



T.C.
NECMETTİN ERBAKAN
ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**NİR AKTİF İNDOSİYANİN YEŞİLİ
BOYASININ MANYETİK APOFERRİTİN
NANOKAFESLERİNE ENKAPSÜLASYONU
İLE ANTİKANSER AJANININ
HAZIRLANMASI**

Tuğba KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

**Temmuz-2024
KONYA
Her Hakkı Saklıdır**

TEZ KABUL VE ONAYI

Tuğba KILIÇ tarafından hazırlanan “NIR Aktif İndosiyenin Yeşili Boyasının Manyetik Apoferritin Nanokafeslerine Enkapsülasyonu ile Antikanser Ajanının Hazırlanması” adlı tez çalışması 30/07/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

Başkan

Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

.....

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

.....

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Suna BALKAN NALÇAYI

.....

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu’nun/.../20.. gün ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Havvanur UÇBEYİAY
FBE Müdürü

Bu tez çalışması Necmettin Erbakan Üniversitesi BAP Birimi tarafından 23YL15002 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

İmza

Tuğba KILIÇ

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

NIR AKTİF İNDOSİYANİN YEŞİLİ BOYASININ MANYETİK APOFERRİTİN NANOKAFESLERİNE ENKAPSÜLASYONU İLE ANTİKANSER AJANININ HAZIRLANMASI

Tuğba KILIÇ

Necmettin Erbakan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

2024, 82 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN
Dr. Öğr. Üyesi Ayşe Suna BALKAN NALÇAYI
Dr. Öğr. Üyesi Pembegül UYAR ARPACI

Nanoteknoloji, nanomalzemeler olarak adlandırılan çok küçük boyutlu parçacıkların sentezi de dahil olmak üzere, atomik ve moleküler düzeyde alet, malzeme ve cihazları üreten bilimsel bir teknolojidir. Nanoparçacıklar nanoteknolojinin en çarpıcı ürünüdür. Boyutları 1-100 nm arasındadır. Morfolojik olarak küresel, oval, kübik, prizma, sarmal/sütun, tozlar, süspansiyon veya kolloidler yapıda bulunabilirler. Fizik, kimya, biyoloji, enerji, elektronik, gıda, tarım, kozmetik ve sağlık başta olmak üzere çok geniş bir uygulama alanı vardır. Manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler), harici bir manyetik alanın etkisi ile manipüle edilebilen ve genellikle nikel, kobalt, demir ve bunların oksitlerinden oluşan nanoparçacıklardır. Demir atomu, orbitallerindeki eşleşmemiş dört elektron nedeniyle güçlü bir manyetik momente sahiptir. Bu nedenle nanoparçacık uygulamalarında sıklıkla tercih edilir. Düşük toksisiteleri, biyokimyasal aktiviteleri artıran yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları ve yüzey modifikasyonlarına olanak tanınması demir oksit nanoparçacıklarının pek çok alanda kullanımını arttırmıştır. Demire biyouyumluluk kazandırılması ile demir bazlı nanoparçacıklar araştırmacılar tarafından dikkatle çalışılmaktadır. Nanoparçacıklara biyouyumluluk kazandırmak amaçlı farklı yüzey kaplamaları ve yüzey fonksiyonelleştirmeleri yapılmaktadır. Tez çalışmasında birlikte çöktürme yöntemi ile demir oksit nanoparçacıklar sentezlenmiş ve UV/Vis Spektrofotometresi, Elektron Mikroskobu (STEM), Fourier-dönüşümlü kızılötesi (FT-IR), İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi (ICP-MS), X Işını Kırınımı Difraktometresi (XRD) ve Zeta Potansiyeli cihazları ile karakterizasyonlar yapılmıştır. Biyolojik uygulamalarda kullanılacak nanoparçacıkların biyouyumlu, fizyolojik ortamda kararlı ve çok fonksiyonlu ajanlar olması hedef bölgede etkinliğinin artırılması bakımından önemlidir. Bunun için NIR aktif ICG boyasının reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturarak kanserli hücelere tahribat vermesi ile manyetik demir oksit nanoparçacıklarının antikanser özelliğine sinerjik etki kazandırılması hedeflenmiştir. Ayrıca tez çalışması kapsamında sentezlenen demir oksit nanoparçacıklarla birlikte vücudun tanıdığı ve immün sistemde bir uyarı yaratmayacak doğal bir protein olan apoferritin ile sentezlenen demir oksit nanoparçacıkları ve ICG boyası sarılmıştır. Böylece nanoparçacıkların dolaşım sisteminde optimum sürede kalabilmesini sağlayarak nanoparçacıkların antikanser etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir. Bunun yanı sıra, apoferritin yüzeyinde halihazırda bulunan fonksiyonel grupları sayesinde yüzey fonksiyonelleştirmesine olanak sağlayarak, yüzeye ya da alt birimler arasında ICG boyasının bağlanmasını kolaylaştıracağı düşünülmektedir. Nanoparçacıkların *in vitro* değerlendirilmesinde, akciğer kanser; A549 ve fibroblast; L929 hücre hatları kullanılmıştır. Sitotoksitesite çalışmaları iki hücre hattında lazer uygulamalı ve lazer uygulamalı olarak yapılmıştır. Sonuçlar, lazer uygulamasının her iki hücre tipinde de hücre canlılığını düşürdüğünü

göstermiştir. Demir oksit nanoparçacıklarının antikanser etkisinin, ICG moleküllerinin ışınlama ile aktive edilmesiyle arttığı görülmüştür. L929 hücrelerinde, A549 hücrelerine göre daha düşük de olsa gözlemlenen hücre canlılığındaki düşmenin de tasarlanan manyetik nanoparçacıklarının potansiyel manyetik yönlendirme kapasitesi ile hedefe taşınarak azaltılabileceği düşünülmüştür ve bu sayede sağlıklı hücrelerdeki toksisitenin azaltılabileceği düşünülmektedir. Nanoparçacıkların hücre içi alım çalışmalarında ise; nanoparçacıkların hücre ile etkileşiminin hücre içine alım ve hücre çeperine bağlanma yoluyla olduğu, hücre ile muamele edilen nanoparçacıkların Prusya mavisi boyaması ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antikanser, Apoferritin, Demir Oksit Nanoparçacık, İndosiyenin Yeşili

ABSTRACT

MS THESIS

PREPARATION OF AN ANTICANCER AGENT BY ENCAPSULATION OF NIR ACTIVE INDOCYANINE GREEN DYE WITHIN MAGNETIC APOFERRITINE NANOCAGES

Tuğba KILIÇ

**THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF
NECMETTİN ERBAKAN UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN MECHANICAL ENGINEERING**

Advisor: Asst.Prof.Dr. Tuğba Nur ASLAN

2024, 82 Pages

Jury

Asst.Prof.Dr. Tuğba Nur ASLAN

Asst.Prof.Dr. Ayşe Suna BALKAN NALÇAIYI

Asst.Prof.Dr. Pembegül UYAR ARPACI

Nanotechnology is a scientific technology that produces tools, materials and devices at the atomic and molecular level, including the synthesis of very small size particles called nanomaterials. Nanoparticles are the most striking product of nanotechnology. Their sizes range from 1 to 100 nm. Morphologically, they can be found in spherical, oval, cubic, prism, spiral/column, powder, suspension or colloid structures. It has a wide range of applications, especially in physics, chemistry, biology, energy, electronics, food, agriculture, cosmetics and health. Magnetic nanoparticles (MNPs) are nanoparticles that can be manipulated by the influence of an external magnetic field and are generally composed of nickel, cobalt, iron and their oxides. The iron atom has a strong magnetic moment due to the four unpaired electrons in its 3D orbitals. For this reason, it is frequently preferred in nanoparticle applications. Their low toxicity, high surface/volume ratio that increases biochemical activities, and the possibility of surface modifications have increased the use of iron oxide nanoparticles in many areas. Since iron is a material with proven biocompatibility, iron-based nanoparticles are carefully studied by researchers. Different surface coatings and surface functionalizations are made to provide biocompatibility to nanoparticles. In the thesis study, iron oxide nanoparticles were synthesized by co-precipitation method and characterized using UV/Vis Spectrophotometry, Scanning Electron Microscopy (STEM), Fourier-transform Infrared Spectrometry (FT-IR), Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS), X-Ray Diffractometer and Zeta Potential devices. It is important that the nanoparticles to be used in biological applications should be biocompatible and stable in the physiological environment and multifunction property to increase their effectiveness in the target area. For this purpose, it is aimed to provide a synergistic effect of ICG dye on the anticancer properties of magnetic iron oxide nanoparticles by damaging cancer cells by creating reactive oxygen species (ROS). In addition, iron oxide nanoparticles synthesized within the scope of the thesis study and ICG dye were capped by apoferritin, a natural protein that the body recognizes and will not cause stimulation in the immune system. Thus, it is aimed to increase the anticancer effectiveness of nanoparticles by ensuring that the nanoparticles remain in the circulatory system for an optimum period of time. In addition, it is thought that it will facilitate the binding of ICG dye to the surface or between subunits by allowing surface functionalization thanks to the functional groups already present on the surface of apoferritin. In the in vitro evaluation of nanoparticles, lung cancer; A549 and fibroblast; L929 cell lines were used. Cytotoxicity studies were conducted in two cell lines with and without laser application. The results showed that laser application reduced cell viability in both cell types. It has been observed that the anticancer effect of iron oxide nanoparticles is enhanced by the activation of ICG molecules by irradiation.

It is thought that the decrease in cell viability observed in L929 cells, although lower than in A549 cells, can be reduced by transporting the designed magnetic nanoparticles to the target with their potential magnetic guidance capacity, and thus the toxicity in healthy cells will be able to reduced. In intracellular uptake studies of nanoparticles; It has also been shown by Prussian blue staining of the nanoparticle treated cells that the interaction of nanoparticles is through cell uptake and binding to the cell wall.

Keywords: Anticancer, Apoferritin, Indocyanine Green, Iron Oxide Nanoparticle

ÖNSÖZ

Akademisyenlik hayatıma ilk adımlarımı attığım Yüksek Lisans eğitimim boyunca tez çalışmamda her türlü bilgi ve tecrübesini sınırsız bir şekilde paylaşan, her zorlukta desteğini çokça hissettiğim çok değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN' a; tez çalışmalarına katkılarından dolayı Öğr. Gör. Fuat ASLAN'a; tez projemi destekleyerek maddi imkânı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmasındaki sentez çalışmalarında her türlü bilgisini benimle paylaşan sevgili arkadaşım Uzm. Moleküler Biyolog Kübra SEYHAN'a; hem deneysel çalışmalarında yanımda olup bana yardım eden, hem de manevi anlamda desteğini bir an olsun esirgemeyen, her daim motive eden ve zor anlarımda yanımda olan biricik arkadaşım Uzm. Biyolog Ümran ATA'ya ve Necmettin Erbakan Üniversitesi, Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitimimde BİDEB tarafından sağlanan 2210-A Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu ile maddi destek olan Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

En özel teşekkürlerimi ise; bana her daim destek olan, sevgilerini hep hissettiğim ailem; canım annem Eşe KILIÇ'a, sevgili babam Sadık KILIÇ'a, canım kardeşlerim; abim Metehan KILIÇ'a, ablam Öğr. Gör. Hacer DUYGU'ya, kardeşim Ahmet Bilgehan KILIÇ'a ve her daim neşesiyle yüzümü güldüren biricik yeğenim Gökçe KILIÇ'a sunarım.

Tuğba KILIÇ
KONYA-2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT.....	iv
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xi
TABLOLAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	3
2.1. Nanoparçacıklar	3
2.1.1. Nanoparçacık Sentezi	4
2.1.1.1. Fiziksel yöntem.....	5
2.1.1.2. Kimyasal Yöntem	6
2.1.1.3. Biyolojik Yöntem	6
2.1.2. Manyetik Nanoparçacıklar ve Manyetizma.....	7
2.1.2.1. Manyetizma	7
2.1.2.1.1. Paramanyetizma.....	9
2.1.2.1.2. Süperparamanyetizma.....	9
2.1.2.1.3. Ferromanyetizma	10
2.1.2.1.4. Ferrimanyetizma	11
2.1.2.1.5. Diyamanyetizma	11
2.1.3. Demir Oksit Nanoparçacıklar	12
2.1.3.1. Demir Oksit Nanoparçacıkların Biyomedikal Uygulama Alanları.....	16
2.1.3.2. Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentez Yöntemleri	19
2.1.3.2.1. Sol-Jel Yöntemi	19
2.1.3.2.2. Mikroemülsiyon Yöntemi.....	20
2.1.3.2.3. Termal Parçalanma Yöntemi	21
2.1.3.2.4. Hidrotermal Sentez Yöntemi	22
2.1.3.2.5. Birlikte Çöktürme Yöntemi	22
2.1.3.3. Demir Oksit Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	24
2.2. İndosiyanın yeşili (ICG)	26

2.3. Apoferritin Protein Kafesi	28
2.4. Kanser	30
2.4.1. Kanserde Tedavi Yaklaşımları.....	33
2.4.2. Akciğer Kanseri	35
2.4.2.1. Akciğer Kanseri Hücre Hattı	35
2.4.3. Sitotoksosite.....	35
2.4.3.1. MTT Hücre Canlılık Testi	36
2.4.3.2. Hücre İçine Alımın Görüntülenmesi Prusya Mavisi Boyama	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM	38
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	38
3.2. Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentezi	39
3.3. Demir Oksit Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	41
3.4. Demir Oksit Nanoparçacıkların ve ICG Molekülünün Birlikte Apoferritin Kafesine Enkapsülasyonu	42
3.4.1. İndosiyenin Yeşili Stabilite Çalışmaları	43
3.4.2. ICG Salınımı Deneyi	43
3.5. Hücre Kültürü	44
3.5.1. Sitotoksosite Deneyleri.....	44
3.5.2. Hücre İçine Alınan Demir Oksit Nanoparçacıkların Görüntülenmesi.....	46
3.6. İstatistik Analizler.....	47
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....	48
4.1. Nanoparçacık Oluşumunun UV-Vis Spektroskopisi ile Takip Edilmesi.....	48
4.2. Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	48
4.2.1. FT-IR Spektroskopik Analizi	48
4.2.2. XRD Analizi	50
4.2.3. STEM Analizi	51
4.2.4. VSM Analizi	51
4.2.5. Zeta Potansiyeli Analizi.....	52
4.3. Enkapsülasyon Reaksiyonunun Optimizasyonu.....	53
4.3.1. İndosiyenin Yeşili Stabilite Çalışmaları	55
4.3.1.1. Nanoparçacık stabilitesi.....	55
4.3.1.2. Işık Stabilitesi	56
4.3.2. ICG Salınımı Deneyi	58
4.4. Hücre Çalışmaları	59
4.4.1. Sitotoksosite Analizleri.....	59
4.4.2. Hücre İçine Alınan Demir Oksit Nanoparçacıkların Görüntülenmesi.....	69
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	72
5.1. Sonuçlar	72
5.2. Öneriler	73
6. KAYNAKLAR	74

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm : Nanometre

°C : Santigrat

rpm : Dakikada Devir Sayısı

µl : Mikrolitre

mL: Mililitre

L: Litre

χ :Manyetik Duyarlılık

M: Malzemenin Miknatıslanması

H: Manyetik Alan Kuvveti

A: Amper

T_C : Curie Sıcaklığı

T_N : Néel Sıcaklığı

Ms: Manyetizasyon Eğrisi

mg : Miligram

g : Gram

m: metre

T : Tesla

pH : Potansiyel Hidrojen Değeri

ζ : Zeta Potansiyeli

K : Kelvin

dk : Dakika

OD : Optik Dansite

Ppm: Milyonda Bir

Kısaltmalar

DNA: Deoksiribonükleik Asit

NP: Nanoparçacık

CNT: Karbon Bazlı Nanotüp

AgNP: Gümüş Nanoparçacık

MNP: Manyetik Nanoparçacık

SPIO: Süperparamanyetik Demir Oksit

USPIO: Ultra Süperparamanyetik Demir Oksit

MRI: Manyetik Rezonans Görüntüleme

SPIONP: Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacık

MagF-ICG: ICG Yüklü Magnetoferritin

SEM: Taramalı Elektron Mikroskopi

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskopi

XRD: X- Işını Kırınımı

FTIR: Fourier-Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

ICP-MS: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi

UV-VİS: Ultraviyole-Görünür

VSM: Titreşimli Örnek Manyetometrisi

ICG: İndosiyanın Yeşili

FDA: Gıda ve İlaç İdaresi

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

NIR: Yakın Kızılötesi Işın

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

MTT: 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür

A549: Akciğer Kanseri Hücre Hattı

L929: Fare Fibroblast Hücre Hattı

TMAOH: Tetramethylammonium Hydroxide

PBS: Fosfat Buffer Saline Solusyonu

FBS: Fetal Bovine Serum

DMEM: Dulbecco' Modified Eagle's Medium

ATCC: Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu

DMSO: Dimetil Sülfoksit

BİTAM: Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Farklı bilim dallarında nanobilim ve nanoteknolojideki ilerleme	2
Şekil 2. NP'lerin uygulama alanları	4
Şekil 3. Harici bir manyetik alanın uygulanması altında çeşitli malzemelerin mıknatıslanma işareti	8
Şekil 4. Farklı malzeme türlerinde bireysel atomik manyetik momentlerin hizalanması	11
Şekil 5. Demir oksitlerin kullanım alanları	12
Şekil 6. Farklı demir oksit formların şekilsel gösterimi. a) Manyetit b) Wüstite c) Hematit d) Maghemit.....	13
Şekil 7. Kübik spinel kristal yapısı.....	15
Şekil 8. SPION'ların sağıktaki uygulama alanları	17
Şekil 9. Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin w/o mikroemülsiyon sistemi ile sentezi.....	21
Şekil 10. Birlikte çöktürme yöntemi ile demir oksit nanoparçacıkların sentezi.....	23
Şekil 11. İndosiyanın yeşili	27
Şekil 12. Apoferritin proteininin kafes yapısı	29
Şekil 13. Apoferritin proteininin farklı pH'larda açılıp kapanması	30
Şekil 14. Kanser gelişimi.....	32
Şekil 15. Kanser ayırt edici özellikleri	33
Şekil 16. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi.....	36
Şekil 17. a. Demir (III) klorür heksahidrat ve demir (II) klorür tetrahidrat çözelti karışımı b. Sentezlenen demir oksit nanoparçacık süspansiyonu	40
Şekil 18. Nanoparçacıkların yıkama ile saflaştırılması	41
Şekil 19. MagF-ICG nanoparçacıklarının diyalizi.	44
Şekil 20. Hepa filtreli inkübatörde nanoparçacık muamele edilmiş hücre hatlarına lazer ışını uygulaması	46
Şekil 21. Demir oksit nanoparçacıklarının UV-Vis absorpsiyon spektrumu.	48

Şekil 22. Tetrametil amonyum hidroksit ile stabilize edilmiş demir oksit nanoparçacık yüzeyi.....	49
Şekil 23. TMAOH ile stabilize edilmiş demir oksit nanoparçacıklarının FTIR spektrumu.	49
Şekil 24. Demir oksit nanoparçacıklarının XRD deseni.....	50
Şekil 25. MagF-ICG nanoparçacık örneğine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (STEM); 100 nm.	51
Şekil 26. MagF-ICG nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M–H) döngüsü.	52
Şekil 27. MagF-ICG nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.	53
Şekil 28. 3 farklı derişimde (2, 2,5, 3 mg/mL) apoferritin kullanıldığı enkapsülasyon reaksiyonundan elde edilen absorbands spektrumları.	54
Şekil 29. MagF, ICG ve MagF-ICG örneklerine ait absorbands spektrumları.....	55
Şekil 30. Farklı pH ortamlarındaki ICG molekülünün absorbands spektrumları.....	56
Şekil 31. ICG molekülünün ışığa maruz kalma süresi boyunca absorbands spektrumu..	57
Şekil 32. MagF-ICG molekülünün ışığa maruz kalma süresi boyunca absorbands spektrumu.	57
Şekil 33. Serbest halde ICG boyasının ve enkapsüle edilmiş ICG boyasının (MagF-ICG) ışık maruziyetine karşı kararlılıklarının karşılaştırılması.	58
Şekil 34. MagF-ICG nanoparçacığının 72 saat boyunca pH=7,4 ve pH=5,0 ortamına karşı diyalizi ile açığa çıkan ICG molekülünün kümülatif yüzdesi.....	58
Şekil 35. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (24. saat).	60
Şekil 36. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (48. saat).	60
Şekil 37. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (24. Saat, lazer uygulaması yapılmış).	60
Şekil 38. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (48. Saat, lazer uygulaması yapılmış)	60
Şekil 39. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (24. saat).	61
Şekil 40. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (48. saat).	61
Şekil 41. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (24. Saat, lazer uygulaması yapılmış).	61
Şekil 42. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (48. Saat, lazer uygulaması yapılmış)	61

Şekil 43. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacıkları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3).....	62
Şekil 44. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacık ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3).....	62
Şekil 45. 221,2 ppm Fe derişimindeki MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş A549 ve L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)	63
Şekil 46. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)	64
Şekil 47. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacık ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği.....	64
Şekil 48. 221,2 ppm Fe derişimindeki MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış A549 ve L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3).....	65
Şekil 49. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)	66
Şekil 50. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3).....	67
Şekil 51. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış L929 ve A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)	68
Şekil 52. L929 hücre hattında hücre içine alınan MagF-ICG nanoparçacıkların Prusya Mavisi ve Nuclear Fast Red boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.	70
Şekil 53. A549 hücre hattında hücre içine alınan MagF-ICG nanoparçacıkların Prusya Mavisi ve Nuclear Fast Red boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.	70

TABLÖLAR DİZİNİ

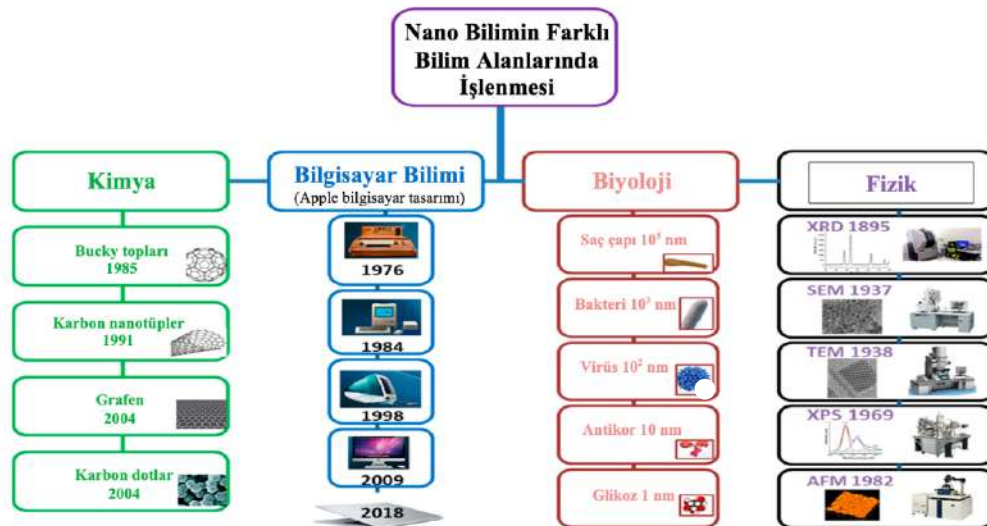
Tablo 1. Bilinen farklı demir oksit formları	14
Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.	38
Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.	39

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nanomalzemeler olarak adlandırılan çok küçük boyutlu parçacıkların sentezi de dahil olmak üzere, atomik ve moleküler düzeyde alet, malzeme ve cihazları üreten bilimsel bir teknolojidir (Fazal-Ur-Rehman, 2018). Nanoteknoloji kelimesindeki 'nano' ön eki milyarda bir anlamına gelmekte (1×10^{-9}) ve metrenin milyarda biri kadar boyutlardaki maddenin çeşitli yapılarıyla ilgilenmektedir (Poole & Frank Owens, 2003). Çevreyi ve insanlığı korumaya yönelik teknolojilerde önemli gelişmeler vaadeden bu bilimsel teknoloji alanı; pazarlanabilir uygulamaları hızla artan, araştırmacılar için nispeten yeni bir alan olarak kabul edilen nano ölçekteki malzemeleri kullanmaktadır (Mohammed, 2019).

Fizik ve elektrik mühendisliğinde nanobilim çoğunlukla kuantum davranışıyla ve elektron ve fotonların nano ölçekli yapılardaki davranışlarıyla ilişkilendirilir. Biyoloji ve biyokimya da ise hücre bileşenleri; DNA ve virüslerden hücre altı organellere ve hücreler arasındaki iyon kanallarına kadar biyolojideki en ilginç yapıların çoğu nano yapılar olarak düşünülebilir. Golgi aygıtı, ribozomlar, histon proteinleri ve kromatin, mitokondrinin iç yapısı, fotosentetik reaksiyon merkezi ve hücrenin enerji sağlayıcısı ATP'azlar, bilim insanlarının yeni anlamaya başladığı ve üzerine daha fazla araştırma gerektiren birer nano yapıdır. Kimyanın nanoteknolojideki konumuna bakacak olursak lider bir rol üstlendiği söylenebilir. Bu anlamda kimyagerler atomları ve atom gruplarını derişim, sıcaklık, pH, zaman gibi farklı koşullarda birleştirerek maddenin yeni formlarını oluştururlar. Nanoteknolojide ilk olarak nanoelektronığe odaklanılmış olsa da nanobilimden ortaya çıkan ilk ve potansiyel ticari teknolojiler malzeme bilimidir ve malzemeler çoğunlukla kimya biliminin ürünleridir (Whitesides, 2005).

Fizik, kimya, biyoloji ve mühendislik gibi alanları da kapsayarak multidisipliner bir bilimsel teknoloji üreten nanoteknoloji, maddeyi atomik ve moleküler düzeyde kontrol etmeyi amaçlamaktadır (Kargozar & Mozafari, 2018). Bu bağlamda nanoteknoloji stratejilerini ilerletmek için nanoçubuklar, nanoteller, nanotüpler, nanokemerler, nanoribbonlar, nanolifler, nanoparçacıklar, kuantum noktaları ve içi boş küreler dahil olmak üzere çeşitli nano boyutlu yapılar geliştirilmiştir. Zamanla enerji, elektronik, gıda ve tarım, kozmetik ve sağlık gibi farklı alanlarda da çeşitli uygulamalar yapılmıştır. Dünyanın dört bir yanındaki insanlar her gün nanoteknoloji ürünü cihaz ve sistemleri kullanmaktadır (Şekil 1).



Şekil 1. Farklı bilim dallarında nanobilim ve nanoteknolojideki ilerleme (Bayda et al., 2020)

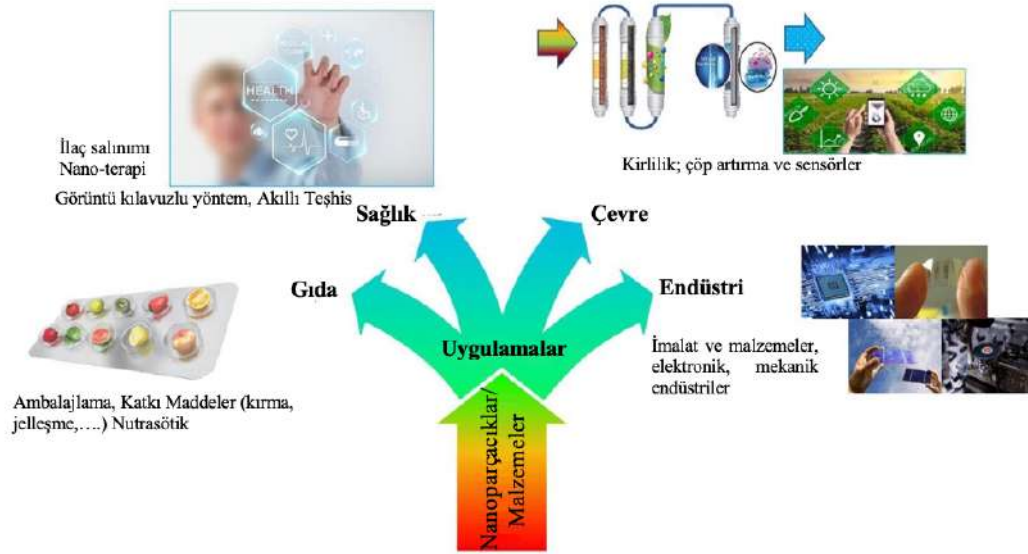
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1. Nanoparçacıklar

Nanoparçacıklar (NP), boyutları 1-100 nm arasında değişen nesnelere olarak tanımlanır ve boyutları nedeniyle bulk malzemelerden farklı yapılardır (Hasan, 2015). Nanoteknolojinin hızlı gelişiminin bir sonucu olarak ön plana çıkmıştır (Ali et al., 2016). Nano boyuttaki yapıları sayesinde kendilerine has fiziksel, kimyasal, elektronik, manyetik, termal, optik ve biyolojik özellikler sergilemektedirler (Sharif Mughal & Mona Hassan, 2022).

Nanoparçacıklar organik, inorganik ve karbon bazlı olarak üç grupta sınıflandırılır. Organik nanoparçacıklara lipozomlar, dendrimerler ve miseller örnek olarak verilebilir. Bu nanoparçacıklar toksik olmadıkları için yaygın olarak biyomedikalde hedeflendirilmiş ilaç dağılımında kullanılır (Varma et al., 2021). İnorganik nanoparçacıklar, karbondan yapılmayan parçacıklardır. Metal ve metal oksit bazlı nanoparçacıklar inorganik nanoparçacıklar olarak sınıflandırılır. Neredeyse tüm metaller kendi nanoparçacıklarına sentezlenebilir. Sentezde yaygın olarak kullanılan metaller ise altın, demir, alüminyum, kadmiyum, kobalt, bakır, kurşun, gümüş ve çinkodur. Bu nanoparçacıklar küçük molekülleri adsorbe etme yeteneğine ve yüksek yüzey enerjisine sahiptir. Biyomoleküllerin tespiti ve görüntülenmesinde, çevresel ve biyoanalitik uygulamalarda kullanımları mevcuttur (Şekil 2). Karbon bazlı nanoparçacıklar, karbon nanotüpler (CNT) ve fullerenler olmak üzere iki ana malzeme içerir. CNT'ler, bir tüpe sarılmış grafen tabakalarıdır. Fullerenler, altmış veya daha fazla karbon atomundan oluşan içi boş bir kafes yapısına sahip karbon allotroplarıdır.

Nanoparçacıkları bir diğer sınıflandırma yöntemi morfolojilerinden ileri gelmektedir. Düzlük, küresellik, yüksek ve düşük en/boy oranları nanoparçacıkları sınıflandırmada kullanılan morfolojik kriterlerdir (Sharif Mughal & Mona Hassan, 2022). Spiraller, zikzaklar, kayışlar gibi şekiller içeren nanotüpler ve nanoteller yüksek en/boy oranlı nanoparçacık örnekleridir. Öte yandan, küresel, oval, kübik, prizma, sarmal, sütun, tozlar, süspansiyon veya kolloidler halinde bulunan nanoparçacıklar, küçük en/boy oranı morfolojisi altında sınıflandırılır.



Şekil 2. NP'lerin uygulama alanları (Ettadili et al., 2022).

2.1.1. Nanoparçacık Sentezi

NP'lerin sentezinde yukarıdan-aşağıya ve aşağıdan-yukarıya olarak tanımlanan iki yaklaşım bulunmaktadır (Mustapha et al., 2022). Bu yaklaşımlardan ilki olan yukarıdan-aşağıya yaklaşımı yıkıcı bir yöntemdir. NP sentezi için daha büyük boyuttaki molekülleri parçalayarak daha küçük boyuttaki moleküllerin NP'lere dönüşümünü hedefler. Bu yöntemin en önemli avantajı nanoparçacıkların boyut dağılımının ve morfolojilerinin kontrol edilebilmesidir. Fotolitografi, elektron ışını litografisi, öğütme teknikleri, anodizasyon, iyon ve plazma dağılama yukarıdan-aşağıya yöntemlerine örnek olarak verilebilir (Dhand et al., 2015). İkinci yaklaşım olan aşağıdan-yukarıya yaklaşımı ise yukarıdan-aşağıya yaklaşımının tam tersidir (Mustapha et al., 2022). Atom ve/veya molekülleri bir araya getirerek NP'leri sentezlemeyi hedefler. Bu yaklaşım yapıcı bir yöntemdir. Sol-jel işlemi, lazer pirolizi, aerosol işlemi, kimyasal buhar biriktirme ve biyolojik ajanlar destekli sentez aşağıdan-yukarıya yöntemine örnektir.

Nanoparçacıkların sentezi genel olarak fiziksel, kimyasal ve biyolojik yöntemler olarak üç gruba ayırmak mümkündür (Dhand et al., 2015). Fiziksel yöntemler yukarıdan-aşağıya yaklaşımını benimserken; kimyasal ve biyolojik yöntemler aşağıdan-yukarıya yaklaşımını benimser (Niculescu et al., 2022).

2.1.1.1. Fiziksel yöntem

Fiziksel yöntemler, basit olduklarından nanoparçacıkların büyük ölçekte üretimi için en çok tercih edilen yöntemlerdir (Niculescu et al., 2022). Mekanik basınç, yüksek enerji radyasyonları, termal enerji ya da elektrik enerjisi kullanır ve malzemelerde aşınma, erime, buharlaşma veya yoğunlaşmaya neden olarak NP üretir (Dhand et al., 2015). Esas olarak yukarıdan-aşağıya stratejiyle çalışır ve solvent kontaminasyonu içermezler, tekdüze tek dağılımlı NP'ler üretmek için avantaj sunarlar.

Öğütme Yöntemleri; İlk olarak 1970 yılında John Benjamin tarafından yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklı oksit dağılımıyla güçlendirilmiş alaşımları sentezlemek için geliştirilen yüksek enerjili bilyeli öğütme, çeşitli şekil ve boyutlara sahip NP'ler üretmek için sağlam ve enerji açısından verimli bir sentez yöntemidir (Dhand et al., 2015). Malzemelerin mikro ya da nano yapılara doğrudan parçalanmasını içerdiğinden, öğütme yukarıdan-aşağıya stratejisinin bir parçasıdır (Habibullah et al., 2021). Bilyelerin kinetik enerjisi malzemeye aktarılır ve böylece kimyasal bağların kırılması sağlanarak malzemeler daha küçük parçacıklara ayrılır. Değirmen türü, öğütme atmosferi, öğütme ortamı, yoğunluk, zaman ve sıcaklık gibi parametreler, NP'lerin şekil ve boyutunun kontrolünde çok önemli bir rol oynar.

Püskürtme; inert gaz iyon demetleri gibi enerjik parçacıklarla bombardıman yoluyla dökme malzemenin yüzeyinden atomları fırlatma prensibiyle çalışan en yaygın sentez protokollerinden biridir (Varma et al., 2021). Bu yöntem aynı zamanda fiziksel buhar biriktirme yöntemi olarak da adlandırılır (Habibullah et al., 2021). Elektron ışını litografisinden daha ucuzdur ve hedef malzeme ile aynı bileşime sahip nanoparçacıkların elde edilmesini sağlar (Niculescu et al., 2022). Tabakanın kalınlığı, tavlama sıcaklığı ve süresi, alt tabaka tipi ve kullanılan gazın doğası; nanopartiküllerin şeklini, boyutunu, yüzey morfolojisini, dokusunu ve optik özelliklerini belirler.

Lazer ablasyon; yönteminde parçacık boyutunu nano seviyeye indirgemek için lazer ışınması kullanılır (Jamkhande et al., 2019). Katı hedef malzeme ince bir tabakanın altına yerleştirilir ve ardından darbeli lazer ışınına maruz bırakılır. Bu işlem NP'leri oluşturmak için buharlaşma veya süblimasyonla sonuçlanır. Diğer geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında lazer ablasyonu, parçacıkların faz bileşiminin, boyutunun ve şeklinin seçici kontrolüne izin verir (Habibullah et al., 2021).

2.1.1.2. Kimyasal Yöntem

Kimyasal sentez yöntemleri, metal NP'lerin kendi metalik tuzlarından sulu çözelti veya organik çözücü içinde kolloidal bir dispersiyon halinde sentezlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lee & Jun, 2019). Altın, gümüş, demir, çinko oksit, bakır, paladyum, platin ve diğer metaller kullanılarak bu yöntem ile NP'ler sentezlenmektedir. Sol-jel yöntemi, mikroemülsiyon tekniği, hidrotermal sentez, kimyasal buhar sentezi ve plazma destekli kimyasal buhar biriktirme tekniği, NP sentezinde yaygın olarak kullanılan kimyasal yöntemlerdendir (Dhand et al., 2015).

2.1.1.3. Biyolojik Yöntem

Biyolojik ya da yeşil sentez yöntemi kullanılarak nanoparçacıkların hazırlanması, son zamanlarda nanoteknolojinin yükselen bir trendidir (Jamkhande et al., 2019). Bu sentez yöntemi, fiziksel ve kimyasal yöntemlerdeki komplikasyonları, yüksek maliyeti ve güvenlik sorunlarını gidermek için alternatif bir yol olarak ortaya çıkmıştır (Niculescu et al., 2022). Biyolojik yöntem, kimyasal ve fiziksel yöntemlerle karşılaştırıldığında araştırmacılara kısa sürede sentez, kolay kullanım, nontoksiklik ve kolay bulunabilirlik gibi ek avantajlar sağlar (Ettadili et al., 2022).

Biyolojik yöntemlerle nanoparçacık üretimi farklı mikroorganizma ve enzimlerinin, izolatlar ve özler gibi bitki ürünlerinin kullanımını içerir (Jamkhande et al., 2019). Bu yöntem ile öncül maddelerden atomların yeşil substratlarda nanoparçacıklara sentezlenmesi sağlanır (Niculescu et al., 2022). Biyolojik substrata bağlı olarak bakteri bazlı ve bitki bazlı sentez yöntemleri vardır. Bakteri ve mantar gibi mikroorganizmaların metal iyonlarını indirgeyerek toksik maddelerin giderilmesinde hayati bir rol oynadığı bilinir (Lee & Jun, 2019). Örnek olarak pek çok bakteri, hücre içi bileşenlerin hem indirgeyici hem de stabilize edici özelliğinden dolayı AgNP'lerini hücre içinde sentezler. Bakterileri reaksiyon ajanı olarak kullanmanın avantajı ise, hızlı çoğalmaları, yetiştirme ve manipülasyon kolaylığıdır (Niculescu et al., 2022). Bitki bazlı sentez de kısa sürede nanoparçacık üretmek için en etkili yöntem olarak kabul edilir. Sentezde kallus, yaprak, meyve ve tohum özleri gibi her türlü bitki kısımları kullanılabilir. Biyoaktif alkaloidler, fenolik asitler, polifenoller, proteinler, şekerler ve terpenoidler içeren bitki ekstraktları, metalik iyonları indirgememenin ardından stabilize ettiği için nanoparçacık sentezinde başka hiçbir sürfaktan veya kaplama maddesi gerekmez (Ettadili et al., 2022). Bitki fitokimyasalları daha fazla stabilizasyon ve redüksiyon gösterdiğinden yeşil sentezde mikroorganizmalara göre kullanımı daha yaygındır.

2.1.2. Manyetik Nanoparçacıklar ve Manyetizma

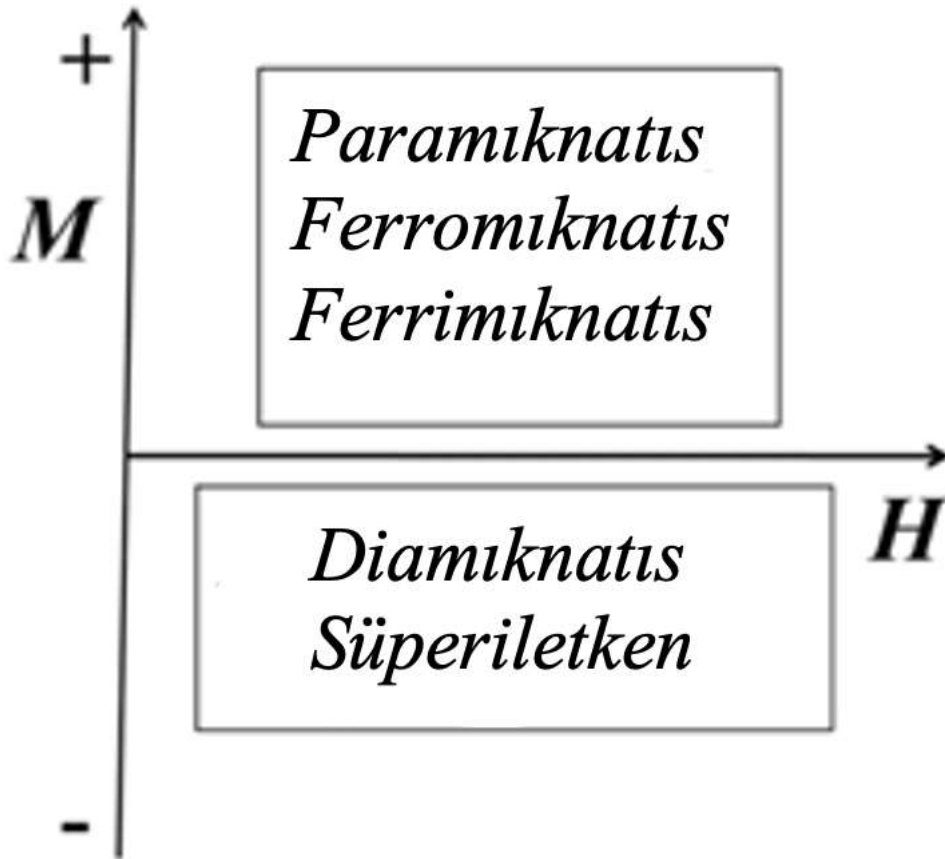
Manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler), harici bir manyetik alanın etkisi ile manipüle edilebilen ve genellikle nikel, kobalt, demir ve bunların oksitlerinden oluşan nanoparçacıklardır (Shubayev et al., 2009). Farklı kimyasal bileşimlere, parçacık boyutlarına ve yüzey özelliklerine göre MNP'ler T1W ajanları ve T2W ajanları olarak ikiye ayrılabilir. Süperparamanyetik demir oksit (SPIO) bir T2W ajanı olarak sınıflandırılırken, USPIO ultra süperparamanyetik demir oksit (USPIO) daha büyük bir T1 etkisine sahiptir (Luo et al., 2020). MNP'lerden oluşan malzemelerin özellikleri hem kendine özgü özelliklerin hem de nanoparçacıklar arası etkileşimlerin bir sonucudur. MNP'lerin harici bir manyetik alan ile yönlendirilebilmesi, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç taşınımı ve gen iletimi, doku mühendisliği, hücre takibi ve biyoayırma gibi pek çok biyomedikal uygulamanın önünü açmıştır. Uygulamaların çoğunda parçacıklar 10-20 nm altındaki kritik değerlerde en iyi performans sergiler. Bunun nedeni parçacık boyutu küçüldükçe bir nanoparçacıktaki tüm atomların büyük bir çoğunluğunun yüzey atomlarını oluşturmasıdır. Bu da yüzey ve arayüzey etkileşiminin artması demektir. Örneğin; çapı 1,6 nm olan yüzey merkezi kübik kobalt için, toplam spin sayısının yaklaşık % 60'ı yüzey spinleridir. Yüzey atomları/yığın atomları oranının yüksek olması sebebiyle yüzey spinleri mıknatıslanmaya önemli bir katkı sağlar (Lu et al., 2007). Nanometre ölçeğindeki parçacıkların bu manyetik özelliklerini anlamak manyetik malzemelerde önemli bir konudur.

2.1.2.1. Manyetizma

Manyetizma, manyetik bir alanın sebep olduğu, maddelerin birbirini çekmesi veya itmesiyle sonuçlanan fiziksel bir özelliktir (Kumar & Yusuf, 2015). Manyetik duyarlılık (χ), maddenin mıknatıslanmasının ve mıknatıslanmasını tetikleyen dış manyetik alanın oranı olarak tanımlanır (Cahaya, 2020). Boyutsuz bir miktar olan bir malzemenin manyetik duyarlılığı $\chi = M/H$ denklemi ile tanımlanır. Denklemden M malzemenin mıknatıslanması (birim hacim başına manyetik moment (spin) miktarı) ve H manyetik alan kuvvetidir, her ikisi de amper(A)/metre(m) cinsinden ölçülür (Gaeta et al., 2021).

Madde ve manyetik alanlar arasında iki gruba ayrılan temelde dört etkileşim türü vardır. İlk grup pozitif duyarlılığa sahip ($\chi > 0$) ve manyetik alan tarafından çekilme

eğiliminde olan paramanyetik, süperparamanyetik ve ferromanyetik maddeler iken ikinci grup ise negatif duyarlılığa ($\chi < 0$) sahip olan ve itilme eğilimindeki diyamanyetik maddeler ve süper iletkenlerdir (Gaeta et al., 2021; Kumar & Yusuf, 2015). Şekil 3'te dış bir manyetik alana karşı maddelerin işaretleri görülmektedir. Atom altı parçacıklardan elektronların orbitaldeki dönüş hareketleri arasındaki etkileşim maddenin kalıcı ya da geçici mıknatıslanması ile sonuçlanır. Manyetizma; Paramanyetizma, Süperparamanyetizma, Ferromanyetizma, Diyamanyetizma, Ferrimanyetizma ve Antiferromanyetizma olarak altı grupta incelenir.



Şekil 3. Harici bir manyetik alanın uygulanması altında çeşitli malzemelerin mıknatıslanma işareti (Kumar & Yusuf, 2015).

2.1.2.1.1. Paramanyetizma

Paramanyetik durumda, bireysel atomik manyetik momentler birbirlerine göre rastgele hizalanır (Şekil 4) ve kristalin net manyetik momentini sıfırdır. Eğer bu kristal harici bir manyetik alana maruz bırakılırsa, bu momentlerden bazıları hizalanacak ve kristal küçük bir net manyetik moment elde edilecektir (Teja & Koh, 2009).

Paramanyetik malzemeler pozitif işaretli manyetik duyarlılığa sahiptir ve manyetik alan tarafından çekilme eğilimindedir (Cahaya, 2020). Manyetik duyarlılık (χ) tipik olarak 10^{-5} – 10^{-3} aralığındadır. Bu duyarlılığın büyüklüğü ferromanyetik malzemelerinkinden %0,1'den azdır (Gaeta et al., 2021). Bu malzemeler atomik veya moleküler yörüngelerde eşleşmemiş elektronlar bulundurur. Harici bir manyetik alan uygulandığında, manyetik momentler uygulanan manyetik alanla aynı yönde hizalanır (Cahaya, 2020). Gadolinyum (Gd), hidroksil radikali ($\cdot\text{OH}$), melanin, moleküler oksijen, (O_2) bakır iyonu (Cu^{2+}), magnezyum (Mg), methemoglobin, titanyum (Ti), alüminyum (Al), mangan (Mn) ve demir oksit (FeO), paramanyetik maddelere örnek olarak verilebilir (Gaeta et al., 2021).

2.1.2.1.2. Süperparamanyetizma

Süperparamanyetizma, MNP'lerin dış bir manyetik alanla hizalanan manyetik momente sahip olması ve ardından dış manyetik alan kaldırıldığında rastgele dönmesiyle ortaya çıkar (Gloag et al., 2019). Dış manyetik alan kaldırıldığında mıknatıslanma kaybolur. Süperparamanyetizmada manyetik duyarlılık paramanyetiklerden çok daha büyük iken ferromanyetik malzemelerle karşılaştırıldığında daha düşüktür (Gaeta et al., 2021).

Süperparamanyetizma, iyi izole edilmiş tek alanlı bir parçacığın davranışı dikkate alınarak anlaşılabilir. Manyetik momentlerin belirli bir doğrultuda tutulmasından sorumlu olan parçacık başına manyetik anizotropi enerjisi şu şekilde ifade edilebilir:

$$E(\theta) = K_{eff} V \sin^2\theta$$

Burada V parçacık hacmi, K_{eff} anizotropi sabitidir ve θ mıknatıslanma ile kolay eksen arasındaki açıdır. Enerji bariyeri $K_{eff} V$, enerjisel olarak eşdeğer iki kolay mıknatıslanma yönünü ayırır. Parçacık boyutunun küçülmesiyle termal enerji $k_B T$, enerji bariyeri $K_{eff} V$ 'yi aşar ve mıknatıslanma kolayca tersine çevrilir. $k_B T, > K_{eff} V$ için sistem bir paramıknatıslanma

gibi davranır, atomik manyetik momentler yerine artık her parçacığın içinde muazzam bir moment vardır. Bu sisteme süperparamıknatis adı verilir (Lu et al., 2007). Süperparamanyetik maddelere ferritin, hemosiderin ve deoksihemoglobin örnek olarak verilebilir (Gaeta et al., 2021).

Kolloidal bir çözeltideki asılı süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkların (SPION) manyetik momentleri, manyetik alanın yokluğunda kendilerini kolay eksen boyunca hizalayacak şekildedir. Ancak manyetik alan uygulandığında ise manyetik momentler uygulanan alana paralel yönde hizalanma eğilimi gösterir ve bu da yüksek mıknatıslanma değerlerine neden olur. Ancak manyetik alan kaldırıldığında SPION'ların momentleri, SPION'ların boyuna ve enine gevşemeleri nedeniyle orijinal kolay eksen konumlarına geri döner (Kandasamy & Maity, 2015). Buradan anlaşıldığı üzere mıknatıslanma kalıcı değildir.

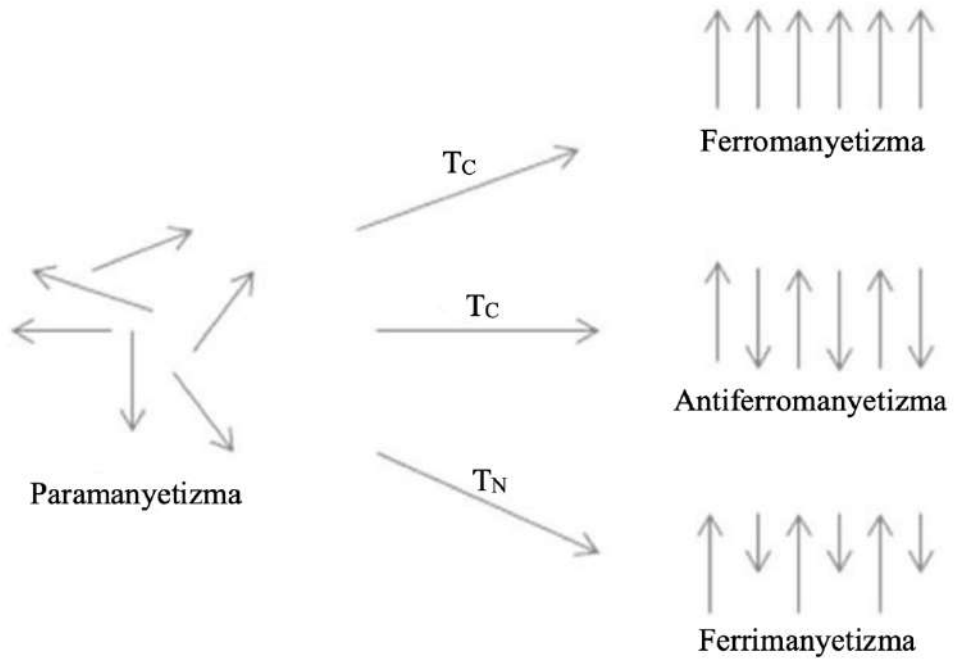
2.1.2.1.3. Ferromanyetizma

Ferromanyetik maddeler, paramanyetik ve süperparamanyetik maddelere benzer şekilde eşleşmemiş elektronlara sahiptir ancak daha yüksek bir manyetik duyarlılık etkisi oluştururlar (Gaeta et al., 2021). Ferromanyetik bir kristalde, bir dış alan olmasa bile tüm bireysel momentler aynı hizadadır (Şekil 4). Manyetik momentlerin düzenli konumu, bireysel momentlerin termal dalgalanmalarından dolayı sıcaklık arttıkça azalır. Néel veya Curie sıcaklığının üstünde malzeme düzensizleşir ve mıknatıslanma özelliğini kaybeder. Geçiş sıcaklığına ferromanyetik ve ferrimanyetik maddeler için Curie sıcaklığı (T_C), antiferromanyetik maddeler için Néel sıcaklığı (T_N) adı verilir (Teja & Koh, 2009).

Elektronların manyetik momentleri (dış manyetik alana ek olarak) birbirine paralel hizalanma eğiliminde olduğundan manyetizmaları paramanyetik malzemelere göre daha yüksektir. Dış manyetik alan kaldırıldığında süperparamanyetik maddelerden farklı olarak kalıcı olarak mıknatıslanır. Ferromanyetizma ve süperparamanyetizmanın görüntülenmesi MR'da büyük önem taşır. Demir (Fe), demir alaşımları (örneğin çelik), kobalt (Co), nadir toprak metallerinin alaşımları ve nikel (Ni) ferromanyetik maddelere örnektir (Gaeta et al., 2021).

2.1.2.2.4. Ferrimanyetizma

Ferrimanyetik bir kristalde manyetik momentlerin büyüklükleri farklıdır ve antiparalel bir şekilde düzenlenir. Bundan dolayı manyetik momentleri sıfır olmayıp net bir manyetik momente sahiptir. Bu antiparalel manyetik momentlerin aynı büyüklükte olduğu duruma ise antiferromanyetizma denir. Bu durumdaki demir kristal yapısı antiferromanyetikdir ve net manyetik momente sahip değildir (Teja & Koh, 2009). Şekil 4’ te ferrimanyetizma ve antiferromanyetizma durumu gösterilmiştir.



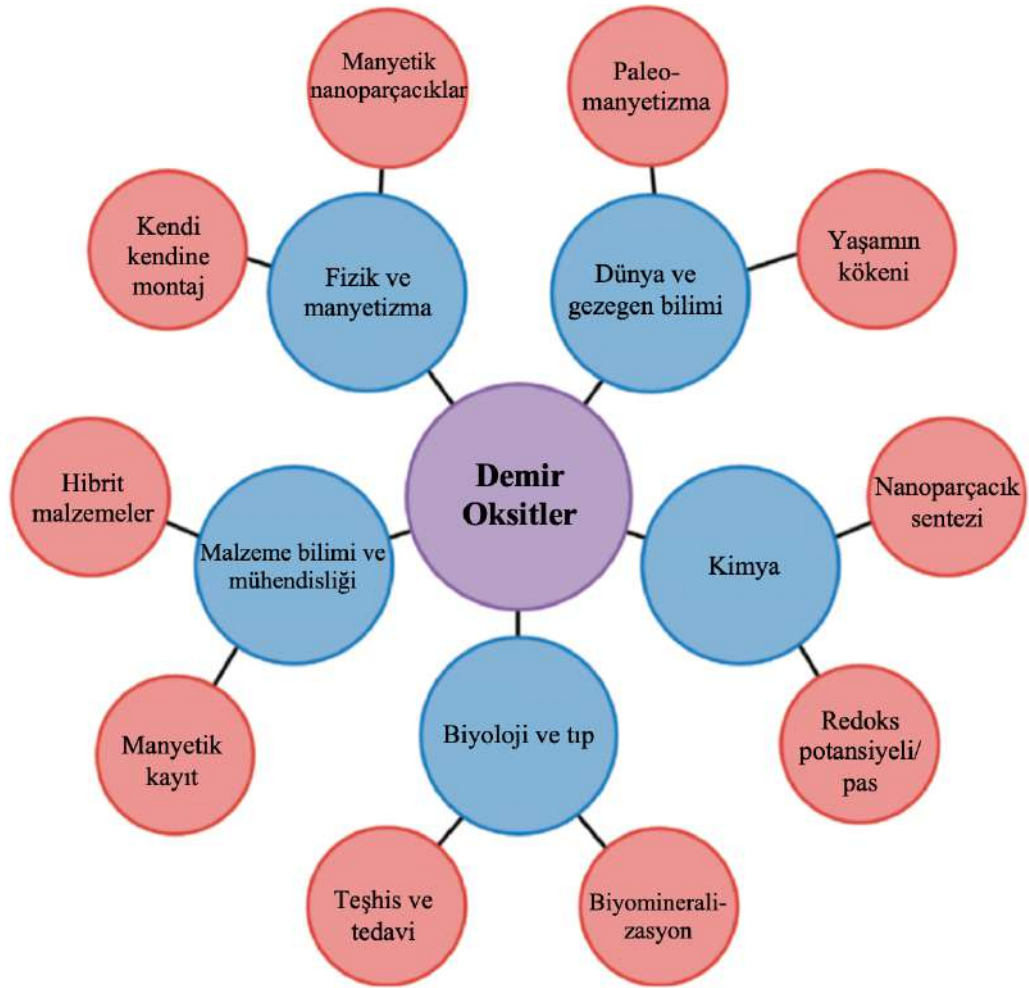
Şekil 4. Farklı malzeme türlerinde bireysel atomik manyetik momentlerin hizalanması (Teja & Koh, 2009).

2.1.2.1.5. Diyamanyetizma

Diyamanyetizma, elektronların yörüngesel hareketinin zayıf manyetik alanlar üreten küçük akım döngüleri yaratmasından kaynaklanır (Gaeta et al., 2021). Manyetik duyarlılık açısından değerlendirildiğinde diyamanyetik bir malzeme negatif işaretli manyetik duyarlılığa sahiptir ve itilme eğilimindedir (Cahaya, 2020). Manyetik duyarlılık değeri (χ) 10^{-6} düzeyindedir. Su, kalsiyum (Ca), oksihemoglobin, yağlar, kollajen, proteinler ve kurşun (Pb) diyamanyetik maddelere örnek olarak verilebilir (Gaeta et al., 2021).

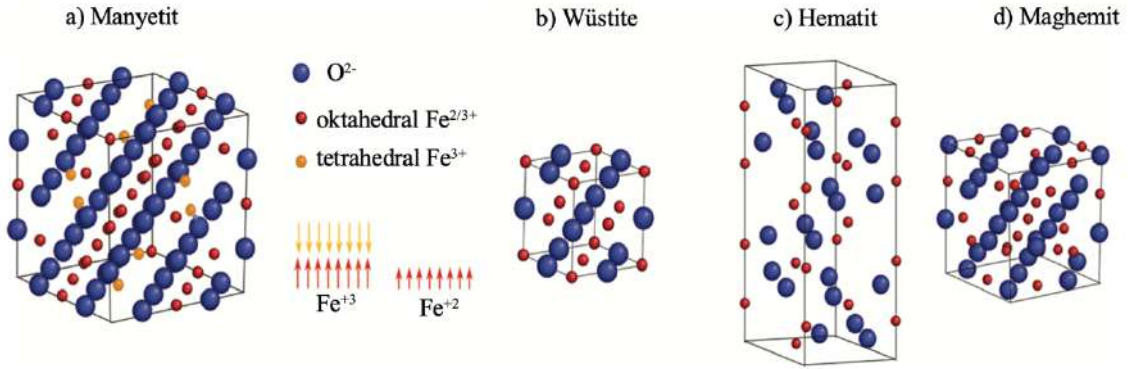
2.1.3. Demir Oksit Nanoparçacıklar

Demir atomu, 3 boyutlu orbitallerindeki eşleşmemiş dört elektron nedeniyle güçlü bir manyetik momente sahiptir (Teja & Koh, 2009). Bu nedenle nanoparçacık uygulamalarında sıklıkla tercih edilir. Düşük toksisiteleri, biyokimyasal aktiviteleri artıran yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmaları ve yüzey modifikasyonlarına olanak tanınması demir oksit nanoparçacıklarının pek çok alanda kullanımını arttırmıştır (Şekil 5) (Liu et al., 2013). Demire biyouyumluluk kazandırılması ile demir bazlı nanoparçacıklar araştırmacılar tarafından dikkatle çalışılmaktadır (Palanisamy & Wang, 2019).



Şekil 5. Demir oksitlerin kullanım alanları (Faivre D., 2016).

Demirin, demir oksitler, demir oksihidroksitler ve demir hidroksitler olmak üzere doğada pek çok formu bulunur. Manyetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma-Fe_2O_3$) ve hematit ($\alpha-Fe_2O_3$) en yaygın olarak bulunan formlardır (Ali et al., 2016). Şekil 6’da Demir oksitlerin yapısı görülmektedir.



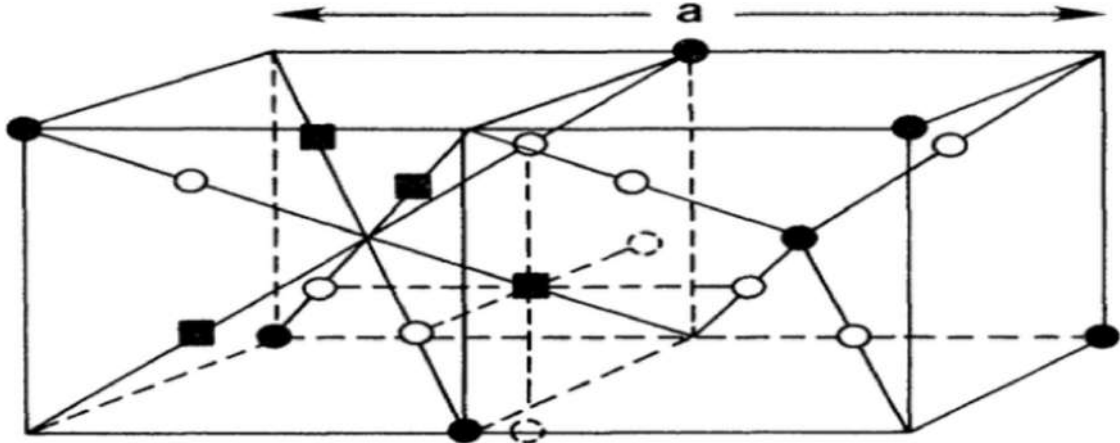
Şekil 6. Farklı demir oksit formlarının şekilsel gösterimi. a) Manyetit b) Wüstite c) Hematit d) Maghemit (Gloag et al., 2019).

Hematit, demir oksitlerin bilinen en eskisidir, kayalarda ve toprakta bulunur. Ortam koşullarında son derece karardır ve diğer demir oksitlerin dönüşümünün son ürünüdür. Curie sıcaklığı olan 956 K'nin üzerindeki sıcaklıklarda paramanyetiktir. Oda sıcaklığında zayıf ferromanyetiktir ve 260 K'de (Morin sıcaklığı, T_M) faz geçişine uğrayarak antiferromanyetik duruma geçer (Teja & Koh, 2009). Manyetit, (Fe_3O_4), MÖ 1500 civarında keşfedilmiş bilinen en eski mıknatıstır (Zhang & Satpathy, 1991) ve kristalleri siyahtır (Tang et al., 2003). Oksit formlar arasında en güçlü manyetizmayı sergiler; siyah demir oksit, yük taşı, demirli ferrit, manyetik demir cevheri veya herkül taşı olarak da bilinir. Maghemit, topraklarda manyetitin ayrışma ürünü ve diğer demir oksitlerin yanma ürünü olarak oluşur. Hematite göre yarı karardır ve manyetit ile katı formlar oluşturur. Manyetit ve maghemit, biyoyumlulukları ve insan vücudundaki düşük toksisiteleri nedeniyle biyomedikal uygulamalarda ön plana çıkmıştır (Teja & Koh, 2009). Tablo 1’de bilinen demir oksit formlar özetlenmiştir.

Tablo 1. Bilinen farklı demir oksit formları (Faivre D., 2016).

	Demir Oksitler	Demir Oksihidroksitler	Demir Hidroksitler
Fe(II) Bileşikler	Wüstite FeO		White rust $Fe(OH)_2$
Fe(II) ve Fe(III) Bileşikler	Magnetite Fe_3O_4	Green rusts -Fougèrite $[Fe^{+2}_4Fe^{+3}_2(OH)_{12}][CO_3].3H_2O$	
Fe(III) Bileşikler	Hematite $\alpha-Fe_2O_3$ $\beta-Fe_2O_3$ Maghemite $\gamma-Fe_2O_3$ $\delta-Fe_2O_3$ $\varepsilon-Fe_2O_3$	Goethite $\alpha-FeOOH$ Akaganéite $\beta-FeOOH$ Lepidocrocite $\gamma-FeOOH$ Feroxyhyte $\delta-FeOOH$ Ferrihydrite $5Fe_2O_3.9H_2O$ Schwermannite $Fe_8O_8(OH)_6(SO_4).nH_2O$	Bernalite $Fe(OH)_3$

Hem manyetit hem de maghemit, oksijen anyonlarının yüz merkezli kübik ((fcc) face-centered cubic) bir düzende paketlenildiği Fe katyonları ve O^{2-} anyon dizilerinden oluşan spinel grubundan minerallerdir. Demir katyonları tetrahedral veya oktahedral bölgelerde bulunur. Manyetit hem ferrik (Fe^{+3}) hem de ferröz (Fe^{+2}) iyonlarını bulundurur. Bu iyonların farklı arayer bölgelerine yayıldığı ters bir spinel yapıya sahiptir (Fodjo et al., 2017; Vangijzegem et al., 2023). Spinel yapının Şekil 7' de gösterildiği gibi iki farklı küpün dönüşümlü olarak istiflenmesiyle oluştuğu düşünülebilir (Zhang & Satpathy, 1991). Manyetit, oda sıcaklığında ferrimanyetiktir ve 850 K Curie sıcaklığına sahiptir (Teja & Koh, 2009).



Şekil 7. Kübik spinel kristal yapısı (Zhang & Satpathy, 1991).

Manyetit yaklaşık 0,84 nm'lik birim kafes uzunluğu ile ters spinel yapısı, 32 oksijen anyonu ve 24 demir katyonundan oluşur. Sonucunu, 8 tetrahedral ve 16 oktahedral konum arasında dağıtılır. Stokiyometrik manyetitte Fe^{+2} 'nin Fe^{+3} 'e oranı 0,5'tir. İki değerli katyonlar (Fe^{+2}) oktahedral bölgelerin yarısını kaplarken üç değerlikli (Fe^{+3}) katyonlar ise tetrahedral bölgeler ile geri kalan oktahedral bölgeler arasında eşit olarak dağılır (Vangijzegem et al., 2023). Oktahedral bölgelerdeki manyetik spinler, dış manyetik alanın yönüne paralel olarak hizalanırken tetrahedral bölgelerde antiparalel olarak hizalanır. Manyetit NP'ler boyut olarak 30 nm'nin altında olduğunda süperparamanyetizmaya ulaşır (Gloag et al., 2019).

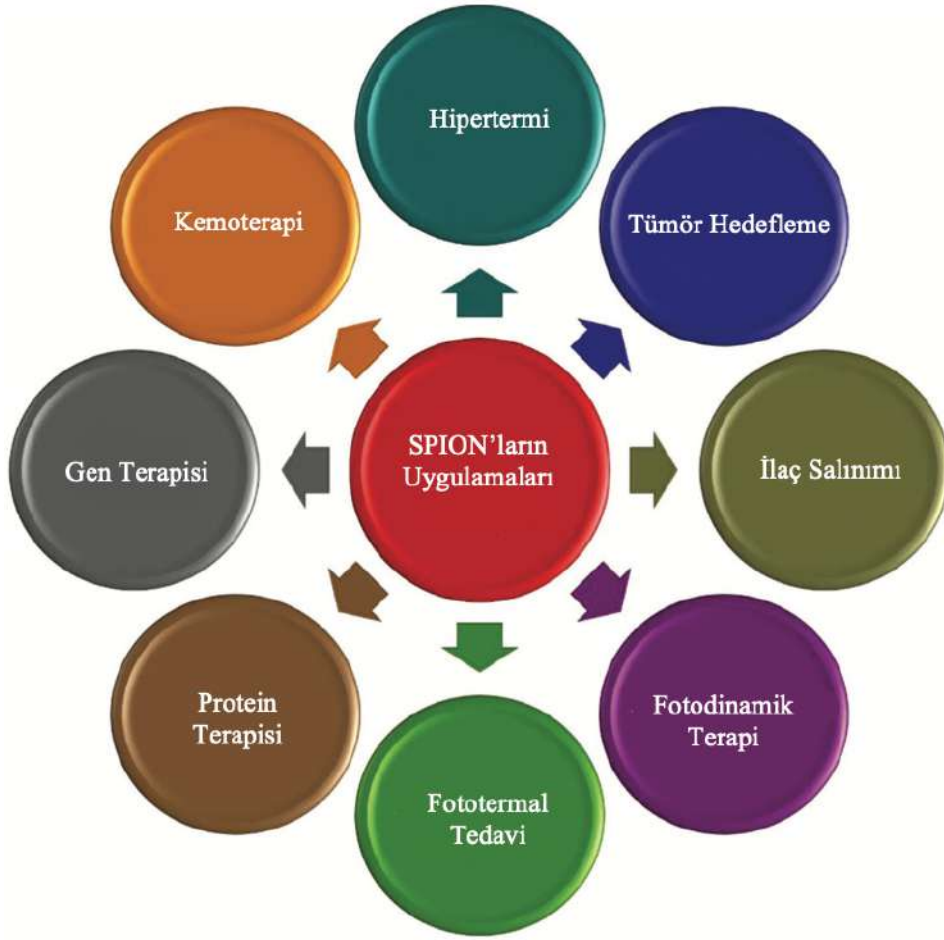
Maghemit genellikle manyetitin oksitlenmiş formu olarak adlandırılır. Kristal yapısında iki değerlikli katyonların bulunmaması sebebiyle manyetitten farklıdır. Dört yüzlü ve oktahedral bölgelerde dağıtılan üç değerlikli (Fe^{+3}) katyonlara ek olarak yapının küresel nötrlüğünü sağlamak için oktahedral bölgelerdeki demir boşlukları eşlik eder (Vangijzegem et al., 2023). Maghemit oda sıcaklığında ferrimanyetiktir, yüksek sıcaklıklarda kararsızdır ve zamanla duyarlılığını kaybeder. Ancak diğer metal iyonlarıyla katkılanarak stabilize edilebilir. (Teja & Koh, 2009). Hem manyetit hemde maghemit neredeyse aynı birim hücre boyutlarında ters spinel oksijen kafesine sahiptir (Tang et al., 2003).

2.1.3.1. Demir Oksit Nanoparçacıkların Biyomedikal Uygulama Alanları

Manyetik nanoparçacıklar içinden en popüler olanı benzersiz özelliklerinden dolayı demir oksit nanoparçacıklardır. Uygulama amacına yönelik olarak farklı manyetizma davranışlarında demir oksit nanoparçacıklar üretmek ucuz ve kolaydır. Demir oksit nanoparçacıkların bu benzersiz özellikleri sayesinde sağıktan kimyaya, bilgisayardan fiziğe, malzeme bilimi ve mühendisliğinden dünya ve gezegen bilimine kadar pek çok alanda kullanılır (Faivre D., 2016).

Demir oksit nanoparçacıklardan olan SPION'ların sağık hizmetlerinde başarılı bir şekilde uygulanması büyük ölçüde yapısal özelliklerle ilişkilidir. Bu özellikler boyut ve boyut dağılımının kontrol edilebilmesi, tek biçimli bir şekil, güçlü manyetik duyarlılık ve istenen yüzey kimyasına büyük ölçüde bağlıdır. Nanoparçacıkların özel yüzey mühendisliği, demir oksit çekirdeklerini çevreleyen polimerik veya inorganik bir moleküler kabuk oluşturulması ile yapılır. Ardından dış kabuk katmanı da belirli biyomoleküllerle işlevselleştirilir (Lin et al., 2008). Stabilite, biyoyumluluk ve kan yarı ömrü, SPION'ların yüzey fonksiyonelleştirilmesinde dikkat edilen üç temel unsurdur (Jin et al., 2014).

Demir oksit nanoparçacıkların en önemli özelliğı manyetik olmalarıdır. Manyetik özelliklerinden dolayı harici bir manyetik alan ile yönlendirilmesi pek çok biyomedikal uygulamada başarıyla kullanılmalarını sağılar. Şekil 8'de demir oksit nanoparçacıkların sağık alanındaki kullanımları görülmektedir.



Şekil 8. SPION'ların sağıhtaki uygulama alanları (Palanisamy & Wang, 2019).

Hipertermi

Demir oksit nanoparacıkların uygulama alanlarından biri kanser tedavisinde hipertermidir. Hipertermi kelime anlamı olarak ısı oluşumu manasına gelir (Erdo & Gan, 2018). Kanseri tedavi etmek için kanser hücrelerini belirli bir sıcaklığa kadar ısıtarak yok eden ancak sağılıklı hücelere zarar vermeyen kemoterapiye alternatif terapötik bir tekniktir (McNamara & Tofail, 2015). MNP'ler bölgesel olarak ısı artışını sağılamak amacı ile kullanılır. Bu teknikte, manyetik alana maruz bırakılan süperparamanyetik demir oksit nanoparacıklar, tümör hücrelerini 41-45 °C'ye kadar ısıtır; burada normal dokularda hasar tersine çevrilebilirken tümör hücreleri geri dönüşümsüz şekilde hasar görür (Teja & Koh, 2009). MNP kullanmanın avantajı çevredeki sağılıklı dokularda ısı artışını önlemektir. Bu sayede sağılıklı dokularda hasar oluşumu görülmez. Demir oksit nanoparacıkları kullanılarak yapılan hipertermik tedaviler, meme ve beyin tümörlerinin tedavisi için hem in vitro hem de in vivo olarak olumlu sonuç vermiştir (McNamara & Tofail, 2015).

Manyetik Rezonans Görüntüleme

MRI (manyetik rezonans görüntüleme), klinik radyolojideki en güçlü görüntüleme tekniklerinden biridir. Manyetik alan ve radyo dalgaları kullanır (Erdo & Gan, 2018). Bu teknikte kontrast maddeler hastalıklı dokudan sağlıklı dokuyu ayırt etmek için kullanılır (McNamara & Tofail, 2015). MRI iç organları ve dokuları görüntüleme imkânı verdiği için hastalıkların teşhisi için önemlidir (Liu et al., 2013).

MNP'lerin kullandığı MRI biyomedikal görüntüleme, klinik tanı ve tedavi için invaziv olmayan iyi bir yöntemdir (Erdo & Gan, 2018). Hasar görme ve sızma yapan damarlardan dolayı tümör dokularının yüzey geçirgenliği ve alıkoyma etkisi artar böylece sağlıklı dokulara nazaran daha çok MNP tutulur. Aktif ve pasif hedefleme mekanizmaları sayesinde tümörlü dokular ayırt edilebilir. Pasif hedefleme, tümör ve sağlıklı dokular arasındaki atomik ve fizyolojik farklılıklara dayanmaktadır. Tümör dokuları asidik düşük pH ortamına sahiptir, MNP modifikasyonu pH'a göre yapılabilmektedir. Aktif hedeflemede ise MNP'lere tümör yüzey reseptörlerini tanıyacak şekilde ligantlar bağlanır.

Son derece küçük demir oksit nanoparçacıkların süperparamanyetizma özelliği, MRI ile görüntülenmelerini sağlar (Bao et al., 2018). Süperparamanyetik nanoparçacıklar harici bir manyetik alan uygulandığında daha hızlı T1/T2 gevşemesi için kararlı kolloidal süspansiyonlar oluşturur ve böylece MRI'da iyi bir kontrast maddesi olarak kullanılabilirler (Wáng & Idée, 2017).

Manyetik İlaç Salınımı

İlaç salınımının en büyük problemlerinden biri, ilacı vücutta yalnızca hedef dokuya ulaştırmak ve sağlıklı dokularda yan etkilerinden kaçınmaktır. Bu durum kanser tedavisinde ayrıca zordur. Nanoparçacıkların küçük boyut, hücre zarından penetrasyon, protein bağlama, stabilizasyon ve endositozdan kaçma özelliklerine sahip olmaları ilaç salınımını mümkün kılmaktadır. İlaç salınımı için kullanılan nanopartiküllerin yüzeyleri proteinler ve genetik materyaller ile kaplanır. Böylece etkin bir tedavi geliştirilmiş olur (de Jong & Borm, 2008).

Kemoterapide kullanılan ilaçlar yalnızca kansere özgü değildir ve kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı hücrelere de zarar verir (Erdo & Gan, 2018). Bu etkin bir tedavi için istenmeyen bir durumdur. Bu sorunu gidermek için MNP'ler terapötik maddeleri hedefe ulaştırmak için kullanılır. Taşıyıcı olarak MNP'ler, kanserli hücrelerin zarlarından ilaç geçişine izin verir (McNamara & Tofail, 2015). İşlevselleştirilmiş

süperparamanyetik manyetit ve maghemit nanoparçacıkları, harici bir manyetik alanla kombinasyonu sonucu ilacın istenen hedefe girmesini sağlar (Teja & Koh, 2009). MNP'lerin kullanıldığı kontrollü ilaç salınımı sayesinde yan etkiler en aza indirilir ve dozaj kontrolü de sağlanmış olur.

2.1.3.2. Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentez Yöntemleri

Demir bazlı nanoparçacıkların düşük toksisite, biyokimyasal aktivite, manyetizma ve yüksek yüzey/hacim oranına sahip olup yüzey modifikasyonlarına olanak tanınması gibi benzersiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı biyolojik uygulamalarda çok önemli bir rolü olduğundan önceki bölümlerde bahsedilmişti. Ancak bu özellikler şekil, boyut, kristal kafes yapısı, kaplama vb. faktörlerden etkilenir ve dolayısıyla sentez yöntemlerine oldukça bağlıdır (Friedrich et al., 2023).

Öte yandan biyolojik uygulamalarda amaca uygun özelliklerde demir nanoparçacıkları sentezlemek önemli bir parametredir. Örneğin görüntüleme için kullanılan nanoparçacıkların son derece stabil, inert olması ve vasküler sistemde uzun süre dolaşabilmesi gerekirken, ilaç hedefleme veya hipertermi amaçlı SPIONP 'ler yüksek manyetik doyumluğa sahip olmalı, hedef bölgede birikmeli, hücrelerle ve dokularla etkileşime girmelidir (Friedrich et al., 2023) . Bundan dolayı araştırmacılar nanoparçacık sentezinde amaca uygun sentez yöntemini tercih etmelidir. Birlikte çöktürme, sol-jel yöntemi, mikroemülsiyon tekniği, hidrotermal sentez, kimyasal buhar sentezi ve plazma destekli kimyasal buhar biriktirme tekniği, NP sentezinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerdendir (Dhand et al., 2015).

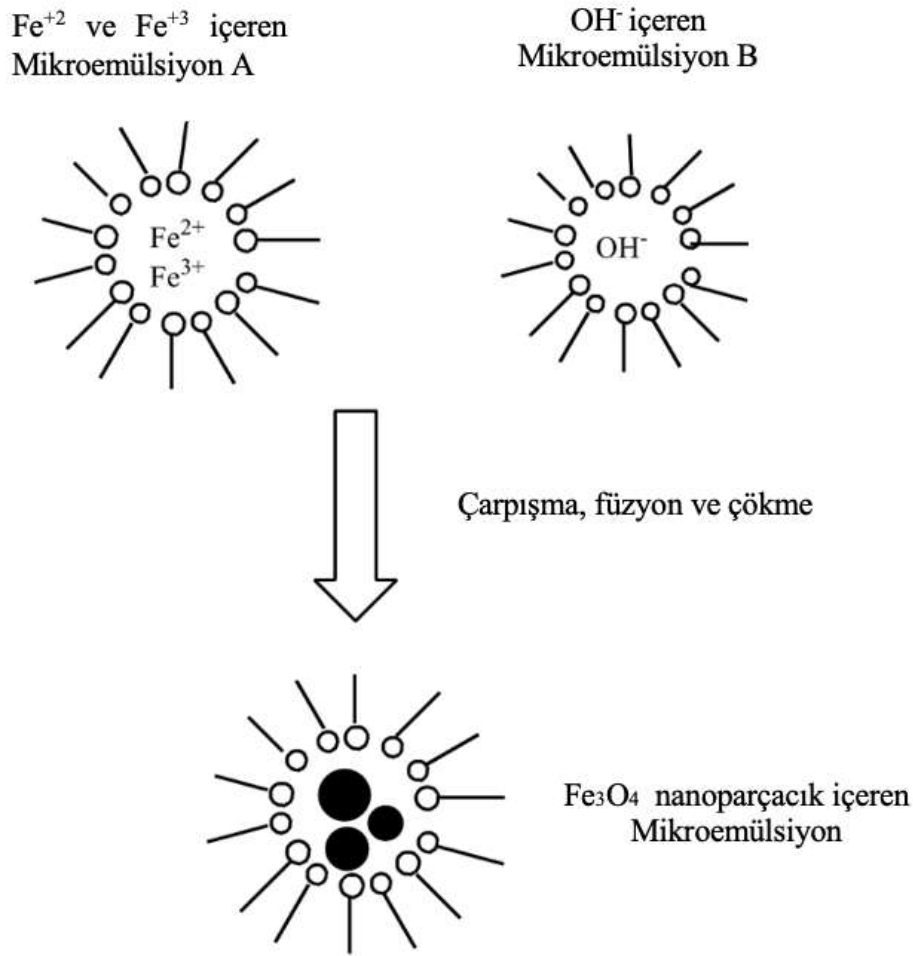
2.1.3.2.1. Sol-Jel Yöntemi

Çözeltideki moleküler öncüllerin hidrolizi ve polikondensasyonunu temel alan bir yöntemdir (Marcelo et al., 2020) . Bu yöntemde iki tür bileşen vardır; ilki bir sıvı içinde katı parçacıkların koloidal bir süspansiyonu olan sol ve diğeri, sıvı içeren polimer bir jeldir (Dhand et al., 2015). Kısaca, elektrostatik etkileşimler, hidrojen bağları ve kovalent bağlar yoluyla ayrı parçacıklardan (sol) üç boyutlu bir polimerik ağa (jel) dönüşen öncüllerin hidrolizi vasıtasıyla stabil bir koloidal çözeltinin oluşumunu içerir (Marcelo et al., 2020). Hidroliz ve yoğunlaşma, sol-jel işleminin tipik adımlarıdır. Hidroliz, jel fazının oluşumunda ilk adım olan katı parçacıkların bağlarını parçalamak için suyu kullanır. Bu

işlemi daha sonra, malzemenin son yapısını belirlemek için ortamdan fazla suyun uzaklaştırıldığı ve nanoparçacıkların oluşumu ile sonuçlanan yoğuşma adımı izler (Dhand et al., 2015). Birlikte çöktürme yaklaşımlarına benzer şekilde, tipik demir öncüleri arasında hidrolize ve ardından polikondensasyona uğrayan demir alkoksitler ve klorürler, nitratlar, sülfatlar ve asetatlar gibi demir tuzları bulunur. Bu reaksiyonlar oda sıcaklığında yürütülebilmesine rağmen, SPIONP 'leri kristal faza dönüştürmek için daha fazla ısıl işlem gereklidir. Genel olarak bu yöntem, $Fe(OH)_3 \rightarrow FeOOH \rightarrow Fe_2O_3$ denklemi ile gösterilen iki aşamalı bir faz dönüşümünü takip eder (Marcelo et al., 2020).

2.1.3.2.2. Mikroemülsiyon Yöntemi

Mikroemülsiyon, birbiriyle karışmayan iki fazın (su ve yağ) yüzey aktif maddeler ve yardımcı yüzey aktif maddeler eşliğinde berrak ve stabil izotropik dispersiyonlarıdır; temelde su içinde yağ (o/w; normal miseller) ve yağ içinde su (w/o; ters miseller) olarak iki kategoriye ayrılır (Dadfar et al., 2019; Marcelo et al., 2020). Su/yağ mikroemülsiyon (w/o veya ters miseller) sistemlerinde, küçük sulu nanodamlacıklar organik fazda (yağ) dağılırken yağ/su mikroemülsiyon (o/w ya da normal miseller) sistemlerinde yağ damlacıkları su içinde dağılır (Lin et al., 2008). Mikroemülsiyonlar polar faz, apolar faz ve sürfaktan olarak en az üç bileşenden oluşur. Bu bileşenler termal olarak kararlı, makroskopik olarak homojen ve optik olarak şeffaftır. Sürfaktan molekülleri, sulu ve organik fazları ayıran arayüz tabakasını oluşturur, mikroemülsiyon ile fazlar arasındaki ara yüzey gerilimini azaltır ve damlacıkların birleşmesini önleyen sterik bir bariyer görevi görür. Yağ içinde su mikroemülsiyonu, yüzey aktif madde molekülleri tarafından stabilize edilmiş, yağ fazında dağılmış nano boyutlu su damlacıklarından oluşur (Ali et al., 2016). Su/yağ ters misel sistemi, NP sentezi için mükemmel bir reaksiyon bölgesi oluşturur. Şekil ve boyut kontrollü demir oksit NP'lerin elde edilmesi için mikroemülsiyon ve ters misel sistemi yaygın olarak kullanılır (Teja & Koh, 2009). Mikroemülsiyon yönteminin dezavantajı düşük ve sınırlı bir reaksiyon sıcaklığının olmasıdır. Bu SPIONP' in düşük kristallite ve düşük verime sahip olmasına neden olur (Dadfar et al., 2019). Bir başka dezavantaj, bu yöntemde çok büyük miktarda yağa ihtiyaç olduğundan ölçek büyütme zorluğu ve nanoparçacıklara yapışan yüzey aktif maddelerin çıkarılması zorluğudur (Lin et al., 2008). Şekil 9' da mikroemülsiyon yöntemi ile Fe_3O_4 nanoparçacık oluşumu görülmektedir.



Şekil 9. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin w/o mikroemülsiyon sistemi ile sentezi (Lin et al., 2008).

2.1.3.2.3. Termal Parçalanma Yöntemi

Proliz olarak bilinen bu yöntem $Fe(acac)_3$, $Fe(CO)_5$, $Fe(Cup)_3$ Prussian blue, demir-üre kompleksi ($[Fe(CON_2H_4)_6](NO_3)_3$), Ferrocene ($Fe(C_5H_5)_2$) ve $Fe(oleat)_3$ gibi çeşitli demir öncüllerinin yüksek sıcaklıklar altında termal ayrışması yoluyla nanoparçacık sentezini içerir (Lin et al., 2008; Marcelo et al., 2020). Bu yöntemde nanoparçacık sentezi oleik asit ve oleilamin gibi yüzey aktif maddelerin ve yüksek kaynama noktalarına sahip organik çözücülerin varlığında 200-300 °C aralığındaki yüksek sıcaklıklarda gerçekleşir (Kandasamy & Maity, 2015; Lin et al., 2008). Yüzey aktif maddelerin konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklıkları, reaksiyon süresi, demir öncüllerin yüzey aktif maddelere oranı, çözücüler ve geri akış sırasındaki ısıtma hızı gibi birçok parametre, SPIONP'lerin fizikokimyasal özelliklerini ve manyetik özelliklerini

etkiler (Kandasamy & Maity, 2015). Termal ayrışma yöntemi demir nanoparçacıklarının boyut, boyut dağılımı ve şekil kontrolüne imkan tanır ve sonuçta kristallik açısından yüksek kalitede numune elde edilmesini sağlar. Ancak bu yöntemin dezavantajı sentezde kloroform, hekzan ve demir pentakarbonil gibi toksik kimyasalların kullanılması sebebiyle çevre dostu olmamasıdır. Ek olarak sentez sonunda oluşan nanoparçacıklar hidrofobik olup polar olmayan çözücüler içinde çözünür. Toksiklik ve suda çözünmeme biyomedikal uygulamalar için büyük bir sorundur. Bu sorunun giderilmesi için sentez sonunda ayrıca bir yüzey modifikasyonu yapılması gerekir (Dadfar et al., 2019).

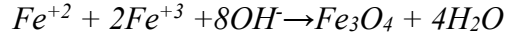
2.1.3.2.4. Hidrotermal Sentez Yöntemi

Hidrotermal yöntemde SPIONP'leri hazırlamak için sulu bir çözelti kullanılır. Sentez reaksiyonu yüksek sıcaklık ve basınçta bir reaktör ya da otoklavda gerçekleşir (Ali et al., 2016; Palanisamy & Wang, 2019). Bu işlemde oluşan nanoparçacıklar, diğer işlemlerden daha iyi bir kristallığe sahiptir (Dhand et al., 2015). Bu yöntemde, sulu çözelti içinde çözülmüş demir tuzlarının karışımı, sıcaklığın 200 °C'nin üzerine çıkarılabildiği teflon kaplı paslanmaz çelik otoklava yerleştirilir (Dadfar et al., 2019). Reaksiyon basıncı atmosfer basıncının üzerine çıkar. Burada demir iyonları hidrolize uğrayarak hidroksit ara ürünleri ($FeOH_n$) oluşturur ve bunlar dehidrasyonla nihai demir oksit fazını üretir (Niculescu et al., 2022). Yüksek sıcaklık ve yüksek basıncın sinerjik etkisi, manyetiklik ve kalite açısından iyi nanoparçacık oluşumunu sağlar. Sıcaklık, basınç, demir öncüllerinin konsantrasyonu ve reaksiyon süresinin değiştirilmesiyle nanoparçacık oluşumu, boyut ve boyut dağılımı üzerindeki kontrol sağlanır. Bu yöntemin avantajları maliyetin düşük olması ve yüksek kristallikte demir oksit nanoparçacıkların nispeten büyük ölçekte üretilmesidir (Dadfar et al., 2019). Bununla birlikte nanoparçacıkların son boyutunu kontrol etmek zordur ve çoğu zaman polidispers numuneler elde edilir. Sentez işleminin güvenilirliği ve tekrarlanabilirliği sınırlıdır ve gerekli ekipmanlar pahalıdır (Niculescu et al., 2022).

2.1.3.2.5. Birlikte Çöktürme Yöntemi

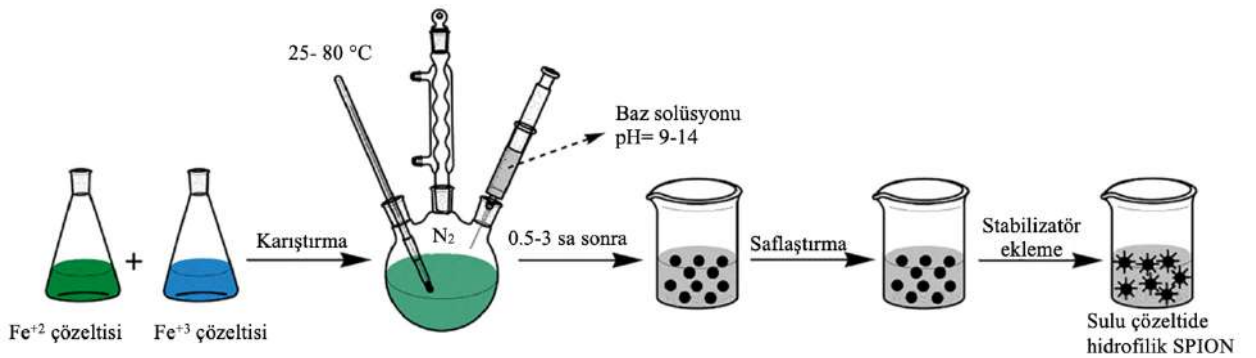
Nano boyutlu Fe_3O_4 sentezi için en basit ve en yaygın kullanılan kimyasal yöntemlerden biri birlikte (ortak) çöktürme yöntemidir. Bu teknik, aşağıdaki kimyasal denklemle tanımlandığı gibi, ferrik (Fe^{+3}) ve ferröz (Fe^{+2}) iyonlarını içeren tuzların bazik sulu bir çözelti içinde eşzamanlı çöktürülmesi esasına dayanır. (Niculescu et al., 2022).

Sentez reaksiyonu oda sıcaklığında ya da 70-90 °C kadar yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilebilir (Marcelo et al., 2020).



Kullanılan demir tuzları oranı (Fe^{+2} ve Fe^{+3} içeren) 2:1 olacak şekilde sulu çözelti hazırlanır. Hazırlanan bu çözeltiliye sodyum hidroksit (NaOH) ya da amonyum hidroksit (NH_4OH) ilave edilerek nanoparçacıkların çöktürülmesi sağlanır. Sentez reaksiyonu pH 9-14 aralığında gerçekleştirilir (Palanisamy & Wang, 2019).

Demir oksit nanoparçacıkların boyutu, şekli ve bileşimi büyük ölçüde kullanılan tuzların türüne (klorürler, sülfatlar, nitratlar vd.), Fe^{+2}/Fe^{+3} oranına, reaksiyon sıcaklığına, pH değerine ve ortamın iyonik gücüne bağlıdır. Sentez reaksiyonu bu parametreler açısından optimize edildikten sonra kaliteli nanoparçacık sentezi tekrarlanabilir hale gelir (Palanisamy & Wang, 2019). Bu yöntemin avantajı, basit, tekrarlanabilirliği yüksek ve kısa zamanda çok miktarda nanoparçacığın sentezlenebilmesidir (Niculescu et al., 2022). Bu yöntemin dezavantajı ise üretilen nanoparçacıkların hem fiziksel hem de kimyasal özelliklerinin oksitlenmesi sonucu olumsuz etkilenmesidir. Ancak bu sorun çöktürme işlemi nitrojen gibi inert bir gaz ortamında gerçekleştirilerek ortadan kaldırılır (Palanisamy & Wang, 2019). Şekil 10' da birlikte çöktürme yöntemi gösterilmiştir.



Şekil 10. Birlikte çöktürme yöntemi ile demir oksit nanoparçacıkların sentezi (Dadfar et al., 2019).

2.1.3.3. Demir Oksit Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri potansiyel uygulamalarını belirler. Bu nedenle nanoparçacıkların çeşitli fizikokimyasal özelliklerinin analizi ve karakterizasyonun yapılması gerekir. MNP'lerin karakterizasyonu boyut, boyut dağılımı ve yüzey, element kompozisyonu, kimyasal yapısı ve manyetik özellikleri belirlenerek yapılır (Ali et al., 2021; Joudeh & Linke, 2022). Bunun için farklı yöntem ve teknikler kullanılmaktadır. Bu teknikler mikroskobik teknikler, spektroskopik teknikler ve manyetometrik teknikler olarak üç gruptur (Ansari et al., 2019).

Mikroskobik teknikler; Taramalı elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) teknikleridir (Ansari et al., 2019). Taramalı elektron mikroskobu (SEM) bir yüzey görüntüleme yöntemidir. Taramalı elektron mikroskobu görüntü oluşumunda yansıyan elektronlardan faydalanır. Kaynaktan salınan birincil elektronların görüntülenmek istenen numune ile etkileşimi sonucu oluşan ikincil elektronların numunenin herhangi bir noktasında toplanması ile görüntü oluşur. Mikro ve nano ölçekteki çeşitli parçacık boyutlarını, boyut dağılımlarını, nanomateryal formları ve nanoparçacıkların yüzey morfolojisini tam olarak belirleyebilir. Nanoparçacıkları manuel olarak ölçerek, sayarak ya da özel bir yazılım kullanarak, nanoparçacıkların morfolojisi belirlenir ve görüntülerden bir histogram oluşturulur (Rezaei et al., 2024). Geçirimli elektron mikroskobunda (TEM) cihazdan çıkan elektronlar ultra-ince numuneye iletilir. Burada numune ve elektronlar etkileşime girer. Etkileşim sonucu numunenin içinden geçen elektronların tespiti ile görüntü oluşturulur (Rezaei et al., 2024; Varma et al., 2021). Son derece hassas ve yüksek çözünürlüklü görüntüleme sunan bu teknik ile nanoparçacıkların iç yapısı, kristal yapısı, şekli, boyutu ve boyut dağılımı belirlenebilir (Rezaei et al., 2024; Vijayaram et al., 2024). Bunlara ek olarak şekil heterojenliği, ortalama boyut ve dağılıma ilişkin nanometrik inceleme, taramalı tünelleme mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilebilir (Ansari et al., 2019). Atomik kuvvet mikroskopunun çalışma prensibi numune yüzeyi ile ölçüm probunun ucundaki atomik kuvvetlerin etkileşimini ölçmesine dayanır (Fan et al., 2021).

Spektroskopik teknikler; X- ışını kırınımı (XRD), Nükleer manyetik rezonans (NMR), Dinamik ışık saçılımı (DLS), Fourier-dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi, Zeta potansiyeli, UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, Raman spektroskopisi ve İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICP-MS) gibi

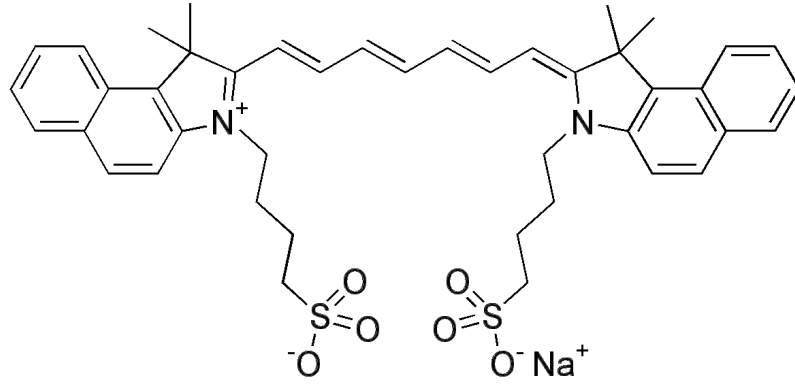
tekniklerdir (Ali et al., 2021; Ansari et al., 2019). XRD, bir malzemeye gelen X ışınlarının ve ardından malzemeyi terk eden X ışınlarının yoğunluklarının ve saçılma açılarının ölçülmesine dayanır (Joudeh & Linke, 2022). Hem organik hem de inorganik kristalli malzemelerin atom seviyesinde karakterizasyonu için tahribatsız bir yöntem olan XRD, NP'lerin kristalliğini tanımlamak için kullanılır (Ali et al., 2021; Rezaei et al., 2024). Nanoparçacıklarda hangi kristal fazın mevcut olduğunu daha kesin olarak belirlemek amacıyla XRD ile karakterize edilebilir (Abdullah et al., 2020). FT-IR analizinde numune kızılötesi kırmızı ışıkla ışınlanır (Vijayaram et al., 2024). IR (infrared radyasyonu) ışınlarının bir kısmı numune tarafından tutulurken geri kalan ışınlar numunenin içinden geçer. Işığın absorblanmasıyla numunede titreşimler meydana gelir ve benzersiz absorpsiyon bantlarını içeren spektrum elde edilir (Joudeh & Linke, 2022). Işığın bu şekilde moleküller tarafından absorbe edilmesi sayesinde FT-IR spektroskopisiyle yapısal karakterizasyon, yüzey kimyası ve fonksiyonel gruplar anlaşılır (Ali et al., 2021; Ansari et al., 2019). İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektroskopisi (ICP-MS) nanoparçacıkların elementel bileşimini ve konsantrasyonunu hesaplamak için kullanılır (Ali et al., 2021; Vijayaram et al., 2024). Nanoparçacıkların yüzey potansiyeli önemli bir fizikokimyasal parametredir çünkü nanoparçacık içi etkileşimlerin gücünü, karşı iyonların adsorpsiyonunu ve dolayısıyla parçacık stabilitesini belirler, bu nedenle nanoparçacıkların yüzey yükünü karakterize etmek önemlidir (Fan et al., 2021). Bunun için bir solvent içindeki elektroforetik hareketlilikten hesaplanan zeta potansiyeli (ζ) ölçümleri kullanılır (Zielinska et al., 2020). NP'lerin yüzey yükü, NP'lerin yüzeyinde (Stern katmanı) ince bir tabaka oluşturan karşı iyonları çeker. Bu katmanın sınırındaki elektrik potansiyeli NP zeta potansiyeli olarak bilinir. Zeta potansiyeli değerleri NP kararlılığının bir göstergesi olup zeta potansiyelinin daha yüksek mutlak değeri daha kararlı NP'ler demektir. Bu değer +30 mV'nin üzerinde veya -30 mV'nin altında olan nanoparçacıklar stabil olarak kabul edilir (Joudeh & Linke, 2022). Nanoparçacıklar boyut, şekil ve dielektrik ortama bağlı olarak optik özellik göstermektedir. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, nanoparçacıkların optik özelliklerinin karakterizasyonu için kullanılan basit ve yaygın bir tekniktir. UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi, bir numunenin emilimini veya yansımalarını ölçmek için görünür ışık ve UV ışığı kullanır (Joudeh & Linke, 2022). Nanoparçacıklar karakteristik olarak farklı dalga boylarında bant oluştururlar. Demir bazlı nanoparçacıklar, tüm spektrumda herhangi bir spesifik tepe noktası olmadan sürekli bir absorpsiyon bandı göstermektedir (Sirdeshpande et al., 2018).

Genellikle, UV-Vis absorpsiyon spektroskopisi ile doğrulanan nanoparçacıklar, 300 - 800 nm arasında değişen dalga boylarında analiz edilir (Vijayarani et al., 2024).

Manyetometrik teknikler; manyetik nanoparçacıkların manyetik özelliklerini ölçmek için birçok teknik mevcuttur. Bu tekniklerden en önemlileri net mıknatıslanmayı ölçmek için kullanılan SQUID manyetometrisi ve titreşimli numune manyetometrisi (VSM) teknikleridir (Ali et al., 2021). Titreşimli numune manyetometrisi (VSM) tekniği Faraday'ın indüksiyon yasasına dayanarak malzemelerin manyetik özelliklerini ölçer. VSM'de numune, dikey olarak titreşen özel bir tutucuya sabitlenmiş olan manyetik alana yerleştirilir. Tutucu titreşmeye başladığında numunenin manyetik momenti, zamanın fonksiyonu olarak değişen bir manyetik alan yaratır. Numunede oluşturulan alternatif manyetik alan, kaydedilen ve numunenin manyetik özelliklerini hesaplamak için kullanılan bir elektrik akımını indükler (Joudeh & Linke, 2022). SQUID, ince filmler, kristaller, tozlar, sıvılar ve gazlar gibi farklı formlardaki numunelerin araştırılmasında faydalıdır. Hem VSM hem de SQUID son derece hassas cihazlardır. VSM'in hassasiyeti 10^{-6} emu iken SQUID ise 10^{-10} emu'ya kadar daha hassastır (Ali et al., 2021).

2.2. İndosiyanın yeşili (ICG)

İndosiyanın yeşili (ICG) ilk olarak II. Dünya Savaşı sırasında renkli görüntüleme için geliştirilmiş olup daha sonra 1950'lerde tıpta kullanılmaya başlanmıştır (Lim et al., 2023). Kodak Araştırma Laboratuvarlarında Heseltine ve Brooker tarafından geliştirilen bu boya 1956'da Fox ve ark. tarafından klinik araştırmalara dahil edilmiştir (Björnsson et al., 1982). 1954 yılında Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından hastalarda kalp debisi ve karaciğer fonksiyonunun değerlendirilmesi gibi klinik uygulamalar için onaylanan amfifilik bir siyanin boyasıdır (Wang et al., 2018). İki hidrofobik polisiklik parça ve sülfonik asit gruplarından oluşan fizyolojik sıvılarda amfifilik, inert ve toksik olmayan bu bileşiğin molekül ağırlığı 774,96 g/mol ve floresan çapı 1,2 nm'dir (Dai et al., 2020; Zhou & Nan, 2023). Şekil 11' de indosiyanın yeşili boyasının molekül yapısı görülmektedir.



Şekil 11. İndosiyenin yeşili (Diaz Tovar et al., 2019).

İndosiyenin yeşili boyasının yakın kızılötesi (NIR) floresans absorpsiyonu 780 nm ve emisyonu 820 nm'dir (Xie et al., 2023). ICG, 720 ve 780 nm'de karakteristik pikler gösterir (Jaiswal et al., 2021). İntravenöz olarak enjekte edildiğinde % 98'i plazma proteinlerine bağlanır, proteine bağlı ICG floresan sinyaller üretir ancak plazma proteinlerinin yapısını bozamaz, geri kalanı serumda serbest haldedir (Khalaf et al., 2024; Zhou & Nan, 2023). 1970'lerde proteine bağlı ICG'nin yakın kızılötesi (NIR) spektrumlarında güçlü absorpsiyona sahip olduğu bulunmuştur. NIR spektrumlarının biyolojik dokular tarafından düşük absorpsiyonu nedeniyle yüksek sinyal/arka plan oranına sahip biyo-görüntüleme uygulamaları için uygun bir boyadır (Wang et al., 2018). Bununla birlikte, zayıf fotostabilite, kısa yarı ömür ve konsantrasyona bağlı agregasyon, proteinlere spesifik olmayan bağlanma ve spesifik olmayan hedefleme gibi bazı kısıtlamaları vardır (Sun et al., 2024; Wang et al., 2018). Ayrıca ICG, ışıkla uyarılarak kanser hücrelerine zarar vermek üzere singlet oksijen ve süperoksit gibi reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturmak için bir fotosensitizer olarak kullanılmaktadır. Ek olarak indosiyenin yeşilinin ısı artışına neden olması fototerml tedavi etkisini doğrulamıştır. $4,32 \mu\text{g/mL} \geq$ ICG kanser hücrelerini 42°C 'nin üstüne ısıtmak için yeterlidir. Bununla birlikte ICG boyası tek başına kanser dokusunda birikmez ve kandan kolayca temizlenir. Bu durum uygulamada boyanın kullanımını zorlaştırmaktadır. Bahsedilen bu sorun ve kısıtlamalar farklı moleküllerle konjuge edilerek giderilmiştir. Bunun için NP-ICG konjugesi çok iyi bir tercihtir (Wang et al., 2018).

Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada $7,2 \mu\text{g/mL} \geq$ ICG-SPIONP inkübasyonu ve ardından NIR lazer uygulaması sonrası HeLa hücrelerinde hücre canlılığının büyük ölçüde (%5) azaldığı görülmüştür (Ma et al., 2013). Aynı çalışmada fare deneylerinde; ICG-SPIONP uygulamasında tümör dokusunda birikim gözlenirken yalnızca ICG

uygulamasında tümör dokusunda birikim gözlenmemiştir. Bu durum demiroksit nanoparçacıklarının tümör hedeflemede yüksek etkinliğinin iyi bir kanıtıdır.

Peng Xue ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FPPI NP'leri ($Fe_3O_4@PB@PEI$ NPs) ile tedavi edilen fareler, ışınlamadan sonraki 10 dakika içinde tümör bölgesinde $51,7$ °C'lik en yüksek sıcaklığı göstermiştir; bu, serbest ICG ($43,5$ °C) veya PB (prussian blue) NP'leri ($43,8$ °C) ile tedavi edilen farelerdekinden çok daha yüksekti (Xue et al., 2018). Bu kadar güçlü hipertermi, PB bileşeninin verimli fototermal dönüştürme yeteneğine ve iyileştirilmiş ICG kapsüllemesine bağlanmıştır.

Chen Shen ve arkadaşlarının SPIO@DSPE-PEG/DOX/ICG NP'ler ile yaptığı çalışmada fare deneylerinde, serbest ICG'nin floresan sinyalleri, enjeksiyondan 2 saat sonra vücutta gözlenmiş, ardından sinyaller kademeli olarak zamana bağlı azalmıştır ve tümör bölgesinde sinyallerin varlığı gözlenmemiştir (Shen et al., 2019). Buna karşılık, NP grubu için, oluşan dağınık sinyallerin ardından tümörde floresan sinyallerin arttığı gözlemlenmiştir. 24 saatte, floresan sinyalleri çoğunlukla tümörde lokalize olmuş, diğer dokularda veya organlarda yalnızca küçük miktarlarda gözlenmiştir.

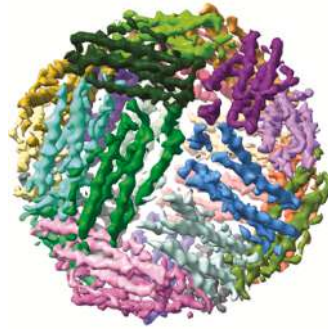
Mingting Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Holo-Tf-ICG'nin (holo transferin- indocyanine green) in vivo hedefleme kabiliyetini doğrulamak için, subkutan ve ortotopik beyin tümörlerinde çift modlu görüntüleme değerlendirilmiştir (Zhu et al., 2017). Subdermal tümörler ~ 60 mm³'e ulaştığında, farelere intravenöz olarak sırasıyla serbest ICG ve holo-Tf-ICG enjekte edilmiştir. Kantitatif analiz, holo-Tf-ICG ile tedavi edilen gruptaki floresan sinyalinin, enjeksiyondan 24 saat sonra serbest ICG ile tedavi edilen grubunkinden 38 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada U87 hücre dizisi üzerinde yapılan fototermal terapide; serbest ICG ve Holo-Tf-ICG karşılaştırıldığında, Holo-Tf-ICG ile yapılan tedavide U87 dizisinde hücre canlılığı ciddi oranda azalmıştır. Bu çalışmalar ICG ile kombine edilen moleküllerle kanser görüntüleme ve tedavisinde daha etkin sonuçlar alındığını göstermektedir.

2.3. Apoferritin Protein Kafesi

Ferritin, çok çeşitli canlı organizmalarda bulunan küresel bir protein kompleksidir. İlk olarak 1937'de Victor Laufberger tarafından at dalağında izole edilmiştir. Proteinin %20' den (w/w) fazla demir içermesi nedeniyle latince demirle ilişkili anlamına gelen "ferratus" kelimesinden türetilerek "ferritin" adı verilmiştir. Demirin oksitlenmesinden ve depolanmasından sorumludur. Tipik olarak ferritin 24

homolog alt birimden oluşur ve her alt birim Fe^{+2} 'yi ferrihidrite dönüştüren aktif bir merkez taşır. Bu alt birimler kendiliğinden demir depolamak için bir kürecik halinde bir araya gelir. Araştırmacılar ferritinin "apoferritin" adı verilen bir protein kaplama ve 4000'e kadar demir atomu içeren inorganik bir mineral çekirdekte oluştuğunu keşfetmiştir. Protein kompleksinin demir içeren formu ferritin, kabuk kısmına ise apoferritin denmektedir (Sudarev et al., 2023).

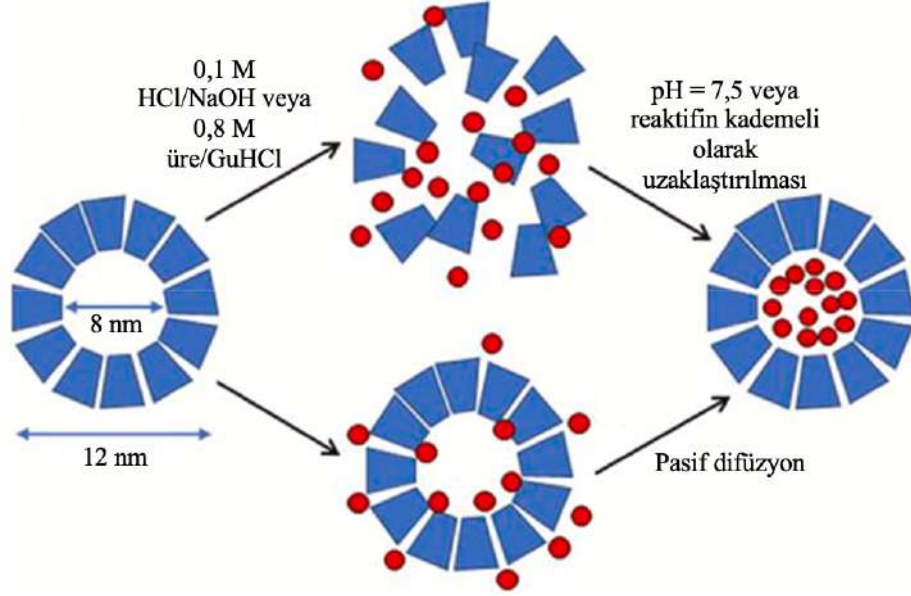
Apoferritin, ferritin proteininin demir içermeyen formudur (Rafipour et al., 2022). 450 kDA molekül ağırlığına sahip olan apoferritin; 24 alt birimden oluşur, dış çapı yaklaşık 12 nm ve iç çapı 8 nm olan içi boş kafes benzeri küresel, son derece düzenli ve stabil bir moleküldür (Ji et al., 2022; Moon et al., 2023). Apoferritinin iç boşluğu küçük moleküler bileşiklerle doldurulabilir (Rafipour et al., 2022). Şekil 12'de apoferritin kafes yapısı verilmiştir.



Şekil 12. Apoferritin proteininin kafes yapısı (Premageetha et al., 2024).

Apoferritin iyi biyoyumluluk ve düşük immünojeniteye sahip doğal bir endojen maddedir. Küçük ve tekdüze bir parçacık boyutu (<30 nm) vardır, bu da onun biyolojik engelleri aşmasına ve derin penetrasyon etkisi oluşturmasını sağlamaktadır (Ji et al., 2022). Apoferritin pH'a duyarlı bir molekül olup geri dönüştürülebilir bir şekilde kendi kendine kapanma özelliğine sahiptir. Güçlü asidik ya da alkalın pH'ta kafes yapı açılır. pH nötr olduğunda eski formuna geri döner (Ji et al., 2022; Tricase et al., 2023). Apoferritin alt birimlerinin asidik pH'ta protonasyon yeteneği, pozitif yüklü bölümlerin oluşturduğu itici kuvvetler nedeniyle zincirlerin ve gözeneklerin parçalanmasına ve bu sayede kafes yapının açılmasına neden olur. Apoferritinin pH'a duyarlı özelliğinden yararlanılarak, yeniden birleştirme işlemi sırasında ortam koşullarını modüle ederek ve apoferritinin açık formunu kapalı forma dönüştürerek ilgilenilen ilaç kapsüllenebilir

(Mollazadeh et al., 2022). Bu benzersiz özelliklerinden dolayı apoferritin ya da demirsiz ferritin, ilaç dağılımı için yaygın olarak kabul edilen bir protein kapsülüdür. Bugüne kadar araştırmacılar, terapötik antikanser ajanlarını kapsüllemek için apoferritin kapsüllerini kullanmıştır (Kuruppu et al., 2022). Şekil 13’ de apoferritin proteininin farklı pH’larda açılıp kapanması ile moleküllerin kapsüllemesi gösterilmiştir.



Şekil 13. Apoferritin proteininin farklı pH’larda açılıp kapanması (Kuruppu et al., 2022).

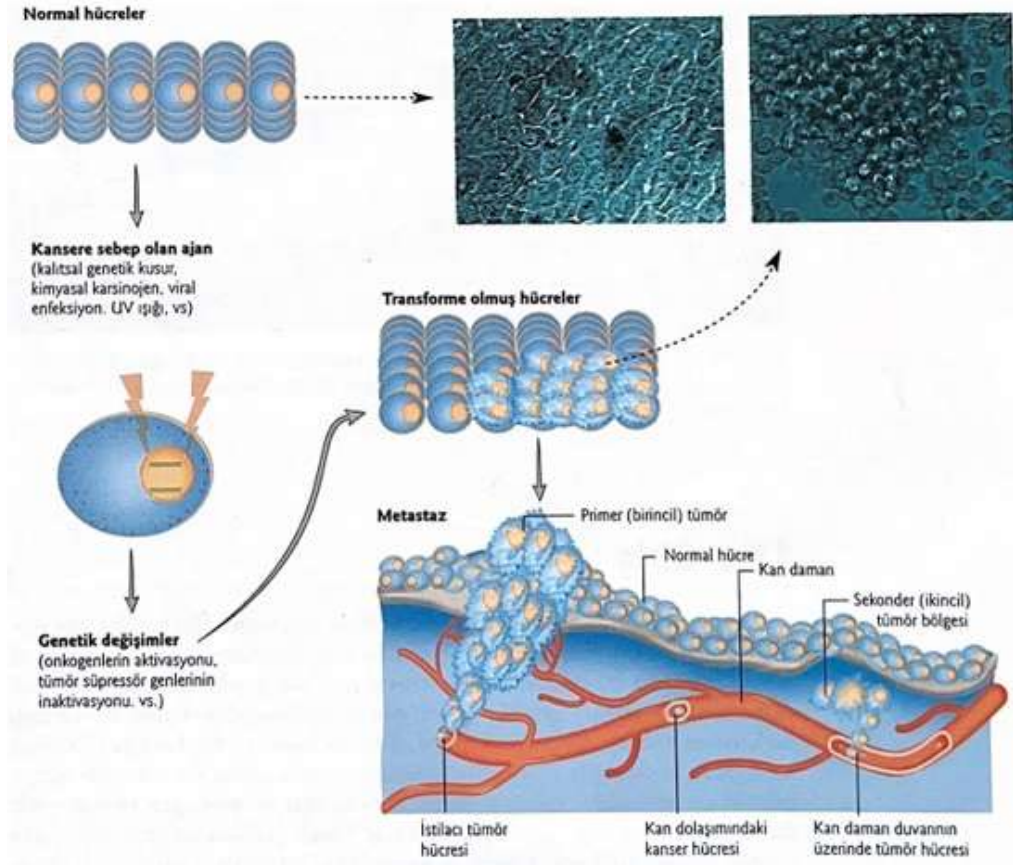
2.4. Kanser

Paleopatolojik bulgular ve antik mumyaların incelenmesi, kanserin tarih öncesi dönemde ortaya çıktığını göstermektedir. Ancak kanserin bilinen ilk yazılı tanımı *Edwin Smith Papirüsü* ve *Ebers Papirüsü*’nde bulunur. *Edwin Smith Papirüsü*, meme kanserinin en eski tanımını içerir ve tedavisi olmadığı sonucuna varır. *Ebers Papirüsü*’nde ise genişlemiş tiroidler, polipler, mide, yutak, rahim, rektum, ve deri tümörleri anlatılmaktadır. Antik çağda, çoğunlukla insan yaşamı yaşlılığa kadar devam etmediğinden kanserin yaygın bir hastalık olmadığı düşünülürken, eski yazılarda diğer malignitelere kıyasla meme kanserinden çokça bahsedilmesi dikkat çekicidir (Hajdu, 2004).

Günümüze gelindiğinde ise kanser, dünya çapında en önemli sağlık sorunudur ve Amerika Birleşik Devletleri’nde ölüm nedenleri arasında ikinci sıradadır (Siegel et al., 2023). İnsanın hayati fonksiyonlarına olumsuz yönde etki ederek bireyin yaşamına tehdit oluşturan anormal hücre popülasyonlarının oluşumu ve büyümesi ile karakterize edilen bir hastalıktır. Kanserin kontrolsüz hücre çoğalmasından kaynaklandığı bilinmesine rağmen, hastalığın ana biyolojik nedeni hala tam olarak anlaşılamamıştır (López-Lázaro,

2018). Normal hücrelerin belli bir düzen içinde gerçekleşen büyüme, bölünme ve ölmek üzere düzenlenmiş yaşam döngüsü vardır. Hücrenin büyümesi, bölünüp çoğalması, farklılaşması ve apoptoz denge içindedir. Nesiller arası aktarılan genetik bir kusur, radyasyon, kimyasal bir karsinojen ya da viral bir enfeksiyon gibi etkenler varlığında bu kritik denge bozularak tümör oluşumu tetiklenir. Hücreler kontrol dışı bölünüp çoğalarak kanser gelişir. Kanserleşme sürecine giren hücrelerde 3 temel değişiklik görülür (Allison, 2020):

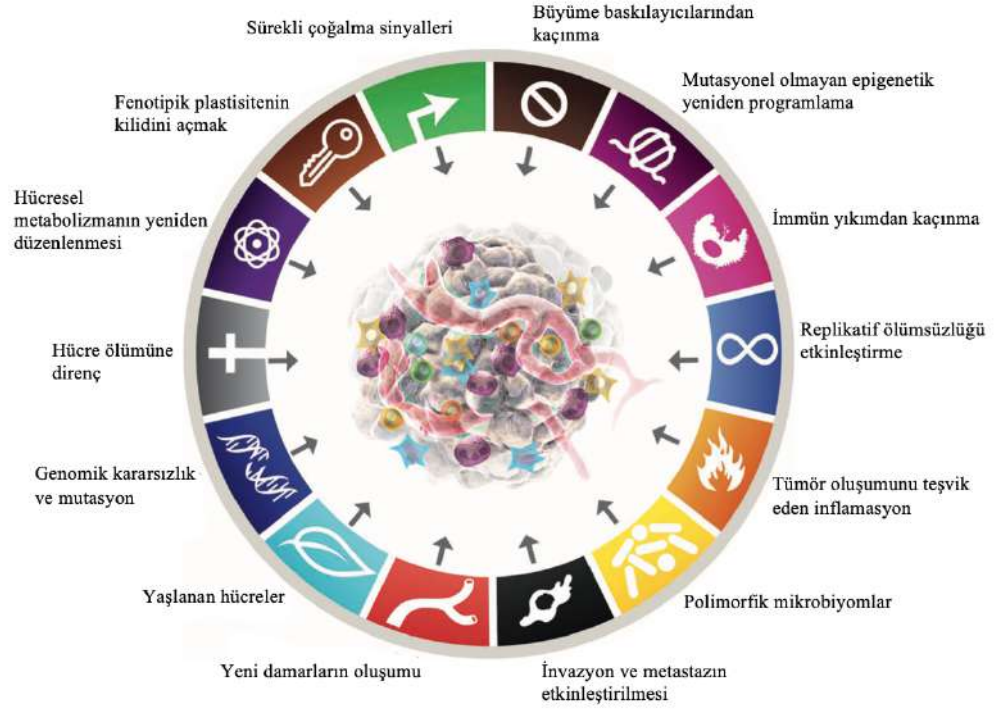
1. Ölümsüzleşme: Kanserleşen hücre sınırsız bölünme ve büyüme yeteneği kazanır (Allison, 2020). Kanserli hücreler hücre dışı matristen (ECM) sinyaller alır; bu da onların hücre organellerini ve DNA'yı onarma yeteneklerini artırır ve böylece apoptoz sinyallerini azaltarak hücre sağ kalımı artar (Weiss et al., 2022). Sürekli ve aşırı hücre bölünmesi yönlendiren sürekli proliferatif sinyaller, kanserin ayırt edici bir özelliğidir (Matthews et al., 2022).
2. Transformasyon: Kanser hücresi, normal büyüme kısıtlamalarından etkilenmez. Yani bölünüp çoğalma ve büyümesi için büyüme faktörlerine ihtiyaç duymaz. Transforme olan hücreler, katı tümörler oluşturabilir (Allison, 2020). Önceden var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşması anlamına gelen ve kanserin ayırt edici bir özelliği olan anjiyogenez sayesinde tümörün büyümesi için gereken kan temin edilir (Rubin et al., 2020).
3. Metastaz: Kanser hücrelerinin primer hastalık bölgesinden çıkıp lenf düğümlerine veya kan dolaşımı yoluyla göç ederek diğer organlara yayılması sürecine metastaz denir (Allison, 2020; Seferbekova et al., 2023). Göç ettikleri bölgelerde çoğalırlar ve normal dokunun yerini alırlar. Örneğin kolon kanseri hücreleri metastaz ile akciğere göç ettiğinde hala kolon kanseri olarak adlandırılır, akciğer kanseri ismini almaz (Allison, 2020).



Şekil 14. Kanser gelişimi (Allison, 2020).

Kanser hakkındaki görüşler son yıllarda değişmiştir. Artık kanserin sadece genetik bir hastalık olmadığı, kanserin başlaması ve ilerlemesi için genetik değişikliklerin gerekli olduğu ancak yeterli olmadığı görüşü hakimdir. Kanser çok çeşitli kanserli olmayan hücreleri ve bunların tümör içindeki sayısız etkileşimini içeren karmaşık bir ekosistem olduğu bilinmektedir (de Visser & Joyce, 2023). Şekil 14’te kanser gelişimi verilmiştir.

Kanserin belli başlı ayırt edici özellikleri vardır. Bu özellikler normal hücrelerin aksine neoplastik büyüme durumlarına doğru ilerleyen insan hücreleri tarafından edinilmiş kötü huylu tümörler oluşturma yetenekleridir. Şekil 15’te yeni eklemelerle birlikte kanserin ayırt edici özellikleri verilmiştir (Hanahan, 2022).



Şekil 15. Kanserinin ayırt edici özellikleri (Hanahan, 2022).

2.4.1. Kanserde Tedavi Yaklaşımları

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler geleneksel ve modern olarak iki kategoriye ayrılabilir. En yaygın kullanılan geleneksel tedavi yöntemleri cerrahi, kemoterapi ve radyoterapidir. Modern yöntemler arasında hormon tedavisi, anti-angiyojenik tedavi, kök hücre tedavileri, immünoterapi ve dendritik hücre bazlı immünoterapi yer almaktadır. Kanser türü, yeri ve ciddiyeti tedavi yönteminin seçilmesinde etkilidir (Debela et al., 2021).

Yirminci yüzyılın başlarında Alman kimyager Paul Ehrlich, bulaşıcı hastalıkların tedavisi için kemoterapi prosedürlerini geliştirmiştir. Eş zamanlı olarak hayvan modelleri üzerinde yapılan bazı deneylerle kemoterapi ilaçlarının kanseri de tedavi edebildiğini keşfetmiştir. Bu çalışmaların öncülüğünde farklı kanserlere karşı ortak kemoterapi yöntemleri geliştirilmiştir. Ne yazık ki kemoterapi ajanlarının spesifik bir anti-tümör aktivitesi yoktur. Sadece kötü huylu hücrelerin kontrolsüz çoğalmasını engellemez, aynı zamanda saç folikülleri, sindirim sistemi epitelyumu ve kemik iliği kök hücreleri gibi hızlı çoğalan hücreleri de etkilemektedir. Normal hücre ve dokularda ciddi yan etkiler ve hasarlar meydana getirir bu nedenle sık kullanılması önerilmez ve yarar-zarar oranının dikkate alınması gerekir (Behranvand et al., 2022). Kemoterapideki bir diğer önemli

sorun başlangıçta anti-kanser ilaç tarafından baskılanan kanser hücrelerinin ilaca karşı direnç geliştirmesidir (Debela et al., 2021).

Radyoterapi kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir tedavi yöntemidir. Vücuttaki kanser hücrelerini hedeflemek ve yok etmek için X-ışınlarını veya protonlar gibi yüksek enerjili radyasyonu kullanır. Kanser hücrelerindeki DNA'ya zarar verir böylece hücrelerin daha fazla büyümesini ve bölünmesini engeller. Birincil tedavi olarak kullanıldığı gibi tedavi etkinliğini arttırmak için cerrahi veya kemoterapi gibi diğer tedavilerle birlikte de kullanılabilir. Radyoterapi, kanser hücrelerinin kesin olarak hedeflenmesine olanak sağlar. Tümörün bulunduğu bölgeleri hedef alarak çevredeki sağlıklı dokulardaki hasarı en aza indirir. Bu, onu özellikle belirli bir bölgeyle sınırlı olan tümörler için yararlı kılar (Chow & Ruda, 2023).

Kanser tedavisinde umut vaadeden tedavi yaklaşımlarına kök hücreler, hedefe yönelik ilaçlar ve gen terapisi yöntemleri örnek olarak verilebilir. Kök hücreler herhangi bir vücut hücresine farklılaşma yeteneğine sahip henüz farklılaşmamış hücrelerdir. Kök hücre tedavi stratejisi güvenli ve etkili olduğu düşünülen kanser tedavi yöntemlerinden biridir. Güvenli ve etkili olup diğer stratejilerle birleştirilebilir olmasına karşın tedavi kalıcı değildir ve potansiyel tümör oluşumu gibi soru işaretleri vardır. Hedefe yönelik ilaçlar, "moleküler hedefli ilaçlar", "moleküler hedefli tedaviler" ve "hassas ilaçlar" olarak da isimlendirilen ilaçlar ya da diğer maddelerdir. Yüksek spesifite etkinliği olmasına rağmen uzun vadeli yan etkiler söz konusudur. Bu ilaçların etki mekanizması büyüme moleküllerine müdahale ederek kanserin büyümesinin ve yayılmasının engellenmesidir. Gen terapisi, belirli bir bozukluğu iyileştirmek için kusurlu bir genin normal bir kopyasının genoma yerleştirilmesidir. Pro-apoptotik, kemosenitizan ve normal tümör baskılayıcı genlerin ekspresyonunun yanında spesifik anti-tümör immün tepkilerini teşvik eden genlerin ekspresyonunu da içerir. Ek olarak onkogenlerin hedeflenen susturulması gibi stratejiler, kanser gen terapisi tedavi stratejisidir (Debela et al., 2021). Bu tedavilere ek olarak fototermal tedavi (PTT), kanser tedavisinde büyük ilgi gören, minimal invaziv, ışığa dayalı bir tedavidir. PTT, protein denatürasyonuna, hücre zarı bozulmasına ve DNA hasarına neden olarak tümör dokusunu yok eder. Fototermal ajanlar (PTA) aracılığıyla ısı üretmek için ışık enerjisini kullanır. PTT'de en sık kullanılan ışık, görünür ışık ve UV ışığına göre daha az saçılımla daha derin dokulara ulaşabilen yakın kızılötesi ışıdır (NIR) (Gowda et al., 2024).

2.4.2. Akciğer Kanseri

Küresel olarak kanser insidansı ve ölümleri artarken, akciğer kanseri toplam vakaların %11,6'sını kapsayarak en sık teşhis edilen kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından iki geniş kategoriye ayrılmaktadır. İlki tüm akciğer kanseri vakalarının %80-85'ini oluşturan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri ve diğeri %15'lik insidansları oluşturan küçük hücreli akciğer kanseridir. Akciğer kanseri ölümlerinin yaklaşık %80'i sigaradan kaynaklanmaktadır. Akciğer kanseri için diğeri risk faktörleri arasında radon, asbest, hava kirliliğine uzun süreli ve kümülatif maruz kalma, polisiklik aromatik hidrokarbon (PAH) emisyonları ve kişisel ya da ailesel akciğer kanseri geçmişi yer alır (Lahiri et al., 2023).

2015-2019 yılları arasında akciğer kanseri insidansı erkeklerde 100.000 kişi başına 64,1 vaka iken kadınlarda 100.000 kişi başına 50,3 vakadır. Kanser insidansı erkeklerde kadınlara göre %27 daha yüksektir. Bunun nedeni, büyük ölçüde erkeklerde 25 kat daha fazla sigara içme prevalansıdır. Ölüm oranlarına bakıldığında ise 2016-2020 yılları arasında erkeklerde 100.000 kişi başına 42,2 iken kadınlarda bu oran 39,3'tür (Kratzer et al., 2024)

2.4.2.1. Akciğer Kanseri Hücre Hattı

Akciğer kanseri hücre hattı (A549) küçük hücreli olmayan akciğer kanseri türüdür (Sorrenti et al., 2021). İnsan alveoler hücreli karsinomdan türetilmiştir. İnsan akciğer kanseri modeli olarak araştırmalarda kullanılmaktadır (Jiang et al., 2010).

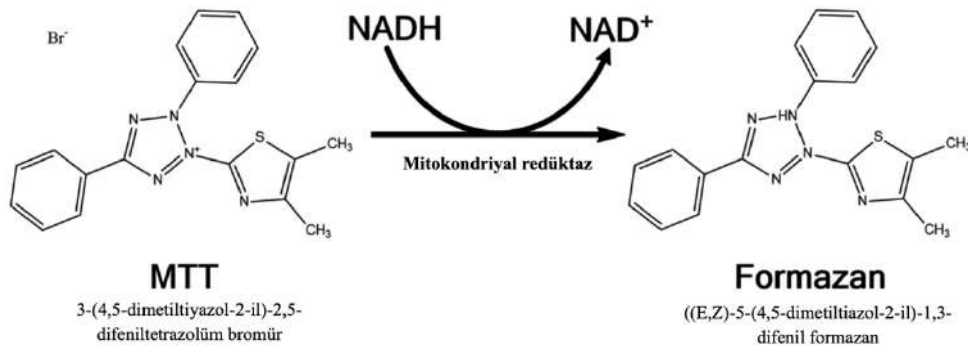
2.4.3. Sitotoksosite

Sitotoksosite, toksik ajanların neden olduğu hücre hasarının ve ölümünün bir ölçüsüdür. Sitotoksosite analizleri, toksik ajanların neden olduğu hücre hasarının veya ölümün boyutunun tespit edilmesine odaklanır. Bu analizler bir maddenin doğrudan etkileri hakkında bilgi sağlarken aynı zamanda bir ilacın veya bileşiğin farklı hücre tipleri için seçiciliğini belirlemek amacıyla da kullanılır (Sukumaran et al., 2023). Sitotoksosite testlerinin sürekli gelişmesiyle birlikte morfolojik değişikliklerle hücre hasarının saptanması, hücre hasarının belirlenmesi, hücre büyümesinin ve metabolik özelliklerinin ölçülmesi gibi yöntemler ortaya çıkmış ve kalitatif değerlendirmeden kantitatif değerlendirmeye doğru bu testler gelişmiştir (Li et al., 2015). Bu testler hücre zarı geçirgenliği, enzim aktivitesi, koenzim üretimi, hücre yapışması, ATP üretimi ve

nükleotid alım aktivitesi gibi hücrenin hayatta kalması için gerekli fonksiyonları değerlendiren MTT, XTT, WST-1, MTS ve Alamar Blue testleri gibi testlerdir. En uygun test yönteminin seçimi hücrelerin tipine ve miktarına, hücre ölüm mekanizmasına, test yönteminin maliyetine ve karmaşıklığına göre yapılır (Carreño et al., 2021).

2.4.3.1. MTT Hücre Canlılık Testi

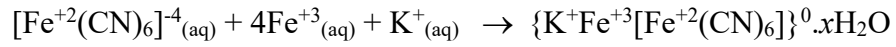
MTT testi, 1983'te Mosmann tarafından geliştirilen hücre çoğalmasını ve hayatta kalmasını ölçen basit kolorimetrik bir testtir (Kamiloglu et al., 2020). Testte kullanılan MTT reaktifi (3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolüm bromür) pozitif yüklü bir mono-tetrazolyum tuzudur. İki fenil kısmı ve bir tiyazolil halkası içerir. Dört nitrojen atomu bu üç aromatik halka ile çevrelenmiştir. MTT reaktifi, pozitif yükü ve lipofilik yapısı nedeniyle canlı hücrelerin zarından ve mitokondriyal iç zardan geçebilir (Ghasemi et al., 2021). Süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçerek hücre canlılığını belirler. MTT testinde 3-(4,5-dimetiltiyazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolüm bromür, NADH tarafından mor bir formazan tuzuna indirgenir (Larramendy, 2018). Spesifik olarak MTT, yalnızca metabolik olarak aktif hücrelerde çalışır (Marques et al., 1995). Çünkü ölü hücrelerin tetrazolüm tuzlarını renkli formazana indirgeyecek enzim aktiviteleri yoktur (Kamiloglu et al., 2020). Hüresel canlılığın değerlendirilmesi için oluşan tuzun 570 nm'de ölçülmesi gerekir (Carreño et al., 2021). Oluşan formazan tuzu suda çözünmez. Absorbans ölçülmeden önce formazan tuzlarını çözmek için dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropanol gibi bir organik çözücü ile muamele etmek gerekir (Larramendy, 2018).



Şekil 16. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi (Kamiloglu et al., 2020).

2.4.3.2. Hücre İçine Alımın Görüntülenmesi Prusya Mavisi Boyama

Prusya mavisi ilk kez 18. yüzyılın başlarında Berlinli bir sanatçı olan Diesbach tarafından keşfedilmiştir. Resim sanatı tarihinde derin bir etkiye sahip olan prusya mavisi ilk sentetik boyadır (Qin et al., 2018). Kimyasal olarak demir mavisi diye bilenen prusya mavisi genellikle ferrik (Fe^{+3}) iyonlarının ve ferrosiyanür ($[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]^{4-}$) iyonlarının reaksiyonuyla sentezlenir (Barman & Nanda, 2019; Sanghvi et al., 2024). $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ veya $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ yaygın olarak Fe^{+3} veya Fe^{+2} 'yi indirgeme ya da asidik çözeltide oksitlenme öncüsü olarak kullanılır (Qin et al., 2018).



Yukarıdaki denklemde prusya mavisinin sentez reaksiyonu verilmiştir (Sanghvi et al., 2024). Reaksiyon sonucu oluşan demir (III) ferrosiyanür ($\text{Fe}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]_3$) bileşiği mavi renklidir ve prusya mavisi olarak adlandırılmaktadır (Barman & Nanda, 2019). Yapıya bağlı olarak çözünmeyen ($\text{Fe}_4^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) ve çözünür ($\text{KFe}^{+3}[\text{Fe}^{+2}(\text{CN})_6]$) olarak ikiye ayrılabilir (Qin et al., 2018).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan gerekli kimyasallar firma ismi - Cas numarası ve özellikleriyle birlikte Tablo 2’de; kullanılan cihazlar ise Tablo 3’te marka ve modelleriyle birlikte verilmiştir. Tez kapmasında yapılan çalışmalarda Millipore su arıtma sisteminden temin edilen deiyonize su kullanılmıştır.

Tablo 2. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Firma İsmi - Cas Numarası:	Özellik
Demir (III) klorür heksahidrat	Chemsolut, Cas-No: 10025-77-1	FeCl ₃ .6H ₂ O Mw: 270,33 g/mol
Demir (II) klorür tetrahidrat	Sigma-Aldrich, Cas-No: 13478-10-9	FeCl ₂ .4H ₂ O Mw: 198,81 g/mol
Sodyum Hidroksit	İsolab, Cas-No: 1310-73-2	NaOH Mw: 40,00g/mol
Amonyum hidroksit	Sigma, Cas-No: 1336-21-6	NH ₄ OH Mw: 35,05 g/mol
HCl	İsolab, Cas-No: 932.103.2501	HCl Mw: 36,5 g/mol, %37
Etanol	İsolab, Cas-No: 64-17-5	C ₂ H ₆ O Mw: 46,07g/mol
Fosfat Tampon Çözeltisi - PBS	Sigma, D5652	10X, 1L
Fetal sığır serumu -FBS	Pan Biotech, Cas-No: P30-3303	1X, 100 mL
Triphan Mavisı	Sigma, Cas-No: 03-102-1B	1X, 100 mL
3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid - MTT	Sigma, M5655	≥ % 97,5
DMEM/Ham’s F-12	Capricorn,	L-Glutamin ile
DMEM-High Glucose	Capricorn,	L-Glutamin ile
Dimetilsülfoksit -(DMSO)	Applichem-Honeywell Cas No: 67-68-5	C ₂ H ₆ OS Mw: 78.13 g/mol
Potasyum ferrosiyandır trihidrat	Sigma-Aldrich, Cas-No: 14459-9-1	K ₄ Fe (CN) ₆ .3H ₂ O ≥ %98,5
Tripsin/EDTA	Sarorius, Cas-No:03-053-1B	1X, 100 mL
Nükleer fast red alüminyum sülfat çözeltisi	Merck, Cas -No:	%0,1 92 g/L
Tetramethylammonium hydrdoxide	Thermo Scientific, Cas - No: 75-59-2	%25 in water

Apoferritine	Sigma, Cas – No: 99013-31-4	54 g/mol
PBS Tablets		1X, 100 mL
Penicilin/Streptomycin Solution	Capricorn Scientific Cas - No:	100X
İndosiyanin yeşili	BLDpharm, Cas - No: 3599-32-4	Safılık: %98

Tablo 3. Tez çalışmasında kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka-Model
Hassas Terazi	Radwag AS 220.R2
Ph Metre	Mettler Toledo FiveEasy
Ultrasonik Banyo	Elmesonic S
Santrifüj	Nüve NF 800R
Vorteks	Multi-Vortex V-32
UV-Vis spektrofotometre	Agilent Technologies Cary 60
ICP-MS	Agilent Technologies 7900
XRD	PANalytical EMPYREAN
TEM	FEI 120kV CTEM
ZETA Potansiyeli Ölçümü	Micromeritics-Nanoplus 3
STEM	ZEISS Gemini SEM 500
FESEM	ZEISS Gemini SEM 500
FTIR	Thermo Scientific-Nicolet İS20
Ters (inverted) Mikroskop	Carl Zeiss 415510-1101-000
ELISA Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan Sky High
Etüv	Esco-CCL-170B-8
VSM	Cryogenic Limited PPMS

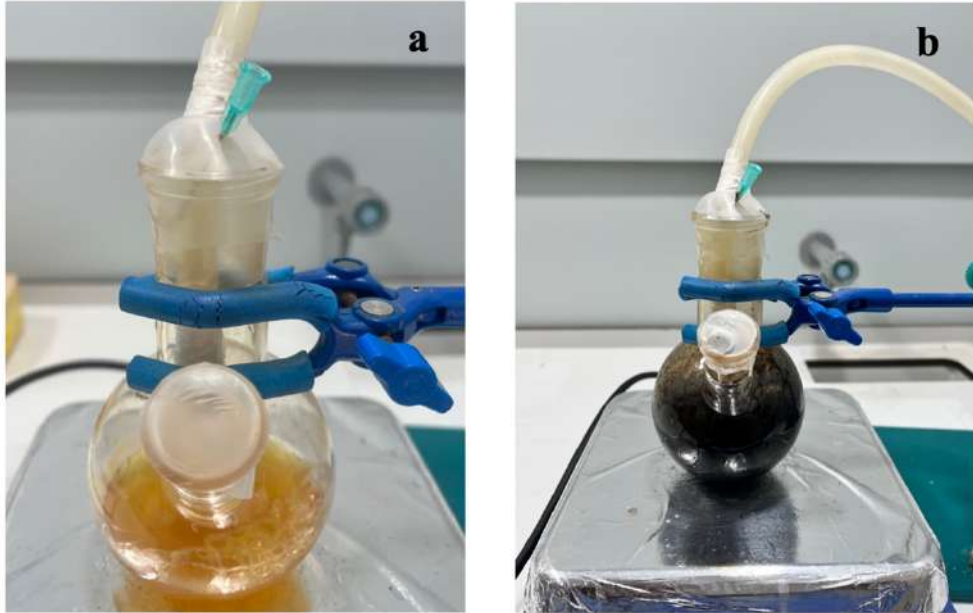
3.2. Demir Oksit Nanoparçacıkların Sentezi

Manyetik demir oksit nanoparçacıkları birlikte çöktürme (co-precipitation) yöntemi ile oda sıcaklığında sentezlenmiştir. Bunun için Fe^{3+} ve Fe^{2+} kaynağı olarak, demir (III) klorür heksahidrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ve demir (II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) tuzları kullanılmıştır. 0,125 M demir (III) klorür heksahidrat ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) ve 0,0625 M demir (II) klorür tetrahidrat ($FeCl_2 \cdot 4H_2O$) çözeltileri oksijeni N_2 gazı geçirilerek uzaklaştırılmış deiyonize su ile hazırlanmıştır ve çözeltiler balon jode karıştırılmaya bırakılmıştır. Reaksiyon boyunca çözünmüş O_2 'nin uzaklaştırılma işlemi, çözeltiden sürekli N_2 gazı geçirilerek yapılmıştır. Birlikte çöktürme yönteminde demir oksit nanoparçacık sentezi Fe^{3+} ve Fe^{2+} iyonlarının bazik ortamda çökmesi ile gerçekleştiğinden çözeltiye NH_3 eklenerek, çözelti pH'sı 11 olarak ayarlanmıştır (Denklem 1). Çözelti karışımı başlangıçta sarı renkte iken, nanoparçacık oluşumu ile ani

renk değişimi gözlemlenmiştir, siyah renkte demir oksit nanoparçacıklarının oluşumu ile reaksiyon 1 saat daha karıştırılmaya bırakılmıştır (Şekil 17).



Denklem 1. Bazik ortamda Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının demir oksit formunda çökme reaksiyonu.



Şekil 17. a. Demir (III) klorür heksahidrat ve demir (II) klorür tetrahidrat çözelti karışımı b. Sentezlenen demir oksit nanoparçacık süspansiyonu.

Reaksiyonun ardından ortamda kalan fazla reaktifi uzaklaştırmak ve nanoparçacıkların saflaştırılması için yıkama işlemine ihtiyaç vardır. Bunun için balon jodedeki çözelti behere alınmıştır. Mıknatıs kullanılarak nanoparçacıkların çökmesi sağlandıktan sonra çöken nanoparçacıkların ardından süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Çökeleğe 50 mL deiyonize su eklenerek tekrar süspansiyon haline getirilmek üzere karıştırılmıştır. Ardından, nanoparçacıklar mıknatısla tekrar çöktürülerek, süpernatant ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Yıkama işlemi bu şekilde 3 kez

tekrarlanmıştır (Şekil 18). En son çöktürme işleminin ardından nanoparçacıklar pH=11 olarak hazırlanan 150 mL deiyonize su içinde çözülmüştür.



Şekil 18. Nanoparçacıkların yıkama ile saflaştırılması.

Nanoparçacıkların sulu ortamda kararlılığını sağlamak için, tetramethylammonium hydroxide (TMAOH) içinde çözerek, yüzey yükü negatif yapılmıştır. 15 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırılan nanoparçacıklara, %12.5' lik tetramethylammonium hydroxide çözeltisi, 3:2 (nanoparçacık sulu süspansiyonu: TMAOH) oranında olacak şekilde ultrasonik banyo içinde damla damla eklenmiş ve 1 saat ultrasonikasyon işlemi yapılmıştır.

3.3. Demir Oksit Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

Demir oksit nanoparçacıkların karakterizasyonunda kullanılan yöntemlere göre, nanoparçacık süspansiyonu ya da süspansiyonun etüvde 80 °C' de kurutulup nanoparçacık toz formu kullanılmıştır.

Demir oksit nanoparçacıkların oluşumu UV-Vis Spektroskopisinde (Agilent Technologies Cary 60) absorbans bandının takibi ile karakterize edilmiştir. Nanoparçacık şekil-boyut analizi için, STEM (ZEISS Gemini SEM 500) görüntüleri alınmıştır. Bunun için analiz öncesi, 10 µL nanoparçacık süspansiyonu bakır grid üzerine damlatılıp kurutulmuştur. Nanoparçacık içeriğinin analizi için nanoparçacık süspansiyonundan 10-20 µL alınıp karbon bant üzerine damlatılmış ve kurutulup 4.30 nm kalınlıkta iridyum kaplama yapılarak Taramalı Elektron Mikroskopu (FESEM- ZEISS Gemini SEM 500) cihazında EDX (Enerji Dağılım X-Işını) analizi yapılmıştır. Nanoparçacıkların XRD analizi (PANalytical EMPYREAN) $2\theta = 10-100$ derece aralığında yapılmış ve nanoparçacığın kristal yapısı aydınlatılmıştır. Yapısal analiz için Fourier-dönüşümlü kızılötesi (Thermo Scientific-Nicolet IS20) analizi yapılmış ve fonksiyonel gruplar

belirlenmiştir. Nanoparçacık yüzey yükü zeta potansiyeli ölçüm cihazı (Micromeritics-Nanoplus 3) ile yapılmıştır. Nanoparçacığın manyetik özellikleri ± 1 T manyetik alan aralığında Titreşimli Örnek Manyetometrisi (VSM-Cryogenic Limited PPMS) cihazı ile ölçülmüştür. Nanoparçacık örneklerinde Fe elementinin kantitatif tayini, İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektroskopisi (ICP-MS) cihazı (Aligent Technologies 7900) ile yapılmıştır. Örnekler analiz edilmeden önce derişik HCl ile parçalanmıştır ve ardından deiyonize su ile uygun seyreltmeler yapılmıştır.

3.4. Demir Oksit Nanoparçacıkların ve ICG Molekülünün Birlikte Apoferritin Kafesine Enkapsülasyonu

Apoferritin proteininin $\text{pH} < 3$ ve $\text{pH} > 10$ ortamlarında alt birimlerine ayrışıp $\text{pH} = 7$ ortamında tekrar birleşme (disassemble/reassemble) özelliğinden faydalanılarak, sentezlenen demir oksit nanoparçacıkların ve aynı çözelti ortamındaki ICG molekülünün enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacık süspansiyonundan 1 mL alınarak, reaksiyon ortamındaki apoferritin derişimi (2, 2.5, 3 mg/mL) ve 1mg/mL olarak hazırlanan ICG çözeltisinin eklenen miktarı (10-100 μL) ve reaktiflerin eklenme sırası optimize edilmiştir. Ayrıca, reaksiyonlar manyetik karıştırıcıda ve ultrasonik banyoda tekrarlanmıştır. Protein kafesine enkapsüle edilemeyen nanoparçacık ve ICG molekülü kısa süre içerisinde (1 saat-24 saat) aglomere olup çökme eğilimi göstermektedir. Kararlı süspansiyon halindeki tüm reaksiyonlardaki enkapsülasyon verimi ICG molekülü üzerinden; enkapsüle edilen ICG molekülünün UV-Vis Spektroskopisi ile absorbans bandının takip edilmesiyle belirlenmiştir (780 nm).

Optimize edilmiş enkapsülasyon reaksiyonunda; 1 mL demir oksit nanoparçacık süspansiyonu ($\text{pH} = 11$) üzerine 50 μL ICG (1mg/mL) çözeltisi damla damla eklenip manyetik karıştırıcıda 15 dk karıştırılmıştır. Karışım üzerine apoferritin çözeltisinden (2,5 mg/mL) 1 mL eklenerek 30 dk karıştırılmaya bırakılmıştır. Daha sonra karışıma 1 M HCl damla damla eklenerek, karışım pH 'sı 7' ye getirilmiştir. Karışım 60 dk karıştırılmaya bırakılmıştır. Ardından çöken nanoparçacıklar mıknatis yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Enkapsüle edilen demir oksit nanoparçacıklarının manyetik özelliği nedeniyle, elde edilen nanoparçacık magnetoferritin olarak adlandırılmıştır. Protein aynı zamanda ICG molekülü de taşıdığından adlandırma, MagF-ICG (ICG Yüklü Magnetoferritin) olarak yapılmıştır.

Enkapsülasyon reaksiyonu sonrasında, apoferritin nanokafeslerine kapsüllenmeden reaksiyon ortamında kalan ICG'nin ortamdaki uzaklaştırılması için saflaştırma işlemi diyaliz yoluyla gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacıklar diyaliz poşetine alınarak (MWCO: 12-14 kDa), 24 saat boyunca 1L, 0,1 M PBS tamponuna (pH: 7,4) karşı diyaliz edilmiştir. Diyaliz Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (BİTAM) bünyesindeki soğuk odada (+4 °C) karanlık ortamda ve çözelti kabının alüminyum folyo ile kapatılmasıyla yapılmıştır.

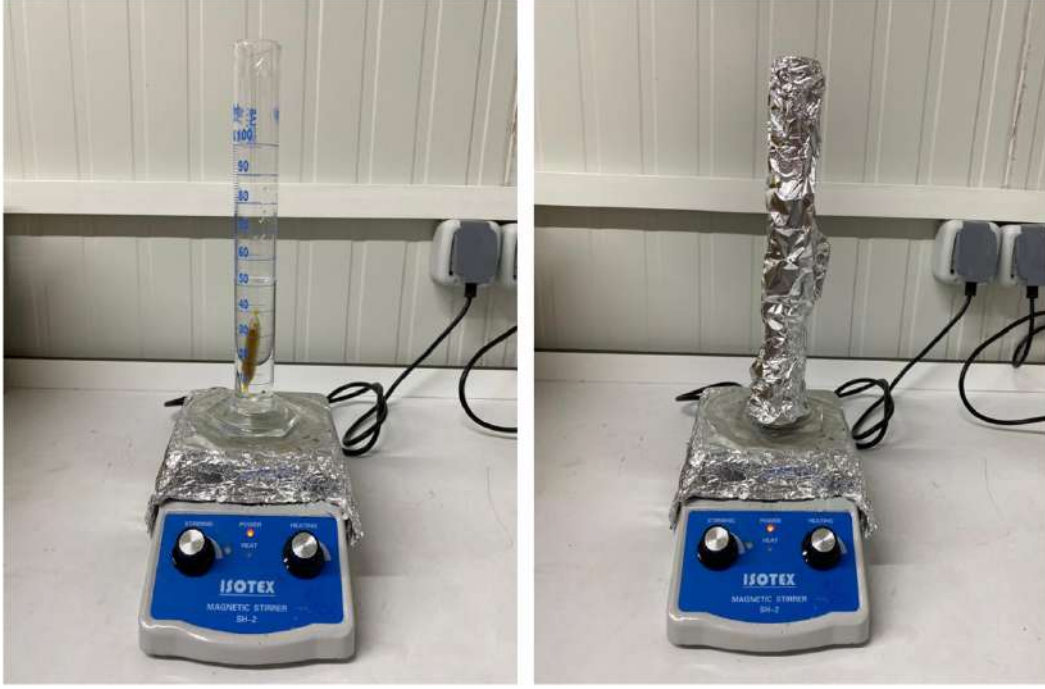
3.4.1. İndosiyanın Yeşili Stabilite Çalışmaları

Apoferritin proteininin hem asidik (pH<3) hem de bazik (pH>10) ortamlarda ayrışabilme özelliği bulunmaktadır ve her iki ortamda da enkapsülasyon yapılabilmektedir. Yalnız ICG molekülünün yapısının bozulmadığı pH değeri önemlidir. 1 mg/mL ICG, pH=1,3,5,7,9,11,13 PBS tampon ortamında çözülmüştür ve çözeltilerin UV-Vis spektrumları kaydedilmiştir.

ICG floresan aktif bir moleküldür, dolayısıyla gün ışığı ile de aktive olup sonrasında sönmelenme süresi bulunmaktadır (Lajunen et al., 2018). Enkapsülasyonunun ICG yarı ömrüne etkisinin incelenmesi için, ışık stabilizasyon deneyleri yapılmıştır. MagF-ICG nanoparçacık süspansiyonu ve serbest ICG (1 mg/mL) çözeltisi 120 saat boyunca laboratuvar ortamında ışığa maruz bırakılarak; 0. saat, 24. saat, 48. Saat, 72. Ve 120. saatlerdeki UV-Vis spektrumları kaydedilmiştir.

3.4.2. ICG Salınımı Deneyi

ICG salınımı, fizyolojik ortam pH'sında ve kanser mikroçevresinin asidik olmasından dolayı asidik pH'da, diyaliz yöntemi ile takip edilmiştir. MagF-ICG nanoparçacık örnekleri, hem 50 mL, 0.1 M PBS (pH: 7.4) hem de 50 mL, 0.1 M PBS (pH: 5.0) tamponlarına karşı 72 saate kadar diyaliz edilmiştir. Başlangıçta, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48. ve 72. saatte diyaliz çözeltisinden alınan örneklerin UV-Vis spektrumları kaydedilmiştir.



Şekil 19. MagF-ICG nanoparçacıklarının diyalizi.

3.5. Hücre Kültürü

In vitro çalışmalarda kullanılacak olan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri (A549) ve fare fibroblast (L929) hücre hatları, ATCC' den (Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu) alınmıştır. Hücre kültür kapları içerisinde %10 Fetal Bovine Serum (FBS) ve %1 Penisilin/Streptomisin içeren besiyerinde (DMEM/Ham's F-12 with L- Glutamine ve DMEM High Glucose with L- Glutamine) 37 °C'de, %95 nem ve %5 CO₂ içeren hepa filtreli inkübatörde çoğaltılmıştır.

3.5.1. Sitotoksosite Deneyleri

Hücre sitotoksosite çalışmaları lazer uygulamalı (770 nm) ve lazer uygulamasız olarak A549 ve L929 hücre hatlarında nanoparçacık uygulaması yapılarak gerçekleştirilmiştir.

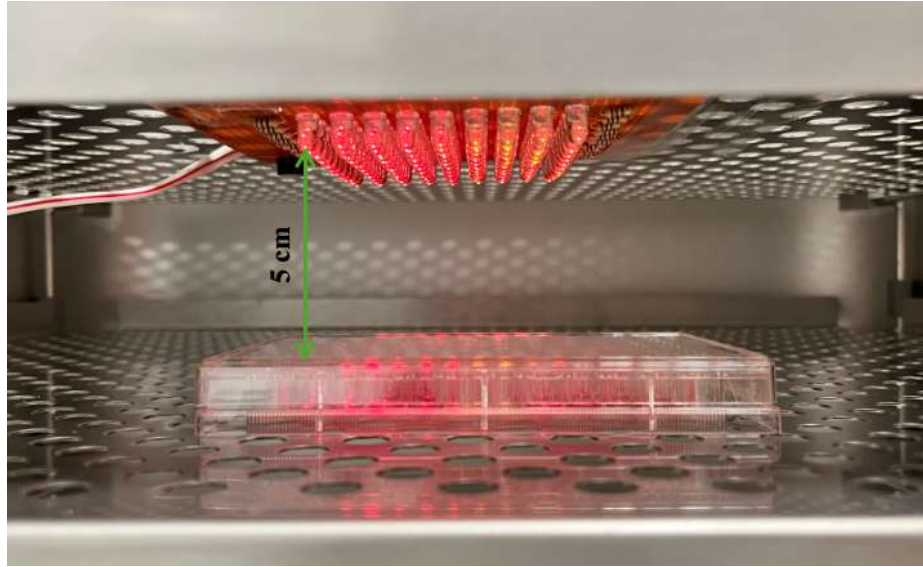
Hücre kültür kaplarında %70-80 konfluensiye ulaşan hücreler, tripsin/EDTA muamelesiyle kaldırılarak thoma lamında tripan mavisi ile boyanarak hücre sayımı yapılmıştır. Sayım işleminin ardından 96 kuyucuklu hücre kültürü kaplarına her bir kuyucukta 5×10^3 hücre olacak şekilde ekim yapılmıştır. 100 µL/kuyucuk olarak ekim yapılan hücreler bir gece hepa filtreli inkübatörde kültüre edilmiştir. Bir gece inkübasyonun ardından, A549 ve L929 hücre hatlarında, 3 farklı derişimde (55,3 ppm; 110,6 ppm; 221,2 ppm) nanoparçacık uygulaması yapılmıştır. Hücre hatları 24 ve 48

saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda, her bir kuyucuk üzerine 10 µL 3-(4,5-dimetiltiyazol2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum-bromür (MTT, 5mg/mL) reaktifi eklenerek, 3 saat boyunca 37 °C'de, %95 nem ve %5 CO₂ içeren hepa filtreli inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından kuyucuklarda bulunan besiyeri uzaklaştırılıp oluşan formazan tuzunu çözmek amacıyla 100 µL dimetil sülfoksit (DMSO) ilave edilerek 20 dk boyunca inkübe edilmiştir. Hücrelerin optik yoğunluk (OD) değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülmüştür. Tüm deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde ve kontrol grupları kullanılarak uygulanmıştır.

Sitotoksisite çalışmalarında lazer uygulamalı olarak ikinci bir deneysel çalışma yapılmıştır. A549 ve L929 hücre hatları, lazer uygulaması yapılmayan deney grubu ile aynı koşullarda çoğaltılıp aynı miktar hücre (5x10³/kuyucuk) 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına ekilmiştir. Aynı şekilde, 100 µL/kuyucuk olarak ekim yapılan hücrelerin bir gece hepa filtreli inkübatörde tutunmaları sağlanmış ve inkübasyonun ardından A549 ve L929 hücre hatlarında, 3 farklı derişimde (55,3 ppm; 110,6 ppm; 221,2 ppm) nanoparçacık uygulaması yapılmıştır. Nanoparçacık uygulamasının ardından hücreler 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından hücre hatları 15 dakika 770 nm lazer ışını ile hepa filtreli inkübatörde muamele edilmiştir. Lazer ışını uygulamasının ardından 24 ve 48 saat inkübasyon yapılmıştır. 24 saat sonra 96 kuyucuklu kültür kaplarından birine MTT prodesürü uygulanırken diğer kültür kabına 2. kez 15 dk 770 nm lazer uygulaması yapıp 48. saatte MTT prodesedürü uygulanmıştır. Hücrelerin optik yoğunluk (OD) değerleri 570 nm dalga boyunda ELISA okuyucuda ölçülmüştür.

$$\text{Hücre Canlılığı (\%)} = \frac{\text{Örnek (OD)}}{\text{Kontrol (OD)}} \times 100 \quad \text{Eşitlik 1.}$$

Deney gruplarındaki hücre canlılığı Eşitlik 1.'deki formül kullanılarak hesaplanmıştır.



Şekil 20. Hepa filtreli inkübatörde nanoparçacık muamele edilmiş hücre hatlarına lazer ışını uygulaması.

3.5.2. Hücre İçine Alınan Demir Oksit Nanoparçacıkların Görüntülenmesi

A549 ve L929 hücre hatları 6 kuyucuklu plakalarda, her bir kuyucukta 1×10^5 hücre olacak şekilde ekim yapılarak bir gece inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 2 farklı derişimde (110,6 ppm; 221,2 ppm) nanoparçacık süspansiyonu ile 6 saat boyunca muamele edilmiştir. 6 saatin sonunda ortamdaki besiyeri uzaklaştırılıp hücre dışında kalan nanoparçacıkların uzaklaştırılması için, hücreler 2 kez fosfat tamponu (PBS, pH = 7,4) ile yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra hücreler %4'lük formaldehit ile fikse edilip oda sıcaklığında 20 dk inkübe edilmiştir. Daha sonra formaldehit uzaklaştırılıp 3 kez PBS (pH = 7,4) ile yıkanmıştır. Sonrasında boya solüsyonu hazırlama işlemine geçilmiş ve bu esnada hücreler PBS içinde bekletilmiştir. Boyama çözeltisi; %5'lik potasyum ferrosiyandır çözeltisi ve %5'lik HCl çözeltisinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla, boyama işlemi yapılmadan hemen önce hazırlanmıştır. 1 mL boyama çözeltisi hücrelere uygulanıp oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından hücreler 2 kez PBS (pH = 7,4) ile yıkanmıştır. Ardından bir çekirdek boyası olan, ~1 ml nükleer fast red alüminyum sülfat hücrelere eklenerek 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Ardından 2 kez PBS (pH = 7,4) ile yıkanıp 40X objektifte görüntülenmiştir.

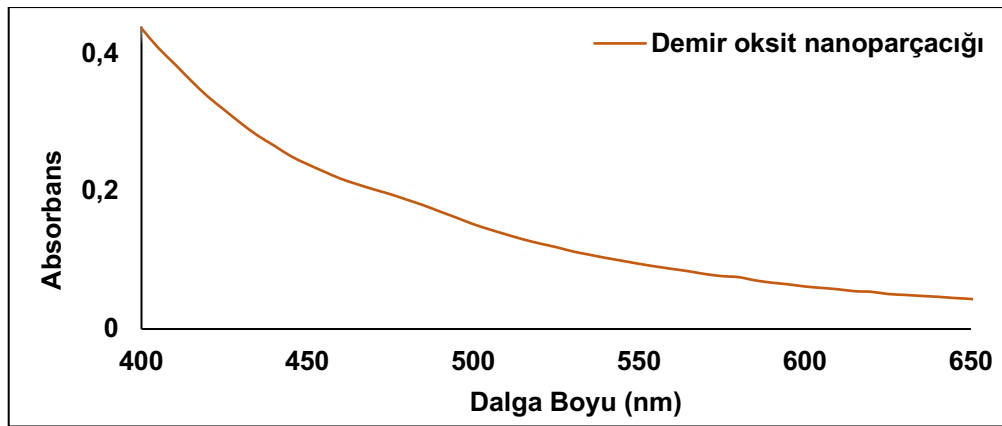
3.6. İstatistik Analizler

İstatistik analizler GraphPad Prism (Version 10.2.3) programı kullanılarak; iki yönlü varyans analizi (ANOVA) ile yapılmıştır. $p < 0,05$ istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir. Değerler ortalama \pm standart hata (S.E) olarak ifade edilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Nanoparçacık Oluşumunun UV-Vis Spektroskopisi ile Takip Edilmesi

Demir oksit nanoparçacıkları, Uv-Vis spektrumunda 400-500 nm dalga boyu aralığında spesifik bir tepe noktası olmadan sürekli absorpsiyon göstermektedir (Sirdeshpande et al., 2018). Şekil 21’de birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenen demir oksit nanoparçacıkların UV-Vis spektrumu verilmiştir.

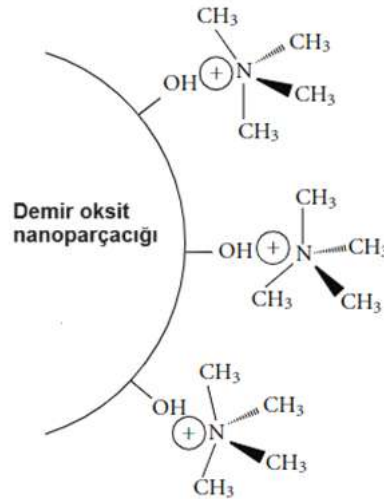


Şekil 21. Demir oksit nanoparçacıklarının UV-Vis absorpsiyon spektrumu.

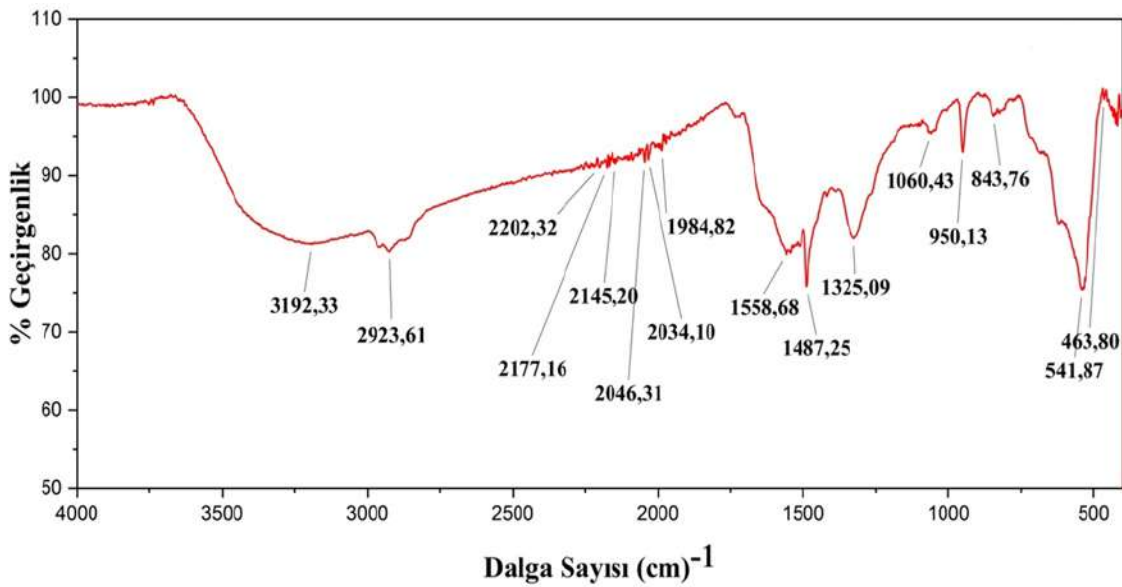
4.2. Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

4.2.1. FT-IR Spektroskopik Analizi

Şekil 22’de tetrametil amonyum hidroksit ile yüzeyi stabilize edilmiş demir oksit nanoparçacıklarının açık yapısı verilmiştir. Nanoparçacıklara ait Fourier-dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisi ile 400-4000 cm^{-1} spektral aralıkta FTIR spektrumu alınmıştır (Şekil 23).



Şekil 22. Tetrametil amonyum hidroksit ile stabilize edilmiş demir oksit nanoparçacık yüzeyi (Andrade et al., 2012).



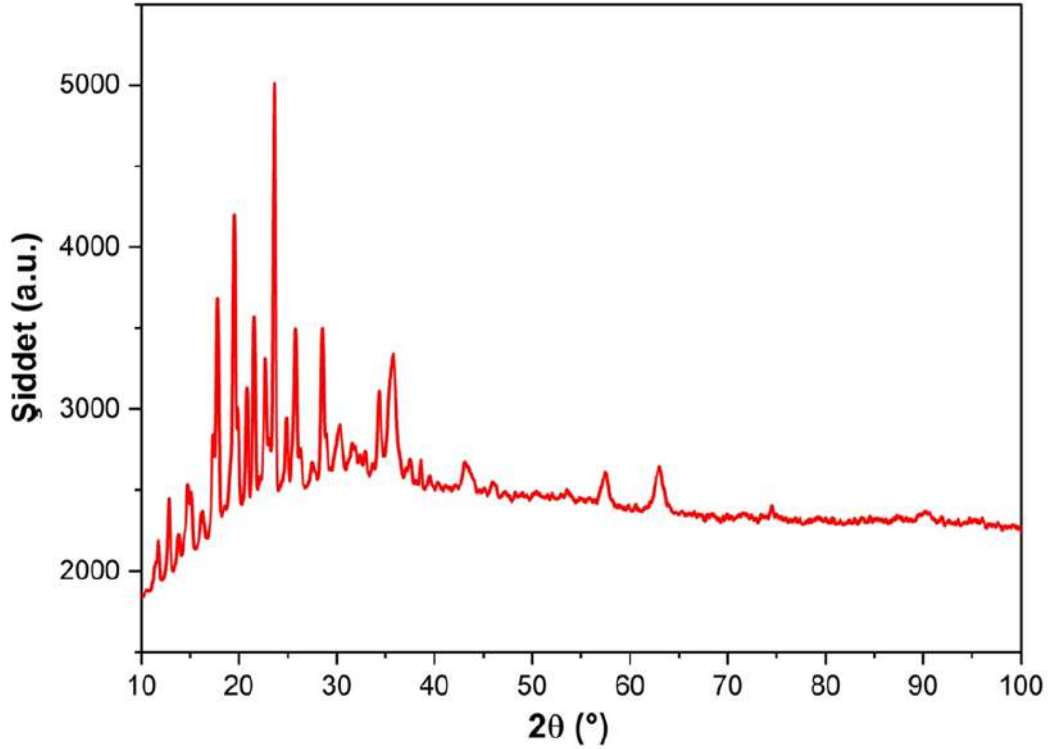
Şekil 23. TMAOH ile stabilize edilmiş demir oksit nanoparçacıklarının FTIR spektrumu.

FTIR spektrumundaki 400 ile 600 cm^{-1} arasındaki bantlar Fe-O gerilme titreşimleriyle ilişkilendirilmektedir (Sirdeshpande et al., 2018, Stoia et al., 2016). Nanoparçacıkların boyut ve yüzey bağlarından dolayı dalga sayılarında kaymalar görülebilmektedir (Amuanyena et al., 2019). Spektrumda 541,87 cm^{-1} de görülen keskin band demir oksit nanoparçacıklarına varlığını göstermektedir. TMAOH molekülüne ait fonksiyonel gruplar spektrumda gözlemlenmiştir; 950, 13 cm^{-1} de ortaya çıkan band C-N asimetrik titreşime karşın gelmektedir; 1490 cm^{-1} de ortaya çıkan band asimetrik metil deformasyonuna karşın gelmektedir (Andrade et al., 2012). 2923, 61 cm^{-1} de ortaya çıkan

band C-H gerilme titreşimine karşın gelmektedir (Gerona et al., 2019). 3192,33 cm^{-1} deki band ise O-H gerilme titreşimine karşın gelmektedir (Sathiyaraj et al., 2021).

4.2.2. XRD Analizi

Nanoparçacıkların kristal yapısını ortaya çıkarmak amacıyla XRD analizi yapılmıştır. XRD spektrumu Şekil 24'te verilmiştir.

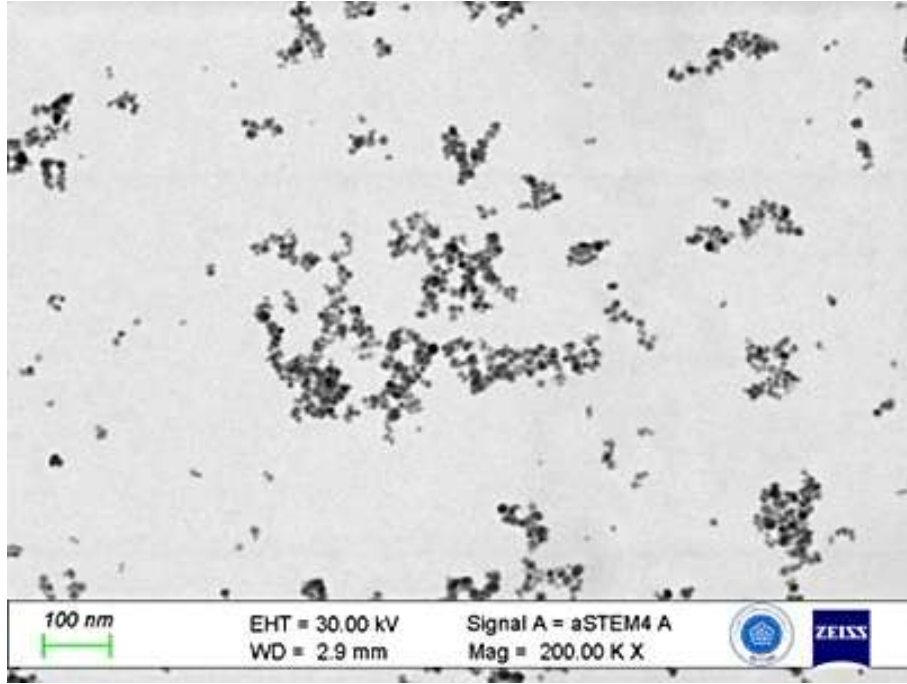


Şekil 24. Demir oksit nanoparçacıklarının XRD deseni.

Şekil 24'te verilen spektrumda, piklerin keskin olması kristal formdaki nanoparçacıklara işaret etmektedir. XRD grafiğindeki konumu; $2\theta = 24,86^\circ$ (110), $28,55^\circ$ (220), $35,76^\circ$ (311), $43,17^\circ$ (400), $57,11^\circ$ (511) ve $62,95^\circ$ (440) olan pikler Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi'nin (International Centre for Diffraction Data -ICDD) 019-0629 numaralı karttaki toz kırınım dosyasındaki (powder diffraction file-PDF) manyetit ile eşleşmektedir (Â. L. Andrade et al., 2012). Konumu $2\theta = 17,95^\circ$ (111) ve $74,35^\circ$ (533) olan pikler ise Uluslararası Kırınım Verileri Merkezi'nin (International Centre for Diffraction Data - ICDD) 00-039-1346 numaralı karttaki toz kırınım dosyasındaki (powder diffraction file-PDF) maghemit ile eşleşmektedir (Stoia et al., 2016).

4.2.3. STEM Analizi

MagF-ICG nanoparçacıkların STEM görüntüleri. Şekil 25'te verilmiştir.

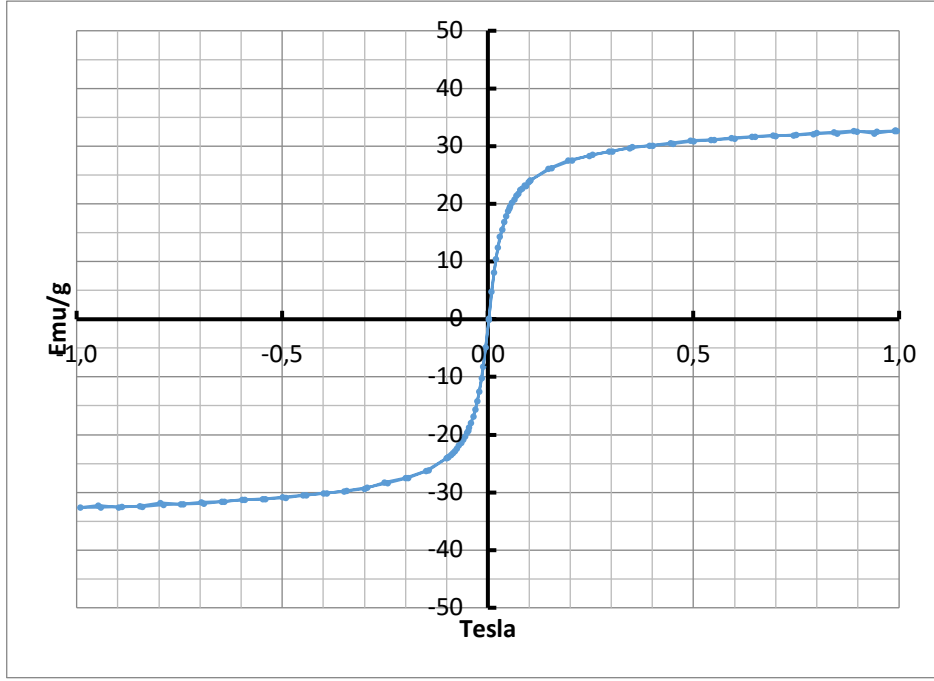


Şekil 25. MagF-ICG nanoparçacık örneğine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (STEM); 100 nm.

STEM görüntülerinden nanoparçacıkların homojen boyut/şekilde oldukları ve ortalama boyutun 10 nm'nin altında olduğu görülmektedir. Buda protein iç çapının 8 nm olduğu düşünüldüğünde; protein kafesinin nanoparçacıkları ve ICG molekülünü protein yapısı bozulmadan enkapsüle edilebildiği sonucu çıkmaktadır.

4.2.4. VSM Analizi

MagF-ICG nanoparçacık örneğinin oda sıcaklığında ve ± 1 Tesla manyetik alan şiddetindeki VSM sonuçları Şekil 26'da verilmiştir.

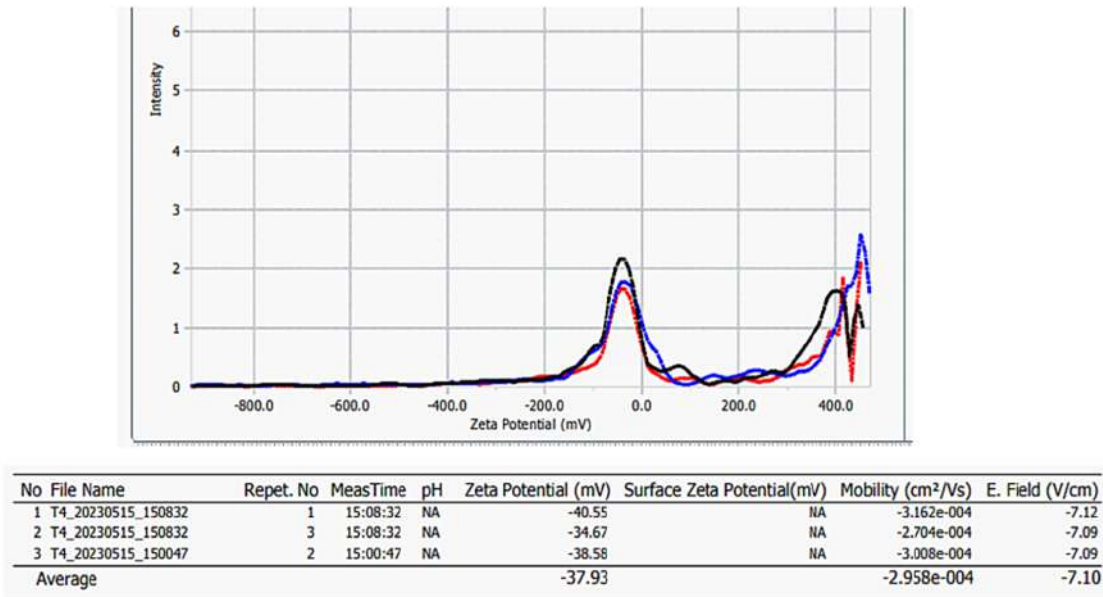


Şekil 26. MagF-ICG nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M-H) döngüsü.

MagF-ICG nanoparçacıklarına ait manyetik histerezis grafiğine göre, doyma manyetizasyon değeri (M_s) 32.6 emu/g olarak bulunmuştur. Sentezlenen demir oksit nanoparçacıkların XRD kırınımlarına göre kristal yapısının magnetit/maghemit karışımı olduğu ortaya çıkmıştır, ayrıca apoferritin enkapsülasyonu manyetikçe ölü alan oluşturabilmektedir (Lu et al., 2017) dolayısıyla M_s değeri bu sonuçlar ile uyumludur.

4.2.5. Zeta Potansiyeli Analizi

MagF-ICG nanoparçacıklarının yüzey karakterizasyonu zeta potansiyel ölçüm cihazı ile yapılmıştır (Şekil 27).



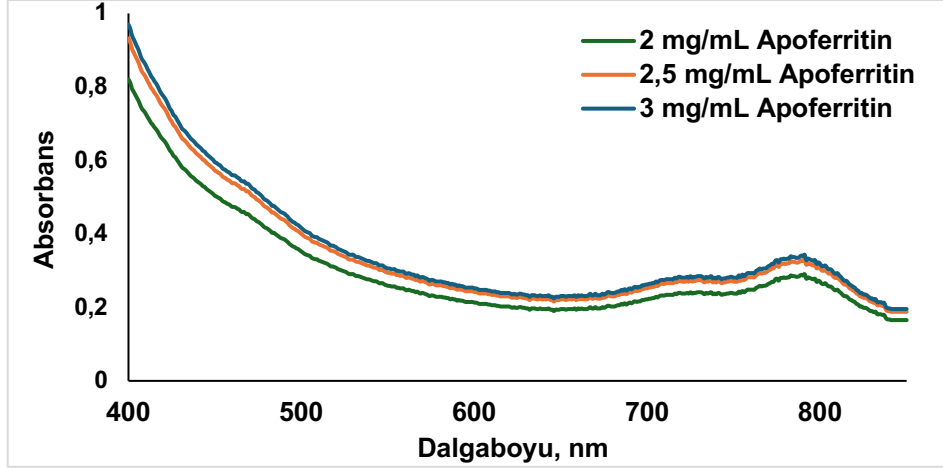
Şekil 27. MagF-ICG nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.

Zeta potansiyeli cihazı ile nanoparçacıkların yüzey yükleri $-37,93$ mV olarak ölçülmüştür. Bu değer nanoparçacıkların yeterli elektrostatik kararlılıkta olduğunu ve sulu çözeltide kararlı olduklarını göstermektedir çünkü yüzey yükü ± 30 mV ve üzeri olduğu durum yeterli yük yoğunluğunu ifade etmektedir (Clogston & Patri, 2011; Honary & Zahir, 2013).

4.3. Enkapsülasyon Reaksiyonunun Optimizasyonu

Enkapsülasyon reaksiyonu için optimize edilen parametreler; reaktiflerin eklenme sırası, karıştırma yöntemi (manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyo), pH (3 veya 11)) ve reaktiflerin derişimleridir. Reaksiyon sonrasında nanoparçacığın stabilitesi ilk planda aglomerasyonun varlığı ile takip edilmiştir. Aglomere olmayan örneklerde ise UV-Vis spektrumunda ilgili absorbans bandının büyümesi ile en optimum reaksiyon koşulu seçilmiştir. Buna göre, reaksiyonlar oda sıcaklığında, alkali pH'da, manyetik karıştırıcıda ve eklenme sırası olarak; nanoparçacık süspansiyonu + ICG + protein şeklinde olacak şekilde yapılmıştır. Derişim parametresi enkapsülasyon verimini artırmak için protein ve ICG için denenmiştir. İki reaktifin derişimi sabit tutulurken, bir diğerinin derişiminin değiştirilmesi ile optimize edilmiştir. Ortamdaki nanoparçacıkları ve ICG molekülünü enkapsüle edebilecek miktarda protein derişimine ihtiyaç olduğu için ilk olarak protein derişimi optimize edilmiştir. Nanoparçacık süspansiyonundan 1 mL ve ICG çözeltisinden 50 μ L kullanıldığı ve protein derişiminin düşük ve yüksek olduğu (1 mg/mL ve 5 mg/mL)

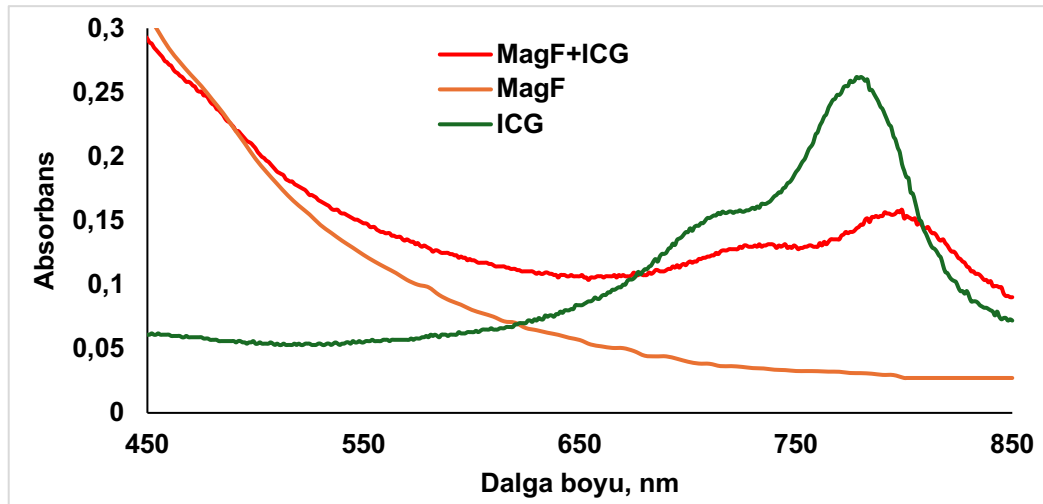
her iki durumda da çökmeler gözlenmiştir. Aynı reaksiyon ortamındaki apoferritin derişimi olarak; 2, 2,5, 3 mg/mL denenmiştir. Her üç reaksiyona ait UV-Vis spektrumları Şekil 28’de verilmiştir.



Şekil 28. 3 farklı derişimde (2, 2,5, 3 mg/mL) apoferritin kullanıldığı enkapsülasyon reaksiyonundan elde edilen absorbands spektrumları.

Şekil 28’de görüldüğü gibi, apoferritin derişiminin 3 mg/mL derişime çıkarılması reaksiyon verimine etkisi çok düşüktür. Bu nedenle, protein derişimi 2,5 mg/mL olarak belirlenmiştir. Bu derişimdeki proteinin ICG taşıma kapasitesi belirlenmiştir. Bunun için, 1 mL nanoparçacık süspansiyonu 2,5 mg/mL apoferritin çözeltisi ile değişen ICG (1mg/mL) miktarları (10 -100 µL) ile optimizasyon yapılmıştır. Benzer şekilde, ICG çözeltisinin 50 µL’nin üzerinde (60, 75-100 µL) kullanıldığı durumlarda ve tekrarlanan reaksiyonlarda nanoparçacık süspansiyonunda çökmeler gözlenmiştir.

Sonuç olarak, demir derişimi 221,2 ppm olan 1 mL nanoparçacık süspansiyonu, 50 µL ICG ve 2,5 mg/mL apoferritin kullanılarak MagF-ICG nanoparçacıkları hazırlanmıştır. MagF-ICG nanoparçacıkları, serbest ICG çözeltisinin ve MagF nanoparçacıklarının UV-Vis spektrumları bir arada Şekil 29’da verimiştir.



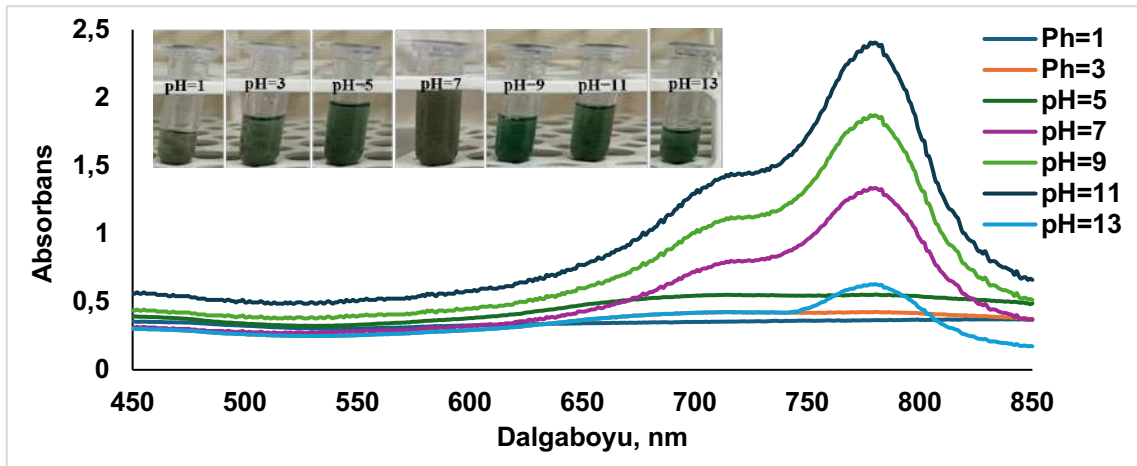
Şekil 29. MagF, ICG ve MagF-ICG örneklerine ait absorbans spektrumları.

Şekil 29'daki spektrumlara göre ICG enkapsülasyonu ile ICG'e ait absorpsiyon maksimumu 780 nm den 783 nm'ye kaymıştır. Dalga boyundaki bu küçük kayma, ICG'nin protein ile etkileşimden kaynaklanmaktadır, literatürdeki enkapsülasyon çalışmalarında da benzer etki görülmektedir (Bilici et al., 2020; Park et al., 2017).

4.3.1. İndosiyanin Yeşili Stabilite Çalışmaları

4.3.1.1. Nanoparçacık stabilitesi

Enkapsülasyon reaksiyonu, güçlü asidik ya da alkali pH ortamlarında apoferritin proteinin kafes yapısının açılma özelliği kullanılarak yapıldığından reaksiyon ortamında ICG'nin pH'a bağlı olarak molekül yapısının bozulmaması önemlidir. Bu nedenle ICG'nin, farklı pH ortamlarında molekül yapısının stabilitesi spesifik UV-Vis spektrumunun takibi ile yapılmıştır (Şekil 30).



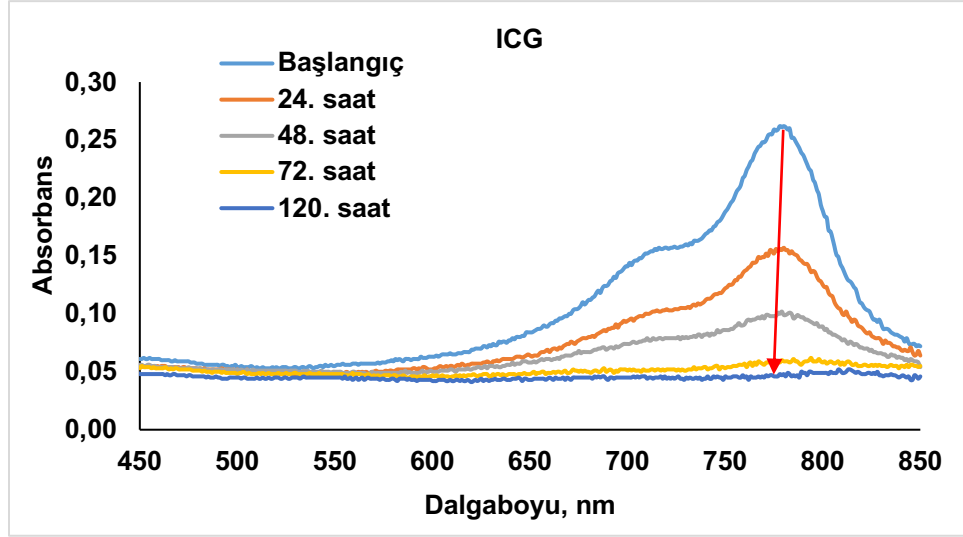
Şekil 30. Farklı pH ortamlarındaki ICG molekülünün absorpsiyon spektrumları.

Şekil 30’da kuvvetli asit ortamlarında (pH=1 ve pH=3) ICG’nin spesifik floresan absorpsiyonu olan 720 ve 780 nm’de absorpsiyon pikleri görülmediğinden bu pH değerlerinde ICG’nin molekül yapısının bozulduğu sonucuna varılmaktadır. En şiddetli absorpsiyonu ise pH=11’dedir. Elde edilen bu sonuçlara göre enkapsülasyon reaksiyonunda apoferritin proteininin kafes yapısının açılması için reaksiyon ortamı pH=11 olarak seçilmiştir. Literatüre göre ICG pH 5’in altında ve pH 11’in üstünde ayrışmaya uğramaktadır (Jaiswal et al., 2021). Elde edilen sonuçlar literatürle uyusmaktadır.

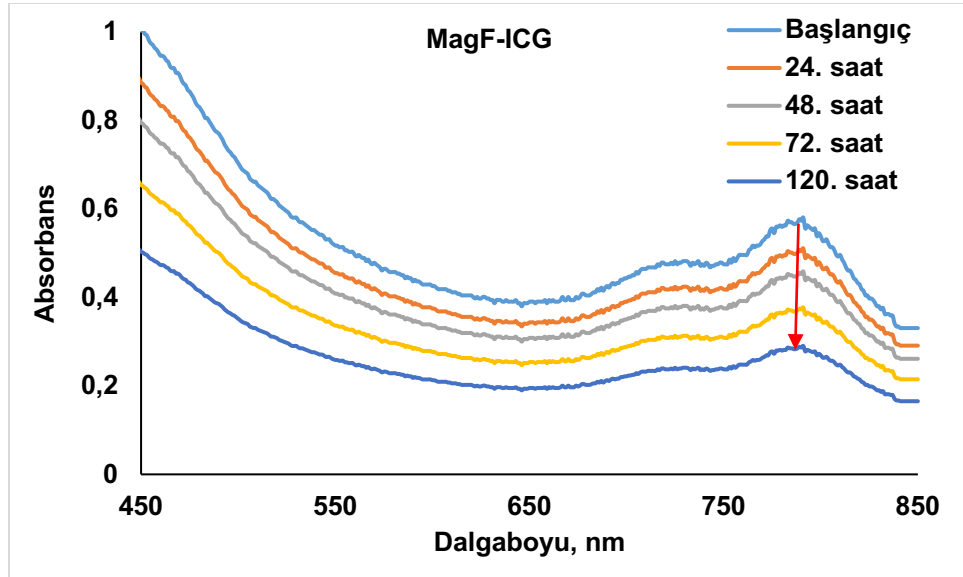
ICG pH stabilite çalışmaları sonucunda enkapsülasyon reaksiyonlarına pH=11’de çalışılmaya karar verilmiştir. Birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenen demir oksit nanoparçacıkları TMAOH ile stabilize edildiğinde, çözelti pH’sı 11 olduğundan enkapsülasyon reaksiyonunda apoferritin nanokafesinin açılması için herhangi bir pH değişikliği yapılmadan nanoparçacık ortamına apoferritin eklenmiştir.

4.3.1.2. Işık Stabilitesi

Gün ışığı maruziyetine bırakılan MagF-ICG ve ICG’nin 780 nm’deki absorpsiyon değişimleri 120 saate kadar takip edilmiştir ve UV-Vis spektrumları Şekil 31 ve 32’de verilmiştir.

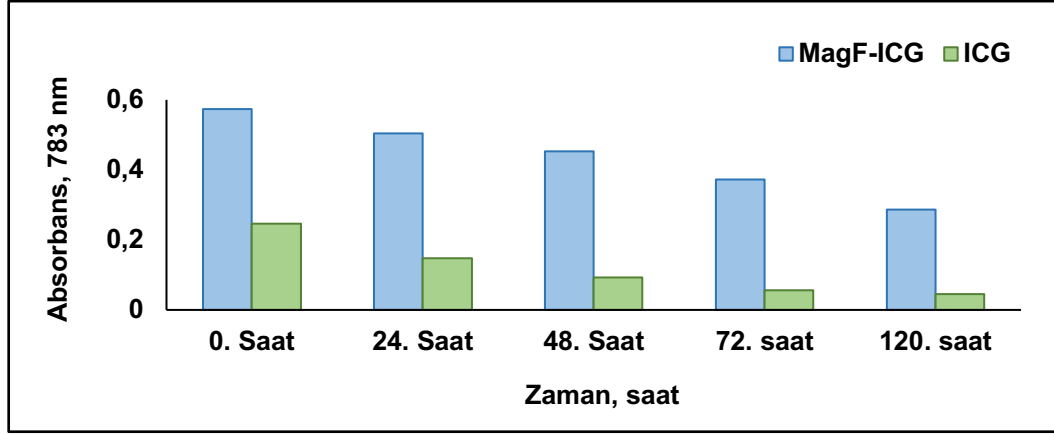


Şekil 31. ICG molekülünün ışığa maruz kalma süresi boyunca absorbans spektrumu.



Şekil 32. MagF-ICG molekülünün ışığa maruz kalma süresi boyunca absorbans spektrumu.

Serbest ICG molekülünün ve MagF-ICG nanoparçacığının 120. saate kadar takip edilen spektrumlarından, 780 nm'deki absorbanslarının grafiğe geçirilmesiyle karşılaştırma yapılmıştır (Şekil 33).

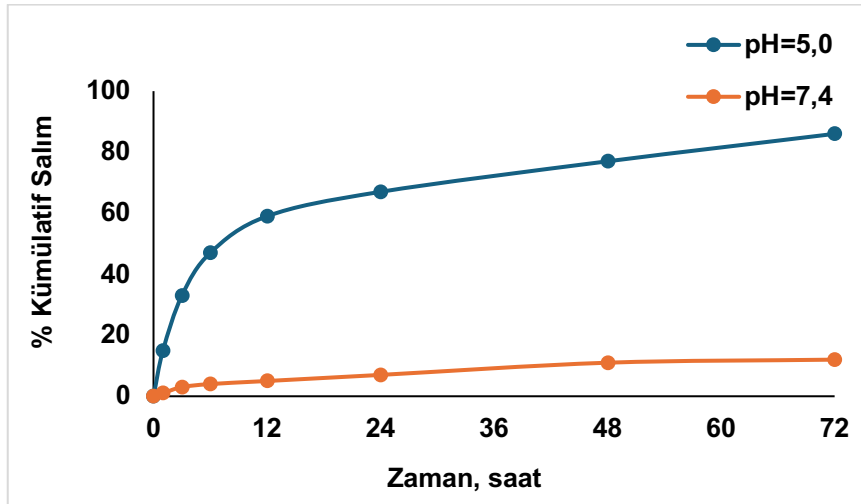


Şekil 33. Serbest halde ICG boyasının ve enkapsüle edilmiş ICG boyasının (MagF-ICG) ışık maruziyetine karşı kararlılıklarının karşılaştırılması.

MagF-ICG ve ICG'nin 780 nm'deki absorpsiyon değişimleri incelendiğinde, 120 saat sonrasında, ICG'nin absorbansında 5,5 kat azalma gözlemlenirken, MagF-ICG'ninkinde ise 2 kat azalma olmuştur. Bu durum protein kafesin ICG'yi fotodegradasyona karşı koruduğunu göstermektedir. Literatürde, lipozom-ICG kompleksinin serbest ICG kompleksinden daha yüksek optik stabilite gösterdiği görülmektedir (Wang et al., 2018). Sonuçlar literatür ile uyusmaktadır (Yaseen et al., 2007).

4.3.2. ICG Salınımı Deneyi

Apo ferritin kafes yapısından olası salınabilecek ICG moleküllerinin kantitatif analizi, MagF-ICG nanoparçacık süspansiyonun fizyolojik ortama ve pH=5 ortamına karşı 3 gün boyunca diyalizi yapılarak, diyaliz çözeltisine geçen serbest ICG'nin 780 nm'deki absorbans takibi ile yapılmıştır. Sonuçlar Şekil 34'de verilmiştir.



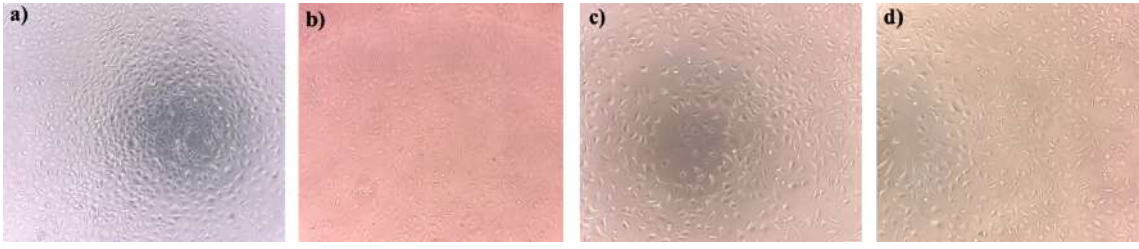
Şekil 34. MagF-ICG nanoparçacığının 72 saat boyunca pH=7,4 ve pH=5,0 ortamına karşı diyalizi ile açığa çıkan ICG molekülünün kümülatif yüzdesi.

Fizyolojik ortama karşı yapılan diyaliz sonucuna göre, apoferritinin sağlam yapısı sayesinde enkapsüle edilen ICG moleküllerinin 72 saat sonrasında, sadece %12 sinin yapıdan ayrıldığı görülmüştür. Ayrıca, ilk 6 saatte nanoparçacıkların hücre içine çoğunlukla girdiği mikroskop görüntülerinden bilindiği üzere, 6 saatteki salımın ise %4 kadar olduğu görülmüştür. Bu sonuç, nanoparçacığının hedef bölgeye ulaşana dek, yapısının bozulmadığını ve hedef bölgeye kadar taşınarak, etkin dozun birikmesini sağlaması açısından önem taşımaktadır. Bu apoferritin sağladığı avantajlardan birisidir (Kuruppu et al., 2022). Bununla birlikte, nanoparçacığın kanserli hücre içine alındığında ya da tümör bölgesinde degrade olarak etkin maddenin açığa çıkmasını beklemekteyiz (Veroniaina et al., 2021). Sonuca göre, 72 saat sonra ICG moleküllerinin %86'sının proteinden ayrıldığı, bu değer ilk 6 saate %47 olduğu görülmektedir. Bu sonuç, MagF nanoparçacığının antikanser ajanı olarak potansiyel etkinliğini göstermektedir.

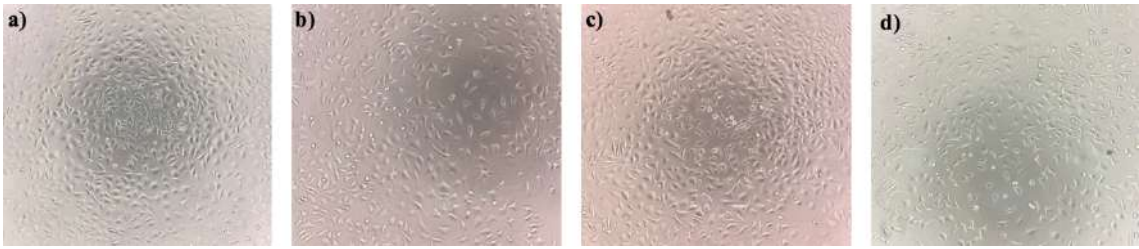
4.4. Hücre Çalışmaları

4.4.1. Sitotoksisite Analizleri

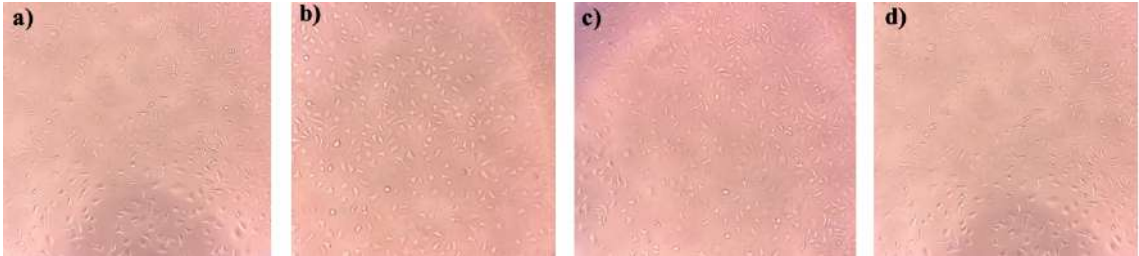
L929 fare fibroblast ve A549 akciğer kanseri hücre hatları 3 farklı derişimde (55,3 ppm; 110,6 ppm; 221,2 ppm) MagF-ICG nanoparçacıkları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiştir. MagF-ICG nanoparçacıkların derişim ve zamana bağlı olarak hücre canlılığına etkisi MTT testi ile belirlenmiştir. Uygulanan derişimlere ek olarak nanoparçacık muamelesi yapılmayan hücreler de kontrol grubu olarak deneye dahil edilmiştir. Tez kapsamında yapılan literatür taraması sonucunda bölüm 2.4.3.1'de verildiği gibi MTT, süksinat dehidrogenaz gibi mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçerek hücre canlılığını belirleyen bir testtir. Bu nedenle yalnızca metabolik aktivitesi olan canlı hücrelerde formazan tuzuna indirgenme gerçekleşirken ölü hücrelerde indirgenme olmaz (Kamiloglu et al., 2020; Marques et al., 1995). Literatür taramasından anlaşıldığı gibi nanoparçacık ile muamele edilen hücrelerin nanoparçacık ile muamele edilmeyen hücrelere kıyasla metabolik aktivitenin daha düşük olması beklenmektedir. Sonuçlar Şekil 43-51'de verilmiştir. Bununla birlikte Şekil 35-42'de sitotoksisite deneylerine ait hücre görüntüleri verilmiştir.



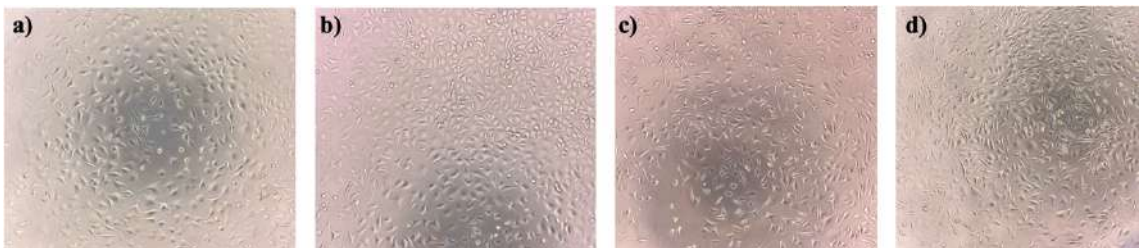
Şekil 35. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (24. saat).



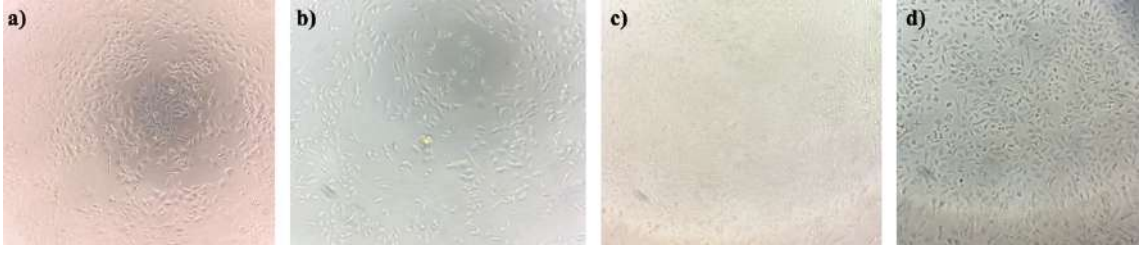
Şekil 36. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (48. saat).



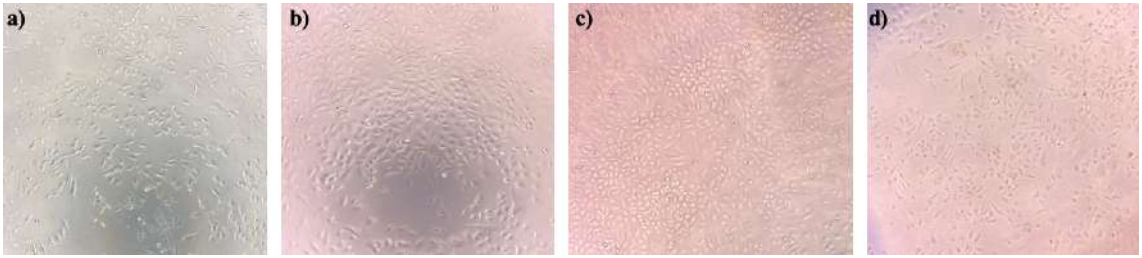
Şekil 37. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (24. Saat, lazer uygulaması yapılmış).



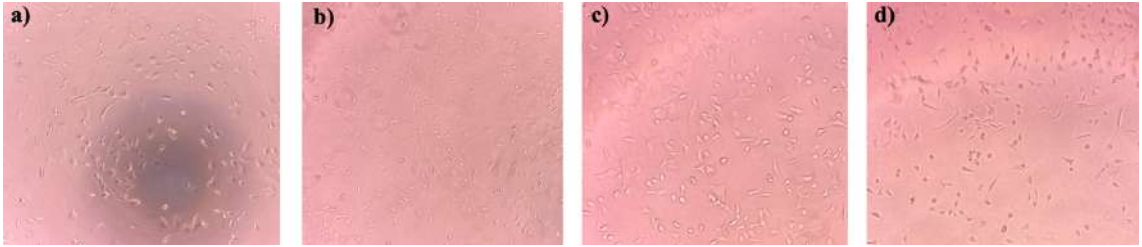
Şekil 38. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış L929 hücre hattı (48. Saat, lazer uygulaması yapılmış).



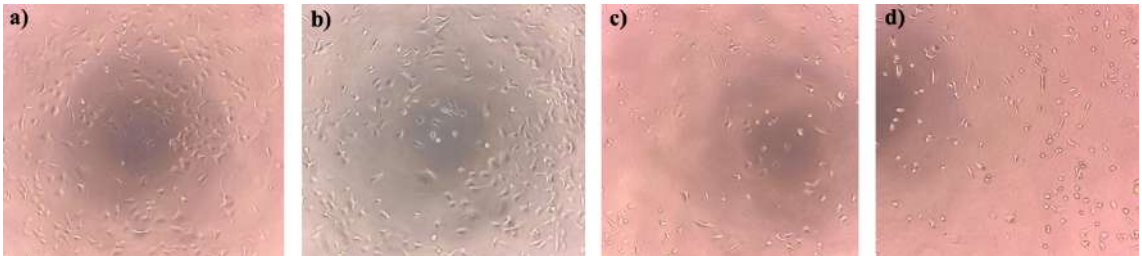
Şekil 39. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (24. saat).



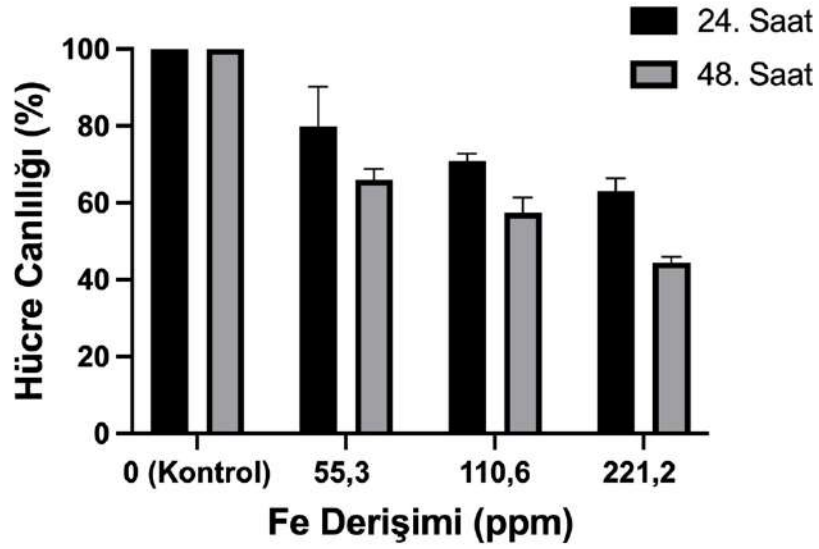
Şekil 40. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (48. saat).



Şekil 41. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (24. Saat, lazer uygulaması yapılmış).

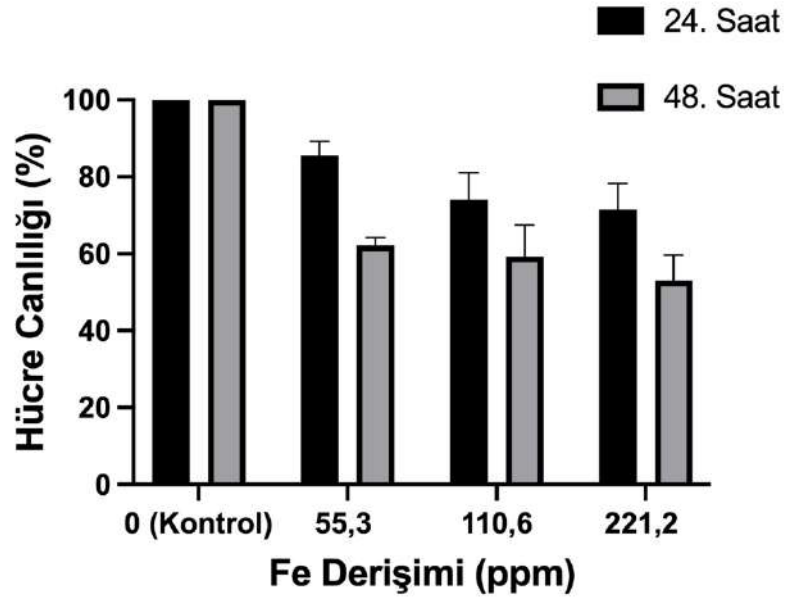


Şekil 42. a) Kontrol (nanoparçacık uygulanmamış); b) 55,3 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; c) 110,6 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış; d) 221,2 ppm derişiminde nanoparçacık uygulanmış A549 hücre hattı (48. Saat, lazer uygulaması yapılmış).



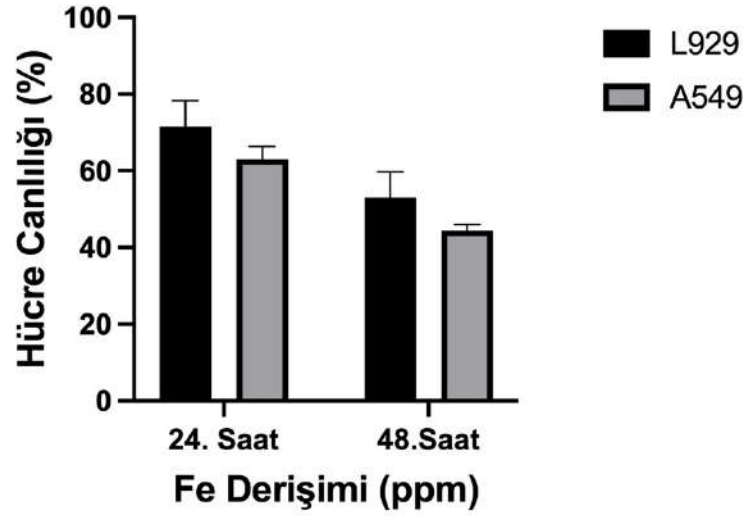
Şekil 43. 3 farklı Fe derişimdeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacıkları ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı. (n=3)

Şekil 43'te verilen MTT testi sonucuna göre nanoparçacık maruziyetinin A549 hücre hattı üzerine etkisi incelendiğinde; hücre canlılığının 221,2 ppm derişimde 24. saatte %63,05'e düştüğü, 48. Saatte %44,46'ya düştüğü görülmüştür.



Şekil 44. 3 farklı Fe derişimdeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacık ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı. (n=3)

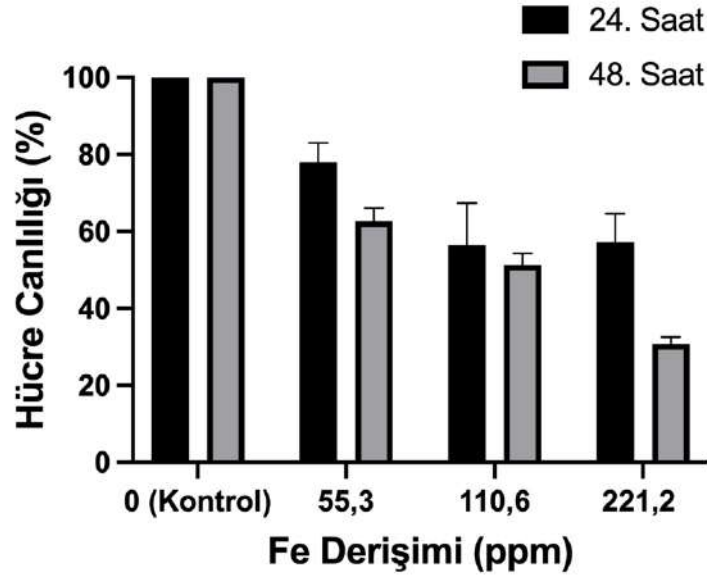
Şekil 44'te verilen MTT testi sonucuna göre Fe nanoparçacık maruziyetinin L929 hücre hattı üzerine etkisi incelendiğinde; hücre canlılığının 221,2 ppm derişimde 24. saatte %71,54'e düştüğü, 48. Saatte %53,01'e düştüğü görülmüştür. Her iki hücre tipinde IC₅₀ derişimi 221,2 ppm Fe olarak belirlenmiştir. Şekil 37, MTT testi sonucuna göre IC₅₀ derişiminde nanoparçacıkların L929 ve A549 hücre hatları üzerine etkisi karşılaştırılmıştır.



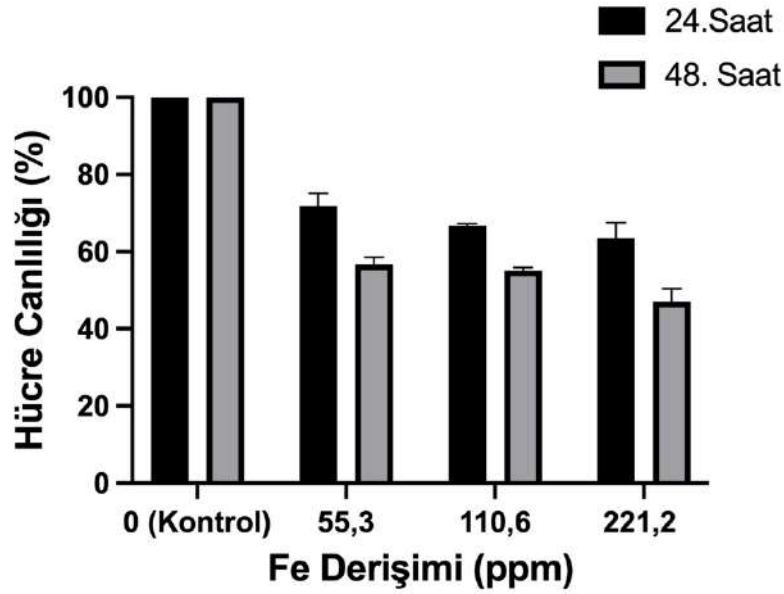
Şekil 45. 221,2 ppm Fe derişimindeki MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş A549 ve L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı. (n=3)

221,2 ppm Fe derişimindeki nanoparçacıklar L929 hücrelerinde hücre canlılığını 24. saatte %71,54'e düşerken A549 hücrelerinde %63,05'e düşmüştür. 48. saatte L929 hücrelerinde hücre canlılığını %53,01'e düşerken A549 hücrelerinde %44,46'ya düşmüştür (Şekil 45).

Hücrelere MagF-ICG nanoparçacık maruziyetiyle birlikte lazer ışını uygulamasının A549 ve L929 hücre hattı üzerine etkisi incelenmiştir ve sonuçlar Şekil 46 ve 47'de verilmiştir.



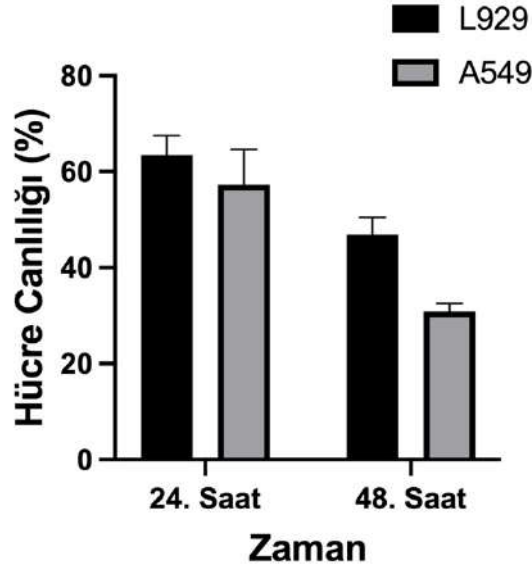
Şekil 46. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)



Şekil 47. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacık ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği.

Hücre canlılığının A549 hücrelerinde 110,6 ppm derişimde 24. saatte %56,57'ye düştüğü, 48. Saatte %51,27'ye düştüğü görülmüştür. 221,2 ppm derişimde 24. saatte %57,27'ye düştüğü, 48. Saatte %30,82'ye düştüğü görülmüştür (Şekil 46). L929 hücre hattı üzerine etkisi incelendiğinde; hücre canlılığının 110,6 ppm derişimde 24. saatte %66,74'e düştüğü, 48. Saatte %55,16'ya düştüğü görülmüştür. 221,2 ppm derişimde 24. saatte hücre canlılığının %63,45'e düştüğü, 48. Saatte %46,92'ye düştüğü görülmüştür

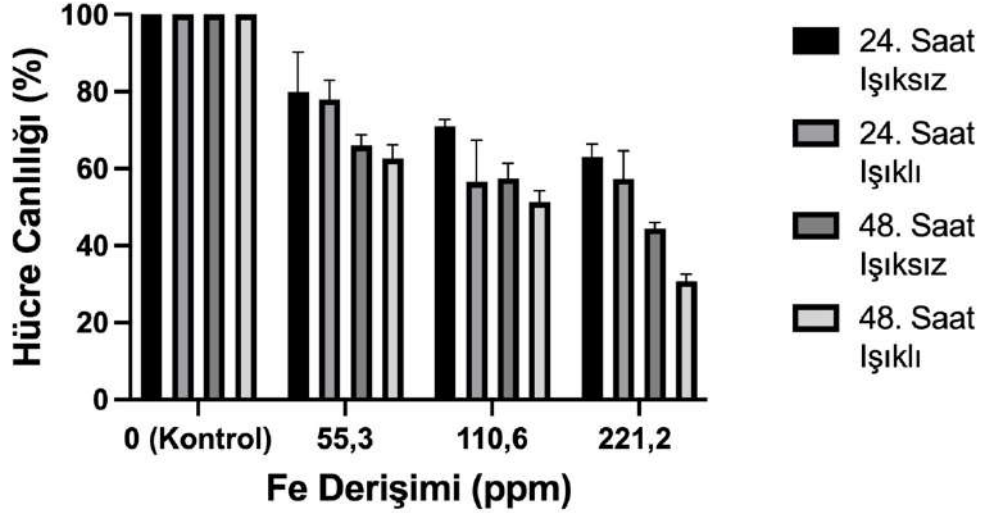
(Şekil 47). Her iki hücre tipinde 221,2 ppm Fe derişimindeki (IC_{50}) hücre canlılığı Şekil 48’de karşılaştırılmıştır.



Şekil 48. 221,2 ppm Fe derişimindeki MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanmış A549 ve L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı. (n=3)

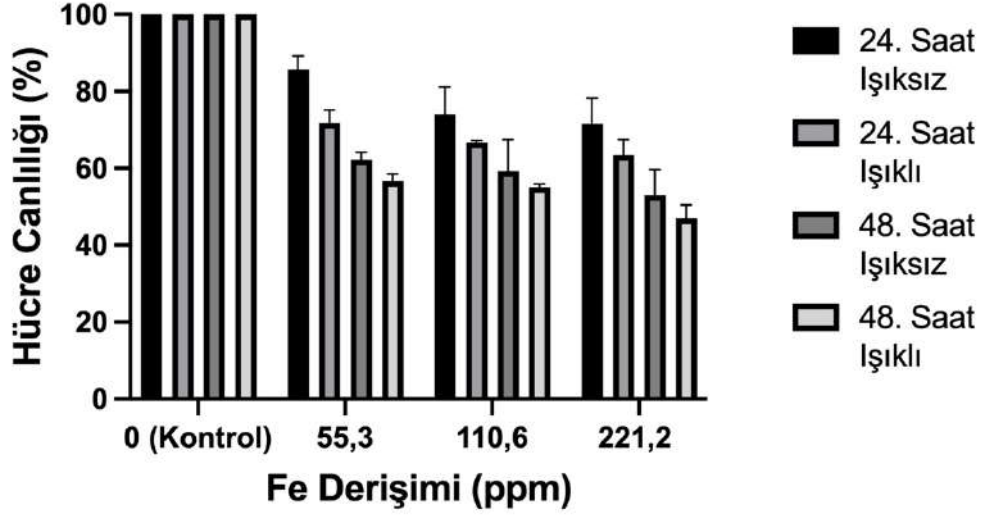
Özetle, 221,2 ppm Fe derişimdeki MagF-ICG nanoparçacık hücre uygulamasında, L929 hücrelerinde hücre canlılığı 24. saatte %63,45’e düşerken A549 hücrelerinde %57,27’ye düşmüştür. 48. saatte L929 hücrelerinde hücre canlılığı %46,92’ye düşerken, A549 hücrelerinde %30,82’ye düşmüştür (Şekil 48).

Lazer uygulaması ile ICG moleküllerinin absorpladığı dalga boyundaki ışın ile ICG molekülleri uyarıldığında, bu enerji ile molekülde serbest radikaller üretilmektedir (Alander et al., 2012; Wang et al., 2018) ve ayrıca spektrumun yakın kızıl ötesi bölgesine yakın absorpladığı ışının enerjisi molekülde titreşimsel hareketlere sebep olduğu için, molekül etrafında ısı artışına sebep olmaktadır (Wang et al., 2018; Xie et al., 2023). Tezde ICG’nin fotodinamik ve fototermal etkisi çalışılmamıştır ancak olası bu etkilerin hücre canlılığı üzerine etkisi çalışılmıştır. Nanoparçacıklar ile muamele edilmiş hücrelere ışınlama uygulaması yapılmayan ve yapılan deneylerin sonuçları Şekil 49,50 ve 51’de bir arada verilmiştir.



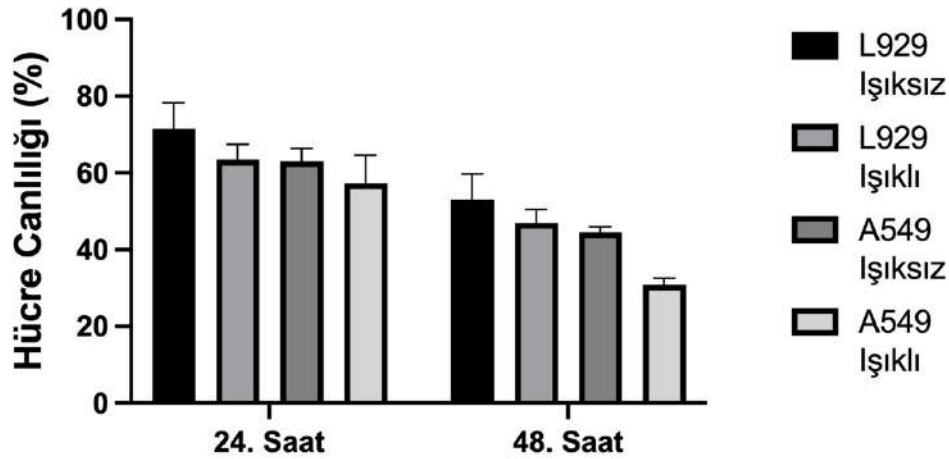
Şekil 49. 3 farklı Fe derişimdeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiğı. (n=3)

Şekil 49'da verilen MTT testi sonucuna göre, MagF-ICG nanoparçacıkları ile muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanan ve uygulanmayan A549 hücreleri karşılaştırıldığında 55,3 ppm derişimde hücre canlılığı 24. saate %79,84'e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %77,97'ye düşmüştür. 48. saatteki hücre canlılığı ise %66,06'ya düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %62,63'tür. 110,6 ppm derişimde hücre canlılığı 24. saate %70,98'e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %56,57'ye düşmüştür. 48.saateki hücre canlılığı ise %57,45'e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %51,57'dir. 221,2 ppm derişimde hücre canlılığı 24.saate %63,05'e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %57,27'ye düşmüştür. 48. saatteki hücre canlılığı ise %44,36'ya düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %30,82'dir.



Şekil 50. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış L929 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)

Şekil 50’de verilen MTT testi sonucuna göre Fe nanoparçacıklar ile muamele edilmiş ve lazer ışını uygulanan ve uygulanmayan L929 hücreleri karşılaştırıldığında 55,3 ppm derişimde hücre canlılığı 24. saate %85,60’a düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %71,77’ye düşmüştür. 48. saateki hücre canlılığı ise %62,22’ye düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %56,71’dir. 110,6 ppm derişimde hücre canlılığı 24. saate %74,02’ye düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %66,74’e düşmüştür. 48.saateki hücre canlılığı ise %59,26’ya düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %55,16’dir. 221,2 ppm derişimde hücre canlılığı 24.saate %71,54’e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde %63,45’e düşmüştür. 48. saateki hücre canlılığı ise %53,01’e düşerken lazer ışını uygulaması yapılan hücrelerde hücre canlılığı %46,92’dir.



Şekil 51. 3 farklı Fe derişimindeki (221,2 ppm; 110,6 ppm; 55,3 ppm) MagF-ICG nanoparçacığı ile 24 ve 48 saat muamele edilmiş, lazer ışını uygulanmamış ve uygulanmış L929 ve A549 hücrelerine ait hücre canlılık grafiği. (n=3)

Özetle, ışınlamanın ve ışınlama yapılmadan, 221,2 ppm Fe derişimindeki MagF-ICG nanoparçacıklarının her iki hücre tipindeki etkileri karşılaştırıldığında; 24. saatte hücre canlılığı L929 hücrelerinde %71,54'e düşerken A549 hücrelerinde %63,05'e düşmüştür. Lazer ışını uygulaması yapılan hücreler için hücre canlılığı L929'da %63,45'e düşerken A549'da %57,27'ye düşmüştür. 48. saatte hücre canlılığı L929 hücrelerinde %53,01'e düşerken A549 hücrelerinde %44,46'ya düşmüştür. Lazer ışını uygulaması yapılan hücreler için hücre canlılığı L929'da %46,92'ye düşerken A549'da %30,82'ye düşmüştür.

Sonuçlar, lazer uygulamasının her iki hücre tipinde de hücre canlılığını düşürdüğünü göstermiştir. Demir oksit nanoparçacıklarının antikanser etkisinin, ICG moleküllerinin ışınlama ile aktive edilmesiyle arttığı görülmüştür. L929 hücrelerinde, A549 hücrelerine göre daha düşük de olsa gözlemlenen hücre canlılığındaki düşmenin de tasarlanan manyetik nanoparçacıklarının potansiyel manyetik yönlendirme kapasitesi ile hedefe taşınarak azaltılabileceği düşünölmüştür ve bu sayede sağlıklı hücrelerdeki toksisitenin azaltılabileceği düşünölmektedir. Bu potansiyel nanoparçacıkların manyetik ölçüm sonucu ile gösterilmiştir (Şekil 26).

Bölüm 2.2'de de açıklandığı gibi benzer yaklaşımlar literatürde bulunmaktadır. Ma ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, HeLa hücrelerinin ICG bağlanmış süper paramanyetik demir oksit nanoparçacıkları (ICG-SPIONs) ile inkübasyonu ve ardından NIR lazer uygulaması sonrası hücre canlılığının (%5) azaldığı görülmüştür (Ma et al., 2013).

Mingting Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada holo transferrin - indocyanine green (Holo-Tf-ICG) proteini in vivo hedefleme çalışmalarında kullanılmıştır, subkutan

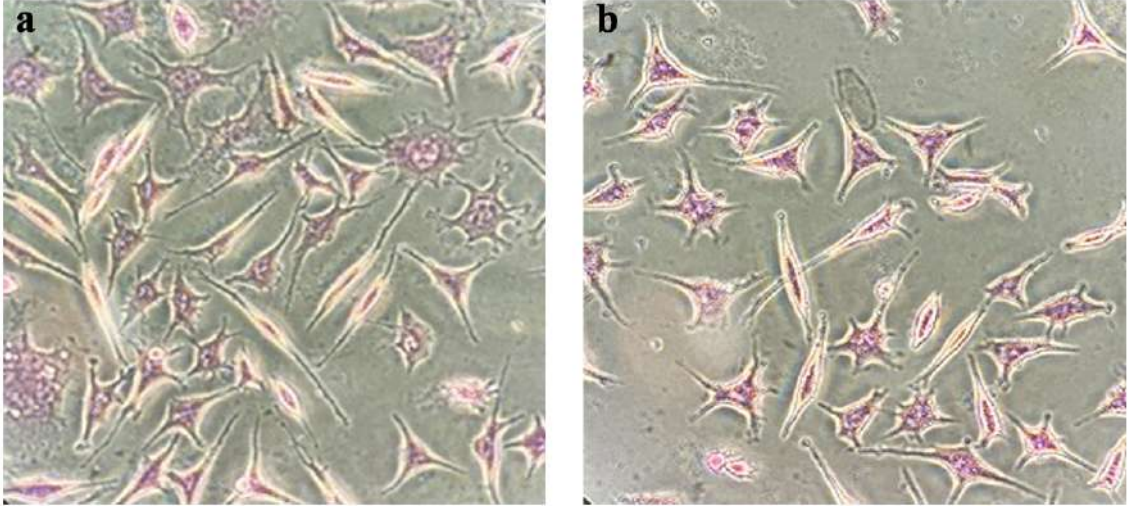
ve ortotopik beyin tümörlerinde çift modlu görüntüleme değerlendirilmiştir (Zhu et al., 2017). Subdermal tümörler $\sim 60 \text{ mm}^3$ 'e ulaştığında, farelere intravenöz olarak sırasıyla serbest ICG ve holo-Tf-ICG enjekte edilmiştir. Kantitatif analiz, holo-Tf-ICG ile tedavi edilen gruptaki floresan sinyalinin, enjeksiyondan 24 saat sonra serbest ICG ile tedavi edilen grubunkinden 38 kat daha fazla olduğunu göstermektedir. Aynı çalışmada U87 hücre hattı üzerinde yapılan fototermal terapide; serbest ICG'e göre Holo-Tf-ICG ile yapılan tedavide U87 dizisinde hücre canlılığının yaklaşık %90 oranda azaldığı görülmüştür.

Yuan Gu ve arkadaşlarının cypate boyası konjuge edilmiş apoferritin (Cy@AFT) ile yaptığı çalışmada, 4T1-luc meme kanseri hücrelerinde, ışın uygulaması sonrasında hücre canlılığı 24 saat sonra yaklaşık %15 olarak bulunmuştur (Gu et al., 2021).

Peng Huang ve arkadaşlarının serbest R820 boyası, enkapsülenmiş R820 boyası (DFRT) ve Ferritin (FRT) ile 4T1 hücreleri ile yaptıkları çalışmada lazer ışın uygulaması sonrası hücre canlılığı yaklaşık olarak FTR grubunda %80, serbest R820 boyası grubunda %40 ve DFRT için %10 olarak bulunmuştur (Huang et al., 2014).

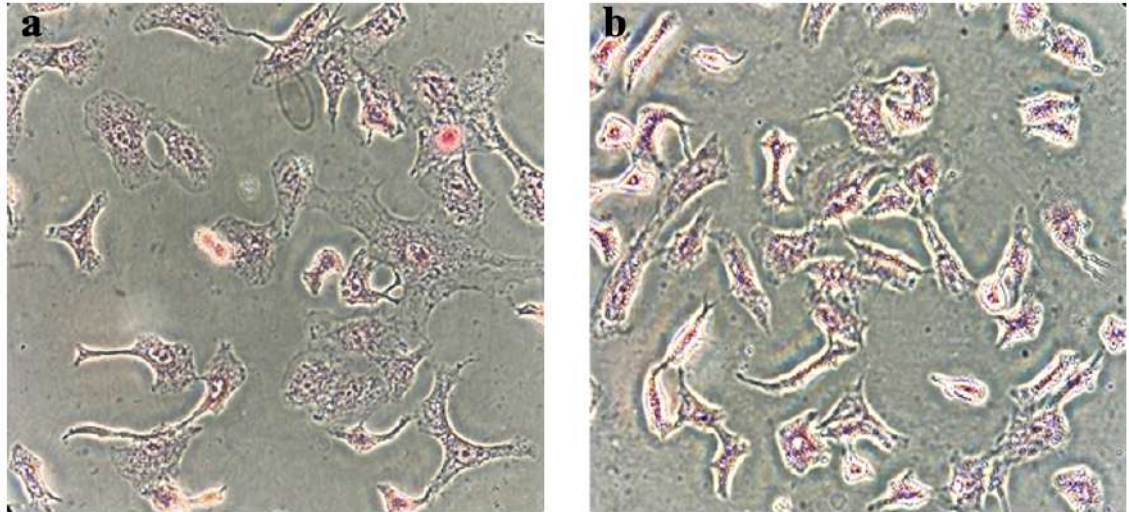
4.4.2. Hücre İçine Alınan Demir Oksit Nanoparçacıkların Görüntülenmesi

A549 ve L929 hücre hatlarında hücre içine alınan MagF-ICG nanoparçacıklarındaki Fe içeriğinin mikroskopik görüntülenmesi Prusya Mavisini boyaması yöntemi ile yapılmıştır. Aynı zamanda görüntüde kontrast oluşturmak için bir çekirdek boyası olan Nuclear fast red kullanılarak hücre çekirdeği boyanmıştır. Boyama uygulamasından önce, A549 ve L929 hücre hatları IC50 derişimindeki (221,2 ppm Fe) nanoparçacıklar ile 6 saat inkübe edilmiştir. Kontrol uygulamaları olarak A549 ve L929 hücre hatları nanoparçacık muamelesi yapılmamıştır. Sonuçlar Şekil 52 ve 53'de verilmiştir.



Şekil 52. L929 hücre hattında hücre içine alınan MagF-ICG nanoparçacıkların Prusya Mavisi ve Nuclear Fast Red boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.

Şekil 52-a'da kontrol hücre grubu olarak nanoparçacık muamelesi yapılmayan L929 hücrelerinin ve b'de MagF-ICG nanoparçacıkları ile muamele edilen L929 hücrelerinin mikroskop görüntüleri verilmiştir. Görüntüler ters (inverted) mikroskopta 40X objektifte çekilmiştir.



Şekil 53. A549 hücre hattında hücre içine alınan MagF-ICG nanoparçacıkların Prusya Mavisi ve Nuclear Fast Red boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.

Şekil 53 -a'da kontrol hücre grubu olarak nanoparçacık muamelesi yapılmayan A549 hücrelerinin ve b'de MagF-ICG nanoparçacıkları ile muamele edilen A549 hücrelerinin mikroskop görüntüleri verilmiştir. Görüntüler ters (inverted) mikroskopta 40X objektifte çekilmiştir.

Apoferritin protein kafesinin kullanıldığı hücre içine alım deneylerinde, ilk saatlerde (0- 8 saat) nanokafeslerin hücre içine alınımının yüksek olduğu literatürde gösterilmiştir (Aşık et al., 2018; Aslan et al., 2020). Bununla birlikte, toksisite sonuçlarına bakıldığında toksik doza ve süreye yaklaşık 24. saatte ulaşıldığı için, hücre bütünlüğünü tam kaybetmeden hücre içine alınan nanoparçacıkların 6 saatlik inkübasyon sonrasında görüntülenmesi planlanmıştır.

Hücre mikroskop görüntülerine göre, nanoparçacıkların her iki hücre tipi tarafından alındığı görülmüştür. Nanoparçacıkların beklendiği gibi kanserli hücre hatları tarafından sağlıklı hücrelere göre daha fazla alındığı ve kanserli hücrelerin nanoparçacık uygulaması ile 6 saat içinde sağlıklı hücrelere göre morfolojik olarak daha fazla etkilendiği de görülmüştür. Ayrıca nanoparçacıkların sitoplazmada biriktiği arka plan boyaması yardımıyla açıkça görülmektedir (Şekil 52 ve 53).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında sentezlenen demir oksit nanoparçacıkları, NIR aktif indosiyanın yeşili boyasıyla birlikte antikanser ajanı olarak geliştirilerek apoferritin nanokafeslerine enkapsüle edilmiştir. Nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri çeşitli metotlarla karakterize edilmiştir. STEM görüntülerine göre sentezlenen nanoparçacıklar 10 nm nin altındadır. FT-IR spektrumunda görülen bantlar ile demir oksit molekülünün ve TMAOH yapısının varlığı gösterilmiştir. XRD spektrumundan sentezlenen demir oksitlerin manyetit (Fe_3O_4) ve maghemit (Fe_2O_3) karışımı olduğu doğrulanmıştır. Nanoparçacığın zeta potansiyeli (-37,93 mV) sulu ortamdaki kararlılığını göstermiştir.

Demiroksit nanoparçacıklarının indosiyanın yeşili boyası (ICG) ile birlikte enkapsülasyon reaksiyonu sonucu elde edilen MagF-ICG nanoparçacıklarının, serbest ICG ile karşılaştırmalı olarak yapılan ışık stabilite çalışmaları enkapsülasyonun ICG'yi serbest ICG'den daha iyi kararlı kıldığını göstermektedir. MagF-ICG sentezinde reaksiyon ortamındaki fazla indosiyanın yeşili boyasını uzaklaştırmak için pH=7,4 ortamına karşı yapılan diyalizde 72 saat sonra ICG nin sadece % 12 sinin salındığını, pH=5,0 ortamına karşı ise %86 sının salındığı görülmüştür. Bu sonuç enkapsülasyon veriminin yüksek olduğunu göstermektedir. Bu sonuç, MagF-ICG nanoparçacığının hedef bölgeye etkin dozda taşınabileceğini ve antikanser ajanı olarak potansiyel etkinliğini göstermektedir.

MagF-ICG nanoparçacıklarının *in vitro* antikanser etkinliği 770 nm lazer ışını uygulaması yapılarak ve lazer uygulamasız olarak L929 ve A549 hücre hatları üzerinde sitotoksisite çalışmaları yapılarak değerlendirilmiştir. Ayrıca MagF-ICG nanoparçacıklarının hücre içi alımı da çalışılmıştır.

Sitotoksisite çalışmaları ile L929 ve A549 hücre hatlarında antikanser etkisi değerlendirilen MagF-ICG'lerin kanser hücrelerini daha fazla etkilediği görülmüştür. Ancak 221,2 ppm derişiminde yapılan sitotoksisite çalışmalarında lazer uygulaması yapılmayan deneylerde A549 hücrelerinde hücre canlılığı 24. saatte %63,45 ile L929 hücrelerinden (%71,54) daha düşüktür. Lazer uygulaması yapılan sitotoksisite çalışmasında ise yine A549 hücrelerinde hücre canlılığı %57,27 ile L929 hücrelerinden (%63,45) düşük olduğu görülmüştür. 48. saatte ise A549 hücrelerinde hücre canlılığı %44,46 ile L929 hücrelerinden (%53,01) daha düşüktür. Lazer uygulaması yapılan

sitotoksiste çalışmasında ise yine A549 hücrelerinde hücre canlılığı %30,82 ile L929 hücrelerinden (%46,92) düşük olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar MagF-ICG'nin A549 hücrelerini daha çok etkilediğini ve lazer uygulamasının antikanser etkinliği arttırdığını doğrulamaktadır. Literatürdeki çalışmalarda göz önüne alınarak; L929 hücrelerindeki sitotoksiste etkisinin MagF-ICG'lerin manyetik özelliklerinden faydalanılarak yapılacak bir manyetik yönlendirme ile yalnızca kanserli dokulara yönlendirilerek ortadan kaldırılabileceği düşünülmektedir.

MagF-ICG'lerin hücre alımının kalitatif değerlendirilmesi için yapılan Prusya mavisi boyaması sonuçlarına göre yine kanser hücrelerinde hücre içi alımın daha fazla olduğu ve morfolojik olarak daha fazla etkilendiği görülmüştür. Ek olarak nanoparçacıkların sitoplazmada biriktiği arka plan boyaması yardımıyla açıkça görülmektedir.

5.2. Öneriler

Tez çalışmasının devamı olarak, MagF-ICG nanoparçacıklarının hücrelerde yaratabileceği serbest radikal (ROS) oluşumu analiz edilebilir ve nanoparçacığın fotodinamik etkisi bu yolla da gösterilebilir. ICG molekülünün uyarılmasıyla ortaya çıkabilecek ısı artışının takip edilmesi ile de tasarlanan nanoparçacığın potansiyel fototermal etkisi değerlendirilebilir.

6. KAYNAKLAR

- Abdullah, J. A. A., Salah Eddine, L., Abderrhmane, B., Alonso-González, M., Guerrero, A., & Romero, A. (2020). Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by phoenix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100280>
- Alander, J. T., Kaartinen, I., Laakso, A., Pätälä, T., Spillmann, T., Tuchin, V. V., Venermo, M., & Välisuo, P. (2012). A Review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. In *International Journal of Biomedical Imaging* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/940585>
- Ali, A., Shah, T., Ullah, R., Zhou, P., Guo, M., Ovais, M., Tan, Z., & Rui, Y. K. (2021). Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.629054>
- Ali, A., Zafar, H., Zia, M., ul Haq, I., Phull, A. R., Ali, J. S., & Hussain, A. (2016). Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles. In *Nanotechnology, Science and Applications* (Vol. 9, pp. 49–67). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/NSA.S99986>
- Allison, L. A. (2020). *Temel Moleküler Biyoloji* (A. O. Beldüz, Ed.; 2nd ed.). Palme Yayınevi.
- Amuanyena, M. O. N., Kandawa-Schulz, M., & Kwaambwa, H. M. (2019). Magnetic Iron Oxide Nanoparticles Modified with Moringa Seed Proteins for Recovery of Precious Metal Ions. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 10(02), 142–158. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2019.102008>
- Andrade, Â. L., Fabris, J. D., Ardisson, J. D., Valente, M. A., & Ferreira, J. M. F. (2012). Effect of Tetramethylammonium Hydroxide on Nucleation, Surface Modification and Growth of Magnetic Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/454759>
- Andrade, L. lao, Fabris, J. D., Ardisson, J. D., & Valente, M. (2012). Effect of tetramethylammonium hydroxide on nucleation, surface modification and growth of magnetic nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 454759.
- Ansari, S. A. M. K., Ficiarà, E., Ruffinatti, F. A., Stura, I., Argenziano, M., Abollino, O., Cavalli, R., Guiot, C., & D'Agata, F. (2019). Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, characterization and functionalization for biomedical applications in the Central Nervous System. In *Materials* (Vol. 12, Issue 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ma12030465>
- Aşık, E., Aslan, T. N., Güray, N. T., & Volkan, M. (2018). Cellular uptake and apoptotic potential of rhenium labeled magnetic protein cages in MDA-MB-231 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 63, 127–134.
- Aslan, T. N., Aşık, E., Güray, N. T., & Volkan, M. (2020). The potential application of gold-apoferritin nanocages conjugated with 2-amino-2-deoxy-glucose for imaging of breast cancer cells. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 25, 1139–1152.
- Bao, Y., Sherwood, J. A., & Sun, Z. (2018). Magnetic iron oxide nanoparticles as: T 1 contrast agents for magnetic resonance imaging. In *Journal of Materials Chemistry C* (Vol. 6, Issue 6, pp. 1280–1290). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c7tc05854c>
- Barman, B. K., & Nanda, K. K. (2019). Total iron measurement in human serum with a smartphone. *AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings, 2019-November*. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>

- Bayda, S., Adeel, M., Tuccinardi, T., Cordani, M., & Rizzolio, F. (2020). The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 1). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25010112>
- Behranvand, N., Nasri, F., Zolfaghari Emameh, R., Khani, P., Hosseini, A., Garssen, J., & Falak, R. (2022). Chemotherapy: a double-edged sword in cancer treatment. In *Cancer Immunology, Immunotherapy* (Vol. 71, Issue 3, pp. 507–526). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00262-021-03013-3>
- Bilici, K., Atac, N., Muti, A., Baylam, I., Dogan, O., Sennaroglu, A., Can, F., & Yagci Acar, H. (2020). Broad spectrum antibacterial photodynamic and photothermal therapy achieved with indocyanine green loaded SPIONs under near infrared irradiation. *Biomaterials Science*, 8(16), 4616–4625. <https://doi.org/10.1039/d0bm00821d>
- Björnsson, O., Murphy, R., & Chadwick, V. (1982). *Physicochemical studies of indocyanine green (ICG): absorbance/concentration relationship, pH tolerance and assay precision in various solvents*.
- Cahaya, A. B. (2020). Paramagnetic and Diamagnetic Susceptibility of Infinite Quantum Well. *Al-Fiziya: Journal of Materials Science, Geophysics, Instrumentation and Theoretical Physics*, 3(2), 61–67. <https://doi.org/10.15408/fiziya.v3i2.18119>
- Carreño, E. A., Alberto, A. V. P., de Souza, C. A. M., de Mello, H. L., Henriques-Pons, A., & Alves, L. A. (2021). Considerations and technical pitfalls in the employment of the MTT assay to evaluate photosensitizers for photodynamic therapy. *Applied Sciences (Switzerland)*, 11(6). <https://doi.org/10.3390/app11062603>
- Chow, J. C. L., & Ruda, H. E. (2023). Flash Radiotherapy: Innovative Cancer Treatment. *Encyclopedia*, 3(3), 808–823. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia3030058>
- Clogston, J. D., & Patri, A. K. (2011). *Zeta potential measurement in characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. Humana Press.
- Dadfar, S. M., Roemhild, K., Drude, N. I., von Stillfried, S., Knüchel, R., Kiessling, F., & Lammers, T. (2019). Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 138, pp. 302–325). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>
- Dai, Q., Ren, E., Xu, D., Zeng, Y., Chen, C., & Liu, G. (2020). Indocyanine green-based nanodrugs: A portfolio strategy for precision medicine. In *Progress in Natural Science: Materials International* (Vol. 30, Issue 5, pp. 577–588). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.pnsc.2020.08.002>
- de Jong, W. H., & Borm, P. J. (2008). Drug delivery and nanoparticles: Applications and hazards. In *International Journal of Nanomedicine* (Vol. 3, Issue 2).
- de Visser, K. E., & Joyce, J. A. (2023). The evolving tumor microenvironment: From cancer initiation to metastatic outgrowth. In *Cancer Cell* (Vol. 41, Issue 3, pp. 374–403). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2023.02.016>
- Debela, D. T., Muzazu, S. G. Y., Heraro, K. D., Ndalama, M. T., Mesele, B. W., Haile, D. C., Kitui, S. K., & Manyazewal, T. (2021). New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. In *SAGE Open Medicine* (Vol. 9). SAGE Publications Ltd. <https://doi.org/10.1177/20503121211034366>
- Dhand, C., Dwivedi, N., Loh, X. J., Jie Ying, A. N., Verma, N. K., Beuerman, R. W., Lakshminarayanan, R., & Ramakrishna, S. (2015). Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: A comprehensive

- overview. In *RSC Advances* (Vol. 5, Issue 127, pp. 105003–105037). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5ra19388e>
- Diaz Tovar, J. S., Kassab, G., Inada, N. M., Salvador Bagnato, V., & Kurachi, C. (2019, October 1). Photodegradation in the infrared region of indocyanine green in aqueous solution. *2019 SBFoton International Optics and Photonics Conference, SBFoton IOPC 2019*. <https://doi.org/10.1109/SBFoton-IOPC.2019.8910207>
- Erdo, A., & Gan, Ş. (2018). Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartiküller Magnetic Nanoparticles In The Diagnosis And Treatment Of Cancer. In *Natural & Applied Sciences Journal: Vol. I* (Issue 1).
- Ettadili, F. E., Aghris, S., Laghrib, F., Farahi, A., Saqrane, S., Bakasse, M., Lahrich, S., & El Mhammedi, M. A. (2022). Recent advances in the nanoparticles synthesis using plant extract: Applications and future recommendations. *Journal of Molecular Structure*, 1248. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131538>
- Faivre D. (2016). *The Iron oxides : from nature to applications*.
- Fan, Y., Marioli, M., & Zhang, K. (2021). Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. In *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (Vol. 192). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113642>
- Fazal-Ur-Rehman, M. (2018). Novel Applications of Nanomaterials and Nanotechnology in Medical Sciences-A Review. *J. Basic. Appl. Sci. Res*, 8(4), 1–1. www.textroad.com
- Fodjo, E. K., Gabriel, K. M., Serge, B. Y., Li, D., Kong, C., & Trokourey, A. (2017). Selective synthesis of Fe₃O₄AuxAg_y nanomaterials and their potential applications in catalysis and nanomedicine. In *Chemistry Central Journal* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0288-y>
- Friedrich, R. P., Janko, C., Unterweger, H., Lyer, S., & Alexiou, C. (2023). SPIONs and magnetic hybrid materials: Synthesis, toxicology and biomedical applications. In *Physical Sciences Reviews* (Vol. 8, Issue 8, pp. 1435–1464). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/psr-2019-0093>
- Gaeta, M., Cavallaro, M., Vinci, S. L., Mormina, E., Blandino, A., Marino, M. A., Granata, F., Tessitore, A., Galletta, K., D'Angelo, T., & Visalli, C. (2021). Magnetism of materials: theory and practice in magnetic resonance imaging. In *Insights into Imaging* (Vol. 12, Issue 1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1186/s13244-021-01125-z>
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The mtt assay: Utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(23). <https://doi.org/10.3390/ijms222312827>
- Gloag, L., Mehdipour, M., Chen, D., Tilley, R. D., & Gooding, J. J. (2019). Advances in the Application of Magnetic Nanoparticles for Sensing. In *Advanced Materials* (Vol. 31, Issue 48). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adma.201904385>
- Gowda, B. H. J., Ahmed, M. G., Almoyad, M. A. A., Wahab, S., Almalki, W. H., & Kesharwani, P. (2024). Nanosponges as an Emerging Platform for Cancer Treatment and Diagnosis. In *Advanced Functional Materials* (Vol. 34, Issue 7). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/adfm.202307074>
- Gu, Y., Zhou, Y., Wu, Y., Ma, J., Wang, Y., Wang, Q., & Wang, Y. (2021). Apoferritin-Engineered Nanoprobe for Tumor-Targeted Triple-NIR Imaging and Phototherapy. *Analytical Chemistry*, 93(25), 8835–8845. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c00730>

- Habibullah, G., Viktorova, J., & Ruml, T. (2021). Current Strategies for Noble Metal Nanoparticle Synthesis. In *Nanoscale Research Letters* (Vol. 16, Issue 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s11671-021-03480-8>
- Hajdu, S. I. (2004). Greco-Roman Thought about Cancer. In *Cancer* (Vol. 100, Issue 10, pp. 2048–2051). <https://doi.org/10.1002/cncr.20198>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In *Cancer Discovery* (Vol. 12, Issue 1, pp. 31–46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hasan, S. (2015). A Review on Nanoparticles: Their Synthesis and Types. In *Research Journal of Recent Sciences* (Vol. 4). www.isca.me
- Honary, S., & Zahir, F. (2013). Effect of zeta potential on the properties of nano- drug delivery systems-a review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265–273.
- Huang, P., Rong, P., Jin, A., Yan, X., Zhang, M. G., Lin, J., Hu, H., Wang, Z., Yue, X., Li, W., Niu, G., Zeng, W., Wang, W., Zhou, K., & Chen, X. (2014). Dye-Loaded Ferritin Nanocages for Multimodal Imaging and Photothermal Therapy. *Advanced Materials*, 26(37), 6401–6408. <https://doi.org/10.1002/adma.201400914>
- Jaiswal, S., Dutta, S. B., Nayak, D., & Gupta, S. (2021). Effect of Doxorubicin on the Near-Infrared Optical Properties of Indocyanine Green. *ACS Omega*, 6(50), 34842–34849. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05500>
- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., & Kalaskar, M. G. (2019). Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. In *Journal of Drug Delivery Science and Technology* (Vol. 53). Editions de Sante. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101174>
- Ji, P., Wang, X., Yin, J., Mou, Y., Huang, H., & Ren, Z. (2022). Selective delivery of curcumin to breast cancer cells by self-targeting apoferritin nanocages with pH-responsive and low toxicity. *Drug Delivery*, 29(1), 986–996. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2056662>
- Jiang, R., Shen, H., & Piao, Y. (2010). The morphometrical analysis on the ultrastructure of A549 cells. In *Romanian Journal of Morphology and Embryology* (Vol. 51, Issue 4).
- Jin, R., Lin, B., Li, D., & Ai, H. (2014). Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: Design considerations and clinical applications. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 18, pp. 18–27). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.08.002>
- Joudeh, N., & Linke, D. (2022). Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 20, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332–349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kandasamy, G., & Maity, D. (2015). Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. In *International Journal of Pharmaceutics* (Vol. 496, Issue 2, pp. 191–218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.10.058>
- Kargozar, S., & Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. In *Materials Today: Proceedings* (Vol. 5). www.sciencedirect.comwww.materialstoday.com/proceedings2214-7853

- Khalaf, M. H., Abdelrahman, H., El-Menyar, A., Afifi, I., Kloub, A., Al-Hassani, A., Rizoli, S., & Al-Thani, H. (2024). Utility of indocyanine green fluorescent dye in emergency general surgery: a review of the contemporary literature. *Frontiers in Surgery*, *11*. <https://doi.org/10.3389/fsurg.2024.1345831>
- Kratzer, T. B., Bandi, P., Freedman, N. D., Smith, R. A., Travis, W. D., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2024). Lung cancer statistics, 2023. In *Cancer* (Vol. 130, Issue 8, pp. 1330–1348). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cncr.35128>
- Kumar, A., & Yusuf, S. M. (2015). The phenomenon of negative magnetization and its implications. In *Physics Reports* (Vol. 556, pp. 1–34). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.physrep.2014.10.003>
- Kuruppu, A. I., Turyanska, L., Bradshaw, T. D., Manickam, S., Galhena, B. P., Paranagama, P., & De Silva, R. (2022). Apoferritin and Dps as drug delivery vehicles: Some selected examples in oncology. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* (Vol. 1866, Issue 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130067>
- Lahiri, A., Maji, A., Potdar, P. D., Singh, N., Parikh, P., Bisht, B., Mukherjee, A., & Paul, M. K. (2023). Lung cancer immunotherapy: progress, pitfalls, and promises. In *Molecular Cancer* (Vol. 22, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01740-y>
- Lajunen, T., Nurmi, R., Wilbie, D., Ruoslahti, T., Johansson, N. G., Korhonen, O., Rog, T., Bunker, A., Ruponen, M., & Urtti, A. (2018). The effect of light sensitizer localization on the stability of indocyanine green liposomes. *Journal of Controlled Release*, *284*, 213–223. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.06.029>
- Larramendy, M. L. (2018). *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*.
- Lee, S. H., & Jun, B. H. (2019). Silver nanoparticles: Synthesis and application for nanomedicine. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 4). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20040865>
- Li, W., Zhou, J., & Xu, Y. (2015). Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices. *Biomedical Reports*, *3*(5), 617–620. <https://doi.org/10.3892/br.2015.481>
- Lim, Z. Y., Mohan, S., Balasubramaniam, S., Ahmed, S., Siew, C. C. H., & Shelat, V. G. (2023). Indocyanine green dye and its application in gastrointestinal surgery: The future is bright green. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*, *15*(9), 1841–1857. <https://doi.org/10.4240/wjgs.v15.i9.1841>
- Lin, M. M., Kim, D. K., El Haj, A. J., & Dobson, J. (2008). Development of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) for translation to clinical applications. In *IEEE Transactions on Nanobioscience* (Vol. 7, Issue 4, pp. 298–305). <https://doi.org/10.1109/TNB.2008.2011864>
- Liu, G., Gao, J., Ai, H., & Chen, X. (2013). Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. In *Small* (Vol. 9, Issues 9–10, pp. 1533–1545). <https://doi.org/10.1002/sml.201201531>
- López-Lázaro, M. (2018). The stem cell division theory of cancer. In *Critical Reviews in Oncology/Hematology* (Vol. 123, pp. 95–113). Elsevier Ireland Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2018.01.010>
- Lu, A. H., Salabas, E. L., & Schüth, F. (2007). Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. In *Angewandte Chemie - International Edition* (Vol. 46, Issue 8, pp. 1222–1244). <https://doi.org/10.1002/anie.200602866>
- Luo, Y., Gao, C., Chen, W., Zhou, K., & Xu, M. (2020). Molecular Magnetic Resonance Imaging with Contrast Agents for Assessment of Inflammatory Bowel

- Disease: A Systematic Review. In *Contrast Media and Molecular Imaging* (Vol. 2020). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2020/4764985>
- Ma, Y., Tong, S., Bao, G., Gao, C., & Dai, Z. (2013). Indocyanine green loaded SPIO nanoparticles with phospholipid-PEG coating for dual-modal imaging and photothermal therapy. *Biomaterials*, 34(31), 7706–7714. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.07.007>
- Marcelo, G. A., Lodeiro, C., Capelo, J. L., Lorenzo, J., & Oliveira, E. (2020). Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. In *Materials Science and Engineering C* (Vol. 106). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110104>
- Marques, E. P., Zhang, J., Tse, Y.-H., Metcalfe, R. A., Pietro, W. J., & Lever, A. B. P. (1995). Surface electrochemistry of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide ([MTI⁺]Br) adsorbed on a graphite electrode. In *Journal of Electroanalytical Chemistry* (Vol. 395).
- Matthews, H. K., Bertoli, C., & de Bruin, R. A. M. (2022). Cell cycle control in cancer. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 23, Issue 1, pp. 74–88). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00404-3>
- McNamara, K., & Tofail, S. A. M. (2015). Nanosystems: The use of nanoalloys, metallic, bimetallic, and magnetic nanoparticles in biomedical applications. In *Physical Chemistry Chemical Physics* (Vol. 17, Issue 42, pp. 27981–27995). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5cp00831j>
- Mohammed, W. A. (2019). Review of Therapeutic Applications of Nanotechnology in Medicine Field and its Side Effects. *Journal Of Chemical Reviews*, 1(3), 243–251. <https://doi.org/10.33945/sami/jcr.2019.3.5>
- Mollazadeh, S., Yazdimamaghani, M., Yazdian-Robati, R., & Pirhadi, S. (2022). New insight into the structural changes of apoferritin pores in the process of doxorubicin loading at an acidic pH: Molecular dynamics simulations. *Computers in Biology and Medicine*, 141. <https://doi.org/10.1016/j.compbimed.2021.105158>
- Moon, O. J., Yoon, C. J., Lee, J. S., Kim, H. H., Seol, Y. H., & Lee, J. (2023). Tumor-specific release of copper-incorporated diethyldithiocarbamate from an optimized apoferritin scaffold enables both potent and safe anti-cancer therapy. *Chemical Engineering Journal*, 473. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2023.145176>
- Mustapha, T., Misni, N., Ithnin, N. R., Daskum, A. M., & Unyah, N. Z. (2022). A Review on Plants and Microorganisms Mediated Synthesis of Silver Nanoparticles, Role of Plants Metabolites and Applications. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 19, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph19020674>
- Niculescu, A. G., Chircov, C., & Grumezescu, A. M. (2022). Magnetite nanoparticles: Synthesis methods – A comparative review. *Methods*, 199, 16–27. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2021.04.018>
- Palanisamy, S., & Wang, Y. M. (2019). Superparamagnetic iron oxide nanoparticulate system: Synthesis, targeting, drug delivery and therapy in cancer. In *Dalton Transactions* (Vol. 48, Issue 26, pp. 9490–9515). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c9dt00459a>
- Park, H. S., Kim, J., Cho, M. Y., Lee, H., Nam, S. H., Suh, Y. D., & Hong, K. S. (2017). Convenient and effective ICGylation of magnetic nanoparticles for biomedical applications. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-09627-x>
- Poole, C. P., & Frank Owens, J. J. (2003). *INTRODUCTION TO NANOTECHNOLOGY*. www.copyright.com.

- Premageetha, G. T. R., Vinothkumar, K. R., & Bose, S. (2024). Exploring advances in single particle CryoEM with apoferritin: From blobs to true atomic resolution. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 169). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2024.106536>
- Qin, Z., Li, Y., & Gu, N. (2018). Progress in Applications of Prussian Blue Nanoparticles in Biomedicine. In *Advanced Healthcare Materials* (Vol. 7, Issue 20). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800347>
- Rafipour, R., Mousavi, A., & Mansouri, K. (2022). Apoferritin nanocages for targeted delivery of idarubicin against breast cancer cells. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 69(3), 1061–1067. <https://doi.org/10.1002/bab.2177>
- Rezaei, B., Yari, P., Sanders, S. M., Wang, H., Chugh, V. K., Liang, S., Mostufa, S., Xu, K., Wang, J. P., Gómez-Pastora, J., & Wu, K. (2024). Magnetic Nanoparticles: A Review on Synthesis, Characterization, Functionalization, and Biomedical Applications. In *Small* (Vol. 20, Issue 5). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/smll.202304848>
- Rubin, J. B., Lagas, J. S., Broestl, L., Sponagel, J., Rockwell, N., Rhee, G., Rosen, S. F., Chen, S., Klein, R. S., Imoukhuede, P., & Luo, J. (2020). Sex differences in cancer mechanisms. In *Biology of Sex Differences* (Vol. 11, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13293-020-00291-x>
- Sanghvi, M. R., Chugh, K. W., & Mhaske, S. T. (2024). Sodium and potassium ferrocyanide derived Prussian blue pigment. *Pigment and Resin Technology*. <https://doi.org/10.1108/PRT-10-2023-0087>
- Sathiyaraj, S., Suriyakala, G., Gandi, A. D., Babujanarthanam, R., Almaary, H. S., Chen, T.-W., & Kaviyarasu, K. (2021). Biosynthesis, characterization, and antibacterial activity of gold nanoparticles. *Journal of Infection and Public Health*, 14, 1842–1847.
- Seferbekova, Z., Lomakin, A., Yates, L. R., & Gerstung, M. (2023). Spatial biology of cancer evolution. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 24, Issue 5, pp. 295–313). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00553-x>
- Sharif Mughal, S., & Mona Hassan, S. (2022). To cite this article: Shahzad Sharif Mughal, Syeda Mona Hassan. Comparative Study of AgO Nanoparticles Synthesize Via Biological, Chemical and Physical Methods: A Review. *American Journal of Materials Synthesis and Processing*, 7(2), 15–28. <https://doi.org/10.11648/j.ajmsp.20220702.11>
- Shen, C., Wang, X., Zheng, Z., Gao, C., Chen, X., Zhao, S., & Dai, Z. (2019). Doxorubicin and indocyanine green loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles with PEGylated phospholipid coating for magnetic resonance with fluorescence imaging and chemotherapy of glioma. *International Journal of Nanomedicine*, 14, 101–117. <https://doi.org/10.2147/IJN.S173954>
- Shubayev, V. I., Pisanic, T. R., & Jin, S. (2009). Magnetic nanoparticles for theragnostics. In *Advanced Drug Delivery Reviews* (Vol. 61, Issue 6, pp. 467–477). <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.03.007>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Wagle, N. S., & Jemal, A. (2023). Cancer statistics, 2023. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 73(1), 17–48. <https://doi.org/10.3322/caac.21763>
- Sirdeshpande, K. D., Sridhar, A., Cholkar, K. M., & Selvaraj, R. (2018). Structural characterization of mesoporous magnetite nanoparticles synthesized using the leaf extract of *Calliandra haematocephala* and their photocatalytic degradation of malachite green dye. *Applied Nanoscience (Switzerland)*, 8(4), 675–683. <https://doi.org/10.1007/s13204-018-0698-8>

- Sorrenti, V., D'amico, A. G., Barbagallo, I., Consoli, V., Grosso, S., & Vanella, L. (2021). Tin mesoporphyrin selectively reduces non-small-cell lung cancer cell line A549 proliferation by interfering with heme oxygenase and glutathione systems. *Biomolecules*, *11*(6). <https://doi.org/10.3390/biom11060917>
- Stoia, M., Istrate, R., & Păcurariu, C. (2016). Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *125*(3), 1185–1198. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5393-y>
- Sudarev, V. V., Dolotova, S. M., Bukhalovich, S. M., Bazhenov, S. V., Ryzhykau, Y. L., Uversky, V. N., Bondarev, N. A., Osipov, S. D., Mikhailov, A. E., Kuklina, D. D., Murugova, T. N., Manukhov, I. V., Rogachev, A. V., Gordeliy, V. I., Gushchin, I. Y., Kuklin, A. I., & Vlasov, A. V. (2023). Ferritin self-assembly, structure, function, and biotechnological applications. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 224, pp. 319–343). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.126>
- Sukumaran, A., K. Sweety, V., Vikas, B., & Joseph, B. (2023). Cytotoxicity and Cell Viability Assessment of Biomaterials. In *Cytotoxicity - Understanding Cellular Damage and Response*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.111822>
- Sun, L., Meng, C., Zhang, Z., Luo, Y., Yang, Z., & Yao, H. (2024). Opportunities and challenges of indocyanine green in gastrointestinal cancers for intraoperative and nano-medicine application. In *Cancer Nanotechnology* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12645-024-00251-9>
- Tang, J., Myers, M., Bosnick, K. A., & Brus, L. E. (2003). Magnetite Fe₃O₄ nanocrystals: Spectroscopic observation of aqueous oxidation kinetics. *Journal of Physical Chemistry B*, *107*(30), 7501–7506. <https://doi.org/10.1021/jp027048e>
- Teja, A. S., & Koh, P. Y. (2009). Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. In *Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials* (Vol. 55, Issues 1–2, pp. 22–45). <https://doi.org/10.1016/j.pcrysgrow.2008.08.003>
- Tricase, A., Alhenaki, B., Marchianò, V., Torsi, L., Gupta, R., & Bollella, P. (2023). Bioelectrochemically triggered apoferritin-based bionanoreactors: synthesis of CdSe nanoparticles and monitoring with leaky waveguides. *Nanoscale Advances*, *6*(2), 516–523. <https://doi.org/10.1039/d3na01046e>
- Vangijzegem, T., Lecomte, V., Ternad, I., Van Leuven, L., Muller, R. N., Stanicki, D., & Laurent, S. (2023). Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy. In *Pharmaceutics* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010236>
- Varma, M. M., Kumar, K. T. S., & Durga Srivalli, I. (2021). A REVIEW ON NANOPARTICLES: SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS. In *Certified Journal | Srivalli et al. World Journal of Pharmaceutical and Medical Research* (Vol. 7). www.wjpmr.com
- Veroniaina, H., Pan, X., Wu, Z., & Qi, X. (2021). Apoferritin: a potential nanocarrier for cancer imaging and drug delivery. In *Expert Review of Anticancer Therapy* (Vol. 21, Issue 8, pp. 901–913). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14737140.2021.1910027>
- Vijayaram, S., Razafindralambo, H., Sun, Y. Z., Vasantharaj, S., Ghafarifarsani, H., Hoseinifar, S. H., & Raeeszadeh, M. (2024). Applications of Green Synthesized Metal Nanoparticles — a Review. In *Biological Trace Element Research* (Vol. 202, Issue 1, pp. 360–386). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12011-023-03645-9>

- Wang, H., Li, X., Tse, B. W. C., Yang, H., Thorling, C. A., Liu, Y., Touraud, M., Chouane, J. B., Liu, X., Roberts, M. S., & Liang, X. (2018). Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics. In *Theranostics* (Vol. 8, Issue 5, pp. 1227–1242). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/thno.22872>
- Wáng, Y. X. J., & Idée, J. M. (2017). A comprehensive literatures update of clinical researches of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging. In *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery* (Vol. 7, Issue 1, pp. 88–122). AME Publishing Company. <https://doi.org/10.21037/qims.2017.02.09>
- Weiss, F., Lauffenburger, D., & Friedl, P. (2022). Towards targeting of shared mechanisms of cancer metastasis and therapy resistance. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 22, Issue 3, pp. 157–173). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00427-0>
- Whitesides, G. M. (2005). Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small*, 1(2), 172–179. <https://doi.org/10.1002/sml.200400130>
- Xie, D., Gu, D., Lei, M., Cai, C., Zhong, W., Qi, D., Wu, W., Zeng, G., & Liu, Y. (2023). The application of indocyanine green in guiding prostate cancer treatment. In *Asian Journal of Urology* (Vol. 10, Issue 1, pp. 1–8). Editorial Office of Asian Journal of Urology. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2021.07.004>
- Xue, P., Yang, R., Sun, L., Li, Q., Zhang, L., Xu, Z., & Kang, Y. (2018). Indocyanine Green-Conjugated Magnetic Prussian Blue Nanoparticles for Synchronous Photothermal/Photodynamic Tumor Therapy. *Nano-Micro Letters*, 10(4). <https://doi.org/10.1007/s40820-018-0227-z>
- Yaseen, M. A., Yu, J., Wong, M. S., & Anvari, B. (2007). Stability assessment of indocyanine green within dextran-coated mesocapsules by absorbance spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 12(6), 064031–064031.
- Zhang, Z., & Satpathy, S. (1991). Electron states, magnetism, and the Verwey transition in magnetite. In *PHYSICAL REVIEW* (Vol. 8).
- Zhou, C., & Nan, X. (2023). Application of indocyanine green in the management of oral cancer: A literature review. In *Oncologie* (Vol. 25, Issue 6, pp. 605–617). Walter de Gruyter GmbH. <https://doi.org/10.1515/oncologie-2023-0236>
- Zhu, M., Sheng, Z., Jia, Y., Hu, D., Liu, X., Xia, X., Liu, C., Wang, P., Wang, X., & Zheng, H. (2017). Indocyanine Green-holo-Transferrin Nanoassemblies for Tumor-Targeted Dual-Modal Imaging and Photothermal Therapy of Glioma. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 9(45), 39249–39258. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14076>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Nagasamy Venkatesh, D., Durazzo, A., Lucarini, M., Eder, P., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>