini sürdürürler. Manyetik alan etkisi olmasa bile daima sıfırdan farklı net bir manyetik moment mevcuttur. Bu özellik, alan şiddeti ile manyetik indüksiyon (B) arasındaki “histeresis” ilişkisi veya “artık mıknatıslanma” olayı ile kendini belli eder. Ferromanyetik davranışlar, diamanyetik ve paramanyetiklerin aksine yalnız kristal yapıya sahip katılara özgüdür. Isıtılarak sıvı ve gaz haline getirilen ferromanyetik bir madde, bu özelliğini Curie sıcaklığı üzerinde kaybederek paramanyetik özellik kazanır. Fe, Co, Ni gibi ferromanyetik özellik gösteren geçiş elementlerinin elektron düzenlerine baktığımızda, sadece bu atomlara ait olan bir özelliğin farkına varırız. Sözü edilen atomlar, normal halde 10 elektron alabilen 3d katmanında boş yer olmasına rağmen, daha üstteki 4s katmanında iki elektron barındırmaktadır. Bu durumda, elektron spinlerinin diziliş biçimlerine bağlı olarak atomların net manyetik momentleri sıfırdan farklı olmaktadır.

Antiferromanyetizma:

Düşük sıcaklıklarda bazı kristallerde, komşu atomların manyetik momentleri birbirine ters olacak şekilde yöneldikleri gösterilmiştir. Cr, Mn gibi bazı metaller ve MnO, MnS, Cr₂O₃, NiCr gibi bazı alaşımlarda meydana çıkan bu özellik antiferromanyetizma adını almaktadır. Antiferromanyetik maddelerde birbirine

komşu iki atomun manyetik momenti birbirini yok edecek biçimde çiftler oluşturur. Çiftleşen spinlerin zıt yönde paralel olması nedeniyle değiş- tokuş enerjisi E_{de} negatif değerler almaktadır. Antiferromanyetik maddeler; “Neel sıcaklığı” (T_N) denilen bir sıcaklıkta paramanyetik faza geçerler (Sayar, 2004).

Ferrimanyetizma:

Ferrimanyetizma, spin dizilimlerinin zıt paralellikte olması sebebiyle antiferromanyetizmaya benzer ama manyetik momentler eş büyüklükte olmadığından uygulanan alanda net bir mıknatıslık oluştururlar. Ferrimanyetik materyallerde gözlenen bu net mıknatıslık ferromanyetik materyallerden daha küçüktür. Bunun sebebi yapı içindeki zıt paralellikte spin dizilimlerinin olmasıdır. Moment dizilimindeki farklılıklara rağmen ferromanyetizma için tanımlanan teoriler değiştirilerek ferrimanyetizma içinde uygulanabilmektedir. Ferrimanyetik kristalin yapı, tetrahedral (A) ve oktahedral (B) olmak üzere iki tip örgü yapısından oluşan iki farklı manyetik iyonlardan oluşmaktadır. Manyetit gibi spinel kristal yapılar için alış-veriş etkileşimlerinin (AA, AB ve BB) hepsi zıt paralellikte dizilimdir. Güçlü AB etkileşiminden dolayı ferrimanyetik davranış oluşmaktadır.

Paramanyetizma:

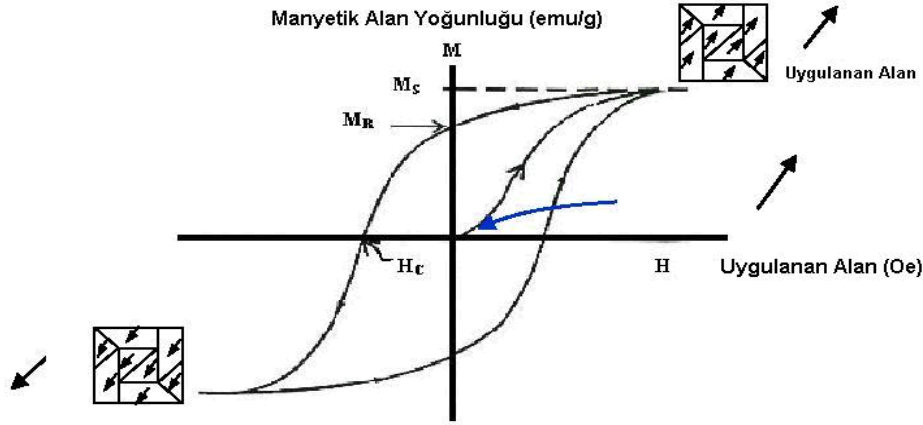
Bazı atomlar, dış elektron katmanlarının tam olarak dolu olmayışı nedeniyle, çiftleşmemiş elektronlara ve bunun doğal bir sonucu olarak da sıfırdan farklı net bir manyetik momente sahiptirler. O_2 , NO gibi bazı gazlarla, $MgCl_2$ gibi bazı çözeltiler, ya da platin, alüminyum, tungsten gibi metaller için durum böyledir. Bu tür bir maddenin bir manyetik alana getirilmesi halinde, madde atomları üzerine manyetik momentleri alan doğrultusunu almaya zorlayacak biçimde bir kuvvet etki eder. Atomlar arası etkileşimler ve özellikle termik hareketler, bu tür yöneltici kuvvetlere karşı koyarlar. Yine de manyetik alan etkisiyle manyetik momentleri kısmi yönelmeler gösteren bu türden maddelere “paramanyetik “ maddeler denir. Manyetik alana konulan bu tür madde, diamanyetik maddelerin aksine, alan şiddetinin bir miktar artmasına, yani cisim yakınlarındaki kuvvet çizgileri sayısının artmasına yol açar. Metaller Pauli paramanyetizmasına uyarlar (Semiz, 2004).

Diamanyetizma:

Diamanyetizma bir örnekteki elektrik yüklerin uygulanan bir dış manyetik alana karşı numune içini perdeleme eğilimiyle bağlantılıdır. Toplam manyetik momenti sıfır veya çok küçük olan atomlar diamanyetik davranışlar gösterirler. Elektronları çiftleşmiş He, Ne, Ar, Kr, Xe gibi soygazlar ile manyetik momenti zayıf (O_2 ve N_2 dışındaki) gazlar ve altın, gümüş, bakır, elmas, grafit, bizmut gibi bazı katılar bu gruba girer. Bir manyetik alana getirilen diamanyetik bir madde, daima alan şiddetini zayıflatacak biçimde bir etki yapar.

Histeresis:

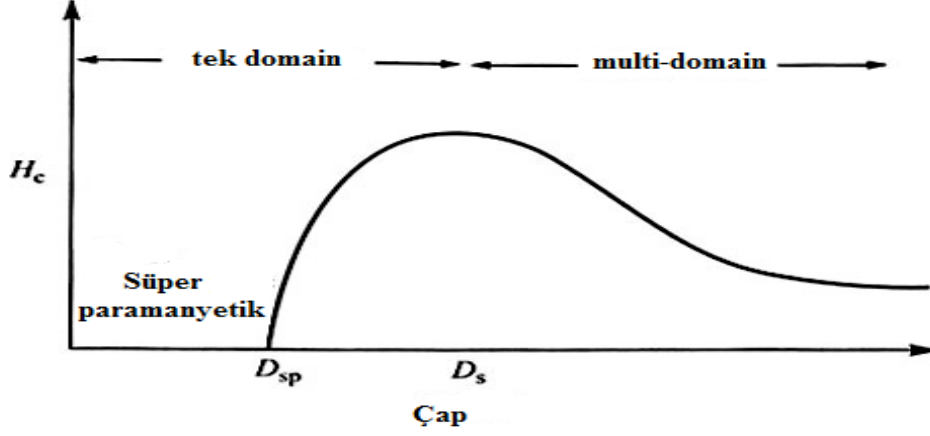
Ferromanyetik yada ferrimanyetik maddelerde madde boyunca bir domaindeki paralel spinler topluluğu rastgele yerleşmiştir. Bu sebeple neticede birbirlerinin etkisini yok ederek bir bütün olarak net sıfır mıknatıslık gösterirler (Şekil 2.1.2'de $M=0$ 'da). Yeterli miktarda bir dış manyetik alan uygulandığında her bir domaindeki spinler bütün dipoller dizilinceye kadar uygulanan manyetik alan yönüne paralel yerleşirler. Mıknatıslık eğrisindeki plato bölgesi doyumluk mıknatıslığıdır (M_s , şekil 2.1.2). M_s gram başına mıknatıslığın bir ölçüsüdür. Şekil 2.1.2'deki düz egride manyetik alan gücü (H) değişirken domain duvarında moment vektörlerinin dönmesini göstermektedir hatta küçük sıçramalar olmakta ve Barkhausen etkisi olarak anlatılmaktadır. Uygulanan alan azaldığında mıknatıslıkta azalır. Çok domainli yığın materyallerde, domain duvarları boyunca spin dönmeleri nedeniyle mıknatıslık giderilmektedir. Uygulanan alan uzaklaştırıldığında mıknatıslığı giderme eğrisi başlangıçtaki mıknatıslık eğrisini takip etmez. Bu materyal şekil 2.1.2'de gösterildiği gibi bir histeresis gösterir. Manyetik alan ($H=0$) sıfır olduğunda arta kalan mıknatıslık kalan mıknatıslık (remanence magnetization, M_r) olarak adlandırılır. Mıknatıslığı sıfırlamak için gerekli negatif yöndeki manyetik alan ise zorlayıcı güç (coercive force, H_c) olarak tanımlanmaktadır (Sayar 2004).



Şekil 2.1.2. Manyetik alan gücüne karşı mıknatıslık eğrisi

Süperparamanyetizma:

Partikül boyu azaldıkça, bir partikülün içerdiği domain sayısı da azalır ve multi domainden tek domainli yapılara geçiş olur. Genel olarak multi domain partiküllerde domain duvarlarından manyetik momentlerin dönmesi kolaylıkla gerçekleştiğinden mıknatıslığı gidermek için gereken manyetik alan şiddeti tek domainlilere göre daha küçüktür. Bu durum tek domainli partiküllerin manyetokristalin yapısı ve şekil anizotropisi ile ilişkilidir. Bu sebeple tek domainli parçacıklar genelde manyetik kayıt ortamlarında kullanılırlar. Bir partikül yeterince küçük olduğunda ise süperparamanyetik özellik sergiler ve manyetik momentleri termal değişimler ile hiçbir yönlenme göstermez. Bu olgu, bireysel parçacıkların manyetik davranışına hakim olan sınırlı boyutundan ve yüzey etkilerinden süregelir (Batlle ve Labarta, 2002). İlk olarak Frenkel ve Dorfman, ferromanyetik maddeye ait bir partikülün kritik parçacık boyutunun (birçok madde için 15 nm'nin altında) altında tek manyetik domain içerdiğini ve böylece her alanda eşit dağılıma sahip bir mıknatıslık göstereceğini öne sürmüştür (Frenkel ve Dorfman, 1930). Bunlar çok küçük giderme mıknatıslığına (H_c) sahiptirler (Şekil 2.1.3). Süperparamanyetik niteliğe sahip küçük manyetik partiküller manyetik sıvıların bileşenlerini oluştururlar. Bu partiküllerin gevşeme zamanları ölçümden daha hızlıdır (yaklaşık 100 sn) ve histerisis eğrisi göstermezler (Kotitz, 1995), yani manyetik alan ortadan kalktığına fazladan artık bir mıknatıslığa sahip değildirler (Sayar 2004).



Şekil 2.1.3 Partikül boyuna bağlı giderilme mıknatıslığı. D_{sp} ; süperparamanyetik partikül çapı, D_s ; tek domain partikül çapı.

2.1.2 Ferroakışkanlar

Bir taşıyıcı sıvı içinde dağıtılmış süperparamanyetik partiküller ferrosıvılar (ferrofluid) olarak tanımlanmaktadır. Kararlı bir ferrosıvı süperparamanyetik partiküller, bir taşıyıcı sıvı ve bir yüzey aktif madde ihtiva eder. Tarihte ilk başlarda, süperparamanyetik davranış gösteren küçük manyetik parçacıkların dispersiyonları manyetik domainleri gözlemlemek için kullanılmıştır. Ferrosıvılar doğal olarak bulunmazlar ve ilk olarak 1960 yılında tanımlanmışlardır (Sayar 2004).

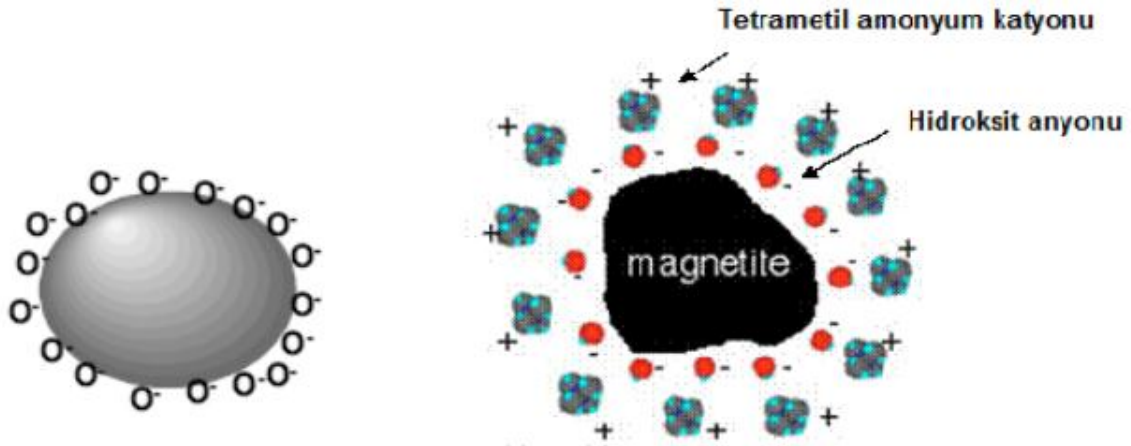
Bir manyetik alan değişimine maruz kaldıkları zaman yoğun manyetik partikül süspansiyonlarının, partikül üzerine etkiyen kuvvet ve dolayısıyla aralarındaki etkileşimi artırılmıştır. Manyetik alan, partikülleri çeker ve böylece dağıtım sıvısı partiküllerle birlikte hareket eder. Böylece sıvı mıknatıslanmış gibi davranır (Ozaki 2000) .

Partiküller arası uzaklık azalırken etkileşim enerjisi artar ve bir yüzey aktif maddeyle korunmadığından topaklanma oluşur. Derişik bir manyetik sıvı dispersiyonuna manyetik alan uygulandığında partiküller sıvı ile beraber uygulanan alan doğrultusunda hareket ederler (Sayar 2004).

Biyomedikal uygulamalar için ferro akışkanın kararlılığı çok önemli olmasına karşı, kolloidal süspansiyon içindeki nanoparçacıklar bir araya gelme davranışı gösterirler ve bu durum şu şekilde açıklanabilir; hidrofobik yüzey alanına karşı

hacim oranının çok yüksek olduğu manyetik demir oksit parçacıklar, aralarındaki hidrofobik etkileşimleri nedeniyle geniş kümeler oluşturma eğilimindedir (Gupta, 2005). Bu durumu önlemek için en çok tercih edilen yöntemler, sterik ya da elektrostatik olarak partikülleri kararlı hale getirmektir. Kullanım alanı ve uygulama kolaylığı açısından yüzey aktif madde kullanımıyla partikül yüzeylerini sterik etkiyle kararlı hale getirmek, çok tercih edilen bir yöntemdir. Düzenli dağılım ve topaklanmanın önlenmesi, 3 birincil çekim kuvvetinin arasındaki dengeye bağlıdır: 1) manyetik çekim kuvvetleri, 2) yer çekimi kuvveti ve 3) London dispersiyon ya da van der Waals kuvvetleri (Harris, 2002).

Partiküllerin etkileşim enerjisinin üstesinden gelmek ve kolloidal stabiliteyi sağlamak için partiküllerin yeterince küçük ve süperparamanyetik olması gerekir. Partikül süperparamanyetik olduğunda manyetik etkileşim azalır, çünkü parçacıkların manyetik momentlerinin serbest dönme hareketlerini termal enerji indüklemektedir (Ozaki, 2000). Brownian hareketi partiküllerin dağılım halini korumaya çalışırken yer çekimi kuvveti partikülleri aşağı çeker. Fakat Rosensweig'e göre tipik bir ferro akışkanın, kolloidal dispersiyona işaret eden nanopartikül kararlılığında, yer çekimi etkisi anlamsızdır (Rosensweig, 1985). Manyetik etkileşimden bağımsız olarak sürekli dalgalanma halindeki elektrik dipole kuvvetlerinin kendiliğinden indüklenen polarlanma özelliğinden kaynaklanan London dispersiyon ya da van der Waals kuvvetleri, yüksek yüzey alanı/hacim oranına sahip partiküllerin yüzey enerjilerini düşürmek için topaklanmayı tetikler; bu nedenle van der Waals çekim kuvvetleri anlamlı bir etkidir ve kolloidal dispersiyonlar hazırlamak/elde etmek için itici kuvvetlerle giderilmelidir (Harris, 2002). Şekil 2.1.4'de, tek domainli partiküllerin kararlılığını bahsedilen kuvvetleri yenerek korumak amacıyla kullanılan, bir yüzey aktif madde ile kaplanmış ferro akışkan taneciğinin şematik gösterimlerine yer verilmiştir. TMAOH (tetrametil amonyum hidroksit) yüzey aktif maddesi iki yüklü türden oluşur; $(CH_3)_4N^+$ ve OH^- . Hidroksit anyonları (OH^-) partikül yüzeyine yapışırken, ters iyonları olan tetrametil amonyum katyonlarını ($(CH_3)_4N^+$) çekerek partikül etrafında pozitif yüklü bir dış kabuk oluşturur (Şekil 2.1.4). Bu da, manyetik partiküllerin birbirini itmesini sağlayarak, kümeleşmeyi önler (Semiz 2008).



Şekil 2.1.4 Bazik yüzey aktif maddeyle etkileşmiş ferro akışkan taneciği. a; Partikül yüzeyine toplanan TMAOH'a ait negatif yükler (Scherer and Figueiredo, 2005) b; Negatif yük etrafına toplanan karşıt yüklü iyonlar (Chun et al., 2005).

2.1.3 Manyetik Nanopartiküller

Manyetik partiküller 1'den 100 nm boyuna kadar değişen skalada metal ve metal oksitlerden oluşmaktadır. Bu metal ve metal oksitler Ni, Co, Fe, Fe_3O_4 ve Fe_2O_3 'den oluşmaktadır.

Çizelge 2.1.3 Geçiş metalleri ve metal oksitlerin manyetik özellikleri (Blum, 1997; Sorensen, 2001).

Maddeler	Doygunluk Miknatıslığı (Ms) (emu/cm^3) 298 K	Curie Sıcaklığı (K)
Ni	485	631
Co (Kübik)	1400-1422	1404
Fe (Kübik)	1700-1714	1043
Γ - Fe_2O_3	394	820-986
$FeO \cdot Fe_2O_3$	480-500	858
$MnO \cdot Fe_2O_3$	410	573
$CoO \cdot Fe_2O_3$	400	793
$NiO \cdot Fe_2O_3$	270	858
$CuO \cdot Fe_2O_3$	135	728

Bu geçiş metalleri oldukça toksik ve oksitlenmeye çok duyarlıdır. Ni, Co ve Fe atmosfer koşulları altında antiferromanyetik özellik gösteren NiO, CoO ve FeO alaşımlarına oksitlenmektedir. Neredeyse nanopartiküllerin büyük yüzey alanı nedeniyle önemli bir problem olan oksidasyon mekanizmasını önlemek için sentetik ve/veya fiziksel bir metot yoktur. Demir oksitler, düşük doygunluk mıknatıslığı değerlerine sahip olmalarına rağmen, diğer metallere göre daha az okside olmaktadır (Sorensen, 2001).

2.1.3.1 Demir oksitler

Demir oksitler farklı manyetik özellikler ile değişik kimyasal bileşenlerden oluşmaktadır. Ferrimanyetizma gösteren bu ilginç materyaller γ -Fe₂O₃, Fe₃O₄, MO.Fe₂O₃ (M=Co, Mn, Ni veya Cu) gibi demir oksitlerdir. Ferrimanyetik demir oksitler geçiş metalleri gibi ferromanyetik metallere göre daha küçük bir manyetik cevap özelliği gösterirler. Fakat demir oksitler oksidasyona daha az duyarlı ve bu nedenle kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar.

Çizelge 2.1.3.1 A. Demir oksihidroksit ve demir oksit türleri

Mineral	Formül	Manyetik Özellik
Goethite	α -FeOOH	Antiferromanyetik
Akaganéite	β -FeOOH	Antiferromanyetik
Lepidocrocite	γ -FeOOH	Antiferromanyetik
Feroksait	δ -FeOOH	Ferrimanyetik
Ferrihidrit	Fe ₅ HO ₈ .4H ₂ O	Antiferromanyetik
Hematit	α -Fe ₂ O ₃	Zayıf Ferrimanyetik
Maghemit	γ -Fe ₂ O ₃	Ferrimanyetik
Manyetit	Fe ₃ O ₄	Ferrimanyetik

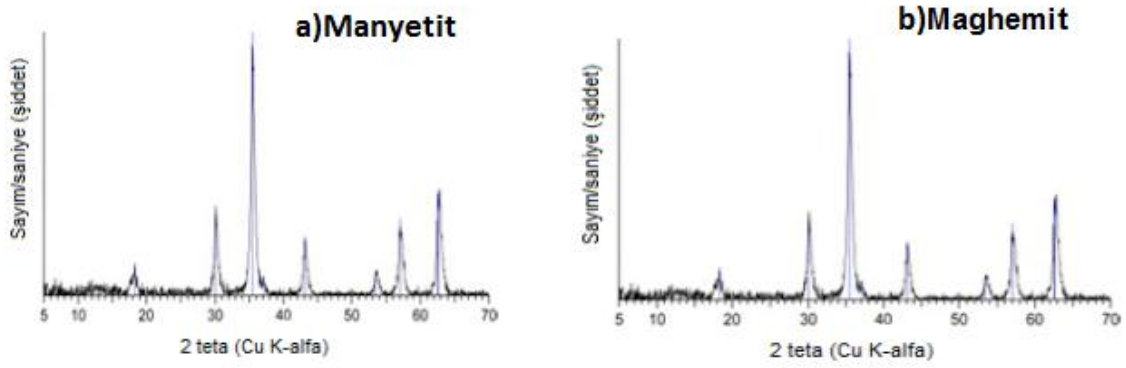
Manyetit (Fe₃O₄) ve maghemit (γ -Fe₂O₃) en genel ve en çok araştırılan demir oksitlerdir. MO.Fe₂O₃ metal karışımı ferritler, çeşitli fiziksel ve manyetik özelliklere sahiptirler ve partikül şekli ve tek domain yapısı nedeniyle elektronik uygulamalar için geliştirilmiştir. Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere ve kristal yapısına sahiptir (çizelge 2.1.3.1 B). Her ikisinde ferrimanyetik özellik gösterir. Fakat

maghemit daha düşük doygunluk mıknatıslığına sahiptir. Bunların manyetik cevapları alt örgü etkileşimleri nedeniyle değişmektedir. Maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) sadece Fe^{3+} iyonlarından oluşmaktadır. Kristal yapısında Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısında oktahedral düzenlenmiştir. Manyetit ise ($\text{FeO}\cdot\text{Fe}_2\text{O}_3$), 1:2 molar oranında Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarından oluşmaktadır. Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral diğer yarısı oktahedral ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir (Sayar 2004).

Çizelge 2.1.3.1 B. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri

	Kristal yapısı	Hücre boyutu (nm)	Renk	Doygunluk mıknatıslığı	Curie sıcaklığı
Manyetit	Kübik	$a_0=0.839$	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	$a_0=0.834$	Kırmızı kahve	76-81	820-986

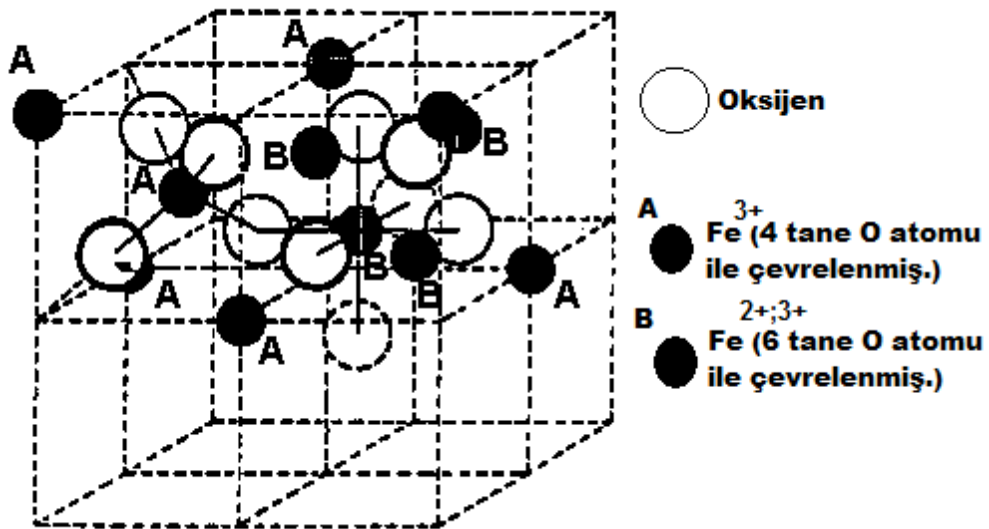
Her ikisinde curie sıcaklığı (T_c) oldukça yüksek olması nedeniyle farklı manyetik cevap uygulamalarında kullanılabilirler. Fakat maghemitin 713 K'in üzerindeki sıcaklıklarda Hematite dönüşmesi nedeniyle curie sıcaklığının (T_c) ölçümü zordur. Her iki demir oksit yapısı ferrimanyetik olması ve aynı mekanizma ile bir sıvı içerisinde stabilize edilmesi nedeniyle literatürde eşit gösterilmektedir (Cornell, 1996). Manyetit (siyah renkli) ve maghemit (kahverengi) hazırlanmasında literatürde değişik çalışmalar vardır. Genelde manyetit sentezi amacıyla elde edilen demir oksit karışımlarının manyetit-maghemit içeriğinden oluştuğu görülür. Bunun nedeni partiküllerin sentez sırasında oksitlenmesi ve manyetit yapının maghemite dönüşümüdür (Yoo, 2007). Aşağıda verilen X ışını kırınımı spektrumlarında (Şekil 2.1.3.1) kristal yapının benzerliği açıkça görülmektedir. Çok sayıda reaksiyon parametresi ve reaktant stokiyometrisinin hassasiyeti, genelde saf manyetit kristalin yapının elde edilmesini zorlaştırır (Semiz 2008).



Şekil 2.1.3.1. Manyetit ve maghemite ait X ışını kırınımı spektrumları (Legodi and De Waal, 2007).

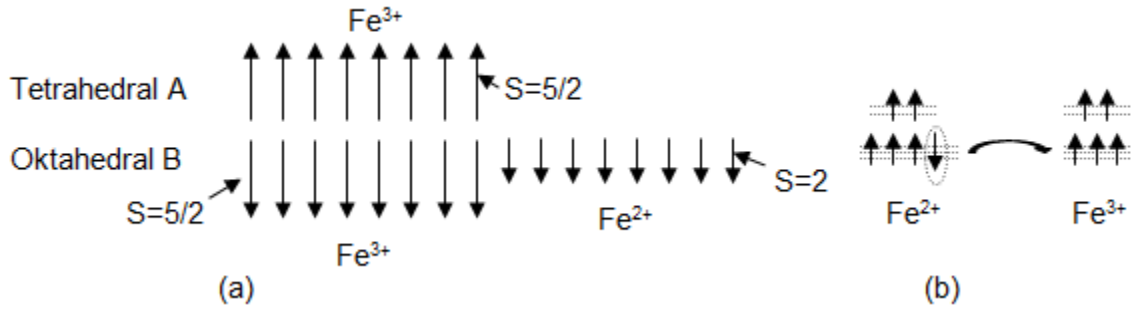
2.1.3.2 Manyetit

Manyetitin kimyasal formülü Fe_3O_4 , ama çoğunlukla $FeO \cdot Fe_2O_3$ olarak gösterilmektedir. Birim hücre, 32 O^{2-} anyonu 16 Fe^{3+} katyonu ve 8 Fe^{2+} katyonları olmak üzere 56 atomdan oluşmaktadır. Şekil 2.1.3.2'de görüldüğü gibi kapalı küp şeklindeki oksijen atomlarının eksen boyunca düzenli olarak yer aldığı ters spinel kristal yapıda, Fe^{3+} iyonlarının yarısı tetrahedral, geri kalan Fe^{3+} iyonları ve Fe^{2+} iyonlarının hepsi oktahedral olarak düzenlenmiştir (Sayar 2004).



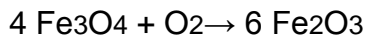
Şekil 2.1.3.2.1. Manyetitin kristal yapısı (Banerjee and Maskowitz, 1985).

Manyetit elektron konfigürasyonu, net manyetik momentler veren eşlenmemiş 3d elektronlarını içermektedir. Tetrahedral düzenlenmiş Fe^{3+} iyonlarının spinleri ve oktahedral düzenlenmiş Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının spinleri ters paralel ve eşit olmayan bir büyüklüktedir (Şekil 2.1.3.2.2a) (Kittel, 1976). Curie sıcaklığının (850 K) altında, bu biribiri içine geçmiş alt dizilimler eşit olmayan momentlerle zıt paralellikte uzanarak ferrimanyetik davranışta artış sağlarlar (Cornell, 1996). Oktahedral düzenlenmiş Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının spin dizilimleri, iyonlar arası elektron transferi ile kurulan çift değiş-tokuş mekanizması aracılığıyla ferromanyetikçe çiftleşmişlerdir (Cox, 1992; Elliott, 1998; Sayar 2004) (Şekil 2.1.3.2.2b).



Şekil 2.1.3.2.2. Manyetit ($FeO.Fe_2O_3$) spin dizilimi (a) ve iyonlar arası elektron transferi ile değiş-tokuş etkileşimi (b) (Elliott, 1998).

Manyetit havada kolaylıkla maghemite oksitlenir bu durum aşağıdaki eşitlikte verilmiştir. Maghemit sadece az manyetik özelliğe sahip ferrimanyettir. Fakat 300 °C'den büyük sıcaklıklarda manyetit antiferromanyetik hematite oksitlenir (Cornell, 1996).



Manyetit nanopartiküllerin kullanımı ve özellikleri dikkate alındığında bu partiküllerin yüzey özellikleri ve kimyası büyük önem taşımaktadır. Manyetitin sudaki dispersiyonu ne pozitif ne de negatiftir, çözeltinin pH'ına bağlıdır. Manyetitin izoelektrik noktası 6.8'dir. Manyetit nanopartiküllerin elektrostatik çift tabaka oluşturulması, sterik stabilizasyonu veya izoelektrik noktasının sitrat ya da silika kaplanarak modifiye edilmesiyle stabilizasyonu sağlanmaktadır. Demir oksit

nanopartiküllerin stabilizasyonu kararlı bir manyetik koloidal ferrosivılar oluşturulması için çok önemlidir [Cornell, 1991].

2.1.4 Manyetik Nanopartikülleri Sentezleme Metotları

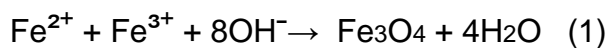
Manyetik nanopartiküllerin sentezinde medikal gözlem uygulamaları için çok sayıda kimyasal metot kullanılmaktadır:

- ❖ Mikroemülsiyon; (Chin, 2007)
- ❖ Sol-Jel Sentezi; (Albornoz, 2006)
- ❖ Sonokimyasal Reaksiyon; (Kim, 2005)
- ❖ Hidrotermal Reaksiyon; (Wan, 2005)
- ❖ Prekürsörlerin Hidroliziz ve Termolizisi; (Kimata, 2003)
- ❖ Akış İnjektasyon Sentezi; (Alvarez, 2006)
- ❖ Elektrospray Sentezi; (Basak, 2007)

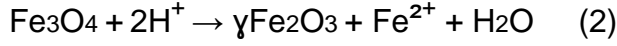
Süperparamanyetik nanopartiküllerin sentezi koloidal yapıları nedeniyle karmaşık bir süreçtir. İlk temel problem monodispers olarak manyetik taneciklerin uygun boyutta oluşumu için deney koşullarının belirlenmesidir. İkinci kritik nokta ise ultrasantrifüzyon, büyüklük ayırma kromatografisi, manyetik filtrasyon ya da akış alanı eğimi gibi kompleks bir saflaştırma prosedürü olmadan üretilebildiği tekrarlanabilir bir prosesin seçimidir. Bu metotlar yakın boyut dağılımı ve homojen kompozisyonda partiküllerin hazırlanmasında kullanılmaktadır. Ancak manyetit üretimi için en yaygın metot demir tuzlarının kimyasal ikili çöktürme yöntemidir.

2.1.4.1 İkili Çöktürme Yöntemiyle Manyetit Sentezi

İkili çöktürme tekniği manyetik nanopartikül üretiminde basit ve en etkin kimyasal yoldur. Demir oksitler (ya Fe_3O_4 ya da γFe_2O_3) sulu ortamda ferrous ve ferric tuzlarının stokiometrik karışımlarının oluşumu ile hazırlanmaktadır. Fe_3O_4 formasyonunun kimyasal reaksiyonu aşağıdaki eşitlik ile şöyle yazılabilir:



Bu reaksiyonun termodinamiğine göre Fe₃O₄ oluşumu pH 8-14 aralığında, stokiometrik oran 2:1 (Fe³⁺ / Fe²⁺) ve oksitleyi etkisi nedeniyle oksijen içermeyen koşullarda gerçekleşmektedir. Ama magnetit (Fe₃O₄) kararlı değildir ve oksidasyona duyarlıdır. Oksijenin bulunduğu ortamda magnetit (Fe₃O₄), maghemite (γFe₂O₃) dönüşmektedir. Havadaki oksidasyon bu dönüşüm için tek yol değildir. Süspansiyon pH 'ına dayalı çeşitli iyon ya da elektron transferlerini içeren formasyon eşitlik 2 ile gösterilmektedir.



Asidik ve anaerobik koşullar altında Fe²⁺ iyonlarının yüzeyi solüsyon içinde hexa-aqua komplekse ayrışır oysa bazik koşullar altında magnetitin oksidasyonu magnetit yüzeyinin oksidasyon-redüksüyonunu gerektirir. İkili çöktürme prosesinin ana avantajı fazla miktarda partikül sentezleyebilmektir. Fakat partikül büyüklüğü dağılımının kontrolü sınırlıdır çünkü sadece kinetik faktörlerin kristal büyümesini kontrol edebiliriz.

İkili çöktürme sürecinde iki aşama katılır (Cornell, 1996; Gribov, 1990): demir çözeltilerinin konsantrasyonu kritik aşırı doygunluğa ulaştığında çekirdeklenme kısa bir zamanda meydana gelir ve daha sonra kristal yüzeyine çözünenin difüzyonu ile çekirdeğin yavaş büyümesi yani kristal gelişimi meydana gelir. Monodisperse demir oksit nanopartiküller üretmek için bu iki aşama ayrılmalıdır yani çekirdeklenme büyüme dönemi süresince kaçınılmalıdır (Tartaj ve ark. 2006). Sonuç olarak monodisperse partiküllerin boyut kontrolü çok kısa çekirdeklenme döneminde yapılmalıdır çünkü son partikül sayısı çekirdeklenme sonunda belirlenir ve partikül büyümesi sırasında bu değişmez. Boyut, manyetik özellik ya da yüzey özellikleri gibi çok çeşitli faktörleri kontrol etmek demir oksit nanoparçacıkların sentezinde ayarlanabilir. Birçok çalışmada bu farklı faktörlerin etkisi ile ele alınmıştır (Tominaga, 2006; Khalafalla, 1980).

Nanopartiküllerin şekli ve büyüklüğü pH, iyonik güç, sıcaklık, doğal tuzlar (perkloratlar, klor, sülfat, nitratlar) ya da FeII/FeIII oranı tarafından ayarlanabilir. 2 ile 17 nm arasında büyüklüğü değişen nanopartiküller bu parametreler değiştirilerek elde edilebilir. Farklı parametrelerin etkisi (ortam içeriği, FeII / FeIII

oranı, enjeksiyon tozları, demir ve TMAOH konsantrasyonu, sıcaklık ve oksijen) temel ikili çöktürme sürecinde ele alınmıştır (Gribanov, 1990).

Manyetit oluşumunda reaktiflerin saflığı önemli bir parametredir. Literatürde ikili çöktürme için kullanılan iki değerlikli Fe tuzları genellikle $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ veya $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 'dır. Fe^{2+} tuzları havada renk değişimi göstermesi ve kararsız olması nedeniyle Akaganeite ($\beta\text{-FeOOH}$) yapısına oksitlenmektedir. Üç değerlikli demir tuzları da $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ veya $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 'dur. Reaktifler azot altında depolanmalı ve çözeltilerin kullanılmadan önce bu kararsızlıklarını önlemek için dikkatlice oksijeni giderilmelidir. Sonuç olarak ikili çöktürme yöntemiyle manyetit Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının oksidasyonunu ve yan reaksiyonların oluşumunu önlemek için tuz çözeltileri hemen kullanılmalıdır (Cornell, 1991).

Manyetit formülü $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ 'dır, bundan dolayı da stokiyometrik dönüşüm için 1 mol Fe^{2+} ve 2 mol Fe^{3+} reaksiyona girmelidir. Bazı araştırmacılar Fe^{2+} iyonunun kolayca oksitlenmesi sebebiyle $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ mol oranının 0.5'den fazla olması gerektiğini önermişlerdir (Pardoe, 2001). Ama saf manyetit için demir tuzlarının stokiyometrik molar miktarlarda kullanılması ve bu çözeltilerin oksijeninin giderilmesi tercih edilmekte ve dikkatli deneysel tekniklerinin kullanılmasıyla saf manyetit oluşumu başarılabilir (Sayar, 2004). İkili çöktürme yöntemi ile manyetit oluşumunda demir tuzlarının literatürde değişik konsantrasyonlarda kullanımı bulunmaktadır. Laboratuvar ortamında karıştırılan demir tuzları çözeltisine pH 9-14 aralığında bir baz ilave edilmesiyle manyetit hazırlanmaktadır. Baz ilavesinin literatürde çok hızlı bir şekilde 1-2 saniyede olması gerektiği belirtilmektedir. Yavaş baz eklenmesi demir iyon türlerinden manyetik ve homojen olmayan yapılar oluşturmaktadır [Gribanov, 1990]. Endüstriyel olarak üretimde ise baz çözeltisi içine demir tuzları çözeltisi eklenmesiyle elde edilmektedir (Sayar 2004) . Manyetit oluşumunda kullanılan hidroksit bazının katyon yapısının oluşturulan manyetitin manyetik özelliği ve kristal yapısına etkisi incelenmiştir. Doygunluk miktatıslığının etkisi aşağıdaki baz gücü sırasıyla arttığı görülmüştür.

$\text{KOH} \geq \text{NaOH} \geq \text{LiOH} \geq \text{NH}_4\text{OH}$

Gribanov, manyetit oluşumunda pH 8.5-10 aralığında amonyum hidroksit kullanıldığında manyetik demir oksit yapılarının oluştuğunu belirtmiştir. Ayrıca

NH₄OH baz konsantrasyonunun etkisini incelemek amacıyla 0.25 M'dan 2 M'a kadar NH₄OH baz konsantrasyonu değiştirilerek manyetit sentezlenmiş ve partiküllerin manyetik özellikleri üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını belirtmiştir (Gribanov, 1990; Babes, 1999; Sayar 2004).

Birçok araştırmacı yüksek reaksiyon sıcaklığının kullanılmasını ve bunun optimum kristal yapının oluşturulmasında önemli olduğunu belirtmektedir. Ancak sıcaklığın artmasıyla çekirdeklenme azaldığından sonuçlar partikül kalitesini olumsuz etkileyen sıcaklığın 343 K'ini geçmemesi gerektiğini göstermiştir [Gribanov, 1990].

Manyetitin yüzeyi izoelektrik noktanın üzerindeki pH değerlerinde negatif yüklüdür. 1981'de Massart bir alkali ortamının polarlaşması veya amonyum, alkali ve toprak alkali iyonlar gibi yüklü katyonların topraklanmayı arttırdığını bildirmiştir (Massart, 1981). Fakat tetrametilamonyum hidroksitinin (TMAOH) N(CH₃)₄⁺ iyonu gibi düşük polarlaşan ve pozitif yüklü iyonların manyetiti stabilize ettiği görülmüştür. Çözelti izoelektrik noktanın altındaki bir pH'da olduğunda partiküller perklorik asidin ClO₄⁻ iyonu ile stabilize edilebilmektedir (Sayar, 2004) .

Qui, manyetit oluşumu üzerine reaksiyon çözeltisinin iyonik gücünün etkisini incelemiştir. 1M NaCl çözelti kullanılarak hazırlanan manyetitin NaCl çözeltisi kullanılmadan elde edilen manyetitten yaklaşık 1.5 nm daha küçük olduğu görülmüştür. Ayrıca, iyon gücü yüksek çözeltilerde oluşturulan küçük nanopartiküller 63 emu/g gibi doygunluk mıknatıslığı gösterirken NaCl olmayan çözeltilerde hazırlanan nanopartiküllerin ise 71 emu/g gibi bir doygunluk mıknatıslığı gösterdiği bulunmuştur (Qui, 2000). İyonik gücü yüksek olan ortamlarda hazırlanan partiküllerin partikül boyunun azalmasıyla doygunluk mıknatıslığı da azalmaktadır.

2.1.5 Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller

Manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküllerin yüksek manyetik momente sahip olmaları, toksik olmamaları ve kolay sentezlenebilmeleri gibi avantajları nedeniyle manyetik demir oksit nanopartikülleri biyotıp alanında çok kullanılan bir malzeme haline gelmiştir. Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanımıyla kolaylıkla uzaklaştırılabilmeleridir. Bu özelliklerine ek olarak fiziksel ortamlarda kararlılığını koruması ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere

yüzeyine biyolojik bir molekül takılabilmesi için polisitiren, polietilen glikol, polivinil alkol ve kitosan gibi değişik doğal ve sentetik polimerler ile fonksiyonelleştirilerek kompozit yapıları meydana getirilmektedir.

Son zamanlarda manyetik partiküllere yeni fonksiyonlar kazandırmak, inert bir yapı oluşturmak, manyetik çekirdeğin oksidasyonunu önleyerek manyetik özelliğini kaybetmeyecek inert bir dış kabuk oluşturmak için yeni arayışlar içine girilmiştir. Bunun sonucunda altın, gümüş gibi metalik yapılarla kaplı manyetik nanopartiküller ortaya çıkmıştır (Sayar 2010). İlk olarak 2001 yılında Cui ve arkadaşları bu yeni kompozit partikülleri sentezlemişlerdir (Cui, 2005).

Altın hem insan hem hayvan uygulamaları için biyoyumlu olması, toksik olmaması, kimyasal kararlı olması ve yüzey plasmon özelliğinden dolayı UV-görünür bölgede bir absorpsiyon bandı vermesi gibi özellikleri sebebiyle en çok tercih edilen kabuk malzemesi olmaktadır. Ayrıca enzim, protein, DNA gibi biyolojik moleküller kovalent olarak altın yüzeyine daha güçlü bağlanabilmektedir. DNA ya da antibadi gibi biyolojik moleküller manyetik-altın nanopartiküllere direkt olarak bağlanamazlar. Geleneksel bağlanma yöntemleri temel olarak ikiye ayrılır. Birincisi biyotinlenmiş DNA kullanarak avidinle aktifleştirilmiş manyetik-Au nanopartiküllerine bağlanma gerçekleştirilmiştir. Diğer yöntem ise altının tiyole olan ilgisinden yararlanılarak tiyol modifiye edilmiş DNA gibi biyolojik moleküllerin kullanılmasıdır. Bu yöntemde diğerine göre daha az zaman ve emek harcanması gerekmektedir. Böylece altın kabuğunun biyolojik uygulamalara uygun olması, gösterdiği optik özelliği, manyetik çekirdek partikülün manyetik özelliği nedeniyle hem altının hem de manyetitin özelliklerinin birlikte kullanılabileceği çok fonksiyonlu partiküller ortaya çıkmıştır (Sun, 2010; Sayar 2010).

2.1.5.1 Manyetik Nanopartiküllerin Altınla Kaplanma Metodları ve Bunların Uygulama Alanları

Altın kaplı manyetik nanopartikül sentezi manyetik çekirdek ve altın kabuk olmak üzere iki ana prosesten oluşmaktadır. Altın kaplı manyetik nanopartikül sentez yöntemleri ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi manyetit partikülleri ve bunun etrafını kaplayacak altını içeren sabit reaktörler şeklindeki ters misel yöntemidir. Ters misel yönteminde verim düşük, üretim zordur. İkinci yöntem ise hem magnetite nanopartiküllerin hem de kaplama işleminin sulu fazda

gerçekleştirilmesidir. Demir tuzlarının alkalın bir ortamda ikili çöktürülmesiyle oluşturulan manyetit nanopartiküllerinin kloraurik asit ile indirgenerek altın kaplamanın oluşturulmasıdır. Bu su fazlı metot basit, hızlı ve üretilen partiküller su içinde dağıtılabilmektedir. Bu yöntemde partikül boyu, altın kabuk kalınlığı çok zor kontrol edilebilmektedir. Ayrıca altın ile kaplanmış partiküller ile kaplanmamış manyetit nanopartiküller aynı örnek içinde bulunup birbirinden ayrılması sorun oluşturmaktadır (Sayar 2010).

Üçüncü bir yöntemde ise manyetit sentezi ve altın kaplamanın organik fazda yapılmasıdır. Demir (III) oleatın ısıl bozulmasıyla oluşan manyetit nanopartiküllere kaplayıcı bir ajan varlığında altın asetatın indirgenmesiyle kaplama gerçekleştirilmektedir. Organik metot da partikül boyu ve altın kabuk kalınlığı kontrol edilebilirken manyetik özellikleri az olup sulu çözelti fazına geçtiklerinde çökme göstermektedirler. Ayrıca kullanılan çözücüler çevre dostu olmayıp büyük ölçekte sentez de sorun oluşturmaktadır.

Partikül boyutunu kontrol edip bulunduğu sulu ortamda kararlılığını sağlamak için manyetik özellikteki çekirdeğin organik fazda altın kaplama işleminin sulu ortamda yapıldığı sentez yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde partikül boyutu çok iyi kontrol edilirken tamamen kaplama işlemi bir derecede başarılı olup kararlılığının sağlanması tam olarak keşfedilememiştir.

Manyetit nanopartikül yüzeyini tamamen kaplamayacak şekilde altın nanopartiküllerin bağlandığı altın-manyetit kompozitleri oluşturulmuştur. Bu kompozitler, protein ayırma, optik görüntüleme ya da kataliz gibi tam kaplama gerektirmeyen uygulamalar için kullanışlı yapılardır. Bu tarz kompozitler amin ya da tiyol grupları gibi fonksiyonel molekülleri taşıyan manyetit nanopartikül yüzeyine altın nanopartiküllerin kovalent ya da gama ışınları uyarılmasıyla bağlanarak hazırlanmaktadır. Bu yöntemle kompozit yapıların kararlılığını sağlayabilecek derecede manyetit yüzeyine bağlanan altın nanopartikülü kontrol edememektedir. Tamamen altın nanopartikül ile kaplanmamış kompozitler manyetit çekirdeğin bozulması ya da okside olması nedeniyle çok kısıtlı çevrelerde kullanılabilir. Özellikle partiküllerin bir araya gelip aglomerasyon oluşturduğu kan damarlarının tıkanması gibi istenmeyen durumların meydana geldiği in vivo uygulamalarda partikül aglomerasyon kararlılığı çok önemlidir.

Demir oksit kararlılığını etkileyen partikül boyu, yüzey fonksiyonallitesi, pH ve iyonik güç gibi parametreler bilinmekte olup, Au-Fe₃O₄ kompozitler için aglomerasyon kararlılığının detayları henüz bilinmemektedir (Sayar 2010).

Mandal ve grubu, misel çözeltisinde 13 nm boyutundaki Fe₃O₄ nanopartiküllerini sentezleyip kararlılığını korumak ve okside olmasını önlemek amacıyla altın, gümüş gibi metallerle kaplamışlardır. Fe₃O₄ nanopartiküllerini toksik olmayan glukoz indirgeme ajanı ile kaplayarak (Fe₃O₄)_{çekirdek}-(Au)_{kabuk} ve (Fe₃O₄)_{çekirdek}-(Ag)_{kabuk} yapısında partiküller oluşturmuşlardır. Çeşitli yöntemlerle karakterize ederek manyetik özellikleri incelenmiştir. Hazırlanan partiküllerin MRI ve DNA sensörü gibi uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Mandal, 2005).

Cui ve arkadaşları, altın kaplı manyetik nanopartikülleri sentezleyerek IgG ve IgM antibadilerini partikül yüzeyine immobilize etmişlerdir. Kan içindeki HBV antijenini belirlemek için bunları katı faz substrat olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda bunları immunolojik ve affinite esaslı tayinler için yeni bir substrat olabileceklerini belirtmişlerdir (Cui, 2005).

Wang ve arkadaşları, yetişkin bir sıçanın omiriliğinden sinir kök hücrelerini izole etmişler ve izole edilen sinir kök hücrelerine altın kaplı manyetik nanopartikülleri yükleyerek manyetik rezonans görüntüleme kontrast artırıcı olarak kullanılabilirliğini araştırmışlardır. 20 hücreyi bu partiküller ile etiketledikten sonra sıçanların omiriliğine yerleştirerek 48 saat ve bir ay sonra MRI ile izlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda altın kaplı manyetik nanopartiküllerin güçlü kontrast artırıcı özellik gösterdiklerini ve nakledilen hücrelerin uzun süreli in vivo izlenmesi için güzel MRI etiketleri olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir (Wang, 2006).

Jeong ve arkadaşları, maghemit (Fe₂O₃) nanopartiküllerini sentezleyip altın tuzunu hirosilamin ile indirgeyerek etrafında altın kabuk oluşturmuşlardır. Altın kaplı bu manyetik partiküllerin yüzeyine karboksil içeren alkil tiyol grubu olan merkaptohexadekanioik asit (MHA) immobilize ederek pozitif yüklü hekza-argin esteraz (Arg₆-esterase) enzimi ile etiketlemişlerdir. Esteraz enzimi takılmış bu altın kaplı manyetik partikülleri ile p-nitrofenol butirat olan renkli substratının kopma (dissociation) hızı izlenerek enzimatik aktivitesini incelenmişlerdir. Enzim

immobilize partiküller substrat çözeltisiyle etkileştirilip UV-görünür bölge spektrumu ile p-nitrofenol butirat ürününün kopma hızı izlenmiştir. Enzim immobilize partiküller manyetik olarak ayrılıp tekrar yeni bir substrat çözeltisi ile etkileştirilerek tekrar tekrar bu partiküllerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda her bir manyetik ayırmadan sonra enzim immobilize edilmiş altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hiçbir enzim aktivitesinde kayıp olmadan tekrar tekrar kullanılabilirliğini rapor etmişlerdir (Jeong, 2006).

Goon ve arkadaşları 50-150 nm aralığında manyetit-altın kompozitleri sentezlemişlerdir. Manyetit nanopartikülleri ikili çöktürme yöntemiyle hazırlayıp manyetit nanopartiküllerin yüzeyini biyouyumlu polietilenimin ile kaplayarak 2 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin bu yüzeye bağlanmasını sağlamışlardır. Partiküllerin aglomerasyona karşı kararlılığını PEI ile sağlarken altın nanopartiküllerin manyetit yüzeyine bağlanmasıyla manyetit çekirdeğin kimyasal saldırılarına karşı koruyucu bir tabaka oluşturmuşlardır (Goon, 2008).

Pham ve arkadaşları 15-40 nm boyutundaki altın kaplı manyetik nanopartikülleri sitrat indirgeme ajanı kullanarak sentezlemişlerdir. Manyetit çekirdeği Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının güçlü bir alkalın çözeltisi ile ikili çöktürülmesi sonucu oluşturarak bu manyetit çekirdeği sitrat ile stabilize edip altın tuzunu ilave ederek kaplama gerçekleştirmişlerdir. Sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartikülün yüzey plasmon rezonans peak ölçümü 528 nm olarak rapor etmişlerdir. Sentezledikleri bu partikülleri IgG proteinini biyolojik ayırma işleminde kullanmışlardır. Bu uygulama ile 400 ng/ml konsantrasyonunda %35 maksimum verimde IgG ayırımı sağlamışlardır (Pham, 2008).

Liu ve arkadaşları, hücre ayırma gibi biyomedikal uygulamalar için polyol prosesi ile eş boyutlu altın kaplı manyetik nanokristalleri sentezlemişlerdir. Fe_3O_4 -Au nanokristallerinin yüzeyi karboksil gruplarıyla fonksiyonlandırılmış ve üzerine karbodimid aktivasyonu ile FITC'li streptavidin immobilize etmişlerdir. Hazırlanan bu nanokristeller, hücre karışımları içinde biyotinli anti CD^{4+} antibadisi bağlanmış hücrelere yüksek seçicilik ve verimde bağlanarak hücrelerin ayrılması gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde sıçan dalağında izole edilmiş CD^{4+} T lenfositlerine sentezlenen bu partiküllerin bağlanabilirliği test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu partiküllerin bütün dalak hücrelerinden CD^{4+} T lenfositlere yüksek

seçicilikte bağlandığını göstermiştir. Böylece bu nanokristallerin, hücre ayırma işlemleri için kullanışlı araçlar olabileceği ayrıca çeşitli hastalıkların tanısı, izlenmesi ve tedavisini içeren biyomedikal uygulamalarda kullanılacak malzemeler olduğu belirtilmiştir (Liu, 2008).

Pita ve arkadaşları, kobalt ferrit nanopartiküllerini sentezleyerek, altın tuzunun tekrarlamalı indirgenmesiyle eş boyutlu suda dağılılabir 21-29 nm aralığında altın kaplı manyetik nanopartikülleri oluşturmuşlardır. Tiyol modifiye edilmiş peptid nükleik asit oligomerleri ile bu partikülleri fonksiyonel hale getirip çözeltideki hedef DNA molekülü ile hibridizasyonunu Rodamin 6G floresan etiketi ile incelemiştirler. Tek nükleotit mutasyonu da araştırılarak çok zaman alan DNA genotipleme çalışmaları için biyosensör çalışmalarında bu partiküllerin kullanılabilceği bildirmişlerdir (Pita, 2008).

Seino ve arkadaşları kompozit altın-demir oksit nanopartikülleri sonokimyasal bir yöntemle sentezleyip bunları polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen katyonik polimerle modifiye etmişlerdir. Altın kaplı manyetik nanopartiküller PBS gibi biyolojik sistemlerde kullanılan tamponlar içinde büyük topaklanmalar oluşturmaktadır. Bu nedenle asidik solüsyon içinde kompozit bu nanopartiküllerin dağılımını PEI modifikasyonu ile geliştirmişlerdir. PEI sayesinde partiküllerin biyolojik tampon içinde topaklanmasını azaltarak sentezlenen partiküller özellikle sülfür içeren amino asitlerle etkileşerek harici bir manyetik alan uygulanması ile çözelti içinden toplanabildiğini göstermişlerdir. Aynı zamanda da partiküller PEI sayesinde pozitif yük kazanmıştır. Böylece sentezlenen bu kompozit nanopartiküller PEI ile modifiye olduğunda hem Au-S bağı yapabildiğini hem de tampon çözeltiler içinde iyi dağılım gösterdiğini rapor etmişlerdir (Seino 2009).

Polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen hem amino hem imin grupları içeren katyonik polimerlerle de elektrostatik olarak manyetik-altın nanopartikülleri kaplanabilmektedir. Sun ve arkadaşları, PEI modifiye edilmiş Fe_3O_4 -Au nanopartikülleri sentezleyerek bunlarla memeli hücrelerinden genomik DNA'nın yüksek verim ve saflıkta ekstraksiyonu ve DNA'nın serbest bırakılmasını başarmışlardır (Sun, 2010).

Manyetik altın kaplı nanopartiküller in vivo gen ve ilaç salımı uygulamalarında taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Jafari ve arkadaşları, ters misel yöntemiyle sentezledikleri manyetik-altın nanopartikülleri ilaç salımı ve MRI için biyouyumlu poligliserol ile kaplamışlardır. Manyetik özellikleri incelenerek MTT ile hücrede toksik etki yaratmadığı ve biyomedikal uygulamalar için uygun taşıyıcı olabilecekleri bildirilmiştir (Jafari, 2010).

Silva ve arkadaşları, 9nm boyunda demir oksit nanopartikülleri mikroemülsiyon yöntemi ile sentezleyip indirgeme ajanı olarak glikozu kullanmışlar ve altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Yeni bir altın çekirdek oluşumundan kaçınıp altın kabuğun oluşumunu kontrol ederek çeşitli yöntemlerle karakterize edip kaplama sonucunda manyetik özelliğinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (Silva, 2010).

Süperparamanyetik demir nanopartikülleri (SPION), hücre etiketleme ve ayırma, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç salımı ve manyetik hypertermia gibi biyomedikal uygulamalarda çok kullanılmaktadır. Bu partikülleri altın ile kaplayarak ve biyolojik moleküller ile fonksiyonel hale getirerek biyomedikal uygulamalarda çeşitli fırsatlar doğmaktadır. Suda dağılan altın kaplı demir oksit nanopartikülleri genellikle manyetik çekirdek yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidrosilamin ya da sitrat ile tekrarlı indirgenmesiyle elde edilmektedir. Lu ve arkadaşları sitratla Au^{3+} iyonlarını manyetik nanopartikül çekirdekleri yüzeyinde indirgeyerek altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Bu partiküllerin manyetik özelliklerini inceleyerek saf altın nanopartikül herhangi bir manyetik özellik göstermezken, altın kaplı manyetik partiküllerin süperparamanyetik özellik gösterdiğini belirterek bu partiküllerin manyetik ayırma ve saflaştırma gerektiren biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Lu, 2006).

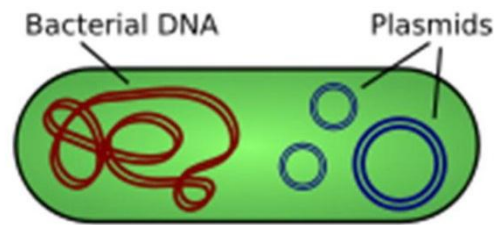
2.2 Gen Terapi

Teröpatik etkinliğe ulaşmak için fonksiyonel genlerin hedef hücrelere gönderilmesi 'gen terapisi' olarak adlandırılmaktadır. 80'lerde ilk adımın atılması ve 1990'da ilk klinik denemenin yapılmasının ardından etkileyici derecede büyüyen araştırma gruplarının, organizasyonların ve endüstrilerin eksponensiyel olarak artış göstermesiyle bu alan büyük bir potansiyel göstermektedir (Blease, 1995).

Gen terapi sistik fibrosis, Parkinson hastalığı, vb. gibi genetik kökenli hastalıkların ve çeşitli kanser türlerinin, tedavisi için uygulanan/uygulanması öngörülen, hücre fonksiyonlarını normalize etmeye yönelik terapötik proteinlerin ekspresyonunu sağlamak üzere somatik hücrelere gen aktarımını içeren önemli bir yaklaşımdır (Pai ve ark., 2005, Kaplitt ve ark., 2007).

Gen terapisinin klasik uygulanmasında istenilen geni taşıyan özel olarak tasarlanmış pDNA'lar kullanılır. pDNA'nın hedef hücreye taşınması, hücre içine alınması, çekirdeğe aktarılması orada genomik DNA ile entegre olarak (veya olmadan) istenilen proteinin ekspresyonu sağlaması beklenir. Plazmidler çift iplikli halkasal bir şekilde olup $4-60 \times 10^6$ dalton molekül ağırlığında değişmektedirler. Plazmidler hücre için hayati önem taşıyan gerekli elementler değildirler. Bunlar sonradan çeşitli yollarla hücreye girerler ve varlıklarını, bu hücrelere yeni özellikler kazandırdıklarında belli ederler.

Plazmidler genellikle, bakteri kromozomunun % 1-2'si kadar ve 12-200 arası gen taşıyabilen bir uzunluğa sahiptirler. Plazmidler küçük moleküllerdir. Genomik DNA ile karşılaştırıldıklarında, DNA'nın %4-20'si arasında olduğu görülür. Plazmidlerin hemen hepsi kendi bağımsız durumlarını devam ettirebilmek için gerekli temel genetik bilgilere sahiptirler. Hücre bölünmesi sırasında, bakteri DNA'sı kopyasını çıkarırken plazmitinde aynı anda bir kopyası çıkarılır ve kardeş hücreye geçer. Böylece girdikleri hücrede hücre sayısının artması kadar içerisindeki plazmid de çoğaltılmış olur. Plazmidler bakteri hücrelerinden kopyalanabilir ve çoğaltılabilirler (Arda, 1985). Plazmid DNA (Şekil 2.2) hücre içerisinde çok çeşitli formlarda bulunabilir. Bunlar arasında süper-sarmal form ve halkasal form sayılabilir.



Şekil 2.2. Plazmid DNA yapısı ve hücre içindeki konumu

Plazmidlerin en önemli özellikleri, antibiyotik gibi çeşitli antibakteriyal ilaçlara karşı direnç gösteren genler taşımalarıdır. Böylece içinde buldukları bakteri hücrelerini bu ilaçlardan koruyabilirler. Plazmidler üzerlerinde antibiyotiklere direnç gibi çok sayıda gen bulunan küçük çembersel DNA molekülleri olup, bakterinin içinde hiçbir sınıra bağımlı olmaksızın kendilerinin eşleyebilir, kendi kopyalarını sınırsız olarak çıkarabilirler (Güven, 2005).

Günümüzde plazmidlerin bu özelliklerinden faydalanarak genetik mühendisliğinde yoğun olarak plazmidler kullanılmaktadır. Gen bozukluklarında sağlam gen izole edilerek plazmid DNA'sına takılmakta, plazmid uygun bakterilere aktarılıp çoğaltılmaktadır. Aktarılan geni almış bakteriler dirençli oldukları antibiyotik ortamında çoğaltılıp, plazmid DNA'lar uygun kit ve metodlarla saflaştırılabilirler. Saflaştırılmış plazmid'in saflıkları kontrol edildikten sonra *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda hücrelere gen aktarımında kullanılmaktadır.

pDNA' lar negatif yüklüdür, dolayısıyla negatif yüklü hedef hücrelere ve hücre çekirdeğine girme olasılıkları çok düşüktür. Buna ilave olarak, özellikle *in vivo* uygulamada pDNA' ların kararlılıkları oldukça düşüktür, başka bir ifadeyle "Nuclease" enzimleri iyi korunmayan DNA'yı kolaylıkla degrades eder ve kan dolaşımına verildiğinde karaciğer tarafından hızla yakalanıp elimine edilir. Dolayısıyla pDNA' lar hedef hücrelere aktarılması için "**taşıyıcılara**", gen terapisinde kullanılan terimle "vektörlere" gereksinim vardır. Bu gelişmeler dikkate alındığında gen terapisinde kullanılan taşıyıcıları şu iki grupta toplamak mümkündür: (i) viral sistemler ve (ii) nonviral sistemler. Viral sistemlerde virüsler taşıyıcı olarak kullanılır ve bunlarla ilgili ayrıntılı bilgi biyolojik gen aktarım sisteminde anlatılmıştır.

Gen transferinde başarı aynı zamanda uygulanan gen aktarım sistemine de bağlıdır. Hedef hücrelere gen aktarımı için çeşitli biyolojik, fiziksel ve kimyasal yöntemler/taşıyıcılar (vektörler) kullanılır.

"Biyolojik" yaklaşımda viral vektörlerin kullanımı söz konusudur. Viral vektörlerin transfeksiyon verimleri çok yüksektir, ancak tümör oluşumuna kadar giden önemli yan etkileri vardır. Viral vektörler hali hazırda insan deneklerde test edilmektedir. bu yöntemde terapötik geni taşıyan virüs hastayı enfekte eder ve geni hedef

hücreye aktarır. Retroviral vektörlerle kullanılan ilk terapi pek de faydalı olmamıştır; bunun nedeni ise retrovirüslerin yalnızca bölünebilen hücreleri enfekte etmesine karşın vücuttaki hücrelerin çoğunun bölünemeyen hücreler olması olarak kaydedilmiştir. Bu noktada adeno virüsler daha etkili görünmektedir, fakat bu virüs tipi de bağışıklık sistemi tarafından saldırıya uğrayıp kısa süre içinde etkinliğini yitirmektedir (Smith, 1995). Başka bir virüs tipide lentivirüslerdir, fakat bu virüsler HIV ve Ebola gibi virüsleri içerdiğinden bunların en azında insanlarda kullanımı, yan etkilerinin kolayca üstesinden gelinememesi nedeniyle problem teşkil etmektedir. Belki de bu alanda en çok gelecek vadeden seçenek hedefi adeno-tipi virüslere uzun vadeli maruz bırakmaktır, bunun insanlara da bilinen herhangi bir yan etkisi yoktur (Recchia, 2004).

“Fiziksel” yöntemler *in vitro* olarak kolaylıkla uygulanabilirler, ancak *in vivo* uygulamalarında sınırlamalar vardır. Fiziksel DNA aktarımı teknikleri aşağıda kısaca verilmiştir.

Ultrason:

Yakın zamanda yapılan bir incelemeye (Newman, 2007) göre şu anda uygulanmakta olan herhangi bir klinik deney söz konusu değildir. Aşağıda ‘Sonoporasyon’ başlığına bakınız.

Sonoporasyon:

Bu yöntem hücre zarını geçirgenleştirmek için ultrason kullanılarak hücrenin DNA gibi büyük molekülleri içine almasını sağlar. Kontrast ajanları olarak kullanılanlara benzer mikro kabarcıklar düşük frekans alanına maruz bırakıldıklarında transfeksiyon etkinliğini önemli ölçüde artırır. Dolayısıyla sonoporasyon hem hücre laboratuvarlarında, hem de canlı organizmalarda hedefli gen transferinde kullanılır (Li, 2008). Hücreleri uzun bir süre düşük frekanslı ultrasona maruz bırakmanın hücre ölümüyle sonuçlandığını kanıtlamıştır, dolayısıyla hücre canlılığının devamı için bu protokolün bireysel uygulanmaya dikkatle uyarlanması gerekmektedir.

Gen tabancası:

Fuller ve arkadaşları Hepatit B, sıtma, grip gibi bulaşıcı hastalıklar karşısında gen tabancasının klinik kullanımları üzerine bir inceleme yapıp çeşitli klinik deneyleri

listelemektedirler (Fuller, 2006). Aşağıdaki 'Partikül Bombardımanı' başlığına bakınız.

Partikül bombardımanı:

Bu yöntemde DNA genellikle altından yapılmış küçük partiküller üzerine oturtulur. Protein ve peptitler gibi başka moleküllerde eklenebilir. Sonrasında DNA yüklü partiküller bir gaz akışı kullanılarak alıcının derisinin içine fırlatılır. Bu bombardıman nedeniyle cildin bazı bölümleri partiküllerin hızına bağlı olarak hasar görse de, bu yöntemin epidermise gen aktarımı konusunda oldukça başarılı olduğu kanıtlanmıştır. Bu yöntem yalnızca herhangi başka bir ameliyattan kaçınılması gereken durumlarda yüzeye yakın bölgelere gen aktarımına uygundur (Steele, 2001).

İğne ve şırınga enjeksiyonu:

İğneyle enjeksiyon plazmid DNA'nın kas dokusuna, deriye ya da dolaşım sistemine (kana) uygulanmasında kullanılır. Burada DNA, hücrenin lipid zarını bir şekilde endositotik bir halde aşmak zorundadır, bu da verilen DNA'nın yalnızca küçük bir kısmının hedef hücreye ulaşabilmesi anlamına gelmektedir. Bu durum bu metodu çoğu doku türü için etkisiz kılmaktadır. Yine de iğne ve şırınga enjeksiyonu metodu viral enfeksiyonlara karşı uygulanan tedavi edici ve önleyici aşı deneylerinde örneğin tümör terapisinde başarıyla uygulanmaktadır (Giese, 1998).

Jet enjeksiyon:

İğnesiz jet enjeksiyon metodu, yüksek hızlı sıvı jetleri kullanılarak DNA solüsyonunun hedef dokuya aktarımını sağlar. Örneğin subkütan tümörlerin tedavisinde bu metod uygulanır. Bu metodla yapılan gen aktarımının etkinliği klasik iğne enjeksiyonu ile yapılan aktarımdan ölçülebilir derecede fazladır. Yüksek basınçlı enjeksiyon esnasındaki yüksek kesme kuvvetine bağlı olarak uygulanan DNA'da tekli veya çifte iplik kopmaları ortaya çıkabilir. Bu bulgu, metodun farmasötik uygulamalarda gen aktarım metodu olarak kullanılmasından önce plazmide bağlı olarak bireysel bir doğrulama ve optimizasyonunun yapılmasını gerekli kılmaktadır (Walther, 2002).

Hidrodinamik gen aktarımı:

Bu yöntemde büyük miktarlarda (vücut ağırlığının yaklaşık %10' nu kadar) çıplak DNA, hızla intravenöz yoldan hedefe aktarılır. DNA' nın aktarımından sonra en yüksek transgen ekspresyonu karaciğerde gözlemlenir (Andrianaivo, 2004). Aktarılan DNA karaciğer dokusuna büyük olasılıkla yüksek oranda uygulanan enjeksiyondan sonra artan damar basıncının ortaya çıkardığı kapı toplardamarı yoluyla geçmektedir. Karaciğer kılcal damar sisteminde oluşan sızıntılar da DNA' nın karaciğer dokusuna geçişinde önemli bir faktör olabilir. Fakat bu yöntem damarın sıkışmasıyla DNA solüsyonunun akışının engellenmesi durumunda yalnızca yeterli miktarda transfekte hücreyle sonuçlanmaktadır. Bu teknik Wolff ve arkadaşları tarafından organ kaslarını izole etmekte de kullanılmıştır (Wooddell, 2010). Bu prosedür kullanılarak plazmid DNA' nın etkili ekstravazyonu ve bunun hemen arkasından gelen kas transfeksiyonu gözlemlenir. Fakat bu prosedür ortaya çeşitli riskler çıkarabilir, ve en azından sistemik hidrodinamik gen aktarımının yakın gelecekte klinik bir uygulama olmaya uygun hale gelebilmesi için geliştirilmesi gerekmektedir (Zang, 2004; Inoue, 2004).

İnhalasyon yoluyla solunum yollarına plasmid DNA aktarımı:

Canlı bir organizmanın solunum sistemi yukarıda belirtilen gen aktarımı yöntemleriyle kolayca ulaşılabilir değildir. Bu noktada örneğin akciğer kanseri, kistik fibroz, amfizemin gibi hastalıklarda gen temelli tedavi için solunumsal tekniklerin geliştirilmesi gerekmektedir. Uygulanacak DNA'nın lipid-DNA ya da polimer-DNA kompleksleri kullanılarak söz konusu akciğer dokusuna aktarımında negatif yan etkileri nedeniyle (Yang, 1995) viral vektörlerden kaçınılmaktadır (Ziady, 2003).

Elektroporatif transfeksiyon (elektrotransfer):

Kısa elektrik alan titreşimleri uygulamak hücre zarlarında geçici olarak gözenekli alanlar oluşturur, hücre zarları böylece normalde geçirgenlik göstermedikleri maddelere karşı geçirgen hale gelirler. Bu yöntemin çeşitli uygulamaları arasında hücre içine doğrudan (elektroforetik) gen aktarımının yanı sıra protein, iyonik boyalar ve ilaçların aktarımı gösterilebilir. Elektroporasyon tekniğinin klinik uygulamaları cilt tümörlerinin elektrokemoterapisi ve gen terapileri için giderek artan bir önem kazanmaktadır. Etkin bir transmembran aktarım için elektrik

alanının gücünün belli bir eşiği aşıyor olması, fakat aynı zamanda hücreye geri dönülmez derecede ağır hasar verecek bir değerden de düşük olması gerekmektedir (Schemeer, 2004). Bu noktada zarar gören hücreler nekroz, olası ülserasyon ve yaralı bir görünüme sebebiyet verebilir. Özellikle gen terapisinde bu olumsuz etkinin önüne geçilmelidir, zira canlılık kaybı DNA aktarımının etkili olma oranını düşürmektedir (Miklavcic, 2000). Bir başka önemli parametre ise titreşim süresidir, çünkü elektrik alanı yukarıda belirtilen gerginleştirme işleminin yanı sıra DNA'yı elektroforetik şekilde hücre zarından ve sitozolden geçirmek zorundadır. Bu yöntem en çok da alan titreşimi uygulaması için elektrotların hedef dokuya ulaşabiliyor olmasıyla sınırlıdır (Schmeer, 2009; Trollet, 2005; Mir, 2005; Mir, 1999; Bureau, 2002; Trollet, 2006). Favard tarafından ortaya konan iyi bir incelemede DNA elektrotransfer mekanizmasına yani lipid zarların elektrogeçirgenleştirme işlemini sağlayan temel fiziksel işlemlere dair sorunlara değinilmiştir (Favard, 2007).

Manyetofeksiyon:

Bu yöntemde DNA manyetik nanopartiküllerle ilişkilendirilerek moleküler kompleksler oluşturulur. Sonrasında bu kompleksler uygun bir manyetik alan yardımıyla hedef hücrelere doğru hatta bazen hedef hücrelerin içine aktarılır (Scherer, 2002). Bu yöntemin canlı organizmalarda kullanımındaki kısıtlamalar harici manyetik alanın hedef dokuya ulaşabilirliği ve hidrodinamik güçlerdir. İkincisi ise örnek vermek gerekirse kan akışı manyetik partiküllerin konumlandırılmasını imkansız hale getirmektedir. DNA-partikül yapılarını geliştirme çalışmaları bu kısıtlamaların üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır (Huettinger, 2008; Jahnke, 2007).

İlk olarak Mah ve grubu 2002 yılında gen terapide viral vektörlere yardımcı terapötik genleri taşıyan manyetik nanopartiküllerin hedefe özgü iletimini sağlamak için harici bir manyetik alan uygulayarak hem in vivo hem de in vitro transfeksiyonu gerçekleştirmek için çalışmışlardır (Mah, 2002).

Daha sonra Scherer ve arkadaşları manyetik nanopartiküllerin magnet dayalı transfeksiyonu için magnetofeksiyon terimini kullanmışlardır (Scherer, 2002). 2002 yılında yaptıkları bu çalışmada nonviral vektörlerin düşük etkinlikleri, adenoviral vektörlerin reseptör dayalı konakçı tropizimleri ve retroviral vektörlerin düşük titreli

olması gibi dezavantajlarının, bu vektörlerin gen terapiye faydalarını sınırlandırmakta olduğunu belirtişlerdir.

Scherer ve arkadaşları yaptıkları başka bir çalışmada manyetik nanopartiküller üzerine polikasyonik ve polianyonik kaplama yaparak transfeksiyon etkinliğinde önemli farklılıklar gözlemediklerini rapor etmişlerdir (Scherer, 2002). Polikasyon (PEI farklı moleküler ağırlıklarda ya da dextran) ve polianyon [poli(aspartik asit), poli(maleic asit), poli(acrylic asit) ya da fosfat fonksiyonel gruplu nişasta] kaplamaları karşılaştırmışlardır. Magnetofeksiyonun in vitro koşullarda gen iletimi için, in vivo koşullarda gen terapide temel sınırlamaların üstesinden gelmesine yardımcı olabileceğini rapor etmişlerdir.

Plank ve arkadaşları magnetofeksiyonun temel adımlarını şu şekilde açıklamışlardır (Plank, 2003): Vektörler ve manyetik partiküller uygun bir bağlantı yolu ile ilişkilendirilirler. Bu amaç doğrultusunda manyetik partiküller polielektrolitlerle kaplanır. Yapılan çalışmaların çoğunda polielektrot olarak poliethyleneimine (PEI) kullanılmıştır. Eğer bu parçacıklar çıplak DNA, lipoplexes veya polyplexes (PEI-DNA) ile tuz tamponunda karıştırılırlarsa bu içeriklerle ya birbirlerine bağlanırlar ya da birlikte agregat oluştururlar. Hücreler vektör-manyetik partikül kokteyli ile manyetik alan etkisinde inkübe edilirse partiküller hücrelere doğru atağa geçmiş olur. Manyetik alan uygulamak için Nd-Fe-B temelli magnetlerden manyetik plâtelere üretilmiştir (Scherer at. al 2002). Magnetofeksiyonun sonucunda tüm hücreler vektörler ile ilişki kurmuşlar ve yüksek oranda transfeksiyon gerçekleşmiştir.

2005 yılında Schillinger ve arkadaşları manyetik nanopartiküllerin manyetik alan uygulayarak spesifik doku, organ, hücre içine gönderilebilmesinin mümkün olduğunu ve bunun magnetofeksiyonun temel ilkesi olduğunu ve enjekte edilen DNA dozunun azalmasına ve hedef hücreye ulaşma süresinin azalmasına izin veren, gen ekspresyon etkinliğini önemli ölçüde artıran bir sistem olduğunu rapor etmişlerdir (Schillinger, 2005).

Chorny ve arkadaşları 2007 yılında partiküllerin hem büyüklüğü hem de manyetik özelliklerinin kontrol edilebilir olması manyetik olarak gen iletimine kolaylık sağlayabileceği hipotezini ortaya koymuşlardır (Chorny, 2007). Bu hipotez

doğrultusunda yeni bir biyobozunur polimerik süperparamanyetik nanopartikül (MNP) formülasyonlarını oluşturarak araştırma yapmışlardır. Manyetik olarak gen transferini yeşil florasan protein geni içeren plasmid DNA kullanımıyla kültüre edilmiş arteriyel düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. MNP-DNA kompleksleri ile transfekte edilmiş hücreler 15 dakika manyetik alan uygulanmasından sonra hem düşük hem de yüksek serum koşullarında inkübe edilmiştir. Manyetik alan yokluğunda ihmal edilebilir bir transfeksiyon gözlenmiştir. Daha büyük boyuttaki MNP (375 nm çaplı) 180 nm ve 240 nm çaplı MNP ile karşılaştırıldığında daha yüksek transfeksiyon oranları görülmüştür. Büyük çaplı MNP lizozomal lokasyondan kaçtığını ve perinükleer zonda DNA salındığını rapor etmişlerdir.

2010 yılında Namgung ve arkadaşları polietilen glikol fonksiyonel grubuna sahip ve dallanmış polyethylenimine kovalent olarak bağlı süperparamanyetik nanomateryal geliştirilmesini sağlamışlardır (Namgung, 2010). Geliştirilen bu nanomateryalle serum içeren ortam koşullarında dahi yüksek verimli transfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada serum istikrarı sağlanarak yüksek hücre canlılığı saptanmış ve böylece potansiyel bir nanopartikül aracılı gen iletim sistemi ortaya koyulmuştur. Bu süperparamanyetik nanopartiküller primer vasküler endotel hücreleri hızlı ve etkili bir şekilde transfekte etmiş, çeşitli damar bozuklukları; damar içi iltihabı ve ateroskleröz gibi rahatsızlıklara neden olan PAI-1 geninin ekspresyonu başarıyla inhibe edilerek son derece hassas bir HUVEC transfeksiyonu sağlanmıştır. Konfokal mikroskobu yardımıyla adım adım hücresel alım gelişmiş magnetofeksiyon için gösterilmiştir.

Literatürde çoğunlukla manyetik nanopartiküller biyoyumlu polimerlerle kaplanarak nonviral vektör olarak gen terapide transfeksiyon amaçlı kullanılmasına ek olarak manyetik nanopartiküller altın (Lin, 2001; Cho, 2004) ya da metal (Carpenter, 2003) kabuklarla kombine edilerek de üretilmiştir. Altın basit sentez prosedürünün olması, kimyasal fonksiyonelliği nedeniyle favori bir kaplama materyalidir ve altınla kaplama manyetik nanopartiküllerin oksitlenmesinin önler ve kaplamadan sonrada manyetik çekirdeğin manyetik özelliklerinin devam etmesine bir engel oluşturmaz (Brust, 1995).

2010 yılında Arsianti ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartikülleri kullanarak bu partiküllerin fiziksel özelliklerini, hücreye alımını, gen ekspresyon etkinliğini, manyetik demir oksit vektörün biyouyumluluğunu, in vitro olarak BHK21 hücrelerinde araştırmışlardır (Arsianti, 2010). Hem altın kaplı manyetik nanopartiküllerle hem çıplak manyetitlerle PEI-DNA kompleksi etkileştirilmiş BHK21 hücrelerine manyetofeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Yüksek manyetit yüklemesinde hücre canlılığında önemli bir azalma gerçekleşmiştir, çünkü çıplak manyetit hücrede yüksek düzeyde toksisiteye neden olmuştur. Altın modifiye vektörün gen ekspresyon etkinliği diğer yandan artan manyetik yükleme ile olumsuz etki yaratmamıştır. 48 saat magnetofeksiyon sonrasında TEM kullanılarak hem çıplak manyetit hem de altın kaplı manyetit vektörlerinin intraselüler deneylerde hücre çekirdeğindeki lokalizasyonu görülmüştür, her iki vektöründe hücreye alım mekanizması açıklanamamıştır. Bu çalışma ihmal edilebilir hücre canlılığı etkisi ile hem manyetik gen iletim aracı hem de hücre içi gözlem ajanı olarak hücresel tedavi araştırmalarında kullanılmak üzere altınla modifiye vektörlerin etkinliğini göstermiştir.

Gen aktarımında kullanılan kimyasal yaklaşımda çeşitli lipidler (lipozomlar), peptidler, polimer esaslı viral-olmayan (nonviral) vektörler kullanılır (Niidome ve Huang, 2002; Pişkin, 2005; Liua ve ark., 2010). En önemli özellikleri katyonik (pozitif yüklü) olmalarıdır. Böylece negatif yüklü plazmid ile net yükü pozitif olacak şekilde konjugatlar oluştururlar, böylece bunların negatif yüklü hedef hücre membranından içeri girmeleri, endozom pH'ını tamponlayarak enzimatik DNA degradasyonunu önlemeleri ve hücre çekirdeğine pDNA'yı aktarmaları mümkün olur/beklenir. Nonviral vektörler ile transfeksiyon ilk kez 1992 de Nabel ve arkadaşları tarafından klinik olarak uygulanmıştır, ancak günümüze kadar olan uygulamaların ancak %20 si nonviral vektörler ile yapılmıştır [Nabel ve ark., 1993]. Bunun nedeni nonviral vektörler için sözü edilen ardışık transfeksiyon basamakları oldukça karmaşıktır, birçok sorun vardır, dolayısıyla virüsler ile karşılaştırılırsa nonviral vektörlerin transfeksiyon verimleri son derece düşüktür (çoğunda %10-20 civarında). Buna karşın, viral vektörlerdeki yan etkilerin çok olumsuz olması, biyogüvenlilik yönünden yeni, daha etkin nonviral vektörlerin geliştirilmesi doğrultusunda hala yoğun araştırmalar devam etmektedir [Dyer ve Herrling, 2000].

Nonviral taşıyıcı vektörleri 5 grupta toplamak mümkündür: (i) lipozomlar, (ii) katyonik lipidler, ve (iii) polikasyonlar (iv) nano partikül ve mikro küreler (v) uyarı-cevap polimerleri. Bunlardan ilk ikisi yaygın olarak uygulanmıştır ve bunlarla ilgili ayrıntılı bilgi ilgili literatürde bulunabilir (Lee ve Huang, 1997; Dash ve ark., 1997).

Tez kapsamında nonviral taşıyıcı olarak altın kaplı manyetik nanopartiküller düşünülüp, transfeksiyonda kullanımı tasarlanmaktadır. Özellikle çekirdek-kabuk (core-shell) yapıdaki nanopartiküller, kabuğun korozyonu ve oksidasyonu önlemesiyle yapısal kararlılığa sahiptir ve bu nedenle altın kaplı manyetit nanopartiküller sentezlenmiştir. Ek olarak kabuk tabakası modifiye edilebilir özelliktedir. Modifiye sonucu nanopartiküller yeni özelliklere ve fonksiyonlara sahip olurlar. Tez kapsamında non-viral vektör olarak yüzeyi 2-aminotiyol ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan altın kaplı manyetit ve pozitif yüklü partiküller manyetik alan ile birlikte transfeksiyon amaçlı kullanılmıştır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan tez çalışmasının ilk bölümünde manyetik özellik taşıyan ve nano boyutta olan inorganik çekirdek materyalinin sentezlenmesi gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla ikili çöktürme yöntemiyle süperparamanyetik özellik taşıyan manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküller sentezlenmiştir. Yaklaşık 90 nm boyutundaki nanopartiküller altın ile kaplama aşamasında kullanılmıştır.

Manyetik nanopartiküller bulunduğu çözeltide demir oksit yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidroksil amin, trisodyum sitrat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar ile indirgenmesi yöntemiyle altınla kaplanmıştır. Bu sentez çalışması için Dr. Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora tezinde çalıştığı ve optimize ettiği prosedür koşulları temel alınmıştır (Sayar 2010). Elde edilen manyetik yüklü polimerik nanopartiküllerin hücre üzerindeki sitotoksik etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Nanopartiküller FTIR, XRD ve Zeta Sizer, AFM ve VSM, ESR analizleri ile karakterize edilmiştir.

Sentezlenen bu partiküller ile ticari ürünle saflaştırılmış plazmid DNA arasında kompleks oluşturularak, gen transfeksiyonunda kullanılmış ve non-viral vektör olarak etkinliği incelenmiştir. Bu çalışmalar ile ilgili deneysel yöntemler aşağıda ayrıntılı olarak ayrı bölümler halinde sunulmuştur.

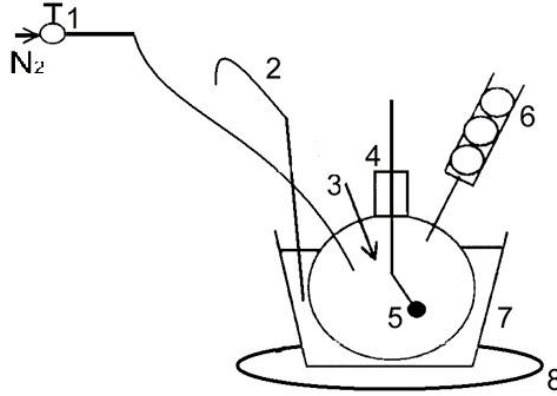
3.1. Manyetit (Fe_3O_4) Nanopartikül Sentezi

Tez çalışması boyunca manyetik nanopartiküllerin üretiminde çalışma grubumuzda bulunan Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans tezi kapsamında kullandığı yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırma ile gerçekleştirilen ikili çöktürme yöntemi kullanılmıştır (Sayar, 2004). Bu yöntemle farklı boylarda partiküller üretmek için belirtilen tezde optimize edilmiş değerlere en yakın ve uygun değerler kullanılarak birçok kez sentez yapılmıştır.

3.1.1. Kullanılan maddeler

Manyetit nanopartiküllerin üretiminde kullanılan reaktif demir tuzları $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ ve çöktürme ajanı olarak kullanılan NaOH Sigma (ABD) 'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Partiküllerin aglomerasyonunu önlemek ve kararlılığını sağlamak için sentez sonrası yine Sigma (ABD) 'dan temin edilen katı toz halinde TMAOH kullanılmıştır. Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır.

3.1.2. Yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırmalı ikili çöktürme yöntemi ile manyetit üretimi



Şekil 3.1.2 Manyetit sentezi için deney düzeneği. (1) Vana, (2) Termoçift, (3) Demir Çözeltisi ve NaOH Çözeltisi için besleme ağzı, (4) Reaktör, (5) Mekanik Karıştırıcı (6) Geri Soğutucu, (7) Su banyosu ve (8) Elektrikli Isıtıcı.

Manyetik nanopartiküller Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans tezinde optimize ettiği değerlere en yakın ve uygun değerler (karıştırma hızı hariç) seçilerek Fe(II) ve Fe(III) iyonlarının NaOH gibi alkali ortamda çöktürülmesiyle üretilmiştir.

Şekil 3.1.2 'de şematik olarak verilen deney düzeneğinde nanopartiküllerin üretimi için izlenen yöntem şöyledir: Dört boyunlu bir reaktörde geri soğutucu altında, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, N₂ atmosferinde, 80°C'deki 160 ml deionize su içine yüksek karıştırma hızında 120 ml 1.25 M Fe²⁺ ve Fe³⁺ tuz çözeltisi ile 120 ml 5M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelek oluşumu gözlenmiştir. Bu çözelti 80°C'de 2 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır. Manyetik ayırıcı (MCB 1200 Biomagnetic Processing Platform, Sigris, İngiltere) yardımıyla manyetik olan partiküller ile olmayan partiküller birbirinden ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. 0.1 M'lık tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH, Sigma, ABD) çözeltisi ile stabilize edilerek 0.01 M'lık HNO₃ ile bir kere yıkanmıştır. 0.01 M'lık HNO₃ çözeltisinde dağıtılan nanopartiküller 80-90°C'de çözelti rengi kahverengi olana kadar karıştırılmıştır. Bu şekilde okside olan Fe₃O₄ nanopartikülleri 0.1 M'lık TMAOH çözeltisi içinde süspansiyon edilip pH 11 olana kadar su ile yıkanmıştır.

Tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe_3O_4 nanopartikülleri hazırlanmıştır.

3.2. Altın kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Üretimi

Üretilen manyetit nanopartiküller bulunduğu çözeltide demir oksit yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidroksil amin, trisodyum sitrat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar ile indirgenmesi yöntemiyle altınla kaplanmıştır. Bu sentez çalışması için Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Biyomühendislik Anabilim Dalı Doktora tezinde çalıştığı reaksiyon koşulları ve optimize ettiği prosedür değerleri temel alınmıştır (Sayar, 2010).

3.2.1. Kullanılan maddeler

Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin üretiminde indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat Analar (İngiltere) 'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Altın tuzu gold(III) chloride trihydrate ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) Sigma-Aldrich (ABD)'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Altın kaplı olan ve olmayan partikülleri ayırma amacıyla kullanılan Okzalot çözeltisi için gerekli olan okzalot asit Merk (Almanya) 'dan ve di-amonyum okzalot Merk (Almanya) 'dan hidroklorik asit (HCl) Merk (Almanya) 'dan satın alma yoluyla temin edilmiştir. Bütün deneylerde ultra saf su kullanılmıştır.

3.2.2. Sitrat İndirgeme Ajaniyla Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Tez kapsamında sentezlenen bu manyetik nanopartiküllerin altınla kaplanmasında indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılmıştır. Çekirdek/kabuk (Fe_3O_4/Au) yapısındaki nanopartiküllerin sentezi, ilk olarak manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin üretimi daha sonra bunların altın ile kaplanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. 1.2 ml tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe_3O_4 nanopartikülleri 100 ml deionize su içinde süspansiyon edilip, 0.7 ml 0.155 mM'lık trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek sitrat iyonlarının OH^- iyonları ile değişmesi için 15 dakika sonike edilmiştir. Daha sonra çözelti yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti ilk kaynama noktasına ulaştığında etrafını altınla kaplamak için Au^{3+} iyonlarının Fe_3O_4 nanopartiküllerinin etrafında indirgenmesi için 5 ml 12 mM'lık tetrakloraurat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) çözeltisi eklenerek 15 dakika kaynama noktasında ($96^\circ C$) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda çözelti oda sıcaklığına gelinceye kadar yüksek

hızda karıştırmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık sarı olan çözelti rengi kahverengi ve koyu renge dönerek en son parlak kırmızı kahve olmuştur. Elde edilen nanopartiküller 15000 rpm'de santrifüjlenerek mıknatıs yardımıyla manyetik olan nanopartiküller ile manyetik olmayanlar birbirinden ayrılmıştır. Bu şekilde manyetik özellik göstermeyen çekirdeğinde manyetit nanopartikülü içermeyen sadece küresel altın nanopartiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri altın kaplı olanlardan ayırmak için her ikisi de manyetik özellik göstermesi nedeniyle manyetik ayırma yapılamamıştır. Literatürde altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri ayırmak için 1 M HCl çözeltisi ile yıkanıp birkaç kez de su ile yıkama işlemi ile gerçekleştirilmiştir (Cui, 2005). Ancak Liu ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartiküllerin 2 M ve üzeri HCl çözeltisi içinde stabilitesini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucu hem manyetit nanopartiküllerin hem de altın kaplı manyetik nanopartiküllerin derişik asit çözeltisi içinde hemen çözüldüğünü belirtmişlerdir (Liu, 2008). Bu nedenle altın kaplı olmayan manyetit nanopartikülleri kaplı olanlardan ayırmak için karışım 0.02 M'lık okzalat çözeltisinde 1 saat mekanik karıştırılmıştır. Okzalat çözeltisi içersinde sadece manyetit nanopartiküllerin çözüldüğü literatürde belirtilmiştir (Goon, 2008). Tekrar su ile santrifüjleme işlemi yapılarak süpernatant kısmında çözülmüş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımda altın kaplı manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalında yaptığı doktora tezinde kullandığı yukarıda anlatılan reçetedeki trisodyum sitrat, tetrakloraurat miktarı, kullanılan nanopartikül miktarı ve bunlara ek olarak farklı boydaki partiküller kullanılarak bunların altın kabuk oluşumuna etkileri ayrıca incelenmiştir. Trisodyum sitrat miktarı 0.155, 0.310, 0.078 mM olarak; tetrakloraurat miktarı 12, 24 mM olarak; altınla kaplanacak manyetit partikül miktarı 0.5, 1, 0.25 ml (100 µg/ml) olarak; 55, 155, 90 nm boyutlarındaki manyetit nanopartiküller kullanılmış ve altın kabuk oluşumuna etkisi araştırılmıştır.

3.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe₃O₄/Au) Nanopartiküllerin Katyonik Hale Getirilmesi

Tez kapsamında sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküller transfeksiyon amaçlı kullanılacağından negatif yüklü plazmid DNA ile etkileşebilmesi için katyonik özellik göstermesi gerekmektedir. Bu amaçla partiküllerin altın yüzeyine pozitif özellik kazandırmak amacıyla, 'kendiliğinden yerleşen tek tabakalar' ('self-assemblying monolayers' – 'SAMs') oluşturacak kabiliyete sahip moleküller bağlanmıştır. Bunun için bir uçlarında altın ile etkileşecek tiyol (SH) diğer uçlarında amino grubu (NH₂) bulunan molekül olarak 2-aminoethantiyol seçilmiştir. Bu moleküllerin "-SH" gruplarıyla altın yüzeylere tek tabaka oluşturacak şekilde yerleşmeleri diğer uçlarındaki "-NH₂" grupları nedeniyle pozitif yük sağlamaları öngörülmüştür.

Niidome ve arkadaşları amin-modifiye edilmiş 100 nm boyutundaki altın nanopartikülleri plazmid DNA ile etkileştirip kültüre edilmiş Hela hücrelerinde transfeksiyon etkinliğini incelemiştir. H₂AuCl₄ 'ün sodyum bor hidrür (NaBH₄) ile indirgenmesi ve 2-aminoethantiyol ilavesi sonucu ile katyonik altın nanopartiküller hazırlamışlar. Sentez reçetelerinde Au/NaBH₄/2-aminoethantiyol oranı 56:0.1:85 (mol/mol/mol) olarak rapor edilmiştir. Partiküllerin yükünün zeta potansiyeli +36.2 mV olarak belirlemiştir. Partiküllerin plazmid ile kompleks oluşturduğunda negatif bir potansiyel yük oluşturduğunu (-33.2 mV) rapor etmişlerdir (Niidome 2004). Sonrasında Zhang ve arkadaşları aynı reçeteyi uygulayarak katyonik altın nanopartikülleri üretmişlerdir. Sentezlenen partiküllerin boyutu 10-48 nm arası değişmekte olup zeta potansiyel ile yükü +31.8 mV değerinde olduğu rapor edilmiştir. (Zhang, 2007). Bu iki araştırma grubu referans alınarak sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartikülleri 10 mM ve 1M arası değişen 2-aminoethantiyol' ün farklı konsantrasyonlarında muamele edip yük değişimleri sonuçlar bölümünde rapor edilmiştir. Transfeksiyon amaçlı kullanılacak potansiyel yük değeri literatüre en uygun olan katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküller şu şekilde sentezlenmiştir:

Sentezlenen 100 ml altın kaplı manyetik nanopartikül çözeltisi çöken partikülleri tek bir tüpte toplayıp yoğunlaştırmak amacıyla 13000 rpm de sürekli santrifüjlenmiş ve üst faz sürekli atılıp dipteki partiküller alınarak 100 µg/ml

konsantrasyonuna sahip 1ml stok çözelti haline getirilmiştir. 2-aminoethantiyol çözeltisinin konsantrasyonu 20 mM ile 1M arası denenmiş olup en iyi pozitif yük veren konsantrasyon hücre kültürü çalışmalarında kullanılmıştır. En iyi sonuç 400 µl 213 mM 2-aminoethantiyol çözeltisi kullanımında bulunmuştur (Bölüm 4.3). Yukarıda verilen partikül konsantrasyonuna sahip çözeltiye 400 µl 213 mM 2-aminoethantiyol çözeltisini ekleyip oda sıcaklığında 2 saat karanlıkta karıştırılmıştır. 2 saatin sonunda mıknatısla partiküller tüpün yanında tutulmuş ve bağlanmayan 2-aminoethantiyol moleküllerini uzaklaştırmak amacıyla partikül harici sıvı alınmış ve bu işlem birkaç kez tekrarlanmıştır. Hazırlanan altın kaplı manyetik yüklü, yüzeylerinde 2-aminoethantiyol ile SAMs oluşturulmuş nanopartiküllerin Zeta Potansiyel ile yükleri tayin edilmiştir ve sonuçlar bölümünde belirtilmiştir. Aynı partiküllerin boyut ve UV/vis absorpsiyon spektrumu ölçümleri de sonuçlar bölümünde verilmiştir.

3.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Hazırlanan manyetit ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, santrifüjlenen partiküller ultra saf su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 2 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içersine konulmuştur.

Aynı cihaz, partiküllerin zeta potansiyellerini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmemektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte ve bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak tanımlanmaktadır. Cihaz mikroeletroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyeli ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Sayar, 2004). Altın kaplı manyetik partiküllerin ve katyonik altın kaplı manyetik partiküllerin yüklerini belirlemek amacıyla zeta potansiyelleri ölçülmüştür.

Nanopartiküllerinin kimyasal yapısı Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Shimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenmiş

olan partiküller etüvde kurutulduktan sonra potasyum bromür (KBr) ile (ağırlıkça %1 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spektrumları oda sıcaklığında çekilmiştir.

Üretilen manyetit (Fe_3O_4) partiküllerin ve altın kaplı manyetit nanopartiküllerin (Fe_3O_4/Au) karakterizasyonu ve kristal yapısının belirlenebilmesi için X-ışını kırınım difraktometresi (Rigaku D/MAX-2200 Ultima+/PC, Japonya) kullanılmıştır. Cu (bakır) kaynaklı X ışını tüpüne sahip cihaz ile “40kWx40mA” gücünde, 15-100° aralığındaki 2 θ açısında partikül spektrumları çekilmiştir.

Nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin bulunmasında bir Titreşimli Manyetometre (Vibrating Sample Magnetometer, Fieldial Mark II Varian, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Etüvde kurutulmuş olan örneklerin 0 – 20000 ve -20000 – 0 oersted (Oe) manyetik alandaki mıknatıslık değerleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Bu ölçüm tekniğinde kurutulmuş olan örneğe sabit frekansta manyetik alan uygulanmaktadır. Eğer örnek manyetik özelliğe sahipse bir mıknatıs gibi davranır ve geçici bir manyetik akış nedeniyle iletken çubuğun içinde potansiyel farkı oluşur. Titreşimli manyetometre bu potansiyel farkı ölçerek örneğin manyetik özelliğini belirlemektedir.

Nanopartiküllerin manyetik özellikleri bir de Elektron Spin Rezonans spektrometresi (ESR, Varian E-L X Band spectrometer, Almanya) kullanılarak belirlenmiştir. Vakum etüvü içerisinde kurutulmuş olan örneklerin 1000-5000 G'luk bir manyetik alanda oda sıcaklığında ESR spektrumları çekilmiştir. Örnek kavitesi homojen, değeri doğrusal olarak değiştirilebilen bir dış manyetik alan oluşturan elektromıknatısın kutupları arasına konulmuştur. ESR spektrumları mikrodalga frekansı 9.3 GHz 'de sabit tutulup manyetik alan değiştirilerek soğurma eğrisinin birinci türevi olarak çizdirilmiştir.

Hücre kültürü aşamalarında kullanılacak olan manyetit ve altın kaplı manyetit nanopartiküllerin fiziksel yapısını, büyüklüklerini görüntülemek ve manyetik özellik gösterip göstermediğini anlamak amacıyla atomik kuvvet mikroskobu (NanoMagnetic Instruments Ltd, Türkiye) kullanılmıştır. Örnek, stok çözeltiden (yaklaşık 100 $\mu g/ml$) 50 μl (manyetit için) ve 10 μl (altın kaplı manyetit için)

alınarak ultrasonik banyoda 10 dk bekletilmiştir. Daha sonra mika üzerine damlatılarak azot atmosferinde kurutulmuştur. Mika üzerindeki örneklerin ölçümü manyetik özellik taşıyan kobalt kaplı tipler kullanılarak MFM de yapılmıştır. AFM cihazının yazılımı kullanılarak, XY eksenine göre nanopartikülerin boyutları hesaplanmıştır.

3.5. “Nanopartikül” – “Plazmid DNA” Etkileşimi

Tez çalışmasının bu kısmında, hedef plazmid DNA'nın *E. Coli* ortamında çoğaltılması ve daha sonraki transfeksiyon çalışmalarında kullanılmak üzere ticari kit ile saflaştırılması işlemlerinden; *E. Coli* hücre kültüründe partikül - plazmid etkileşimi için seçilen ve yapılan uygulamalardan ve bunların değerlendirilmesi için kullanılan yöntemlerden söz edilmiştir.

3.5.1. *E.Coli* hücresinde plazmidin çoğaltılması

Mikrobiyolojide bilinen klasik teknik kullanılarak *E.Coli* üretimi gerçekleştirilmiştir. Öncelikle, temel bileşimi ve tez çalışmasında kullanılan malzeme özellikleri Çizelge 3.5.1.'de verilen Luria Broth besi yeri, sterilizasyon için prosedüre uygun olacak şekilde otoklavlanmıştır (121°C, 20 dakika, vakum ortamında); üzerine, sıvı stoktan “50µg/ml” olacak şekilde uygun antibiyotik (kanamisin) ilavesi yapılmıştır. Kanamisin antibiyotiğine karşı direnç geni taşıyan kullanılan plazmid, kanamisin katkılı ortamda çoğaltılmıştır. -80°C de dondurulmuş yoğun bakteri stoğundan alınan numunenin antibiyotik içeren besi yerine ekimi yapılmıştır. Daha sonra kültür ortamının ağzı bir tampon ile kapatılmıştır, kuru hava ısıtmalı çalkalayıcıda (Edmund Bühler, ALMANYA) 37°C yaklaşık 150 rpm hızda en az 1 gün çoğalmaya bırakılmıştır. Büyük ölçekli kültür ortamı (100ml ve üzeri) çalışmaları için öncelikle en fazla 1/10 olmak üzere ölçek büyütme tekniği kullanılmış; bakteri hücreleri küçük ölçekte 1 gün çoğaltıldıktan sonra istenen miktarda besi yerine tamamlanıp 1 gün daha yukarıda belirtilen koşullarda çoğaltılmaya bırakılmıştır.

Çizelge 3.5.1 *E.Coli* için gerekli besi yeri bileşenleri.

Luria Broth besi yeri bileşenleri	Miktar (g/L)
Tripton (Tryptone)	10
Maya ekstraktı (Yeast extract)	5
Sodyum klorür (NaCl)	19

3.5.2. Plazmid DNA 'nın ticari ürünle saflaştırılması

Ticari ürünle (Qiagen-tip 100 Plazmid Midi Kit, ABD) saflaştırılan plazmidler sentezlenen partiküllerle etkileştirilerek transfeksiyon çalışmalarında kullanılmıştır.

3.5.2.1. Kullanılan çözeltiler

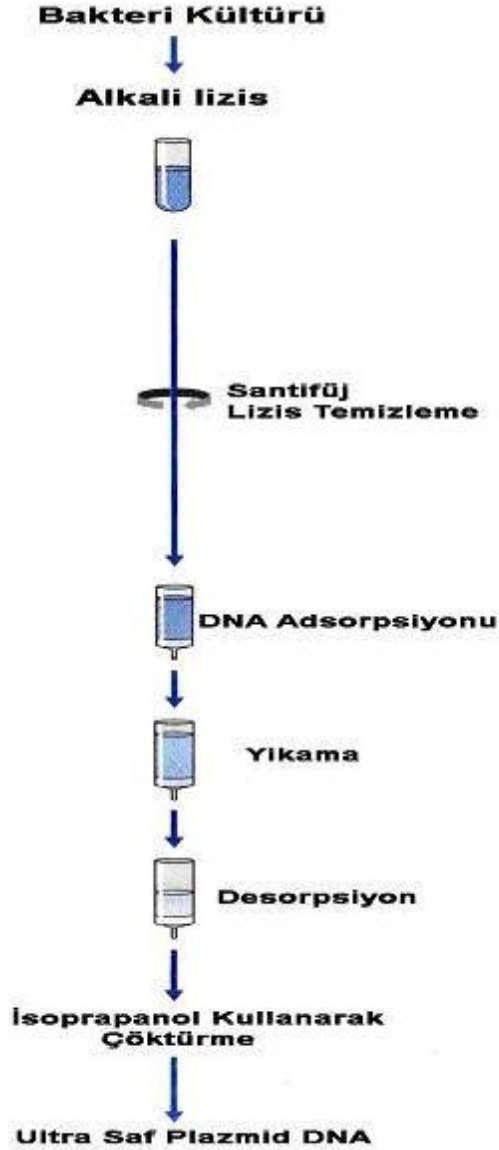
Çizelge 3.5.2.1'de ticari kit ile yapılan saflaştırma işleminde kullanılan çözeltilerin içerikleri tanımlanmıştır.

Çizelge 3.5.2.1. Qiagen® plazmid saflaştırma tampon çözeltileri.

TAMPON	BİLEŞİMİ	MUHAFAZA KOŞULLARI
Tampon P1 (Süspansiyon Tamponu)	50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml Rnase A	2 – 8 °C
Tampon P2 (Lizis Tamponu)	200 mM NaOH, %1 SDS ¹ (w/v)	Oda sıcaklığı
Tampon P3 (Nötralizasyon Tamponu)	3.0 M potasyum asetat, pH 5.5	Oda sıcaklığı veya 2-8 °C
Tampon QBT (Adsorpsiyon Tamponu)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS ² , pH 7.0; % 15 isopropanol (v/v); %0.15 Triton® X-100 (v/v)	Oda sıcaklığı
Tampon QC (Yıkama Tamponu)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 8.5; %15 isopropanol (v/v)	Oda sıcaklığı
Tampon QF (Desorpsiyon Tamponu)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris-HCl, pH 8.5; %15 isopropanol (v/v)	Oda sıcaklığı

3.5.2.2. Saflaştırma protokolü

Kültür ortamında çoğalmış olan *E.Coli* hücreleri aşağıda belirtilen genel prosedüre (Şekil 3.5.2.2.) uygun olacak şekilde Qiagen-tip 100 midi plazmid kit protokolü esas alınarak saflaştırılmıştır. Bu işlem için midi ölçek 100 ml besi yeri kullanılmıştır.



Şekil 3.5.2.2. *E.Coli* saflaştırma prosedürü.

100ml kültür ortamı için genel olarak basamaklar şöyledir:

1. Kültür ortamı altı konik santrifüj tüplerinde 4°C'de 6000rpm de 10-15dk santrifüjlenmiştir.
2. Süpernatanı atılan bakteri peletleri toplam 4ml P1 tampon çözeltisinde pipetlenerek çözülmüştür
3. Üzerine 4ml P2 tampon çözelti eklendikten sonra hafifçe 4-5 kez alt üst edilen karışım en fazla 5 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılmıştır.
4. 5 dakika sonunda 4ml P3 çözeltisi eklenerek 15 dakika buzda bekletildikten sonra 4°C'de 18000 rpm hızla 30 dakika iki kez santrifüjlenmiştir.
5. Çöken kısım genomik DNA ve hücre artıklarını ve ara işlemler sırasında çöken tuzları içermektedir.
6. Hazır kolondan 4 ml QBT tampon çözelti akıtılmıştır.
7. Ardından en son elde edilen örneğin üst fazı yavaş yavaş eklenerek yer çekimi etkisiyle kolondan boşalması beklenmiştir.
8. Daha sonra kolon 10 ml QC tampon ile 1 kez yıkanmıştır. (Çok miktarda karbonhidrat sentezi yapan bakteriler için bu aşama iki kez uygulanır.)
9. Sonraki aşamada temiz tüpe yerleştirilen kolondan 5 ml QF geçirilerek plazmid izole edilmiştir.
10. Sıvı içinde bulunan plazmid 3.5 ml filtre edilmiş isopropanol ile çöktürülmüştür.
11. 6000 rpm de 60 dakika süre ile 4°C'de santrifüjlenmiştir.
12. Üst faz dikkatlice alınarak dipte kalan (gözle çok zor seçilmektedir ve tüp çeperlerine yapışabilir) kısım 2 ml %70'lik etanol ile yıkandıktan sonra 6000 rpm de 60 dakika süre ile 4°C'de santrifüjlenmiştir.
13. Üstte kalan etanol dikkatlice boşaltılarak kalanın buharlaşması için bir süre beklenmiştir (yaklaşık 10-15 dakika). Tüpte eser miktarda görülen plazmid peleti 1ml 10mM Tris-HCl çözeltisi ile çözümlenerek steril kaba alınmıştır. (Elde edilen stok - 80°C'de saklanmıştır.)

3.5.3. “*plazmid*”–“*partikül*” etkileşimini saptamada uygulanan analiz yöntemleri

Bölüm 3.5.2.2’de verilen aşamalarda madde kayıp, kazanımlarını, safsızlığı ve konjugat (plazmid-partikül) oluşumunu belirlemek için nanodrop cihazı ve elektroforez tekniği kullanılmıştır.

Nanodrop®, UV-görünür dalga boylarında absorbands ölçümüne dayalı çalışan, nükleik asitler ve proteinler gibi yapıların direkt konsantrasyon değerlerinin ölçülebildiği, bir spektrofotometrik cihazdır. Kendi yazılımı ile DNA’nın çift sarmal yapısına göre absorbands ölçümü yaparak 1µl’lik örnekteki DNA miktarını belirleyebilir. Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer (ABD) ile analizi yapılan her örneğin içerdiği standart maddelerden oluşan kör çözeltiler cihaza tanıtılarak süspansiyon ortamının etkisi spektrofotometrik olarak sıfırlanmıştır. Bazı durumlarda, alınan numunelerin içerisinde, elektroforez resimlerinde (Bölüm 4.4.2) ayrıntılı şekilde görüleceği üzere, plazmid ve genomik DNA kalıntıları bir arada olabileceğinden nanodrop ile ölçülen sonuçların toplam miktarı verdiği göz ardı edilmemelidir.

Agaroz jel elektroforez tekniğinde, nükleik asit çözeltileri gözenekli bir jel haline getirilen agaroz içerisine açılan dizili kuyulara yüklenir. Örnekler, zıt yüklü iki elektrot arasında elektiği ileten mobil faz yardımıyla jel boyunca yüklendikleri kuyu düzleminde ilerler. Nükleik asitler belli süre sonunda, molekül büyüklüklerine dayalı olarak yol boyunca dizilir. UV ışık altında görüntülenen jelin en sonunda gözlenen yani en hızlı ilerleyen bant en küçük moleküle aittir. Etidyum bromür DNA’ya bağlanarak, yapının UV ışık altında belirgin bir biçimde görünür (floresan ışımaya ile) hale gelmesini sağlayan bir kimyasaldır. Bu nedenle EtBr örnekle yüklenerek ya da jel karışımı içerisine eklenerek elektroforez sırasında sisteme katılır. Böylece jel boyunca belli noktalarda bulunan DNA yapıları UV ışık altında tespit edilir. Farklı büyüklük ve yapıdaki DNA moleküllerinin yol boyunca ilerledikleri noktaların hangi baz çifti büyüklüklerine denk geldiği DNA merdiveni (ya da marker) denilen ve örneklerle paralel olarak jelde yürütülen bir belirtici kimyasal ile saptanır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda, örnekler; Thermo EC Midi Cell® Primo EC 330 yatay elektroforez sistemi kullanılarak, etidyum bromür içeren 0.8’lik

agaroz jelde TAE (tri-asetat/etilendiamin tetraasetik asit) tamponu (40 mM Trizma-base, 20 mM asetik asit, 1 mM EDTA, pH 8.0) varlığında 120 mA'de yürütülmüştür. DNA merdiveni olarak Promega 1kb DNA marker kullanılmıştır. Farklı miktarlarda kullanılan nanopartiküllerin saflaştırılan plazmitleri ne derecede tuttuğu araştırılmıştır. Partikül miktarları 2, 4, 8, 16, 32, 40 µg (100 µg/ml) olarak 2 µg plazmit ile karıştırılıp oda sıcaklığında konjugat oluşumu için yarım saat bekletilmiştir. Yarım saatin sonunda oluşturulan konjugatlar jel kuyucuklarına yüklenmiş ve sonuç olarak UV ışık altında etidyum bromür ile görünür hale gelen jeller fotoğraflanmıştır.

3.5.4. Nanopartikül, Plasmid DNA, Nanopartikül / Plasmid DNA Konjugatlarının Zeta Potansiyel Yükleri ve Partikül Boyutlarının Ölçülmesi

Hazırlanan nanopartiküllerin boyutları ve yükleri ölçümlerinin nasıl yapılacağı Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak bölüm 3.4. de ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Hazırlanan konjugatların boyut ve yük ölçümleri de aynı cihaz kullanılarak yapılmıştır.

Mililitresinde 100 µg partikül içeren stok bir çözelti hazırlanmıştır. Partiküller UV ışık altında 15 dk steril edilmiştir. Bu çözülden 2, 4, 8, 16, 32 µg partikül ayrı tüplere alınmış ve 0.15 M'lık NaCl ile son hacimleri 1 ml ye tamalanmıştır. Ayrı tüplerde her birinde 2 µg olan plasmid çözeltileri alınıp son hacimleri 0.15 M'lık NaCl ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan plasmid çözeltileri partikül çözeltileri üzerine alınıp 30 dakika oda sıcaklığında konjugat oluşumunun sağlanması amacıyla bekletilmiştir. Daha sonra 25°C de Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak konjugatların potansiyel ve boyut ölçümleri yapılmıştır.

3.6. Sitotoksitite Testleri

3.6.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Partiküllerin Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması

Transfeksiyon aşamalarında kullanılan katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerindeki etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolyum) Sigma'dan (ABD) temin edilmiştir. Yapılan çalışmada MTT, sentezlenen katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküllerin farklı miktarları hücre kuyularında ekilmiş hücreler ile

etkileştirilmiş, hücrelerin canlılıkları ve partiküllerin hücreler üzerindeki toksik etkisi, canlı hücre aktivitesine bağlı renk değiştiren MTT tuzu yardımıyla kolorimetrik olarak tespit edilmiştir.

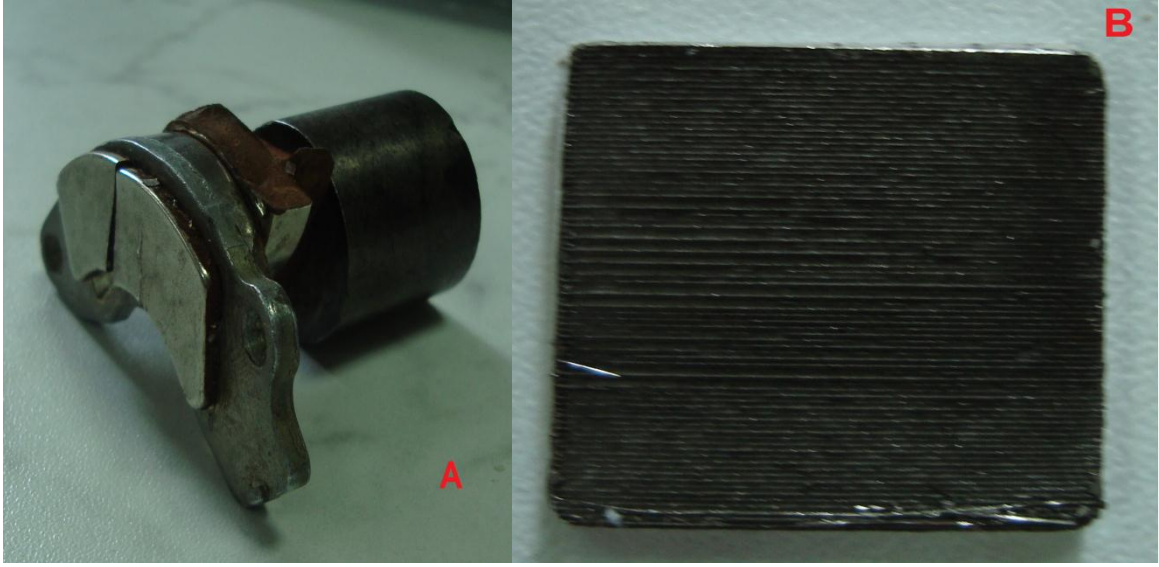
MTT testi 96 kuyucuklu plaklarda gerçekleştirilmiştir. Bu plakların satırında 12 kuyucuk, sütununda ise 8 kuyucuk yerleşmiştir. İlk sütuna yalnız hücre ekilmiş ve hiçbir aktif madde ile etkileştirilmemiştir, bu sütun negatif kontrol grubudur. Bu sütunda en yüksek absorpsiyon elde edilmiştir. Kültür kabında her bir bölmeye 1×10^4 hücre konulmuştur.

Çalışmada öncelikle 5 farklı miktarda nanopartikül kullanılmış ve hücreler üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiştir. Partiküller her bir kuyucuğa 5, 10, 20, 30, 40 µg olacak şekilde eklenmiştir. Her miktar için 3 kuyucuk kullanılmıştır. 24 saat sonunda bu kuyulara MTT eklenmiş ve ardından yüzde canlılık hesaplanırken bu 3 kuyucuktan alınan absorpsiyon değerleri değerlendirilmiştir. Altın kaplı manyetik pozitif yüklü nanopartiküllerin 24 saat sonunda oluşan sitotoksik etkileri belirlenmiştir. Manyetik nanopartiküllerin sitotoksikite çalışmalarında model hücre olarak L929 fare fibroblast hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 serum, %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 ortamında kültüre edilmişlerdir. . Burada bulunan optimum partikül miktarının (20 µg) altında partikül konsantrasyonları hücre çalışmaları için seçilmiş bu miktarlar sonuçlar bölüm 4.5.1'de verilmiştir.

3.6.2. Uygulanan Manyetik Alanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisinin Araştırılması

Transfeksiyon aşamalarında kullanılan katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hücreye gönderilmesinde kullanılan manyetik alanın partikülleri ve plazmid/partikül konjugatlarını hücreye sokarkenki hücre canlılığı üzerindeki etkisi WST testi ile belirlenmiştir. WST testi MTT ile aynı prosedürle yapılmaktadır ve WST (Water soluble Tetrazolium salts) tuzu MTT tuzunun suda çözünen formudur. Yapılan çalışmada WST (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium), sentezlenen kullanılan katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküllerin farklı miktarları hücre kuyularında ekilmiş hücreler ile etkileştirilmiş, hücrelerin canlılıkları ve partiküllerin hücreler üzerindeki toksik etkisi, canlı hücre aktivitesine bağlı renk değiştiren WST tuzu yardımıyla kolorimetrik olarak tespit edilmiştir.

Çalışmada 48 kuyucuklu plaklar kullanılmış ve bu plaklar üç bölüme ayrılmıştır. Kültür kabında her bir bölüme 1×10^4 hücre konulmuştur. Partikül miktarı 100 $\mu\text{g/ml}$ olan stok çözeltiden 2, 4, 8, 16, 20 μg alınarak her bir kuyucukta bulunan Hela hücreleri üzerine konulmuştur. Üç bölüme ayrılan plakların birinci bölümüne hiçbir manyetik alan uygulanmamıştır ve sadece yukarıdaki miktarlarda kullanılan partiküllerin sitotoksitesi araştırılmıştır. İkinci bölüme yüzeyi herhangi bir işlem görmemiş yönlendirilmemiş sıradan bir mıknatıs kullanılmış ve bu mıknatısın partikülleri hücreye sokarkenki sitotoksitesi araştırılmıştır (Şekil 3.6.2 A). Üçüncü bölüme ise yüzeyi elmas bıçaklarla işlenmiş nikel kaplı Neodim-Demir-Bor mıknatısı kullanılmıştır (Şekil 3.6.2 B).



Şekil 3.6.2 Transfeksiyon amaçlı kullanılacak yüzeyi işlenmemiş (A) yüzeyi işlenmiş (B) mıknatıslar

Burada kullanılan iki mıknatıs içinde 5, 10 ve 30 dk süre ile manyetik alan uygulanmıştır ve hem süre hem de mıknatıs türü için sitotoksite araştırılmıştır. Daha sonra 0 dk, 5 dk, 10 dk ve 30 dk manyetik alan uygulanmış hücrelere 200'er μl besi ortamı eklendikten sonra hücreler 37°C 'de %5 CO_2 etüvünde 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda bu kuyucuklara 15 μl WST-1 çözeltisi eklenmiş ve ardından yüzde canlılık hesaplanırken bu kuyucuklardan alınan absorbans değerleri değerlendirilmiştir. Manyetik alan uygulamasının sitotoksite çalışmalarında model hücre olarak Hela insan servikal karsinoma hücre hattı

kullanılmıştır. Hücreler %10 serum, %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 ortamında kültüre edilmişlerdir.

Aynı çalışma belirlenen bu partikül miktarlarının plazmid ile oluşturulan konjugatları içinde yapılmıştır. Plazmid-partikül konjugatlarının hücre canlılığı üzerindeki etkilerinin araştırılması da yukarıda anlatılan aynı yöntemle gerçekleştirilmiştir. Yukarıdan denenen partikül konsantrasyonlarından en az sitotoksititeye sahip konsantrasyonun altında yeni partikül miktarları belirlenmiş (20 µg altında) ve 2 µg plazmid DNA ile etkileştirilerek 30 dk oda sıcaklığında konjugat oluşumunu sağlamak amacıyla bekletilmiştir. Partikül konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 20 µg olacak şekilde belirlenmiştir. Konjugat oluşumu sağlandıktan sonra 48 kuyucuklu plağın her bir kuyucukta bulunan hücreleri üzerine partiküller eklenmiştir. Bu çalışmada da bu plak üç bölüme ayrılmıştır ve yukarıda anlatılan mıknatıslar kullanılmıştır. Plakta ayrılan birinci bölüme herhengi bir manyetik alan uygulanmamıştır. İkinci bölüme yüzeyi işlenmemiş mıknatıs kullanılarak 10 dk manyetik alan uygulanmıştır. Üçüncü bölüme ise yüzeyi işlenmiş mıknatıs kullanılarak 10 dk manyetik alan uygulanmıştır. Sonra hücreler 24 saat inkübe edilmiştir. Negatif kontrol olarak sadece medium, pozitif kontrol olarak H₂O₂ li medium hücrelere uygulanmıştır. 24 saat sonunda her kuyucuğa 15 µl WST-1 çözeltisi ilave edilmiştir. 37 °C'de 4 saat inkübasyondan sonra hücre yaşayabilirliğinin tespiti için 48 kuyucuklu plakların absorbans yoğunluk değerleri ELISA plate okuyucuda 420-480 nm'de okunmuştur. Yaşayan hücreler sarı renk oluştururken, ölü hücrelerde renk oluşumu gözlenmez. Kontrol grubu absorbans değerleri 100% olarak kabul edilerek farklı konsantrasyondaki partiküllerin % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

Katyonik altın kaplı manyetik nanopartikül-pDNA konjugatlarının 24 saat sonunda oluşan sitotoksiteleri belirlenmiştir. Manyetik nanopartiküllerin sistotoksite çalışmalarında model hücre olarak Hela insan servikal karsinoma hücreleri kullanılmıştır. Hücreler %10 serum, %1 antibiyotik içeren DMEM/F12 ortamında kültüre edilmişlerdir.

3.7. Transfeksiyon Çalışmaları

Bu kısımda tez kapsamında non-viral vektör olarak kullanılması düşünülen partiküllerin, gen aktarım etkinliğini incelemek için uygulanan aşamalar anlatılmıştır.

3.7.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Floresan Boya ile İşaretlenmesi ve Hela Hücrelerine Aktarılması

Hazırlanmış katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hücreye aktarımını göstermek için kültüre edilmiş Hela hücrelerine florescein (fluorescein) ile işaretlenmiş partiküller aktarılmıştır. Öncelikle Hela hücrelerinin ekimi yapılmış ve %10 FCS, %1 antibiyotik içeren besi yeri eklenmiştir. Sonra 1 ml 100 µg/ml konsantrasyonunda partikül içeren stok bir çözelti hazırlanmış ve UV ışık altında 15 dk steril edilmiştir. Bu partikül stok çözeltisine 100 µg/ml konsantrasyonunda 1ml floresan boya eklenmiştir ve 30 dk karıştırılmıştır. Ardından partiküller santrifüj ve mıknatıs ile ortamdaki ayrıldıktan sonra 0.15 M NaCl içerisinde, hücrelerle etkileştirilmiştir. Floresan boya ile işaretlenmiş partikül stoğundan 2, 4, 8, 16, 20 µg alınıp hücre kuyucuklarındaki hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. Manyetik alan uygulandığında ve uygulanmadığında partiküllerin hücreye alınımı üzerine inceleme yapılmıştır. Manyetik alan uygulama süresi 30 dk olarak denenmiştir. Hücreler ve floresan boya ile işaretlenmiş partiküller 37°C'de %5 CO₂ ortamında 30 dk inkübe edilmiştir. 30 dk inkübasyonun sonunda üzerlerine 200 µl hücre besi ortamı eklenmiş ve tekrar 4 saat inkübasyona bırakılmıştır. 4 saat sonunda kuyucuklardaki besi yeri alınıp PBS ile 3 kez hücreler yıkanmış ve floresan ataçmanlı inverted mikroskopla (Leica DMI70, Almanya) FITC filtresi ile hücrelere partiküllerin ne oranda girdiği ve manyetik alanın buna etkisi üzerine inceleme yapılmıştır. Bu çalışmada da yüzeyi işlenmiş ve işlenmemiş mıknatıslar kullanılmıştır.

FITC işaretli partiküllerde meydana gelen nekrozun belirlenmesinde ikili boyama metodu kullanılmıştır. Nekroz bir diğer hücre ölüm şekli olup hücreler dışarıdan gelen etkilerden aldıkları hasar sonucu ölüme gitmektedir. Öncelikle Hela hücreleri 48 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa 10000 hücre düşecek şekilde ekilmiştir. Farklı miktarlarda FITC işaretli (2, 4, 8, 16 ve 20 µg/ml) katyonik altın kaplı manyetik nanopartiküller hücrelerin üzerine ilave edilmiştir. 48 kuyucuklu plaklar üç

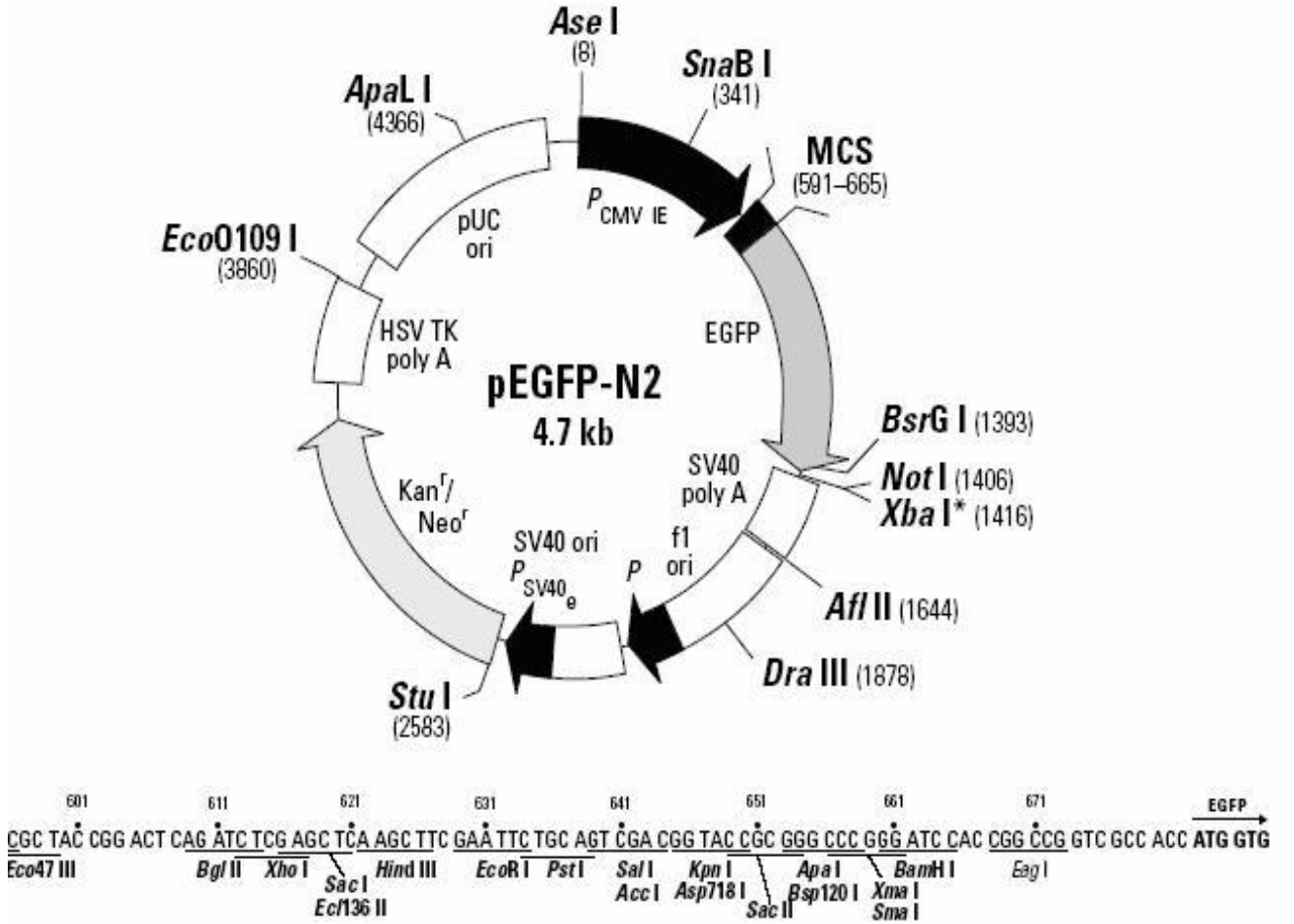
farklı bölüme ayrılmıştır ve ilk bölüme manyetik alan uygulanmamıştır. İkinci bölüme yüzeyi işlenmemiş mıknatısla 10 dk manyetik alan uygulanmıştır. Üçüncü bölüme yüzeyi işlenmiş mıknatısla 10 dk manyetik alan uygulanmıştır. 48 saat 37 °C'de 5%'lik karbondioksitli ortamda inkübe edilmiştir. 48 saat sonunda kuyucuk tabanından kalkmış hücreleri tüpte toplayıp santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası oluşan süpernetant atılmış ve üzerlerine ikili boyama solüsyonu [RNase (2µl/ml), Hoechst 33342(2µl/ml), Propidium iodide (2µl/ml)] 10⁶ hücreye 100µl solüsyon eklenip ve 20 dk etüvde inkübe edilmiştir. Bu karışım lam üzerine damlatıldıktan sonra lamelle kapatılmış ve floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) DAPI filitresi kullanılarak normal hücreler ve FITC (480-520 nm dalga boyunda) nekroza uğramış hücrelerin değerlendirilmesi yapılmıştır. Kuyucuk tabanına yapışık hücreler enzimle kaldırılmadan aynı işlemlere tabii tutularak incelenmiştir. Değerlendirme Floresan mikroskopta (Leica DMI70, Almanya) 10 farklı alan (yaklaşık 1000 hücre) sayılarak ortalaması alınmıştır ve nekrotik indeks yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.

Değerlendirmede normal nekrotik olmayan hücreler çekirdekleri sönük mavi, çekirdekte DNA dağılmamış, hücrede veziküller oluşmamış olarak görülmektedir. Kültür kabında yüzeye tutunan hücreler kaldırılmadan yukarıda belirtilen floresan boyama solüsyonu 100 µl/well hücrelere uygulanarak da inceleme yapılmıştır. İkili boyama sonucunda normal hücrelerin çekirdekleri Hoechst 33342 floresan boyası ile boyanmıştır. İkili boyamada kullanılan diğer boya propodium iyodid(PI) ise nekroza uğramış hücreleri göstermek amacı ile kullanılmıştır. PI floresan boyası normal de canlı ve hücre zarlarında hasar olmayan hücrelere giremez ve bu hücreler PI ile boyanmazlar. Fakat hücre nekroza uğradığında veya hücre zarı hasar gördüğünde hücre içerisine girer ve çekirdeği kırmızıya boyar. Floresan ışık (FITC veya kırmızı floresan ışık) altında bakıldığında nekroza uğrayan hücrelerin hücrelerin çekirdekleri kırmızı renkte görülür.

3.7.2. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül/Plazmid DNA Konjugatlarının Hela Hücrelerine Aktarılması

Bu tezin her aşamasında *E.Coli* hücresinde bulunan 4.7 kb büyüklüğünde ampisilin antibiyotiklerine duyarlı, “Yeşil Floresan Protein” geni (GFP) taşıyan plazmid DNA kullanılmıştır. Şekil 3.7.2' de tranfeksiyon amaçlı kullanılacak ve *E.Coli* de bulunan pEGFP-N2 plazmid DNA sının gen haritası verilmiştir. GFP

floresan protein *in vitro* ve *in vivo* gen aktarımında gen ekspresyonunun takibinde kullanılmaktadır. GFP, 450-490 nm'lik floresan ışık altında yeşil renk veren bir proteindir. Yayıdığı yeşil ışık kararlıdır ve kullanılan hücre hattına bağlı değildir. Hücre içine giren plazmid DNA ile birlikte bu genin hücrenin genetik birimlerine aktarılması durumunda, muamele edilen hücrelerde bu proteinin sentezi gerçekleşir ve bunun sonucunda yeşil ışımaya yapan hücreler tespit edilerek sayılır. Işımanın tespit edildiği hücreler başarılı gen ekspresyonunun göstergesidir. Böylece transfeksiyon çalışması sonunda elde edilen görüntüler kıyaslanarak ya da ışımaya yapan hücrelerin baştaki toplam hücre sayısına oranından transfeksiyon verimi saptanabilir.



Şekil 3.7.2 pEGFP-N2 gen haritası

Yapılan çalışmada öncelikle GFP-pDNA miktarı sabit tutulup katyonik altın kaplı manyetit nanopartikül miktarı değiştirilerek konjugat oluşumu gerçekleştirilmiştir.

Konjugat oluşum oranları (pDNA/partikül) 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 olarak belirlenmiştir. İlk olarak 200 µl transfeksiyon çözeltilisi hazırlanmıştır. 2, 4, 8, 16, 20 µg olarak belirlenen beş farklı partikül miktarı stok partikül çözeltilisinden ayrı ayrı ependorf tüplere alınıp üzerleri 0.15 M NaCl çözeltilisi ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde pDNA çözeltilisinden 2 µg içerecek şekilde pDNA ayrı ayrı ependorf tüplere alınıp 100 µl'ye tamamlanmıştır. pDNA çözeltilisi partikül çözeltilisi üzerine aktarılıp 20 kez pipetle çekilip bırakılarak çözeltilerin karışımı sağlanmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari in vitro transfeksiyon ajanı (TurboFect, Fermentas, EU) 2 µl olarak kullanılmış ve ayrı bir ependorf tüpte bulunan 2 µg pDNA içeren çözeltili üzerine eklenip son hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece 2 µg pDNA içeren 100 µl çözeltili kullanılmıştır. Konjugat oluşumunu sağlamak amacıyla 30 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Konjugat oluşumu sağlandıktan sonra önceden 10000 hücre olacak şekilde ekimi yapılmış ve plaktaki kuyucukları kaplamış Hela hücreleri üzerinden besi ortamı alınmıştır. 100 µl PBS tamponu ile hücreler yıkanmıştır. 15 dak hücreler üzerine bir şey eklenmeden 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Yeterince aç kalan Hela hücreleri üzerine oluşturulan konjugatları içeren transfeksiyon çözeltilisi ve son olarak 200 µl besi ortamı eklenmiştir. 48 kuyucuklu plaka ikiye ayrılmıştır. İlk bölümüne manyetik alan uygulanmamıştır. İkinci bölüme partiküllerin hücreye girişinde etkin olduğu gösterilmiş (Bölüm 4.6.1) yüzeyi işlenmiş (yönlendirilmiş) mıknatısla 5 ve 15 dak manyetik alan uygulanmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 4 saat sonra hücreler üzerindeki besi ortamı değiştirilmiştir. 48 saatin sonunda transfeksiyon etkinliği incelenmiştir. İncelenen bölmeye ait ortalama görüntüyü yansıtan bir bölgede transfekte olmuş hücreler ve toplam hücre miktarı sayılarak, gen ekspresyon yetenekleri yüzde olarak hesaplanmıştır.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMALAR

4.1. Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tezde kullanılan manyetik nanopartiküller Filiz Sayar'ın Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Yüksek Lisans tezi kapsamında optimize ettiği prosedür doğrultusunda sentezlenmiştir (Sayar, 2004). Manyetik nanopartiküllerin Zeta Sizer, XRD, FTIR, VSM, AFM analizleri ile karakterize edilmiştir.

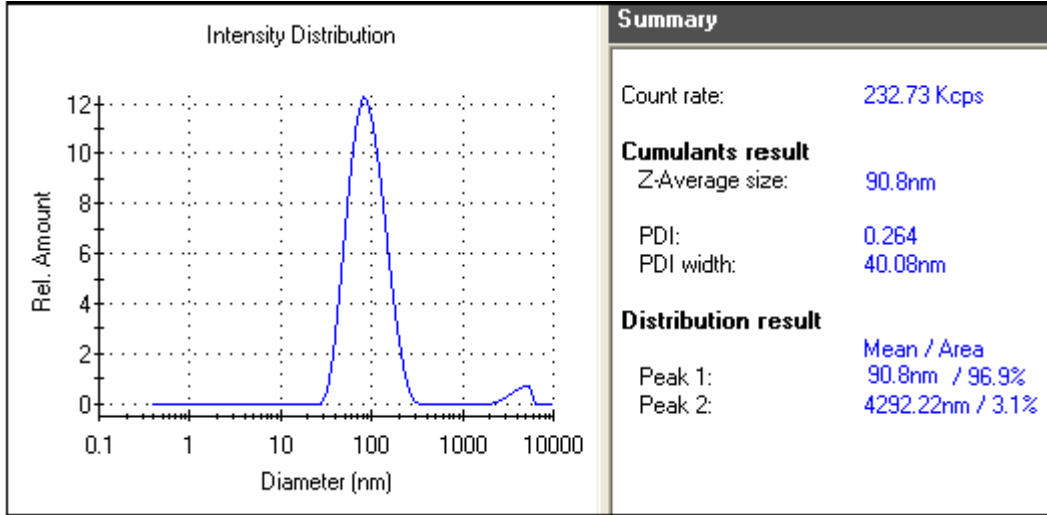
4.1.1. Zeta Sizer İle Boyut Analizi

Tez çalışması doğrultusunda sentezlenen manyetik nanopartiküller zeta sizer cihazı kullanılarak boyutları analiz edilmiştir. Sentez sonrasında partiküller farklı hızlarda santrifüjlenerek boyut bakımından birbirinden ayrılmıştır. Çizelge 4.1.1. 'de farklı santrifüj hızlarında elde edilen partikül çapları görülebilmektedir.

Çizelge 4.1.1 Farklı santrifüj hızlarında elde edilen partikül çap değerleri

Santrifüj hızı (rpm)	Partikül çapı (nm)	PI (Boy Dağılımı)
9000 rpm	155 nm \pm 7.134	0.273
12000 rpm	90 nm \pm 2.169	0.264
14000 rpm	60 nm \pm 1.770	0.237
16000 rpm	20 nm \pm 0.984	0.365

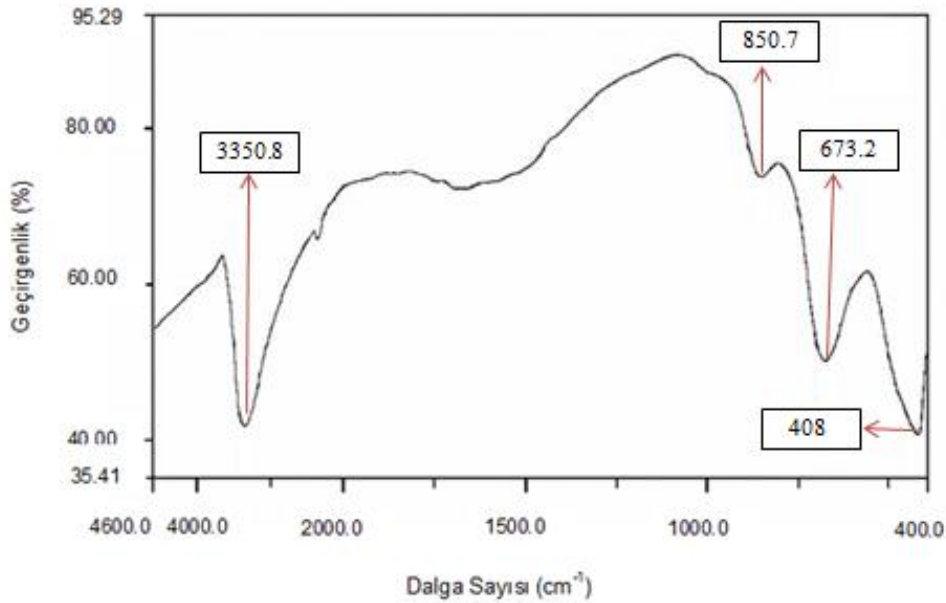
Büyük partiküller düşük santrifüj hızıyla çöküp çözüldüğüden ayrılabilirken santrifüj hızını yükselttiğimizde daha küçük partiküller sentez sonrası oluşan manyetik nanopartikül çözeltisinden ayrılabilir. Tez kapsamında 20-155 nm çap aralığında farklı boylarda manyetik nanopartikül üretimi gerçekleştirilmiştir. Partikül sentezi 3 kez tekrarlanmış ve her sentez sonrası bu santrifüjleme hızları tekrarlanmıştır. Altınla kaplama ve transfeksiyon çalışmaları için literatüre en yakın değer olarak Şekil 4.1.1' de boyut grafiği verilen 90 nm çapındaki manyetik partiküller uygun bulunmuştur (Niidome, 2004).



Şekil 4.1.1 90 nm boyutundaki manyetik nanopartiküllerin zeta boyut grafiği

4.1.2. FTIR Analizi

Tez kapsamında 90 nm boyutundaki manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin FTIR spektrumları Şekil 4.1.2. 'de verilmiştir. Karakterize edilen nanopartiküllerin FTIR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri Çizelge 4.1.2. 'de sunulmaktadır.



Şekil 4.1.2 FTIR spektrumu; Manyetit nanopartikül (Fe_3O_4)

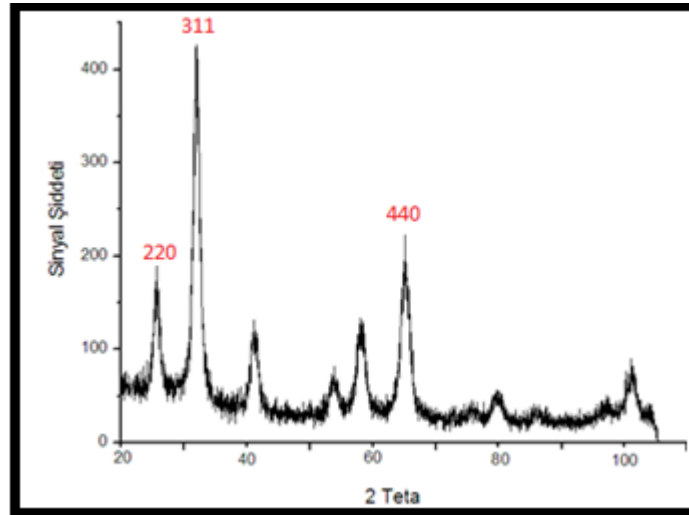
Çizelge 4.1.2. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik Pikler

Karakteristik Pik	Dalga Sayısı (cm ⁻¹)
OH ⁻ piki	3350
Fe-O gerilme titreşim modu	673
Fe-O gerilme titreşim modu	408

Şekil 4.1.2. 'de görülmek üzere Fe-O gerilme titreşimi ile ilgili karakteristik pikler 673 ve 408 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenmiştir. Bu karakteristik pikler manyetitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini işaret eden piklerdir. 3350 cm⁻¹'deki pik ise serbest su moleküllerine aittir. FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatürde rapor edilenlerle uyum içindedir [Deb P, 2001; Sayar, 2010].

4.1.3. X Işını Kırılması Analizi

Oluşturulan 90 nm buyutundaki manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküllerinin kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış olup ilgili spektrumlar Şekil 4.1.3. 'de sunulmuştur.

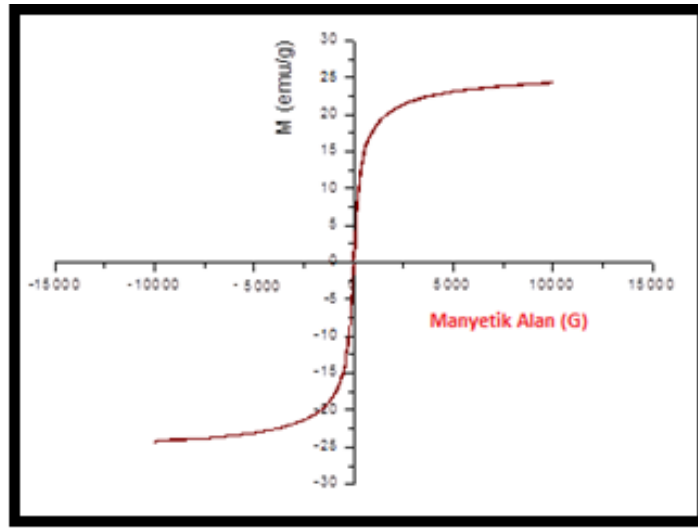


Şekil 4.1.3 Manyetit nanopartikülün (Fe₃O₄) X-RD spektrumu

Şekil 4.1.3'de görülmek üzere 30, 35 ve 62 iki teta değerlerindeki manyetit nanopartikülleri sırasıyla (220), (311) ve (440) kristal yapısına özgü karakteristik piklerini göstermektedir (Pita, 2008).

4.1.4. Manyetometre ile Manyetik Özelliklerin Belirlenmesi

Tez kapsamında titreşimli manyetometre (VSM) cihazı kullanılarak oluşturulan manyetik nanopartiküllerinin manyetik özellikleri belirlenmiştir. Partiküllerin manyetik özellikleri bir manyetik alan içindeki birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir.



Şekil 4.1.4 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri

Bir manyetik partiküldeki manyetik momentlerin hepsi uygulanan alan yönünde yönlendiğinde ölçülen toplam manyetik moment sabit kalır. Bu noktaya doygunluk, bu noktada ölçülen manyetik momente doygunluk mıknatıslığı, doygunluğa ulaşıldığındaki alan doygunluk manyetik alanı olarak tanımlanmaktadır. Tez kapsamında yapılan ölçüme göre sentezlenen ve sonraki hücre kültürü deneylerinde kullanılmak üzere seçilen 90 nm boyutundaki manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri Şekil 4.1.4. 'de görüldüğü üzere 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (M_s) doygunluk mıknatıslığı göstermektedir. Uygulanan manyetik alan etkisi altındayken manyetit nanopartikülü, manyetik alana karşı mıknatıslık eğrisinde histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmüştür.

4.1.5. AFM ile Görüntüleme Sonuçları

Tez kapsamında altın kaplı manyetit nanopartiküllerin çekirdeğini oluşturacak 90 nm boyutundaki manyetit nanopartiküllerin AFM (NanoMagnetic Instruments Ltd. Türkiye) ile de analizi yapılmıştır. Nanopartiküllerin bu cihazla hem boyut hem de manyetik olup olmadığına dair analiz yapılabilmektedir. 90 nm boyutundaki çıplak manyetit XY eksenine göre boyut analizi yapılmıştır. Kullanılan atomik kuvvet mikroskobunun çalışma kipi kobalt kaplı tipler (manyetik kaplı tipler) kullanılarak değiştirilip MFM (manyetik kuvvet mikroskobu) olarak da kullanılabilen ve analiz yapılabilmektedir.

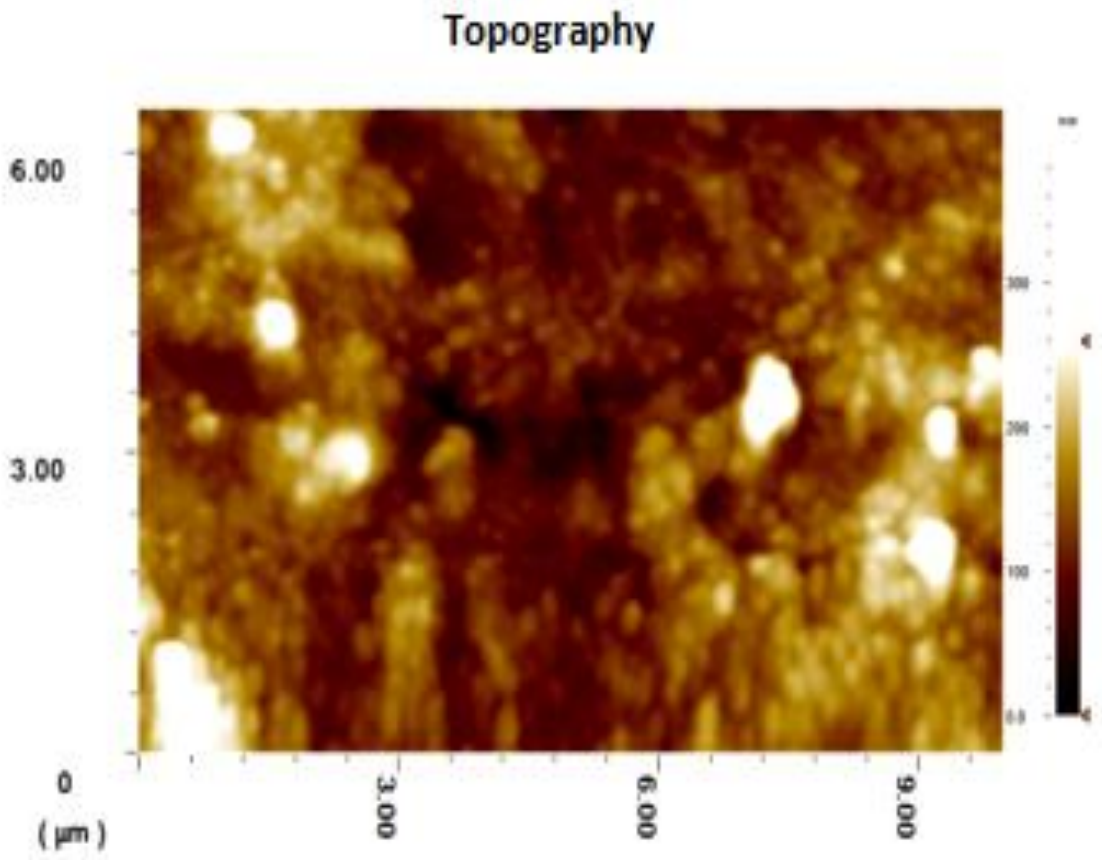
Partikül aglomerasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla yapılan ultrasonikasyon uygulamasından sonra 50 µl manyetit (yaklaşık 100 µg/ml manyetit konsantrasyonuna sahip örnek) düz mika tabakası üzerine yaydırılıp beklemeye hızlı kurutma için azot gazı uygulaması yapılmıştır. Daha sonra mika üzerindeki örneğin MFM modunda 10×6 µm² tarama alanında, kobalt kaplı tipler ile 90 nm uzaktan taranarak AFM ve MFM ile analizi yapılmıştır. Çizelge 4.1.5' te ayrıntılı verilen AFM analiz özelliklerine göre görüntüleme yapılmıştır.

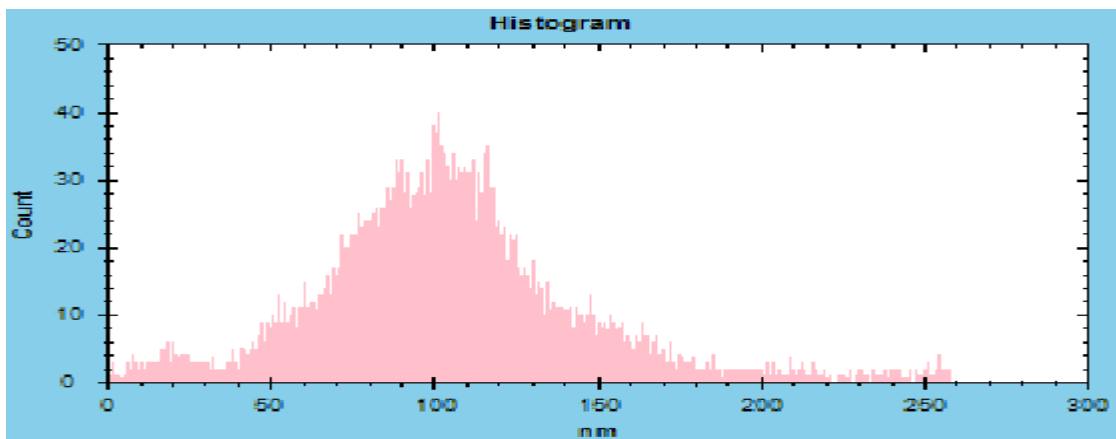
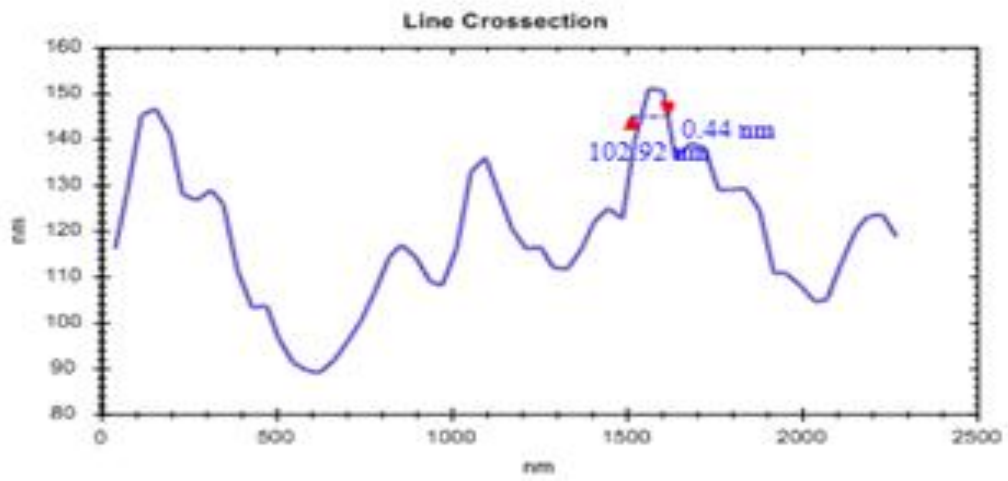
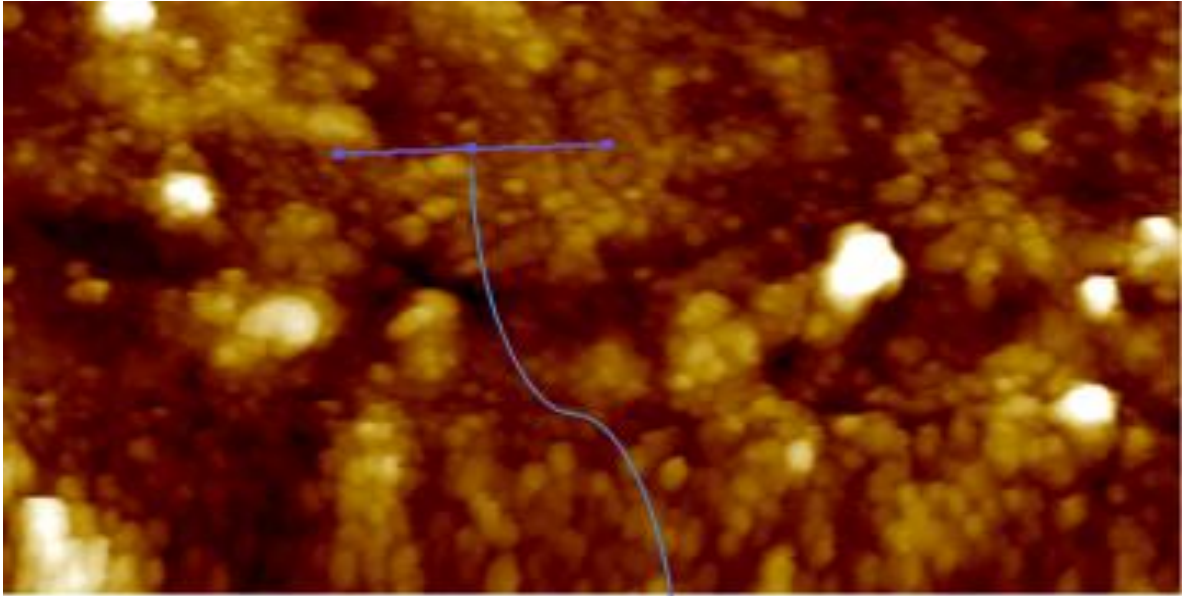
Şekil 4.1.5' te manyetit nanopartiküllerin topografisi verilmiştir. Örneğin konsantrasyonu çok yoğun geldiğinden partiküller birbirinin üzerine gelmiştir. Bu nedenle tip sadece üstteki partikülleri tarayabilmiştir. Alınan görüntüleme sonuçlarının XY eksenine göre histogramı verilmiş olup boyut 102 nm olarak bulunmuştur. Zeta sizer da ölçülen değerle birbirine yakın sonuç alınmıştır.

Şekil 4.1.6' da manyetit nanopartiküllerin MFM de analizi verilmiştir. Burada manyetik özellik gösterip göstermediğine ilişkin bir yorum yapılmaktadır. Açık parlak ve karanlık bölgeler varlığına göre bu yorum yapılmaktadır. Karanlık bölgelerdeki domain yönelimlerine bakılarak bu görüntüdeki partiküller manyetik özellik göstermektedir. Manyetik kaplı tip 90 nm kaldırılıp yüzey taraması yapılmış ve buradaki manyetit partiküllerde manyetik özellik bulunmuştur. 200 nm kaldırmaya ayarlandığında ise manyetik özellik algılanmamıştır.

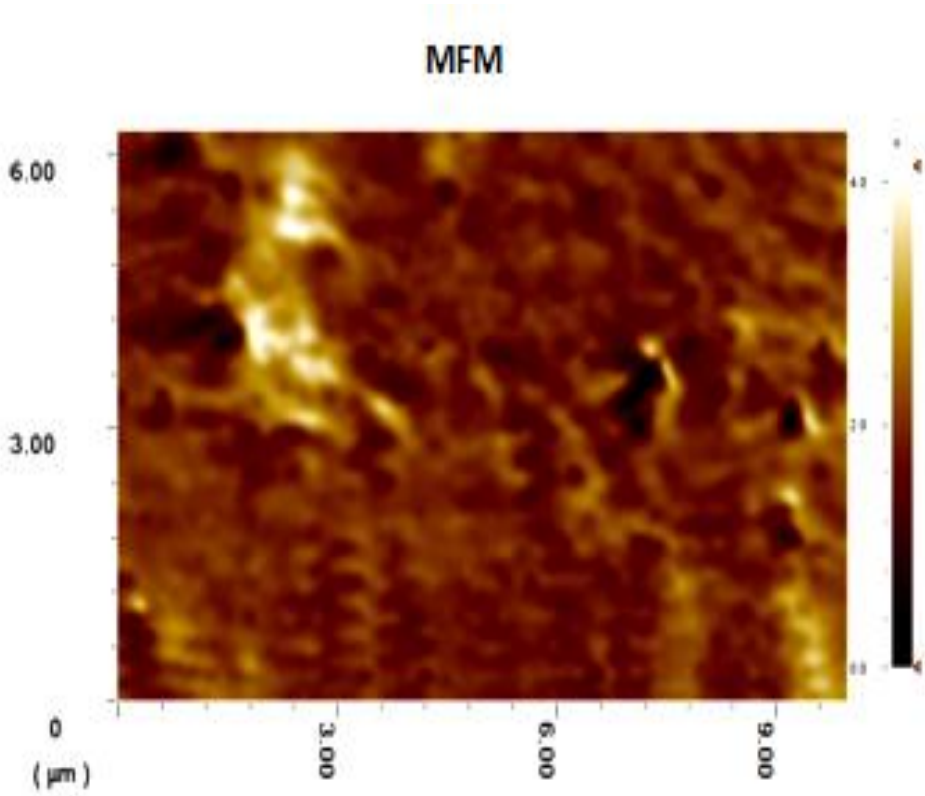
Çizelge 4.1.5 Çıplak manyetit için AFM analiz özellikleri

AFM Mode	MFM	Scan Area (μm^2)	10 x 6
Osc. Amp. (V)	0.800	Scan Speed ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	2
Loop Gain	999	Image Pixels	256x256
F Total (V)	1.0	Cantilever type	PPP-MFMR
Software	Nmi spm 1.14.6 (Build 9)	Lift	90 nm





Şekil 4.1.5 AFM ile alınan topografi sonucu ve histogramı



Şekil 4.1.6 Manyetit nanopartiküllerin MFM de analizi

4.2. Altın Kaplı Manyetit (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Bölüm 4.1.1. de karakterizasyonu zeta sizer ile yapılmış ve sonuçları verilmiş manyetit nanopartiküller arasında ortalama çapı 90 nm olarak ölçülen nanopartiküller in (AFM'ye göre 102 nm) tez kapsamında altınla kaplandıktan sonraki karakterizasyon sonuçları bu bölümde ayrıntılı olarak yapılan analiz başlıkları altında verilmiştir. Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı doktora tezinde kullandığı reçetede malzemelerin (trisodyum sitrat, tetrakloraurat, kullanılan manyetit nanopartikül) miktarı farklı oranlarda kullanılmış ve manyetit üzerine oluşacak altın kabuk oluşumuna etkileri incelenmiştir. Ayrıca farklı boyda manyetit nanopartiküllerde altınla kaplanmış ve özellikleri karakterize edilmiştir.

4.2.1. Zeta Sizer İle Boyut Analizi

Altın tuz miktarı oluşturulan manyetik altın kaplı nanopartiküllerin etrafındaki altın kabuk kalınlığını etkilemektedir (Sayar, 2010). Bu nedenle Bölüm 3.2.2. de ayrıntılı

bir şekilde anlatılmış Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı doktora tezinde kullandığı deneysel prosedür aynen uygulanarak H_{AuCl}₄ miktarı 12 ve 24 mM olacak şekilde iki farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir (Sayar, 2010). Aynı deney prosedüründe tri sodyum sitrat miktarı da altın kabuk oluşumundaki etkisi incelenmiştir. Tri sodyum sitrat miktarı 0.155, 0.310, 0.078 mM olacak şekilde üç farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca kullanılan partikül miktarının altın kabuk oluşumuna etkisi de incelenmiştir. Bu parametrelerden farklı olarak ortalama partikül boyu 60, 90, 155 nm olan Fe₃O₄ nanopartikülü kullanılarak üç farklı sentezde altın kaplı manyetit nanopartikül (Fe₃O₄ /Au) sentezlenerek partikül boyu, potansiyel yükü Çizelge 4.2.1 de gösterilmiş olup elde edilen en iyi sonuçlar arasından hücre kültürü için kullanılacak altın kaplı manyetit nanopartikülün (Fe₃O₄/Au) zeta sizer ile ölçülen boyut ve potansiyel yük grafiği Şekil 4.2.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.1 Farklı H_{AuCl}₄, tri sodyum sitrat, farklı partikül miktarında ve ortalama partikül çapı farklı manyetit (Fe₃O₄) ile üretilen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerin özellikleri.

Fe ₃ O ₄ çapı (nm)	Partikül Miktarı (ml)	Sitrat Miktarı (mM)	Altın Tuzu Miktarı (mM)	Fe ₃ O ₄ /Au çapı (nm)	Heterojenlik indeksi (PI)	Zeta Potansiyel (mV)
90	0.5	0.155	12	95.7	0.195	-30
90	0.5	0.310	12	105	0.233	-30.8
90	0.5	0.078	12	105	0.444	-29.9
90	0.5	0.155	24	165	0.373	-32.7
90	1	0.155	12	91.2	0.370	-31.8
90	0.25	0.155	12	110	0.230	-30.7
60	0.5	0.155	12	80	0.402	-28
155	0.5	0.155	12	160	0.207	-34.2

Çizelge 4.2.1. e göre 90 nmlik (100 µg/ml konsantrasyonunda) çıplak manyetit öncelikle farklı konsantrasyonlarda trisodyum sitrat kullanılarak altınla kaplanmış ve altın kabuk oluşumunda kullanılan diğer malzemelerin miktarları sabit tutulmuştur. Bu denenen parametreye göre genel kullanılan reçetede 0.155 mM

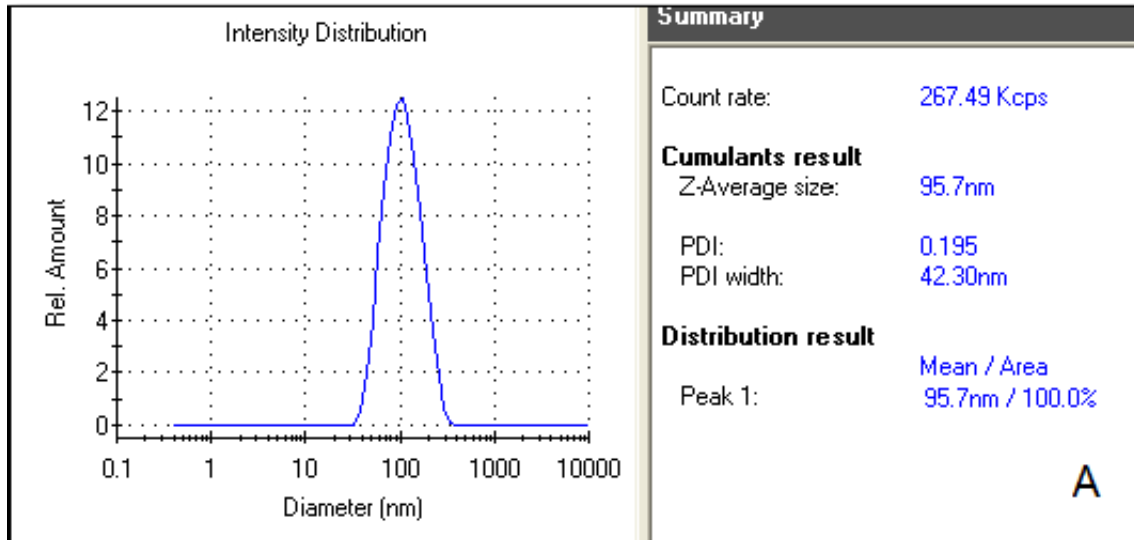
tri sodyum sitrat konsantrasyonu hem iki katına çıkarılıp hem de yarıya indirilerek kullanılmış, altın kabuk kalınlığına 15 nm kadar bir etki görülmüştür. 90 nm lik manyetit 105 nm boyutuna ulaşmıştır. Altın kabuk kalınlığı arttıkça manyetik özellik azalır Şekil 4.2.6.2'de görülen ESR spektrumu bunu vermektedir (Sayar, 2010). Nanopartiküllerin boyutunu ölçmekte kullanılan zeta sizer cihazı ile potansiyel yük ölçümünde yapılabilmektedir. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin potansiyel yüklerine baktığımızda negatif yüke sahip oldukları ve kullanılan sitrat miktarının değişimiyle partiküllerin negatif yüklerinin tam bir değişime uğramadığı görülmüştür.

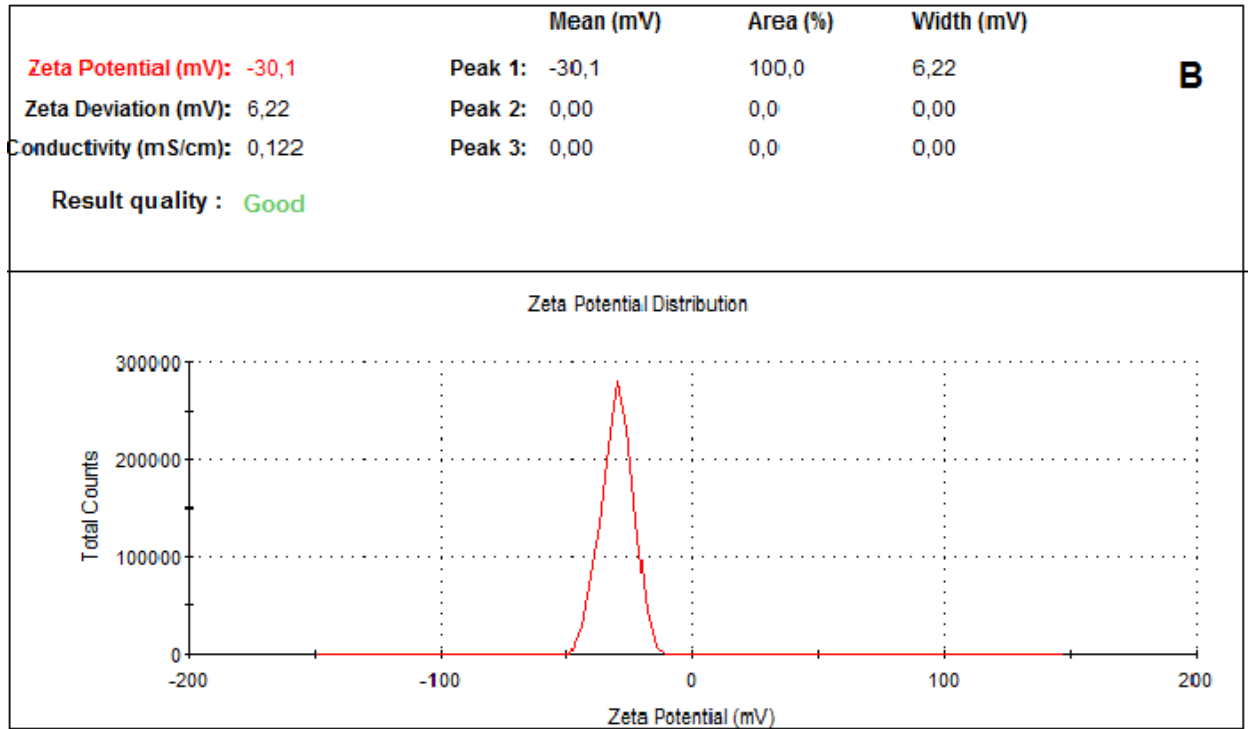
Çizelge 4.2.1. e göre 90 nmlik (100 µg/ml konsantrasyonunda) çıplak manyetit altın tuzu miktarı iki katına çıkarılarak altın kaplı manyetit nanopartikül sentezlenmiş ve partikül boyu da oluşan altın kabuk kalınlığına bağlı olarak artmıştır. 90 nmlik manyetit boyutu 165 nm'ye ulaşmıştır. Altın kabuk kalınlığı arttığından ESR (Şekil 4.2.6.1) spektrumundaki pikte azalmış çıplak manyetitindiği değerden daha düşük bir değer vermiştir. Bu parametre Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı doktora tezinde optimize edilmiştir (Sayar, 2010) .

Çizelge 4.2.1. e göre 90 nmlik (100 µg/ml konsantrasyonunda) çıplak manyetit içeren çözülden farklı miktarlarda partikül alındığında boyutta değişim olmaktadır. Normal prosedürde kullanılan 0.5 ml partikül miktarında boyut 95 nm iken 1ml ve 0.25 ml partikül kullanıldığında 91 ve 110 nm boyutunda partikül elde edilmiştir. 1ml manyetit partikül kullanıldığında altın miktarı manyetit partikülleri kaplamaya yeterli gelmemiş ve yıkama sırasında çok fazla manyetit kaplanmamış olarak yıkama tübünde siyah çökelti olarak görülmüştür. Bu nedenle çıplak manyetitindiği boyutuna (90.8) yakın bir değer bulunmuştur. ESR spektrumunda en fazla pik şiddeti 1ml manyetit kullanımıyla elde edilmiştir. Buda en az kaplamanın gerçekleştiğini göstermektedir. 0.25 ml içinde 90 nm çapındaki çıplak manyetit partiküller ise fazla miktarda altınla kaplanmış ve 110 nm boyutunda partikül oluşturmuşlardır. ESR spektrumundaki ΔH genişliği en az olan partikül dolayısıyla en az manyetik özellik gösteren partikül 0.25 ml çıplak manyetit kullanımıyla gerçekleşmiştir (Şekil 4.2.6.3). Potansiyel yüklere bakıldığında negatif yük etkisi devam etmektedir.

Çizelge 4.2.1. e göre 60 nm çıplak manyetit (30 µg/ml konsantrasyonunda) kullanıldığında ise 20 nm lik bir altın kabuk oluşumu gerçekleşerek altın kaplı manyetitin boyutu 80 nm'ye ulaşmıştır. Hem çıplak manyetit konsantrasyonunun az olması hem de kalın altın kabuk oluşumu nedeniyle ESR spektrumunda çok zayıf bir manyetit şiddet göstermiştir (Şekil 4.2.6.4). 155 nm'lik manyetit partiküller (200 µg/ml konsantrasyonunda) kullanıldığında 160 nm çapında altın kaplı manyetit nanopartiküller sentezlenmiştir. Manyetitin boyu büyükse manyetik özelliğide büyük olup bunun altınla kaplanmasıyla da manyetik özellik 80 ve 95 nmlik altın kaplı manyetit partiküllerinden daha fazladır (Şekil 4.2.6.2) (Sayar, 2010). Diğer altın kaplı manyetit nanopartiküllerdeki negatif yük etkisi bu partiküllerde de görülmüştür.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiş 95.7 nm boyutundaki altın kaplı manyetit nanopartikülün zeta sizer cihazı ile elde edilmiş boyut ve zeta potansiyel grafiği Şekil 4.2.1 de verilmiştir.





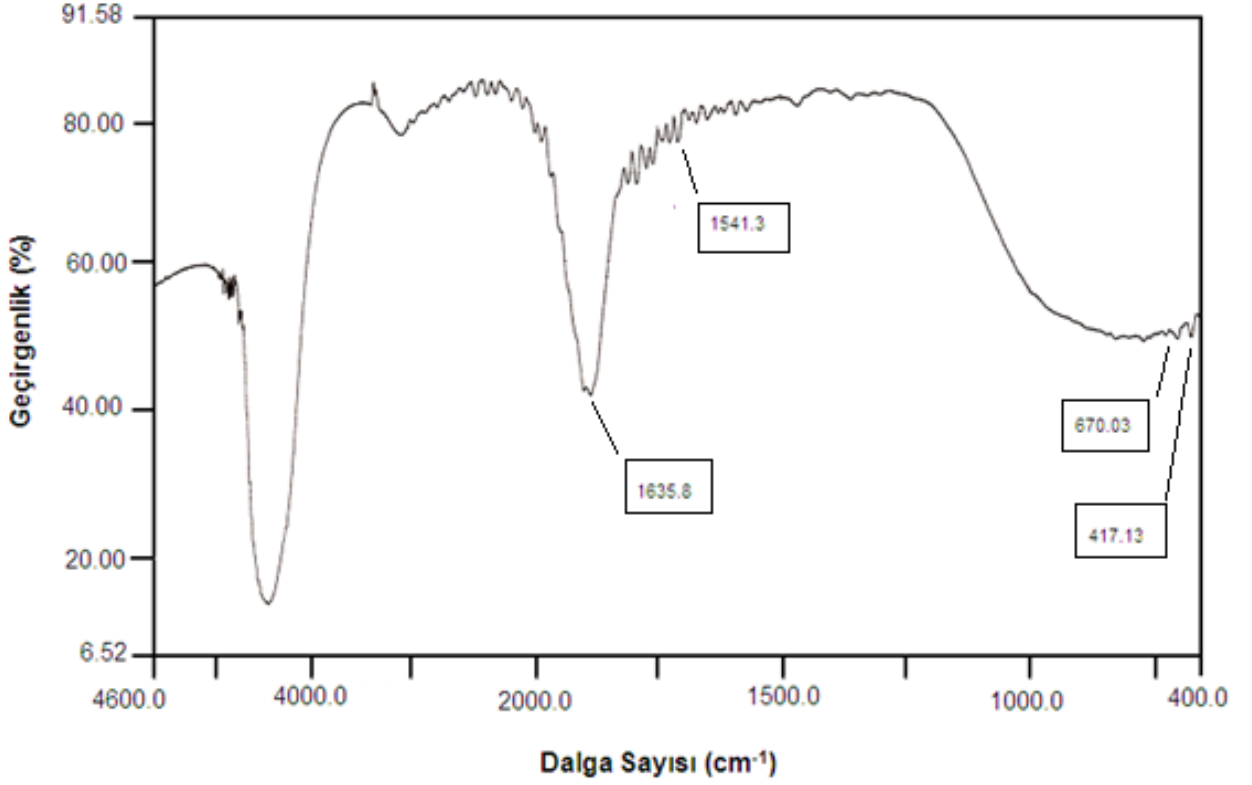
Şekil 4.2.1 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetik nanopartikülün zeta sizer cihazı ile elde edilmiş boyut (A) ve potansiyel yük (B) grafiği

4.2.2. FTIR Analizi

Tez kapsamında 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Karakterize edilen nanopartiküllerin FTIR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri Çizelge 4.2.2. 'de sunulmaktadır. Altın kaplı manyetit ($\text{Au}/\text{Fe}_3\text{O}_4$) nanopartiküllerin FTIR spektrumları Şekil 4.2.2. 'de verilmiştir.

Çizelge 4.2.2. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.

Dalga Sayısı (cm^{-1})	Karakteristik pik
3383	OH gerilimi
1635	Karboksilat grupları
1541	$-\text{CH}_2 - \text{O}$ deformasyon
670.02	Fe-O gerilimi
417.13	Fe-O gerilimi

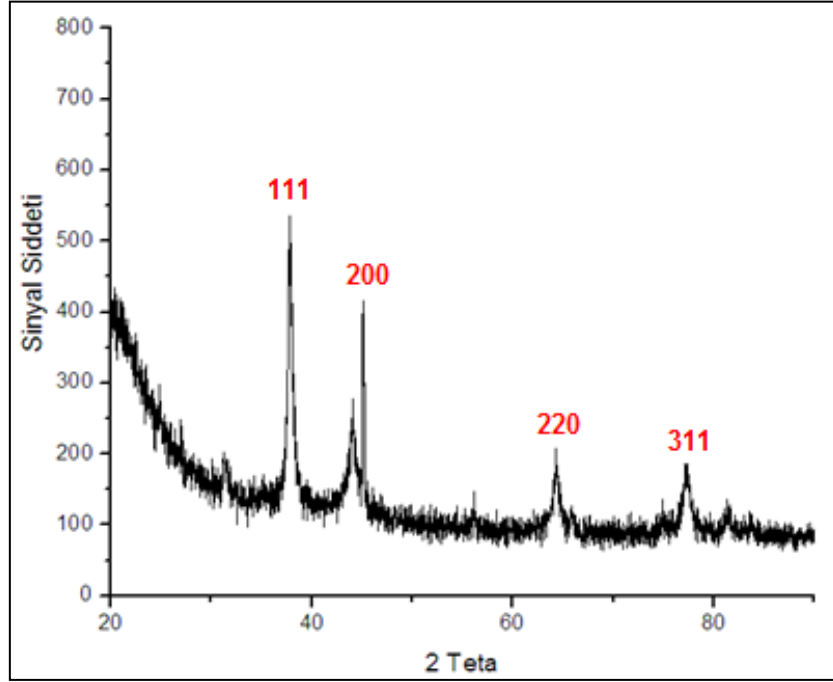


Şekil 4.2.2 FTIR spekturumu; Altın kaplı manyetit nanopartikül (Fe_3O_4/Au)

Şekil 4.2.2 'de görüldüğü gibi altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin (Fe_3O_4/Au) FTIR spektrumunda 670 cm^{-1} ve 417 cm^{-1} dalga sayılarında pikler saptanmıştır. Bu pikler manyetitin 673 cm^{-1} ve 408 cm^{-1} dalga sayılarında oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O geriliminden kaynaklanmaktadır. FTIR spekturumuna göre altın kaplı manyetik nanopartiküllerin yapısında manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerine ait karakteristik piklerin görülmesi sebebiyle yapıda manyetit nanopartiküllerin var olduğu söylenebilir. Literatürde 670 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} dalga sayısı arasındaki piklerin Fe-O gerilim piki olduğu belirtilmiş olup literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Mandal, 2005; Sayar,2010). 1635 ve 1541 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler sırasıyla manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat yapısındaki karboksilat gruplarına ve trisodyum sitrat yapısındaki CH_2-O deformasyonuna ait piklerdir.

4.2.3. X Işını Kırılması Analizi

Oluşturulan 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerinin kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış olup ilgili spektrumlar Şekil 4.2.3. 'de sunulmuştur.



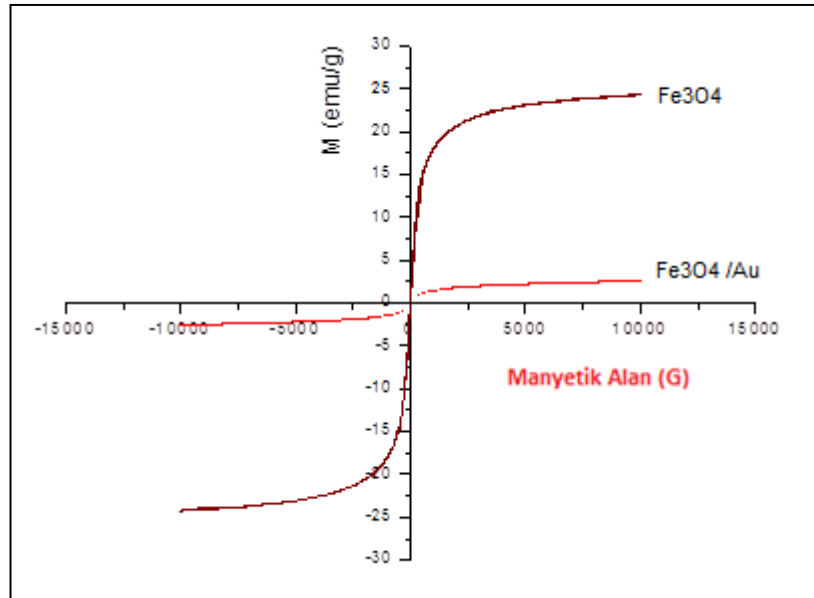
Şekil 4.2.3. Altın kaplı manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerinin X-ışınları kırılması (X-RD) analizi ile ilgili spektrumları

Şekil 4.1.3 'de görüldüğü gibi 30, 35 ve 62 iki teta değerlerinde manyetit nanopartikülleri sırasıyla (220), (311) ve (440) kristal yapısına ait spesifik piklerini göstermektedir (Pita, 2008; Sayar, 2010). Bu manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması neticesinde elde edilen nanopartiküllerin X-RD spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.2.3), 37, 43, 63 ve 77 iki teta değerlerinde (111), (200), (220) ve (311) altının kristal yapısına ait pikler saptanmıştır. Manyetit nanopartikülleri 37, 43 ve 77 iki teta değerlerinde herhangi bir pike sahip değilken altın ile kaplanması sonucu bu teta değerlerinde altının kristal yapısına ait pikler saptanmıştır. Neticede altın kaplı manyetik nanopartiküller ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) için, manyetit nanopartiküllerin kristal yapısına özgü pikleri içermemesi nedeniyle manyetit nanopartiküllerin yüzeyinin tamamen altın ile kaplandığı söylenebilir. Liu ve arkadaşları manyetit nanopartikülleri farklı kalınlıkta altın ile kaplayarak X-RD ile kristal yapılarını araştırmışlar ve manyetit nanopartikülleri çok ince altın ile

kaplandığında manyetite özgü pikler gözlemlenmişlerdir. Kalın bir tabaka altın ile kaplandığında ise manyetite özgü piklerin olmadığını ve kaplamasının yeterli olduğunu vurgulamışlardır (Liu, 2008). Dolayısıyla altın kaplı manyetik nanopartiküller için elde ettiğimiz X-RD spektrumunda manyetite özgü pikler görülmediğinden kaplamanın gerçekleştiği söylenebilir. Literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir (Jafari, 2010; Mandal, 2005; Sayar, 2010).

4.2.4. Manyetometre ile Manyetik Özelliklerin Belirlenmesi

Tez kapsamında titreşimli manyetometre (VSM) cihazı kullanılarak oluşturulan 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri belirlenmiştir.



Şekil 4.2.4 Manyetit (Fe₃O₄) ve altın kaplı manyetik (Fe₃O₄/Au) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri.

Şekil 4.2.4 'de görülmek üzere manyetit (Fe₃O₄) nanopartikülü 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı göstermiş ve altın kaplı manyetik nanopartikülü (Fe₃O₄/Au) ise 10000 Gauss manyetik alanda 0.003 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı vermiştir. Doymuşluk mıknatıslığı manyetit nanopartiküllerinin altın ile kaplanması neticesinde azalmıştır. Dolayısıyla manyetit nanopartiküllerin altınla kaplanmasının manyetik özelliğini azalttığı söylenebilir. Jeong ve arkadaşları maghemit nanopartiküllerini altın ile kaplamadan önce 10000 (Oe) manyetik alanda 36.8 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı gösterirken altın ile

kaplandıktan sonra 10000 (Oe) manyetik alanda 1.08 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı ölçmüşlerdir. Manyetik özellik gösteren nanopartiküllerin altın ile kaplanması neticesinde manyetik özelliğin azaldığını rapor etmişlerdir (Jeong, 2006).

4.2.5. AFM ile Görüntüleme Sonuçları

Tez kapsamında 90 nm boyutundaki manyetit nanopartikülleri altınla kaplanarak 95 nm boyutundaki altın kaplı manyetit nanopartikülleri oluşturmuş ve zeta sizer ile bu sonuç elde edilmiştir. Aynı partiküllerin AFM (NanoMagnetic Instruments Ltd Türkiye) ile de analizi yapılmıştır. Nanopartiküllerin bu cihazla kobalt kaplı tipler kullanılarak MFM (manyetik kuvvet mikroskobu) de hem boyut hem de manyetik özellik analizi yapılmıştır. Partikül aglomerasyonunu ortadan kaldırmak amacıyla yapılan ultrasonikasyon uygulamasından sonra, çıplak manyetitte kullanılan 50 µl manyetit (yaklaşık 100 µg/ml manyetit konsantrasyonuna sahip örnek) örneği görüntüleme için çok yoğun geldiğinden 10 µl altın kaplı manyetit örneği (yaklaşık 100 µg/ml manyetit konsantrasyonuna sahip örnek) düz mika tabakası üzerine yaydırılıp beklemeden hızlı kurutma için azot gazı uygulaması yapılmıştır. Daha sonra mika üzerindeki örneğin MFM modunda 2.5×2.5 µm² tarama alanında, kobalt kaplı tipler 50 nm kaldırmaya ayarlanarak AFM ile analizi yapılmıştır. Çizelge 4.2.5' te ayrıntılı verilen AFM analiz özelliklerine göre görüntüleme yapılmıştır.

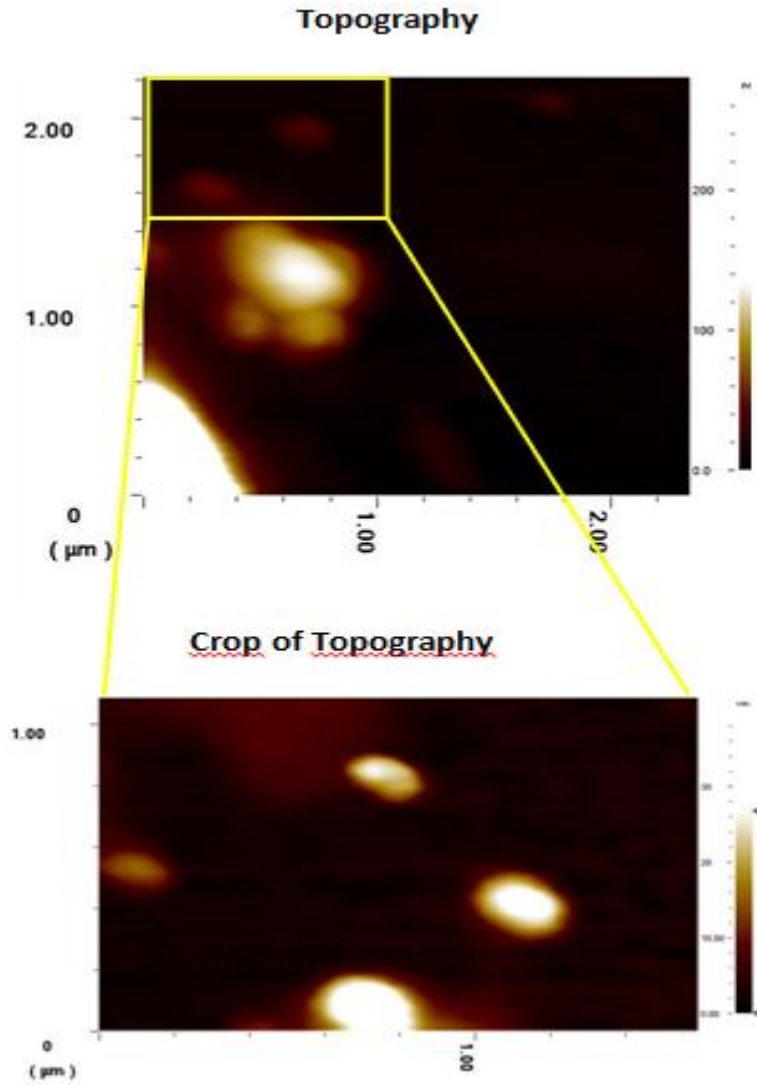
Şekil 4.2.5.1' te altın kaplı manyetit nanopartiküllerin topografisi verilmiştir. Alınan görüntüleme sonuçlarının XY eksenine göre boyut grafiği verilmiş olup boyut 107 nm olarak bulunmuştur. Zeta sizer (95.7 nm) da ölçülen değerle birbirine yakın sonuç alınmıştır.

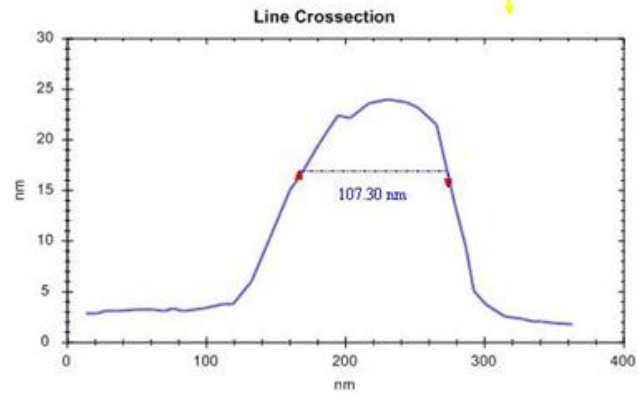
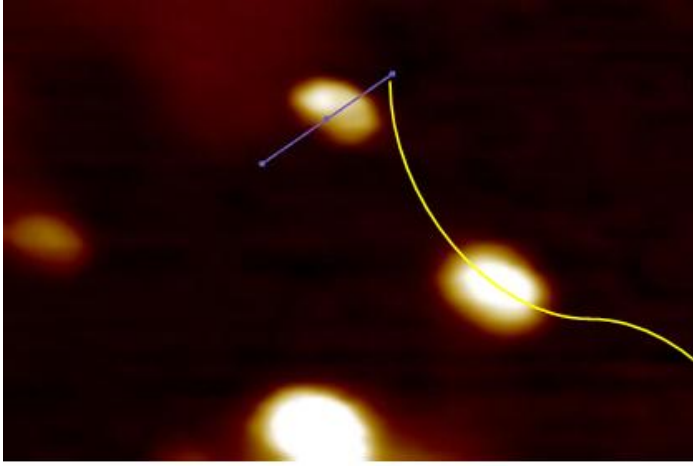
Şekil 4.2.5.2' da manyetit nanopartiküllerin MFM de analizi verilmiştir. Burada manyetik özellik gösterip göstermediğine ilişkin bir yorum yapılmaktadır. Açık parlak ve karanlık bölgeler varlığına göre bu yorum yapılmaktadır. Karanlık bölgelerdeki domain yönelimlerine bakılarak bu görüntüdeki partiküller manyetik özellik göstermektedir. Manyetik kaplı tip 50 nm kaldırılıp indirilerek yüzey taraması yapılmış ve buradaki manyetit partiküllerde manyetik özellik bulunmuştur. 100 nm kaldırmaya ayarlandığında ise manyetik özellik algılanmamıştır. Bu durumda çıplak manyetit 200 nm kaldırmaya kadar sonuç verirken altın kaplı

manyetit 100 nm kaldırmaya kadar sonuç vermektedir. Bu durum çıplak manyetitin altınla kaplanmasından kaynaklandığını göstermektedir.

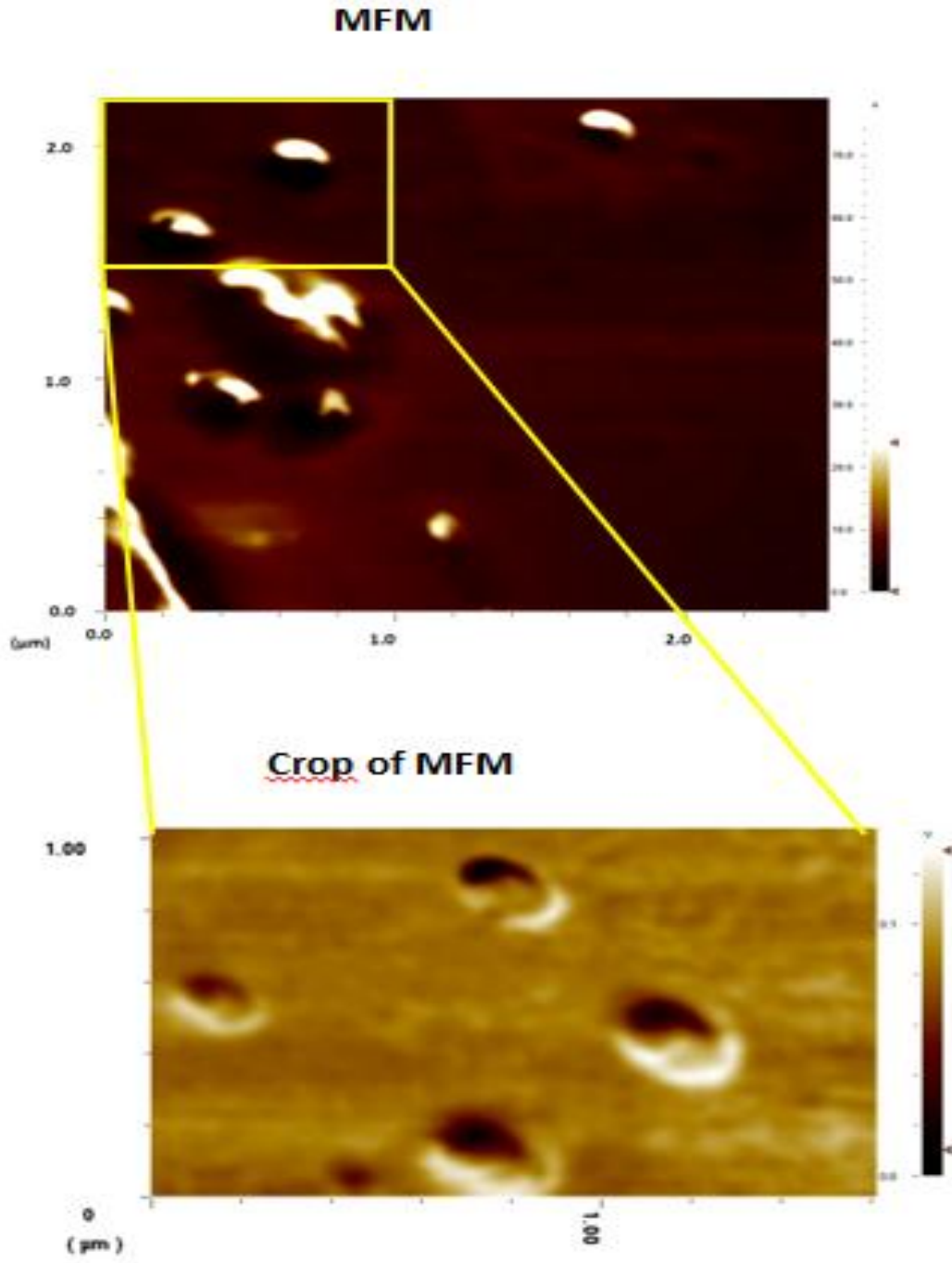
Çizelge 4.2.5 Altın kaplı manyetit nanopartiküller için AFM analiz özellikleri

AFM Mode	MFM	Scan Area (μm^2)	2.5 x 2.5
Osc. Amp. (V)	0.800	Scan Speed ($\mu\text{m}/\text{sec}$)	1
Loop Gain	999	Image Pixels	256x256
F Total (V)	1.0	Cantilever type	PPP-MFMR
Software	Nmi spm 1.14.6 (Build 9)	Lift	50 nm





Şekil 4.2.5.1 Altın kaplı manyetit nanopartiküller için AFM ile alınan topografi sonucu ve XY eksenine göre profili

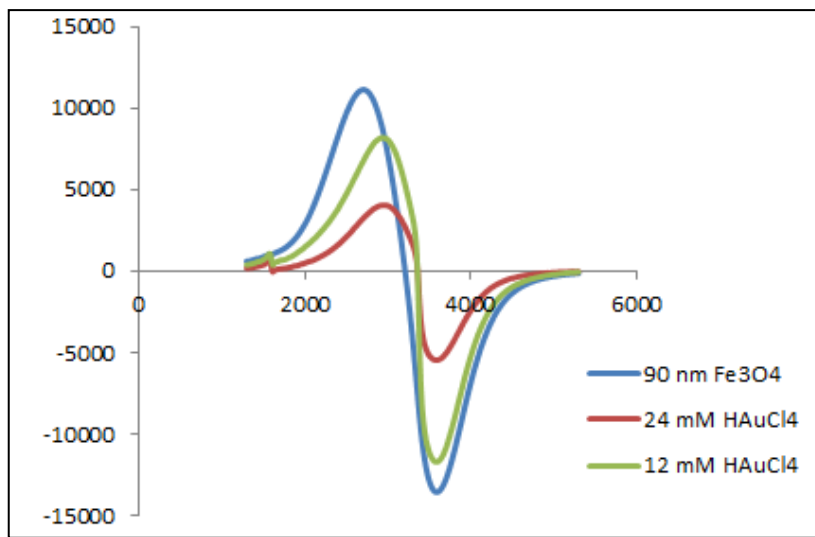


Şekil 4.2.5.2 Altın kaplı manyetit nanopartiküllerinin MFM de analizi

4.2.6. ESR Analizi

Sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin manyetik özelliği ESR (Elektron Spin Rezonans) ile analiz edilmiştir. Manyetit nanopartiküllerin altınla kaplanmasında kullanılan malzemelerin altın kabuk oluşumu neticesinde manyetik özelliklerine etkisi araştırılmış olup kabuk kalınlığına etkisi Bölüm 4.2.1' de verilmiştir. Manyetik özelliğe etkisi ise bu bölümde verilmiştir.

Bölüm 3.2.2'de anlatılan ve Dr. Filiz Sayar' ın Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı doktora tezinde kullandığı deneysel prosedür aynen uygulanarak 90 nm boyutundaki çıplak manyetit nanopartikül HAuCl_4 miktarı 12 ve 24 mM olacak şekilde iki farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2.6.1. 'de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumları birlikte verilmektedir. 90 nm boyutundaki çıplak manyetit 12 mM altın tuzu kullanılarak kaplandığında 95 nm çapında ve 24 mM altın tuzu kullanılarak kaplandığında 165 nm çapında altın kaplı manyetit nanopartikül oluşturulmuştur. Altın kabuk kalınlığının artmasıyla manyetik özellik azalmaktadır (Sayar, 2010). Çizelge 4.2.6.1. ' de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumundan elde edilen spektroskopi özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.2.6.1 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu

Şekil 4.2.6.1' de görüldüğü gibi manyetit nanopartikülü altın ile kaplandıktan sonra da neredeyse manyetit nanopartikül genişliğide ve asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Şekil 4.2.6.1' de görülen ESR spektrumlarında manyetit nanopartikülü uygulanan manyetik alana karşı büyük sinyal şiddeti gösterirken altınla kaplandıktan sonra sinyal şiddetinde azalma gözlenmektedir. Manyetit üzerine altınla kaplamada 12 mM HAuCl₄ kullanımıyla gerçekleştirilen altın kabuk oluşumu, 24 mM HAuCl₄ kullanımıyla gerçekleştirilen altın kabuk oluşumundan daha ince olduğundan sinyal şiddeti daha yüksek olduğu düşünülmektedir.

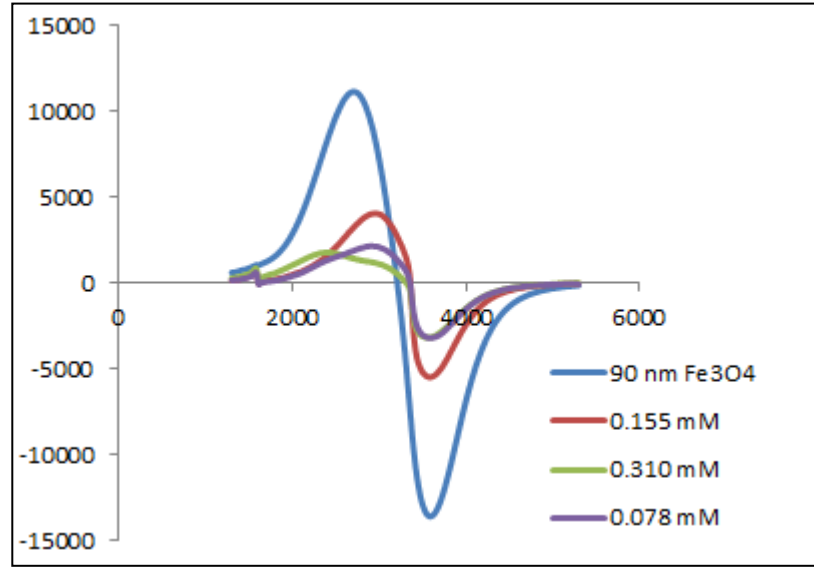
Çizelge 4.2.6.1' de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin altınla kaplanması sonucu yarı eğri genişliğinin (ΔH) azaldığı gözlenmiştir. Yarı eğri genişliğindeki bu azalma manyetik birimler arasına altının (HAuCl₄) girmesi nedeniyle etkileşimin azaldığını göstermektedir (Sayar, 2004). Ayrıca 12 mM HAuCl₄ kullanılarak oluşturulan altın kaplı manyetit nanopartikülü için g faktörü 2.0020 ve 24 mM HAuCl₄ kullanılarak oluşturulan altın kaplı manyetit nanopartikülü için g faktörü ise 2.0021 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.6.1 Manyetit (Fe₃O₄) ve altın tuzunun farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri

Nanopartiküller	G	ΔH	Hr
Manyetit (Fe ₃ O ₄)	2.0932	876	3210
12 Mm HAuCl ₄ Au-Fe ₃ O ₄	2.0020	641	3359
24 mM HAuCl ₄ Au-Fe ₃ O ₄	2.0021	657	3359

90 nm boyutundaki manyetit nanopartikül tri sodyum sitrat miktarı 0.155, 0.310, 0.078 mM olacak şekilde üç farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2.6.2 'de manyetit (Fe₃O₄) nanopartikülünün, tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumları birlikte verilmektedir. Çizelge 4.2.6.2' de manyetit (Fe₃O₄) nanopartikülünün, tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen

altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumundan elde edilen spektroskopi özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.2.6.2 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu

Şekil 4.2.6.2' de görüldüğü gibi manyetit nanopartikülü 0.155 mM tri sodyum sitrat kullanılarak altın ile kaplandıktan sonra neredeyse manyetit nanopartikül genişliğinin yarısı ve asimetric tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Tri sodyum sitrat miktarını yarıya indirdiğimizde ve iki katına çıkarttığımızda ise 0.155 mM sitrat kullanımıyla sentezlenen nanopartikül genişliğinin yaklaşık yarısı kadar bir rezonans eğrisi vermiştir. 0.078 mM (yarısı) olarak sitrat kullanıldığında asimetric ve tek çizgili bir rezonans eğrisi gösterirken, 0.310 mM (iki katı) olarak sitrat kullanıldığında tek çizgili fakat tam asimetric olmayan bir rezonans eğrisi göstermektedir. Şekil 4.2.6.2' de görülen ESR spektrumlarında manyetit nanopartikülü uygulanan manyetik alana karşı büyük sinyal şiddeti gösterirken 0.155, 0.078, 0.310 mM tri sodyum sitrat kullanılarak altınla kaplandıktan sonra altın kabuk oluşumuna bağlı olarak sinyal şiddetinde birbirlerine yakın azalma gözlenmektedir.

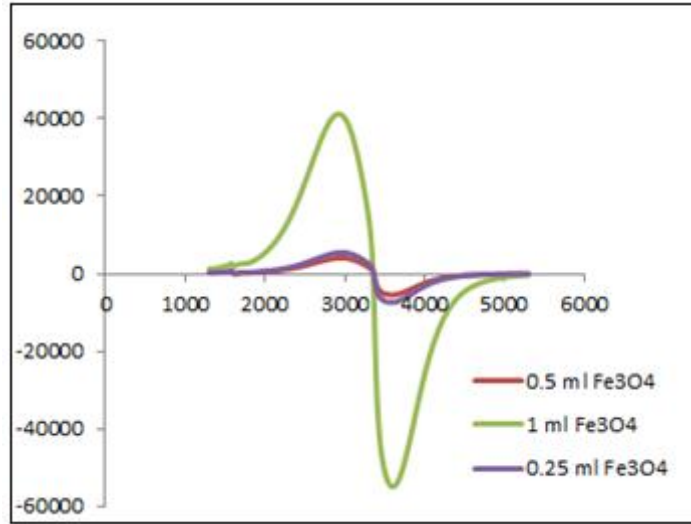
Çizelge 4.2.6.2' de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin altınla kaplanması sonucu yarı eğri genişliğinin (ΔH) azaldığı gözlenmiştir. Yarı eğri genişliğindeki bu azalma manyetik birimler arasına altının (HAuCl_4) girmesi nedeniyle etkileşimin

azaldığını göstermektedir. Ancak tri sodyum sitrat miktarını iki katına çıkardığımızda yarı eğri genişliğinde diğer altın kaplı manyetit nanopartiküllere göre artma meydana gelmiştir ve bunun örneği cam hazneye alırken diğerlerine göre fazla gelmesi nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Ayrıca 0.155, 0.078, 0.310 mM tri sodyum sitrat kullanılarak altınla kaplanan nanopartiküllerin g faktörleri sırasıyla 2.0020, 2.0042, 2.0311 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.6.2 Manyetit (Fe_3O_4) ve tri sodyum sitratın farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri

Nanopartiküller	G	ΔH	Hr
Manyetit (Fe_3O_4)	2.0932	876	3210
0.155 Mm sitrat Au- Fe ₃ O ₄	2.0020	641	3359
0.310 Mm sitrat Au- Fe ₃ O ₄	2.0311	1182	3312
0.078 Mm sitrat Au- Fe ₃ O ₄	2.0042	657	3353

100 $\mu g/ml$ partikül yoğunluğuna sahip stok 90 nm boyutundaki manyetit çözeltisinden klasik prosedürde 0.5 ml olarak altınla kaplama işlemi gerçekleştirilmektedir. Bu stoktan 1 ml ve 0.25 ml alınarak iki farklı daha altın kaplı manyetit nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2.6.3 'de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumları birlikte verilmektedir. Çizelge 4.2.6.3' de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumundan elde edilen spektroskopi özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.2.6.3 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu

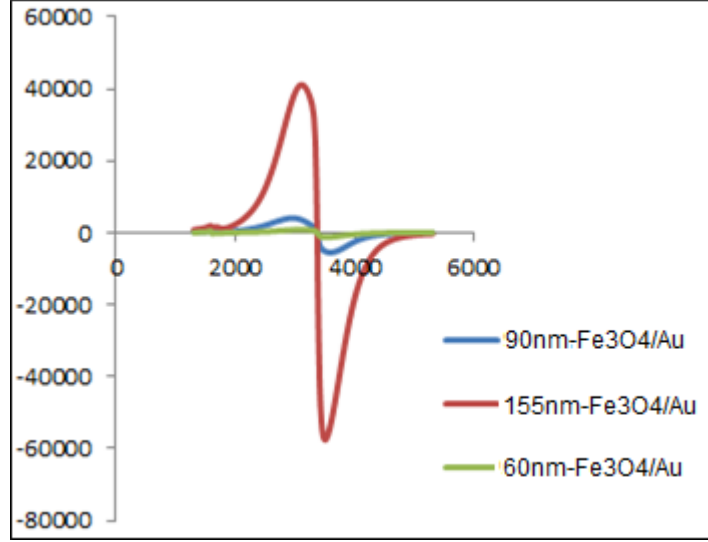
Şekil 4.2.6.3' de görüldüğü gibi 0.5 ml ve 0.25 ml manyetit nanopartiküllerini altın ile kapladıktan sonra neredeyse birbirine yakın genişlik ve asimetric tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Altın kaplamada manyetit partikül yoğunluğunu arttırıp 1ml olarak kullandığımızda ise denenen diğer partikül miktarlarının yaklaşık 4 katı genişliğinde ve asimetric tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Şekil 4.2.6.3' de görülen ESR spektrumlarında 1 ml manyetit nanopartikül kullanılarak sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartikülü, 0.5 ml ve 0.25 ml manyetit nanopartikül kullanılarak sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerden uygulanan manyetik alana karşı 8 kat daha büyük sinyal şiddeti göstermektedir. Bu durumun partikül miktarını 1 ml ye çıkarttığımızda manyetit nanopartikülleri kaplamada kullanılacak altın miktarının (HAuCl_4) yeterli gelmeyip ortamda çıplak manyetitin bulunmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Çizelge 4.2.6.3' de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin farklı miktarlarda kullanılıp altınla kaplanması sonucu yarı eğri genişliğinin (ΔH) azaldığı gözlenmiştir. Yarı eğri genişliğindeki bu azalma manyetik birimler arasına altının (HAuCl_4) girmesi nedeniyle etkileşimin azaldığını göstermektedir. Ayrıca 0.5, 1, 0.25 ml manyetit kullanılarak altınla kaplanan nanopartiküllerin g faktörleri sırasıyla 2.0020, 2.0062, 2.0008 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.6.3 Manyetit (Fe_3O_4) ve manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, farklı miktarlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopi özellikleri

Nanopartiküller	G	ΔH	Hr
Manyetit (Fe_3O_4)	2.0932	876	3210
0.5 ml Fe_3O_4 Au- Fe_3O_4	2.0020	641	3359
1 ml Fe_3O_4 Au- Fe_3O_4	2.0062	673	3351
0.25 ml Fe_3O_4 Au- Fe_3O_4	2.0008	634	3359

Bu parametrelerden farklı olarak ortalama partikül boyu 60, 90, 155 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülü kullanılarak üç farklı boyutta manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül (Fe_3O_4 /Au) sentezlenmiştir. Şekil 4.2.6.4 'de farklı boyutlarda manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumları birlikte verilmektedir. Çizelge 4.2.6.4 'de manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün, farklı boyutlarda manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumundan elde edilen spektroskopi özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.2.6.4 Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün boyutlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ESR spektrumu

Şekil 4.2.6.4' de görüldüğü gibi 60 nm boyutunda ($30 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda) manyetit nanopartikülleri altın ile kapladıktan sonra (80 nm boyutuna ulaşmıştır) çok zayıf bir rezonans eğrisi göstermektedir. Hem çıplak manyetit konsantrasyonunun az olması hem de kalın altın kabuk oluşumu (20 nm) nedeniyle ESR spektrumunda çok zayıf bir manyetit şiddet göstermiştir 155 nm boyutunda ($200 \mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda) manyetit nanopartikülleriyle sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ nanopartikülleri (160 nm boyutunda), 90 nm boyutunda manyetit nanopartikülleriyle sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ nanopartiküllerine (95 nm boyutunda) göre çok fazla genişlikte asimetrik tek çizgili bir rezonans eğrisi göstermektedir. Manyetitin boyu büyükse manyetik özelliğide büyük olan bu partikülün altınla kaplanmasıyla da manyetik özelliği 80 ve 95 nmlik altın kaplı manyetit partiküllerinden daha fazladır (Şekil 4.2.6.2) (Sayar, 2010). Şekil 4.2.6.4' de görülen ESR spektrumlarında 155 nm boyutunda manyetit nanopartikülleriyle sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ nanopartikülleri, 90 nm boyutunda manyetit nanopartikülleriyle sentezlenen $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ nanopartiküllerine göre uygulanan manyetik alana karşı 10 kat daha büyük sinyal şiddeti göstermektedir.

Çizelge 4.2.6.4' de görüldüğü gibi manyetit nanopartiküllerinin farklı boyutlarda kullanılıp altınla kaplanması sonucu yarı eğri genişliğinin (ΔH) azaldığı gözlenmiştir. Yarı eğri genişliğindeki bu azalma manyetik birimler arasına altının

(HAuCl₄) girmesi nedeniyle etkileşimin azaldığını göstermektedir. Ayrıca 90, 155, 60 nm boyutunda manyetit kullanılarak altınla kaplanan nanopartiküllerin g faktörleri sırasıyla 2.0020, 1.9961, 1.9970 olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.2.6.4 Manyetit (Fe₃O₄) ve manyetit (Fe₃O₄) nanopartikülünün farklı boyutlarda kullanılmasıyla sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin spektroskopik özellikleri

Nanopartiküller	G	ΔH	Hr
Manyetit (Fe ₃ O ₄)	2.0932	876	3210
95 nm Au- Fe ₃ O ₄	2.0020	641	3359
160 nm Au- Fe ₃ O ₄	1.9961	392	3366
80 nm Au- Fe ₃ O ₄	1.9970	391	3366

4.2.7. UV/Vis Absorpsiyon Spektrumu Analizi

Tez kapsamında bölüm 3.2.2' de anlatılan altın kaplama prosedüründeki altın tuz [HAuCl₄] miktarı, tri sodyum sitrat miktarı, manyetit partikül miktarı farklı konsantrasyonlarda kullanılmış ve altın kabuk oluşumuna etkileri UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi ile incelenmiştir. Bu parametrelere ek olarak farklı boyutlardaki manyetit nanopartiküllerin üzerine altın kabuk oluşumu da aynı analiz yöntemiyle incelenmiştir.

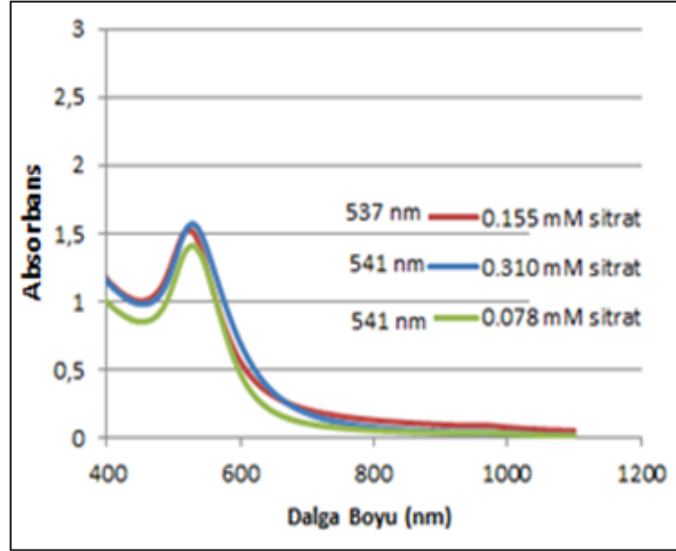
Çizelge 4.2.7' da manyetit üzerine altın kaplama deneysel prosedüründe kullanılan parametreler ve UV/Vis absorpsiyon spektrumu analiz sonucu plasmon özellikleri verilmiştir.

Çizelge 4.2.7 Farklı parametrelerde sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerin özellikleri

Fe ₃ O ₄ çapı (nm)	Partikül Miktarı (ml)	Sitrat Miktarı (mM)	Altın Tuzu Miktarı (mM)	Fe ₃ O ₄ /Au çapı (nm)	Heterojenlik indeksi (PI)	λ _{max} (nm)
90	0.5	0.155	12	95.7	0.195	537
90	0.5	0.310	12	105	0.233	541
90	0.5	0.078	12	105	0.444	541
90	0.5	0.155	24	165	0.373	545
90	1	0.155	12	91.2	0.370	538
90	0.25	0.155	12	110	0.230	540
55	0.5	0.155	12	80	0.402	554
155	0.5	0.155	12	160	0.207	540

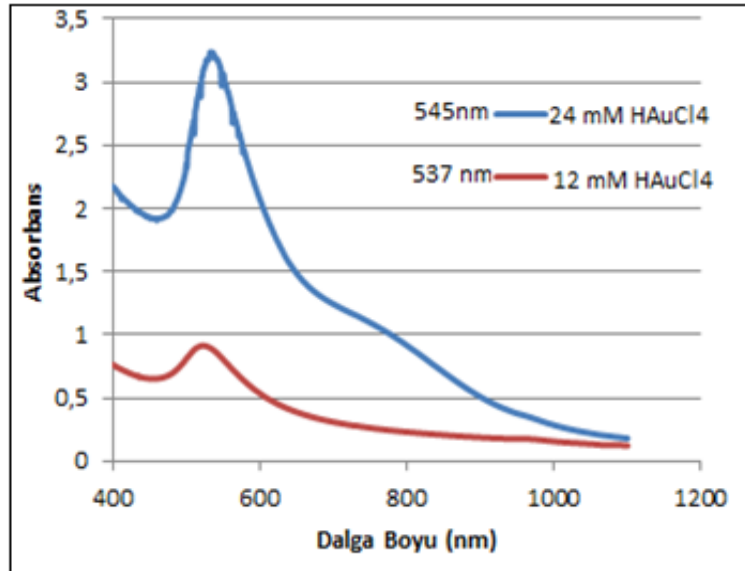
Çizelge 4.2.7' de görüldüğü gibi sekiz farklı Fe₃O₄/Au nanopartikülü sentezlenmiştir. Bunlardan ilki bölüm 3.2.2' de anlatılan prosedürdeki malzeme miktarlarına göre sentezlenmiştir.

İkinci ve üçüncü sırada sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartikülleri yine aynı deneysel reçete fakat sitrat miktarının iki katı (0.310 mM) ve yarısı (0.078 mM) konsantrasyonları kullanılarak sentezlenmiştir. Sitrat miktarının bu farklı konsantrasyonlarında aynı boyda Fe₃O₄/Au (105 nm) nanopartikülü sentezlenmiştir ve radyal plasmon dalga boyunda da aynı artış (sağa kaydığı) görülmüştür. Şekil 4.2.7.1' de görüldüğü gibi her iki değişimde de 541 nm dalga boyunda plasmon vermiştir, fakat alınan absorbans değeri bu dalga boyunda 0.310 mM kullanıldığında artmış, 0.078 mM kullanıldığında azalmıştır. Dalga boyundaki kaymanın kaplanma sonucu boyutun artmasıyla ilgili olduğu düşünülmüştür.



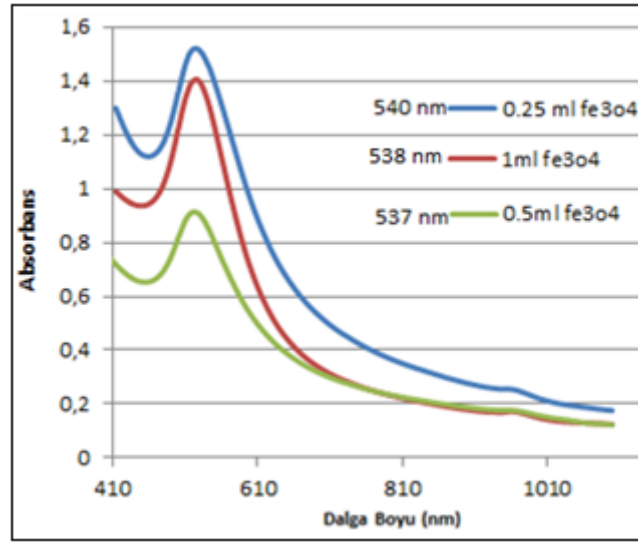
Şekil 4.2.7.1 Farklı sitrat derişimlerinde sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları

Çizelge 4.2.7' de görüldüğü gibi bölüm 3.2.2' de anlatılan prosedürdeki altın tuz [HAuCl₄] miktarı iki katına çıkartılarak Fe₃O₄/Au nanopartikülü sentezlenmiştir. Partikül boyutu 95.7 nm' den 165 nm' ye çıkmıştır. Altın kabuk oluşumundaki bu artış radyal plasmon dalga boyunda artmasına (sağa kaydığı) ve alınan absorpsiyon değerinin de artmasına sebep olmuştur. Kullanılan altın tuzunun artmasıyla altın kabuk oluşumu da artmış ve dalga boyu 537 nm den 545 nm ye artmıştır (Şekil 4.2.7.2).



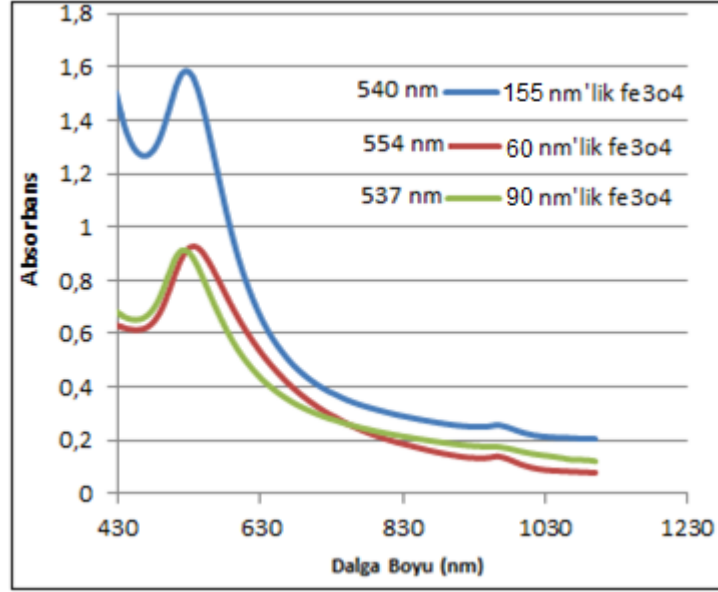
Şekil 4.2.7.2 Farklı altın tuz [HAuCl₄] derişimlerinde sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları

Bölüm 3.2.2' de anlatılan reçetedeki partikül miktarı (0.5 ml) da 1ml ve 0.25 ml olarak farklı oranlarda kullanılarak Fe_3O_4/Au nanopartikülleri sentezlenmiştir. Partikül miktarı iki katına çıkartıldığında 91.2 nm boyutuna sahip ve 538 nm dalga boyunda plasmon verirken, partikül miktarına yarıya indirildiğinde 110 nm boyutunda ve 540 nm dalga boyunda plasmon vermiştir (Şekil 4.2.7.3). Fe_3O_4/Au nanopartiküller sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermektedirler. Şekil 4.2.7.3'de görüldüğü gibi Fe_3O_4/Au nanopartiküllerin altın kabuk kalınlığı arttıkça radyal plasmon dalga boylarında arttığı görülmüştür (Çizelge 4.2.7).



Şekil 4.2.7.3 Farklı manyetit nanopartikül miktarları kullanılarak sentezlenen Fe_3O_4/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları

Son olarak denenen parametre farklı manyetit boylarının Bölüm 3.2.2' de anlatılan deneysel prosedüre göre altınla kaplanmasıdır. Aynı miktarda altın tuzu [$HAuCl_4$] kullanıldığından küçük boy manyetit nanopartikülün yüzeyi daha kalın bir altın tabaka ile kaplanırken büyük boy manyetit daha ince bir altın tabaka ile kaplanmıştır. Dolayısıyla 60 nm lik manyetit altınla kaplandıktan sonra 80 nm boyutuna ulaşarak 554 nm dalga boyunda plasmon verirken, 155 nm lik manyetit altınla kaplanma sonucu 160 nm boyutuna ulaşmış ve 540 nm dalga boyunda plasmon vermiştir (Şekil 4.2.7.4).



Şekil 4.2.7.4 Faklı boy manyetit nanopartikül kullanılarak sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin UV/Vis absorpsiyon spektrumları

Lin ve arkadaşları altın kaplı manyetit nanopartiküllerin karakterizasyonlarına dair yaptıkları çalışmada UV/Vis absorpsiyon spektrum analizlerinde altın nanopartiküllerin absorpsiyon pikleri maksimum 528 nm'de görülürken altın kaplı manyetit nanopartiküllerin absorpsiyon pikleri maksimum 560 nm'de görülmekte olduğunu rapor etmişlerdir. Tez kapsamında yapılan çalışmada denenen tüm parametrelerde görüldüğü gibi absorpsiyon batlarının tümü 528 nm'den yukarıda pik vermektedir. Buna göre manyetit partiküllerin altınla kaplandığı düşünülebilir (Lin, 2001).

4.3. Katyonik Altın Kaplı Manyetit Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

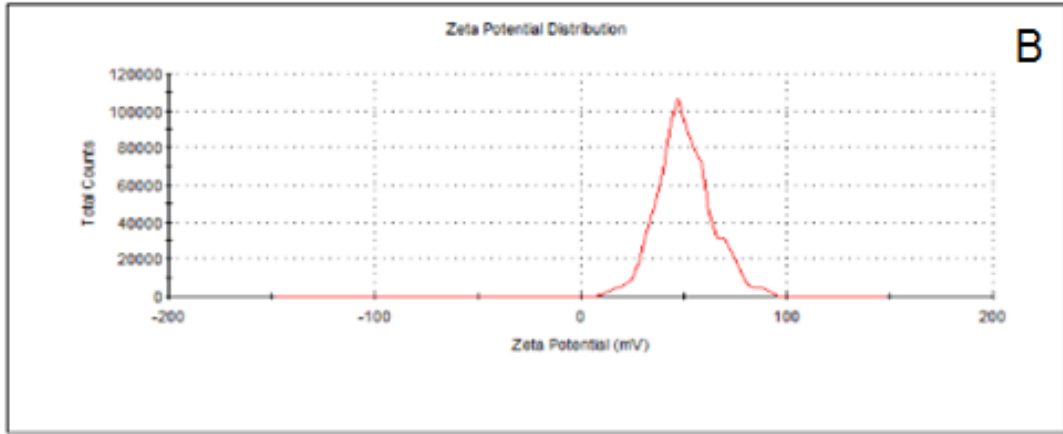
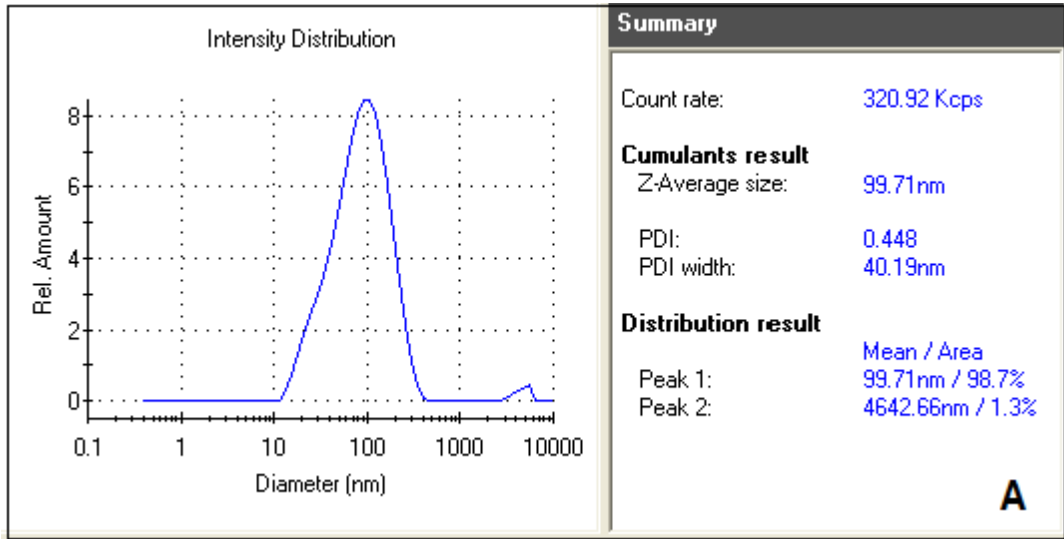
4.3.1. Zeta Sizer ve Potansiyel Analizi

Tez kapsamında sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartiküller transfeksiyon amaçlı kullanılacağından negatif yüklü plasmit DNA ile etkileşebilmesi için katyonik özellik göstermesi gerekmektedir. Öncesinde sentezlenmiş olan altın kaplı manyetit nanopartiküllere Bölüm 3.3'de anlatılan deneysel prosedürle katyonik özellik kazandırılmaya çalışılmıştır. Bunun için Çizelge 4.3.1'de görüldüğü gibi 2-aminoethantiyol çözeltisinin konsantrasyonu ilk başta düşük tutulup denemeler yapılmış fakat istenilen pozitif yük yoğunluğuna sahip partikül elde edilememiştir. 2-aminoethantiyol çözeltisinin konsantrasyonu 20 mM ile 1 M arası denenmiş olup

literatüre en yakın değer Çizelge 4.3.1’de görüldüğü gibi 213 mM 400 µl 2-aminoethantiyol çözeltisi kullanımıyla elde edilmiştir (Niidome 2004). Hücre kültürü çalışmalarında 213 mM 400 µl 2-aminoethantiyol çözeltisi kullanımıyla sentezlenen katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküller seçilmiştir. Çizelge 4.3.1’de görüldüğü gibi bu partiküllerin zeta potansiyel ölçümü sonucu yük yoğunluğu $+36.7 \pm 8.18$ mV çıkmıştır. Zeta sizer ile boyut ölçümü sonucu 99.71 nm (PDI: 0.448) bulunmuştur (Şekil 4.3.1A). Şekil 4.3.1B’de hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak $+36.7$ mV yük yoğunluğuna sahip partikülün zeta potansiyel grafiği verilmiştir.

Çizelge 4.3.1 Denenen 2-aminoethantiyol çözeltileri ve elde edilen zeta potansiyel sonuçları

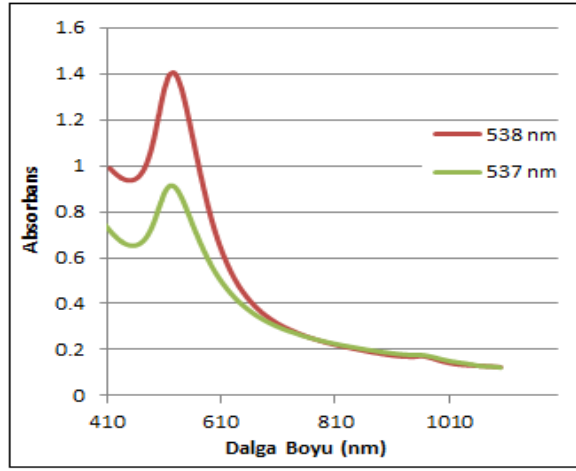
2-aminoethantiyol Molaritesi	2-aminoethantiyol Miktarı (µl)	zeta potansiyel (mV)
20 mM	10	-30
20 mM	20	-28
20 mM	40	-26
20 mM	60	-23
20 mM	400	-5.3
40 mM	200	-22
40 mM	400	-26
40 mM	800	-27
80 mM	200	-32.7
80 mM	400	-30
80 mM	800	-29.9
100 mM	200	-27.5
100 mM	400	-27.2
100 mM	800	-26.2
213 mM	100	+4.54
213 mM	200	+9.4
213 mM	400	+36.7
416 mM	100	-1
416 mM	200	+12.4
1M	50	+10.8



Şekil 4.3.1 Hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak partikülün boyut (A) ve zeta potansiyel grafiği (B)

4.3.2. UV/Vis Absorpsiyon Spektrumu Analizi

Tez kapsamında sentezlenen ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak altın kaplı manyetit nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi 537 nm dalga boyunda pik vermiştir. 2 aminoethantiyol molekülleri altın yüzeye bağlandığında ise 538 nm dalga boyunda pik vermiştir. Dalga boyundaki kaymaya bakarak moleküllerin yüzeye bağlandığını söyleyebiliriz. Şekil 4.3.2'de görüldüğü gibi altın kaplı manyetit nanopartikülün ve katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi verilmiştir.



Şekil 4.3.2 Altın kaplı manyetit nanopartikülün (yeşil) ve katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülün (kırmızı) UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi

4.4. Nanopartikül - pDNA Etkileşimi

4.4.1. Nanopartikül, pDNA ve Bunlarla Oluşturulan Konjugatların Zeta Potansiyel ve Boyut Analizi

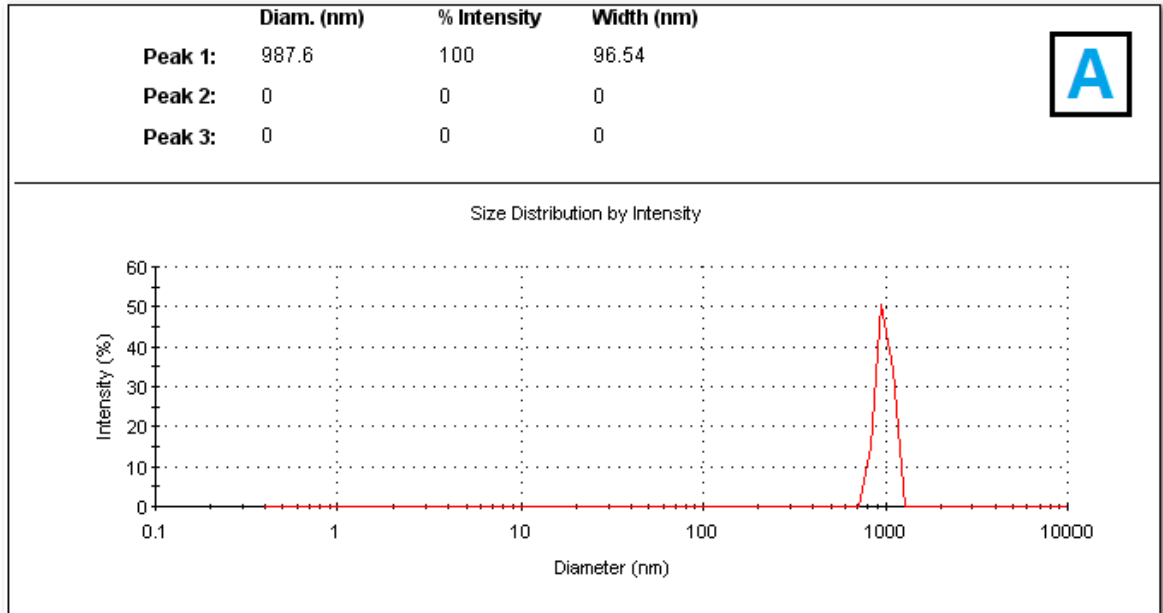
Çalışmada 2-aminoethantiyol ile katyonik özellik kazandırılmış altın kaplı manyetit nanopartiküller kullanılmıştır. Elde edilen partikül, plazmid DNA ve bunlarla oluşturulmuş konjugatların boyut ölçümü ve zeta potansiyel sonuçları Çizelge 4.4.1'de verilmiştir.

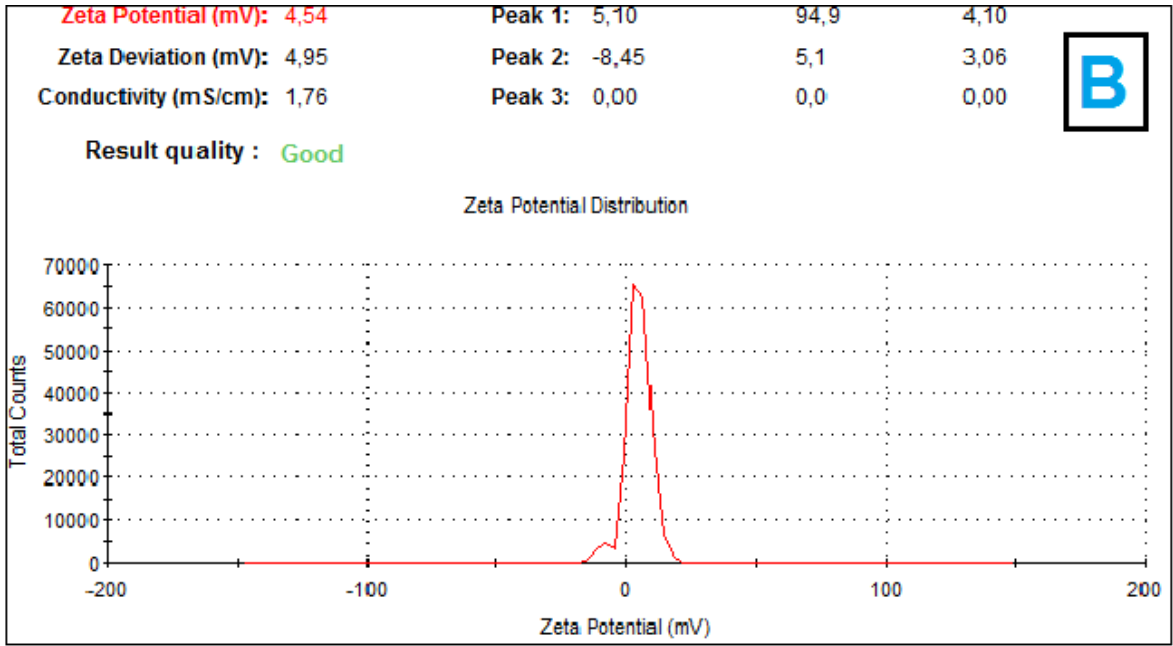
Çizelge 4.4.1 Katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülün, plazmid DNA'nın, partikül/pDNA konjugatlarının büyüklükleri ve zeta potansiyel yükleri

Konjugat (w/w) (partikül/pDNA)	Ortalama boy (nm)	PDI	Zeta potansiyel (mV) standart sapma
1:1	850 (0.983)		+1.7 ± 0.46
2:1	954 (0.690)		+2.6 ± 1.6
4:1	997.6 (0.613)		+4.54 ± 7.5
8:1	1175 (0.632)		+2.5 ± 7.3
16:1	1380 (0.519)		+1.45 ± 4.9
pDNA	759.8 (0.891)		-21 ± 1.6
Kullanılan partikül	103 (0.293)		+36.7 ± 8.18

Mililitresinde 100 µg partikül içeren stok bir çözelti hazırlanmıştır. Partiküller UV ışık altında 15 dk steril edilmiştir. Bu çözülden 2, 4, 8, 16, 32 µg partikül ayrı tüplere alınmış ve 0.15 M'lık NaCl ile son hacimleri 1 ml'ye tamalanmıştır. Ayrı tüplerde her birinde 2 µg olan plazmid çözeltileri alınıp son hacimleri 0.15 M'lık NaCl ile 1 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan plazmid çözeltileri partikül çözeltileri üzerine alınıp 30 dakika oda sıcaklığında konjugat oluşumunun sağlanması amacıyla bekletilmiştir. Daha sonra 25°C'de Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılarak konjugatların potansiyel ve boyut ölçümleri yapılmıştır.

Çizelge 4.4.1'e göre plazmid DNA negatif yüklü iken, pozitif yüklü partiküllerle oluşturulan konjugatların tümü pozitif yüklü bulunmuştur. Gen aktarımında konjugatın negatif yüklü hücre duvarını geçebilmesi için pozitif yüklü olması istenir. Oranın daha fazla artması pozitif yükü daha fazla artırmamakta, buna karşın yığılmalara ve hücreler üzerinde toksisiteye neden olabilmektedir. Dolayısıyla çalışmanın gen transferi bölümünde hazırlanan tüm konjugatlar pozitif özellik gösterdiğinden hepsinin transfeksiyon etkinliği incelenmiştir. Konjugatlar arasında en yüksek pozitif yük yoğunluğuna sahip 4:1 (w/w) oranındaki konjugatın boyutu 997.6 nm (0.613) ve zeta potansiyel sonucu $+4.54 \pm 7.5$ milivolt olarak Şekil 4.4.1'de verilmiştir.





Şekil 4.4.1.En yüksek yük yoğunluğuna sahip partikül/pDNA konjugatının boyut (A) ve zeta potansiyel (B) grafikleri

Polikasyon/ plazmid DNA komplekslerinin (farklı polikasyonlarla) boyutları ve transfeksiyon yetenekleri araştırılmıştır. Tek başına genelde plazmid DNA yaklaşık 1000 nm (oligonukleotid sayısına göre) boyutundadır. Pozitif yüklü polikasyon plazmid DNA ile kompleks oluşturduğunda, plazmid DNA'nın boyutlarını 40-200 nm arası bir boyuta çekmektedir (bu boyuta polimerin kendisinde dahildir). Burada görülen kondenzasyon plazmid DNA 'nın büyük boyuttan çok aşağı boyutlara çekilmesi sağlandığı rapor edilmiştir (Bouitris, 1997).

Bu nanopartiküller, "Deneysel Çalışmalar" bölümünde ayrıntılı olarak sunulduğu gibi, GFP plazmid DNA ile konjugatları hazırlanmıştır ve bunların Zeta Sizer ile boyutları ve zeta potansiyelleri (yükleri) ölçülmüştür. Sonuçlar Çizelge 4.4.1'de sunulmuştur. Kullanılan GFP plazmid DNA'nın daha önce belirtildiği üzere zeta Sizer ile ölçülen boy ve zeta potansiyeli (yükü), sırasıyla 770 nm ve -21 mV dir.

Çalışma kapsamında katyonik altın kaplı manyetit nanopartikülleri ile GFP plazmidini ile hazırlanan konjugatların büyüklük ve zeta potansiyel yükleri belirlenirken Çizelge 4.4.1'den görüldüğü üzere plazmid konsantrasyonu sabit tutulup, partikül konsantrasyonu artırılarak ölçümler yapılmıştır. 1:1 (2 µg partikül/2 µg plazmid

DNA) oranında partikül/ plazmid DNA konjugatının boyu 850 nm ve zeta potansiyeli +1.7'dir.

Partikül konsantrasyonunu 2, 4, 8, 16 katına çıkardığımızda konjugat boyu büyümüş ve transfeksiyon için gerekli zeta potansiyeli kaybedilmemiştir. Bu konjugatlar ile Hela hücrelerinde transfeksiyon çalışmaları yapılmıştır.

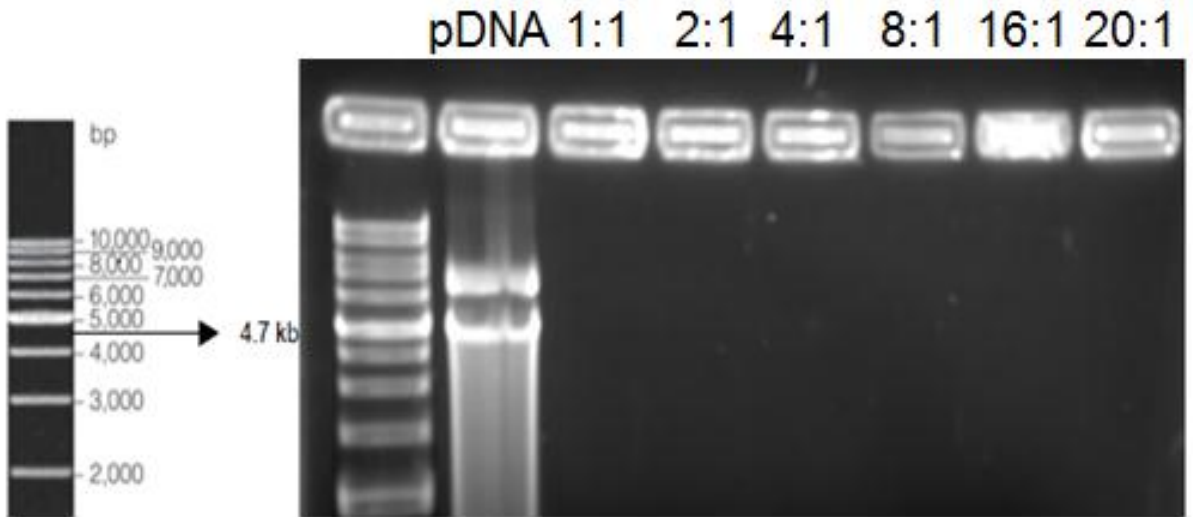
Niidome ve arkadaşları 100 nm boyutunda $+36.2 \pm 15$ mV yük yoğunluğuna sahip katyonik altın nanopartikülleri sentezlemişler ve bunları plazmid DNA ile etkileştirdiklerinde -33.2 ± 18 mV yük yoğunluğu ölçmüşler (Niidome, 2004), Zhang ve arkadaşları ise 50 nm boyutunda $+31.8 \pm 8.2$ mV yük yoğunluğunda altın nanopartikülleri sentezlemişler ve pDNA ile kompleks oluşturduklarında -15.2 ± 7.2 mV yük yoğunluğu ölçmüşlerdir (Zhang, 2007). Tez kapsamında sentezlenen altın kaplı manyetit nanopartiküllerle oluşturulan konjugatların pozitif yük yoğunluğunun devam ettiği görülmüştür.

4.4.2. Nanopartikül - pDNA Etkileşimini Gösteren Elektroforez Analizi

Tez kapsamında transfeksiyon amaçlı kullanılacak pDNA Qiagen midi plasmit saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen plazmidler, marker ile yürütülerek agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Aynı zamanda saflaştırılmış pDNA farklı miktarlarda partiküller ile etkileştirilerek konjugat oluşumu kontrol edilmiş ve jel elektroforez görüntüsü Şekil 4.4.2'de verilmiştir.

Farklı baz çifti büyüklüklerindeki nükleik asitlerin jeldeki yerini belirlemek amacıyla kullanılan DNA merdiveni, elektroforez resimlerinin en solunda görülen sütundur ve bantların yerleri işaretlenmiş olarak orijinal hali Şekil 4.4.2' te verilmiştir. Buna göre tez çalışmasında kullanılan 4.7 kb büyüklüğündeki plazmid, Şekil 4.4.2 üzerinde okla gösterilen, yukarıdan 6. sıradaki batların biraz aşağısındaki noktaya denk gelmelidir. plazmid bandı üzerinde gözlenen beyazlık şeklinde fotoğrafa yansıyan görüntü ise denature genomik kontaminasyonuna işaret etmektedir. Bunların haricinde DNA marker'a ait aşağıdan 6. ve 7. bantlar arasındaki bölge hizasında (4.7 kb), örnek sütunlarında gözlenen plazmidbandı süpersarmal (sc) formu gösterirken, bu bandın hemen üzerinde gözlenen ince bant genelde açık halkasal (oc) forma aittir.

Jelde 3. kuyucuktan itibaren farklı miktarlarda partikül ile etkileştirilmiş partikül/pDNA konjugatları yüklenmiştir. Farklı miktarlarda kullanılan nanopartiküllerin saflaştırılan plazmidleri ne derecede tuttuğu araştırılmıştır. Partikül miktarları 2, 4, 8, 16, 32, 40 µg (100 µg/ml) olarak 2 µg plazmit ile karıştırılıp oda sıcaklığında konjugat oluşumu için yarım saat bekletilmiştir. Yarım saatin sonunda oluşturulan konjugatlar jel kuyucuklarına yüklenmiş ve sonuç olarak UV ışık altında etidyum bromür ile görünür hale gelen jeller fotoğraflanmıştır. Şekil 4.4.2'deki jel fotoğrafına göre 3, 4, 5, 6, 7, 8. Kuyucuklardaki partiküller pDNA'yı bırakmadığından kuyucukların altınada hiç bat gözlemlenmemiştir. Partiküllerin pDNA'yı tuttuğu ve konjugat oluşumunun sağlandığı görülmektedir.



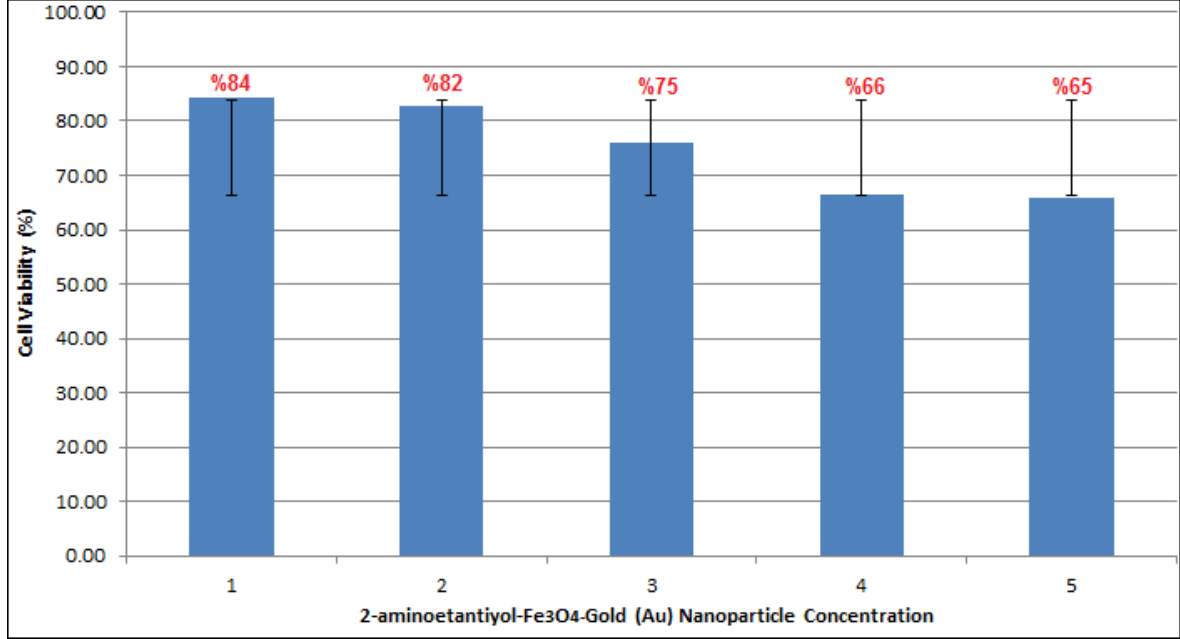
Şekil 4.2.2. GFP plasmitinin ve partiküllerle oluşturulan konjugatlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri.

4.5. Sitotoksitite Testleri

4.5.1. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Partiküllerin ve pDNA ile Oluşturulan Konjugatların Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkileri

Öncelikle tez kapsamında hücre çalışmalarında kullanılacak partiküllerin hücrelere hangi miktarlar da ne kadar zarar verdiğini anlamak amacıyla bir MTT testi yapılmış ve bu bölüm 3.6.1'de bu test anlatılmıştır. Genel toksik sınırı bulmak için yapılan bu teste ait hücre canlılığı Şekil 4.5.1.1'de verilmiştir. Burada 5 µg/ml

partikül kullanıldığında %84, 10 µg/ml kullanıldığında %82, 20 µg/ml da %75, 30 µg/ml da %66 ve en üst sınır olarakta 40 µg/ml kullanıldığında %65 olarak %70'in altında bir hücre canlılığı saptanmıştır. Buradaki verilerden yola çıkılarak hücre çalışmalarında 20 µg/ml partikül konsantrasyonunun altında partiküller kullanılmıştır.



Şekil 4.5.1.1 Genel toksisite sınırını belirlemede kullanılan partikül miktarlarının hücre canlılığı üzerine etkisi; 1, 2, 3, 4, 5 numaralı sütunlar sırasıyla 5, 10, 20, 30, 40 µg/ml partikül konsantrasyonunun hücrelerde kullanımındaki sitotoksisiteyi vermektedir.

Belirlenen yeni partikül konsantrasyonları partikül sitotoksitesini az tutmak için 2, 4, 8, 16, 20 µg olarak belirlenmiş ve hücre çalışmalarında literatüre yakın değerler olarak bu miktarlar kullanılmıştır (Zhang, 2007). Jafari ve arkadaşlarının altın kaplı manyetit nanopartiküller ile yaptıkları MTT çalışmasında 24 saat sonunda hücre canlılığını yaklaşık %89-%90 bulmuşlardır. 48 saat sonunda hücre canlılığı %5-%10 azalmıştır. Altın kaplı manyetit nanopartiküllerin düşük konsantrasyonlarının biyoyumluluğunun iyi olup biyomedikal uygulamalar için kullanımlarının uygun olduğunu rapor etmişlerdir (Jafari, 2010).

4.5.2. Uygulanan Manyetik Alanın Hücre Canlılığı Üzerindeki Etkisi

Çalışmanın bu kısmında bölüm 4.5.1’de MTT testi ile belirlenen 20 µg partikül konsantrasyonu maksimum olarak kullanılmış ve partikül konsantrasyonları 2, 4, 8, 16, 20 µg olarak belirlenmiştir. Deneysel çalışmalar Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı gibi çalışmanın bu kısmında öncelikle 2, 4, 8, 16, 20 µg partikül olarak belirlenmiş konsantrasyonlar hücrelerle etkileştirilmiş farklı sürelerde, yüzeyi işlenmemiş ve yüzeyi işlenmiş mıknatıslar kullanılarak hücre canlılığı araştırılmıştır. Çizelge 4.5.2.1’de 2, 4, 8, 16, 20 µg olarak kullanılan katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin farklı manyetik alan sürelerinde, yüzeyi işlenmiş ve işlenmemiş mıknatıslar kullanarak hücre canlılığına etkileri verilmiştir.

Çizelge 4.5.2.1 Manyetik alan uygulama zamanına ve kullanılan mıknatısa göre manyetik partiküllerin toksisitesini gösteren tablo (SD ±2 olarak alınmıştır.).

Partikül miktarı(µg/ml)	Manyetik alan uygulanmamış			Manyetik alan uygulanmış (işlenmemiş mıknatıs)			Manyetik alan uygulanmış (işlenmiş mıknatıs)		
				5dk.	10dk	30dk	5dk.	10dk	30dk
0(kontrol)	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	98,8	97,5	98,3	98,1	96,6	97,5	95,4	93,2	92,6
4	98,2	97,4	96,5	96,2	89,8	88,6	88,3	84,1	82,7
8	91,3	89,9	88,7	83,7	80,3	81,2	80,6	76,8	74,9
16	85,1	84,6	82,5	76,4	71,8	71,6	74,2	66,4	66,9
20	83,4	80,9	78,2	71,6	64,4	62,5	63,8	54,2	52,8

2, 4, 8, 16, 20 µg olarak kullanılan katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerle 2 µg plazmid DNA ile etkileştirilip 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 plazmid/partikül oranlarında konjugatlar kullanılmıştır. Deneysel çalışmalar Bölüm 3.6.2’de anlatıldığı gibi hücreler üzerine eklenen bu partiküllere 10 dk manyetik alan uygulanmış ve kullanılan mıknatısın türüne göre bir sitotoksosite sonucu çizelge 4.5.2.2’de verilmiştir. Çizelge 4.5.2.1’e göre farklı sürelerde manyetik alan uygulamanın toksisite üzerine etkisine bakıldığında ise, 5 dakikalık manyetik alan uygulamanın toksik etkiyi manyetik alan uygulanmamış gruplara göre %5-10 arasında daha fazla toksisiteye neden olduğu saptanmıştır. Özellikle yüzeyi işlenmiş mıknatısla manyetik alan uygulandığında toksik etkide %10-15 arasında artış gözlenmiştir. Bu etki daha çok yüksek konsantrasyonlarda (16-20 µg/ml) açık olarak gözlenmiştir.

Çizelge 4.5.2.2 farklı mıknatıslarla 10 dak manyetik alan uygulanmış farklı oranlarda partikül/ plazmid DNA komplekslerinin toksisitesini gösteren tablo (SD \pm 2 olarak alınmıştır.).

Partikül/Plazmid oranı	Manyetik alan uygulanmamış	Manyetik alan uygulanmış (yüzeyi işlenmemiş mıknatıs)	Manyetik alan uygulanmış (yüzeyi işlenmiş mıknatıs)
0	100	100	100
1	100	98.4	97.2
2	97.5	95.6	92.1
4	95.8	91.2	86.7
8	93.6	85.9	83.2
10	89.2	79.4	74.8

Elde edilen bu iki tablodaki sonuçlara göre partikül toksisitesinde en önemli etkenlerden birinin partikül miktarı olduğu tesbit edilmiştir. İki tabloda da görüldüğü gibi partikül miktarı arttıkça hücre canlılığı azalmaktadır. Diğer önemli bir etken ise manyetik alan uygulanması olduğu gözlenmiştir. Manyetik alan demir içerikli partiküllerin kuyucuk tabanına çökmesini sağlayan bir kuvvet oluşturmaktadır. Bu da partiküllerin kuyucuk tabanında yapışık olan hücrelerin içerilerine girmelerini sağlayıcı bir etki yapmaktadır.

Çizelge 4.5.2.2'ye göre manyetik alan uygulandığında, uygulanmayan gruplara göre toksisitenin yaklaşık olarak %16 (20 μ g/ml konsantrasyonda) oranında arttığı gözlenmiştir. Özellikle yüzeyi işlenmiş mıknatıs kullanılarak yapılan deneylerde manyetik alan uygulanmayan gruplara göre toksisite %26 oranında artarken, yüzeyi işlenmemiş mıknatısla manyetik alan uygulanmış gruplara göre toksisitenin % 10 civarında arttığı gözlenmiştir.

Yüzeyi işlenmemiş mıknatısla manyetik alan uygulanmış gruplarda yapılan mikroskop incelemesinde partiküllerin belli bölgelerde kümeleştiği gözlenmiştir. Bunun sonucunda toksik etkinin kuyucuk içersinde sadece belli bölgelerde ortaya çıkmasına neden olduğu tahmin edilmektedir. Yüzeyi işlenmiş mıknatısla manyetik alan uygulanmış gruplarda partiküllerde kümeleşme olmadığı kuyucuk tabanının her noktasına partiküller yayıldığı için toksik etkinin diğerlerine göre daha fazla olmasının nedeni olarak tahmin edilmektedir.

Partikül /plazmid DNA komplekslerinin toksik etkisine bakıldığında ise tek başına partiküle oranla plazmid DNA'nın partiküllerin etkisini azalttığı net olarak gözlenmektedir. Bunun nedeninin plazmid DNA ile partiküller birleştiğinde

kompleks boyutlarının büyümesi sonucunda ve kümeleşme meydana geldiğinden hücre içerisine kompleksler giremediğinden ayrıca sadece belli bölgelere etki ettiğinden toksisitenin düşük olduğu tahmin edilmektedir. Plazmid DNA'nın toksisiteyi azaltıcı diğer bir etkisi ise partikülere bağlanarak partikül yüzeyinde bulunan amin gruplarını kapatması ve böylece partiküllerin negatif yüklü hücrelere tutunmasını azaltan etkisinden dolayı olduğu tahmin edilmektedir.

4.6. Nanopartiküller ile Gen Aktarımı ve Ekspresyon

4.6.1. Floresan Boya ile İşaretli Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküllerin Hela Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyon

DeneySEL çalışmalar Bölüm 3.7.1'de anlatılan çalışmada FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 30 dk manyetik alan uygulamanın sonucunda hücreye ne oranda girdiği çizelge 4.6.1.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.6.1.1 FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 30 dk manyetik alan uygulaması sonucu Hela hücrelerine girme yüzdeleri (%)

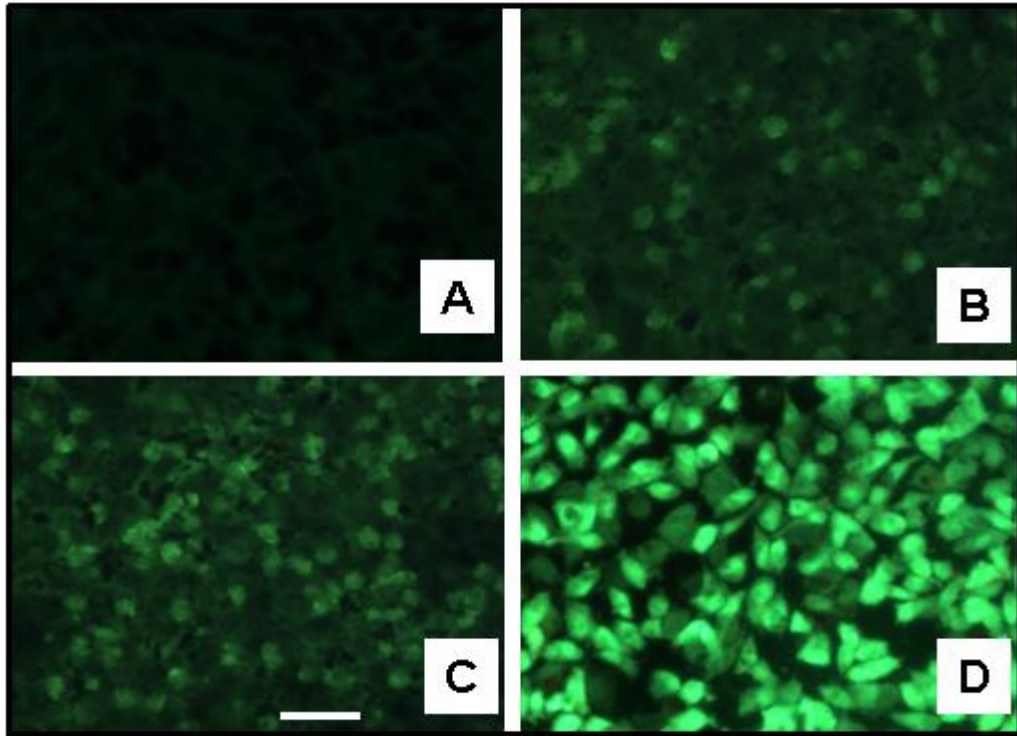
Partikül miktarı	Manyetik alan uygulanmamış	Manyetik alan uygulanmış(yüzeyi işlenmemiş miktatis)	Manyetik alan uygulanmış(yüzeyi işlenmiş miktatis)
2	4±1	5±2	12±3
4	11±2	13±2	21±3
8	29±3	26±3	42±4
16	36±5	41±4	68±5
20	47±4	53±4	89±7

Çizelge 4.6.1.1'e göre 2 µg kadar düşük bir oranda bile partiküllerin hücreye giriş oranlarında farklılıklar göze çarpmaktadır. Yüzeyi işlenmiş miktatisla (yönlendirilmiş) partiküllerin hücrelere girişi, manyetik alan yokluğunda ve yüzeyi işlenmemiş miktatisla manyetik alan uygulamasına göre artmaktadır. Çizelgede aynı zamanda partikül miktarının artmasına bağlı partiküllerin hücreye girişinde artma meydana gelmektedir. Kullanılan her partikül miktarında dahi en fazla partikül girişi yönlendirilmiş miktatislarla olmaktadır.

Sonuç olarak yönlendirilmiş manyetik alan uygulamasının kültür kabındaki hücrelere daha çok sayıda girdiği tespit edilmiştir (Çizelge 4.6.1, Şekil 4.6.1.1). Sadece manyetik alan uygulanması partiküllerin belli bölgelerde bir araya

toplanmasına neden olmakta ve mikroskop incelemesinde bu topaklanmalar gözlenmektedir. Manyetik alan uygulanmamış grupta ise az da olsa bu tipte toplanmalar gözlemlenmiştir.

Şekil 4.6.1.1' de HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. D'de yönlendirilmiş mıknatısla uygulanan manyetik alan sonucu partiküllerin hücelere daha yüksek oranlarla girdiği ve verdikleri ışımının net belirgin olduğu görülmektedir. C'de yüzeyi işlenmemiş (yönlendirilmemiş) mıknatısla manyetik alan uygulaması sonucu partiküllerin hücreye girişinin yönlendirilmemiş göre daha az ve ışım daha dağınık ve sönük olduğu görülmektedir. B'de ise manyetik alan uygulamasının hiç olmadığı durumda partiküllerin hücelere diğer iki gruba göre daha az oranda girdiği ışımın sönük olduğu görülmektedir. A'da sadece floresan boya ile etkileştirilmiş hücrelerin fotoğrafı verilmiş ve hiçbir ışımın olmadığı görülmüştür.



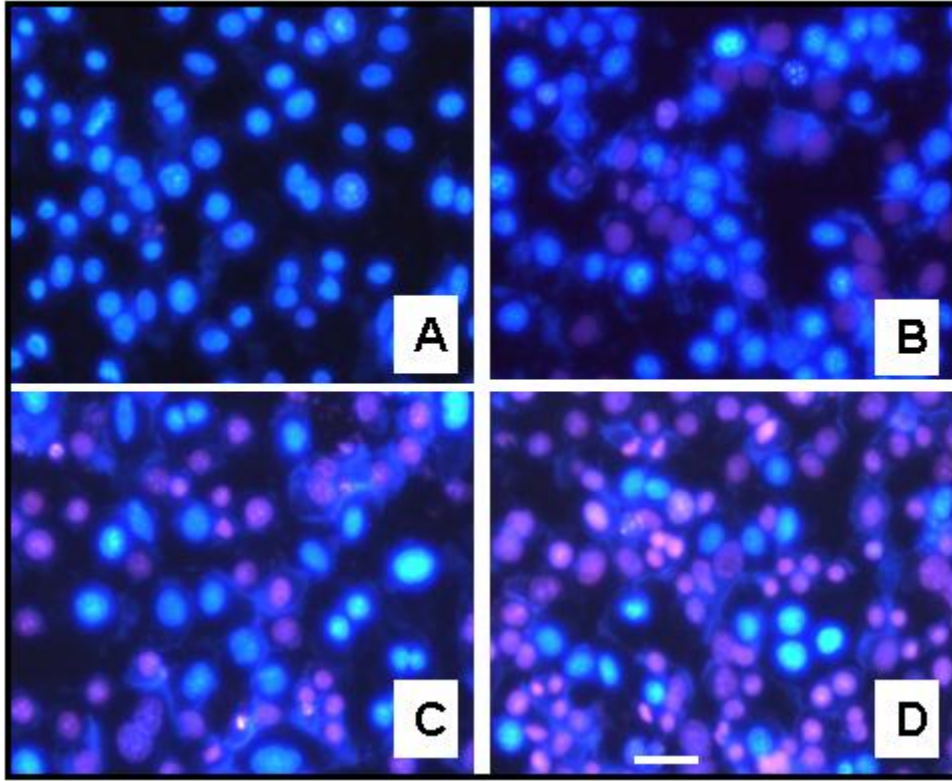
Şekil 4.6.1.1 HeLa hücrelerinin floresan mikroskop fotoğrafları. A) Sadece floresan boya ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, B) Manyetik alan uygulanmamış partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, C) 30 dak. Manyetik alan uygulanmış partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 30 dak. yönlendirilmiş manyetik alan uygulanmış partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri. Yeşil olanlar floresan işaretli partikülleri içersine almış hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskobun FITC filtresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir.

Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı gibi floresan işaretli katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin hücreye verdiği zararı (Nekrozu: bir diğer hücre ölüm şekli olup hücrelerin dışarıdan gelen etkilerden aldıkları hasar sonucu ölüme gitmesi.) belirlemek için ikili boyama metodu kullanılmıştır. Bu bölümde yine farklı miktarlarda floresan işaretli partiküller hücrelerle etkileştirilip manyetik alan uygulamadan, 10 dk yönlendirilmiş manyetik alan uygulayarak ve 10 dk yönlendirilmemiş manyetik alan uygulayarak olmak üzere 3 farklı şekilde uygulama yapılmıştır. Bölüm 3.7.1’de anlatıldığı gibi ikili boyama metoduyla hücreler boyanmıştır. Şekil 4.6.1.2’de görüldüğü gibi ikili boyama yöntemiyle (Hoesth 33342 ve propodium iyodite(PI) boyaarı içeren ikili çalışma solusyonu) boyanan hücrelerde Hoesth canlı hücrelerin çekirdeklerini maviye, PI ise ölü veya hücre zarı hasar görmüş hücrelerin çekirdeklerini kırmızı renge boyamaktadır. 10 dk manyetik alan uygulanması sonucu hücrelerdeki %nekrozu gösteren veriler Çizelge 4.6.1.2’de verilmiş olup canlı ve nekroza uğramış hücrelerin floresan mikroskop fotoğrafları Şekil 4.6.1.2’de verilmiştir.

Çizelge 4.6.1.2 FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 10 dk manyetik alan uygulaması sonucu Hela hücrelerinde meydana getirdikleri nekrozun yüzdeleri (%)

Partikül miktarı (µg/ml)	Manyetik alan uygulanmamış	Manyetik alan uygulanmış (yüzeyi işlenmemiş miktatisla)	Manyetik alan uygulanmış (yüzeyi işlenmiş miktatisla)
0	1±1	2±1	1±1
2	2±1	4±1	7±1
4	6±2	8±2	11±2
8	9±2	12±2	17±2
16	12±2	18±2	26±3
20	25±3	38±2	46±4

Çizelge 4.6.1.2’de 10 dak. manyetik alan uygulanmış grupların sonuçları verilmiştir. Nekrotik etkinin partikül miktarı ile orantılı olarak arttığı tesbit edilmiştir. Yüzeyi işlenmiş (yönlendirilmiş) miktatisla manyetik alan uygulamanın hücrelerde nekrotik etkinin yüksek oranda artmasına neden olduğu tesbit edilmiştir (Şekil 4.6.1.2). Sadece yüzeyi işlenmemiş miktatisla manyetik alan uygulanmış grupta özellikle nekrotik etkinin belli bölgelerde kümelenildiği gözlenmiştir. Sonuç olarak yönlendirilmiş manyetik alan uygulamanın partiküllerin hücre içersine yüksek oranda ve daha fazla hücreye girmesini sağladığı söylenebilir. Buna bağlı olarak hücrelere yüksek miktarda partikül girmesinin nekrotik etkinin artmasına sebep olduğunu söylenebilir.

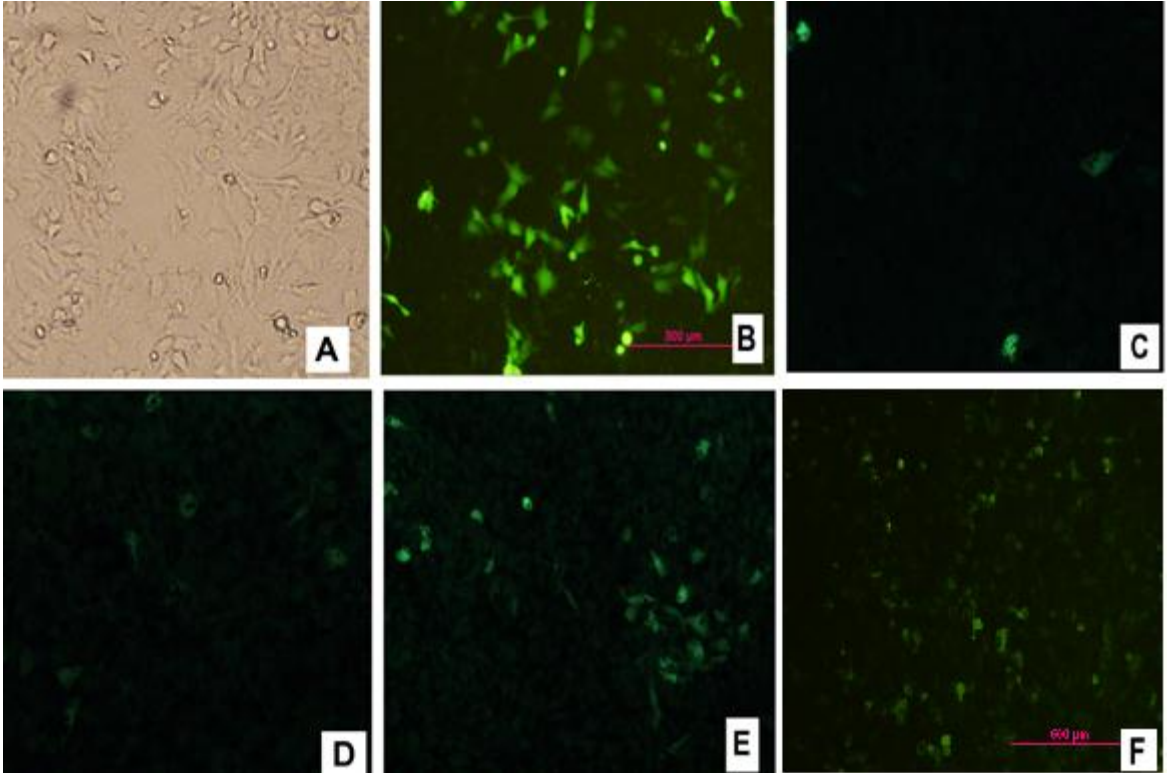


Şekil 4.6.1.2. İkili boyama ile boyanmış HeLa hücrelerinin floresan mikroskop fotografları. A) Patikül ile etkileştirilmemiş HeLa hücreleri (kontrol grubu), B) Manyetik alan uygulanmadan partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, C) 10 dk. yüzeyi işlenmemiş mıknatısla manyetik alan uygulayarak partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 10 dk. yönlendirilmiş manyetik alan uygulayarak partiküllerle etkileştirilmiş HeLa hücreleri. Mavi olan hücre çekirdekleri (Hoesth ile boyanmış) canlı hücreleri, Kırmızı olan hücre çekirdekleri (Propodium ile boyanmış) ölü veya hücre zarı hasar görmüş hücreleri göstermektedir. Fotoğraflar Floresan mikroskopun 480-520nm filitresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir.

4.6.2. Katyonik Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül/Plazmid DNA Konjugatlarının Hela Hücrelerine Aktarılması ve Ekspresyon

Yapılan çalışmada öncelikle GFP-pDNA miktarı sabit tutulup katyonik altın kaplı manyetit nanopartikül miktarı değiştirilerek konjugat oluşumu gerçekleştirilmiştir. Konjugat oluşum oranları (pDNA/partikül) 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:10 olarak belirlenmiştir. İlk olarak 200 µl transfeksiyon çözeltisi hazırlanmıştır. 2, 4, 8, 16, 20 µg olarak belirlenen beş farklı partikül miktarı stok partikül çözeltisinden ayrı ayrı ependorf tüplere alınıp üzerleri 0.15 M NaCl çözeltisi ile 100 µl'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde pDNA çözeltisinden 2 µg içerecek şekilde pDNA ayrı ayrı ependorf tüplere alınıp 100 µl'ye tamamlanmıştır. pDNA çözeltisi partikül çözeltisi üzerine aktarılıp 20 kez pipetle çekilip bırakılarak çözeltilerin karışımı sağlanmıştır. Pozitif kontrol olarak ticari in vitro transfeksiyon ajanı (TurboFect, Fermentas, EU) 2 µl

olarak kullanılmış ve ayrı bir ependorf tüpte bulunan 2 µg pDNA içeren çözelti üzerine eklenip son hacim 100 µl'ye tamamlanmıştır. Negatif kontrol olarak sadece 2 µg pDNA içeren 100 µl çözelti kullanılmıştır. Konjugat oluşumunu sağlamak amacıyla 30 dak oda sıcaklığında bekletilmiştir. Konjugat oluşumu sağlandıktan sonra önceden 10000 hücre olacak şekilde ekimi yapılmış ve plaktaki kuyucukları kaplamış Hela hücreleri üzerinden besi ortamı alınmıştır. 100 µl PBS tamponu ile hücreler yıkanmıştır. 15 dak hücreler üzerine bir şey eklenmeden 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Yeterince aç kalan Hela hücreleri üzerine oluşturulan konjugatları içeren transfeksiyon çözeltisi ve son olarak 200 µl besi ortamı eklenmiştir. 48 kuyucuklu plaka ikiye ayrılmıştır. İlk bölümüne manyetik alan uygulanmamıştır. İkinci bölüme partiküllerin hücreye girişinde etkin olduğu gösterilmiş (Bölüm 4.6.1) yüzeyi işlenmiş (yönlendirilmiş) mıknatısla manyetik alan uygulanmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan 4 saat sonra hücreler üzerindeki besi ortamı değiştirilmiştir. 48 saatin sonunda transfeksiyon etkinliği incelenmiştir.



Şekil 4.6.2.1 Gen aktarımı sonucu HeLa hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri, A) Kültüre edilmiş HeLa hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüsü, B) Ticari transfeksiyon ajanı kullanılmış pozitif kontrol grubu, C) Sadece GFP-pDNA

ile etkileştirilmiş HeLa hücreleri, D) 1:8 pDNA/partikül oranında manyetik alan uygulanmadan yapılan transfeksiyon denemesi, E) 1:8 pDNA/partikül oranında 15 dak manyetik alan uygulayarak yapılan transfeksiyon denemesi, F) 1:10 pDNA/partikül oranında 5 dak manyetik alan uygulayarak yapılan transfeksiyon denemesi. Yeşil hücreler GFP-pDNA (yeşil floresan proteini) ekspresyonu yapan hücreler. Fotoğraflar Floresan mikroskobun FITC filtresinde çekildi. Bar 45µm göstermektedir.

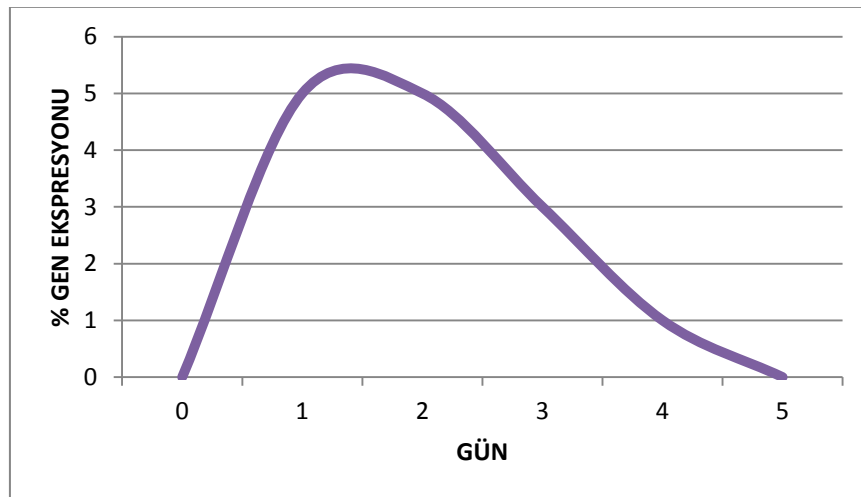
Yapılan çalışma sonucu elde edilen floresan mikroskopu görüntüleri Şekil 4.6.2.1'de verilmiştir. Şekil 4.6.2.1 A'da kültüre edilmiş Hela hücrelerinin ışık mikroskopu görüntüsü verilmiştir. Hücreler kuyucukları tek tabakalı bir şekilde %70 kaplamıştır. Her bir kuyucukta 10000 hücre bulunmaktadır. Şekil 4.6.2.1 B'de pozitif kontrol gurubunun görüntüsü verilmiştir. Ticari transfeksiyon ajanı kullanılarak yapılan transfeksiyon çalışmasında %40 oranında gen ekspresyonu hesaplanmıştır. Şekil 4.6.2.1 C'de ise negatif kontrol olarak kullanılan sadece plazmid ile etkileştirilmiş hücrelerin görüntüsü verilmiş olup transfeksiyonda gen ekspresyonu %0,1 olarak hesaplanmıştır. Negatif yüklü plazmidin kendi başına negatif yüklü hücre duvarını geçememesi nedeniyle transfeksiyonda gen ekspresyonu yok denecek kadar azdır. Şekil 4.6.2.1 D'de 1:8 pDNA/partikül oranına sahip konjugatın manyetik alan uygulamadan transfeksiyon etkinliği verilmiştir. Görüldüğü gibi gen ekspresyonu bu konjugat kullanımında mevcut değildir. Şekil 4.6.2.1 E'de 15 dak manyetik alan uygulamasıyla gerçekleştirilen 1:8 pDNA/partikül oranına sahip konjugatın transfeksiyon etkinliği gösterilmiştir. Burada %5 oranında gen ekspresyonu hesaplanmıştır. Şekil 4.6.2.1 F'de sadece 5 dak manyetik alan uygulamasıyla gerçekleştirilen 1:10 pDNA/partikül oranına sahip konjugatın gen ekspresyonu verilmiştir. Burada gen ekspresyonu etkinliği %10 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla partikül miktarı arttığında veriminde arttığını söyleyebiliriz (Çizelge 4.6.2). Manyetik alan alan uygulandığın transfeksiyon gözlenirken yokluğunda hiçbir transfeksiyon gözlenmemiştir. En uygun partikül oranı 1:8 oranı olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6.2 Partikül miktarına bağlı transfeksiyon verimi

pDNA/partikül oranı	1:1	1:2	1:4	1:8	1:10	Pozitif kontrol	Negatif kontrol
Transfeksiyon verimi	0	0	0	%5	%10	%40	%0,1

2-aminoetantiyol ile modifiye edilmiş altın nanopartiküllerin transfeksiyonunu ilişkin araştırmalarda Niidome ve grubu hücrelerde %0,5 oranında plazmid DNA olduğunu rapor etmişlerdir (Niidome, 2004). Tez kapsamında yapılan çalışmada manyetik özellik kullanıldığından onların yaptığı transfeksiyonun on katı kadar bir transfeksiyon verimi saptamıştır. Zhang ve arkadaşları ise yine katyonik, 2-aminoetantiyol ile modifiye altın nanopartiküller ile transfeksiyonun oldukça iyi olduğunu bildirmişler fakat rakamsal veri vermemişlerdir (Zhang, 2007).

15 dak mayetik alan uygulayarak 8:1 oranında partikül/pDNA kullanımında elde edilen transfeksiyonda GFP sentezinden kaynaklanan yeşil ışımının etkisi 7 gün incelenmiştir. Transfeksiyondan 48 saat sonra %5 olan transfeksiyon verimi 2 gün aynen sürmüş sonra %3'e bir gün daha sonra %1'e düşmüş ve sonraki günlerde herhangi bir ışımaya saptanmamıştır.



Şekil 4.6.2.2 Transfeksiyon sonrası GFP gen ekspresyonunun günlere göre etkinliği

5.SONUÇLAR

- Yüksek sıcaklıkta mekanik karıştırmalı ikili çöktürme yöntemi ile 20-155 nm boyut aralığında manyetit üretimi gerçekleştirilmiştir.
- Sentezlenen manyetit partiküllerin boyut analizi Zeta Sizer, yapısal analizi XRD ve FTIR, manyetik özelliklerinin karakterizasyonu ise VSM ile yapılmıştır.
- Zeta Sizer ile ortalama çapı 90.8 nm olarak belirlenen partiküllerin farklı özellikleri karakterize edilerek, bu boydaki partiküller daha sonraki aşamalarda kullanılmıştır.
- Sentezlenen partiküllerin FTIR spektrumunda manyetitin oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini gösteren karakteristik pikleri gözlenmiştir.
- Sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin X-RD grafiğinde manyetite ait spesifik pikler görülmüştür.
- Titreşimli manyetometre cihazı ile yapılan ölçümlerde 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doyumluk mıknatıslığı göstermiş ve histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmüştür.
- ESR spektrumundan sentezlenen manyetit nanopartiküllerinin geniş ve asimetric tek çizgili bir rezonans eğrisine sahip olduğu belirlenmiştir. Manyetit nanopartikülünün g faktörü 2.0932 olarak hesaplanmıştır.

- Sentezlenen manyetit nanopartiküllerin ortalama çapları Zeta Sizer ile 90.8 nm, AFM ile 102 nm olarak ölçülmüştür.
- Manyetit nanopartiküllerin MFM analizinde karanlık bölgelerdeki domain yönelimlerinden manyetik özellik taşıdığı anlaşılmıştır. Manyetik kaplı tip 200 nm kaldırmaya ayarlandıktan sonra manyetik özellik gözlenmemiştir.
- 90.8 nm boyutunda seçilen manyetit sitrat indirgeme ajanıyla altın kaplı manyetit sentezleme metoduyla altınla kaplanmıştır. Altınla kaplama reçetesindeki parametreler değiştirilerek 8 farklı Fe_3O_4/Au partikülü sentezlenmiş ve zeta size, potansiyel, ESR, UV-vis spektrum analizleri yapılmıştır.
- Tri sodyum sitratın altın kabuk oluşumuna etkisi incelendiğinde standartın (0.155 mM) yarısı (0.078 mM) ve iki katı (0.310 mM) konsantrasyonlarda sitrat kullanıldığında altın kabuk oluşumu aynı derecede artmıştır. 0.078 mM, 0.155 mM, 0.310 mM sitrat kullanıldığında sırasıyla 105, 95.7, 105 nm boyutlarında ve üçü de negatif Fe_3O_4/Au partikülleri sentezlenmiştir. UV-vis spektrum analizlerinde 0.155 mM sitrat kullanımındaki 537 nm dalga boyundaki plasmon piki diğer iki parametrede de 541 nm dalga boyuna kaymıştır.
- ESR analizlerinde ise 0.078 mM tri sodyum sitrat kullanılanın Fe_3O_4/Au nanopartikülünün sinyal şiddeti fazla iken 0.310 mM kullanılanın Fe_3O_4/Au nanopartikülünün sinyal şiddeti daha az çıkmıştır. 0.155 mM sitrat kullanımında Fe_3O_4/Au nanopartikülünün sinyal şiddeti diğer ikisinden de daha fazladır.
- Altın kaplamada kullanılan altın tuzu $[HAuCl_4]$ miktarı (12 mM ve 24 mM) artırıldığında altın kabuk kalınlığı artmaktadır. Buna bağlı olarak ESR spektrumunun sinyal şiddetinde azalma meydana gelmiştir. Altın kabuk

- kalınlığı arttığında UV-vis spektrum analizinde plasmon dalga boyunda arttığı (sağa kaydığı) görülmüştür. 537 nm dalga boyundan 545 nm dalga boyuna kaymıştır.
- Altın kaplamada kullanılan manyetit miktarı (0.25 ml, 0.5 ml, 1ml) (100 µg/ml manyetit konsantrasyonu) artırıldığında altın kabuk kalınlığı azalmaktadır. Buna bağlı olarak ESR spektrumunun sinyal şiddetinde artma meydana gelmektedir. UV-vis spektrum analizinde 0.25 ml, 0.5 ml, 1ml manyetit içeren Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin plasmon dalga boyları sırasıyla 540 nm, 537 nm, 538 nm olarak ölçülmüştür.
 - Altın kaplamada farklı boylarda da manyetit nanopartiküller kullanılmış olup (55 nm, 90 nm, 155 nm) manyetit boyu arttıkça sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin ESR spektrumunun sinyal şiddetlerinde artma meydana gelmiştir. UV-vis spektrum analizinde 55 nm, 90 nm, 155 nm boyutlarında manyetit kullanıldığında sentezlenen Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin plasmon dalga boyları sırasıyla 554nm, 537nm, 540 nm olarak ölçülmüştür.
 - 90.8 nm boyutunda seçilen manyetit 0.5 ml olarak 0.155 mM konsantrasyonunda sitrat indirgeme ajanıyla 12 mM [HAuCl₄] altın tuzu kullanılarak altınla kaplanmıştır. Seçilen bu partikülün zeta sizer ile boyutu 95.7 nm, potansiyel yükü -30 milivolt olarak ölçülmüştür.
 - Sentezlenen 95.7 nm, Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin FTIR analizinde manyetitte ait 670 cm⁻¹ ve 400 cm⁻¹ dalga sayısı arasında Fe-O gerilim piklerinin varlığı görülmüştür. Aynı zamanda manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat yapısındaki karboksilat gruplarına ve trisodyum sitrat yapısındaki CH₂-O deformasyonuna ait 1635 ve 1541 cm⁻¹ dalga sayısındaki pikler yapıda saptanmıştır.
 - Sentezlenen 95.7 nm, Fe₃O₄/Au nanopartiküllerinin X-RD analizinde 37, 43, 63 ve 77 iki teta değerlerinde (111), (200), (220) ve (311) altının kristal

yapısına ait pikler saptanmıştır. Manyetit nanopartikülleri 37, 43 ve 77 iki teta değerlerinde herhangi bir pike sahip değilken altın ile kaplanması sonucu bu teta değerlerinde altının kristal yapısına ait pikler saptanmıştır.

- Sentezlenen 95.7 nm, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerinin VSM analizinde çıplak 90 nm boyutundaki manyetit 10000 Gauss manyetik alanda 0.003 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı vermiştir. Doymunluk mıknatıslığı manyetit nanopartiküllerinin altın ile kaplanması neticesinde azalmıştır (çıplak manyetit 24 emu/g (Ms) doymunluk mıknatıslığı göstermiştir).
- Sentezlenen 95.7 nm, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerinin AFM analizinde boyut 107 nm olarak ölçülmüştür.
- MFM analizinde çıplak manyetitten manyetik tip 200 nm'ye kadar kaldırmaya ayarlandığında ölçüm alınabilirken $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ partiküllerinden 100 nm'ye kadar kaldırmaya ayarlandığında ölçüm alınabilmektedir.
- Sentezlenen 95.7 nm, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerini katyonik hale getirmede kullanılan 2-aminoethantiyol çözeltisinin konsantrasyonu 20 mM ile 1 M arası denemiş olup literatüre en yakın değer 213 mM 400 μl 2-aminoethantiyol çözeltisi kullanımıyla elde edilmiştir.
- Sentezlenen katyonik $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerinin zeta potansiyeli $+36.7 \pm 8.18$ mV çıkmıştır. Zeta size ile boyut ölçümü sonucu 99.71 nm (PDI: 0.448) bulunmuştur.
- Sentezlenen ve hücre kültürü çalışmalarında kullanılacak altın kaplı manyetit nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spektrumu analizi 537 nm dalga boyunda pik verirken 2 aminoethantiyol molekülleri altın yüzeye bağlandığında ise 538 nm dalga boyunda pik vermiştir.

- Transfeksiyon çalışmalarında kullanılacak partikül/ plazmid DNA konjugatlarının boy ve yük analizi yapılmış olup en yüksek pozitif yük ve en uygun boyut 4:1 oranında hazırlanmasında bulunmuştur. 4:1 oranında oluşturulan konjugatın boyutu 997.6 nm (0.613) ve zeta potansiyel sonucu $+4.54 \pm 7.5$ milivolt olarak bulunmuştur.
- Transfeksiyon amaçlı kullanılacak pDNA Qiagen midi plazmid saflaştırma kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen plazmidler, marker ile yürütülerek agaroz jel elektroforezinde saptanmıştır. Aynı zamanda saflaştırılan pDNA 2 µg olarak 2, 4, 8, 16, 32, 40 µg (100 µg/ml) katyonik Fe₃O₄/Au nanopartikülleri etkileştirilip jel kuyucuklarına yüklenmiş ve partiküllerin pDNA'yı bırakıp bırakmadığı agaroz jel elektroforezinde kontrol edilmiştir. Hiçbir partikül pDNA'yı bırakmamıştır.
- Hücre çalışmalarında kullanılacak partiküllerin hücrelere hangi miktarlar da ne kadar zarar verdiğini anlamak amacıyla bir MTT testi yapılmış Burada 5 µg partikül kullanıldığında %84, 10 µg kullanıldığında %82, 20 µg da %75 hücre canlılığı saptanmış ve 20 µg partikül kullanımının üzerinde hücre canlılığı %70'in altına düştüğü saptanmıştır.
- Transfeksiyonda kullanılmış olan manyetik alan varlığının, süresinin ve kullanılan miktarın türünün farklı oranlarda partikülleri hücreye sokarken oluşturdukları hücre canlılığı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Manyetik alan uygulanmadığında %78-%98 hücre canlılığı saptanmıştır. Yüzeyi işlenmemiş miktarla 5 dak-30 dak manyetik alan uygulama aralığında %62-%98 arasında hücre canlılığı saptanmıştır. Yüzeyi işlenmiş miktarla 5 dak-30 dak manyetik alan uygulama aralığında %52-%95 aralığında hücre canlılığı saptanmıştır. Yüzeyi işlenmiş miktarla daha fazla partikül hücrelere girdiğinden hücre ölümü de artmaktadır.
- Transfeksiyonda kullanılmış olan manyetik alan varlığının ve kullanılan miktarın türünün farklı oranlarda partikül/pDNA konjugatlarını hücreye

sokarken oluşturdıkları hücre canlılığı üzerindeki etkisi de araştırılmıştır. Manyetik alan uygulanmadığında %89-%100 hücre canlılığı saptanmıştır. 10 dk yüzeyi işlenmiş mıknatısla manyetik alan uygulandığında %79-%98 hücre canlılığı ve 10 dk yüzeyi işlenmemiş mıknatısla manyetik alan uygulandığında %74-%97 hücre canlılığı saptanmıştır. Yüzeyi işlenmiş mıknatısla daha fazla konjugat hücrelere girdiğinden hücre ölümü de artmaktadır.

- FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 30 dk manyetik alan uygulaması sonucu HeLa hücrelerine girme yüzdeleri (%) manyetik alan uygulanmadığında %4-%47 olarak, yönlendirilmemiş manyetik alan uygulandığında %5-%53 olarak, yönlendirilmiş manyetik alan uygulandığında %12-%89 olarak saptanmıştır.
- FITC ile işaretlenmiş katyonik altın kaplı manyetit nanopartiküllerin 10 dk manyetik alan uygulaması sonucu HeLa hücrelerinde meydana getirdikleri nekrozun yüzdeleri (%) manyetik alan uygulanmadığında %1-%25 olarak, yönlendirilmemiş manyetik alan uygulandığında %2-%38 olarak, yönlendirilmiş manyetik alan uygulandığında %1-%46 olarak saptanmıştır. Yönlendirilmiş manyetik alan partikülleri en yüksek oranda hücrelere sokmakta fakat hücre ölümü daha fazla olmaktadır.
- Sentezlenen partiküllerin non-viral vektör olarak transfeksiyon etkinlikleri incelenmiştir. Plazmid miktarı sabit tutularak farklı miktarda partiküller, HeLa hücre hattı ile etkileştirilmiş ve 48 saat sonunda transfeksiyon etkinlikleri izlenmiştir. Oranları 1:8 (15 dak manyetik alan), 1:10 (5 dak manyetik alan), (pDNA/partikül) olarak belirlenen konjugatlarda transfeksiyon sırasıyla %5, %10 olarak bulunmuştur. Sadece plazmid gönderilen hücrelere kıyasla, plazmid ile partikül gönderilen hücrelerde, GFP sentezinden kaynaklanan yeşil ışımada anlamlı artış gözlenmiştir. Manyetik alan uygulanmadığında transfeksiyon gözlenmemiştir. 20 µg partikül ve 5 dk yönlendirilmiş manyetik alan uygulamasıyla ulaşılan optimum transfeksiyon verimi %10'dur.

- 15 dak manyetik alan uygulayarak 8:1 oranında partikül/pDNA kullanımında elde edilen %5 transfeksiyon veriminin GFP sentezinden kaynaklanan yeşil ışımının etkisi 4 gün sürmüştür. Transfeksiyondan 48 saat sonra %5 olan transfeksiyon verimi iki gün sonra %3'e bir gün daha sonra %1'e düşmüş ve sonraki günlerde herhangi bir ışıma saptanmamıştır.
- Sonuç olarak tez kapsamında transfeksiyon amaçlı non-viral vektör olarak 2-aminoetantiyol modifiye edilmiş altın kaplı manyetit nanopartiküller üretilip karakterize edilerek bu partiküllerin HeLa hücre hattını transfekte ettiği ve GFP (yeşil floresan protein) ekspresyonu gerçekleştiği ortaya konulmuştur.

6.KAYNAKLAR

- Arsianti, 2010; Arsianti M, Lim M, Lou N. S, Goon I. Y, Marquis P. C, Amal R, Bi-functional gold-coated magnetite composites with improved biocompatibility, *Journal of Colloid and Interface Science*, xxx:xxx-xxx,.
- Andrianaivo, 2004; Andrianaivo F, Lecocq M, Wattiaux-De Coninck S, Wattiaux R, Jadot, 2004; Jadot M. Hydrodynamics-based transfection of the liver: entrance into hepatocytes of DNA that causes expression takes place very early after injection. *J Gen Med*; 6: 877-83.
- Anderson, 1998; Anderson W. F, Human gene therapy. *Nature* **392** (1998), pp. 25-30.
- Albornoz, 2006; Albornoz C Jacobo, S. E. *J. Magn. Magn. Mater.* 2006, 305, 12.
- Alvarez, 2006; Alvarez, G. S; Muhammed, M; Zagorodni, A. A. *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 4625.
- Arda, 1985; Arda, M, Genel Bakteriyoloji, A.Ü. Vet. Fak. Yayınları.
- Bureau, 2002; Bureau, MF, Gehl J, Deleuze V, Mir LM, Scherman D. Importance of association between permeabilization and electrophoretic forces for intramuscular DNA electrotransfer. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1474: 353-9.
- Battle and Labarta, 2002; Battle, X., Labarta, A., 2002, Finite-size effects in fine particles: magnetic and transport. Properties, *J. Phys. D: Apply. Phys.*, 35, 15-42.
- Blaese, 1995; M. Blaese, T. Blankenstein, M. Brenner, O. Cohen-Haguenuer, B. Gansbacher, S. Russell, B. Sorrentino, and T. Velu, "Vectors in cancer therapy: How will they deliver?," *Cancer Gene Ther.*, vol. 2, pp. 291-297, 1995.
- Basak, 2007; Basak, S.; Chen, D.-R.; Biswas, P. *Chem. Eng. Sci.* 2007, 62, 1263.
- Babes, 1999; Babes, L., Denizot, B., Tanguy, G., Le Jeune, J. J., Jallet, P., 1999, *Journal of Colloid and Interface Science*, 212, 474.
- Blum et al. 1997; Blum, E., Cebers, A., Maiorov, M. M., 1997, *Magnetic Fluids*, Walter de Gruyter, Berlin.
- Banerjee and Maskowitz, 1985; Banerjee, S. K., Moskowitz, B. M., 1985, Ferrimagnetic properties of magnetite. *Magnetite Biomineralization and Magnetoreception in Organisms: A New Magnetism*, Kirschvink, J. L. et al. (eds.) , Plenum Publishing Corporation, pp. 17-41.

- Brust, 1995; Brust M, Bethell D, Schi!rin D. J, and Kiely C. J, *Adv. Mater.* 7,795, 1995.
- Cho, 2004; Cho S.–J, Kauzlarich S.M, Olamit J, Liu K, Grandjean F, Rebbouh L. and Long G, *J. Appl. Phys.* 95[11 II] 6804-6806, 2004.
- Carpenter, 2003; Carpenter E.E, Calvin S, Stroud R.M. and Harris V.G, *Chem. Mater.* 15[17] 3245-3246, 2003.
- Cornell, 1991; Cornell, R.M., Schertmann, U., 1991, *Iron Oxides in the Laboratory; Preparation and Characterization.*, VCH, Weinheim.
- Cornell, 1996; Cornell, R. M., Schertmann, U., 1996, *The Iron Oxides: Structure, Properties, Reactions, Occurrence and Uses*, VCH Publishers, Weinheim.
- Chin, 2007; Chin, A. B.; Yaacob, I. I. *J. Mater. Process. Technol.* 2007, 191, 235–237.
- Chun, 2005; Chun D., Karlen S., Kolodziej C., Jost B., Virji S., Weinberger M., 2005, *Synthesis of an Aqueous Ferrofluid, Version 3* , The California NanoSystems Institute & Materials Creation Training Program, University of California, Los Angeles, 12
- Cox, 1992; Cox, P. A., 1992, *Transition Metal Oxides*, Clarendon Press, Oxford.
- Cui, 2005; Banu Kesanli, Yong Cui, Milton R. Smith, Edward W. Bittner, Bradley C. Bockrath, and Wenbin Lin, *Highly Interpenetrated Metal–Organic Frameworks for Hydrogen Storage*, *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005, 44, 72 – 75
- Chorny, 2007; Chorny M, Polyak B, Alferiev IS, Walsh K, Friedman G, Levy RJ. *Magnetically driven plasmid DNA delivery with biodegradable polymeric nanoparticles.* *FASEB J* 21:2510–9, 2007.
- Dyer, 2000; Dyer MR, Herrling PL, *Mol. Ther.*, 1:213, 2000.
- Dash, 1997; P.R., Toncheva, V., Schacht, E., Seymour, L.W., 1997, *J. Controlled Release*, 48: 269.
- Elliott, 1998; Elliott, S.R., 1998, *The Physics and Chemistry of Solids*, John Wiley & Sons, New York.
- Frenkel and Dorfman, 1930; Frenkel, J., Dorfman, J., 1930, *Spontaneous and induced magnetisation in ferromagnetic bodies*, *Nature*, 126, 274-275.
- Fuller, 2006; Fuller DH, Loudon P, Schmaljohn C. *Preclinical and clinical progres of particle-mediated DNA vaccines for infectious diseases.* *Methods* 2006; 40: 86-97.
- Favard, 2007 Favard C, Dean DS, Rols MP. *Electrotransfer as a non viral method of gene delivery.* *Curr Gene Ther* 2007; 7: 67-77.

- Goon, 2008; Goon I. Y., Leon M., Lai H., Lim M., Munroe P., Gooding J. J., Amal P., Fabrication and dispersion of gold-shell protected Magnetic Nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine, *Chemistry of Materials*, (2009), vol21.
- Guyen, 2008; Guven, G. U., Laçin, N. T., Piskin, E., 2008, Monosize polycationic nanoparticles as non-viral vectors for gene transfer to HeLa cells, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2, 155-163.
- Gao, 2005; Gao, Y. *Nanotechnologies for the Life Sciences*; Kumar, C., Ed.; Wiley: New York, 2005; Vol. 1, Chapter 3: Biofunctionalization of Nanomaterials.
- Gupta, 2005; Gupta, A., K., Gupta, M., 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26(18), 3995–4021.
- Giese, 1998; Giese M. DNA-antiviral vaccines: new developments and approaches a review. *Virus Genes* 1998; 17: 219-32.
- Gribanov, 1990; Gribanov, N.M., Bibik, E.E., Buzunov, O.V., Naumov, V.N., 1990, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 85, 7.
- Harris, 2002; Harris, L. A., 2002, Polymer Stabilized Magnetite Nanoparticles and Poy(propylene oxide) Modified Styrene-Dimethacrylate Networks, Ph. D. Thesis, Virginia Faculty of Virginia Polytechnic Institue and State Univeristy, Blacksburg, 161 p.
- Huettinger, 2008; Huettinger C, Hirschberger J, Jahnke A, *et al.* Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial. *J Gene Med* 2008; 10: 655-67.
- Inoue, 2004; Inoue S, Hakamata Y, Kaneko M, Kobayashi E. Gene therapy for organ grafts using rapid injection of naked DNA: application to the rat liver. *Transplantation* 2004; 77: 997-1003.
- Invitrogen, 2008; Plasmid DNA Purification, 2008 Invitrogen Corporation. [http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Purification-and-Analysis/DNA-Purification/Plazmid -DNA-Purification.reg.tr.html](http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Nucleic-Acid-Purification-and-Analysis/DNA-Purification/Plazmid-DNA-Purification.reg.tr.html).
- Jain, 2005; Jain, T. K.; Morales, M. A.; Sahoo, S. K.; Leslie-Pelecky, D. L.; Labhasetwar, V. *Mol. Pharm.* 2005, 2 (3), 194.
- Jahnke, 2007; Jahnke A, Hirschberger J, Fischer C, *et al.* Intra-tumoral Gene Delivery of feL-2, feIFN-gamma and feGM-CSF using Magnetofection as a Neoadjuvant Treatment Option for Feline Fibrosarcomas: A Phase-I Study. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2007; 10: 599-606.
- Jeong, 2006; Jeong J, Ha TH, Chung BH (2006) Enhanced reusability of hexa-arginine-tagged esterase immobilized on goldcoated magnetic

- Jafari, 2010; T. Jafari, A. Simchi, N. Khakpash, Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron–gold core–shell nanoparticle coated with polyglycerol; *Journal of Colloid and Interface Science* 345 (2010) 64–71
- Kotitz, 1995; Kotitz, R., Fannin, P. C., Trahms, L., 1995, Time domain study of Brownian and Neel relaxation in ferrofluids, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 149, 42-46.
- Kittel, 1976; Kittel, C., 1976, *Introduction to Solid State Physics*, Wiley, New York.
- Kim, 2005; Kim, E. H.; Lee, H. S.; Kwak, B. K.; Kim, B. K. *J. Magn. Magn. Mater.* 2005, 289, 328.
- Kimata, 2003; Alvarez, G. S.; Muhammed, M.; Zagorodni, A. A. *Chem. Eng. Sci.*, 61, 4625.
- Kaplitt, 2007; Kaplitt MG, Feigin A, Tang C, Fitzsimons HL, Mattis P, Lawlor PA, Bland RJ, Young D, Strybing K, Eidelberg D, During MJ. Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet.* 2007;369:2097–2105.
- Khalafalla, 1980; Khalafalla, S. E.; Reimers, G. W. *IEEE Trans. Magn.* 1980, 16, 178.
- Laurent, 2008; Sophie Laurent,† Delphine Forge,† Marc Port,‡ Alain Roch,† Caroline Robic,‡ Luce Vander Elst,† and Robert N. Muller*, 2008, Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications, *Chem. Rev.* 108, 2064–2110
- Legodi and De Waal, 2007; Legodi, M. A., De Waal, D., 2007, The preparation of magnetite, goethite, hematite and maghemite of pigment quality from mill scale iron waste, *Dyes and Pigments* , 74(1), 161-168.
- Li, 2008; Li YS, Davidson E, Reid CN, McHale AP. Optimising ultrasoundmediated gene transfer (sonoporation) *in vitro* and prolonged expression of a transgene *in vivo*: Potential applications for gene therapy of cancer. *Cancer Lett* 2008; 273: 156-62.
- Lin, 2001; Lin J, Zhou W, Kumbhar A, Wiemann J, Fang J. and Carpenter E.E, O'Connor C.J, *J. Solid State Chem.*159[1] 26-31, 2001.
- Liua, 2010; Liua G, Magdalena Swierczewskaa M, Leea S, Chena X, *Nano Today*, 5:524, 2010.
- Lee, 1997; Lee, R.J. ve Huang, L., 1997, *Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst.*, 14,173-206.

- Liu, 2008; Hong Ling Liu a,b,1, Chung Hee Sonn c,1, Jun Hua Wu a, Kyung-Mi Lee c,**, Young Keun Kim, Synthesis of streptavidin-FITC-conjugated core-shell Fe₃O₄-Au nanocrystals and their application for the purification of CD4⁺ lymphocytes: *Biomaterials* 29 (2008) 4003–4011
- Lu, 2006; Q.H. Lu, K.L. Yao,, D. Xi , Z.L. Liu, X.P. Luo, Q. Ning, Synthesis and characterization of composite nanoparticles comprised of gold shell and magnetic core/cores, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 301 (2006) 44–49
- Lin, 2001; Lin J.; Zhou, W.; Kumbhar, A.; Weimann, J.; Fang, J.; Carpenter, E. E.; O'Connor, C. J. *J. Solid State Chem.* 2001, 159, 26-31.
- Mandal, 2005; Mandal M, Kundu S, Ghosh SK, Panigrahi S, Sau TK, Yusuf SM, et al. Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell. *J Colloid Interface Sci* 2005; 286:187–94. Massart, 1981 Massart, R. *IEEE Trans. Magn.* 1981, 17, 1247.
- Miller, 2002; Miller, M. M.; Prinz, G. A.; Cheng, S. F.; Bounnak, S. *Appl. Phys. Lett.* 2002, 81, 2211.
- Mir, 1999; Mir L, Bureau M, Gehl J, et al. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4262-7.
- Mir, 2005; Mir LM. Electrogenettransfer in clinical applications. In: Schleef M Ed, DNA Pharmaceuticals: formulation and delivery in gene therapy, DNA vaccination and immunotherapy. Weinheim, Wiley- VCH 2005; pp. 219-26.
- Müller, 1995; Müller-Schulte D. Ve Brunner, 1995 Müller-Schulte, D., Brunner, D., 1995, Novel magnetic microspheres on the basis of poly(vinyl alcohol) as affinity medium for quantitative detection of glycosylated haemoglobin, *J. Chromatogr. A* 711, 53-60.
- Muthana, 2008; Muthana, M., Scott, S. D., Farrow, N., Morrow, F., Murdoch, C., Grubb, S., Brown, N., Dobson, J., Lewis, C. E., 2008, A novel magnetic approach to enhance the efficacy of cell-based gene therapies, *Gene Therapy*, 15(12) , 902-910.
- Miklavcic, 2000; Miklavcic D, Semrov D, Mekid H, Mir LM. A validated model of *in vivo* electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. *Biochim et Biophys Acta* 2000; 1523, 73-83
- Mah, 2002; Mah C, Fraites TJ, Zolotukhin I, Song SH, Flotte TR, Dobson J, et al. Improved method of recombinant AAV2 delivery for systemic targeted gene therapy, *Mol Ther* 6:106–12, 2002.
- McAllister, 2002; McAllister, A.K., Washbourne, P. *Current Opinion in Neurobiology*, 12, 566-573

- Namgung, 2010; Namgung R, Singha K, Yu M, Jon S, Kim Y, Ahn Y, Park I, Kim J, Hybrid superparamagnetic iron oxide nanoparticle-branched polyethylenimine magnetoplexes for gene transfection of vascular endothelial cells, *Biomaterials Elsevier* 31:4204–4213, 2010.
- Newman, 2007; Newman CMH, Bettinger T. Gene therapy progress and prospects: Ultrasound for gene transfer. *Gene Therapy* 2007; 14: 465–75
- Niidome, 2002; Niidome T, Huang L, Gene Therapy Progress and Prospects: non-viral Vectors. *Gene Therapy* 9 (24):164752, 2002.
- Nabel, 1993; Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, GPlautz GE, Gao X, Huang L, Shu S, Gordon D, Chang AE, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:11307, 1993.
- Ozaki, 2000; Ozaki, M., 2000, Formation of Magnetic Particles. *Fine Particles: Synthesis, Characterization and Mechanisms of Growth*. Sugimoto, T. (ed.), Marcel Dekker, Inc., New York. 662-682.
- Pham, 2008; Pham TT, Cao C, Sim SJ (2008) Application of citrate-stabilized gold-coated ferric oxide composite nanoparticles for biological separations. *J Magn Magn Mater* 320:2049– 2055. doi:10.1016/j.jmmm.2008.03.015
- Pita, 2008; Pita M., Abad J. M., Vaz-Dominguez C., Briones C., Mateo-Martí E., Martín-Gago J., Morales M.P., Fernández V.M., *Journal of Colloid and Interface Science* 321, (2008), 484–492.
- Portet, 2001; Portet, D., Denizot, B., Rump, E., Lejeune, J. J., Jallet, P., 2001, Nonpolymeric Coatings of Iron Oxide Colloids for Biological Use as Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents, *Journal of Colloid and Interface Science*, 238(1), 37-42.
- Pai, 2005; Pai SI, Lin YY, B. Macaes B, Meneshian A, Hung CF, Wu TC, Prospects of RNA interference therapy for cancer *Gene Ther.* 13:464, 2005.
- Pardoe, 2001; Pardoe, H.; Chua-anusorn, W.; St. Pierre, T. G.; Dobson, J. J. *Magn. Magn. Mater* 2001, 225, 41.
- p.http://voh.chem.ucla.edu/classes/Magnetic_fluids/pdf/Ferrofluid%20Teacher%20Manual%202005.doc.
- Plank, 2003; Plank C, Schillinger U, Scherer F, Bergemann C, Remy JS, Kroft F, et al. The magnetofection method: using magnetic force to enhance gene delivery. *Biol Chem* 384:737–47, 2003.
- Pişkin E, 2005; *ExpRev Med Devices* 2:1.
- Qui, 2000; Qui, X. *Chin. J. Chem.* 2000, 18, 834.

- Rosensweig, 1985; Rosensweig, R. E., 1985, Ferrohydrodynamics, Cambridge University Press, Cambridge, 344 p.
- Recchia, 2004; Recchia A, Perani L, Sartori D, Olgiate C, Mavilio F. Site-Specific Integration of Functional Transgenes into the Human Genome by Adeno/AAV Hybrid Vectors. *Mol Ther* 2004; 10: 660-70.
- Semiz, 2008; Semiz E, 2008. Manyetik Yüklü Polimerik Nanopartikül Esaslı Plazmid DNA Saflaştırma Kitlerinin Geliştirilmesi Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe üniversitesi, Biyomühendislik AD, Ankara,
- Sun, 2000; Sun, X., Gutierrez, A., Yacaman, M.J., Dong, X., Jin, S., 2000, *Materials Science & Engineering A*, 286, 157
- Safarik ve Safarikova, 2004; Safarik, I., Safarikova, M., 2004, Magnetic techniques for the isolation and purification of proteins and peptide, *BioMagnetic Research and Technology*, 2, 7 p.
- Sorensen, 2001; Sorensen, C. M., 2001, *Nanoscale Materials in Chemistry. Magnetism*. Klabunde, K. J. (ed.), John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 169.
- Sayar, 2004; Sayar, F., 2004, Mikroemülsiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle MMA/AAC/PEG-MA Esaslı Manyetik Nanopartiküllerin Üretimi, Yüksek Mühendislik Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sayar, 2010; Sayar F. Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik AD, Ankara.
- Smith, 1995; Smith AE. Viral Vectors in Gene Therapy. *Annu Rev Microbiol* 1995; 49: 807-38.
- Schmeer, 2004; Schmeer M, Seipp T, Pliquett U, Kakorin S, Neumann E. Mechanism for the conductivity changes caused by membrane electroporation of CHO cell-pellets. *PCCP* 2004; 6: 5564-74.
- Schmeer, 2009; Schmeer M. Electroporative Gene Transfer. In Walther W, Stein US Eds, *Methods in molecular biology, gene therapy of cancer*. Totowa NJ, Humana Press 2009; 157-165.
- Schillinger, 2005; Schillinger U, Brill T, Rudolph C, Huth S, Gersting S, Krötz F, Hirschberger J, Bergemann C, and Plank C, "Advances in magnetofection— Magnetically guided nucleic acid delivery," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 293, pp. 501–508.
- Scherer F, 2002; Anton M, Schillinger U, *et al.* Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force *in vitro* and *in vivo*. *Gene Ther*; 9: 102-9.
- Steele, 2001; Steele KE, Stabler K, VanderZanden L. Cutaneous DNA vaccination against ebola virus by particle bombardment: histopathology

- and alteration of CD3-positive dendritic epidermal cells. *Vet Pathol* 2001; 38; 203-15.
- Scherer and Figueiredo, 2005; Scherer, C., Figueiredo Neto A. M., 2005, *Ferrofluids : Properties and Applications*, Brazilian Journal of Physics, 35 (03A) , 718-727.
- Seino, 2009; Satoshi Seino, YuMatsuoka, Takuya Kinoshita , Takashi Nakagawa , TakaoA.Yamamoto, Dispersibility improvement of gold/iron-oxide composite nanoparticles by polyethylenimine modification *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 321 (2009) 1404–1407
- Silva, 2010; E. Iglesias-Silva a,b, J.L. Vilas-Vilela a, M.A. López-Quintela b, J. Rivas b, M. Rodríguez a, L.M. León, Synthesis of gold-coated iron oxide nanoparticles, *Journal of Non-Crystalline Solids* 356 (2010) 1233–1235
- Sun, 2010; Sun H., Zhu X., Zhang L., Zhang Y., Wang D., *Materials Science and Engineering C* 30, (2010), 311–315.
- Tu ve Denizot, 2007; Tu, W., Denizot, B., 2007, Synthesis of small-sized rhenium sulfide kolloidal particles, *Journal of Colloid and Interface Science*, 310, 167–170.
- Tardaj, 2003; Tartaj, P., Morales, M. del P. Veintemillas-Verdaguer, S., Gonzalez-Carreno, T., Serna, C. J., 2003, The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.*, 36, 182-197.
- Tominaga, 2006; Tominaga, M.; Matsumoto, M.; Soejima, K.; Taniguchi, I. *J. Colloid Interface Sci.* 2006, 299, 761.
- Trollet, 2005; Trollet C, Bigey P, Scherman D. Electrotransfection – An Overview. In: Schleef M Ed, *DNA Pharmaceuticals: formulation and delivery in gene therapy, dna vaccination and immunotherapy*. Weinheim, Wiley-VCH 2005; pp. 189-218.
- Trollet, 2006; Trollet C, Bloquel C, Scherman D, Bigey P. Electrotransfer into skeletal muscle for protein expression. *Curr Gene Ther* 2006; 5: 561-78.
- Wan, 2005; Wan, J.; Chen, X.; Wang, Z.; Yang, X.; Qian, Y. *J. Cryst. Growth* 2005, 276, 571.
- Walther, 2002; Walther W, Stein U, Fichtner I, *et al.* Intratumoral low-volume jetinjection for efficient nonviral gene transfer. *Mol Biotechnol* 2002; 21: 105-15.
- Wooddell, 2010; Wooddell JO, Zhang CI, Hagstrom G., *et al.* Evaluation of hydrodynamic limb vein injections in nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2010; 21: 829-42.
- Wang, 2006; J. Luo, P. Njoki, Y. Lin, D. Mott, L. Y Wang and C. J. Zhong, *Langmuir*, 2006, 22, 2892;

- Xu, 2004; Xu, C.; Xu, K.; Gu, H.; Zheng, R.; Liu, H.; Zhang, X.; Guo, Z.; Xu, B. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9938.
- Yoo, 2007; Yoo, M. K., Kim, I., Y., Kim, E. M., Jeong, H. J., Lee, C. M., Jeong, Y. Y., Akaike, T., Cho C. S., 2007, Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Coated with Galactose-Carrying Polymer for Hepatocyte Targeting, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2007, 9 p.
- Yang, 1995; Yang Y, Li Q, Ertl HC, Wilson JM. Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J Virol* 1995; 69 : 2004-15.
- Zang, 2004; Zhang X, Dong X, Sawyer GJ, Collins L, Fabre JW. Regional hydrodynamic gene delivery to the rat liver with physiological volumes of DNA solution. *J Gen Med* 2004; 6: 693-703.
- Ziady, 2003; Ziady AG, Davis PB, Konstan MW. Non-viral gene transfer therapy for cystic fibrosis. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 449-58.

EKLER

EK 1- ESR spektrumundan g değerinin hesaplanması

90 nm'lik manyetit (Fe_3O_4) için:

ESR spektrumundan okunan değerlerle spektroskopik yarıлма çarpanının (g) hesaplanması:

$H_s=3920$ (standardın ESR spekturumdan okunan manyetik alanı)

$H_ö=4060$ (örneğin ESR spekturumdan okunan manyetik alanı)

$g=H_s/H_ö$ x serbest elektron için g faktörü

$g=H_s/H_ö$ x 2.0028

$g=3920/4060$ x 2.0028=2.0932

Rezonans koşulundan spektroskopik yarıлма çarpanının (g) hesaplanması:

$g \cdot \beta \cdot H_r = h \cdot \nu$

$h = 6.63 \cdot 10^{-34}$ J/ s (Boltzman sabiti)

$B = 9.27 \cdot 10^{-24}$ J/T (Bohr magnetonu)

$H_r = 3460 + 15 \times 10 = 3610$ (rezonans alanı)

$\nu = 9.262$ Ghz (Frekans)

$g \cdot \beta \cdot H_r = H \cdot \nu$

$g \times 9.27 \cdot 10^{-24}$ J/T x 0.3610 T = $6.63 \cdot 10^{-34}$ J/ s x $9.262 \cdot 10^9$ s = 2.0020

EK 2- Turbofect (ticari tranfe ksion ajanı) ile genel transfeksiyon protokolü

- 1) 24 kuyucuklu kültür kaplarına 5×10^4 hücre olacak şekilde ekim yapılır.(her bir kuyucuk için)
- 2) 1 gün sonra hücreler kuyucukları %70 kaplamış hale getirdiğinde transfeksiyon işlemlerine geçilebilir.
- 3) 1 µg DNA ile 100 µl kültür ortamı karıştırılır.
- 4) 2 µl Turbofect çözeltisi DNA çözeltisine eklenir.
- 5) 15-20 dakika oda sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakılır.
- 6) 100 µl Turbofect-DNA kompleksi karışımını kültür kabına eklenir.
- 7) Üzerine 1 ml kültür ortamı eklenir ve hafif çalkalanır.
- 8) 37 °C'de inkübasyona bırakılır ve ekspresyon sonuçları izlenir.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlknur Ilgın Doğan

Doğum Yeri : Bolu

Doğum Yılı : 1987

Medeni Hali : Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 2000-2005 Sincan Lisesi , Ankara

Lisans : 2005 – 2009 Ankara Üniversitesi Fen Fakóltesi Biyoloji Bölümü, Ankara

Yabancı Dil: İngilizce

