



**PEPTİT KAPLI VE KEMOTERAPÖTİK İLAÇ YÜKLÜ
SÜPERPARAMANYETİK DEMİROKSİT NANOPARTİKÜLLERİN
SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA KULLANILMAK
ÜZERE HİPERTERMİ MARUZİYET SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Fatih ŞENTÜRK

**DOKTORA TEZİ
BİYOFİZİK ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2020

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Fatih ŞENTÜRK

30.07.2020

PEPTİT KAPLI VE KEMOTERAPÖTİK İLAÇ YÜKLÜ SÜPERPARAMANYETİK DEMİR
OKSİT NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE GLİOBLASTOMA HÜCRE HATTINDA
KULLANILMAK ÜZERE HİPERTERMİ MARUZİYET SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ
(Doktora Tezi)

Fatih ŞENTÜRK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Temmuz 2020

ÖZET

Glioblastoma Multiforme (GBM), yüksek invaziflik ve düşük hayatta kalma ile karakterize IV. derece diffüz gliomadır. Son yıllarda, GBM patogenezinin anlaşılmasında önemli gelişmeler olmasına rağmen, GBM hastalarının ortalama sağ kalım süresi 12-15 ay arasında değişmektedir ve GBM tedavisinde yeni ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasında, radyofrekans (RF)-alan kaynaklı hipertermi maruziyet sisteminin üretimi ve üretilen bu cihazla farklı fonksiyonel özellikler kazandırılan nanopartiküllerin RF-alan hipertermi ile etkinliğinin artırılması ve *in vitro* koşullarda GBM hücrelerinde (T98G) araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle, 13,56 MHz frekansta RF-alan hipertermi maruziyet sisteminin tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, alternatif manyetik alan (AMF) ile etkileşerek hedef bölgede ısı oluşumu sağlayacak süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar) sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Elde edilen SPDON'lar, PLGA-b-PEG di-blok ko-polimeri ile kaplanarak, poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) polimerinin biyobozunur/biyouyumluluk, poli(etilen glikol)'ün (PEG) ise makrofajlarca tanınmama özellikleri ile fonksiyonlandırılmış ve manyetik özellikli PLGA (PLGA+SPDON) nanopartiküller (NP'ler) üretilmiştir. Ardından, PLGA+SPDON NP'lere temozolomid (TMZ) enkapsülasyonu çalışmaları yapılmış, ancak TMZ'nin % enkapsülasyon verimi (%EE, %4) düşük çıktığından, T98G hücrelerinde etkin toksik doz derişimine ulaşamamıştır. Bu nedenle, etken madde değiştirilerek GBM tedavisi için potansiyel bir ajan olan kurkumin (CUR) çalışılmış ve CUR yüklü manyetik PLGA NP'ler sentezlenerek, bu NP'lere, yüzeylerine fibronektin yapışma sekansı olan glisin-arjinin-glisin-aspartik asit-serin (GRGDS) peptit konjugasyonu ile hücresel alım/hedeflendirme fonksiyonu kazandırılmıştır. Ayrıca, üretilen ve farklı biyo-aktif özellik kazandırılan tüm nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, hücre kültürü deneyleri yapılmıştır ve peptit bağlı CUR yüklü manyetik PLGA NP'ler 6 kat daha az CUR içermesine rağmen CUR yüklü manyetik PLGA NP'ler ile T98G hücreleri üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizlerinde benzer toksik etkiler görülmüştür ve 72. saatte bu etkiler canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleri ile desteklenmiştir. Bu durum, GRGDS ile fonksiyonelleştirilmiş PLGA NP'lerin hücresel alım/hedeflendirme başarısıyla açıklanabilir. Ayrıca, RF-hipertermi uygulanan NP'ler, T98G hücrelerinin % canlılık değerlerini RF-hipertermi uygulanmayan PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır. Sonuç olarak, peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin RF-hipertermi ile birlikte glioblastoma tedavisinde etkili bir anti-tümör sistemi olarak kullanılabileceği *in vitro* deneylerle gösterilmiştir.

Bilim Kodu	1008
Anahtar Kelimeler	Hipertermi maruziyet sistemi, radyofrekans, manyetik nanopartikül, HUVEC, T98G, glioblastoma, RGD, kurkumin, TMZ, PLGA, PEG
Sayfa Adedi	205
Danışman	Prof. Dr. Göknur GÜLER ÖZTÜRK

SYNTHESIS OF PEPTIDE COATED AND CHEMOTHERAPEUTIC DRUG LOADED
SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES AND DEVELOPMENT OF A
HYPERTHERMIA EXPOSURE SYSTEM FOR USE IN GLIOBLASTOMA CELL LINES

(Ph. D. Thesis)

Fatih ŞENTÜRK

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

July 2020

ABSTRACT

Glioblastoma Multiforme (GBM) is characterized by high invasiveness and low survival IV. degree diffuse glioma. In recent years, despite significant improvements in understanding the pathogenesis of GBM, the average overall survival of GBM patients varies between 12-15 months, so new and more effective treatment strategies need to be developed in GBM treatment. In this thesis, it is aimed to produce hyperthermia exposure system originated from the radiofrequency (RF)-field and to increase the effectiveness of nanoparticles with different functional properties with this device to investigate in GBM cells (T98G) *in vitro* conditions. For this purpose, firstly, the design and production of RF-field hyperthermia exposure system at 13,56 MHz frequency was realized. Subsequently, superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) were synthesized and characterized, which would interact with the alternating magnetic field (AMF) to generate heat in the target area. The obtained SPIONs were coated with PLGA-b-PEG di-block co-polymer which functionalized due to both biodegradability/biocompatibility of poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) polymer and the non-recognition properties of poly (ethylene glycol) (PEG) by macrophages, and then magnetic PLGA (PLGA+SPDON) nanoparticles (NPs) were produced. Afterwards, temozolomide (TMZ) encapsulation studies were performed on PLGA+SPDON NPs, but effective toxic dose concentration could not be achieved in T98G cells since TMZ's % encapsulation efficiency (EE%, 4%) was low. Therefore, curcumin (CUR), a potential agent for GBM treatment, was studied by changing the active ingredient, and CUR-loaded magnetic-PLGA NPs were synthesized, and these NPs were provided with cellular uptake/targeting function by their glycine-arginine-glycine-aspartic acid-serine (GRGDS) peptide conjugation on their surface. In addition, characterization processes of all nanoparticles produced and brought into different bioactive properties were carried out. After this, cell culture experiments were conducted and although the peptide-bound CUR-loaded magnetic-PLGA NPs contained 6 times less CUR than CUR-loaded magnetic-PLGA NPs, they showed similar toxic effects on T98G cells at 24, 48 and 72 hours in MTT analysis, and at 72 hours, these effects were supported by live/dead staining and Annexin V/PI analysis. This can be explained by the cellular uptake/targeting success of PLGA NPs functionalized with GRGDS. In addition, NPs applied RF-hyperthermia statistically significant reductions in PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR and PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs were observed in the % cell viability of T98G cells compared to NPs without RF-hyperthermia. In conclusion, *in vitro* experiments have been shown that peptide-bound CUR-loaded magnetic-PLGA NPs can be used as an effective anti-tumor system in the treatment of glioblastoma with RF-hyperthermia.

Science Code : 1008

Key Words : Hyperthermia exposure system, radiofrequency, magnetic nanoparticle, HUVEC, T98G, glioblastoma, RGD, curcumin, TMZ, PLGA, PEG

Page Number : 205

Advisor : Prof. Dr. Gökür GÜLER ÖZTÜRK

TEŞEKKÜR

Zor zamanlar geçirdiği dönemde, TÜBİTAK projemiz kabul aldığında 'şu an o kadar mutluyum ki!' diyerek mutluluğunu paylaşan insani yönünü bana her zaman hissettiren Sayın Hocam Prof. Dr. Göknur Güler Öztürk'e,

Yanına ilk gittiğimde beni kabul eden, bana laboratuvarını açan ve kendi çalışma grubundan ayırmayan Sayın Hocam Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Tez çalışması boyunca tüm deneylerde yanımda olan, çalışkanlığına öykündüğüm Sayın Hocam, abim, dostum Dr. Öğr. Üyesi Soner Çakmak'a, 'Sevgili Fatih' diyerek telefonumu cevaplayan, Hipertermi maruziyet sistemini oluşturduğumuz Sayın Hocam Prof. Dr. İsmail Cengiz Koçum'a, Mikrotek şirketi olarak hipertermi sisteminin üretimde destek olan Sayın Murat Bike ve Sayın Ramazan Çağlayan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hücre kültürü çalışmalarında benimle birlikte çalışan Dr. Anıl Sera Çakmak'a, desteğini hiç esirgemeyen Ekin Özge Tunçay'a, HPLC analizlerinde yardımcı olan Dr. Damla Çetin Altındal'a, karakterizasyon çalışmalarında laboratuvarlarını kullandığım, Dr. Tayfun Vural'a, Dr. Burak Kaynar'a, Dr. Cem Bayram'a yardımları için teşekkürlerimi sunarım. Tülay Ertekin'e, Sena Koç'a ve tüm Hücre ve Doku Mühendisliği Araştırma Laboratuvarındaki arkadaşlarıma, nanopartikül sentez kısmında sıklıkla kullandığım HÜNİTEK araştırma merkezine, teşekkürlerimi sunarım.

Ankara'da olduğu zamanlarda, her zaman abilik yapan, fikirlerimin olgunlaşmasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Mehmet Zahid Tüysüz'e, bilimsel sohbetinden her zaman keyif aldığım, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesinden arkadaşlarıma, Dr. Zübeyir Elmazoğlu'na, Dr. Gülşah Albayrak'a, Dr. Alaaddin Coşkun'a, Duygu Deniz Usta Salimi'ye, İsmail Türkoğlu'na ve tüm arkadaşlarıma, tüm hayatım boyunca desteklerini gördüğüm, sevgili annem Nurten Şentürk, babam Muhammet Şentürk, ağabeyim Ali Şentürk, ablalarım Melek Mağden ve Pınar Yolalan'a, vaktimin çoğunu alan doktora tez çalışmam boyunca, beni hep idare eden, gülüşünü hiçbir şeye değiştirmeyeceğim biricik eşim Sevilay Şentürk'e iyi ki varsınız ve hayatımdasınız. Son olarak, oğlum Ali Kuzey Şentürk'e...evlat! bilimle kal... Bu tez, TÜBİTAK 118S027 kodlu proje tarafından ve TÜBİTAK-BİDEB 2211 Yurtiçi Doktora Burs Programı tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xiv
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xvi
RESİMLERİN LİSTESİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glioma.....	3
2.1.1. Glioblastoma Multiforme.....	5
2.1.2. Glioblastoma standart tedavi yöntemleri	6
2.1.3. Glioblastoma tedavisinde karşılaşılan zorluklar (kısıtlılıklar)	10
2.2. Kan Beyin Bariyeri	11
2.2.1. Kan beyin bariyeri geçiş stratejileri	12
2.3. GBM Tedavisinde Potansiyel İlaç Etken Maddeler.....	17
2.3.1. Temozolomid	19
2.3.2. Kurkumin	22
2.4. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPDON'lar).....	24
2.4.1. SPDON'ların fiziksel özellikleri	24
2.4.2. SPDON'ların sentez yöntemleri.....	29
2.5. Nano-Taşıyıcı Sistemler	32
2.5.1. Polimerik manyetik nanopartiküller.....	32

	Sayfa
2.5.2. Hedefe yönelik sistemler.....	36
2.6. Hipertermi	38
2.6.1. Moleküler seviyede hipertermi	39
2.6.2. Kanser tedavisinde hipertermi	40
2.6.3. Manyetik nano hipertermi	41
2.6.4. Hipertermi maruziyet sistemleri.....	43
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler	48
3.2. Hipertermi Maruziyet Sisteminin Tasarımı ve Üretimi	50
3.2.1. Radyofrekans sinyal jeneratörü.....	51
3.2.2. Radyofrekans osilatör	51
3.2.3. Radyofrekans sürücü (RF driver).....	52
3.2.4. Radyofrekans yükselteç (RF amplifier)	54
3.2.5. Empedans uyumlayıcı (matching unit) tasarımı ve yapımı	56
3.2.6. Soğutma sistemi	56
3.2.7. Metal kutu	57
3.2.8. Sıcaklık ölçüm sistemi	57
3.3. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartikül (SPDON) sentezi.....	58
3.3.1. İkili çöktürme yöntemi ile SPDON sentezi.....	58
3.3.2. Termal ayrıştırma yöntemi ile SPDON sentezi.....	59
3.4. PLGA-b-PEG Kopolimer Sentezi	60
3.5. Temozolomid Yüklü manyetik PLGA Nanopartiküllerin Formülasyon Çalışmaları	61
3.6. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA Nanopartiküllerin Sentezi	63
3.7. Manyetik PLGA NP Yüzeyine Glisin-Arjinin-Glisin-Aspartik Asit-Serin (GRGDS) ve karboksitetrametilrodamin (TAMRA) İşaretli Peptitlerin bağlanması	63

Sayfa

3.8. Karakterizasyon Çalışmaları	65
3.8.1. X-ışını kırınımı (XRD) analizi	65
3.8.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi	66
3.8.3. Titreşimli örnek manyetometre (VSM) analizi	66
3.8.4. SPDON'ların indüksiyon ısıtma yeteneği	66
3.8.5. Termogravimetrik (TGA) analiz	67
3.8.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi	68
3.8.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi	68
3.8.8. Dinamik ışık saçılım (DLS) analizi	68
3.8.9. Büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC) analizi	68
3.8.10. Proton-NMR (¹ H-NMR) analizi	68
3.9. Enkapsülasyon Çalışmaları	69
3.9.1. Manyetik PLGA nanopartiküllere TMZ enkapsülasyon veriminin UV spektrometre (Nanodrop) ile belirlenmesi	69
3.9.2. Manyetik PLGA nanopartiküllerine TMZ enkapsülasyon veriminin HPLC ile belirlenmesi	70
3.9.3. Manyetik PLGA nanopartiküllere kurkumin enkapsülasyon veriminin UV spektrometre (Nanodrop) ile belirlenmesi	70
3.10. Salım Çalışmaları	70
3.11. Hücre kültürü Çalışmaları	71
3.11.1. Hücrelerin çözülmesi ve çoğaltılması	71
3.11.2. Hücre Sayımı	71
3.11.3. Serbest TMZ'nin T98G ve HUVEC hücreleri üzerine etkisi	72
3.11.4. Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkisi	72
3.11.5. Serbest kurkuminin T98G ve HUVEC hücreleri üzerine etkisi	73
3.11.6. Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkisi	73

	Sayfa
3.11.7. Hipertermi uygulamaları	74
3.11.8. Hücre kültürü analizleri.....	75
3.12. İstatistiksel Analiz.....	78
4. BULGULAR	79
4.1. Hipertermi Maruziyet Sistemine İlişkin Bulgular.....	79
4.1.1. Radyofrekans sinyal jeneratörü	80
4.1.2. Radyofrekans osilatör	80
4.1.3. Radyofrekans sürücü (RF driver)	81
4.1.4. Radyofrekans yükselteci (RF amplifier).....	83
4.1.5. Empedans uyumlayıcı (matching unit) tasarımı ve yapımı	85
4.1.6. Soğutma sistemi.....	87
4.1.7. Metal kutu.....	88
4.1.8. Sıcaklık ölçüm sistemi.....	88
4.2. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin (SPDON'ların) Üretimi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular.....	89
4.2.1. SPDON'ların ikili çöktürme yöntemi ile üretimi ve karakterizasyonuna ait bulgular	89
4.2.2. SPDON'ların termal ayrıştırma yöntemi ile üretimine ve karakterizasyonlarına ait bulgular	96
4.3. PLGA-b-PEG Kopolimeri Karakterizasyon Çalışmaları.....	99
4.3.1. Büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC) Analizi	99
4.3.2. Proton-NMR (¹ H-NMR) analizi	100
4.3.3. ATR- FTIR analizi.....	101
4.4. Temozolomid Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Sentezine ve Karakterizasyonuna ait Çalışmalar	101
4.4.1. TMZ'nin UV spektrometre analizleri	104
4.4.2. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin UV spektrometre ile enkapsülasyon verimleri	107

Sayfa

4.4.3. TMZ'nin HPLC ile analizleri	108
4.4.4. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez parametreleri ve HPLC ile enkapsülasyon verimleri	110
4.5. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Sentezine ve Karakterizasyonuna ait Çalışmalar	114
4.5.1. Kurkuminin UV spektrometre analizleri.....	118
4.5.2. Kurkumin yüklü nanopartiküllere bağlanan peptit miktarı tayini.....	120
4.5.3. Kurkumin yüklü manyetik nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi.....	123
4.5.4. Kurkumin yüklü nanopartiküllerin salım çalışmaları	123
4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	124
4.6.1. Serbest TMZ'nin HUVEC ve T98G hücreleri üzerine etkilerinin hücre canlılık analizleri ile belirlenmesi.....	125
4.6.2. TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin T98G hücreleri üzerine etkisi.....	127
4.6.3. Serbest kurkuminin HUVEC/T98G hücrelerinde canlılık analizleri ve T98G hücre morfolojisine etkisi.....	133
4.6.4. Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin hücre kültürü analizleri	137
4.6.5. Hipertermi maruziyeti ile hücre kültürü deneyleri	147
5. TARTIŞMA	153
5.1. Hipertermi Maruziyet Sistemi Üretiminin Değerlendirilmesi	155
5.2. SPDON'ların Karakterizasyonuna ait Bulguların Değerlendirilmesi	156
5.2.1. İkili Çöktürme Yöntemiyle SPDON Üretimi ve Karakterizasyonu.....	156
5.2.2. Termal Ayırıştırma Yöntemiyle SPDON Üretimi ve Karakterizasyonu ...	160
5.3. PLGA-b-PEG Kopolimeri Sentezinin Değerlendirilmesi	161
5.4. Manyetik PLGA NP'lerin Tartışılması.....	163
5.5. TMZ yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Tartışılması.....	164
5.6. Serbest TMZ ve TMZ Yüklü Manyetik PLGA NP'ler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları	167

Sayfa

5.7. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Üretimi ve Karakterizasyonu	169
5.8. Serbest Kurkumin ve Kurkumin yüklü Manyetik PLGA NP'ler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları	172
5.9. Hipertermi Maruziyeti Altında Hücre Kültürü Çalışmaları	174
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	179
KAYNAKLAR	181
ÖZGEÇMİŞ	204



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. GBM tedavisinde kullanılan potansiyel ajanlar.....	18
Çizelge 2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasal yöntemlerin karşılaştırılması.....	30
Çizelge 2.3. Hipertermi maruziyet sistem modelleri	43
Çizelge 3.1. Hipertermi maruziyet sistemi tasarımında ve üretiminde kullanılan malzemeler ve cihazlar	48
Çizelge 3.2. Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasallar	48
Çizelge 3.3. Karakterizasyon için kullanılan cihazlar	49
Çizelge 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kitler.....	50
Çizelge 3.5. Temozolomid (TMZ) yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin formülasyon parametreleri ve miktarları	62
Çizelge 3.6. Temozolomid miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait parametreler	70
Çizelge 3.7. Serbest TMZ ile gerçekleştirilen hücre kültürü analizi	72
Çizelge 3.8. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin hücre kültürü analizleri	73
Çizelge 3.9. Serbest kurkumin ile gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri.....	73
Çizelge 3.10. Kurkumin yüklü NP'lerle gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri	74
Çizelge 3.11. Hipertermi uygulamasında gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri.....	74
Çizelge 4.1. TGA grafiğinden (Şekil 4.5) elde edilen sonuçlar.....	92
Çizelge 4.2. PLGA ve PLGA-b-PEG polimerlerinin Mn, Mw ve PDI değerleri	99
Çizelge 4.3. Nanopartikül sentez parametreleri ve % EE.....	110
Çizelge 4.4. Su fazı saturasyonu ile sentezlenen nanopartiküller ve %EE değerleri.....	111
Çizelge 4.5. Organik faza asit ilave edilerek hazırlanan formülasyonlar ve %EE değerleri	111
Çizelge 4.6. Düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı PLGA içeren nanopartikül formülasyonları.....	112
Çizelge 4.7. Farklı moleküler ağırlıklı PLGA ve PVA içeren nanopartikül formülasyonları.....	113

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.8. Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin %EE değerleri	123
Çizelge 4.9. TMZ' nin T98G hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde IC ₅₀ değerleri	127
Çizelge 4.10. Kurkumin yüklü NP'lerin yüklenen ve salınan kurkumin miktarına göre doz değerleri	139
Çizelge 5.1. Literatürdeki TMZ yüklü PLGA NP çalışmalarından bazı örnekler, sentez parametreleri ve %EE (indirekt/direkt) değerleri, (Su fazında TMZ içeren (TMZ+), içermeyen (TMZ-)).....	165



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Beyin hücreleri [9].....	4
Şekil 2.2. (a) Malign primer beyin tümörleri ve diğer MSS tümörlerinin görülme sıklığı dağılımı, (b) primer beyin gliomaları ve diğer MSS gliomaların görülme sıklığı dağılımı ([12]'den uyarlanmıştır).....	5
Şekil 2.3. (a) Hücre bölünmesine TTFields etkisi, (b) tümör bölgesine uygulanan elektrik alan [44].....	10
Şekil 2.4. Glioblastoma tedavi zorluklarının ana hatları [47].....	11
Şekil 2.5. Kan-beyin bariyerinin yapısal gösterimi ([51]'den uyarlanmıştır)	12
Şekil 2.6. Kan beyin bariyeri geçiş mekanizmaları, ([52, 53]'ten uyarlanmıştır)	13
Şekil 2.7. (a) TMZ, MTIC, AIC ve MC'nin kimyasal yapısı, (b) Metildiazonyum kasyonu (MC) ile, DNA alkilasyonu ([82]'ten uyarlanmıştır).	20
Şekil 2.8. (a) O ⁶ -metilguanin, DNA tamir enzimi, (b) MGMT, DNA tamir reaksiyonu; metil grubun (turuncu) hasarlı DNA bazından MGMT'ye aktarılması ve MGMT'nin inaktif hale gelmesi ([92]'den uyarlanmıştır)...	22
Şekil 2.9. Kurkuminin kimyasal yapısı, (a) Kurkuminin keto formu, (b) kurkuminin enol formu, (c) kurkumin analoglarının yapı-aktivite ilişkisi ([95]'den uyarlanmıştır).....	23
Şekil 2.10. Demir oksit nanopartiküllerin içerdikleri 'domain' sayılarına göre oluşturdukları manyetik alan ([109]'dan uyarlanarak oluşturulmuştur)	25
Şekil 2.11. Manyetik malzemelerde çoklu domain ve tek domain bölgelerinin gösterimi ([112]'den uyarlanmıştır).....	26
Şekil 2.12. Manyetik malzemelerde histerezis eğrisi [114].....	27
Şekil 2.13. Alternatif manyetik alan (AMF) varlığında manyetik nanopartiküllerin Neel ve Brownian relaksasyon kayıplarının şematik gösterimi ([110]'dan uyarlanmıştır).....	28
Şekil 2.14. Termal ayırıştırma yöntemi ile eş boyut dağılımlı demir oksit sentez şeması (TEM görüntüsü bu çalışmaya aittir).....	31
Şekil 2.15. Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) hidrolizi [132].	34
Şekil 2.16. En çok kullanılan PLGA nanopartikül sentez yöntemleri, (A) tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma, (B) nanoçöktürme [132]	35
Şekil 2.17. Tümör bölgesine EPR etkisi ile pasif ve aktif hedeflendirme ([141]'den uyarlanmıştır).....	37

Şekil	Sayfa
Şekil 2.18. Hipertermi maruziyetinin tümör hücreleri üzerindeki moleküler etkileri ([155]'ten uyarlanmıştır).....	40
Şekil 2.19. (a) Dıştan-içe hipertermi, (b) içten-dışa hipertermi, RF: radyofrekans, NPTT: nano foto termal terapi, NMH: nano manyetik hipertermi, NaRFA: nano radyofrekans ablasyon, NUH: nano ultrason hipertermi ([3]'dan uyarlanmıştır.).....	41
Şekil 3.1. Hipertermi maruziyet sisteminin şematik gösterimi.....	51
Şekil 3.2. (a) Empedans uyumlayıcı devre şeması, (b) variable (ayarlı) kondansatör, (c) empedans uyumlayıcı bobin, (d) pancake ve selenoid bobin.....	56
Şekil 3.3. İkili çöktürme yöntemi ile demir oksit nanopartiküllerin sentez şeması....	58
Şekil 3.4. Termal ayrıştırma yöntemi ile (a) demir oleat, (b) SPDON sentez şeması	59
Şekil 3.5. Poli(laktik-ko-glikolik asit)-poli(etilen glikol) di-blok kopolimerin sentez şeması	60
Şekil 3.6. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemine göre sentezlenen TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin genel sentez şeması.....	61
Şekil 3.7. Nanopartikül yüzeyine GRGDS peptit konjugasyonu şematik çizimi	64
Şekil 3.8. T98G hücrelerine hipertermi uygulamasının şematik gösterimi	75
Şekil 4.1. Hipertermi maruziyet sistemi tasarımının ve üretiminin genel şematik gösterimi	79
Şekil 4.2. Empedans uyumlayıcı (matching unit) devre şeması ve devre elemanlarının kapasitif ve indüktif değerleri (LC metre üzerindeki ölçüm değerleri net görünmediğinden tekrar yazılmıştır)	86
Şekil 4.3. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen (a) SPDON, (b) SPDON +%0,2OA, (c) SPDON+%0,5OA, (d) SPDON+%1OA nanopartiküllerine ait XRD grafikleri.....	89
Şekil 4.4. (a) Oleik asit, b) SPDON+%0,2OA, c) SPDON+%0,5OA, d) SPDON +%1OA, (e) SPDON'ların ATR-FTIR spektrumları.	90
Şekil 4.5. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen (a) SPDON, (b) SPDON +%0,2OA, (c) SPDON+%0,5OA, (d) SPDON+%1OA nanopartiküllerin TGA termogramları	91
Şekil 4.6. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) TEM görüntüleri ve boyut dağılım histogramları	92
Şekil 4.7. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen a) SPDON, b) SPDON+%0,2OA, c) SPDON+%0,5OA, d) SPDON+%1OA NP'lerin DLS analizleri.....	93

Şekil	Sayfa
Şekil 4.8. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen oleik asit (OA) içermeyen ve OA kaplı SPDON'lara ait manyetizasyon eğrileri (tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir)	94
Şekil 4.9. (a),(b) SPDON ve SPDON+%1OA nanopartiküllerin zamana ve doza bağlı sıcaklık değişim eğrileri, (c) 10 mg/mL derişimde tüm nanopartiküllerin zamana bağlı sıcaklık değişim eğrileri, (d) 10 dk. manyetik alan maruziyeti sonrasında tüm nanopartiküllerin doza bağlı sıcaklık değişim eğrileri.....	95
Şekil 4.10. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen OA kaplı SPDON'ların XRD grafiği.....	96
Şekil 4.11. Oleik asit ve termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen OA kaplı SPDON'ların ATR-FTIR grafiği.....	97
Şekil 4.12. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar (a,b) farklı büyütmelede TEM görüntüleri, (c) ImageJ ile boyut analizi yapılan TEM görüntüsü, (d) boyut analiz histogramı.....	98
Şekil 4.13. GPC kromatogramları; a) PLGA b) PLGA-b-PEG	99
Şekil 4.14. ¹ H-NMR spektrumu (a) PLGA, (b) PEG, (c) sentezlenen PLGA-b-PEG ko-polimeri karakteristik piklerinin grafiği	100
Şekil 4.15. (a) PLGA, (b) PEG, (c) sentezlenen PLGA-b-PEG kopolimerine ait ATR-FTIR spektrumları	101
Şekil 4.16. İkili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenen SPDON'ların PLGA kaplamaları sonrasında TEM görüntüleri ve ImageJ programı ile boyut ölçümleri	102
Şekil 4.17. TMZ içermeyen ve TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lere ait SEM görüntüleri, ImageJ boyut analizleri ve DLS analizleri.....	103
Şekil 4.18. TMZ'nin farklı derişimlerde (a) PBS (pH:7,4) içerisinde, (b) DMSO içerisinde UV spektrumları.....	105
Şekil 4.19. (a) PBS (pH:7,4) içerisinde 50 µg/ml TMZ'nin zamanla bozunma eğrileri, (b) PBS (pH:7,4) içerisinde farklı derişimlerde AIC (266 nm)'nin zamanla stabilite grafiği, (c) DMSO içerisinde 50 µg/ml TMZ'nin zamanla bozunma eğrileri, (d) DMSO içerisinde farklı derişimlerde TMZ (330 nm)'nin zamanla stabilite grafiği	106
Şekil 4.20. UV spektrometre ile TMZ kalibrasyon eğrileri (a) PBS içerisinde 330 nm, (b) DMSO içerisinde 330 nm (n=5)	107
Şekil 4.21. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez sonrası süpernatandan (ultra saf su içerisinde) elde edilen UV örnek spektrumu	108

Şekil	Sayfa
Şekil 4.22. (a) Mobil faz (MP) ve (b) asetonitril:mobil faz (ACN:MP, 1:4) ortamlarında farklı derişimlerde TMZ'nin HPLC kromatogramları	109
Şekil 4.23. HPLC ile TMZ kalibrasyon eğrileri (a) mobil faz, (b) asetonitril:mobil faz (1:4)	109
Şekil 4.24. F14-17 formülasyonlarının HPLC örnek kromatogramları (direkt yöntem %EE).....	112
Şekil 4.25. F18 formülasyonunun HPLC örnek kromatogramı (direkt yöntem %EE).	114
Şekil 4.26. ATR-FTIR spektrumları; (a) Kurkumin, (b) PLGA+SPDON NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (e) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs.	116
Şekil 4.27. SPDON, PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA nanopartiküllerin manyetik alana karşı manyetizasyon eğrisi.....	117
Şekil 4.28. Kurkumin içermeyen ve kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri, boyut ve DLS analizleri	118
Şekil 4.29. Kurkuminin farklı konsantrasyonlarda (a) asetonitril (ACN) ve (b) etanol:PBS (ETH:PBS, 1:1) içerisinde UV spektrumları.....	119
Şekil 4.30. Kurkumin kalibrasyon doğruları (a) ACN içerisinde (b) ETH:PBS (1:1) içerisinde (n=5).....	119
Şekil 4.31. Kütle spektroskopileri (a) GRGDS, (b) GRGDS-TAMRA.....	120
Şekil 4.32. HPLC kromatogramları, (a) GRGDS, (b) GRGDS-TAMRA	121
Şekil 4.33. 0-20 µg/mL doz aralığında GRGDS-TAMRA spektrumları, (a) eksitasyon, (b) emisyon dalgaboylarında	122
Şekil 4.34. TAMRA işaretli GRGDS peptitin kalibrasyon doğrusu ve nanopartiküllere bağlanan GRGDS-TAMRA miktarları	122
Şekil 4.35. (a) PLGA+SPDON+CUR, (b) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin PBS (pH:7,4) ortamında kümülatif salım grafikleri	124
Şekil 4.36. Hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi.....	124
Şekil 4.37. TMZ'nin HUVEC hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 24, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=5)	125

Şekil

Sayfa

- Şekil 4.38. TMZ'nin T98G hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz değeri için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 24, 48 ve 72 saatler için kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=8) 127
- Şekil 4.39. PLGA, PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ nanopartiküllerinin T98G hücrelerinde 72. saatte % canlılık grafikleri (a) gruplar arası kıyaslama, (b) her bir nanopartikül için doza bağlı grup içi kıyaslama, anlamlılık dereceleri, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=3)..... 128
- Şekil 4.40. PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücrelerinde 72. saatte % canlılık grafikleri (a) gruplar arası kıyaslama, (b) her bir nanopartikül için doza bağlı grup içi kıyaslama, anlamlılık dereceleri, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=3)..... 129
- Şekil 4.41. Kurkuminin HUVEC hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=5)..... 134
- Şekil 4.42. Kurkuminin T98G hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=5)..... 135
- Şekil 4.43. Farklı dozlarda (0-1 mg/mL) PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+GRGDS, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin T98G hücrelerine uygulandıktan (a) 24, (b) 48 ve (c) 72 saat sonra MTT analizleri ile elde edilen % canlılık grafikleri (grafik simgeleri üç grafikte de aynı nanopartikülleri göstermektedir, istatistiksel olarak aynı dozların NP'ler arası karşılaştırması yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, n=5) 138
- Şekil 4.44. Farklı nanopartiküllerin kendi içlerinde 24, 48 ve 72. saatlerde doza bağlı % canlılık grafikleri, (a) PLGA+SPDON NPs, (b) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs (Nanopartiküller, her bir uygulama süresinde kendi kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, n=5) 140
- Şekil 4.45. RF-hipertermi uygulama sonrası T98G hücrelerinin % canlılık sütun grafikleri, (a) hipertermi uygulanan ve uygulanmayan nanopartiküllerin karşılaştırılması, (b) hipertermi uygulanmayan grubun kendi içinde, hipertermi uygulanan grubun kendi içinde karşılaştırılması, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=5)..... 149
- Şekil 4.46. T98G hücrelerinde NPs veya NPs+RF uygulamaları sonrası ROS seviyeleri..... 152

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Alternatif manyetik alan cihazı MFH 300F (MagForce Nanoteknolojileri AG, Berlin, Almanya) [161]	43
Resim 2.2. Ticari olarak kullanılan manyetik hipertermi cihazları [173]	45
Resim 2.3. Kapasitif RF maruziyet sistemi (a) diyagramı ve (b) cihazı [174]	46
Resim 3.1. RF sinyal jeneratöründen üretilen 13,56 MHz sinyal	51
Resim 3.2. (a) RF osilatör devre çizimi	52
Resim 3.3. RF osilatörün sisteme entegrasyonu ve kutulanması	52
Resim 3.4. AN779L RF sürücü demonte devre elemanları, (a) baskı devre kartı, (b) dirençler, (c) kapasitörler, (d) diyotlar ve demir boncuklar, (e) soğutucu plakalar ve vidalar, (f) yarı iletken transistörler ve (g) empedans transformatörleri.....	53
Resim 3.5. (a) AN779L RF sürücü devre şeması, (b) devre şemasına göre lehim ve montajı yapılan RF sürücü	53
Resim 3.6. EB104 RF yükseltici demonte devre elemanları, (a) baskı devre kartı, (b) dirençler ve trim değişken dirençler, (c) seramik çip ve disk kapasitörler, (d) ferrit boncuk ve çubuklar, (e) diyot, zener diyot ve voltaj regülatörü, (f) transformatörler ve (g) yarı iletken mosfet transistörler	54
Resim 3.7. (a) EB104 RF yükseltici devre şeması ve (b) devre şemasına göre lehim ve montajı yapılan RF yükseltici	55
Resim 3.8. SWR-watt metre (çift ibreli)	56
Resim 3.9. (a) Bakır külçe soğutucu, (b) alüminyum soğutucu ve fanlar.....	57
Resim 3.10. (a) empedans uyumlayıcı, (b) RF sürücü ve (c) tüm sistem için metal kutular	57
Resim 3.11. Flir E6 termal kamera	57
Resim 3.12. (a) Bobin, (b) fiber-optik sıcaklık ölçer, (c) kilohertz (kHz) bandında çalışan indüksiyon cihazı (EasyHeat, 8310).....	67
Resim 4.1. Radyofrekans sinyal jeneratörünün ürettiği 13,56 MHz sinyalin, RF sürücüyeye kontrollü bir şekilde iletilmesini gösteren resimler	80
Resim 4.2. Lehimlenmiş ve bitmiş RF osilatör devresi	81
Resim 4.3. Lehimlenmiş, montajı ve entegrasyonu sağlanmış AN779L RF sürücü	82

Resim	Sayfa
Resim 4.4. Lehimlenmiş ve entegrasyonu sağlanmış EB104 RF yükselteç devresi.....	84
Resim 4.5. Montajı ve metal kutulaması yapılmış empedans uyumlayıcı.....	86
Resim 4.6. RF yükselteç devresinin külçe bakır blok üzerine montajı.....	87
Resim 4.7. RF yükselteç devresinin alüminyum blok üzerine monte edilmesi ve soğutma sistemi.....	87
Resim 4.8. (a) Bölümlendirilmiş metal kutu, (b) Metal kutu kapalı iken görünüm.....	88
Resim 4.9. (a), (b) RF yükselteç devresinde oluşan sıcaklığın dijital ve termal kamera görüntüleri; (c), (d) inkübatörden çıkarıldıktan hemen sonra T98G hücrelerinin dijital ve termal kamera görüntüleri	88
Resim 4.10. T98G hücreleri canlı/ölü hücre analizi floresan mikroskop görüntüleri, (a-c) nanopartikül içermeyen (kontrol) gruplar, sırasıyla, 24, 48 ve 72. saatler, (d-f) sırasıyla; 1,25; 5 ve 10 mg/mL PLGA+SPDON NP'leri uygulanan gruplar (72. saat), (g-i) sırasıyla; 1,25; 5 ve 10 mg/mL PLGA+SPDON+TMZ NP'leri uygulanan gruplar (72. saat).....	131
Resim 4.11. Nanopartikül uygulanmamış T98G hücrelerinin 72. saat sonunda Anneksin V/PI boyama sonrası floresan mikroskobu görüntüsü (20X).....	132
Resim 4.12. Farklı dozlarda nanopartikül uygulaması sonrası (72.saat) Anneksin V-FITC/PI ile boyanmış T98G hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri	133
Resim 4.13. T98G hücrelerine farklı dozlarda serbest kurkumin uygulandıktan 72 saat sonra kristal viyole boyamaları (40X); (a) kontrol, (b) 6,25 μ M (c) 12,5 μ M, (d) 25 μ M, (e) 50 μ M, (f) 100 μ M.....	136
Resim 4.14. T98G hücrelerine serbest kurkumin uygulandıktan 72 saat sonra Alexa Flour-DAPI boyamaları; (a) Kontrol, (b) 6,25 μ M (c) 12,5 μ M, (d) 25 μ M, (e)50 μ M, (f) 100 μ M	136
Resim 4.15. T98G hücrelerine 1 mg/mL NP uygulandıktan 72 saat sonra canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (4X), (a) PLGA+SPDON NPs, (b) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs	141
Resim 4.16. T98G hücrelerine 0,25; 0,5; 1 mg/mL NP uygulandıktan 72 saat sonra canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (a-c) kontrol grupları,10X, 20X, 40X; (d-f) PLGA+SPDON NPs (20X), (g-i) PLGA+SPDON+GRGDS NPs (20X), (j-l) PLGA+SPDON+CUR NPs (20X), (m-o) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs (20X)	142
Resim 4.17. T98G hücrelerinin 72. saatte canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (1 mg/mL) (a) PLGA+SPDON+CUR NPs, (b) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs	143

Resim	Sayfa
Resim 4.18. T98G hücrelerine PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR +GRGDS NP'leri uygulandıktan 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamalarına ait floresan mikroskop görüntüleri.....	144
Resim 4.19. T98G hücrelerine uygulanan peptit bağlı ve peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin (1 mg/mL), 40X büyütmede 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamalarının floresan mikroskop görüntüleri.	144
Resim 4.20. T98G hücrelerine PLGA+SPDON+CUR+GRGDS-TMR NP'ler uygulandıktan 2 saat sonra optik, floresan ve optik üzerine bindirilmiş floresan mikroskop görüntüleri	146
Resim 4.21. Radyofrekans (RF) alan maruziyeti sırasında T98G hücrelerinin bulunduğu 25 cm ² 'lik kültür kabının termal kamera görüntüleri.....	148
Resim 4.22. T98G hücrelerinde hipertermi uygulaması sonrası canlı/ölü hücre analizi	150
Resim 4.23. T98G hücrelerinde hipertermi uygulaması sonrası Anneksin V/PI analizi	151

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

°C	Santigrad Derece
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram
g	Gram
kDa	Kilo Dalton
mg	Miligram
ml	Mililitre
Hz	Hertz
kHz	Kilohertz (10^3 Hz)
MHz	Megahertz (10^6 Hz)
Gy	Gray (radyoterapide, doz birimi, (1 Joule/kg))
nm	nanometre (10^{-9} m)

Kısaltmalar

AMF	Alternatif Manyetik Alan
CUR	Kurkumin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EGFR	Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
ELISA	Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay
EM	Elektromanyetik
FBS	Fetal Sığır Serumumu
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FITC	Floresan İzotiyosiyanat
GBM	Glioblastoma multiforme

Kısaltmalar**Açıklamalar**

HPLC	Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi
KBB	Kan Beyin Bariyeri
MNH	Manyetik Nano Hipertermi
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
NP	Nanopartikül
NPs	Nanopartiküller
PBS	Fosfat Tamponlu Tuz Çözeltisi
PEG	Polietilen Glikol
PLGA	Poli(laktik-ko-glikolik asit)
PLGA+SPDON	Manyetik PLGA
PLGA+SPDON+CUR	Kurkumin yüklü manyetik PLGA
PLGA+SPDON+CUR+GRGDS	GRGDS bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA
RES	Retiküloendotelyal sistem
RF	Radyofrekans
ROS	Reaktif oksijen türleri
Rpm	Dakika Başına Dönme Sayısı
SAR	Özgül Soğurma Oranı
SPDON	Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartikül
TEM	Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu
TMZ	Temozolomid
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Kanser, tüm dünyadaki ölüm oranının en önemli nedenlerinden biri olarak, anormal hücrelerin kontrolsüz büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin, en ölümcül türü olan glioblastoma multiforme (GBM), histolojik heterojenite, yüksek invazyon, atipik çekirdek ve yüksek damar geçirgenliği gibi histopatolojik özellikler gösteren IV. derece diffüz gliomadır [1]. Glioblastoma standart tedavi protokolü, temel olarak, cerrahi rezeksiyon ile başlamaktadır, ardından eşzamanlı radyoterapi (RT) ve kemoterapi (temozolomid, TMZ) ile devam etmektedir [2]. Glioblastoma tedavisinde kullanılan yöntemler geleneksel ve modern yöntemler olarak sınıflandırılabilir. Cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi, GBM tedavisi için en yaygın kullanılan konvansiyonel yöntemlerdir. Ancak, geleneksel yöntemlerin hem etkinlikleri sınırlıdır hem de önemli yan etkileri mevcuttur [3]. Örneğin; cerrahi yöntemle küçük boyutlu çok sayıdaki metastatik tümörün çıkarılmasındaki zorluk, kemoterapi ve diğer ilaç tedavilerinde, tümörün ilaca kümülatif direncinin etkin olması, ilacın toksik olması, tekrar kullanımının sınırlanması gibi kısıtlılıklar mevcuttur. Radyoterapinin ise vücuda yayılmış çok sayıda tümöre uygulanmasındaki zorluk ve sağlıklı dokuların yüksek enerjili iyonize radyasyona maruz kalması gibi geleneksel yöntemlerin tedavideki kısıtlılıklarından bazılarıdır [4, 5]. Bu nedenle modern yöntemler olarak isimlendirilen hipertermi, fotodinamik terapi, ultrases terapi, immüno terapi vb. alternatif yöntemler önerilmekte ve araştırılmaktadır.

Tümör bölgesinde ısı oluşumuna dayanan hipertermi yöntemi, tümör hücresinin fizyolojik olarak değişimine ve sonunda ölüme gitmesine yol açmaktadır. Hipertermi uygulaması, 41-45°C sıcaklık aralığında ısı stresi oluşturarak; sinyal iletimindeki değişiklik, apoptoz indüksiyonu, pH'da değişiklik gibi hücre içi ve dışı yıkım mekanizmalarının aktivasyonuna neden olmaktadır [6, 7]. Hipertermi etkinliği, hedeflenen tümör bölgesindeki sıcaklık profiline, maruziyet süresine ve kanser hücresinin karakteristiğine bağlıdır. Son yıllarda, farklı fonksiyonel özellikler kazandırılan nanopartikül çalışmaları oldukça artmıştır ve bu nanopartiküllerin hedef bölgelerde non-invazif uyarılara (elektromanyetik alan, ultrases, lazer vb.) verdikleri yanıtlar ile tedavi etkinlikleri belirlenmektedir. Daha etkili hipertermi uygulaması için hipertermi ajanı olarak kullanılması düşünülen manyetik nanopartiküllerin dış bir kaynaktan gelen enerjiyi soğurmaları ve bu enerjinin tümör üzerine odaklanabilmesi

ile hipertermi etkinliğini arttırabilmiştir [3]. Manyetik nanopartikül aracılı hipertermi çalışmaları ilk olarak 1996'da Shinkai M. ve ark. tarafından manyetik katyonik lipozomlar kullanılarak glioma hücrelerinde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda hipertermi, kanser hücrelerinde sıcaklığa bağlı olarak, apoptotik ve/veya nekrotik hücre ölüm yollarını uyarmak için kullanılmıştır [8].

Bu tez çalışmasında, öncelikle radyofrekans (RF)-alan kaynaklı hipertermi maruziyet sisteminin tasarımı ve üretimi gerçekleştirilmiştir. İmal edilen bu cihazla, sentezlenen manyetik güdümlü nanobiyoteknolojik ilaç taşıyıcı sistem etkinliğinin RF alan hipertermi etkisiyle arttırılması ve *in vitro* koşullarda glioblastoma kanser hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda;

Bölüm 2'de, glioma, glioblastoma multiforme (GBM), GBM standart tedavi yöntemleri ve tedavide karşılaşılan zorluklar, kan beyin bariyeri ve geçiş stratejileri, GBM tedavisinde potansiyel etken maddeler, temozolomid, kurkumin, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar), SPDON'ların fiziksel özellikleri ve sentez yöntemleri, nano-taşıyıcı sistemler ve hipertermi ile ilgili genel bilgiler literatür eşliğinde verilmiştir.

Bölüm 3'te, öncelikle hipertermi maruziyet sisteminin tasarımı ve üretiminde kullanılan malzemeler ve bunların entegrasyon süreçleri anlatılmıştır. Ardından, SPDON'lar, PLGA-b-PEG ko-polimeri, TMZ enkapsülasyon çalışmaları, kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküller ve peptit konjugasyonlarını içeren tüm sentez ve karakterizasyon işlemlerine ait yöntemler bu bölümde anlatılmıştır. Son olarak, sentezleri gerçekleştirilen ve farklı biyo-aktivite kazandırılan nanopartiküllerin hücre kültürü analiz yöntemleri anlatılmıştır.

Bölüm 4'te, radyofrekans (RF) hipertermi maruziyet sistemine ve entegrasyonuna ilişkin bulgular, ardından tüm nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonlarına ait bulgular verilmiştir. Son olarak da hücre kültürü analizlerinden (MTT, canlı/ölü hücre, Anneksin V/PI, ROS) elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Bölüm 5'te, tez kapsamında yapılan tüm çalışmalara ilişkin deney sonuçları literatür eşliğinde değerlendirilerek tartışılmıştır.

Bölüm 6'da ise gerçekleştirilen tez çalışmasından elde edilen genel sonuçlar ve öneriler verilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Bu bölümde gerçekleştirilen tez çalışmasının temel aldığı konular, literatür bilgileri ışığında özetlenmiştir. Öncelikle, merkezi sinir sistemi tümörlerinden olan gliomalar ve gliomaların en ölümcül türü olan glioblastomalar ile ilgili genel bilgiler verilmiştir. Ardından, glioblastoma standart tedavi yöntemleri ve tedavide karşılan zorluklar (sınırlılıklar) ile devam edilmiştir. Daha sonra, glioblastoma tedavisinin en önemli ‘engeli’ oluşturan kan beyin bariyeri, kan beyin bariyeri geçiş mekanizmaları ve bu mekanizmalar ile nanopartiküllerin KBB geçişlerindeki rolleri anlatılmıştır. Devam eden bölümde, glioblastoma tedavisinde potansiyel ilaçlardan kısaca bahsedilerek, temozolomid ve kurkumin etken maddelerinin moleküler düzeydeki etkileri ve mekanizmaları açıklanmış ve sonrasında süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin fiziksel özellikleri ve sentez yöntemleri anlatılmıştır. Daha sonra, nano-taşıyıcı sistemler başlığı altında polimerik manyetik nanopartiküller, bu nanopartiküllerin kaplamalarında kullanılan polimerler (özellikle PLGA, PEG) ve nanopartikül hedefleme stratejilerinden bahsedilmiştir. Son olarak, hipertermi ve moleküler etkileri, kanser tedavisinde hipertermi, manyetik nanopartikül aracılı hipertermi ve hipertermi çalışmalarında kullanılan maruziyet sistemleri özetlenerek bu bölüm sonlandırılmıştır.

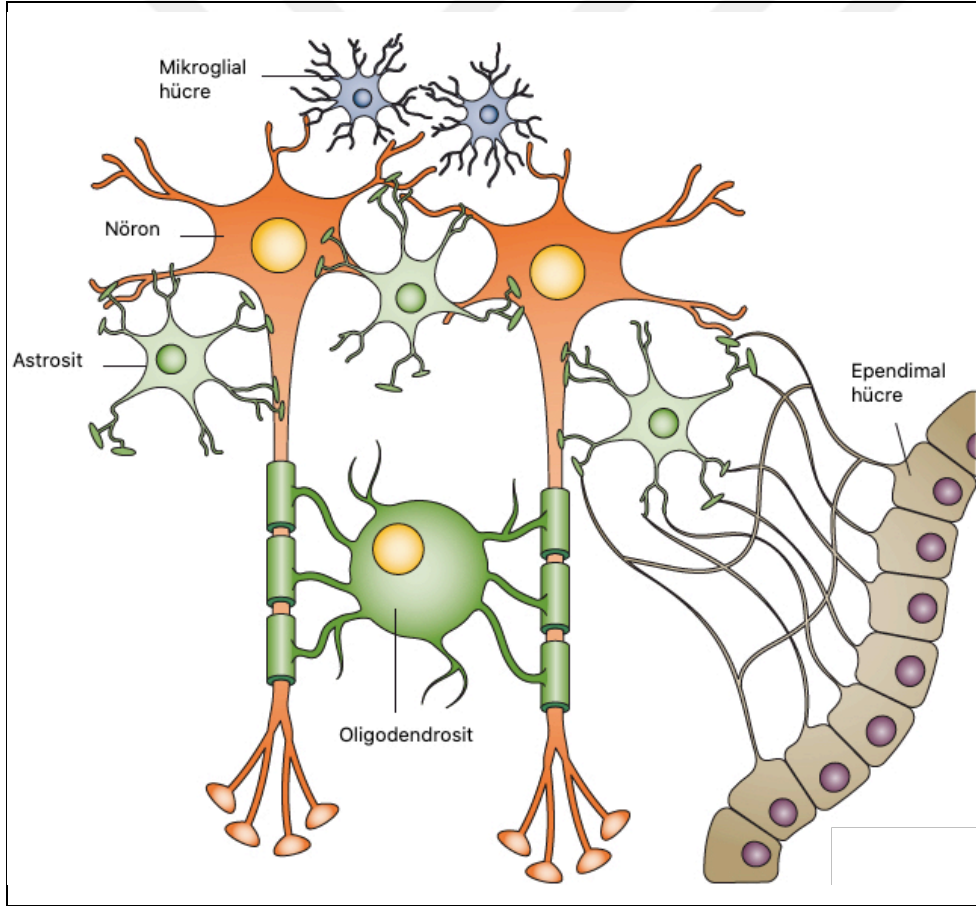
2.1. Glioma

Bu bölümde, öncelikle sağlıklı glial hücrelerden, daha sonra glial veya öncüllerinden köken alan glioma tümörlerinden ve gliomaların Dünya Sağlık Örgütü sınıflandırma kriterlerinden kısaca bahsedilmektedir. Bu tez kapsamında, gliomaların en ölümcül alt türü olan glioblastoma (GBM) hücreleri çalışılmıştır, böylece devam eden alt bölümlerde glioblastoma özelinde; GBM insidansı, GBM tedavi yöntemleri ve GBM tedavisinde karşılaşılan zorluklar anlatılmıştır.

Merkezi sinir sistemi (MSS), nöron ve glia olmak üzere iki farklı hücre tipinden oluşmaktadır. Nöronlar; homeostazın ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde ve tüm sinir sistemi fonksiyonlarını içeren geniş ağlar (networks) oluşturarak beynin ana kontrol fonksiyonunda görev alır [9]. Glial hücreler ise astrositler, oligodendrositler, ependimal ve mikrogial hücrelerden oluşur [10]. Astrositler; beynin ana bağ dokusunda, oligodendrositler

aksonların miyelin kılıf ile sarılmasında, ependimal hücreler ventriküllerin etrafında, mikrogliyal hücreler ise sinir sistemi immün fonksiyonlarında görev alır [9, 11] (Şekil 2.1).

Gliomalar, glial veya öncül hücrelerden (kök-progenitör) köken alan heterojen, merkezi sinir sistemi tümörleridir [1, 12]. Gliomaların kökenleri tam olarak aydınlanmış değildir [11]. Ancak, güçlü olan hipotez, gliomaların, bir nöroglial kök veya progenitör hücreden köken alan heterojen tümörler olduğu yönündedir [13-15]. Bu hipoteze göre, nöronlar post-mitotik, astrosit ve oligodendrositler ise sınırlı proliferatif kapasiteye sahip hücrelerdir. Bu nedenle, gliomaların farklılaşma yetisini kaybetmiş (de-diferansiyasyon) nöron, astrosit veya oligodendrosit hücrelerinden ziyade büyük olasılıkla bu hücrelerin öncüllerinden (kök veya progenitör) köken aldığı belirtilmektedir [9, 11, 16].



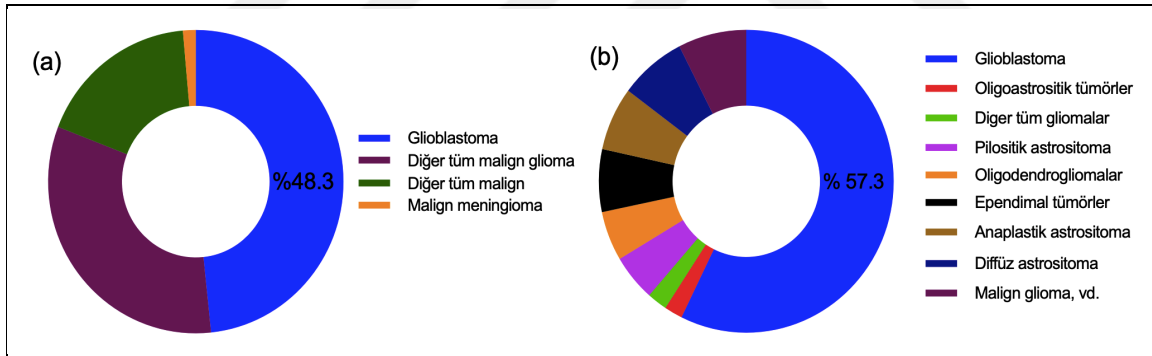
Şekil 2.1. Beyin hücreleri [9].

Gliomalar, normal nöroglial hücrelere morfolojik benzerlikleri, genotipleri ve histolojilerine göre karakterize edilmektedir [1, 9, 17, 18]. Dünya sağlık örgütü, 2016 öncesi, gliomaları; astrositoma, oligodendroglioma ve ependimoma gibi histopatolojilerine göre

sınıflandırırken, 2016 güncellemesi ile gliomaların sınıflandırma kriterlerine, moleküler genetik değişiklikler de eklenmiştir. Bu güncelleme ile birlikte gliomalar, tümör büyüme paternine ve izositrat dehidrojenaz (IDH) mutasyonuna göre; sınırları belli gliomalar (Derece I) ve diffüz gliomalar (Derece II-IV) olarak ayrılmıştır. Sınırları belli gliomalar çoğunlukla benign ve tam rezekte edilebilen tümörlerdir [1]. Glioblastomalar ise IV. derece diffüz glioma olup; atipik çekirdek, artan mitotik aktivite, mikrovasküler proliferasyon ve nekroz ile karakterizedir [2, 18].

2.1.1. Glioblastoma Multiforme

Glioblastoma Multiforme (GBM), yüksek invazivlik ve düşük hayatta kalma ile karakterize IV. derece diffüz gliomadır. 'Multiforme' terimi GBM'nin karakteristik tümöral heterojenliğini tanımlamak için kullanılmaktadır. Glioblastoma, merkezi sinir sisteminde; tüm tümörlerin %14,6'sını, malign tümörlerin %48,3'ünü (Şekil 2.2a), gliomaların ise %57,3'ünü (Şekil 2.2b) oluşturmaktadır [12].



Şekil 2.2. (a) Malign primer beyin tümörleri ve diğer MSS tümörlerinin görülme sıklığı dağılımı, (b) primer beyin gliomaları ve diğer MSS gliomaların görülme sıklığı dağılımı ([12]'den uyarlanmıştır)

Glioblastoma hastalarının, teşhisten sonra 5-yıllık genel sağ kalım (OS) oranı %6,8 olup, ortalama yaşam süreleri 12-15 ay arasında değişmektedir [19]. Amerika Birleşik Devletleri'nde 2012-2016 yılları arasında GBM'nin insidansının 3,22/100 000, ortalama teşhis yaşının tüm popülasyonda 65 olduğu ve erkeklerde daha sık görüldüğü rapor edilmiştir [12]. Glioblastoma, küresel olarak 100 binde 10 kişiden az insidansa sahip nadir bir tümör olmasına rağmen, hastaların nörolojik fonksiyonlarını, psikolojik sağlıklarını ve yaşam kalitelerini ciddi olarak etkilemektedir [20, 21].

2.1.2. Glioblastoma standart tedavi yöntemleri

Glioblastoma (GBM) tedavisi, tıbbi onkoloji, radyasyon onkolojisi ve beyin cerrahisini kapsar ve multidisipliner bir ekip tarafından hastaya 'kişiselleştirilerek' uygulanır. Tedavi protokolleri; tümör tipine, lokasyonuna, malignite potansiyeline, hastanın yaşı ve fiziksel durumuna göre değişiklikler içerebilmektedir [22, 23].

Glioblastoma tanısı yeni almış (yeni teşhis) ve Karnofsky performans durumu, $KPS \geq 60$ (KPS: hastanın genel durum skalası, 0: hastanın ölümü; 100: bulgu yok) iyi olan GBM hastalarında, 2005 yılından itibaren standart tedavi protokolü; güvenli ve uygulanabilir ise tümörün maksimum cerrahi rezeksiyonu ile başlar, ardından eşzamanlı olarak radyoterapi ve kemoterapi (temozolomid) uygulanır ve daha sonra adjuvan temozolomid tedavisi ile devam eder [2, 24]. Bazı araştırmacılar tarafından, GBM 'standart tedavi protokolü' maksimum cerrahi rezeksiyon, ardından eşzamanlı radyoterapi ve kemoterapi olarak tanımlanmaktadır [22, 25, 26].

Cerrahi

Glioblastoma tedavisinin ilk aşaması, fonksiyonel beyin bölgelerine nörolojik harabiyet vermeden, maksimum tümör kitlesinin çıkarılmasını amaçlayan cerrahi rezeksiyondur [21, 27]. Cerrahi rezeksiyon ile; kesin histopatolojik tanı ve araştırma için tümör dokusu elde etmek, hastalığın biyolojisi hakkında bilgi edinmek ve tümör hacmini azaltarak (kitle etkisi) hastanın semptomlarını hafifletmek hedeflenmektedir [28]. Güvenli ve uygulanabilir olduğu sürece, tam rezeksiyon uygulanmasına rağmen, bu yaklaşımın hastaların genel sağ kalım süreleri (OS) üzerine etkisi, prospektif kontrollü bir çalışma ile henüz araştırılmamıştır [28]. Ancak, birçok araştırmacı tarafından, rezekte edilen tümör hacminin büyüklüğünün, hastanın progresyonsuz (PFS) ve genel sağ kalım (OS) süreleri ile ilişkili olduğu (iyileştiği) belirtilmektedir [21, 29, 30]. Cerrahi olarak, tümörün keskin sınırlarla tamamen çıkarılması (tam rezeksiyon) yüzeysel ve küçük tümörler için daha uygun olup, derin ve orta hatlı tümörlerde neredeyse mümkün değildir [28]. Fakat, potansiyel klinik faydalar göz önüne alındığında, standart tedavi, tümörün olabildiğince güvenli bir şekilde rezeksiyonu ile başlamaktadır [27, 29]. Glioblastoma hastalarında, tam rezeksiyon girişimlerine rağmen tümörün rezekte edilen boşlukta (kavite) nüksetmesi (tekrar oluşması) çok büyük olasılıkla

karşılaşılan bir durumdur. Bu yüzden, GBM'nin invazif doğası nedeniyle ve cerrahi sonrası nüksün önlenmesi için, genellikle destek tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır [14, 24].

Radyoterapi

Radyoterapi (RT), cerrahi sonrası veya primer olarak GBM hastalarında uygulanabilir [21, 23]. Karnofsky performans durumu ($KPS \geq 60$) iyi olan, 70 yaşın altındaki hastalarda cerrahi rezeksiyon veya biyopsi sonrası optimum radyoterapi dozu, 6 hafta boyunca, 2 Gy fraksiyonda verilen 60 Gy dozdur [27]. Standart eksternal radyoterapi, en yaygın kullanılan tedavi yaklaşımıdır, diğer seçenekler arasında brakiterapi, fraksiyonel stereotaktik radyoterapi ve radyocerrahi bulunmakta ve bu seçenekler genellikle nükseden GBM tedavisinde daha başarılı olmaktadır [21, 23, 27].

Kemoterapi

Bu alt bölümde, GBM'nin standart tedavisinde kullanılan Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) onaylı başta TMZ olmak üzere kemoterapötik ajanların tedavi protokolleri ile ilgili bilgiler verilmektedir. Temozolomid'in moleküler yapısı ve etki mekanizması ile ilgili bilgiler Bölüm 2.3.1'de anlatılmıştır.

Temozolomid (TMZ), yeni teşhis glioblastoma hastalarının prognozu için ilk ve tek tercih kemoterapötik ajandır [20]. Temozolomid, yeni teşhis GBM hastalarında cerrahi rezeksiyon sonrası, radyoterapi ile birlikte eşzamanlı (günlük 75 mg TMZ/m², 7 gün boyunca) ve adjuvan olarak (günlük 150-200 mg/m², 5 gün boyunca, 6 kür (28 gün/kür)) uygulanmaktadır [1]. Genel sağkalım süresi (OS), cerrahi sonrası radyoterapi (RT) alan hastalarda 12,1 ay; RT ile eşzamanlı TMZ ve adjuvan TMZ alan hastalarda 14,6 ay olarak belirtilmiştir. Son on yıldır, eşzamanlı RT+TMZ ve devamında TMZ tedavisi, performans skoru (PS) iyi olan, yeni teşhis GBM hastalarında 'standart tedavi protokolü' olarak uygulanmaktadır [1, 2, 28].

Nitrozoüreler; karmustin (BCNU), lomustin (CCNU), nimustin (ACNU) ve fotemustin (FTM), DNA zincirleri arasında çapraz bağlanmayı indükleyen ve birkaç proteinin karbamillenmesini destekleyen alkilleyici ajanlardır [31]. Bu ajanlar, hücrelerde hasara neden olarak hücre döngülerinin inhibisyonu ile hücre ölümüne yol açar [32].

Karmustin (BCNU), TMZ'nin 2005 yılında FDA onayından önce, yeni teşhis GBM standart tedavisinde sistemik enjeksiyon veya polimerik wafer (biyobozunur yassı kapsül) formlarında FDA onaylı bir alkilleyici olarak kullanılmıştır [24, 33]. Glioblastoma hastalarının tümör bölgesine cerrahi rezeksiyon sonrası implante edilen polimerik karmustin (Gliadel® wafers) kapsülleri ile rezeksiyon sonrası kalan tümör hücrelerinin öldürülmesi hedeflenmiştir. Ayrıca, bu yassı kapsüller, cerrahi kavite bölgesine direkt implante edildiği için GBM hastalarında daha etkili tedavi sağlamaktadır [33] ve radyoterapi ile eşzamanlı verilen karmustin kapsüllerinin, yüksek dereceli gliomalı genç hastalarda sağ kalımı süresini arttırdığı belirtilmektedir [23]. Ancak, GBM hasta takiplerinde sınırlı klinik faydası ve ciddi yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla, karmustinin çoğunlukla ikinci basamak tedavilerde (nükseden GBM'lerde) kullanımına devam edilmiştir [2]. Lomustin (CCNU), yeni teşhis ve nükseden GBM hastalarında FDA onaylı diğer bir alkilleyici ajandır. Son zamanlarda, metillenmiş MGMT promotörlerine sahip yeni tanı GBM hastaları ile yapılan bir faz III çalışmasında, standart TMZ terapisine lomustin eklenmesiyle ortalama genel sağkalımın (OS) arttığı rapor edilmiştir [34].

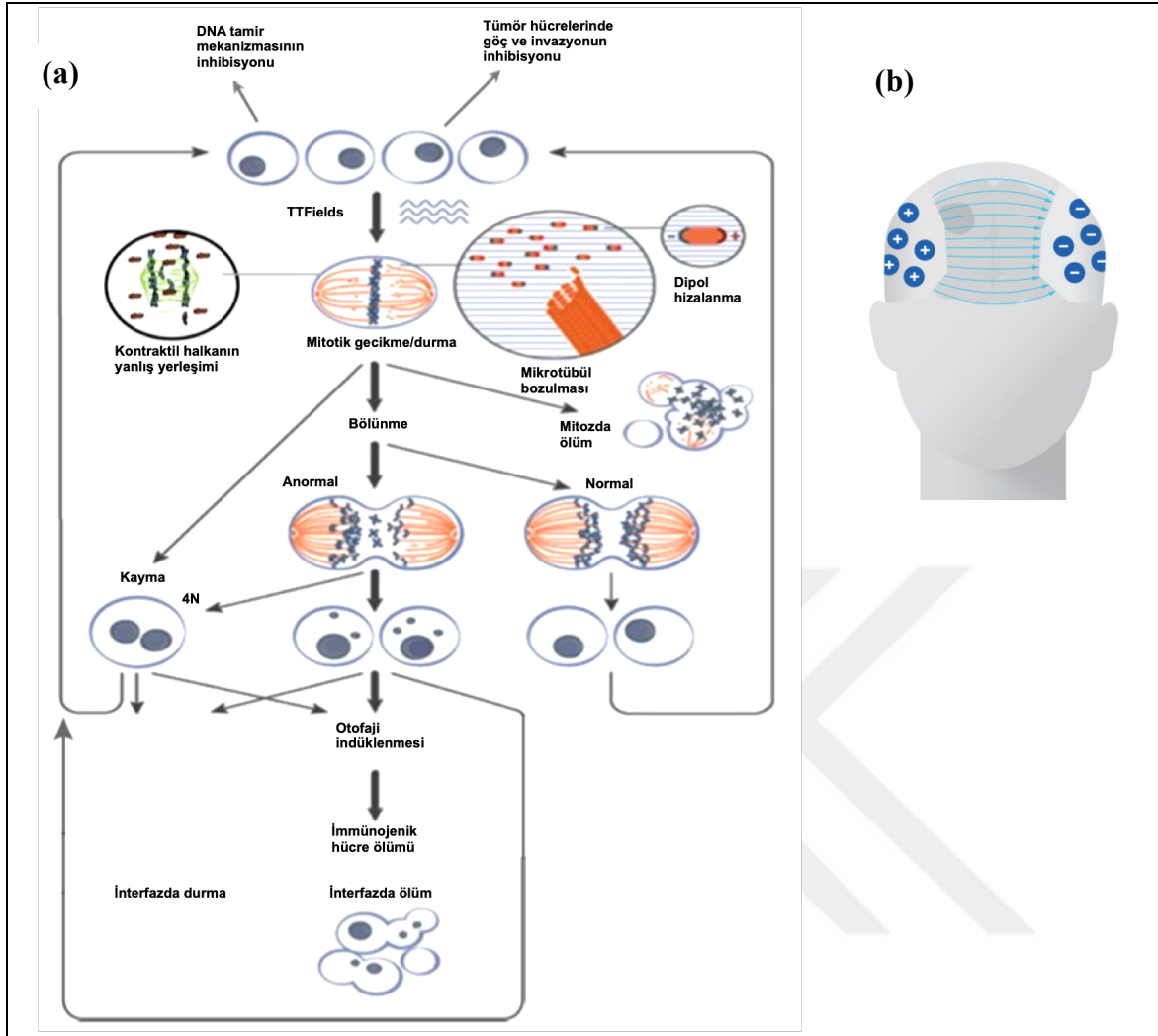
Genel olarak, nitrozoüreler, TMZ ile kıyaslandıklarında hastada oldukça toksik özellik gösteren [32] ve ilaca karşı erken direnç gelişimine neden olan ajanlar olarak sınıflandırılmıştır [21]. Bu alkilleyici ajanlar GBM hastalarında miyelosupresyon (kemik iliği baskılanması), hepatotoksisite ve pulmoner fibrozis [35, 36] gibi ciddi yan etkiler gösterdiklerinden, bunların GBM tedavisinde genellikle ikinci seçenek ajanlar olarak kullanımları uygun görülmüştür. Ayrıca, nükseden GBM tümörlerinde, VEGF-A'yı hedefleyen bevacizumab (Avastin), FDA tarafından 2009 yılında onaylanmıştır, ancak 'standart GBM tedavi protokolü' ile kombinasyonunda ortalama sağkalım süresini önemli ölçüde değiştirmemiştir [37, 38].

Glioblastoma, temozolomid (TMZ) tedavisine duyarlı olmasına rağmen, tüm GBM vakalarında tümörler kaçınılmaz olarak nüksetmekte [22, 39] ve nükseden GBM tümörlerine daha yüksek dozlarda uygulanan TMZ hiçbir klinik başarı göstermemektedir [40]. Ayrıca, nükseden tümörlerden sonra GBM hastalarının ortalama sağkalım süreleri sadece 6 ay olarak belirtilmiştir [2]. Son zamanlarda, GBM tedavisi için tek olumlu gelişme, FDA tarafından onaylanan ve GBM standart tedavi protokolünde 'tamamlayıcı tedavi' olarak yerini alan alternatif elektrik alanlar (tümör tedavi alanları, TTFields) ile tedavi uygulamaları olmuştur [41].

Alternatif elektrik alan ile GBM tedavisi

Alternatif elektrik alan kullanılarak gerçekleştirilen GBM tedavisi (Tumor-Treating Fields, TTFields, Novocure Inc, İsrail) 2011 ve 2015 yıllarında sırasıyla, nükseden ve yeni teşhis GBM'ler için FDA tarafından tedavi protokolü olarak onaylanmıştır [42]. Ayrıca, TTField'lar 2019'da mezotelyoma (akciğer zarı kanseri) tedavisi için onaylanmıştır ve birçok kanser türünde (pankreas, over, vb.) klinik çalışmaları devam etmektedir [43]. Tümör tedavi alanları (TTFields), glioblastoma bölgesine düşük şiddette (1-3V/cm, 200 kHz) elektrik alan verilerek tümör hücrelerinde anti-mitotik etki oluşturan bir yöntem olarak tanımlanmıştır (Novocure Inc, İsrail) (Şekil 2.3) [44].

Şekil 2.3a'da TTField'ların hücre bölünmesi üzerindeki etki mekanizması gösterilmiştir. Bu etki mekanizması firmanın (Novocure) kendi açıklaması olarak Nature dergisinde, 2018 yılında yayınlanmıştır [44]. Şekil 2.3b'de ise temsili olarak beyinde TTFields etkisiyle oluşan elektrik alan vektörleri verilmiştir. Yapılan araştırmalara göre, TTField'ların, hücresel düzeyde, öncelikle mitotik hücreleri etkilediği belirtilmiştir [42]. Tübülin dimerleri ve septin gibi büyük dipol momenti olan proteinler, uygulanan elektrik alan etkisiyle tümör hücrelerinde (spesifik) mitoz evreleri bozarak, apoptotik [41] ve otofajik hücre ölümlerini tetiklemektedir [45]. Stupp ve ark. tarafından (2015), bir faz III çalışmasının ara analizinde, temozolomid (TMZ) tedavisine adjuvan olarak TTFields uygulamasının sağkalım oranında dikkate değer bir artış sağladığı gösterilmiştir. Bu çalışmada, 695 hasta rastgele seçilerek; TTFields+TMZ (466) veya sadece TMZ (229) uygulanan iki gruba ayrılmıştır ve 2017 yılında açıklanan sonuç raporuna göre TTFields+TMZ, ortalama sağ kalımı 5 ay artırarak, 5-yıllık sağ kalım oranını %5'den %13'e çıkarmıştır [46].



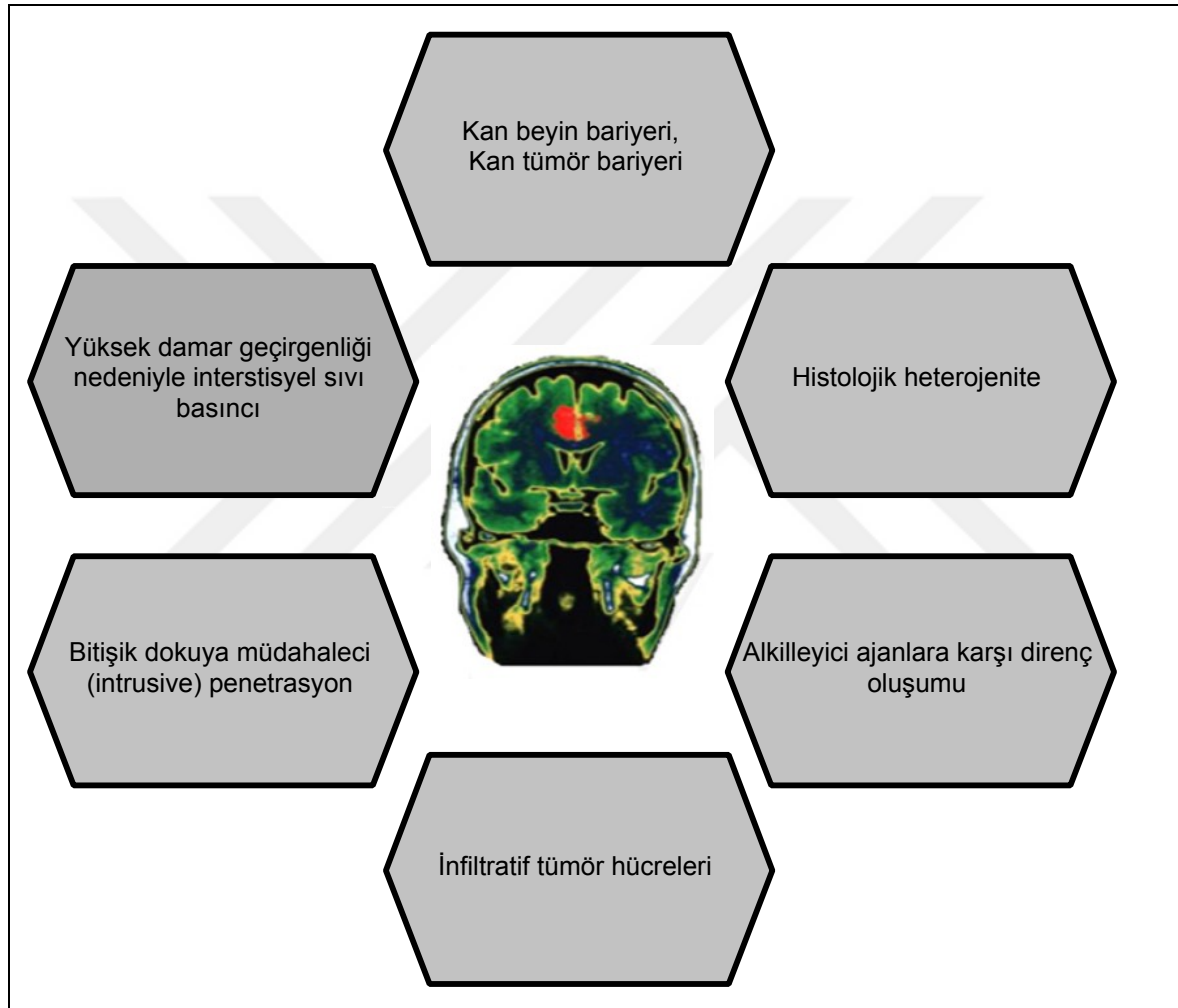
Şekil 2.3. (a) Hücre bölünmesine TTFields etkisi, (b) tümör bölgesine uygulanan elektrik alan [44]

2.1.3. Glioblastoma tedavisinde karşılaşılan zorluklar (kısıtlılıklar)

Glioblastoma tedavisinin en önemli engellerinden biri olan kan beyin bariyeri (KBB) ve KBB geçiş mekanizmaları bir sonraki bölümde (Bölüm 2.2) ayrıntılı olarak anlatılmıştır. Bu bölümde, glioblastomanın histopatolojik özelliklerinden kaynaklı tedavi kısıtlılıkları açıklanmıştır.

Glioblastoma; agresif, heterojen ve genetik olarak kararsız neoplastik hücrelerden oluşmaktadır. Şekil 2.4'te GBM tedavisinde karşılaşılan zorluklar şematik olarak gösterilmiştir. Glioblastoma'nın histopatolojik özellikleri arasında, proliferatif endotel hücreleri, artmış kan damarı çapı, kalınlaşmış bazal membran ve interstisyel (hücreler arası) sıvı basıncına yol açan yüksek damar geçirgenliği bulunur [47]. Glioblastoma tümör bölgesi

infiltratif olup, peritümöral ödem ve inflamasyon ile çevrilidir. Ayrıca, GBM'nin sınırlarının belirsiz olması ve agresif penetrasyonu nedeniyle tamamen rezekte edilmesi neredeyse mümkün değildir. Tüm GBM hastalarında kan-tümör bariyeri bozulur fakat bazı alanlarda kan-beyin bariyerinin (KBB) bozulmadan kaldığı da klinik çalışmalarda gösterilmiştir [48]. Glioblastoma'nın invazif ve infiltratif özellikleri, GBM'nin nüksetmesinin, ilaca karşı direncinin ve sonunda hasta kaybının nihai nedenidir [47].

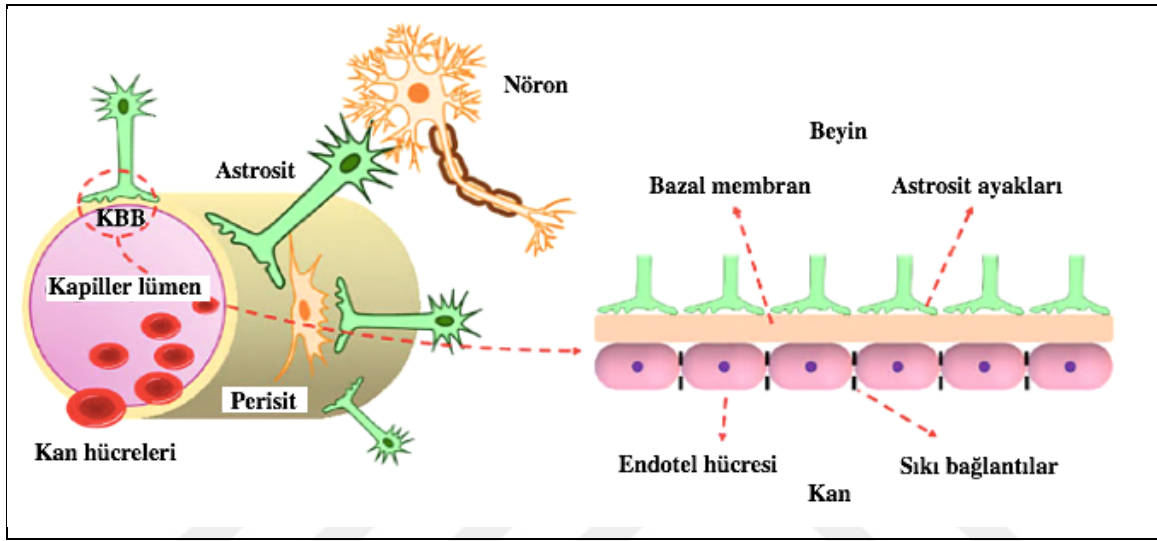


Şekil 2.4. Glioblastoma tedavi zorluklarının ana hatları [47].

2.2. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri (KBB), merkezi sinir sistemini koruyan fiziksel bir bariyer olup perisitler ve astrositler tarafından çevrelenmiş endotel hücrelerinden oluşur (Şekil 2.5). Vücudun diğer organlarındaki endotel hücrelerden farklı olarak, KBB'de bulunan endotel hücreleri polarize plazma zarları ile sıkı bağlantılar (tight junctions) yapar. Bu sıkı bağlantılar, besinlerin ve metabolitlerin düzgün bir şekilde geçişine izin verirken; mikroskobik nesnelerin, büyük veya

hidrofilik moleküllerin kandan beyne hareketini kısıtlar [49]. Kan beyin bariyeri, merkezi sinir sisteminin normal fonksiyonu için önemli olsa da çeşitli ilaç moleküllerinin bariyerden geçmesine engel olarak merkezi sinir sistemi (MSS) hastalıklarının ve tümörlerinin tedavisinde gerçek anlamda bir 'engel' oluşturur [50]. Bu nedenle, ilaç moleküllerini KBB üzerinden, özellikle nanoteknolojik yaklaşımlar ile hedef bölgelere ulaştırmak etkili bir tedavi sağlamak için kritik öneme sahiptir.

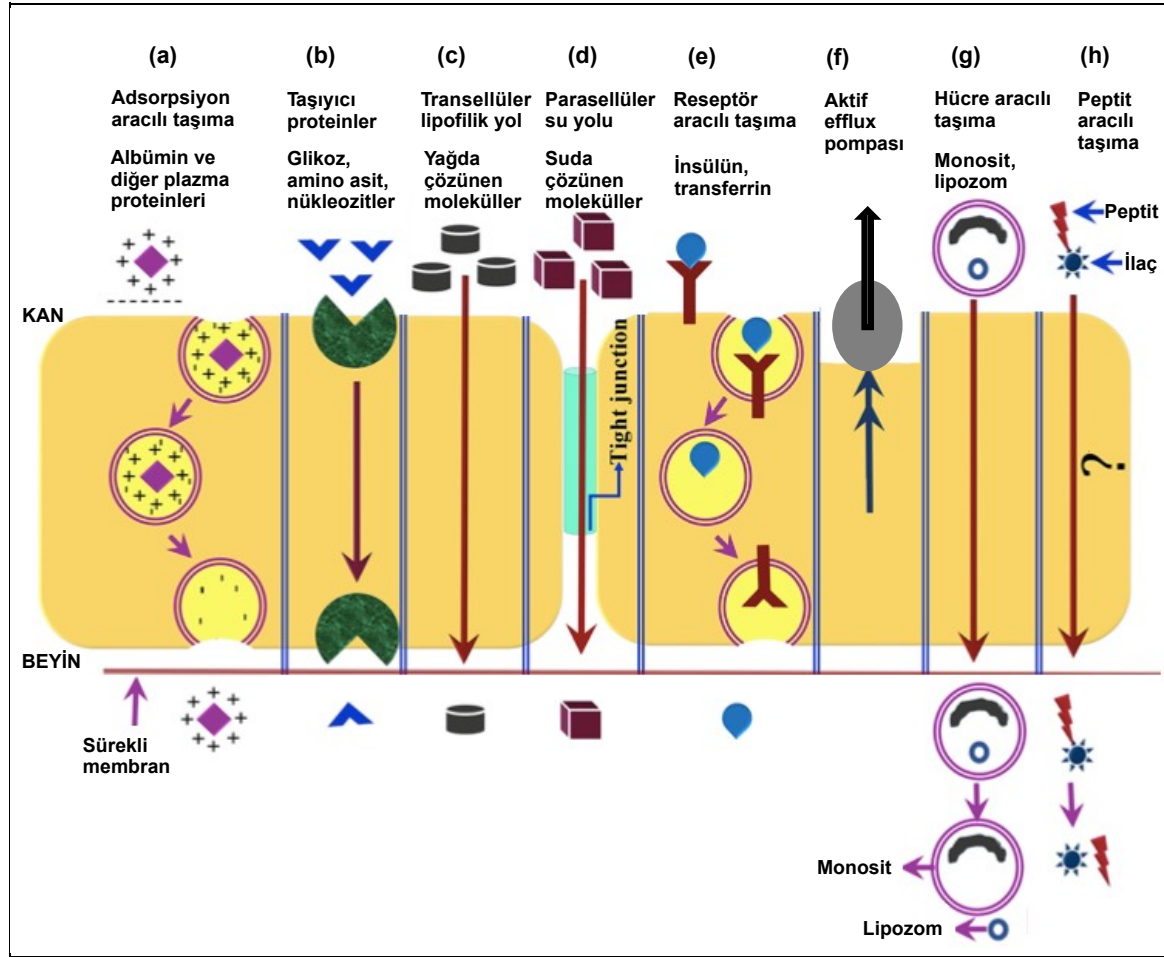


Şekil 2.5. Kan-beyin bariyerinin yapısal gösterimi ([51]'den uyarlanmıştır)

2.2.1. Kan beyin bariyeri geçiş stratejileri

Moleküllerin, merkezi sinir sistemine kan beyin bariyeri (KBB) aracılığıyla etkin olarak taşındığı çeşitli potansiyel mekanizmalar bulunmaktadır (Şekil 2.6). Öncelikle, bu mekanizmalardan suda ve yağda çözünen moleküllerin KBB geçişleri açıklanmıştır. Suda çözünen maddeler parasellüler yollardan (Şekil 2.6d) basit difüzyon ile KBB boyunca taşınabilir [52]. Ancak, beyin kapiller endotel hücreleri (BCECs), suda çözünen maddelerin parasellüler difüzyonunu kısıtlayan sıkı bağlantılara (tight junctions) sahiptir (Şekil 2.6d) [53]. Bu sıkı bağlantılar bozulmadan kaldığında (intakt), KBB küçük moleküllu ilaçların %98'inin geçişini sınırlandıran biyokimyasal ve fiziksel bir bariyeri temsil eder [54]. Steroid hormonlar, nikotin, alkol gibi yağda çözünen küçük moleküller (<400-500 Da) ve O₂, CO₂ gibi gazlar transellüler lipofilik yollardan (Şekil 2.6c) KBB'yi geçebilir [53]. Moleküllerin belirli koşullar altında KBB'yi geçebildikleri diğer mekanizmalar ise; adsorpsiyon aracılı taşıma (AMT), taşıyıcı proteinler (CMT), reseptör-aracılı taşıma (RMT), aktif dışa atım (efflux) pompası inhibisyonu ve hücre aracılı taşıma mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar

kullanılarak nanopartiküllerin KBB geçiş stratejilerindeki rolleri, yapılan çalışmalar eşliğinde aşağıda özetlenmiştir [52].



Şekil 2.6. Kan beyin bariyeri geçiş mekanizmaları, ([52, 53]'ten uyarlanmıştır)

Adsorpsiyon aracılı taşıma

Adsorpsiyon aracılı taşınım (AMT), polikasyonik peptidlerin veya proteinlerin endotelial hücrelerin luminal yüzeyinde bulunan mikro-anyonik kısımlara elektrostatik etkileşimleri yoluyla gerçekleşir (Şekil 2.6a). Adsorbe olan molekülün membran yüzeyine bağlanması spesifik değildir. Bu yolla taşınım, taşınan moleküller reseptör aracılı taşımaya (RMT) göre daha düşük bağlanma ilgisine (affinity), ancak daha yüksek bağlanma kapasitesine sahiptir [52, 53].

Pozitif yüklü nanopartiküller, nötr veya negatif yüklü olanlara göre bu mekanizma ile taşınmaya daha yatkındır [55]. Nanopartiküllerin yüzeyi, biyolojik aktiviteye sahip pozitif yüklü biyomoleküller ile işlevselleştirilerek AMT yoluyla KBB geçişi sağlanabilir. Bu

amaçla, nanopartiküllere fonksiyon kazandırmak için yaygın olarak kullanılan ve KBB ilaç geçişini kolaylaştıran hücre-penetrasyon peptitleri (CPPs, örn., HIV'den türetilen TAT peptiti, Herpes simplex virüsü tip 1'den türetilen gH625 peptiti) ve katyonik proteinler (albümin) kullanılmaktadır. Örneğin, Rao ve ark. ritonavir (anti-retroviral proteaz inhibitörü) ilacının, TAT-konjugeli NP'ler yoluyla uygulanmasından sonra, beyinde ilaç seviyesinde serbest ilaca göre yaklaşık 800 katlık bir artış tespit etmişlerdir. Ayrıca, bu araştırmacılar, TAT-konjugeli polimerik NP'lerin ilk önce beyin damar sistemlerinde mobilize olduklarını, daha sonra beyin parankimine geçerek ilaç salımına devam ettiklerini belirtmişlerdir [56]. Lu ve ark. ise katyonik sıgır serum albümini (CBSA) konjüge edilmiş poli (etilen glikol)-poli (laktik asit) (PEG-PLA) nanopartiküllerle (CBSA-NP) ko-kültür çalışması gerçekleştirmişlerdir. Nanopartiküllerin yüzeyindeki CBSA yoğunluğunun artmasına bağlı olarak KBB geçirgenliğinin arttığını göstermişlerdir [57].

Taşıyıcı proteinler

Taşıyıcı proteinler veya taşıyıcı-aracılı taşınım (CMT), besinler ve hormonlar için önemli bir taşıma yoludur. Örneğin, glikoz veya glutatyon, membranın bir tarafındaki protein taşıyıcılarına bağlanır ve proteinin konformasyonel değişikliğini tetikleyerek konsantrasyon gradyentine göre membranın diğer tarafına taşınır (Şekil 2.6b) [53]. Vücudumuzun glikoz, vitamin, aminoasit, nöropeptit gibi temel besin maddeleri ve iyonlar taşıyıcı proteinler yoluyla beyne taşınmaktadır. Beyin bölgesine hedeflenen ilaçların veya nanopartiküllerin bu yolla taşınabilmesi için kimyasal olarak modifiye edilmeleri gerekir. Böylece yapıları vücudun endojen maddesine benzer ve CMT yoluyla spesifik olarak beyne taşınabilir. En klasik örneklerden biri, Parkinson hastalığının tedavisi için kullanılan dopamin, öncü maddesi olan levo-dopaya (L-DOPA) dönüştürülür. Dopamin KBB'yi geçemez, ancak L-DOPA büyük bir nötr aminoasit taşıyıcısı ile KBB'yi geçerek beyne ulaşır [52].

Beyin kapiler endotel hücrelerinde (BCECs), birçok taşıyıcı ve reseptöre göre önemli ölçüde daha fazla eksprese edilen CMT taşıyıcısı GLUT1'dir (glikoz taşıyıcı 1). Beyin endotel hücrelerinde GLUT1 ekspresyonunun yüksek olması, GLUT1'e hedeflendirilen nanopartikül çalışmalarını ilgi çekici hale getirmiştir. Bu çalışmaların bazılarında, lipozoma entegre edilen glikoz formülasyonları denenmiş ve GLUT1'e hedeflenen lipozomların KBB geçişleri incelenmiştir. Ancak, yapılan çalışmalarda taşıyıcı proteinler ile KBB'den yüksek bir geçiş seviyesi tespit edilememiştir [58].

Poli (etilen glikol)-ko-poli (trimetilen karbonat) nanopartikülleri, 2-deoksi-D-glukoz (D-Glu) ile modifiye edilerek, kan-beyin bariyerine ve tümörlü bölgeye hedeflendirilmiş ve bu nanopartiküller (DGlu-NP) glioma tedavisi için başarıyla kullanılmıştır [59]. 2-deoksi-D-glukoz ile modifiye edilmiş NP'ler RG-2 hücreleri (sıçan glioma hücre hattı) tarafından modifiye edilmemiş nanopartiküllere (NP) göre daha yüksek miktarda hücre içerisine alınmıştır ve modifiye nanopartiküllerdeki hücresel alımın GLUT1 taşıyıcı proteinler (CMT) yoluyla gerçekleştiği düşünülmüştür. Ayrıca, D-Glu-NP'ler normal sağlıklı dokuya göre glioma bölgesinde daha fazla birikmiş ve *in vivo* çalışmada daha iyi anti-glioma etkinliği göstermiştir. Benzer şekilde, D-glukozamin modifiye edilmiş nanopartiküller de GLUT1'i hedef alarak hem *in vitro* hem de *in vivo*'da yüksek anti-glioma etkinliği göstermiştir [60].

Reseptör aracılı taşıma (RMT)

Bazı hastalık durumlarında (özellikle kanser), spesifik reseptörler aşırı eksprese edilir ve ilaçlar reseptör aracılı taşıma (RMT) yoluyla spesifik reseptörlerine tutunarak kan beyin bariyerini aşabilir. Bu durumda, hazırlanan nanopartikül (veya ilaç) aşırı eksprese olmuş reseptöre özgü ligand ile etiketlenerek, ilgili reseptörüne spesifik olarak bağlanma (hedeflendirme) sağlanabilir. Ligand-reseptör bağlanması meydana geldiğinde reseptör aracılı taşıma gerçekleşir [52, 61] (Şekil 2.6e).

Hedefleme ligandları ile yüzeyleri fonksiyonlaştırılan polimerik nanopartiküller reseptör aracılı taşıma (RMT) yoluyla, KBB'yi geçme potansiyeli kazanır. Poli (etilen glikol)-poli (kaprolakton) (PEG-PCL) nanopartikülleri, kan beyin bariyeri ve glioma hücreleri üzerinde aşırı eksprese edilen düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili proteini (LRP) hedefleyen anjiyopep (ANG) ligandı ile konjuge edilmiştir. Hedeflenmeyen nanopartiküllerle (PEG-PCL) karşılaştırıldığında, PEG-PCL-ANG nanopartikülleri U87 MG (glioblastoma) hücreleri tarafından daha yüksek miktarda hücre içerisine alınmıştır [62, 63].

Reseptör aracılı taşıma yoluyla ikili hedeflendirme (dual-targeting) sistemleri de geliştirilmiştir. Örneğin, arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) ve interlökin 13 (IL-13) peptitlerinin polimerik nanopartiküllere bağlanması ile ikili hedeflendirme çalışmaları yapılmıştır. Belirtilen çalışmada, RGD, yeni kan damarı oluşumlarında $\alpha v\beta 3$ integrin reseptörlerine bağlanan bir ligand görevi görürken, IL-13 peptiti ise IL-13R $\alpha 2$ reseptörünün

ligandı olarak kullanılmıştır. Böylece, iki reseptör iki ligand kullanılarak nanopartiküllerle hedeflendirme çalışması yapılmıştır [64].

Son zamanlarda, farklı hedeflendirme çalışmalarından biri, hedeflendirilen bölgenin iki reseptörüne de bağlanabilen tek bir peptidin kullanımıdır. Okta-arjinin hücreye penetre olabilen bir peptittir. Okta-arjinin, RGD'nin ters sekansı olan DGR ile konjuge edilerek, hem nörofilin-1 hem de integrin $\alpha v \beta 3$ reseptörleri için ligand görevi gören bir tandem peptit oluşturmuştur. Bu tandem peptit, paklitaksel yüklü lipozomlara konjuge edilerek kanser kök hücrelerinde anti-proliferatif etki göstermiştir. Ayrıca, oluşturulan bu lipozomlar, sıçanlar üzerinde de denenmiştir ve yüksek bir anti-glioma etki görülmüştür [65]. Bununla birlikte, transferin, insülin ve folat gibi ligandların da spesifik reseptörlerine bağlanarak reseptör aracılı taşıma gerçekleştirebildikleri bilinmektedir [53].

Aktif dışa atım (efflux) pompası

Beyin endotel hücreleri, ilaçların beyinden kana atılımından sorumlu olan çoklu ilaç dirençli proteinlerini (MRP) ve p-glikoprotein (p-gp) gibi adenosin trifosfat (ATP) ile çalışan ilaç atım (efflux) pompalarını eksprese eder (Şekil 2.6f). Bu atım pompaları beyne ilaç hedeflendirmede bariyer görevini üstlenir. Çoklu ilaç direncine sahip birçok protein katyonik, amfifilik ve nötral bileşikler dışarı atarken, p-gp lipofilik bileşiklerin dışarı atımından sorumludur. Bu nedenle, dışa atım pompalarının inhibisyonu (özellikle p-gp) beyne ilaç hedeflendirilmesinde önemli bir yaklaşımdır [52, 61].

Gliomaların tedavi stratejisi olarak p-gp'nin inhibisyonu da son yıllarda yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Sediranib, glioblastoma multiforme de dahil çeşitli kanserlerin tedavisi için araştırılan bir vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü (VEGFR) inhibitörüdür. Sediranib, p-gp için bir substrattır ve bu nedenle KBB'ye penetrasyonu sınırlıdır. Sediranib, p-gp inhibitörü LY335979 ve p-gp/Bcrp (meme kanseri direnç proteini) inhibitörü GF120918 ile birlikte uygulandığında, farelerin beyinde 'sediranib' konsantrasyonunun önemli ölçüde arttığı görülmüştür. Benzer şekilde, P-gp/Bcrp inhibitörü olan 'elacridar'ın, glioma için çok hedefli bir tirozin kinaz inhibitörü olan sorafenib ile birlikte uygulandığında, 'sorafenib'in beyne penetrasyonunu arttırdığı belirtilmiştir [66].

Hücre aracılı taşıma

Vücudun kendi hücrelerini kullanarak ilaçların taşınması hücre aracılı taşımadır (Şekil 2.6g). Bu hücreler, herhangi bir beyin hasarının enflamatuvar fazında görev yapan ve dolaşım yoluyla enflamasyon bölgesine ulaşma yeteğine sahip makrofajlar, monositler ve nötrofiller gibi spesifik hücrelerdir [67]. Bu hücreler, 'Truva atları' görevi üstlenerek ilaç moleküllerinin KBB'yi geçişini kolaylaştırabilir. Ancak, hücre-aracılı taşıma çalışmalarının çoğunda, hücrelerin ilaç yükleme kapasitelerinin düşük olması ve ilacın hücrelerden erken salınması ve hedeflenen bölgeye etkin bir şekilde ulaşamaması gibi dezavantajlar tespit edilmiştir [52].

2.3. GBM Tedavisinde Potansiyel İlaç Etken Maddeler

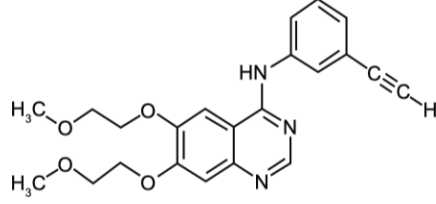
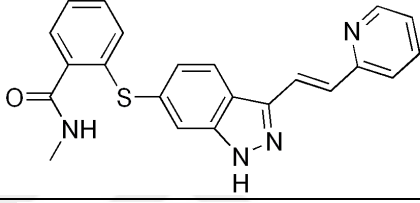
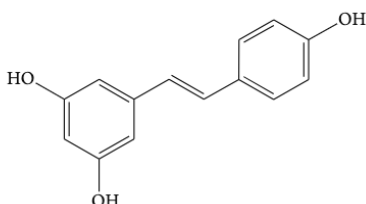
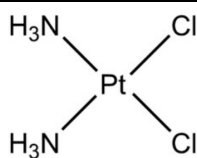
Glioblastoma'nın standart tedavisinde kullanılan FDA onaylı kemoterapötik ajanların klinik uygulama protokolleri daha önce Bölüm 2.1.2'de anlatılmıştır. Bu bölümde, GBM tedavisinde büyüme faktörlerini (EGF, VEGF) inhibe eden ajanlar, GBM hücrelerini kemoterapötik ilaca karşı hassaslaştıran doğal bileşikler ve platin bazlı ajanlara birer örnek verilerek (Çizelge 2.1) etken maddeler kısaca özetlenmiştir. Ayrıca, tez kapsamında kullanılan temozolomid ve kurkumin etken maddeleri devam eden alt bölümlerde ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Mevcut tedavi yöntemleri son 20 yılda gelişmiş olsa da GBM hastalarında sağkalım oranı henüz diğer katı tümörler için elde edilen seviyelere yükselememiştir. Bu anlamda, genellikle diğer kanser türlerinin tedavilerinde kullanılan FDA onaylı ajanlar, GBM standart tedavi protokollerine entegre edilerek klinik çalışmalar gerçekleştirilmektedir [68]. Ayrıca, FDA onaylı olmayan doğal veya sentetik ajanların ise *in vitro/in vivo* çalışmalar ile GBM hücreleri üzerine etkileri incelenmektedir.

Glioblastoma tümörlerinde, birçok sinyal yolağı değişmekte olup, hastalık prognozu ve hastaların tedaviye yanıtı genetik ve epigenetik değişikliklere bağlıdır [26, 69]. Glioblastoma vakalarının %40-60'ında epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) artışı ve mutasyonu saptanmıştır. Glioblastoma tümörlerinde aşırı eksprese olan EGFR, tümör büyümesine, anjiyogeneze ve apoptoz inhibisyonuna yol açarak GBM'nin kötü prognozuna neden olmaktadır [70]. Bu nedenle, EGFR inhibitörlerinin GBM tedavisindeki etkinlikleri yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Glioblastoma tedavisinde EGFR inhibitörleri olarak erlotinib,

gefitinib ve afatinib gibi ilaçlar klinik çalışmalara girmiş, ancak bu ajanlar GBM hastalarının prognozunu önemli ölçüde iyileştirmemiştir [71].

Çizelge 2.1. GBM tedavisinde kullanılan potansiyel ajanlar

İlaçlar	Molekül ağırlığı	Kimyasal yapısı
Erlotinib (EGFR-inhibitörü)	393,4 g/mol	
Bevacizumab (anti-VEGFR mAb)	149,19 g/mol	
Resveratrol (doğal anti-oksidadan)	228,24 g/mol	
Sisplatin (platin-temelli)	300 g/mol	

Vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), tümör anjiyogenezini düzenleyen ana reseptördür. Tümör hücreleri tarafından üretilen VEGF, tirozin kinaz reseptörlerine bağlanarak tümör hücrelerinin büyümesine yol açan hücre proliferasyonu, migrasyonu ve invazyonunu tetikler. Bu nedenle, GBM tedavisinde VEGFR inhibitörlerinin kullanılması, tümör anjiyogenezini inhibe ederek tümör hacminin küçülmesini ve metastazın önlenmesini sağlayabilir [72]. Anti-VEGFR ajanları, küçük molekül VEGFR tirozin kinaz inhibitörleri (cediranib, vatalanib, vb.) veya anti-VEGFR monoklonal antikorlarıdır (mAb) [73]. Bevacizumab, tekrarlayan GBM tümörleri için VEGFR'a karşı FDA onaylı bir monoklonal antikorudur [74]. Ancak, 'bevacizumab'ın yan etkileri ile ilgili (hipertansiyon, arteriyel tromboembolik etkiler, vb.) çok fazla tartışma bulunmaktadır. Bir faz III çalışmasında,

bevacizumab ve TMZ kombinasyonunun standart tedaviye göre ortalama sağkalımı belirgin bir şekilde değiştirmediği bildirilmiştir [2].

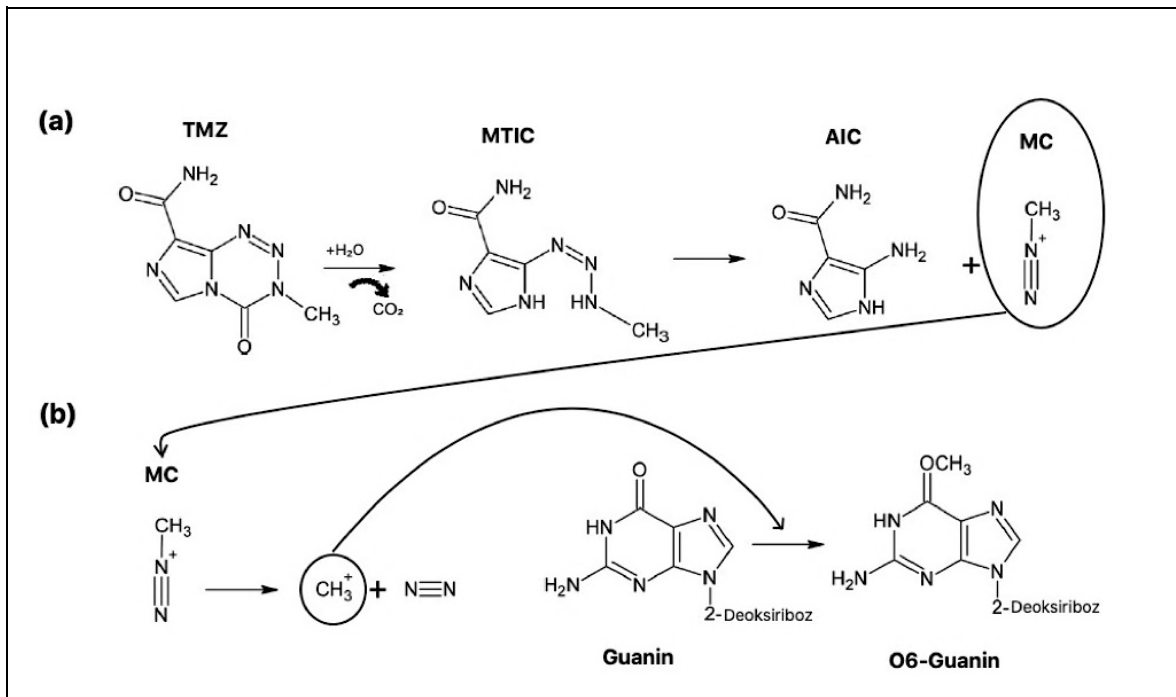
Resveratrol, doğal polifenolik bir bileşik olup anti-oksidan, anti-inflamatuar etkilerinin yanı sıra kanser hücresini kemoterapötik ajanlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir [75-77]. Resveratrol'un, TMZ etkinliğini çeşitli mekanizmalarla arttırdığına dair birçok *in vitro/in vivo* çalışma yapılmıştır [75]. Bu çalışmalardan birinde, resveratrol ve TMZ'nin birlikte uygulanmasının, TMZ'nin GBM hücrelerindeki anti-tümör etkinliğini ROS'a bağlı 5' adenosin monofosfat-aktif edilmiş protein kinaz (AMPK) sinyal yolu aktivasyonu ile arttırdığı gösterilmiştir. AMPK sinyal yolu aktivasyonunun ise apoptoza bağlı Bcl-2 (B-hücreli lenfoma-2) proteininin ekspresyon seviyesini değiştirerek hücre apoptozunu indüklediği belirtilmiştir [78].

Sisplatin, karboplatin, oksaliplatin kanser tedavisi için FDA tarafından onaylanmış platin temelli bileşiklerdir. Platin temelli ajanlar hücre içerisinde bakır taşıyıcı protein-1 (CTR1) yoluyla birikmektedir. Hücreye girdikten sonra ise, platin-bazlı bileşikler çeşitli mekanizmalar yoluyla sitotoksik etkiler göstermektedir ve bu sitotoksik etkiler DNA replikasyonun ve gen transkripsiyonunun önlenmesi ile ortaya çıkmaktadır [79]. Platin-temelli ilaçların GBM tedavisindeki etkinliğini değerlendirmek için farklı klinik çalışmalar yapılmıştır. Bir faz III çalışmasında, sisplatin ve karmustin birlikte uygulandığında, karmustin ve eşzamanlı radyoterapi tedavisine göre GBM hastalarının ortalama sağkalım süreleri değişmemiştir [80].

2.3.1. Temozolomid

Bu bölümde, Temozolomid (TMZ) ve metabolitlerinin moleküler düzeydeki etkileri ve TMZ tedavisine karşı gelişen direnç mekanizmalarından bahsedilmiştir. Temozolomid (TMZ), glioblastoma hastalarının ilk basamak tedavisinde kullanılmak üzere, FDA tarafından onaylanan oral bir alkilleyici ajandır [81]. Alkilleyici ajanlar, kanser tedavisinde kullanılan ilk anti-neoplastik moleküllerdir. Bu anti-tümör aktiviteye sahip farmasötik bileşikler, DNA ile etkileşime girerek geri dönüşümsüz DNA hasarına ve hücresel replikasyonun inhibisyonuna neden olur. Bir metilleyici ajan olarak çalışan TMZ, DNA alkilasyonunu ve çapraz bağlanmasını indükleyerek hücre ölümüne yol açmaktadır [82].

Temozolomid (TMZ), düşük molekül ağırlıklı, oral olarak uygulanan alkilleyici bir molekül olup fizyolojik pH'da 3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-karboksamid (MTIC) aktif bileşenine kendiliğinden hidrolize olur. Bu aktif bileşen (MTIC) ise pürin ve nükleik asit sentezinde bir ara madde olarak bilinen 5-amino-imidazol-4-karboksamide (AIC) ve aktif alkilleyici bir tür olan metildiazonyum katyonuna (MC) hidrolize olur (Şekil 2.7a). Oluşan bu reaktif katyon (MC) ise DNA'daki guaninleri O6 pozisyonunda metilleyerek (Şekil 2.7b) baz çifti uyumsuzluğuna (mismatch) neden olmaktadır ve baz çifti uyumsuzluk döngüleri, DNA iplikçğinde kırılmalara yol açarak, hücreyi apoptoza götürmektedir [82-84].



Şekil 2.7. (a) TMZ, MTIC, AIC ve MC'nin kimyasal yapısı, (b) Metildiazonyum katyonu (MC) ile, DNA alkilasyonu ([82]'ten uyarlanmıştır).

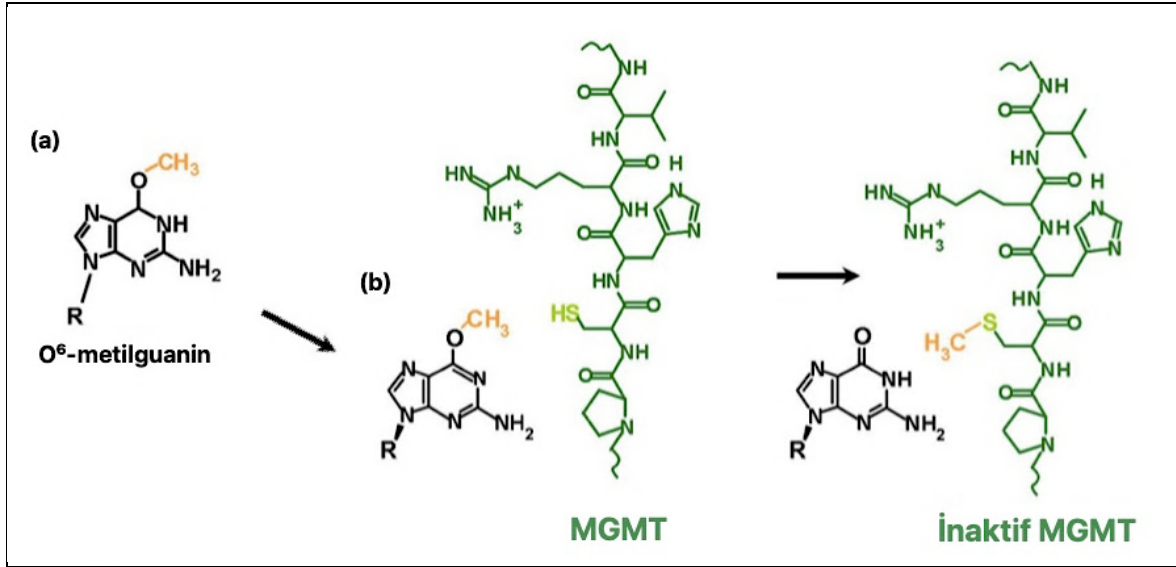
Şekil 2.7a'da, TMZ ve degradasyon ürünlerinin kimyasal yapıları; Şekil 2.7b'de ise, TMZ'nin DNA hasarını arttıran farmakolojik mekanizması gösterilmiştir. Suyun, tetrazinon halkanın elektropozitif karbonil C4 atomu ile reaksiyonu, heterosiklik halkayı açarak, MTIC ve CO₂'yi serbest bırakır. Daha sonra, MTIC hızlı bir şekilde AIC'ye (aktif olmayan bir tür) ve oldukça reaktif bir elektrofilik iyon olan metildiazonyum katyonuna (MC) dönüşür. Bu yüksek oranda reaktif katyon DNA ile etkileşime girerek, N7-guanin, O6-guanin ve O3-adenin konumlarında metilasyona neden olur. Guanin O6 konumu, TMZ'nin en düşük frekansta (sıklıkta) hedefi olmasına rağmen, sitotoksik etkilerden birincil derecede sorumludur [85-87].

Temozolomid, asidik koşullar altında kararlı, ancak nötr ve bazik koşullar altında hızla degradasyon ürünlerine dönüşmektedir. Oral olarak uygulanan TMZ, asidik ortamlarda stabil olduğu için, sindirim sisteminden geçerken bir ön ilaç (pro-drug) durumunda kalır. Ayrıca, TMZ oral olarak verildikten sonra en yüksek plazma konsantrasyonuna 72 dakikada ulaşır ve TMZ'nin biyolojik ortamda yarılanma süresi yaklaşık iki saattir [82, 83, 85].

Temozolomide karşı direnç gelişimi

Temozolomid (TMZ) kemoterapisine karşı direncin arkasındaki moleküler yolları anlamak, GBM tedavisinin ve hastalık prognozunun geliştirilmesi için kritik öneme sahiptir [82]. Metilguanin-metiltransferaz (MGMT), tümör hücrelerini alkilleyici ajanlara karşı koruyan kritik bir DNA onarım proteini olup, bu proteinin GBM tümörlerinde aşırı ekspresyonu ile kemoterapötik ajanlara karşı direnç gelişmektedir. Metilguanin-metiltransferaz, TMZ tarafından alkile edilen guaninin O6 pozisyonundan alkil gruplarını uzaklaştırarak TMZ'nin toksik etkisini azaltmakta ve alkilenmiş DNA lezyonunu onarmaktadır (Şekil 2.8) [88, 89].

Glioblastoma tümörlerinde moleküler belirteçlerin tanımlanması ve karakterizasyonu, GBM hastalarının tedavisinde spesifik hedeflere yönelik çalışmalar bakımından oldukça önemlidir [90]. GBM tedavisinde, kemoterapötik ilaçlara karşı (özellikle, TMZ gibi alkilleyici ajanlar) bazı moleküler anlamlı yanıtlar, biyobelirteçler (biomarker) olarak kabul edilmiş ve bu duruma metilguanin-metiltransferaz (MGMT) promotörünün metilasyonu örnek gösterilmiştir [2]. Metilguanin-metiltransferaz promotörünün metilasyonu ile (GBM vakalarının %30-50'sinde görülür) MGMT geni baskılanmaktadır ve tümör hücreleri TMZ veya diğer alkilleyici ajanlara karşı daha duyarlı hale gelmektedir [1]. Ayrıca, metillenmiş MGMT promotörleri olan tümörlere sahip GBM hastaları, standart tedaviyi takiben daha yüksek sağkalım oranları göstermişlerdir [91]. Radyoterapi (RT) ve TMZ standart tedavisi uygulanan MGMT metilasyonuna sahip GBM hastalarının, ortalama sağ kalım sürelerinin (23 ay, 5 yıllık-%14) sadece RT alan (15 ay, 5 yıllık-%5) hastalara göre daha iyi olduğu belirlenmiştir [39]. Temozolomid ve farklı ajanların TMZ kombinasyonları kullanılarak birçok tedavi protokolü denenmiş olmasına rağmen, GBM vakalarında tümörler kaçınılmaz olarak nüksetmekte ve TMZ'nin, glioblastoma hastalarının tedavisinde etkin bir fayda sağlamadığı belirtilmektedir [2].



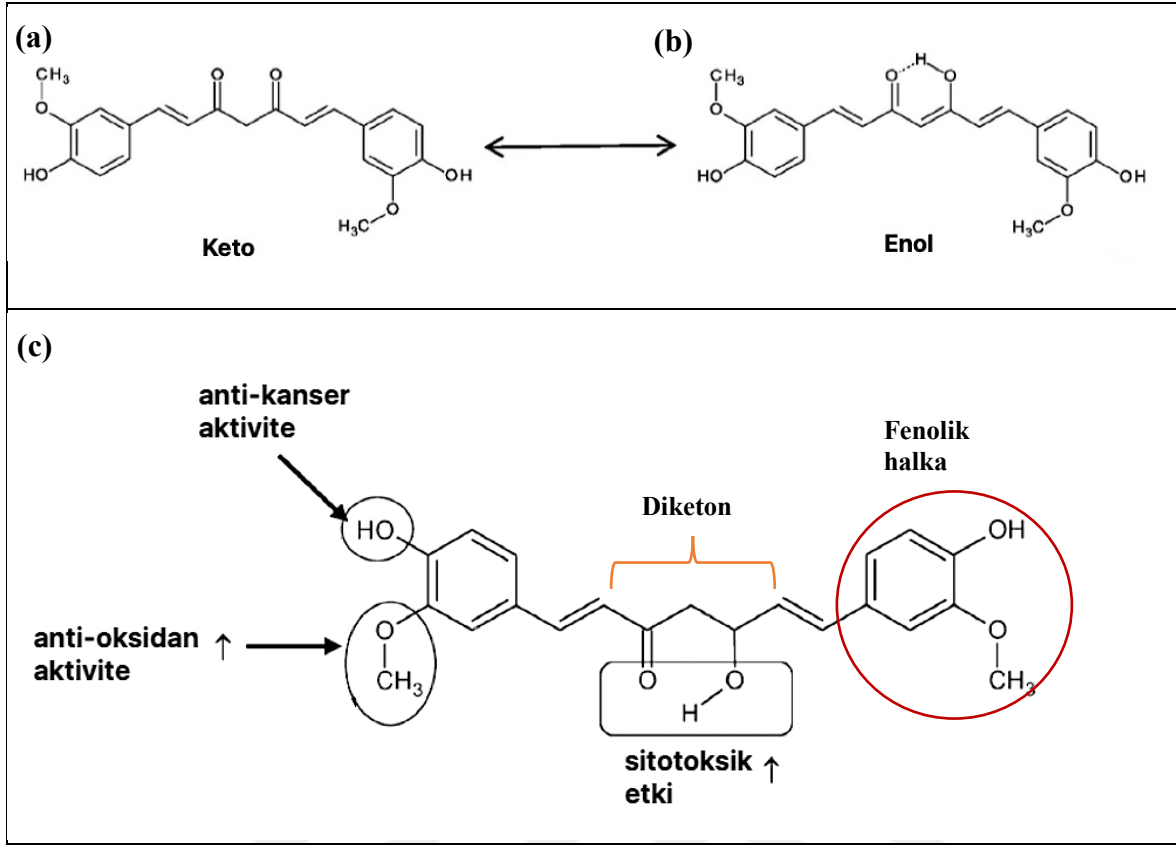
Şekil 2.8. (a) O⁶-metilguanin, DNA tamir enzimi, (b) MGMT, DNA tamir reaksiyonu; metil grubun (turuncu) hasarlı DNA bazından MGMT'ye aktarılması ve MGMT'nin inaktif hale gelmesi ([92]'den uyarlanmıştır)

2.3.2. Kurkumin

Son zamanlarda doğal bileşiklerin sağlık uygulamalarında kullanılması ve faydaları, bu bileşiklerin tıbbi uygulamalarda ilgi çekici bir araştırma alanı haline getirmiştir. Kanser tedavisinde kullanım potansiyeline sahip birçok doğal bileşen tanımlanmış ve GBM tedavisi için kurkumin etken maddesi dikkat çeken potansiyel adaylardan biri haline gelmiştir [93].

Kurkuminin kimyasal yapısı

Kurkumin, zerdaçala sarı rengini veren, keto-enol tautomeri (kimyasal dengesi) sergileyen doğal bir polifenoldür (Şekil 2.9a, b). Kurkuminin molekül ağırlığı 368,38 g/mol'dür ve kimyasal formülü ise C₂₁H₂₀O₆'dır [94]. Kurkuminin aktivitesini üç reaktif fonksiyonel grup belirlemektedir ve bunlar, iki fenolik ve bir diketonik (keto-enol) gruplardır (Şekil 2.9c). Ayrıca, kurkuminin antikanser özellikleri fenolik halkada bulunan OH gruplarının varlığına bağlı olup (Şekil 2.9c), anti-oksidan özelliğini ise 3 ve 3' konumlarındaki metoksi grupları arttırmaktadır. Bileşiğin orta kısmına (Şekil 2.9c) heteroatomların (oksijen ve azot) bağlanması ise, artmış sitotoksik (anti-tümör ve anti-anjiyogenez) aktivitelere sahip bileşiklerin oluşumuna yol açmaktadır [95].



Şekil 2.9. Kurkuminin kimyasal yapısı, (a) Kurkuminin keto formu, (b) kurkuminin enol formu, (c) kurkumin analoglarının yapı-aktivite ilişkisi ([95]'den uyarlanmıştır)

Kurkuminin moleküler hedefleme çalışmaları; transkripsiyon faktörleri ve onların reseptörleri, büyüme faktörleri, sitokinler, genler ve adezyon molekülleri gibi geniş bir spektrumu etkilemektedir [96]. Kurkumin, kanser hücrelerinin önemli bir hücre hedefi olan nükleer faktör kappa B'nin (NF- κ B) hücre sinyal yolunu inhibe eder [97] ve NF- κ B ile düzenlenen, inflamasyon sürecinde önemli rol oynayan, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), interleükin 8 (IL-8) ve siklooksijenaz 2 (COX-2) gibi inflamatuvarların ekspresyonlarında azalmalara neden olur [98]. Ayrıca, kurkuminin Alzheimer hastalığı gibi çeşitli nörolojik patolojilerle ilişkili olan amiloid- β ($A\beta$) proteininin beyinde birikmesini önlediği de belirtilmektedir [99].

Kurkumin'in birçok çalışmada, anti-mikrobiyal, anti-enflamatuvar, anti-oksidan ve özellikle anti-kanser farmasötik etkilere sahip olduğu gösterilmiştir [100, 101]. Bununla birlikte, kurkuminin glioblastomaya karşı etkili bir anti-tümör ajanı olarak kullanılabileceği veya kemoterapi öncesi uygulanan kurkuminin, GBM hastalarını tedaviye karşı daha duyarlı hale getirebileceğini belirten birçok çalışma bulunmaktadır [102, 103]. Kurkumin-bazlı tedavi denemeleri özellikle nörolojik hastalıklar için önemli hale gelmiştir. Kurkumin, KBB'yi

geçerek, hipokampüste biriken doğal farmasötik bileşiklerden olup lipofilik doğası merkezi sinir sistemine uygun emilim sağlamaktadır [104]. Ancak, kurkuminin zayıf biyoyararlanımı, sulu ortamlarda düşük çözünürlüğü ve yüksek bozunma hızı, terapötik uygulamalarını sınırlandırmaktadır [96]. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için nanopartiküler sistemler geliştirilmektedir ve bu sistemlere belirli fonksiyonlar kazandırılarak, fizyolojik engellerin aşılması, ilacın suda çözünürlüğünün ve dolaşımında kalma süresinin arttırılması gibi önemli avantajlar sağlanmaktadır [96, 105].

2.4. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartiküller (SPDON'lar)

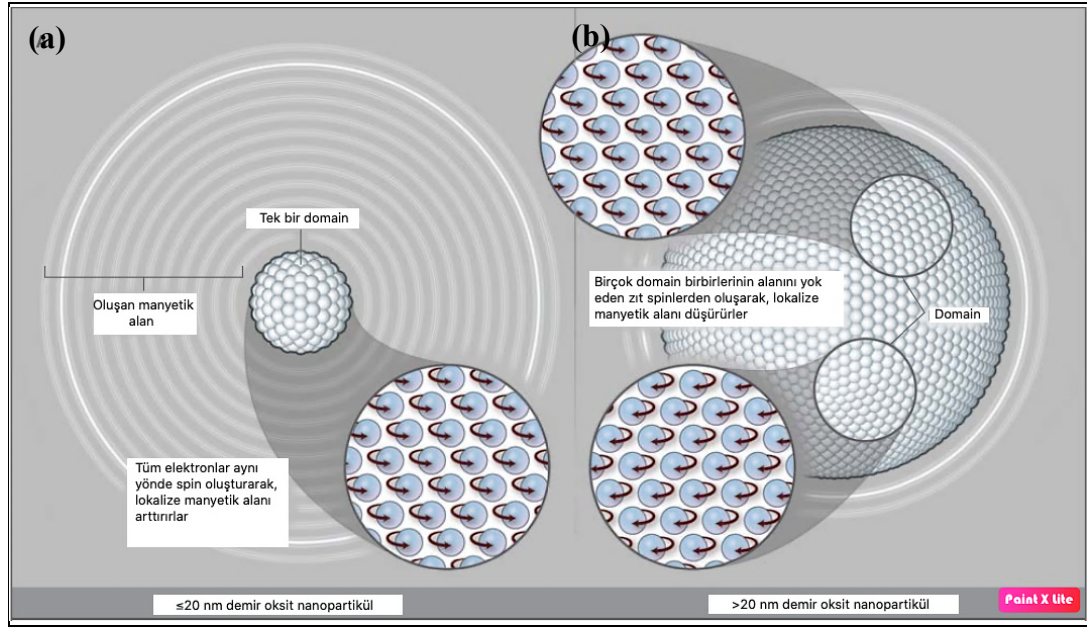
Son zamanlarda, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerinin (SPDON) üstün manyetik özellikleri, merkezi sinir sistemi (MSS) ile ilgili birçok yeni biyomedikal uygulamalar ortaya çıkarmıştır. Bunlar; hedeflendirilmiş nanobiyoteknolojik ilaç taşıyıcı sistemler, hipertermi ajanı olarak ısıya dayalı hücre ölüm yollarının indüklenmesi, manyeto-termal stimülasyon, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ajanı ve kan beyin bariyerinin geçirgenliğinin arttırılması gibi uygulamalardır [106]. Ayrıca, manyetik nanopartiküller, manyetik alan uygulaması altında çeşitli MSS hastalıklarının tedavisinde kan beyin bariyeri (KBB) geçirgenliğini arttırarak tümörlü bölgeye kemoterapötik ilaç birikimini arttırmaktadır [107, 108].

2.4.1. SPDON'ların fiziksel özellikleri

En az bir boyutu 100 nm'den küçük olan metal içerikli partiküllerin; boyutları, şekilleri ve bileşimleri ile elektronik, manyetik ve optik özellikleri arasındaki ilişki benzersiz yönlerini oluşturmaktadır. Bu ilişki ise, nanomalzemedeki elektron davranışının bir sonucudur. Elektronların iki önemli özelliği vardır; bunlar, spinleri (dönüşleri) ve belirli enerji seviyeleri arasında kuantize olarak hareket etmeleridir. Elektronlar, uygulanan bir alandaki elektron spinine karşılık gelen, çevresinde bir manyetik alana sahip küçük çubuk mıknatıslara benzer [109].

Manyetik malzemeler, 'domain' adı verilen bölgeler içerir (Şekil 2.10). Her bir domain'de, tüm elektronlar aynı yönde hizalanır veya döner. Boyutları 20 nm'den küçük olan süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar), tek bir 'domain' içerir ve bu 'domain' boyutları büyük olan partiküllere göre daha yüksek bir manyetik alan oluşturur

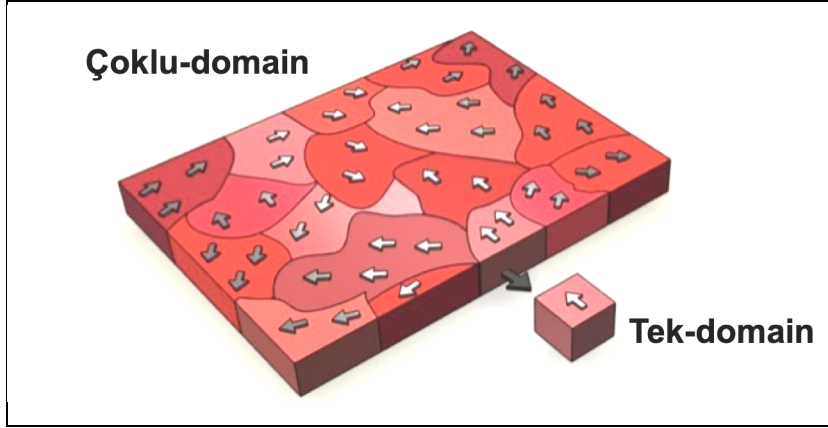
(Şekil 2.10a). Diğer bir yandan, boyutları 20 nm'den büyük olan manyetik partiküller birçok domain içerir ve bu domain'ler birbirlerinin alanlarını iptal ederek (dönüş yönleri ters), partikülleri çevreleyen manyetik alanı azaltır (Şekil 2.10b). Bir malzemenin toplam manyetik alan şiddeti, tek tek elektronların manyetik alanlarının toplamı olduğundan, boyutu 20 nm'den küçük olan tek domain'li manyetik nanopartiküller büyük partiküllere göre daha büyük bir lokalize manyetik alana sahiptir [109].



Şekil 2.10. Demir oksit nanopartiküllerin içerdikleri 'domain' sayılarına göre oluşturdukları manyetik alan ([109]'dan uyarlanarak oluşturulmuştur)

Isı oluşum mekanizmaları

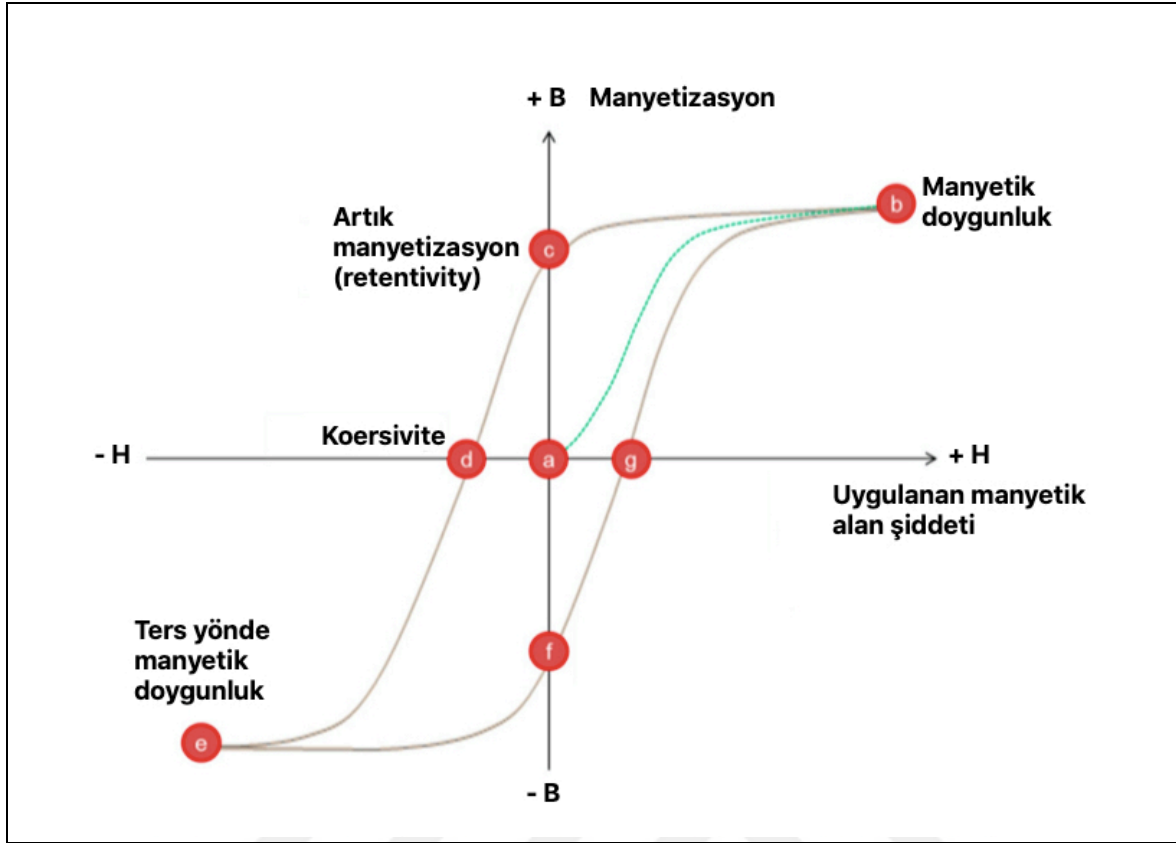
Manyetik nanopartiküller alternatif bir manyetik alan altında iki ana mekanizma ile ısı oluşturur ve bu mekanizmalar histerezis ve relaksasyon kayıpları olarak bilinmektedir [47, 110, 111]. Çoklu 'domain' bölgesi içeren ferromanyetik malzemeler (Şekil 2.11) histerezis kayıpları ile ısı oluşumu gerçekleştirir. Neel ve Brownian relaksasyon kayıpları ile ısı oluşumu ise esas olarak süperparamanyetik nanopartiküller gibi tek 'domain' içeren nanopartiküllerde görülür.



Şekil 2.11. Manyetik malzemelerde çoklu domain ve tek domain bölgelerinin gösterimi ([112]'den uyarlanmıştır)

Çoklu-domain yapılar ve histerezis eğrisi

Çoklu domain'e sahip nanopartiküllerin (ferromanyetik malzeme) ısı üretimi, bir manyetizasyon döngüsü sırasında dağıtılan enerji miktarı olarak belirtilen histerezis kayıplarından oluşur. Bir ferromanyetik malzemenin mıknatıslanma eğrisi histerezis döngüsü (loop) ile temsil edilir (Şekil 2.12) ve histerezis kayıpları bu döngünün integral alanı ile hesaplanabilir [113]. Ferromanyetik malzemeler, üzerlerine uygulanan herhangi bir dış manyetik alan (H) olmadığında sıfır manyetizasyon (mıknatıslanma) gösterir (Şekil 2.12, a noktası). Malzeme üzerine dış manyetik alan uygulanmaya başladığında ise, manyetik malzemenin mıknatıslanması hızla artarak manyetik doygunluk (b noktası) olarak adlandırılan maksimum seviyeye ulaşır. Maksimum doygunluk (M_s) seviyesinde, manyetik momentlerinin tamamı aynı yönde hizalandığı (yöneldiği) için malzeme manyetik olarak doygunluğa ulaşmıştır. Bu noktadan sonra, dış manyetik alan (H) sıfıra düşürülmesine rağmen (b'den c'ye) malzemede bir mıknatıslanma görülür (retentivity, M_r) ve bu durum artık/kalıcı mıknatıslanma olarak ifade edilir. Bu kalıcı mıknatıslanmayı sıfıra düşürmek için malzemeye ters yönde dış bir manyetik alan uygulanır ve manyetizasyon 'd noktasında' sıfıra düşer, manyetizasyonu sıfıra düşüren ters yöndeki alana koersivite alanı (H_c) denilmektedir. Dış manyetik alan şiddeti (H) ters yönde artmaya devam ederse, malzeme bu sefer ters yönde bir manyetik doygunluk noktasına (e noktası) ulaşacaktır. Bu şekilde, manyetizasyon tekrar pozitif manyetik doygunluğa (e'den b'ye) ulaşarak, malzemenin histerezis döngüsü tamamlanır [114].

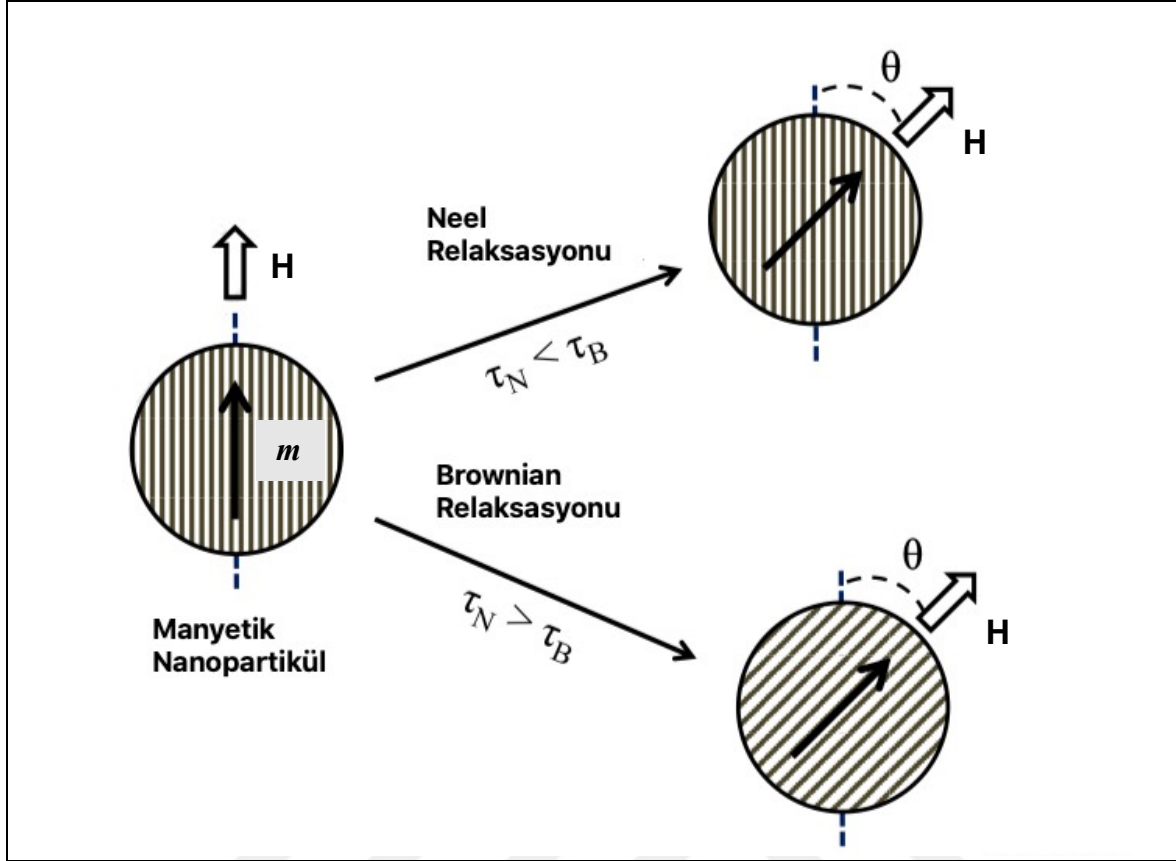


Şekil 2.12. Manyetik malzemelerde histerezis eğrisi [114]

Tek-domain yapılar ve relaksasyon mekanizmaları

Tek-domain'li yapılarda (süperparamanyetik NP'ler) ısı oluşumu Neel ve Brownian mekanizmaları ile gerçekleşmektedir. Neel relaksasyon hareketi, alternatif manyetik alan altında manyetik dipol momentin (m) hızla dönmesi (rotation) ve nanopartikülün sabit kalması ile; Brownian relaksasyonu ise nanopartikülün sıvı içerisinde bütün (fiziksel) olarak dönmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 2.13).

Relaksasyon mekanizmaları nanopartiküllerin boyutuna ve manyetik dipollerin yönelimine bağlı olarak manyetik özelliklerin farklılığını ifade eden anizotropi durumuna bağlıdır. Neel relaksasyon mekanizmasında, parçacığın fiziksel yönelimi sabit kalırken, manyetik momentin uygun yönelimleri arasında geçen ortalama süre relaksasyon süresi olarak tanımlanmaktadır [115]. Brownian relaksasyonu ise manyetik nanopartikülün süspanse edildiği ortam içinde fiziksel dönüşü ile ilgili olup, enerji partikülün yüzeyi ile ortam arasında sürtünme yoluyla ortama aktarılmaktadır. Neel (τ_N) ve Brownian (τ_B) relaksasyon süreleri Eş. 2.1 ve 2.2'de verilmiştir [116].



Şekil 2.13. Alternatif manyetik alan (AMF) varlığında manyetik nanopartiküllerin Neel ve Brownian relaksasyon kayıplarının şematik gösterimi ([110]'dan uyarlanmıştır)

$$\tau_N = \tau_0 \exp \frac{KV_M}{kT} \quad (2.1)$$

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT} \quad (2.2)$$

$$\tau = \frac{\tau_B \tau_N}{\tau_B + \tau_N} \quad (2.3)$$

Eşitlik 2.1-2.3'te, τ_N Neel relaksasyon süresi, τ_B Brownian relaksasyon süresi, τ etkin relaksasyon süresi, $\tau_0 = 10^{-9}s$, K anizotropi sabiti, V_M partikül hacmi, k Boltzmann sabiti, T sıcaklığı, η sıvı viskozitesi ve V_H hidrodinamik partikül hacmini temsil etmektedir. Eş. 2.1'de Neel relaksasyon süresinin büyük ölçüde nanopartikül çapına, Eş. 2.2'de ise Brownian relaksasyon süresinin büyük ölçüde nanopartikülün hidrodinamik çapına ve sıvının viskozitesine bağlı olduğu görülmektedir. Nanopartiküller, manyetik relaksasyon sürelerinden daha az manyetik terslenme süresine sahip AC manyetik alana maruz

kaldığında, manyetik momentin relaksasyonundaki gecikmeden dolayı ısı yayılımı gerçekleşir. Isı yayılım denklemi Eş. 2.4'te verilmiştir [110].

$$P = \mu_0 \chi'' f H^2 \quad (2.4)$$

Eş. 2.4'te, P ısı dağılım değerini, μ_0 boş uzayın manyetik geçirgenliğini, χ'' manyetik duygunluğu (susceptibility), f uygulanan manyetik alan frekansını, H uygulanan manyetik alan şiddetini göstermektedir. Bu nedenle, ısı dağılım değeri, uygulanan manyetik alanın frekansına ve şiddetine ve nanoparçacıkların manyetik özelliklerine bağlıdır [116].

Manyetik nanopartiküllerin ısıtma potansiyelleri özgül soğurma oranı (SAR) veya özgül kayıp gücü (SLP) olarak ifade edilmektedir ve bunlar birim kütle tarafından soğurulan enerji olarak tanımlanmaktadır [117]. Özgül soğurma oranının bu tanımı klinik uygulama terminolojisinde kafa karışıklığına yol açabilmektedir. Klinik olarak SAR, örneğin, cep telefonları tarafından üretilen radyofrekans (RF) elektromanyetik alanın insan vücuduna transferi anlamındadır, yani birim doku kütlesi başına soğurulan güç olarak tanımlanır (Watt/kg, Watt/g) [118]. Manyetik nanopartikül aracılı SAR oluşumunun teorik ve deneysel mekanizmasını çalışan birçok grup, SAR'ın manyetik nanopartiküllerin karakteristik özelliklerine (boyut, şekil, manyetizasyon vb.), uygulanan manyetik alanın frekansına, gücüne ve uygulanma süresine bağlı olduğunu belirtmişlerdir [115, 119].

2.4.2. SPDON'ların sentez yöntemleri

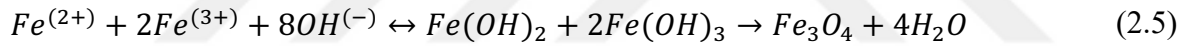
Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar) kimyasal, fiziksel ve biyosentetik yöntemlerle sentezlenebilmektedir [120]. Bunlar arasında kimyasal yöntemler, kimyasal yöntemlerden ise ikili çöktürme (co-precipitation) ve termal ayrıştırma (thermal decomposition) SPDON sentezinde en yaygın kullanılanlarıdır. Çizelge 2.2'de SPDON sentezinde yaygın olarak kullanılan kimyasal metotlar karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Tez kapsamında, SPDON'lar ikili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenmiştir. Bu nedenle, ikili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri aşağıdaki bölümlerde daha ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 2.2. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasal yöntemlerin karşılaştırılması [120].

Metot	Sentez prosedürü	Sentez sıcaklığı	Boyut dağılımı	Şekil kontrolü	Morfoloji	Kristalite derecesi	Verim
İkili çöktürme	Çok basit	Düşük	Geniş	Kötü	Düzensiz küre	Düşük	Yüksek
Termal ayrıştırma	Çok kompleks	Yüksek	Çok dar	Çok iyi	Küp-küre	Yüksek	Yüksek
Mikro-emülsiyon	Kompleks	Düşük	Nispeten dar	İyi	Küp-küre	Düşük	Düşük
Sol-jel	Nispeten basit	Düşük	Nispeten dar	İyi	Gözenekli/ Gözeneksiz küre	Düşük	Orta
Hidrotermal	Nispeten basit	Yüksek	Nispeten geniş	Kötü	Düzensiz küre	Yüksek	Orta

İkili çöktürme yöntemi

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin sentezinde, düşük maliyetli ve en yaygın olarak kullanılan ikili çöktürme yöntemi, zayıf veya güçlü baz ilavesiyle Fe^{+2} ve Fe^{+3} sulu tuz çözeltilerinin birlikte çöktürülmesine dayanır (Bkz. Şekil 3.3). İkili çöktürme genel sentez reaksiyonu Eş. 2.5'te verilmiştir [120].

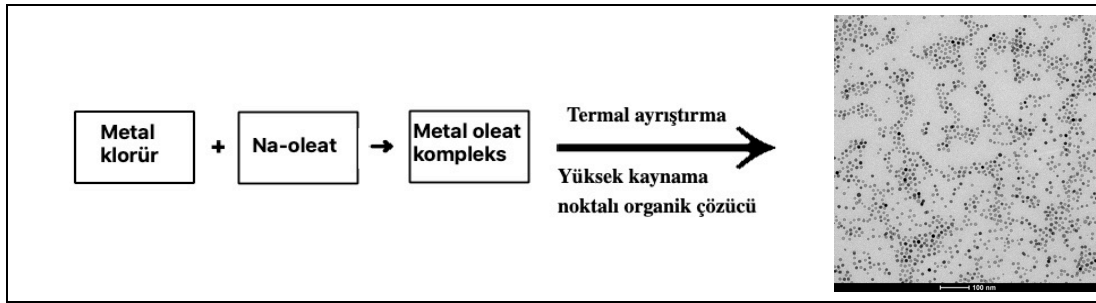


İkili çöktürme yönteminde, SPDON'ların sentez aşamasında kullanılan parametreler; Fe^{+2}/Fe^{+3} oranı, sıcaklık, pH, tuz (klorür, nitrat, sülfat, perklorat) ve bazlar (NaOH, NH_4OH , Na_2CO_3) ile elde edilen nanopartikülün boyut, boyut dağılımı, şekil, kolloidal stabilite, oksitlenme vb. gibi özellikleri belirlenmektedir [114, 120, 121]. Ancak, bu yöntemle elde edilen nanopartiküller genellikle düşük derecede kristalinite ve geniş boyut dağılımı sergiler [122]. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar biyolojik uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Bu uygulamaların çoğunda, nanopartiküllerin yüzeyleri çeşitli ligandlarla (örneğin hedeflendirme ligandları ile) modifiye edilerek nanopartiküllere işlevsellik kazandırılır. Ayrıca, karaciğer lezyonları ve lenf düğümlerinin görüntülenmesi için klinikte kullanım onayı almış dekstran kaplı demir oksit nanopartiküller (Feridex®, Resovist®, Sinerem®) ticari olarak kullanılmaktadır [123]. İkili çöktürme, düşük maliyetli ve tekrar edilebilirliği yüksek bir yöntem olsa da elde edilen nanopartiküllerin, büyüklük ve morfoloji kontrollerinin zor olması nedeniyle nanopartiküller yaygın olarak agregre olur [123]. Bu agregasyon, nanopartiküllerin süperparamanyetik karakterlerini ve sulu ortamdaki

dağıtılabirliklerini olumsuz yönde etkilemekte ve homojen dağılımlı bir polimer kaplamada zorluklara neden olabilmektedir [124, 125].

Termal ayrıştırma yöntemi

Termal ayrıştırma yöntemi, organo-metalik maddelerin, bir yüzey aktif madde (oleik asit, oleamin vb.) varlığında, yüksek kaynama noktalı organik çözücüler içerisinde termal olarak ayrıştırılması esasına dayanır (Bkz. Şekil 3.4). En yaygın kullanılan organo-metalik kompleksler; demir oleat (Fe(oleat)_3), demir asetilaseton (Fe(acac)_3), demir karbonil (Fe(CO)_5), demir kupferronat (Fe(Cup)_3)'tır. Ayrıca, homojen dağılımlı SPDON'lar elde etmek için reaksiyon ortamına oleik asit, oleamin, 1-oktadesen ve 1-tetradekan gibi stabilizatör ve çözücüler ilave edilmektedir [122]. Termal ayrıştırma yöntemi kullanılarak, küresel morfolojide, eş boyut dağılımlı, boyut ve şekil kontrollü, yüksek kristaliniteye sahip manyetik nanopartiküller elde edilebilmektedir [106, 114, 121]. Fakat, termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi, hidrofobik olan yüzeyinin suda dağılılabir formda modifiye edilmesi ile mümkündür [120]. Şekil 2.14'te basitleştirilmiş termal ayrıştırma şeması verilmiştir.



Şekil 2.14. Termal ayrıştırma yöntemi ile eş boyut dağılımlı demir oksit sentez şeması (TEM görüntüsü bu çalışmaya aittir)

Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyon sistemi, birbiri içerisinde karışmayan iki sıvının termodinamik olarak kararlı izotropik dağılımıdır. Mikroemülsiyonlar, su içinde yağ (yağ/su; normal misel) ve yağ içinde su (su/yağ; ters miseller) emülsiyonları olarak iki kategoriye ayrılabilir ve dağılan faz, nano/mikro partiküllerin çekirdeklenmesi ve kontrollü büyümesi için uyumlu bir ortam sağlar. Misel mikroemülsiyon sistemlerinin oluşumu için dioktil sodyum dodesil sülfat

(DSS), setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) ve sodyum dodesil sülfat (SDS) gibi çeşitli amfifilik yüzey aktif maddeleri kullanılmaktadır [120].

Hidrotermal yöntemi

Hidrotermal yaklaşım, yüksek kristalli hidrofilik SPDON'ların üretimi için demir öncüllerinin (precursor) sulu ortamda çözündüğü yüksek sıcaklık ve/veya yüksek basınçlı bir işlemdir [121].

Sol-jel yöntemi

Silika kaplı SPDON üretimi için yaygın olarak kullanılan sol-jel yöntemi, hidroliz ve (etanol ve %30'luk sulu H_2O_2 çözeltisi içerisinde tetraetilortosilikat (TEOS) ile Fe^{+3} çözeltisinin) yoğunlaşma ile kolloidal sol'ların oluşumuna dayanır. Sol, daha sonra demir oksit yığını elde etmek için kimyasal reaksiyon veya çözücü uzaklaştırılması ile jelleştirilir. Demir oksit nanopartiküller, oluşan jelin kurutma işleminden sonra ilave bir öğütme aşaması ile elde edilir [120].

2.5. Nano-Taşıyıcı Sistemler

Birçok hastalık, biyolojik süreçlerde moleküler veya nano-ölçek düzeyde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Mutasyon geçirmiş genler, yanlış katlanmış proteinler, virüs veya bakteri kaynaklı enfeksiyonlar, hücrelerin işlev bozukluğuna, iletişim bozukluğuna ve hatta yaşamı tehdit eden hastalıklara yol açabilir. Bu moleküller ve enfeksiyon ajanları nanometre boyutunda olup kimyasal özellikleri, şekilleri ve boyutları özel biyolojik bölmelere taşınmalarını ve moleküller arası etkileşimlerini belirlemektedir [109]. Nanopartiküllerin, boyut ve fonksiyonel özellikleri açısından biyolojik moleküllere benzetilerek nano-sistemler olarak tasarlanabilmeleri teşhis ve tedavide kullanılmalarına olanak sağlamaktadır [126].

2.5.1. Polimerik manyetik nanopartiküller

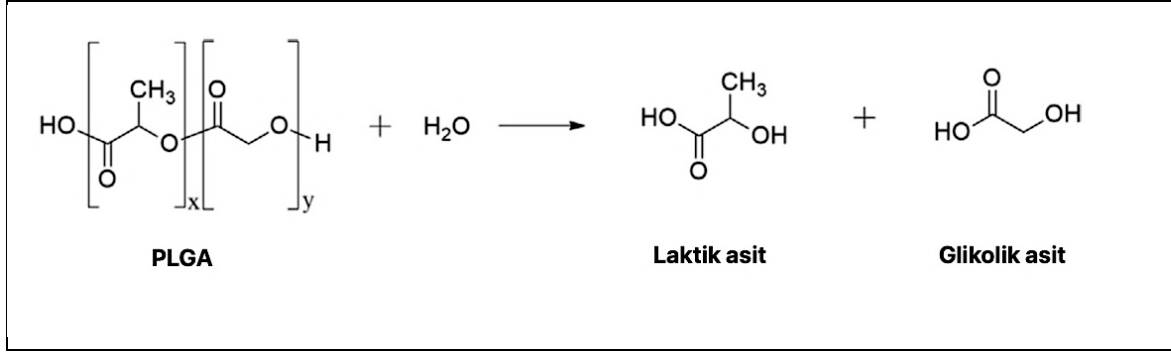
Küresel morfolojide, eş-boyut dağılımlı ve kontrol edilebilir boyutta süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) sentezinde termal ayrıştırma yöntemi diğer yöntemlere göre ön plana çıkmıştır [110, 120]. Ancak, bu yöntemle sentezlenen SPDON'ların biyolojik uygulamalarda kullanılabilmesi için, hidrofobik olan yüzeylerinin

suda dağıtılabılır formda modifiye edilmesi, fiziksel stabilitelerinin ve kolloidal kararlılıklarının artırılması gerekmektedir[127]. Bu amaçla, demir oksit nanopartiküllerin yüzeyleri, sentez sırasında veya sonrasında biyouyumlu bir malzeme ile kaplanarak modifiye edilir. Bu kaplamalar, SPDON'ların biyolojik ortamdaki stabilitelerini ve biyoyumluluklarını artırmak, olası oksidasyonlarını önlemek veya SPDON'lara ligand ve ilaç gibi fonksiyonel molekülleri bağlamak amacıyla yapılabilmektedir [127, 128].

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin yüzey kaplamalarında, çok sayıda doğal ve sentetik biyobozunur polimer kullanılmaktadır. Albümin, jelatin, kitosan, poli (akrilik asit), poli (ϵ -kaprolakton) (PCL), poli (vinil alkol) (PVA), poli (D, L-laktit) (PLA), poli (D, L-laktit-ko-glikolit) (PLGA), poli (etilen glikol) (PEG) ve PLGA-b-PEG gibi doğal ve/veya sentetik polimerler SPDON'ların yüzey kaplamalarında kullanılmaktadır [110, 120, 127, 129, 130]. Ayrıca, bu polimerik kabukların terminal grupları (amin ve karboksil), nanopartikül yüzeyine biyoaktif moleküller ve/veya hedeflendirme ligandlarının konjugasyonunu mümkün kılmaktadır [127].

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA), ilaç taşıma-hedeflendirme sistemlerinde ve doku mühendisliği çalışmalarında yoğun bir şekilde kullanılan bir poli(laktik asit) (PLA) ve poli(glikolik asit) (PGA) kopolimeridir. Şekil 2.15'te laktik ve glikolik asit tekrar birimlerine sahip doğrusal bir kopolimer olan PLGA'nın hidroliz reaksiyonu verilmiştir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) monomerlerinin (LA ve GA) vücut içerisinde, trikarboksilik asit döngüsünde karbondiyoksit ve suya kolayca metabolize edilmesi ile PLGA'nın vücutta minimum sistemik toksisiteye neden olduğu belirtilmektedir. [131, 132]. Yaygın olarak kullanılan çözücülerin çoğunda çözünmesinin yanı sıra PLGA farklı şekil ve boyutlarda sentezlenme avantajına sahip bir polimerdir [131-133].



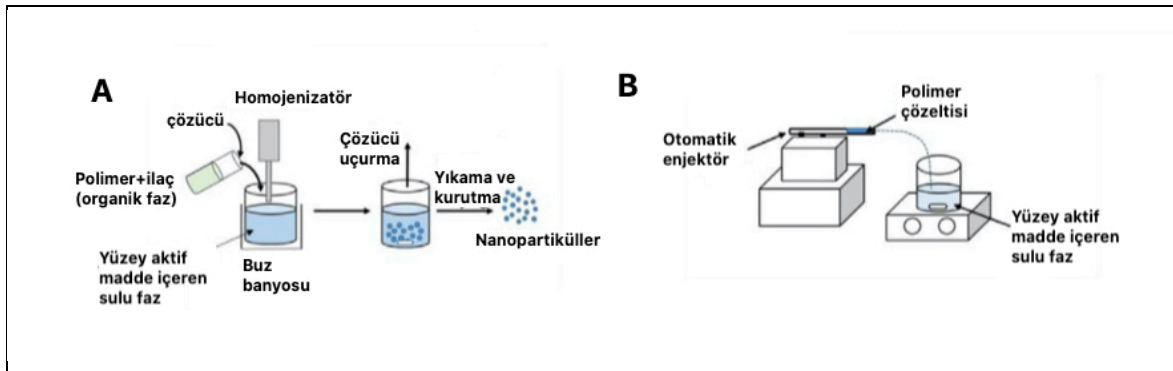
Şekil 2.15. Poli(laktik asit-ko-glikolik asit) (PLGA) hidrolizi [132].

Poli(laktik-ko-glikolik asit) polimerinin bileşenleri (laktid:glükolid) hidrofilisitesini ve degradasyon hızını belirleyen en önemli faktördür. Poli(laktik-ko-glikolik asit) sentezi sırasında laktid:glükolid oranının değiştirilmesiyle örneğin, PLGA 50:50 (%50 laktik asit ve %50 glükolik asitten oluşan bir kopolimeri ifade eder), PLGA 75:25, PLGA 85:15 gibi farklı bileşimlerde PLGA polimeri elde edilebilir. Kullanılan molekül ağırlığına ve laktid:glükolid kopolimer oranına bağlı olarak, polimerin bozunma süresi birkaç aydan birkaç yıla kadar değişebilmektedir [134]. Genellikle, daha yüksek glükolik asit (GA) oranları, PLGA'nın daha yüksek hidrofilik yapıda ve hızlı degrade olmasını sağlar. Aksine, daha yüksek laktik asit içeriğine sahip PLGA daha hidrofobiktir, daha az su emer ve daha yavaş bir şekilde bozunur. Bu durumun, haftalar ve aylar arasında değişen kontrollü ve sürekli ilaç salımı için yararlı olduğu belirtilmiştir [131, 132, 134]. PLGA (50:50) diğer LA:GA oranında üretilen PLGA'ya göre daha yüksek bozunma hızına sahip olduğu için kontrollü ilaç salım çalışmalarında en çok kullanılan PLGA ko-polimerlerinden biridir. Ayrıca, PLGA'nın fiziksel özellikleri, polimere ilaç yükleme kapasitesinde önemli bir rol oynayan moleküler ağırlık gibi farklı özelliklere bağlı olarak değişmektedir [133].

Poli(laktik-ko-glikolik asit), bileşimine bağlı olarak birçok organik çözücüde çözünebilmektedir. Daha yüksek miktarda laktik asit içeren PLGA'lar, diklorometan ve kloroform gibi klorlu çözücüler veya aseton ve tetrahidrofuran gibi suyla karışabilen çözücüler içerisinde çözünebilirken, daha yüksek miktarda glükolik asit içeren PLGA'lar hekzafloro-2-propanol gibi flor bazlı çözücüler içerisinde çözünebilmektedir [132]. Poli(laktik-ko-glikolik asit) temelli nanopartiküllerin, biyoyumluluk, biyobozunurluk, hücre içi endositozdan sonra zaman içerisinde enkapsüle ilaçların kontrollü salınması, düşük maliyetleri ve kullanımlarının FDA onaylı olması gibi birçok avantajı bulunmaktadır [135, 136].

Polimerik nanopartiküllerin hazırlanmasında, tekli ve ikili emülsiyon-çözücü buharlaştırma, nanoçöktürme (nanoprecipitation), tuzla çöktürme (salting out), emülsifikasyon-çözücü difüzyonu, püskürtürerek kurutma (spray-drying) ve mikroakışkanlarla üretim gibi birçok farklı yöntem kullanılmaktadır [132, 134, 137]. Nanopartiküllerin, boyut, bozunma hızı gibi fizikokimyasal özellikleri ve yapısal organizasyonları, nanopartikül hazırlama yöntemine bağlı olarak değişebilmektedir [134]. Ayrıca, istenilen özelliklerde (boyut, enkapsülasyon verimi, salım karakteristiği vb.) kontrollü bir sentez gerçekleştirebilmek için sadece doğru yöntemin değil, aynı zamanda sentez parametrelerinin de (homojenizatör türü/hızı, yüzey aktif madde türü/miktarı, organik faz:su fazı oranı vb.) optimize edilmesi gerekmektedir [132, 134, 137]. Nanopartiküllerin hazırlanmasında, tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma ve nanoçöktürme en yaygın kullanılan PLGA sentez yöntemleridir (Şekil 2.16). Tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi (yağ/su), enkapsüle edilen ilacın genellikle hidrofobik veya suda az çözünür olduğu durumlarda kullanılır [134]. Bu yöntem kısaca, polimer ve etken madde içeren organik fazın, yüzey aktif madde içeren su fazında homojenizatör (mekanik veya ultrasonik) yardımıyla emülsifiye edilmesi olarak açıklanabilir (Şekil 2.16a).

Nanoçöktürme yönteminde, öncelikle polimerik (polimer ve/veya ilaç) çözelti, suyla karışabilir bir çözücü (asetonitril, etanol vb.) içerisinde çözülür. Daha sonra, bu çözelti otomatik enjektör sistemi ile yüzey aktif madde içeren su fazına kontrollü bir şekilde ilave edilerek nanopartikül oluşumu sağlanmaktadır (Şekil 2.16b) [132].



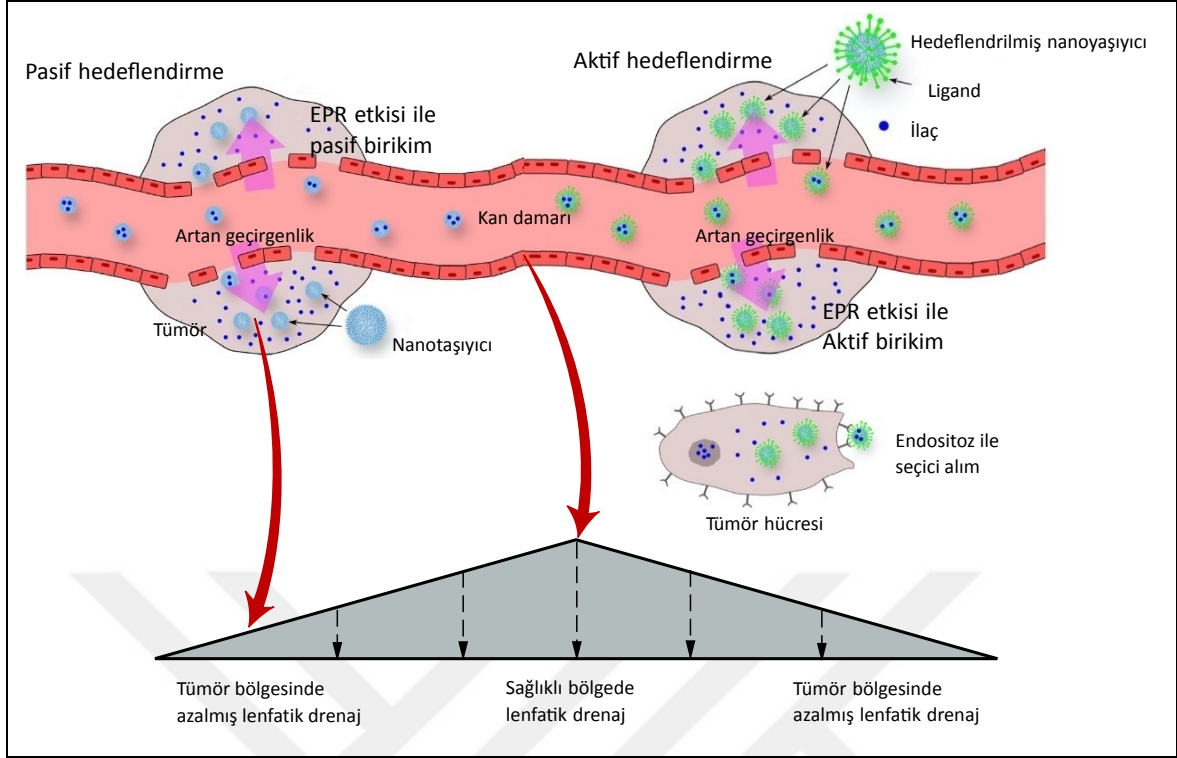
Şekil 2.16. En çok kullanılan PLGA nanopartikül sentez yöntemleri, (A) tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma, (B) nanoçöktürme [132]

Poli (etilen glikol) (PEG), yüksek biyoyumluluğa sahip non-iyonik ve hidrofilik özellikte bir polimerdir. Nanopartikül yüzeyinin PEG ile kaplanması, yani PEGilasyon,

nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu için en yaygın kullanılan tekniklerden biridir [134]. PEGilasyon, kan proteinleri opsonizasyonunu azaltıcı, makrofajlarca tanınmama ve bağışıklık sisteminden kaçma gibi özelliklerinden dolayı ilaç hedeflendirme sistemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca, PEGilasyonun bu özellikleri nanopartiküllerin kan dolaşımında (plazma yarılanma ömürleri) ve hedef hücrelerde bulunma sürelerini artırabilmektedir [133]. Bu durumun altında yatan mekanizma ise, nanopartikül yüzeyindeki hidratlanmış bariyerler tarafından oluşturulan sterik itme ve van der Waals kuvvetlerinin, nanopartiküllerin opsonizasyonunu (opsonin proteinleri ile kaplanarak fagosit edilmesi) engellediği şeklindedir [134]. Poli (laktik asit-ko-glikolik asit) polimerinin PEGilasyonu ile sentezlenen PLGA-b-PEG ko-polimerleri, PLGA polimerinin biyobozunurluk ve biyouyumluluğuna, PEG'in ise kan proteinlerinden kaçma özelliğine sahiptir [133, 138]. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin, PLGA-b-PEG ko-polimeri ile fonksiyonlandırılmaları manyetik PLGA nanopartiküllerine üstün bir biyoaktivite kazandırmaktadır [138].

2.5.2. Hedefe yönelik sistemler

Genel olarak, ilaç hedeflendirme sistemleri, pasif ve aktif hedeflendirme olarak iki temel stratejiye dayanmaktadır. Pasif hedeflendirme, etken maddenin istenilen bölgeye yönlendirilmesi için hedef doku veya organın (tümör hücresinin) fizyolojik koşullarından yararlanılması esasına dayanır. Pasif hedeflendirme, artan geçirgenlik ve tutunma etkisi (enhanced permeation and retention, EPR) olarak da bilinmektedir ve EPR etkisiyle etken madde, tümörlü dokularda sağlıklı dokulara göre daha fazla birikir (Şekil 2.17). Artan geçirgenlik ve tutunma etkisinde; artan geçirgenlik, tümör bölgesinin vasküler geçirgenliğinin yüksek olmasından, artan tutunma ise tümörlü bölgede lenfatik drenajın eksikliğinden veya fonksiyon göstermemesinden kaynaklanır [139]. Belirli koşullar altında (tümör bölgesi için inflamasyon/hipoksi durumu) kan damarları endotelinin sağlıklı duruma göre daha geçirgen hale geldiği bilinmektedir. Hipoksi durumunda, hızla büyüyen tümör mevcut damarları içine alarak yeni damarlanmalar oluşturur. Bu yeni oluşan sızıntı damarlanmalar (leaky vessels) 40 kDa'dan büyük moleküllerin/nanosistemlerin tümör stromalarına nüfuz etmelerini sağlar. Ayrıca, tümör dokusunun normal lenfatik drenajın olmaması nanopartiküllerin tümörlü bölgede tutunmasına katkıda bulunmaktadır [140] (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. Tümör bölgesine EPR etkisi ile pasif ve aktif hedeflendirme ([141]'den uyarlanmıştır)

Aktif hedeflendirmede, etken madde/nanosistemlerin istenilen bölgeye seçici olarak hedeflendirilmesi sağlanır ve böylece sağlıklı dokularda birikmesi önlenmiş olur. Bu sayede, geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemlerin terapötik etkinliği artırılarak yan etkilerinin sınırlandırılması amaçlanmaktadır. Aktif hedeflendirme, hedef hücreye iletilen ilaç miktarını, serbest ilaç ve pasif hedefleme uygulamalarına göre önemli derecede arttırabilmektedir [141] (Şekil 2.17). Kemoterapötik ilaçların, sağlıklı dokular üzerinde bilinen olumsuz etkileri nedeniyle, tümör bölgesine ulaşan ilaç miktarını maksimum düzeye çıkarmak ve hedef dışı ilaç maruziyetini sınırlamak önemlidir. İlaç hedeflendirme sistemlerinde peptitler, aptamerler ve diğer küçük moleküller ilaçların ve/veya manyetik nanopartiküllerin kan beyin bariyeri geçişini kolaylaştırmak ve kullanılan nanopartikülleri istenen dokuya hedeflendirmek için kullanılmaktadır [137, 142].

İlaç hedeflendirme sistemleri arasında, hücre yüzeylerindeki reseptörlere bağlanabilen proteinlerin sadece hücre reseptörü-protein etkileşimini sağlayan küçük peptit sekanslarının kullanımı, maliyet, sentez kolaylığı ve kolay bir kimya ile fonksiyonelleştirme gibi çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Bu amaçla, fibronektinin hücre yapışma sekansı olan arjinin-glisin-aspartik asit (RGD) ve/veya arjinin-glisin-aspartik asit-serin (RGDS) sekansı

gibi çok farklı proteinlerden belirlenmiş peptitler, ilaç taşıyıcı sistemi olarak geliştirilen nanopartiküllerin yüzeyine immobilize edilerek, bu nanopartiküllerin KBB'yi aşmalarını kolaylaştırmaktadır [143, 144]. Peptitlerin nanopartiküllerin yüzeyine immobilizasyonunda çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Zayıf ikincil kuvvetlerin kullanıldığı immobilizasyon stratejilerinde, nanopartikülleri oluşturan moleküllerle peptitler arasında kuvvetli bir bağ gerçekleşmez ve bu peptitler *in vitro/in vivo* koşullarda zamanla partikül yüzeyinden kopar ve etkinliğini kaybeder. Bu nedenlerle, peptitlerin yüzeyindeki etkinliklerinin uzun süre sağlanması için kovalent immobilizasyon yöntemleri nanopartikül hedefleme sistemlerinde daha çok tercih edilmektedir.

Danhier ve ark, glisin-arjinin-glisin-aspartik asit-serin (GRGDS) peptidini ışık ile aktive edilmiş PCL-PEG polimerine kovalent olarak bağlamış ve bu polimerlerle RGD'yi PLGA nanopartiküllerin yüzeyine kovalent olarak immobilize etmişlerdir. Elde edilen RGD bağlı PLGA nanopartiküllerin RGD içermeyen nanopartiküllere göre endotel hücrelerle daha fazla etkileşime girdikleri gösterilmiştir [145]. Chen ve ark, ise RGD peptidini altın nanopartiküllerin yüzeyine EDC/NHS kimyası ile kovalent olarak bağlamış ve RGD glioblastoma hücrelerine sağlıklı hücrelere göre daha yüksek afinite gösterdiği için hedefleme ajanı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalar kovalent immobilizasyonun daha etkin olduğunu göstermekle birlikte RGD'nin gerek KBB'yi aşabilme gerekse hedefleme ajanı olarak kullanılabileceğini ortaya koymaktadır [146].

2.6. Hipertermi

Bu bölümde öncelikle hiperterminin moleküler düzeydeki etkileri, daha sonra kanser tedavisinde hipertermi, manyetik nano hipertermi ve son olarak hipertermi maruziyet sistemleri anlatılmıştır.

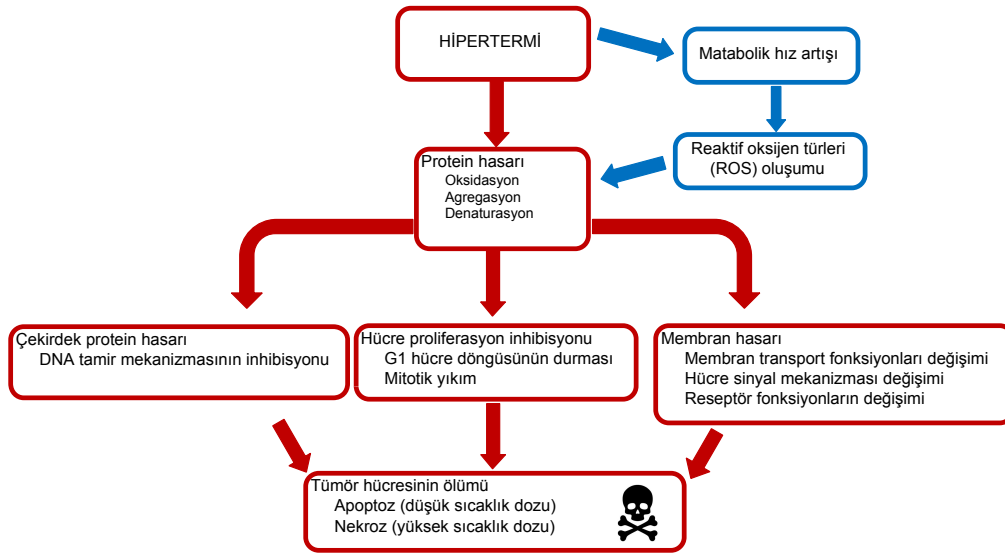
Tıbbi bir terim olarak 'hipertermi' kavramı, birçok hastalığın belirteçlerinden (hastalık göstergesi) biri olan insan vücudundaki sıcaklık artışını (ateş) ifade eder. Ancak, kanser tedavisi açısından hipertermi ise tümörlü dokuda anti-tümör etkileri artıran veya radyo-kemo terapiye karşı hassaslaştıran, organizmada kasıtlı (bilerek) sıcaklık artışının uyarılmasını ifade eder [147].

2.6.1. Moleküler seviyede hipertermi

Hipertermi etkisiyle ile indüklenen hücre ölümünün kesin mekanizması tam olarak aydınlanmış değildir, ancak hücre ölümünün olası mekanizmalarından biri olarak protein denatürasyonu kabul edilmektedir [148, 149]. Protein denatürasyonu yaklaşık 40°C'de başlamakta ve daha yüksek sıcaklıklarda proteinlerin daha büyük bir kısmı denatüre olmaktadır, bu ise hücre ölüm oranının sıcaklıkla neden daha fazla arttığını açıklamaktadır. Hücrelerde, 40-42°C sıcaklık aralığında proteinlerin küçük bir kısmı denatüre olur, ancak bu denatüre olan proteinlerden bazıları diğer proteinlerle bir araya gelerek proteinlerin agregasyon seviyelerini önemli derecede artırır. Isı-kaynaklı protein denatürasyonunun ve devamında gelen agregasyonun, protein sentezinin inaktivasyonunu, hücre döngüsünü ve DNA onarım mekanizmalarını içeren birçok sinyal yolağını etkilediği düşünülmektedir (Şekil 2.18). Ayrıca, hücre ölümüne katkıda bulunan diğer potansiyel etkiler, hücre ve hücre-altı organellerin membranlarında ve membran proteinlerinde açığa çıkan ısı-kaynaklı değişikliklerdir [150].

Programlanmış hücre ölüm tiplerinden biri olarak tanımlanan apoptoz, hipertermi uygulaması ile indüklenebilir. Hücreler, 41-47°C sıcaklık aralığında apoptoza uğrar ve oluşan bu ısı hücre içi kaspaz (sistein aspartik proteazlar, Caspase) sinyal kaskadlarını aktive eder. Başlatıcı Kaspaz-8 ve -9, hücre proteinlerinin kesilmesinden sorumlu efektör kaspaz-3, -6 ve -7'yi aktive etmekte ve bu sinyaller mitokondrial yollarda ilerlemektedir [148]. Sıcaklıklar 50°C'nin üzerine çıktığında, nekroz yoluyla hücre ölümünün apoptozdan daha olası olduğu görülür. Nekroz, sıralı protein aktivasyonu gerektirmeyen çok daha hızlı ve düzensiz bir hücre ölüm şeklidir [151].

Reaktif oksijen türleri (ROS), mitokondride oksijen metabolizması sırasında üretilen yan ürünlerdir. Reaktif oksijen türlerinin aşırı üretimi oksidatif stresi uyandırabilir ve makromoleküllere, proteinlere, lipitlere ve DNA'ya zarar verebilir. Apoptoz, reaktif oksijen türlerindeki artışla da indüklenebilir [152] (Şekil 2.18). Hipertermi uygulamasının hidrojen peroksit, süperoksit anyonu ve hidroksil radikalleri şeklinde ROS seviyesinde bir artışa neden olduğu birçok araştırmacı tarafından gösterilmiştir [152, 153]. Ancak, antioksidan sistemler ROS oluşumunu nötralize edebilmektedir. Hipertermi maruziyeti sonrası antioksidanlar ve yüksek ROS konsantrasyonu arasındaki rekabet, hücreyi oksidatif stresin etkilerine karşı savunmasız hale getirebilmektedir [154].



Şekil 2.18. Hipertermi maruziyetinin tümör hücreleri üzerindeki moleküler etkileri ([155]'ten uyarlanmıştır)

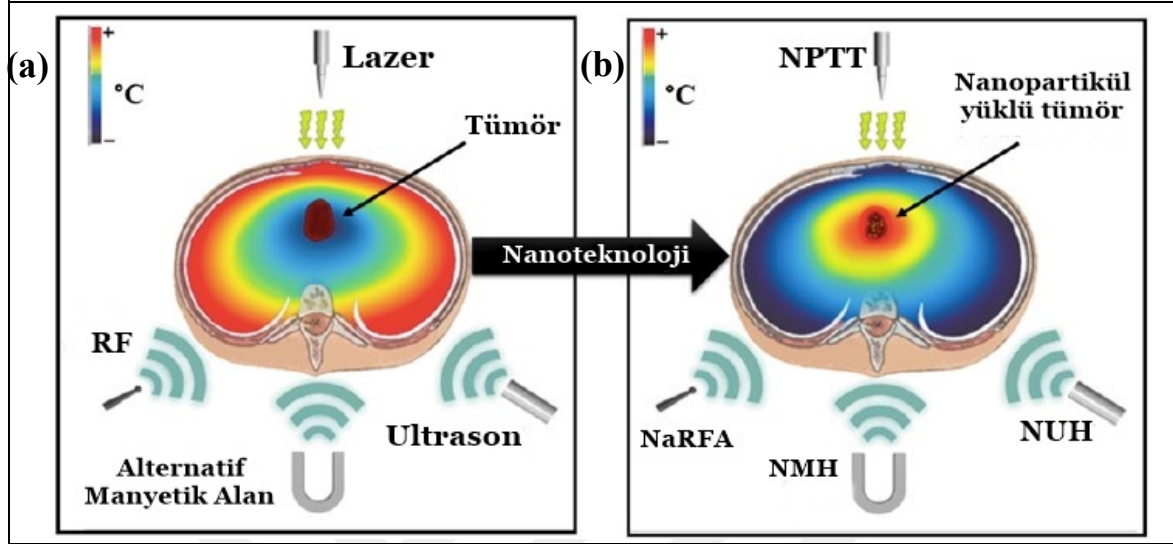
Hipertermi uygulamasının etkinliği, yeterli sürede maruziyete ve hücrelerde yeterli sıcaklık artışına bağlıdır [148]. Bu şartlarda hücre ölümü tetiklenebilir, ancak hücreler hayatta kalırsa termotoleransa yol açan birkaç ana protein sınıfı aktive olmaktadır. Bu protein sınıfları, yanlış katlanmış proteinleri stabilize eden ısı şok proteinleri, denatüre ve agregasyona uğramış proteinleri temizleyen proteolitik enzimler, DNA ve RNA hasarını onaran modifiye edici proteinlerdir [150].

2.6.2. Kanser tedavisinde hipertermi

Hücrel sıcaklık artışı kontrol edilebildiğinde, birçok tıbbi uygulamada özellikle kanser tedavisinde kullanım potansiyeline sahiptir [156]. Hipertermi, çeşitli kanser türleri için tümörlü dokunun yüksek sıcaklığa maruz bırakıldığı bir destek tedavi olarak tanımlanır. Hedef dokunun yüksek sıcaklığa maruz kaldığı bu tedavi yönteminde, 47°C'nin üzerindeki sıcaklıklarda ya doğrudan doku yok edilir ki buna “termal ablasyon” denir, ya da kanser hücreleri 41-45°C sıcaklık aralığında 'termal hassaslaşma' ile diğer tedavi yöntemlerine (kemoterapi, radyoterapi) karşı daha hassas hale gelir [3].

Hipertermi uygulaması, 41-45°C sıcaklık aralığında birçok hücre içi ve dışı yıkım mekanizmasının aktivasyonuna neden olmaktadır. Hiperterminin hücre içi ve dışı etkileri, tümör bölgesinin sinyal yollarında değişiklik, apoptozun indüklenmesi, tümör dokusunda hipoksi, asidoz ve enerji yoksunluğunu içerir. Ayrıca, hipertermi etkisi ile tümörlü bölgenin

değişen bu özellikleri kemoterapi ve radyoterapi uygulamalarının etkinliğini artırmaktadır [7].



Şekil 2.19. (a) Dıştan-içe hipertermi, (b) içten-dışa hipertermi, RF: radyofrekans, NPTT: nano foto termal terapi, NMH: nano manyetik hipertermi, NaRFA: nano radyofrekans ablasyon, NUH: nano ultrason hipertermi ([3]'dan uyarlanmıştır.)

Geleneksel hipertermi, dış enerji kaynağından (RF, lazer, ultrason vb.) uzaklaştıkça tümörlü dokuda ani bir şekilde düşen bir sıcaklık gradyenti oluşturmaktadır. Enerjinin büyük bir kısmı, tümörlü hedef dokuya ulaşmadan dış kaynak yolunda yer alan sağlıklı dokularda yayılıp harcanmaktadır (Şekil 2.19a, dıştan-içe hipertermi). Bu seçici olmayan ısınma hem tedavi performansını olumsuz yönde etkilemekte hem de yan etkilere yol açabilmektedir. Hipertermi maruziyetinin etkinliği, hedeflenen tümör alanındaki sıcaklık profiline, maruziyet süresine ve kanser hücresinin karakteristiğine bağlı olarak değişmektedir. Daha etkili hipertermi uygulaması için nanopartiküllerin dış bir kaynaktan gelen enerjiyi soğurmaları ve bu enerjinin tümör bölgesine lokal olarak odaklanması düşünülmüştür (Şekil 2.19b, içten-dışa hipertermi). Böylece nanopartiküllerin, lokalize termal yıkım yaparak kollateral dokular üzerindeki etkiyi minimize etmeleri mümkün olmaktadır [3].

2.6.3. Manyetik nano hipertermi

Manyetik nano hipertermi (MNH), manyetik nanopartiküller aracılığıyla alternatif manyetik alan (AMF) maruziyeti altında tümör bölgesinde lokal ısı oluşumuna dayanır. Bu non-invaziv yöntem, tümör hücresinin fizyolojik olarak değişimine ve sonunda apoptoza gitmesine yol açar [157]. Manyetik nanopartiküllerin, manyetik alan altında tümörlü bölgede

lokal hipertermi oluşturmaları; boyutlarına, şekillerine, eş-boyut dağılımlarına, manyetik karakterlerine ve homojenitelerine önemli derecede bağlıdır [158].

Manyetik nanopartikül aracılı hipertermi tedavisi iki yönden avantajlıdır, birincisi manyetik nanopartiküller tümörün fizyolojisinden dolayı (artan geçirgenlik ve tutunma etkisi, EPR) tümörlü bölgede birikir ve bu sayede nanopartiküllerin sağlıklı hücreler üzerindeki hasarları sınırlıdır. İkincisi, manyetik hipertermi tedavisi non-invaziftir, manyetik nanopartiküller cerrahi olarak ulaşılması zor tümörlü bölgelere (özellikle beyin) hedeflendirilerek bu bölgelerde hipertermi etkinliği oluşturulabilir. Manyetik nano hipertermi etkinliği, nanopartiküllerin boyutları, mıknatıslanma ve Curie sıcaklığı gibi parçacık özelliklerinin yanı sıra, maruziyet sisteminin frekansına, alan şiddetine ve tümörlü bölgede ısının dağılım paternine bağlıdır [6, 159]. Demir oksit nanopartiküller (Fe_3O_4) boyuta bağlı manyetik özellikleri, biyouyumlulukları, minimal toksisiteleri, hedef bölgede yüksek birikimleri ve vücut dışına atılım kolaylıkları sebebiyle hipertermi uygulamalarında en çok tercih edilen termal ajanlardır [160].

Manyetik nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilen hipertermi tedavisi, glioblastoma (GBM) tümörleri için henüz FDA tarafından standart tedavi protokolüne dahil edilmemiştir. Ancak, Avrupa'da özellikle Almanya'da GBM hastalarının klinik tedavilerinde kullanılan bir yöntemdir. Demir oksit (manyetit) nanopartiküller kullanılarak manyetik hipertermi uygulaması, GBM tümörlerinde bir adjuvan tedavi olarak Avrupa'da 2012 yılında onaylanmıştır. İlgili tedavide, alternatif manyetik alan uygulaması altında, manyetik nanopartiküller lokal olarak uygulanmaktadır ve standart tedavilere göre hastalarda yedi aylık bir sağkalım artışı görülmektedir [47].

MagForce Nanoteknolojileri firması (Berlin, Almanya) tarafından tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen sistem (Resim 2.1); NanoTherm® aminosilan kaplı manyetit çözelti (12-20 nm), NanoActivator® alternatif manyetik alan sistemi (100 kHz, 18 kA/m) ve NanoPlan® sıcaklık simülasyon yazılım programı olmak üzere üç ana bileşenden oluşmaktadır Bu sistem, cerrahi sonrası nükseden (relapse), ilerleyici (progressive) ve tekrarlayan (recurrent) GBM tümörlerinde ve daha sonradan ise prostat kanseri tedavisinde kullanılmış ve bu çalışmalarda başarılı sonuçlar alınmıştır [150].



Resim 2.1. Alternatif manyetik alan cihazı MFH 300F (MagForce Nanoteknolojileri AG, Berlin, Almanya) [161]

2.6.4. Hipertermi maruziyet sistemleri

Literatürdeki *in vitro/in vivo* çalışmalarda kullanılan hipertermi maruziyet sistemleri Çizelge 2.3'te verilmiştir. Bu çizelgede, maruziyet sistemlerinin fiziksel özellikleri, uygulanan nanopartiküller, elektromanyetik alanı biyolojik malzemeye ileten bobin tipleri (pancake, solenoid) ve hedeflenen hücreler verilmiştir.

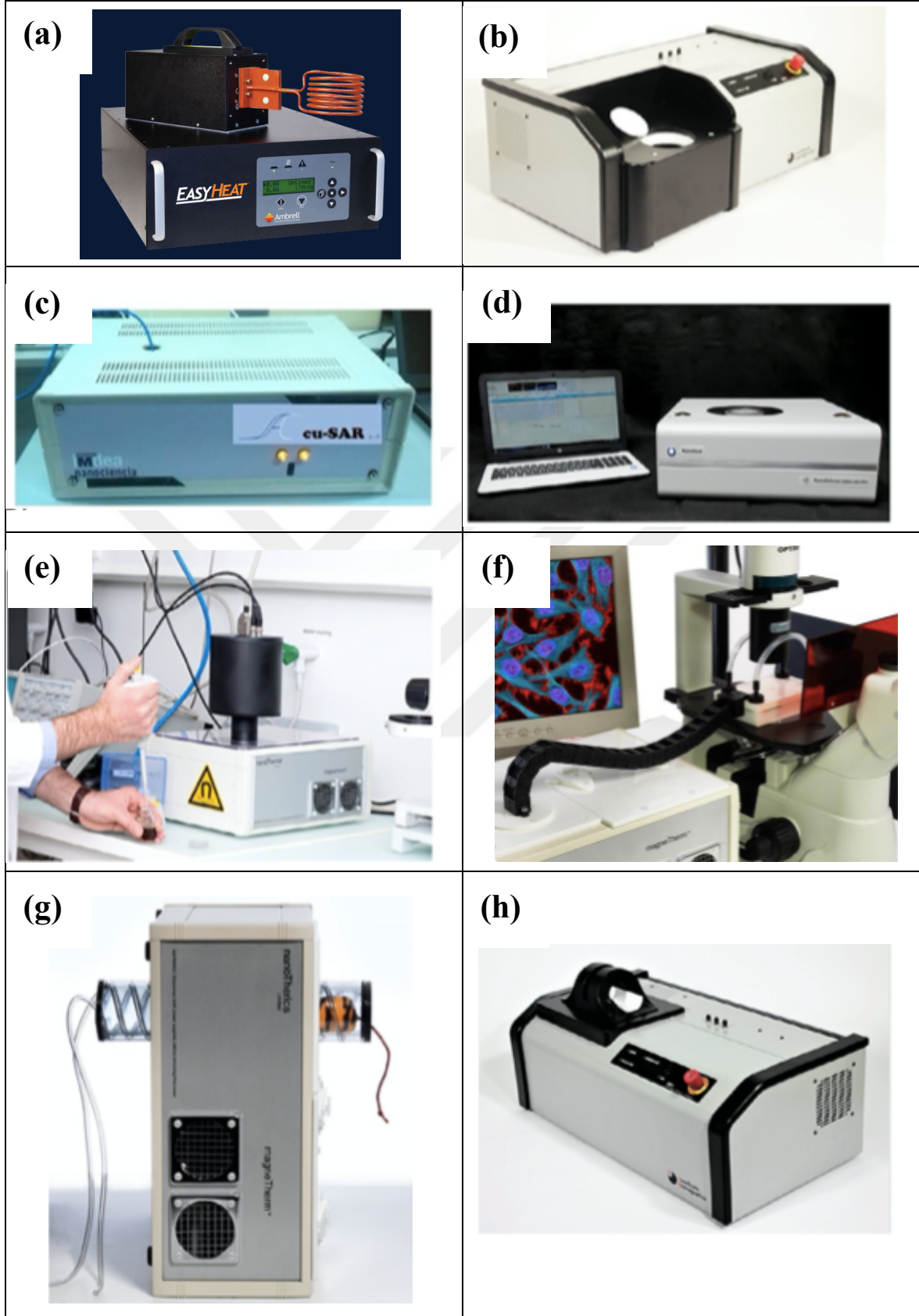
Çizelge 2.3. Hipertermi maruziyet sistem modelleri

Makale	Nanopartikül	Frekans	Manyetik alan şiddeti veya akım	Güç	Maruziyet sistemi	Konumlandırma	Hedef hücre
Chen ve ark. (2014) [162]	Fe ₂ O ₃ +lipid çift tabaka+doksorubisin (magnetoliposom)	170 kHz	250 A	1 kW	Pancake stili bakır yatay bobin	6 gözlü kültür kabı bakır bobin üzerine yerleştirilmiştir.	Hepatosellüler karsinom
Sadhasivam ve ark. (2015) [163]	Karbon kapsüle edilmiş demir oksit nanopartikül	750 kHz	10 Oe= 800 A/m	Max: 5,6 kW	Solenoid	cam şişe solenoid içine yerleştirilmiştir.	İnsan fibroblast ve HeLa hücre hattı
Meenach ve ark. (2010) [7]	Hidrojel nanokompozit içeren manyetik nanopartikül	297 kHz	25 kA/ m		Solenoid (15 mm çapında 5 tur döndürülmüş)	Solenoid üzerine petri kabı konulmuştur.	Glioblastoma hücre hattı
Haghniaz ve ark. (2015) [164]	Dextran kaplı manyetik nanokompozit	365 kHz	700 A	8 kW	Pancake stili bakır yatay bobin	Flask yatay bobin üzerine yerleştirilmiştir.	Melanoma hücre hattı
Raof M. ve Curley A.(2011) [165]	Altın nanopartiküller (AuNPs)	13.56 MHz		0-2 kW	Kanzius RF jeneratörü		Hepatosellüler karsinom

Çizelge 2.3. (devam) Hipertermi maruziyet sistem modelleri

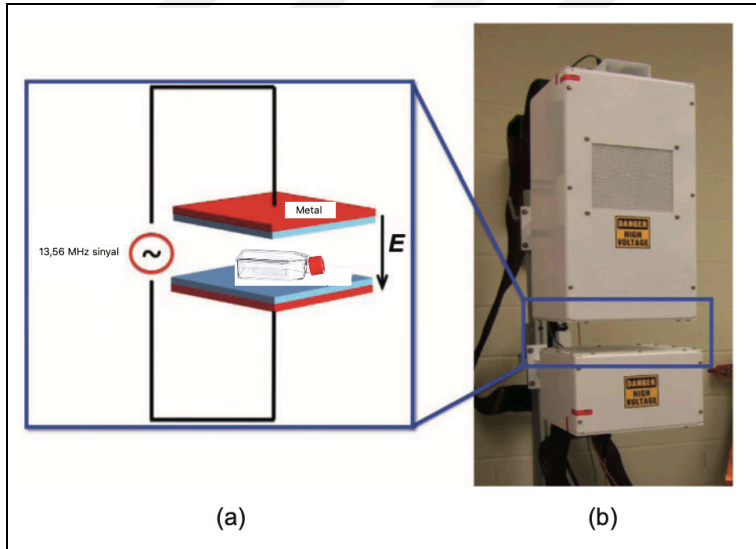
Kim S.K. ve ark. (2015) [166]	Manyetik nanopartikül (Fe_3O_4)	26 MHz		2 kW	Kapasitif RF sistemi		Fantom kullanılmıştır
Du Q. ve ark. (2015) [167]	gelatin/IL@ Fe_3O_4	450 MHz		1.8 W/cm ²			Hepatosellüler karsinom
Raouf M. ve ark. (2013) [168]	Metalik nanopartikül	13.56 MHz		600 W	Kanzius sistem	Fare, alıcı ve verici arasına yerleştirilmiştir.	Hepatosellüler ve pankreatik kanser hücre hatları
Petryk A. ve ark. (2013) [169]	Manyetik nanopartikül	915 MHz	36 kA/m		Bobin	Fare bobin içerisine yerleştirilmiştir.	Fare meme adenokarsinoma (MTGB) hücreleri, fareye enjekte edilmiştir.
Allam, A. A., ve ark. (2013) [170]	Lipid kaplı Fe_3O_4	13.56 MHz	7 mT		Bakır bobin (10 tur, silindirik)	ince duvarlı PCR tüp	
Raouf, M., ve ark. (2012) [171]	Altın nanopartiküller (AuNPs)	13.56 MHz		600 W	Kanzius sistem	Çok gözlü kültür kabı, alıcı ve verici arasında yerleştirilmiştir.	Hepatosellüler karsinom

Resim 2.2'de literatürde kullanılan ticarileşmiş hipertermi cihazları verilmiştir. Literatürde, hipertermi çalışmalarının çoğunda, Ambrell (Easyheat, İngiltere) indüksiyon güç kaynakları kullanılmaktadır (Resim 2.2a) ve bu güç kaynağının 150-400 kHz frekans bandında, 500 watt'dan 10 kilowatt'a değişen güçlere sahip modelleri bulunmaktadır (Ambrell, datasheet). Bu sistem, daha çok *in vitro* çalışmalar için uygundur, *in vivo* çalışmalar için hayvanın yatay pozisyonunda kalması için farklı bobin tasarımları gerektirmektedir. Çevre ile net ısı değişimi olmayan, termal yalıtımlı ve SAR ölçümü yapılabilen hipertermi sistemleri Resim 2.2b (NanoScale, Biomagnetics, İspanya) ve Resim 2.2c'de (IMDEA Nanociencia, İspanya) verilmiştir. Resim 2.2d'de ise (NanoHeat, NanoScience Laboratories, İngiltere) alternatif manyetik alana maruz kalan malzemenin, vakumlu bir tüpe yerleştirilmesi ile hassas SAR ölçümüne ve maruziyet esnasında gerçek zamanlı frekans ölçümüne olanak sağlayan hipertermi sistemi verilmiştir [172]. Resim 2.2e'de kızılötesi (infrared) kamera entegre edilmiş sistemde (Nanolockin, İsviçre) numunenin anlık olarak termal değişimleri yüksek hassasiyetle görüntülenebilmektedir.



Resim 2.2. Ticari olarak kullanılan manyetik hipertermi cihazları [173]

Canlı hücreler için tasarlanmış, hücrelere inkübatör koşullarını sağlayan ve maruziyet esnasında mikroskop altında eşzamanlı-hücre takibinin yapılabildiği tek ticari sistem NanoTherics şirketi (İngiltere) tarafından geliştirilmiştir (Resim 2.2f). Aynı şirket tarafından *in vivo* uygulamalar için de bir hipertermi sistemi tasarlanmıştır (Resim 2.2g). *In vivo* deneyler için diğer bir sistem ise hayvan konumlandırma aparatına sahip NanoScale Biomagnetics (İspanya) şirketi tarafından geliştirilmiş hipertermi sistemidir (Resim 2.2h) [173]. Resim 2.2'de verilen sistemlerde alternatif manyetik alan frekansları 100 kHz-1 MHz aralığında değişmektedir. Daha yüksek radyofrekans (RF) bandında hipertermi maruziyet sistemleri de ticari olarak bulunmaktadır. Bu sistemler içerisinde en popüler olan ve daha çok *in vitro/in vivo* çalışma yapılan 13,56 MHz frekansa sahip 'Kanzius sistemi'dir. Resim 2.3'te kapasitif RF 'Kanzius sistemi' gösterilmiştir. Resim 2.3a'da iki metal plaka (kırmızı) arasına 13,56 MHz RF alan uygulanmış ve metal plakalar, teflon (mavi) yalıtkan malzeme ile kaplanmıştır. Radyofrekans güç kaynağı değişken hava boşluğunda 600 Watt ve 15 kV/m elektrik alan üretmektedir. Resim 2.3b'de üstteki metal kutu plakalar arasında düzgün RF alanları üretmek için yüksek voltajlı empedans uyumlayıcı sistem (matching unit) içermektedir [174].



Resim 2.3. Kapasitif RF maruziyet sistemi (a) diyagramı ve (b) cihazı [174]

Bu tez kapsamında 13,56 MHz frekansta RF alan üreten bir hipertermi maruziyet sistemi üretilmiştir. Üretilen bu sistem ile peptit bağlı etken madde yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerinin hipertermi etkisiyle glioblastoma hücre hattı üzerindeki etkileri *in vitro* deneylerle incelenmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu bölümde, tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda kullanılan gereçler ve yöntemler hakkında ayrıntılı bilgi verilmiştir.

Gereç kısmında, hipertermi maruziyet sistemi üretiminde kullanılan malzemeler ve cihazlar, nanopartikül sentez aşamalarında kullanılan kimyasallar, karakterizasyon işlemlerinde kullanılan cihazlar ve son olarak da hücre kültür çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kitler çizelgeler halinde verilmiştir.

Yöntem kısmı, üç bölümden oluşmaktadır. Birinci bölüm, radyofrekans (RF) alan kaynaklı hipertermi maruziyet sisteminin tasarım ve üretim aşamalarını; RF sinyal jeneratörü, RF osilatör, RF sürücü, RF yükseltici, RF empedans uyumlayıcı, soğutma sistemi, metal kutu ve sıcaklık ölçüm sistemini içerir. Bu bölüm, anlaşılabilirliği artırmak ve akışı sağlamak için şematik çizimler ve bazı ölçüm sonuçları eşliğinde ayrı ayrı başlıklar halinde açıklanmıştır.

İkinci bölüm, nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyon yöntemlerini içermektedir. Bu bölümde; demir oksit nanopartiküllerin sentezi, pegilasyon işlemleri, manyetik PLGA nanopartiküllerin sentezi, TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartikül formülasyon çalışmaları, kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikül sentezi, GRGDS peptit konjugasyonu, ilaç enkapsülasyon ve salım çalışmaları yöntemleri açıklanmıştır. Ayrıca sentezleri gerçekleştirilen ve farklı biyo-aktivite kazandırılan tüm nanopartiküllerin karakterizasyon işlemleri de bu bölümde açıklanmıştır.

Son bölüm, hücre kültür çalışmalarını içermektedir. Bu bölümde, serbest TMZ ve kurkuminin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT testi ile, serbest kurkuminin hücre morfolojilerine etkileri kristal viyole ve Alexa Fluor-DAPI boyama yöntemleri ile belirlenmiştir. Nanopartikül-hücre etkileşimi ve hipertermi deneylerinde, hücre canlılığı üzerine etkiler kalitatif olarak canlı-ölü hücre deney kiti, kantitatif olarak MTT yöntemi, hücrelerin apoptoz ya da nekroz ölüm yollarından hangisi ile ölüme gittiği apoptoz tespit kiti, hücrelerde oluşan oksidatif stres ROS tespit kiti ile belirlenmiştir. Çalışmada gerçekleştirilen tüm hücre kültür yöntemleri ve kit protokolleri detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

3.1. Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Malzemeler

Hipertermi maruziyet sisteminin tasarımında ve üretiminde kullanılan malzemeler ve cihazlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Hipertermi maruziyet sistemi tasarımında ve üretiminde kullanılan malzemeler ve cihazlar

Malzemeler ve Cihazlar	
AN779L 20 watt HF AMP komponent set	RF sinyal jeneratörü (Agilent, HP8648C)
EB104 600 watt HF AMP komponent set	Osiloskop
Düşük kayıplı RG-213 RF Kablo	SWR watt metre
TNC dişi şase tip konnektör (4 adet)	LC metre
SO 239 (UHF dişi şase tip) konnektör (4 adet)	Dummy load
N erkek/UHF erkek konnektör (4 adet)	48 volt güç kaynağı
PL259k konnektör (4 adet)	Flir E6 wifi termal kamera
DC güç kaynağı (8,5A; 12V)	Alümiyum soğutucu blok
RF filtre (2 adet)	Bakır külçe blok
Bakır bobin (5 mm çap)	Termal macun
Cam-elyaf makaron	Variable kondansatör (2 adet)
Fan (soğutucu, 2 adet)	Alümiyum kutu (2 adet)

Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasallar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Markalar
Demir (III) klorür heksahidrat	Sigma Aldrich, Almanya
Demir (II) klorür tetrahidrat	Sigma Aldrich, Almanya
Hidroklorik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Amonyum hidroksit	Merck, Almanya
Oleik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Sodyum oleat	Sigma Aldrich, Almanya
1-Oktadesen	Sigma Aldrich, Almanya
Hekzan	Merck, Almanya
Poli(d,l-laktid-ko-glikolid), laktid:glikolid (50:50), mol. wt. 30 000-60 000	Sigma Aldrich, Almanya
DL-laktid/glikolid ko-polimer (Purasorb PDLG 8531) (85:15)	Corbion, Hollanda
DL-laktid/glikolid ko-polimer (Purasorb PDLG 5010) (50:50) (Mw:90 000)	Corbion, Hollanda
Resomer RG 756 S, Poli(d,l- laktid-ko-glikolid), (75:25), ester terminated, Mw. (76 000-115 000)	Sigma Aldrich, Almanya

Çizelge 3.2. (devam) Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan kimyasallar

Resomer RG 503, Poli(d,l- laktid-ko-glikolid), (50:50), ester terminated, Mw. (24 000-38 000)	Sigma Aldrich, Almanya
Poli(vinil alkol) mol.wt.(89 000-98 000)	Sigma Aldrich, Almanya
Poli(vinil alkol) mol.wt. (145 000)	Fluka, Almanya
Poli(vinil alkol) mol.wt. (30 000-70 000)	Sigma Aldrich, Almanya
N,N dimetil-formamid (DMF)	Merck, Almanya
GRGDS peptit sekansı	GeneCust, Lüksemburg
GRGDS-TMR peptit sekansı	GeneCust, Lüksemburg
Poli(etilen glikol) 2-aminoetil eter asetik asit (Mn 3500)	Sigma Aldrich, Almanya
N-hidroksisüksinimid (NHS)	Sigma Aldrich, Almanya
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC)	Sigma Aldrich, Almanya
Temozolomide (TMZ-T2577)	Sigma Aldrich, Almanya
D-alfa-tokoferol polietilen glikol 1000 suksinat (TPGS)	Sigma Aldrich, Almanya
Metanol	Merck, Almanya
Kurkumin (C1386-%65)	Sigma Aldrich, Almanya
MES sodyum tuzu	Sigma Aldrich, Almanya
Asetonitril	Sigma Aldrich, Almanya
Stearik asit	Sigma Aldrich, Almanya
Asetik asit	Merck, Almanya
Diklorometan (DCM)	Sigma Aldrich, Almanya
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Mutlak etanol	Isolab, Almanya
Mutlak metanol	Isolab, Almanya

Sentezlenen demir oksit ve manyetik PLGA nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılan cihazlar Çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. Karakterizasyon için kullanılan cihazlar

Cihazlar	Markalar
Yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM)	FEI Tecnai G2 Spirit Biotwin CTEM
Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	Quanta 400F Field Emission SEM
X-ışını toz kırınım difraktometresi (XRD)	Rigaku D-Max B diffractometer
Örnek titreşimli manyetometre (VSM)	Quantum Design PPMS
Zeta sizer (DLS)	Zeta sizer Nano-ZS, Malvern
Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrometresi (FTIR)	Nicolet iS10 FT-IR
Termogravimetri/diferansiyel termal analiz cihazı (TG/DTA)	TG/DTA 6300, Seiko

Çizelge 3.3. Karakterizasyon için kullanılan cihazlar

Nükleer manyetik rezonans ($^1\text{H-NMR}$)	AV 400 NMR
Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)	Dionex UltiMate 3000 Standard Systems
Büyükölçek ayırma kromatografisi (GPC)	Malvern, Omnisec GPC/SEC System
Floresan spektrofotometre	Cary Eclipse, Agilent
Nanodrop	Thermo 2000c

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kitler Çizelge 3.4’te verilmiştir.

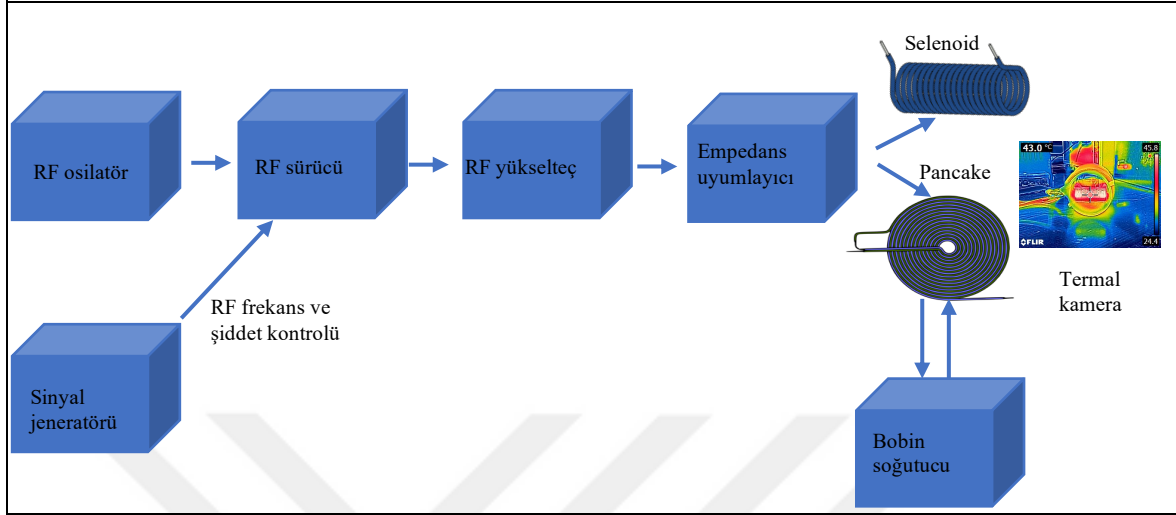
Çizelge 3.4. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasallar-Kitler	Markalar
DMEM F12	Multicell, Wisent Inc, Kanada
RPMI 1640	Capricorn, Almanya
L-glutamin	Biowest, Fransa
Penisilin-streptomisin	EuroClone, İtalya
Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, Almanya
Fetal sıgır serumu (FBS)	Capricorn, Almanya
Sığır serum albümin (BSA)	Sigma Aldrich, Almanya
İzopropanol	Sigma Aldrich, Almanya
Aseton	Sigma Aldrich, Almanya
Kristal viyole	BDH, İngiltere
DAPI	Sigma Aldrich, Almanya
Alexa fluor 488	Thermo Fischer, ABD
Triton X-100	Sigma Aldrich, Almanya
DMSO (dimetilsülfoksit)	AppliChem, Almanya
MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür)	Sigma Aldrich, Almanya
Dulbecco’s steril fosfat tampon çözeltisi (DPBS)	Hyclone, ABD
Paraformaldehit	Merck, Almanya
Anneksin V-FITC apoptoz tespit kiti	Biovision, ABD
Canlı/ölü hücre canlılık kiti	Biovision, ABD
Reaktif oksijen türleri tespit kiti	Biovision, ABD

3.2. Hipertermi Maruziyet Sisteminin Tasarımı ve Üretimi

Hipertermi maruziyet sistemi; radyofrekans (RF) sinyal jeneratörü, RF osilatör, RF sürücü (driver), RF yükseltici (amplifier), RF empedans uyumlayıcı (matching unit), soğutma

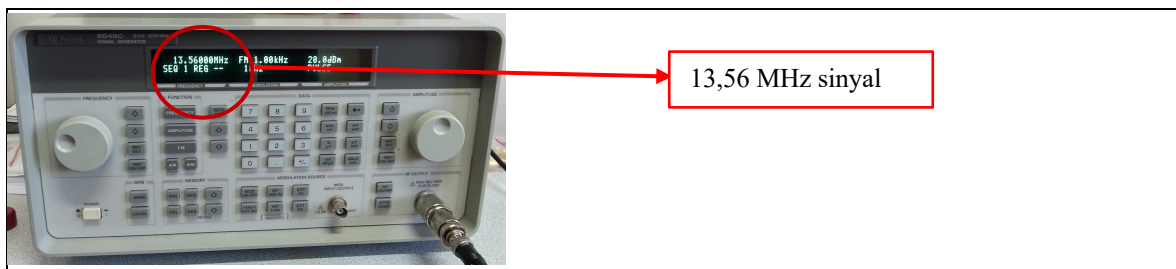
sistemi, metal kutu ve sıcaklık ölçüm sisteminden oluşmaktadır (Şekil 3.1). Bu bileşenler aşağıda sırasıyla açıklanmıştır.



Şekil 3.1. Hipertermi maruziyet sisteminin şematik gösterimi

3.2.1. Radyofrekans sinyal jeneratörü

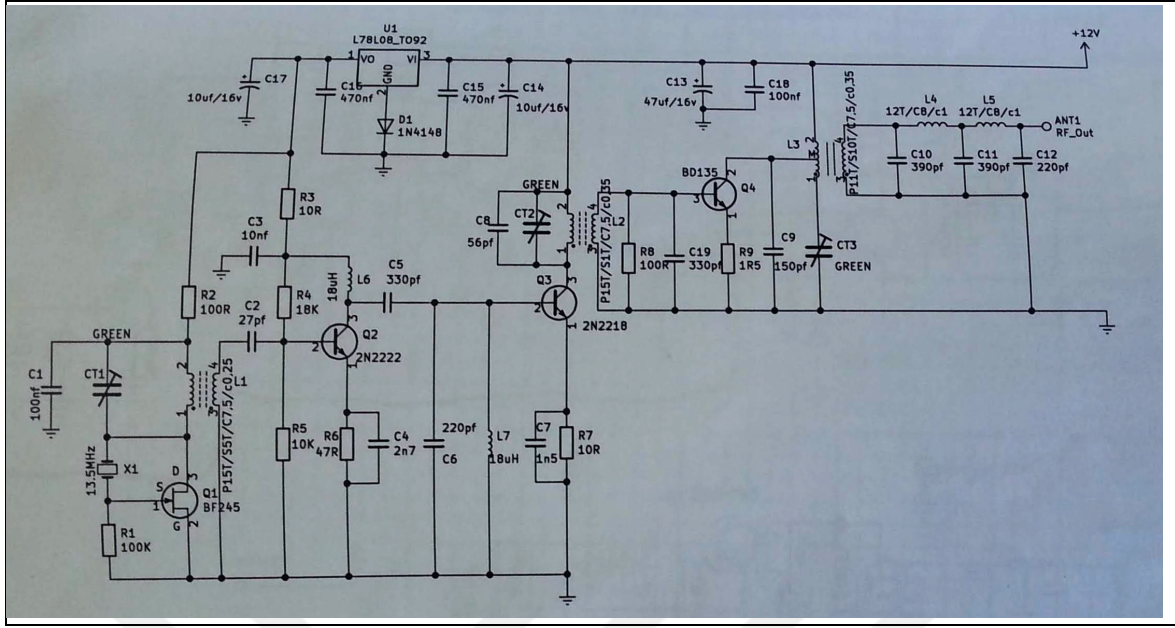
Radyofrekans sürücüye, kontrollü frekans ve şiddette elektromanyetik sinyal iletebilmek için 9 kHz-3,2 GHz frekans aralığında çalışan RF sinyal jeneratörü (Agilent Technologies HP 8648C) kullanılmıştır (Resim 3.1). Radyofrekans sinyal jeneratörü ile 13,56 MHz frekansında sinyal, RF sürücüye kontrollü olarak verilmiştir.



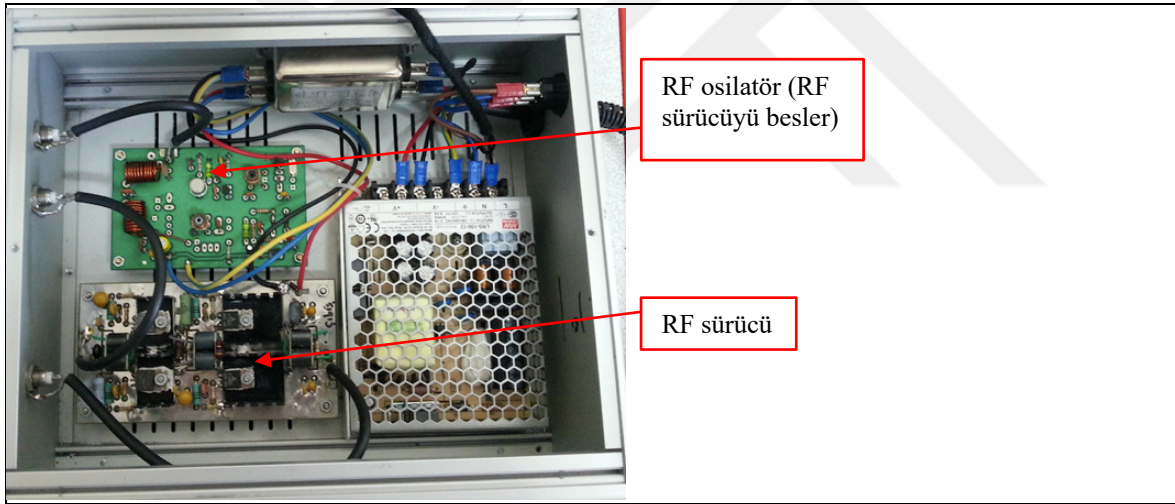
Resim 3.1. RF sinyal jeneratöründen üretilen 13,56 MHz sinyal

3.2.2. Radyofrekans osilatör

Radyofrekans sürücü devresi, RF sinyal jeneratörü ile kontrollü olarak test edildikten sonra, geliştirilen maruziyet sisteminin taşınabilirliği ve ergonomisi açısından, sinyal jeneratörünün yerine RF osilatör devresi çizilmiştir (Resim 3.2) ve sisteme entegrasyonu yapılmıştır (Resim 3.3).



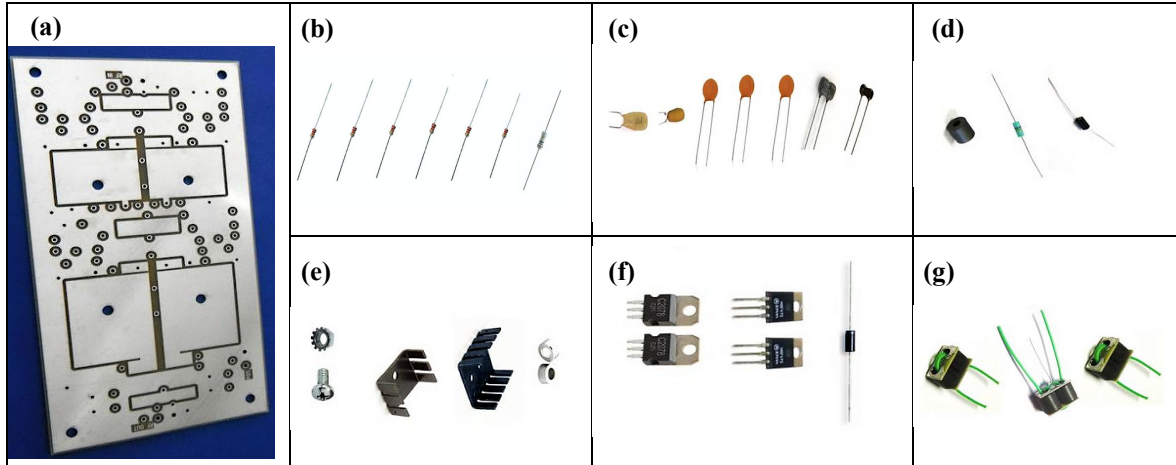
Resim 3.2. (a) RF osilatör devre çizimi



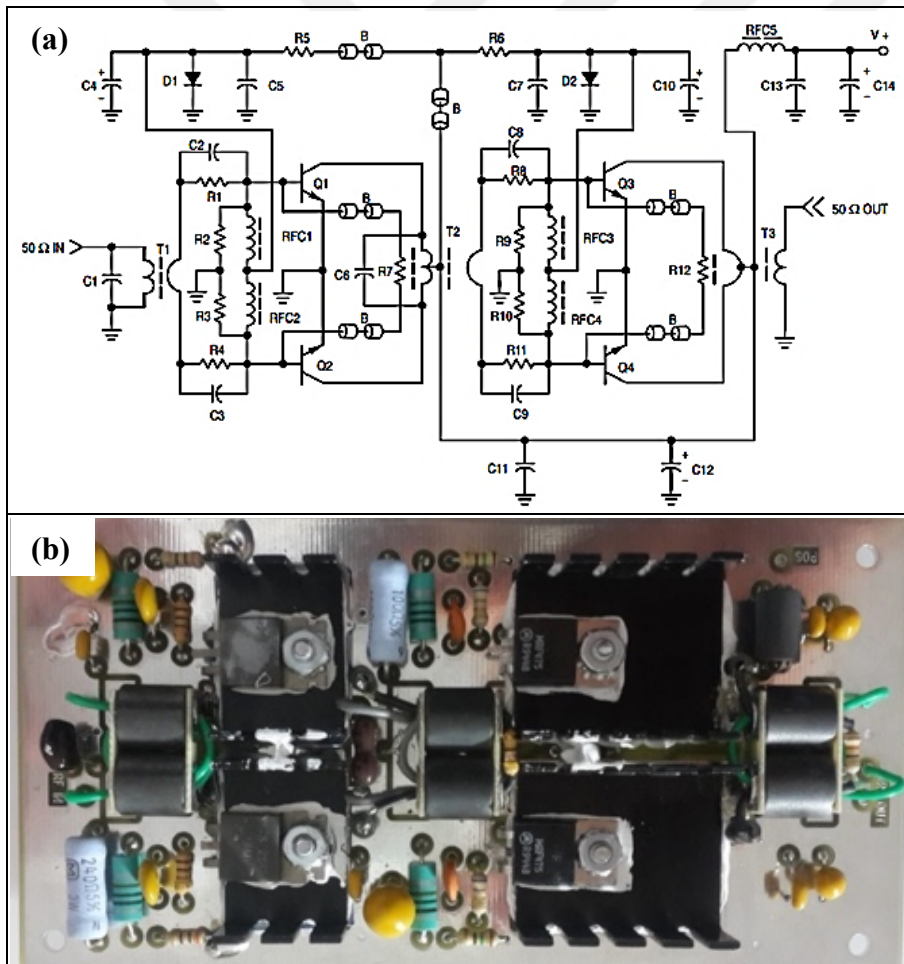
Resim 3.3. RF osilatörün sisteme entegrasyonu ve kutulanması

3.2.3. Radyofrekans sürücü (RF driver)

Radyofrekans sürücü, RF osilatörden aldığı sinyali bir miktar yükselterek RF yükselteç devresine iletmekle sorumludur. Motorola firmasının tasarımı olan kit halindeki devre, “Communication Concepts Inc.” firmasından demonte olarak satın alınmıştır. Resim 3.4’te satın alınan devre elemanları, Resim 3.5’te devre elemanlarının montajının yapıldığı devre şeması ve montajı yapılan RF sürücü gösterilmiştir.



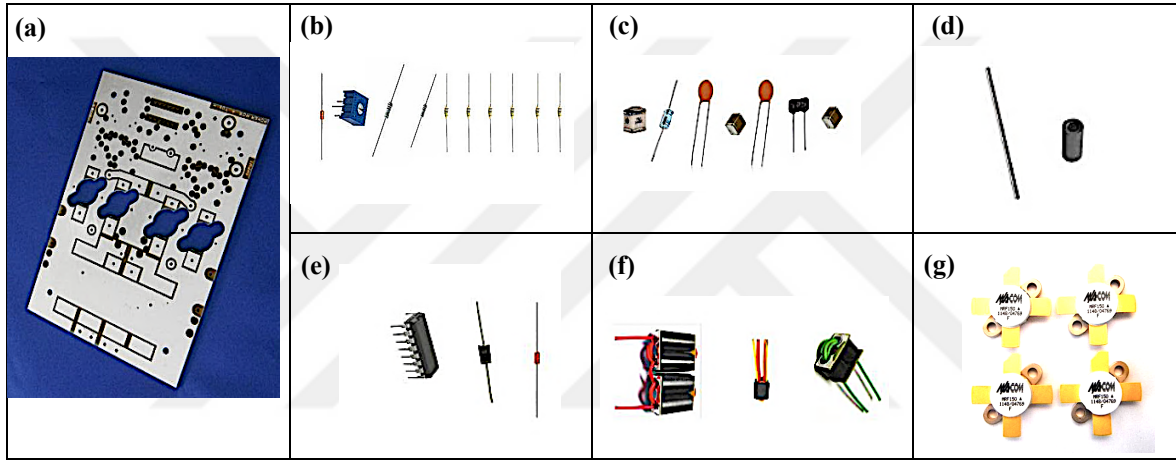
Resim 3.4. AN779L RF sürücü demonte devre elemanları, (a) baskı devre kartı, (b) dirençler, (c) kapasitörler, (d) diyotlar ve demir boncuklar, (e) soğutucu plakalar ve vidalar, (f) yarı iletken transistörler ve (g) empedans transformatörleri



Resim 3.5. (a) AN779L RF sürücü devre şeması, (b) devre şemasına göre lehimli ve montajı yapılan RF sürücü

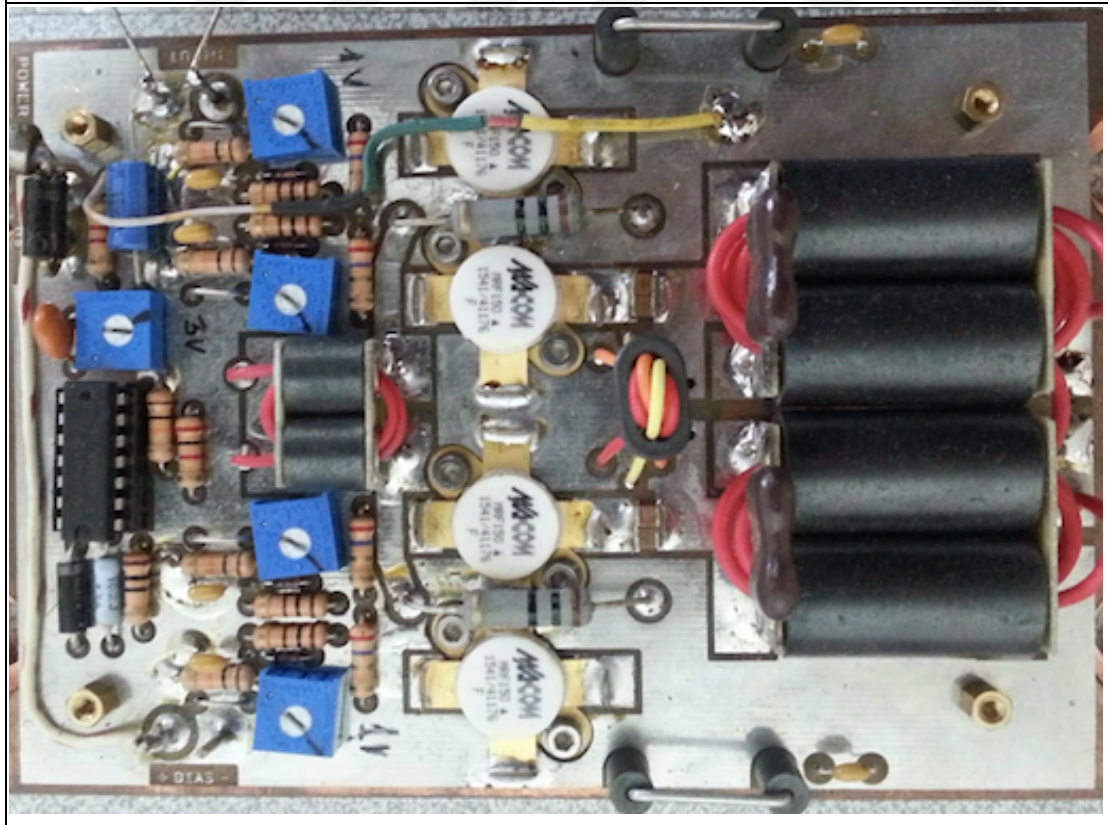
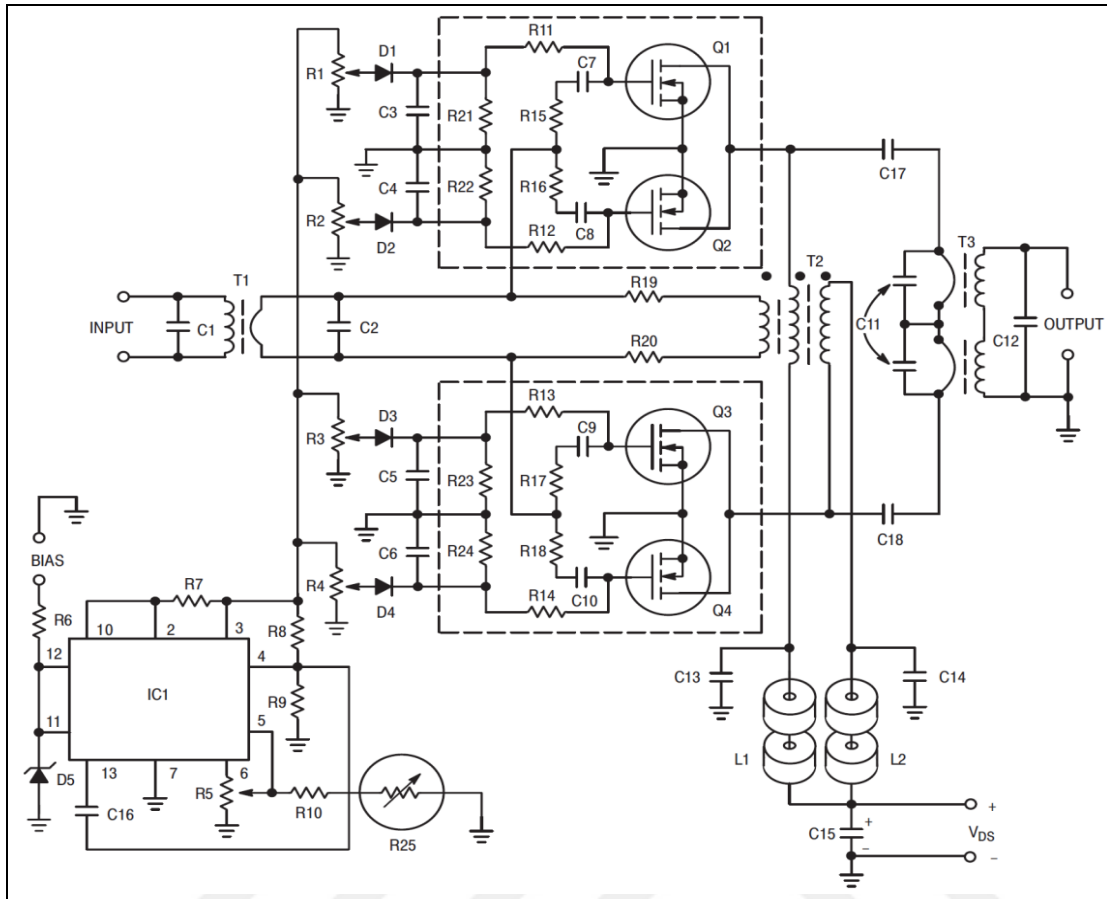
3.2.4. Radyofrekans yükselteç (RF amplifier)

Radyofrekans yükselteç, güç basamağının son katı olup, istenilen en son güç bu devrenin çıkışıyla elde edilir. Sürücünden aldığı sinyali istenilen güç değerine (max. 400 watt test edilmiştir) yükselterek empedans uyumlayıcıya (matching unit) iletir, hipertermi maruziyet sisteminden hücrelere verilen elektromanyetik alan son olarak bu devreden çıkan güçteki RF alanıdır. Motorola firmasının tasarımı olan kit halindeki devre, “Communication Concepts Inc.” firmasından demonte olarak satın alınmıştır. Resim 3.6 'da EB104 RF yükseltici devre elemanları demonte halde verilmiştir.



Resim 3.6. EB104 RF yükseltici demonte devre elemanları, (a) baskı devre kartı, (b) dirençler ve trim değişken dirençler, (c) seramik çip ve disk kapasitörler, (d) ferrit boncuk ve çubuklar, (e) diyot, zener diyot ve voltaj regülatörü, (f) transformatörler ve (g) yarı iletken mosfet transistörler

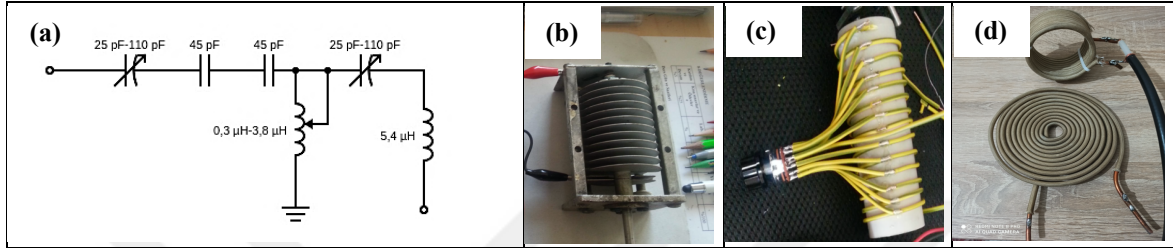
Resim 3.7a'da devre elemanlarının montajının yapıldığı devre şeması, Resim 3.7b'de ise lehimlenmiş ve montajı bitmiş RF yükseltici devresi verilmiştir.



Resim 3.7. (a) EB104 RF yükseltici devre şeması ve (b) devre şemasına göre lehimli ve montajı yapılan RF yükseltici

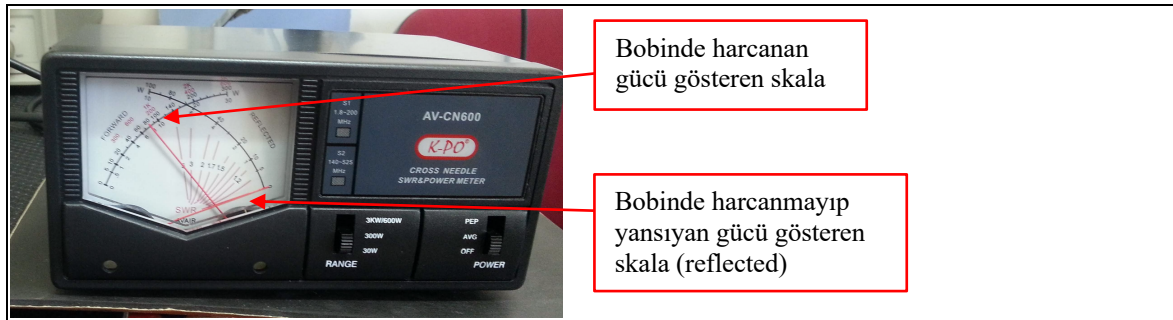
3.2.5. Empedans uyumlayıcı (matching unit) tasarımı ve yapımı

Çalışmanın bu aşamasında, RF yükselteçten elde edilen sinyallerin geri yansımaları (reflected power) ile devrelerin zarar görmemesi ve değerlerin sağlıklı ölçülebilmesi için empedans uyumlayıcı tasarlanmış ve üretimi gerçekleştirilmiştir. Empedans uyumlayıcı devre şeması ve kullanılan malzemeler Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. (a) Empedans uyumlayıcı devre şeması, (b) variable (ayarlı) kondansatör, (c) empedans uyumlayıcı bobin, (d) pancake ve selenoid bobin

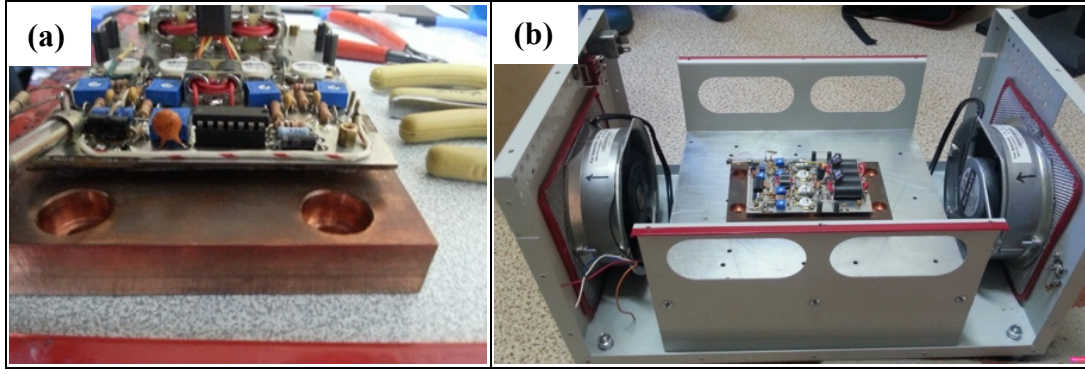
Hücrelere, RF alan maruziyeti bobinler (Şekil 3.2d) aracılığı ile gerçekleştirilmiştir. Bu bobinlerde oluşan veya bobinlerde harcanmayıp yansıyan RF dalgaları SWR-watt metre ile ölçülmüştür (Resim 3.8).



Resim 3.8. SWR-watt metre (çift ibreli)

3.2.6. Soğutma sistemi

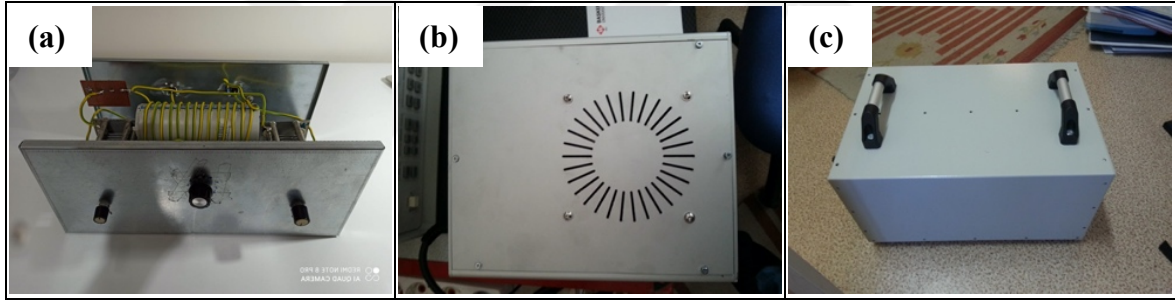
Radyofrekans güç devrelerinde üretilen gücün büyük bir bölümü ısıya dönüşür. Yüksek güçlerde çalışan sistemlerde oluşan ısı oldukça önemli bir sorundur. Radyofrekans yükselteç devresi bir külçe bakır (Resim 3.9a) üzerine yerleştirilmiş daha sonra bu bakır plaka da termal macun ile alüminyum soğutucuya monte edilmiştir (Resim 3.9b). Güç katında soğutma önemli bir problem olduğundan metal kutu içine iki fan yerleştirilmiştir.



Resim 3.9. (a) Bakır külçe soğutucu, (b) alüminyum soğutucu ve fanlar

3.2.7. Metal kutu

Elektronik cihazlarda parazit oluşumunu ve/veya çalışanın etkilenmesini önlemek amacıyla elektromanyetik alan yalıtımı için metal kutular üretilmiştir (Resim 3.10).



Resim 3.10. (a) empedans uyumlayıcı, (b) RF sürücü ve (c) tüm sistem için metal kutular

3.2.8. Sıcaklık ölçüm sistemi

Hipertermi maruziyeti altında hücrelerin ve RF sistemlerinin sıcaklıkları, termal kamera (Flir E6, İsveç) kullanılarak ölçülmüştür (Resim 3.11).

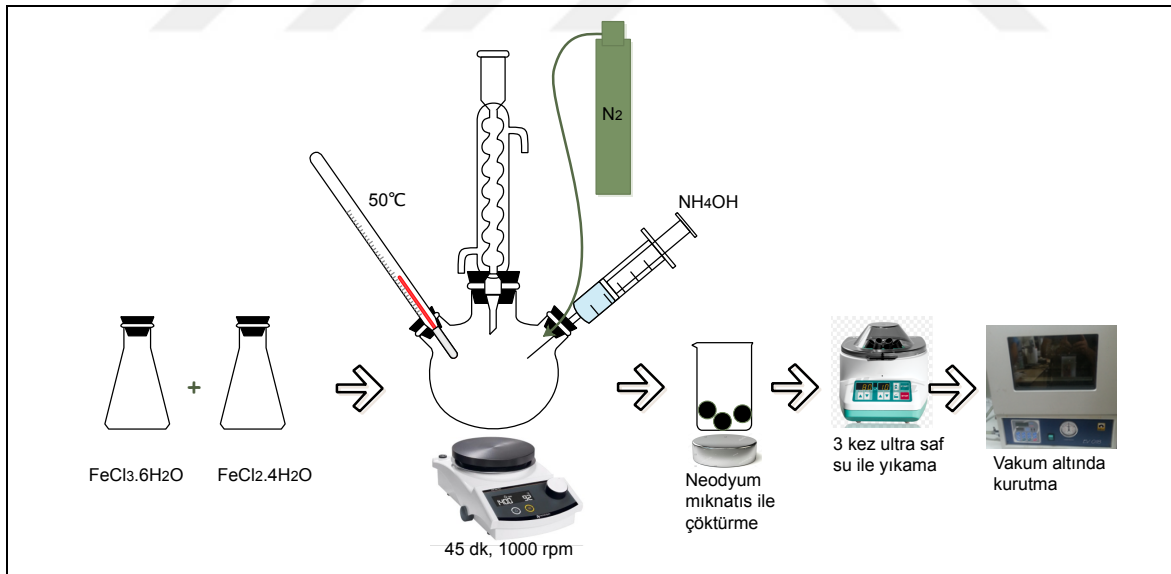


Resim 3.11. Flir E6 termal kamera

3.3. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartikül (SPDON) sentezi

3.3.1. İkili çöktürme yöntemi ile SPDON sentezi

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar) klasik ve yaygın bir yöntem olan ikili çöktürme yöntemi (co-precipitation) ile sentezlenmiştir [175, 176]. Yüz mL ultra saf su azot gazı ile 30 dk yıkanmıştır. Demir (III) klorür (8 mL; 2,162 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) ultra saf su içinde, demir (II) klorür (2 mL; 0,793 g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2 M HCl) 1,67 mL ultra saf su ve 0,33 mL HCl içerisinde manyetik karıştırıcı ile çözelti haline getirilmiştir. Azot ile yıkanmış ultra saf su üç boyunlu balon jojeye aktararak sıcaklık 50°C 'ye çıkarılmıştır. Ardından, demir (III) klorür ve demir (II) klorür çözeltileri balon jojeye aktarılmış ve bu çözelti 50°C , 1000 rpm'de, 15 dk karıştırılmıştır. Karışım esnasında reaksiyon ortamına damla damla amonyum hidroksit (NH_4OH ; 5,3 mL; 0,7 M) eklenmiş ve 30 dk daha karıştırma işlemi devam ettirilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında, demir oksit çökelti, çözelti ortamından neodyum mıknatıs yardımıyla uzaklaştırılmıştır ve ultra saf su ile üç kez yıkanarak karakterizasyon işlemleri için vakum altında kurutulmuştur (Şekil 3.3).

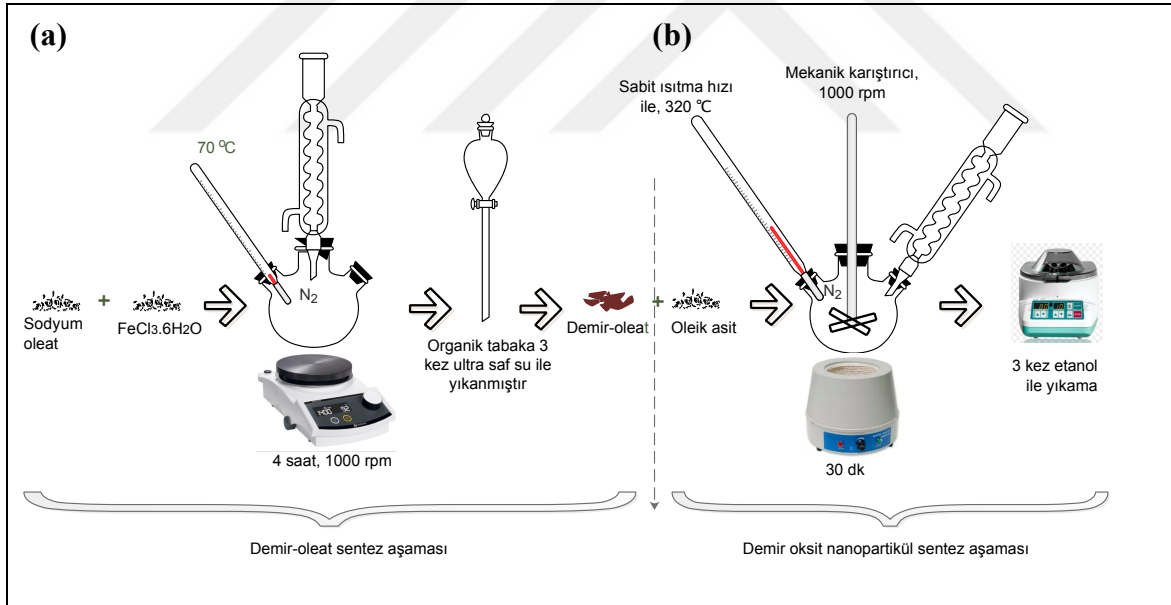


Şekil 3.3. İkili çöktürme yöntemi ile demir oksit nanopartiküllerin sentez şeması

Elde edilen SPDON'ların yüzeyleri oleik asit (OA) ile modifiye edilmiştir. Bu işlem için yukarıda açıklanan sentez yönteminde, amonyak çözeltisi eklendikten sonra reaksiyon ortamına belirlenen derişimlerde oleik asit (%0,2; %0,5; %1, hacim/hacim (h/h)) damla damla eklenmiş ve çözelti 30 dk karıştırılmıştır. Reaksiyon sonunda, yüzeyleri OA ile kaplanmış SPDON'lar, üçer kez sırasıyla saf su ve %70'lik etanol ile yıkanmıştır.

3.3.2. Termal ayrıştırma yöntemi ile SPDON sentezi

Termal ayrıştırma yöntemi ile SPDON sentezi iki aşamadan oluşmaktadır (Şekil 3.4). Birinci aşamada, sodyum-oleat ve demir (III) klorür tepkimesiyle demir-oleat oluşumu gerçekleşir, ikinci aşamada ise oluşan bu demir-oleat bileşiğinin yüksek kaynama noktalı organik çözücünde termal olarak ayrışmasıyla demir oksit nanopartiküller elde edilir [125]. Demir-oleat kompleksi; 10,8 g demir klorür ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 40 mmol, %98) ve 36,5 g sodyum oleat (120 mmol, %95), 80 mL etanol, 60 mL distile su ve 140 mL hekzan içeren karışımda çözülmüştür. Elde edilen çözeltinin sıcaklığı 70°C 'ye çıkarılarak 4 saat bu sıcaklıkta reaksiyona izin verilmiştir. Reaksiyon tamamlandığında, demir-oleat kompleksini içeren üstteki organik tabaka, bir ayırma hunisi kullanılarak 3 kez 30 mL ultra saf su ile yıkanmıştır. Yıkama sonrası hekzan uzaklaştırılarak demir-oleat kompleksi balmumu kıvamında bir yapıda elde edilmiştir (Şekil 3.4a). Sentezlenen demir-oleat kompleksi, eş boyut dağılımlı demir oksit nanopartikül sentezinde kullanılmıştır.

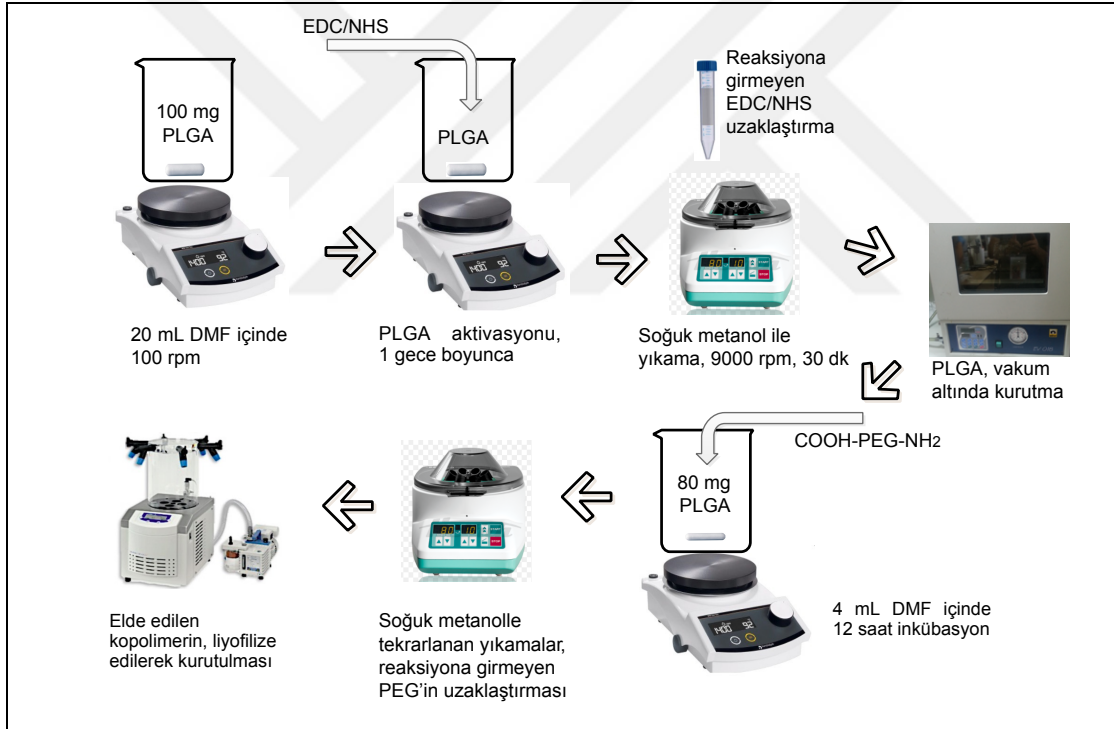


Şekil 3.4. Termal ayrıştırma yöntemi ile (a) demir oleat, (b) SPDON sentez şeması

Demir oksit nanopartiküllerin sentezinde, 36,0 g (40 mmol) demir-oleat kompleksi ve 5,7 g oleik asit (20 mmol, %90), 200 g 1-oktadesen (%90) içerisinde oda sıcaklığında çözülmüştür. Çözelti, sabit ısıtma hızı ile 320°C 'ye çıkarılmış ve 30 dk boyunca bu sıcaklıkta tutulmuştur. Reaksiyon sıcaklığı 320°C 'ye çıktığında çözeltinin başlangıçtaki şeffaf görüntüsü siyah renge dönüşmüştür. Nanopartikülleri içeren çözelti, oda sıcaklığına soğutulmuş ve SPDON'lar 3 kez etanol ile yıkanmıştır (Şekil 3.4b).

3.4. PLGA-b-PEG Kopolimer Sentezi

Poli(laktik-ko-glikolik asit, PLGA)-poli(etilen glikol, PEG) di-blok kopolimeri aşağıda belirtilen yöntemle göre sentezlenmiştir [142]. Yüz mg PLGA, 20 mL dimetilformamid (DMF) içinde 100 rpm'de karıştırılarak çözülmüştür. Bu çözeltiye, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-karbodiimid (EDC) ve N-hidroksisüksinimid (NHS) derişimleri sırasıyla 1198,3 μM ve 1172,3 μM olacak miktarda eklenmiş ve PLGA polimerinin aktivasyonu oda sıcaklığında gece boyunca devam ettirilmiştir. Aktive olan PLGA polimeri soğuk metanol kullanılarak 9000 rpm, $+4^\circ\text{C}$ ve 30 dk santrifüj işlemi ile çöktürülmüştür. Reaksiyona girmeyen EDC/NHS soğuk metanol ile tekrarlanan yıkamalar sonucu ortamdan uzaklaştırılmış ve aktive edilen PLGA vakum altında kurutulmuştur (Şekil 3.5).

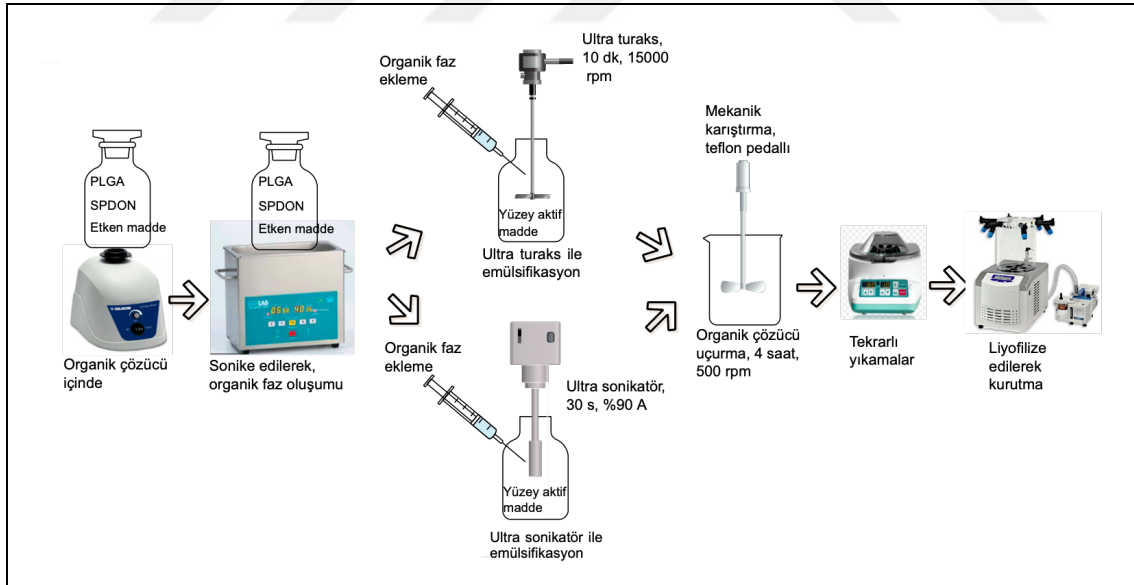


Şekil 3.5. Poli(laktik-ko-glikolik asit)-poli(etilen glikol) di-blok kopolimerin sentez şeması

Elde edilen 80 mg PLGA, 4 mL DMF içerisinde çözülmüş ve bu çözeltiye 26,6 μM hetero iki fonksiyonlu PEG (COOH-PEG-NH₂) eklenmiştir. Elde edilen karışım, 12 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Di-blok kopolimer (PLGA-CO-NH-PEG-COOH), soğuk metanol kullanılarak çöktürülmüş ve reaksiyona girmeyen PEG tekrarlı yıkamalar ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen di-blok kopolimer liyofilize edilerek kurutulmuş ve gerçekleştirilen sentezin başarısı ATR-FTIR ve ¹H-NMR ile belirlenmiştir.

3.5. Temozolomid Yüklü manyetik PLGA Nanopartiküllerin Formülasyon Çalışmaları

Bu çalışmada, tüm polimerik nanopartiküller PLGA-b-PEG polimeri ile sentezlenmiştir. Bu aşamadan sonra yazılan tüm PLGA'lar, PLGA-b-PEG polimerini ifade etmektedir. Temozolomid (TMZ) yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir [135, 142, 177]. Optimum sentez formülasyonunu belirlemek için sentezde kullanılan değişkenler ve miktarları (derişim, oran, vs.) Çizelge 3.5'te verilmiştir. Bu nedenle, aşağıda açıklanan sentez yönteminde, kullanılan miktarlar aralık olarak verilmiştir. Poli(laktik-ko-glikolik asit) (10-50 mg) ve TMZ (1-5 mg), organik çözücü içerisinde (DCM) şeffaf görünüm elde edilene kadar vortekslenerek çözülmüştür. Polimerik ilaç karışımına belirlenen miktarlarda (1-25 mg) SPDON eklenerek çözelti sonike edilmiş ve organik faz oluşturulmuştur. Elde edilen organik faz, poli(vinil alkol) (PVA; %0,2-3; kütle/hacim(k/h)) sulu çözeltisine damla damla ilave edilmiştir. Çözelti, homojenizatör (ultra turaks: 10 dk, 15 000 rpm veya ultra sonikatör: 30 s, %90A) kullanılarak emülsifiye edilmiştir.



Şekil 3.6. Tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemine göre sentezlenen TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin genel sentez şeması

Elde edilen emülsiyon, 4 saat oda sıcaklığında mekanik olarak karıştırılarak organik çözücü buharlaştırılmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyinde kalan safsızlıklar ve yüklenmemiş TMZ tekrarlı yıkamalar (ultra saf su) ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Elde edilen nanopartiküller önce -80'de dondurulmuş daha sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur (Şekil 3.6).

Çizelge 3.5'te F1-F6 formülasyon aralığında TMZ miktarı, dilüsyon fazı, emülsifikasyon güç kaynağı, SPDON miktarı, organik:su fazı oranları sırasıyla değiştirilmiştir; F7-F8 kodlu sentezlerde su fazının TMZ ile doygun hale getirilmesi, F9-F13 aralığı organik faza stearik veya asetik asit eklenmesi, F14-F26 formülasyon aralığında ise farklı molekül ağırlıklı PLGA ve PVA kombinasyonları kullanılarak sentezler gerçekleştirilmiştir. Çizelge 3.5'te verilen formülasyonlarda, değiştirilen parametrelerin gerekçeleri ve enkapsülasyon verimleri Bölüm 4.5.4'te ayrıntılı incelendiği için burada sadece değiştirilen parametrelerle ilgili özet bilgi verilmiştir.

Çizelge 3.5. Temozolomid (TMZ) yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin formülasyon parametreleri ve miktarları

Kod	PLGA (mg), (laktik:glisolik), (Mw)	TMZ (mg)	SPDON (mg)	Organik faz:su fazı:dilüsyon fazı	Organik faza eklenen asit (PLGA:asit) oranı	Su fazı PVA (%k/h), (Mw)	Su fazına eklenen TMZ (mg)	Dilüsyon fazı PVA (%k/h)	Emülsifikas yon güç kaynağı
F1	50, (50:50), (30 000-60 000)	2	25	4:4:50	--	3, (30 000-70 000)	--	0,3	Ultra sonikatör
F2	50, (50:50), (30 000-60 000)	5	25	4:4:50	--	3, (30 000-70 000)	--	0,3	Ultra sonikatör
F3	50, (50:50), (30 000-60 000)	5	25	4:50	--	2, (30 000-70 000)	--	--	Ultra sonikatör
F4	50, (50:50), (30 000-60 000)	2.5	25	4:4	--	1, (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F5	50, (50:50), (30 000-60 000)	2.5	5	3: 6	--	1, (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F6	50, (50:50), (30 000-60 000)	2.5	5	3:15	--	1, (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F7	50, (50:50), (30 000-60 000)	2.5	5	3:6	--	1, (30 000-70 000)	2	--	Ultra turrax
F8	50, (50:50), (30 000-60 000)	2.5	5	3:15	--	1, (30 000-70 000)	5	--	Ultra turrax
F9	50, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:20	--	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F10	50, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:20	Stearik asit(9:1)	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F11	50, (50:50), (30 000-60 000))	1	1	2:20	Asetik asit(9,5:0,5)	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F12	50, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:20	Asetik asit(9:1)	0,2; (30-70 000)	--	--	Ultra turrax
F13	50, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:20	Asetik asit(8:2)	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F14	10, (50:50), (24 000-38 000)	1	1	1:5	--	0,2; (145 000)	--	--	Ultra turrax
F15	10, (50:50), (24 000-38 000)	1	1	2:20	--	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F16	10, (75:25), (76 000-115 000)	1	1	2:20	--	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F17	10, (85:15)	1	1	2:20	--	0,2; (30 000-70 000)	--	--	Ultra turrax
F18	10, (85:15)	1	1	2:6:10	--	1, (30 000-70 000)	--	0,1	Ultra turrax
F19	10, (85:15)	1	1	2:6:10	--	1, (89 000-98 000)	--	0,1	Ultra turrax
F20	10, (85:15)	1	1	2:6:10	--	1, (145 000)	--	0,1	Ultra turrax

Çizelge 3.5. (devam) Temozolomid (TMZ) yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin formülasyon parametreleri ve miktarları

F21	10, (50:50), (90 000)	1	1	2:6:10	--	1, (30 000-70 000)	--	0,1	Ultra turrax
F22	10, (50:50), (90 000)	1	1	2:6:10	--	1, (89 000-98 000)	--	0,1	Ultra turrax
F23	10, (50:50), (90 000)	1	1	2:6:10	--	1, (145 000)	--	0,1	Ultra turrax
F24	10, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:6:10	--	1, (30 000-70 000)	--	0,1	Ultra turrax
F25	10, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:6:10	--	1, (89 000-98 000)	--	0,1	Ultra turrax
F26	10, (50:50), (30 000-60 000)	1	1	2:6:10	--	1, (145 000)	--	0,1	Ultra turrax

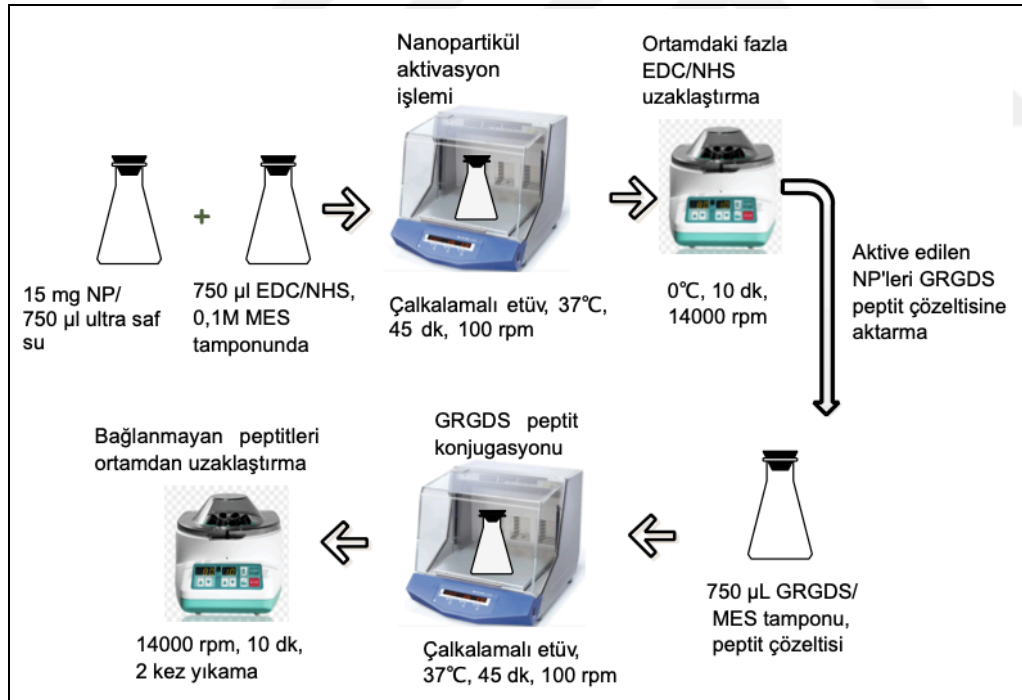
3.6. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA Nanopartiküllerin Sentezi

Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemine göre sentezlenmiştir. Yirmi mg PLGA (50:50, Mw: 30 000-60 000) ve 8 mg kurkumin, 4 ml DCM içinde vortekslenerek çözülmüştür. Polimerik ilaç çözeltisine 2 mg SPDON eklenmiş ve bu karışım sonike edilerek organik faz oluşturulmuştur. Elde edilen organik faz, 20 mL %1 (a/h) PVA (Mw: 30 000-70 000) sulu çözeltisine karışım esnasında damla damla aktarılmıştır. Çözelti ultra turaks (IKA-T25, Almanya) kullanılarak (10 dk, 15 000 rpm) emülsifiye edilmiştir. Elde edilen emülsiyon, 4 saat oda sıcaklığında teflon (PTFE) karıştırıcı ile mekanik olarak karıştırılarak organik çözücü buharlaştırılmıştır. Nanopartiküllerin yüzeyinde kalan safsızlıklar ve yüklenmemiş kurkumin ultra saf su ile tekrarlı yıkamalar sonucu ortamdan uzaklaştırılmıştır. Nanopartiküller önce -80°C’de dondurulmuş ve daha sonra liyofilize edilerek kurutulmuştur.

3.7. Manyetik PLGA NP Yüzeyine Glisin-Arjinin-Glisin-Aspartik Asit-Serin (GRGDS) ve karboksitetrametilrodamin (TAMRA) İşaretli Peptitlerin bağlanması

Tez kapsamında kullanılan peptit molekülleri standart Fmoc kimyası kullanılarak otomatik peptit sentez cihazı ile GeneCust (Lüksemburg) firması tarafından sentezlenmiştir. Kullanılan peptit moleküllerinin kimyasal yapıları, fibronektin yapışma sekansı olan arjinin-glisin-aspartik asit-serin (RGDS) sekanslarını içerecek şekilde tasarlanmıştır [178]. Bu peptitler, kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin yüzeylerine kovalent olarak bağlanmıştır. Kimyasal bağlanma işleminde moleküle serbestlik kazandırması için RGDS peptit yapısına 1 adet glisin amino asidi eklenmiş ve çalışmalarda NH₂-GRGDS-COOH

amino asit sekansı kullanılmıştır. Ayrıca, TAMRA floresan işaretli GRGDS (GRGDS-TAMRA) peptit sekansı, peptitlerin nanopartikül yüzeyine bağlanma yüzdesi ve miktarının belirlenmesinde kullanılmıştır. Peptitlerin PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+CUR nanopartiküllerinin yüzeylerine kovalent olarak bağlanması EDC/NHS kimyası ile gerçekleştirilmiştir [142]. On beş mg nanopartikül 750 μ L ultra saf su içinde homojen olarak dağıtılmıştır. Homojen olarak dağıtılan nanopartikül çözeltisi ile 750 μ L EDC/NHS çözeltisi karıştırılarak (37°C, 45 dk, 100 rpm) aktivasyon işlemi çalkalamalı etüv içinde gerçekleştirilmiştir (75 mg EDC ve 75 mg NHS 0,1M MES (2-(N-morfolino)etansulfonik asit) tamponu içinde, pH:5). Ortamdaki fazla EDC/NHS yıkama işlemi (0°C, 10 dk, 14 000 rpm) ile uzaklaştırılmıştır. Aktive edilen nanopartiküller, 750 μ L GRGDS (1 mg/mL, MES tamponu içinde) çözeltisine eklenmiş ve peptit konjugasyonu için 45 dk çalkalamalı etüvde (37°C, 100 rpm) tutulmuştur. Reaksiyon sonunda, nanopartiküller 2 kez 0,1M MES tamponu ile yıkanmış (10 dk, 14 000 rpm) ve bağlanmayan peptitler ortamdan uzaklaştırılmıştır (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Nanopartikül yüzeyine GRGDS peptit konjugasyonu şematik çizimi

Manyetik PLGA ve kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllere bağlanan peptit miktarının belirlenmesi için GRGDS-TAMRA peptit sekansı kullanılmıştır. Yapısında floresan ışımaya yapabilen kimyasal gruplar bulunan GRGDS-TAMRA, nanopartiküllerin yüzeyine yukarıda belirtilen yöntem ile konjuge edilmiştir ve konjugasyon işlemi sonrasında

yıkama çözeltileri falkon tüplerde toplanarak peptit bağlanma miktarı indirekt yöntem ile floresan spektrofotometresi (Cary Eclipse, Agilent, ABD) kullanılarak belirlenmiştir. Bu amaçla, 0-20 µg/mL derişim aralığında GRGDS-TAMRA çözeltileri hazırlanmıştır ve 544 nm eksitasyon, 572 nm emisyon dalgalıboyalarında kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Tüm peptit bağlanma miktarı hesaplamaları bu kalibrasyon grafiğı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Nanopartikül yüzeyindeki peptit varlığı ise floresan mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) ile görüntülenmiştir.

3.8. Karakterizasyon Çalışmaları

Nanopartiküllerin, kristal yapıları XRD analizi, yüzeylerine bağlanan yeni kimyasal yapılar ATR-FTIR analizi, manyetik özellikleri VSM analizi, SPDON'lara bağlanan oleik asit miktarı TGA analizi, nanopartiküllerin çapları, çap dağılımları, morfolojileri, homojeniteleri TEM ve SEM analizleri, hidrodinamik boyutları ve boyut dağılımları DLS analizi, polimerlerin molekül ağırlıkları ve pegilasyon verimleri GPC ve NMR analizleri, peptit konjugasyonu floresan spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Karakterizasyon çalışmalarında yapılan analizler ayrı ayrı başlıklar halinde aşağıda açıklanmıştır.

3.8.1. X-ışını kırınımı (XRD) analizi

İkili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenen manyetik nanopartiküllerin kristal yapıları X-ışını difraktometresi kullanılarak (Rigaku, D/Max-B, Tokyo, Japonya), tarama hızı 0,2°/dk ve tarama aralığı 20-80° olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Nanopartiküller katı halde analiz edilmiştir. Manyetik nanopartiküllerin kristal çapı Eş. 3.1'de verilen Debye-Scherrer eşitliği kullanılarak hesaplanmıştır [179].

$$d = 0,9\lambda/\beta \cos \theta \quad (3.1)$$

Eş. 3.1 ortalama kristal boyutunu, λ kullanılan X-ışını kaynağının dalgalıboyunu ($\lambda=1,5405$ Å), β keskin piklerin yarı yüksekliğindeki çizgi genişliğini (full width at half maximum, radyan) ve θ Bragg açısını ifade etmektedir.

3.8.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Sentezlenen tüm nanopartiküller, PLGA, PEG, PLGA-b-PEG polimerler, serbest oleik asit ve kurkuminin kimyasal yapıları Nicolet iS10 FTIR spektrofotometresi (Thermo Scientific, MA, ABD) kullanılarak $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında incelenmiştir.

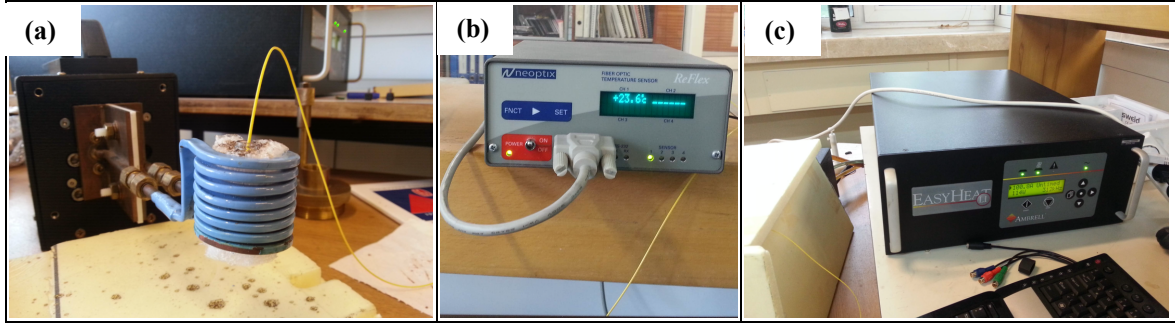
3.8.3. Titreşimli örnek manyetometre (VSM) analizi

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküller (SPDON'lar), oleik asit (OA) kaplı SPDON'lar, PLGA, manyetik PLGA ve kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin manyetik alana bağlı manyetizasyon değişimleri kuantum tasarım titreşimli örnek manyetometresi (QD-PPMS, ABD) ile oda sıcaklığında, $\pm 2\text{ T}$ manyetik alan şiddetinde ölçülmüştür.

3.8.4. SPDON'ların indüksiyon ısıtma yeteneği

İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON'larla ön çalışma olarak indüksiyon ısıtma deneyleri Easy Heat 8310 (Ambrell, İngiltere) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Resim 3.7c). Bu cihaz, 312 kHz frekans bandında (kullanılan bobine göre değişmektedir) manyetik alan üretmektedir. Bölüm 3.2'de tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen cihaz ise 13,56 MHz frekans bandında sinyal üretmektedir.

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllere (SPDON'lara) ve OA (%0,2-1) kaplı SPDON'lara uygulanan manyetik alan 3,43 cm çapında, 8 tur sarılı, aktif soğutmalı bobin yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Resim 3.12a). Nanopartiküller (1, 2, 5 ve 10 mg/mL) cam vialde distile su içinde süspanse edilerek homojen dağılımlı çözeltiler elde etmek için 1 dk sonike edilmiştir. Homojen dağılan NP'ler bobin merkezine yerleştirilerek 10 dk boyunca 100 A, 312 kHz manyetik alana maruz bırakılmıştır. Maruziyet esnasında sıcaklık değerleri fiber-optik sıcaklık probu (Neoptix, Kanada) ile ölçülmüştür (Resim 3.12b).



Resim 3.12. (a) Bobin, (b) fiber-optik sıcaklık ölçer, (c) kilohertz (kHz) bandında çalışan indüksiyon cihazı (EasyHeat, 8310)

İndüksiyon bobininde oluşan manyetik alan şiddeti Eş.3.2'den hesaplanmıştır.

$$H = 1,257 ni/L (Oe) \quad (3.2)$$

Eşitlik 3.2'de; H (Oe) manyetik alan şiddetini, n bobinin sarım sayısını, i (A) uygulanan akım değerini ve L bobin çapını (cm) simgelemektedir.

Manyetik nanopartiküllerin ısıtma potansiyellerini ifade eden SAR (specific absorption rate) değerleri Eş. 3.3'ten hesaplanmıştır.

$$SAR(W/g) = C \frac{m_{sol}}{m_{mag}} \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (3.3)$$

Eşitlik 3.3'te C su için özgül ısı kapasitesi ($C= 4,18 \text{ J/g.}^\circ\text{C}$), m_{sol} çözelti kütlesi, m_{mag} manyetik nanopartikül kütlesi, $\Delta T/\Delta t$ ise zamana bağlı sıcaklık eğrisinin 0-30 saniye aralığındaki eğimi olarak tanımlanır [117].

3.8.5. Termogravimetrik (TGA) analiz

İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen manyetik nanopartiküllere bağlanan oleik asit miktarı Exstar 6000 TG/DTA 6300 (SII Nanotechnology Inc, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Örnekler, 10°C/dk ısıtma hızıyla 25°C 'den 900°C 'ye kadar ısıtılmıştır. Kütle kayıpları elde edilen termogramlar ile belirlenmiştir.

3.8.6. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizi

Nanopartiküllerin çapları, çap dağılımları ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir. Temozolomid yüklü nanopartiküller Quanta 400F Field Emission (FEI, ABD) cihazı kullanılarak, kurkumin (CUR) yüklü nanopartiküller ise GAIA3 FIB-SEM (Tescan, Çek Cumhuriyeti) cihazı kullanılarak görüntülenmiştir. Katı ve sulu çözelti formunda hazırlanan örnekler SEM aparatlarına yerleştirilmiş ve analiz öncesi ince altın tabaka ile kaplanmıştır. SEM görüntüleri alınan örneklerin boyutları ve boyut dağılımları ImageJ programı (NIH, ABD) ile hesaplanarak histogramları çizilmiştir.

3.8.7. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Demir oksit nanopartiküllerin oleik asit ile kaplama öncesi ve sonrası çapları, SPDON'ların PLGA nanopartiküller içerisindeki dağılımları ve morfolojileri geçirimli elektron mikroskobu (TEM, FEI Tecnai G² Spirit BioTwin, ABD) ile incelenmiştir. Nanopartiküllerin sulu çözeltileri TEM gridleri üzerine damlatılmış ve örnekler oda sıcaklığında kurutulduktan sonra analiz edilmiştir.

3.8.8. Dinamik ışık saçılım (DLS) analizi

Nanopartiküllerin boyut ve boyut dağılımları Zetasizer Nano ZS (Malvern, İngiltere) ile belirlenmiştir. Nanopartiküller deiyonize su içerisinde sonikleme işlemi ile dağıtılmış ve 1 mL'lik örnek çözeltileri polistiren küvetler içerisine konularak ölçümler gerçekleştirilmiştir.

3.8.9. Büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC) analizi

Poli(laktik-ko-glikolik asit) ve PLGA-b-PEG polimerlerinin molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC/SEC System, Omnisec, Malvern) ile belirlenmiştir. Elde edilen molekül ağırlıkları pegilasyon veriminin hesaplanmasında kullanılmıştır.

3.8.10. Proton-NMR (¹H-NMR) analizi

Sentezi gerçekleştirilen PLGA-b-PEG kopolimerinin yapısal analizi sıvı Bruker 400 MHz AV model NMR spektrometresi (¹H-NMR) ile analiz edilmiştir. Üretilen PLGA-b-PEG

kopolimerinin üretim verimi Eş. 3.4 kullanılarak hesaplanmıştır. Büyüklükçe ayırma kromatografisi ile molekül ağırlıkları tespit edilen polimerlerin ise NMR spektrumlarından yararlanılarak pegilasyon verimleri Eş. 3.5'ten hesaplanmıştır. [180].

$$\% \text{ Verim} = \frac{\text{Elde edilen (PLGA – b – PEG) kütlesi}}{(\text{PLGA – NHS}) \text{ ve PEG kütlesi}} \quad (3.4)$$

$$\% \text{ Pegilasyon verimi} = \frac{(\text{pik alanı})/4}{[(\text{pik alanı}) + (\text{pik alanı}) + (\text{pik alanı})]/6} \quad (3.5)$$

3.9. Enkapsülasyon Çalışmaları

3.9.1. Manyetik PLGA nanopartiküllere TMZ enkapsülasyon veriminin UV spektrometre (Nanodrop) ile belirlenmesi

Temozolomid yüklü nanopartiküllerin enkapsülasyon etkinliğinin değerlendirilmesinde direkt ve indirekt yöntemler kullanılmıştır. İndirekt yöntemde nanopartiküller sentezlendikten sonra yıkama aşamalarındaki süpernatantlar toplanmıştır. Süpernatanda kalan TMZ derişimi, PBS çözeltisinde kalibrasyonu yapılmış doğru denkleminde (Bkz. Şekil 4.15a) yararlanılarak belirlenmiştir. Enkapsülasyon verimi (%EE) ise Eş. 3.6'ya göre indirekt olarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Formülasyondaki etken madde miktarı} - \text{Süpernatanda kalan etken madde miktarı}}{\text{Formülasyondaki etken madde miktarı}} \times 100 \quad (3.6)$$

Direkt yöntemde ise nanopartiküller liyofilize edildikten sonra 4 mg nanopartikül 4 mL DMSO içerisinde çözülmüştür. Enkapsülasyon verimi, TMZ kalibrasyon doğru denkleminde (Bkz. Şekil 4.15b) yararlanılarak Eş. 3.7'ye göre hesaplanmıştır.

$$\% \text{ EE} = \frac{\text{Nanopartiküldeki etken madde miktarı}}{\text{Formülasyondaki etken madde miktarı}} \times 100 \quad (3.7)$$

Ultraviyole spektrometre ile gerçekleştirilen TMZ enkapsülasyon verimi analizleri, karşılaştırma yapmak amacıyla daha hassas bir yöntem olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile de gerçekleştirilmiştir.

3.9.2. Manyetik PLGA nanopartiküllerine TMZ enkapsülasyon veriminin HPLC ile belirlenmesi

Manyetik PLGA nanopartiküllerin TMZ enkapsülasyon verimi, nanopartikül içinde bulunan TMZ miktarından direkt olarak ve süpernatant ortamında serbest halde bulunan TMZ miktarından indirekt olarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC, Dionex UltiMate 3000, USA) yöntemi ile belirlenmiştir.

Bu yöntemle göre, 4 mg TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküller, 4 mL asetonitril içerisinde ultrasonik su banyosu ve manyetik karıştırıcı kullanılarak çözülmüştür. Safsızlıklar ve SPDON'lar santrifüj ve neodyum mıknatıs kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çözelti, HPLC yöntemi ile miktar tayini analizinde kullanılmış ve HPLC çalışma şartları Çizelge 3.6'da sunulmuştur.

Çizelge 3.6. Temozolomid miktar tayininde kullanılan HPLC yöntemine ait parametreler

Mobil faz	İzokratik, %0,1 asetik asit: asetonitril (90:10, v/v)
Kolon	Acclaim 120 C18, Reverse phase, 4,6x250 mm, 5 µm
Akış hızı	1 mL/dk
Dedektör ve dalga boyu	UV, 330 nm
Analiz sıcaklığı	25°C
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Analiz süresi	10 dk
pH (mobil faz)	5,2

3.9.3. Manyetik PLGA nanopartiküllere kurkumin enkapsülasyon veriminin UV spektrometre (Nanodrop) ile belirlenmesi

Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri direkt yöntem kullanılarak UV spektrometre ile belirlenmiştir. Nanopartiküller liyofilize edildikten sonra asetonitril içerisinde (1 mg/mL) çözülerek, kalibrasyonu yapılmış doğru denklemden (Bkz. Şekil 4.21a) enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır.

3.10. Salım Çalışmaları

Manyetik PLGA nanopartiküllerinden kurkumin salım deneyleri

Kurkumin yüklü nanopartiküllerle salım çalışmaları fosfat tamponu çözeltisinde (PBS, pH:7,4) gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan nanopartiküller PBS ortamında dağıtılarak (2 mg/mL), sıcaklığı 37’de sabit tutulan yatay çalkalayıcı etüvde (100 rpm) inkübe edilmiştir. Salım ortamından belirli zaman aralıklarında (0,5; 1, 2, 3, 6, 12, 24, 48, 72. saatlerde) 2 µl örnek alınarak, aynı ortama eşit hacim ve sıcaklıkta taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örneklerle 2 µl etanol ilave edilmiş ve örneklerin absorbansı UV spektrofotometre ile ölçülmüştür. Etanol/PBS (50:50, h/h) ortamında çıkarılan kurkumin kalibrasyon grafiğinden (Bkz. Şekil 4.30) kümülatif salım değerleri hesaplanmıştır.

3.11. Hücre kültürü Çalışmaları

Bu çalışmada insan glioblastoma hücre hattı (T98G) kullanılmıştır. Ayrıca, insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) tez kapsamında kullanılan TMZ ve kurkumin etken maddelerinin normal hücrelere olan etkilerinin incelenmesi için kullanılmıştır. Glioblastoma (T98G) hücre hattı, %10 (hacim/hacim: h/h) FBS ve %1 (h/h) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besiyerinde kültüre edilmiştir. HUVEC hücreleri ise, %10 (h/h) FBS, %1 (h/h) penisilin-streptomisin, %1 L-glutamin içeren RPMI-1640 ortamında kültüre edilmiştir. İnkübasyon işlemleri 37°C’de %5 CO₂ içeren nemli ortamda (Heraeus Instruments, Almanya) gerçekleştirilmiştir.

3.11.1. Hücrelerin çözülmesi ve çoğaltılması

Sıvı azot tankında kriyo tüplerde stoklanan T98G ve HUVEC hücreleri, 37°C’de su banyosunda kısa süre bekletilerek hızla çözünmeleri sağlanmıştır. Su banyosundan çıkarılan kriyo tüpler, %70 lik alkolle temizlenerek laminar hava akışlı kabine alınmıştır. Hücreler, 5 mL besiyeri ile toplanarak 1000 rpm, +4°C’de 5dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücre süspansiyonunun süpernatant kısmı dökülmüş ve hücreler, içerisinde 5 mL besiyeri bulunan 25 cm²’lik flasklara alınarak inkübatöre kaldırılmıştır.

3.11.2. Hücre Sayımı

Hücre sayımı, membran bütünlüğüne göre canlı-ölü hücre ayrımının yapılmasını sağlayan tripan mavisi boyası kullanılarak yapılmıştır. Hücre kültür kabında bulunan hücreler 10 mL steril PBS ile yıkanmıştır. Hücreleri tutundukları yüzeyden kaldırmak için 75 cm²’lik

kültür kabına 4 mL tripsin/EDTA eklenerek 5 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, tripsinin enzimatik aktivitesini nötralize etmek için kültür kabına 7 mL besiyeri ilave edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonları belirli oranlarda tripan mavisi çözeltisi ile seyreltilmiş ve pipetlenerek hücrelerin ortamda homojen dağılmaları sağlanmıştır. Elde edilen çözeltiden Neubauer lamı üzerine 10 μ L aktararak hücre sayım işlemi yapılmıştır. Canlı hücreler tripan mavisi boyasını membranlarından geçirmeyerek parlak beyaz renkte, ölü hücreler ise tripan mavisi membran bütünlüğü bozulmuş hücrelerin içerisine girdiğinden koyu mavi renkte görüntülenmiştir. Hücre sayımı optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında gerçekleştirilmiştir

3.11.3. Serbest TMZ'nin T98G ve HUVEC hücreleri üzerine etkisi

Temozolomid (TMZ) ana stok solüsyonu 10 mg/mL DMSO çözeltisinde hazırlanmıştır. Literatür taraması sonucunda TMZ derişimleri 0-1000 μ M olarak belirlenmiş ve ana stoktan seri dilüsyon işlemi ile bu derişimler hazırlanmıştır. Serbest TMZ'nin T98G ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Serbest TMZ ile gerçekleştirilen hücre kültürü analizi

Etken madde	Hücreler	Doz derişimi (μ M)	MTT analiz zamanı (saat)	Açıklama
Serbest TMZ	T98G, HUVEC	0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 μ M	24, 48, 72	TMZ etkin doz ve zaman belirleme

3.11.4. Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkisi

Boş PLGA (PLGA), manyetik PLGA (PLGA+SPDON) ve TMZ yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+TMZ) nanopartikülleri T98G hücrelerine uygulanmadan önce sterilizasyon için 10 dk ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılmış ve daha sonra DMEM-F12 ortamında vortekslenerek dağıtılmıştır. Homojen olarak dağıtılan partiküller, T98G hücrelerine 0-1000 μ g/mL doz aralığında uygulanmış ve hücre canlılıkları MTT testi ile belirlenmiştir (Çizelge 3.8). Daha sonra, TMZ yüklü manyetik NP'lerin doz miktarları artırılmış (0-10 mg/mL) ve yüksek NP dozlarında MTT, canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin hücre kültürü analizleri

Nanopartikül (NP)	Hücre	NP dozu	NP içindeki $\approx$ TMZ dozu	Analizler (72.saat)	Açıklama
PLGA NPs	T98G	0; 62,5; 125; 250; 500; 1000 μ g/mL	0, 2, 4, 8, 16, 32 μ M	MTT	TMZ yüklü NP uygulamaları (düşük dozda)
PLGA+SPDON NPs					
PLGA+SPDON+TMZ NPs					
PLGA+SPDON NPs	T98G	0; 1,25; 2,5; 5; 10 mg/mL	0; 75; 150; 300 μ M	MTT, canlı/ölü, Anneksin V/PI	TMZ yüklü NP uygulamaları (yüksek dozda)
PLGA+SPDON+TMZ NPs					

3.11.5. Serbest kurkuminin T98G ve HUVEC hücreleri üzerine etkisi

Kurkumin ana stok solüsyonu 10 mM olacak şekilde DMSO çözeltisinde hazırlanmıştır. Hücrelere uygulanacak kurkumin derişimleri 0-100 μ M aralığında belirlenmiş ve DMSO oranı tüm dozlarda hacimce %1 olarak ayarlanmıştır. Kontrol amacıyla hücreler hacimce %1'lik DMSO içeren kültür ortamında da inkübe edilmiştir. Serbest kurkuminin T98G ve HUVEC hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri, 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi ile belirlenmiştir. Kurkuminin T98G hücrelerinin morfolojilerine etkileri ise 72 saat sonra kristal viyole ve Alexa-DAPI boyamaları ile incelenmiştir (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Serbest kurkumin ile gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri

Etken madde	Hücreler	Doz derişimi (μ M)	Analizler (saat)	Açıklama
Serbest kurkumin (CUR)	T98G, HUVEC	0; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 μ M	MTT (24, 48, 72)	CUR etkin doz ve zaman belirleme
	T98G		Kristal viyole, Alexa-Dapi (72)	

3.11.6. Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkisi

Bu çalışmada, manyetik PLGA (PLGA+SPDON), peptit bağlı manyetik PLGA (PLGA+SPDON+GRGDS), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) nanopartikülleri kullanılmıştır. Nanopartiküller, T98G hücrelerine uygulanmadan önce sterilizasyon için 10 dk ultraviyole (UV) ışığa maruz bırakılmış, daha sonra DMEM-F12 ortamında vorteksenerek dağıtılmıştır. Homojen olarak dağıtılan nanopartiküller, T98G hücrelerine 0-1 mg/mL derişimlerde uygulanarak 24, 48 ve 72. saatlerde MTT, 72. saatte canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleri gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10. Kurkumin yüklü NP'lerle gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri

Nanopartikül (NP)	Hücre	NP dozu (µg/mL)	NP içindeki CUR dozu (µM)	Analizler (saat)	Açıklama
PLGA+SPDON NPs	T98G	0; 0,25; 0,5; 1 mg/mL	0, 50, 100, 200 µM	MTT (24, 48, 72), Canlı/ölü, Anneksin V/PI (72)	CUR yüklü NP uygulamaları
PLGA+SPDON+GRGDS NPs					
PLGA+SPDON+CUR NPs					
PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs					

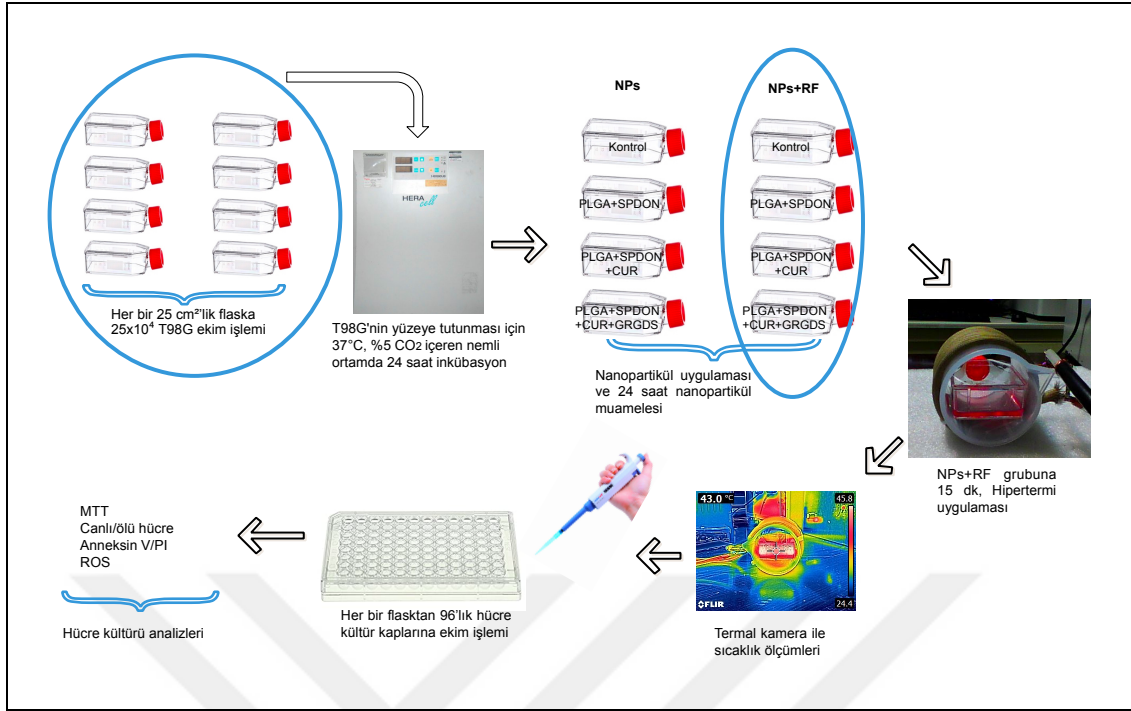
3.11.7. Hipertermi uygulamaları

Manyetik PLGA (PLGA+SPDON), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve GRGDS bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) nanopartiküllerin, hipertermi uygulaması altında T98G hücrelerine etkileri hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenmiştir. Bu amaçla hipertermi uygulamasında kullanılan nanopartiküller, nanopartiküllerin içerdikleri kurkumin miktarları ve yapılan analizler Çizelge 3.11'de verilmiştir.

Çizelge 3.11. Hipertermi uygulamasında gerçekleştirilen hücre kültürü analizleri

Nanopartikül (NP)	Hücre	NP dozu (µg/mL)	NP içindeki CUR dozu (µM)	Analizler (24.saat)	Açıklama
PLGA+SPDON NPs	T98G	750 µg/mL	-----	MTT, Canlı/ölü boyama, Anneksin V/PI, ROS	Hipertermi uygulamaları
PLGA+SPDON+CUR NPs			150 µM		
PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs			30 µM		

Hipertermi maruziyetinin T98G hücreleri üzerindeki etkisini incelemek amacıyla sham (NPs) ve hipertermi (NPs+RF) grupları oluşturulmuştur. Sham grubu, hipertermi grubuyla aynı koşullarda tutulan ancak RF uygulanmayan gruptur. Hipertermi grubu ise, 13,56 MHz RF alana 15 dk boyunca (10 dk-150 watt; 5 dk-200 watt) maruz bırakılan gruptur (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. T98G hücrelerine hipertermi uygulamasının şematik gösterimi

T98G hücreleri, 25 cm²'lik kültür kaplarına her birinde 25x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiş ve kültür kabının yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır ve kültür kaplarına 750 µg/mL nanopartikül içeren taze besiyeri ilave edilerek 24 saat inkübatörde tutulmuştur. İnkübatörden çıkarılan hücelere 15 dk hipertermi maruziyeti uygulanmış ve maruziyet esnasında termal kamera görüntüleri alınarak sıcaklık takipleri yapılmıştır. Daha sonra, 25 cm²'lik kültür kaplarında bulunan hücreler 96-gözlü kültür kaplarına aktararak tekrar 24 saat inkübe edilmiştir. Son olarak, hücelere MTT, canlı/ölü hücre boyama, Annexin V/PI ve ROS analizleri yapılmış ve RF hipertermi etkisi incelenmiştir. Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen hücre kültürü analizlerine ait yöntemlerin ve kit protokollerinin tamamı, devam eden bölümde ayrıntısıyla açıklanmıştır.

3.11.8. Hücre kültürü analizleri

MTT analizleri

Canlı hücrelerde, mitokondriyal dehidrogenaz aracılığı ile tetrazolyum tuzlarının formazan kristallerine dönüşmesine dayanan MTT (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) kolorimetrik bir test olup, ölçülen absorbans değerleri doğrudan canlı hücre sayısı

ile orantılıdır. Glioblastoma (T98G) ve endotel hücreleri (HUVEC), 96-gözlü hücre kültür kaplarının her bir gözüne 10^4 hücre ve son hacim 200 μ L olacak şekilde ekilmiştir. Hücreler, kültür kaplarının tabanına tutunmaları için 24 saat inkübe edilmiştir. Bu süreçten sonra hücrelerin üzerindeki besiyerleri uzaklaştırılarak Çizelge 3.7-10'da belirtilen dozlar belirtilen inkübasyon sürelerinde uygulanmıştır. Her bir inkübasyon süresinin sonunda kontrol ve doz gruplarının bulunduğu besiyerleri uzaklaştırılmıştır ve her bir göze T98G hücreleri için 200 μ L DMEM-F12, HUVEC hücreleri için 200 μ L RPMI-1640 ve 20'şer μ L MTT çözeltisi eklenmiştir. Örnekler, 37°C'de 3 saat inkübe edildikten sonra, üzerlerindeki MTT içeren ortam uzaklaştırılmış ve her bir göze 200 μ L izopropanol çözeltisi eklenerek formazan kristallerinin çözünmesi sağlanmıştır. Elde edilen çözeltilerin, mikropilaka okuyucuda (Asys UVM 340, Avusturya) 690 nm referans olmak üzere 570 nm'de absorbanları ölçülmüştür.

Kristal viyole ile boyama

Glioblastoma (T98G) hücrelerine 0-100 μ M doz aralığında uygulanan serbest kurkuminin hücre morfolojilerine etkilerini incelemek için hücreler kristal viyole (72. saat) ile boyanmıştır (Çizelge 3.9). Bu amaçla, öncelikle hücrelerin üzerindeki besi ortamı uzaklaştırılmış ve PBS ile iki kez yıkama işlemi yapılmıştır. Hücreler, 1:1 (h/h) oranında aseton:metanol çözeltisi ile 4°C'de 20 dk muamele edilerek fiksasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra her bir göze 200 μ L kristal viyole (%20 metanol çözeltisinde hazırlanan %0,5'lik kristal viyole) çözeltisi eklendikten sonra 30 dk boyunca inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Boyanan yüzeylere, boya kalıntıları tamamen uzaklaşmaya kadar yıkama yapılmış ve hücreler optik mikroskop (Olympus IX71, Japonya) altında incelenmiştir.

Alexa Fluor-DAPI boyamaları

Glioblastoma (T98G) hücrelerine serbest kurkumin etkisi (Çizelge 3.9), ikili floresan (Alexa Fluor 488-DAPI) boyama (72. saat) yapılarak floresan mikroskop altında incelenmiştir. Hücreler iki kez PBS ile yıkandıktan sonra, %4 (h/h) paraformaldehit çözeltisi (PBS, pH: 7,4 içinde hazırlanmış) ile 20 dk muamele edilerek fikse edilmiştir. Fiksasyon işleminden sonra %0,1 (h/h) Triton X-100 (PBS içinde) ile 5 dk muamele edilerek hücre membran geçirgenliği arttırılmıştır. Hücrelerin filamentöz aktinleri (F-aktin), %1 (a/h) sığır serum

albumin (BSA) içeren PBS çözeltisi içerisinde hazırlanmış %1'lik (h/h) alexa fluor-488 ile 20 dk, hücre çekirdeği ise %0,1'lik (h/h) DAPI çözeltisi ile 5 dk boyunca karanlıkta inkübe edilerek boyanmıştır. Örnekler floresan mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında görüntülenmiştir.

Canlı/ölü hücre boyama yöntemi

Glioblastoma (T98G) hücrelerinin canlılık analizleri “Live/dead cell viability assay kit” (K502-100, Biovision) kullanılarak floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Hücreler, 10^4 hücre/göz yoğunluğunda 96-gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücrelerin, kültür kabı yüzeyine tutunmaları için 24 saat inkübe edildikten sonra, besiyerleri uzaklaştırılmış ve Çizelge 3.8’de belirtilen dozlarda nanopartikül içeren taze besiyerleri üzerlerine ilave edilmiştir. Ardından, hücrelere, Çizelge 3.8, 10-11’de belirtilen inkübasyon sürelerinde canlı/ölü hücre canlılık deney kit protokolüne göre boyamalar yapılmıştır. Bu amaçla öncelikle kit içerisinde gelen “assay buffer” tamponu, “live cell staining dye” ve “dead cell staining dye” boya ları 37°C’de su banyosunda bir süre tutulduktan sonra laminar kabine alınmıştır. Daha sonra, hücre kültür kabındaki nanopartikülleri içeren besiyerleri uzaklaştırılmış ve her bir göze, 200 µL “assay buffer” 0,4 µL “live cell staining dye” ve 0,2 µL “dead cell staining dye” eklenerek hücreler karanlık ortamda 37°C, 15 dk inkübe edilmiştir. İnkübasyon sürecinden sonra canlı hücreler (yeşil) 485/530 nm dalgaboylarında, ölü hücreler (kırmızı) 495/635 nm dalgaboylarında ışımaya yaparak floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Live/dead cell viability assay kit, Biovision, protokol).

Apoptoz tespiti: Anneksin V-FITC/PI yöntemi

Hücrelerin apoptotik ya da nekrotik ölüm yollarından hangisi ile ölüme gittiği Anneksin V-FITC/PI boya ları kullanılarak floresan mikroskobu ile belirlenmiştir. Normal koşullarda hücre membranının sitoplazmik (iç) yüzeyinde bulunan fosfatidilserin (PS) molekülü, erken apoptotik evrede hücre membranının dış yüzeyine transloke olur. Bu yöntem, transloke olan fosfatidilserin molekülüne floresan boya (FITC) işaretli Anneksin V molekülünün bağlanması ve hücre membranlarının yeşil floresan ışımaya vermesine dayanır. Ayrıca, Anneksin V-FITC ile birlikte kırmızı floresan ışımaya yapan propidyum iyodür (PI) molekülünün ikinci boya olarak kullanılması geç apoptotik ve nekrotik hücrelerin eş zamanlı analiz edilmesine olanak sağlamaktadır (Annexin V-FITC, Biovision kit protokolü). T98G

hücreleri, her gözde $2,5 \times 10^4$ hücre olacak şekilde 24-gözlü hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Hücreler, 24 saat inkübe edildikten sonra üzerlerindeki besiyerleri uzaklaştırılmıştır ve Çizelge 3.8, 10-11’de belirtilen dozlarda nanopartikül içeren besiyerleri üzerine ilave edilmiştir. Ardından, hücrelere, Çizelge 3.8, 10-11’de belirtilen inkübasyon sürelerinde Annexin V-FITC/PI deney kit protokolüne göre boyamalar yapılmıştır. Öncelikle, hücre kültür kabında nanopartikülleri içeren besiyerleri uzaklaştırılmıştır ve her bir göze, 500 μL 1X “binding buffer” 5 μL “Annexin V-FITC” ve 5 μL “Propidium iodide” eklenerek karanlıkta, oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir. Erken apoptozda, plazma membranı bütün halde olup yeşil olarak görülür, fakat PI boyası (kırmızı) görülmez. Geç apoptoz veya nekrozda membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerin çekirdekleri kırmızı (PI) ve çekirdek etrafında yeşil bir halka görülür. Boyamalar sonunda hücreler floresan mikroskop (Olympus IX71, Japonya) ile görüntülenmiştir.

Oksidatif stres (ROS) tespiti

Oksidatif stres oluşumu, reaktif oksijen türleri (ROS) tespit kiti (K936-100, Biovision) kullanılarak belirlenmiştir. Hipertermi maruziyetinden sonra hücrelere ROS kit protokolü uygulanmıştır. Besiyerleri çekildikten sonra hücreler 100 μL ROS assay tamponu ile yıkanmış ve göz başına hücrelere 100 μL 1xROS label uygulanmıştır. Karanlık ortamda, 37°C, 45 dk inkübe edilen hücrelerin üzerinden ROS label uzaklaştırılarak 100 μL ROS assay tamponu eklenmiş ve floresan spektrofotometre ile örneklerin ışık şiddetleri ölçülmüştür (Bkz. Şekil 3.8). Bu analiz sadece hipertermi uygulanan örneklerle gerçekleştirilmiştir.

3.12. İstatistiksel Analiz

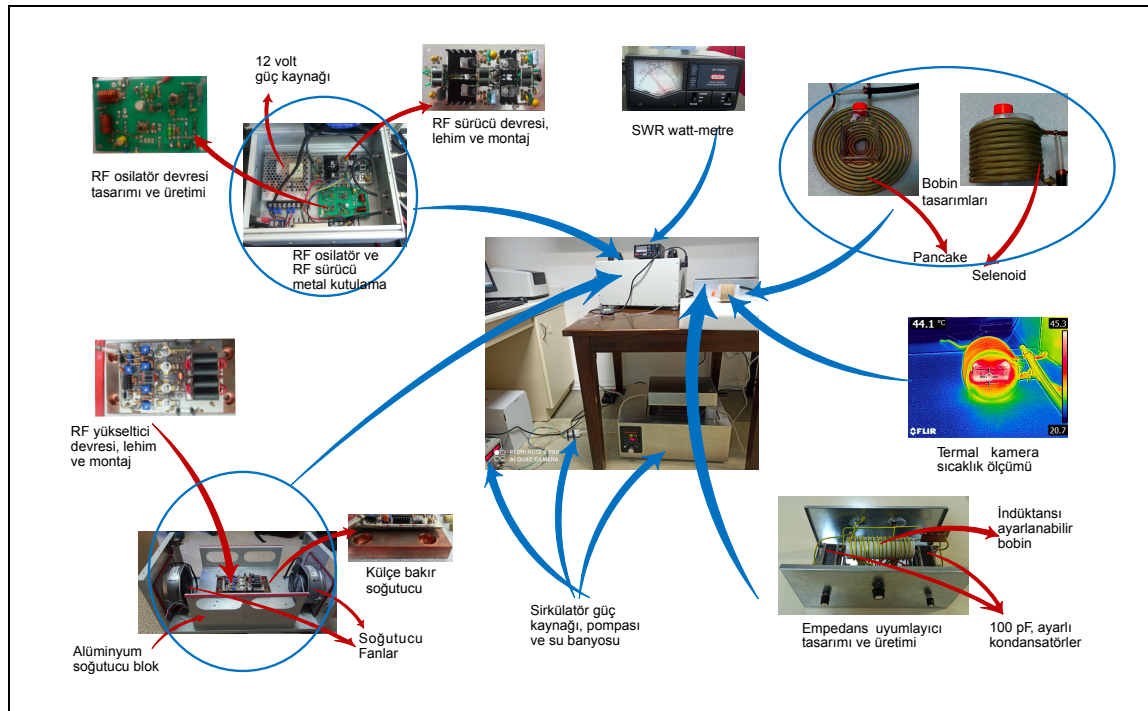
Hücre kültürü analizlerinde, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur. Çalışma sonuçları, Graphpad Prism 8 (Graphpad Software, Inc., San Diego, CA) programı kullanılarak farklı grupların istatistiksel açıdan karşılaştırılması tek-yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ve Dunnett’s post-test kullanılarak yapılmıştır. Anlamlılık dereceleri, $p > 0,05$ (anlamli değil), $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmanın bu bölümünde tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların bulguları sunulmuştur. İlk olarak, hipertermi maruziyet sisteminin tasarım ve üretim aşamaları, bu aşamalarda entegrasyonu yapılan devreler, gerçekleştirilen ölçümler detaylı bir şekilde açıklanmıştır. Daha sonra, süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) karakterizasyonu ile başlayan, PLGA-b-PEG kopolimeri, TMZ ve kurkumin yüklü manyetik nanopartiküller, enkapsülasyon ve salım çalışmalarını kapsayan tüm karakterizasyon ve deneysel çalışmaların bulguları verilmiştir.

Son bölüm, hücre kültür çalışmalarının bulgularını içermektedir. Nanopartiküllerin veya etken maddelerin (Temozolomid/kurkumin) hücre ile etkileşimleri neticesinde MTT, kristal viyole, Alexa Fluor-DAPI, canlı/ölü boyama, Anneksin V/PI analizlerinin bulguları verilmiştir. Ardından, tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen hipertermi maruziyet sistemi altında, nanopartikül-hücre etkileşimleri sonrasında gerçekleştirilen MTT, canlı/ölü hücre boyama, Anneksin V/PI ve ROS analizlerine ait bulgular verilmiştir.

4.1. Hipertermi Maruziyet Sistemine İlişkin Bulgular

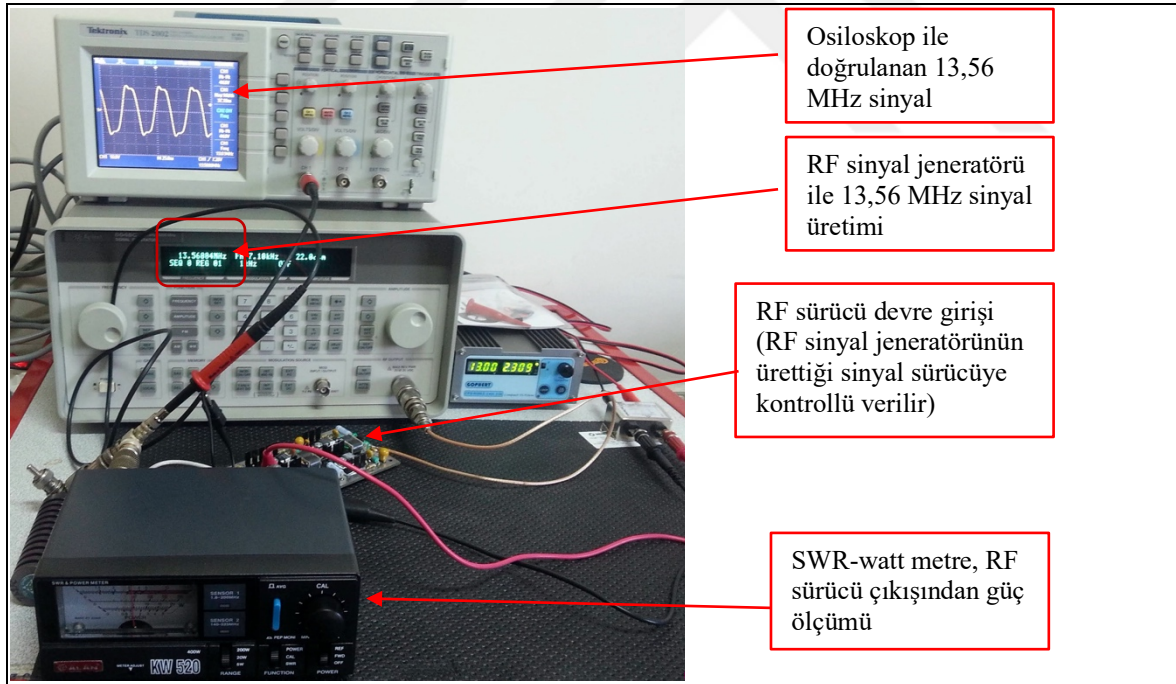


Şekil 4.1. Hipertermi maruziyet sistemi tasarımının ve üretiminin genel şematik gösterimi

Hipertermi maruziyet sistemi üretiminin genel şematik gösterimi Şekil 4.1’de verilmiştir. Radyofrekans (RF) alan hipertermi maruziyet sistemi; RF sinyal jeneratörü, RF osilatör, RF sürücü (driver), RF yükseltici (amplifier), RF empedans uyumlayıcı (matching unit), soğutma sistemi, metal kutu ve sıcaklık ölçüm sistemi bölümlerinden oluşmaktadır.

4.1.1. Radyofrekans sinyal jeneratörü

Radyofrekans (RF) sinyal jeneratörü, kontrollü frekans ve şiddette elektromanyetik sinyal üretebilen ve pulsü RF sürücüye ileten bir RF elektromanyetik alan jeneratörüdür. Radyofrekans sinyal jeneratöründe, elektromanyetik dalganın frekans aralığı düşük frekanstan-yüksek frekansa (9 kHz-3,2 GHz) kadar geniş bir bant aralığına sahiptir. RF sinyal jeneratörü ile 13,56 MHz çalışma frekansına sahip sinyal, AN779 kodlu RF sürücüye kontrollü olarak verilmiş ve montajı yapılan RF sürücü devresinin testleri bu sinyal jeneratöründen sağlanan sinyal ile kontrollü olarak gerçekleştirilmiştir (Resim 4.1).

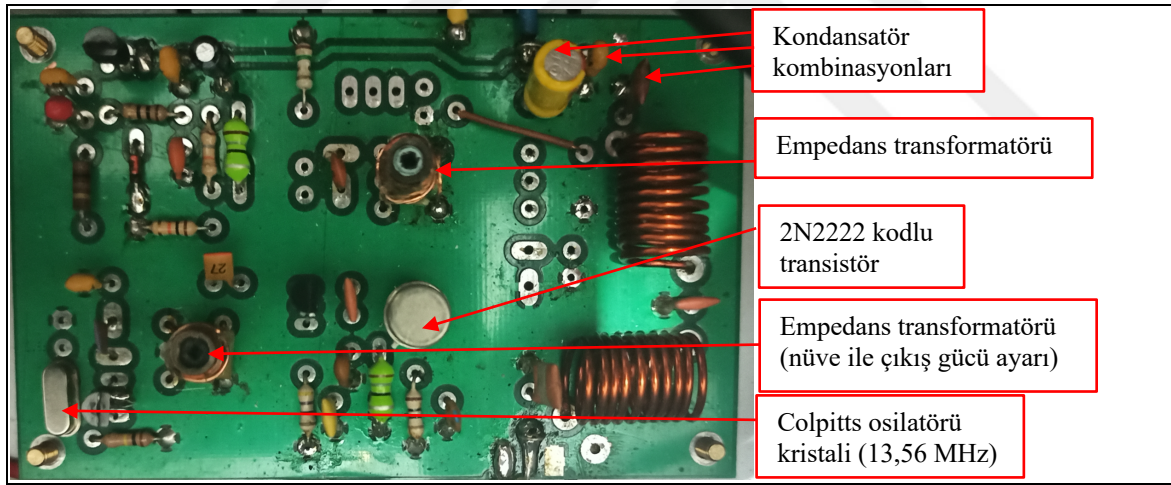


Resim 4.1. Radyofrekans sinyal jeneratörünün ürettiği 13,56 MHz sinyalin, RF sürücüye kontrollü bir şekilde iletildiğini gösteren resimler

4.1.2. Radyofrekans osilatör

Radyofrekans sinyal jeneratörü ile devre kontrollü olarak test edildikten sonra, hipertermi maruziyet sisteminin kullanım kolaylığı ve taşınabilirliği açısından sinyal jeneratörünün

yerine RF osilatör devresi çizilmiş ve entegrasyonu yapılmıştır. Radyofrekans osilatör devresi kendi içerisinde 3 ana bölümden oluşmaktadır. Bu bölümler; Colpitts osilatörü kristali (13,56 MHz), tampon yükselteç (osilatörü yüklemekten sinyali iletmek için) ve 100 mW güç katı'dır (Resim 4.2). Colpitts osilatörü bu frekanslarda kararlılığı en iyi osilatörlerden biridir. Buna rağmen, düzensiz osilasyonları engellemek ve kararlılığı en yüksek noktada tutmak için 12V besleme gerilimi tekrar 9V seviyesine regüle edilmiş ve gürültüyü engellemek için her noktada kondansatör kombinasyonları kullanılmıştır. Ayrıca yapım kolaylığı açısından literatürde birçok örneği olan JFET'li Colpitts osilatörü tercih edilmiştir. Katlar arasındaki bağdaşım, empedans transformatörleri ile sağlanmıştır. Bu transformatörlerin primerleri aynı zamanda çalışma frekansına akortlanmış birer rezonans devresidir. Son katta 2N2222 kodlu transistöre bağlı olan empedans transformatörü içindeki nüve ile çıkış gücü 30-100 mW arasında ayarlanabilmektedir. Bu sayede istenildiği takdirde gücü daha düşük değerlerde sınırlamak ve gerekmedikçe termal açıdan daha güvenli seviyelerde kalmak mümkün olmaktadır.



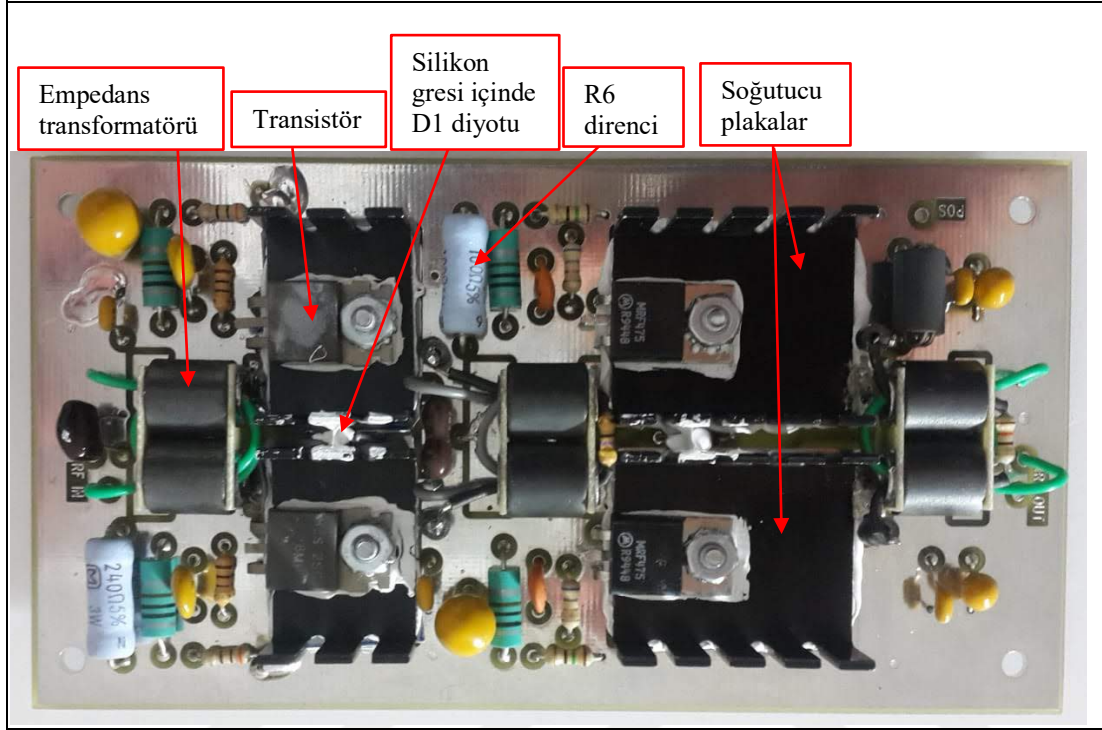
Resim 4.2. Lehimlenmiş ve bitmiş RF osilatör devresi

4.1.3. Radyofrekans sürücü (RF driver)

Radyofrekans sürücü için motorola firmasının tasarımı olan kit halindeki devre, "Communication Concepts Inc." firmasından demonte olarak satın alınmıştır. Bu devre elemanlarının montajı ve entegrasyonları aşağıda anlatılmıştır (Resim 4.3).

Her ne kadar bu devre kit olarak alınmış, bir tasarım yapılmamış olsa da bu tür devrelerin montajı ve testleri de incelikler içermekte ve deneyim gerektirmektedir. Tüm empedans

transformatörleri orta uçlu olduğundan, 1-2, 1-3 gibi az sayıda tur ve yine tek tur üzerinden geri besleme direnci içerdiğinden montajı son derece dikkat gerektirmektedir.



Resim 4.3. Lehimlenmiş, montajı ve entegrasyonu sağlanmış AN779L RF sürücü

Radyofrekans sürücü devresi geniş bantlı lineer bir yükselteç olduğundan A sınıfı çalışmaktadır. Bu nedenle transistörler ve soğutucuları da baskı devre kartına özenle monte edilmelidir. Tüm transistörler ve soğutucular devre kartına termal silikon gresi kullanılarak monte edilmiştir. Bu tasarım için yapılan uygulamalarda çeşitli bias akımları önerilmiştir. R6 direncinin değeri 150Ω seçilerek termal açıdan oldukça uygun bir devre elde edilmiştir. Ayrıca ön gerilim (bias) akımı için gerekli gerilimi sağlayan D1 ve D2 diyotu transistörlerin soğutucuları arasına yerleştirilerek termal silikon gresi ile ısıl bağdaşım (coupling) sağlanmıştır. Bu sayede aşırı sıcaklık artışı olması durumunda ön gerilim diyot tarafından kısılarak transistörlerin aşırı sıcaklık nedeniyle hasar görmesi önlenmektedir. Radyofrekans sürücünün gücü en yüksek 20 Watt olacak şekilde tasarlandığı katalogunda belirtilmiştir. Bu güç değerlerine yaklaşılmış olmakla birlikte, verilen uygulama tavsiyelerinde son kademedeki güç katının girişine 6 watt'ın üstünde giriş yapılmaması gerektiğinden bu katın gücü de 10 watt seviyesine ayarlanmıştır. Ayrıca bu sayede yine termal kararlılık açısından daha güvenli bir RF sürücü devresi elde edilmiştir.

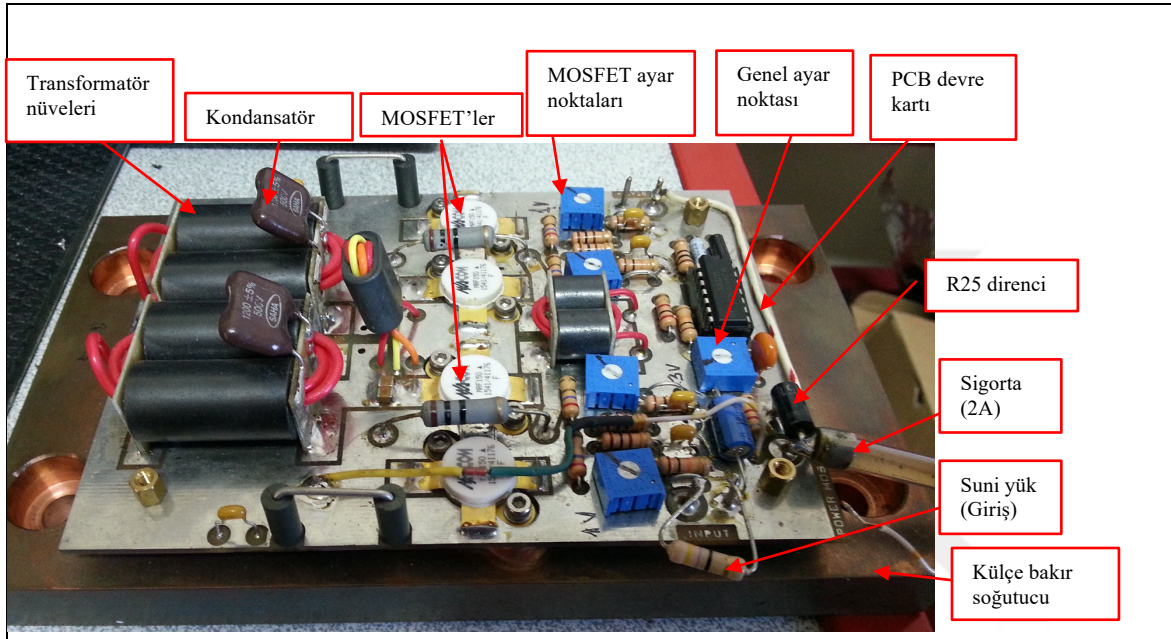
4.1.4. Radyofrekans yükselteci (RF amplifier)

Radyofrekans yükselteci için motorola firmasının tasarımı olan kit halindeki devre, “Communication Concepts Inc.” firmasından demonte olarak satın alınmıştır. Bu devre elemanlarının montajı ve entegrasyonları aşağıda anlatılmıştır (Resim 4.4).

Öncelikle, tüm empedans transformatörlerinin ve özellikle MOSFET’lerin (metal oksit yarı iletken alan etkili transistörler) montajı özenle yapılmıştır. Transformatörlerin nüveleri ferrit malzeme olduğu için kırılmandır. MOSFET’ler RF için özel tasarım komponentlerdir ve statik elektriğe karşı duyarlıdır. Diğer taraftan MOSFET’lerin fiziki yapıları gereği devre kartına (PCB) ve soğutucu plakaya montajları da zordur. Montaj aşamasından sonraki en önemli aşama MOSFET’lerin ön gerilimlerinin ayarlanmasıdır. Resim 4.4’te verilen şemadan da görüleceği gibi bir genel ayar noktası ve her bir MOSFET için de özel bir ayar noktası mevcuttur. Verilen uygulama tavsiyeleri ve internet üzerinde yapılan uygulama örnekleri incelenerek genel ayar noktasının 3,5V seviyesine ayarlanarak sabitlenmesine karar verilmiştir. Çünkü sıcaklığın artmasıyla yarı iletkenlerin geçirgenlikleri hızla değişmektedir. Ayrıca kazançları yüksek olan MOSFET’lerin ön gerilimlerinin de tavsiye edilenin üzerinde olması durumunda istenmeyen osilasyonlar meydana gelmekte ve gate-source voltajı hızla sınır değerlerin üstüne ($\pm 40V$) çıkarak MOSFET’lerin zarar görmesine neden olmaktadır. Tüm bu durumlar göz önüne alınmış ve tavsiye edilen, her bir MOSFET için sükûnet akımı 250 mA olacak şekilde öngerilim ayarlama prosedürleri yapılmıştır.

Öncelikle öngerilim devresi üzerinde bulunan sıcaklık algılayıcısı (R25) devre dışı bırakılarak ön gerilim değerinin değişkenlik göstermesi engellenmiştir. Ayrıca istenmeyen osilasyonların vereceği zararı engellemek için akım-sınırlamalı bir güç kaynağından faydalanılmıştır. İlave olarak giriş ve çıkış noktalarına 50 Ω suni yükler bağlanmış, besleme ucuna da 2 A değerinde bir sigorta yerleştirilerek besleme gerilimi uygulanmıştır (Resim 4.4). Sıcaklık algılayıcısı devre dışı bırakıldığı halde her bir MOSFET’in, sıcaklık ile ön gerilim sabit olsa dahi sükûnet akımının değiştiği gözlenmiştir. Aynı zamanda bu akım değeri etrafındaki ayarlar için ön gerilim değerinin 2,8 ile 3,1 V arasında değiştiği de tespit edilmiştir. Bu nedenle genel ayar noktası maksimum değer olan 3,1 V’un az üstündeki bir değere (yukarıda belirtilen 3,5 V) ayarlanmıştır. Ayrıca yukarıda anlatılan en kötü durum senaryosuna göre sükûnet akımı 200 mA seviyesinde sabitlenmiştir. Bu ayarlama yapılırken soğutucu sıcaklığı az da olsa yükseldiğinden her MOSFET için ayar yapıldıktan sonra termal

dengeinin oluşması beklenmiştir. Tüm ayarlamalar beş kere tekrarlanıp gate-source gerilimleri aynı voltmetre ile ölçülmüş ortalaması alınarak 180-200 mA noktasında sabitlenmiştir. Daha sonra, sıcaklık algılayıcısı devreye alınarak MOSFET'lerden bir tanesinin üzerine termal silikon ile irtibatlanmış ve ısındıkça ön gerilim değerini kısıttığı test edilerek ayar sonlandırılmıştır (Resim 4.4).



Resim 4.4. Lehimlenmiş ve entegrasyonu sağlanmış EB104 RF yükselteç devresi

Profesyonel bir tasarım olmasına rağmen PCB tasarımında göze çarpan bazı eksikler ve yanlışlıklar da giderilmiştir. Örneğin; i) besleme noktasından 20 A akım geçeceği bildirilmekle birlikte bu noktadan dağılan bakır yolların yeterince geniş yüzey alanına sahip olmadığı görülmüş ve bu yollara çok damarlı bakır kablo ve lehim ile dolgu yapılmıştır, ii) RF yükselteçte istenmeyen osilasyon olmaması için ön gerilim uçları dışarı verilmiştir fakat besleme noktasından buraya irtibatlama yapmak için mini bağlantı (jumper) pabuçları yerleştirilmediği gözlenerek bu noktaya bağlantı yapılmıştır, iii) yanlış bağlantı yapılma olasılığına karşı besleme noktasında güç kaynağını kısa devre ile devre dışı bırakacak bir diyot ilave edilmiştir.

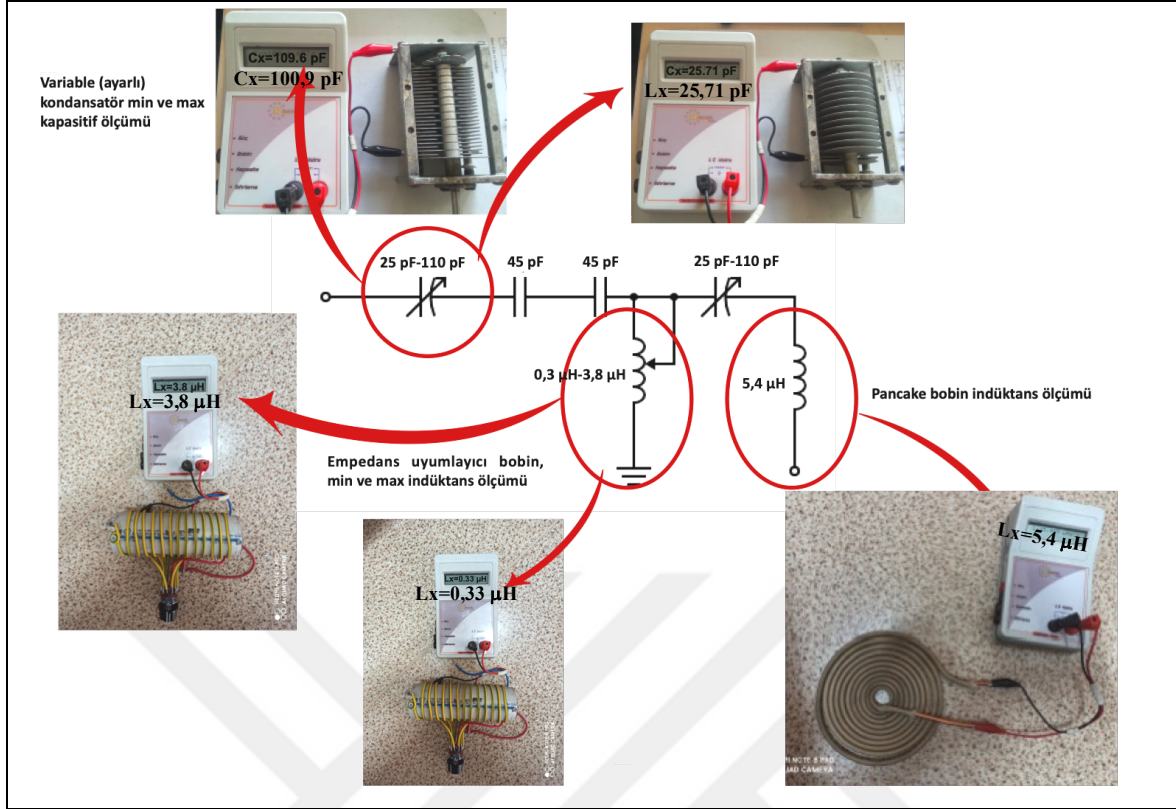
Montajı ve ayarları biten devre yine akım sınırlamalı güç kaynağı ile 100-400 Watt seviyesine kadar test edilmiştir. Radyofrekans yükselteç devresinde, istenmeyen osilasyonları önlemek için, gücün sürücü kart üzerinden bir zayıflatıcı kullanılarak uygulanması önerilmektedir. Bu amaçla -3dB (gücü yarıya indiren) 50 Watt güce dayanıklı

bir zayıflatıcı kullanılmıştır. Bu sayede yukarıda da belirtildiği gibi sürücü devrenin ürettiği güç her aşamada yarısı değerine indirilerek güç katına uygulanmıştır.

Çalışma gerilimleri farklı olduğundan osilatör ve sürücü devre 12 V, RF güç yükselteci ise 48 V anahtarlama gücü kaynağı ile beslenmiştir. Yine bu noktada da kritik bir konu mevcuttur: anahtarlama gücü kaynakları bilindiği gibi bir geri besleme devresi aracılığı ile gerilimi sabit tutar. Fakat bu noktaya RF kaçağı olduğu takdirde ölçüm yanlış olacağı için kontrolden çıkar ya kendileri hasar görür ya da beslediği devreye zarar verebilir. Bu nedenle uygun akım değerindeki hat filtreleri güç kaynağının DC ucu ile RF yükselteç arasına yerleştirilmiştir. Hat filtreleri normalde anahtarlama gücü kaynaklarında şehir şebekesine gürültü kaçmasını engellemek amacıyla kullanılan pasif filtrelerdir ve kesim frekansları kHz mertebesinde. Burada ise RF gürültüsünün güç kaynağı içine istenmeyen etkisini engellemek amacıyla kullanılmıştır.

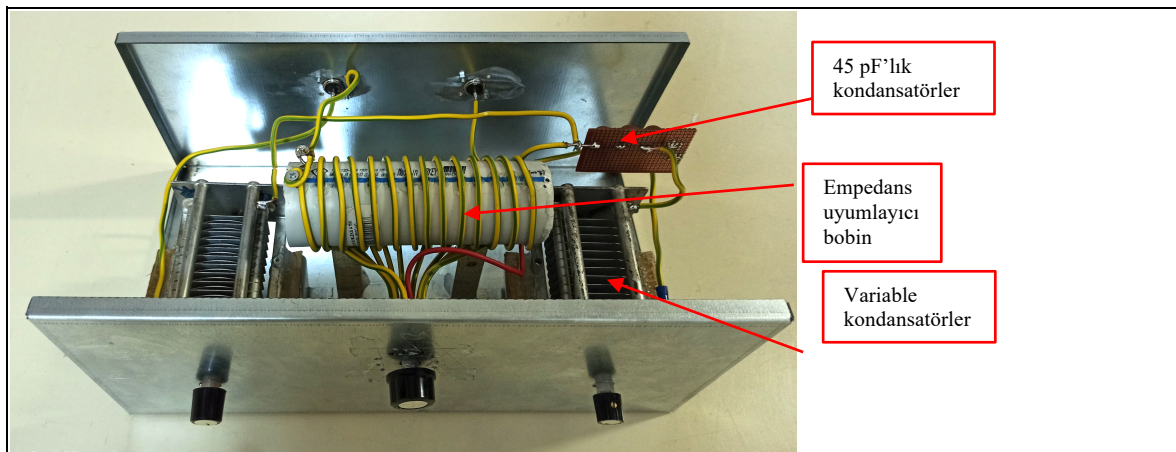
4.1.5. Empedans uyumlayıcı (matching unit) tasarımı ve yapımı

Çalışmanın bu aşamasında, RF sürücü ve yükselteçten elde edilen RF sinyallerinin geri yansımaları (reflected power) ile devrelerin zarar görmemesi ve değerlerin sağlıklı ölçülebilmesi için empedans uyumlayıcı devre tasarlanmış ve ölçümleri yapılmıştır (Şekil 4.2). Radyofrekans devrelerinde çıkışta üretilen tüm gücün yük üzerinde (pancake veya selenoid bobin) harcanması istenir. Bu şart üreticinin iç direnci ile yükün eşit olması durumunda yerine gelmektedir. Aksi durumda, aktif sistemde üretilen güç kendi üzerinde harcanmakta ve transistörlerinin eklemlerinde aşırı bir sıcaklık yükselmesine neden olarak transistörler hasar görebilmektedir. Bu durumun doğal sonucu olarak geri yansıyan güç arttıkça üretilen enerji de yük üzerine aktarılamamış olmaktadır. Kayıp güç değerlerini en aza indirebilmek için bir empedans uyumlayıcı (matching unit) sistem gerekmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Empedans uyumlayıcı (matching unit) devre şeması ve devre elemanlarının kapasitif ve indüktif değerleri (LC metre üzerindeki ölçüm değerleri net görünmediğinden tekrar yazılmıştır)

Ölçümleri ve testleri gerçekleştirilen empedans uyumlayıcı devre elemanlarının sabitlenmesi için montajı ve metal kutulaması yapılmıştır (Resim 4.5).



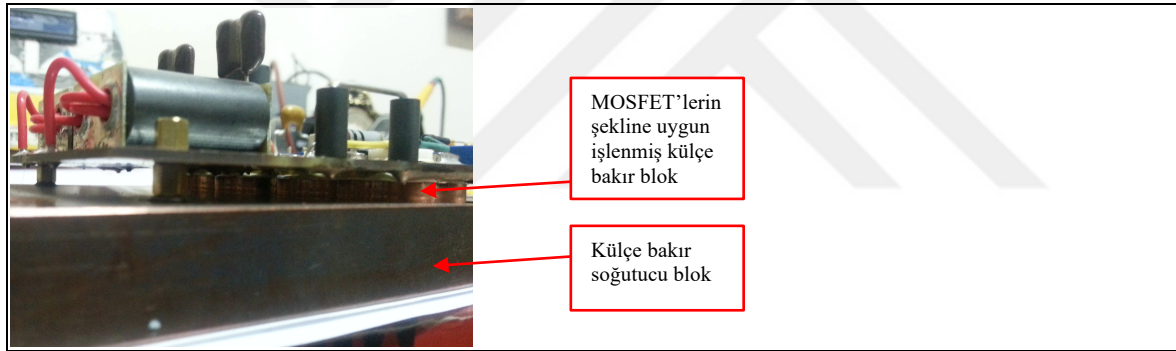
Resim 4.5. Montajı ve metal kutulaması yapılmış empedans uyumlayıcı

Radyofrekans yükselteç devrelerinin çıkışı sadece dirençten oluşmadığı için devre çıkışında biyolojik örnekler (veya malzemelere) RF alan iletecek endüktif (pancake bobin) ve

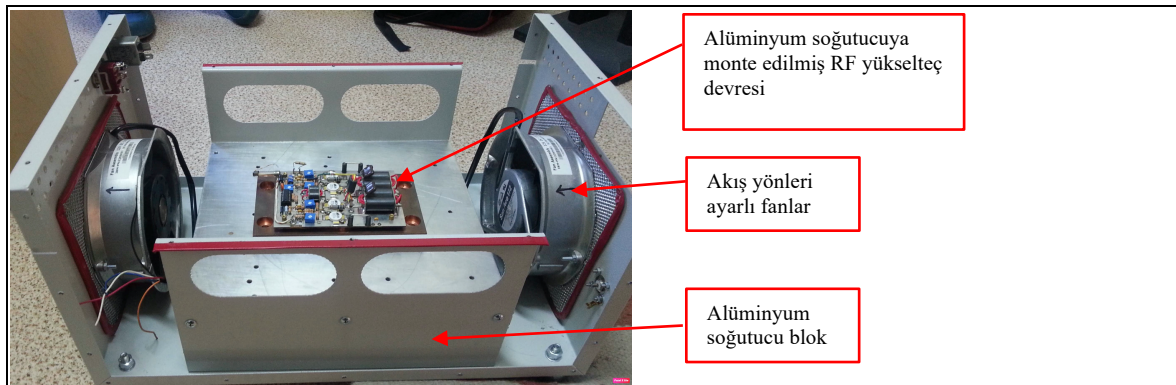
kapasitif yükler bulunmaktadır. Basitçe Resim 4.5'te gösterilen sistemde amaç "Giriş" tarafından görülen empedansın yükselteç devresinin "Çıkış" empedansına (50Ω) eşitlemektir.

4.1.6. Soğutma sistemi

Radyofrekans güç devrelerinde üretilen gücün büyük bir bölümü ısıya dönüşür. Yüksek güçlerde çalışan sistemlerde oluşan ısı oldukça önemli bir sorundur. Metal oksit yarı iletken alan etkili transistörler (MOSFET) öncelikle bir külçe bakır (Resim 4.6) üzerine yerleştirilmiş, daha sonra bu bakır plaka da termal macun ile alüminyum soğutucuya monte edilmiştir (Resim 4.7). Güç katında soğutma önemli bir problem olduğundan metal kutu içine iki fan yerleştirilmiştir. Bunlardan bir tanesi metal kutu içine doğru hava akışı sağlarken diğeri içeriden dışarı yönde akış sağlayacak şekilde yerleştirilmiştir (Resim 4.7).



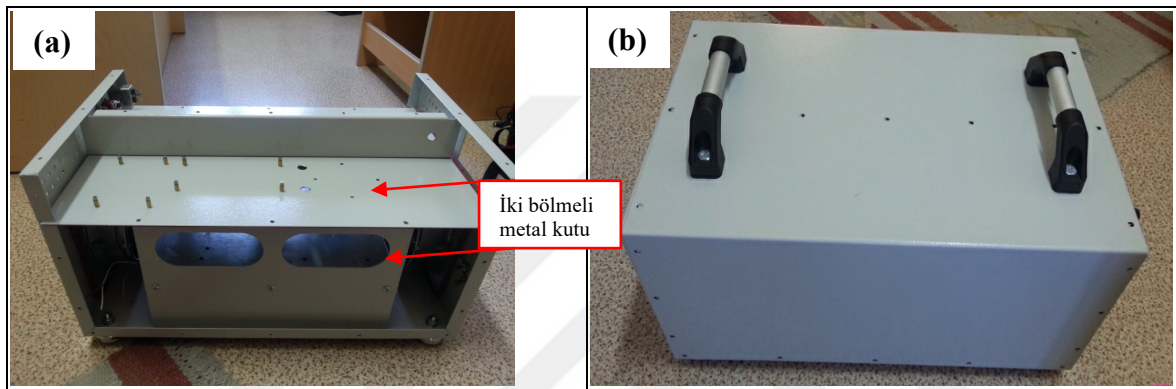
Resim 4.6. RF yükselteç devresinin külçe bakır blok üzerine montajı



Resim 4.7. RF yükselteç devresinin alüminyum blok üzerine monte edilmesi ve soğutma sistemi

4.1.7. Metal kutu

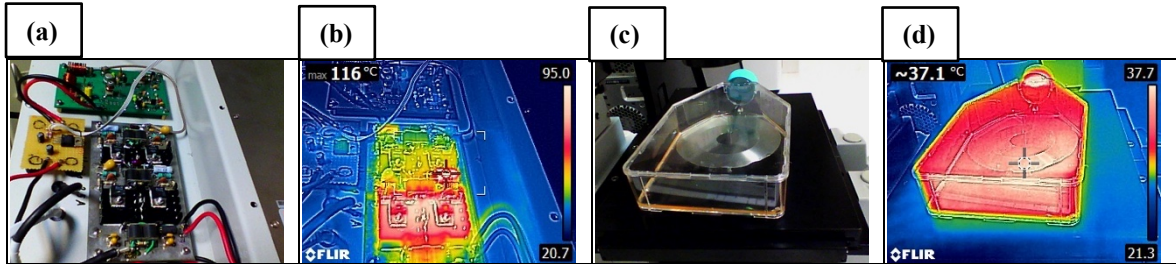
Elektronik cihazlarda parazit oluşumunu ve/veya çalışanın elektromanyetik alandan etkilenmesini önlemek amacıyla metal kutulama yapılmıştır (Resim 4.8). Kutu tasarımı, RF devreleri için önem arz etmektedir. Bu nedenle kutu bölmelendirilmiş, osilatör ve RF sürücü üst bölme, RF yükselteç alt bölme yerleştirilecek şekilde tasarlanmıştır (Resim 4.8a). Böylelikle devrelerin birbirini etkileme olasılığı azaltılmıştır. Ayrıca, statik yük birikimini önlemek için metal kutu üzerinden tek noktada topraklama gerçekleştirilmiştir.



Resim 4.8. (a) Bölümlendirilmiş metal kutu, (b) Metal kutu kapalı iken görünüm

4.1.8. Sıcaklık ölçüm sistemi

Biyolojik örneklerde sıcaklık değeri ölçümü, termal kamera (Flir E6, İsveç) yardımıyla gerçekleştirilmiştir (Resim 4.9d). Ayrıca, RF sürücü ve yükseltici devre elemanları üzerinde oluşabilecek aşırı sıcaklığı (Resim 4.9b) kontrol edebilmek ve önlem alabilmek için termal kamera ile devrelerin sıcaklık ölçümleri yapılmıştır.



Resim 4.9. (a), (b) RF yükselteç devresinde oluşan sıcaklığın dijital ve termal kamera görüntüleri; (c), (d) inkübatörden çıkarıldıktan hemen sonra T98G hücrelerinin dijital ve termal kamera görüntüleri

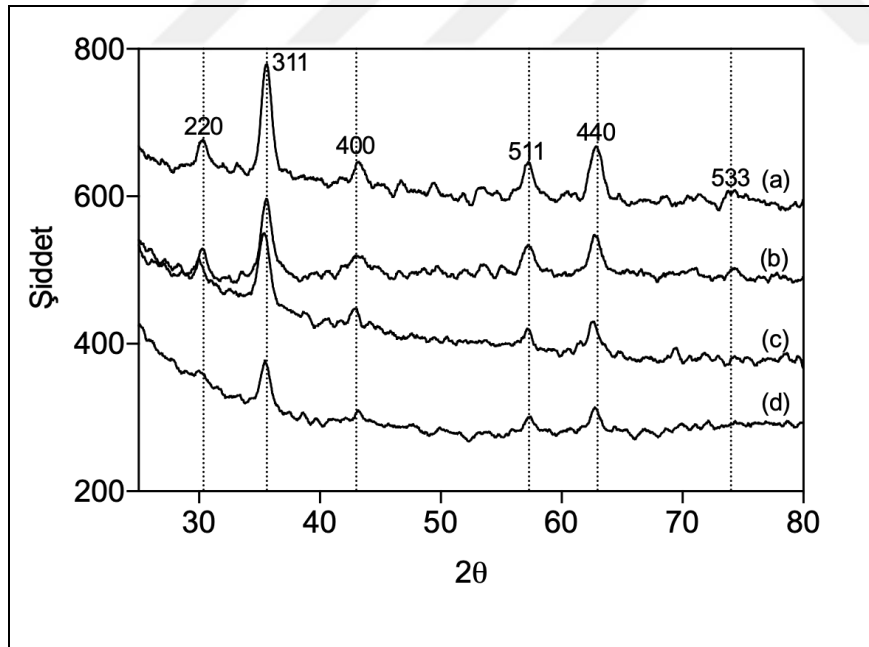
4.2. Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartiküllerin (SPDON'ların) Üretimi ve Karakterizasyonuna ait Bulgular

4.2.1. SPDON'ların ikili çöktürme yöntemi ile üretimi ve karakterizasyonuna ait bulgular

İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen, SPDON ve oleik asit (%0,2; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların karakterizasyon çalışmalarında; XRD, ATR-FTIR, TGA, TEM, DLS, VSM ve indüksiyon ısıtma deneyleri yapılmış ve bu analizlere ait bulgular aşağıda verilmiştir.

X-ışını kırınımı (XRD) analizi

Şekil 4.3'te SPDON ve oleik asit (OA) kaplı SPDON'ların XRD grafikleri gösterilmektedir. Demir oksit nanopartiküllerin kristal yapıları (220), (311), (400), (511), (440) ve (533) düzlemlerinde; 30,36°; 35,60°; 43,51°; 57,29°; 62,96° ve 74,16° karakteristik 2θ piklerinde görülmüştür (Şekil 4.3).



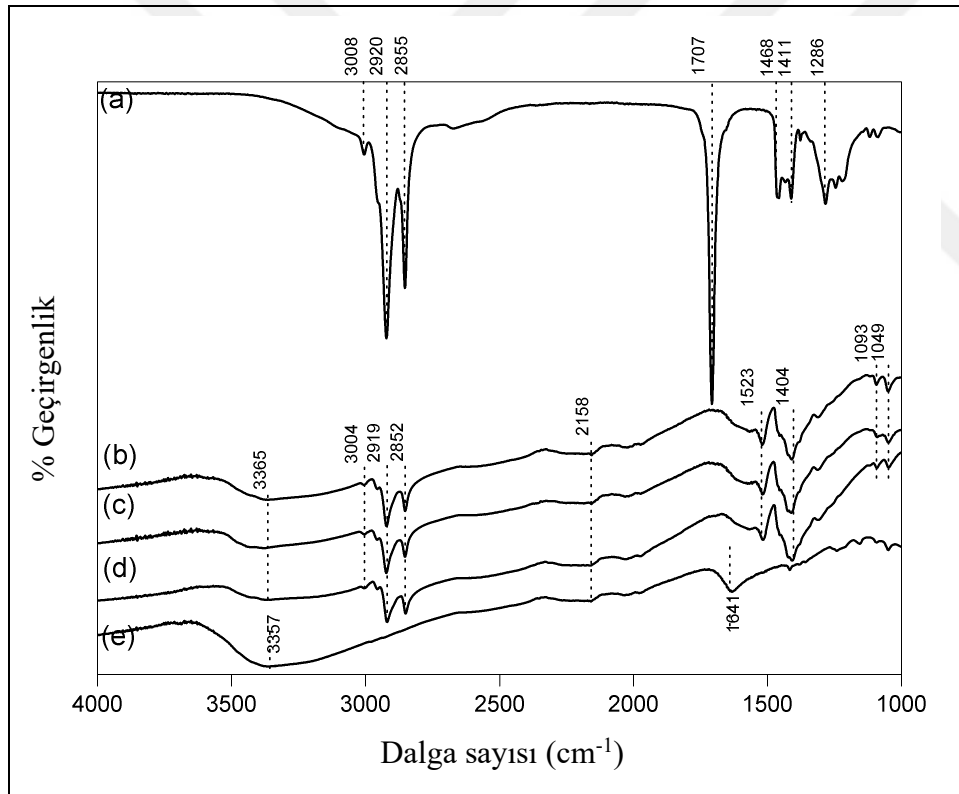
Şekil 4.3. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen (a) SPDON, (b) SPDON+%0,2OA, (c) SPDON+%0,5OA, (d) SPDON+%1OA nanopartiküllerine ait XRD grafikleri

Şekil 4.3b-d'de oleik asit miktarı arttıkça, OA kaplı SPDON'ların (311) pik şiddetleri azalarak pik genişlikleri artmış ve bu durum en net %1OA içeren Şekil 4.3d'de görülmüştür. Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1) kaplı SPDON'ların ortalama kristal boyutları

Scherrer eşitliği (Bkz. Eş. 3.1) kullanılarak hesaplanmış ve sırasıyla; 8,30; 9,30; 10,40 ve 11,10 nm olarak bulunmuştur.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Şekil 4.4'te oleik asit, oleik asit kaplı ve OA içermeyen SPDON'ların ATR-FTIR spektrumları gösterilmiştir. Oleik asit spektrumunda, Şekil 4.4a'da 2920 ve 2855 cm^{-1} 'de görülen iki keskin pik sırasıyla, asimetrik ve simetrik $-\text{CH}_2$ gerilmelerine aittir. 1707 cm^{-1} 'de görülen keskin pik C=O titreşim gerilimini, 1286 cm^{-1} oleik asitin C-O gerilimini, 1468 cm^{-1} O-H düzlem içi bandını, 1411 cm^{-1} CH_3 'ün şemsiye modunu (CH_3 umbrella mode) göstermektedir [181-185].



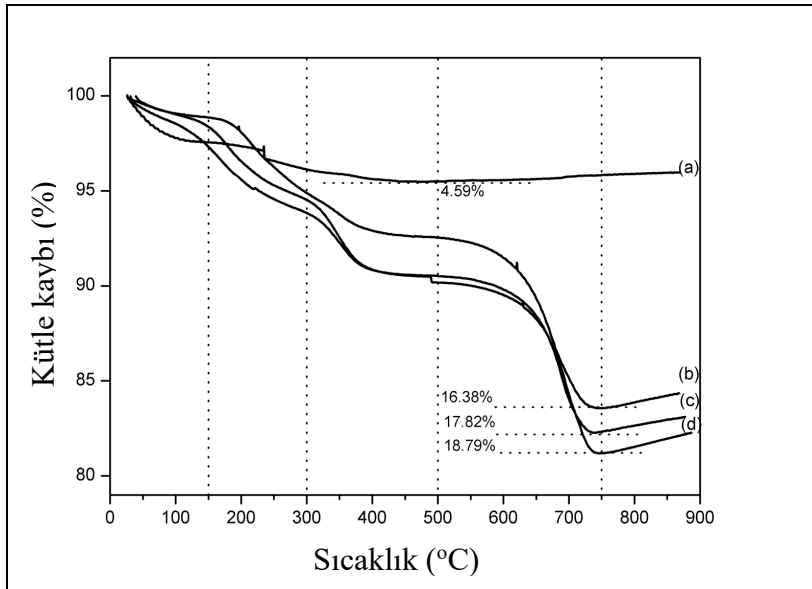
Şekil 4.4. (a) Oleik asit, b) SPDON+%0,2OA, c) SPDON+%0,5OA, d) SPDON+%1OA, (e) SPDON'ların ATR-FTIR spektrumları.

Şekil 4.4b-d'de farklı derişimlerde OA (%0,2; %0,5; %1, h/h) kaplı SPDON'ların ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. İkili çöktürme yöntemiyle sentezlenen SPDON'ların yüzeyleri sulu ortamda gerçekleştirilen sentez nedeniyle hidroksil gruplar ile kaplanmıştır. Bu hidroksil grupların 3357 ve 1641 cm^{-1} 'deki karakteristik pikleri OA içermeyen SPDON'larda da görülmüştür (Şekil 4.4e). Oleik asit kaplı SPDON'ların asimetrik ve

simetrik $-\text{CH}_2$ gerilme piklerinde daha düşük frekanslara (2919 ve 2852 cm^{-1}) kayma görülmüştür (Şekil 4.4b-d). Bu durum, SPDON'ları çevreleyen hidrokarbon zincirlerinin sıkı-paketler oluşturduğu anlamına gelmektedir [181, 184, 186, 187]. Oleik asit'in $\text{C}=\text{O}$ titreşim gerilimini gösteren keskin piki (1707 cm^{-1}), OA kaplı SPDON'larda kaybolarak yerine Fe^{+3} bağlı karboksil grupların asimetrik ve simetrik 1523 ve 1404 cm^{-1} gerilme titreşimleri gelmiştir. Bu titreşimler, demir atomları ve oleik asitin karboksil grupları arasındaki bağların kurulduğunu göstermekte ve demir oksit nanopartiküllerin OA ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir [181, 182, 188].

Termogravimetrik (TGA) analiz

Oleik asit içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların ısısal karakteristik özellikleri termogravimetrik analiz ile belirlenmiştir (Şekil 4.5a-d). Başlangıçta, tüm nanopartiküllerde 150°C 'nin altında suyun dehidrasyonundan kaynaklı %1-2 kütle kaybı görülmüştür (Şekil 4.5, Çizelge 4.1). Oleik asit içermeyen SPDON'larda $200-400^\circ\text{C}$ aralığında hidroksil gruplarının yüzeyden uzaklaşmasına bağlı olarak %2,1'lik bir kütle kaybı görülmüştür (Şekil 4.5a).



Şekil 4.5. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen (a) SPDON, (b) SPDON+%0,2OA, (c) SPDON+%0,5OA, (d) SPDON+%1OA nanopartiküllerin TGA termogramları

Oleik asit kaplı SPDON'ların kütle kayıpları üç aşamada (derivasyonda) gerçekleşmiştir. İlk aşamada ($150-300^\circ\text{C}$) serbest veya zayıf bağlı OA'nın yapıdan uzaklaşması ile ~%4'lük kütle kaybı gözlenmiştir. İkinci aşamada ($300-500^\circ\text{C}$) kimyasal olarak SPDON'lara

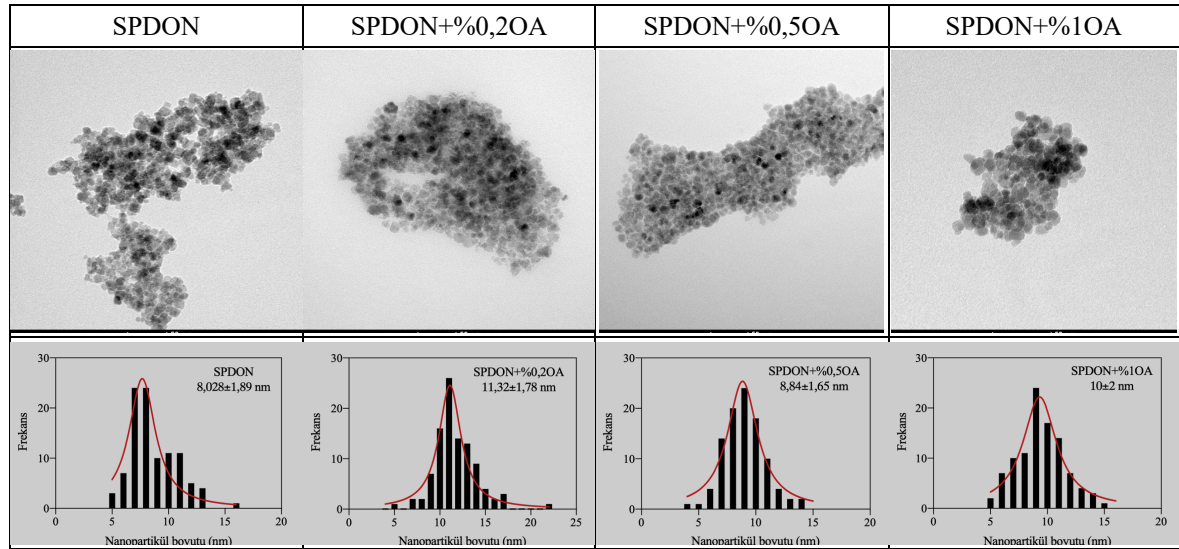
bağlanmış OA'dan kaynaklı $\sim 3,5$ kütle kaybı görülmüştür. Üçüncü aşamada ($500-750^{\circ}\text{C}$) gerçekleşen ~ 9 'luk kütle kaybı ise, SPDON yüzeyine daha güçlü tutunan OA tabakasından kaynaklanmaktadır (Şekil 4.3b-d; Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. TGA grafiğinden (Şekil 4.5) elde edilen sonuçlar

NPs	Başlangıç kütle kaybı (%) (0-150°C)	İlk kütle kaybı(%) (150-300°C)	İkinci kütle kaybı(%) (300-500°C)	Üçüncü kütle kaybı(%) (500-750 °C)	Toplam kütle kaybı(%)
SPDON	2,50	2,1 (200-400°C)	----	----	4,6
SPDON+%0,2OA	1,15	3,95	2,38	8,9	16,38
SPDON+%0,5OA	2,50	3,64	3,36	8,32	17,82
SPDON+%1OA	1,58	3,86	4,35	9	18,79

Geçirimli elektron mikroskobu (TEM) analizi

Oleik asit içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların boyutları ve morfolojileri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile belirlenmiştir (Şekil 4.6). Oleik asit içermeyen SPDON'ların ortalama çapları ~ 8 nm olup topaklanma eğiliminde oldukları görülmüştür (Şekil 4.6a). TEM görüntülerinin altında bulunan histogramlardan OA (%0,2; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların çap değerleri, sırasıyla ~ 12 , ~ 9 ve 10 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.6b-d).



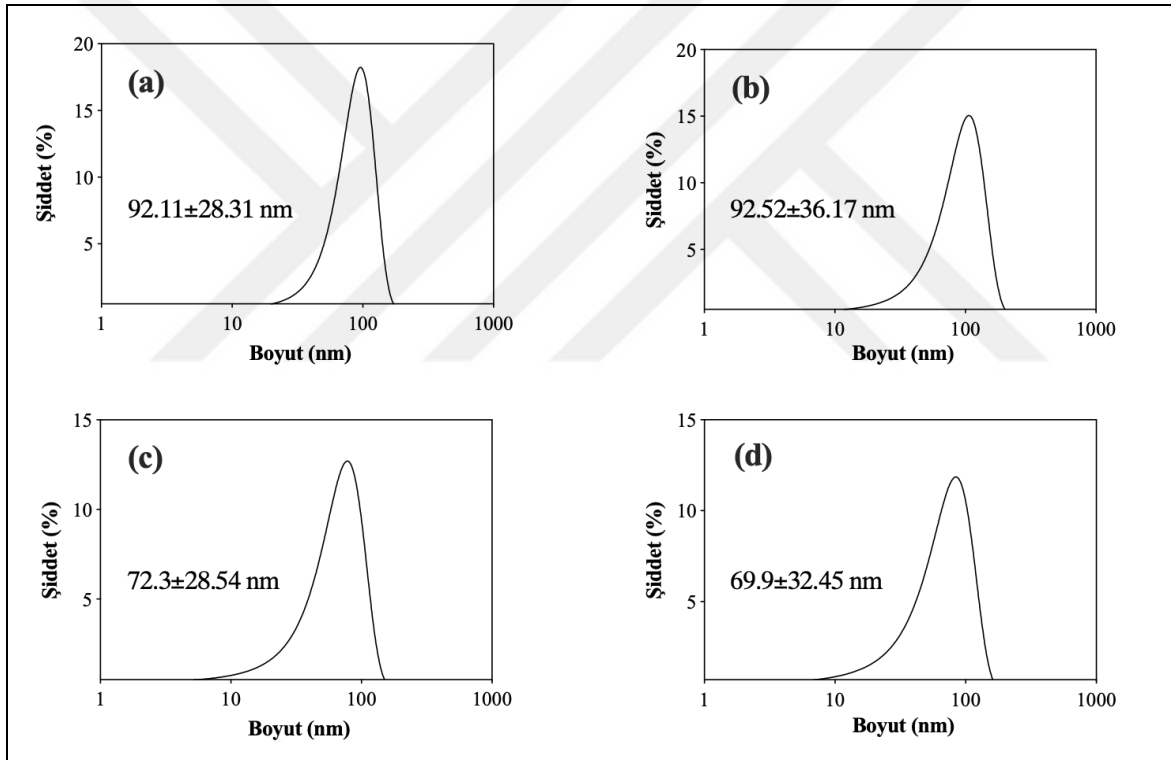
Şekil 4.6. Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) TEM görüntüleri ve boyut dağılım histogramları

Bu sonuçlar, OA kaplamanın SPDON'ların ortalama çaplarını önemli ölçüde değiştirmedığı ve XRD sonuçları (boyut) ile uyumlu olduğunu göstermektedir. TEM görüntülerinde, OA

miktarı arttıkça (özellikle, %1OA), nanopartiküller küresel bir morfoloji göstermişlerdir (Şekil 4.6d).

Dinamik ışık saçılımı (DLS) analizi

Manyetik nanopartiküllerin hidrodinamik boyutu ve boyut dağılımları dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.7). Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1) kaplı SPDON'ların hidrodinamik çapları sırasıyla; ~92, 92, 72 ve 70 nm olarak ölçülmüştür. Oleik asit miktarı arttıkça, özellikle %0,5 ve %1OA kaplı SPDON'ların hidrodinamik boyutlarının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.7c,d).

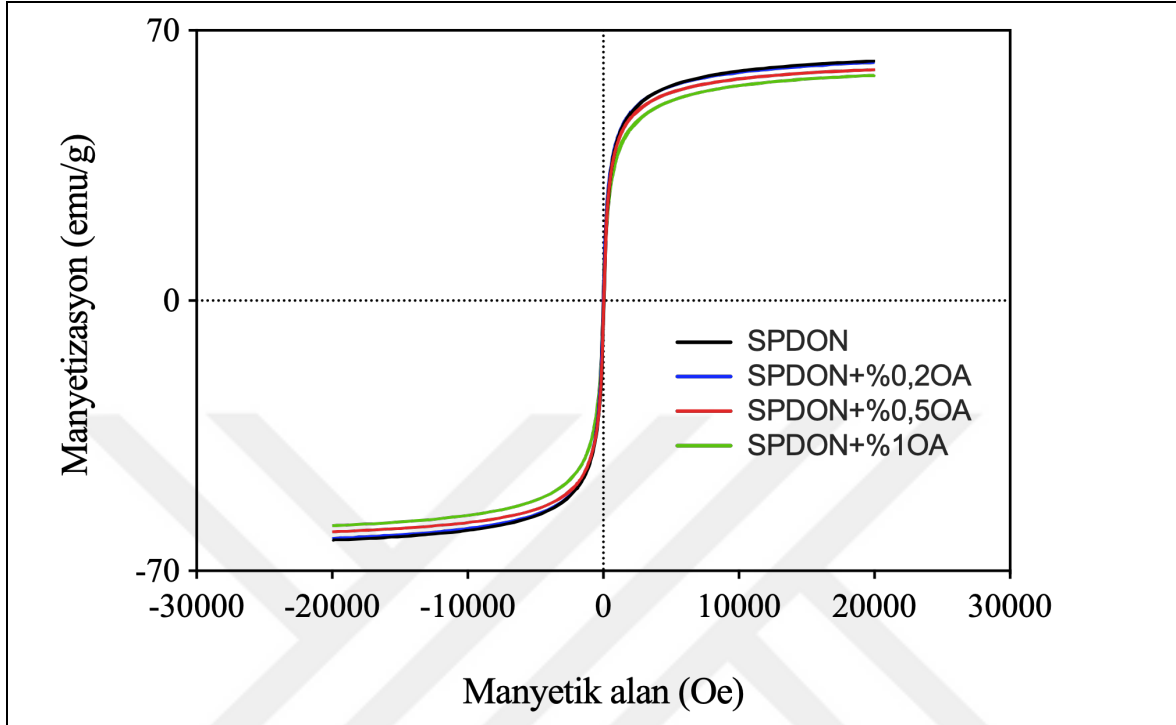


Şekil 4.7. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen a) SPDON, b) SPDON+%0,2OA, c) SPDON+%0,5OA, d) SPDON+%1OA NP'lerin DLS analizleri

Titreşimli örnek manyetometresi (VSM) analizi

Oleik asit içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların manyetik özellikleri, titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ile oda sıcaklığında incelenmiştir (Şekil 4.8). Manyetizasyon eğrilerinden (Şekil 4.8) manyetik nanopartiküllerin koersivite (coercivity) değerlerinin yaklaşık sıfır olduğu ve süperparamanyetik davranış sergilediği görülmüştür. Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların manyetizasyonları (M_s)

sırasıyla, 62; 61,5; 59,5; 58,5 emu/g ölçülmüştür (Şekil 4.8). Oleik asit miktarı arttıkça Ms değerlerinde önemli bir değişim gözlenmemiştir.



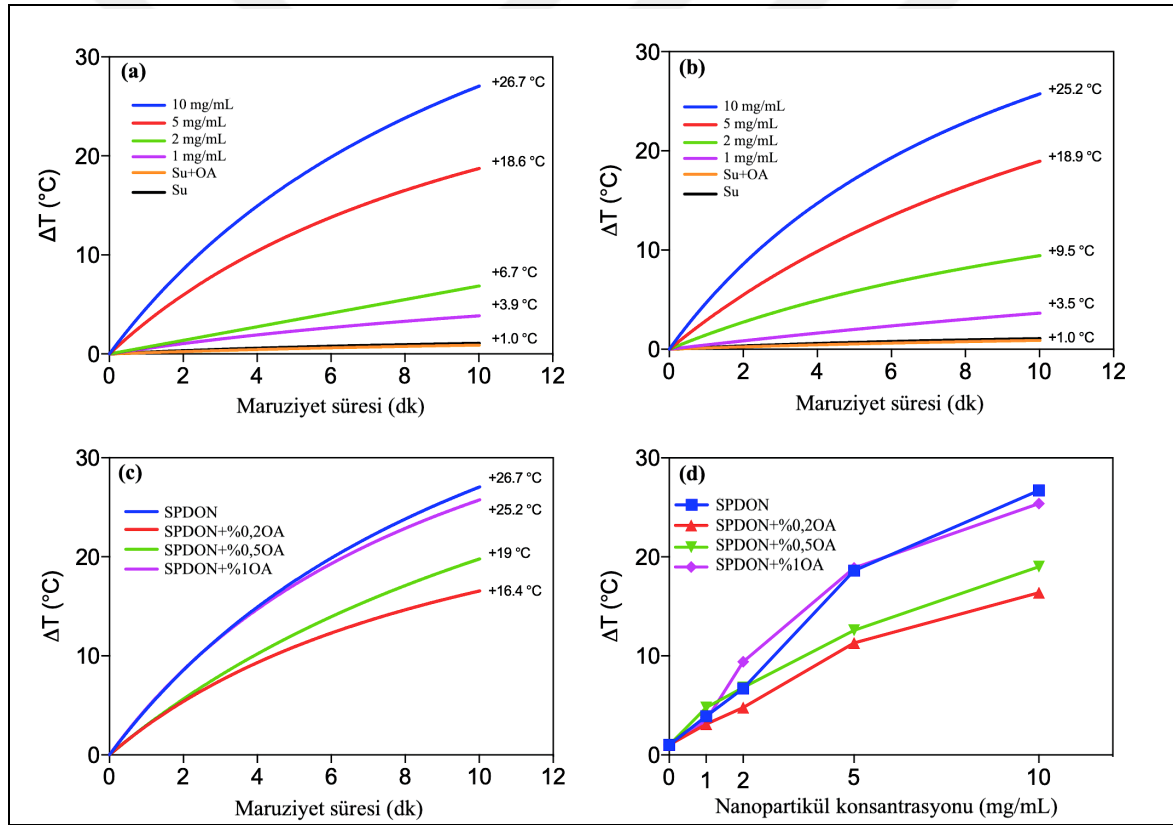
Şekil 4.8. İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen oleik asit (OA) içermeyen ve OA kaplı SPDON'lara ait manyetizasyon eğrileri (tüm analizler oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir)

İndüksiyon ısıtma yeteneği

Ön çalışma olarak gerçekleştirilen indüksiyon ısıtma deneylerinde, ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların, 312 kHz, 100 A manyetik alan maruziyeti altında ısıtma potansiyelleri incelenmiştir. Manyetik nanopartiküllere uygulanan manyetik alan şiddeti 295,5 Oe (23,51 kA/m) olarak hesaplanmıştır (Bkz. Eş. 3.2). Manyetik nanopartiküllerin ısıtma potansiyelini gösteren SAR (spesific absorption rate) değerleri (Bkz. Eş. 3.3) OA içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1) kaplı SPDON'lar için sırasıyla 39,50; 34,81; 23,36 ve 45,98 W/g olarak hesaplanmıştır.

Şekil 4.9a,b'de OA içermeyen ve %1OA kaplı SPDON'ların farklı konsantrasyonlarda (100A, 312 kHz, 10 dk) indüksiyon maruziyeti altında sıcaklık değişim eğrileri verilmiştir. Sıcaklık artışı, süspanse ortamda bulunan manyetik nanopartiküllerin konsantrasyonları ile lineer bir ilişkiye sahiptir. En yüksek dozda (10 mg/mL), SPDON ve SPDON+%1OA

nanopartiküllerin sıcaklık artışları birbirine yakın olup sırasıyla, 26,7 ve 25,2°C olarak bulunmuştur. Şekil 4.9c’de tüm nanopartiküllerin 10 mg/mL konsantrasyonda sıcaklık değişim eğrileri verilmiştir. Burada, %0,2OA ve %0,5OA içeren SPDON’ların sıcaklık artışlarının OA içermeyen ve %1OA içeren nanopartiküllere göre önemli ölçüde düşük olduğu gözlenmiştir. Şekil 4.9d, tüm nanopartikül ortamlarının 10 dk’lık maruziyet sonunda konsantrasyona bağlı olarak sıcaklık değişimlerini göstermektedir. Bu grafikte, düşük dozlarda nanopartiküllerin sıcaklık artışlarının birbirine yakın olduğu, ancak 2 mg/mL derişimden itibaren OA içermeyen SPDON ve %1OA içeren SPDON’ların sıcaklık artışlarının %0,2 ve %0,5OA içeren SPDON’lara göre önemli derecede (~10°C) yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.9d).



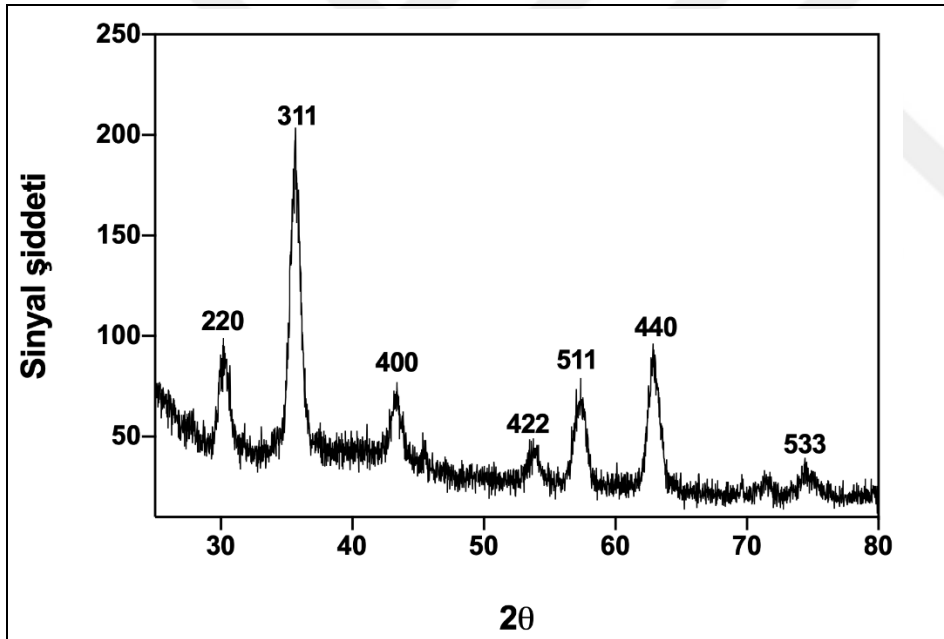
Şekil 4.9. (a),(b) SPDON ve SPDON+%1OA nanopartiküllerin zamana ve doza bağlı sıcaklık değişim eğrileri, (c) 10 mg/mL derişimde tüm nanopartiküllerin zamana bağlı sıcaklık değişim eğrileri, (d) 10 dk. manyetik alan maruziyeti sonrasında tüm nanopartiküllerin doza bağlı sıcaklık değişim eğrileri

4.2.2. SPDON'ların termal ayrıştırma yöntemi ile üretimine ve karakterizasyonlarına ait bulgular

Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların karakterizasyon çalışmalarında; XRD, ATR-FTIR ve TEM analizleri gerçekleştirilmiş ve bu analizlere ait bulgular aşağıda verilmiştir.

X-ışını kırınımı (XRD) analizi

Şekil 4.10'da SPDON'ların XRD grafiği verilmiştir. Demir oksit nanopartiküllerin (220), (311), (400), (422), (511), (440) ve (533) düzlemlerindeki ana karakteristik pikler $30,24^\circ$; $35,6^\circ$; $43,26^\circ$; $45,57^\circ$; $53,7^\circ$; $57,11^\circ$; $62,82^\circ$ ve $74,23^\circ$ 2-teta değerlerinde görülmüştür.

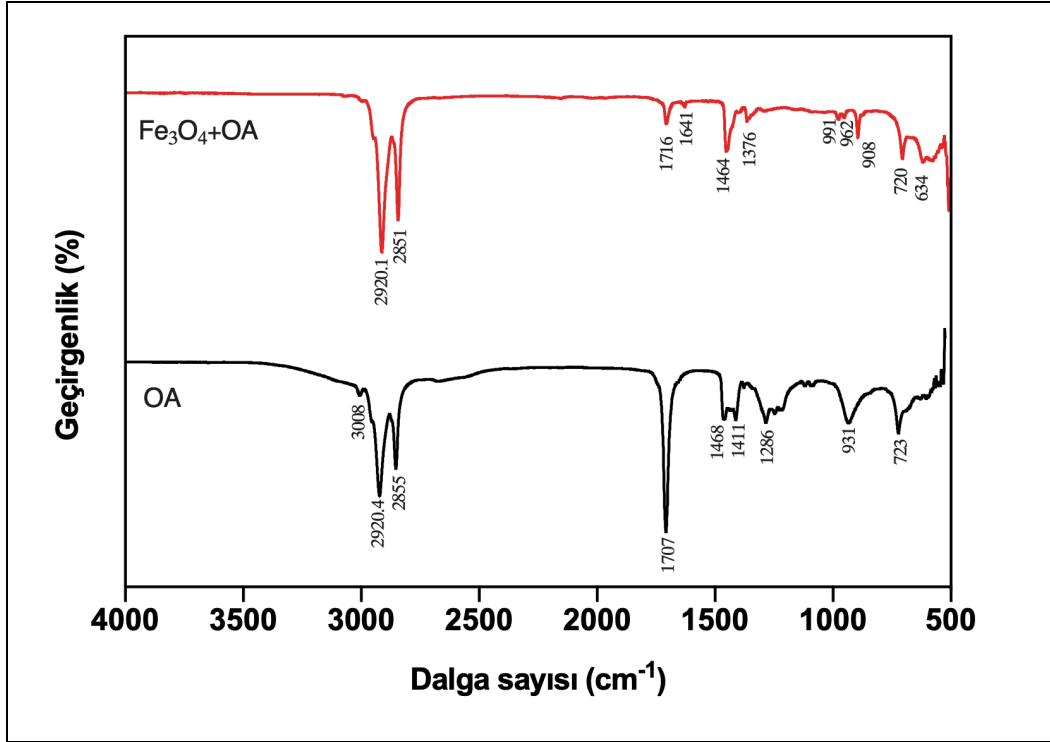


Şekil 4.10. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen OA kaplı SPDON'ların XRD grafiği

Nanopartiküllerin ortalama kristal boyutu, tüm pikler kullanılarak Debye-Scherrer eşitliği (Bkz. Eş. 3.1) ile $8,32 \text{ nm}$ olarak hesaplanmıştır. Örnek, JCPDS 01-075-0449 veritabanı numarası ve basit kübik yapı için uygun olup, paralel kristal düzlemler arası mesafesi $d=2,51 \text{ Å}$ 'dır.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizi

Şekil 4.11’de oleik asit (OA) ve oleik asit kaplı SPDON’lara ait ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Oleik asit spektrumunda, 2855 cm^{-1} ve 2920 cm^{-1} karakteristik pikleri sırasıyla simetrik $-\text{CH}_2$ ve asimetrik $-\text{CH}_2$ gerilmelerini, 1707 cm^{-1} piki asimetrik $-\text{C}=\text{O}$ gerilmesini, 1286 cm^{-1} piki C-O gerilmesini göstermektedir.

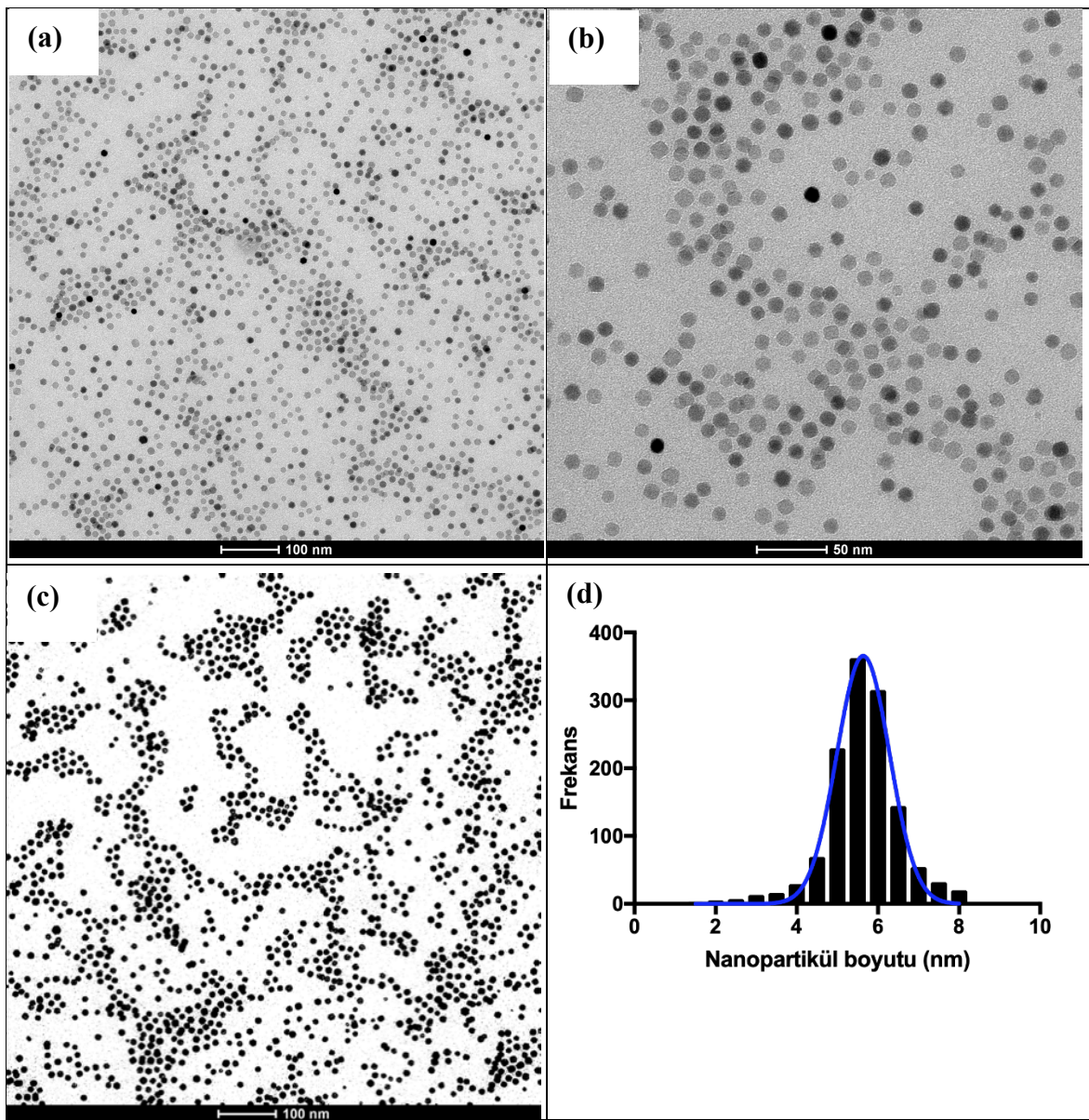


Şekil 4.11. Oleik asit ve termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen OA kaplı SPDON’ların ATR-FTIR grafiği

Oleik asit kaplı SPDON’ların ATR-FTIR spektrumu incelendiğinde, simetrik $-\text{CH}_2$ ve asimetrik $-\text{CH}_2$ gerilmelerine ait pikler 2851 cm^{-1} ve 2920 cm^{-1} ’de görülmüştür. Oleik asit kaplı SPDON’ların simetrik $-\text{CH}_2$ gerilme pikinin (2851 cm^{-1}) daha düşük dalga sayısında görülmesi, oleik asit moleküllerinin katı yüzeye adsorplandığını ve hidrokarbon moleküllerinin SPDON yüzeyini kapladığını göstermektedir [181]. Ayrıca, 1641 cm^{-1} ve 1464 cm^{-1} pikleri karboksilat grupların asimetrik ve simetrik gerilmelerine ait olup, demir atomları ve oleik asit arasındaki bağların kurulduğunu göstermektedir [124, 181, 188, 189].

Geçirimli elektron mikroskop (TEM) analizi

Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların TEM görüntüleri Şekil 4.12a-c'de verilmiştir. Nanopartikül agregasyonları ikili çöktürme sentez yöntemine (Bkz. Şekil 4.6) göre büyük çoğunlukla önlenmiş ve homojen dağılımlı, küresel morfolojide nanopartiküller elde edilmiştir. Nanopartiküllerin boyutları "ImageJ" yazılım programı ile $5,63 \pm 0,85$ nm olarak hesaplanmış ve SPDON'lara ait boyut dağılım histogramları Şekil 4.12d'de verilmiştir.



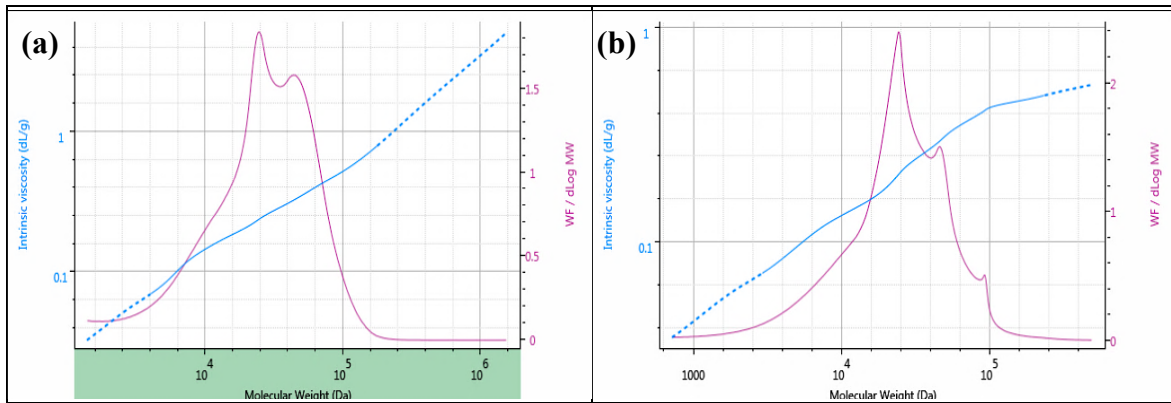
Şekil 4.12. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar (a,b) farklı büyütme ölçeklerinde TEM görüntüleri, (c) ImageJ ile boyut analizi yapılan TEM görüntüsü, (d) boyut analiz histogramı

4.3. PLGA-b-PEG Kopolimeri Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezi gerçekleştirilen PLGA-b-PEG ko-polimerin karakterizasyon çalışmaları; büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC), Proton-NMR (^1H -NMR) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizlerini içermektedir. Analiz gerekçeleri ve bulgular aşağıda açıklanmıştır.

4.3.1. Büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC) Analizi

Büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC), molekülleri büyüklüklerine göre ayırabilen kromatografik bir yöntemdir. Bu yöntem ile PLGA ve PLGA-b-PEG ko-polimerlerinin molekül ağırlıkları ve molekül ağırlığı dağılımları elde edilmiştir (Şekil 4.13, Çizelge 4.2). Elde edilen molekül ağırlıkları sentezlenen PLGA-b-PEG polimerinin pegilasyon verimi hesabında kullanılmıştır. PLGA polimerinin sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) 15,450 Da iken PLGA-b-PEG kopolimerinin M_n değeri 14,420 Da olmuştur. Sayıca ortalama molekül ağırlığı (M_n) polimer örneğindeki moleküllerin toplam kütesinin örnekteki mol sayısına bölünmesi ile hesaplanır. Ağırlıkça ortalama molekül ağırlığı (M_w) ise, sayıca ortalama molekül ağırlığından (M_n) her zaman yüksek değer göstermektedir. PDI ise polimerin zincir uzunluklarının birbirine ne kadar yakın olduğunun bir göstergesidir ve değeri M_w/M_n olarak bulunur. PLGA polimerinin PDI değeri 2,256 iken bu değer PLGA-b-PEG kopolimerinde 2,187 olarak GPC kromatogramından belirlenmiştir.



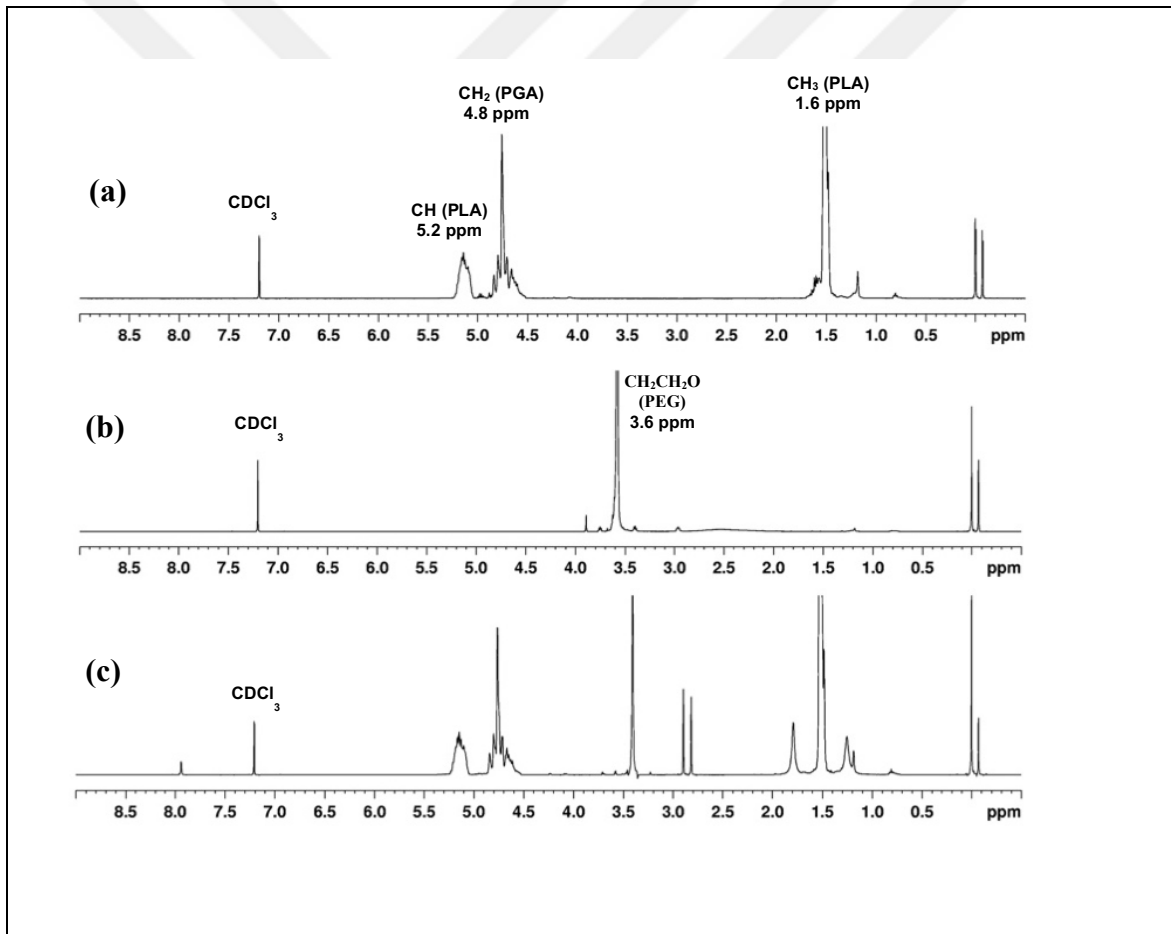
Şekil 4.13. GPC kromatogramları; a) PLGA b) PLGA-b-PEG

Çizelge 4.2. PLGA ve PLGA-b-PEG polimerlerinin M_n , M_w ve PDI değerleri

Polimer	M_n (Da)	M_w (Da)	PDI (M_w/M_n)
PLGA (50:50)	15,450	34,860	2,256
PLGA-b-PEG	14,420	31,540	2,187

4.3.2. Proton-NMR (^1H -NMR) analizi

Büyükölçek ayırma kromatografisi yöntemi ile moleköl ağırlıkları tespit edilen polimerlerin ^1H -NMR spektrumu kullanılarak pegilasyon verimleri hesaplanmıştır. Şekil 4.14'te PLGA, PEG ve PLGA-b-PEG polimerlerinin ^1H -NMR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.14a'da 1,6 ppm'de görülen pik laktik asitin tekrarlayan metil grupları (d,-CH₃) ile ilişkilidir. Ayrıca, 5,2 ppm ve 4,8 ppm'deki pikler laktik asitten gelen CH-CH₃ ve glikolik asitten gelen CH-H yapıları ile ilgilidir. Şekil 4.14b'de 3,6 ppm piki PEG zincirinin metilen gruplarına aittir. Şekil 4.14c'de ise sentezi gerçekleştirilen PLGA-b-PEG kopolimerinin, PLGA ve PEG polimer piklerine sahip olduğu gösterilerek pegilasyon doğrulanmıştır [180].

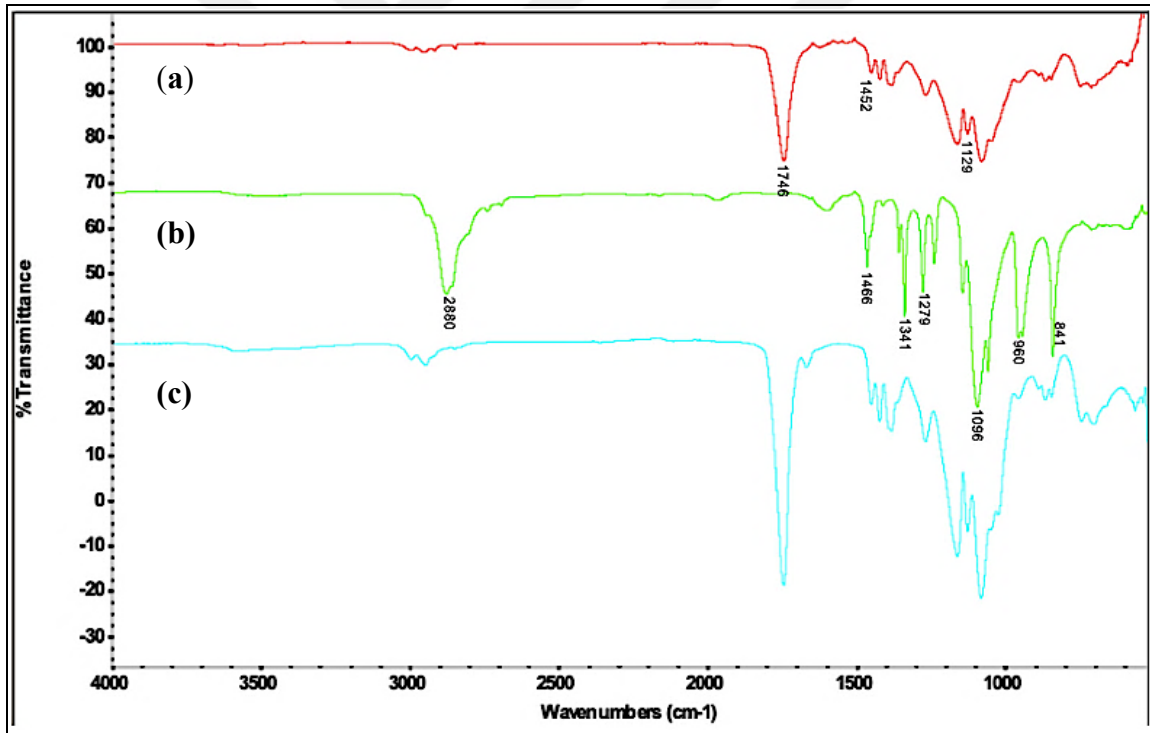


Şekil 4.14. ^1H -NMR spektrumu (a) PLGA, (b) PEG, (c) sentezlenen PLGA-b-PEG kopolimeri karakteristik piklerinin grafiği

PLGA-b-PEG kopolimerinin pegilasyon verimi (Bkz. Eş. 3.4) ~%50, üretim verimi ise (Bkz. Eş. 3.5) ~%80 hesaplanmıştır.

4.3.3. ATR- FTIR analizi

Şekil 4.15'te PLGA, PEG ve PLGA-b-PEG polimerlerine ait ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.15a'da gösterilen PLGA spektrumuna ait karakteristik pikler; 1746 cm^{-1} C=O gerilmesine, 1129 cm^{-1} ve 1452 cm^{-1} sırasıyla C-O-C grubu ve metil grubunun C-H bağına aittir. Şekil 4.15b'de PEG spektrumunda karakteristik pikler; 2880 cm^{-1} CH, CH₂ ve CH₃ gruplarının gerilmelerine, 1466 cm^{-1} ve 1341 cm^{-1} C-H bağına, 1279 cm^{-1} ve 1096 cm^{-1} C-C-O gerilmelerine aittir. Şekil 4.15c'de PLGA-b-PEG polimeri spektrumu PLGA spektrumuna oldukça benzemektedir. Bu durum PLGA-PEG sentezi sırasında çok az miktarda PEG eklenmesiyle açıklanabilir [190]. PLGA-b-PEG spektrumunda baskın olan PLGA yapısı olmasına rağmen PEG'den gelen 960 cm^{-1} ve 841 cm^{-1} C-C-O harmonikleri, PEG'in PLGA yapısına başarılı bir şekilde katıldığını göstermektedir.



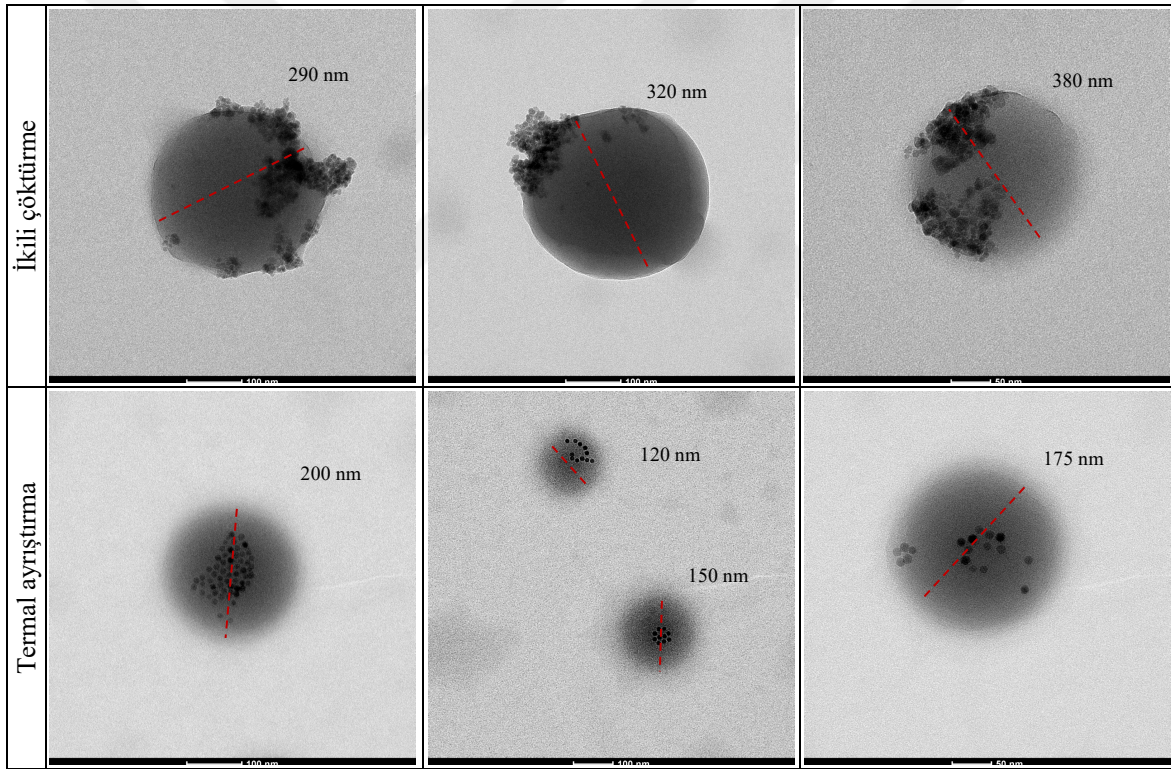
Şekil 4.15. (a) PLGA, (b) PEG, (c) sentezlenen PLGA-b-PEG kopolimerine ait ATR-FTIR spektrumları

4.4. Temozolomid Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Sentezine ve Karakterizasyonuna ait Çalışmalar

Temozolomid (TMZ) yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemine (Bkz. Bölüm 3.5) göre sentezlenmiştir. Tekli emülsiyon-çözücü

buharlaştırma yöntemi, polimer ve etken madde içeren organik faz ve yüzey aktif madde içeren su fazından oluşmaktadır. Özetle, PLGA polimeri ve TMZ etken maddesi organik çözücünde (diklorometan) çözülerek yüzey aktif madde (polivinil alkol, PVA) içeren sulu faza aktarılmış ve elde edilen karışım homojenizatör ile emülsifiye edilmiştir. Daha sonra, organik çözücü buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmış ve nanopartikül oluşumu sağlanmıştır.

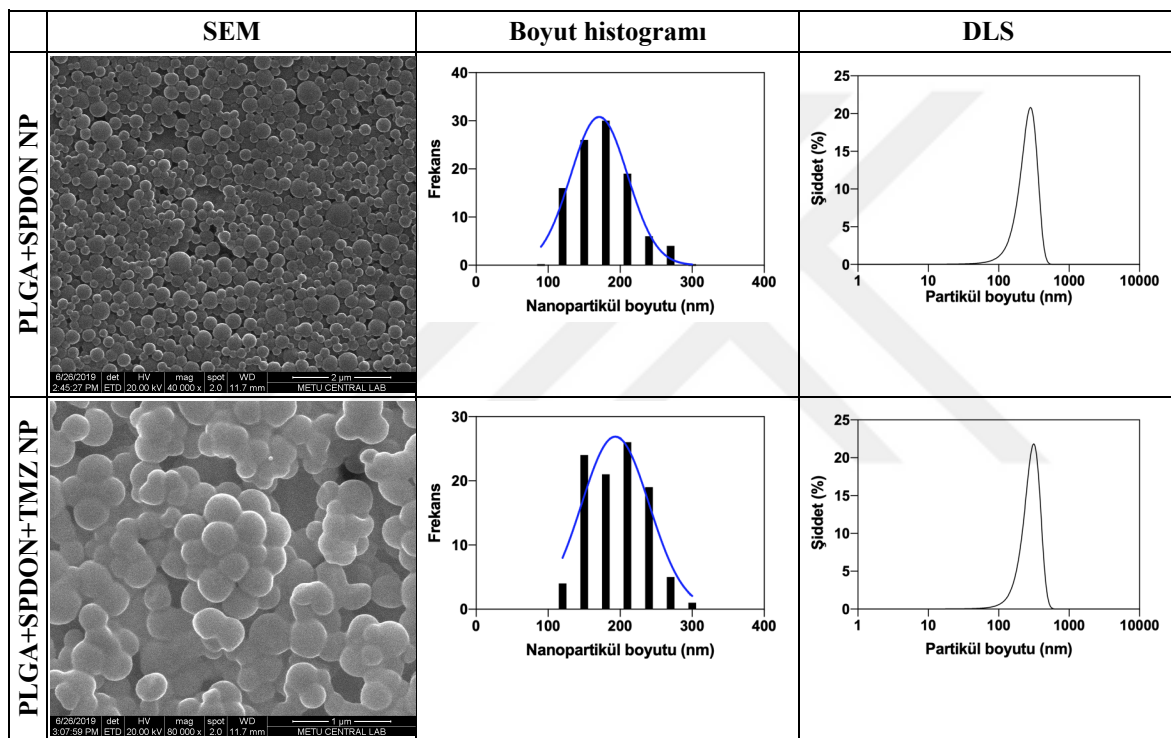
Öncelikle, ikili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenen SPDON'ların PLGA kaplamaları sonrasında (TMZ içermeyen manyetik PLGA NP'ler) TEM görüntüleri ve ImageJ programı ile boyut ölçümleri verilmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. İkili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenen SPDON'ların PLGA kaplamaları sonrasında TEM görüntüleri ve ImageJ programı ile boyut ölçümleri

Şekil 4.16'da ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların, PLGA ile kaplandıktan sonra, büyük oranda polimer yüzeyinde yer aldıkları görülmüş ve homojen bir polimer kaplama gerçekleşmemiştir. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların ise küresel morfolojide, homojen dağılımlı polimer kaplamalarının gerçekleştiği görülmüştür (Şekil 4.16). Ayrıca, termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar kullanılarak üretilen manyetik PLGA NP'lerin TEM görüntülerine göre çapları 120-200 nm aralığında

olup, bu NP'lerin ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen manyetik PLGA NP'lerin boyutlarından (290-380 nm) daha küçük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, ikili çöktürme ile sentezlenen SPDON'lar her ne kadar oleik asit ile kaplanmış olsa da manyetik PLGA NP'lerin üretimi sırasında agregasyon sorunu tam çözülememiştir. Ancak, termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar sentezin gerçekleştirildiği diklorometan (DCM) çözücüsünde çok iyi bir şekilde dağılmışlardır. Yukarıda açıklanan gerekçelerden ötürü, manyetik PLGA nanopartiküllerin sentezi için devam eden çalışmalarda termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'lar kullanılmıştır.



Şekil 4.17. TMZ içermeyen ve TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lere ait SEM görüntüleri, ImageJ boyut analizleri ve DLS analizleri

Temozolomid içermeyen ve TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin çapları, çap dağılımları ve morfolojileri taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile incelenmiştir (Şekil 4.17). Nanopartiküllerin SEM görüntüleri kullanılarak boyut histogramları 'Imagej' programı ile çizilmiş ve hidrodinamik boyutları, hidrodinamik çap dağılımları ise dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile belirlenmiştir (Şekil 4.17). Sentezleri gerçekleştirilen TMZ içermeyen ve TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin SEM görüntülerinden küresel morfolojide oldukları görülmüştür. Temozolomid içermeyen manyetik PLGA NP'lerin ortalama çapları SEM ve DLS analizlerine göre sırasıyla 171 ve 283 nm olarak bulunmuştur. Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP'lerin ortalama çapları ise SEM ve DLS

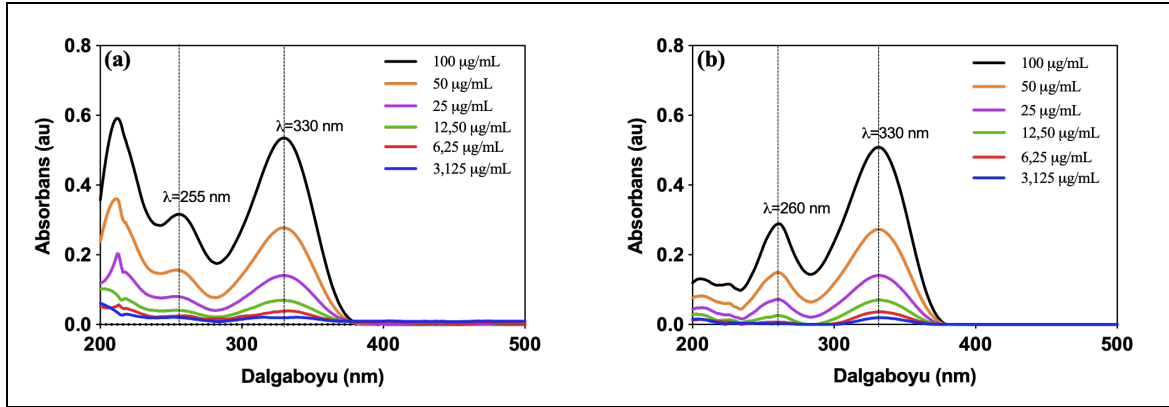
analizlerine göre sırasıyla 193 ve 284 nm olarak bulunmuştur. Aynı nanopartiküllerin, ortalama çaplarının elektron mikroskobu (TEM, SEM) ve DLS analizleri ile farklı çıkması, bu karakterizasyon yöntemlerinin çalışma prensiplerinden kaynaklandığı daha önceden SPDON'lar (ikili çöktürme) üzerinden açıklanmıştı. Bu farklılığa ilave olarak, elektron mikroskop analizlerinde örneklerin kuru formda analiz edilmesi, ancak DLS ile sulu ortamda, örneklerin şişmiş halde analiz edilmesi eklenebilir [181, 191].

4.4.1. TMZ'nin UV spektrometre analizleri

Temozolomid, fizyolojik pH'da 3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-karboksamid (MTIC) aktif bileşenine kendiliğinden hidrolize olur. Bu aktif bileşen (MTIC) ise 5-amino-imidazol-4-karboksamide (AIC) ve aktif alkilleyici bir tür olan metildiazonyum katyonuna (MC) hidrolize olur. Temozolomid'in stabil bir ilaç olmaması nedeniyle, farklı çözücü ortamlarındaki davranışı zamana ve doza bağlı olarak incelenmiştir. Bu amaçla, öncelikle TMZ'nin sulu ve DMSO çözücü ortamlarındaki doza bağlı ultraviyole (UV) spektrumları, ardından, zamana ve doza bağlı olarak stabilite testleri, son olarak da kalibrasyon doğruları çıkarılmıştır.

TMZ'nin UV spektrumu

Temozolomid'in farklı konsantrasyonlarda (0-100 $\mu\text{g/mL}$) PBS ve DMSO çözeltilerinde UV spektrumları Şekil 4.18a,b'de verilmiştir. Her iki çözelti içerisinde TMZ piki 330 nm dalgaboyunda, degradasyon ürünleri 3-metil-(triazen-1-il)imidazol-4-karboksamid ve 5-amino-imidazol-4-karboksamide (MTIC/AIC) ait pikler ise PBS ortamında 255 nm, DMSO ortamında 260 nm dalgaboylarında görülmüştür. Temozolomid derişimi arttıkça her iki çözelti içerisinde de TMZ ve degradasyon ürünlerinin (MTIC/AIC) absorbands değerleri artmıştır. Temozolomid'in UV spektrometre ile tespit edilebildiği en düşük doz değeri $\sim 10 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Şekil 4.18'de verilen grafikler TMZ'nin PBS ve DMSO çözücü ortamlarında seri dilüsyonu yapıldıktan hemen sonra ($t=0$.saat) gerçekleştirilen ölçümlerdir. Temozolomid ve bozunma ürünlerinin zamana bağlı olarak davranışları bir sonraki bölümde stabilite testleri ile incelenmiştir.

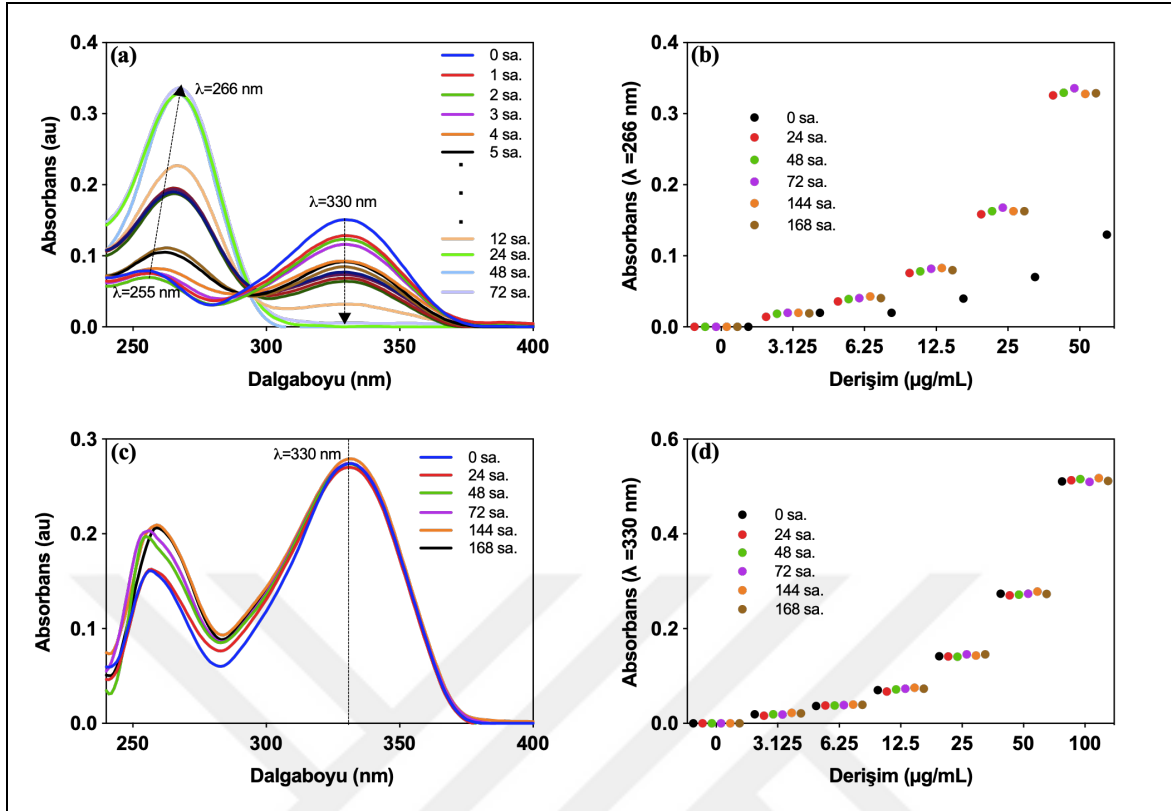


Şekil 4.18. TMZ'nin farklı derişimlerde (a) PBS (pH:7,4) içerisinde, (b) DMSO içerisinde UV spektrumları

TMZ stabilite testi

Temozolomid'in farklı konsantrasyon ve zamanlarda PBS (pH:7,4) ve DMSO çözeltileri içerisindeki stabiliteleri Şekil 4.19'da verilmiştir. Şekil 4.19a'da 50 µg/ml TMZ'nin PBS (pH:7,4) çözeltisinde zamanla (0-72 saat) bozunma eğrileri verilmiştir. Temozolomid, PBS çözeltisinde degradasyon ürünlerine (MTIC/AIC, 255/266 nm) ilk 24 saatte hızlıca bozunmakta ve 24 saat sonra ortamda sadece AIC (266 nm) bulunmaktadır. Bozunma ürünleri piki, ilk saatlerde 255 nm'den yüksek dalga boylarına doğru kaymaya başlamış ve 5. saatten itibaren ise artık tamamen 266 nm'de görülmüştür (Şekil 4.19a). Gerek salım deneylerinde TMZ miktar tespiti için, gerekse süpernatant ortamından enkapsülasyon verimi hesaplayabilmek için, TMZ veya AIC'nin farklı derişimlerde zamanla stabilitesini koruması gerekmektedir. Bu amaçla, Şekil 4.19b'de TMZ'nin son bozunma ürünü olan AIC'nin (266 nm) farklı derişimlerde zamanla değişimi incelenerek, AIC'nin 24. saat ve ilerleyen zamanlarda (48, 72, 144, 168. saat) 266 nm'de stabilitesini koruduğu görülmüştür (Şekil 4.19b).

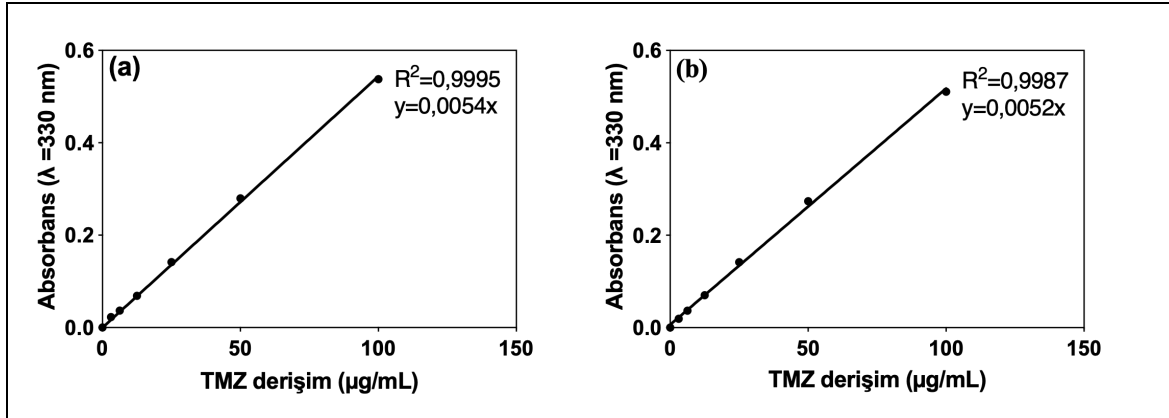
Şekil 4.19c'de 50 µg/ml TMZ'nin DMSO içerisinde zamanla (0-168 saat) bozunma eğrileri verilmiştir. Temozolomid (330 nm) pikinin DMSO çözeltisinde zamanla değişmediği görülmüştür. Şekil 4.19d'de ise 0-100 µg/ml derişim aralığında TMZ'nin 330 nm'de zamanla değişimi incelenmiş ve aynı derişimlerde TMZ'nin zamanla stabilitesini koruduğu net bir şekilde görülmüştür. Sonuç olarak, nanopartiküllerin içerisine enkapsüle olmuş TMZ miktarının belirlenmesinde, DMSO ile hazırlanmış TMZ kalibrasyon doğrusunun daha doğru sonuç vereceği sonucuna ulaşılmıştır.



Şekil 4.19. (a) PBS (pH:7,4) içersinde 50 µg/ml TMZ'nin zamanla bozunma eğrileri, (b) PBS (pH:7,4) içersinde farklı derişimlerde AIC (266 nm)'nin zamanla stabilite grafiğı, (c) DMSO içersinde 50 µg/ml TMZ'nin zamanla bozunma eğrileri, (d) DMSO içersinde farklı derişimlerde TMZ (330 nm)'nin zamanla stabilite grafiğı

TMZ'nin UV spektrometre ile kalibrasyon doğruları

Şekil 4.20a,b'de TMZ'nin, PBS (pH:7,4) çözeltisinde ve DMSO çözeltisinde 330 nm'de kalibrasyon doğruları çıkarılmıştır. Temozolomid'in, PBS çözeltisinde 330 nm dalgaboyunda zamanla stabil olmadığı gösterilmiştir (Bkz. Şekil 4.19a). Ancak, süpernatant ortamından enkapsülasyon verim hesabı için nanopartiküller sentezlendikten hemen sonra UV ölçümleri yapılarak enkapsülasyon verimleri değerlendirilmiştir. Temozolomid, DMSO çözeltisi içersinde 330 nm dalgaboyunda stabilitesini korumuş (Bkz. 4.19c,d) ve kalibrasyon grafiğı Şekil 4.20b'de verilmiştir.

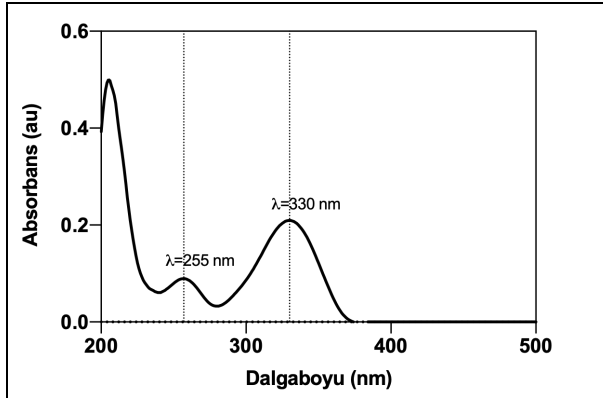


Şekil 4.20. UV spektrometre ile TMZ kalibrasyon eğrileri (a) PBS içerisinde 330 nm, (b) DMSO içerisinde 330 nm (n=5)

4.4.2. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin UV spektrometre ile enkapsülasyon verimleri

Temozolomid yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri UV spektrometre ile direkt ve indirekt yöntemler (Bkz. Bölüm 3.9.1) kullanılarak hesaplanmıştır. İndirekt yöntemde; nanopartiküller sentezlendikten sonra yıkama aşamalarında süpernatantlar toplanmış ve süpernatanda kalan TMZ konsantrasyonu, PBS çözeltisinde kalibrasyonu yapılmış doğru denklemden (Bkz. Şekil 4.20a) yararlanılarak hesaplanmıştır. Şekil 4.21'de örnek olması açısından, TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez sonrası süpernatandan elde edilen UV spektrumu verilmiştir. Bu spektrumdan indirekt yöntem ile hesaplanan TMZ enkapsülasyon verimi %70 bulunmuştur. Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentezlendikten hemen sonra UV spektrometre analizleri yapıldığından, Şekil 4.21'de TMZ (330 nm) ve bozunma ürünü olan MTIC (255 nm) pikleri aynı anda tespit edilebilmiştir. Sonuç olarak, indirekt yöntem ile hesaplanan TMZ enkapsülasyon verimleri %50-%70 arasında değişen oranlarda bulunmuştur (n=20).

Direkt yöntemde; nanopartiküller liyofilize edildikten sonra DMSO çözeltisinde kalibrasyonu yapılmış doğru denklemden (Bkz. Şekil 4.20b) yararlanılarak enkapsülasyon verimleri hesaplanmıştır. Direkt yöntemle göre hesaplanan enkapsülasyon verimleri ise %1-%20 arasında değişmekte olup, ölçümlerin tekrar edilebilirliği düşük çıkmıştır (n=20).



Şekil 4.21. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez sonrası süpernatandan (ultra saf su içerisinde) elde edilen UV örnek spektrumu

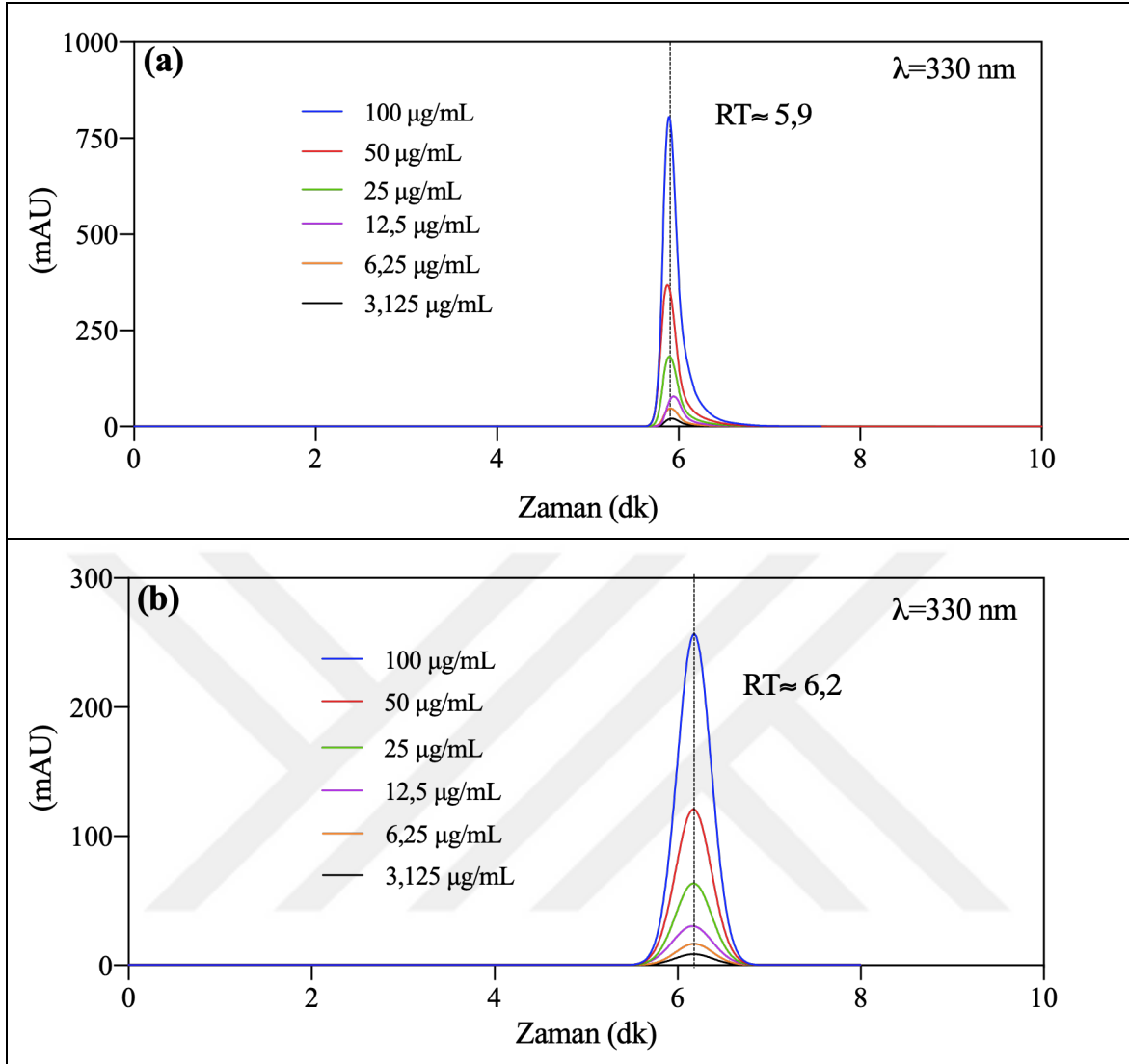
Ultraviyole (UV) spektrometre ile gerçekleştirilen TMZ enkapsülasyon verimi analizleri, karşılaştırma yapmak amacıyla daha hassas bir yöntem olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile de gerçekleştirilmiştir.

4.4.3. TMZ'nin HPLC ile analizleri

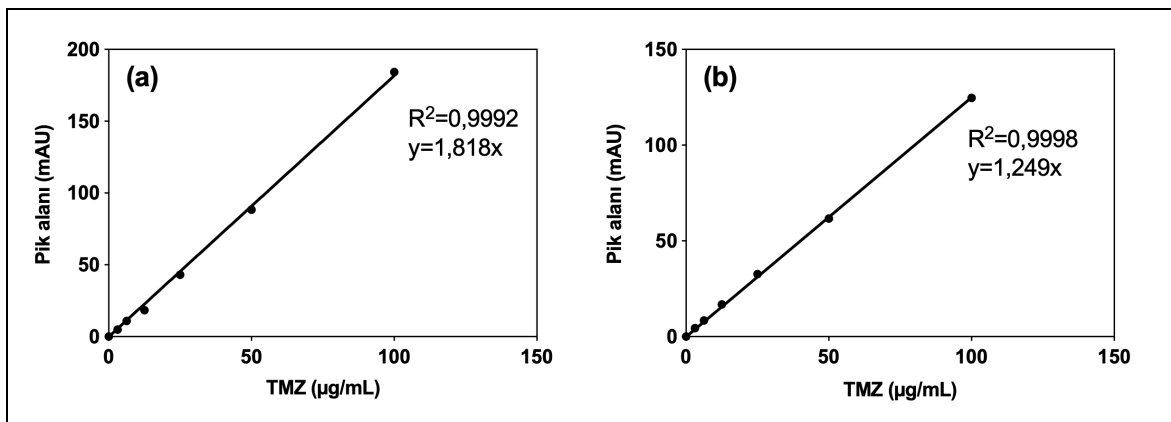
Temozolomid yüklü nanopartiküllerin HPLC ile enkapsülasyon verimleri (%EE) indirekt ve direkt yöntemler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu amaçla, TMZ'nin mobil faz (indirek yöntem) ve asetonitril:mobil faz (direkt yöntem) çözücü sistemlerinde HPLC kromatogramları çıkarılmıştır (Şekil 4.22a,b).

Şekil 4.22a'da TMZ'nin mobil faz içerisinde, 330 nm dalgaboyunda, alıkonma süresi (retention time, RT) tüm derişimlerde (0-100 µg/ml) ~5,9 dakika olarak bulunmuştur. Şekil 4.22b'de ise asetonitril:mobil faz (ACN:MP, 1:4) içerisinde tüm derişimlerde (0-100 µg/ml) TMZ'nin alıkonma süresi ve pik genişliği azda olsa artmış ve RT 6,2 dakika olarak belirlenmiştir.

Temozolomid'in, MP ve ACN:MP (1:4) ortamlarında elde edilen kromatogramlarından, her bir derişime karşılık gelen pik alan değerleri kullanılarak kalibrasyon doğruları ve %EE hesabı için kalibrasyon denklemleri elde edilmiştir (Şekil 4.23).



Şekil 4.22. (a) Mobil faz (MP) ve (b) asetonitril:mobil faz (ACN:MP, 1:4) ortamlarında farklı derişimlerde TMZ'nin HPLC kromatogramları



Şekil 4.23. HPLC ile TMZ kalibrasyon eğrileri (a) mobil faz, (b) asetonitril:mobil faz (1:4)

4.4.4. TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez parametreleri ve HPLC ile enkapsülasyon verimleri

Temozolomid yüklü manyetik PLGA nanopartiküller tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentezlenmiştir. Sentez aşamaları ve formülasyon parametreleri detaylı olarak Bölüm 3.5'teki yöntem kısmında anlatılmıştır. Bu bölümde, değiştirilen sentez parametrelerinin açıklamaları ve HPLC yöntemi ile kromatogramları çıkarılan nanopartiküllerin enkapsülasyon verimleri (%EE, indirekt/direkt) her bir formülasyon için çizelgelerde gösterilmiştir.

Çizelge 4.3'te kırmızı çerçeveye alınan parametreler; bir önceki formülasyona göre değiştirilen sentez parametresini göstermektedir. Bu değişiklikler (Çizelge 4.3 için), sırasıyla; TMZ miktarının arttırılması (F2), dilüsyon fazının çıkarılması (F3-F6), homojenizatörün değiştirilmesi (F4-F6), SPDON miktarının düşürülmesi (F5,F6), organik:su fazı oranının (1:1'den 1:2 ve 1:5) çıkarılması (F5,F6) şeklindedir.

Çizelge 4.3. Nanopartikül sentez parametreleri ve % EE

Kod	TMZ (mg)	SPDON (mg)	PLGA (mg)	Organik faz:su fazı:dilüsyon fazı (mL:mL:mL)	Su fazı PVA (%w/v)	Dilüsyon fazı PVA (%w/v)	Emülsifikasyon kaynağı (zaman,güç/hız)	TMZ %EE (supernatan)	TMZ %EE (NP'den)
F1	2	25	50	4:4:50	3	0.3	Ultra sonikatör (30s, %90A)	~42	~1
F2	5	25	50	4:4:50	3	0.3	Ultra sonikatör (30s, %90A)	~40	~1
F3	5	25	50	4:50:0	2	--	Ultra sonikatör (30s, %90A)	~45	~1
F4	2.5	25	50	4:4:0	1	--	Ultra turaks (10 dk, 15000 rpm)	~50	~1
F5	2.5	5	50	3:6:0	1	--	Ultra turaks (10 dk, 15000 rpm)	~32	~1
F6	2.5	5	50	3:15:0	1	--	Ultra turaks (10 dk, 15000 rpm)	~24	~1

Nanopartikül formülasyonlarında yapılan değişiklikler neticesinde supernatandan hesaplanan enkapsülasyon verimleri (%EE) ile nanopartikülden elde edilen %EE değerleri doğrulanamamıştır (Çizelge 4.3). Enkapsüle edilen TMZ miktarının nanopartikül içerisinden (direkt yöntem) belirlenmesinin daha doğru sonuç vereceği düşünülerek sentez formülasyonlarının geliştirilmesine devam edilmiştir.

Literatürde, TMZ'nin enkapsülasyon etkinliğini artırmak için su fazını etken madde (TMZ) ile sature eden çalışmalar yer almaktadır [135, 136]. Su fazının, TMZ ile doymun hale

getirilmesi, konsantrasyon gradientini azaltarak, nanopartikülden su fazına TMZ difüzyonunu azaltabilir. Su fazı doymuş hale getirilerek gerçekleştirilen formülasyonlar ve %EE değerleri Çizelge 4.4'te sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Su fazı saturasyonu ile sentezlenen nanopartiküller ve %EE değerleri

Kod	Su fazı TMZ doyurma	TMZ (mg)	SPDON (mg)	PLGA (mg)	Organik faz:su fazı (h/h, mL)	SU fazı PVA (%a/h)	Emülsifikasyon güç kaynağı	TMZ %EE (supernatan)	TMZ %EE (NP'den)
F7	2 mg TMZ	2.5	5	50	3:6	1	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~86	~2
F8	5 mg TMZ	2.5	5	50	3:15	1	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~47	~4

F8 formülasyonunda, nanopartikülden hesaplanan %EE yaklaşık dört kat artmıştır. Fakat TMZ enkapsülasyon verimi (%4) yeterli olmayıp formülasyon parametrelerinde literatür bilgileri ışığında değişikliğe devam edilmiştir. Çizelge 4.3 ve 4.4'te TMZ'nin indirekt yöntem (supernatan) ile hesaplanan %EE yüksek olmasına rağmen nanopartikül içerisinden hesaplanan değerler düşüktür.

PLGA'da bulunan hidroksil grupları ile TMZ'nin NH₂ gruplarının güçlü bağ yapmış olabileceği düşünülerek nanopartikül içerisinden TMZ ekstraksiyonunu kolaylaştırmak için iyi bir bağ kırıcı olan asetik asit (9,5:0,5; 9:1; 8:2; polimer:asetik asit, h/h) ve hidrofobik matrikste enkapsülasyonu arttırabileceği düşünülen stearik asit (8:2, h/h) organik faza ilave edilerek çeşitli sentezler gerçekleştirilmiştir (Çizelge 4.5) [192].

Çizelge 4.5. Organik faza asit ilave edilerek hazırlanan formülasyonlar ve %EE değerleri

Kod	Organik faza eklenen asit (h/h)	TMZ (mg)	SPDON (mg)	PLGA (mg)	Organik faz:su fazı (h/h, mL)	Su fazı PVA (%a/h)	Emülsifikasyon güç kaynağı	TMZ %EE (supernatan)	TMZ %EE (NP'den)
F9	--	1	1	10	2:20	0.2	Ultra turaks (10 dk, 15 000 rpm)	~12	~1
F10	9:1 (PLGA:sterik asit)	1	1	10	2:20	0.2	Ultra turaks (10 dk, 15 000 rpm))	~24	~1
F11	9,5:0,5 (PLGA:asetik asit)	1	1	10	2:20	0.2	Ultra turaks (10 dk, 15 000 rpm)	~8	~1
F12	9:1 (PLGA:asetik asit)	1	1	10	2:20	0.2	Ultra turaks (10 dk, 15 000 rpm)	~13	~1
F13	8:2 (PLGA:asetik asit)	1	1	10	2:20	0.2	Ultra turaks (10 dk, 15 000 rpm)	~35	~1

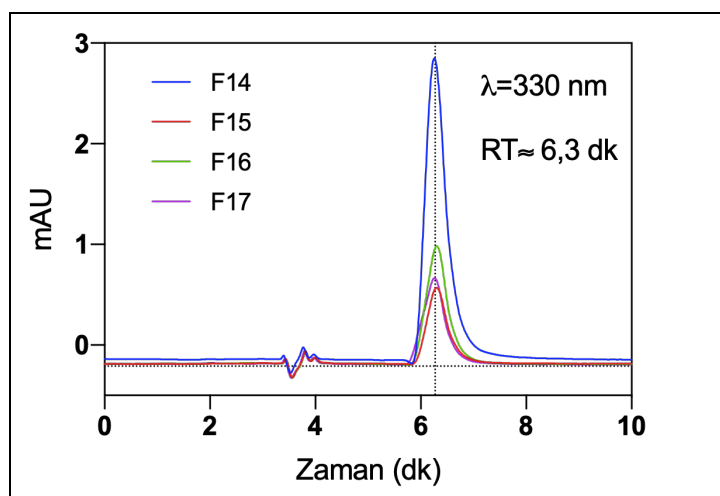
Çizelge 4.5'te yapılan formülasyon çalışmalarında nanopartikül içerisinden %EE değerlerinde herhangi bir artış görülmemiştir.

Çizelge 4.3-5'te gerçekleştirilen tüm formülasyonların organik fazında molekül ağırlığı 30 000-60 000 olan PLGA polimeri kullanılmıştır. Çizelge 4.6'da gerçekleştirilen sentez çalışmalarında düşük ve yüksek molekül ağırlıklı PLGA'nın enkapsülasyon verimine etkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.6. Düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı PLGA içeren nanopartikül formülasyonları

Kod	PLGA(mg), (laktik:glisolik), (Mw)	TMZ (mg)	SPDON (mg)	Organik faz:su fazı (v/v, mL)	Su fazı PVA (%a/h, Mw)	Emülsifikasyon güç kaynağı	TMZ %EE (supernatan)	TMZ %EE (NP'den)
F14	10 mg, (50:50), (24 000-38 000)	1	1	1:5	%0,2 (30 000-70 000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~18	~14
F15	10 mg, (50:50), (24 000-38 000)	1	1	2:20	%0,2 (30 000-70 000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~15	~8
F16	10 mg, (75:25), (76 000-115 000)	1	1	2:20	%0,2 (30 000-70 000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~12	~7
F17	10 mg, (85:15) (180 000)	1	1	2:20	%0,2 (30 000-70 000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~33	~6

Çizelge 4.6'da düşük molekül ağırlıklı PLGA (50:50, Mw:24 000-38 000) kullanılarak F14 formülasyonunda enkapsülasyon verimi %14 bulunmuştur. Ayrıca daha yüksek molekül ağırlıklı PLGA'lar kullanılarak da (F16, F17), NP'den hesaplanan %EE değerlerinde artış görülmüştür. Çizelge 4.6'da F14-17 formülasyonları ile sentezlenen nanopartiküllerin direkt yöntem (NP içinden) ile %EE değerlerinin hesaplandığı örnek HPLC kromatogramları Şekil 4.24'te verilmiştir.



Şekil 4.24. F14-17 formülasyonlarının HPLC örnek kromatogramları (direkt yöntem %EE)

Şekil 4.24'te F14-17 formülasyonlarının HPLC kromatogramları kullanılarak, TMZ'nin asetonitril:mobil faz (ACN:MP, 1:4) çözeltisinde kalibrasyonu yapılmış doğru

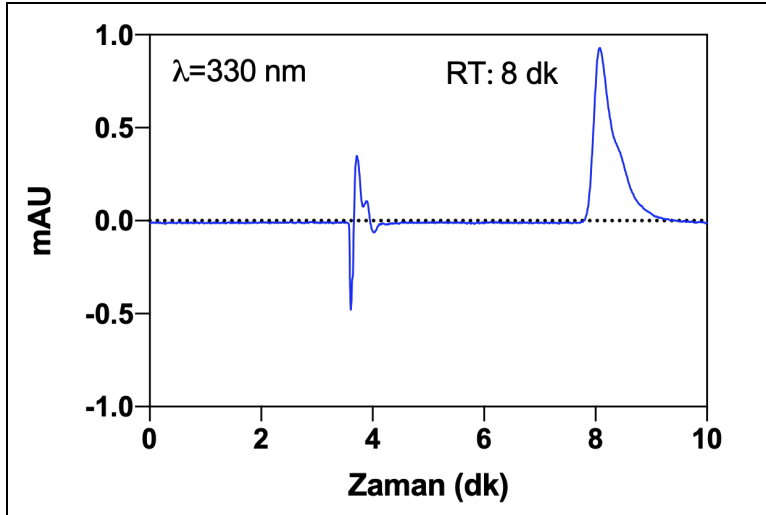
denkleminde (Bkz. Şekil 4.23b) %EE verimleri hesaplanmıştır. Bu hesaba göre, herbir formülasyona ait kromatogramın altında kalan pik alanı kalibrasyon denkleminde yerine koyulmuş, çıkan sonuç seyreltme faktörü ile çarpılmış ve çözünen nanopartikül içindeki TMZ miktarı elde edilmiştir. Bu elde edilen değer toplam nanopartikül miktarına oranlanarak, F14, F15, F16, F17 formülasyonlarından hesaplanan %EE değerleri sırasıyla, %14, %8, %7 ve %6 bulunmuştur.

Son olarak, Çizelge 4.7’de gerçekleştirilen sentezlerde farklı molekül ağırlıklı PLGA ve PVA kombinasyonlarının enkapsülasyon verimine etkisi değerlendirilmiştir. F18 formülasyonu için NP’den elde edilen HPLC örnek kromatogramı Şekil 4.25’te verilmiştir.

Çizelge 4.7. Farklı moleküler ağırlıklı PLGA ve PVA içeren nanopartikül formülasyonları

Kod	PLGA(mg) (Laktik:glolik), (Mw)	TMZ (mg)	SPDON (mg)	Organik faz:su fazı:dilüsyon fazı (h:h:h, mL)	Su fazı PVA (%a/h, Mw)	Dilüsyon fazı PVA (%a/h), (Mw)	Emülsifikasyon güç kaynağı	TMZ %EE (NP’den)
F18	10 mg (85:15) (180 000)	1	1	2:6:10	%1 (30 000-70 000)	%0.1 (30.000- 70.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~4
F19	10 mg (85:15) (180.000)	1	1	2:6:10	%1 (89 000-98 000)	%0.1 (89.000- 98.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F20	10 mg (85:15) (180.000)	1	1	2:6:10	%1 (145 000)	%0.1 (145.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F21	10 mg (50:50) (90 000)	1	1	2:6:10	%1 (30.000- 70.000)	%0.1 (30.000- 70.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F22	10 mg (50:50) (90 000)	1	1	2:6:10	%1 (89 000-98 000)	%0.1 (89.000- 98.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F23	10 mg (50:50) (90 000)	1	1	2:6:10	%1 (145 000)	%0.1 (145.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F24	10 mg (50:50) (30.000- 60.000)	1	1	2:6:10	%1 (30 000-70 000)	%0.1 (30.000- 70.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F25	10 mg (50:50) (30.000- 60.000)	1	1	2:6:10	%1 (89 000-98 000)	%0.1 (89.000- 98.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1
F26	10 mg (50:50) (30.000- 60.000)	1	1	2:6:10	%1 (145 000)	%0.1 (145.000)	Ultra turrax (10 dk.15000 rpm)	~1

F18 formülasyonu ile sentezlenen nanopartiküle ait HPLC kromatogramında (Şekil 4.25), TMZ’nin alıkonma zamanı 8 dk bulunmuş ve kalibrasyon doğrusundan yararlanılarak %EE değeri (direkt yöntem ile) %4 hesaplanmıştır.



Şekil 4.25. F18 formülasyonunun HPLC örnek kromatogramı (direkt yöntem %EE)

F1-26 formülasyonlarının tamamında %EE değerleri süpernatant ortamından (indirekt) ve nanopartikül içerisinden (direkt) HPLC kromatogramları kullanılarak hesaplanmıştır. Ancak, TMZ'nin enkapsülasyon veriminin tekrarlanabilirliğine ilişkin yapılan çalışmalardan bir standart belirlenememiştir. Nanopartiküllerin salım çalışmaları da gerçekleştirilmiş olmasına rağmen nanopartiküle yüklenen TMZ miktarı çok düşük olduğu için ortama salınan miktar UV spektrometre ve HPLC analizleri ile bazen tespit edilememiş bazen de tekrarlanabilirliği gerçekleşmemiştir. Bu gerekçelerle tezin bu kısmında etken madde değişikliğine karar verilip glioblastoma tedavisi için potansiyel bir ajan olarak dikkat çeken kurkumin etken maddesi çalışılmıştır.

4.5. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Sentezine ve Karakterizasyonuna ait Çalışmalar

Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemine (Bkz. Bölüm 3.6) göre sentezlenmiştir. Özetle, PLGA polimeri ve kurkumin etken maddesi organik çözücüde (diklorometan) çözülerek yüzey aktif madde (polivinil alkol, PVA) içeren sulu faza aktarılmış ve mekanik karıştırıcı ile emülsiye edilmiştir. Daha sonra, organik çözücü buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmış ve nanopartikül oluşumu sağlanmıştır.

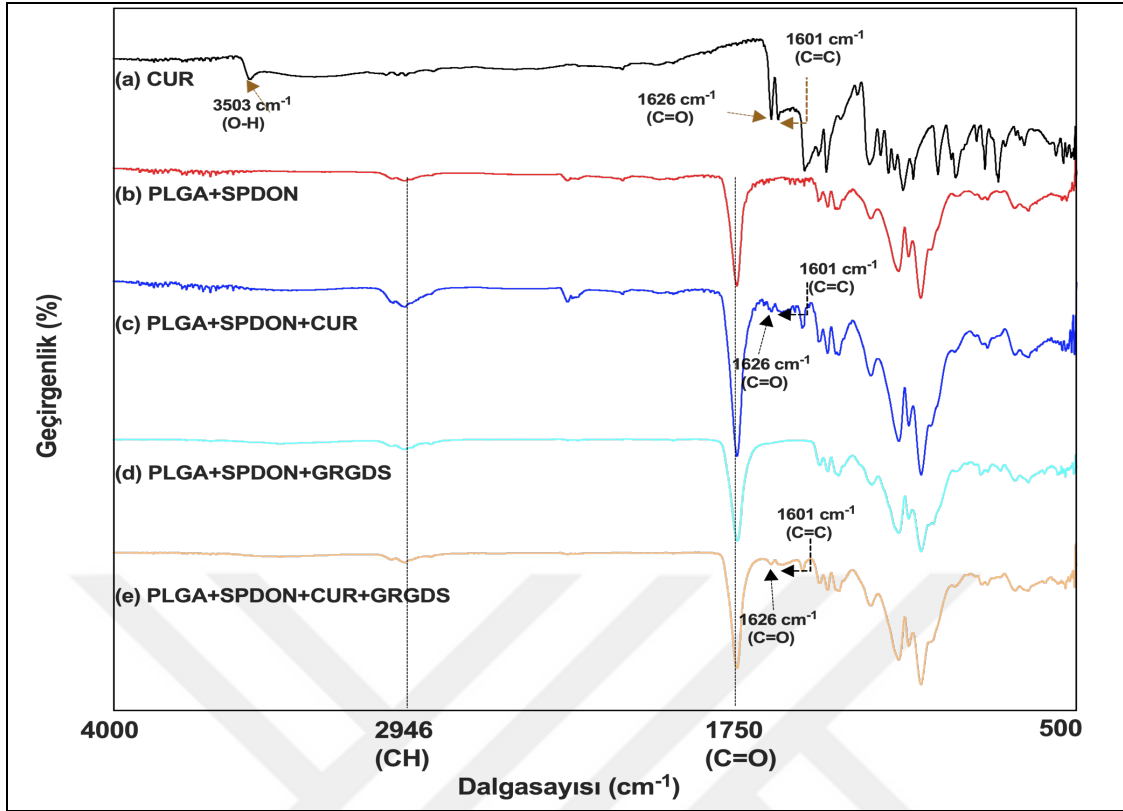
Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküller sentezlendikten sonra ATR-FTIR, VSM, SEM ve DLS analizleri yapılmıştır. Daha sonra, kurkuminin UV spektrometre analizleri, kalibrasyon doğruları ve kalibrasyon doğru denklemi ile hesaplanan enkapsülasyon

verimleri ve salım çalışmaları ile devam edilmiştir. Son olarak, kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lere bağlanan peptit miktarının belirlenmesi için kalibrasyon doğrusu çıkarılmış ve peptit bağlanma miktarı hesaplanmıştır. Bu çalışmalara ait bulgular devam eden alt bölümlerde sırasıyla verilmiştir.

Gerçekleştirilen çalışmalarda etken madde ve farklı özellik kazandırılmış nanopartiküller için bazı kısaltmalar kullanılmıştır. Bu kısaltmalar; kurkumin (CUR), manyetik PLGA nanopartiküller (PLGA+SPDON NPs), peptit bağlı manyetik PLGA nanopartiküller (PLGA+SPDON+GRGDS), kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküller (CUR+PLGA+SPDON NPs), peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküller (CUR+PLGA+SPDON+GRGDS NPs) şeklindedir.

ATR-FTIR analizi

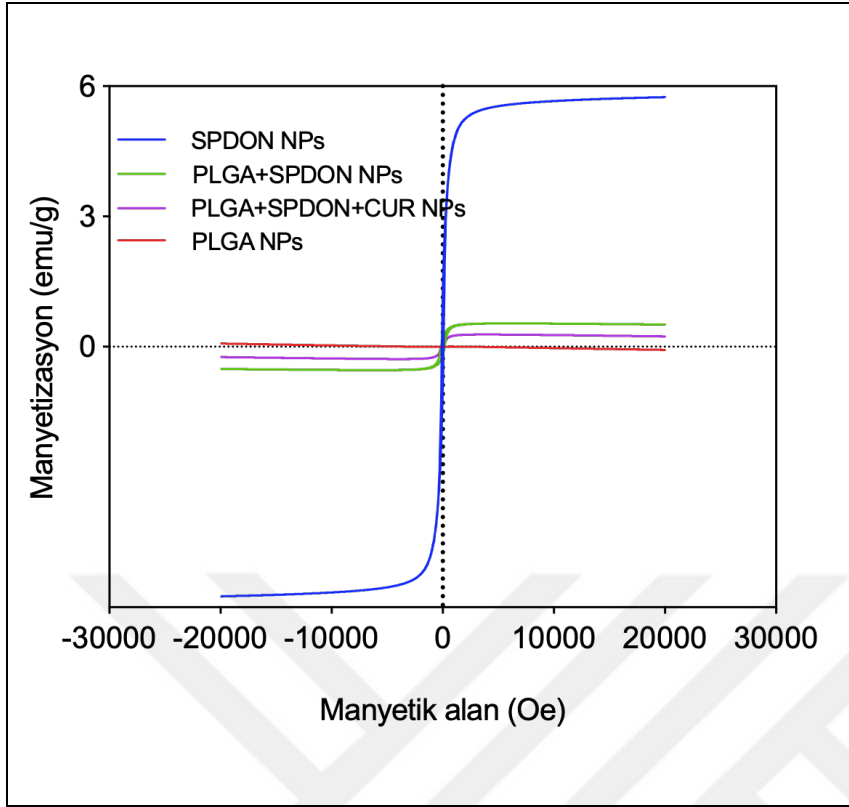
Şekil 4.26'da serbest kurkumin (CUR) ve tez kapsamında sentezlenen farklı nanopartiküllerin ATR-FTIR spektrumları verilmiştir. Şekil 4.26a'da gösterilen CUR spektrumunda; 3503 cm^{-1} O-H gerilmesine aittir. Ayrıca, 1626 cm^{-1} ve 1601 cm^{-1} sırasıyla C=O gerilme titreşimine ve C=C aromatik gerilmesine ait olup kurkumin yüklü NP'lerde de bu gerilimler görülmüştür (Şekil 4.26c,e). PLGA polimerinin 1750 cm^{-1} 'de görülen C=O gerilmesi ve 2946 cm^{-1} 'deki alifatik CH bandına ait titreşim gerilimi PLGA kaplı tüm manyetik NP'lerde görülmüştür (Şekil 4.26b-e). GRGDS peptit yapısından gelen herhangi bir pik FTIR spektrumunda görülmemiştir (Şekil 4.23d,e). Nanopartikül yüzeyine bağlanan peptit (GRGDS) varlığı floresan spektrofotometre ile belirlenmiştir. [193, 194].



Şekil 4.26. ATR-FTIR spektrumları; (a) Kurkumin, (b) PLGA+SPDON NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (e) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs.

Titreşimli örnek manyetometre (VSM) analizi

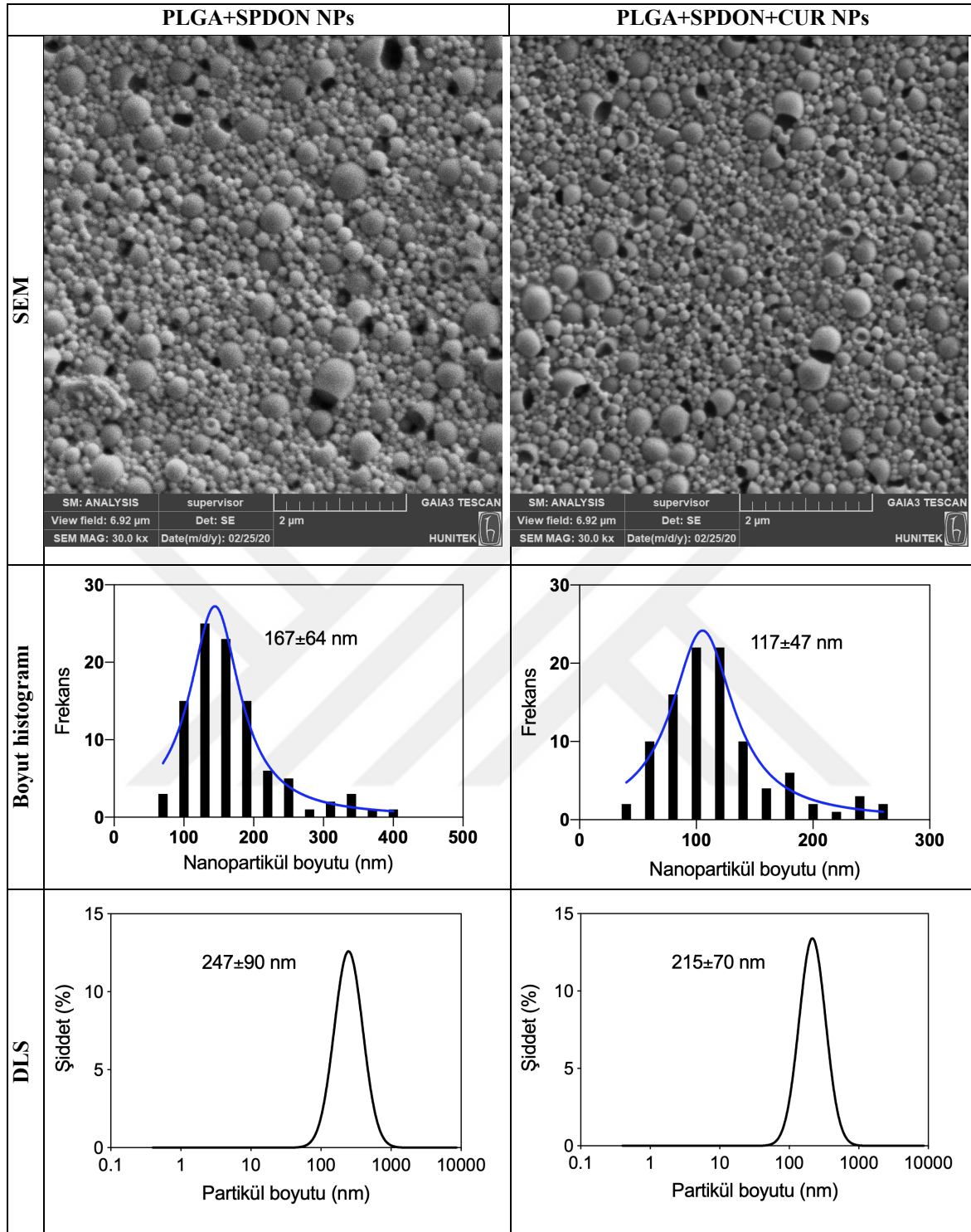
Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON, manyetik PLGA, CUR yüklü manyetik PLGA ve PLGA NP'lerin manyetik özellikleri titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ile oda sıcaklığında incelenmiştir (Şekil 4.27). Boş PLGA nanopartikülün manyetizasyonu (M_s) beklenildiği gibi sıfır bulunmuştur. Oleik asit kaplı SPDON, PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+CUR nanopartiküllerin manyetizasyonları yaklaşık olarak sırasıyla; 6; 0,6 ve 0,3 emu/g bulunmuştur. Demir oksit nanopartiküllerin, manyetizasyon eğrisinden koersivite (coercivity) değeri yaklaşık sıfır olduğu için süperparamanyetik davranış sergilemiştir. Hipertermi çalışmalarında, manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin yanı sıra eş boyut dağılımlı, agregasyonlarının düşük ve polimer kaplama verimlerinin yüksek olması ısıtma kabiliyetlerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir [123, 195].



Şekil 4.27. SPDON, PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA nanopartiküllerin manyetik alana karşı manyetizasyon eğrisi

Taramalı elektron mikroskop (SEM) ve DLS analizleri

Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin çapları, çap dağılımları, morfolojileri SEM ve DLS analizleri ile belirlenmiştir (Şekil 4.28). Kurkumin içermeyen manyetik PLGA NP'lerin ortalama çapları SEM ve DLS analizlerine göre sırasıyla 167 ± 64 nm ve 247 ± 90 nm olarak bulunmuştur. Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin ortalama çapları ise SEM ve DLS analizlerine göre 117 ± 47 nm ve 215 ± 70 nm olarak bulunmuştur (Şekil 4.28). Elektron mikroskop ve DLS analizlerinden elde edilen nanopartikül boyutlarının farklılıkları daha önceden açıkladığımız gibi bu yöntemlerin çalışma prensiplerinin farklılıklarına bağlıdır.

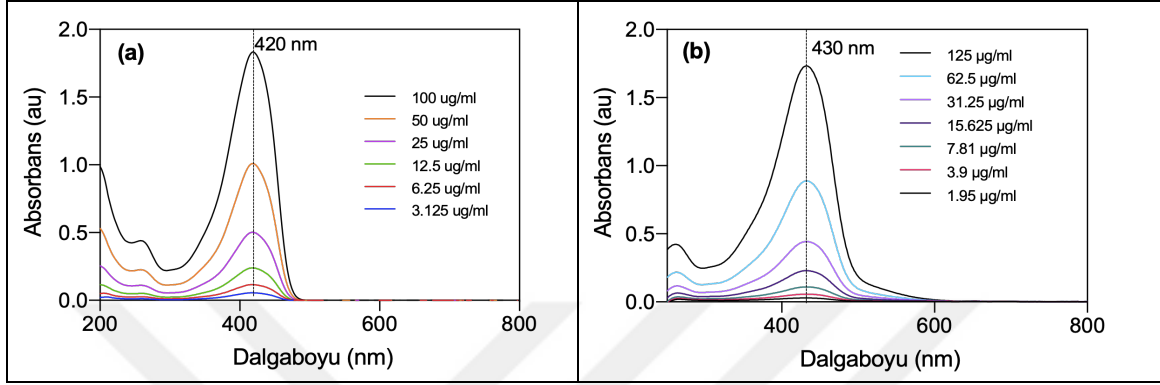


Şekil 4.28. Kurkumin içermeyen ve kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin SEM görüntüleri, boyut ve DLS analizleri

4.5.1. Kurkuminin UV spektrometre analizleri

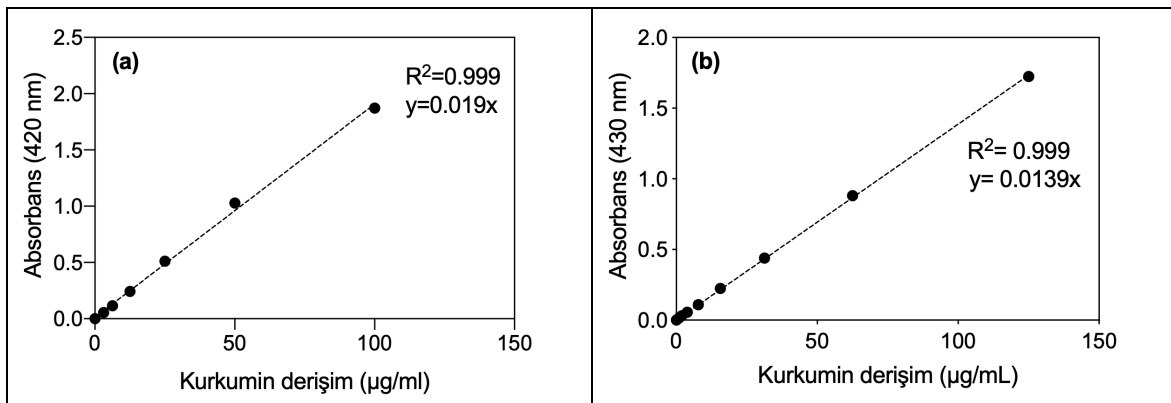
Kurkuminin (CUR) farklı konsantrasyonlarda asetonitril ve etanol:PBS (1:1) çözeltilerinde UV spektrumları Şekil 4.29a,b’de verilmiştir. Asetonitril içerisinde kurkumin piki 420 nm

dalgaboyunda, etanol:PBS içerisinde ise 430 nm dalgaboyunda görülmüştür. Kurkumin konsantrasyonu arttıkça her iki çözelti içerisinde de kurkuminin absorbens değerleri artmıştır. Kurkuminin UV spektrometre ile tespit edilebildiği en düşük doz değeri her iki çözelti içerisinde de $\sim 3\text{-}4\text{ }\mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.29. Kurkuminin farklı konsantrasyonlarda (a) asetonitril (ACN) ve (b) etanol:PBS (ETH:PBS, 1:1) içerisinde UV spektrumları.

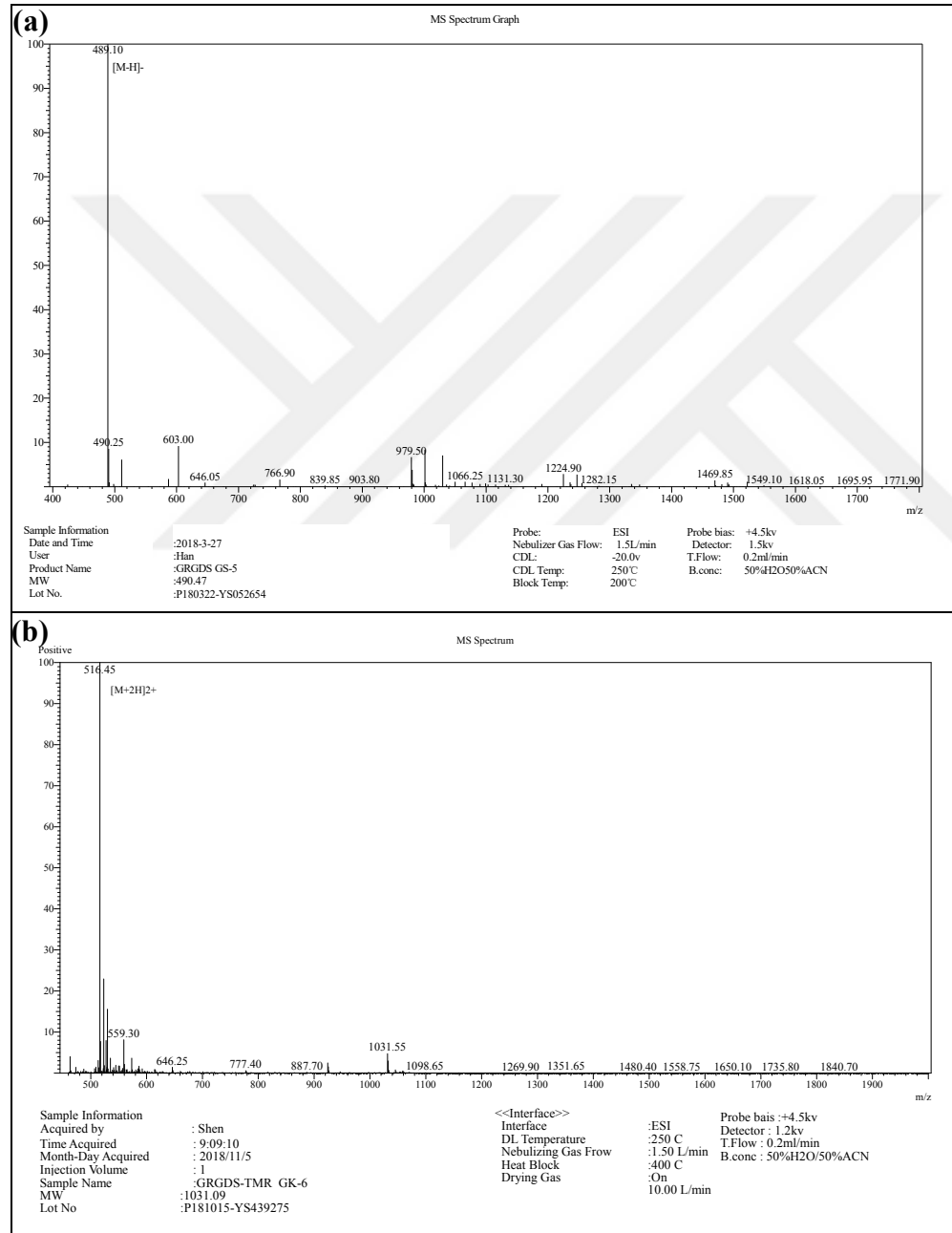
Şekil 4.29’da verilen kurkuminin farklı konsantrasyonlarda asetonitril ve etanol:PBS (1:1) çözeltilerindeki UV spektrumlarından yararlanılarak kurkuminin asetonitril (4.30a) ve etanol:PBS (4.30b) çözeltilerinde kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Bu kalibrasyon doğrularından elde edilen kalibrasyon denklemleri kullanılarak enkapsülasyon ve salım deneylerinde kurkumin miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 4.30. Kurkumin kalibrasyon doğruları (a) ACN içerisinde (b) ETH:PBS (1:1) içerisinde ($n=5$).

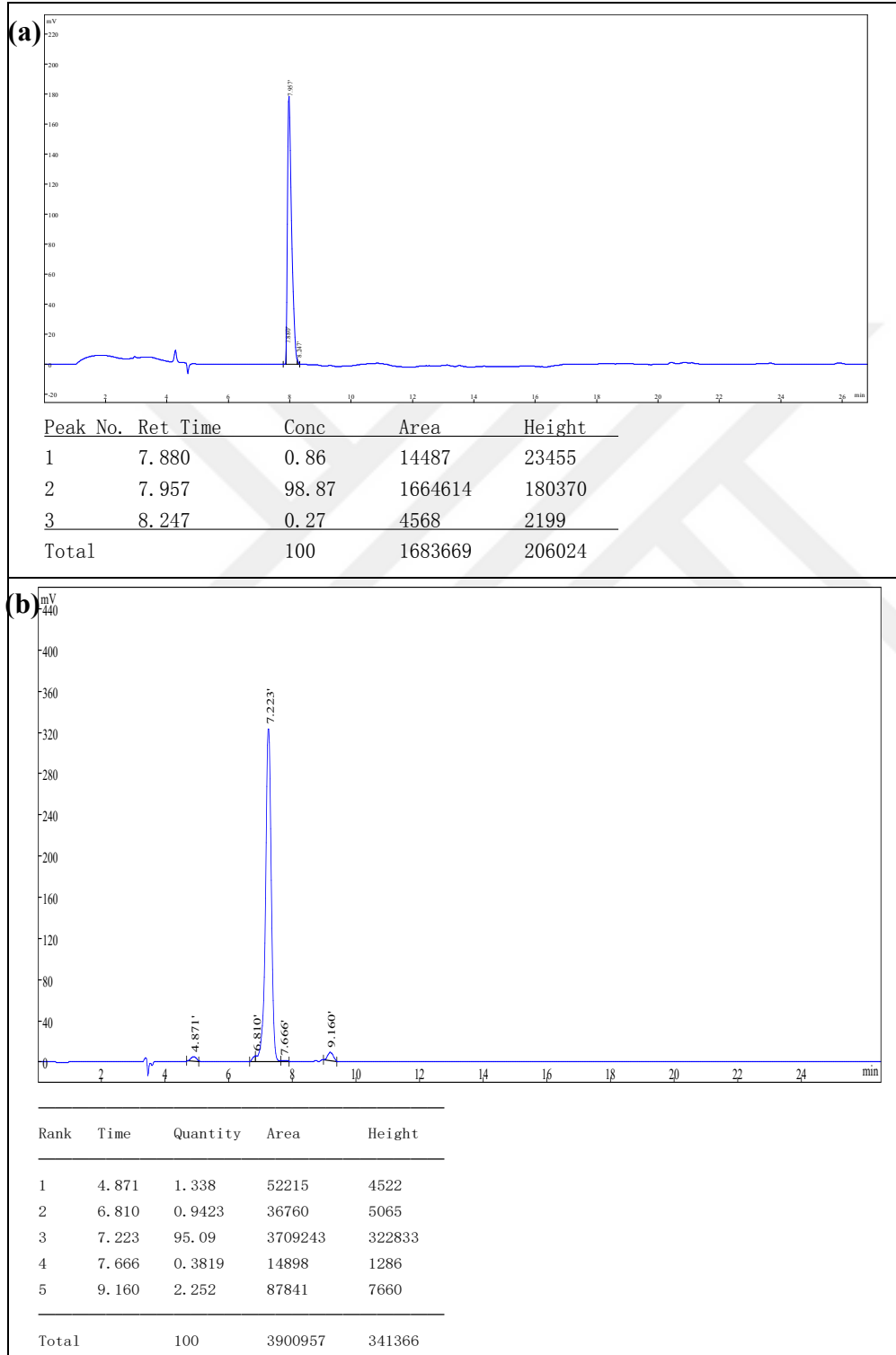
4.5.2. Kurkumin yüklü nanopartiküllere bağlanan peptit miktarı tayini

GRGDS ve GRGDS-TAMRA peptitlerinin sentez başarıları kütle spektroskopisi ve HPLC analizleri ile belirlenmiştir. Kütle spektroskopisi analizlerine göre GRGDS ve GRGDS-TAMRA molekül ağırlıkları sırasıyla; 490,47 ve 1031,09 g/mol ($[M-H]^-$) olarak bulunmuştur ve bu değerler teorik değerlere oldukça yakındır.



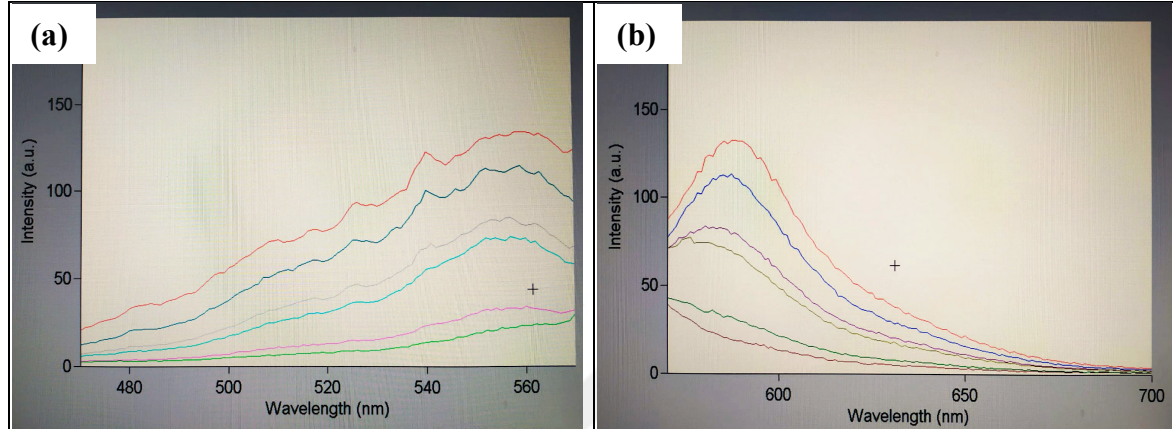
Şekil 4.31. Kütle spektroskopileri (a) GRGDS, (b) GRGDS-TAMRA

HPLC analizlerine göre ise GRGDS (Şekil 4.32a) ve GRGDS-TAMRA (Şekil 4.32b) peptitleri sırasıyla %99 ve %95 saflık derecelerine sahip olup *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için kullanılabilir özelliktedir.



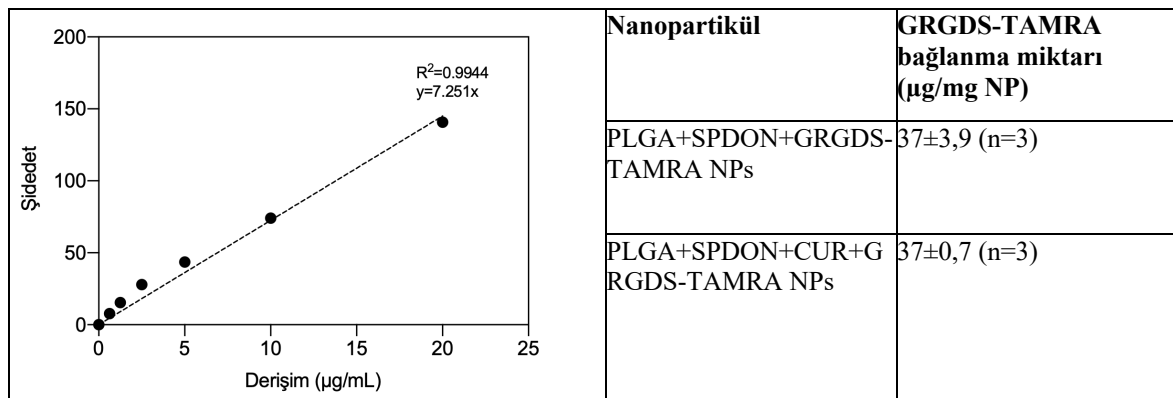
Şekil 4.32. HPLC kromatogramları, (a) GRGDS, (b) GRGDS-TAMRA

Kurkumin yüklü ve kurkumin içermeyen manyetik PLGA nanopartiküllere bağlanan GRGDS-TAMRA miktarı indirekt olarak floresan spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Floresan spektrofotometresi ile 0-20 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında GRGDS-TAMRA spektrumları alınmış ve bu spektrumlar Şekil 4.33'te verilmiştir.



Şekil 4.33. 0-20 $\mu\text{g/mL}$ doz aralığında GRGDS-TAMRA spektrumları, (a) eksitasyon, (b) emisyon dalgaboylarında

Floresan spektrofotometre ile 555 nm eksitasyon, 585 nm emisyon dalgaboylarında ölçülen değerler kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir (Şekil 4.34). Tüm peptit bağlanma miktarı hesaplamaları bu kalibrasyon grafiği kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kurkumin yüklü ve kurkumin içermeyen manyetik PLGA NP'lerin 1 mg'ına yaklaşık 37 μg GRGDS-TAMRA bağlanmıştır (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. TAMRA işaretli GRGDS peptidin kalibrasyon doğrusu ve nanopartiküllere bağlanan GRGDS-TAMRA miktarları

4.5.3. Kurkumin yüklü manyetik nanopartiküllerin enkapsülasyon verimi

Peptit (GRGDS) bağlı ve peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin enkapsülasyon verimleri UV spektrometre ile kalibrasyonu yapılmış doğru denklemden (Şekil 4.29a) yararlanılarak direkt yöntem (NP içinden) ile belirlenmiştir (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin %EE değerleri

Nanopartiküller (NPs)	%EE	%DL
PLGA+SPDON+CUR NPs	25,5 ± 3,2 (n=5)	8,0 ± 1,1
PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs	4 ± 0,2 (n=3)	1,6 ± 0,2

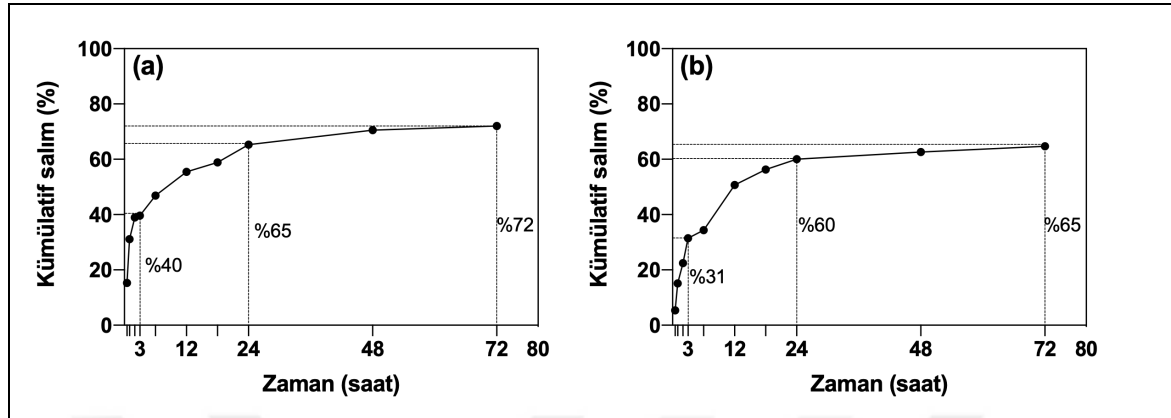
Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin enkapsülasyon verimi %25,5 bulunmuş ve 1 mg kurkuminin 250 µg'ı nanopartiküle yüklenmiştir. Peptit bağlı NP'lerde ise enkapsülasyon verimi %4 bulunmuş ve 1 mg kurkuminin 40 µg'ı nanopartiküle yüklenmiştir. Kurkumin yükleme etkinliği (%DL) ise, birim nanopartikül kütlesi başına yüklenen kurkumin miktarıdır. Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'ler için bu değer %8 bulunmuş ve 1 mg nanopartiküle 80 µg kurkumin yüklenmiştir. Peptit bağlı NP'ler için yükleme etkinliği %1,6 bulunmuş ve 16 µg kurkumin (mg nanopartikül başına) yüklenmiştir (Çizelge 4.8).

Peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin %EE ve %DL değerleri, peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lere göre düşük çıkmıştır. Bu durum, peptit bağlama deneylerinde ekstradan 2 defa yıkamanın yapılması, ayrıca nanopartikül aktivasyonu ve GRGDS peptit konjugasyonu için 45'er dakika 2 kez çalkalamalı etüvde nanopartiküllerin MES tamponu ile muamelesi sonucu gerçekleştiği düşünülmektedir.

4.5.4. Kurkumin yüklü nanopartiküllerin salım çalışmaları

Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin salım grafikleri Şekil 4.35'te verilmiştir. PLGA nanopartiküllerinden ilaç salımı genellikle iki-fazlıdır; birinci faz, patlama (burst effect) fazı, ikinci faz, difüzyon kontrollü daha yavaş salım olarak gerçekleşmektedir [196]. Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'den, 3 saat içinde patlama etkisi ile yüzeyde bulunan ve/veya zayıf bağlı kurkumin salınmıştır ve bu değer toplam yüklenen değer yaklaşık %40'ına eşittir. Ayrıca, 24 saat sonunda %65, toplamda ise %72 kurkumin salınarak plato fazına ulaşılmıştır (Şekil 4.35a). Peptit bağlı nanopartiküllerde ise; patlama etkisi ile ilk 3 saatte

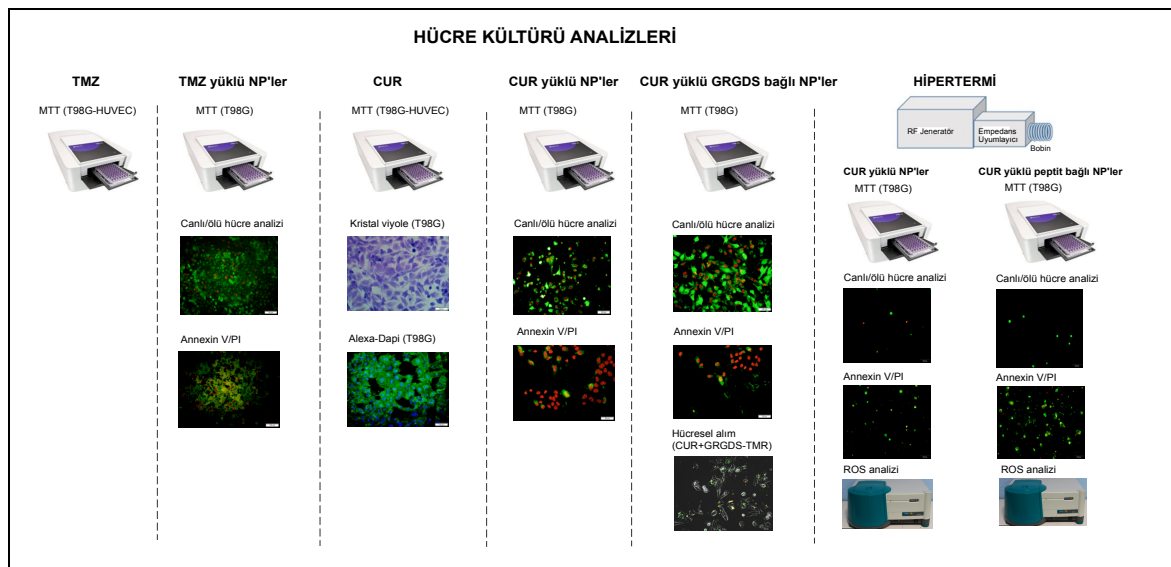
%31, 24 saat sonunda %60, toplam kurkumin miktarının ise %65'i ortama salınmıştır (Şekil 4.35b).



Şekil 4.35. (a) PLGA+SPDON+CUR, (b) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin PBS (pH:7,4) ortamında kümülatif salım grafikleri

4.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültür çalışmalarında, serbest TMZ, TMZ yüklü NP'ler, serbest kurkumin, kurkumin yüklü NP'ler ve kurkumin yüklü peptit bağlı NP'lerin hücreler ile etkileşimleri sonrasında MTT, kristal viyole, Alexa-DAPI, canlı/ölü, Anneksin V/PI analizleri gerçekleştirilmiştir. Daha sonra, hipertermi maruziyeti uygulanmış ve nanopartikül-hücre etkileşimleri sonrasında MTT, canlı/ölü boyama, Anneksin V/PI ve ROS analizleri yapılmıştır. Şekil 4.36'da hücre kültür çalışmalarında gerçekleştirilen analizler şematik olarak özetlenmiştir.



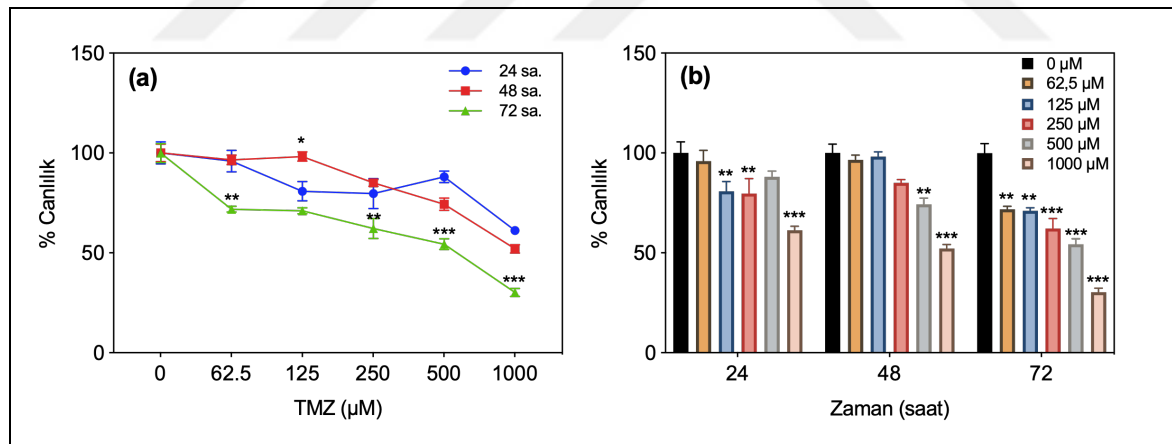
Şekil 4.36. Hücre kültür çalışmalarının şematik gösterimi

4.6.1. Serbest TMZ'nin HUVEC ve T98G hücreleri üzerine etkilerinin hücre canlılık analizleri ile belirlenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki TMZ'nin (0-1000 μ M) endotel (HUVEC) ve glioblastoma (T98G) hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi 24, 48 ve 72. saatlerde MTT testi ile incelenmiştir.

Serbest TMZ'nin HUVEC hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi- MTT analizi

Temozolomid'in sağlıklı hücreler üzerindeki sitotoksik etkisini incelemek için insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) kullanılmıştır. Temozolomid, glioblastoma (GBM) hastalarının tedavisi için uygulandığında, tümör anjiyogenezinde yer alan özellikle endotel hücrelerini içeren geniş bir hücre popülasyonunu etkilemektedir [197]. Bu sebeple, endotelial bir hücre olan HUVEC'ler üzerinde TMZ'nin toksik etkisi çalışılmıştır. Şekil 4.37'de TMZ'nin HUVEC hücrelerinin % canlılıkları üzerine etkisinin zamana ve doza bağlı grafikleri verilmiştir.



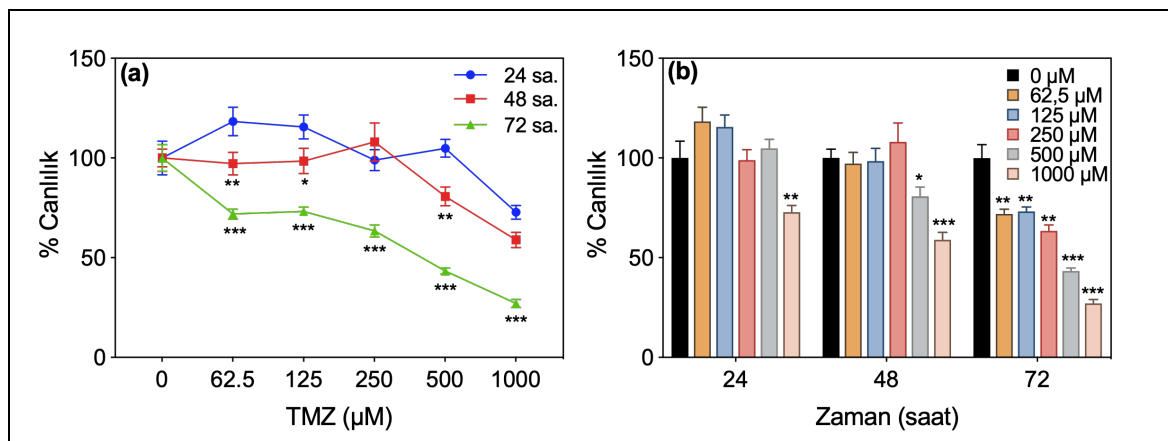
Şekil 4.37. TMZ'nin HUVEC hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 24, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ *** (n=5)

HUVEC hücrelerine uygulanan TMZ doz aralığı 0-1000 μ M'dır. Hücrelerin %50'sini inhibe eden doz miktarı olarak tanımlanan IC_{50} (The halfs maximal inhibitory concentration) değerleri, Graphpad Prism programı kullanılarak belirlenmiştir. TMZ'nin HUVEC hücrelerinde 72. saatte IC_{50} değeri non-linear fit eğri denkleminde ~ 500 μ M olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.37a'da 24, 48 ve 72. saatler arasında her bir doz değeri için gruplar

arası kıyaslama yapılmış ve 72 saat TMZ uygulanan grupta 125 μ M hariç tüm dozlarda 24 saatlik gruba göre hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür. Ayrıca, 48 saat TMZ uygulamasında 24 saatlik gruba göre 500 ve 1000 μ M TMZ dozlarında hücre canlılığında bir azalma görülmüş ancak bu azalmalar istatistiksel olarak anlamlı değildir (Şekil 4.37a). Şekil 4.37b’de ise 24, 48 ve 72 saat TMZ uygulamalarının kontrol hücrelerine göre grup içi karşılaştırmaları yapılmıştır. HUVEC hücrelerine uygulanan 125 μ M TMZ’nin, hücrelerin % canlılıklarını 24 saat sonra %80’e, 72 saat sonra %70’e düşürdüğü görülmüştür ($p \leq 0,01$); 500 μ M TMZ ise % canlılıkları 48 saat sonra %74’e ($p \leq 0,01$), 72 saat sonra %54’e ($p \leq 0,001$) düşürmüş, ancak 24 saatlik TMZ uygulamasında (500 μ M) hücrelerin % canlılıklarında anlamlı bir değişim görülmemiştir. Ayrıca, HUVEC hücrelerinde en düşük hücre canlılığının (1000 μ M TMZ), 24 saat sonra %61, 48 saat sonra %52 ve 72 saat sonra %30 değerlerine düştüğü görülmüştür ($p \leq 0,001$) (Şekil 4.37b).

Serbest TMZ’nin T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi- MTT analizi

Serbest TMZ’nin T98G hücrelerinde, MTT analizi ile belirlenen % canlılık grafikleri zamana ve doza bağlı olarak Şekil 4.38’de verilmiştir. Şekil 4.38a’da her bir doz değeri için zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır ve 72 saat TMZ uygulanan grubun tüm dozlarında 24 saatlik gruba göre hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür (tüm dozlar için $p \leq 0,001$). Ayrıca, 48 saatlik TMZ uygulamasının, 24 saatlik gruba göre 62,5 ve 500 μ M dozlarda $p \leq 0,01$, 125 μ M dozda $p \leq 0,05$ anlamlılık derecelerinde azalmaya neden olduğu görülmüştür (Şekil 4.38a). Şekil 4.38b’de ise her bir TMZ uygulama süresinin (24, 48 ve 72 saat) kendi içinde (grup içi) doza bağlı canlılık analizleri yapılmış ve 24 saat grubunda sadece 1000 μ M TMZ dozunun % canlılığı %72’ye ($p \leq 0,01$) düşürdüğü görülmüştür. 48 saatlik TMZ uygulamasının ise % hücre canlılıklarını 500 μ M’da %80’e ($p \leq 0,05$), 1000 μ M’da %58’e ($p \leq 0,001$) düşürdüğü görülmektedir. Son olarak, 72 saatlik TMZ uygulamasının tüm dozlarında T98G hücrelerinin % hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar bulunmuş ve en yüksek dozda (1000 μ M) bu oran %27’lere kadar düşmüştür (Şekil 4.38b).



Şekil 4.38. TMZ'nin T98G hücreleri üzerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz değeri için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 24, 48 ve 72 saatler için kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=8)

Şekil 4.38a'da verilen % canlılık eğrilerinden yararlanılarak, IC_{50} değerleri, Graphpad Prism programı ile hesaplanmıştır (Çizelge 4.9) (absorbans değerleri normalize edilmiş ve non-linear fit uygulanmıştır).

Çizelge 4.9. TMZ' nin T98G hücrelerinde 24, 48 ve 72. saatlerde IC_{50} değerleri

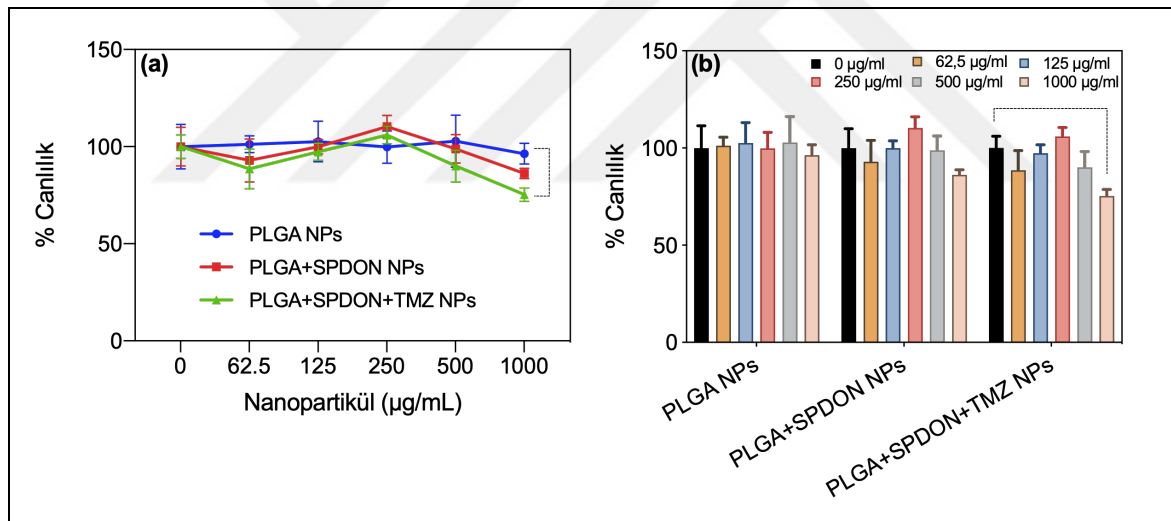
TMZ-T98G	24 saat	48 saat	72 saat
IC_{50}	~6,8 mM (teorik)	~1,9 mM (teorik)	~350 µM (deneysel doz aralığında)

T98G hücrelerine uygulanan TMZ doz aralığı 0-1000 µM aralığında olup, 24 ve 48 saatler için non-linear fit eğri denkleminde IC_{50} değerleri sırasıyla ~6,8 mM ve ~1,9 mM olarak hesaplanmıştır. Bu değerler deneysel doz aralığında olmadığından IC_{50} değerleri 24 ve 48 saatler için deneysel olarak tespit edilemeyip teorik olarak belirlenmiştir. Fakat, 72 saat TMZ uygulanan grupta hesaplanan IC_{50} değeri deneysel doz aralığında bulunmuş ve ~350 µM olarak hesaplanmıştır.

4.6.2. TMZ yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin T98G hücreleri üzerine etkisi

Serbest TMZ'nin canlılık analizleri neticesinde TMZ yükü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücrelerine 72 saat boyunca uygulanmasına karar verilmiştir. T98G hücrelerine PLGA, manyetik PLGA (PLGA+SPDON) ve TMZ yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+TMZ) NP'leri uygulanmış ve hücreler NP'lerle 72 saat boyunca muamele edilmiştir. Şekil 4.39a'da PLGA, PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerinin aynı doz miktarlarına karşılık

gelen % canlılık değerleri gruplar arası karşılaştırma yapılarak istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.39b’de ise her bir nanopartikül (PLGA, PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+TMZ) kendi içinde doza bağlı olarak, kendi kontrol grubuyla (0 µg/mL) kıyaslanmış ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4.39a,b’de verilen doz miktarları hücre kültür ortamındaki nanopartikül derişimini ifade etmektedir ve hücrelere nanopartiküller 0-1000 µg/mL derişiminde uygulanmıştır. Şekil 4.39a’da PLGA+SPDON NP’lerin PLGA NP’lere göre herhangi bir doz değerinde T98G hücrelerinin % canlılıklarında anlamlı bir değişim görülmemiştir ($p>0,05$). Aynı şekilde, PLGA+SPDON+TMZ NP’lerin de PLGA veya PLGA+SPDON NP’lere göre % canlılıklarda herhangi bir doz değerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir. Ancak, 1000 µg/ml derişiminde uygulanan PLGA+SPDON+TMZ NP’lerin PLGA NP’lere göre % hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen %78’e ($p>0,05$) düşürdüğü tespit edilmiştir (Şekil 4.39a’da işaretlenmiştir).

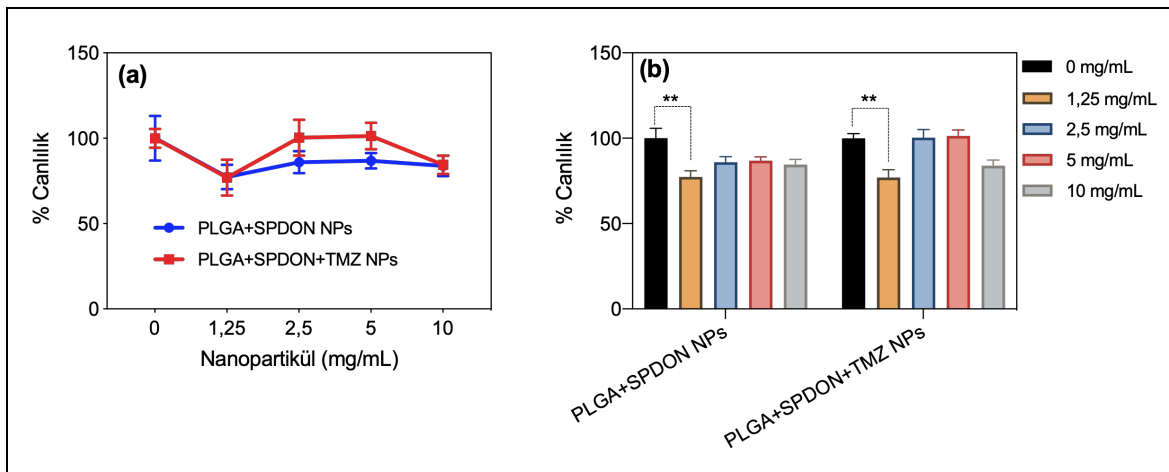


Şekil 4.39. PLGA, PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ nanopartiküllerinin T98G hücrelerinde 72. saatte % canlılık grafikleri (a) gruplar arası kıyaslama, (b) her bir nanopartikül için doza bağlı grup içi kıyaslama, anlamlılık dereceleri, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ ($n=3$)

Aynı şekilde, Şekil 4.39b’de PLGA, PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP’lerin grup içi kendi kontrol hücreleri (0 µg/mL) ile karşılaştırıldığında hücre canlılıklarında doza bağlı olarak herhangi bir anlamlı değişim görülmemiştir ($p>0,05$). Ancak, PLGA+SPDON+TMZ NP’lerin doza bağlı grup içi kıyaslamasında 1000 µg/mL NP dozunun kendi kontrol hücrelerine (0 µg/mL) kıyasla % canlılığı istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olmamasına rağmen %75’e düşürdüğü görülmüştür ($p>0,05$) (Şekil 4.39b’de

işaretlenmiştir). Sonuç olarak gerek grup içi gerekse gruplar arası T98G % canlılık analizlerinde istatistiksel anlamlı değişimler görülmemiştir, fakat 1000 µg/mL PLGA+SPDON+TMZ NP dozunun % canlılığı bir miktar düşürmüş olması (%78-%75) daha yüksek nanopartikül dozlarının istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya karşılık gelebileceğini düşündürmüştür. Bu amaçla, bir sonraki çalışmada daha yüksek nanopartikül dozlarının T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi incelenmiştir.

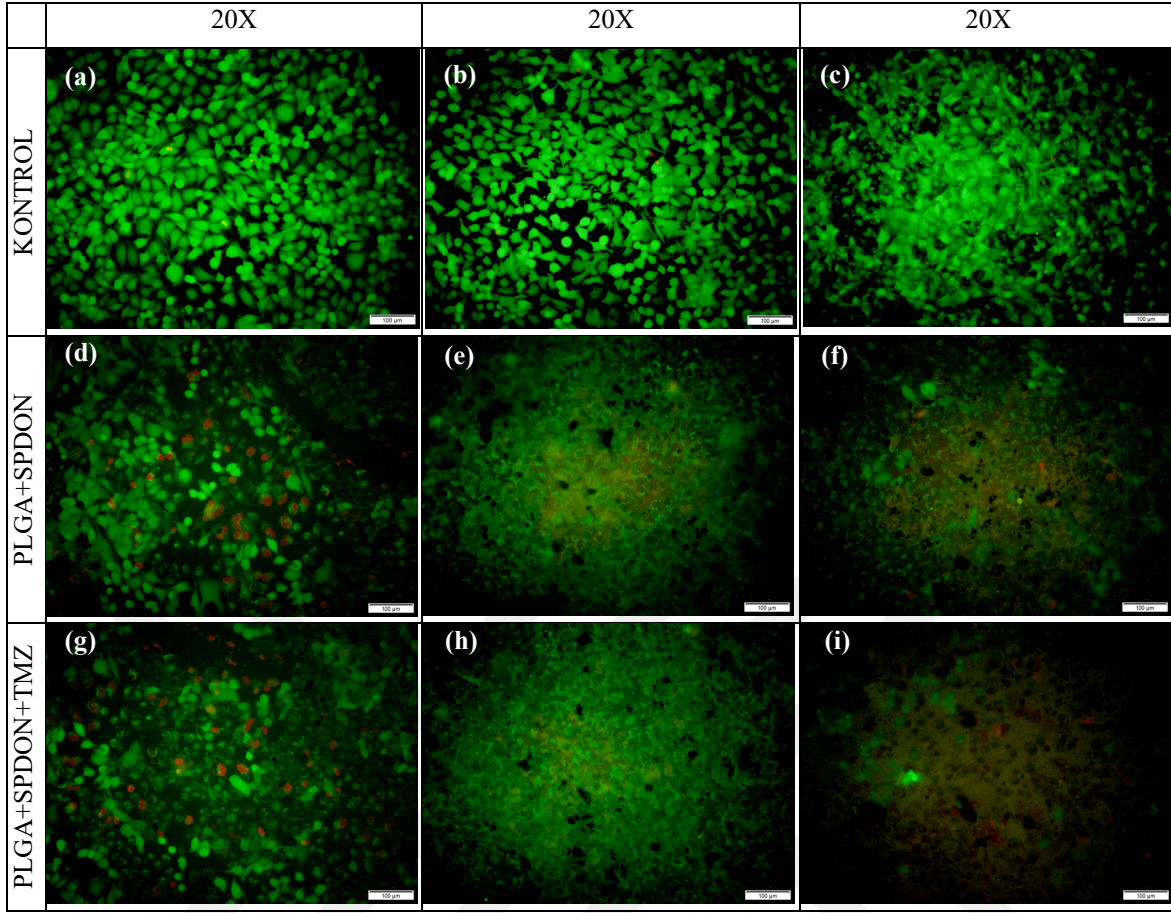
Yüksek dozda (0-10 mg/mL) PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin 72 saat sonra T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi MTT analizi ile incelenmiştir (Şekil 4.40). Şekil 4.40a'da aynı dozlarda PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücreleri üzerinde gruplar arası kıyaslamada % canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p > 0,05$). Şekil 4.40b'de ise PLGA+SPDON NP'lerin 1,25 mg/mL dozda kendi kontrol hücrelerine (0 mg/mL) göre % canlılığı %77'e düşürerek, istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görülmüştür ($p \leq 0,01$). Aynı şekilde, PLGA+SPDON+TMZ NP'leri 1,25 mg/mL derişimde kendi kontrol hücrelerine göre % hücre canlılığını %76'ya düşürmüş ve hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p \leq 0,01$). Şekil 4.40b'de hem PLGA+SPDON hem de PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin grup içi kıyaslamalarında sadece 1,25 mg/mL doz değerinde hücre canlılıklarında anlamlı azalma görülmüş, fakat PLGA+SPDON NP için 2,5; 5 ve 10 mg/mL; PLGA+SPDON+TMZ NP için 10 mg/mL doz değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen T98G hücrelerinin % canlılıklarında azalmalar görülmüştür.



Şekil 4.40. PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücrelerinde 72. saatte % canlılık grafikleri (a) gruplar arası kıyaslama, (b) her bir nanopartikül için doza bağlı grup içi kıyaslama, anlamlılık dereceleri, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ (n=3)

TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkisinin canlı/ölü hücre boyama yöntemi ile belirlenmesi

Temozolomid (TMZ) yüklü ve TMZ içermeyen manyetik PLGA nanopartiküllerin, T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi canlı/ölü hücre boyama yöntemiyle de incelenmiştir (canlı/ölü hücre canlılık deney kiti, Biovision). İlgili kit protokolüne göre yapılan boyama işlemlerinden sonra hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Resim 4.10). Bu yöntemde, canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı olarak görüntülenir. Resim 4.10a-c'de nanopartikül içermeyen (kontrol) T98G hücrelerinin sırasıyla 24, 48 ve 72. saatlerdeki floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. T98G hücrelerinin kontrol gruplarında 24. ve 48. saatlerde fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları görülmüş (Resim 4.10a,b) ve 72. saatte ise hücre morfolojilerinin bir miktar bozulduğu fakat hücrelerin çoğalmaya devam ettiği belirlenmiştir (Resim 4.10c). Resim 4.10d-i'de PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücre morfolojilerine ve canlılıklarına etkileri gösterilmiştir. Resim 4.10d,g'de MTT sonuçlarına (Şekil 4.40b) benzer şekilde 1,25 mg PLGA+SPDON ve 1,25 mg PLGA+SPDON+TMZ NP'ler uygulanan hücrelerin kontrol hücrelerine göre hücre canlılıklarının azaldığı ve ölü hücre sayısının arttığı görülmüştür. Resim 4.10e,h'de ise 5 mg NP uygulanan hücrelerin, 1,25 mg NP uygulananlara göre hücre canlılıklarının arttığı ve MTT sonuçlarına uygun olduğu görülmüştür. Uygulanan nanopartikül doz miktarı arttıkça ölü hücrelerin görülmesi zorlaşmakta ve nanopartiküller hücre yüzeyinde bir tabaka oluşturmaktadır. Bu durum Resim 4.10f,i'de net bir şekilde görülmektedir ve 10 mg/mL derişimde uygulanan PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin oluşturduğu tabakaların ardından ölü hücre varlığı (kırmızı) zor da olsa görülebilmektedir. T98G hücrelerine uygulanan nanopartiküllerin derişimleri yüksek olduğundan ve kültür kabının yüzeyine çöktükleri için yıkama işlemlerinde nanopartiküller uzaklaştırılamamış, bu yüzden floresan görüntülerde hücre morfolojileri özellikle yüksek dozlarda net görüntülenememiştir.

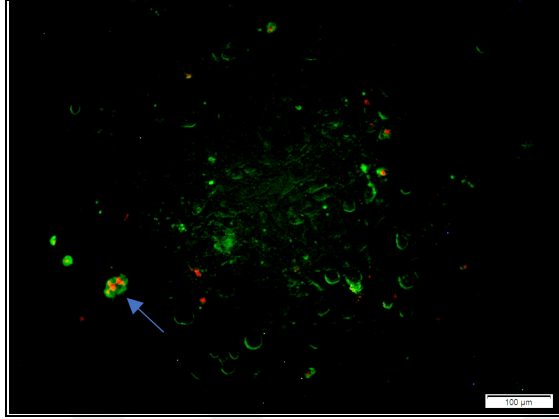


Resim 4.10. T98G hücreleri canlı/ölü hücre analizi floresan mikroskop görüntüleri, (a-c) nanopartikül içermeyen (kontrol) gruplar, sırasıyla, 24, 48 ve 72. saatler, (d-f) sırasıyla; 1,25; 5 ve 10 mg/mL PLGA+SPDON NP'leri uygulanan gruplar (72. saat), (g-i) sırasıyla; 1,25; 5 ve 10 mg/mL PLGA+SPDON+TMZ NP'leri uygulanan gruplar (72. saat)

TMZ yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücrelerinin ölüm süreçleri üzerine etkisinin Anneksin V/PI boyama yöntemleri ile belirlenmesi

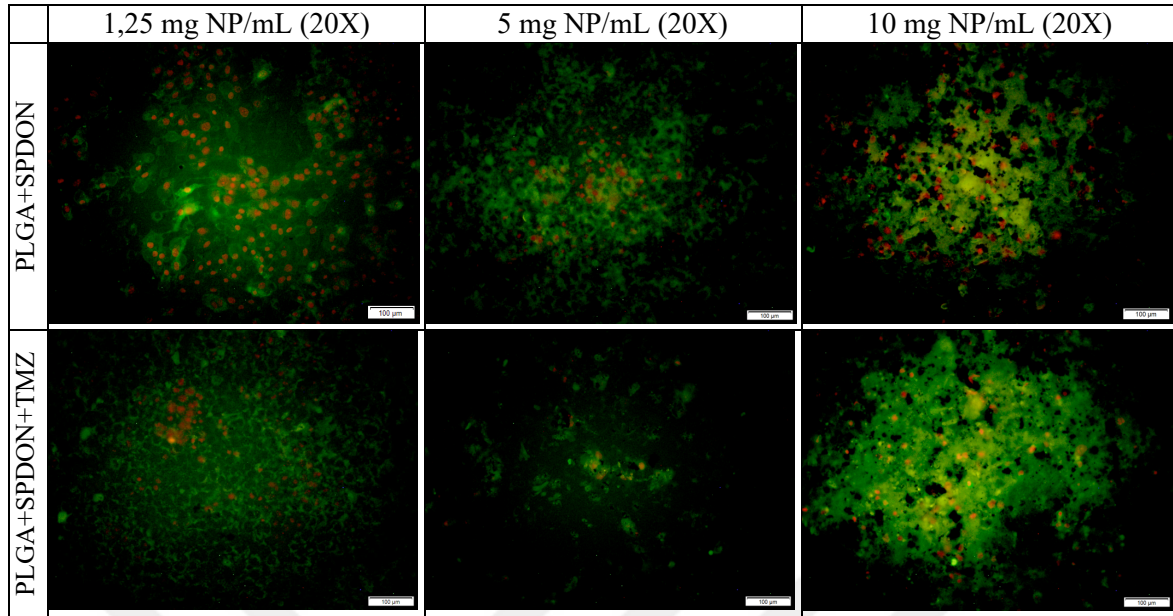
T98G hücrelerinin, apoptotik/nekrotik ölüm yollarından hangisi üzerinden ölüme gittiği Anneksin V-FITC/PI boyaları kullanılarak floresan mikroskobu ile belirlenmiştir. Erken apoptozda, plazma membranı bütün halde olup yeşil (FITC) olarak görülür, fakat propidyum iyodür (PI) boyası (kırmızı) görülmez. Geç apoptoz veya nekrozda membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerin çekirdekleri kırmızı (PI) ve çekirdek etrafında yeşil bir halka görülmektedir [198]. Resim 4.11'de 72. saat sonunda Anneksin V/PI boyaları ile boyanan T98G kontrol hücreleri gösterilmiştir. Bu resimde, mavi ok ile gösterilen hücrede membran bütünlüğü kaybolmuş ve hücre çekirdekleri kırmızı ve çekirdekler etrafında yeşil bir halka net olarak görülmüştür. Bu durum, geç apoptotik veya nekrotik evreyi işaret etmektedir,

ancak kontrol hücresinde sadece birkaç tane geç apoptotik veya nekrotik hücre görülmüş ve hücre proliferasyonunun devam etmekte olduğu anlaşılmıştır.



Resim 4.11. Nanopartikül uygulanmamış T98G hücrelerinin 72. saat sonunda Anneksin V/PI boyama sonrası floresan mikroskobu görüntüsü (20X)

Resim 4.12’de, T98G hücrelerine uygulanan 1,25; 5 ve 10 mg/mL derişimlerde PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP’lerin (72. saat) Anneksin V/PI analizi gösterilmektedir. Manyetik PLGA NP’lerin 1,25 mg/mL derişimlerinde hücre çekirdekleri kırmızı (PI), çekirdek etrafındaki fosfatidilserine (PS) bağlanan Anneksin V yeşil olarak yoğun görülmüş, bu durum geç apoptotik veya nekrotik hücre ölümünü göstermektedir. Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP’lerin 1,25 mg/mL derişimlerinde PLGA+SPDON NP’lere göre daha az propidyum iyodür (PI) boyası, daha fazla AnneksinV/FITC boyası görülmüş, bu durum erken apoptotik evrede (özellikle hücrelerin yoğunlaştığı merkezden uzaklaştıkça) hücrelerin daha yoğun olduğunu göstermiştir. [199]. Canlı/ölü hücre analizinde olduğu gibi, Anneksin V/PI analizinde de nanopartikül derişimi arttıkça hücre yüzeylerinde tabakalaşma görülmüş (özellikle, 10 mg/mL derişimlerde), bu nanopartikül tabakası yıkamalar ile uzaklaştırılmaya çalışılmış fakat yüzeye çöktükleri için tam olarak uzaklaştırılamamıştır. Özellikle, 1,25 mg/mL NP dozu uygulandıktan 72 saat sonra T98G hücrelerinin Anneksin V/PI floresan görüntülerinin (Resim 4.12) MTT sonuçları (Şekil 4.40) ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Resim 4.12. Farklı dozlarda nanopartikül uygulaması sonrası (72.saat) Anneksin V-FITC/PI ile boyanmış T98G hücrelerinin floresan mikroskop görüntüleri

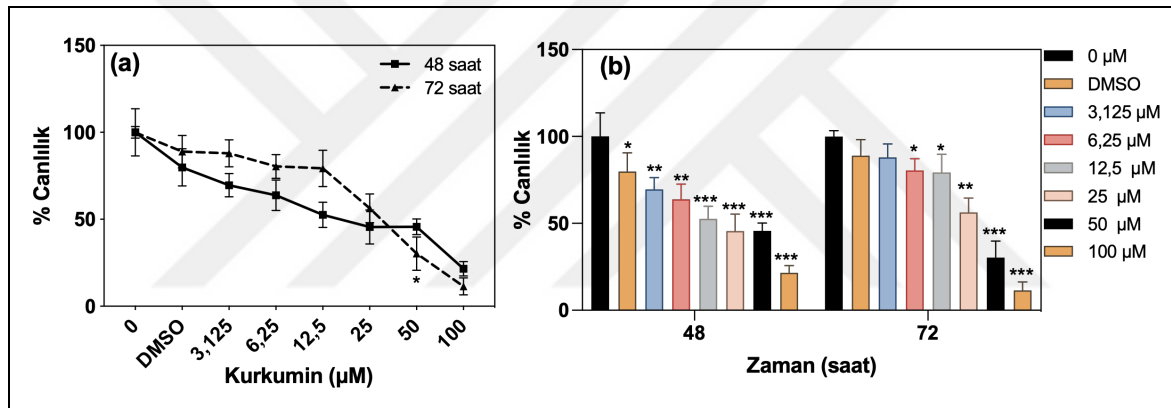
Hücre kültür çalışmalarında TMZ yüklü nanopartiküllerin miktarları artırılmış, ancak TMZ'nin 'etkin doz' konsantrasyonuna ulaşamamış ve T98G hücrelerinde üzerindeki toksik etkisi görülememiştir. Ayrıca, daha önce TMZ enkapsülasyon verimi çalışmasında açıklandığı gibi, farklı formülasyonlar kullanılarak sentezlenen NP'lere TMZ yükleme deneylerinde tekrarlanabilir %EE değerlerine ulaşamamıştır. Bu gerekçelerden ötürü etken madde değiştirilmiş ve glioblastoma tedavisi için potansiyel bir ajan olarak dikkat çeken kurkumin etken maddesinin kullanılmasına karar verilmiştir.

4.6.3. Serbest kurkuminin HUVEC/T98G hücrelerinde canlılık analizleri ve T98G hücre morfolojisine etkisi

Serbest kurkuminin HUVEC hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi-MTT analizi

Serbest kurkuminin HUVEC hücrelerinde, MTT analizleri ile belirlenen % canlılık grafikleri zamana ve doza bağlı olarak Şekil 4.41'de verilmiştir. HUVEC hücrelerine uygulanan serbest kurkumin derişimleri 0-100 μ M aralığında belirlenmiş ve her bir doz değerinde DMSO oranı hacimce %1 olarak ayarlanmıştır. Aynı hacim oranında DMSO'nun hücre canlılıklarına etkisi kültür ortamında incelenmiş ve 48 saatlik grupta %20 ($p \leq 0,05$), 72 saatlik grupta %12 oranlarında hücre canlılık azalmaları tespit edilmiştir (Şekil 4.41b). Şekil 4.41a'da her bir doz değeri için zamana göre gruplar arası karşılaştırma yapılmış ve 48

saatlik kurkumin uygulanan grupta, 72 saatlik uygulamaya göre düşük dozlarda kurkuminin toksik etkisinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak, yüksek doz değerinde (50 μ M), 72 saatlik kurkumin uygulanan grupta, 48 saatlik gruba göre % canlılık değerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p \leq 0,05$). Şekil 4.41b’de ise her bir kurkumin uygulama süresinin (48 ve 72 saat) kendi içinde kontrol grubuna göre doza bağlı % canlılık analizleri yapılmış ve 48 saatlik CUR uygulanan grupta doz değerleri arttıkça tüm dozlarda hücre canlılığında anlamlı azalmalar görülmüştür. En yüksek kurkumin doz değerinde (100 μ M) 48 ve 72 saatlik grupların % canlılıkları sırasıyla, %21 ve %11 değerlerine düşmüştür ($p \leq 0,001$) (Şekil 4.41b). Serbest kurkuminin HUVEC hücrelerinde IC_{50} değeri Graphpad prism programı kullanılarak non-linear fit eğri denkleminde 30 μ M (72. saat) olarak hesaplanmıştır.

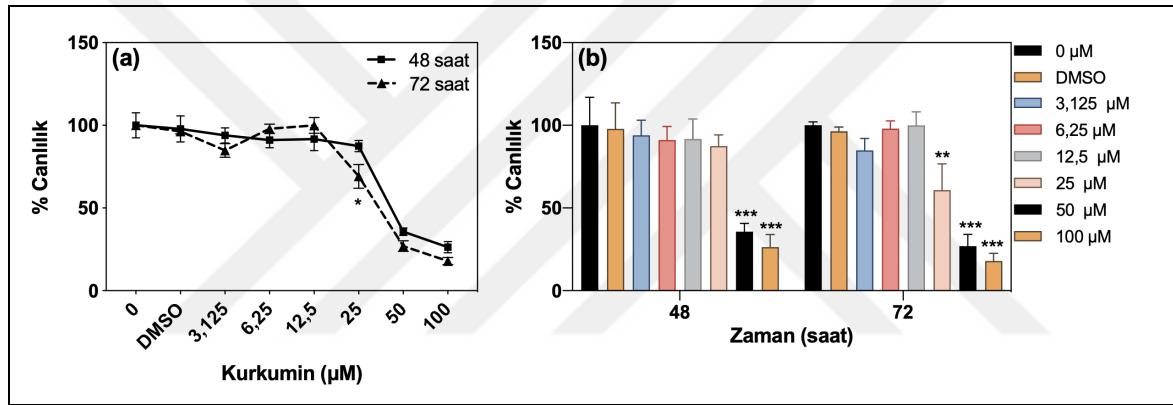


Şekil 4.41. Kurkuminin HUVEC hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **, $p \leq 0,001$ *** (n=5)

Serbest kurkuminin T98G hücreleri üzerine etkisinin belirlenmesi

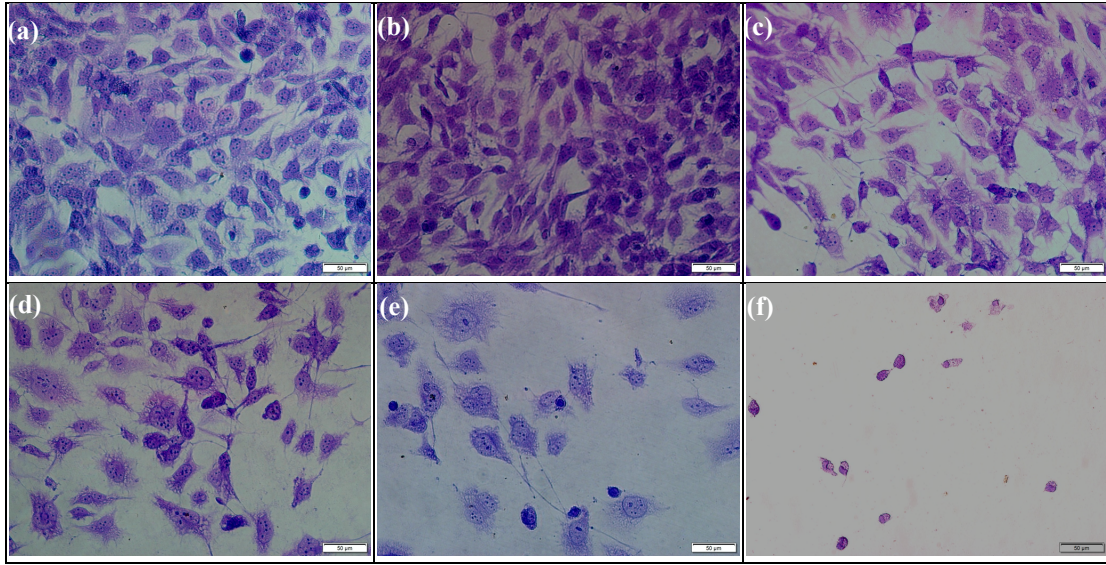
Serbest kurkuminin T98G hücrelerinde, MTT analizleri ile belirlenen % canlılık grafikleri zamana ve doza bağlı olarak Şekil 4.42’de verilmiştir. T98G hücrelerine uygulanan serbest kurkumin derişimleri 0-100 μ M aralığında belirlenmiş ve her bir doz değerinde DMSO oranı hacimce %1 olarak ayarlanmıştır. Aynı hacim oranında DMSO’nun hücre canlılıklarında bir etkisi olup olmadığı kültür ortamında incelenmiş ve 48 saatlik grupta %3, 72 saatlik grupta %4 oranlarında anlamlı olmayan hücre canlılık azalmaları tespit edilmiştir (Şekil 4.42b). Şekil 4.42a’da 48 saatlik grupta ~ 25 μ M, 72 saatlik grupta $\sim 12,5$ μ M kurkumin dozları T98G hücrelerinin % canlılıklarını sadece %10 kadar düşürmüş ve T98G hücrelerinin düşük

dozlarda kurkumine karşı dirençli oldukları görülmüştür. 72 saatlik kurkumin uygulanan grupta, 48 saatlik uygulamaya göre 25 μM doz değerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma görülmüştür ($p \leq 0,05$) (Şekil 4.42a). Şekil 4.42b’de ise her bir kurkumin uygulama süresinin (48 ve 72 saat) kendi içinde kontrol grubuna kıyasla doza bağlı % canlılık analizleri yapılmış ve 48 saatlik grupta 50 ve 100 μM doz değerlerinde T98G hücre canlılıklarının sırasıyla %36 ve %25’lere düştüğü görülmüştür ($p \leq 0,001$). Ayrıca, 72 saatlik grupta 25, 50 ve 100 μM derişimlerde kurkumin uygulamasının hücre canlılıklarını, %60 ($p \leq 0,01$), %26 ($p \leq 0,001$) ve %17 ($p \leq 0,001$) değerlerine düşürdüğü belirlenmiştir (Şekil 4.42b). Serbest kurkuminin T98G hücrelerinde IC_{50} değeri non-linear fit eğri denkleminde 35 μM (72. saat) olarak hesaplanmıştır.



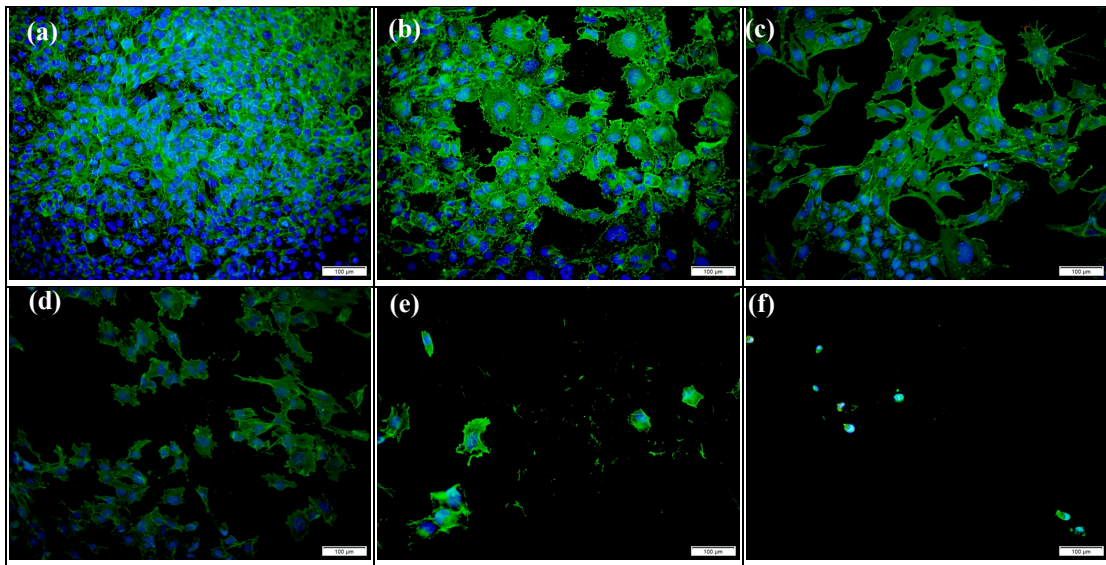
Şekil 4.42. Kurkuminin T98G hücrelerinde zamana ve doza bağlı % canlılık (a) çizgi eğrisi, her bir doz için gruplar arası kıyaslama yapılmıştır, (b) sütun grafiği, 48 ve 72. saatlerde kontrole göre grup içi kıyaslama yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ ($n=5$)

Farklı dozlarda (0-100 μM) kurkumin uygulanan T98G hücrelerinin 72. saat sonunda kristal viyole boyamalarına ait optik mikroskop görüntüleri Resim 4.13’te verilmiştir. Kristal viyole boyamaları incelendiğinde kontrol grubu hücrelerinin çok çekirdekli ve fibroblast benzeri yapıda oldukları görülmektedir (Resim 4.13a). Ayrıca, kurkumin dozu arttıkça hücre yoğunluğunda azalma görülmüş ve doz değeri 50 μM ’ın üstüne çıktığında hücre yoğunluğu çok fazla düşmüştür (Resim 4.13e,f). Kristal viyole boyamalarından elde edilen görüntüler MTT sonuçları ile uyumludur.



Resim 4.13. T98G hücrelerine farklı dozlarda serbest kurkumin uygulandıktan 72 saat sonra kristal viyole boyamaları (40X); (a) kontrol, (b) 6,25 µM (c) 12,5 µM, (d) 25 µM, (e) 50 µM, (f) 100 µM

Farklı dozlarda kurkumin uygulandıktan 72 saat sonra T98G hücrelerine Alexa Fluor-DAPI ikili boyaması yapılmış ve hücre çekirdeği mavi (DAPI), aktin filamentler ise yeşil (Alexa-Fluor) olarak floresan mikroskop ile görüntülenmiştir (Resim 4.14).



Resim 4.14. T98G hücrelerine serbest kurkumin uygulandıktan 72 saat sonra Alexa Fluor-DAPI boyamaları; (a) Kontrol, (b) 6,25 µM (c) 12,5 µM, (d) 25 µM, (e) 50 µM, (f) 100 µM

Resim 4.14a-c’de kurkuminin düşük dozlarında T98G hücre yoğunluğu yüksek olduğundan çekirdek (DAPI) boyası baskın görülmektedir. Hücrelere uygulanan kurkumin dozu arttıkça,

hücre yoğunluğu azalarak aktin filamentleri ve çekirdekler (Alexa Fluor/DAPI boyaları) daha az görülmüştür (Resim 4.14d-f).

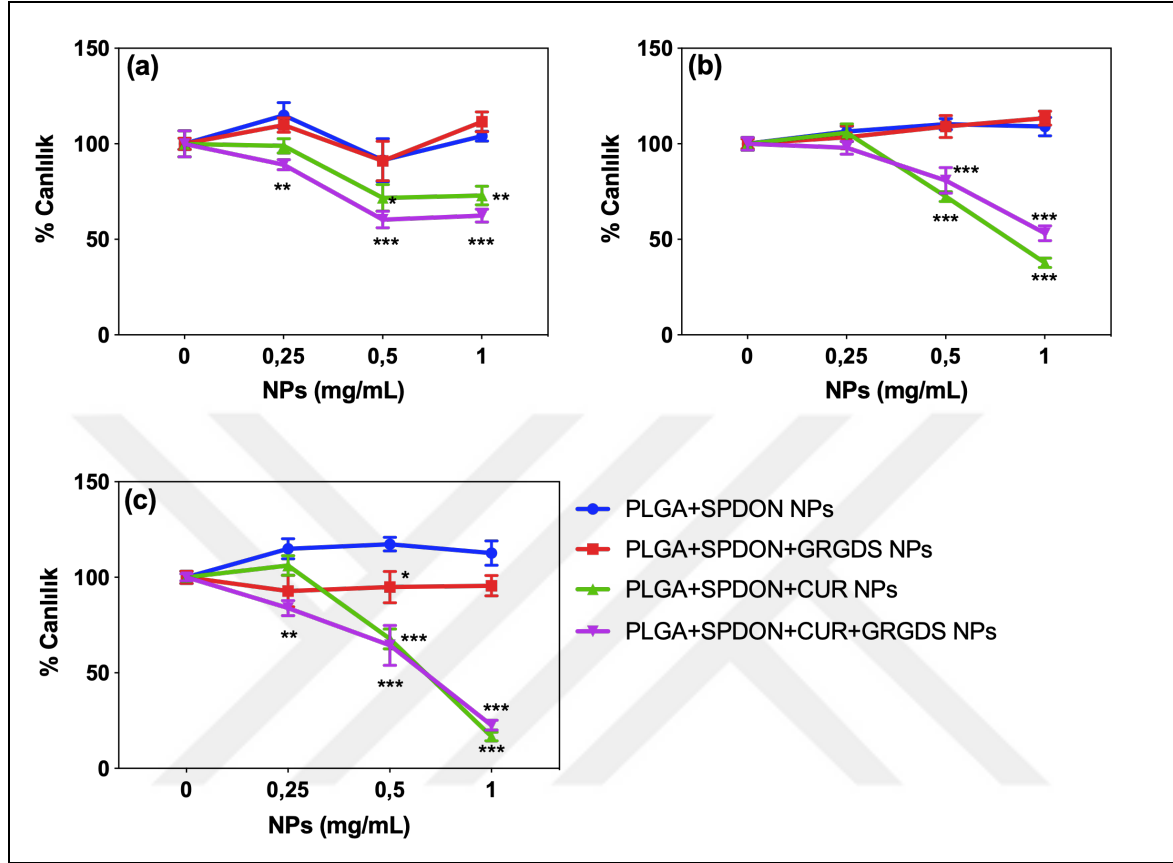
4.6.4. Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin hücre kültürü analizleri

Manyetik PLGA (PLGA+SPDON), peptit bağlı manyetik PLGA (PLGA+SPDON+GRGDS), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) nanopartiküllerinin T98G hücreleri üzerindeki etkileri; 24, 48 ve 72. saatlerde MTT, 72. saatte canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleriyle belirlenmiştir.

Kurkumin yüklü nanopartiküllerin T98G hücreleri üzerine etkisi- MTT analizleri

T98G hücrelerine farklı dozlarda (0-1 mg/mL) uygulanan nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkisi MTT analizi ile kantitatif olarak belirlenmiştir. Şekil 4.43'te 24, 48 ve 72. saatlerde MTT analizleri sonucu kontrol grubuna göre normalize edilmiş % hücre canlılığı grafikleri verilmiştir. Şekil 4.43a-c'de genel olarak, PLGA+SPDON+GRGDS NP'leri uygulanan hücrelerin, PLGA+SPDON NP'leri uygulanan hücrelere göre % hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, sadece Şekil 4.43c'de (72. saat) 0,5 mg/mL derişimde hücre canlılığında anlamlı bir azalma görülmüştür ($p \leq 0,05$). Şekil 4.43a'da T98G hücrelerine NP'ler 24 saat uygulandıktan sonra MTT analizleri gerçekleştirilmiş ve aynı doz değerlerinde nanopartiküller arası istatistiksel değerlendirme yapılmıştır. Buna göre, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerinin 0,5 ve 1 mg/mL derişimlerinde PLGA+SPDON NP'lere göre hücre canlılığında anlamlı azalmalar görülmüştür. Benzer olarak, Şekil 4.43b,c'de 48 ve 72 saat nanopartikül uygulaması sonrasında PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin PLGA+SPDON NP'lere göre özellikle 0,5 ve 1 mg/mL doz değerlerinde T98G hücre canlılıklarını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı belirlenmiştir ($p \leq 0,001$). Ayrıca, özellikle 0,5 ve 1 mg/mL doz değerlerinin T98G hücrelerinde % canlılığı en fazla; 24 saat için PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin, 48 saat için ise PLGA+SPDON+CUR NP'lerin düşürdüğü, ancak 72 saat sonra ise iki nanopartikülün de % hücre canlılığını yaklaşık aynı oranda azalttığı görülmüştür (Şekil 4.43a-c). Hücrelerin %50'sini inhibe eden doz miktarı olarak tanımlanan IC_{50} değerleri, non-lineer fit eğri denkleminde 72 saat sonra,

PLGA+SPDON+CUR NP'leri için ~0,62 mg/mL, PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'leri için ise ~0,61 mg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.43. Farklı dozlarda (0-1 mg/mL) PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+GRGDS, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin T98G hücrelerine uygulandıktan (a) 24, (b) 48 ve (c) 72 saat sonra MTT analizleri ile elde edilen % canlılık grafikleri (grafik simgeleri üç grafikte de aynı nanopartikülleri göstermektedir, istatistiksel olarak aynı dozların NP'ler arası karşılaştırması yapılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $n=5$)

Çizelge 4.10'da MTT analizlerinde kullanılan kurkumin yüklü NP'lerin doz değerlerinin (0,25; 0,5; 1 mg/mL) içerdikleri kurkumin ve salınabilen kurkumin miktarları göz önüne alınarak hesaplanan doz karşılıkları verilmiştir. Buna göre, kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin içerdikleri kurkumin miktarları; 36, 72, 144 μM ; peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin ise 6,5; 13; 26 μM olarak belirlenmiştir.

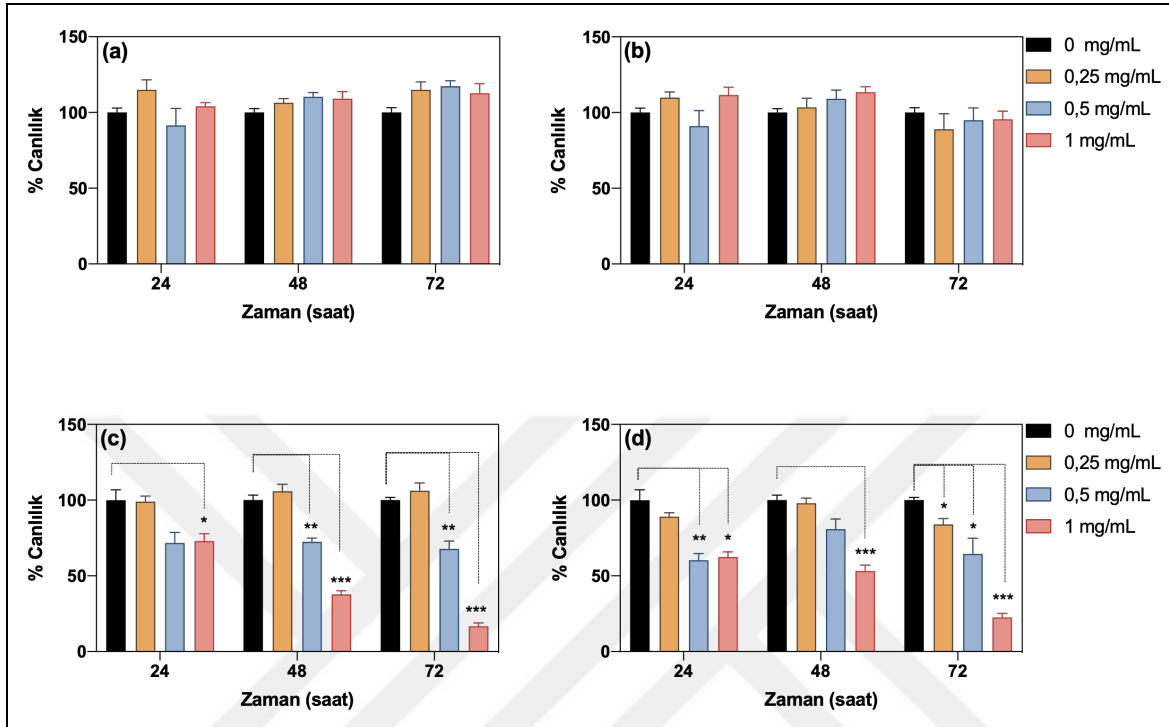
Çizelge 4.10. Kurkumin yüklü NP'lerin yüklenen ve salınan kurkumin miktarına göre doz değerleri

Parametreler	PLGA+SPDON+CUR NPs	PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs
%DL (yükleme verimi)	%8	%1,6
µg CUR/mg NP	80 µg	16 µg
µM CUR/mg NP	~200 µM	~40 µM
72 saatte NP'den salınan % CUR	%72	%65
1 mg NP'den 72 saatte salınan CUR miktarı	144 µM	26 µM
Uygulanan nanopartikül dozları (nanopartikül miktarına göre)	0,25; 0,5; 1 mg/mL	0,25; 0,5; 1 mg/mL
Uygulanan nanopartikül dozları (yüklenen ve salınan CUR miktarına göre)	36, 72, 144 µM	6,5; 13, 26 µM

Yapılan hesaplamalar ile GRGDS bağlı ve GRGDS içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin içerdikleri kurkumin miktarları arasında ~6 kat fark tespit edilmiştir (Çizelge 4.10). Bu farka rağmen Şekil 4.43a-c'de 24, 48 ve 72. saatlerde GRGDS bağlı ve GRGDS içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin % hücre canlılık eğrilerinde benzer toksik etkiler görülmüştür. Bu durum 6 kat daha düşük derişimde kurkumin içeren, peptit-bağlı kurkumin-yüklü manyetik PLGA NP'lerin, GRGDS peptit konjugasyonları ile hedeflendirilmesinin başarısı olarak görülmüştür.

Şekil 4.44'te, her bir nanopartikülün kendi içerisinde 24, 48 ve 72. saatlerde kendi kontrol gruplarına göre doza bağlı karşılaştırılmaları verilmiştir. Buna göre, kurkumin yüklü olmayan nanopartiküllerin (Şekil 4.44a,b) 24, 48 ve 72. saatlerde kontrol gruplarına göre doz değerleri arttıkça % hücre canlılık değerlerinde herhangi bir anlamlı fark görülmemiştir. Şekil 4.44c'de kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin farklı derişimlerinin, T98G hücrelerinin % canlılıklarını; 24. saatte 1 mg/mL için %72'ye ($p \leq 0,05$); 48. saatte 0,5 mg/mL için %72'ye ($p \leq 0,01$) ve 1 mg/mL için %37'ye ($p \leq 0,001$); 72. saatte 0,5 mg/mL için %67'ye ($p \leq 0,01$) ve 1 mg/mL için %16'ya ($p \leq 0,001$) düşürdükleri görülmüştür. Şekil 4.44d'de ise GRGDS bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin; 24. saatte 0,5 mg/mL ($p \leq 0,01$) ve 1 mg/mL ($p \leq 0,05$); 48. saatte 1 mg/mL ($p \leq 0,001$); 72. saatte 0,25 mg/mL ($p \leq 0,05$), 0,5 mg/mL ($p \leq 0,05$) ve 1 mg/mL ($p \leq 0,001$) derişimlerinde, T98G hücrelerinin % hücre canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalara neden olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, en yüksek dozda (1 mg/mL) nanopartikül uygulamasının 72. saatteki % hücre canlılığını, PLGA+SPDON+CUR NP uygulanan hücrelerde %16'ya, PLGA+SPDON

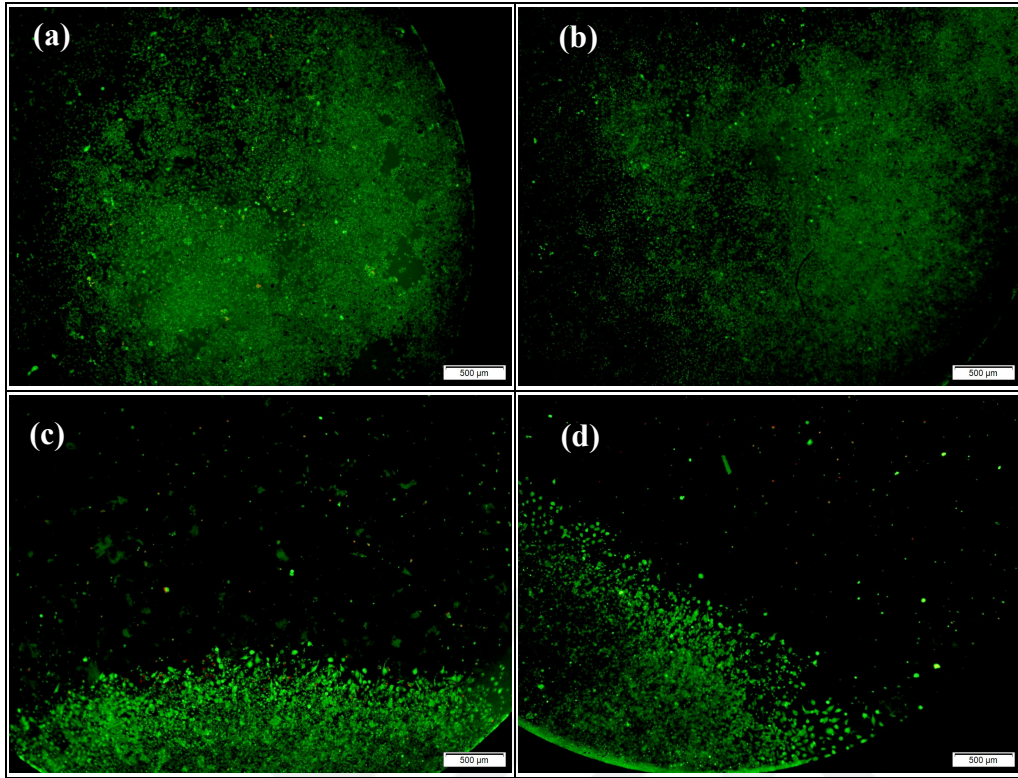
+CUR+GRGDS NP uygulanan hücrelerde ise %22'ye düşürdüğü görülmüştür (Şekil 4.44c,d).



Şekil 4.44. Farklı nanopartiküllerin kendi içlerinde 24, 48 ve 72. saatlerde doza bağlı % canlılık grafikleri, (a) PLGA+SPDON NPs, (b) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs (Nanopartiküller, her bir uygulama süresinde kendi kontrol grubuna göre karşılaştırılmıştır, anlamlılık dereceleri; $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$, $n=5$)

Kurkumin yüklü nanopartiküllerin T98G hücreleri üzerine etkisi-canlı/ölü hücre boyama yöntemi

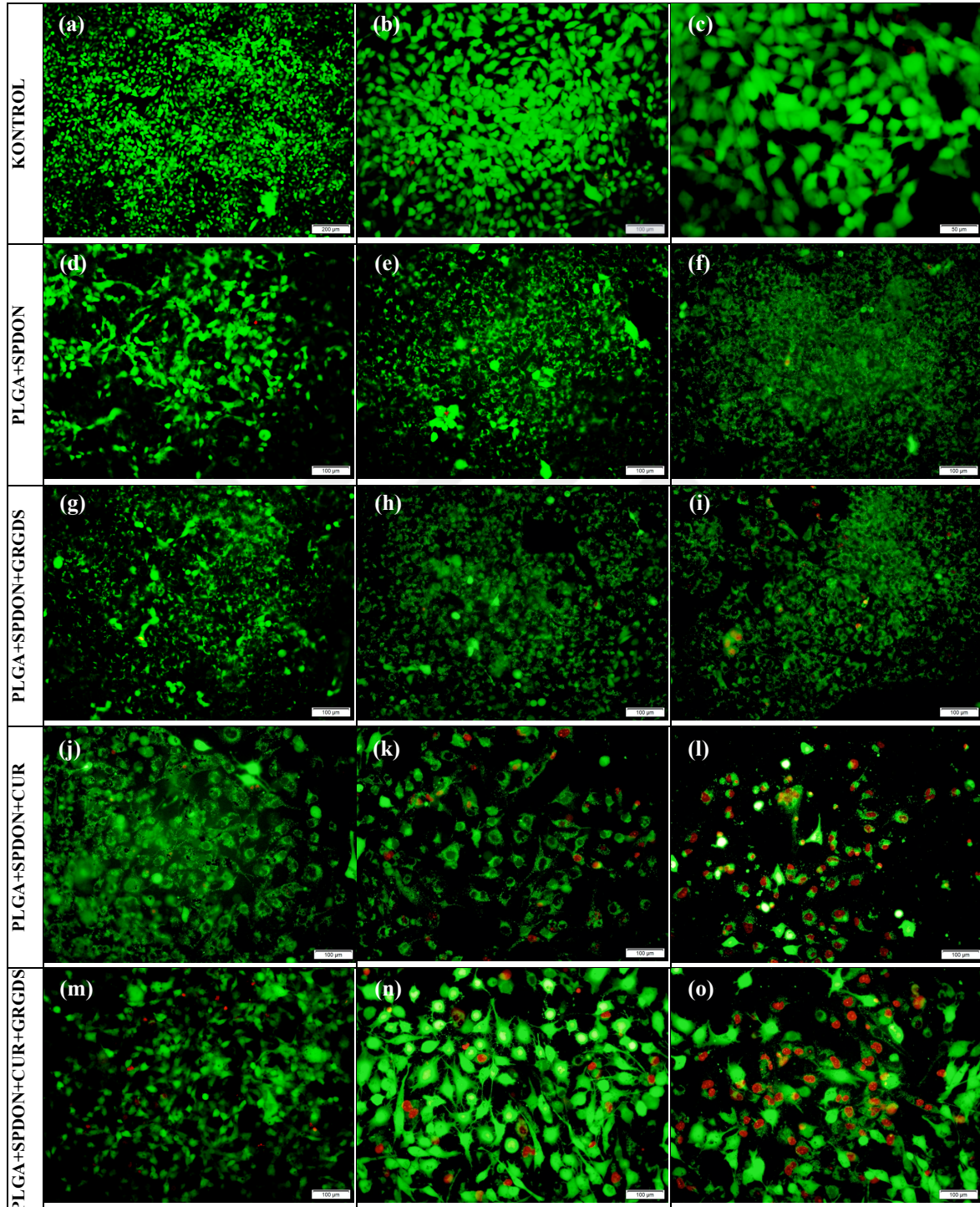
Farklı dozlarda (0-1 mg/mL) nanopartiküllerin, T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi 72 saat sonra canlı/ölü hücre boyama yöntemiyle floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Öncelikle, 1 mg/mL (en yüksek doz) derişimde tüm nanopartiküllerin 4X büyütme altında T98G hücrelerinde floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir (Resim 4.15). Resim 4.15'te kurkumin yüklü nanopartiküllerin (Resim 4.15c,d), kurkumin içermeyen nanopartiküllere (Resim 4.15a,b) göre T98G hücrelerinin canlılıklarını net bir şekilde düşürdüğü görülmektedir. Ayrıca, kurkumin yüklü nanopartiküllerin uygulandığı Resim 4.15c,d'de hücre kültür kaplarının merkezinde neredeyse hücre kalmamış ve çok az kalan hücreler de merkezden uzak, kültür kabının çeperine doğru toplanmıştır. Bu görüntülerin MTT sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.



Resim 4.15. T98G hücrelerine 1 mg/mL NP uygulandıktan 72 saat sonra canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (4X), (a) PLGA+SPDON NPs, (b) PLGA+SPDON+GRGDS NPs, (c) PLGA+SPDON+CUR NPs, (d) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs

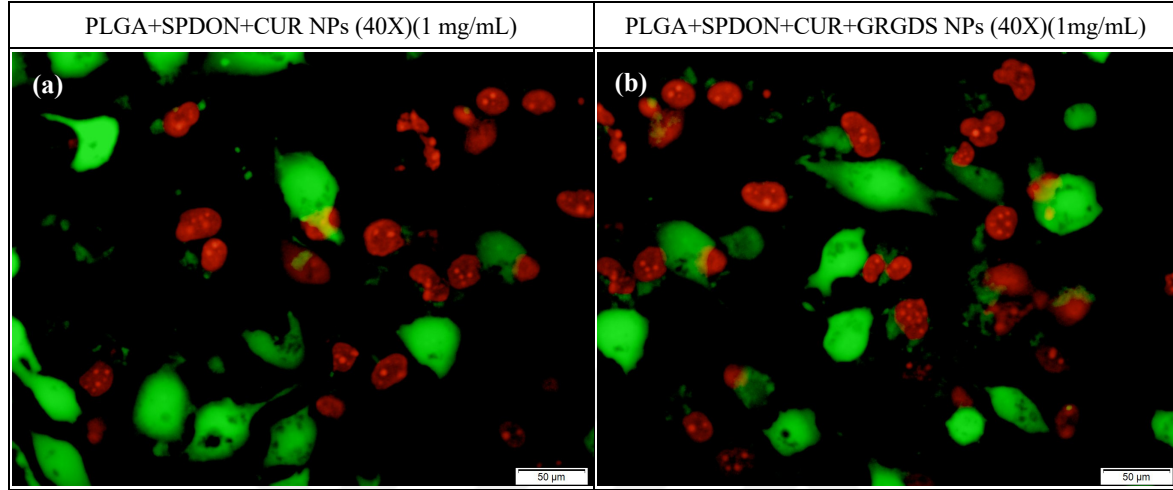
Resim 4.15'te en yüksek dozda (1 mg/mL) NP'lerin T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisini genel olarak (4X) görüntülendikten sonra farklı derişimlerde NP uygulanan T98G hücrelerinin daha yüksek büyötmelerde floresan mikroskop görüntüleri de alınmıştır (Resim 4.16). Resim 4.16a-c'de NP içermeyen (kontrol) T98G hücrelerinin farklı büyötmelerde floresan mikroskop görüntüleri verilmiş ve hücrelerin fibroblast benzeri bir morfolojiye sahip oldukları görölmüştür. Peptit içermeyen ve peptit bağılı manyetik PLGA NP'leri uygulanmış T98G hücrelerinin (Resim 4.16d-f;g-i) floresan görüntülerinde NP doz miktarı arttıkça kontrol hücrelerine göre hücre morfolojilerinin bir miktar bozulduğı fakat hücre canlılıklarında önemli bir değışim olmadığı görölmüştür. Bu görüntüler MTT sonuçları ile de uyumludur. Resim 4.16j'de 0,25 mg/mL derişimde PLGA+SPDON+CUR NP'ler ile muamele edilen hücrelerin, kontrol hücrelerine göre hücre canlılığında bir azalma görölmemiş, ancak doz miktarı arttıkça (Resim 4.16k) ölü hücreler (kırmızı) belirgin hale gelmiş ve 1 mg/mL doz değerinde artık hücre canlılığının önemli ölçüde azaldığı görölmüştür (Resim 4.16l). Peptit bağılı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin floresan görüntülerinde ise 0,25 mg/mL derişimde az da olsa ölü hücre (kırmızı) görüntölenmiştir

(Resim 4.16m), nanopartikül doz miktarı arttıkça ölü hücrelerin sayısı artmış (Resim 4.16n) ve 1 mg/mL doz değerinde ölü hücreler yoğun bir şekilde görülmüştür (Resim 4.16o).



Resim 4.16. T98G hücrelerine 0,25; 0,5; 1 mg/mL NP uygulandıktan 72 saat sonra canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (a-c) kontrol grupları, 10X, 20X, 40X; (d-f) PLGA+SPDON NPs (20X), (g-i) PLGA+SPDON+GRGDS NPs (20X), (j-l) PLGA+SPDON+CUR NPs (20X), (m-o) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs (20X)

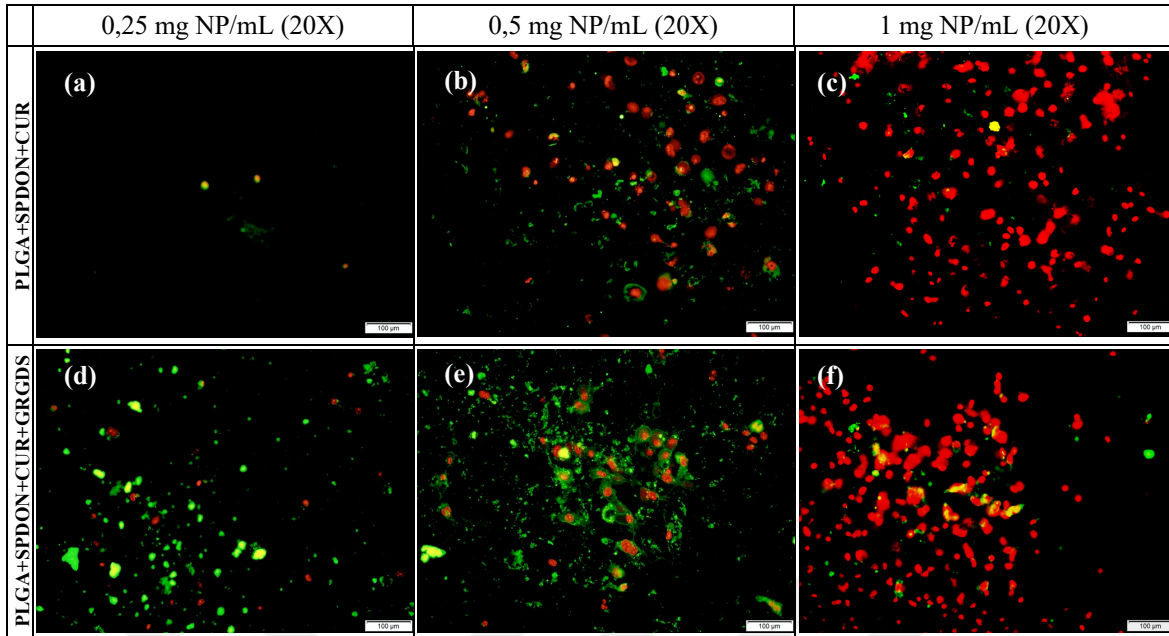
Resim 4.17’de ise 1 mg/mL derişimde peptit içermeyen ve peptit bağı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP’ler uygulanmış T98G hücrelerinin 40X büyütmedeki floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. Nanopartiküller uygulandıktan 72 saat sonra canlı/ölü hücreler ve hücre morfolojileri net bir şekilde görölmektedir.



Resim 4.17. T98G hücrelerinin 72. saatte canlı/ölü hücre floresan mikroskop görüntüleri (1 mg/mL) (a) PLGA+SPDON+CUR NPs, (b) PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NPs

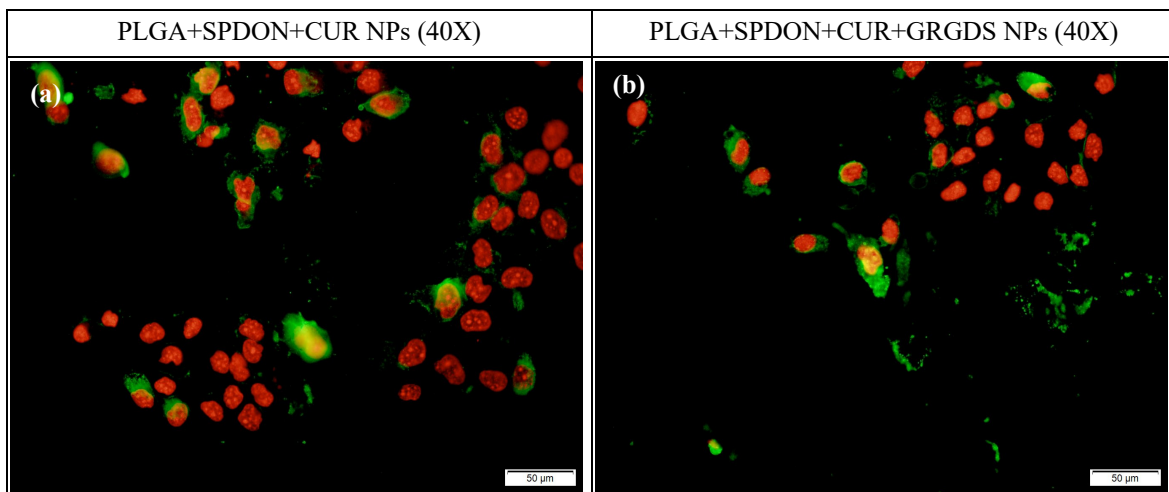
Kurkumin yüklü nanopartiküllerin T98G hücrelerinin ölüm yolları üzerine etkisinin Annexin V-Propidium Iyodür boyama yöntemleri ile belirlenmesi

Peptit bağı ve peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin T98G hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamaları yapılmış ve floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Resim 4.18). Resim 4.18a-c’de kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri uygulanan T98G hücrelerinde artan doz miktarı ile geç apoptotik/nekrotik hücrelerin yoğunluğu artmış ve 1 mg/mL doz değerinde artık membran bütünlüğü tamamen bozularak yoğun bir şekilde çekirdek boyası (kırmızı) görölmüştür. Aynı şekilde, Resim 4.18d-f’de peptit bağı kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri uygulanan T98G hücrelerinde artan doz miktarı ile çekirdek boyasının (PI) yoğunluğu artmış ve 1 mg/mL doz değerinde geç apoptotik/nekrotik hücreler oldukça fazla sayıda görölmüştür. Farklı derişimlerde peptit bağı/peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri uygulanan T98G hücrelerinin Anneksin V/PI boyamaları gerek canlı/ölü boyama sonuçları ile gerekse MTT sonuçları ile uyumlu olduğı sonucuna varılmıştır.



Resim 4.18. T98G hücrelerine PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'leri uygulandıktan 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamalarına ait floresan mikroskop görüntüleri

Resim 4.19a,b'de ise peptit bağlı/peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin T98G hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamalarının 40X büyütmede floresan mikroskop görüntüleri verilmiştir. Burada, membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerin çekirdekleri kırmızı (PI) ve çekirdekleri etrafında yeşil (FITC) bir halka net olarak görülmüş ve bu durum geç apoptotik veya nekrotik evreyi işaret etmektedir

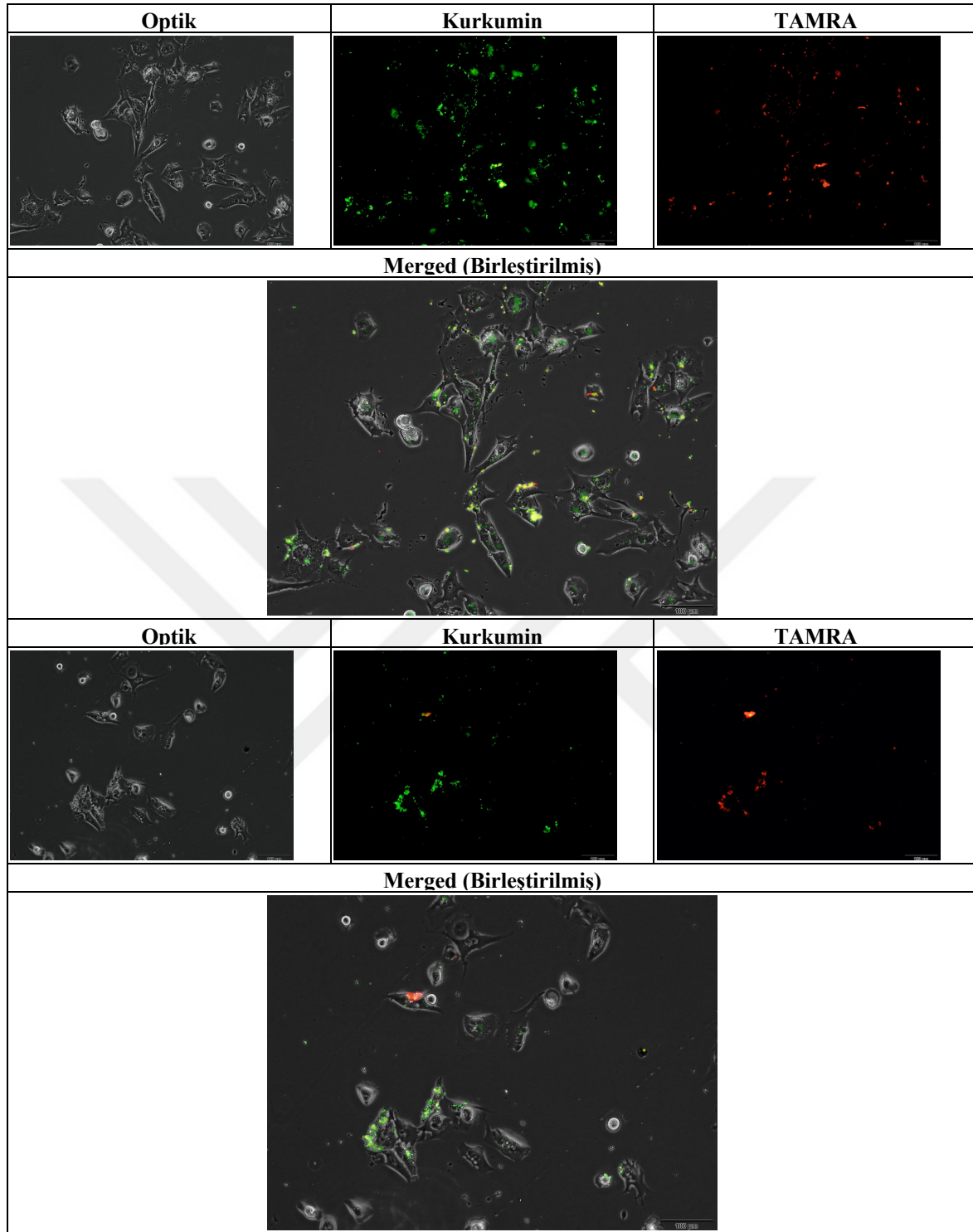


Resim 4.19. T98G hücrelerine uygulanan peptit bağlı ve peptit içermeyen kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin (1 mg/mL), 40X büyütmede 72 saat sonra Anneksin V/PI boyamalarının floresan mikroskop görüntüleri

Bazı kaynaklara göre tek başına çekirdek boyasının (PI) görülmesi, nekrotik hücre ölümünün göstergesi olduğu bildirilmektedir [200]. Ancak, genel kabul olarak ikili boyama ile floresan görüntülerden geç apoptotik ve nekrotik hücre ölümü ayrımı yapılamayacağı, bu ayrım için apoptoz göstergelerinden olan kaspaz deneyleri gibi ilave yöntemlerin gerekli olduğu bildirilmiştir [201]. Ayrıca, akış sitometrisi (flow cytometry) yöntemi ile kantitatif olarak hücrelerin canlı, erken apoptoz, geç apoptoz ve nekroz ayrımları yapılabilmektedir.

Peptit bağlı nanopartiküllerin hücresel alım deneyi

Kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin hücre içerisine alınıp alınmadığının belirlenmesi amacıyla nanopartiküllere floresan boya işaretli (TAMRA) GRGDS peptit konjugasyonu yapılmış ve hücreler floresan mikroskop altında görüntülenmiştir (Resim 4.20). Karboksitetrametilrodamin (TAMRA) molekülü floresan mikroskop altında kırmızı renkte ve doğal bir floresan ışıma özelliğinde olan kurkumin ise yeşil renkte görülmektedir. GRGDS-TAMRA bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartikülleri T98G hücrelerine 2 saat boyunca uygulanarak nanopartikül-hücre etkileşimine izin verilmiştir. Nanopartikül-hücre etkileşimi sonunda, floresan mikroskopun farklı filtreleri kullanılarak kurkumin ve TAMRA floresan görüntüleri ile hücrelerin optik mikroskop görüntüleri alınmış ve bu görüntüler Resim 4.20’de verilmiştir. Resim 4.20’de GRGDS-TAMRA işaretli kurkumin yüklü manyetik PLGA nanopartiküllerin T98G hücreleri tarafından hücresel alımlarının başarılı bir şekilde gerçekleştiği net bir şekilde görülmektedir.

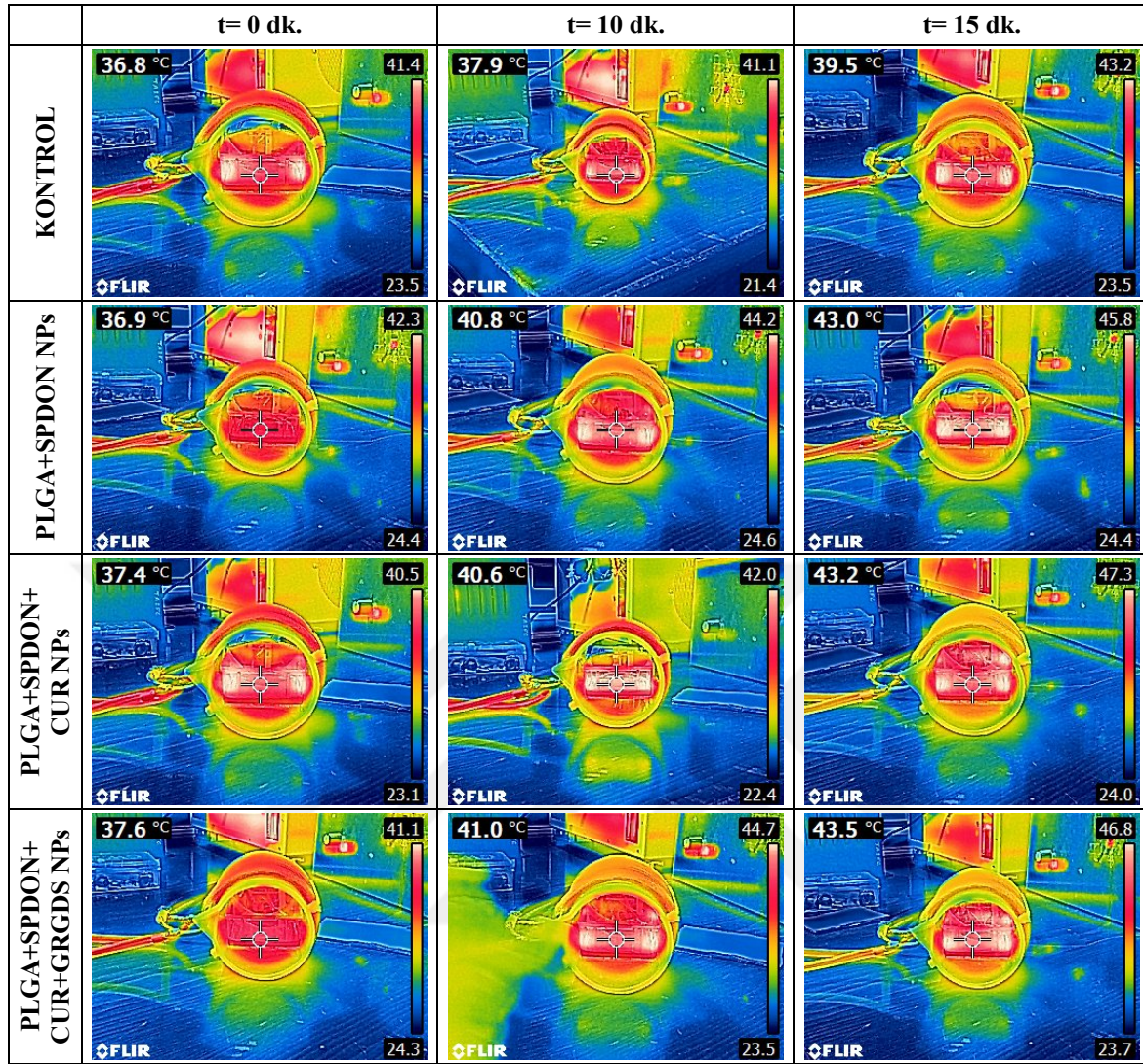


Resim 4.20. T98G h  relerine PLGA+SPDON+CUR+GRGDS-TMR NP'ler uygulandıktan 2 saat sonra optik, floresan ve optik üzerine bindirilmiş floresan mikroskop görüntüleri

4.6.5. Hipertermi maruziyeti ile hücre kültürü deneyleri

Manyetik PLGA (PLGA+SPDON), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve GRGDS bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) NP'lerin, hipertermi uygulaması (13,56 MHz RF alan) altında T98G hücreleri üzerine etkileri hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenmiştir. Hipertermi deneylerinde, T98G hücrelerine 750 µg/mL derişimde nanopartikül uygulanmış ve NP'lere yüklenen kurkumin miktarları; PLGA+SPDON+CUR NP'leri için ~150 µM, PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'leri için ~30 µM olarak hesaplanmıştır. T98G hücrelerine 750 µg/mL derişimde nanopartikül uygulandıktan sonra hücreler 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve inkübasyon sürecinden sonra kültür kapları solenoid bobin içerisine yerleştirilerek 15 dk (10 dk-150 watt; 5dk-200 watt) boyunca 13,56 MHz RF alana maruz bırakılmıştır. Radyofrekans alana maruz bırakılan T98G hücrelerinin maruziyet boyunca termal kamera ile sıcaklık takipleri yapılmış ve termal kamera görüntüleri Resim 4.21'de verilmiştir. Resim 4.21'de farklı NP'ler uygulanan ve NP uygulanmayan (kontrol) T98G hücrelerinin RF alan altında t=0, 10 ve 15. dakikalarda çekilen termal kamera görüntüleri verilmiştir. Bu görüntülerden, kontrol hücrelerinin bulunduğu kaplarda nanopartikül bulunmamasına rağmen RF alan etkisiyle ~2,5°C kadar sıcaklık artışı tespit edilmiştir. Bu sıcaklık artışının hücrenin besiyeri içeriğindeki iyonlardan kaynaklandığı düşünülmektedir. PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerinin 15 dk'lık hipertermi maruziyeti sonunda sıcaklıkları (ve artışları), sırasıyla 43 (6,1); 43,2 (5,8) ve 43,5°C (5,9°C) olarak ölçülmüştür.

Hipertermi maruziyeti sonrasında, hücreler 25 cm²'lik kültür kaplarından tripsin ile kaldırılmış 96-gözlü kültür kaplarına ekilmiştir. Ekim sonrası 24 saat inkübatörde bekletilen hücrelerin yüzeye tutunmaları sağlanmıştır ve sonrasında hücrelere, MTT, canlı/ölü hücre, Anneksin V/PI ve ROS analizleri yapılarak nanopartiküller varlığında RF hiperterminin T98G hücreleri üzerine etkileri incelenmiştir.

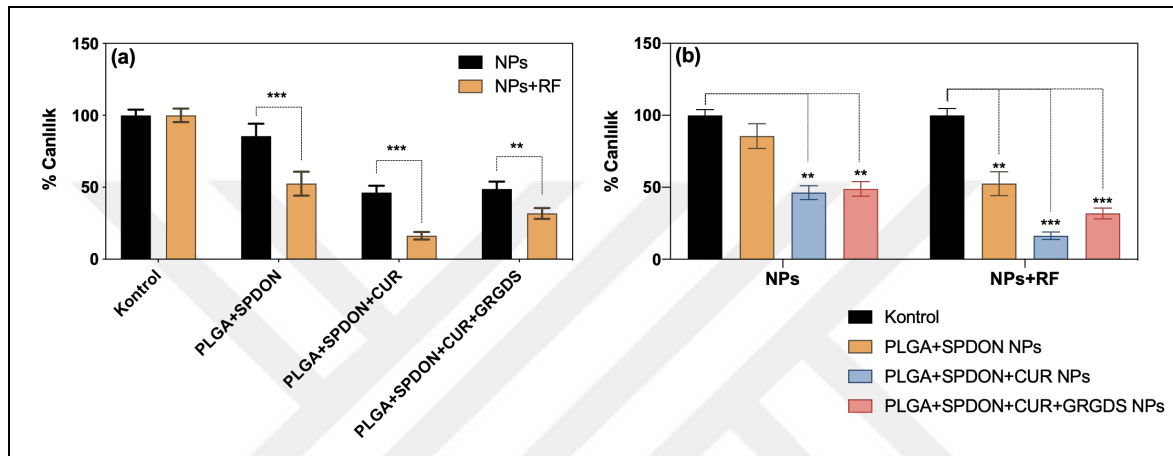


Resim 4.21. Radyofrekans (RF) alan maruziyeti sırasında T98G hücrelerinin bulunduğu 25 cm²'lik kültür kabının termal kamera görüntüleri

Hipertermi maruziyetinin T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi- MTT analizi

Manyetik PLGA (PLGA+SPDON), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) NP'lerin radyofrekans hipertermi maruziyeti altında T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir (Şekil 4.45). Şekil 4.45a'da hipertermi uygulanan ve uygulanmayan aynı nanopartiküllerin istatistiksel karşılaştırmaları yapılmıştır. Buna göre, nanopartiküller varlığında hipertermi uygulanan T98G hücrelerinin, hipertermi uygulanmayan hücrelere göre % canlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı azalmalar görülmüştür (Şekil 4.45a). Şekil 4.45b'de ise sadece NP uygulanan ve NP+RF alan uygulanan hücrelerin % canlılıkları kendi içlerinde kendi kontrol hücrelerine

göre karşılaştırılmıştır. Sadece NP uygulanan grupta, PLGA+SPDON+CUR NP'leri kontrol hücrelerine göre % hücre canlılığını %46'ya ($p \leq 0,01$), PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'leri ise %48'e ($p \leq 0,01$) düşürmüştür (Şekil 4.45b). Ayrıca, hipertermi maruziyeti T98G hücrelerinin % canlılıklarını; PLGA+SPDON NP'leri ile %52'ye ($p \leq 0,01$), PLGA+SPDON+CUR NP'leri ile %16'ya ($p \leq 0,001$) ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'leri ile %31'e ($p \leq 0,001$) düşürmüştür (Şekil 4.45b).

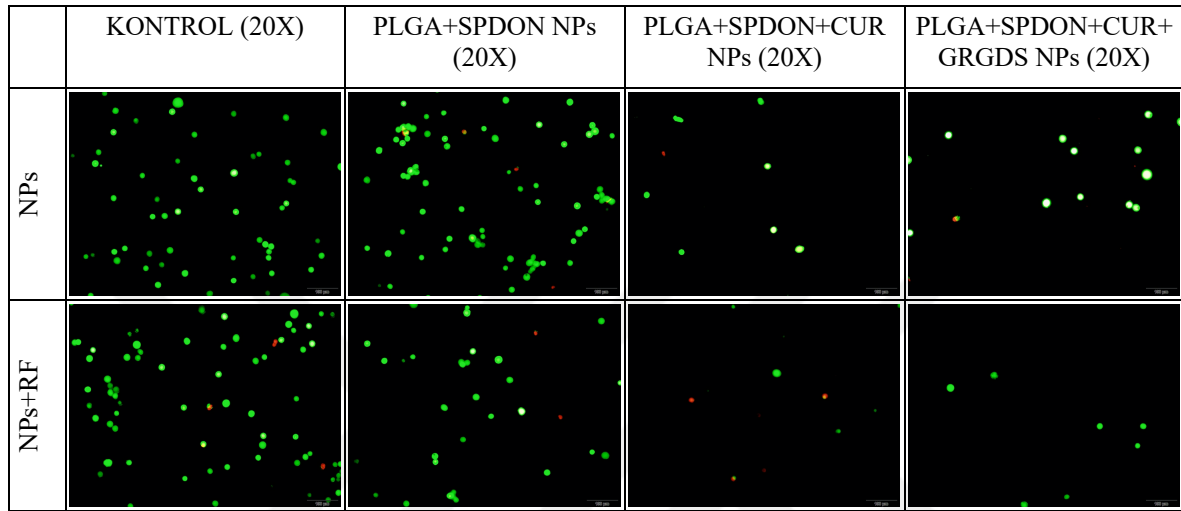


Şekil 4.45. RF-hipertermi uygulama sonrası T98G hücrelerinin % canlılık sütun grafikleri, (a) hipertermi uygulanan ve uygulanmayan nanopartiküllerin karşılaştırılması, (b) hipertermi uygulanmayan grubun kendi içinde, hipertermi uygulanan grubun kendi içinde karşılaştırılması, $p \leq 0,05^*$, $p \leq 0,01^{**}$, $p \leq 0,001^{***}$ ($n=5$)

Hipertermi maruziyetinin T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi- canlı/ölü hücre boyama yöntemi

Radyofrekans hipertermi maruziyetinin farklı nanopartiküller varlığında, T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkisi canlı/ölü hücre boyama yöntemiyle floresan mikroskop altında görüntülenerek belirlenmiştir (Resim 4.22). Resim 4.22'de verilen floresan mikroskop görüntüleri kültür kabından tripsin ile kaldırılan süspanse hücrelerin görüntüleri olup, ölü hücreler (kırmızı) görüntülenememiş ve canlı hücreler (yeşil) üzerinden sonuçlar açıklanmıştır. Hipertermi maruziyeti yapılan PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin, hipertermi uygulanmayan NP'lere kıyasla T98G hücrelerinde canlı hücre sayılarını azalttığı görülmüş ve bu görüntülerin MTT sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Resim 4.22). Hipertermi uygulanmayan (NPs) grubun kendi içinde kontrol hücrelerine göre karşılaştırılması yapıldığında, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerinin, T98G canlı hücre sayılarını kontrol hücrelerine

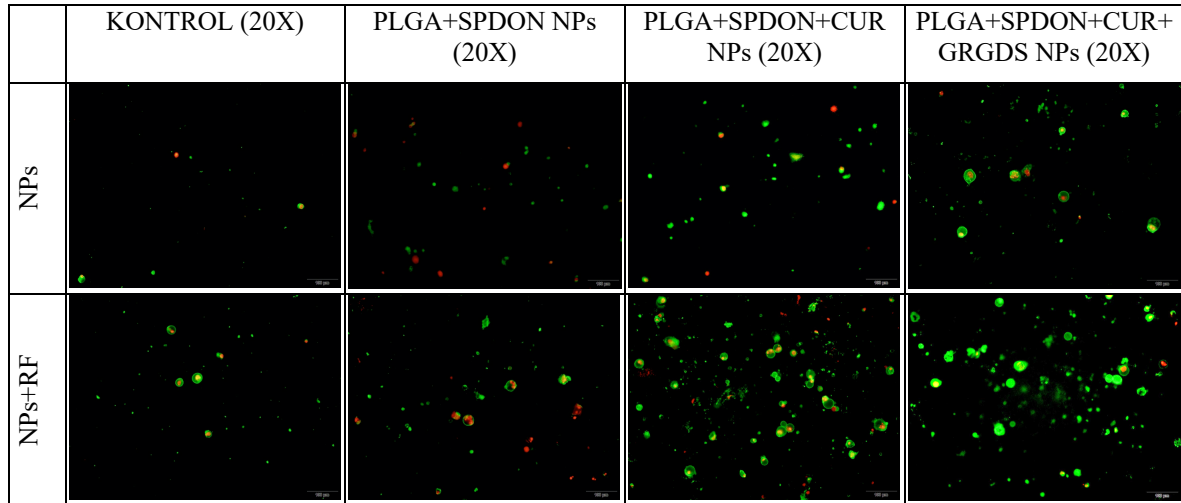
göre önemli ölçüde azalttığı görülmüştür. Aynı şekilde, hipertermi uygulanan grubun (NPs+RF) kendi içerisinde kontrol hücrelerine göre karşılaştırılmasında, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS NP'lerin kontrol hücrelerine göre T98G canlı hücre sayısını azalttığı tespit edilmiş ve floresan mikroskop görüntülerinin MTT analizleri ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Resim 4.22).



Resim 4.22. T98G hücrelerinde hipertermi uygulaması sonrası canlı/ölü hücre analizi

Hipertermi maruziyetinin T98G hücrelerinin ölüm yolları üzerine etkisi- Anneksin V/PI boyama yöntemi

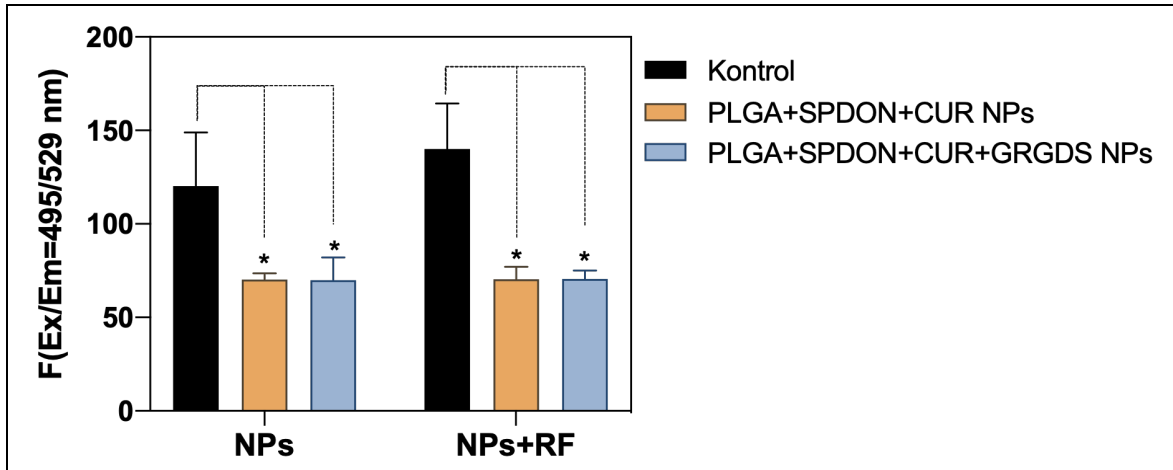
Radyofrekans hipertermi maruziyeti ve nanopartikül uygulaması altında, T98G hücrelerinin apoptotik/nekrotik ölüm yollarının hangisi üzerinden ölüme gittiği Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemiyle floresan mikroskobu kullanılarak incelenmiştir (Resim 4.23). Resim 4.23'te kontrol hücrelerinde, özellikle sadece nanopartikül uygulanan hücrelerde, çok az ölü hücre görülüp, hücre proliferasyonunun devam ettiği belirlenmiştir. Nanopartiküller varlığında hipertermi maruziyeti uygulanan hücrelerde, hipertermi uygulanmayan hücrelere göre daha fazla Anneksin V/PI boyası görülmüştür ve bu durum hipertermi uygulaması ile ölü hücre sayılarında (erken apoptotik evrede) artış olduğunu göstermektedir (Resim 4.23). Hipertermi uygulaması altında PLGA+SPDON+CUR NP'lerin uygulandığı T98G hücrelerinde membran bütünlüğünü kaybeden hücrelerin çekirdekleri kırmızı (PI) ve etrafında yeşil halka (Anneksin V-FITC) görülerek geç apoptoz/nekroz evresini işaret etmiştir. Hipertermi uygulaması altında PLGA+SPDON+CUR+GRGDS nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde ise plazma membranının bütün halde olması ile erken apoptotik evreyi işaret eden Anneksin V-FITC boyası daha çok görülmüştür.



Resim 4.23. T98G hücrelerinde hipertermi uygulaması sonrası Anneksin V/PI analizi

Hipertermi maruziyetinin T98G hücrelerinde oksidatif stres üzerine etkisi- ROS analizi

Hipertermi maruziyeti altında, kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) NP'lerinin, T98G hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna etkisi Şekil 4.46'da verilmiştir. Oksidatif stres oluşumu, reaktif oksijen türleri tespit kiti (K936-100, Biovision) kullanılarak belirlenmiş ve hipertermi maruziyetinden sonra hücelere ROS kit protokolü uygulanarak floresan spektrofotometre ile örneklerin ışık şiddetleri ölçülmüştür. Hipertermi uygulanmayan sadece nanopartikül içeren grupta, PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS nanopartikülleri, T98G hücrelerinde ROS oluşumunu kontrol hücrelerine göre %55 ($p \leq 0,05$) seviyelerine düşürmüştür. Hipertermi maruziyeti altında nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde ise ROS oluşumu kontrol hücrelerine göre %41 seviyelerine düşmüştür ($p \leq 0,05$). Ancak, hipertermi uygulanan ve uygulanmayan aynı nanopartiküllerin oluşturduğu ROS seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir.



Şekil 4.46. T98G hücrelerinde NPs veya NPs+RF uygulamaları sonrası ROS seviyeleri

5. TARTIŞMA

Tez çalışmasında, radyofrekans (RF)-alan kaynaklı hipertermi maruziyet sisteminin üretimi, üretilen bu cihazla, farklı biyo-aktif özellikler kazandırılmış nanopartikül etkinliğinin, RF-alan hipertermi etkisiyle arttırılması ve *in vitro* koşullarda glioblastoma kanser hücrelerinde araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, öncelikle, glioblastoma (GBM) standart tedavisi ve bu tedavinin geliştirilmesine yönelik gerçekleştirilen klinik çalışmalar ve mevcut tedavide geline son durum özetlenmiştir. Daha sonra ise, tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerden elde edilen sonuçlar 'Bulgular' bölümündeki sıralama izlenerek literatür eşliğinde tartışılmıştır.

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörlerinin, en agresif ve ölümcül türü olan glioblastoma multiforme (GBM), histolojik heterojenite, yüksek invazyon, atipik çekirdek gibi histopatolojik özellikler gösteren IV. derece diffüz gliomadır [1, 2, 70]. Glioblastoma standart tedavi protokolü, tümör lokasyonu ve hastanın fiziksel durumunu göre küçük değişiklikler içerebilmekle birlikte, temel olarak, cerrahi rezeksiyon ile başlamaktadır, ardından eşzamanlı radyoterapi (RT) ve kemoterapi (temozolomid, TMZ) ile devam etmektedir [2, 22, 24-26].

Etken madde olarak TMZ'nin GBM tedavisinde vazgeçilmez bir ajan olarak standartlaşması, Stupp ve ark. tarafından 2005 yılında yapılan klinik çalışmada, cerrahi sonrası, RT+TMZ tedavisinin RT'ye göre GBM prognozunda iyileşme göstermesi ile başlamıştır [24]. İlgili çalışmada, yeni teşhis GBM hastalarının ortalama sağkalım süreleri, sadece RT alan hastalarda 12,1 ay, RT+TMZ (eşzamanlı ve adjuvan TMZ) alan hastalarda ise 14,6 ay olarak bildirilmiştir ve bu çalışmanın sonuçları ile oral bir alkilleyici ajan olan TMZ yeni teşhis GBM hastaları için FDA tarafından onaylanarak 'standart tedavi' protokolüne girmiştir [1, 28]. Ancak, aynı grubun, 2017 yılında yayınlanan, dört rastgele çalışmanın retrospektif analizinde, RT+TMZ tedavisinin ardından uygulanan adjuvan TMZ'nin (6 kür) genel sağkalım oranını arttırmadığı ve aksine hastaları daha çok toksik etkilere maruz bıraktığı belirtilmiştir [1, 202]. Bununla birlikte, glioblastoma hücrelerinin TMZ'ye karşı direnç geliştirmesi, tümör ilerlemesi ve tümör nüksünü kaçınılmaz kılmaktadır [22, 39] ve daha yüksek dozlarda uygulanan TMZ, hiçbir klinik başarı göstermemektedir [2, 40]. Sonuç olarak, GBM standart tedavisinde, cerrahi, radyoterapi ve

kemoterapi (TMZ) kombinasyonları yıllardır değişmeden uygulanmasına rağmen, yeni teşhis GBM hastalarında ortalama sağkalım süreleri 12-15 ay, nükseden GBM hastalarında ise 6 ay olarak bildirilmiştir [1, 2, 19].

Glioblastoma tedavi etkinliğini (aslında, hastaların ortalama sağkalım süresi) artırmaya yönelik ilaç çalışmalarının birçoğunda, TMZ'nin biyolojik etkilerine benzer etkiler gösterebilen küçük molekül ağırlıklı ajanlar veya diğer kanser türlerinde toksik etkileri ispatlanmış FDA onaylı ajanlar kullanılmaktadır [68]. Bu ilaçların tedavi etkinlikleri, genellikle standart tedavi protokolüne entegre edilmeleri ve TMZ tedavisine göre hastaların ortalama sağkalım sürelerindeki değişimleri üzerinden değerlendirilmektedir [26]. Bu ajanlardan özellikle alkilleyici olanlar GBM hastalarının genel sağkalım oranlarını arttırmış, ancak TMZ'ye göre oldukça toksik olduklarından, bunların GBM tedavisinde ikinci seçenek ajanlar olarak tercih edilmeleri uygun bulunmuştur [37]. Bunun haricinde, tümör bölgesinde aşırı eksprese olan büyüme faktörlerini (EGF, VEGF) inhibe eden ajanlar (erlotinib, bevacizumab) GBM tedavisinde denenmiş, ancak bu ajanlarında GBM hastalarının prognozunu önemli ölçüde değiştirmedeği ifade edilmiştir [2].

Potansiyel terapötik stratejilerin, tümör patogenezinin anlaşılmasındaki önemli katkılarına rağmen, yeni teşhis GBM tedavisinde, FDA onaylı, TMZ'den daha etkili bir ajan henüz bulunmamaktadır ve GBM tüm kötü huylu (malign) beyin tümörleri arasında en düşük sağkalım süresine sahip tedavi edilemeyen bir hastalık olmaya devam etmektedir [14]. Ancak, elektromanyetik (EM) spektrumun radyofrekans bölgesindeki EM alanların, direk biyolojik etkileri (TTFields) veya manyetik nanopartiküller (SPDON) aracılığıyla biyolojik etkileri üzerine son zamanlarda GBM tedavisinde olumlu gelişmeler yaşanmıştır.

Alternatif elektrik alanlar kullanılarak, elektriksel uyarıların GBM hücrelerinde anti-mitotik etki oluşturmalarına dayanan 'tümör tedavi alanları' (tumor treating fields, TTFields), yeni teşhis-GBM tedavisinde FDA tarafından 'standart tedavi protokolü'ne dahil edilmiştir [41, 42, 203]. Stupp ve ark. sadece TMZ tedavisine göre TMZ+TTFields uygulanan GBM hastalarında genel sağkalım sürelerinin 5 ay arttığını rapor etmişlerdir [46].

Alternatif manyetik alan maruziyetinde ise, manyetik nanopartiküller aracılığıyla, tümör bölgesinde ısı oluşumuna dayanan manyetik nano hipertermi (MNH) uygulaması, Avrupa'da, nükseden-GBM vakalarında adjuvan-tedavi olarak uygulanmaktadır

(NanoTherm, MagForce Teknolojileri, Almanya). Tedavi protokolü, intratümöral manyetik nanopartikül enjeksiyonu, ardından eş zamanlı manyetik hipertermi ve radyoterapi (RT) olarak devam etmektedir. Sonuç olarak, nükseden-GBM hastalarında sadece TMZ tedavisine göre MNH+RT uygulanan GBM hastalarının ortalama sağkalım sürelerinde yaklaşık 7 aylık bir artış görülmüştür [47, 204].

Son 20 yıl içerisinde, GBM standart tedavisinde değişen tek şey, alternatif elektrik alanların (TTFields) tedavi protokolüne dördüncü sıradan girmeleri olmuştur. Glioblastoma tedavisini geliştirmeye yönelik yapılan klinik çalışmaların başarı kriteri ise, hastaların genel ve progresyonsuz sağkalım sürelerindeki "aylık" artışlar üzerinden değerlendirilmektedir. Ancak, ağır tedavi şartları, hastaların nörolojik fonksiyonlarını ve yaşam kalitelerini oldukça düşürmektedir. Bu nedenlerle, GBM tedavisinin geliştirilerek hastalara daha etkili bir tedavi sağlanması kritik bir öneme sahiptir. Son yıllarda, farklı fonksiyonel özellikler kazandırılan nanopartikül çalışmaları oldukça artmıştır ve bu nanopartiküllerin hedef bölgelerde non-invazif uyaranlara (elektromanyetik alan, ultrases, lazer vb.) verdikleri yanıtlar ile tedavi etkinlikleri belirlenmektedir.

5.1. Hipertermi Maruziyet Sistemi Üretiminin Değerlendirilmesi

Radyofrekans (RF) alan hipertermi maruziyet sistemi; RF osilatör, RF sürücü (driver), RF yükseltici (amplifier) ve RF empedans uyumlayıcı (matching unit) devreleri içermektedir. Bu devrelerin kendi içerisinde ayrı ayrı montajları, kontrollü ölçümleri, metal kutulama işlemleri yapılmıştır ve RF sinyalleri (13,56 MHz, 400 watt) üretebilen bir cihaz haline başarılı bir şekilde getirilmiştir. Ayrıca, bu sisteme pancake ve solenoid yapıda bobinler entegre edilerek, bu bobinler aracılığıyla hücrelere RF-alan maruziyeti uygulanmış ve termal kamera ile hücrelerin bulundukları ortamın sıcaklık değişimleri takip edilmiştir.

Tasarımı ve üretimi gerçekleştirilen RF-alan hipertermi maruziyet sisteminin ticarileşebilme potansiyeli vardır, ancak yurtdışında ticarileşmiş muadillerine göre (Bkz. Bölüm 2.6.4) hücre kültürü ve hayvan çalışmaları için daha kompakt hale getirilmesi ve sistem kurulumunun basitleştirilmesi-iyileştirilmesi gibi eksikleri bulunmaktadır. Bu eksikliklerin tamamlanması ile tez çalışması kapsamında geliştirilen sistem, gerek RF jeneratörü olarak plazma sterilizasyon cihazlarında gerekse tam kontrollü RF-alan hipertermi maruziyet sistemi olarak *in vitro/in vivo* çalışmalarda kullanılabilir.

5.2. SPDON'ların Karakterizasyonuna ait Bulguların Değerlendirilmesi

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) fizikokimyasal özellikleri, kolloidal stabiliteleri ve biyolojik davranışları, nanopartikül sentez yöntemlerine bağlı olarak değişmektedir [127]. İkili çöktürme ve termal ayrıştırma biyomedikal uygulamalarda en yaygın kullanılan SPDON sentez yöntemleridir [114]. Bu amaçla, öncelikle ikili çöktürme, daha sonra ise termal ayrıştırma yöntemleri kullanılarak SPDON'lar sentezlenmiş ve bu yöntemlere ait bulgular özetlenerek literatür eşliğinde tartışılmıştır.

5.2.1. İkili Çöktürme Yöntemiyle SPDON Üretimi ve Karakterizasyonu

İkili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON ve oleik asit (%0,2; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların karakterizasyon çalışmalarında; XRD, ATR-FTIR, TGA, TEM, DLS, VSM ve indüksiyon ısıtma deneyleri yapılmıştır ve elde edilen sonuçlar literatürdeki benzer çalışmaların bulguları ile kıyaslanarak tartışılmıştır.

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin (SPDON) ve oleik asit (OA) kaplı SPDON'ların kristal yapıları XRD ile belirlenmiştir. Oleik asit içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların XRD grafiklerinde (Bkz. Şekil 4.3), tüm difraksiyon pikleri, Fe_3O_4 'ün basit-kübik kristal yapısıyla (JCPDS 01-075-0449) ve literatürdeki diğer çalışmalarla uyumludur [205, 206]. Oleik asit kaplı SPDON'ların yüzeyinde OA tabakasının oluşumuyla piklerin şiddeti kısmen zayıflamış olmasına rağmen, bu pikler demir oksit nanopartiküllerin kristal düzlemlerini temsil etmiştir [205]. Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1) içeren SPDON'ların ortalama kristal boyutları, Scherrer eşitliği kullanılarak sırasıyla 8,30; 9,30; 10,40 ve 11,10 nm olarak hesaplanmış ve OA kaplaması ile SPDON'ların kristal boyutlarının çok az arttığı görülmüştür. Petcharoen ve ark. %0,8 OA (h/h) kaplamasının SPDON'ların kristal boyutlarını 16,8 nm'den 13,9 nm'ye düşürdüğünü [179], Soares ve ark. OA kaplamanın SPDON'ların kristal yapısını ve çapını değiştirmediğini [207], Wulandari ve ark. ise OA miktarı arttığında (1 mL'den 1,5 mL'ye) SPDON'ların kristal boyutunun 4,73 nm'den 5,69 nm'ye çıktığını bulmuşlardır [208]. Literatürde, OA kaplamasının SPDON'ların kristal boyutunu azalttığı, değiştirmedığı veya arttırdığı yönünde çalışmalar bulunmaktadır. Ancak, bu çalışmada OA miktarının SPDON'ların kristal boyutunu az da olsa arttırdığı tespit edilmiştir.

Oleik asit, OA içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların kimyasal yapıları FTIR spektroskopisiyle incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.4). Oleik asitin, 2920 ve 2855 cm^{-1} 'de görülen asimetric ve simetric $-\text{CH}_2$ gerilmelerine ait iki keskin piki, OA kaplı SPDON'larda daha düşük dalga sayılarında (2919 ve 2852 cm^{-1}) görülmüştür. Bu durum, oleik asitin hidrokarbon zincirlerinin SPDON yüzeyinde sıkı-paketler oluşturduğu anlamına gelmektedir [181, 184, 186, 187]. Ayrıca, OA kaplı SPDON'larda Fe^{+3} bağlı karboksil grupların (COO^-) asimetric ve simetric gerilme titreşimleri 1523 ve 1404 cm^{-1} 'de görülmüştür [181, 182, 188] ve bu sonuçlar, demir oksit nanopartiküllerin OA ile başarılı bir şekilde kaplandığını göstermektedir.

Oleik asit içermeyen ve OA kaplı SPDON'ların ısısal karakteristik özellikleri termogravimetrik analiz (TGA) ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.5). Başlangıçta ($<150^\circ\text{C}$) tüm nanopartiküllerde nemden kaynaklı %1-2'lik bir kütle kaybı görülmüştür ve sonrasında OA kaplı SPDON'ların kütle kayıpları üç aşamada gerçekleşmiştir. İlk aşamada ($150-300^\circ\text{C}$) serbest veya zayıf bağlı OA'lar, ikinci aşamada ($300-500^\circ\text{C}$) kimyasal bağlı OA'lar, üçüncü aşamada ($500-750^\circ\text{C}$) ise yüzeye daha güçlü tutunan OA'ların SPDON yüzeyinden uzaklaşmaları ile sırasıyla, ~%4; ~%3,5 ve ~%9'luk kütle kayıpları görülmüştür (Bkz. Çizelge 4.1). Literatürde, $\sim 120^\circ\text{C}$ 'nin altında gerçekleşen kütle kayıplarının, SPDON yüzeyinden nem uzaklaşması olduğu belirtilmiş [179, 209] ve OA kaplı SPDON'lar 600°C 'nin altında iki belirgin kütle kaybı göstererek, bu kayıpların ortalama $150-300^\circ\text{C}$ ve $300-500^\circ\text{C}$ sıcaklık aralıklarında olduğu bildirilmiştir [179, 186, 209]. Sonuç olarak, sentezlenen OA kaplı SPDON'ların ısısal özelliklerinin ilgili çalışmalar ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1, h/h) kaplı SPDON'ların boyut ve morfolojileri geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile belirlenmiş ve ortalama çapları sırasıyla 8 ± 2 , 11 ± 2 , 9 ± 2 , 10 ± 2 nm olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 4.6). Bu değerlerden, OA kaplamasının SPDON'ların ortalama çaplarını önemli ölçüde değiştirmedeği ve kristal boyutları (XRD) ile uyumlu olduğu görülmüştür ve %1OA içeren NP'lerin daha küresel morfolojide olduğu belirlenmiştir. Petcharoen ve ark. yüzeyde biriken oleik asitin manyetik nanopartikül çapını arttırdığını, SEM görüntülerine göre SPDON ve %0,8OA kaplı SPDON'ların sırasıyla, 15 ve 27 nm ortalama çapta olduklarını belirtmişlerdir [179]. Bu çalışmanın aksine, Madhavi ve ark. OA kaplamanın nanopartikül boyutunu küçülttüğünü ve OA içermeyen ve %1,7OA kaplı SPDON'ların ortalama çaplarının sırasıyla 16,5 ve 7,3 nm

olduğunu bildirmişlerdir [210]. Literatürde, OA kaplamanın SPDON'ların boyutlarını arttırdığı veya azalttığı yönünde çalışmalar bulunmakla birlikte, bu çalışmada kristal boyutları ile uyumlu olarak OA'nın az da olsa SPDON boyutunu arttırdığı tespit edilmiştir.

Dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemi ile SPDON ve OA (%0,1; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların hidrodinamik çapları sırasıyla, ~92, 92, 72 ve 70 nm olarak ölçülmüştür ve artan oleik asit miktarı (%0,5 ve %1) ile SPDON çaplarının azaldığı belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.7). Nanopartiküllerin, DLS (~70 nm) ve TEM (~10 nm) analizlerinde ortalama çap değerleri arasında ~7 katlık (SPDON+%1OA için) bir farkın ortaya çıkması, elektron mikroskobu ile elde edilen görüntünün NP'lerin statik (gerçek) görüntüsünü, DLS yönteminin ise partiküllerin hidrodinamik çapını ölçmesinden kaynaklanmaktadır [181, 191].

Oleik asit içermeyen ve OA (%0,1; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların manyetik özellikleri titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ile ölçülmüştür ve doygunluk manyetizasyonları (Ms) sırasıyla, 62; 61,5; 59,5; 58,5 emu/g olarak bulunmuştur. Bu sonuçlarla, OA kaplamanın SPDON'ların Ms değerlerini önemli ölçüde değiştirmedığı görülmüştür (Bkz. Şekil 4.8). Petcharoen ve ark. OA içermeyen, %0,8OA (h/h) içeren ve hekzanoik asit kaplı SPDON'ların Ms değerlerini sırasıyla, 57,1; 33,3 ve 58,7 emu/g olarak bulmuşlardır. Hekzanoik asit kaplamanın manyetizasyonu 1-2 emu/g arttırdığını fakat %0,8OA'nın ise SPDON'ların Ms değerini önemli ölçüde azalttığını belirtmişlerdir [179]. Oleik asit kaplamanın manyetizasyonu azalttığına dair bir diğer çalışma Liu ve ark. tarafından yapılmıştır. İlgili çalışmada, oleik asit içermeyen SPDON'ların Ms değeri 58 emu/g olarak bulunmuşken, OA kaplama (%2,16; h/h) sonrası bu değerin 46 emu/g'ye düştüğü gösterilmiştir [211]. Ancak, Javanovic ve ark. farklı molaritelerde (0; 0,1; 0,15; 0,2; 0,25; 0,5; 1 ve 2 M) oleik asit içeren manyetik nanopartiküllerin (MN) manyetizasyonlarını (Ms) ölçerek, 0,25 M OA kaplı MN'lerin en düşük Ms değerine (30 emu/g) sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca, 0,25 M OA'dan itibaren molarite arttıkça Ms değerinin arttığını ve 2M OA kaplı MN'lerin 40 emu/g manyetizasyona sahip olduğunu bildirmişlerdir [212]. Literatürdeki çalışmalara göre yüzey modifikasyonunun Ms değerini etkilediği (genellikle düşürdüğü) ancak bunun Ms değerini belirleyen tek parametre olmadığı çıkarımında bulunulmuştur. Literatürdeki sonuçlar, OA miktarı ile Ms değerinin az da olsa düştüğünü gösteren bu çalışmanın bulgularıyla uyusmaktadır.

Oleik asit içermeyen ve OA (%0,2; %0,5; %1; h/h) kaplı SPDON'ların, distile su içerisinde süspansiyon edildikten sonra, manyetik indüksiyon (312 kHz, 100A) altında ısıtma potansiyelleri incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.9) ve SAR (özgül soğurma oranı) değerleri sırasıyla; 39,50; 34,81; 23,36 ve 45,98 W/g olarak hesaplanmıştır. Buna göre, OA içermeyen (39,50 W/g) ve özellikle %1OA içeren SPDON'ların (45,98 W/g) daha yüksek ısıtma potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. Örneğin, en yüksek dozda (10 mg/mL), SPDON ve SPDON+%1OA nanopartiküllerin sıcaklık artışları birbirine yakın olup sırasıyla, 26,7 ve 25,2°C olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.9c). Manyetik indüksiyon ile ısınan süspansiyon ortamının sıcaklığı, hücrelölüm yollarının indüklenmesi için yaklaşık 43-45°C değerlerinde olması gerekmektedir [3]. Bu durum, manyetik indüksiyon maruziyeti altında, hücrelerin normal sıcaklığından (37°C) yaklaşık 8°C'lik bir artışı ile mümkündür. Bu sıcaklık artışı, oleik asit içermeyen ve %1OA içeren SPDON'lar için 2 dk'lık maruziyet ve 5 mg/mL dozlarda elde edilebilir (yaklaşık değerler verilmiştir). Ayrıca, maruziyet süresi ve nanopartikül dozları arasında ters orantı olduğundan, doz miktarı düşürülüp, maruziyet süresi arttırılarak da 8°C'lik bir sıcaklık artışı sağlanabilir (örneğin, %1OA içeren SPDON'larda 10 dk maruziyet ve 2 mg/mL doz).

Ghosh ve ark. farklı derişimlerde (2-20 mg/mL) SPDON ve SPDON+OA(%10, h/h) NP'lerin artan manyetik indüksiyon koşulları (100-600 A) altındaki, ısıtma potansiyellerini (10 dk, 265 kHz) incelemişlerdir [213]. Oleik asit içermeyen SPDON'ların 100 amper manyetik indüksiyon ile tüm derişimlerinde (2-20 mg) sadece 1-2°C sıcaklık artışı görülmüş ve hipertermi sıcaklığına (42°C) ulaşılammıştır. Ancak, akım değeri 500-600 amperlere çıktığında, en düşük SPDON konsantrasyonu (2 mg) bile 40-50°C sıcaklıklara ulaşmak için yeterli olmuştur. Diğer yandan, OA kaplı SPDON'lara 300 ampere kadar uygulanan akım değerlerinde sıcaklık artışı (önemsiz) görülmemiş, 400 amperde ise en yüksek derişimde (20 mg/mL) sadece ~3°C'lik bir artış görülmüştür [213]. İlgili sonuçlara göre SPDON yüzeyinin %10 oleik asit ile modifiyesi, ısıtma potansiyelini olumsuz yönde etkileyen yüksek bir derişim olarak yorumlanmıştır.

Tez kapsamında, ikili çöktürme yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların yüzeyleri oleik asit (%0,2-1) ile modifiye edilmiş ve manyetik indüksiyon altında hipertermi etkinlikleri 'ön çalışma' kapsamında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca bu 'ön çalışma' bulgularının bilimsel makalesi [214] yayınlandığından, karakterizasyon çalışmalarına ait literatür tartışmaları kapsamlı olarak sunulmuştur. İkili çöktürme yöntemi kullanılarak sentezlenen SPDON'lar,

karşılaştırma yapmak amacıyla termal ayrıştırma yöntemi ile de sentezlenmiş ve her iki yöntemle elde edilen manyetik nanopartiküllerin etkinlikleri (boyutları, agregasyon durumları, polimer kaplamaları vb.) devam eden bölümlerde tartışılmıştır.

5.2.2. Termal Ayrıştırma Yöntemiyle SPDON Üretimi ve Karakterizasyonu

Termal ayrıştırma yöntemi, organo-metalik maddelerin, bir yüzey aktif madde (sürfaktan) varlığında, yüksek kaynama noktalı organik çözücüler içerisinde termal olarak ayrıştırılması esasına dayanmaktadır [122]. Bölüm 3.2.2'de açıklanan sentez yöntemine göre, organo-metalik madde olarak sodyum-oleat, yüzey aktif madde olarak da oleik asit kullanılmıştır. Bu nedenle, üretilen SPDON'ların yapısında, sentez ortamından kaynaklı oleik asit bulunmaktadır. Termal ayrıştırma yöntemiyle sentezlenen SPDON'ların, kristal yapıları XRD, kimyasal yapıları ATR-FTIR, manyetizasyonları VSM, boyutları ve morfolojileri ise TEM analizleri ile belirlenmiştir.

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin 'basit-kübik' kristal yapıları XRD analizi ile belirlenerek, karakteristik piklerinin ilgili veritebanı (JCPDS 01-075-0449) ile uyumlu oluşu görülmüştür. Bu nanopartiküllerin kristal boyutları Scherrer eşitliği ile 8,32 nm, kristal düzlemleri arası mesafe ise $d_{311}=2,51 \text{ Å}$ olarak hesaplanmıştır (Bkz. Şekil 4.10). Bu sonuçlar, literatürdeki çalışmalar ile örtüşmektedir [215, 216].

Süperparamanyetik demir oksit nanopartiküllerin kimyasal yapıları FTIR spektrofotometresi ile incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.11) ve SPDON yüzeyinin oleik asit ile kaplanması, OA'nın hidrokarbon moleküllerinin SPDON yüzeyinde sıkı-paketler oluşturmaya ve simetrik $-\text{CH}_2$ gerilmesinin düşük dalga sayısında görülmesine neden olmuştur [181]. Bunun haricinde, SPDON+OA spektrumunda görülen tüm pikler literatür ile uyumlu olup, OA'nın SPDON yapısına katıldığı doğrulanmıştır [124, 181, 188, 189].

Doygunluk (saturation) manyetizasyonu (M_s), manyetik nanopartikül çalışmalarında sıklıkla bildirilen manyetik özelliklerinden biridir ve yüksek bir manyetik alana maruz kalan örnekten elde edilen manyetizasyonun bir ölçüsüdür [114]. Manyetik NP'lerin manyetizasyonu (M_s) titreşimli örnek manyetometresi (VSM) ile ölçülerek $\sim 6 \text{ emu/g}$ olarak bulunmuştur ve manyetizasyon eğrisinde (Bkz. Şekil 4.27) koersivite (coercivity) değeri sıfır olduğundan SPDON'lar süperparamanyetik davranış sergilemiştir. Süperparamanyetik

demir oksit nanopartiküllerin manyetizasyon değerinin düşük çıkması literatürde birtakım sebeplere dayandırılmıştır. Manyetik nanopartiküller, fiziksel ve manyetik olmak üzere iki farklı çap değerine sahiptir ve MN'lerin manyetizasyonları 'manyetik çapları' küçüldükçe veya yüzeylerinde "manyetik ölü tabaka" oluşumu ile azalabilmektedir [119, 216]. Ayrıca, MN'lerin manyetik ve fiziksel çaplarını karşılaştıran birçok çalışmada, düşük manyetizasyon sebebinin, NP yüzeyinde 'manyetik ölü tabaka' etkisi ile manyetik dipol momentlerin kristal simetrilerinin bozulması (spin canting effect) olarak belirtilmiştir [119, 173, 217]. Muhtemel diğer bir sebep ise, termal ayrıştırma yönteminde manyetik SPDON'ların sentez atmosferine (O_2 'li veya O_2 'siz) bağlı olarak manyetizasyon değerlerinin önemli ölçüde değiştiği ve O_2 'li ortamda gerçekleştirilen sentez ile 74 emu/g olan Ms'nin, O_2 'siz ortamda 17 emu/g değerine düştüğü ifade edilmiştir [216]. Diğer bir çalışmada, Khurshid ve ark. daha düşük manyetizasyon değerine sahip kübik şekilli SPDON'ların daha yüksek ısıtma verimine sahip olabileceğini göstermişlerdir [218]. Hipertermi çalışmalarında, manyetizasyon değerlerinin yanı sıra, nanopartiküllerin agregasyonu düşük, homojen ve eş-boyut dağılımlı olmaları ısıtma potansiyellerinin belirlenmesinde oldukça önemlidir [123, 195] ve bu çalışmada üretilen SPDON'ların bahsedilen özellikleri TEM analizi ile incelenmiştir.

Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların TEM görüntülerinde (Bkz. Şekil 4.12) nanopartikül agregasyonları ikili çöktürme yöntemine göre büyük ölçüde önlenmiş ve küresel morfolojide, homojen-eş boyut dağılımlı manyetik nanopartiküller elde edilmiştir. Ayrıca, SPDON'ların boyut ve boyut-dağılımları 'ImageJ' programı ile $5,63 \pm 0,85$ nm olarak hesaplanmıştır ve ikili çöktürme yöntemine (10 ± 2 nm) göre daha küçük boyut ve boyut-dağılımlı nanopartiküller üretilmiştir. Ayrıca, ikili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri ile sentezlenen SPDON'ların polimer kaplama dağılımları da (homojen veya agregasyon durumu) devam eden bölümlerde tartışılmıştır ve çalışmanın devamında kullanılacak SPDON sentez yöntemine karar verilmiştir.

5.3. PLGA-b-PEG Kopolimeri Sentezinin Değerlendirilmesi

Etken madde yüklü polimerik manyetik NP'ler hazırlamak için öncelikle, PLGA (poli(laktik-ko-glikolik asit)) ve PEG (poli(etilen glikol, PEG)) polimerleri kullanılarak PLGA-b-PEG di-blok ko-polimer sentezi gerçekleştirilmiştir (Bkz. Bölüm 3.4). Sentezin başarısı, büyüklükçe ayırma kromatografisi (GPC), Proton-NMR (1H -NMR) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (ATR-FTIR) analizleri ile doğrulanmıştır (Bkz. Bölüm 4.3).

Büyükölükçe ayırma kromatografisi (GPC) ile PLGA (50:50, 34 kDa) ve PEG (3,5 kDa) polimerleri kullanarak sentezlenen PLGA-b-PEG ko-polimerinin ağırlıkça-ortalama moleköl ağırlığı (M_w) 31,5 kDa, sayıca-ortalama moleköl ağırlığı (M_n) 14,4 kDa ve moleköl ağırlığı dağılımı (M_w/M_n , PDI) ise 2,18 olarak belirlenmiştir. Liu ve Lin, peptit konjugasyonu için, PLGA (50:50, 28 kDa) ve PEG (5 kDa) polimerlerini kullanarak amfifilik PLGA-PEG ko-polimeri sentezlemişler ve M_w , M_n ve PDI değerlerini sırasıyla; 32,6 kDa; 17,6 kDa ve 1,8 olarak bulmuşlardır [180]. İlgili çalışmada kullanılan polimerlerin (PLGA (50:50), PEG) ve sentezlenen PLGA-PEG ko-polimerinin moleköl ağırlıkları bulgularımıza yakın değerler göstermektedir. Büyükölükçe ayırma kromatografisi yöntemi ile moleköl ağırlıkları tespit edilen polimerlerin $^1\text{H-NMR}$ spektrumu kullanarak pegilasyon verimleri hesaplanmıştır.

PLGA-b-PEG ko-polimerinin kimyasal yapısı $^1\text{H-NMR}$ spektrumu ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.14) ve 1,6 ppm laktik asitten gelen metil gruplarına ($\text{d}, -\text{CH}_3$); 5,2 ppm laktik asitten gelen CH-CH_3 'e; 4,8 ppm glikolik asitten gelen CH-H yapılarına ve $\sim 3,4$ ppm ise PEG'in metilen grubuna ait olup pegilasyon verimi %50 olarak hesaplanmıştır. Liu ve Lin, sentezledikleri PLGA-PEG polimerine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda yer alan grupların pik aralıklarını vermişlerdir. Buna göre, laktik asitin CH piki $\delta(5,30-5,17)$ ppm, laktik asitin CH_3 piki $\delta(1,62-1,55)$ ppm, glikolik asitin CH_2 piki $\delta(4,90-4,56)$ ppm ve etilen glikölün CH_2 piki ise $\delta(3,61-3,55)$ ppm'lerde görölmüştür [180]. Ayrıca, 'PLGA-PEG' polimer yapısının kullanıldığı bazı çalışmalarda, PLGA'nın karakteristik pikleri; CH grubu $\delta(5,20-5,40)$, CH_2 grubu $\delta(4,60-4,90)$ ve CH_3 grubu 1,50 ppm'lerde, PEG'in CH_2 grubunun ise $\delta(3,33-3,50)$ ppm pik aralığında görölmüştür [219-221]. Literatürde tez kapsamındaki $^1\text{H-NMR}$ bulgularıyla örtüşen sonuçlar bulunmakta olup, PEG'in PLGA polimer yapısına katılımı doğrulanmıştır, ayrıca PLGA'nın pegilasyon başarısı ATR-FTIR spektrumu ile de doğrulanmıştır.

PLGA-b-PEG ko-polimerinin ATR-FTIR spektrumu (Bkz. Şekil 4.15), PLGA spektrumuna oldukça benzemektedir ve bu durum, pegilasyon sırasında sentez ortamına PEG'in az miktarda ($\sim 0,5\%$; kütle/kütle) eklenmiş olması ile açıklanabilir. PLGA-b-PEG ko-polimerinin ATR-FTIR spektrumunda, PLGA'dan (en şiddetli pik) gelen 1746 cm^{-1} C=O gerilmesi ve PEG'den gelen 960 cm^{-1} ve 841 cm^{-1} C-C-O harmonikleri, PLGA-b-PEG di-blok kopolimerinin başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir [190]. Ha ve ark. tarafından, PLGA-PEG konjugasyonu FTIR spektrumu ile doğrulanmış ve PLGA-PEG

spektrumunda iki önemli pik dikkate alınmıştır. Bu piklerin, 1767 cm^{-1} dalga sayısında gözlenen güçlü C=O çift bağ yapısından ve 3457 cm^{-1} dalga sayısında bulunan N-H titreşim geriliminden kaynaklandığı belirtilmiştir [222]. Her üç analiz için de (GPC, NMR, FTIR) verilen literatür örnekleri, bu çalışmada elde edilen bulgularla uyuşmakta ve PLGA polimerine pegilasyon işlemini doğrulamaktadır. Ayrıca, bu bölümün tartışılmasından itibaren devam eden bölümlerde kullanılan tüm polimerler 'PLGA-b-PEG' ko-polimeri olup, ko-polimer için anlatımı basitleştirmek amacıyla 'PLGA' kısaltması kullanılmıştır.

5.4. Manyetik PLGA NP'lerin Tartışılması

İkili çöktürme (co-precipitation, CP) ve termal ayrıştırma yöntemleri (Thermal decomposition, TD) ile sentezlenen SPDON'lar ayrı ayrı PLGA polimerleri ile kaplanmış ve manyetik PLGA NP'ler sentezlenmiştir. Burada, daha önce CP ve TD yöntemleri ile sentezlenen ve etkinlikleri kısmen tartışılan SPDON'lar kullanılmış ve manyetik PLGA NP'lerin bir bütün olarak tartışılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, CP ve TD yöntemleri ile sentezlenen manyetik PLGA NP'lerin, TEM analizinden elde edilen görüntüler üzerinden (Bkz. Şekil 4.16) boyutları ve morfolojileri değerlendirilmiştir. Buna göre, ikili çöktürme ile sentezlenen SPDON'ların, PLGA ile kaplandıktan sonra, büyük oranda polimer yüzeyinde yer aldıkları, agregasyona uğradıkları ve homojen bir PLGA kaplamanın gerçekleşmediği belirlenmiştir. İkili çöktürme yönteminde SPDON'ların her ne kadar oleik asit (en fazla %10A) ile kaplanmış olsa da manyetik PLGA NP'lerin üretimi sırasında agregasyon sorunu tam olarak çözülememiştir ve SPDON'lar büyük ölçüde polimer yüzeyinde yer almışlardır. Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların ise küresel morfolojide, homojen dağılımlı polimer kaplamalarının gerçekleştiği görülmüştür (Bkz. Şekil 4.16) ve SPDON'lar polimer içerisine çok iyi girmişlerdir. Bu durum, TD yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların organik çözücü olarak kullanılan diklorometan (DCM) içerisinde çok iyi dağıldıklarını, ancak CP yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların DCM içerisinde iyi dağılmadıklarını göstermiştir. Ayrıca, TD yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların DCM içerisinde çokmeden haftalar boyunca süspanse halde kaldıkları görülmüştür. Literatürde birçok derleme çalışmada boyut-şekil kontrollü ve eş-boyut dağılımlı SPDON sentezinde termal ayrıştırma yönteminin ikili çöktürme yöntemine göre avantajlarından bahsedilmiştir [114, 121, 123, 129, 223] ve bu avantajlar SPDON'ların homojen dağılımlı PLGA kaplamalarına da olanak sağlamaktadır. Ayrıca, TEM

görüntülerinden TD yöntemi ile sentezlenen manyetik PLGA NP'lerin, CP yöntemi ile sentezlenen NP'lere göre daha küçük çapta oldukları belirlenmiştir.

Yukarıda açıklanan gerekçelerden ötürü, manyetik PLGA NP'ler ve manyetik PLGA NP'lere işlevsellik kazandırılması amacıyla (etken madde yükleme, peptit bağlama) yapılan tüm sentezlerde, TD yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların kullanılmasına karar verilmiştir.

5.5. TMZ yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Tartışılması

Temozolomid (TMZ) yüklü polimerik NP'lerin sentezinde 'tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma' yöntemi literatürde en yaygın kullanılan sentez yöntemidir [224]. Bu nedenle, nanopartiküle TMZ yükleme çalışmalarında tekli emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmış ve TMZ yüklü manyetik PLGA'ların üretiminde Prabhu ve ark.'nın yapmış oldukları sentez protokolü uygulanmıştır [142]. Nanopartiküllerin, TMZ enkapsülasyon verimleri (%EE) UV spektrometre (Nanodrop) ile direkt (NP'den) ve indirekt (süpernatandan) yöntemler kullanılarak hesaplanmıştır (Bkz. Bölüm 4.4.2). Ancak, TMZ'nin direkt ve indirekt yöntemlerle hesaplanan %EE değerleri doğrulanamamış, ayrıca tekrarlanan UV spektrometre ölçümlerinin TMZ absorbans değerleri farklılıklar göstermiştir. Bu nedenle, TMZ'nin enkapsülasyon verimi analizleri, karşılaştırma yapmak amacıyla, daha hassas bir analiz yöntemi olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ile de gerçekleştirilmiştir.

Farklı formülasyonlar (sentez parametrelerinin kontrollü değişimi) kullanılarak TMZ enkapsülasyon çalışmaları (Bkz. Çizelge 4.5) yapılarak, HPLC analizi ile %EE değerleri direkt ve indirekt yöntemlerle hesaplanmıştır. Ancak, direkt ve indirekt yöntemler kullanılarak hesaplanan %EE değerleri HPLC ile de doğrulanamamıştır. Sonuç olarak, TMZ'nin kararsız bir etken madde olması, süpernatant ortamında (ultra saf su ve safsızlıklar) hızla bozunması gibi durumları düşünülmüş ve %EE değerlerinin direkt yöntem (NP'den) ile hesaplanmasının daha doğru (güvenilir) sonuç vereceğine karar verilmiştir.

Literatürde, TMZ yüklü PLGA nanopartiküllerin sentezlerini içeren bazı çalışmalar, nanopartikül sentez parametreleri ve TMZ %EE değerleri ile birlikte Çizelge 5.1'de verilmiştir. Temozolomid yüklü nanopartiküllerin sentezlerini içeren, gerek Çizelge 5.1'de verilen gerekse literatürde bulunan çalışmaların çoğunda, TMZ'nin %EE değerleri

Ling ve ark, farklı miktarlarda TMZ (10-80 mg) kullanarak sentezledikleri TMZ yüklü manyetik NP'lerdeki %EE değerlerini direkt yöntem ile 1,54-27,55 aralığında bulmuşlardır. Daha sonra, aynı sentez işlemi su fazı TMZ ile doyurularak gerçekleştirilmiştir ve TMZ'nin %EE'si ~%80'lere kadar çıkmıştır [136]. Enkapsülasyon verimindeki bu artış, su fazının TMZ ile doymuş hale getirilerek, NP'den TMZ difüzyonunun azalması ile sağlanmıştır. Ancak, sentez sonrası NP'ler mıknatıs yardımıyla çözelti ortamından alındıktan sonra, nanopartiküllerin yüzeyinde kalan, iyi bağlanmamış veya zayıf bağlı ilaçları (TMZ) uzaklaştırmak için herhangi bir yıkama işlemi yapılmamıştır. Ayrıca, su fazını doyurmak için kullanılan TMZ miktarı çalışmada verilmemiştir [136].

Bölüm 4.4.4'te paylaşılan F1-26 formülasyonlarının tamamında %EE değerleri süpernatant ortamından (indirekt) ve nanopartikül içerisinden (direkt) HPLC kromatogramları kullanılarak hesaplanmıştır. Ancak, TMZ'nin enkapsülasyon veriminin tekrarlanabilirliğine ilişkin yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar elde edilememiştir. Nanopartiküllerin salım çalışmaları da gerçekleştirilmiş, ancak enkapsüle edilen TMZ miktarı çok düşük olduğu için ortama salınan miktar UV spektrometre ve HPLC analizleri ile bazen tespit edilememiş bazen de tekrarlanabilir sonuçlar görülememiştir.

Literatürde, TMZ'nin polimerik nanopartiküllere % enkapsülasyon verimlerinde, %0,32 gibi çok düşük [177] ve %80 gibi yüksek değerler [136] bulunan çalışmalar bildirilmiştir. Yüksek enkapsülasyon verimi elde edilen çalışmalarda, derin bir literatür araştırması neticesinde, genellikle, su fazı TMZ ile doyurulmuştur, ancak hesaplanan %EE değeri organik faza ilave edilen TMZ miktarından hesaplanmıştır. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2018 yılında çıkarılan 'Endüstri için lipozom ilaç ürünleri' [227] ve 2017 yılında çıkarılan 'Nanomalzeme endüstrisine yönelik biyolojik ürünler içeren ilaç ürünleri' [228] kılavuzlarında, ilaç enkapsülasyon verimi, örneğin, 'toplam ilaç miktarına kıyasla lipozomların (veya nanopartiküllerin) içinde bulunan ilaç miktarı' olarak tanımlanmıştır. Ancak, bu tanıma uygun olmayarak, su fazı TMZ ile doyurulan çalışmalarda, su fazına ilave edilen TMZ miktarı toplam ilaç miktarına dahil edilmemiştir ve organik faza ilave edilen TMZ miktarından %EE hesaplanmıştır [135, 136]. Bu durumun, hesaplanan %EE değerinin yanıltıcı olabileceğini düşündürmüş, ayrıca gerçekleştirilen sentezlerde su fazına yüklenen TMZ miktarının belirtilmemesi, etkin-maliyet (cost-effective) değerlendirilmesi açısından da bir eksiklik olarak görülmüştür.

Literatürde, TMZ enkapsülasyon veriminde karşılaşılan sorunlar [177] genel olarak çalışmamızda da yaşanmıştır. Birçok formülasyon denenmesine rağmen (Bkz. Çizelge 4.3-7) elde edilen %EE değerlerinde tekrarlanabilir sonuçlar elde edilememiştir. Nanopartiküllerden salım çalışmalarında TMZ tespit edilememesi, gerek yüklenen TMZ miktarının çok düşük olması gerekse ortama salınan TMZ'nin hızlıca degradasyona uğraması şeklinde yorumlanmıştır. Ancak, %4 TMZ enkapsülasyon veriminin (F18) T98G hücreleri üzerinde sitotoksik etkisi yine de tez kapsamında incelenmiştir.

5.6. Serbest TMZ ve TMZ Yüklü Manyetik PLGA NP'ler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları

Serbest TMZ'nin sağlıklı bir hücre olan insan göbek kordonu endotel hücreleri (HUVEC) ve insan glioblastoma hücre hattı olan T98G hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkiler *in vitro* hücre kültürü çalışmalarıyla belirlenmiştir. Temozolomid'in HUVEC'ler üzerindeki sitotoksik etkisi MTT analizi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.37) ve TMZ'nin zamana (24, 48, 72 sa) ve doza (0-1000 μ M) bağlı olarak HUVEC hücrelerinin % canlılıklarını anlamlı derecede azalttığı görülmüştür. Örneğin, 1000 μ M TMZ uygulandığında, zamana bağlı olarak % hücre canlılıkları, 24 saat sonra %61, 48 saat sonra %52, 72 saat sonra %30 değerlerine düşmüştür ($p \leq 0,001$) ve TMZ'nin HUVEC hücrelerinde 72.saat için hücrelerin %50'sini inhibe eden TMZ doz değeri (IC_{50}) ~500 μ M olarak bulunmuştur. Literatürde, TMZ'nin HUVEC hücrelerinde IC_{50} doz değerleri farklılıklar göstermektedir. Örneğin; IC_{50} doz değerlerini Sun ve ark. 144 saat sonra ~900 μ M; Lam ve ark. 96 saat sonra 6,6 μ M ve Nunes ve ark. ise 72 saat TMZ uygulaması sonrası 762 μ M olarak bulmuşlardır [229-231]. Sonuç olarak, bu çalışmada TMZ'nin HUVEC hücrelerinde 72 saat sonra IC_{50} değeri ~500 μ M olarak bulunmuştur ve literatürde bu değere yakın IC_{50} değerleri bulunmaktadır.

Serbest TMZ'nin glioblastoma hücre hattı (T98G) üzerinde toksik etkileri farklı dozlarda (0-1000 μ M) ve zamanlarda (24, 48, 72 sa) MTT testi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.38). Genel olarak doza ve zamana bağlı, % hücre canlılık değerlerinde anlamlı azalmalar görülmüştür. Özellikle, 72 saatlik TMZ uygulaması ile % hücre canlılık değeri; zamana bağlı olarak tüm dozlarda (24 saate göre) anlamlı olarak azalmıştır ($p \leq 0,001$), doza bağlı olarak ise 1000 μ M'da %27'ye ($p \leq 0,001$) düşmüştür. Ayrıca, T98G hücreleri için TMZ IC_{50} doz değeri, non-lineer fit eğri denkleminde 350 μ M olarak hesaplanmıştır. Literatürde, TMZ'nin T98G hücrelerindeki IC_{50} doz değerleri arasında büyük farklılıklar görülmektedir. Huang ve ark.

T98G hücrelerine artan dozlarda (0-400 μM) TMZ uyguladıktan 48 saat sonra hücrelerin ~%25'inin (400 μM için) canlılığını kaybettiğini belirtmişlerdir [232]. Kim ve ark. TMZ'ye dirençli hücreler olarak tanımlanan T98G'nin 72 saat sonunda IC_{50} değerini $>1500 \mu\text{M}$ olarak bildirmişlerdir [233]. Temozolomid'in T98G hücrelerinde 72 saat sonra IC_{50} değerlerini daha düşük dozlarda bildiren araştırmacılar da bulunmaktadır ve bu değerleri Yoshino ve ark. 441 μM , Kanzawa ve ark. $>500 \mu\text{M}$, Munoz ve ark. ise 150-200 μM olarak belirtmişlerdir [89, 234, 235]. Bu tez çalışması kapsamında, 72 saat TMZ uygulamasından sonra T98G hücrelerinin IC_{50} değeri $\sim 350 \mu\text{M}$ olarak hesaplanmıştır ve literatürde bu aralıkta da değerler bulunmaktadır.

Temozolomid yüklü manyetik PLGA NP'lerin sentez çalışmalarında (Bkz. Bölüm 4.4), yüklenen TMZ miktarlarına ilişkin tekrarlanabilir değerler bulunamamıştır. Ancak, düşük miktarlarda TMZ yüklenmiş (F18, %EE: ~%4) olmasına rağmen, bu değerlerin T98G hücreleri üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı MTT, canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleri ile incelenmiştir. Ayrıca, bu analizlerde sadece TMZ yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+TMZ) NP'leri değil, aynı zamanda boş PLGA ve manyetik PLGA (PLGA+SPDON) NP'lerinin de T98G hücreleri üzerine canlılık etkileri incelenmiştir.

Bu amaçla, öncelikle, düşük derişimlerde 0-1000 $\mu\text{g/mL}$ nanopartikül doz aralığında PLGA, PLGA+SPDON, PLGA+SPDON+TMZ NP'ler uygulanan T98G hücrelerinde MTT analizleri (72.saat) gerçekleştirilmiş ve genel olarak hücre canlılıklarında doza ve NP'ye bağlı anlamlı bir değişim (artış veya azalış) görülmemiştir. Ancak, istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen, 1000 $\mu\text{g/mL}$ TMZ yüklü PLGA NP dozu, T98G hücrelerinin % canlılığını, boş PLGA NP'ye göre %78'e, kendi kontrol grubuna (0 $\mu\text{g/mL}$) göre ise %75'e düşürmüştür (Bkz. Şekil 4.39). Bu durum, NP'de yüklü olan TMZ'nin T98G hücrelerinde toksisite oluşturabilecek yeterlilikte olmadığını düşündürmüştür, bu nedenle NP doz miktarları arttırılarak MTT analizi tekrarlanmıştır (Bkz. Şekil 4.40). Yüksek dozlarda (1,25-10 mg/mL) PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücreleri üzerine toksik etkileri incelenmiştir ve her iki nanopartikülün de 1,25 mg/mL doz değerinde kendi kontrol gruplarına göre % hücre canlılıklarını anlamlı olarak azalttığı ($p \leq 0,01$), ancak artan doz değerlerinde anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Ayrıca, yüksek dozlarda (1,25-10 mg/mL) PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+TMZ NP'lerin T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkileri canlı/ölü hücre boyama yöntemi ile de incelenmiştir. TMZ içermeyen ve

TMZ yüklü NP'lerin 1,25 mg/mL doz değerinde kontrol hücrelerine göre canlı hücre sayılarını azalttığı, ölü hücre sayılarını ise arttırdığı görülmüştür ve bu görüntülerin MTT sonuçları ile uyumlu olduğu belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.10). TMZ yüklü ve TMZ içermeyen NP'lerin T98G hücreleri üzerinde apoptotik veya nekrotik hücre ölümüne etkileri, Anneksin V/PI boyama yöntemi ile incelenmiştir. Bu analizde, 1,25 mg/mL doz değerinde TMZ içermeyen NP'lerle muamele edilen örneklerde daha fazla sayıda geç apoptotik/nekrotik hücre, TMZ yüklü NP'li örneklerde ise daha fazla sayıda erken apoptotik hücre bulunduğu floresan görüntüler ile belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.12). Ancak, gerek canlı/ölü gerekse Anneksin V/PI analizlerinde, T98G hücrelerine uygulanan NP doz miktarı arttıkça, hücre yüzeylerini kaplayan bir NP tabakası oluşmuş ve bu tabaka floresan görüntülerin bozulmasına neden olmuştur.

Hücre kültür çalışmalarında TMZ yüklü nanopartiküllerin miktarları artırılmış, ancak TMZ'nin 'etkin doz' konsantrasyonuna ulaşamamış ve T98G hücreleri üzerinde toksik etkisi görülememiştir. Ayrıca, daha önce TMZ enkapsülasyon verimi çalışmasında açıklandığı gibi, farklı formülasyonlar kullanılarak üretilen nanopartiküllere TMZ yükleme deneylerinde tekrarlanabilir %EE değerlerine ulaşamamıştır. Bu gerekçelerden ötürü etken madde değiştirilmiş ve glioblastoma tedavisi için potansiyel bir ajan olarak dikkat çeken kurkumin etken maddesinin çalışılmasına karar verilmiştir.

5.7. Kurkumin Yüklü Manyetik PLGA NP'lerin Üretimi ve Karakterizasyonu

Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'ler tekli emülsiyon çözücü buharlaştırma yöntemine göre sentezlenmiştir. Karakterizasyon çalışmaları için ATR-FTIR, VSM, SEM ve DLS analizleri yapılmış ve daha sonra manyetik PLGA NP'lere yüklenen kurkumin miktarı ve NP'lerin yüzeyine bağlanan peptit miktarları hesaplanmıştır (Bkz. Bölüm 4.5).

Kurkumin (CUR), manyetik PLGA (PLGA+SPDON) ve kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) NP'lerin kimyasal yapıları ATR-FTIR spektrumları ile incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.26). Ayrıca, peptit-konjuge edilen NP'lerin de FTIR spektrumları incelenmiş ancak peptit yapısından gelen herhangi bir pik FTIR spektrumunda görülmemiş ve peptit varlığı floresan spektrofotometre ile tespit edilmiştir. Kurkumine ait spektrumda, 3503 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 1626 cm^{-1} (C=O gerilmesi) ve 1601 cm^{-1} (C=C gerilmesi) dalga sayılarında görülen gerilme piklerinin tamamı CUR yüklü NP'lere ait spektrumda da

görülmüştür. Jamali ve ark. kurkumin yüklü PLGA NP'leri sentezlemişler ve kurkuminin FTIR spektrumunda görülen 3490 cm^{-1} (O-H gerilmesi), 1629 cm^{-1} (C=O gerilmesi) ve 1600 cm^{-1} (C=C gerilmesi) dalgasayılarındaki piklerin CUR yüklü NP'lere ait spektrumda da görüldüğünü ve kurkuminin fonksiyonel grupları ile PLGA molekülleri arasında bir kimyasal etkileşimin olmadığını belirtmişlerdir [193]. Chereddy ve ark. kurkumin, PLGA ve PLGA-CUR NP'lerin FTIR spektrumunda, kurkuminden gelen $1400\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ 'deki aromatik C=C gerilmesinin PLGA-CUR NP'lerde de görüldüğünü göstermişlerdir [194]. İlgili sonuçlar, bu tez çalışmasının bulguları ile uyumludur.

Termal ayrıştırma yöntemi ile sentezlenen SPDON'ların, manyetik PLGA ve CUR yüklü manyetik PLGA NP'lerin manyetizasyon değerleri (Ms) VSM analizi ile incelenmiştir (Bkz. Şekil 4.27) ve SPDON'ların Ms değerlerinin düşüklüğüne ilişkin literatür değerlendirmesi 'termal ayrıştırma yöntemi ile SPDON sentezi' bölümünde daha önceden tartışılmıştır. Süperparamanyetik demir oksit NP'lerin Ms değeri 6 emu/g , manyetik PLGA NP'lerin $0,6\text{ emu/g}$ ve CUR yüklü manyetik PLGA NP'lerin ise $0,3\text{ emu/g}$ olarak bulunmuştur. Beklenildiği gibi SPDON'ların Ms değeri düşük olduğundan boş ve CUR yüklü manyetik PLGA NP'lerin Ms değerleri literatürdeki değerlere göre düşük çıkmıştır. Manyetik PLGA NP'lerin ısıtma etkisini sadece Ms değeri değil ayrıca SPDON'ların polimer içerisinde homojen dağılımları, boyutları, agregasyon durumları önemli ölçüde etkilemektedir [236]. Hardiansyah ve ark. oleik asit (OA) kaplı manyetik NP'lerin (OA-MNP) ve kurkumin yüklü pegile edilmiş manyetik lipozomların (CUR-PEG-MNP) Ms değerlerini sırasıyla 54 ve 39 emu/g olarak bildirmiş ve alternatif manyetik alan altında NP'lerin PBS içerisinde sırasıyla 48 ve 45°C sıcaklık değerlerine çıktığı gösterilmiştir. İlgili çalışmada, NP'lerin manyetik alan altında çıktıkları sıcaklık değerleri birbirine yakınken, Ms değerleri arasında 15 emu/g 'lik bir fark vardır [237]. Purushothaman ve ark. hibrid protein taşıyıcı, kurkumin yüklü kalsiyum-ferrit nanopartiküller (casein-CFNP-Cur) sentezlemişler ve manyetik NP'lerin (CFNP) Ms değerini 15 emu/g , casein taşıyıcı-Cur yüklü manyetik NP'lerin (casein-CFNP-Cur) Ms değerini ise $4,5\text{ emu/g}$ olarak bulmuşlardır [238]. Literatürde, 'manyetik ölü tabaka' veya sentez ortamının O_2 'siz olmasının manyetik nanopartiküllerin Ms değerlerini düşürebileceğine değinilmiştir [216]. Bu tez çalışmasında, manyetik PLGA NP'lerin Ms değerinin düşük olmasına rağmen, homojen dağılımlı polimer kaplamanın sağlanması, boyut/boyut dağılımının küçüklüğü ve agregasyonun gözlenmemesinin daha önemli olduğu görülmüştür.

Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin çap/çap dağılımları ve morfolojileri SEM ve DLS analizleri ile incelenmiş ve sırasıyla ortalama çapları 117 ± 47 nm ve 215 ± 70 nm olarak bulunmuştur (Bkz. Şekil 4.28). Daha önceden açıklandığı üzere NP'lerin boyut farkı SEM ve DLS analizlerinin çalışma prensiplerinin farklılığından kaynaklanmaktadır. Ayrıca kurkumin yüklü NP'lerin SEM görüntülerinden morfolojilerinin küresel olduğu belirlenmiştir. Jamali ve ark. kurkumin yüklü PLGA NP'lerin boyutunu SEM ve DLS analizleri ile sırasıyla 140 ve 248 nm olarak bulmuşlardır [193]. İlgili çalışma sonuçları, tez çalışması bulguları ile uyumludur.

Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin (PLGA+SPDON+CUR) kurkumin enkapsülasyon verimleri (%EE) ve yükleme verimleri (%DL) hesaplanmıştır ve sırasıyla %25 ve %8 olarak bulunmuştur. Ayrıca, peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin ise %EE ve %DL değerleri sırasıyla %4 ve %1,6 olarak hesaplanmıştır. Jamali ve ark. kurkumin yüklü NP'lerin (PLGA+Cur) %EE ve %DL değerlerini sırasıyla %66 ve %11; antikor-konjuge edilmiş NP'lerin (MAb-PLGA-Cur) ise %27 ve %4,5 olarak bulmuşlardır [193]. Dutta ve ark. kurkumin yüklü manyetik misel nanopartiküllerin (MMNPs-Cur) %EE değerini, sentez ortamında 2 mg/mL kurkumin varlığında %13,8; sentez ortamında 1 mg/mL CUR varlığında ise %20,7 olarak tespit etmişlerdir [239]. Jiang ve ark. paklitaksel (PTX) ve kurkumin (CUR) yüklü (co-loaded) lipozomların (PTX/CUR LPs) ve RGD bağlı (RGD-PTX/CUR LPs) lipozomların ilaç yükleme kapasitelerini (%DL) sırasıyla %8,7 ve %8,6 olduğunu belirtmişlerdir [240]. Diğer çalışmalarda, kurkumin yüklü PLGA NP'lerin %EE değerlerini, Orunoğlu ve ark. %35 [241], Doggui ve ark. %31 [242], Busari ve ark. ise %22 olarak bulmuşlardır [243]. Sonuçta, tez çalışması kapsamında bulunan %EE değerlerinin literatürle uyumlu olduğu görülmüştür.

Peptit içermeyen (peptit(-)) ve peptit bağlı (peptit(+)) kurkumin yüklü PLGA NP'lerden CUR salımı iki fazlı olarak gerçekleşmiştir (Bkz. Şekil 4.35). İlk üç saat ve 72 saat sonunda ortama salınan kurkumin miktarları sırasıyla; peptit(-) NP'lerden %40 ve %72, peptit(+) NP'lerden ise %31 ve %65 olarak bulunmuştur. Doggui ve ark. kurkumin yüklü PLGA NP'lerden CUR salımının iki fazda gerçekleştiğini ve ilk fazda (eksponansiyel) 6 saat sonunda %74, daha yavaş salımın gerçekleştiği ikinci fazda ise devam eden 16 saat boyunca %81 kurkumin salımının gerçekleştiğini bildirmişlerdir [242]. Mukerjee ve ark. ise ilk bir saatte %10-13 ve devam eden 10 gün boyunca %65 CUR salımının gerçekleştiğini rapor etmişlerdir [196]. Duan ve ark. kurkumin yüklü PLGA ve monoklonal antikor (mAb) bağlı

CUR yüklü PLGA NP'lerin serbest kurkumine göre CUR-salım sürelerinin 9 kat artış göstererek 72 saat sürdüğünü ifade etmişlerdir. Ayrıca, mAb bağlı ve mAb içermeyen CUR yüklü NP'lerin salım miktarlarında ve salım sürelerinde 72 saat boyunca herhangi bir anlamlı fark görülmediğini belirtmişlerdir [244]. Zhao ve ark. kurkumin yüklü PEG-PLA miselleri (Cur-MP) ve RGD bağlı PEG-PLA misellerinin (RGD-CUR-MP) salım deneylerinde ilk 4 saat içinde sırasıyla %11 ve %8, 120 saat sonunda ise %73 ve %97 oranlarında kurkumin salımı gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, RGD içeren misellerin az da olsa daha hızlı kurkumin salımı gösterdiklerini belirtmişlerdir [245]. Jiang ve ark. paklitaksel (PTX) ve kurkumin (CUR) yüklü (co-loaded) lipozomların (PTX/CUR LPs) ve RGD bağlı (RGD-PTX/CUR LPs) lipozomların ilk 2 saatte %30 kurkumin, devam eden 12 saat boyunca ise %60 CUR saldıgını bulmuşlar ve RGD varlığının, lipozomların salım değerlerinde anlamlı bir fark oluşturmadığını belirtmişlerdir [240]. Literatürde, tez çalışmasının kurkumin salım deneyi ile örtüşen çalışmalar bulunmakla birlikte, farklı zamanlarda (daha uzun) kurkumin salımının gerçekleştiği çalışmalar da bulunmaktadır.

5.8. Serbest Kurkumin ve Kurkumin yüklü Manyetik PLGA NP'ler ile Gerçekleştirilen Hücre Kültürü Çalışmaları

Öncelikle, serbest kurkuminin (CUR) HUVEC ve T98G hücreleri üzerine, daha sonra ise CUR ve/veya peptit ile işlevsellik kazandırılmış NP'lerin T98G hücreleri üzerine etkileri literatür eşliğinde tartışılmıştır.

Serbest kurkuminin 0-100 μ M doz aralığında, HUVEC hücrelerinin % canlılığı üzerine etkisi 48 ve 72 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.41) ve zamana bağlı olarak düşük dozlarda 48 saatlik grubun, yüksek dozlarda ise (50 ve 100 μ M) 72 saatlik grubun % hücre canlılığını daha fazla düşürdükleri bulunmuştur. Her iki grupta da kurkumin dozları arttıkça HUVEC hücrelerinin % canlılıkları anlamlı olarak azalmış ve örneğin, % hücre canlılık değeri 100 μ M CUR uygulandıktan 48 saat sonra %21'e ($p \leq 0,001$), 72 saat sonra %11'e ($p \leq 0,001$) düşmüştür. Ayrıca, kurkuminin HUVEC hücrelerinde IC_{50} değeri 72 saat sonra ~ 30 μ M (11 μ g/mL) olarak bulunmuştur. Literatürde kurkuminin HUVEC hücrelerinde doz-canlılık ilişkisi geniş bir doz aralığı göstermektedir. Astinfeshan ve ark. 100 μ M kurkuminin 72 saat sonra HUVEC hücrelerinin canlılığını kontrole göre %20 oranında azalttığını belirtmişlerdir [246]. Gong ve ark. kurkuminin 48 saat sonra HUVEC hücrelerinde IC_{50} değerini ~ 100 μ M (40 μ g/mL) bulmuşlardır [247]. Fu ve ark. HUVEC

hücrelerinde 40 μM kurkumin uygulamasının 72 saat sonra hücre canlılığını $\sim\%30$ 'a düşürdüğünü görmüşlerdir [248]. Özellikle en son verilen çalışmanın % canlılık değeri bu çalışmadaki bulgularla uyumludur.

Serbest kurkuminin (0-100 μM) T98G hücre canlılığı üzerine etkileri 48 ve 72 saat sonra MTT analizi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.42). Serbest kurkumin uygulanan T98G hücrelerinin % canlılıklarında; 25 μM için 48 saat uygulama sonrasında $\%10$ azalma, 12,5 μM için 72 saat sonrasında ise sadece $\%1$ azalma görülmüştür. Bu sonuçlardan, T98G hücrelerinin düşük dozlarda kurkumine karşı dirençli oldukları söylenebilir. Her iki grupta da yüksek kurkumin dozlarında (50, 100 μM), hücre canlılıklarında kontrol hücrelerine göre anlamlı azalmalar tespit edilmiştir ($p \leq 0,001$). En yüksek CUR doz değerinde (100 μM) % hücre canlılığı, 48 saat sonra $\%26$ 'ya ($p \leq 0,001$), 72 saat sonra $\%17$ 'ye ($p \leq 0,001$) düşmüştür ve T98G hücrelerinin IC_{50} değeri 48 saat sonra $\sim 50 \mu\text{M}$ (18 $\mu\text{g/mL}$), 72 saat sonra ise $\sim 36 \mu\text{M}$ (13 $\mu\text{g/mL}$) olarak bulunmuştur. Literatürde, kurkuminin T98G hücrelerinde IC_{50} değerlerini; Langone ve ark. 24 saat sonra 8 μM [249]; Du ve ark. 24 saat sonra 31 μM [250]; Dilnawaz ve ark. 120 saat sonra 18 μM [251]; Karmakar ve ark. 24 saat sonra $\sim 50 \mu\text{M}$ [252] olarak bulmuşlardır. Literatürde, kurkuminin T98G hücreleri üzerinde IC_{50} doz değerleri, bu tez çalışmasının bulgularıyla da uyuşan, geniş bir doz aralığı içermektedir.

T98G hücrelerine farklı dozlarda (0-1 mg/mL) ve zamanlarda (24, 48, 72 sa.) uygulanan manyetik PLGA nanopartiküllerin hücre canlılığı üzerine etkileri MTT analizleri ile incelenmiştir ve her üç uygulama süresinde, özellikle 0,5 ve 1 mg/mL doz değerlerinde, kurkumin içeren NP'lerin, kurkumin içermeyenlere göre % hücre canlılığını anlamlı olarak düşürdüğü görülmüştür (Bkz. Şekil 4. 43). Ayrıca, NP'lerin hücre canlılığı üzerine etkileri bakımından aynı uygulama sürelerinde, kurkumin içermeyen NP'ler (PLGA+SPDON ve PLGA+SPDON+GRGDS) birbirlerine göre (72. saat uygulaması dışında) benzer etkiler; kurkumin içeren NP'ler (PLGA+SPDON+CUR ve PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) ise yine birbirlerine göre (özellikle 72. saat; 0,5 ve 1 mg/mL için) benzer 'toksik' etkiler göstermiştir.

Kurkumin içermeyen NP'lerin, polimer (PLGA), manyetik çekirdek (SPDON) veya peptit (GRGDS) yapıları T98G hücreleri üzerinde toksik etki göstermemiş veya çok az toksik etki göstermiştir. PLGA ve PLGA+SPDON yapılarının toksik etki göstermemesi daha önceden yapılan MTT analiz sonuçları (TMZ yüklü NP çalışmalarında Bkz. Şekil 4.39) ile de

gösterilmiştir, burada yeni ve önemli olan peptit (GRGDS) yapısının toksik etki göstermemesi ve peptit bağlı kurkumin yüklü NP'lerin (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) hücre canlılığı üzerindeki toksik etki kaynağının tek başına 'kirkumin' olarak ortaya çıkmasıdır.

Peptit içermeyen ve peptit bağlı kurkumin yüklü NP'lerin içerdikleri kurkumin miktarları arasında ~6 kat fark (PLGA+SPDON+CUR, lehine) olmasına rağmen (Bkz. Çizelge 4.10) benzer toksik etki göstermeleri, peptit (GRGDS) yapısının hücre alım veya hedeflendirme başarısıyla açıklanabilir. Ayrıca, T98G hücrelerinde kurkumin yüklü NP'lerin oluşturdukları bu benzer toksik etkiler, canlı/ölü hücre boyama ve Anneksin V/PI analizleri ile de desteklenmiştir (Bkz. Resim 4.16-19).

Arjinin-glisin-aspartik asit (RGD), glioblastoma (GBM) anjiyogenezinde ve hücrelerinde aşırı ekprese edilen integrin $\alpha v \beta 3$ reseptörleri için hedeflendirme ligandı olarak kullanılmaktadır [53, 253, 254]. RGD ile hedeflendirilmiş nanopartiküler sistemler (polimerik nanopartikül, misel, dendrimer, lipozomlar vb.) GBM hücrelerinde hücre alımı veya *in vivo* GBM tümör modellerinde reseptör aracılı taşıma (RMT) yoluyla kan beyin bariyeri (KBB) geçişlerini arttırmaktadır. Örneğin, Quader ve ark. tarafından, epirubisin (potansiyel anti-GBM ajanı) yüklü polimerik misellere (Epi/m), siklik-RGD konjugasyonu (cRGD) ile integrin reseptörleri hedeflenmiş ve cRGD içeren misellerin GBM (U87MG, sferoid kültür ortamı) hücrelerine cRGD içermeyenlere göre daha hızlı ve daha yüksek miktarlarda taşındığı belirtilmiştir [253]. Misellerin, cRGD konjugasyonu ile hücre içerisine yüksek penetrasyonunun RGD-integrin (ligand-reseptör) bağlanması ile gerçekleştiği bildirilmiştir. Ayrıca, immün yetersiz (nude) farelerde xenograft-ortotopik GBM modeli oluşturulmuştur ve cRGD içeren misellerin serbest epirubisin veya epirubisin yüklü misellere göre GBM tümör hacmini 12 kat azalttığı görülmüştür [53, 253]. Bu çalışmada, GRGDS peptiti T98G hücrelerinde hedeflendirme ajanı olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır ve peptit bağlı NP'lerin peptit içermeyenlere göre kurkuminin efektif dozunu 6 kat azalttığı görülmüştür.

5.9. Hipertermi Maruziyeti Altında Hücre Kültürü Çalışmaları

Glioblastoma (T98G) hücrelerini içeren kültür ortamının, manyetik PLGA (PLGA+SPDON), kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR) ve peptit bağlı

kurkumin yüklü manyetik PLGA (PLGA+SPDON+CUR+GRGDS) NP'leri varlığında, RF-alan (13,56 MHz, 15 dk) hipertermi etkisiyle sıcaklıkları sırasıyla; 6,1; 5,8 ve 5,9°C artmış ve bu sıcaklıklar 43; 43,2; 43,5°C olarak belirlenmiştir (Bkz. Resim 4.21). Ayrıca, nanopartikül içermeyen (kontrol) T98G hücrelerinin RF-alan hipertermi etkisiyle sıcaklıkları ~2,5°C artmıştır. Kontrol hücrelerindeki bu artışın sebebi şu şekilde açıklanabilir. İletken bir malzeme alternatif bir manyetik alana maruz kaldığında, içerisinde 'eddy akımları' adı verilen girdap akımlar üreten bir voltaj (elektrik alan) indüklenir. Bu akımlar dış manyetik alana tepki olarak, zıt bir manyetik alan oluşturur ve manyetik enerji ısıya dönüşerek harcanır [255]. Bununla birlikte, manyetik nanopartiküllerin 'eddy akımı' yoluyla ısı oluşumu, nano boyutlarından dolayı önemsizdir [115]. Ancak, yüksek frekanslarda indüklenen girdap akımları 'dokunun' elektriksel iletkenliğine bağlı olarak (elektrolitler, sodyum ve klor gibi) lokal ısınmaya sebep olabilir [256]. Ayrıca, bu durumun başka bir nedeni olarak, hücre kültür kabının (25 cm'lik flask) bobine yakın olan köşelerinde, ardışık iki bobin sarımının kapasitif bir etki göstermesi ve oluşan parazit elektrik alanların girdap akımlarla sıcak noktalar (hot spot) oluşturmasıdır [257]. Sonuç olarak, 13,56 MHz RF alan, hücre besiyeri içeriğinden ve/veya hücre kültür kabının bobinle temasından kaynaklı T98G kontrol hücrelerinin sıcaklığını 15 dk'lık maruziyet sonunda ~2,5°C artırmıştır. Ayrıca, nanopartikül-RF alan etkileşimi T98G hücrelerinin ortam sıcaklıklarını ~6°C'lik bir artışla ~43°C'ye çıkarmıştır.

Nanopartiküllerin RF-hipertermi maruziyeti altında T98G hücrelerinin canlılıkları üzerine etkileri MTT analizi ile belirlenmiştir (Bkz. Şekil 4.45) ve RF-alan uygulanan NP'lerin, RF-alan uygulanmayanlara göre T98G hücrelerinin % canlılıklarını anlamlı oranlarda azalttığı görülmüştür. Peptit içermeyen ve peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin uygulandığı gruplarda % hücre canlılıkları sırasıyla %46 ve %48'e; RF-alan+NP'lerin birlikte uygulandığı grupta ise %16 ve %31'e düşmüştür. Ayrıca, bu canlılık azalmaları canlı/ölü ve Anneksin V/PI analizleri ile de desteklenmiştir. Literatürde, 13,56 MHz RF-AMF (radyofrekans-alternatif manyetik alan) maruziyetinde nanopartiküler sistemlerin etkinliklerini artırmaya yönelik çalışmalar az da olsa bulunmaktadır. Hipertermi etkinliğinin RF frekansına (350 kHz; 13,56 MHz) ve SPDON boyutuna göre incelendiği bir çalışmada, 20 dk RF-alan maruziyetinin MCF-7 hücreleri üzerindeki termal toksisiteyi değerlendirilmiştir. Buna göre, frekans-boyut etkileşimlerinin, 350 kHz-25 nm; 13,56 MHz-15 nm değerlerinde daha efektif olduğu ve bu etkileşimlerin MCF-7 hücrelerinin % canlılıklarını sırasıyla %43 ve %25 azalttıkları belirtilmiştir [258].

Radyofrekans hipertermi (13,56 MHz; 80 watt) etkinliğinin incelendiği bir diğer çalışmada, TMZ yüklü-folik asit bağlı-polimerik manyetik nanopartiküllerin (TMZ-MNP-FA), RF hipertermi maruziyeti ile C6 glioblastoma hücreleri üzerindeki anti-kanser etkinliği incelenmiştir. RF-hipertermi maruziyeti (10 dk) altında, C6-GBM hücrelerinin kültür ortamının sıcaklığı, NP içermeyen (kontrol) grupta $\sim 9^{\circ}\text{C}$, MNP-FA içeren grupta ise $\sim 15^{\circ}\text{C}$ artış göstermiştir. Bununla birlikte, RF-alanın C6 hücrelerinde koloni oluşturma etkisi incelenmiş ve %PE (plating efficiency, yüzeyi kaplama verimi) değerini düşürerek toksik etki gösterdiği belirtilmiştir. RF-alan uygulanan MNP-FA ve TMZ-MNP-FA NP'lerin, RF alan uygulanmayan NP'lere göre C6 hücrelerinin % canlılıklarını ~ 15 ve ~ 30 düşürdükleri görülmüştür. Ayrıca, manyetik nanopartikül ile RF-alan kombinasyonunun apoptotik-nekrotik hücre ölümlerini önemli ölçüde arttırdığı belirtilmiştir [259]. İlgili çalışma sonuçları, bu çalışmada görülen ve RF-hipertermi varlığında kontrol hücrelerinin bulunduğu kültür ortamındaki sıcaklık artışı ile uyumludur.

Jia ve ark. tarafından, süperparamanyetik demir oksit nanopartikül (SPDON) ve kurkumin (Cur) yüklü eksozomlar sentezlenmiş ve eksozom membranına peptit (RGE) konjuge edilerek glioblastoma hücrelerinde (U251) ve glioblastoma zenograft modelinde eksozomların (RGE-Exo-SPDON/Cur) terapötik etkinlikleri incelenmiştir. Ayrıca, işlevsellik kazandırılmış eksozomların alternatif manyetik alan (200 kHz, 10 kA/m, 1 sa.) altında manyetik hipertermi (MFH) etkinlikleri de değerlendirilmiştir. Buna göre, RGE-Exo-SPDON, RGE-Exo-CUR ve RGE-Exo-SDPON/CUR NP'leri U251 GBM hücrelerinin % canlılıklarını, RF-hipertermi altında, sırasıyla ~ 40 , ~ 40 ve ~ 10 değerlerine düşürmüştür. Ayrıca, U251 hücrelerinin % canlılıklarını, RF-hipertermi ile birlikte manyetik NP'lerin (Exo-SPDON) ~ 60 'a, RGE bağlı manyetik NP'lerin (RGE-Exo-SPDON) ise ~ 40 'a düşürdüğü belirtilmiştir. Buradan aynı miktar SPDON içeren eksozomların RGE etkisi ile U251 hücrelerinin % canlılıklarını ~ 20 daha fazla düşürdüğü anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, hipertermi maruziyeti altında "RGE-Exo-SPDON/Cur" eksozomlarının uygulandığı GBM hücreleri ve GBM zenograft modelinde, RF-Cur sinerjik etkisi gözlenmiş ve hücre canlılığı ~ 10 'a düştüğü, tümör hacminin ise neredeyse kaybolduğu bildirilmiştir [260].

Rejinold ve ark. tarafından, SPDON ve kurkumin yüklü kitosan-poli(N-vinil kaprolaktam) NP'lerin 4T1 (fare duktal meme kanseri) hücrelerinde RF-hipertermi (13,56 MHz, 80 watt, 2dk, solenoid bobin) etkisi ile sıcaklığa duyarlı olarak ilaç salımları ve buna bağlı olarak

hücre canlılıkları incelenmiştir. Bu çalışmaya göre, RF uygulanan 4T1 hücrelerinin bulunduğu ortama, RF uygulanmayana göre daha yüksek seviyede kurkumin salındığı ve bu salımın RF-bağımlı olduğu görülmüştür. Ayrıca, RF+NP'lerin, sadece NP uygulanan gruba göre 4T1 hücrelerinde, hücre canlılığını azalttığı (~%50) ve apoptoz artışına bağlı olarak anti-kanser özellik gösterdiği belirtilmiştir [261]. Bu tez kapsamında gerçekleştirilen RF-hipertermi deneylerinde gerek kontrol hücrelerinin sıcaklık artışı gerekse T98G hücrelerinin RF-alan etkisi ile % hücre canlılıklarında görülen azalmalar literatür çalışmaları ile uyumludur.

Literatürde, kurkuminin farklı kanser türleri üzerindeki kemo-protetik ve kemo-terapötik etkilerinin gösterildiği çalışmalar da bulunmaktadır [93]. Bazı çalışmalarda, modifiye edilmiş kurkumin, serbest kurkumine kıyasla daha yüksek antioksidan özellik gösterirken, bazılarında ise kurkuminin modifiye edilmesi veya nanopartiküle yüklenmesi ile antioksidan etkinliğinin azaldığı belirtilmektedir [262, 263]. Bu nedenle, kurkuminin özellikle antioksidan ajanı olarak, ROS seviyelerinde farklı etkileri görülebilmektedir.

Bu çalışmada, hipertermi maruziyeti altında, peptit(+) ve peptit(-) CUR yüklü manyetik PLGA NP'lerin (+/-, peptit bağlı/içermeyen), T98G hücrelerinde reaktif oksijen türleri (ROS) oluşumuna etkisi (Bkz. Şekil 4.47) incelenmiştir. Nanopartikül içeren grupta (RF uygulanmayan), peptit(+) ve peptit(-) CUR yüklü NP'ler, ROS seviyesini kontrol hücrelerine göre anlamlı oranda ($p \leq 0,05$) düşürmüştü, ancak kendi aralarında anlamlı bir fark görülmemiştir. Yallapu ve ark. serbest CUR ve CUR yüklü manyetik NP'lerin meme kanseri hücreleri (MDA-MB-231) üzerindeki antioksidan etkilerini incelemişler ve serbest CUR'un ROS seviyesini değiştirmedığını, ancak CUR yüklü manyetik NP'lerin ROS seviyesini arttırdığını bildirmişlerdir [264]. Doggui ve ark. boş PLGA ve CUR yüklü PLGA NP'lerin insan nöroblastoma hücreleri (SK-N-SH) üzerinde toksik etki göstermediğini ancak, CUR yüklü NP'lerin ROS seviyesini kontrol hücrelerine göre düşürdüğünü ($p \leq 0,01$) bulmuşlardır [242]. Sonuç olarak, CUR yüklü NP'ler ROS üzerinde farklı etkiler göstermekle birlikte, literatürle uyumlu sonuçlar da bulunmaktadır.

RF-hipertermi uygulanmayan, peptit(+) ve peptit(-) NP'lerin ROS seviyelerinde birbirine yakın değerler göstermesi ise peptit yapısının ROS oluşturmadığı anlamına gelmekle birlikte, oluşan hücre içi anti-oksidan etkinin (ROS'un düşmesi) kurkumin kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Bu durumun ise peptit(+) NP'lerde düşük olan kurkumin miktarının, peptit

aracılığı ile hücre içerisine daha fazla taşınması ile mümkün olduğu sonucuna varılmıştır. Başka bir ifadeyle, peptit(+) NP'lerin içerdiği CUR miktarı düşük olmasına rağmen, hücresel alımları daha yüksek olduğu için ROS seviyeleri peptit(-) NP'ler ile benzerlik göstermiştir. Platel ve ark. L5178Y hücrelerinde (fare-lenfoma) hücre içi ROS indüksiyonunun, NP'lerin endositozu ile ilişkili olup olmadığını incelemişler ve yüzey yükü pozitif olan PLGA(+) NP'lerin endositozu (%95) ile ROS oluşumunun ilişkili olduğunu belirtmişlerdir [265]. Sonuç olarak, sadece NP uygulanan hücrelerde kontrol hücrelerine göre ROS seviyesinin baskılanması güçlü antioksidan özelliğe sahip kurkuminin serbest radikalleri temizlemesi olarak değerlendirilebilir.

Bu tez çalışmasında, hipertermi maruziyeti altında nanopartiküllerin uygulandığı hücrelerde de ROS seviyesi kontrol hücrelerine göre azalmıştır ($p \leq 0,05$) ve RF-alan etkisi ile NP'lerin ROS seviyelerinde anlamlı bir değişim görülmemiştir (Bkz. Şekil 4.47). Hipertermi uygulamasının ROS oluşumunda bir artışa neden olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir [152, 266, 267]. Ancak, hücreler, normal şartlar altında ROS üretimini dengeleyen çeşitli antioksidan savunma sistemleri içermektedir [267] ve bu sistemlere ek olarak uygulanan ajanların güçlü antioksidan özelliği, ROS oluşumunu nötralize edebilmektedir [154]. Liu ve ark., anti-kanser, anti-enflamatuar ve antioksidan özellik gösteren DHM'nin (dihidromiretin) HepG2 (hepatosellüler karsinoma) hücreleri üzerine etkilerini araştırmışlar ve ROS seviyesinde keskin bir düşüşün hücre proliferasyonunu önemli ölçüde inhibe ettiğini ve HepG2 hücrelerinin apoptozunu indüklediğini göstermişlerdir [268].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışmasında, GRGDS peptit konjugasyonu ile T98G hücrelerine hedeflendirilmiş CUR yüklü manyetik PLGA NP'ler sentezlenmiştir ve bu NP'lerin, tez kapsamında üretilen RF-alan hipertermi sistemi ile birlikte kullanıldığında GBM tedavisinde etkili olduğu *in vitro* sonuçlarla ortaya konmuştur. Bu bölümde, tez kapsamında yapılan çalışmalarla ilgili genel sonuçlar, sınırlılıklar ve çözüm önerileri verilmiştir.

Tez kapsamında, 13,56 MHz frekansta, 400 watt güç değerine çıkabilen RF-alan hipertermi maruziyet sistemi üretilmiştir ve geliştirilen bu sistem hücre kültürü deneylerinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Ayrıca, MHz-frekans bandında çalışan RF güç kaynaklarında mutlaka bulunması gereken bir sistem olan 'RF empedans uyumlayıcı' (matching unit) üretilmiştir ve RF-alan maruziyeti esnasında RF-sinyallerinin takibi (SWR-watt metre) ve ince ayarı dikkatle yapılmıştır. Üretimi gerçekleştirilen hipertermi maruziyet sisteminin ticarileşebilmesi için daha kompakt hale getirilmesi ve kurulumunun basitleştirilmesi gerekmektedir. Bu eksiklerin tamamlanması ile ticarileşebilecek olan bu sistem, RF güç kaynağı olarak plazma sterilizasyon cihazlarında veya hipertermi maruziyet sisteminde kullanılabilir. Ayrıca, ileriye dönük çalışmalarda, çoklu-frekans uygulamasına olanak sağlayan hipertermi maruziyet sistemi üretilebilir, böylece sentezlenen nanomalzemenin maksimum etkileşime girdiği RF-alan frekans değeri, frekans taramaları neticesinde belirlenebilir. Hipertermi maruziyet sistemi üretiminde tespit edilen sınırlılıklar ve ileriye dönük önerilerden bazıları bu şekilde özetlenebilir.

İkili çöktürme ve termal ayrıştırma yöntemleri kullanılarak sırasıyla $\sim 10 \pm 2$ nm ve $5,6 \pm 0,8$ nm boyutlarına sahip SPDON'lar başarılı bir şekilde sentezlenmiştir ve PLGA NP'lere kazandırılan işlevsel özelliklerde (etken madde, peptit) agregasyonu düşük, eş-boyut dağılımlı, homojen polimer-kaplamasına olanak sağlayan termal ayrıştırma yöntemi tercih edilmiştir.

Poli(laktik-ko-glikolik asit, PLGA) ve poli(etilen glikol, PEG) polimerleri kullanılarak %80 verimle PLGA-b-PEG di-blok ko-polimer sentezi gerçekleştirilmiştir. Bu sentezin başarısı GPC, $^1\text{H-NMR}$ ve ATR-FTIR analizleri ile doğrulmuş ve analizler sonucunda %50 pegilasyon verimi elde edilmiştir.

Serbest TMZ'nin, HUVEC ve T98G hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonra, IC₅₀ doz değerleri sırasıyla, 500 μ M ve 350 μ M olarak bulunmuştur. Düşük ve yüksek derişim aralıklarında TMZ yüklü (%4) manyetik PLGA NP'ler uygulanan T98G hücrelerinde, % hücre canlılık değerlerinde anlamlı bir değişim görölmemiştir.

Kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin, %EE ve %DL değerleri, sırasıyla %25 ve %8; peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin ise %4 ve %1,6 bulunmuştur. Serbest kurkuminin, HUVEC ve T98G hücrelerine uygulandıktan 72 saat sonra, IC₅₀ doz değerleri sırasıyla, 30 μ M ve 36 μ M olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, T98G insan glioblastoma hücrelerinde, TMZ'ye göre yaklaşık 10 kat daha fazla toksik etki gösterdiği tespit edilen kurkuminin, kemoterapi öncesi uygulanmasıyla GBM hastalarını tedaviye karşı daha duyarlı hale getirebilir.

Peptit(+) CUR yüklü manyetik PLGA NP'ler, peptit(-) CUR yüklü manyetik PLGA NP'lere göre ~6 kat daha az kurkumin içermesine rağmen, bu NP'ler T98G hücrelerinde benzer toksik etki göstermiştir. Bu durum, GRGDS ile fonksiyonelleştirilmiş PLGA NP'lerin hücre alım ve hedeflendirme başarısıyla açıklanabilir. Ayrıca, peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin GBM tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılabileceği *in vitro* deneyler ile gösterilmiştir.

RF-alan hiperterminin T98G hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir. Buna göre, RF-alan uygulanan NP'lerle, RF-alan uygulanmayanlara göre T98G'lerin % hücre canlılıklarında anlamlı azalmalar görölmüştür. Tez kapsamında, NP'ler varlığında T98G hücreleri üzerine hipertermi uygulaması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte, peptit bağlı kurkumin yüklü manyetik PLGA NP'lerin hipertermi tedavisiyle birlikte glioblastomaya karşı etkili bir anti-tümör sistemi olarak kullanılabileceği *in vitro* olarak gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Lapointe, S., Perry, A., and Butowski, N. A. (2018). Primary brain tumours in adults. *The Lancet*, 392(10145), 432-446.
2. Aparicio-Blanco, J., Sanz-Arriazu, L., Lorenzoni, R., and Blanco-Prieto, M. J. (2020). Glioblastoma chemotherapeutic agents used in the clinical setting and in clinical trials: Nanomedicine approaches to improve their efficacy. *International Journal of Pharmaceutics*, 581, 119283.
3. Beik, J., Abed, Z., Ghoreishi, F. S., Hosseini-Nami, S., Mehrzadi, S., Shakeri-Zadeh, A., and Kamrava, S. K. (2016). Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. *Journal of Controlled Release*, 235, 205-221.
4. Samanta, B., Yan, H., Fischer, N. O., Shi, J., Jerry, D. J., and Rotello, V. M. (2008). Protein-passivated Fe₃O₄ nanoparticles: low toxicity and rapid heating for thermal therapy. *Journal of Materials Chemistry*, 18(11), 1204-1208.
5. Taratula, O., Dani, R. K., Schumann, C., Xu, H., Wang, A., Song, H., Dhagat, P., and Taratula, O. (2013). Multifunctional nanomedicine platform for concurrent delivery of chemotherapeutic drugs and mild hyperthermia to ovarian cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 458(1), 169-180.
6. Verma, J., Lal, S., and Van Noorden, C. J. (2014). Nanoparticles for hyperthermic therapy: synthesis strategies and applications in glioblastoma. *International journal of nanomedicine*, 9, 2863.
7. Meenach, S. A., Hilt, J. Z., and Anderson, K. W. (2010). Poly(ethylene glycol)-based magnetic hydrogel nanocomposites for hyperthermia cancer therapy. *Acta Biomaterialia*, 6(3), 1039-1046.
8. Hildebrandt, B., Wust, P., Ahlers, O., Dieing, A., Sreenivasa, G., Kerner, T., Felix, R., and Riess, H. (2002). The cellular and molecular basis of hyperthermia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 43(1), 33-56.
9. Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S. M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P. Y., Stupp, R., and Reifenberger, G. (2015). Glioma. *Nature Reviews Disease Primers*, 1, 15017.
10. Jakel, S., and Dimou, L. (2017). Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 24.
11. Ferris, S. P., Hofmann, J. W., Solomon, D. A., and Perry, A. (2017). Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Archiv*, 471(2), 257-269.
12. Ostrom, Q. T., Cioffi, G., Gittleman, H., Patil, N., Waite, K., Kruchko, C., and Barnholtz-Sloan, J. S. (2019). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro-Oncology*, 21(Suppl 5), v1-v100.

13. Azzarelli, R., Simons, B. D., and Philpott, A. (2018). The developmental origin of brain tumours: a cellular and molecular framework. *Development*, 145(10).
14. Shergalis, A., Bankhead, A., 3rd, Luesakul, U., Muangsin, N., and Neamati, N. (2018). Current Challenges and Opportunities in Treating Glioblastoma. *Pharmacological Reviews*, 70(3), 412-445.
15. Waker, C. A., and Lober, R. M. (2019). Brain Tumors of Glial Origin. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1190, 281-297.
16. Batista, C. M., Mariano, E. D., Barbosa, B. J., Morgalla, M., Marie, S. K., Teixeira, M. J., and Lepski, G. (2014). Adult neurogenesis and glial oncogenesis: when the process fails. *Biomed Research International*, 2014, 438639.
17. Jovcevska, I. (2019). Genetic secrets of long-term glioblastoma survivors. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences. Udruzenje Basicnih Mediciniskih Znanosti*, 19(2), 116-124.
18. Alcantara Llaguno, S. R., and Parada, L. F. (2016). Cell of origin of glioma: biological and clinical implications. *British Journal of Cancer*, 115(12), 1445-1450.
19. Yao, M., Li, S., Wu, X., Diao, S., Zhang, G., He, H., Bian, L., and Lu, Y. (2018). Cellular origin of glioblastoma and its implication in precision therapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 15(8), 737-739.
20. Bahadur, S., Sahu, A. K., Baghel, P., and Saha, S. (2019). Current promising treatment strategy for glioblastoma multiforme: A review. *Oncology Reviews*, 13(2), 417.
21. Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S. M., and Simjee Sh, U. (2017). Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1), 3-9.
22. Alifieris, C., and Trafalis, D. T. (2015). Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. *Pharmacology and Therapeutics*, 152, 63-82.
23. Perkins, A., and Liu, G. (2016). Primary brain tumors in adults: diagnosis and treatment. *American Family Physician*, 93(3), 211-217.
24. Stupp, R., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M. J., Belanger, K., Brandes, A. A., Marosi, C., and Bogdahn, U. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 987-996.
25. Matarredona, E. R., and Pastor, A. M. (2019). Neural Stem Cells of the Subventricular Zone as the Origin of Human Glioblastoma Stem Cells. Therapeutic Implications. *Frontiers in Oncology*, 9, 779.
26. Taylor, O. G., Brzozowski, J. S., and Skelding, K. A. (2019). Glioblastoma Multiforme: An Overview of Emerging Therapeutic Targets. *Frontiers in Oncology*, 9, 963.

27. Fernandes, C., Costa, A., Osorio, L., Lago, R. C., Linhares, P., Carvalho, B., and Caeiro, C. (2017). Current Standards of Care in Glioblastoma Therapy. In S. De Vleeschouwer (Ed.), *Glioblastoma* (10.15586/codon.glioblastoma.2017.ch11). Brisbane (AU).
28. Reni, M., Mazza, E., Zanon, S., Gatta, G., and Vecht, C. J. (2017). Central nervous system gliomas. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 113, 213-234.
29. Wang, L., Liang, B., Li, Y. I., Liu, X., Huang, J., and Li, Y. M. (2019). What is the advance of extent of resection in glioblastoma surgical treatment—a systematic review. *Chinese Neurosurgical Journal*, 5(1).
30. Haj, A., Doenitz, C., Schebesch, K. M., Ehrensberger, D., Hau, P., Putnik, K., Riemenschneider, M. J., Wendl, C., Gerken, M., Pukrop, T., Brawanski, A., and Proescholdt, M. A. (2017). Extent of Resection in Newly Diagnosed Glioblastoma: Impact of a Specialized Neuro-Oncology Care Center. *Brain Sciences*, 8(1).
31. Carrillo, J. A., and Munoz, C. A. (2012). Alternative chemotherapeutic agents: nitrosoureas, cisplatin, irinotecan. *Neurosurgery Clinics of North America*, 23(2), 297-306, ix.
32. Agarwal, S., Tyagi, G., Chadha, D., and Mehrotra, R. (2017). Structural-conformational aspects of tRNA complexation with chloroethyl nitrosourea derivatives: A molecular modeling and spectroscopic investigation. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology*, 166, 1-11.
33. Bregy, A., Shah, A. H., Diaz, M. V., Pierce, H. E., Ames, P. L., Diaz, D., and Komotar, R. J. (2013). The role of Gliadel wafers in the treatment of high-grade gliomas. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 13(12), 1453-1461.
34. Herrlinger, U., Tzaridis, T., Mack, F., Steinbach, J. P., Schlegel, U., Sabel, M., Hau, P., Kortmann, R.-D., Krex, D., Grauer, O., Goldbrunner, R., Schnell, O., Bähr, O., Uhl, M., Seidel, C., Tabatabai, G., Kowalski, T., Ringel, F., Schmidt-Graf, F., Suchorska, B., Brehmer, S., Weyerbrock, A., Renovanz, M., Bullinger, L., Galldiks, N., Vajkoczy, P., Misch, M., Vatter, H., Stuplich, M., Schäfer, N., Kebir, S., Weller, J., Schaub, C., Stummer, W., Tonn, J.-C., Simon, M., Keil, V. C., Nelles, M., Urbach, H., Coenen, M., Wick, W., Weller, M., Fimmers, R., Schmid, M., Hattingen, E., Pietsch, T., Koch, C., and Glas, M. (2019). Lomustine-temozolomide combination therapy versus standard temozolomide therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma with methylated MGMT promoter (CeTeG/NOA-09): a randomised, open-label, phase 3 trial. *The Lancet*, 393(10172), 678-688.
35. Chang, F. H., Sutherland, J., and Bradford - Grieve, J. (2017). Taxonomic revision of D ictyochaes (D ictyochophyceae) based on morphological, ultrastructural, biochemical and molecular data. *Phycological Research*, 65(3), 235-247.
36. Fisusi, F. A., Siew, A., Chooi, K. W., Okubanjo, O., Garrett, N., Lalatsa, K., Serrano, D., Summers, I., Moger, J., and Stapleton, P. (2016). Lomustine nanoparticles enable both bone marrow sparing and high brain drug levels—a strategy for brain cancer treatments. *Pharmaceutical Research*, 33(5), 1289-1303.

37. Bolcaen, J., Acou, M., Descamps, B., Kersemans, K., Deblaere, K., Vanhove, C., and Goethals, I. (2017). PET for therapy response assessment in glioblastoma. *Exon Publications*, 175-195.
38. Gilbert, M. R., Dignam, J. J., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Blumenthal, D. T., Vogelbaum, M. A., Colman, H., Chakravarti, A., Pugh, S., Won, M., Jeraj, R., Brown, P. D., Jaeckle, K. A., Schiff, D., Stieber, V. W., Brachman, D. G., Werner-Wasik, M., Tremont-Lukats, I. W., Sulman, E. P., Aldape, K. D., Curran, W. J., Jr., and Mehta, M. P. (2014). A randomized trial of bevacizumab for newly diagnosed glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 370(8), 699-708.
39. Stupp, R., Hegi, M. E., Mason, W. P., Van Den Bent, M. J., Taphoorn, M. J., Janzer, R. C., Ludwin, S. K., Allgeier, A., Fisher, B., and Belanger, K. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *The lancet oncology*, 10(5), 459-466.
40. Gilbert, M. R., Wang, M., Aldape, K. D., Stupp, R., Hegi, M. E., Jaeckle, K. A., Armstrong, T. S., Wefel, J. S., Won, M., and Blumenthal, D. T. (2013). Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. *Journal of Clinical Oncology*, 31(32), 4085.
41. Berkelmann, L., Bader, A., Meshksar, S., Dierks, A., Hatipoglu Majernik, G., Krauss, J. K., Schwabe, K., Manteuffel, D., and Ngezahayo, A. (2019). Tumour-treating fields (TTFields): Investigations on the mechanism of action by electromagnetic exposure of cells in telophase/cytokinesis. *Scientific Reports*, 9(1), 7362.
42. Zhu, P., and Zhu, J. J. (2017). Tumor treating fields: a novel and effective therapy for glioblastoma: mechanism, efficacy, safety and future perspectives. *Chinese Clinical Oncology*, 6(4), 41.
43. Berger, T. R., and Wong, E. T. (2020). Tumor treating fields in neuro-oncology: integration of alternating electric fields therapy into promising treatment strategies. *Chinese Clinical Oncology*.
44. Weinberg, U. (2018). Novocure's Tumor Treating Fields: Innovative brain cancer therapy with survival and safety benefits. *Nature*, 561(7724).
45. Kessler, A. F., Frombling, G. E., Gross, F., Hahn, M., Dzokou, W., Ernestus, R. I., Lohr, M., and Hagemann, C. (2018). Effects of tumor treating fields (TTFields) on glioblastoma cells are augmented by mitotic checkpoint inhibition. *Cell Death Discovery*, 4, 12.
46. Stupp, R., Taillibert, S., Kanner, A., Read, W., Steinberg, D., Lhermitte, B., Toms, S., Idubai, A., Ahluwalia, M. S., Fink, K., Di Meco, F., Lieberman, F., Zhu, J. J., Stragliotto, G., Tran, D., Brem, S., Hottinger, A., Kirson, E. D., Lavy-Shahaf, G., Weinberg, U., Kim, C. Y., Paek, S. H., Nicholas, G., Bruna, J., Hirte, H., Weller, M., Palti, Y., Hegi, M. E., and Ram, Z. (2017). Effect of Tumor-Treating Fields Plus Maintenance Temozolomide vs Maintenance Temozolomide Alone on Survival in Patients With Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial. *The Journal of American Medical Association*, 318(23), 2306-2316.

47. Pinel, S., Thomas, N., Boura, C., and Barberi-Heyob, M. (2019). Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 344-357.
48. Sarkaria, J. N., Hu, L. S., Parney, I. F., Pafundi, D. H., Brinkmann, D. H., Laack, N. N., Giannini, C., Burns, T. C., Kizilbash, S. H., and Laramy, J. K. (2018). Is the blood–brain barrier really disrupted in all glioblastomas? A critical assessment of existing clinical data. *Neuro-Oncology*, 20(2), 184-191.
49. Lu, Q., Cai, X., Zhang, X., Li, S., Song, Y., Du, D., Dutta, P., and Lin, Y. (2018). Synthetic Polymer Nanoparticles Functionalized with Different Ligands for Receptor-mediated Transcytosis across Blood-Brain Barrier. *American Chemical Society Applied Bio Materials*, 1(5), 1687-1694.
50. Dong, X. (2018). Current Strategies for Brain Drug Delivery. *Theranostics*, 8(6), 1481-1493.
51. Zhou, Y., Peng, Z., Seven, E. S., and Leblanc, R. M. (2018). Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 270, 290-303.
52. Patel, M. M., and Patel, B. M. (2017). Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. *CNS Drugs*, 31(2), 109-133.
53. Tang, W., Fan, W., Lau, J., Deng, L., Shen, Z., and Chen, X. (2019). Emerging blood-brain-barrier-crossing nanotechnology for brain cancer theranostics. *Chemical Society Reviews*, 48(11), 2967-3014.
54. Pardridge, W. M. (2005). The blood-brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*, 2(1), 3-14.
55. Ceña, V., and Játiva, P. (2018). Nanoparticle crossing of blood–brain barrier: a road to new therapeutic approaches to central nervous system diseases. In: *Future Medicine*.
56. Masserini, M. (2013). Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN biochemistry*, 2013.
57. Lu, W., Wan, J., She, Z., and Jiang, X. (2007). Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle. *Journal of Controlled Release*, 118(1), 38-53.
58. Grabrucker, A. M., Ruozi, B., Belletti, D., Pederzoli, F., Forni, F., Vandelli, M. A., and Tosi, G. (2016). Nanoparticle transport across the blood brain barrier. *Tissue Barriers*, 4(1), e1153568.
59. Jiang, X., Xin, H., Ren, Q., Gu, J., Zhu, L., Du, F., Feng, C., Xie, Y., Sha, X., and Fang, X. (2014). Nanoparticles of 2-deoxy-D-glucose functionalized poly (ethylene glycol)-co-poly (trimethylene carbonate) for dual-targeted drug delivery in glioma treatment. *Biomaterials*, 35(1), 518-529.
60. Kou, L., Bhutia, Y. D., Yao, Q., He, Z., Sun, J., and Ganapathy, V. (2018). Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 27.

61. Chen, Y., and Liu, L. (2012). Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64(7), 640-665.
62. Li, X., Tsibouklis, J., Weng, T., Zhang, B., Yin, G., Feng, G., Cui, Y., Savina, I. N., Mikhalevska, L. I., Sandeman, S. R., Howel, C. A., and Mikhalevsky, S. V. (2017). Nano carriers for drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, 25(1), 17-28.
63. Xin, H., Jiang, X., Gu, J., Sha, X., Chen, L., Law, K., Chen, Y., Wang, X., Jiang, Y., and Fang, X. (2011). Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(epsilon-caprolactone) nanoparticles as dual-targeting drug delivery system for brain glioma. *Biomaterials*, 32(18), 4293-4305.
64. Gao, X., Qian, J., Zheng, S., Changyi, Y., Zhang, J., Ju, S., Zhu, J., and Li, C. (2014). Overcoming the blood-brain barrier for delivering drugs into the brain by using adenosine receptor nanoagonist. *American Chemical Society nano*, 8(4), 3678-3689.
65. Liu, Y., Mei, L., Xu, C., Yu, Q., Shi, K., Zhang, L., Wang, Y., Zhang, Q., Gao, H., Zhang, Z., and He, Q. (2016). Dual Receptor Recognizing Cell Penetrating Peptide for Selective Targeting, Efficient Intratumoral Diffusion and Synthesized Anti-Glioma Therapy. *Theranostics*, 6(2), 177-191.
66. Wang, T., Agarwal, S., and Elmquist, W. F. (2012). Brain distribution of cediranib is limited by active efflux at the blood-brain barrier. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 341(2), 386-395.
67. Simard, A. R., and Rivest, S. (2004). Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 18(9), 998-1000.
68. Balca-Silva, J., Matias, D., Carmo, A. D., Sarmento-Ribeiro, A. B., Lopes, M. C., and Moura-Neto, V. (2019). Cellular and molecular mechanisms of glioblastoma malignancy: Implications in resistance and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology*, 58, 130-141.
69. Ghosh, D., Nandi, S., and Bhattacharjee, S. (2018). Combination therapy to checkmate Glioblastoma: clinical challenges and advances. *Clinical Translational Medicine*, 7(1), 33.
70. Li, J., Liang, R., Song, C., Xiang, Y., and Liu, Y. (2018). Prognostic significance of epidermal growth factor receptor expression in glioma patients. *OncoTargets and Therapy*, 11, 731-742.
71. Chakravarti, A., Wang, M., Robins, H. I., Lautenschlaeger, T., Curran, W. J., Brachman, D. G., Schultz, C. J., Choucair, A., Dolled-Filhart, M., and Christiansen, J. (2013). RTOG 0211: a phase 1/2 study of radiation therapy with concurrent gefitinib for newly diagnosed glioblastoma patients. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics*, 85(5), 1206-1211.

72. Scott, E. N., Meinhardt, G., Jacques, C., Laurent, D., and Thomas, A. L. (2007). Vatalanib: the clinical development of a tyrosine kinase inhibitor of angiogenesis in solid tumours. *Expert opinion on investigational drugs*, 16(3), 367-379.
73. Fontanella, C., Ongaro, E., Bolzonello, S., Guardascione, M., Fasola, G., and Aprile, G. (2014). Clinical advances in the development of novel VEGFR2 inhibitors. *Annals of translational medicine*, 2(12).
74. Li, Y., Ali, S., Clarke, J., and Cha, S. (2017). Bevacizumab in recurrent glioma: patterns of treatment failure and implications. *Brain tumor research and treatment*, 5(1), 1-9.
75. Kiskova, T., Kubatka, P., Busselberg, D., and Kassayova, M. (2020). The Plant-Derived Compound Resveratrol in Brain Cancer: A Review. *Biomolecules*, 10(1).
76. Cilibrasi, C., Riva, G., Romano, G., Cadamuro, M., Bazzoni, R., Butta, V., Paoletta, L., Dalprà, L., Strazzabosco, M., and Lavitrano, M. (2017). Resveratrol impairs glioma stem cells proliferation and motility by modulating the wnt signaling pathway. *PloS One*, 12(1), e0169854.
77. Öztürk, Y., Günaydın, C., Yalçın, F., Nazıroğlu, M., and Braidı, N. (2019). Resveratrol enhances apoptotic and oxidant effects of paclitaxel through TRPM2 channel activation in DBTRG glioblastoma cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019.
78. Yuan, Y., Xue, X., Guo, R. B., Sun, X. L., and Hu, G. (2012). Resveratrol enhances the antitumor effects of temozolomide in glioblastoma via ROS-dependent AMPK-TSC-mTOR signaling pathway. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 18(7), 536-546.
79. Roberts, N. B., Wadajkar, A. S., Winkles, J. A., Davila, E., Kim, A. J., and Woodworth, G. F. (2016). Repurposing platinum-based chemotherapies for multi-modal treatment of glioblastoma. *Oncoimmunology*, 5(9), e1208876.
80. Grossman, S. A., O'Neill, A., Grunnet, M., Mehta, M., Pearlman, J. L., Wagner, H., Gilbert, M., Newton, H. B., and Hellman, R. (2003). Phase III study comparing three cycles of infusional carmustine and cisplatin followed by radiation therapy with radiation therapy and concurrent carmustine in patients with newly diagnosed supratentorial glioblastoma multiforme: Eastern Cooperative Oncology Group Trial 2394. *Journal of Clinical Oncology*, 21(8), 1485-1491.
81. Wesolowski, J. R., Rajdev, P., and Mukherji, S. K. (2010). Temozolomide (Temodar). *AJNR: American Journal of Neuroradiology*, 31(8), 1383-1384.
82. Ramalho, M. J., Coelho, M. A. N., and Pereira, M. C. (2018). Nanocarriers for the delivery of temozolomide in the treatment of glioblastoma. In *Design and Development of New Nanocarriers* (10.1016/b978-0-12-813627-0.00018-1pp. 687-722).
83. Andrasi, M., Bustos, R., Gaspar, A., Gomez, F. A., and Klekner, A. (2010). Analysis and stability study of temozolomide using capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography. B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(21), 1801-1808.

84. Ramalho, M. J., Andrade, S., Coelho, M. A. N., Loureiro, J. A., and Pereira, M. C. (2019). Biophysical interaction of temozolomide and its active metabolite with biomembrane models: The relevance of drug-membrane interaction for Glioblastoma Multiforme therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 136, 156-163.
85. Nagasawa, D. T., Chow, F., Yew, A., Kim, W., Cremer, N., and Yang, I. (2012). Temozolomide and other potential agents for the treatment of glioblastoma multiforme. *Neurosurgery Clinics of North America*, 23(2), 307-322, ix.
86. Stupp, R., Gander, M., Leyvraz, S., and Newlands, E. (2001). Current and future developments in the use of temozolomide for the treatment of brain tumours. *The Lancet Oncology*, 2(9), 552-560.
87. Marchesi, F., Turriziani, M., Tortorelli, G., Avvisati, G., Torino, F., and De Vecchis, L. (2007). Triazene compounds: mechanism of action and related DNA repair systems. *Pharmacological Research*, 56(4), 275-287.
88. Chamberlain, M. C. (2010). Temozolomide: therapeutic limitations in the treatment of adult high-grade gliomas. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 10(10), 1537-1544.
89. Yoshino, A., Ogino, A., Yachi, K., Ohta, T., Fukushima, T., Watanabe, T., Katayama, Y., Okamoto, Y., Naruse, N., Sano, E., and Tsumoto, K. (2010). Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *International Journal of Oncology*, 36(6), 1367-1377.
90. Haque, A., Banik, N. L., and Ray, S. K. (2011). Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 98, pp. 187-234): Elsevier.
91. Hegi, M. E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., De Tribolet, N., Weller, M., Kros, J. M., Hainfellner, J. A., Mason, W., and Mariani, L. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *New England Journal of Medicine*, 352(10), 997-1003.
92. Nay, S. L., and O'Connor, T. R. (2013). Direct repair in mammalian cells. *New Research Directions in DNA Repair*, 123-160.
93. Shabaninejad, Z., Pourhanifeh, M. H., Movahedpour, A., Mottaghi, R., Nickdasti, A., Mortezaipoor, E., Shafiee, A., Hajighadimi, S., Moradizarmehri, S., Sadeghian, M., Mousavi, S. M., and Mirzaei, H. (2020). Therapeutic potentials of curcumin in the treatment of glioblastoma. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 112040.
94. Giordano, A., and Tommonaro, G. (2019). Curcumin and Cancer. *Nutrients*, 11(10).
95. Jankun, J., Wyganowska-Świątkowska, M., Dettlaff, K., Jelińska, A., Surdacka, A., Wątróbska-Świetlikowska, D., and Skrzypczak-Jankun, E. (2016). Determining whether curcumin degradation/condensation is actually bioactivation. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(5), 1151-1158.

96. Prado-Audelo, D., María, L., Caballero-Florán, I. H., Meza-Toledo, J. A., Mendoza-Muñoz, N., González-Torres, M., Florán, B., Cortés, H., and Leyva-Gómez, G. (2019). Formulations of curcumin nanoparticles for brain diseases. *Biomolecules*, 9(2), 56.
97. Guo, Y.-Z., He, P., and Feng, A.-M. (2017). Effect of curcumin on expressions of NF- κ Bp65, TNF- α and IL-8 in placental tissue of premature birth of infected mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(2), 175-178.
98. Becher, B., Spath, S., and Goverman, J. (2017). Cytokine networks in neuroinflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(1), 49.
99. Zhang, C., Browne, A., Child, D., and Tanzi, R. E. (2010). Curcumin decreases amyloid- β peptide levels by attenuating the maturation of amyloid- β precursor protein. *Journal of Biological Chemistry*, 285(37), 28472-28480.
100. Cianciulli, A., Calvello, R., Porro, C., Trotta, T., Salvatore, R., and Panaro, M. A. (2016). PI3k/Akt signalling pathway plays a crucial role in the anti-inflammatory effects of curcumin in LPS-activated microglia. *International Immunopharmacology*, 36, 282-290.
101. Dhandapani, K. M., Mahesh, V. B., and Brann, D. W. (2007). Curcumin suppresses growth and chemoresistance of human glioblastoma cells via AP-1 and NFkappaB transcription factors. *Journal of Neurochemistry*, 102(2), 522-538.
102. Zanutto-Filho, A., Braganhol, E., Klafke, K., Figueiro, F., Terra, S. R., Paludo, F. J., Morrone, M., Bristot, I. J., Battastini, A. M., Forcelini, C. M., Bishop, A. J. R., Gelain, D. P., and Moreira, J. C. F. (2015). Autophagy inhibition improves the efficacy of curcumin/temozolomide combination therapy in glioblastomas. *Cancer Letters*, 358(2), 220-231.
103. Yin, H., Zhou, Y., Wen, C., Zhou, C., Zhang, W., Hu, X., Wang, L., You, C., and Shao, J. (2014). Curcumin sensitizes glioblastoma to temozolomide by simultaneously generating ROS and disrupting AKT/mTOR signaling. *Oncology Reports*, 32(4), 1610-1616.
104. Tsai, Y. M., Chien, C. F., Lin, L. C., and Tsai, T. H. (2011). Curcumin and its nano-formulation: the kinetics of tissue distribution and blood-brain barrier penetration. *International Journal of Pharmaceutics*, 416(1), 331-338.
105. Bhatia, S. (2016). Nanoparticles types, classification, characterization, fabrication methods and drug delivery applications. In *Natural polymer drug delivery systems* (pp. 33-93): Springer.
106. Champagne, P.-O., Westwick, H., Bouthillier, A., and Sawan, M. (2018). Colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the central nervous system: a review. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(11), 1385-1400.
107. He, Q., Liu, J., Liang, J., Liu, X., Li, W., Liu, Z., Ding, Z., and Tuo, D. (2018). Towards improvements for penetrating the blood–brain barrier—recent progress from a material and pharmaceutical perspective. *Cells*, 7(4), 24.

108. D'Agata, F., Ruffinatti, F. A., Boschi, S., Stura, I., Rainero, I., Abollino, O., Cavalli, R., and Guiot, C. (2018). Magnetic nanoparticles in the central nervous system: targeting principles, applications and safety issues. *Molecules*, 23(1), 9.
109. Kim, B. Y., Rutka, J. T., and Chan, W. C. (2010). Nanomedicine. *New England Journal of Medicine*, 363(25), 2434-2443.
110. Das, P., Colombo, M., and Prosperi, D. (2019). Recent advances in magnetic fluid hyperthermia for cancer therapy. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 174, 42-55.
111. Mohapatra, J., Xing, M., and Liu, J. P. (2019). Inductive Thermal Effect of Ferrite Magnetic Nanoparticles. *Materials (Basel)*, 12(19).
112. Bleier, G. C. (2018). Systematic Size Control in the Synthesis of Zero-Valent Iron Nanoparticles (Doctoral dissertation, The University of New Mexico).
113. Hergt, R., Dutz, S., Müller, R., and Zeisberger, M. (2006). Magnetic particle hyperthermia: nanoparticle magnetism and materials development for cancer therapy. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18(38), S2919-S2934.
114. Wallyn, J., Anton, N., and Vandamme, T. F. (2019). Synthesis, Principles, and Properties of Magnetite Nanoparticles for In Vivo Imaging Applications-A Review. *Pharmaceutics*, 11(11).
115. Deatsch, A. E., and Evans, B. A. (2014). Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 354, 163-172.
116. Suto, M., Hirota, Y., Mamiya, H., Fujita, A., Kasuya, R., Tohji, K., and Jeyadevan, B. (2009). Heat dissipation mechanism of magnetite nanoparticles in magnetic fluid hyperthermia. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321(10), 1493-1496.
117. Hilger, I., Frühauf, K., Andrä, W., Hiergeist, R., Hergt, R., and Kaiser, W. A. (2002). Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology. *Academic Radiology*, 9(2), 198-202.
118. Wildeboer, R. R., Southern, P., and Pankhurst, Q. A. (2014). On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(49).
119. Abenojar, E. C., Wickramasinghe, S., Bas-Concepcion, J., and Samia, A. C. S. (2016). Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. *Progress in Natural Science: Materials International*, 26(5), 440-448.
120. Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knuchel, R., Kiessling, F., and Lammers, T. (2019). Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138, 302-325.
121. Marcelo, G. A., Lodeiro, C., Capelo, J. L., Lorenzo, J., and Oliveira, E. (2020). Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 106, 110104.

122. Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., and Kim, W.-S. (2015). Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. *Science and technology of advanced materials*, 16(2), 023501.
123. El-Boubbou, K. (2018). Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: Preparation, conjugation and delivery. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 13(8), 929-952.
124. Cano, M., Núñez-Lozano, R., Lumberras, R., González-Rodríguez, V., Delgado-García, A., Jiménez-Hoyuela, J. M., and de la Cueva-Méndez, G. (2017). Partial PEGylation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles thinly coated with aminosilane as a source of ultrastable tunable nanosystems for biomedical applications. *Nanoscale*, 9(2), 812-822.
125. Park, J., An, K., Hwang, Y., Park, J. G., Noh, H. J., Kim, J. Y., Park, J. H., Hwang, N. M., and Hyeon, T. (2004). Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. *Nature Materials*, 3(12), 891-895.
126. Cheng, K. W., and Hsu, S. H. (2017). A facile method to prepare superparamagnetic iron oxide and hydrophobic drug-encapsulated biodegradable polyurethane nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, 12, 1775-1789.
127. Reddy, L. H., Arias, J. L., Nicolas, J., and Couvreur, P. (2012). Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. *Chemical Reviews*, 112(11), 5818-5878.
128. Wu, M., Guo, Q., Xu, F., Liu, S., Lu, X., Wang, J., Gao, H., and Luo, P. (2016). Engineering phosphopeptide-decorated magnetic nanoparticles as efficient photothermal agents for solid tumor therapy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 476, 158-166.
129. Zhao, S., Yu, X., Qian, Y., Chen, W., and Shen, J. (2020). Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. *Theranostics*, 10(14), 6278-6309.
130. Wu, L., Mendoza-Garcia, A., Li, Q., and Sun, S. (2016). Organic Phase Syntheses of Magnetic Nanoparticles and Their Applications. *Chemical Reviews*, 116(18), 10473-10512.
131. Makadia, H. K., and Siegel, S. J. (2011). Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel)*, 3(3), 1377-1397.
132. Swider, E., Koshkina, O., Tel, J., Cruz, L. J., de Vries, I. J. M., and Srinivas, M. (2018). Customizing poly(lactic-co-glycolic acid) particles for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*, 73, 38-51.
133. Arias, L. S., Pessan, J. P., Vieira, A. P. M., Lima, T. M. T., Delbem, A. C. B., and Monteiro, D. R. (2018). Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications: A Perspective on Synthesis, Drugs, Antimicrobial Activity, and Toxicity. *Antibiotics (Basel)*, 7(2).

134. Sharma, S., Parmar, A., Kori, S., and Sandhir, R. (2016). PLGA-based nanoparticles: A new paradigm in biomedical applications. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 30-40.
135. Ananta, J. S., Paulmurugan, R., and Massoud, T. F. (2016). Temozolomide-loaded PLGA nanoparticles to treat glioblastoma cells: a biophysical and cell culture evaluation. *Neurological Research*, 38(1), 51-59.
136. Ling, Y., Wei, K., Zou, F., and Zhong, S. (2012). Temozolomide loaded PLGA-based superparamagnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and treatment of malignant glioma. *International Journal of Pharmaceutics*, 430(1-2), 266-275.
137. Rezvantlab, S., Drude, N. I., Moraveji, M. K., Guvener, N., Koons, E. K., Shi, Y., Lammers, T., and Kiessling, F. (2018). PLGA-Based Nanoparticles in Cancer Treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1260.
138. Locatelli, E., and Comes Franchini, M. (2012). Biodegradable PLGA-b-PEG polymeric nanoparticles: synthesis, properties, and nanomedical applications as drug delivery system. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12).
139. Abd Ellah, N. H., and Abouelmagd, S. A. (2017). Surface functionalization of polymeric nanoparticles for tumor drug delivery: approaches and challenges. *Expert Opinion Drug Delivery*, 14(2), 201-214.
140. Torchilin, V. (2011). Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63(3), 131-135.
141. Attia, M. F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., and Vandamme, T. F. (2019). An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8), 1185-1198.
142. Prabhu, S., Goda, J. S., Mutalik, S., Mohanty, B. S., Chaudhari, P., Rai, S., Udupa, N., and Rao, B. S. S. (2017). A polymeric temozolomide nanocomposite against orthotopic glioblastoma xenograft: tumor-specific homing directed by nestin. *Nanoscale*, 9(30), 10919-10932.
143. Miura, Y., Takenaka, T., Toh, K., Wu, S., Nishihara, H., Kano, M. R., Ino, Y., Nomoto, T., Matsumoto, Y., and Koyama, H. (2013). Cyclic RGD-linked polymeric micelles for targeted delivery of platinum anticancer drugs to glioblastoma through the blood-brain tumor barrier. *American Chemical Society nano*, 7(10), 8583-8592.
144. Xu, Q., Liu, Y., Su, S., Li, W., Chen, C., and Wu, Y. (2012). Anti-tumor activity of paclitaxel through dual-targeting carrier of cyclic RGD and transferrin conjugated hyperbranched copolymer nanoparticles. *Biomaterials*, 33(5), 1627-1639.
145. Danhier, F., Vroman, B., Lecouturier, N., Crockart, N., Pourcelle, V., Freichels, H., Jérôme, C., Marchand-Brynaert, J., Feron, O., and Préat, V. (2009). Targeting of tumor endothelium by RGD-grafted PLGA-nanoparticles loaded with paclitaxel. *Journal of Controlled Release*, 140(2), 166-173.

146. Chen, D., Li, B., Cai, S., Wang, P., Peng, S., Sheng, Y., He, Y., Gu, Y., and Chen, H. (2016). Dual targeting luminescent gold nanoclusters for tumor imaging and deep tissue therapy. *Biomaterials*, 100, 1-16.
147. Prieto, C., and Linares, I. (2018). Nanoparticles and nanothermia for malignant brain tumors, a suggestion of treatment for further investigations. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, 23(5), 474-480.
148. Kang, J. K., Kim, J. C., Shin, Y., Han, S. M., Won, W. R., Her, J., Park, J. Y., and Oh, K. T. (2020). Principles and applications of nanomaterial-based hyperthermia in cancer therapy. *Archives of Pharmacal Research*, 43(1), 46-57.
149. Mallory, M., Gogineni, E., Jones, G. C., Greer, L., and Simone, C. B., 2nd. (2016). Therapeutic hyperthermia: The old, the new, and the upcoming. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 97, 56-64.
150. Chang, D., Lim, M., Goos, J., Qiao, R., Ng, Y. Y., Mansfeld, F. M., Jackson, M., Davis, T. P., and Kavallaris, M. (2018). Biologically Targeted Magnetic Hyperthermia: Potential and Limitations. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 831.
151. Cherukuri, P., Glazer, E. S., and Curley, S. A. (2010). Targeted hyperthermia using metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62(3), 339-345.
152. Belhadj Slimen, I., Najar, T., Ghram, A., Dabbebi, H., Ben Mrad, M., and Abdrabbah, M. (2014). Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 513-523.
153. Palapati, P., and Averill-Bates, D. A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 degrees C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 667-679.
154. Patel, A. P. (2017). *Cancer hyperthermia using gold and magnetic nanoparticles*. (Doctoral Dissertation, University of Glasgow)
155. Bettaieb, A., K, P., and A, D. (2013). Hyperthermia: Cancer Treatment and Beyond. In *Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches* (10.5772/55795).
156. Tansey, E. A., and Johnson, C. D. (2015). Recent advances in thermoregulation. *Advances in Physiology Education*, 39(3), 139-148.
157. Kafrouni, L., and Savadogo, O. (2016). Recent progress on magnetic nanoparticles for magnetic hyperthermia. *Progress in Biomaterials*, 5(3-4), 147-160.
158. Dan, M., Bae, Y., Pittman, T. A., and Yokel, R. A. (2015). Alternating magnetic field-induced hyperthermia increases iron oxide nanoparticle cell association/uptake and flux in blood-brain barrier models. *Pharmaceutical Research*, 32(5), 1615-1625.
159. Dennis, C. L., and Ivkov, R. (2013). Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 715-729.

160. Ito, A., Shinkai, M., Honda, H., and Kobayashi, T. (2005). Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 100(1), 1-11.
161. Thiesen, B., and Jordan, A. (2008). Clinical applications of magnetic nanoparticles for hyperthermia. *International Journal of Hyperthermia*, 24(6), 467-474.
162. Chen, Y., Chen, Y., Xiao, D., Bose, A., Deng, R., and Bothun, G. D. (2014). Low-dose chemotherapy of hepatocellular carcinoma through triggered-release from bilayer-decorated magnetoliposomes. *Colloids and Surfaces and B-Biointerfaces*, 116, 452-458.
163. Sadhasivam, S., Savitha, S., Wu, C.-J., Lin, F.-H., and Stobiński, L. (2015). Carbon encapsulated iron oxide nanoparticles surface engineered with polyethylene glycol-folic acid to induce selective hyperthermia in folate over expressed cancer cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 480(1-2), 8-14.
164. Haghniaz, R., Umrani, R. D., and Paknikar, K. M. (2015). Temperature-dependent and time-dependent effects of hyperthermia mediated by dextran-coated La_{0.7}Sr_{0.3}MnO₃: in vitro studies. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 1609.
165. Raoof, M., and Curley, S. A. (2011). Non-invasive radiofrequency-induced targeted hyperthermia for the treatment of hepatocellular carcinoma. *International Journal of Hepatology*, 2011, 676957.
166. Kim, K. S., Hernandez, D., and Lee, S. Y. (2015). Time-multiplexed two-channel capacitive radiofrequency hyperthermia with nanoparticle mediation. *Biomedical Engineering Online*, 14(1), 95.
167. Du, Q., Ma, T., Fu, C., Liu, T., Huang, Z., Ren, J., Shao, H., Xu, K., Tang, F., and Meng, X. (2015). Encapsulating ionic liquid and Fe₃O₄ nanoparticles in gelatin microcapsules as microwave susceptible agent for MR imaging-guided tumor thermotherapy. *American Chemical Society Applied Materials & Interfaces*, 7(24), 13612-13619.
168. Raoof, M., Cisneros, B. T., Corr, S. J., Palalon, F., Curley, S. A., and Koshkina, N. V. (2013). Tumor selective hyperthermia induced by short-wave capacitively-coupled RF electric-fields. *PloS One*, 8(7), e68506.
169. Petryk, A. A., Giustini, A. J., Gottesman, R. E., Trembly, B. S., and Hoopes, P. J. (2013). Comparison of magnetic nanoparticle and microwave hyperthermia cancer treatment methodology and treatment effect in a rodent breast cancer model. *International Journal of Hyperthermia*, 29(8), 819-827.
170. Allam, A. A., Sadat, M. E., Potter, S. J., Mast, D. B., Mohamed, D. F., Habib, F. S., and Pauletti, G. M. (2013). Stability and magnetically induced heating behavior of lipid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 426.
171. Raoof, M., Zhu, C., Kaluarachchi, W. D., and Curley, S. A. (2012). Luciferase-based protein denaturation assay for quantification of radiofrequency field-induced targeted hyperthermia: developing an intracellular thermometer. *International Journal of Hyperthermia*, 28(3), 202-209.

172. Wildeboer, R., Southern, P., and Pankhurst, Q. (2014). On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 47(49), 495003.
173. Blanco-Andujar, C., Teran, F. J., and Ortega, D. (2018). Current Outlook and Perspectives on Nanoparticle-Mediated Magnetic Hyperthermia. In *Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications* (10.1016/b978-0-08-101925-2.00007-3pp. 197-245).
174. Moran, C. H., Wainerdi, S. M., Cherukuri, T. K., Kittrell, C., Wiley, B. J., Nicholas, N. W., Curley, S. A., Kanzius, J. S., and Cherukuri, P. (2010). Size-dependent joule heating of gold nanoparticles using capacitively coupled radiofrequency fields. *Nano Research*, 2(5), 400-405.
175. Massart, R. (1981). Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. *IEEE transactions on magnetics*, 17(2), 1247-1248.
176. Çakmak, S. (2008). *Manyetik poli(glisidil metakrilat) mikrokürelerin immünofonksiyonalizasyonu ve hayvansal hücre saflaştırılmasındaki etkinliğinin araştırılması*, Yüksek lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
177. Lee, C. Y., and Ooi, I. H. (2016). Preparation of Temozolomide-Loaded Nanoparticles for Glioblastoma Multiforme Targeting-Ideal Versus Reality. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 9(3).
178. Goncalves, D. P. N., Rodriguez, R. D., Kurth, T., Bray, L. J., Binner, M., Jungnickel, C., Gur, F. N., Poser, S. W., Schmidt, T. L., Zahn, D. R. T., Androutsellis-Theotokis, A., Schlierf, M., and Werner, C. (2017). Enhanced targeting of invasive glioblastoma cells by peptide-functionalized gold nanorods in hydrogel-based 3D cultures. *Acta Biomaterialia*, 58, 12-25.
179. Petcharoen, K., and Sirivat, A. (2012). Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. *Materials Science and Engineering: B*, 177(5), 421-427.
180. Liu, C. W., and Lin, W. J. (2012). Polymeric nanoparticles conjugate a novel heptapeptide as an epidermal growth factor receptor-active targeting ligand for doxorubicin. *International Journal of Nanomedicine*, 7, 4749-4767.
181. Ibarra, J., Melendres, J., Almada, M., Burboa, M. G., Taboada, P., Juárez, J., and Valdez, M. A. (2015). Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles. *Materials Research Express*, 2(9).
182. Sharma, K. S., Ningthoujam, R. S., Dubey, A. K., Chattopadhyay, A., Phapale, S., Juluri, R. R., Mukherjee, S., Tewari, R., Shetake, N. G., Pandey, B. N., and Vatsa, R. K. (2018). Synthesis and characterization of monodispersed water dispersible Fe₃O₄ nanoparticles and in vitro studies on human breast carcinoma cell line under hyperthermia condition. *Scientific Reports*, 8(1), 14766.
183. Zhang, L., He, R., and Gu, H.-C. (2006). Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, 253(5), 2611-2617.

184. Wu, N., Fu, L., Su, M., Aslam, M., Wong, K. C., and Dravid, V. P. (2004). Interaction of fatty acid monolayers with cobalt nanoparticles. *Nano letters*, 4(2), 383-386.
185. Premaratne, W., Priyadarshana, W., Gunawardena, S., and De Alwis, A. (2014). Synthesis of nanosilica from paddy husk ash and their surface functionalization. *Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka*, 8.
186. Yang, K., Peng, H., Wen, Y., and Li, N. (2010). Re-examination of characteristic FTIR spectrum of secondary layer in bilayer oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Applied Surface Science*, 256(10), 3093-3097.
187. Okassa, L. N., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Herve, K., Cohen-Jonathan, S., Munnier, E., Souce, M., Linassier, C., Dubois, P., and Chourpa, I. (2007). Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(d,l-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67(1), 31-38.
188. Bootdee, K., Nithitanakul, M., and Grady, B. P. (2012). Synthesis and encapsulation of magnetite nanoparticles in PLGA: effect of amount of PLGA on characteristics of encapsulated nanoparticles. *Polymer Bulletin*, 69(7), 795-806.
189. El-Mahdy, G. A., Atta, A. M., and Al-Lohedan, H. A. (2014). Synthesis and evaluation of poly(Sodium 2-Acrylamido-2-Methylpropane Sulfonate-co-Styrene)/magnetite nanoparticle composites as corrosion inhibitors for steel. *Molecules*, 19(2), 1713-1731.
190. Pereira, E. D., Cerruti, R., Fernandes, E., Peña, L., Saez, V., Pinto, J. C., Ramón, J. A., Oliveira, G. E., and Souza Júnior, F. G. d. (2016). Influence of PLGA and PLGA-PEG on the dissolution profile of oxaliplatin. *Polímeros*, 26(2), 137-143.
191. Prabha, S., Zhou, W.-Z., Panyam, J., and Labhasetwar, V. (2002). Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 244(1-2), 105-115.
192. Sun, F., Yu, C., Liu, X., Wang, D., Liu, N., Liu, J., Teng, L., and Li, Y. (2019). Butyl stearate prolongs the drug release period of isoperidone-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres: In vitro and in vivo investigation. *Molecular Medicine Reports*, 19(3), 1595-1602.
193. Jamali, Z., Khoobi, M., Hejazi, S. M., Eivazi, N., Abdolapour, S., Imanparast, F., Moradi-Sardareh, H., and Paknejad, M. (2018). Evaluation of targeted curcumin (CUR) loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on human glioblastoma cell line. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 23, 190-201.
194. Chereddy, K. K., Coco, R., Memvanga, P. B., Ucar, B., des Rieux, A., Vandermeulen, G., and Preat, V. (2013). Combined effect of PLGA and curcumin on wound healing activity. *Journal of Controlled Release*, 171(2), 208-215.
195. Cai, J., Miao, Y. Q., Yu, B. Z., Ma, P., Li, L., and Fan, H. M. (2017). Large-scale, facile transfer of oleic acid-stabilized iron oxide nanoparticles to the aqueous phase for biological applications. *Langmuir*, 33(7), 1662-1669.

196. Mukerjee, A., and Vishwanatha, J. K. (2009). Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer Research*, 29(10), 3867-3875.
197. Mathieu, V., De Neve, N., Le Mercier, M., Dewelle, J., Gaussin, J. F., Dehoux, M., Kiss, R., and Lefranc, F. (2008). Combining bevacizumab with temozolomide increases the antitumor efficacy of temozolomide in a human glioblastoma orthotopic xenograft model. *Neoplasia*, 10(12), 1383-1392.
198. Dervaux, T., Porro, C., Kunzelmann, C., Freyssinet, J.-M., and Martínez, M. (2006). Cyclic GMP modulates store-operated calcium entry inducing phosphatidylserine translocation at the surface of megakaryocytic cells. *Biochimie*, 88(9), 1175-1182.
199. Archana, M., Yogesh, T., and Kumaraswamy, K. (2013). Various methods available for detection of apoptotic cells-A review. *Indian Journal of Cancer*, 50(3), 274.
200. Songthaveesin, C., Sa-Nongdej, W., Limboonreung, T., and Chongthammakun, S. (2018). Combination of metformin and 9-cis retinoic acid increases apoptosis in C6 glioma stem-like cells. *Heliyon*, 4(5), e00638.
201. Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y., and Schenke-Layland, K. (2014). Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Scientific Reports*, 4, 4698.
202. Blumenthal, D. T., Gorlia, T., Gilbert, M. R., Kim, M. M., Burt Nabors, L., Mason, W. P., Hegi, M. E., Zhang, P., Golfopoulos, V., and Perry, J. R. (2017). Is more better? The impact of extended adjuvant temozolomide in newly diagnosed glioblastoma: a secondary analysis of EORTC and NRG Oncology/RTOG. *Neuro-Oncology*, 19(8), 1119-1126.
203. Onken, J., Staub-Bartelt, F., Vajkoczy, P., and Misch, M. (2018). Acceptance and compliance of TTFIELDS treatment among high grade glioma patients. *Journal of Neuro-Oncology*, 139(1), 177-184.
204. Norouzi, M., Amerian, M., Amerian, M., and Atyabi, F. (2020). Clinical applications of nanomedicine in cancer therapy. *Drug Discovery Today*, 25(1), 107-125.
205. Wang, F., Yin, C., Wei, X., Wang, Q., Cui, L., Wang, Y., Li, T., and Li, J. (2014). Synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles modified with oleic acid. *Integrated Ferroelectrics*, 153(1), 92-101.
206. Zhang, Q., Wang, C., Qiao, L., Yan, H., and Liu, K. (2009). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles coated with a folate-conjugated polymer. *Journal of Materials Chemistry*, 19(44), 8393-8402.
207. Soares, P. I., Alves, A. M., Pereira, L. C., Coutinho, J. T., Ferreira, I. M., Novo, C. M., and Borges, J. P. (2014). Effects of surfactants on the magnetic properties of iron oxide colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 419, 46-51.
208. Wulandari, I. O., Sulistyarti, H., Safitri, A., Santjojo, D. J. H., and Sabarudin, A. (2019). Development of synthesis method of magnetic nanoparticles modified by oleic

- acid and chitosan as a candidate for drug delivery agent. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 9(07), 001-011.
209. Jadhav, N. V., Prasad, A. I., Kumar, A., Mishra, R., Dhara, S., Babu, K. R., Prajapat, C. L., Misra, N. L., Ningthoujam, R. S., Pandey, B. N., and Vatsa, R. K. (2013). Synthesis of oleic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 108, 158-168.
 210. Mahdavi, M., Ahmad, M. B., Haron, M. J., Namvar, F., Nadi, B., Rahman, M. Z. A., and Amin, J. (2013). Synthesis, surface modification and characterisation of biocompatible magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Molecules*, 18(7), 7533-7548.
 211. Liu, X., Kaminski, M. D., Guan, Y., Chen, H., Liu, H., and Rosengart, A. J. (2006). Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. *Journal of magnetism and magnetic materials*, 306(2), 248-253.
 212. Jovanović, S., Spreitzer, M., Tramšek, M., Trontelj, Z., and Suvorov, D. (2014). Effect of oleic acid concentration on the physicochemical properties of cobalt ferrite nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 118(25), 13844-13856.
 213. Ghosh, R., Pradhan, L., Devi, Y. P., Meena, S., Tewari, R., Kumar, A., Sharma, S., Gajbhiye, N., Vatsa, R., and Pandey, B. N. (2011). Induction heating studies of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles capped with oleic acid and polyethylene glycol for hyperthermia. *Journal of Materials Chemistry*, 21(35), 13388-13398.
 214. Senturk, F., Çakmak, S., and Ozturk, G. G. Synthesis and Characterization of Oleic Acid Coated Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia Applications. *Natural and Applied Sciences Journal*, 2(2), 16-29.
 215. Mahajan, S., Koul, V., Choudhary, V., Shishodia, G., and Bharti, A. C. (2013). Preparation and in vitro evaluation of folate-receptor-targeted SPION-polymer micelle hybrids for MRI contrast enhancement in cancer imaging. *Nanotechnology*, 24(1), 015603.
 216. Unni, M., Uhl, A. M., Savliwala, S., Savitzky, B. H., Dhavalikar, R., Garraud, N., Arnold, D. P., Kourkoutis, L. F., Andrew, J. S., and Rinaldi, C. (2017). Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. *American Chemical Society Nano*, 11(2), 2284-2303.
 217. Wu, K., Su, D., Liu, J., Saha, R., and Wang, J.-P. (2019). Magnetic nanoparticles in nanomedicine: a review of recent advances. *Nanotechnology*, 30(50), 502003.
 218. Khurshid, H., Alonso, J., Nemati, Z., Phan, M. H., Mukherjee, P., Fdez-Gubieda, M. L., Barandiarán, J. M., and Srikanth, H. (2015). Anisotropy effects in magnetic hyperthermia: A comparison between spherical and cubic exchange-coupled FeO/Fe₃O₄ nanoparticles. *Journal of Applied Physics*, 117(17).
 219. Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Ostad, S. N., Atyabi, F., Seyedabadi, M., Malekshahi, M. R., Amini, M., and Dinarvand, R. (2008). Folate-receptor-targeted

- delivery of docetaxel nanoparticles prepared by PLGA-PEG-folate conjugate. *Journal of Drug Targeting*, 16(5), 415-423.
220. Faschee, H., Dinarvand, R., Ghavamzadeh, A., Esfandyari-Manesh, M., Moradian, H., Faghihi, S., and Ghaffari, S. H. (2016). Delivery of disulfiram into breast cancer cells using folate-receptor-targeted PLGA-PEG nanoparticles: in vitro and in vivo investigations. *J Nanobiotechnology*, 14, 32.
 221. Yadav, A. K., Agarwal, A., Rai, G., Mishra, P., Jain, S., Mishra, A. K., Agrawal, H., and Agrawal, G. P. (2010). Development and characterization of hyaluronic acid decorated PLGA nanoparticles for delivery of 5-fluorouracil. *Drug Delivery*, 17(8), 561-572.
 222. Dao, T. P. T., Nguyen, T. H., Ho, T. H., Nguyen, T. A., and Dang, M. C. (2014). A new formulation of curcumin using poly (lactic-co-glycolic acid)—polyethylene glycol diblock copolymer as carrier material. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 5(3), 035013.
 223. Gholami, A., Mousavi, S. M., Hashemi, S. A., Ghasemi, Y., Chiang, W.-H., and Parvin, N. (2020). Current trends in chemical modifications of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery in cancer chemotherapy. *Drug Metabolism Reviews*, 52(1), 205-224.
 224. Jain, A., Chasoo, G., Singh, S. K., Saxena, A. K., and Jain, S. K. (2011). Transferrin-appended PEGylated nanoparticles for temozolomide delivery to brain: in vitro characterisation. *Journal of Microencapsulation*, 28(1), 21-28.
 225. Mao, J., Meng, X., Zhao, C., Yang, Y., and Liu, G. (2019). Development of transferrin-modified poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for glioma therapy. *Anti-Cancer Drugs*, 30(6), 604-610.
 226. Ramalho, M. J., Sevin, E., Gosselet, F., Lima, J., Coelho, M. A. N., Loureiro, J. A., and Pereira, M. C. (2018). Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment. *International Journal of Pharmaceutics*, 545(1-2), 84-92.
 227. Food, U., and Administration, D. (2018). Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. Guidance for Industry. *Guidance for Industry*.
 228. Food, U., and Administration, D. (2017). Drug Products, Including Biological Products, That Contain Nanomaterials. In: Draft Guidance for Industry Federal Register.
 229. Sun, C., Yu, Y., Wang, L., Wu, B., Xia, L., Feng, F., Ling, Z., and Wang, S. (2016). Additive antiangiogenesis effect of ginsenoside Rg3 with low-dose metronomic temozolomide on rat glioma cells both in vivo and in vitro. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1), 1-12.
 230. Lam, T., Hetherington, J. W., Greenman, J., Little, S., and Maraveyas, A. (2007). Metronomic chemotherapy dosing-schedules with estramustine and temozolomide act synergistically with anti-VEGFR-2 antibody to cause inhibition of human umbilical venous endothelial cell growth. *Acta Oncologica*, 46(8), 1169-1177.

231. Costa Nunes, F., Silva, L. B., Winter, E., Silva, A. H., de Melo, L. J., Rode, M., Martins, M. A. P., Zanatta, N., Feitosa, S. C., Bonacorso, H. G., and Creczynski-Pasa, T. B. (2018). Tacrine derivatives stimulate human glioma SF295 cell death and alter important proteins related to disease development: An old drug for new targets. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1862(7), 1527-1536.
232. Huang, H., Jiang, R., Lian, Z., Zhang, W., Hu, Z., and Hu, D. (2019). miR-222/GAS5 is involved in DNA damage and cytotoxic effects induced by temozolomide in T98G cell line. *Journal of Applied Toxicology*, 39(5), 726-734.
233. Kim, S. S., Rait, A., Kim, E., DeMarco, J., Pirollo, K. F., and Chang, E. H. (2015). Encapsulation of temozolomide in a tumor-targeting nanocomplex enhances anti-cancer efficacy and reduces toxicity in a mouse model of glioblastoma. *Cancer Letters*, 369(1), 250-258.
234. Kanzawa, T., Germano, I. M., Kondo, Y., Ito, H., Kyo, S., and Kondo, S. (2003). Inhibition of telomerase activity in malignant glioma cells correlates with their sensitivity to temozolomide. *British Journal of Cancer*, 89(5), 922-929.
235. Munoz, J. L., Rodriguez-Cruz, V., Greco, S. J., Nagula, V., Scotto, K. W., and Rameshwar, P. (2014). Temozolomide induces the production of epidermal growth factor to regulate MDR1 expression in glioblastoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(10), 2399-2411.
236. Wu, K., and Wang, J.-P. (2017). Magnetic hyperthermia performance of magnetite nanoparticle assemblies under different driving fields. *AIP Advances*, 7(5).
237. Hardiansyah, A., Yang, M.-C., Liu, T.-Y., Kuo, C.-Y., Huang, L.-Y., and Chan, T.-Y. (2017). Hydrophobic drug-loaded PEGylated magnetic liposomes for drug-controlled release. *Nanoscale research letters*, 12(1), 1-11.
238. Purushothaman, B. K., Maheswari, P. U., and Begum, K. M. S. (2019). Magnetic assisted curcumin drug delivery using folate receptor targeted hybrid casein-calcium ferrite nanocarrier. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 509-520.
239. Dutta, B., Rawoot, Y. A., Checker, S., Shelar, S. B., Barick, K., Kumar, S., Somani, R. R., and Hassan, P. (2020). Micellar assisted aqueous stabilization of iron oxide nanoparticles for curcumin encapsulation and hyperthermia application. *Nano-Structures & Nano-Objects*, 22, 100466.
240. Jiang, K., Shen, M., and Xu, W. (2018). Arginine, glycine, aspartic acid peptide-modified paclitaxel and curcumin co-loaded liposome for the treatment of lung cancer: in vitro/vivo evaluation. *International journal of nanomedicine*, 13, 2561.
241. Orunoğlu, M., Kaffashi, A., Pehlivan, S. B., Şahin, S., Söylemezoğlu, F., Oğuz, K. K., and Mut, M. (2017). Effects of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the RG2 rat glioma model. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 32-38.
242. Doggui, S., Sahni, J. K., Arseneault, M., Dao, L., and Ramassamy, C. (2012). Neuronal uptake and neuroprotective effect of curcumin-loaded PLGA nanoparticles on the human SK-N-SH cell line. *Journal of Alzheimer's Disease*, 30(2), 377-392.

243. Busari, Z. A., Dauda, K. A., Morenikeji, O. A., Afolayan, F., Oyeyemi, O. T., Meena, J., Sahu, D., and Panda, A. K. (2017). Antiplasmodial activity and toxicological assessment of curcumin PLGA-encapsulated nanoparticles. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 622.
244. Duan, D., Wang, A., Ni, L., Zhang, L., Yan, X., Jiang, Y., Mu, H., Wu, Z., Sun, K., and Li, Y. (2018). Trastuzumab-and Fab' fragment-modified curcumin PEG-PLGA nanoparticles: preparation and evaluation in vitro and in vivo. *International journal of nanomedicine*, 13, 1831.
245. Zhao, L., Yang, C., Dou, J., Xi, Y., Lou, H., and Zhai, G. (2015). Development of RGD-functionalized PEG-PLA micelles for delivery of curcumin. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 11(3), 436-446.
246. Astinfeshan, M., Rasmi, Y., Kheradmand, F., Karimipour, M., Rahbarghazi, R., Aramwit, P., Nasirzadeh, M., Daeihassani, B., Shirpoor, A., Gholinejad, Z., and Saboory, E. (2019). Curcumin inhibits angiogenesis in endothelial cells using downregulation of the PI3K/Akt signaling pathway. *Food Bioscience*, 29, 86-93.
247. Gong, C., Deng, S., Wu, Q., Xiang, M., Wei, X., Li, L., Gao, X., Wang, B., Sun, L., and Chen, Y. (2013). Improving antiangiogenesis and anti-tumor activity of curcumin by biodegradable polymeric micelles. *Biomaterials*, 34(4), 1413-1432.
248. Fu, Z., Chen, X., Guan, S., Yan, Y., Lin, H., and Hua, Z.-C. (2015). Curcumin inhibits angiogenesis and improves defective hematopoiesis induced by tumor-derived VEGF in tumor model through modulating VEGF-VEGFR2 signaling pathway. *Oncotarget*, 6(23), 19469.
249. Langone, P., Debata, P. R., Inigo Jdel, R., Dolai, S., Mukherjee, S., Halat, P., Mastroianni, K., Curcio, G. M., Castellanos, M. R., Raja, K., and Banerjee, P. (2014). Coupling to a glioblastoma-directed antibody potentiates antitumor activity of curcumin. *International Journal of Cancer*, 135(3), 710-719.
250. Du, W. Z., Feng, Y., Wang, X. F., Piao, X. Y., Cui, Y. Q., Chen, L. C., Lei, X. H., Sun, X., Liu, X., Wang, H. B., Li, X. F., Yang, D. B., Sun, Y., Zhao, Z. F., Jiang, T., Li, Y. L., and Jiang, C. L. (2013). Curcumin suppresses malignant glioma cells growth and induces apoptosis by inhibition of SHH/GLI1 signaling pathway in vitro and vivo. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(12), 926-936.
251. Dilnawaz, F., and Sahoo, S. K. (2013). Enhanced accumulation of curcumin and temozolomide loaded magnetic nanoparticles executes profound cytotoxic effect in glioblastoma spheroid model. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 85(3 Pt A), 452-462.
252. Karmakar, S., Banik, N. L., Patel, S. J., and Ray, S. K. (2006). Curcumin activated both receptor-mediated and mitochondria-mediated proteolytic pathways for apoptosis in human glioblastoma T98G cells. *Neuroscience Letters*, 407(1), 53-58.
253. Quader, S., Liu, X., Chen, Y., Mi, P., Chida, T., Ishii, T., Miura, Y., Nishiyama, N., Cabral, H., and Kataoka, K. (2017). cRGD peptide-installed epirubicin-loaded

- polymeric micelles for effective targeted therapy against brain tumors. *Journal of Controlled Release*, 258, 56-66.
254. Li, C., Wang, W., Xi, Y., Wang, J., Chen, J. F., Yun, J., and Le, Y. (2016). Design, preparation and characterization of cyclic RGDfK peptide modified poly(ethylene glycol)-block-poly(lactic acid) micelle for targeted delivery. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 64, 303-309.
 255. Shaterabadi, Z., Nabiyouni, G., and Soleymani, M. (2018). Physics responsible for heating efficiency and self-controlled temperature rise of magnetic nanoparticles in magnetic hyperthermia therapy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 133, 9-19.
 256. Laurent, S., Dutz, S., Hafeli, U. O., and Mahmoudi, M. (2011). Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Advances in Colloid and Interface Science*, 166(1-2), 8-23.
 257. Mehdizadeh, M. (2015). Fundamentals of field applicators and probes at radiofrequencies and microwave frequencies. In *Microwave/RF Applicators and Probes* (10.1016/b978-0-323-32256-0.00002-6pp. 34-67).
 258. Mustafa, T., Zhang, Y., Watanabe, F., Karmakar, A., Asar, M. P., Little, R., Hudson, M. K., Xu, Y., and Biris, A. S. (2013). Iron oxide nanoparticle-based radio-frequency thermotherapy for human breast adenocarcinoma cancer cells. *Biomaterials Science*, 1(8), 870-880.
 259. Minaei, S. E., Khoei, S., Khoei, S., Vafashoar, F., and Mahabadi, V. P. (2019). In vitro anti-cancer efficacy of multi-functionalized magnetite nanoparticles combining alternating magnetic hyperthermia in glioblastoma cancer cells. *Materials Science & Engineering. C: Materials for Biological Applications*, 101, 575-587.
 260. Jia, G., Han, Y., An, Y., Ding, Y., He, C., Wang, X., and Tang, Q. (2018). NRP-1 targeted and cargo-loaded exosomes facilitate simultaneous imaging and therapy of glioma in vitro and in vivo. *Biomaterials*, 178, 302-316.
 261. Rejinold, N. S., Thomas, R. G., Muthiah, M., Lee, H. J., Jeong, Y. Y., Park, I. K., and Jayakumar, R. (2016). Breast Tumor Targetable Fe₃O₄ Embedded Thermo-Responsive Nanoparticles for Radiofrequency Assisted Drug Delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 12(1), 43-55.
 262. Abrahams, S., Haylett, W. L., Johnson, G., Carr, J. A., and Bardien, S. (2019). Antioxidant effects of curcumin in models of neurodegeneration, aging, oxidative and nitrosative stress: A review. *Neuroscience*, 406, 1-21.
 263. Jangra, A., Kwatra, M., Singh, T., Pant, R., Kushwah, P., Sharma, Y., Saroha, B., Datusalia, A. K., and Bezbaruah, B. K. (2016). Piperine augments the protective effect of curcumin against lipopolysaccharide-induced neurobehavioral and neurochemical deficits in mice. *Inflammation*, 39(3), 1025-1038.
 264. Yallapu, M. M., Gupta, B. K., Jaggi, M., and Chauhan, S. C. (2010). Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells. *Journal of Colloid and Interface Science*, 351(1), 19-29.

265. Platel, A., Carpentier, R., Becart, E., Mordacq, G., Betbeder, D., and Nessler, F. (2016). Influence of the surface charge of PLGA nanoparticles on their in vitro genotoxicity, cytotoxicity, ROS production and endocytosis. *Journal of Applied Toxicology*, 36(3), 434-444.
266. Hou, C. H., Lin, F. L., Hou, S. M., and Liu, J. F. (2014). Hyperthermia induces apoptosis through endoplasmic reticulum and reactive oxygen species in human osteosarcoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 17380-17395.
267. Palapati, P., and Averill-Bates, D. A. (2011). Mild thermotolerance induced at 40 C protects HeLa cells against activation of death receptor-mediated apoptosis by hydrogen peroxide. *Free Radical Biology and Medicine*, 50(6), 667-679.
268. Liu, B., Tan, X., Liang, J., Wu, S., Liu, J., Zhang, Q., and Zhu, R. (2014). A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*, 4, 7041.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı,adı : ŞENTÜRK, Fatih

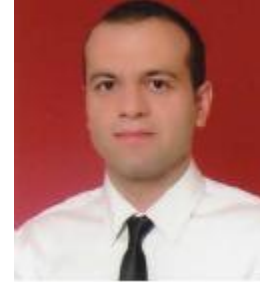
Uyruğu : T.C.

Doğum yeri : Ordu

Medeni hali : Evli

Telefon : 0536 655 4303

e-mail : senturkfatih52@gmail.com.tr



Eğitim Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyofizik Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Fizik	2012
Lisans	Gazi Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü	2010
Lise	Ordu Anadolul Lisesi	2004

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görevi
2014	Gazi Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik AD	Araştırma Görevlisi

Yayınlar

Senturk, F., Çakmak, S., and Ozturk, G. G. Synthesis and Characterization of Oleic Acid Coated Magnetic Nanoparticles for Hyperthermia Applications. *Natural and Applied Sciences Journal*, 2(2), 16-29.

Kuzay, D., Ozer, C., Goktas, T., Sirav, B., Senturk, F., Kaplanoglu, G., and Seymen, M. (2018). Effects of 2100 MHz radio frequency radiation on the viscosity of blood and oxidative stress parameters in hypertensive and normal rats. *International Journal of Radiation Research*, 16(4), 431-442.

Esmekaya, M., Senturk, F., Kayhan, H., Tuysuz, M., and Tomruk, A. (2016). Cytotoxicity of Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles with/without Microwave Radiation Exposure in RG2 Glioblastoma Cells. *J Nanomater Mol Nanotechnol* 5: 1. of, 5, 0-100.

Projeler

TÜBİTAK-118S027 (3001), "Peptit Kaplı ve Kemoterapötik İlaç Yüklü Süperparamanyetik Demiroksit Nanopartiküllerin (SPDON) Sentezi ve Glioblastoma Hücre Hatlarında Kullanılmak Üzere Hipertermi Maruziyet Sisteminin Geliştirilmesi", Hak sahibi (Doktora tezi), Yürürlükte, ARDEB, SBAG-Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu.

TÜBİTAK-119S137 (1002), "İn Vitro Kan Beyin Bariyeri (Kbb) Modelinde Polimer Kaplı Süperparamanyetik Demir-Oksit Nanopartiküllerin Manyetik Alan Maruziyeti Altında Kbb Geçirgenliğine Etkisinin İncelenmesi, Yürütücü, Yürürlükte, ARDEB, SBAG-Sağlık Bilimleri Araştırma Destek Grubu.

"2100 Mhz Radyo Frekans Radyasyonun Hipertansif Ve Normal Sıçanlarda Kan Viskozitesi Ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri", Yürütülen Kuruluş: Ahievran Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Fizyoloji Anabilim Dalı, Destek Alınan Kuruluş: Ahievran Üniversitesi (Yurt İçi), 01 Temmuz 2017.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..