



T.C.
NECMETTİN ERBAKANÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



DEMİR OKSİT NANOPARÇACIKLARININ
BİYOSENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE *İN*
VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Kübra SEYHAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Temmuz-2022
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DEMİR OKSİT NANOPARÇACIKLARININ BİYOSENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Kübra SEYHAN

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

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN

2022, 97 Sayfa

Jüri

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN
Prof. Dr. Gökhan KARS
Dr. Öğr. Üyesi Derya ÖZHAVA

Metalik nanoparçacıklar; biyomedikal uygulamalarda; nano taşıyıcı olarak ilaç dağıtımında, hastalık tedavisinde, tıbbi görüntüleme ve biyoteknoloji çalışmalarında kullanılabilirliği açısından çok fazla ilgi çekmektedir. Tıp alanında en çok kullanılan metalik nanoparçacıkları arasında demiroksitler (FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄) bulunmaktadır. Son yıllarda, özellikle biyomedikal alanda kullanılacak olan demiroksit nanoparçacıkların sentezini biyolojik sistemlerle yapmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaçla algler, enzimler, bitki özütleri kullanılarak toksisitesi düşük çevre dostu malzemeler kullanılabilir. Biyolojik orijinli materyallerin kullanımı nanoparçacık yüzeyini sarmaları ile çökme eğilimini engelleyerek ve toksik etkilerini iyileştirerek onları biyoyumlu hale getirmektedir. Bu tezin temel amacı, Punica Granatum (nar) kabuğu özütü kullanılarak biyomedikal alanda kullanılabilir çok küçük boyutlarda ve kararlılıkta demir oksit nanoparçacıklarının sentezi, hazırlanan nanoparçacıkların karakterizasyonunun yapılması ve kanser tedavisindeki etkinliğinin araştırılmasıdır. Sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonu Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), UV-Vis Spektrofotometresi (UV-Vis), X-ışını Kırınım Spektroskopisi (XRD), Zeta Potansiyeli Ölçümü, Infrared Spektrofotometresi (FTIR), Termal Gravimetrik Analiz (TGA), Titreşimli Örnek Manyetometrisi (VSM) yöntemleri ile yapılmıştır. Punica Granatum özütü ile sentezlenen nanoparçacıklar çok küçük boyutta; 3.76 ± 0,59 nm ve Fe₂O₃ kristal yapısında oluşmuştur ve sulu çözeltide haftalarca kararlı kalabilmektedir. Nanoparçacıkların derişim artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinde artış olduğu ve kontrol olarak kullanılan askorbik asitin maksimum inhibisyon değerine yaklaştığı görülmüştür ve aynı zamanda nanoparçacıklarının E. coli bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi göstermiştir. Nanoparçacıkların *in vitro* değerlendirilmesinde, meme kanser; MDA-MB-231 ve meme normal; CRL-4010 hücre hatları kullanılmıştır. Nanoparçacıklar, CRL-4010 hücrelerine göre, MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla toksik etki göstermiştir ve 2,86 kat artış ile MDA-MB-231 hücrelerinde seçici apoptoza neden olmuştur. Nanoparçacıkların hücre ile etkileşiminin hücre içine alım ve hücre çeperine bağlanma yoluyla olduğu, hücre ile muamele edilen nanoparçacıkların Prusya mavisini boyanarak görüntülenmesi ile gösterilmiştir. Sonuçlara göre, yeşil sentez yoluyla elde edilen nanoparçacıkların, potansiyel bir antikanser, antioksidan ve antibakteriyel ajan olarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel, Antikanser, Antioksidan, Demiroksit Nanoparçacıkları, Yeşil Sentez.

ABSTRACT

MS THESIS

BIOSYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND *IN VITRO* EVALUATION OF IRON OXIDE NANOPARTICLES

Kübra SEYHAN

Necmettin Erbakan University
Institute of Science and Technology
Department of Molecular Biology and Genetics

Advisor: Assist Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN

2022, 97 Pages

Jury

Assist Prof. Dr. Tuğba Nur ASLAN

Prof. Dr. Gökhan KARS

Assist Prof. Dr. Derya ÖZHAVA

Metallic nanoparticles attract much attention as they can be used as nano-carrier in drug delivery, disease treatment, medical imaging in biomedical applications and in biotechnology studies. There exists iron oxides (FeO, Fe₂O₃, Fe₃O₄) nanoparticles among the most used metallic nanoparticles in the medical field. In recent years, studies have been carried out to synthesize magnetic nanoparticles that will be used in especially biomedical field with biological systems. For this purpose, more environmentally friendly materials with low toxicity can be obtained by using algae, enzymes, plant extracts. The use of materials of biological origin makes the nanoparticles surface biocompatible by preventing its collapse behavior and improving toxic effects by coating the surface. The fundamental purpose of the thesis is, the synthesis of iron oxide nanoparticles with an ultra-small size and stability for biomedical fields, characterization of nanoparticles and investigation of the effectiveness in cancer therapy. Characterization of nanoparticles synthesized was performed by Transmission Electron Microscope (TEM), UV-Vis Spectrophotometer (UV-Vis), X-ray Diffraction Spectroscopy (XRD), Zeta Potential Measurement, Infrared Spectrophotometer (FTIR), Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Vibrating Sample Magnetometer (VSM). Nanoparticles synthesized with Punica Granatum has the crystal form of Fe₂O₃, with an ultra-small size of 3.76 ± 0.59 nm, and are stable for weeks in aqueous solution. It is seen that antioxidant activity of nanoparticles is increased with the concentration of nanoparticles and approached the max. inhibition value of that of ascorbic acid used as control and nanoparticles also showed antibacterial activity to Escherichia coli bacteria. For *in vitro* evaluation of nanoparticles; breast cancer; MDA-MB-231 and breast normal; CRL-4010 cell lines were used. Nanoparticles displayed more toxic effect on MDA-MB-231 cells in contrast to CRL-4010 cells and gave rise to selective apoptosis with a 2.86 fold increase on MDA-MB-231 cells. It is showed that the interaction of nanoparticles with cells is occurred by cellular uptake of nanoparticles and binding nanoparticles on the cell membrane and it is visualized by Prussian blue staining of cells incubated with nanoparticles. According to the results, it is expected that nanoparticles synthesized by green ways will be able to contribute as a potential anticancer, antioxidant and antibacterial agent to the literature.

Keywords: Antibacterial, Anticancer, Antioxidant, Iron Oxide Nanoparticles, Green Synthesis.

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans Tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan, bilgisini ve tecrübesini esirgemeyen, her konuda yakın ilgi ve desteğini gördüğüm sevgili danışman hocam, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Tuğba Nur ASLAN'a, tezime katkılarından dolayı yardımcı danışmanım Sayın Doç. Dr. Suray PEHLİVANOĞLU'na, tez çalışmam boyunca bana her konuda yardımcı olan sevgili Öğr. Üyesi Fuat ASLAN'a, tez projemi destekleyerek gerekli maddi olanağı sağlayan Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğü'ne teşekkürü bir borç bilirim. Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvar arkadaşlarıma, çalışmalarını birlikte yürüttüğüm ve en zor anlarımı paylaştığım Ümran ATA, Hasan SİVRİKAYA, Muhammed Lengichow KADİR ve Feyza KOSTAK'a, hayatımın her aşamasında bana motivasyon ve destek veren arkadaşım Zehra ALAGÖZ ve Ali Furkan YAŞAR'a teşekkür ederim. Maddi manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım aileme, annem Keriman SEYHAN'a, babam Ramazan SEYHAN'a sevgili kardeşlerime Serkan SEYHAN'a ve varlığıyla bana güç veren Yıldız ŞAHİN'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Kübra SEYHAN
KONYA-2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
ÖNSÖZ	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER VE TABLO DİZİNİ	xii
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xiv
1.GİRİŞ	15
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI	16
2.2. Nanoparçacıklar	16
2.3. Nanoparçacık Çeşitleri.....	16
2.4. Manyetik Nanoparçacıklar	17
2.4.1. Manyetizma	18
2.5. Demir Oksit Nanoparçacıkları	20
2.6. Manyetik Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kullanım Amaçları ve Avantajları	23
2.7. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentez Yöntemleri	24
2.7.1. Termal ayrışma yöntemi	25
2.7.2. Hidrotermal ve solvotermal sentez	26
2.7.3. Mikroemülsiyon yöntemi.....	26
2.7.4. Ortak/birlikte çöktürme yöntemi	27
2.7.5. Yeşil sentez (Biyosentez).....	28
2.8. Punica Granatum (Nar)	29
2.8.1. Punica granatum ile yapılan demir oksitler çalışmaları ve sonuçları	30
2.9. Nanoparçacık Karakterizasyonu	31
2.9.1. Geçirimli elektron mikroskobu analizi (TEM)	31
2.9.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ve enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDX)	32
2.9.3. X-ışını kırınımı (XRD)	32
2.9.4. Zeta potansiyel/ yüzey yükü	32
2.9.5. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)	33
2.9.6. UV-görünür spektroskopisi (UV-vis spektroskopisi).....	33
2.9.7. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS).....	33
2.9.8. Titreşimli örnek manyetometrisi analizi (VSM).....	34
2.9.9. Termogravimetri analizi (TGA).....	34
2.10. Kanser Tanımı ve Genel Özellikleri	35
2.11. Kanser Hücresi Oluşumu	36
2.12. Kanser Türleri	38

2.12.1. Metastaz	38
2.12.2. Non-metastaz	39
2.13. Meme Kanseri	39
2.14. Kanser Tedavisi	40
2.15. MDA-MB-231 ve CRL-4010 Hücre Hatları	41
2.16. Sitotoksisite Çalışmaları	41
2.16.1. MTT hücre canlılık testi	42
2.16.2. Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi ile apoptozun belirlenmesi	43
2.16.3. Hücresel alım ve prusya mavisi boyaması.....	44
2.16.4. Antioksidan aktivitesi	44
2.16.5. Antimikrobial aktivitesi	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	47
3.1. Materyal ve Kimyasallar	47
3.2. Kullanılan Cihazlar	48
3.3. Pınuca Granutum Kabuklarının Hazırlanması ve Ekstraksiyonu	49
3.3.1. Pınuca granutum özütünün organik ekstraksiyonu	50
3.4. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Yeşil Sentezi.....	51
3.4.1. Demir oksit nanoparçacıklarının pınuca granutum ekstraktı (ph: 3.5) ile yeşil sentezi	51
3.4.2. Demir oksit nanoparçacıklarının pınuca granutum ekstraktı (ph: 11) ile yeşil sentezi	52
3.5. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu.....	53
3.6. Demir Oksit Nanoparçacıklarının <i>in vitro</i> Deneyleeri	54
3.6.1. Hücre hatları ve büyütme koşulları.....	54
3.6.2. Sitotoksisite testi (MTT testi)	55
3.6.3. Demir oksit nanoparçacıklarının hücre içine alınması	56
3.6.4. Aneksin-V/PI boyaması (Flow sitometre analizi)	56
3.7. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Antioksidan Aktivitesi (DPPH Metodu)	57
3.8. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	57
3.8.1. Besiyeri hazırlanması	57
3.8.2. Bakteri çoğaltma	58
3.8.3. Spot ekim	58
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	59
4.1. Bitki Özütlerinin Ekstraksiyon	59
4.2. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentez Optimizasyonu.....	60
4.3. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu.....	64
4.3.1. Nanoparçacıkların şekil boyut analizi.....	64
4.3.2. Nanoparçacıkların UV/VIS absorbans spektrumları	65
4.3.3. Nanoparçacıkların FT-IR analizleri	66
4.3.4. Nanoparçacıkların zeta potansiyelleri analizleri.....	70
4.3.5. Nanoparçacıkların TGA analizleri.....	71
4.3.6. Nanoparçacıkların XRD analizleri.....	72
4.3.7. Nanoparçacıkların VSM analizleri	79
4.4. Antioksidan Aktivitesi Tayini.....	82
4.5. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları	83
4.6. Sitotoksisite Testleri	85
4.7. Anneksin-V Apoptoz Analizi (Flow Sitometre Analizi)	86

4.8. Hücre İçindeki Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kantitatif Tayini	91
4.9. Hücre İçindeki Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kalitatif Analizi	93
(Prusya Mavisı Boyası).....	93
4.10. İstatistiksel Analiz.....	94
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	95
5.1. Sonuç	95
5.2. Öneriler	97
6. KAYNAKLAR	98

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

nm	:	Nanometre
μ l	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
mg	:	Miligram
g	:	Gram
ζ	:	Zeta Potansiyeli
ppb	:	Milyarda bir
K	:	Kelvin
$^{\circ}$ C	:	Santigrat
rpm	:	Dakikada Devir Sayısı
pH	:	Potansiyel Hidrojen Değeri
dk	:	Dakika
T	:	Tesla
OD	:	Optik Dansite

Kısaltmalar

FeO	: Demir Oksit
SPFeON	: Süperparamanyetik Demir Oksit Nanoparçacıklar
MRI	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
PG	: Punica Granatum (Nar)
MDA-MB-231	: İnsan Meme Metastatik Adenokarsinomu
CRL-4010	: Non-Metastaz Meme Hücre Hattı
PBS	: Fosfat Buffer Saline Solusyonu
MTT	: 3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid
PI	: Propidium Iodide
MHA	: Mueller Hinton Agar
DPPH	: 2,2-difenil-1-pikril-hidrazil
[Fe ² (CN) ₆] ⁴⁻	: Hekzasiyanoferrat (II) anyonu (ferrosiyandır)
PS	: Fosfatidilserinler
FITC	: Floresan İzotiyosiyandır
FBS	: Fetal Bovine Serum
IC	: İnhibisyon Yüzdesi
IC ₅₀	: Yarı-Maksimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ATCC	: Amerikan Hücre Kültürü Koleksiyonu
UV/VİS	: Ultraviyole/Görünür
ICP-MS	: İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi
TEM	: Geçirgenli Electron Mikroskopisi
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi
XRD	: X-Işını Kırınımı
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
VSM	: Titreşimli örnek manyetometrisi analizi
TGA	: Termal gravimetrik analizi

ŞEKİLLER VE TABLO DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. Hematit (α -Fe ₂ O ₃), manyetit (Fe ₃ O ₄), maghemit (γ -Fe ₂ O ₃) kafes yapıları . 20 (Karakelle, Avşar, 2019).....	20
Şekil 2. ϵ -Fe ₂ O ₃ kristal yapısı (Thomas, 2010).	22
Şekil 3. Demir oksit nanoparçacıklarının uygulama alanları.	23
Şekil 4. Demir oksit nanoparçacıklarının, biyomedikal uygulama için bazı sentez yöntemleri ve modifikasyonlarının şematik gösterimi (Israel ve ark., 2020).	25
Şekil 5. Apoptoz sırasında hücrelerin yapısal değişikliklerinin gösterimi (Şahin, 2017).	37
Şekil 6. Hücre ölümünün şematik gösterimi.	37
Şekil 7. Primer tümörün büyümesi ve dolaşıma çıkması ile oluşan metastaz gösterilmektedir (Dilmaç, 2014).	39
Şekil 8. Meme anatomisi (Özlüer, 2018).	40
Şekil 9. Meme kanseri belirtileri ve evreleri (Baran, 2013).	40
Şekil 10. MTT bileşiğinin formazan tuzuna dönüşüm formülü (Güleç, 2016).	43
Şekil 11. Kurutulan ve öğütülen Punica Granutum kabuğu.	49
Şekil 12. Punica Granutum ekstraktın posasından arındırılması.	50
Şekil 13. Punica Granutum özütünün ekstraksiyonu.	51
Şekil 14. Nanoparçacık örneklerine yapılan diyaliz işlemi.	53
Şekil 15. a. MDA-MB-231 hücre hattı, b. CRL-4010 hücre hattı mikroskop görüntüleri.	55
Şekil 16. 3 farklı derişimdeki (0.001, 0.01, 0.1 g/ml) ekstrakt ile 24 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).	59
Şekil 17. 3 farklı derişimdeki (0.001, 0.01, 0.1 g/ml) ekstrakt ile 24 saat inkübe edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).	60
Şekil 18. FeO-PG1 nanoparçacık örneğine ait taramalı electron mikroskobu görüntüsü (FESEM); skala: 10 μ m.	61
Şekil 19. FeO-PG1 nanoparçacık örneğinin EDX Analizi.	61
Şekil 20. FeO-PG2 nanoparçacık örneğine ait taramalı electron mikroskobu görüntüsü (STEM); skala: 100 nm.	62
Şekil 21. FeO-PG2 nanoparçacık örneğinin EDX Analizi.	62
Şekil 22. Farklı ekstrakt derişimlerinde sentezlenmiş FeO-PG2 süspansiyonları.	63
Şekil 23. Nanoparçacık örneklerine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (TEM, 120 kV); a. FeO-PG1, skala: 50 nm. b. FeO-PG2, skala: 20 nm. Tem görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafikleri, c. FeO-PG1, d. FeO-PG2, 100 parçacık boyutu ölçülerek elde edilmiştir.	64
Şekil 24. FeO-PG1 nanoparçacıklarının ve PG ekstraktının Uv-Vis absorpsiyon spektrumu.	65
Şekil 25. FeO-PG2 nanoparçacıklarının ve PG ekstraktının Uv-Vis absorpsiyon spektrumu.	66
Şekil 26. PG ekstraktı (kırmızı) ve FeO-PG1 nanoparçacığına (mavi) ait FTIR spektrumları.	68
Şekil 27. PG ekstraktı (siyah) ve FeO-P2 nanoparçacığına (kırmızı) ait FTIR spektrumları.	69
Şekil 28. FeO-PG1 nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.	70

Şekil 29. FeO-PG2 nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.....	70
Şekil 30. FeO-PG2 nanoparçacığının TGA grafiği.	71
Şekil 31. a. FeO-PG1 ve b. FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.....	72
Şekil 32. PG ekstrakt örneğinin XRD deseni.	73
Şekil 33. a. İndirgenme yoluyla ve b. Yükseltgenme yoluyla, elde edilen nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.	74
Şekil 34. FeO-PG1 nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).	75
Şekil 35. FeO-PG2 nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).	76
Şekil 36. Sadece Fe ³⁺ iyonu ile sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).....	77
Şekil 37. Sadece Fe ²⁺ iyonu ile sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).....	78
Şekil 38. FeO-PG1 nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M–H) döngüsü.....	79
Şekil 39. FeO-PG2 nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M–H) döngüsü.....	80
Şekil 40. ‘a. Örnek 1 ve b. Örnek 2 c. Örnek 3 d. Örnek 4 e. Örnek 5 f. Örnek 6 g. Örnek 7’ nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.....	82
Şekil 41. 42 ppm’den başlayan farklı derişimlerde FeO nanoparçacıkları ile kontrol olarak kullanılan askorbik asitin gösterdiği % inhibisyon değerleri (n=3).....	83
Şekil 42. <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerinin oluşturduğu koloniler.....	84
Şekil 43. 3 farklı derişimdeki (22 ppm, 44 ppm ve 66 ppm) FeO nanoparçacık ile 24 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).	85
Şekil 44. 3 farklı derişimdeki (22 ppm, 44 ppm, 66 ppm) FeO nanoparçacık ile 24 saat inkübe edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).....	86
Şekil 45. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacıkları ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hatları ve kontrol grubu için akım sitometrisi ölçümü analizi sonuçları.	87
Şekil 46. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometresi ölçümü analizi sonuçları.	88
Şekil 47. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hatlarının 24. saat % apoptoz grafiği.	89
Şekil 48. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücre hatlarının 24. saat % apoptoz grafiği.	89
Şekil 49. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarının 24. saat % toplam apoptoz grafiği (Toplam apoptoz= erken apoptoz + geç apoptoz).	90
Şekil 50. 44 ppm FeO nanoparçacıkları ile 1, 6, 12, 48, 72 saat inkübe edilen MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücrelerinde, hücre başına altın derişimi (ppm/hücre) (n=3). ...	91
Şekil 51. MDA-MB-231 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.....	93
Şekil 52. CRL-4010 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.....	94

TABLÖLAR

Tablo 1. Deneylerde kullanılan kimyasalların listesi.	47
Tablo 2. Deneylerde kullanılan cihazların listesi.	48
Tablo 3. FeO nanoparçacık sentezinde kullanılan reaksiyon parametreleri.	63
Tablo 4. Standart absorpsiyon FT-IR bantları ile PG ekstraktı, FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarına ait bantların karşılaştırılması.	66
Tablo 5. FeO nanoparçacık sentezinde kullanılan reaksiyon parametreleri.	81
Tablo 6. <i>E. coli</i> ve <i>S. aureus</i> bakterilerinin oluşturduğu koloni sayısı.	84

1.GİRİŞ

Özelleşmiş alanlarda uyarlanabilen kimyasal karakteristiğe sahip malzemelerin sentezi, yeni teknolojilerin gelişmesi açısından önem taşımaktadır. Son dönemlerde yapısı ve özellikleri belirlenmiş maddelerin nano boyuta indirgenerek kimyasal yapısının ve özelliklerinin değiştirilmesi üzerine çalışmalar artmaktadır. Bunun sebebi maddelerin belirli boyutlarda hacimsel yapılarından farklı olarak normalin dışında özellik ve işlevsellik göstermeleridir (Uçan, 2015). Nanoteknoloji kavramını, indirgenmiş nanometre ölçeğinde malzemeler veya materyaller üreten, kullanıma sunan teknoloji olarak görmek mümkündür (Turunç, 2019; Uçan, 2015). Temelde benzersiz nesnelerin yeni uygulamalarına olanak tanınması, belirli nanometre boyutlardaki maddenin yapısının anlaşılması (Kütük, 2010) ve maddenin kontrol edebilmesini mümkün kılmaktadır (Hulla ve ark., 2015). Nano kelimesi, Yunanca "nannos" kelimesinden köken alır ve "cüce" anlamına gelmektedir. Günümüzde ise nano terimi, ölçü birimi olarak kullanılmakta ve herhangi bir birimin milyarda biri anlamına gelmektedir (Turunç, 2019; Uçan, 2015). Malzemede boyut ufaldıkça atomik özellikler, farklılık göstermesinden dolayı dikkat çekici hale gelmektedir. Maddeleri nano boyuta indirgeyerek kullanmak enerji yönünden kuvvetli, hafif ve boyut olarak küçük materyaller üretilmesini olanak sağlamaktadır. Bu sebepler doğrultusunda nanoteknoloji ticari olarak ilgi çekmiş ve kozmetik ürünler, kendini temizlenebilen boyalar, patlamayan otomobil lastikleri ve çizilmeyen otomobiller, deterjanlar, temizlik bezleri gibi ürünler piyasaya sunulmuştur (Gülten, 2007; Yürüksoy, 2020). Nanoteknolojinin hedefi daha az maliyet ile istenen özellikte cihaz ve sistemlerin tasarımı, karakterizasyonu, üretim ve uygulamalarıdır. Nano boyuttaki bir materyallerin daha dayanıklı ve uzun ömürlü olduğu bildirilmiştir (Gülten, 2007; Yürüksoy, 2020). Nanoteknoloji kullanılarak üretilen malzemelere "nanomateryal" adı verilmektedir (Ates ve Bahceci, 2015; Turunç, 2019). Bugüne kadar tanımlanmış nano yapılar ise; nano kristaller, parçacıklar, tüpler, teller, çubuklar veya nano ince filmler gibi işlevsel yapılardır. Nanoteknoloji uygulama alanları, birçok endüstride geniş kapsamlıdır. Farmasötik uygulamalarda teşhis biyosensörleri, ilaçların dağıtım sistemleri ve görüntüleme araçları olarak kullanılmaktadır. Kozmetik ve gıda sektöründe ise üretim, paketlenme, raf ömrü ve antibakteriyel iyileştirmeler için önemli ölçüde kullanımı artmıştır. Bunların yanı sıra, temiz enerji üretiminde de önemli bir etkiye sahiptir, daha verimli güneş pilleri ve çevre dostu pillerin üretimini gerçekleştirmektedir (Hulla ve ark., 2015).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.2. Nanoparçacıklar

Nano terimi, fiziksel bir büyüklüğün milyarda biri anlamına gelen, bir ölçme birimidir (Lenhardt ve ark., 2008). ‘Nanoparçacıklar’ boyutları 1-100 nm aralığında olan toz taneleri ya da parçacık olarak tanımlanmış nano boyutlu malzemeler olarak tanımlanmaktadır (Pehanich, 2006; Goesmann ve Feldmann, 2010). Nanoteknoloji ise nanoboyutlu malzemelerin hazırlanması, karakterizasyonu ve uygulamaları ile ilgilenen bir teknoloji alanıdır. Nanoboyutlu malzemelerin, kendi bulk yapıları ile kıyaslandığında kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey atomlarının sayısı gibi etkiler ile farklı özellikler sergiledikleri görülür (Liveri, 2006; Jeong ve ark., 2007). Bunun sebebi, nanoparçacıkların hacim yüzey alanı oranı çok büyük olmasından dolayı, büyük yüzey enerjilerine sahip olmalarıdır (Goesmann ve Feldmann, 2010). Bu sayede kimyasal ve fiziksel özellikleri değişirken aynı zamanda işlevsellikleri de değişmektedir ve farklı bilim alanlarında uygulama alanı bulabilecek ve birçok avantaj sağlayabilecek akıllı küçük malzemeler elde edilmektedir (Jamkhande ve ark., 2019; Dinparvar ve ark., 2020). Özellikleri geliştirilmiş nanoparçacıkların sentezi ile katalizörler, süper iletkenler, yüzey aktif olan maddeler, ilaç taşıyıcı sistemler, biyosensörler gibi ürünler piyasaya kazandırılmıştır (Ates ve Bahceci, 2015; Turunç, 2019). Tıp alanında kullanımı ise yeni tedavi yöntemlerine imkân sağlanmaktadır. Örnek olarak, nanoboyutta sentezlenmiş miseller; içinde kapsüllenmiş küçük ilaç moleküllerini hedef bölgeye taşıyabilme imkânı sağlamaktadır. Böylece toplam ilaç tüketimi ve ilacın oluşturduğu yan etkileri azaltmada etkili olmaktadır (Ateş ve ark., 2013).

2.3. Nanoparçacık Çeşitleri

Nanoparçacıkların üretiminde kullanılan birçok farklı kimyasal yöntem bulunmaktadır. Nanoparçacıklar silikat, metal, metal oksitler, seramik ve oksit olmayan seramik, polimer, organik ve inorganik, karbon türevleri, biyomoleküller gibi yapılardan farklı morfolojilerde üretilebilirler. Temelde morfolojiler heliks, üçgen, küresel, silindirik, tüp, çubuk ve kübik gibi şekillerde olmaktadır (Nasseri, 2013). Bununla birlikte, nanoparçacıkların uygulamadaki ihtiyaçlarına bağlı olarak yüzey modifikasyonları tasarlanmaktadır.

Nanoparçacıkları, karbon içeren inorganik nanoparçacıklar ve organik nanoparçacıklar olarak sınıflandırmak mümkündür. İnorganik nanoparçacıklar manyetik, soy metal (platin, altın, paladyum, gümüş) ve yarı iletken nanoparçacıklarıdır (kuantum noktaları, demir oksit, titanyum oksit ve çinko oksit). İnorganik nanoparçacıklardan soy metal nanoparçacıkları çoklu fonksiyonelliğe sahip olduğu için araştırmalarda ilgi çekmektedirler (Nasseri, 2013). Metal bazlı nanoparçacıklar ise altın kolloidler, nanokabuklar, nanoçubuklar, süperparamanyetik demiroksit nanopartiküllerdir (Lewinski ve ark., 2008). Organik nanoparçacıklar ise karbon temelli; çok katmanlı nanotüpler, fulerenlerdir. Polimerik nanoparçacıklar içinde yer alan doğal polimerler ise; proteinler, nükleik asitler, kitosan, oligosakkaritlerdir (Dyawanapelly ve ark., 2016). Bununla birlikte sentetik polimerlere; polimalik asit, polikaprolakton ve poliglutamik asit örnek olarak verilebilmektedir (Guo, 2011).

2.4. Manyetik Nanoparçacıklar

Çeşitli kompozisyonlarda, manyetik özellikte nanoparçacık sentezi yapılabilmektedir. Manyetik özellikteki nanoparçacıklar arasında; Fe_3O_4 (magnetit) ve $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemit), toz metalleri; Fe ve Co, bimetalik; $MgFe_2O_4$, $MnFe_2O_4$ ve $CoFe_2O_4$, alaşım karışımları; $CoPt_3$, ve FePt bulunmaktadır (Lu ve ark., 2007). Bu malzemelerin her biri farklı manyetik özellik göstermektedir ve bu da atomik yapılarıyla ilgilidir.

Demir oksit nanoparçacıkları teknolojik açıdan oldukça önemli olmakla birlikte ticari ve tıbbi olarak sensörler, kozmetik, biyotıp, teşhis ve radyoloji, patojenler, enzimler ve aşı üretimi gibi birçok alanlarda uygulamaya sahiptir (Gole ve ark., 2008; Hasırcı, 2019). Bu geniş aralıktaki kullanım potansiyelleri, yüksek kimyasal kararlılık, düşük toksisite, yüksek biyoyumluluk, manyetik yapı, yüksek yüzey alanı ve küçük bant aralığı gibi benzersiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Abbasi ve ark., 2019).

Manyetik nanoparçacıklar dış manyetik alana maruz bırakıldığında, uygulanan alan yönünde net bir manyetik moment kazanmaktadır. Buna “mıknatıslanma” adı verilmektedir. Manyetik nano ya da mikro boyuttaki malzemeler manyetizma özelliklerine göre paramanyetik, diyamanyetik ve ferromanyetik olarak sınıflandırılırlar (Gole ve ark., 2008).

2.4.1. Manyetizma

Manyetizma, atomlarda bulunan elektronların yörünge ve dönüş hareketleri arasındaki mekaniksel etkileşimlerden kaynaklanmaktadır. Bu etkileşimler güçlü veya zayıf olabilir. Manyetik malzemeler, harici olarak uygulanan bir manyetik alanda (H) ölçülen manyetik momentin büyüklüğü ve yönüne (M) göre sınıflandırılmaktadır (Soetaert ve ark., 2020).

Paramanyetizma; bazı atomlar, dış elektron katmanlarında çiftlenmemiş elektronlara ve bir de net dipol momente sahiptirler. Bu tür maddelere harici manyetik alan uygulandığı esnada momentler manyetik alan yönünde sıralanmaktadır. Paramanyetik maddeler pozitif değerli fakat zayıf bir tepki verirler. Yani manyetik alan etkisiyle manyetik momentleri kısmi yönelmeler gösterir. Harici alan uzaklaştırıldığında indüklenen manyetik alan da kaybolur ve kalıcı manyetizasyon göstermezler (Özel, 2015).

Diyamanyetik; maddelerin dış kabuklarında çiftlenmemiş elektronları yoktur ve sürekli manyetik özelliğe sahip değildirler. Dış manyetik alan uygulandığında materyalin içinde manyetik alanla ters yönde (negatif) küçük bir alan meydana gelmektedir. Uygulanan manyetik alanla birlikte manyetizasyon, doğru orantıda değişmektedir. Diyamanyetik yanıt bütün malzemelerde oluşmaktadır. Manyetik alan kaldırıldığında da manyetizasyon ortadan kalkmaktadır. Biyolojik dokuların da dahil olduğu çoğu malzeme zayıf bir şekilde diyamanyetik özelliğe sahiptirler (Lu ve ark., 2007; Özel, 2015).

Ferromanyetizma; demir, nikel, kobalt gibi metallerin manyetik özellik göstermesi için harici bir manyetik alan uygulanmasına gerek yoktur. Manyetik maddelerin bilinen en genel tipidir. Dış manyetik alan uygulandığında yapısında yer alan atomlar daha düzenli hale gelerek oldukça yüksek manyetizasyona sahip olmaktadırlar. Bununla birlikte harici manyetik alan kaldırılrsa da bir dereceye kadar manyetik etki kalmaktadır. Bunun sebebi manyetik alanın yokluğunda bile manyetik momentlerin aynı hizada kalmasından kaynaklanmaktadır. Ferromanyetik malzemelerdeki etkileşimler manyetik temelli olmaktan çok elektriksel etkileşimlerin bir sonucudur. Yüksek sıcaklıklarda ferromanyetik yapıları bozulan maddeler paramanyetik davranış sergilemeye başlarlar (Çakmak, 2020).

Süperparamanyetizma; bu tür malzemeler, paramanyetiklere benzer özelliklere sahiptirler. Uygulanan dış manyetik alanlara karşı oldukça hassas hale getiren yüksek bir manyetik duyarlılık gösterirken minimum kalıcılığa sahiptirler. Harici manyetik alan ortadan kalktığına manyetizasyon göstermezler. Süperparamanyetizma davranışı, manyetik hedef taşıyıcılar için önemli bir özelliktir. Ferromanyetizmanın süperparamanyetizmadan farkı da partikül boyutundan kaynaklanmaktadır. Literatüre göre, partikül boyutunun 50 nm altında olması parçacıkların süperparamanyetik davranış göstermelerine neden olmaktadır (Gole ve ark., 2008; Hasırcı, 2019).

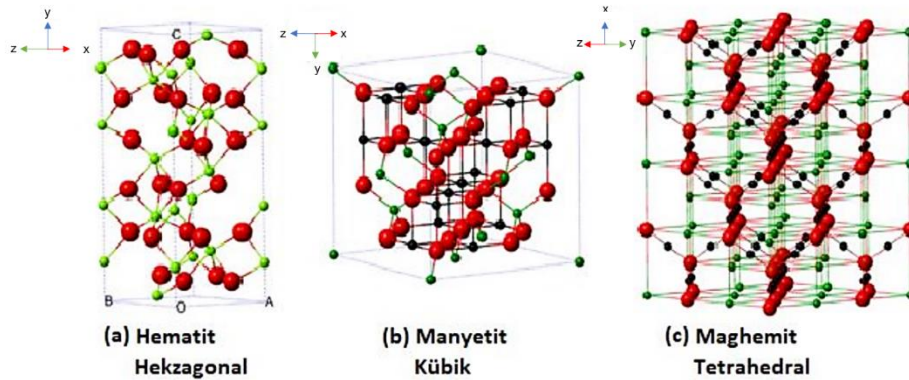
Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar (SPFeON); süperparamanyetik davranış paramanyetik ve ferromanyetik davranışların bir bileşimi olarak tanımlanmaktadır. Süpermanyetizma özelliği gösteren nanoparçacıkların büyüklük ve yüzey morfolojisi, manyetik özelliklerini etkilemektedir. Bu etki parçacık büyüklüğü azaldıkça daha da artar. SPFeON'lar 5-20 nm arasındaki biyoyumlu "Maghemit" (γ - Fe_2O_3) ve "Manyetit" (Fe_3O_4) parçacıklardır. Bu manyetik nanoparçacıklar, homojen ve ferroakışkan süspansiyon çözeltileridir (Nasseri, 2013).

SPFeON'ların, yüksek manyetizasyon değerleri ile sonuçlanmasının nedeni manyetik alan uygulandığında, manyetik momentlerin uygulanan alana paralel bir yönde hizalanma eğilimi göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Fakat harici alan kaldırıldığında, SPFeON'ların uzunlamasına ve enine gevşemeleri nedeniyle momentler orijinal eksen konumlarına geri dönerler. SPFeON'lar temelde kararsız ve bozulma eğilimindedirler. Kolayca oksitlenebilen metalik nanoparçacıklar oksijen açısından zengin ortamlarda manyetizmalarını kaybederler. Özellikle tıbbi uygulamalarda, tümör koşulları gibi kimyasal ve fiziksel olarak güç ortamlarda uzun süre stabil kalmalıdır. Bu nedenle SPFeON'larda yüzey kaplama gibi çeşitli yöntemler kullanılarak stabilite sağlanmaktadır. Çeşitli moleküllerle reaksiyona girebildiğinden, kullanım alanları geniştir (Yasin ve ark., 2020).

2.5. Demir Oksit Nanoparçacıkları

Demir oksitler, demir ve oksijenden meydana gelen kimyasal bileşiklerdir. Demir oksitlerin çoğu doğada bulunmakla birlikte, laboratuvar ortamında da sentezlenmektedirler. Amorf demir (III) oksit dışında, 6 kristal, susuz demir oksit türü bulunmaktadır. Bunlar; Fe_3O_4 (manyetit), Fe_2O_3 'in 4 çeşit polymorfolojisi vardır; $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit), $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit), $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, and $\varepsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ve FeO fazı (wustit) (Ohkoshi ve Tokoro, 2013; Tucek ve ark., 2012). $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit), Fe_3O_4 (manyetit) ve $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) yığın ve nanoboyutta bulunan en yaygın demir oksit türleridir ve genellikle doğada da bulunmaktadır. Farklı sentetik yollar ile bu fazların farklı morfolojilerini, farklı boyutlarını ve farklı boyut dağılımları ile hazırlamak mümkündür (Tucek ve ark., 2010).

$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) minerali, kırmızımsı kahverengi tonlarda renge sahiptir ve ferrimanyetik etkili bir mineraldir. Fe_3O_4 ile benzer yapıya sahiptir. Fe_3O_4 hava ile temas ettiğinde oksitlenmekte ve $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ oluşumuna neden olmaktadır (Özel, 2015). Eski demir oksitlerden en bilineni olan $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit), kayalarda ve topraklarda yaygın olarak bulunmaktadır. Çelik endüstrisinde ana demir kaynağı olarak kullanılmaktadır. Oda koşullarında kararlı bir yapıya sahiptir. Temelde paramanyetiktir ve asitler tarafından kolayca etkilenmektedir. Kristal halde bulunurken siyah veya gri renkte, parçalanmış halde ise kırmızı renge sahiptir. Fe_3O_4 (manyetit) ferrimanyetiktir; harici bir mıknatısa çekilir, harici dış manyetik alanın yokluğunda da manyetik özelliğini korumaktadır. Yarı kararlı yapıya sahiptir. $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) ve $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit)' in her ikisi de yeterince küçük kristaller oluşturduktan sonra süperparamanyetik hale gelebilmektedir (Dulinska-Litewka ve ark., 2019). Fe_3O_4 (manyetit), $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) ve $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematit) demir oksitlerinin kristal yapısı, sıkı istiflenmiş kübik yapıdır (Şekil 1) (Ercan, 2019).



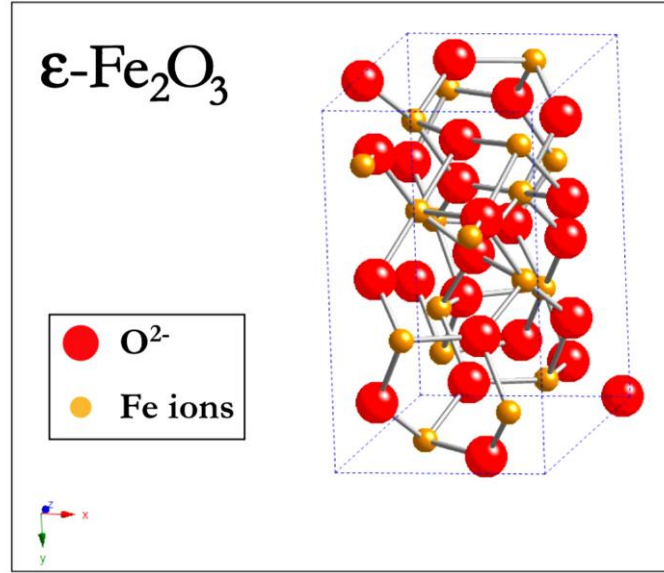
Şekil 1. Hematit ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), manyetit (Fe_3O_4), maghemit ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) kafes yapıları (Karakelle, Avşar, 2019).

Fe_3O_4 (manyetit), oksijen varlığında $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemit), 300 °C ve daha yüksek sıcaklıklarda ise $\alpha-Fe_2O_3$ (hematit)' e okside olabilir. Maghemit, manyetite göre daha az manyetik özelliğe sahipken, hematit ise antiferromanyetiktir. Bu sebeple manyetitin oksidasyonunu önlemek için birçok uygulamada yüzey kaplaması yapılmaktadır (Ercan, 2019).

Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar (SPFeON); süperparamanyetik davranış paramanyetik ve ferromanyetik davranışların bir bileşimi olarak tanımlanmaktadır. Manyetik özelliklerini yalnızca dış manyetik alana maruz kaldıklarında ortaya çıkarırlar. Süpermanyetizma özelliği gösteren nanoparçacıkların büyüklük ve yüzey morfolojisi, manyetik özelliklerini etkilemektedir. Bu etki parçacık büyüklüğü azaldıkça daha da artar. SPFeON'lar 5-20 nm arasındaki biyouyumlu $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemit) ve Fe_3O_4 (manyetit) parçacıklarıdır. Bu manyetik nanoparçacıklar, homojen ve ferroakışkan süspansiyon çözeltileridir (Nasseri, 2013).

SPFeON' ların, yüksek manyetizasyon değerleri ile sonuçlanmasının nedeni manyetik alan uygulandığında, manyetik momentlerin uygulanan alana paralel bir yönde hizalanma eğilimi göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Fakat harici alan kaldırıldığında, SPFeON' ların uzunlamasına ve enine gevşemeleri nedeniyle momentler orijinal eksen konumlarına geri dönerler. SPFeON' lar temelde kararsız ve bozulma eğilimindedirler. Kolayca oksitlenebilen metalik nanoparçacıklar oksijen açısından zengin ortamlarda manyetizmalarını kaybederler. Özellikle tıbbi uygulamalarda, tümör koşulları gibi kimyasal ve fiziksel olarak güç ortamlarda uzun süre stabil kalmalıdır. Bu nedenle SPFeON' larda yüzey kaplama gibi çeşitli yöntemler kullanılarak stabilite sağlanmaktadır. Çeşitli moleküllerle reaksiyona girebildiğinden, kullanım alanları geniştir (Yasin ve ark., 2020).

$\beta-Fe_2O_3$ ve $\varepsilon-Fe_2O_3$ demir oksit fazları ise, ilk olarak laboratuvarında bulunmuştur. Ara fazlardır ve doğal olarak nadir bulunmaktadırlar. Nanoboyutta hazırlanabilmektedirler ancak tek faz olarak elde edebilmek zordur ve termal olarak kararsızdırlar (Tuçek ve ark., 2012). Fe_2O_3 ' ün ε - polimorfolojisi dielektrik özellikleri ve oda sıcaklığında gösterdiği yüksek koersif alan büyüklüğü ile dikkat çekmiştir (Tuçek ve ark., 2010; Gich ve ark., 2005). $\varepsilon-Fe_2O_3$ antiferromanyetik özelliktedir ve kristal yapısı ortorombik yapıdır (Şekil 2) (Thomas, 2010).



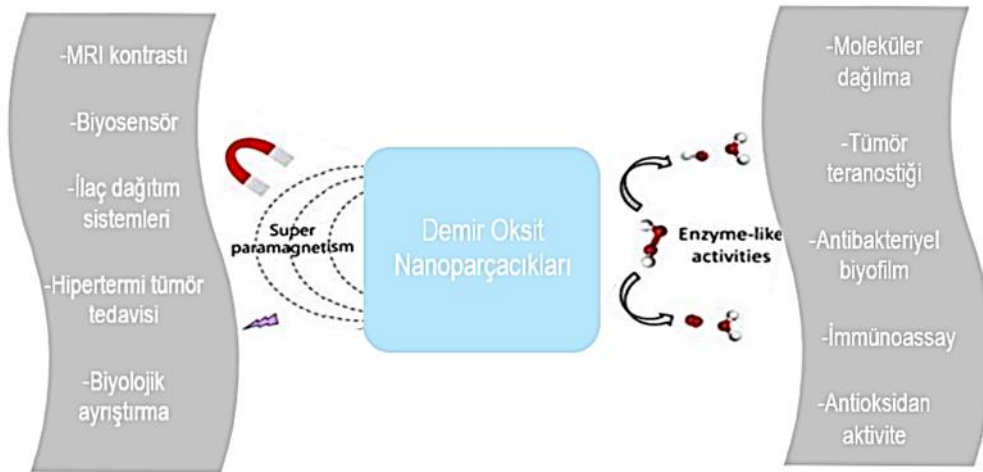
Şekil 2. $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ kristal yapısı (Thomas, 2010).

$\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparçacıklarının farklı manyetik özelliği (yüksek koersivite) nedeniyle biyotıp alanında kullanılabilirliği bazı çalışmalarda gösterilmiştir. $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparçacıklarının manyetik hipertermi etkisi araştırılması için yapılan çalışmada, hücre sitoplazmasınıninkine benzer vizkozitede bir ortamda düşük frekans (20–100 kHz) altında ısındığı bulunmuştur. Aynı ortamda, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) nanoparçacıklarının yüksek frekans altında (400–900 kHz) daha etkili ısındığı görülmüştür. $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparçacıkları hücre kültürü deneylerinde, geniş bir konsantrasyon aralığında toksisite göstermemiştir ve yüksek hücre sel alım göstermiştir. Sonuç olarak, $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparçacıklarının manyetik hipertermi uygulamaları için $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemit) nanoparçacıklarına göre daha üstün performans sergilemiştir (Gu ve ark., 2020). Bununla birlikte, $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanoparçacıkları ~ 500 K Curie sıcaklığı ile yüksek manyetokristalin anisotropisi özelliği ile farklıdır ve yüksek manyetik alan altında (11.75 T) MRI çalışmalarında kontrast ajanı olarak etkinliği gösterilmiştir (Kubickova ve ark., 2019).

Demir oksit nanoparçacıklarının yüzeyi, çeşitli organik veya inorganik malzemeler tarafından modifiye edilebilmektedir. Demir oksit nanoparçacıkları özellikle manyetik yüksek kimyasal aktivite ve havada kolayca oksitlenebildiği için çoğunlukla manyetik özelliğin azalmasına neden olmaktadır. Bu nedenle, manyetik demir oksit nanoparçacıkların stabilitesini sağlamak için polimerler, biyomoleküller, silika, metaller vb. gibi uygun organik ya da inorganik malzemeler ile yüzeyin kaplanması stabilizeyi sağlamada önemli rol oynar. Bu stratejiler, aynı zamanda daha fazla işlevselleştirme için de kullanılmaktadır. Bu uygulamalar için belirli boyut, şekil ve yüzey karakteristiğine sahip manyetik özelliklerde nanoparçacıklar sentezlenmektedir (Wu ve ark., 2008).

2.6. Manyetik Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kullanım Amaçları ve Avantajları

Demir oksitlerin genellikle sahip olduğu manyetik özellikler sayesinde, manyetik kayıt ortamı, katalizörler ve ferro-akışkanlar, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) için kontrast maddeler olarak ve kanser tedavisi için terapötik maddeler olarak uygulama alanları bulmaktadırlar (Teja ve Koh, 2009). Manyetik demir oksit nanoparçacıklarının biyotıp uygulamalarında, oral ilaç dağıtımında ve damar yolunda karşılaşılan olumsuz etkileri atlatarak hedef bölgeye ilaç taşınmasında önemli rol almaktadır. Demir oksitlerin kullanım yaygınlığı toksisite, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, kararlı boyut dağılımı, kimyasal ve manyetik kararlılık gibi benzersiz özelliklerinden kaynaklanmaktadır (Aisida ve ark., 2020). Demir oksit nanoparçacıklarının uygulama alanları Şekil 3'te gösterilmiştir. Ayrıca demir oksit nanoparçacıkları, biyoaktif malzemeler ya da polimerik malzemelerle kaplanarak kullanılabilir. Temelde doğal biyoaktif bileşikler ve biyo-koruyucular, oksidatif reaksiyonlara duyarlıdır. Çevresel faktörler veya proses koşulları olan oksijen, ışık, yüksek sıcaklıklar, nem, pH değişiklikleri vb. tarafından kolayca bozunabilir ve uygulamaları kısıtlanır (Yürüksoy, 2020). Nano boyutta manyetik parçacıkların sentezlenerek biyoaktif malzemeler ya da polimerik zarflarla kapsüllenmesi/kaplanması bu sınırlamayı azaltabilir (Laurent ve ark., 2008; Wu ve Huang, 2017). Manyetik nanoparçacıklar içinde biyoaktif moleküller ile sarılması birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlar arasında olumsuz çevresel etkilerden korunma, kararsız bileşiklerin raf ömrünün uzatılması, terapötik ve fonksiyonel etkiler elde etmek için fonksiyonelleştirme ile hedefe yönelik kontrol salımlı nanomalzemeler geliştirilmesi bulunmaktadır (Ekinci ve Özdemir, 2021; Soltanzadeh ve ark., 2021).



Şekil 3. Demir oksit nanoparçacıklarının uygulama alanları.

2.7. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentez Yöntemleri

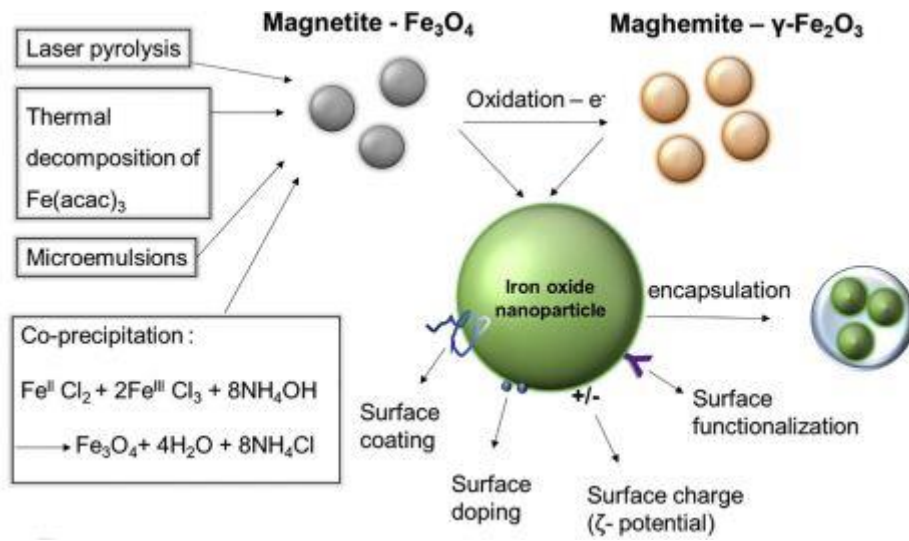
Nanoparçacıkların sentez yöntemlerini fiziksel, biyolojik, kimyasal olarak ayırmak mümkündür. Genel olarak, fiziksel yöntem; maliyetlidir, zaman tüketimi fazladır, ayrıca toksik ve biyoyumlu değildir. Biyolojik yollarla sentez yöntemi; kolay üretilebilir, biyoyumlu, çevre dostu, biyolojik olarak parçalanabilir, verimliliği yüksek ve malzeme bulunabilirliği açısından kolaydır. Kimyasal sentez yöntemi ise toksik, pahalı, yüzey aktif madde içermesi, düşük verimliliği ve düşük biyoyumluğu nedeniyle dezavantajlıdır (Aisida ve ark., 2020).

Nanoparçacıkların sentez yöntemleri iki başlık altında incelendiğinde; birincisi, “yukarıdan aşağıya” metodudur. Bu yöntem, nanoparçacık oluşturmak için büyük malzemelerin aşınma yoluyla parçalanmasına dayanmaktadır. Sentezlenen parçacıklar geniş boyut dağılımına ve çeşitli şekillere sahip olmasına rağmen, bu tür sentez yöntemi genellikle, uygulaması için boyut ve şeklin gerekli olmadığı seramik malzemeler için kullanılmaktadır. Mekanik aşındırma, elektronik patlama, yüksek enerji ve termik yöntem gibi çeşitli metodlar “yukarıdan aşağıya” sentez yöntemine girmektedir (Balcı, 2016). İkinci yol ise “aşağıdan yukarıya” olarak bilinmektedir. Daha büyük nanoparçacıklar oluşturmak için atomların veya moleküllerin birleşmesinden oluşmaktadır. Bu sentez ile daha homojen kimyasal bileşimi, boyut ve şekil açısından düzgün bir dağılıma sahip daha az kusurlu nanoparçacıklar elde edilebilmektedir. Bu tip nanoparçacıklar, şekil ve küçük parçacık boyutu dağılımının özellikle önemli olduğu biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal buharlaştırma, yanma, sol jel ve ultrasonik sprey pirolizi gibi metodlar “aşağıdan yukarıya” sentez yöntemine girmektedir (Liu ve ark., 2013).

Nanoteknoloji ve biyoteknoloji alanlarındaki uygulamalarda kullanılmak üzere monodispers demir oksit nanoparçacıkları elde etmek için birçok araştırma ve rapor geliştirilmiştir. Bu sayede parçacık boyutu, şekil kontrollü, kristallik, kararlılık, biyoyumluluk, yüzey yapısı, monodispersite ve son olarak manyetik özelliklerin uygun kontrolünün sağlanması açısından birçok verimli sentez yaklaşımları tanımlanmıştır (Hernandez ve ark., 2020; Wegmann ve Scharr, 2018).

Demir oksit nanoparçacıklarını sentezlemek için uygulanan bazı kimyasal yöntemler: mikroemülsiyon, sol jel metodu, hidrotermal, öncüllerin hidrolizi ve termolizi, akış enjeksiyon sentezleri ve elektrosprey sentezleri ve sonokimyasal sentez yöntemleridir.

Bu yöntemler ile yüksek kaliteli demir oksit nanoparçacıklarının sentezini gerçekleştirebilir. Genellikle bu yöntemler tıbbi görüntüleme uygulamaları için kullanılmaktadır. Temelde en yaygın demir oksit nanoparçacık sentez yöntemi, birlikte çöktürme yöntemidir (Laurent ve ark., 2008). Ayrıca nanoparçacıklar lazer piroliz teknikleri, mikroorganizma ya da bakteriyel sentez yöntemlerinden özellikle manyetotaktik bakteriler ve demir indirgeyen bakteriler gibi yöntemlerle de hazırlanabilir (Aisida ve ark., 2020).



Şekil 4. Demir oksit nanoparçacıklarının, biyomedikal uygulama için bazı sentez yöntemleri ve modifikasyonlarının şematik gösterimi (Israel ve ark., 2020).

Şekil 4.'te manyetitinin birkaç farklı yöntemle: birlikte çöktürme, demir asetil asetonatın ($\text{Fe}(\text{acac})_3$) termal ayrışması, mikroemülsiyonlar ya da lazer pirolizi gibi metotlar kullanılarak elde edilebileceği gösterilmektedir. Maghemit ise manyetitinin doğrudan oksidasyonu ile sentezlenebilir. Sentezlenen nanoparçacıkların daha sonra yüzey kaplaması, dopinglenmesi veya işlevselleştirilmesinin yanı sıra kapsülleme veya yüzey yükünün (ζ potansiyeli) değiştirilmesi ile bunlar biyomedikal uygulamalar için modifiye edilebilmektedir (Israel ve ark., 2020).

2.7.1. Termal ayrışma yöntemi

Bu yöntem, bileşiklerin yüksek sıcaklıkta kimyasal ayrışmasından oluşur. Termal ayrıştırma yöntemleri karmaşık olsa da, benzer dağılım ve boyut kontrolü ile yüksek kaliteli nanoparçacıkların üretilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda manyetizmalarını ve

kristallik derecelerini iyileştirerek ortak çöktürme sınırlamalarını ortadan kaldırmaktadır. Kontrol edilebilir sentez süreci, uygun özellik, parçacık boyutu, şekil ve yüksek kristallığe sahip demir oksit nanoparçacıklar elde edilebilir. Bu metot, demir (III)(dodekakarbonil) ya da demir (III) (asetilasetonat) kaynağının etanol içinde 280 °C'ye kadar sıcaklık kullanılarak termal ayrışmasını içerir. Nanoparçacıklar sulu ortamda dağılamazlar fakat yüzey aktif madde kullanımı boyunca sadece organik çözücü içinde çözülebilmektedirler. En büyük dezavantajı, sentez sırasında kimyasal olarak bağlanabilen toksik organik çözücüler kullanılmaktadır. Bu da nanoparçacıkların biyolojik uygulamalar için kullanımlarını sınırlamaktadır (Majida ve ark., 2017).

2.7.2. Hidrotermal ve solvotermal sentez

Hidrotermal sentez, metal tuzlarının aşırı doygunluğu ile sonuçlanan, suyu alınmış tuzu hidrolize etmek için yüksek basınç ve sıcaklığı içermektedir. Yüksek basınç ve sıcaklık, sudaki tuzların difüzyonu ile dehidrasyon yeteneğini arttırmak için kullanılmaktadır. Bu yöntem ile organik çözücü (solvotermal sistem) reaksiyon ortamında suyun yerini aldığından, hidrotermal yöntemin susuz bir işlem olduğu bilinmektedir. Bu yaklaşımla, iyi kristal özelliği gösteren ince taneler elde edilmektedir. Reaksiyon parametreleri; zaman, sıcaklık, basınç ve demir kaynağıdır. Bu metot, organik çözücü veya yüzey aktif madde kullanımı gerektirmez (Yusefi ve ark., 2020). Hidrotermal ve solvotermal kullanmanın avantajı, demir tuzları, üre, sodyum sitrat ve asetatın etilen glikol içinde homojen bir dağılım elde etmek için karıştırılması ve ardından otoklav reaktöre (teflon paslanmaz çelik) aktarılması ile tüm gün boyunca sıcaklığı 200 °C'ye kadar artırarak kolayca sentezlenmesidir (Wu ve ark., 2015).

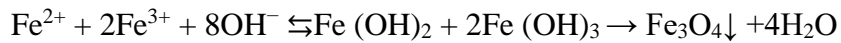
2.7.3. Mikroemülsiyon yöntemi

Mikroemülsiyon, iki karışmaz sıvı maddenin (yağ ve su) ara yüzeyinde bir yardımcı tabaka oluşturan yüzey aktif madde yardımı ile stabilize edilmiş, birbiriyle karışmayan iki sıvının termodinamik olarak kararlı olan çözeltinin stabil ve izotropik dispersiyonudur. Mikroemülsiyonlar üç bileşenden oluşur: Polar faz (su), polar olmayan faz (yağ) ve yüzey aktif madde. Yağ-su mikroemülsiyon sistemlerinde, küçük sulu nanodamlar organik fazda dağılır. Bu dağılım, moleküllerin hidrofilik baş kısımlarının sulu faza, hidrofobik kuyruklarının ise yağ fazına uzanması ile meydana gelmektedir. Sentezde, sulu faz farklı metal tuzları veya diğer bileşenleri içerirken, yağ fazı çeşitli

hidrokarbonlar ve olefinlerden oluşur. İki çeşit mikroemülsiyon yöntemi vardır. FeO nanoparçacıklarının sentezi için kullanılmış olan doğrudan olarak adlandırılan suda dağılmış yağ (o/w) ve ters olarak adlandırılan yağda dağılmış su (s/o) şeklinde ayrılmaktadır (Chia Hua Lin, 2015). Mikroemülsiyon tekniği ile hazırlanan nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri esas olarak yüzey aktif maddenin seçimine bağlıdır. Spesifik olarak nanoparçacıkların ortalama çapı 10-25 nm arasında değişen, neredeyse tek dağılımlı, küresel bir şekil oluşturur. Elde edilen nanoparçacıklar, kolaylıkla kontrol edilebilen homojen şekil ve küçük boyutlara sahiptir. Bu nedenle nanoparçacıkların çekirdeklenmesini ve büyüyerek aglomerasyon oluşmasını sınırlamaktadır. Fakat geleneksel birlikte çöktürme yöntemine kıyasla düşük verim elde edilir ve yüzey aktif maddelerin doğası gereği parçacıkların saflaştırılması karmaşıktır (Ansari ve ark., 2019).

2.7.4. Ortak/birlikte çöktürme yöntemi

Ortak çöktürme tekniği, Fe₃O₄ nanoparçacıklar gibi çeşitli metal oksit nanoparçacıkların sentezinde kullanılan geleneksel ve kolay bir yöntemdir. Bu yöntem, toksik ara maddeler veya çözücüler üretmez, öncü komplekslere ihtiyaç duymaz ve nanoparçacıklar oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda üretilebilir.



Denklem 1. Fe²⁺ ve Fe³⁺ tuzlarının alkali ortamda demir oksit formuna dönüşme reaksiyonu.

Yöntem Denklem 1. uyarınca, bazik ortamda 1:2 oranında Fe³⁺/Fe²⁺ tuzlarının karıştırılması ile gerçekleşmektedir. İdeal olarak çözelti 80°C'nin altında ya da oda sıcaklığında yapılmaktadır. Sentez, gaz korumalı veya korumasız olarak yapılabilir (Yusefi ve ark., 2020). Demir oksit nanoparçacıkların boyutu ve şekli, kullanılan tuza (klorürler, sülfatlar, nitratlar, perkloratlar vb.), demir iyonlarının oranına, reaksiyon sıcaklığına, pH değerine ve tuz çözeltisinin iyonik şiddetine bağlıdır. Sentez sırasında, pH 10 veya 11'in üzerindeyken nanoparçacıkların çekirdeklenmesi hızlandığı için pH değerinin kontrol edilmesi oldukça önemlidir. Ayrıca ortam ve diğer reaksiyon parametreleri; karıştırma hızı, pH kontrolü gibi parametreler de son derece önemlidir (Aisida ve ark., 2020).

Araştırmacılar, yüzey aktif maddeler olmadan birlikte çöktürme yoluyla homojen dağılımlı, tek şekilli ve küçük boyutlu Fe₃O₄ nanoparçacıkların kolloidal süspansiyonlarını

elde etmişlerdir. Fe_3O_4 'ün kolloidal süspansiyonları havalandırma ile doğrudan oksitlenebilmektedir. Buna karşılık, oksitlenmenin önüne geçmek ve monodispers nanoparçacıklar elde etmek için birçok yeni araştırma etkili yol açmıştır. Bunun için dekstran veya polivinil alkol (PVA) gibi yüzey aktif maddeler sentez sırasında reaksiyon ortamına eklenebilir veya parçacıklar sonraki bir adımda kaplanabilir. Bu sayede yüzey aktif maddeler koruyucu ajan görevi görmektedir. Birlikte çöktürme yöntemi ile fazla miktarda madde elde edilebilme avantajının yanı sıra bu sulu çözelti sentezlerinin dezavantajı, elde edilen süspansiyonun yüksek pH değerinin hem sentez hem de saflaştırma adımlarında ayarlanması, tek tip ve homojen dağılımlı nanoparçacıklara yönelik işlemin sınırlı bir başarıya sahip olmasıdır (Aisida ve ark., 2020; Ezhilarasi ve ark., 2016).

2.7.5. Yeşil sentez (Biyosentez)

Metal nanoparçacıkların sentezi için çevre dostu yöntemlerin kullanılması amacıyla günümüzde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda basit, ekonomik ve tekrarlayan tekniklerle yüksek oranda saf nanoparçacıklar üretmeyi sağlayan yeşil sentez olarak adlandırılan yöntemler geliştirilmiştir. Biyosentez veya yeşil sentez, reaksiyon sürecinde indirgeme/yükseltgeme rolleri nedeniyle aşağıdan yukarıya sentez yöntemi olarak bilinmektedir. Benzersiz özellikleri sayesinde nanoparçacıkların sentezini katalizleyen polifenoller ile birlikte bitki veya meyve özleri ve biyo-organizmalar; yüzey kaplama, indirgeyici ya da hem yüzey kaplama hem de indirgeyici ajan olarak kullanılabilirler (Yusefi ve ark., 2020).

Bununla birlikte, nanoparçacıkların geleneksel sentezi fiziksel ve kimyasal yöntemlerle de gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntemlerle hazırlanan nanoparçacıkların sentezinde; kuvvetli indirgeyici ajanlar, organik çözücü kullanma ve yüksek sıcaklık, basınç gereksinimi gibi bazı zorluklar karşımıza çıkmaktadır. Ayrıca kimyasal sentezler büyük ölçekli endüstriyel alanda yüksek maliyetli olmanın yanı sıra insan sağlığı üzerine toksik etki oluşturmasından dolayı risk taşımaktadır (Wu ve ark., 2011; Zhou ve ark., 2010). Bu dezavantajlar sebebiyle çevre dostu, biyoyumlu ve uygun maliyetli yeşil sentez yöntemi diğer yöntemlere göre tercih edilmektedir (Salavati-Niasari ve ark., 2012). Yeşil sentezde bitkiler ve mikroorganizmalar kullanılabilir. Aktinobakteriler, aerobik koşullarda manyetik özelliklere sahip manyetit nanoparçacıkların sentezinde kullanılmıştır (Bharde ve ark. 2008). Manyetotaktik bakteriler ve aerobik durumda indirgeyici özellik

gösteren bakterilerin kullanılması, süperparamanyetik özellik sergileyen FeO nanoparçacıkların sentezini sağlamıştır (Wu ve ark., 2008).

Yeşil sentezde bitki kullanılarak yapılan nanoparçacıkların sentezinde, basit reaksiyon koşulları ile önemli ölçüde dikkati çekmiştir. Bitki özleri biyoaktif fenolik, alkaloidler, flavonoidler, polisakkarit, vitaminler gibi çeşitli kümelerden oluşmaktadır. Biyoaktif bileşen içeriği yüksek olan bitkiler hem indirgeyici hem de kaplama maddesi olarak işlev görebilirler. Bu yüzden bitkiler antioksidan, terapötik ve gıda katkı maddelerine kadar çeşitli alanlarda büyük ilgi toplamıştır. Biyoaktif bileşenler farklı ve benzersiz özelliklere sahip nanoparçacıkların sentezine yol açabilmektedir. Parçacıklar çeşitli şekillerde (küreler, gövdeler, prizmalar, plakalar, iğneler, yapraklar veya dendritler) ve boyutlarda sentezlenebilir. Parçacığın şekil ve boyut özelliği bitki ekstraktının doğası, ekstraktın ve metal tuzlarının oranı, pH, sıcaklık ve reaksiyon süresi ayrıca karıştırma gibi sentez esnasında kullanılan ve uygulanan parametrelere bağlıdır (Abdullah ve ark., 2020).

2.8. Punica Granatum (Nar)

Günümüzde, bitki yan ürünlerinden elde edilen bitki özlerinin yiyecek muhafazasında, tarımda, farmasötikte, kozmetikte ve tıbbi tedavilerde kullanımına yönelik artan bir talep vardır (Soltanzadeh ve ark., 2021). Nar meyvesini kabukları (*Punica granatum* L.) meyve ağırlığının yarısını oluşturur ve doğrudan tüketilmez, yan ürün olarak kalır (Mohamad ve ark., 2019). Nar kabuğu, yaprak, çekirdek ve nar suyu farklı fitokimyasalları içermeleri nedeniyle tehlikeli rahatsızlıkları tedavi etmek için önem arz etmektedir. Bu fitokimyasallar araştırıldığında, nar kabuğunun polifenoller, flavonoidler (kateşinler ve antosiyaninler vb.), proantosiyandinler (Akhtar ve ark., 2015) ve hidrolize edilebilir tanenler (glikozun gallik, elajik asit esterleri. pedunkulajin, punikalın, ve punikalajin vb.) (Hussein ve ark., 1997) gibi biyoaktif bileşikler açısından zengin olduğu çeşitli makaleler tarafından bildirilmiştir (Sarkar ve Kotteeswaran, 2018). Ayrıca kabuğun aminoasitler, yağ asitleri, aromatik bileşikler, steroller, terpenoidler ve diğer bileşenlere nispeten düşük oranda alkaloid içeriğine sahip olduğu, alkaloidlerden piperidin ve pirolidinleri (Wang ve ark., 2010) içerdiği bilinmektedir.

Punica granatum kabuğunun güçlü antioksidan (Miguel ve ark., 2009), antikanserojenik (Keta ve ark., 2020), antimikrobiyal (Hanani ve ark., 2019; Jalali ve ark., 2020), antiviral, antiinflamatuvar (Özmert Ergin, 2019), antikolinesteraz (Bekir ve ark.,

2013) aktiviteler gösterdiği bilinmektedir. PG kabuğu çeşitli koruma ve terapötik uygulamalarda karşımıza çıkmaktadır. Antioksidan aktivitesi, küçük derişimlerde bile oksidasyon işlemlerini önleyebilen ve insan vücudunda olumlu etkiler sağlayan genellikle kanser tedavisi için önemli olarak kabul edilen gallotanninler, punicalin, punikalagin ve ellagik asit gibi polifenolik bileşenlerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle, nar kabuğunun sulu ekstraktı zengin miktarda fitokimyasal içeriği ile anormal hücre proliferasyonunu engellemeye yardımcı olabileceğini düşünülmektedir (Singh ve ark., 2019).

2.8.1. Punica granatum ile yapılan demir oksitler çalışmaları ve sonuçları

Tez kapsamında demir oksit nanoparçacıklarının sentezinde Punica Granatum (nar) kabuğu özütü kullanılmıştır. Literatürde, PG ekstraktı ile Fe_3O_4 nanozimleri sentezlenmiştir. Nanozimlerin, peroksidaz (HRP), katalaz ve süperoksit dismutaz (SOD) aktivitesinin olduğu gösterilmiştir (Mundekkad ve Alex, 2022). PG dahil olmak üzere farklı bitki özleri kullanılarak demir oksit nanoparçacıkları üretilmiştir. Nanoparçacıkların boya emilimi açısından etkinliği, Kongo Kırmızısı (CR) ve Evans Mavisı (EB) boyları kullanılarak değerlendirilmiştir. Nanoparçacıkların, çevresel koşullar altında boya bozunması için iyi katalitik aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (Meneceur ve ark., 2022). Bir diğer çalışmada, Punica Granatum ekstraktı ile işlevselleştirilmiş silika kaplı manyetik Fe_3O_4 nanoparçacıkları sentezlenerek, Fenton benzeri katalizör olarak boya giderim çalışmalarında etkinliği gösterilmiştir (Iranfar ve ark., 2021). Başka bir çalışmada ise PG özütünü kullanarak ortak çöktürme yöntemi ile demir oksit nanoparçacıkları sentezlenmiştir. Nanoparçacıkların potansiyel antikansorejen etkileri incelenmiş ve NPC hücre hattı HONE1'e karşı güçlü öldürme etkisi gösterirken CCD112 ve HEK293 normal hücre hatlarında ise sitotoksik etki göstermediği bildirilmiştir (Yusefi ve ark., 2020).

PG ekstraktı kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada, gümüş-biyo-nanokonjugatları sentezlenerek, antibakteriyel özellikleri incelenmiştir (Kadhim ve ark., 2022). Nanoparçacıklar hem gram negatif hem de pozitif bakterilere karşı düşük konsantrasyonda (50 μ g/ml) antibakteriyel özellik göstermiştir (Foujdar ve ark., 2020). Beta vulgaris ve PG özlerinin Fe_3Cl_2 tuzları ile 200 °C' de, 2 saat boyunca karıştırılmasıyla demir oksit nanoparçacıkları elde edilmiştir. Nanoparçacıkların bir meme kanseri hücre hattında (MCF-7) sitotoksik etkisi incelenmiştir ve % inhibisyon oranının nispeten yüksek olduğu görülmüştür (Kadhim ve ark., 2022).

PG ekstraktı kullanılarak mezo gözenekli farklı nanomorfolojilere sahip demir oksit (hematit) nanoparçacıkları üretilmiştir, ardından Fe₂O₃/grafit elektrotları hazırlanmış ve yüzeyinde nanoyapılı bir Au tabakası biriktirilerek, elde edilen malzeme fotoelektrokimyasal hidrojen üretimi için değerlendirilmiştir. PG özü ile sentezlenen diğer bir demir oksit nanoparçacıkları ise arsenit iyonları için adsorban olarak kullanılmıştır (Mohammed ve ark., 2020).

2.9. Nanoparçacık Karakterizasyonu

Nanoparçacıkların çeşitli spektroskopik stratejiler kullanarak morfolojik ve yapısal özelliklerini belirlemek gerekmektedir. Bunun için kullanılan karakterizasyon yöntemleri aşağıda belirtilmiştir:

- 1) Mikroskopik Yöntemler: Geçirimli elektron mikroskobu (TEM), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) -Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi (EDX).
- 2) Spektroskopik Yöntemler: X-ışını kırınımı (XRD), Zeta potansiyel, Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR), UV-vis absorpsiyon spektroskopisi, İndüktif eşleşmiş plazma-kütle spektrometresi analizi (ICP-MS), Titreşimli örnek manyetometrisi analizi (VSM), Termalgravimetrik analizi (TGA) (Şahin, 2020).

2.9.1. Geçirimli elektron mikroskobu analizi (TEM)

Geçirimli elektron mikroskobu, yüksek enerjili bir elektron ışını ($E \sim 200$ keV), üzerinde nanoparçacık süspansiyonunun bir damlacığının buharlaştırıldığı karbon ızgarasından yapılmış ince bir örneğe odaklanmaktadır. Örnekten geçen elektronlar, çeşitli açılarda saçılır ve daha sonra yüksek çözünürlüğe sahip mikrograflar elde etmek için bir dedektör üzerindeki mercekle sistemi ile odaklanma gerçekleşir. TEM cihazının 50-106 arasında değişen yüksek büyütme özelliği sayesinde görüntü ve kırınım model bilgisi sağlama yeteneği sunmaktadır (Hirschle ve ark., 2016). Sentezlenen nanoparçacıkların boyutu, dağılımı ve morfolojisini belirtmek için TEM cihazı kullanılmaktadır (Lemal ve ark., 2019).

2.9.2. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) ve enerji dağılımlı x-ışını spektroskopisi (EDX)

Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM), materyalin yüzey morfolojisi ile ilgili çeşitli özellikleri göstermek için kullanılmaktadır. Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobuna (FESEM) bağlı enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX), sabit bir enerji elektron ışınının etkileşimi tarafından üretilen maddeye özgü X-ışınlarının toplanmasına dayanmaktadır (Gupta ve ark., 2022). Örnek yüzeyindeki iyonlardan ve atomlardan X-ışını emisyonlarını üreterek malzemenin kimyasal bileşimi hakkında bilgi edinmek için kullanılmaktadır (Sürmelioglu ve ark., 2021). FESEM ve EDX çeşitli, hızlı, basit ve tahribatsız ölçümler sağlamaktadır. Nicel karakterizasyonlar için FESEM analizi tercih edilirken, kalitatif, kantitatif analizler ve malzemelerin kimyasal bileşimini analiz etmek için EDX analizi yapılmaktadır (İdris ve El-Zahhar, 2019).

2.9.3. X-ışını kırınımı (XRD)

Nanoparçacıkların karakterizasyonunda kristal boyutu, şekli ve kafes yapısının belirlenmesi önemlidir. X-ışınlarının kırınımı, nesnenin kristal düzlemi üzerine paralel gelen X-ışınları demetinin yansımaları olarak tanımlanmaktadır. X-ışını kırınımı, atomik düzeyde numune yapısını bulmak için geniş alanda kullanılsa da büyüyen kristallerdeki karmaşıklık ve materyalin tek konformasyon/bağlanma durumunda sonuç verme yeteneği az olduğu için kullanımı kısıtlanmaktadır (Jain ve Thareja, 2019).

2.9.4. Zeta potansiyel/ yüzey yükü

Yüklü bir nanoparçacığın yüzeyinde genellikle elektriksel çift katman adı verilen adsorbe edilmiş bir çift katman oluşmaktadır. Bu katman iç (stern katmanı) ve dış olarak ikiye ayrılmıştır. Nanoparçacık dağılımının fiziksel stabilitesi yüzey yüküne bağlıdır. Yüklü parçacıklar arasındaki parçacık kümelenmesi, aralarındaki elektriksel itme nedeniyle az miktarda gerçekleşir. Zeta potansiyel (ζ) analizi sıvı numunedeki yüklere göre parçacıklar arasındaki elektriksel itme veya çekimin net yükü hakkında fikir vermektedir. Seyreltilmiş nanoparçacık süspansiyonundan zayıf elektrik akımı geçirilir ve ardından elektroforetik hareketliliği hesaplamak için kullanılan frekans kayması ile birlikte saçılan ışık gözlemlenmektedir (μ , parçacık hızı/elektrik alan gücü). Zeta potansiyelinin hesaplanmasında elektrik akımı altında parçacık hızını tespit etmek için elektroforetik ışık

saçılımı kullanılmaktadır. Nanoparçacık süspansiyonunda bulunan iyonik kuvvet, pH ve iyon çeşitleri Zeta potansiyelini etkilemektedir. Genellikle, ± 30 mV'den büyük zeta potansiyeli, elektriksel itme sebebiyle parçacıklar arasındaki teması engelleyerek parçacığın dispers olmasını sağlamaktadır (Jain ve Thareja, 2019).

2.9.5. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR)

FTIR spektroskopisi, çeşitli fonksiyonel grupların varlığını belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Nanoparçacıkların yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların ya da metabolitlerin nitel analizi için de kullanılmaktadır (Gour ve Jain, 2019). Kızılötesi radyasyon örneğe verildiğinde, örnek ışığı absorblamakta ve çeşitli titreşimler meydana gelmektedir. Gerçekleşen absorpsiyon moleküldeki bağların doğası ile ilgilidir. FTIR spektrometresi absorpsiyon ya da % geçirgenliğe karşı dalga sayısının grafiğini verir. Çünkü dalga sayısı doğrudan enerji ve frekans ile alakalıdır. Tipik olarak $4000-600 \text{ cm}^{-1}$ aralığındaki dalga sayıları olarak ölçülmektedir (Khan ve ark., 2018).

2.9.6. UV-görünür spektroskopi (UV-vis spektroskopisi)

Örnek tarafından ışık spektrumunun UV ve görünür bölge ışımalarının absorblanması ile ölçüm gerçekleştirilmektedir. Nanoparçacıklar optik özellik göstermektedir. Bu sayede parçacıkların boyutu, şekli, derişimi, aglomerasyonu, yüzeye yakın kırılma indeksine karşı hassasiyetinden dolayı UV-vis analizi ile incelenmesi ve karakterize edilmesi mümkündür (Dağlıoğlu ve Yılmaz, 2018).

2.9.7. İndüktif eşleşmiş plazma kütle spektrometresi (ICP-MS)

ICP-MS analizi, başta metalik olmak üzere periyodik tablodaki elementlerin kalitatif ve kantitatif olarak belirlenmesinde kullanılan, kimyasal özellikleri benzer olan elementleri tanıyabilen bir tür kütle spektrometresidir. ICP-MS cihazı için numune analiz düzeyi milyarda birden (ppb, pounds per billion) daha düşüktür. Böylece, doğrudan çözeltideki “iz element” derişimlerinin ve miktarlarının tayin edilmesi için en kullanışlı yöntemdir. ICP-MS cihazına genellikle solüsyon halinde bulunan seyreltilmiş örnekler yerleştirilmektedir. Pompa yardımı ile örnekler indüktif olarak eşleşmiş plazmaya (Ar plazması) gönderilmektedir. Buradaki sıcaklık değeri $8000-10000 \text{ K}$ aralığındadır. Sıcaklığın yüksek olmasıyla birlikte örnekteki moleküler bağlar kırılarak iyonlaştırılması

sağlanmakta ve bu sayede örnek atomlarına ayrıştırılmaktadır. Ardından bu iyonlar kütle filtresine yönlendirilmekte, kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılarak ölçüldükleri bir analiz yöntemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Toksikoloji bu analiz yönteminin kullanıldığı alanlardan biridir. Aynı zamanda tıp ve adli tıp gibi alanlarda da vücut sıvılarındaki metal elementleri tayin etmek için kullanılmaktadır. Bunun dışında ICP-MS yöntemi ile gıda, ilaç, jeoloji, maden çalışmalarında ağır metal tayini, doğal ve atık su kaynakları gibi çevresel analizler de yapılmaktadır (Çakmak, 2020).

2.9.8. Titreşimli örnek manyetometrisi analizi (VSM)

Titreşimli örnek manyetometresi, ferromanyetik, ferrimanyetik, anti ferromanyetik, paramanyetik ve diyamanyetik materyallerin sıcaklık ve manyetik alanının bir fonksiyonu olarak malzemelerin manyetik davranışını ölçmek için kullanılmaktadır. Analiz için örnek sabit bir manyetik alanda tutulmaktadır. İncelenen örnek manyetik ise, bu sabit manyetik alan ya da alanları, bireysel manyetik dönüşleri alanla hizalayarak örneği manyetize etmektedir. Sabit alan ne kadar güçlü olursa, manyetizasyon da doğru orantılı şekilde büyük olur. Cihazın çeşitli bileşenleri bilgisayar arayüzüne bağlanır. Bu sistem, kontrol ve izleme yazılımı ile birlikte örneğin ne kadar manyetize olduğu ve manyetizasyonunun sabit manyetik alanın gücü ile nasıl etkileşimde olduğunu ayrıca indüklenen manyetik akı yoğunluğu ile mıknatıslama kuvveti arasındaki ilişkiyi gösterirken, manyetik doygunluk ve malzemede kalan artık manyetizma seviyesi hakkında histerezis eğrisi ile bilgi vermektedir (Kirupakar ve ark., 2016).

2.9.9. Termogravimetri analizi (TGA)

Termogravimetrik analizi kömür, biyokütle, polimerler vb. maddelerin termal aktivitesini analiz etmek için kullanılan yaygın bir tekniktir. Ayrıca TGA analizleri, numunelerin termal davranışını analiz ederken kimyasal bileşimi ve termal kararlılığı hakkında bilgi vermektedir. Esas olarak TGA, bileşenlerin termal bozunma sıcaklığını tespit ederek karışımların nicel analizi için kullanılmaktadır. Bitkilerin farklı yapısal dokularının pirolitik bozunması için farklı sıcaklık aralıkları uygulanması gerekmektedir. Düşük sıcaklıklar, piroliz ve gazlaştırma DTG eğrilerinin karşılaştırılmasından meydana geldiği gibi, gazlaştırma sırasında maksimum ağırlık kaybı oranı vermektedir. Diferansiyel

termogravimetrik analiz (DTG), TGA'nın türev biçimi olan veri eğrisini ifade etmektedir (Kumar ve ark., 2021).

2.10. Kanser Tanımı ve Genel Özellikleri

Sağlıklı bir doku hücresi, hücre sel sinyaller sayesinde çoğalmakta ve bu sinyallere göre düzenlenmektedir. Sağlıklı hücrenin bölünme miktarı bu sistemle kontrol altına alınmaktadır. Hücrelerin kontrolsüz büyümesi ve yayılması kanser olarak adlandırılmaktadır (Ultav, 2019). Kanseri, normal fizyolojik şartlarda hücrelerin hayatta kalma ve göç yeteneğini kontrol eden mekanizmalarında oluşan hasar, genetik ve epigenetik değişikliklerin neden olduğu kontrolsüz proliferasyonun yönettiği kabul edilmektedir. Hücrenin çoğalmasını kontrol eden genlerde bir mutasyon meydana geldiğinde hücreler kontrolsüz bölünmeye başlamaktadır. Bu hücreler bir araya gelerek tümör yapılarını oluşturmaktadır. Tümör oluşumunun başlatılmasında kilit rol oynayan önemli genler DNA tamir mekanizmalarının kontrolünü sağlayanlar, tümör baskılayıcılar ve pro-onkogenlerdir. Temelde onkogenlerin aktifleştirilmesi kontrolsüz hücre döngüsünün devam etmesine, tümör baskılayıcı genlerin inaktivasyonu ise apoptotik yolların devre dışı kalmasına neden olmaktadır (Uludağ, 2021).

Tümör terimi ve kanser terimi genellikle birbirinin yerine kullanılırken yanıltıcı olabilmektedir. Tümör vücutta oluşan bir kütledir. Tümör malign (kötü huylu) ve benign (iyi huylu) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Benign tümörler, iyi huylu kanserli olmayan tümörlerdir. Genelde benign tümörler lokalizedir ve vücudun başka bölgelerine yayılmazlar. Benign tümörler tedaviye olumlu yanıt vermektedirler. Ayrıca bazı benign tümörler tedavi edilmediği takdirde büyüyebilir ve boyutları nedeniyle ciddi hastalıklara neden olabilmektedirler. Malign tümörler ise kötü huylu ve invaziv tümörlerdir. Genellikle tedaviye dirençlidir, tedavi sonrasında tekrarladığı gözlemlenmiştir (Buluş, 2019). Kanseri hücreler için kullanılan diğer terimler ise malign tümörler ve neoplazmalardır. Kanserin yayılması, tümör dokusu ve etrafındaki neoplazma olarak tanımlan hücreler ile dinamik etkileşimde iken hücreler arası boşluk ile de bağlantılıdır. Tümör bölgesinin etrafında meydana gelen yerel mikro ortamdaki farklılıklar; immün yanıtların inhibisyonuna, tümörün yayılmasına neden olmaktadır. Tümörün yayılmasına neden olan anjiyogenez, artan oksijen ve besin ihtiyacının karşılanmasını sağlamaktadır. Kanser, canlı vücudunun hemen her bölümünü etkileyebilmektedir. Kanseri gelişimini beslenme şekli, fiziksel

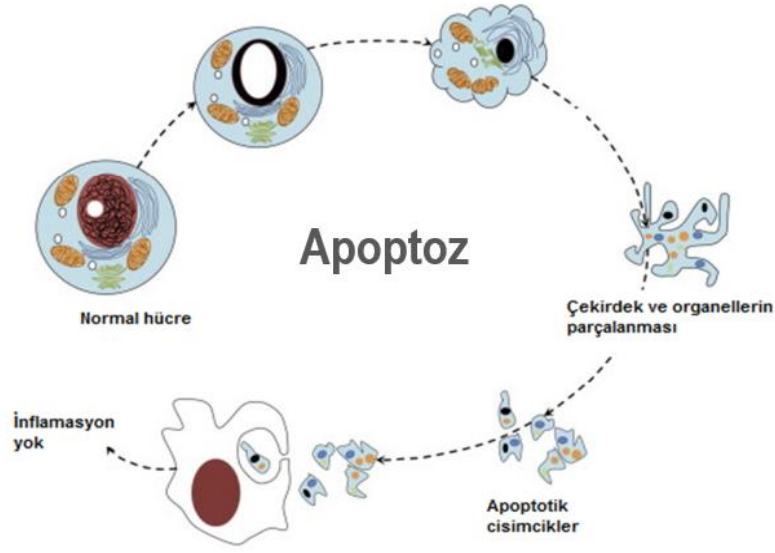
aktivite ve vücut ağırlığı gibi çevresel ve genetik birçok faktörün kanser türlerinin gelişiminde önemli etkilerinin olduğu belirtilmektedir (Özgün ve Türker, 2020).

2.11. Kanser Hücresi Oluşumu

Kanser oluşumuna neden olan maddelere ‘kanserojen’ epitelyal kötü huylu tümörleri oluşturanlar ise ‘karsinojen’ olarak adlandırılmaktadır. Kanser hücresi oluşum yolları aşağıda açıklanmaktadır.

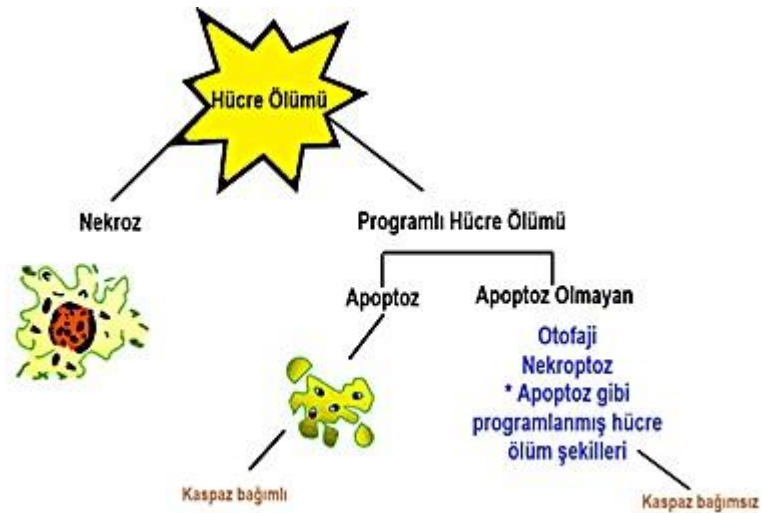
Kontak inhibisyonu; sağlıklı hücrelerin komşu hücrelerle iletişimi adezyon mekanizması sayesinde gerçekleşmektedir. Adezyon, hücrelerin çeperinde elektronca yoğun bir bölge oluşturmaktadır. Böylece, optimum şartlara sahip kültür ortamında bile sağlıklı hücreler ancak tek tabaka oluşturabilmekte ve bu durum kontak inhibisyonu olarak adlandırılır. Hücre çoğalması bu şekilde kontrol edilir. Kanser hücrelerinde kontak inhibisyonu kaybı olduğu için sürekli bölünerek birkaç tabakalı düzensiz kitleler oluşturabilirler (Şahin, 2017).

Apoptozis ve nekrozis; hücre ölümü geniş olarak tanımlanmış programlanmış hücre ölümü ve nekroz olmak üzere iki süreci içermektedir. Belirli sinyallere yanıt olarak gelişen genetik olarak programlanmış hücre intiharı içeren hücre ölümüne programlanmış hücre ölümü denilmektedir. Çok hücreli organizmaların gelişimi, doku homeostazı ve bütünlüğünü sağlamasında hücre ölümü önemli bir süreç olmaktadır. Programlanmış hücre ölümü olan apoptoz yalnızca hücre hasarı ya da dış stresin bir sonucunda oluşan bir ölüm değil, aynı zamanda normal gelişim sırasında da meydana gelen, programlı ölümün önemli bir mekanizması olarak tanımlanmaktadır (Şekil 5). Programlı ölüm etki mekanizması, uygulayıcı ve düzenleyici moleküller farklı grupları tarafından düzenlenmektedir. Endojen proteazlar (T lenfositler) ile birlikte hücre kendini parçalayabilmektedir. Genellikle apoptotik hücre ölümünün etki mekanizması, kromatin materyalinin yoğunlaşması, DNA hasarı, hücre büzülmesi, dinamik membran kabarması ve hücre dışı matrislere adezyon (yapışma) kaybı ile karakterize edilmektedir. Bunların yanı sıra biyokimyasal değişiklikler ise hücre zarında yer alan fosfatidilserinin dışsallaştırılması ve kaspazlar adı verilen sistein aspartil proteazlarının aktivasyonu gerçekleşmesi şeklindedir (Jan, 2015).



Şekil 5. Apoptoz sırasında hücrelerin yapısal değişikliklerinin gösterimi (Şahin, 2017).

Apoptotik olmayan hücre ölümleri arasında otofaj ve nekroz yer almaktadır. Otofajik hücre ölümü, hücrenin kendi kendini parçaladığı bir süreç olarak görülmektedir. Otofaji, ölmekte olan hücre ve içindeki bileşenlerin otofajik vakuoller içerisinde bozulmasıdır. Nekroz ise akut hasarı takiben oluşan fiziksel olarak yangı, travmalar, enfeksiyondan kaynaklanan ve çeşitli nörodejenerasyon biçimleri sonucunda hücrelerin şişmesi ve lizisi ile gerçekleşen bir ölümdür (Şekil 6). Bu nedenle apoptotik yolakla ölen hücrelerin bütünlüğü bozulmazken nekrotik yolakla ölen hücrelerin hücre bütünlüğü bozulmaktadır. Nekroz, ölümün programlanmış bir şeklidir ve apoptozu tetikleyen aynı ölüm sinyalleriyle başlamaktadır (Gong ve ark., 2019).



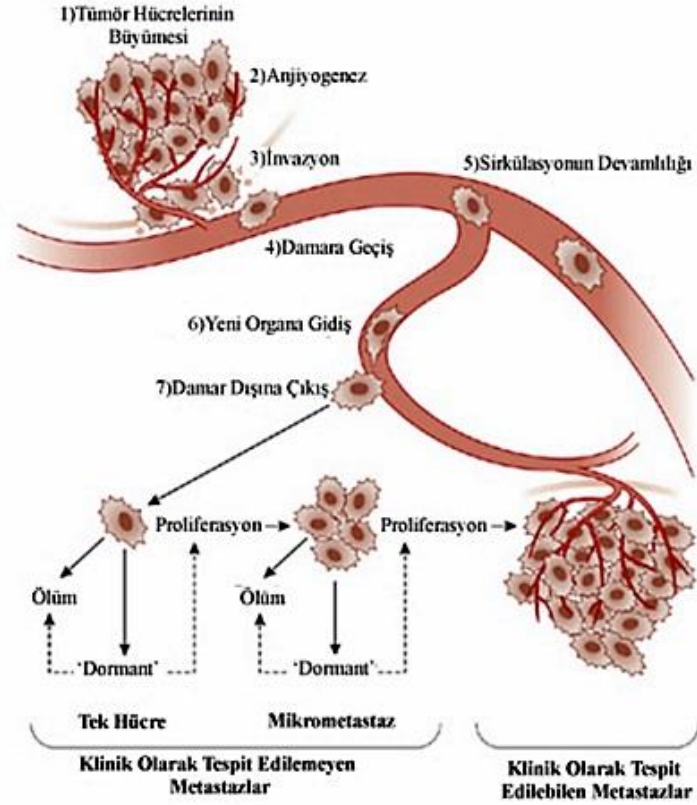
Şekil 6. Hücre ölümünün şematik gösterimi.

2.12. Kanser Türleri

Kanserler türleri üç grupta toplanmaktadır: Karsinomlar, sarkomlar ve lenfomalar. Karsinom, epidermisin bazal hücrelerinden ya da kıl folliküllerinin dış kök kılıfından meydana geldiği bilinen kötü huylu deri tümörleridir. Tümörler epitel dokudan köken alırsa karsinom olarak adlandırılmaktadır (Terzioğlu, 2010). İnsanda görülen kanserlerinin yaklaşık %89,3'ünü oluştururlar. Bağ dokuları olan kemik, kas, fibröz ve kıkırdak gibi dokularda ya da yumuşak dokularda meydana gelen katı tümörlere “sarkom” adı verilmektedir. Genellikle insanlarda az görülür. Lenfomalar ise kan hücrelerinden gelişen kanser çeşididir. İnsanda görülen kanserlerinin yaklaşık %8,8'ini oluşturur (Şahin, 2017).

2.12.1. Metastaz

Kötü huylu tümörlerin en dikkat çekici özelliği birincil tümör odağını lokal olarak farklı doku veya organa ikincil tümör odağı olarak taşıyabilmesidir. Bu olay metastaz olarak adlandırılmaktadır (Şekil 7). Malign tümör hücreleri metastaz yapma aşamasına geldiklerinde; besin ve oksijen temini için yeni kan damarlarını oluşturur (anjyogenez) ve bu damarları kullanarak vücudun farklı bölgelerine yerleşmektedirler. Kötü huylu tümörler vücuda üç yolla yayılabilmektedir; vücut boşluklarına ekilme, lenfatik yayılım ve hematojen yayılım. Kötü huylu tümörler dokular arasındaki boşluğa ulaştığında kanser oluşumu başlamış olur. Bu şekilde over kanserinin metastazı gerçekleşmektedir. Kanserin yayılma yollarından bir diğeri ise lenfatik dolaşım sistemi ve vasküler sistem arasındaki bağlantıdır. Lenfatik yayılım ile genellikle karsinomlar üretilmektedir. Hematojen yayılım, tümörlerin ven ve arter yayılımından daha kolay olduğu için sarkom oluşumunda görülmektedir. Meme, akciğer, prostat, tiroid, böbrek gibi doku ve organlarda kötü huylu tümörlerin neden olduğu kanser türleri, genellikle kemik dokusunda metastaz yapma eğilimi gösteren tümörler olmaktadır. Kemik dokusunda meydana gelen sekonder tümör odağının aslında %70'inin akciğerde, %60'ının memede, %30'unun ise prostatta birincil tümör odağı oluşturduğu bildirilmiştir (Koçak, 2009).



Şekil 7. Primer tümörün büyümesi ve dolaşıma çıkması ile oluşan metastaz gösterilmektedir (Dilmaç, 2014).

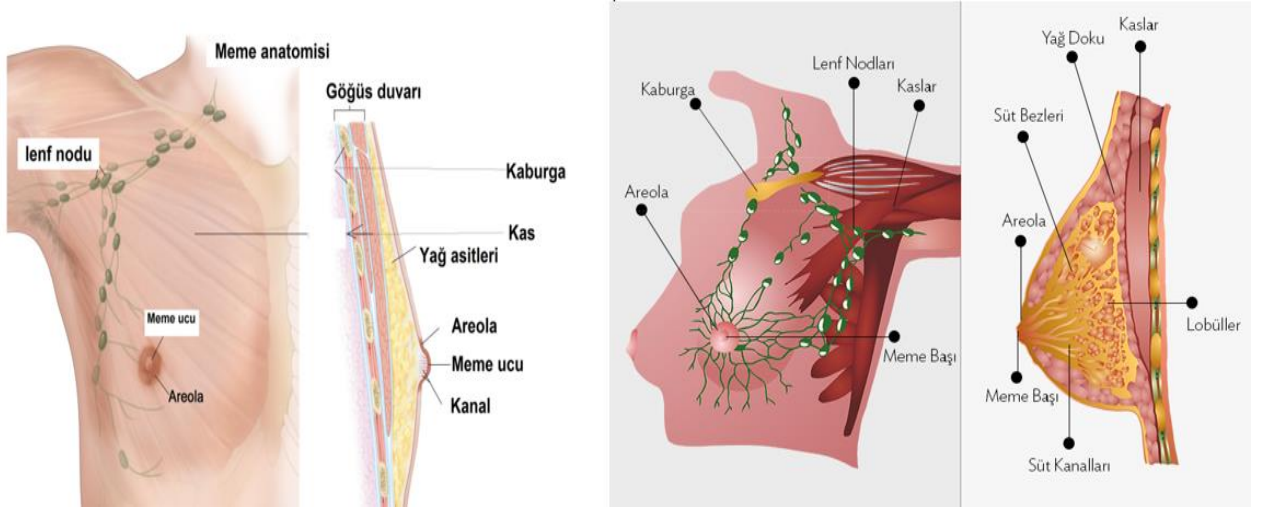
2.12.2. Non-metastaz

Vücutta oluşan iyi huylu tümör hücrelerinin primer tümör odağı buldukları doku ile sınırlı olmakla birlikte bazı iyi huylu tümörler kitlesel olarak büyüebilmektedirler. Bu olay non-metastaz yani metastaz olmayan olarak adlandırılmaktadır (Dilmaç, 2014).

2.13. Meme Kanseri

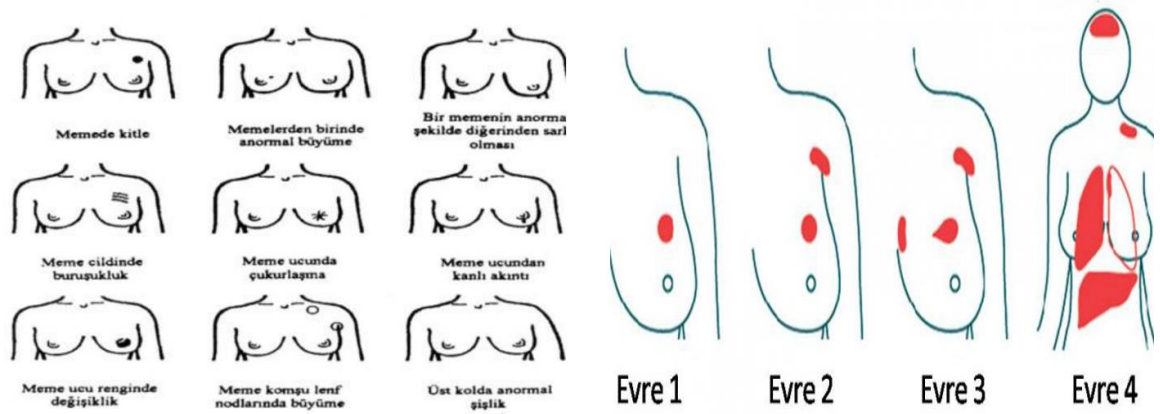
En sık rastlanan kanser türlerinden meme kanseri her yıl dünyada 1,7 milyon kadında görülmektedir. Meme kanseri için yaş, aile öyküsü, erken yaşta görülen regli ile östrojen hormonuna uzun süre maruz kalmak, geç menopoza, aşırı kilo, fiziksel hareketin az olması, alkol tüketimi, doğum yapmayanlar ya da 30 yaşını doldurduktan sonra ilk doğumunu yapanlar, BRCA-1 ve BRCA-2 genetik mutasyonlarına benzer mutasyonların oluşması ana risk faktörleridir. Kanserin oluştuğu yer meme doku hücreleridir. Kanser oluşumu meme dokusunun herhangi bir yerinde orjin oluşturabilmektedir. Çok rastlanılan meme kanseri ise süt kanalı (duktal) kanseridir. İsmi oluştuğu süt bezi (lobüler)

dokusundan alan kanser tiplerine de sıkça rastlanmaktadır. Medüller, tübüler, müsinöz gibi diğer dokularda meydana gelen kanserlerde mevcuttur (Şekil 8) (Buluş, 2019).



Şekil 8. Meme anatomisi (Özlür, 2018).

Kadınlarda emzirme, meme kanseri riskini azaltmakta olup ayrıca emzirme süresinin uzunluğu ile de riskin daha fazla azaldığı bildirilmiştir (Kankaya ve ark., 2019). Meme kanserinin belirtileri meme dokusunda oluşan yumru, meme ucunun geri çekilmesi, görüntüde asimetri, kanlı meme ucu akıntısı, egzama ve derinin geri çekilmesidir (Şekil 9) (Suleman ve Riaz, 2020).



Şekil 9. Meme kanseri belirtileri ve evreleri (Baran, 2013).

2.14. Kanser Tedavisi

Kanserin tedavisinde kemoterapi, radyoterapi, cerrahi yöntemler gibi çeşitli tedavi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır. Ayrıca güncel tedavi yöntemleriyle birlikte ya da tek

başına kullanılan çeşitli biyolojik metotlar ve hormon terapisi yaklaşımları tedavi yöntemlerine destek olmaktadır. Kanser tedavisinin kesin olmamasının nedeni hastalığın kişiye özgü olması ve kişilerde tedavi sonuçlarının farklılık göstermesidir. Her yöntemin kendine özgü avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Radyoterapi yöntemi, kanserli hücreleri iyonizan ışınlar kullanılması ile yok etmeye dayanan bir tedavi yöntemidir. Vücudun belli bir bölgesini hedef alarak yapılabildiği gibi, tüm vücuda da uygulanmaktadır. Cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunu küçültmek için yapılmaktadır. Kemoterapi yöntemi, esas amacı kanser hücrelerini kemoterapötik ajanlar kullanarak yok etmektir. Bu tedavi tipinde sitotoksik, anti-neoplastik ajanlar başrolde. Kanser hücrelerinde hücre ölümünü tetiklemek için hedef hücrelere ilaç verilmesi yeterli olmamaktadır. Kemoterapötik ilaçların hücre büyümesini engellemesi için yeterli konsantrasyonlarda salınması gerekmektedir (Salimi ve ark., 2020). Kemoterapi de cerrahi girişim öncesinde tümörün boyutunu küçültmek üzere uygulanmaktadır (Kankaya ve ark., 2019). Cerrahi yöntemler, aynı zamanda radyoterapi ya da kemoterapi yöntemleri ile birlikte de kullanılabilir. Sağlıklı dokulara zarar vermeyecek şekilde cerrahi müdahalelerin mümkün olmadığı durumlarda kemoterapi veya radyoterapi ile kitlenin küçültülmesi amaçlanmaktadır. Meme kanseri için kullanılan radyasyon tedavisi, cerrahi ve kemoterapi gibi tedavi yöntemleri ikincil kanser, tümör nüksü ve normal doku hasarı gibi çeşitli yan etkilere sahiptir. Kanser tedavisi için nanoteknoloji tabanlı yöntemlerin geliştirilmesi ve kullanımı son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Salimi ve ark., 2020).

2.15. MDA-MB-231 ve CRL-4010 Hücre Hatları

MDA-MB-231 hücre hattı epitel meme bezi, insan östrojen-bağımsız meme kanser hücreleridir. Bu hücreler yüksek düzeyde metastatik özelliktedirler (Dundar, 2017). CRL-4010 hücre hattı ise epitel meme bezi dokusundan elde edilen non-metastatik (normal) hücre hattıdır (Bozgeyik, 2017).

2.16. Sitotoksisite Çalışmaları

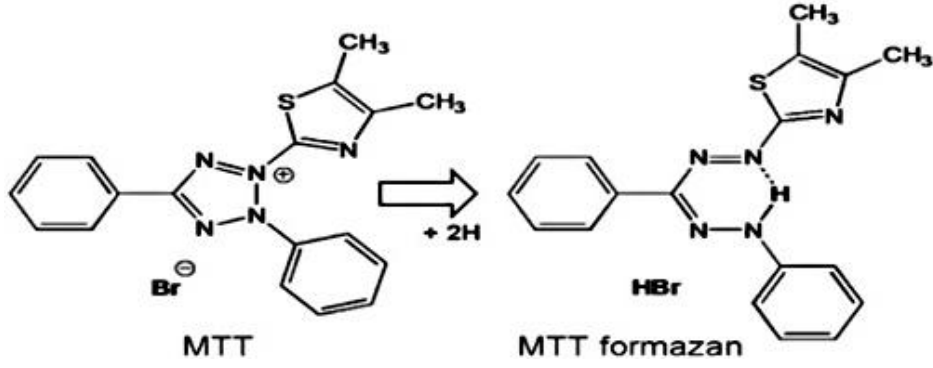
Sitotoksisite, bir ajanın spesifik hücreler üzerinde toksik olma derecesidir. Hücreler, sitotoksik materyallere nekroz (zar bütünlüğünü kaybetme) veya apoptoz (kontrollü hücre ölümü programı oluşturma) gibi farklı tepkiler verebilmektedir. Ayrıca hücrelerde büyüme/bölünme durması ve lizis gibi olaylarda gerçekleşebilmektedir. İlaçlar, toksik ajanlar ya da bazı hastalıklar hücresel dengenin bozulmasını tetiklemektedir. Nekroz

durumunda hücrelerde şişme meydana gelmekte ve zar bütünlüğü bozulmaktadır. Ardından hücreler metabolizma aktivitelerini durdurur ve hücrenin içerikleri dışarıya verilir. Apoptoz durumunda ise hücre zarında yer alan PS'den başlayarak bir dizi nükleer değişiklikler oluşmaktadır. Bunların yanı sıra kromatin yoğunlaşması, çekirdek parçalanması ve hücre büzülmesi gibi morfolojik değişiklikler meydana gelmektedir. Sonunda hücreler lizise uğramakta ve hızlı ölüm gerçekleşmektedir (Hutchins ve Barger, 1998).

2.16.1. MTT hücre canlılık testi

Temelde sitotoksik veya antiproliferatif etkilerin tespit edilmesi için yapılan in vitro taramalar, özellikle anti-kanserojen ilaçlarla ya da terapötik maddelerle yapılan tedavilerin değerlendirilmesinde ilk basamak olarak karşımıza çıkmaktadır. İlk basamakta kullanılan çeşitli metotlar çalışma prensibi ve yarı-maksimum inhibisyon konsantrasyonu (IC₅₀) değeri bakımından farklı sonuçlar vermekte ve hücrelerle inkübe edilen ajanların toksik konsantrasyonunu bulmaya yardımcı olmaktadır (Martins ve ark., 2020). Yaptığımız çalışmada terapötik nanoparçacıklarla veya ilaçlarla tedavi edildikten sonra canlı hücrelerin belirlenmesi için kullanılan MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi ile hücrenin canlılık oranı belirlenmiştir. MTT testi, hücrelerin metabolik aktivitesi, membran geçirgenliği ve indirgeme potansiyeline dayanan, renkli çözeltilerin ışığı absorblaması sayesinde ölçüm alan kolorimetrik metotlar arasına girmektedir (Husni ve ark., 2021).

MTT testinde tetrazolyum bromür çözeltisi canlı hücreler tarafından hücre içine alınmakta ve mitokondriyal solunum reaksiyonundaki redüktaz enzimi tarafından suda çözünmeyen formazan tuzuna indirgenmektedir (Şekil 10). Bu indirgeme sonucunda canlı hücrelerde mor/mavi rengin oluşması gözlenmektedir. Oluşan renkli ürün bir dizi canlı hücrenin 415 nm'de absorbladığı spektrofotometrik değeri ifade etmektedir (Scudiero ve ark., 1998).



Şekil 10. MTT bileşiğinin formazan tuzuna dönüşüm formülü (Güleç, 2016).

Ölü hücreler mitokondriyal aktiviteye sahip değildir, bu nedenle MTT formazan tuzu oluşturamaz. Formazan tuzunun 415 nm’de absorbansı ölçülerek hücre canlılığı hesaplanır, çünkü ölçülen formazan miktarı canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. % hücre canlılık ile konsantrasyon grafiği oluşturularak IC_{50} değeri bulunmaktadır. IC_{50} değeri, in vitro %50 inhibisyon için gerekli olan bir ilaç, kimyasal veya terapötik maddenin konsantrasyonunu belirler ve diğer sitotoksosite analizleri için deneylerin tasarlanmasına yardımcı olan önemli bir parametre olarak karşımıza çıkmaktadır.

2.16.2. Anneksin V-FITC/PI boyama yöntemi ile apoptozun belirlenmesi

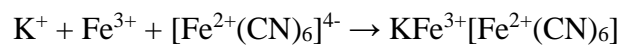
Sağlıklı hücrelerin membran yüzeyinde yer alan fosfatidilserinler (PS), hücre apoptoza uğradığında translokelize olmaktadır. Membran geçirgenliğinde meydana gelen değişim ve bozulan membran bütünlüğü sonucunda hücrelerin apoptotik ya da nekrotik ölüm gerçekleştirdiğini tespit etmek mümkündür. Hücrelerin apoptotik ya da nekrotik olduğunu belirlemek için Annexin V ve PI boyası kullanılmaktadır (Güleç, 2016). Bir kalsiyum bağlayıcı hücre protein olan Annexin V, dışsallaşmış fosfatidilserin gruplarına bağlanma afinitesine sahiptir. Annexin V’in tespiti için 518 nm’de floresan yayma özelliği olan bileşik FITC (floresan izotiyosiyanyür), anneksin V’ ile kompleks oluşturmaktadır. Floresan işaretli Anneksin-V ile PS’nin bağlanması ile erken apoptotik hücrelerin tespiti sağlamaktadır. PI boyası ise propidium iyodür vital olarak adlandırılır, 617 nm’de floresan yaymaktadır. Membran geçirgenliğinin yok olması ile birlikte PI boyası hücre içine girer ve hücrenin çekirdeğini boyar. PI ile çekirdeğin boyanması, geç apoptotik hücrelerin akış sitometrisi analizinde kantitatif tayinini sağlamaktadır (Crowley ve ark., 2016).

Akım sitometrisi (Flow Cytometry), temelde “akım boyunca kan hücrelerinin sayımı” tekniği ile ortaya çıkarak hücre karakterizasyonu için kullanılan geliştirilmiş bir sistem olarak karşımıza çıkmaktadır. Akım sitometrisinin prensibi, hücrenin bir

süspansiyon sıvısı içinden enjeksiyon kanalı yardımı ile alınmasının ardından akış kanalı boyunca geçen hücrelerin granülaritesi ve büyüklüğüne göre sınıflandırılması işlemine dayanmaktadır. Akım boyunca geçen hücrelerin üzerine gönderilen lazer sayesinde yayılan ve yayılmayan sinyaller farklı dedektörler tarafından toplanarak veri haline dönüştürülmektedir. Elde edilen verilere göre bilgi edinmek istenen hücre popülasyonu arasından “kapılama (gating)” adı verilen hücre grupları bir çerçeve ile seçilmektedir. Bu kapıların belirlenmesi ile % hücre popülasyonu otomatik olarak hesaplanmaktadır. Akış sitometri profillerinde; yüzdeyi gösteren dört alan vardır. Alan A1: canlı hücreler, Alan A2: ölü hücreler, Alan A3: erken apoptotik, Alan A4: geç apoptotik hücreleri ifade etmektedir (Görgülü, 2019).

2.16.3. Hüresel alım ve prusya mavisi boyaması

Biyoloji ve patolojide yaygın olarak kullanılan Prusya Mavisi boyası, hücreler tarafından alınan nanoparçacıkları belirlemek ve ölçmek için spektroskopik yöntemler ile birlikte kullanılmaktadır. Bu çalışmada hücrenin demir içeriği ve doku kesitlerindeki dağılımını göstermek için kullanılmıştır. Temelde reaktif olarak serbest Fe^{3+} ü bağlamak için $[Fe^2(CN)_6]^{4-}$ (hekzasiyanoferrat (II) anyonu (ferrosiyanür)) kullanılmaktadır. Ferrik demirin serbest Fe^{3+} iyonu olarak var olması için pH'ın 2'den küçük olması gerekmektedir. Bu nedenle reaktif, Fe^{3+} 'ü dokudaki bağlı formlarından ayırmak için hidroklorik asit (HCl) çözeltisi içinde uygulanmaktadır.



Denklem 2. Prusya Mavisi oluşturmak için Fe^{3+} ve ferrosiyanür arasındaki reaksiyon.

Fe_2O_3 veya Fe_3O_4 gibi demir oksitler düşük pH ortamında parçalanmaktadırlar. Serbest kalan hedef iyonlar Prusya Mavisi ile etiketlenmektedir. Reaksiyon, hücreler tarafından alınan demir oksit nanoparçacıkları ile asidik ferrosiyanür çözeltisi arasında gerçekleşmekte ve oluşan karakteristik mavi renk ışık mikroskobu ile görüntülenmektedir (Denklem 2).

2.16.4. Antioksidan aktivitesi

Dış orbitallerinde eşleşmemiş elektron bulunduran moleküllere radikal denir. Çeşitli biyokimyasal reaksiyonlar ile meydana gelen radikaller reaktiviteleri yüksek olduğu

için proteinler, nükleik asitler ve lipitlerde hasara neden olabilmektedirler. Antioksidanlar düşük derişimlerde substrat oksidasyonunu engelleyebilen ya da geciktirebilen maddeler olarak bilinmektedir. Antioksidanlar askorbik asit, ürik asit, flavonoidler, glutatyon peroksidaz ve askorbat peroksidaz gibi katalaz enzimleri içermektedirler. Hücrelerde oksidatif stresin oluşmasına neden olan serbest radikalleri etkin bir şekilde süpürerek daha az toksisite gösteren ya da toksik olmayan ürünlere dönüştürmektedirler (Bekdeşer, 2012). Antioksidan aktivitesi, oksidasyon ürünlerinin belirlenmesinin ya da radikalleri yakalama yeteneğinin bir ölçüsü olarak tanımlanmaktadır (Abdullah ve ark., 2020). Yakalanan radikal miktarı ile kullanılan antioksidan miktarı arasında bir bağlantı kurulmaktadır (Siddiqui ve ark., 2019).

İnsanlar için elzem bir vitamin olan askorbik asit (C vitamini), antioksidan savunması, transkripsiyon ve gen ekspresyonunun epigenetik düzenlenmesinde yer alan enzimler için kofaktör görevi görmektedir. Mehta ve ark. tarafından yapılan in vitro çalışmada askorbik asit, kafein, ellagik asit ve gallik asit gibi diyabetle ilişkili nörolojik semptomların gelişimine yol açan yolaklara inhibe etmek için kullanılmış ve aynı zamanda antioksidan etkilerini karşılaştırmak için DPPH yönteminde kontrol olarak kullanılmıştır (Mehta ve ark., 2017; Seyhan, 2019). Ayrıca Yılmaz ve Boyacıoğlu'nun yaptığı bir çalışmada içinde askorbik asitin de olduğu farklı sentetik antioksidanların, antioksidan aktivitelerini 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) yöntemi ile kullanarak karşılaştırmışlardır. Bu amaçla standart olarak askorbik asit ve troloksun kullanılmıştır (Yılmaz ve Boyacıoğlu, 2020).

Tez kapsamında serbest radikal olarak 1,1-difenil-2-pikrihidrazil (DPPH•) kullanılmıştır. DPPH (2,2-difenil-1-pikrilhidrazil) testi, antioksidan aktivite analizinde yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. DPPH, kararlı serbest radikaller üretebilmektedir. Bu kararlılık, molekül içindeki serbest elektronların delokalizasyonundan kaynaklanmaktadır. DPPH yaklaşık 517 nm dalgaboyunda absorpsiyon yapan mor renkli bir moleküldür. DPPH radikallerinin bir antioksidan tarafından indirgenmesi, test çözeltisinin mor renginin açılmasına neden olur ve 517 nm dalgaboyundaki absorbans değerinin düşmesine neden olur. Bu ölçümü ifade etmenin yolu, UV-Görünür spektroskopi ile elde edilen inhibisyon yüzdesinin hesaplanması ve/veya standart polifenol eşdeğeri ile karşılaştırma yoludur. Standart polifenollerin eşdeğerliğinin bir fonksiyonu olarak antioksidan aktivitenin değerlendirilmesine yönelik yöntem, numunelerin absorbansının, standartlardaki konsantrasyonla ilişkilendiren bir kalibrasyon çizgisi ile

karşılaştırmasından oluşur. İnhibisyon yüzdesi (IC) hesabı da aşağıdaki eşitlik uyarınca yapılır (Maheswari ve Reddy, 2016);

$$\text{Antioksidan aktivitesi (\% İnhibisyon)} = 100 \times (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}$$

A_{kontrol} : Negatif kontrol olarak hazırlanan çözeltisinin absorbans değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: Nanoparçacık çözeltilerinin absorbans değerleridir.

Pozitif kontrolün antioksidan aktivitesi hesaplanırken;

A_{kontrol} : Negatif kontrol çözeltisinin absorbans değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: Ascorbic asit çözeltilerinin absorbans değerleridir.

2.16.5. Antimikrobiyal aktivitesi

Antimikrobiyal etki, bakteriyel üremeye engel olma veya bakterilerin öldürülmesidir. Fakat bakteriler antibiyotiklere karşı direnç kazanırlar. Bu durumda yeni, etkili ve sağlıklı hücrelere toksik etkisi olmayan antimikrobiyal ajanlara ihtiyaç duyulmaktadır. Metal nanoparçacıkları bakterilerin metabolik aktivilerini değiştirebildikleri için, antimikrobiyal ajan olarak kullanılabilirler. Antibakteriyel etki gösterebilmeleri için elektrostatik çekim, van der waals kuvvetleri, reseptör-ligand ilişkisi ve hidrofobik bağlanma gibi yollarla bakterilere temas etmeleri gerekir (Dong, 2012; Hallouard, 2010).

Bakteriler ile temas sağlandıktan sonra, nanoparçacıklar bakteri zarını geçirirler ve hücrenin şeklini, işlevini bozarlar. Bunun sonucunda aşağıdaki etkilere sebep olurlar; (Zhou, 2016)

- Oksidatif stres,
- Heterojen değişiklikler,
- Bozulmuş hücre zarı geçirgenliğinin yol açtığı elektrolit denge bozuklukları.

DNA, lizozomlar, ribozomlar ve enzimler gibi bakterilerin hücresel temel bileşenleri ile etkileşime girerek;

- Enzim inhibisyonu,
- Protein deaktivasyonu.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal ve Kimyasallar

Tez kapsamında demir oksit nanoparçacıkların yeşil sentezi için Punica Granatum (nar) kabuğu kullanılmıştır. Nar meyvesi Konya ilinde bulunan yerel bir manavdan tedarik edilmiştir. Sentez sırasında N₂ gazı kullanılmıştır. Deneyleerde kullanılan tüm kimyasallar Tablo 1. de verilmiştir.

Tablo 1. Deneyleerde kullanılan kimyasalların listesi.

Kimyasallar	Firma - Cas No:	Özellik
Demir(III) klorür heksahidrat	Chemsolut, Cas-No: 10025-77-1	FeCl ₃ .6H ₂ O Mw: 270.33 g/mol
Demir sülfat heptahidrat	Merck, Cas-No: 7782-63-0	FeSO ₄ .7H ₂ O Mw: 278.01 g/mol
Trisodyum sitrat (TSC)	Tekim, Cas-No: 3132-04-3	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O Mw: 294.10 g/mol
Sodium 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
Kloroform	Merk, Cas-No: 67-66-3	CHCl ₃ Mw: 119.38 g/mol
n-Heksan	Sigma-Aldrich, Cas-No: 110-54-3	CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ Mw: 86.18 g/mol
Etil asetat	Sigma Aldrich, Cas-No: 141-78-6	C ₄ H ₈ O ₂ Mw: 88,11 g-mol
Tris-hidroklorür	Roth, Cas-No: 1185-53-1	C ₄ H ₁₁ NO ₃ .HCl Mw: 157.60 g/mol
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma-Aldrich, Cas-No: 91-95-2	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ Mw: 214.27g/mol
Hidrojen Peroksit	Sigma-Aldrich, Cas-No: 7722-84-1	H ₂ O ₂ Mw: 34.01 g/mol
Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS)	Sigma, D5652	10X, 1L

Fetal sığır serumu (FBS)	Pan Biotech, Cas-No: P30-3303	1X, 100 ml
Tripsin/EDTA	Sarorius, Cas-No:03-053-1B	1X, 100 ml
Triphan Mavisı	B1 Biyolojik Endüstriler Cas-No: 03-102-1B	1X, 100 ml
3-4,5-dimetil-tiyazolil-2,5-difeniltetrazolyum bromid (MTT)	Sigma, M5655	% 97,5
Dulbecco'nun Modifiye Eagle Medium-High glucose (DMEM)	Sigm, D6429	% 10 FBS, %1 PS
Gentamisin sülfat	Biyolojik Endüstriler	50 mg/ml
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Applichem-Honeywell Cas No: 67-68-5	C ₂ H ₆ OS Mw: 78.13 g/mol
Hidrokortizon ve insülin	Sigma-Aldrich, Cas No: 50-23-7	C ₂₁ H ₃₀ O ₅ Mw: 362.46 g/mol
Potasyum ferrosiyandır trihidrat	Sigma-Aldrich,	K ₄ Fe (CN) ₆ .3H ₂ O ≥ %98,5
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl	Sigma Aldrich, Cas-No: 1898-66-4	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆ Mw: 394,32 g/mol
FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI	Biolegend, Cat:640914, Lot: B329954	Saklama koşulu: 2 -8 °C

3.2. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazlar Tablo 2.'de verilmiştir.

Tüm deneysel çalışmalarda deiyonize su (Millipore su arıtma sistemi, Molsheim, France, 18 MΩ) kullanılmıştır.

Tablo 2. Deneysel çalışmalarda kullanılan cihazların listesi.

Hassas Terazı	Radwag AS 220.R2
Ph Metre	Mettler Toledo FiveEasy
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Stirring Mantle IKA C-MAG HS7
Ultrasonik Banyo	Elmesonic S
Santrifüj	Nüve NF 800R
Vorteks	Multi-Vortex V-32
Mikrodalga fırın	Thermo Scientific, Multiscan Go
UV-Vis spektrofotometre	Agilent Technologies Cary 60
ICP-MS	Agilent Technologies 7900
XRD	PANalytical EMPYREAN

FESEM	ZEISS GeminiSEM 500
TEM	FEI 120kV CTEM
ZETA POTANSİYELİ ÖLÇÜMÜ	Micromeritics-Nanoplus 3
VSM	Cryogenic Limited PPMS
TGA	Seteram-Labsys Evo
FT-IR	Thermo Scientific-Nicolet İS20
İnvört Mikroskop	Carl Zeiss 415510-1101-000
ELISA Okuyucu	Thermo Scientific, Multiskan Sky High
Etüv	Esco-CCL-170B-8

3.3. Pinuca Granutum Kabuklarının Hazırlanması ve Ekstraksiyonu

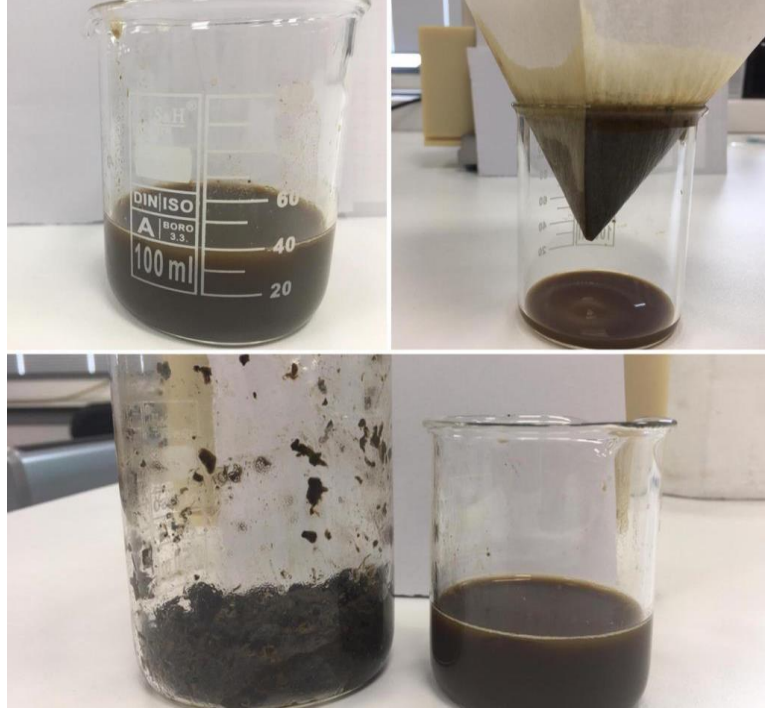
Konya ilinde bulunan yerel bir manavdan satın alınan nar meyvesi öncelikle bazı ön hazırlık işlemlerine tabii tutulmuştur. İlk olarak nar meyvesi musluk suyu ve ultra saf su ile yıkanmıştır. Ardından kabukları meyvesinden ayrılarak, küçük parçalar haline getirilmiş ve sonra oda sıcaklığı koşullarında gölge bir yerde kuruması için yaklaşık 1 hafta kadar bekletilmiştir. Kurutulan nar kabukları öğütücü yardımı ile toz haline getirilmiştir (Şekil 11). Sentez çalışmalarına kadar kapalı kapta 4 °C sıcaklıkta tutulmuştur.



Şekil 11. Kurutulan ve öğütülen Punica Granutum kabuğu.

Nar kabuğunun ekstraksiyonu için su ve etanol çözücüleri kullanılmıştır. Öğütülmüş bitkilerden alınan 5'er gramlık örnekler 50 ml çözücüde çözülerek, 80 °C sıcaklıkta mikrodalga fırında 800 Watt'da 30 dakika boyunca ısıtılmıştır. Bitki kalıntılarında kurtulmak için örnekler önce 4500 rpm' de santrifüj yapılarak, daha sonra

whatman no:1 süzgeç kâğıdı ile süzölmüş ve ekstrakt posalardan ayrılmıştır (Şekil 12). Ekstraktlar tüplere alınarak +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

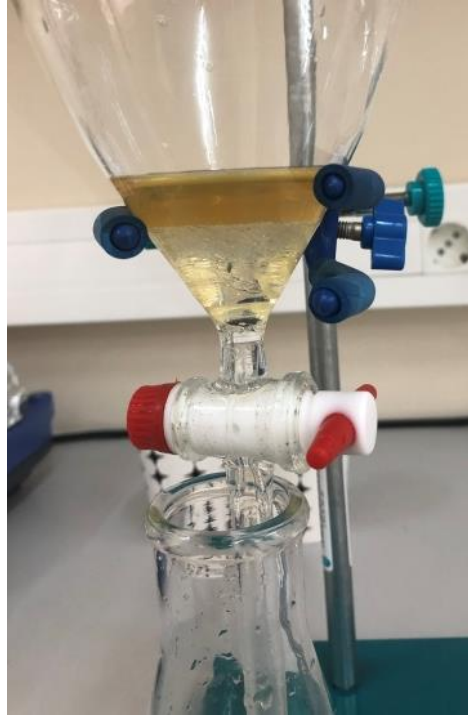


Şekil 12. Punica Granatum ekstraktın posasından arındırılması.

Su ve etanol çözücöleri ile elde edilmiş ekstraktlar dışında, yukarıda anlatılan aynı işlemler ile elde edilmiş su ekstraktının, suda az çözüner bileşenlerinin ayrılması için, farklı polaritelerde organik çözücöler kullanılarak tekrar bir ekstraksiyon işlemine tabi tutulması yöntemine başvurulmuştur.

3.3.1. Pinuca granatum özütünün organik ekstraksiyonu

Deiyonize su kullanılarak, mikrodalga fırında elde edilmiş bitki özütünün suda az çözüner bileşenlerinden ayrılması amaçlı farklı polaritelerdeki çözücöler kullanılarak ekstraksiyonu yapılmıştır. Kullanılan çözücöler sırayla; hekzan, kloroform, etil asetat ve son olarak da deiyonize sudur. Tüm çözücölerin bitki özütü ile eşit hacimleri kullanılarak ekstraksiyon işlemi yapılmıştır (Şekil 13).



Şekil 13. Punica Granatum özütünün ekstraksiyonu.

3.4. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Yeşil Sentezi

Demir oksit nanoparçacıklarının Punica Granatum ekstraktı ile sentezi bazı modifikasyonlar yapılarak iki yolla yapılmıştır. Ekstrakt ortamında alkali ortamda gerçekleşen reaksiyon Denklem 3.' de verilmiştir.



Denklem 3. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının alkali ortamda demir oksit formuna dönüşme reaksiyonu.

3.4.1. Demir oksit nanoparçacıklarının punica granatum ekstraktı (ph: 3.5) ile yeşil sentezi

Demir oksit nanoparçacıkların yeşil sentezinde, 10 ml, 20 mM demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ve 5 ml, 20 mM demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) çözeltisinin pH: 3 ayarlanarak hazırlanan çözeltisi balon jøjeye alınmıştır, çözelti ortamından 30 dakika boyunca N_2 gazı geçirilerek, çözeltiden çözünmüş O_2 uzaklaştırılmıştır. Yine N_2 gazı ortamında, ayrı deneylerde; 15 ml farklı derişimlerdeki bitki özütleri damla damla çözelti karışımı üzerine eklenerek, çözelti manyetik karıştırıcıda 1500 rpm' de 30 dakika boyunca karıştırılmıştır. Bitki özütünün eklenmesi ile

kahverengi/siyah nanoparçacık oluşumu gözlemlenmiştir. Nanoparçacık suspensiyonuna, damla damla %24'lük NH_3 eklenerek pH: 11 olarak ayarlanmıştır ve 1 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Deneyler, ekstrakt ve metal derişimi ve reaksiyon süresi dışında; manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyoda tekrarlanmıştır. Ayrıca, demir tuzlarının ve ekstraktların eklenme sıralaması değiştirilerek; en kararlı nanoparçacık oluşumu gözlemlenmiştir.

Hazırlanan nanoparçacık suspensiyonu 9000 rpm hızda, 10 dakika santrifüj edilerek aglomere olan nanoparçacıklardan uzaklaştırılmıştır. Reaksiyon ortamındaki bitki kalıntıları ya da reaksiyona girmeden kalan tuzlardan uzaklaştırmak için, nanoparçacıklar santrifüjlenerek yıkama yapılmak istenmiştir, ancak yüksek rpm değerlerinde bile (30.000 rpm'e kadar) nanoparçacıklar çöktürülemediği için, yıkama işlemleri bu yolla yapılamamıştır. Bu yüzden, örneğe son saflaştırma işlemi olarak, diyaliz yapılmıştır. Örnekler diyaliz poşetlerine alınarak (MWCO: 12–14 kDa), 6 saat boyunca deiyonize suya (pH: 7.5) karşı diyaliz edilmiştir (Şekil 14). Elde edilen nanoparçacıklar suspensiyonu, FeO-PG1 nanoparçacık olarak adlandırılmıştır.

3.4.2. Demir oksit nanoparçacıklarının punica granutum ekstraktı (ph: 11) ile yeşil sentezi

Demir oksit nanoparçacıklarının sentezi, klasik yeşil sentez yöntemi modifiye edilerek, öncelikle kullanılan tüm bitki özütlerinin pH'ı %24 NH_3 ile pH: 11'e (demir oksit nanoparçacıklarının oluşum pH'ı) getirilerek yapılmıştır. Demir oksit nanoparçacıkların yeşil sentezinde, 10 ml, 10 mM demir (III) klorür heksahidrat ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ve demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) çözeltisinin pH: 3 ayarlanarak hazırlanan çözeltisi balon jöjeye alınmıştır, çözelti ortamından 30 dakika boyunca N_2 gazı geçirilerek, çözeltiden çözünmüş O_2 uzaklaştırılmıştır. Yine N_2 gazı ortamında, ayrı deneylerde; 15 ml farklı derişimlerdeki bitki özütlerinin pH'ı %24 NH_3 ile 11 yapılarak, ekstrakt damla damla çözelti karışımı üzerine eklenmiştir ve çözelti manyetik karıştırıcıda 1500 rpm' de 2 saat boyunca karıştırılmaya bırakılmıştır. Deneyler, ekstrakt ve metal derişimi ve reaksiyon süresi dışında; manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyoda tekrarlanmıştır. Ayrıca, demir tuzlarının ve ekstraktların eklenme sıralaması değiştirilerek; en kararlı nanoparçacık oluşumu gözlemlenmiştir.

Hazırlanan nanoparçacık suspensiyonu 9000 rpm hızda, 10 dakika santrifüj edilerek aglomere nanoparçacıklardan uzaklaştırılmıştır. Yüksek hızda (30000 rpm) bile çöktürme yapılamadığından, yıkama yerine son saflaştırma basamağı olarak, örnekler diyaliz poşetlerine alınarak (MWCO: 12–14 kDa), 6 saat boyunca deiyonize suya (pH: 7.5) karşı diyaliz edilmiştir (Şekil 14). Elde edilen nanoparçacık suspensiyonu, FeO-PG2 nanoparçacık olarak adlandırılmıştır.



Şekil 14. Nanoparçacık örneklerine yapılan diyaliz işlemi.

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin yanısıra, kullanılan tüm ekstrakt örneklerine diyaliz son basamağı uygulanarak, *in vitro* testlerden önce tüm örnek ve ekstraktların aynı işlemlere tabi tutulması sağlanmıştır. Yukarıda bahsedilen iki sentez yöntemi de; etanol içinde ekstraksiyonu yapılmış nar kabuğu ekstraktı kullanılarak ve aynı zamanda, suda çözünmeyen bileşenlerinden ekstraksiyon yöntemi ile ayrılan nar kabuğu ekstraktı kullanılarak da tekrarlanmıştır.

3.5. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

Demir oksit nanoparçacıkların sentezi, uygun seyreltmeler yapılarak ve kör çözelti olarak deiyonize su kullanılarak UV-VIS Spektrometresi ile nanoparçacıkların absorpsiyon bandlarının görülmesiyle takip edilmiştir. Nanoparçacık oluşumunu görüntülemek, boyut ve şekil analizi yapmak için 10 µL nanoparçacık suspensiyonu Cu grid üzerine damlatılıp kurutularak, TEM görüntüleri alınmıştır. Aynı zamanda, nanoparçacık suspensiyonundan

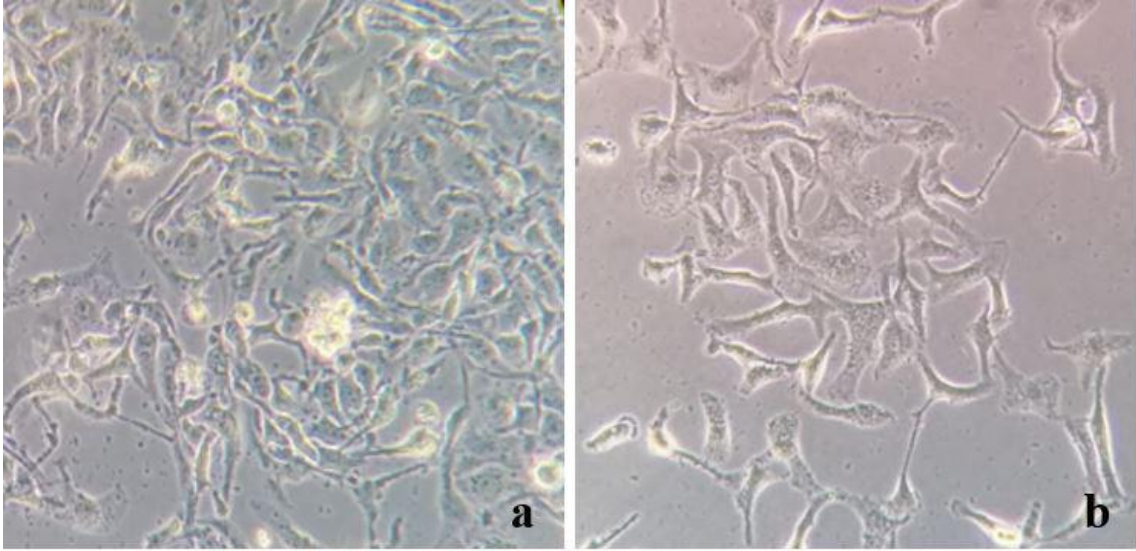
10-20 µL alınarak karbon bant üzerine damlatılıp, 4.30 nm kalınlığında iridyum kaplama yapılarak Taramalı Elektron Mikroskopisi (FESEM) cihazı ile EDX analizi yapılmış ve örneğin bileşimi gösterilmiştir.

Nanoparçacık suspensiyonu 90 °C sıcaklıkta kurutularak, toz formları ile XRD spektrumları elde edilerek kristal yapıları belirlenmiştir. XRD spektrumları Rietveld analizi ile aydınlatılmıştır. Nanoparçacık örneklerinin yüzey yüklerinin belirlenmesi için zeta potansiyelleri ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler MALVERN Nano ZS90 cihazında, 20-90 °C sıcaklık ve 1.2-1.65 kırılma indisi aralıklarında yapılmıştır. Nanoparçacık suspensiyonunun metal içeriğinin kantitatif analizi için, örnekler yaklaşık 1000 kat seyreltme yapılarak, İndüktif Eşleşmiş Plazma Kütle Spektrometresi (ICP-MS) cihazında analiz edilmiştir. Bitki özütü ve nanoparçacık suspensiyonu 90 °C sıcaklıkta kurutularak FT-IR spektrometresi ile yapısal analizi yapılmıştır. TGA cihazı kullanılarak, 10 °C/dk ısıtma hızı ile 25-900 °C sıcaklık aralığında, nanoparçacıkların sıcaklık ile bozunma testi yapılmıştır. Manyetik özelliklerinin belirlenmesi için, VSM ölçümü yapılmıştır. Manyetik özelliklerinin belirlenmesi için, oda sıcaklığında, ± 1 T manyetik alan aralığında Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) kullanılarak örneklerin manyetik ölçümü yapılmıştır.

3.6. Demir Oksit Nanoparçacıklarının *in vitro* Deneyleleri

3.6.1. Hücre hatları ve büyütme koşulları

Metastatik meme kanseri MDA-MB-231 ve CRL-4010 meme hücre hatları ATCC'den (Amerikan hücre kültürü koleksiyonu) temin edilmiştir (Şekil 15). Hücre hatları %10 FBS (fetal bovine serum) ve %1 Penisilin/Streptomisin/Amfoterisin B içeren DMEM ortamı içinde 37 °C' de, %95 nem ve %5 CO₂ koşullarında Hepa filtreli inkübatörde çoğaltılmıştır.



Şekil 15. a. MDA-MB-231 hücre hattı, b. CRL-4010 hücre hattı mikroskop görüntüleri.

3.6.2. Sitotoksosite testi (MTT testi)

MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücreleri steril 1X DPBS ile yıkandıktan sonra %0,25 tripsin-edta ile kaldırılarak süspansiyon edildi. Homojen hücre süspansiyonundan 20 μ L 0,2 ml santrifüj tüpüne alındı, üzerine 20 μ L hazır Tripan mavisini boyası eklenerek karıştırıldı ve Thoma lamı ile kaldırılan hücreler sayıldı. Hücreler 5×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde 96 kuyucuklu kültür kaplarına ekildi. Hücreler 100 μ L/kuyucuk içerisinde geceboyu kültüre edildi. Ertesi gün, tutunan hücreler nanoparçacıklar ile muamele edildi. MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücreleri, final hacimleri 22, 44, 66 ve 84 ppm derişimlerinde dört tekrarlı olacak şekilde, 24 ve 48 saat süre boyunca nanoparçacıklar ile muamele edildi. Süre sonunda, hücreler üzerine 10 μ L/kuyucuk MTT (5 mg/ml) ajanı ilave edilerek 3 saat boyunca inkübatörde bekletildi. Ardından, kuyucuklardaki tüm besiyeri aspire edildi ve her kuyucuğa 100'er μ L dimetilsülfoksit (DMSO) eklendi. Oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dakika inkübasyondan sonra canlı hücreler tarafından formazana indirgenmiş tetrazolyum tuzunun yoğunluğuna bağlı olarak oluşan renklenme 570-690 nm dalgaboyunda spektrofotometrik analiz ile optik dansite (OD) değerleri ölçüldü. Hücre canlılığı (%) = Örnek (OD) / Kontrol (OD) x 100 formülüne göre hesaplandı. Nanoparçacıkların IC₅₀ değerleri AAT Bioquest yazılımı ile hesaplandı.

3.6.3. Demir oksit nanoparçacıklarının hücre içine alınması

3.6.3.1. Hücre içindeki demir oksit nanoparçacıklarının kantitatif analizi

Her iki hücre türünde, hücre içine alınan demir oksit nanoparçacıklarının kantitatif analizi için, hücreler IC₅₀ derişimindeki nanoparçacıklar ile 24 saat boyunca muamele edilmiştir. İnkübasyondan sonra, hücre suspensiyonu PBS (fosfat tamponu, pH: 7,4) ile yıkanarak, tripsinize edilmiştir ve tripan mavisi ile boyanarak, ışık mikroskobunda sayılmıştır. Daha sonra hücreler, der. HCl ile 1 gece boyunca parçalanmıştır ve daha sonra deiyonize su ile seyreltilip, örneklerin demir içeriğinin analizi ICP-MS cihazı ile yapılmıştır.

3.6.3.2. Hücre içindeki demir oksit nanoparçacıklarının kalitatif analizi (Prussian Blue boyaması)

MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücreleri, demir oksit nanoparçacığı ile IC₅₀ derişimde %5 CO₂ atmosferinde 37 °C' de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra hücreler, hücre dışında kalan nanoparçacıkları uzaklaştırmak için iki kez DPBS ile yıkanarak, %0.25 tripsin ile toplanmıştır. Hücreler %4 formaldehit ile fikse edilmiştir, ardından PBS ile dört kez yıkanmıştır. Boyama çözeltisi; koyu şişede saklanan %5' lik potasyum ferrosiyaniür çözeltisi ve %5 hidroklorik asit çözeltisi 1:1 oranında karıştırılarak, boyama uygulamasından hemen önce hazırlanmıştır. Nanoparçacıklar ile muamele edilen ve yıkamaları yapılan hücreler, oda sıcaklığında 30 dakika boyunca çalışma çözeltisi ile inkübe edilmiştir, üç kez distile su ile yıkanmıştır ve mikroskop görüntüleri alınmıştır.

3.6.4. Aneksin-V/PI boyaması (Flow sitometre analizi)

Demir oksit nanoparçacıkların MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücreleri üzerindeki apoptotik etkilerini değerlendirmek için, Annexin V-FITC/propidium iodide (PI) boyaması Annexin V-FITC apoptoz kiti (Biolegend USA) talimatlarına göre yapılmıştır. Hücreler nanoparçacığın IC₅₀ derişimindeki çözeltisi ile 12 saat ve 24 saat boyunca muamele edildikten sonra tripsin-edta kullanılarak kaldırılmış ve PBS ile yıkanıp ve tekrar bağlanma tamponu (10 mM HEPES/NaOH, pH 7,5 içinde 140 mM NaCl and 2,5 mM CaCl₂) ile resuspanse edilmiştir. Hücre süspansiyonuna floresan izotiyosiyanat (FITC) konjüge

edilmiş Annexin V ve PI eklenerek, hücreler boyanmış ve akım sitotometri (BD C6 flow cytometry) cihazı ile analiz edilmiştir. Kit farklı popülasyonların ayırt edilmesini sağlamaktadır. Bunlar; canlı hücrenin bozulmamış mitokondriyal zarı, bozulmuş mitokondri zarı, erken ve geç apoptotik hücreler ve ölü hücrelerdir. Her bir durum yüzdeleri hesaplanarak histogram olarak verilmiştir.

3.7. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Antioksidan Aktivitesi (DPPH Metodu)

FeO-PG2 nanoparçacık örneğinin antioksidan aktivitesi belirlenmiştir. Nanoparçacık suspensiyonundan 50 µl alınarak, üzerine 150 µl, 0.1 mM DPPH radikalinin metanol ile hazırlanan çözeltisi eklenerek, karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 30 dakika bekletilmiştir. Negatif kontrol olarak 50 µl metanol ve 150 µl DPPH radikalinin metanol ile hazırlanan çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır. Pozitif kontrol olarak nanoparçacık çözeltileri aynı derişimlerde sentetik antioksidan olan askorbik asit çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltilerin absorbans değerleri 517 nm dalga boyunda Elisa tabaka okuyucuda okunmuştur ve ölçümler üç kez tekrarlanarak sonuçların ortalaması alınmıştır.

Çözeltilerinin antioksidan aktiviteleri DPPH absorpsiyonunun % inhibisyonu olarak verilmiştir. Bu değer aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{Antioksidan aktivitesi (\% İnhibisyon)} = 100 \times (A_{\text{kontrol}} - A_{\text{örnek}}) / A_{\text{kontrol}}$$

A_{kontrol} : Negatif kontrol olarak hazırlanan çözeltisinin absorbans değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: Nanoparçacık çözeltilerinin absorbans değerleridir.

Pozitif kontrolün antioksidan aktivitesi hesaplanırken;

A_{kontrol} : negatif kontrol çözeltisinin absorbans değeridir.

$A_{\text{örnek}}$: ascorbic asit çözeltilerinin absorbans değerleridir.

3.8. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

3.8.1. Besiyeri hazırlanması

Antimikrobiyal çalışmaları için sıvı ve katı besiyeri hazırlanmıştır. Sıvı besiyeri LB-Broth'tan 2,5 gr tartılarak 100 ml'e distile su ile tamamlanmıştır. Katı besiyeri için Mueller Hinton agardan (MHA) 7,6 gr tartılarak 200 ml'e distile su ile tamamlanmıştır.

Sterilizasyon için 121°C, 1 atm basınçta, 15 dakika otoklav yapılmıştır. Sterilizasyon işleminden sonra katı besiyeri 100 mm³ petri kaplarına yaklaşık 20 ml dökülmüştür ve kullanılmak üzere +4 °C' de saklanmıştır.

3.8.2. Bakteri çoğaltma

Escherichia coli (*E. coli*) ve *Staphylococcus Stafilokokus aureus* (*S. aureus*) bakterilerini kültüre etmek için stok kültürlerinden, 20'şer µL alınarak üzerlerine 1 ml LB-Broth sıvı besiyeri eklenmiştir. Ardından 37°C' de 24 saat çalkalamalı inkübatörde (150 rpm) bırakılarak çoğalmaları sağlanmıştır.

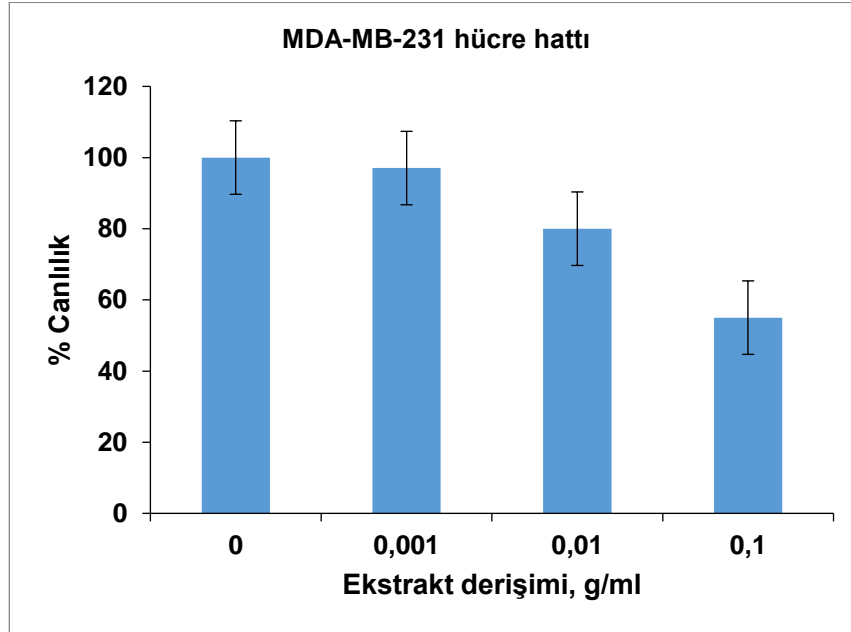
3.8.3. Spot ekim

Spot ekim için *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinden ayrı ayrı 1 ml stok hazırlanmıştır. Nanoparçacık uygulaması için farklı derişimlerdeki nanoparçacıklardan 500 µL alınarak, 200 µL bakteri, 4300 µL LB-Broth sıvı besiyeri eklenmiştir ve bu şekilde her iki bakteri türü için de stok hazırlanmıştır. Kontrol ve nanoparçacık uygulanmış stok bakterilerden 10⁻², 10⁻⁴, 10⁻⁶, 10⁻⁸ ve 10⁻¹⁰ oranlarında dilüsyonlar hazırlanmıştır. Daha önce hazırlanan katı besiyeri içeren petri kaplarına örneklerden 10'ar µL alınarak spot ekim yapılmıştır. Petriler 37°C'deki etüvde 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda her spot içinde bakterilerin oluşturduğu koloniler sayılmıştır.

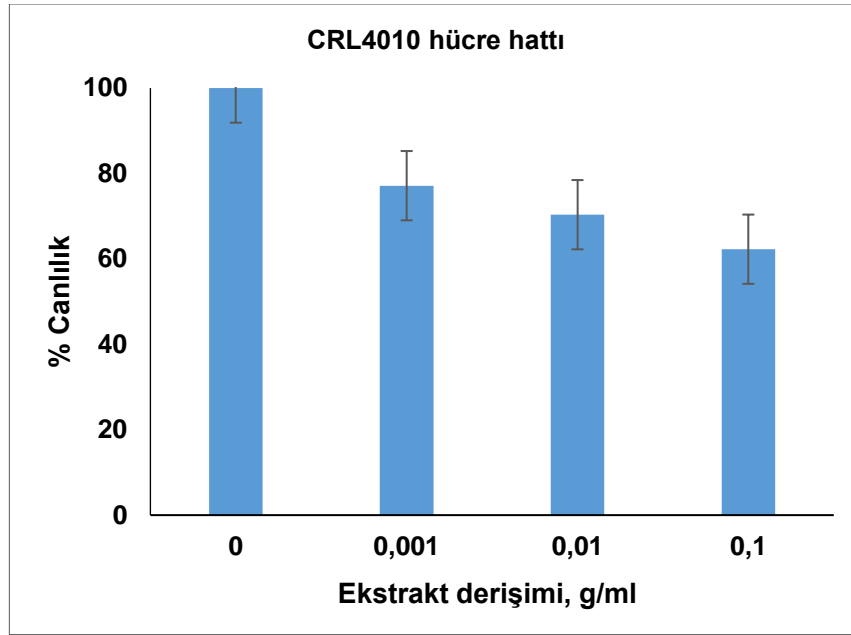
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Bitki Özütlerinin Ekstraksiyon

Su (Esu), etanol (Eetanol) ve suda az çözünen bileşenlerin ayrılması ile organik çözücülerle yapılan ekstraksiyondan (E-org) elde edilen özütler ile sentezlenen demir oksit nanoparçacıklarının kararlılıkları karşılaştırılmıştır. Su ve etanol ekstraktları ile yapılan sentezlerde, benzer kararlılıkta nanoparçacıklar elde edilmiştir. Ancak E-org ekstraktı ile sentezlenen nanoparçacıkların aglomere olup çökme eğiliminde olduğu görülmüştür. Ekstrakt içeriğinin ve yoğunluğunun diğer ekstraktlara göre daha az olmasından dolayı, ekstraktın metali indirgeme ve nanoparçacıkları stabilize etme kapasitesinin daha zayıf olduğu anlaşılmıştır. Diğer yandan, biyoyumluluğu daha yüksek olması nedeniyle sentezlere bitkinin etanol ekstraktı yerine, su ekstraktı ile devam edilmiştir. Sentezlerde kullanılacak ekstraktın (0.1 g/ml) ilk sitotoksosite değerlendirmeleri MTT testi ile yapılmıştır (Şekil 16-17).



Şekil 16. 3 farklı derişimdeki (0.001, 0.01, 0.1 g/ml) ekstrakt ile 24 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).



Şekil 17. 3 farklı derişimdeki (0.001, 0.01, 0.1 g/ml) ekstrakt ile 24 saat inkübe edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).

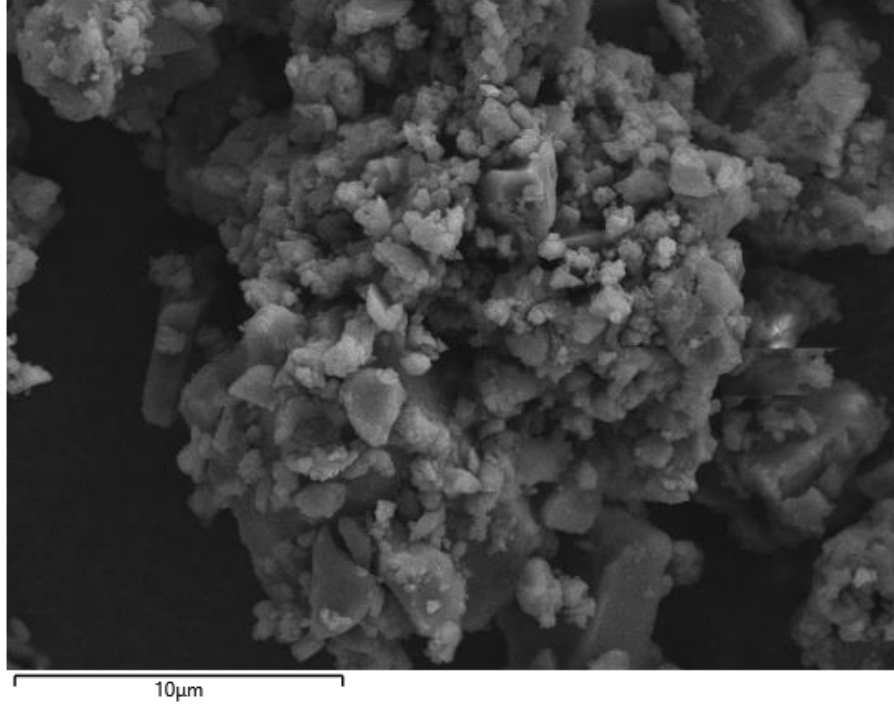
Veriler ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Kontrol hücrelerine göre muamele görmüş hücrelerin sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı student t-testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

Sentezlerde kullanılacak ekstraktın (0.1 g/ml) MDA-MB-231 kanser hücrelerinde hücre canlılığını %55'e düşürdüğü görülmüştür. CRL-4010 hücrelerinde ise hücre canlılığı %62'e düşmüştür (Şekil 16 ve 17). Nanoparçacıkların bu derişimdeki ekstrakt ile sentezlendiği koşullarda, nanoparçacıkların özellikle CRL-4010 hücrelerinde daha yüksek oranda toksisiteye neden olacağı düşünülerek, tüm sentezlerde hem nanoparçacık çekirdek oluşumunu sağlayacak ve nanoparçacıkların büyümesi esnasında aglomere olmadan kararlı kalmalarını sağlayacak, hemde özellikle CRL-4010 hücrelerinde daha düşük toksik etki gösterecek; en düşük ekstrakt derişiminin bulunması için, nanoparçacık sentezlerinde kullanılmak üzere ekstraktın farklı derişimleri (0.1 g/ml derişimden seyreltme oranları: 1/2.5, 1/5, 1/7.5, 1/10, 1/15) hazırlanmıştır ve en uygun ekstrakt derişimi belirlenmiştir.

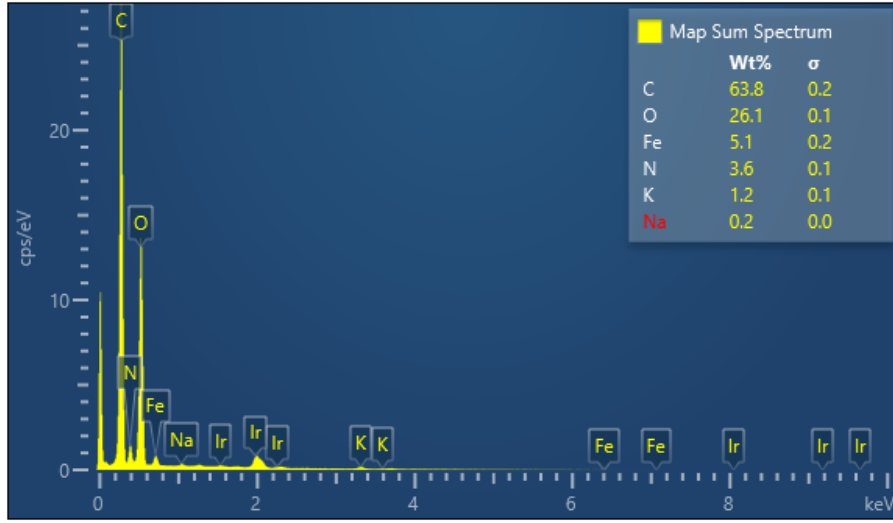
4.2. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Sentez Optimizasyonu

Hazırlanan en yüksek derişimli (0.1 g/ml) ekstrakt kullanılarak yapılan sentez ile elde edilen FeO-PG1 nanoparçacıklarının deiyonize su içindeki süspansiyonuna ait FESEM görüntüsü çekilerek, EDX analizi yapılmıştır (Şekil 18-19).

Electron Image 3

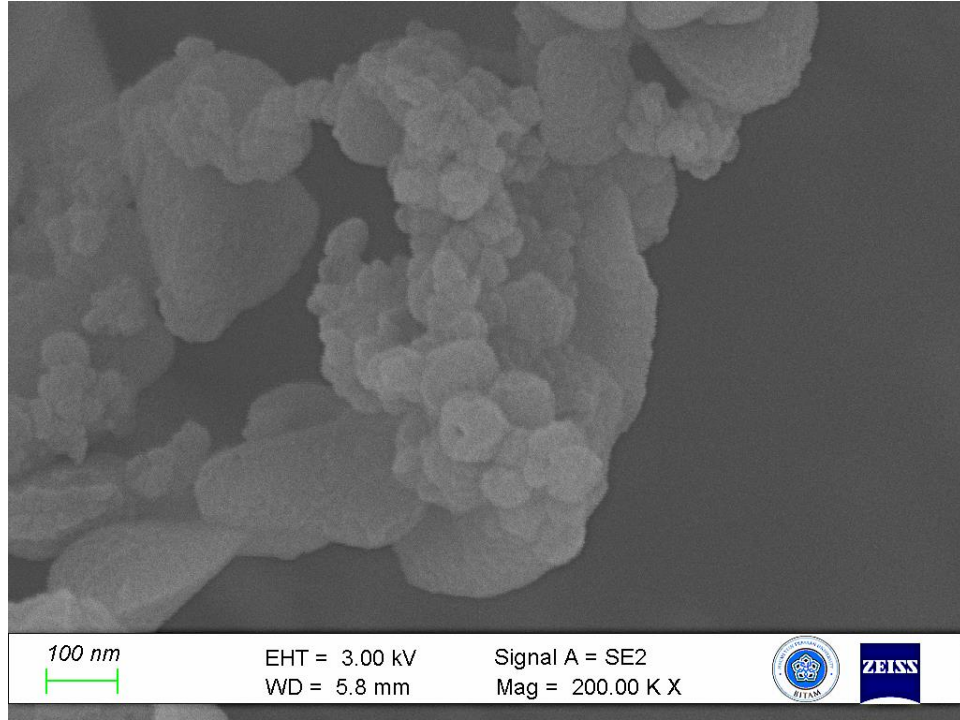


Şekil 18. FeO-PG1 nanoparçacık örneğine ait taramalı electron mikroskobu görüntüsü (FESEM); skala: 10 μm.

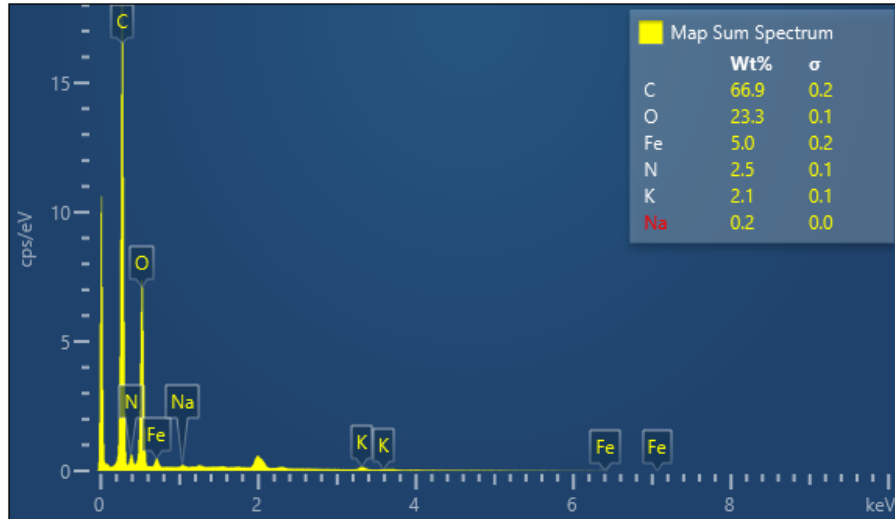


Şekil 19. FeO-PG1 nanoparçacık örneğinin EDX Analizi.

Aynı şekilde, FeO-PG2 nanoparçacıklarının deiyonize su içindeki süspansiyonuna ait FESEM görüntüsü çekilerek, EDX analizi yapılmıştır (Şekil 20-21).



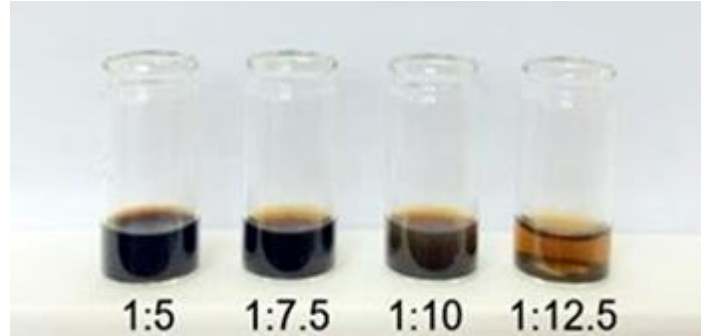
Şekil 20. FeO-PG2 nanoparçacık örneğine ait taramalı electron mikroskobu görüntüsü (STEM); skala: 100 nm.



Şekil 21. FeO-PG2 nanoparçacık örneğinin EDX Analizi.

Elde edilen FESEM görüntülerinde ekstrakta ait mikro boyuttaki bileşenlerde görülmektedir, görüntülerden kullanılan ekstrakt yoğunluğunun fazla olabileceği düşünülerek, ayrıca daha önce de belirtildiği üzere kullanılan ekstrakt derişiminin MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücrelerinde toksik etki göstermesinden dolayı; FeO-PG1 ve FeO-

PG2 nanoparçacık sentezi için farklı seyreltme oranlarındaki ekstraktlar (1:5 - 1:7,5 - 1:10 - 1:12,5 - 1:15) (ekstrakt:su) kullanılmıştır (Şekil 22). EDX spektrumlarından, FeO nanoparçacık süspansiyonunun demir ve oksijen içeriği görülmektedir.



Şekil 22. Farklı ekstrakt derişimlerinde sentezlenmiş FeO-PG2 süspansiyonları.

Nanoparçacık kararlılığının en yüksek olduğu ve sentez sonrasında aglomerasyon ile FeO nanoparçacık kaybının en az olduğu ekstrakt derişimi belirlenmiştir ve 1:7,5 (ekstrakt:su) oranında seyreltilen ekstrakt ile sentezlere devam edilmiştir.

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarının farklı ekstrakt derişimleri kullanılarak sentezlenmesi dışında, manyetik karıştırıcı ve ultrasonik banyoda reaksiyonlar tekrarlanmıştır, demir tuzlarının ve ekstraktların eklenme sıralaması değiştirilmiştir; en kararlı nanoparçacık oluşumu ve aglomerasyonun en az olduğu nanoparçacık süspansiyonu seçilmiştir. Sentezlere oda sıcaklığında ve manyetik karıştırıcıda tuz çözeltilerine ekstraktın eklenmesiyle devam edilmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların mıknatısa toplanma eğilimi düşük olduğundan, aynı derişimde ekstrakt (1:7,5) kullanılarak demir iyonlarının derişimleri artırılarak, manyetik özelliği iyileştirilmeye çalışılmıştır (Tablo 3).

Tablo 3. FeO nanoparçacık sentezinde kullanılan reaksiyon parametreleri.

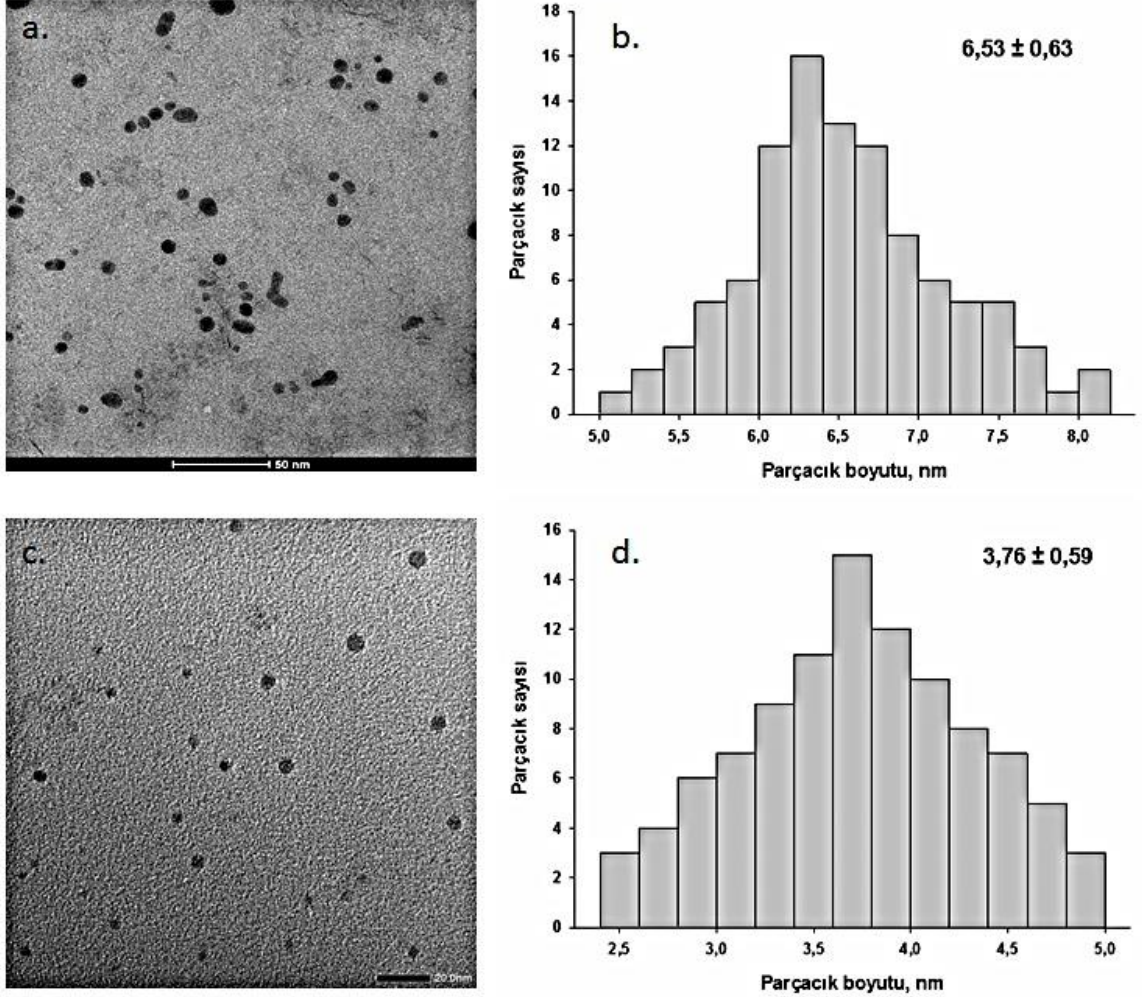
Sentez Adı	[Fe ³⁺], [Fe ²⁺]	Reaksiyon süresi	Renk	Aglomerasyon	Manyetiklik
FeO-PG1	20 mM	1 saat	Siyah	Yok	Düşük, hissedilir
	50 mM	1 saat	Siyah	Az	Düşük, hissedilir
	100 mM	1 saat	Siyah	Yüksek	Düşük, hissedilir
	150 mM	1 saat	Siyah	Yüksek	Düşük, hissedilir
FeO-PG2	20 mM	1 saat	Siyah	Yok	Düşük, hissedilir
	50 mM	1 saat	Siyah	Az	Düşük, hissedilir
	100 mM	1 saat	Siyah	Az	Düşük, hissedilir
	150 mM	1 saat	Siyah	Az	Düşük, hissedilir

Demir iyonlarının derişimlerinin artırılmasıyla dış manyetik alana hissedilen çekimde bir değişiklik olmamıştır. Sentezlere, 20 mM derişimde demir tuzları ile devam edilmiştir.

4.3. Demir Oksit Nanoparçacıklarının Karakterizasyonu

4.3.1. Nanoparçacıkların şekil boyut analizi

Uygun sentez koşulları ve ekstrakt derişimi belirlenerek sentezlenen FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarının TEM görüntüleri elde edilmiştir (Şekil 23 a-c).

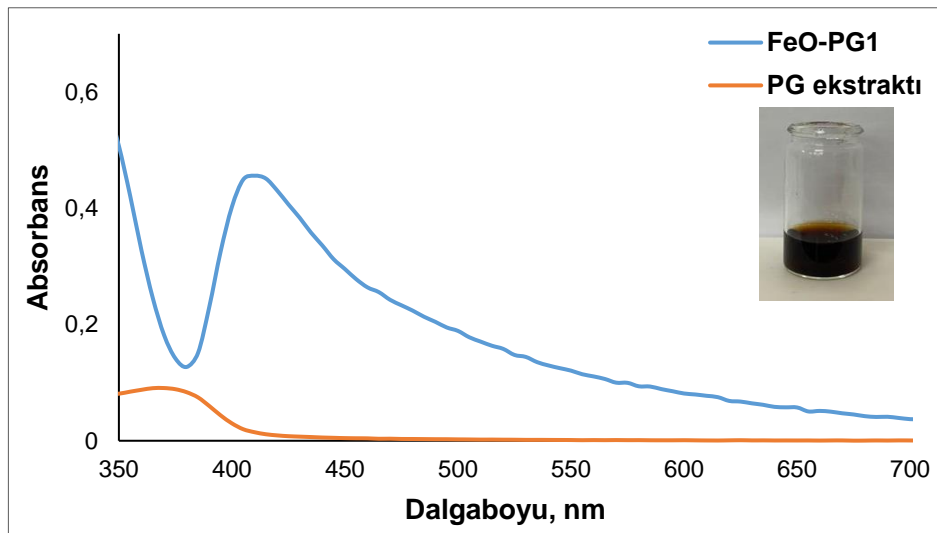


Şekil 23. Nanoparçacık örneklerine ait taramalı elektron mikroskobu görüntüleri (TEM, 120 kV); **a.** FeO-PG1, skala: 50 nm. **b.** FeO-PG2, skala: 20 nm. Tem görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafikleri, **c.** FeO-PG1, **d.** FeO-PG2, 100 parçacık boyutu ölçülerek elde edilmiştir.

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerine ait TEM görüntülerinden, her iki yöntem ile sentezlenen nanoparçacıkların küçük boyutta (<10 nm) oldukları görülmektedir. Ancak 100 farklı parçacığın boyutu ölçülerek elde edilen boyut dağılım grafiğinden FeO-PG2 nanoparçacıklarının ortalama boyutunun $6.53 \pm 0,63$ nm, FeO-PG1 nanoparçacıklarının ortalama boyutunun $3.76 \pm 0,59$ nm oldukları görülmüştür (Şekil 23 b-d).

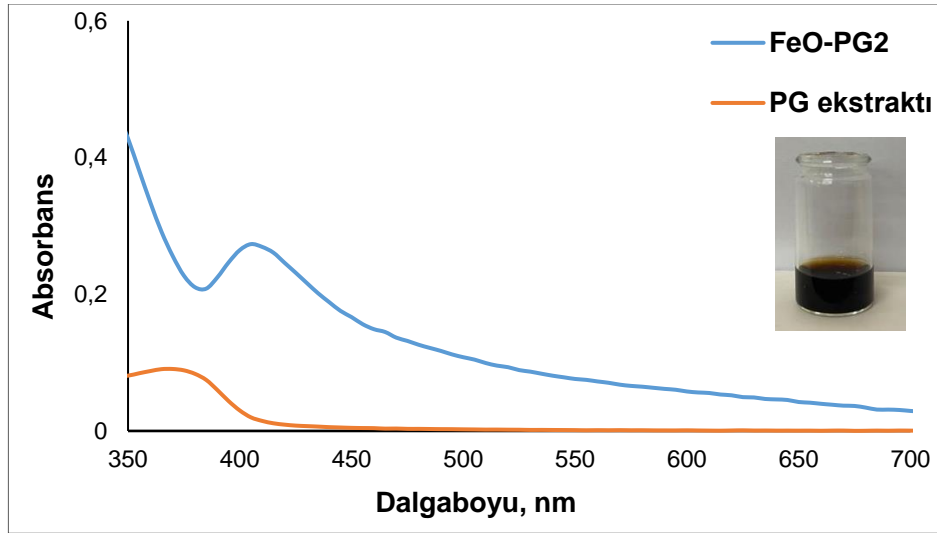
4.3.2. Nanoparçacıkların UV/VIS absorpsiyon spektrumları

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin absorpsiyon spektrumları 350-700 nm dalgaboyu aralığında taranarak, maximum absorpsiyon dalgaboyları belirlenmiştir (Şekil 24-25).



Şekil 24. FeO-PG1 nanoparçacıklarının ve PG ekstraktının Uv-Vis absorpsiyon spektrumu.

UV/Vis spektrumunda FeO-PG1 nanoparçacıklarına ait 410 nm dalgaboyunda maximum absorpsiyon piki gözlemlenmiştir.



Şekil 25. FeO-PG2 nanoparçacıklarının ve PG ekstraktının Uv-Vis absorpsiyon spektrumu.

UV-Vis spektrumunda FeO-PG2 nanoparçacıklarına ait 405 nm dalgaboyunda maximum absorbans piki gözlemlenmiştir. FeO-PG1 nanoparçacıklarına ($6.53 \pm 0,63$ nm) göre maximum absorbansın 5 nm daha küçük dalgaboyuna kayması, FeO-PG2 nanoparçacıklarının boyutunun ($3.76 \pm 0,59$ nm) daha küçük olması ile açıklanmaktadır (Sekmen, 2019; Schwaminger ve ark., 2017).

4.3.3. Nanoparçacıkların FT-IR analizleri

Sentezlenen demir oksit nanoparçacıklarının ve PG ekstraktının kimyasal bağlarını belirlemek için, Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi ile örneklerin 400–4000 cm^{-1} spektral aralıkta spektrumları alınmıştır (Şekil 26-27). Örnekler için FT-IR spektrumlarından gözlemlenen şiddetli bantlar Tablo 4.'de özetlenmiştir (Wang ve ark., 2010; Irshada, 2017; Sirdeshpande, 2018; Venkateswarlu, 2019).

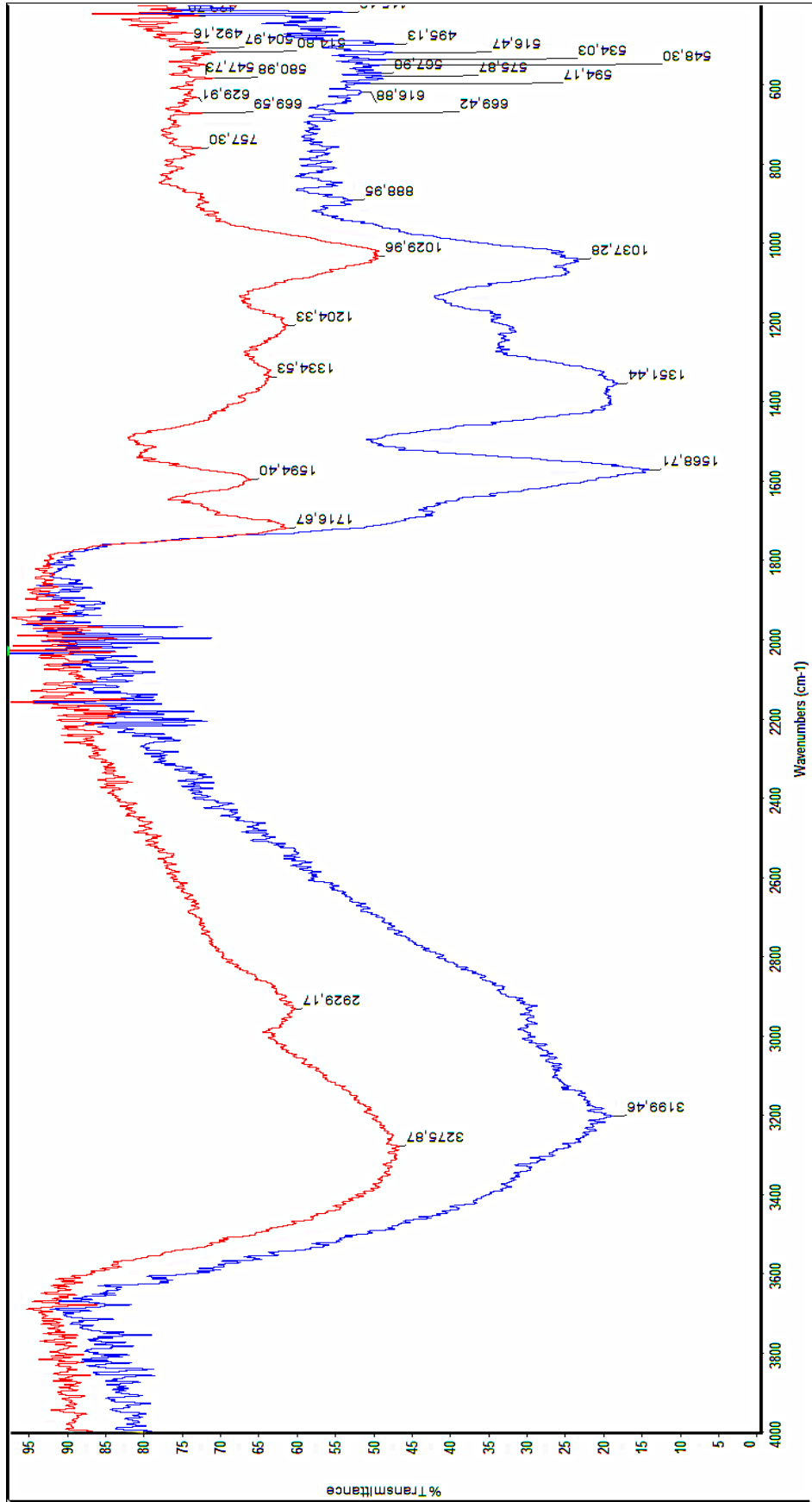
Tablo 4. Standart absorpsiyon FT-IR bantları ile PG ekstraktı, FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarına ait bantların karşılaştırılması.

PG ekstrakt, frekans (cm^{-1})	FeO-PG1, frekans (cm^{-1})	FeO-PG2, frekans (cm^{-1})	Standart bantlar, frekans (cm^{-1})
3275	3199	3199	O-H gerilme
2929	2929	2929	C-H gerilme
1716	1716	1716	C=O
1594	1568	1574	C-C esneme
1334	1351	1317	C-H makaslama
1204	1204	1204	C-O gerilme
1029	1037	1065	C-O gerilme
	575	575	Fe-O

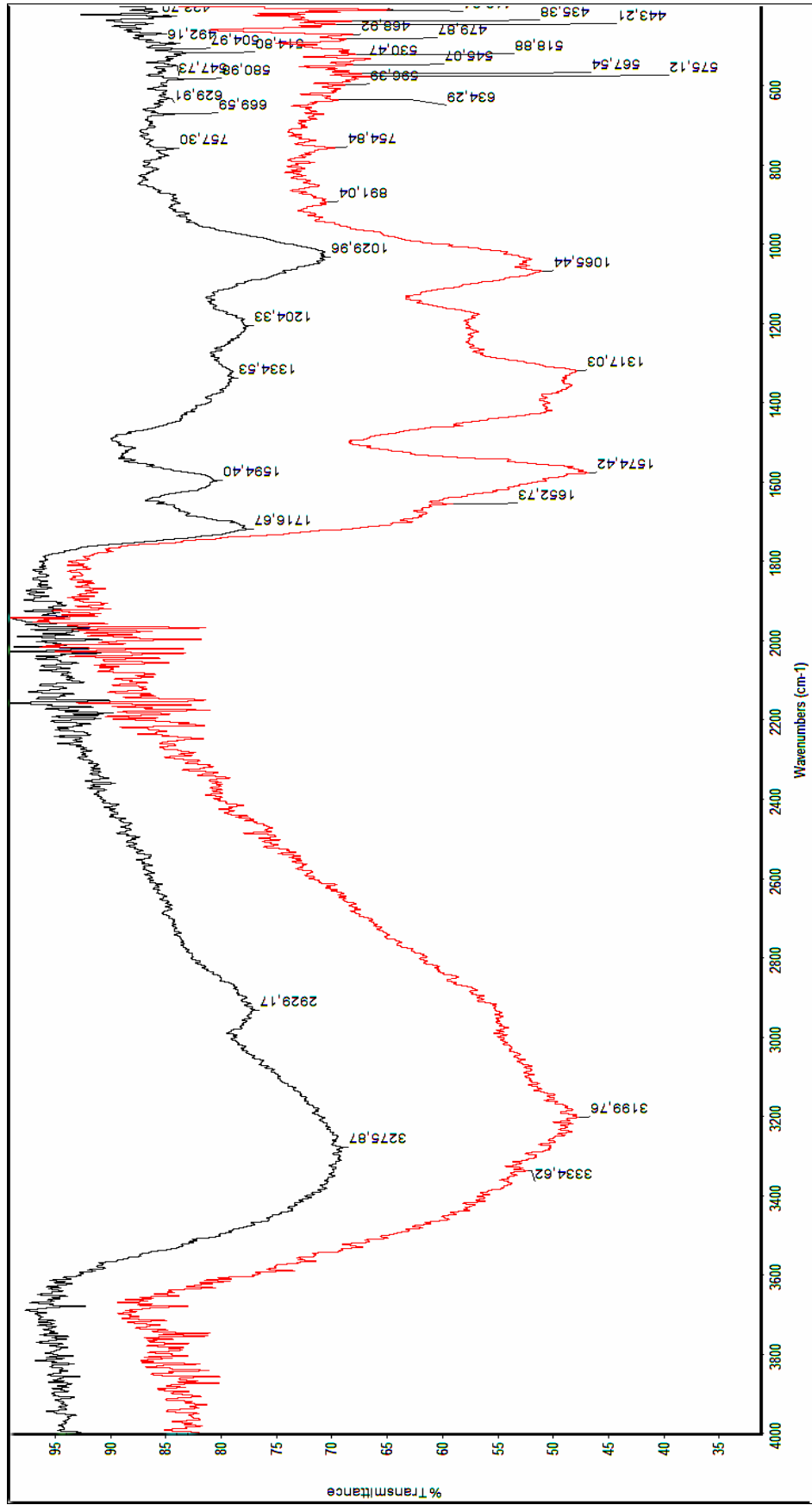
PG kabuğu ekstraktına ait güçlü adsorpsiyon bantları 3275, 2929, 1716, 1594, 1334, 1204, 1029 cm^{-1} dalga sayılarında görülmüştür. Demir oksit nanoparçacıklarına ait güçlü bantlar, FeO-PG1 için; 3199, 1568, 1351, 1037, 888, 575 cm^{-1} dalga sayılarında, FeO-PG2 için; 3199, 1574, 1317, 1065, 891, 575 cm^{-1} dalga sayılarında görülmüştür. Nanoparçacıklara ait spektrumların ekstrakt spektrumu ile karşılaştırılmasıyla sentezlenen nanoparçacıklarının bantlarında güçlü tepe noktalarının biraz kaydığını ancak PG ekstraktını içerdiği doğrulanmaktadır (Şekil 26-27).

PG kabuğu, zengin polifenoller, karbonhidratlar, asit türevleri, proteinler, lipidler ve liflerden oluşmuştur (Wang ve ark., 2010). FT-IR spektrumundaki 3275 cm^{-1} ' deki en şiddetli bant, polifenolik gruplardaki O-H bağı gerilme titreşimlerine karşın gelmektedir. Bu bantın 3275' den 3199 cm^{-1} ' e kayması polifenollerin nanoparçacık sentezindeki olası katkısını göstermektedir. 2929 cm^{-1} ' deki bant karboksilli asitlerdeki metil gruplarının C-H bağı gerilme titreşiminden (Yusefi, 2020; Venkateswarlu, 2019). 1716 cm^{-1} ' deki bant biyomoleküllere ait C=O grubunu göstermektedir (Irshada, 2017). Her üç spektrumda gözlenen, 1650 ve 1450 cm^{-1} aralığındaki bantlar (1594, 1574, 1568 cm^{-1}) aromatik halkaların C=C, C-C, C-O bağlarının gerilme titreşimlerinden ileri gelmektedir (Bouafia, 2021). 1317, 1351 ve 1334 cm^{-1} ' deki bantlar ve 1204 cm^{-1} ' deki bantlar C-H ve C-O gerilme titreşimlerine aittir (Sirdeshpande, 2018; Venkateswarlu, 2019). 1029, 1037 ve 1065 cm^{-1} ' deki bantlar alkol, karboksilik asit, ester, eterdeki amid C-O bağı ve amin bağlarına aittir. Bu bantlar flavanoid ve amino asitlerin varlığına dayandırılmaktadır (Yusefi, 2020). Tanımlanan tüm bantlar, ekstraktın zengin polifenol bileşiklerinin varlığını doğrulamaktadır.

Fe-O bağı titreşimine ilişkin spesifik bantlar genellikle 650-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında bulunmaktadır ve demir oksit varlığı bu dalgaboyu aralığındaki bantlar ile belirlenmektedir (Arularasu, 2018; Bouafia, 2021; Yusefi, 2020). Her iki spektrumda 575 cm^{-1} ' da nispeten şiddetlenen bir bant bulunmaktadır, ilgili bant ile demir oksit nanoparçacık içeriği doğrulanmaktadır. Literatürde, Fe-O gerilme titreşimi yığın magnetit için 570 cm^{-1} dalgasayısında görülürken, nanoparçacık boyutu ve yüzey bağlarının farklanmasıyla bu dalga sayısından kaymalar gözlemlenmektedir (Arularasu, 2018; Yusefi, 2020). Genellikle, 400-570 cm^{-1} dalga sayısı aralığındaki titreşimler manyetite, 620-660 cm^{-1} aralığı maghemite, 540 cm^{-1} dalga sayısı hematite dayandırılmıştır. 470 cm^{-1} , 501 cm^{-1} , 555 cm^{-1} , 594 cm^{-1} ve 633 cm^{-1} dalga sayısında kaydedilen bantlar, farklı demir oksit formları olabildiği gösterilmiştir (Demirezen, 2019; Venkateswarlu, 2019).



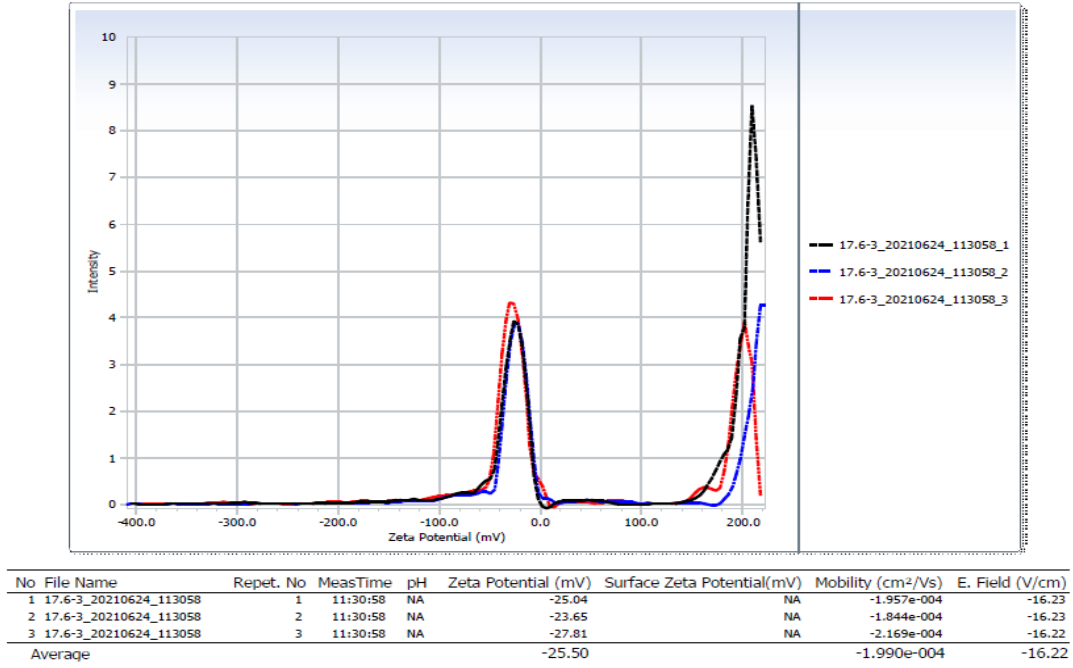
Şekil 26. PG ekstraktı (kırmızı) ve FeO-PG1 nanoparçacığına (mavi) ait FTIR spektrumları.



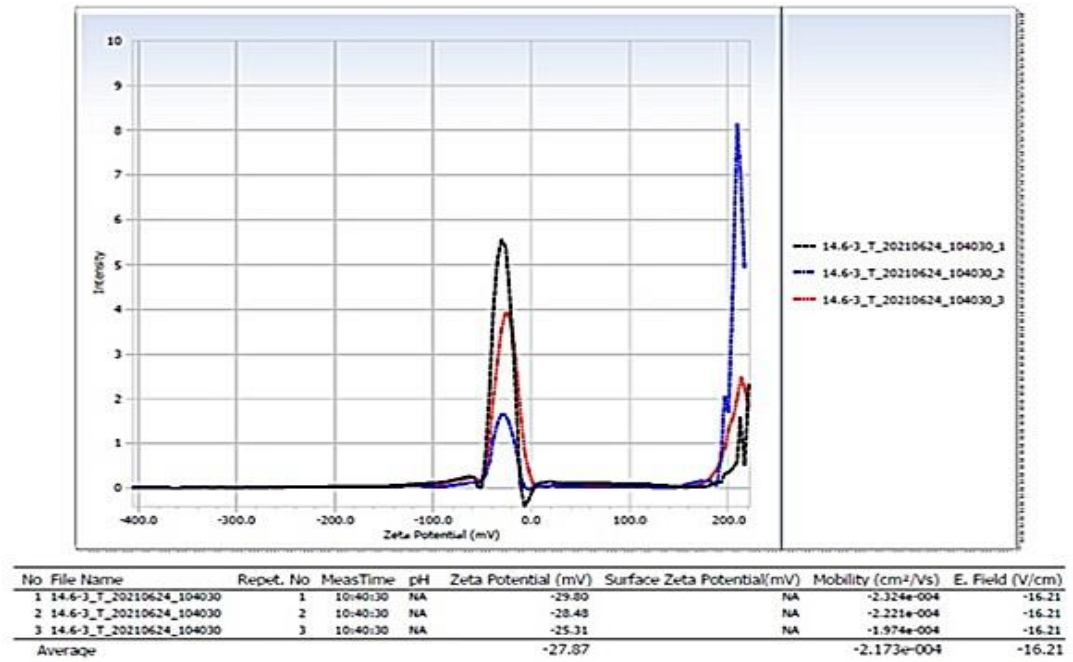
Şekil 27. PG ekstraktı (siyah) ve FeO-P2 nanoparçacığına (kırmızı) ait FTIR spektrumları.

4.3.4. Nanoparçacıkların zeta potansiyelleri analizleri

In vitro uygulamalarda kullanılmak üzere hazırlanan FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin yüzey karakterizasyonu yapılarak kararlılıklarının belirlenmesi amacıyla zeta potansiyel ölçüm cihazı ile nanoparçacıkların yüzey yükleri 3 tekrarlı olarak ölçülmüştür (Şekil 28-29).



Şekil 28. FeO-PG1 nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.

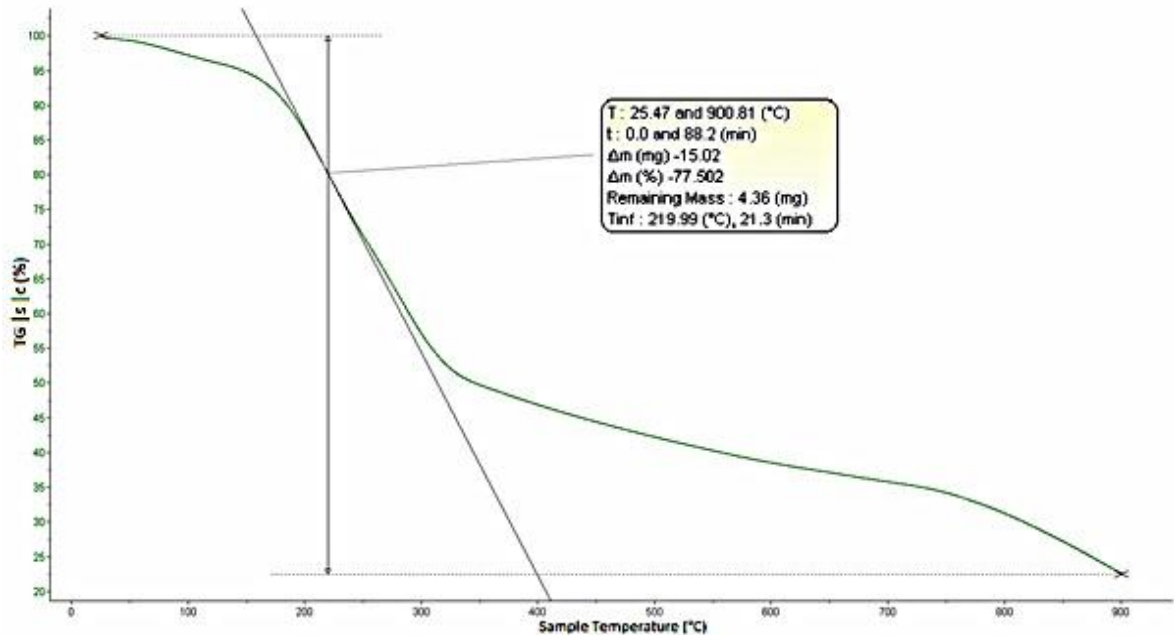


Şekil 29. FeO-PG2 nanoparçacık örneğine ait zeta potansiyeli grafiği.

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerine ait zeta potansiyelleri sırasıyla, 25.50 mV ve 27.87 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 28-29). Negatif zeta potansiyeli nanoparçacık yüzeyinde negatif yüklü gruplar bulunduğunu göstermektedir. Bunun da ekstrakt polifenol gruplarının yüzeyi stabilize etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Yusefi ve ark., 2021). Zeta potansiyel değeri 20 mV civarlarında olan parçacıkta kısa süreli bir kararlılık söz konusudur ve zamanla aglomere olup çökme eğilimindedir. 30 mV ve üzeri zeta potansiyeli değerlerine sahip nanoparçacıkların yüzey yük yoğunluğunun fazla olmasından dolayı, nanoparçacıkların birbirlerini itme potansiyeli artmaktadır, bu sayede parçacıkların birbirlerine yaklaşması engellenerek aglomerasyona engel olmaktadır (Clogston ve Patri, 2011; Honary ve Zahir, 2013). Bulunan zeta potansiyeli değerleri sınır değerlere yakın olmakla birlikte, her iki örneğin yüzey yükleri nanoparçacıklara yeterli elektrostatik kararlılık sağlayarak sulu çözeltide haftalarca çökmeden kalabilmesini sağlamıştır.

4.3.5. Nanoparçacıkların TGA analizleri

FeO-PG2 nanoparçacık süspansiyonunun termal bozunma davranışı TGA ölçümü ile incelenmiştir (Şekil 30).



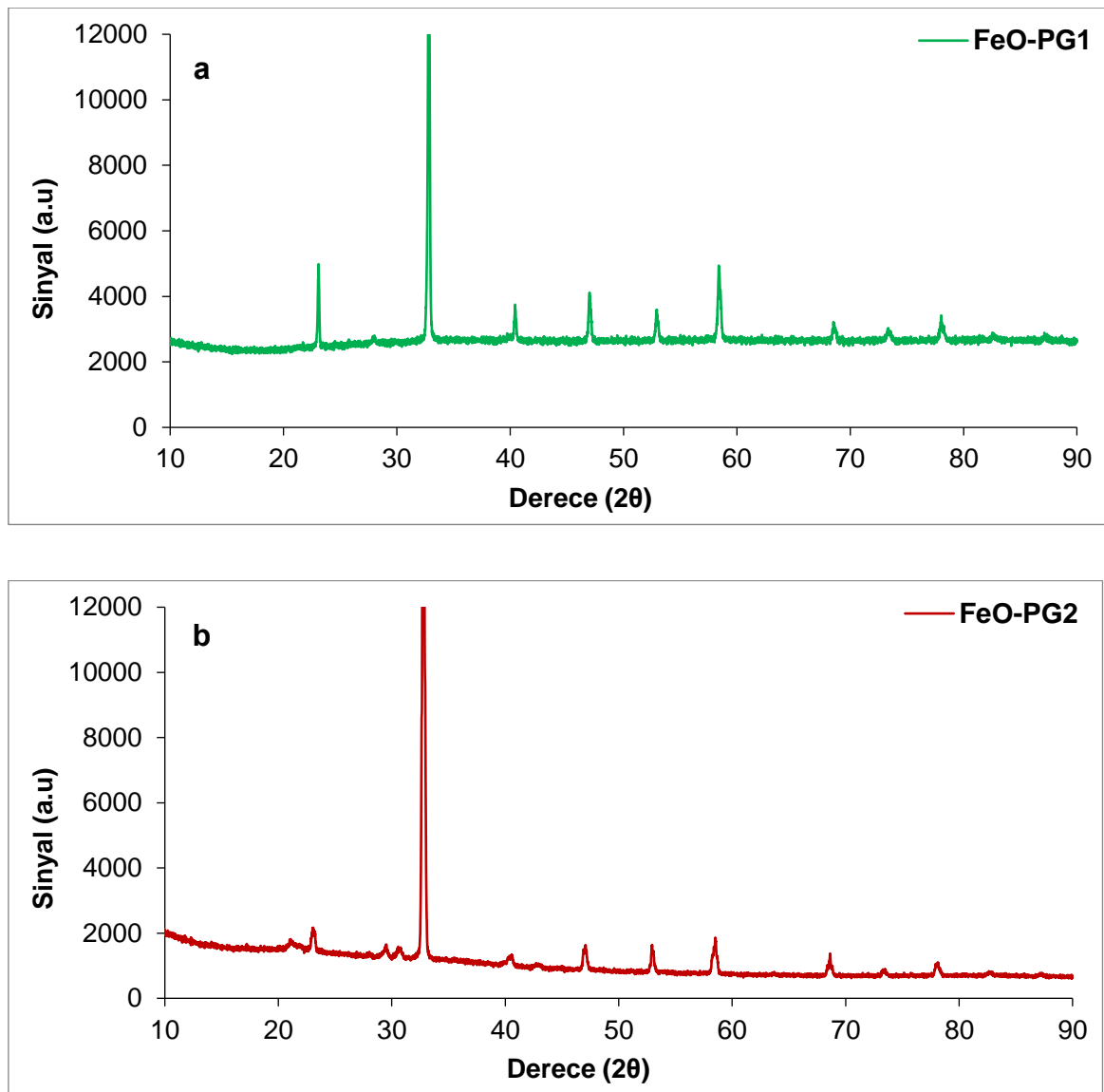
Şekil 30. FeO-PG2 nanoparçacığının TGA grafiği.

TGA ölçümünden elde edilen kütle kaybı-sıcaklık grafiğinden FeO-PG2 süspansiyonunun belirlenen sıcaklık aralığında %77,5 kütle kaybına uğradığı sonucuna

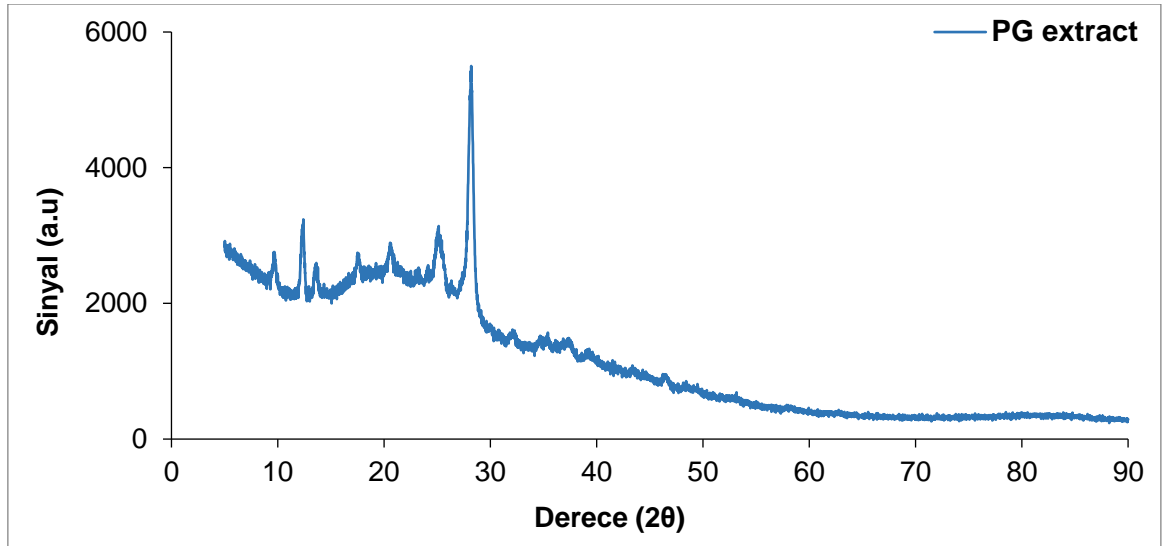
ulaşılmıştır. Bu sonuç, nanoparçacık süspansiyonunun kütleye %77,5 organik bileşen içerdiği anlamına gelmektedir. Bu yüksek bileşen içeriği, organik bileşenlerin yarattığı manyetikçe ölü alana sebep olabilmektedir (Wu ve ark., 2021; Unni ve ark., 2017).

4.3.6. Nanoparçacıkların XRD analizleri

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin kristal yapısını incelemek için XRD spektrumları elde edilmiştir (Şekil 31 a, b). Aynı zamanda PG ekstraktının da XRD spktrumunu elde edilerek, ekstrakt kaynaklı olası piklerin varlığı sorgulanmıştır (Şekil 32).



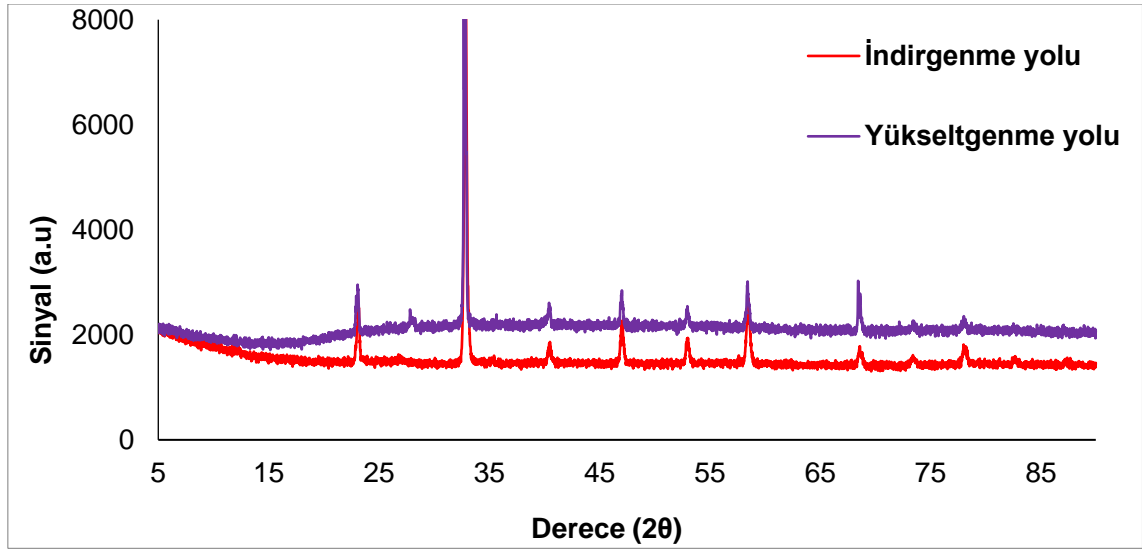
Şekil 31. a. FeO-PG1 ve b. FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.



Şekil 32. PG ekstrakt örneğinin XRD deseni.

FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarının XRD spektrumlarındaki keskin piklerin oluşan demir oksitlerin kristalinitesinin yüksek olduğunu ve tüm keskin piklerin birbiri ile çakıştığı görülmektedir (Şekil 31 a, b). Bununla birlikte PG ekstraktına ait keskin piklerin çakışmadığı Şekil 32.' de gösterilmiştir. FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarının elde edilen kırınım deseni sonucuna göre, ICSD: 161785 numaralı karttaki açı değerleri $2\theta = 32.8^\circ$ (122), 47.1° (124), 52.9° (051), 58.5° (312); ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 237290 numaralı karttaki açı değeri $2\theta = 23.14^\circ$ (112); β -Fe₂O₃ kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 195710 numaralı karttaki açı değeri $2\theta = 68.6^\circ$ (244); Fe₃O₄ kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 108905 numaralı karttaki açı değeri $2\theta = 40.22^\circ$ (114); Fe₂O₃ kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 37156 numaralı karttaki açı değeri $2\theta = 78.11^\circ$ (503); goetit kristal yapısına karşın gelmektedir.

Her iki nanoparçacık örneği için elde edilen kırınım desenlerine göre, karışık demir oksit formlarının oluştuğu görülmüştür. XRD spektrumunda görülen en keskin pik olan $2\theta = 32.8^\circ$ (122) piki; nanoparçacıkların çoğunlukla ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısından oluştuğunu göstermektedir. ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısına ait olduğu düşünülen $2\theta = 32.8^\circ$ pikinin ekstraktan kaynaklanmadığı, ekstrakta ait XRD spektrumunda gösterilmiştir (Şekil 32). Bitki içeriğinin demiri oksitleme ve indirgeme kapasitesinin farklı faz oluşumlarına etkisinin incelenmesi amaçlı; sentezler sadece Fe³⁺ (indirgenme yolu) ve sadece Fe²⁺ (yükseltgenme yolu) varlığında tekrarlanmıştır ve elde edilen nanoparçacıkların XRD spektrumları alınmıştır (Şekil 33 a, b).

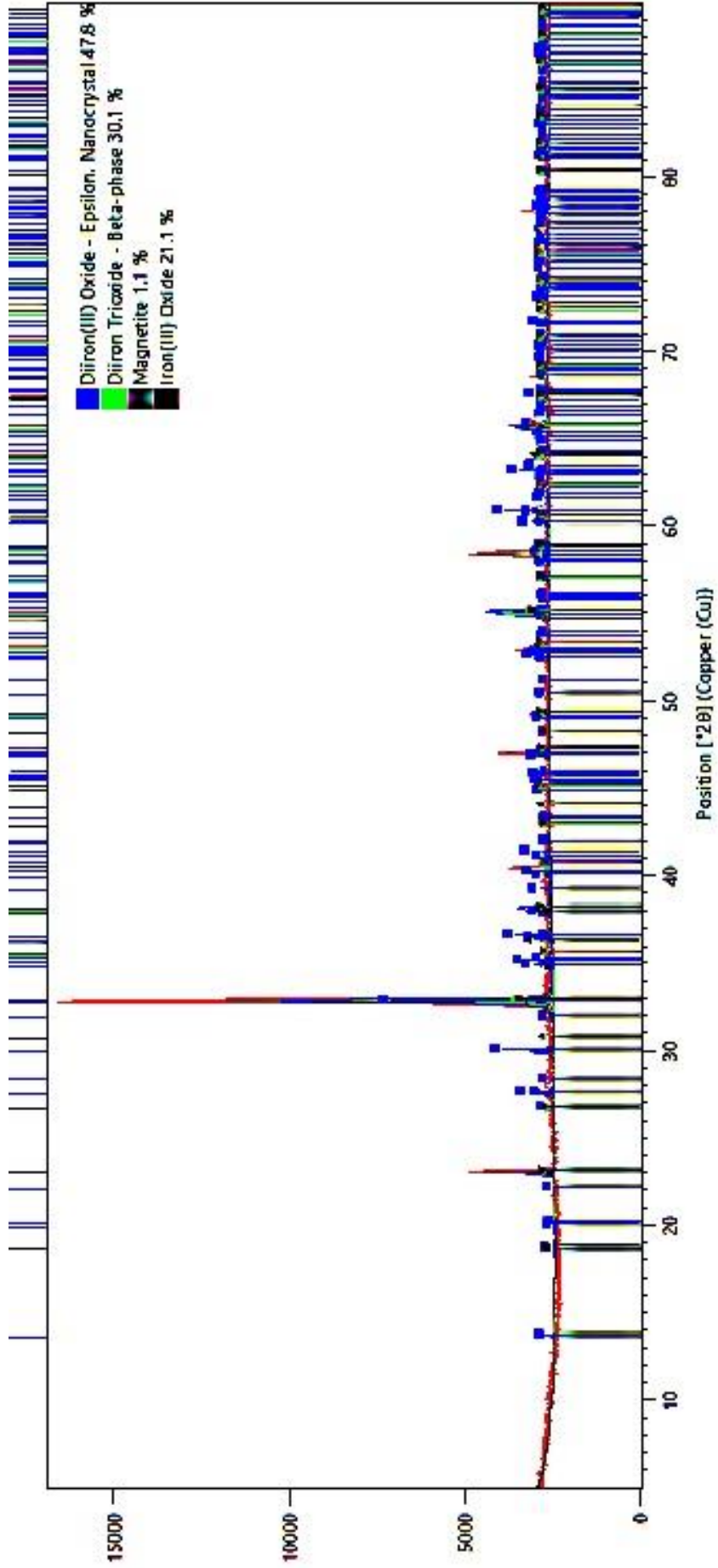


Şekil 33. a. İndirgenme yoluyla ve b. Yükseltgenme yoluyla, elde edilen nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.

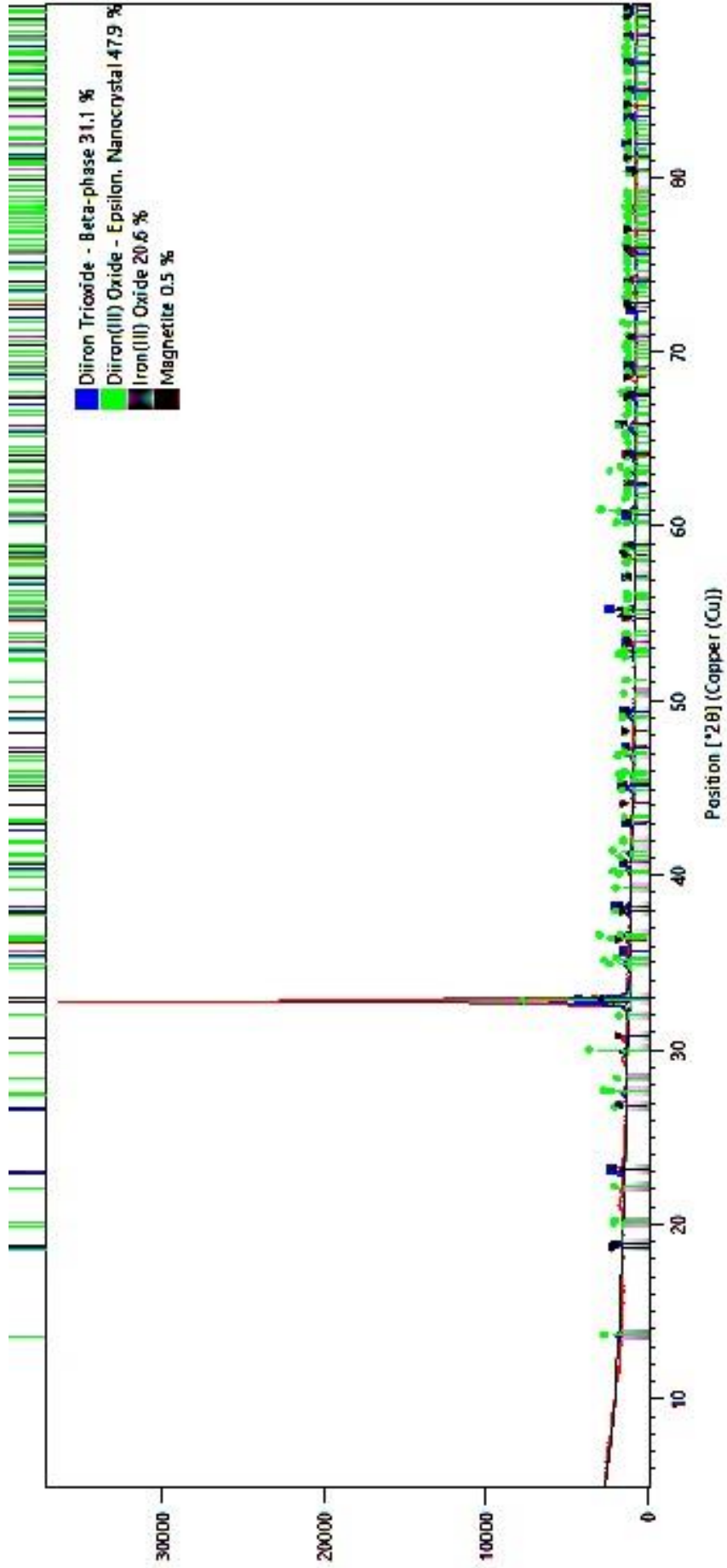
Şekil 32. a, b' de gözlenen yansımalar, ICSD: 0161785 numaralı karttaki açılma değerleri $2\theta = 32.8^\circ$ (122), 47.1° (124), 52.9° (051), 58.5° (312), 78.1° (350); ϵ - Fe_2O_3 kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 108905 numaralı karttaki açılma değeri $2\theta = 40.22^\circ$ (114); Fe_2O_3 kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 159962 numaralı kartındaki açılma değeri $2\theta = 68.7^\circ$ (013); goetit kristal yapısına karşın gelmektedir. ICSD: 237290 numaralı karttaki açılma değeri $2\theta = 23.14^\circ$ (112); β - Fe_2O_3 kristal yapısına karşın gelmektedir.

Sonuçlara göre, FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarının sentezinden elde edilen nanoparçacıklar ile aynı şekilde sadece Fe^{3+} ve sadece Fe^{2+} varlığında yapılan sentezlerde de farklı oksit formlarının oluşumu söz konusudur. Farklı oksit formlarının oluşmasının sebebinin, bitkinin kendisinin indirgeme ve yükseltgeme potansiyelinden kaynaklanması ve deney parametrelerinin kontrol edilse bile demirin ekstrakt ortamında kendiliğinden oksitlenme ve indirgenme reaksiyonlarının önüne geçilememesinden ve dolayısıyla oluşacak oksit formlarının kontrol edilememesi olduğu düşünülmektedir.

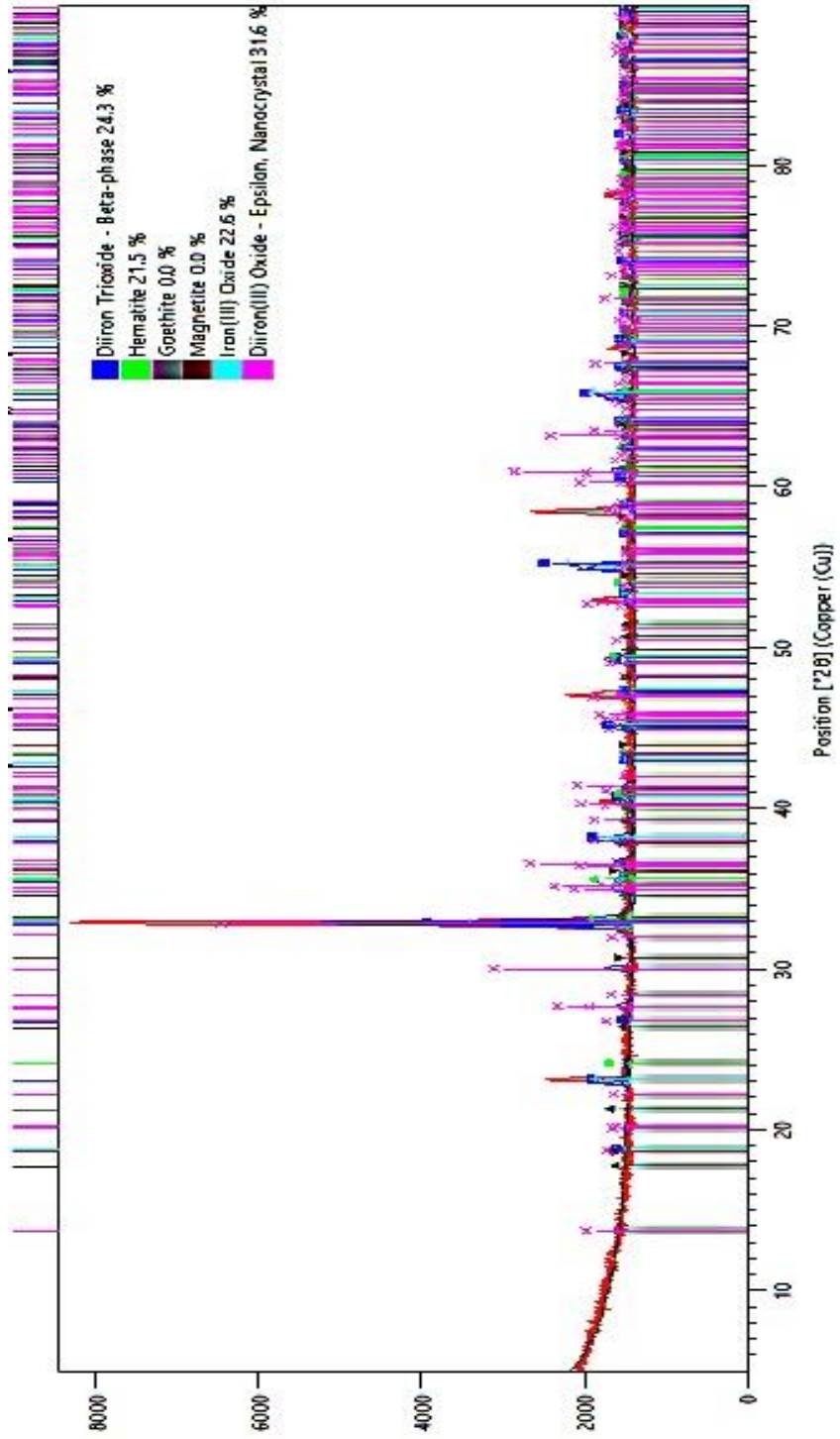
Sonuç olarak, PG ekstraktı kullanılarak, çok küçük ve homojen boyutlarda ve aylarca kararlı kalabilen demir oksit nanoparçacıkları elde edilebilirken, manyetik özelliği yüksek saf manyetik/maghemit demir oksit nanoparçacıkları yerine çoğunlukla ϵ - Fe_2O_3 olmakla birlikte, karışık demir oksit türleri olduğu görülmüştür. XRD sonuçlarının Rietveld analizi ile oksit türlerinin % bileşimleri de hesaplanmıştır. Sırasıyla FeO-PG1 ve FeO-PG2, indirgenme ve yükseltgenme yoluyla yapılan sentezlerden elde edilen nanoparçacıkların XRD spektrumlarının Rietveld analizleri Şekil 34-37.' da verilmiştir.



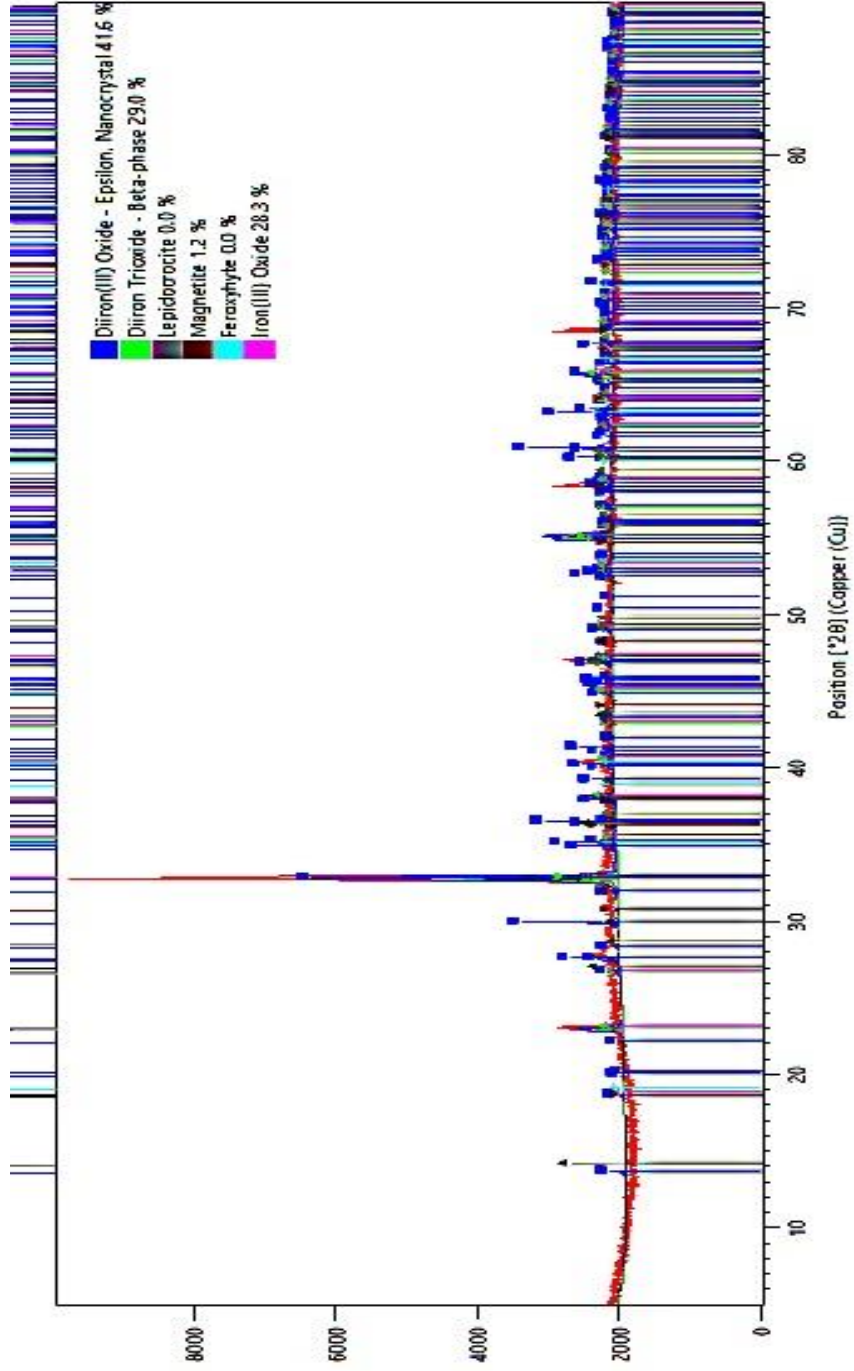
Şekil 34. FeO-PG1 nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).



Şekil 35. FeO-PG2 nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).



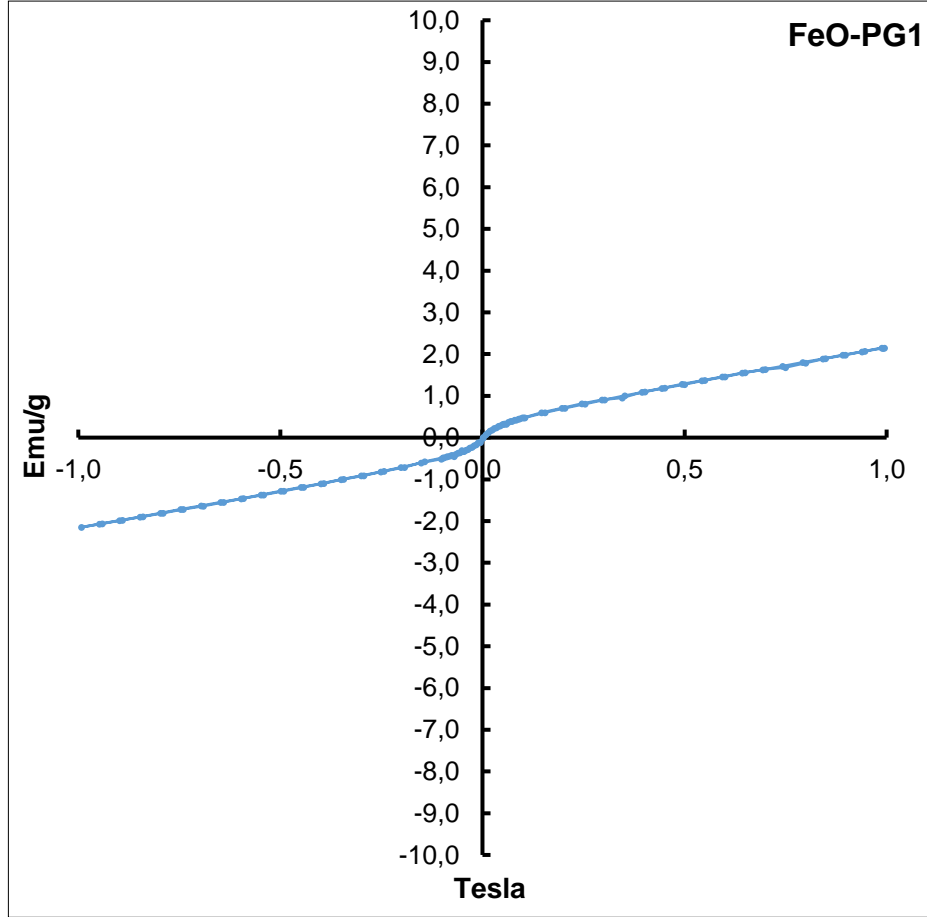
Şekil 36. Sadece Fe³⁺ iyonu ile sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).



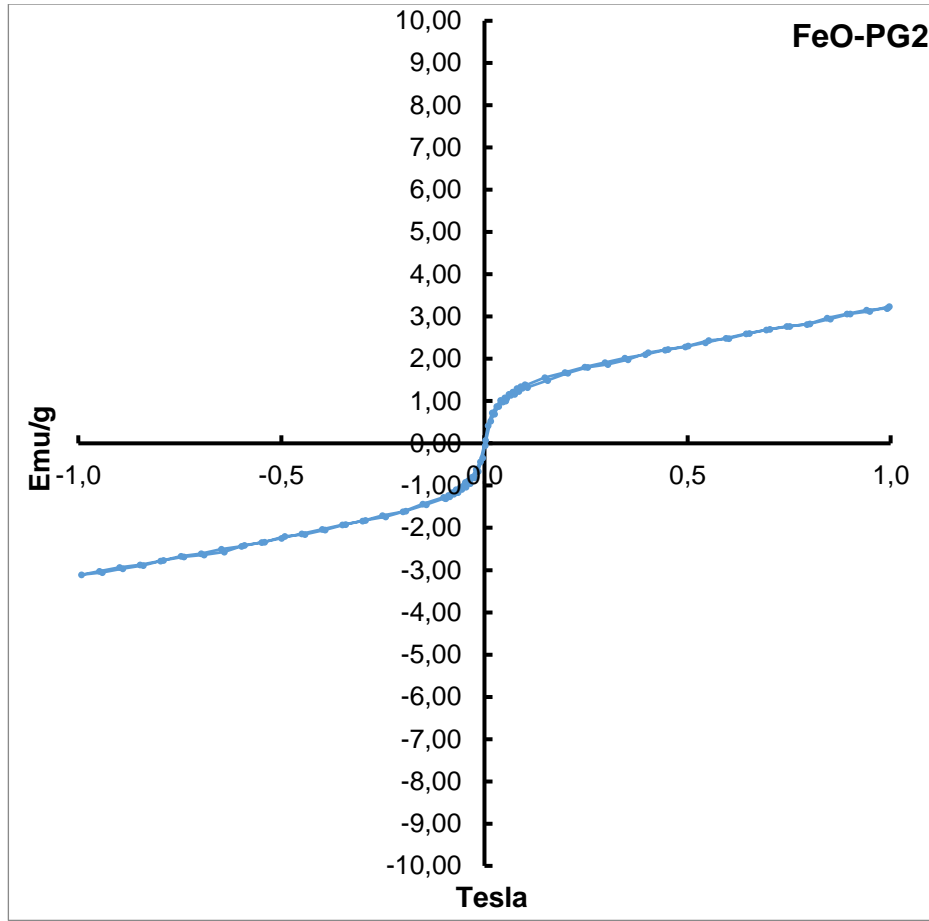
Şekil 37. Sadece Fe²⁺ iyonu ile sentezlenen nanoparçacık örneğinin XRD deseni (Rietveld analizi).

4.3.7. Nanoparçacıkların VSM analizleri

Şekil 38. ve 39. FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacık örneklerinin oda sıcaklığında ve ± 1 Tesla manyetik alan şiddetindeki VSM sonuçlarını göstermektedir.



Şekil 38. FeO-PG1 nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M-H) döngüsü.



Şekil 39. FeO-PG2 nanoparçacıkların manyetizasyon-histerezis (M-H) döngüsü.

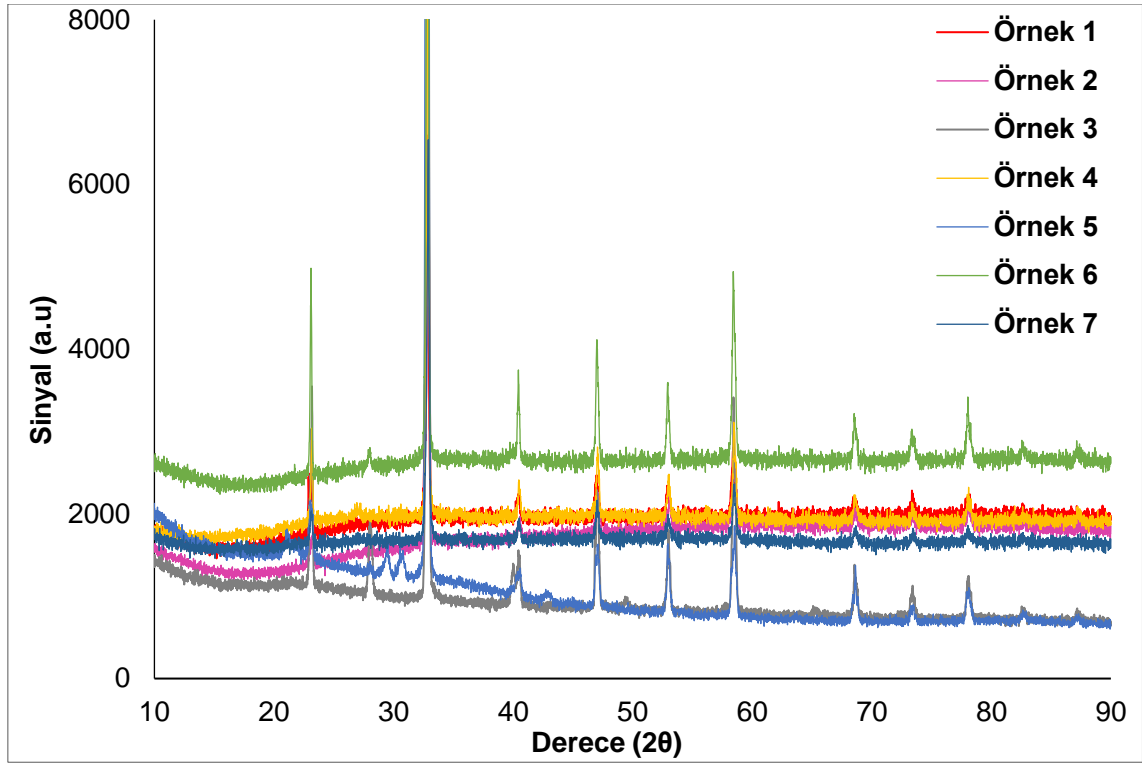
FeO-PG1 ve FeO-PG2 nanoparçacıklarına ait manyetik histerezis grafiklerine göre her iki şekilde gösterilen döngüden, doyma manyetizasyon değeri (M_s) sırasıyla 2.15 ve 3.24 emu/g olarak bulunmuştur.

Bitki ekstraktındaki aktif grupların surfaktant görevi görerek manyetikçe aktif çekirdeklerin etrafını sarmaları nedeniyle manyetikçe ölü alanlar oluşmaktadır (Wu ve ark., 2021; Unni ve ark., 2017). Manyetikçe ölü alanların yüzdesi yani bitki içeriği %77,5 olarak TGA analizi ile belirlenmiştir (Şekil 30). Ayrıca nanoparçacıkların çok küçük boyutta olmaları (<10 nm) nedeniyle manyetik yanıtları oda sıcaklığında ve ± 1 Tesla manyetik alan altında düşük olması ayrıca beklenen bir sonuçtur (Etemadifar ve ark., 2018). Bunların yanısıra, manyetik özelliğinin düşük olmasının en büyük etkenlerinden manyetik demir oksit ($Fe_3O_4/\gamma-Fe_2O_3$) nanoparçacık oluşumu yerine, karma oksit formlarında demir oksit ($\epsilon-Fe_2O_3$, $\alpha-Fe_2O_3$) nanoparçacıklarının oluşmasıdır (Baltacı, 2010; Suturin ve ark., 2018). Bu sonuç örneklerin XRD spektrumu ile gösterilmiştir. Elde edilen çok küçük FeO nanoparçacıklarının hedef bölgeye kolaylıkla ulaşabilecek ve kanser hücrelerine spesifik bir nano-ilaç olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda, karma demir oksit formlarının önüne geçmek ve manyetik özelliğinin artırılması amacıyla demir oksit nanoparçacıklarının sentez parametreleri değiştirilerek tekrar sentezleri yapılmıştır ve elde edilen nanoparçacıkların manyetik yanıtına ilişkin ilk değerlendirmeleri harici bir neobidyum magnet (1.2 T) kullanılarak yapılmıştır. Tüm yapılan sentezlere ilişkin parametreler ve yanıtlar gözlem olarak Tablo 4.'de verilmiştir. Sentez parametreleri arasında, demir iyonları derişimi, ekstrakt derişimi, bileşenlerin eklenme sırası, reaksiyon başlangıç pH'sı, reaksiyon pH'sı, reaksiyon süresi, sıcaklık bulunmaktadır. Ayrıca tüm çözeltiler en az 30 dakika N₂ gazı altında tutularak reaksiyon balonuna eklenmiş ve reaksiyon süresince de sürekli olarak N₂ gazı geçirilerek, oksijensiz ortam sağlanmaya çalışılmıştır. Reaksiyon sonunda nanoparçacık süspansiyonlarının hava ile teması kesilmiştir. Tüm sentezlenen nanoparçacıkların içinden dış manyetik alana hissedilir bir çekim gösteren örneklerin (Örnek 1-7) XRD spektrumları elde edilmiştir (Şekil 40). Bu örnekler Tablo 5.' de özetlenmiştir.

Tablo 5. FeO nanoparçacık sentezinde kullanılan reaksiyon parametreleri.

Sentez Metodu	Sıcaklık	Reaksiyon		Gözlem			Seçilen Örnekler
		pH	Süresi	Renk	Aglomere	Manyetiklik	
FeO-PG2	60 °C	8-9	30 dakika	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 1
FeO-PG2	Oda Sıc.	8-9	2 saat	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 2
FeO-PG2	60 °C	10-11	30 dakika	Koyu Kahve	Yok	Hissedilir	Örnek 3
FeO-PG2	85 °C	10-11	30 dakika	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 4
FeO-PG2	Oda Sıc.	10-11	2 saat	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 5
FeO-PG2	Oda Sıc.	10-11	2 saat	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 6
FeO-PG2	85 °C	8-9	30 dakika	Siyah	Var	Hissedilir	Örnek 7

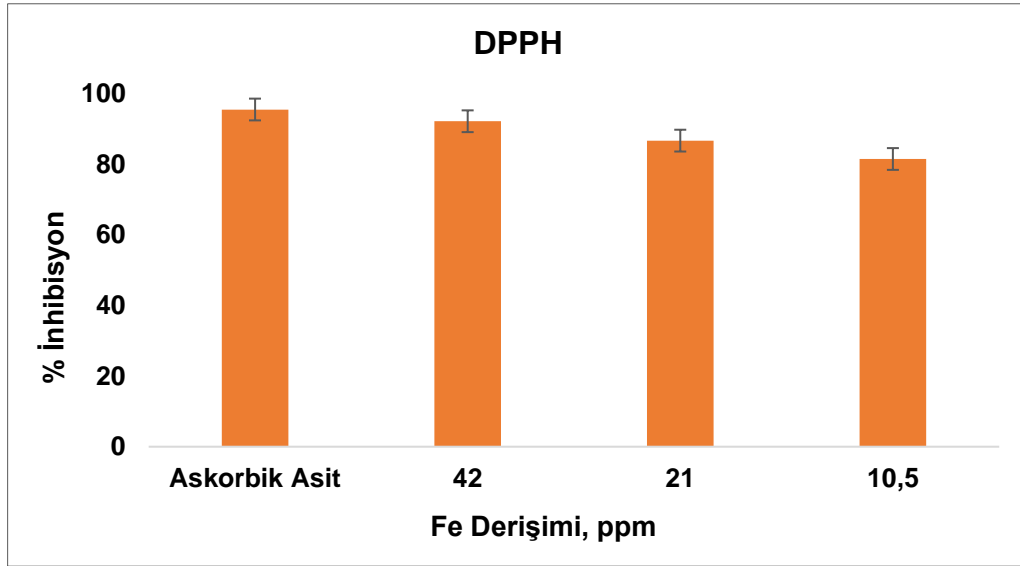


Şekil 40. 'a. Örnek 1 ve b. Örnek 2 c. Örnek 3 d. Örnek 4 e. Örnek 5 f. Örnek 6 g. Örnek 7' nanoparçacık örneklerinin XRD deseni.

Şekil 40.'ta verilen tüm örneklere ait XRD spektrumlarının analizinde en keskin pik; $2\theta = 32.8^\circ$ (122) olarak görülmüştür (ICSD: 0161785). Bu spektrumlar sentezlenen nanoparçacıkların çoğunlukla ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısından oluştuğunu göstermektedir. Reaksiyon parametrelerinin karma kristal formların oluşumunu engellemediği görülmüştür. Reaksiyon koşulları değişse de PG ekstraktı ile yapılan sentezlerde ϵ -Fe₂O₃ nanoparçacığı elde edilmektedir.

4.4. Antioksidan Aktivitesi Tayini

Punica granatum ile sentezlenen demir oksit nanoparçacığının antioksidan aktivitesi DPPH yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Sonuçlar, Şekil 41.'de % inhibisyon olarak verilmiştir. Sentetik antioksidan olan askorbik asit kontrol olarak kullanılmış ve % inhibisyon değerleri bulunmuştur. Nanoparçacıkların antioksidan aktiviteleri askorbik asitin aktivitesi ile karşılaştırılmıştır.



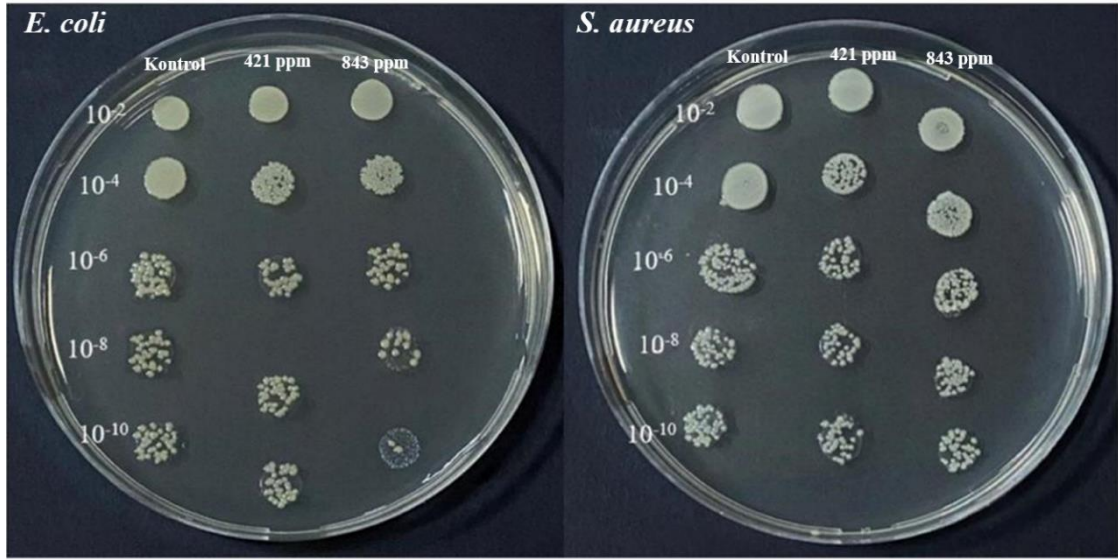
Şekil 41. 42 ppm'den başlayan farklı derişimlerde FeO nanoparçacıkları ile kontrol olarak kullanılan askorbik asitin gösterdiği % inhibisyon değerleri (n=3).

Veriler ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Kontrol hücrelerine göre muamele görmüş hücrelerin sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı student t-testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

FeO nanoparçacıklarının 42, 21 ve 10.5 ppm derişimlerindeki % inhibisyon değerleri sırasıyla %92.26, % 86.76 ve %81.56 olarak hesaplanmıştır. Kontrol olarak kullanılan 50 ppm askorbik asitin inhibisyon değeri ise %95.58 olarak hesaplanmıştır. Bu deney koşullarında nanoparçacığın derişim artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinde artış olduğu ve askorbik asitin maksimum inhibisyon değerine yaklaştığı görülmüştür.

4.5. Antimikrobiyal Aktivite Çalışmaları

FeO nanoparçacıklarının antibakteriyel etkinliğini araştırmak için koloni sayma yöntemi uygulanmıştır ve 421 ppm ve 843 ppm derişimindeki nanoparçacıklarının 24. saatte *E. coli* ve *S. aureus* bakterileri üzerindeki inibe edici etkileri incelenmiştir (Şekil 42). *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} ve 10^{-10} seyreltmeleri ile uygulama yapılmıştır.



Şekil 42. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin oluşturduğu koloniler.

Şekil 42.'de 2 farklı derişimde (843 ppm ve 421 ppm) FeO nanoparçacıkları ile muamele edilmiş farklı seyrelme oranlarındaki (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} ve 10^{-10} , $\times 10^{12}$ Cfu/ml) *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin oluşturduğu koloniler gösterilmiştir.

E. coli'de 421 ppm ve 843 ppm FeO nanoparçacık uygulaması ile 24. saatte koloni sayısında kayda değer bir azalma görülmüştür. Özellikle 843ppm FeO nanoparçacıklarının *E. coli* için antibakteriyel olduğunu sonucuna varılmıştır. Her iki derişimdeki FeO nanoparçacıklarının *S. aureus* koloni oluşumunda azalmaya neden olduğu ancak FeO nanoparçacıklarının *S. aureus*'a karşı tamamen etkili bir bakterisit olmadığı görülmüştür (Şekil 42, Tablo 6).

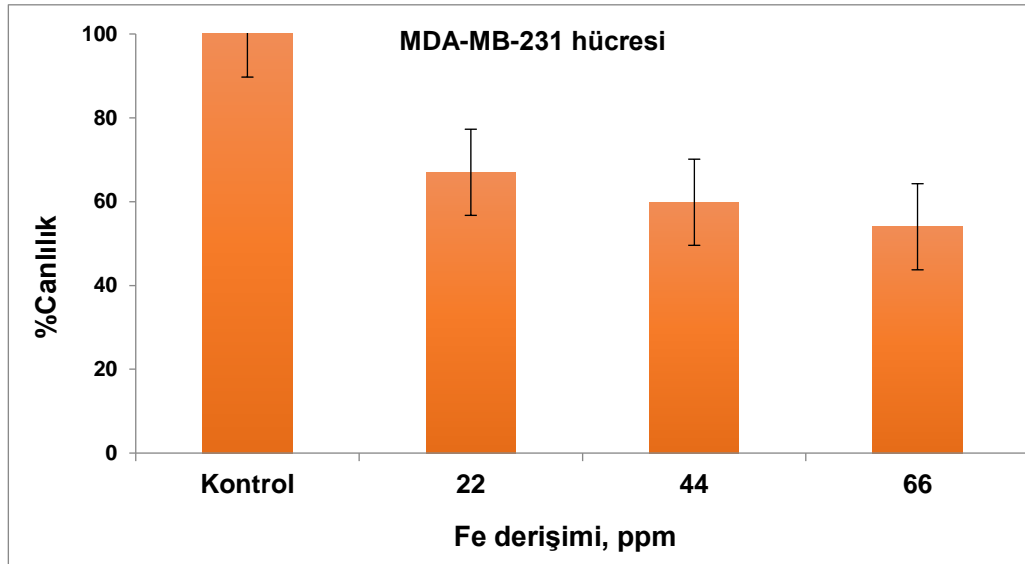
Tablo 6. *E. coli* ve *S. aureus* bakterilerinin oluşturduğu koloni sayısı.

Seyreltme Faktörü ($\times 10^{12}$ Cfu/ml)	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>		
	Kontrol	421 ppm	843 ppm	Kontrol	421 ppm	843 ppm
10^{-2}	+	+	+	+	+	+
10^{-4}	+	48	60	+	66	+
10^{-6}	42	33	30	67	38	60
10^{-8}	38	28	11	35	29	38
10^{-10}	30	27	2	34	28	34

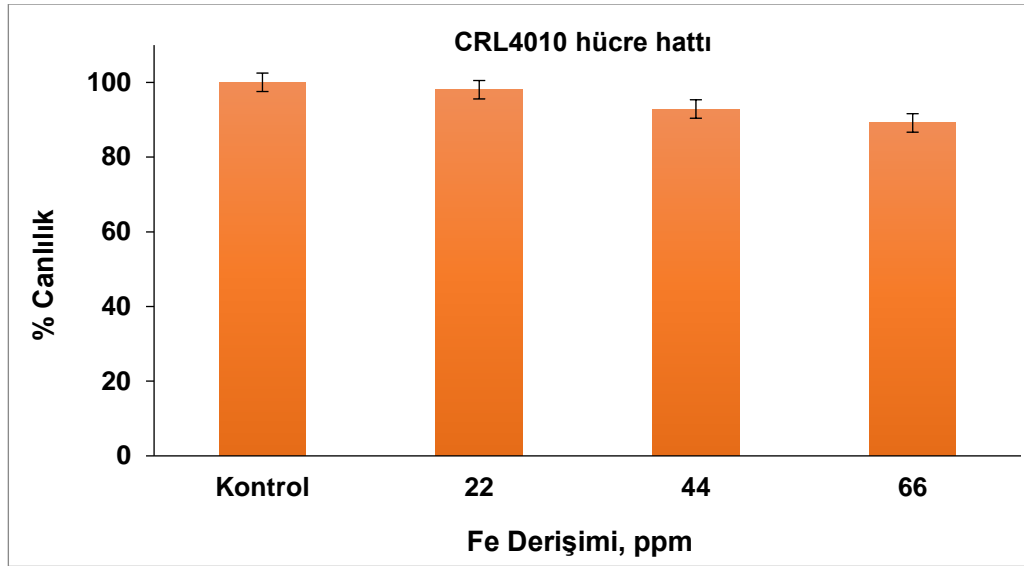
4.6. Sitotoksosite Testleri

Modifiye edilerek iki farklı yolla sentezi yapılmış demir oksit nanoparçacıklarının benzer manyetik özellikleri, biraz farklı boyut ve yüzey yükü analizleri sonuçlarından yola çıkılarak, *in vitro* deneylere FeO-PG2 nanoparçacık örneği ile devam edilmiştir. FeO-PG2 nanoparçacıklarının biraz daha dar homojen boyut dağılımı ve küçük boyutta oldukları TEM görüntülerinden ve boyut analizinden görülmüştür, yüzey yükünün yine biraz daha fazla olduğu zeta potansiyel ölçümü ile görülmüştür. Tezin bu kısmından sonra FeO-PG2 nanoparçacıkları; FeO nanoparçacık olarak adlandırılmıştır.

MDA-MB-231 kanser ve CRL-4010 sağlıklı hücre hatları 3 farklı dozda (22 ppm, 44ppm, 66 ppm) FeO nanoparçacık ile 24 saat muamele edilmiştir. Nanoparçacıkların hücre canlılığına etkileri MTT testi ile belirlenmiştir. Doz ve zamana bağlı olarak sitotoksosite grafikleri elde edilmiştir. Nanoparçacık ile muamele edilmemiş hücreler kontrol deney grubu olarak adlandırılmıştır ve elde edilen derişim ve zamana bağlı hücre canlılık profillerinden IC₅₀ değerleri (hücre büyümesinin %50' sini inhibe etmek için gerekli derişim) elde edilmiştir (Şekil 43-44).



Şekil 43. 3 farklı derişimdeki (22 ppm, 44 ppm ve 66 ppm) FeO nanoparçacık ile 24 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).



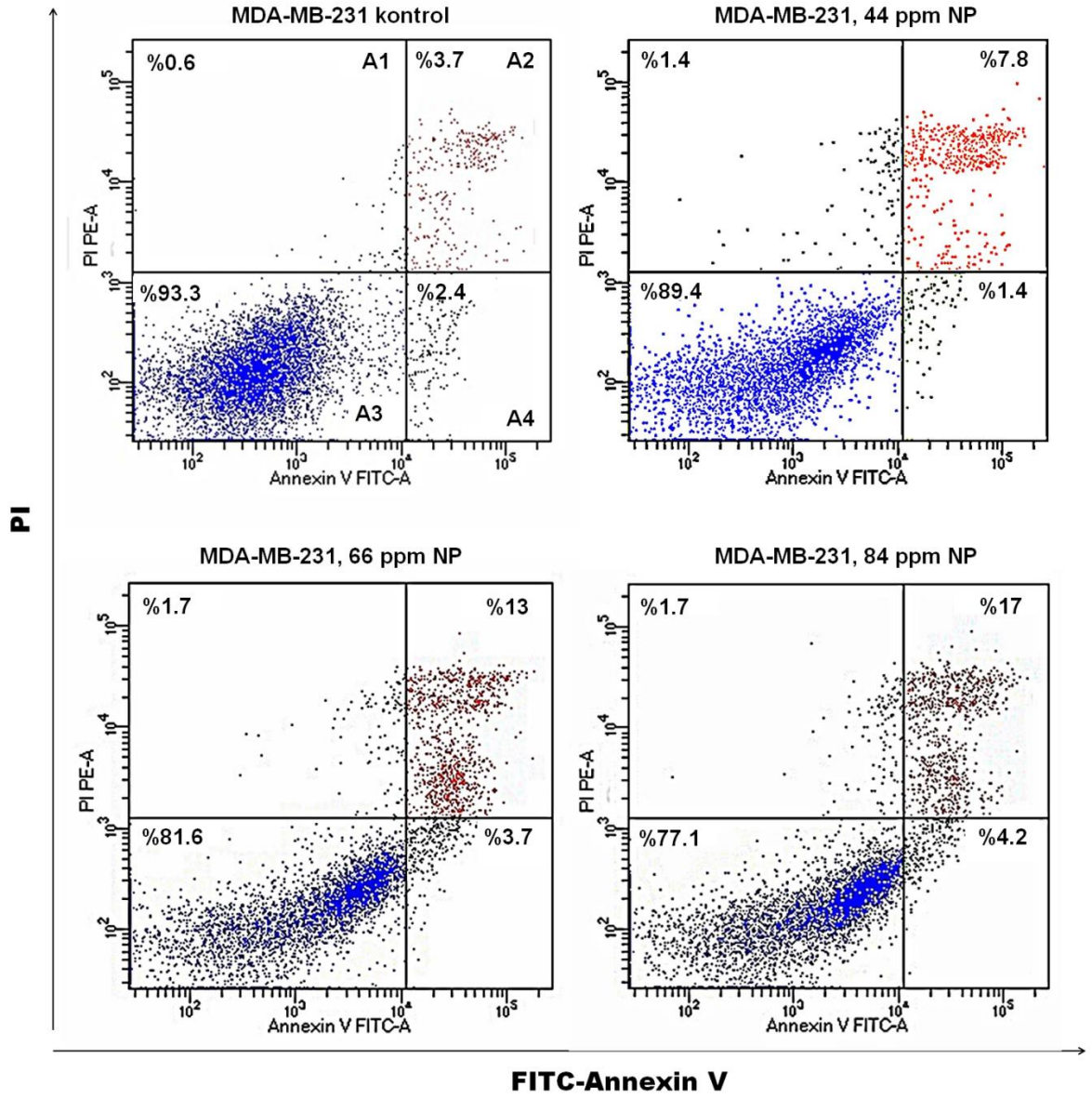
Şekil 44. 3 farklı derişimdeki (22 ppm, 44 ppm, 66 ppm) FeO nanoparçacık ile 24 saat inkübe edilmiş CRL-4010 hücrelerine ait toksisite grafiği (n=3).

Veriler ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Kontrol hücrelerine göre muamele görmüş hücrelerin sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı student t-testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

FeO nanoparçacıkları MDA-MB-231 hücreleri üzerinde CRL-4010 hücrelerine kıyasla daha fazla toksik etki göstermiştir (Şekil 43-44). 66 ppm FeO nanoparçacık ile 24 saat inkübe edilmiş MDA-MB-231 hücrelerinin hücre canlılığı %54.0' a düşmüştür, bu değer CRL-4010 hücreleri için %89.15' dir. MDA-MB-231 kanser hücreleri için IC_{50} değeri 66 ppm olarak kabul edilerek, sonraki deneyler bu derişim dikkate alınarak planlanmıştır.

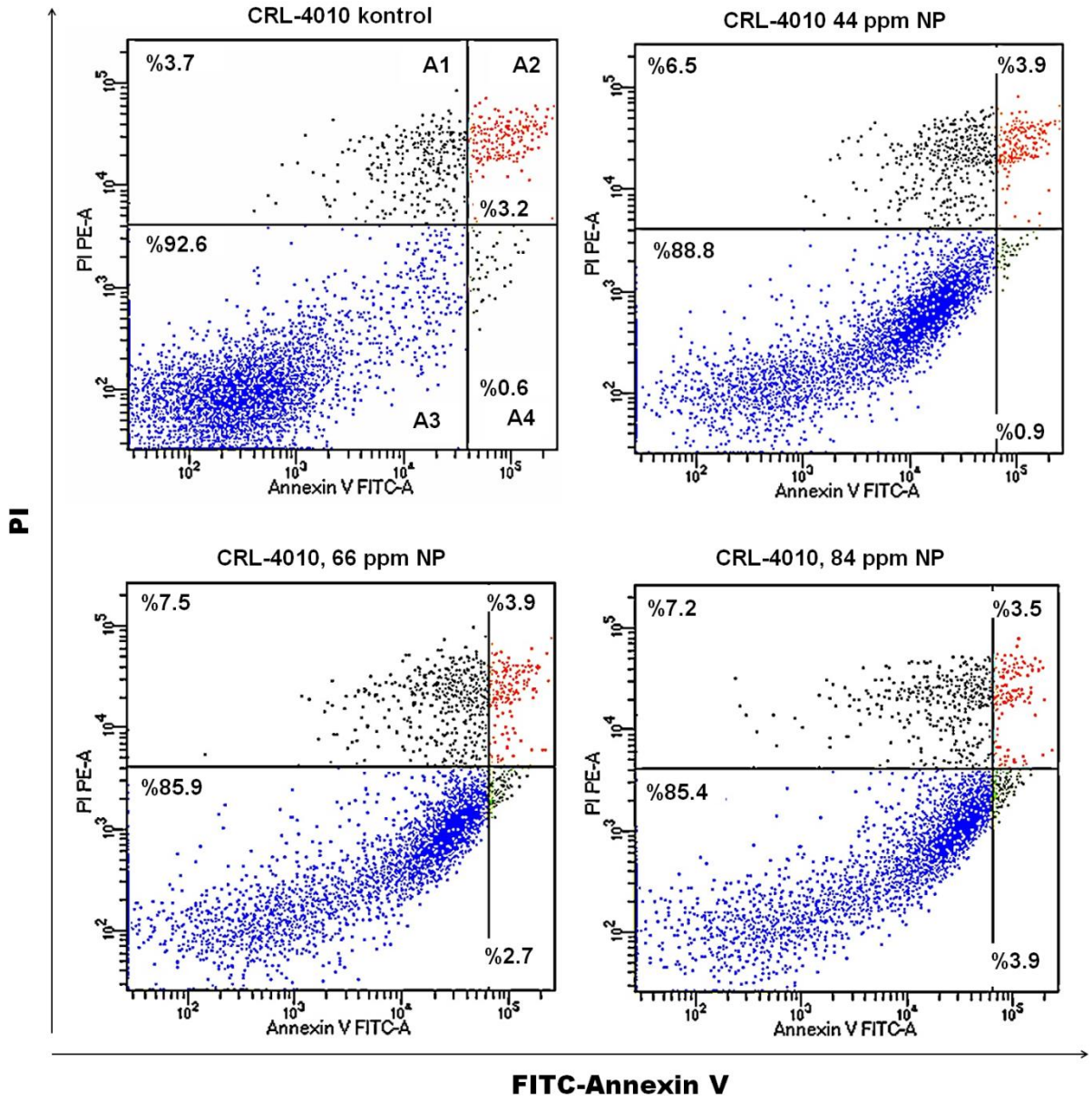
4.7. Anneksin-V Apoptoz Analizi (Flow Sitometre Analizi)

Apoptoza karşı direnç, kanser gelişiminde önemli bir faktördür. Apoptozun tetiklenmesini hedefleyen yeni tedavi stratejileri çeşitli kanser tiplerinde kullanılabilir. Bu yüzden, hücre ölümünün apoptoz yoluyla olup olmadığını anlayabilmek için, FeO nanoparçacıkları ile inkübe edilmiş kanserli ve normal hücrelerde Annexin-V ve PI kimyasalları ile çift boyama yapılmıştır. Her iki hücre hattı, IC_{50} derişimindeki; 66 ppm ve bir alt ve üst derişim olarak; 44 ppm ve 84 ppm derişimindeki nanoparçacıklar ile 24 saat muamele edilmiştir. Sonuçlar histogramlar şeklinde Şekil 45. ve 46.' da verilmiştir.



Şekil 45. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacıkları ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hatları ve kontrol grubu için akım sitometrisi ölçümü analizi sonuçları.

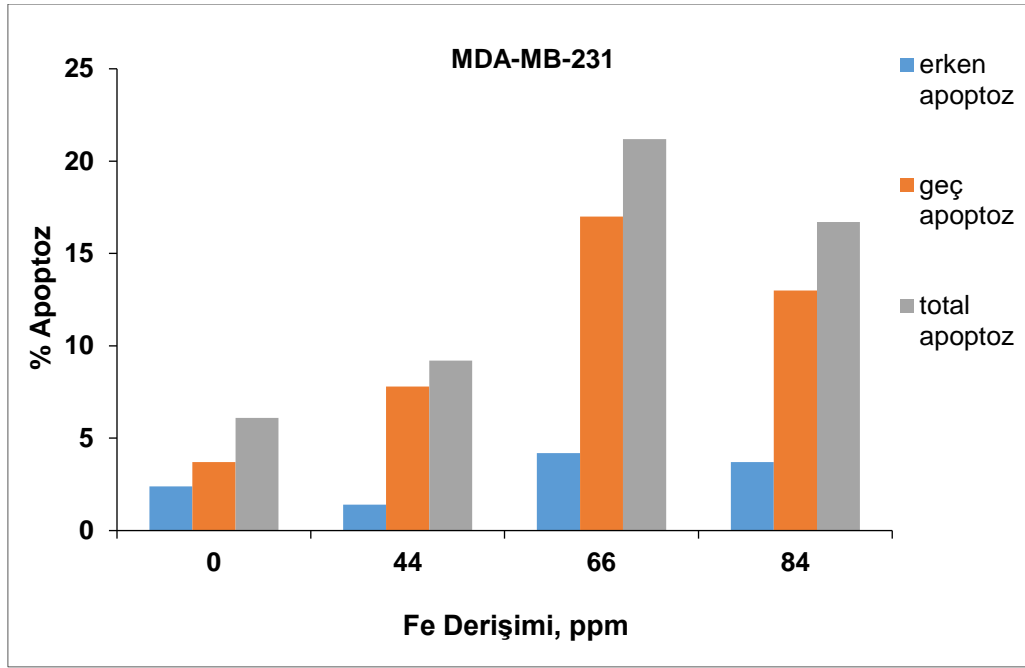
Şekil 45.'te A1 ve A3; ölü (nekrotik) ve canlı hücre popülasyonunu göstermektedir, A2 ve A4; geç ve erken apoptotik hücre popülasyonunu göstermektedir.



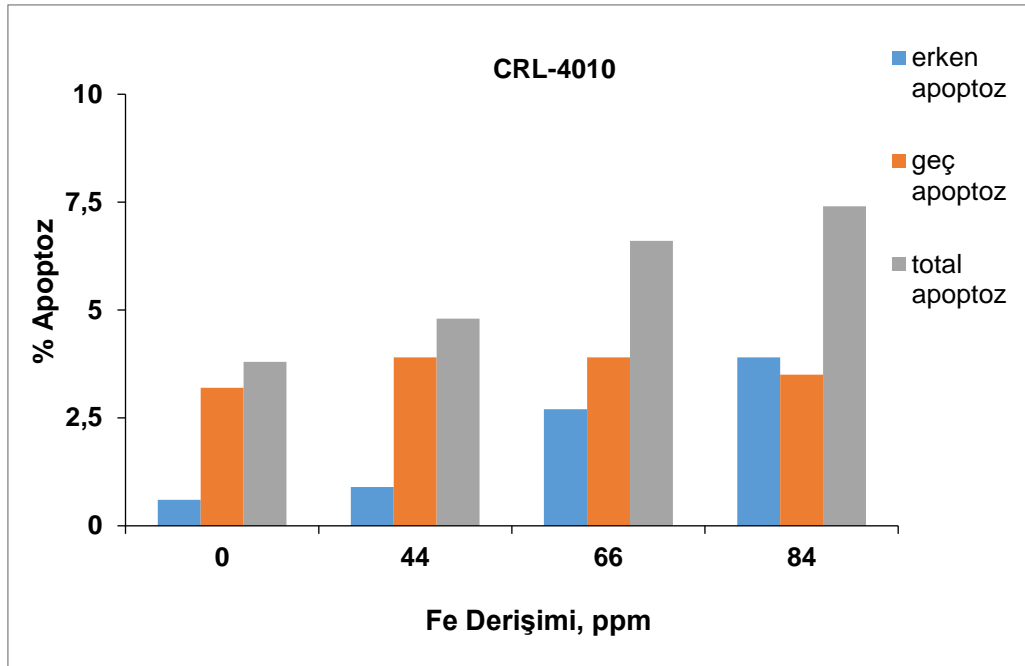
Şekil 46. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücre hatları ve kontrol grubu için akış sitometresi ölçümü analizi sonuçları.

Şekil 46.'da A1 ve A3; ölü (nekrotik) ve canlı hücre popülasyonunu göstermektedir, A2 ve A4; geç ve erken apoptotik hücre popülasyonunu göstermektedir.

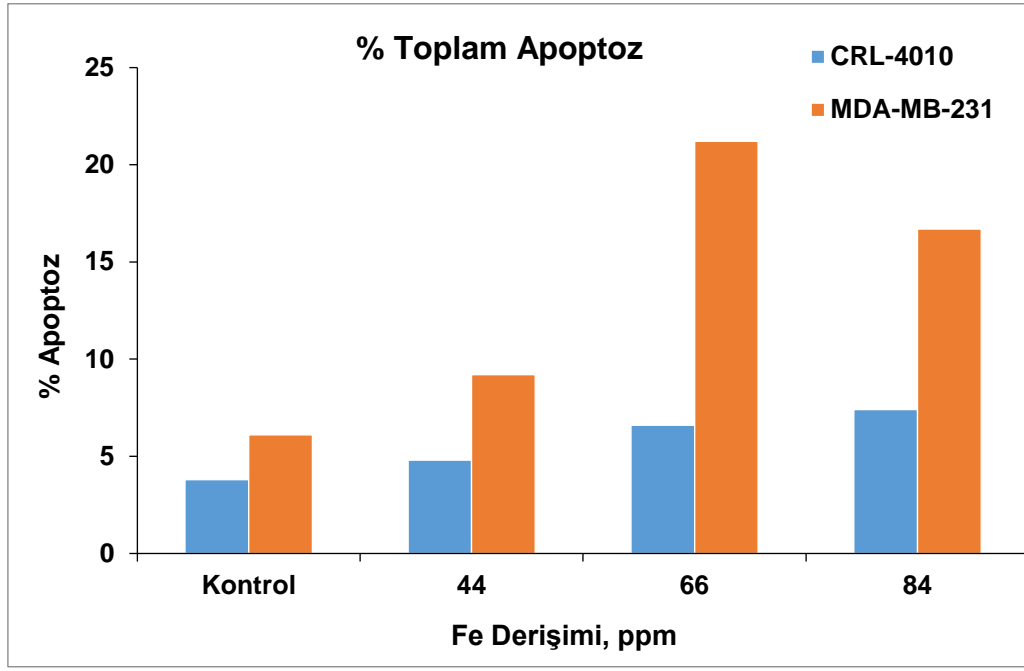
Şekil 45. ve 46.'daki histogram verilerinden, FeO nanoparçacıklar ile muamele edilen MDA-MB-231 VE CRL-4010 hücrelerinde ve kontrol gruplarında ortaya çıkan erken ve geç apoptoz ve toplam apoptoz yüzdeleri dikkate alınarak Fe derişimine karşı apoptotik hücre popülasyonları elde edilmiştir (Şekil 47-48).



Şekil 47. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 hücre hatlarının 24. saat % apoptoz grafiği.



Şekil 48. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş CRL-4010 hücre hatlarının 24. saat % apoptoz grafiği.



Şekil 49. Farklı derişimlerde (44, 66, 84 ppm) FeO nanoparçacık ile muamele edilmiş MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarının 24. saat % toplam apoptoz grafiğı (Toplam apoptoz= erken apoptoz + geç apoptoz).

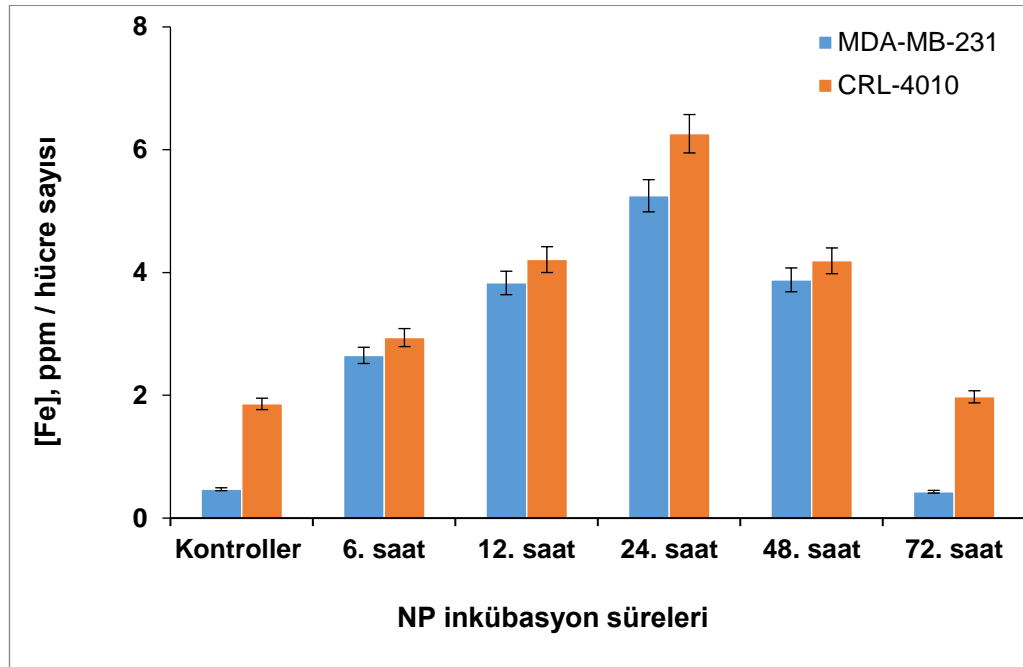
FeO nanoparçacıkları ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hatlarında inkübasyonun 24. saatinde apoptotik hücre popülasyonu, CRL-4010 hücre hatlarına kıyasla daha yüksektir ve her iki hücre tipinde apoptotik hücre popülasyonu nanoparçacık dozuna bağlı olarak artmaktadır (Şekil 49). Bu sonuç ile, FeO nanoparçacıkların yüksek derişimi ve hücrelerde daha uzun maruziyet sürelerinde MDA-MB-231 hücre hatlarında seçici apoptoza neden olacağı ve apoptozu hedefleyen yeni tedavi stratejileri için kullanılabileceğı düşünölmüştür.

Kanser hücrelerinin apoptoza gitme oranının yüksek olması literatürde apoptotik yolak üzerinde etkili olan *BAX/BCL-2* genlerinin ekspresyon seviyesine bakılarak ifade edilmiştir. Jalili ve ark., tarafından yapılan bir çalışmada, hücrelere kolayca girebildiğı için demir nanoparçacıklar (NP) kullanılarak meme kanser hücre hattı olan MCF-7'de sitotoksik etkileri araştırılmıştır. 50 nm boyutuna sahip demir nanopartiküllerin bilinmeyen bir mekanizma yoluyla MCF-7 hücrelerinde apoptozu indüklediğini ve MCF-7'de hücre içi ROS'u arttırdığı gösterilmiştir. Meme kanserinde *BCL-2* geninde ifade düzeyinin tanısal bir biyobelirteç olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, apoptotik gen ekspresyonunu belirlemek için 187.5 ppm demir NP'ler ile tedavi edilen MCF-7 hücrelerinde antiapoptotik *BAX/BCL-2* geninin ekspresyon seviyesine bakılmıştır. MCF-7 hücrelerinde *BAX* geninin ekspresyon seviyesinin değışmediğı bununla birlikte, *BCL-2* geninin

ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. Bu da NP'lerin BAX/BCL-2 oranını apoptoz lehine kaydırarak apoptozu indüklediğini düşündürmektedir (Jalili ve ark., 2016).

4.8. Hücre İçindeki Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kantitatif Tayini

MDA-MB-231 kanser ve CRL-4010 sağlıklı hücreleri IC₅₀ derişiminin altındaki derişimdeki (44 ppm) FeO nanoparçacıkları ile belirli inkübasyon süreleri boyunca (6, 12, 24, 48, 72 saat) muamele edilmiştir. Her iki hücre tipinin hücre içine aldığı nanoparçacık tayini için ICP-MS cihazında demir analizi yapılmıştır, aynı zamanda nanoparçacıklarla muamele edilip yıkama yapılan hücrelerin sayımı da yapılmıştır. Sonuçlar, Şekil 50.'de hücre başına Fe (ppm) oranı (Fe (ppm)/hücre) olarak verilmiştir.



Şekil 50. 44 ppm FeO nanoparçacıkları ile 1, 6, 12, 48, 72 saat inkübe edilen MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücrelerinde, hücre başına altın derişimi (ppm/hücre) (n=3).

Veriler ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir ve biyolojik olarak bağımsız üç deneyden elde edilmiştir. Kontrol hücrelerine göre muamele görmüş hücrelerin sonuçlarının istatistiksel anlamlılığı student t-testi ile belirlenmiştir ($p < 0.05$).

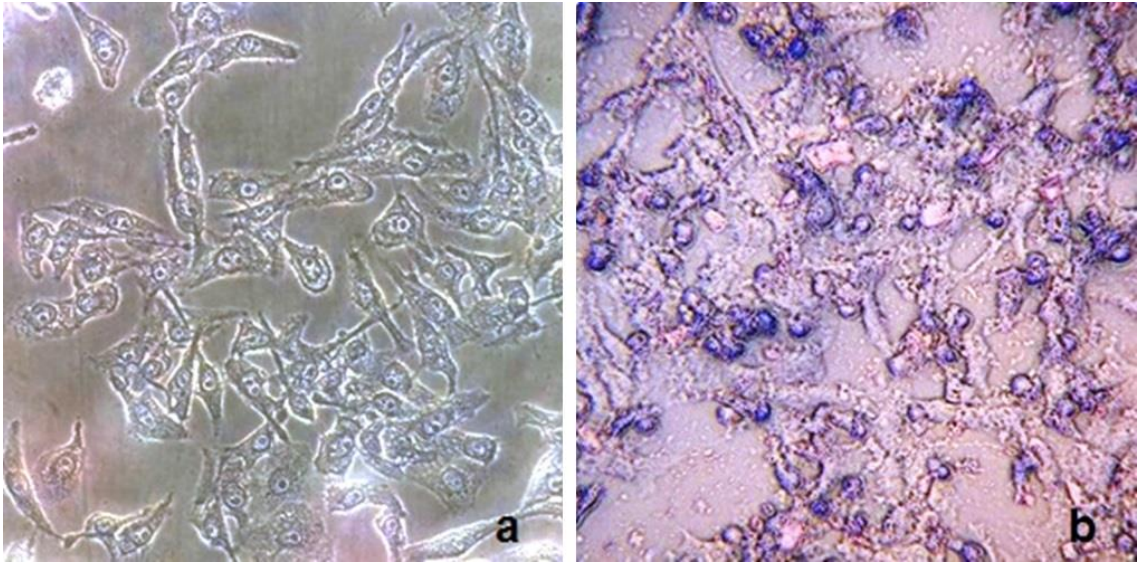
Sonuçlara göre, sağlıklı CRL-4010 hücrelerinde MDA-MB-231 meme kanseri hücrelerine göre daha yüksek ya da yaklaşık bir nanoparçacık alımı görülmüştür. Nanoparçacık temelli kanser tedavilerinde sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerinde göre daha yüksek nanoparçacık alım düzeyi göstermesi önemli bir sorun olarak karşımıza

çıkabilmektedir. Literatürde sağlıklı (MCF10A) ve meme kanseri (MCF-7) hücrelerinin farklı şekillerdeki (nanoçubuk/nanoküre) nanoparçacıkları hücre içine alım düzeyleri karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada elde edilen sonuçlara göre sağlıklı hücrelerin kanser hücrelerine kıyasla daha yüksek seviyede nanoparçacık alım kapasitelerine sahip olduğu belirlenmiştir. Hücrelerin bulunduğu *in vitro* ortamdaki serum miktarının azaltılması (%5 FBS) sonucunda nutrient stersine maruz bırakılan MCF-7 hücrelerinde nanoparçacık alımının artırıldığı rapor edilmiştir (Cong ve ark., 2021). Bu bağlamda, sağlıklı ve kanser hücrelerine ait endositozis yollarındaki farklılıkların aydınlatılmasıyla seçilimli olarak kanser hücrelerine daha etkili bir şekilde nanoparçacık transferinin yapılabilmesi tedavi açısından yararlı olacaktır (Cong ve ark., 2021). Literatürde nanoparçacıkların hücre zarlarından çoğunlukla endositoz gibi enerjiye bağlı süreçlerle hücre içine girebildiği gösterilmiştir (Sincai ve ark., 2005).

Çalışmamızda, her iki hücre tipinde 24. saatten itibaren nanoparçacık alımı azalmıştır. Aynı zamanda, MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla bir düşüş olmakla birlikte her iki hücre tipinde 48. saatten itibaren hücre sayısında da azalma görülmüştür. Bu sonuçlar ile her iki hücre türünde 24 saatlik inkübasyon sonrası nanoparçacıkların hücre içi alım hızında görülen azalma, hücre bütünlüğünün bozulmasından ya da hücre içine alınan ya da hücre yüzeyine adsorplanan yüksek derişimdeki nanoparçacıkların hücre dışına atılmaya başlamasından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu sonuç aynı zamanda, akım sitometri analizi ile de desteklenmiştir; yine IC₅₀ derişiminin altındaki derişimdeki (44 ppm) nanoparçacıklar ile 24 saat boyunca inkübe edilen hücrelerde, nanoparçacıkların hücrelerdeki apoptotik etkileri görülmüştür, bu da hücre bütünlüğünün bozulduğunun bir göstergesidir. Bununla birlikte, CRL-4010 hücrelerinde MDA-MB-231 hücrelerine göre, alımın en yüksek olduğu 24. Saatte %19 katı, 12. Saatte ise %10 katı kadar fazla olsa da, nanoparçacıklar MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla sitotoksik etki göstermiştir (66 ppm nanoparçacık ile inkübe edilen MDA-MB-231 hücrelerinin, hücre canlılığı %54, CRL-4010 hücrelerinin; %89) ve nanoparçacıkların seçici olarak MDA-MB-231 hücrelerinde CRL-4010 hücrelerine göre daha yüksek oranda apoptotik süreci tetiklediği sonucuna varılmıştır (Şekil 50).

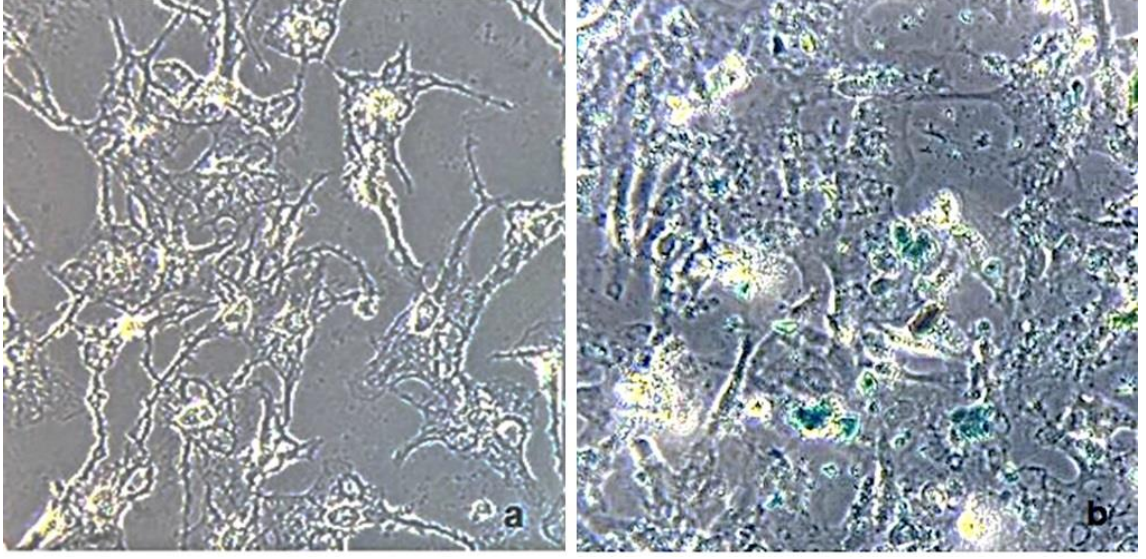
4.9. Hücre İçindeki Demir Oksit Nanoparçacıklarının Kalitatif Analizi (Prusya Mavisi Boyası)

Hücre içine alınan demirin kalitatif tayini için Prusya mavisi boyaması uygulaması yapılmıştır. Hücre içine FeO nanoparçacık alımının kantitatif analizi sonuçlarına göre, her iki hücre tipinde 24. saatten sonra hücre içindeki nanoparçacık miktarı azalmıştır. Bu nedenle boyama deneyleri, her iki hücre de IC₅₀ derişiminin altındaki derişimde (44 ppm) nanoparçacıkları ile 24 saat boyunca inkübe edilerek yapılmıştır. Kontrol uygulamaları olarak, FeO nanoparçacıkları ile muamele edilmeyen MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücrelerine de Prusya mavisi boyaması uygulaması yapılmıştır (Şekil 51-52).



Şekil 51. MDA-MB-231 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.

Şekil 49.' deki a. Kontrol deneyi olarak MDA-MB-231 hücre hatlarının ve b. 44 ppm FeO nanoparçacık ile muamele edilen MDA-MB-231 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleridir. Görüntülerdeki büyütme oranı: 40X.



Şekil 52. CRL-4010 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleri.

Şekil 52.'deki a. Kontrol deneyi olarak CRL-4010 hücre hatlarının ve b. 44 ppm FeO nanoparçacık ile muamele edilen CRL-4010 hücre hatlarının Prusya Mavisi boyaması sonrası mikroskop görüntüleri. Görüntülerdeki büyütme oranı: 40X. FeO nanoparçacıklarının her iki hücre tipi içinde biriktiği ya da hücre çeperinde tutulduğu mikroskop görüntüleri ile gösterilmiştir.

4.10. İstatistiksel Analiz

Gruplar arasındaki istatistiksel anlamlılığı değerlendirmek için, Graphpad Prism VI istatistik yazılımı (GraphPad Inc. CA, ABD) kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılmıştır. p değeri 0,05'ten küçük ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Veriler ortalama \pm ortalamanın standart hatası olarak verilmiştir.

5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

5.1. Sonuç

Tez çalışmasında, antikanser ajanı olarak kullanılmak üzere, demir oksit nanoparçacıkları çevre dostu ve basit bir yol olan yeşil sentez ile hazırlanarak, çeşitli karakterizasyon yöntemleri ile nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenmiştir. Ayrıca, nanoparçacıkların MDA-MB-231 ve CRL-4010 hücre hatlarındaki in vitro sitotoksik ve apoptotik etkileri çalışılarak, hücre içi alımı da gösterilmiştir.

Punica granatum kabuklarının özütü kullanılarak sentezlenen demir oksit nanoparçacıklarının karakterizasyonu ile boyut, kristal yapısı, bileşim tayini ve manyetizasyon ölçümleri yapılmıştır. Bununla birlikte, antioksidan ve antibakteriyel aktiviteleri de gösterilmiştir. Tem görüntülerinden elde edilen boyut dağılım grafiklerine göre; nanoparçacıklar çok küçük boyutta ($3.76 \pm 0,59$ nm) ve homojen boyut dağılımında başarıyla sentezlenmiştir. Nanoparçacıkların -27.87 mV zeta potansiyeli ile sulu çözeltide haftalarca kararlı kalabildiği görülmüştür. TGA ölçümünden elde edilen kütle kaybı-sıcaklık grafiğinden nanoparçacığın belirlenen sıcaklık aralığında %77,5 kütle kaybına uğradığı sonucuna ulaşılmıştır. Bu sonuç, nanoparçacık süspansiyonunun kütlece %77,5 organik bileşen içerdiği anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, ekstrakt ile sentezlenen nanoparçacık ve ekstrakta ait çakışan FTIR bandları, ekstrakt içeriğini doğrulamaktadır. XRD ölçümleri ile nanoparçacığın kristal yapısı belirlenmiştir. XRD spektrumunda görülen en keskin pik olan $2\theta = 32.8^\circ$ (122) piki; nanoparçacıkların çoğunlukla ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısından oluştuğunu göstermektedir. Ayrıca Rietveld analizlerinde karışık demir oksit formlarının oluştuğu ve ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısının % bileşim olarak fazla olduğu görülmüştür. Nanoparçacığın oda sıcaklığında ve ± 1 Tesla manyetik alan şiddetindeki VSM analizi sonuçlarına göre, doyma manyetizasyon değeri (Ms) 3.24 emu/g olarak bulunmuştur. Bitki ekstraktındaki aktif grupların surfaktant görevi görerek manyetikçe aktif çekirdeklerin etrafını sarmaları nedeniyle manyetikçe ölü alanlar oluşmaktadır (Wu ve ark., 2021; Unni ve ark., 2017). Manyetikçe ölü alanların yüzdesi yani bitki içeriği %77,5 olarak TGA analizi ile belirlenmiştir. Ayrıca nanoparçacıkların çok küçük boyutta olmaları (<10 nm) nedeniyle manyetik yanıtları oda sıcaklığında ve ± 1 Tesla manyetik alan altında düşük olması ayrıca beklenen bir sonuçtur (Etemadifar ve ark., 2018). Bunların yanısıra, manyetik özelliğinin düşük olmasının en büyük etkenlerinden manyetik demir oksit (Fe₃O₄/ γ -Fe₂O₃) nanoparçacık oluşumu yerine, karma oksit formlarında demir

oksit (ϵ -Fe₂O₃, α -Fe₂O₃) nanoparçacıklarının oluşmasıdır (Baltacı, 2010; Suturen ve ark., 2018). Bu sonuç örneklerin XRD spektrumu ile gösterilmiştir.

Bu sonuçlar doğrultusunda, karma demir oksit formlarının önüne geçmek ve manyetik özelliğinin artırılması amacıyla demir oksit nanoparçacıklarının sentez parametreleri değiştirilerek tekrar sentezleri yapılmıştır ve elde edilen nanoparçacıkların manyetik yanıtına ilişkin ilk değerlendirmeleri harici bir neobidyum magnet (1.2 T) kullanılarak yapılmıştır. Örneklere ait XRD spektrumlarının analizinde en keskin pik; $2\theta = 32.8^\circ$ (122) olarak görülmüştür (ICSD: 0161785). Bu spektrumlar sentezlenen anoparçacıkların çoğunlukla ϵ -Fe₂O₃ kristal yapısından oluştuğunu göstermektedir. Reaksiyon parametrelerinin karma kristal formların oluşumunu engellemediği görülmüştür. Reaksiyon koşulları değişse de PG ekstraktı ile yapılan sentezlerde ϵ -Fe₂O₃ nanoparçacığı elde edilmektedir. Literatüre göre ϵ -Fe₂O₃ kristal formunu elde etmek zor olmakla birlikte bu form üzerinde biyolojik orjinli çalışmaların az olduğu bilinmektedir (Ohkoshi ve Tokoro, 2013).

Nanoparçacıkların derişim artışına bağlı olarak antioksidan aktivitesinde artış olduğu ve kontrol olarak kullanılan askorbik asitin maksimum inhibisyon değerine yaklaştığı görülmüştür ve aynı zamanda nanoparçacıklarının *E. coli* bakterilerine karşı antibakteriyel aktivitesi göstermiştir.

Nanoparçacıkların *in vitro* değerlendirilmesinde, meme kanser; MDA-MB-231 ve meme normal; CRL-4010 hücre hatları kullanılmıştır. Nanoparçacıklar, CRL-4010 hücrelerine göre, MDA-MB-231 hücrelerinde daha fazla toksik etki göstermiştir ve 2,86 kat artış ile MDA-MB-231 hücrelerinde seçici apoptoza neden olmuştur. Nanoparçacıkların hücre ile etkileşiminin hücre içine alım ve hücre çeperine bağlanma yoluyla olduğu, hücre ile muamele edilen nanoparçacıkların Prusya mavisini ile boyanarak görüntülenmesi ile gösterilmiştir. Sonuçlara göre, yeşil sentez yoluyla elde edilen nanoparçacıkların, potansiyel bir antikanser, antioksidan ve antibakteriyel ajan olarak literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

5.2. Öneriler

PG ekstraktı kullanılarak yapılan FeO nanoparçacık sentezi N₂ gazı ortamında, bazik ortamda birlikte çöktürme prensibine dayalı olarak yapılmıştır ancak ekstrakt bileşenlerinden kaynaklı demir iyonlarının kontrol edilemeyen oksitlenmesi ve indirgenmesi nedeniyle manyetik özellikleri düşük farklı fazlarda demir oksit fazları oluşmuştur. Bu fazların içinde en yüksek oranda bulunan faz ϵ -Fe₂O₃' tür. ϵ -Fe₂O₃ nanoparçacıklarının hipertermi etkisi ve MRI kontrast ajanı olarak kullanılabilirliğinin araştırılması önerilir. Ayrıca, diğer meme hücre hatlarının da kullanılması ile sentezlenen FeO nanoparçacıklarının tüm meme hücrelerindeki antikanser etkinliğinin incelenmesi önerilir.

6. KAYNAKLAR

- Abbasi A. B., Iqbal J., Zahra S. A., Shahbaz A., Kanwal S., Rabbani A., M. T., 2019, Bioinspired synthesis and activity characterization of iron oxide nanoparticles made using Rhamnus Triquetra leaf extract, *Accepted Manuscript Bioinspired*.
- 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 pheonix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 17(May).
- Aisida, S. O., Akpa, P. A., Ahmad, I., Zhao, T. kai, Maaza, M., Ezema, F. I., 2020, Bio-inspired encapsulation and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *European Polymer Journal*, 122(October 2019), 109371.
- Akhtar, S., Ismail, T., Fraternali, D., Sestili, P., 2015, Pomegranate peel and peel extracts: Chemistry and food features, *Food Chemistry*, 174, 417–425.
- 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, *Materials*, 12(3).
- Arularasu, M.V., Devakumar, J., Rajendran, T.V., 2018, An innovative approach for green synthesis of iron oxide nanoparticles: Characterization and its photocatalytic activity, *Polyhedron*, 156, 279–290.
- Ates, H., Bahceci, E., 2015, Nano Malzemeler için üretim yöntemleri, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 3(2), 492–494.
- Ateş, M., Demir, V., İmamoğlu, H., 2013, Nanoparçacıkların özellikleri ve akuatik çevreye etkisi, *Ziraat Mühendisliği*, 360, 52–59.
- Balcı, A., 2016, Metal bezeli silika partiküllerinin yarı-biyosentezle üretimi, yapısal analizi ve (antibakteriyel ve fotokatalitik) özelliklerinin incelenmesi, *Tübitak Projesi*.
- Baltacı, Ö. A., 2010, Production and characterization of maghemite nanoparticles, *Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*.

- Baran, M., 2013, Meme ve serviks kanseri konusunda kadınların bilgi ve bilinç düzeyleri, *Beykent Üniversitesi*.
- Bekdeşer, B., 2012, Biyolojik örneklerde reaktif oksijen türleri süpürme etkinliği ölçümü için spektrofotometrik yöntemler geliştirilmesi, *İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Bekir, J., Mars, M., Souchard, J. P., Bouajila, J., 2013, Assessment of antioxidant, anti-inflammatory, anti-cholinesterase and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves, *Food and Chemical Toxicology*, 55, 470–475.
- Bharde, A. A., Parikh, R. Y., Baidakova, M., Jouen, S., Hannyoy, B., Enoki, T., Sastry, M., 2008, Bacteria-mediated precursor-dependent biosynthesis of superparamagnetic iron oxide and iron sulfide nanoparticles, *Langmuir*, 24(11), 5787-5794.
- Buluş, S., 2019, Meme Kanseri dokusundan elde edilen tümör infiltran lenfosit (TIL)'lerin in vitro ortamda çoğaltılması ve fenotiplerinin saptanması, *Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi*, 1–76.
- Bozgeyik, E., 2017, Doğal antisense transkriptlerin kanserdeki roller, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*.
- Bouafia, A., Laouini, S. E., Tedjan, M. L., Ali, G. A. M., Barhoum, A., 2021, Green biosynthesis and physicochemical characterization of Fe₃O₄ nanoparticles using *Punica granatum* L. fruit peel extract for optoelectronic applications, *Textile Research Journal*, 0, 1– 12.
- Çakmak, E., 2020, Manyetik demir nanopartiküllerinin limon kabuğu ile sentezi, karakterizasyonu ve kurşun iyonunun katı faz ekstraksiyonunda kullanılması, *Sivas Cumhuriyet Üniversitesi*.
- Chia Hua Lin, C. Y. W., 2015, Using glucose-bound Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as photothermal agents for targeted hyperthermia of cancer cells, *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, 06(01), 1–7.
- Cong, V. T., Wang, W., Tilley, R. D., Sharbeen, G., Phillips, P. A., Gaus, K., Gooding, J. J., 2021, Can the shape of nanoparticles enable the targeting to cancer cells over healthy cells, *Advanced Functional Materials*, 31(32).
- Clogston, J. D., Patri, A. K., 201, Zeta potential measurement in characterization of nanoparticles intended for drug delivery, *Humana Press*, (Pp. 63-70).

- Crowley, L. C., Marfell, B. J., Scott, A. P., Waterhouse, N. J., 2016, Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry, *Cold Spring Harbor Protocols*, 2016(11), 953–957.
- Dağlıoğlu, Y., Yılmaz, H. Ö., 2018, Nanopartikül karakterizasyon yöntemleri ve ekotoksisite deneylerindeki önemi, *Marmara Fen Bilimleri Dergisi*.
- Da, X., Dong, S., Meng, X., Lu, Q., Meng, L., Yec, J., 2012, Gold nanoparticles as computerized tomography (CT) contrast agents, *RSC Advances*, 2, 12515–12524.
- Dyawanapelly, S., Koli, U., Dharamdasani, V., 2016, Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins, *Drug Deliv. and Transl. Res.*, 6, 365–379.
- Demirezen, D. A., Yıldız, Y. Ş., Yılmaz, Ş., Yılmaz, D. D., 2019, Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles using *Ficus carica* (common fig) dried fruit extract, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 127, 2, 241-245.
- Dilmaç, S., 2014, Metastatik ve nonmetastatik tümörlerdenefronektin ekspresyonu, *Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı*, 1–60.
- Dinparvar, S., Bagirova, M., Allahverdiyev, A. M., Abamor, E. S., Safarov, T., Aydođdu, M., Aktaş, D., 2020, A nanotechnology based new approach in the Treatment Breast Cancer: Biosynthesized Silver Nanoparticles Using *Cuminum Cyminum* L. Seed Extract, *Photochemistry and Photobiology*, 208.
- Dulinska-Litewka, J., Lazarczyk, A., Halubiec, P., Szafranski, O., Karnas, K., Karewicz, A., 2019, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles-current and prospective medical applications, *Materials*, 12(4).
- Dundar, B., 2017, GLUT-1 (SLC2A1) ve GLUT-3 (SLC2A3) genlerinin ve bu genleri hedefleyen mikrona ekspresyonlarının farklı meme kanseri hücre hatlarında (SKBR-3, MDA-MB-231, MCF-7, hTERT) karşılaştırılması, *Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Ekinci, M., Özdemir, D., İ., 2021, Nanoteranostikler, *Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Radyofarmasi Anabilim Dalı*, 35100.
- Ercan, İ. Ç., 2019, Demir oksit nanoparçacıklarının ağır metal adsorpsiyonunda kullanımı, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 80.

- Etemadifar, R., Kianvash, A., Arsalani, N., Abouzari-Lotf, E., Hajalilou, A., 2018, Green synthesis of superparamagnetic magnetite nanoparticles: effect of natural surfactant and heat treatment on the magnetic properties, *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 29(20), 17144-17153.
- Ezhilarasi, A. A., Vijaya, J. J., Kaviyarasu, K., Maaza, M., Ayeshamariam, A., Kennedy, L. J., 2016, Green synthesis of NiO nanoparticles using Moringa oleifera extract and their biomedical applications: Cytotoxicity effect of nanoparticles against HT-29 cancer cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 164, 352–360.
- Foujdar, R., Chopra, H. K., Bera, M. B., 2020, Prob Ultrasonikasyonu, mikrodalga ve güneş ışığının, Punica granatum Peel'in polifenol bazlı gümüş nanokojugatlarının biyosentezi, biyoaktivitesi ve yapısal morfolojisi üzerindeki etkisi, *Atık Biyokütle Valor* 12, 2283–2302.
- Gich, M., Roig, A., Frontera, C., Molins, E., Sort, J., Popovici, M., Nogues, J., 2005, Large coercivity and low-temperature magnetic reorientation in ϵ -Fe₂O₃ nanoparticles, *Journal of Applied Physics*, 98(4), 044307.
- Goesmann, H., Feldmann, C., 2010, Nanoparticle Function Materials, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 1362-1395.
- Gole, A., Stone, J. W., Gemmill, W. R., Loye, H. C. Zur, Murphy, C. J., 2008, Iron oxide coated gold nanorods: Synthesis, characterization, and magnetic manipulation, *Langmuir*, 24(12), 6232–6237.
- Gong, Y., Fan, Z., Luo, G., Yang, C., Huang, Q., Fan, K., Cheng, H., Jin, K., Ni, Q., Yu, X., Liu, C., 2019, The role of necroptosis in cancer biology and therapy, *Molecular Cancer*, 18(1), 1–17.
- Görgülü, Ş., 2019, N-(4-asetilfenil)-2-(ariltiyo) asetamit ve n-(3-hidroksi-4-metoksibenziliden)-2-(4-tosilpiperazin-1-il) asetohidrazit türevlerinin pankreas kanserinde antikanser etkilerinin parp inhibitörleri ile karşılaştırılması, *Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Eskişehir.
- Gour, A., Jain, N. K., 2019, Advances in green synthesis of nanoparticles, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 844–8.
- Guo, S., Huang, Y., Zhang, W., Wang, W., Wei, T., Lin, D., Xing, J., Deng, L., Du, Q., Liang, Z., Liang, X. J., Dong, A., 2011, Ternary complexes of amphiphilic polycaprolactone-graft-poly (N, N-dimethylaminoethyl methacrylate), DNA and polyglutamic acid-graft-poly(ethylene glycol) for gene delivery, *Biomaterials*, 32, 18, 4283-4292.

- Gu, Y., Johansson, C., Ahrentorp, F., Bonvin, D., Fernandez-Silva, P., Yoshikiyo, M., Moreno-Loshuertos, R., 2020, Magnetic hyperthermia with e-Fe₂O₃ nanoparticles, *No. ART-2020-119560*.
- Güleç, K., 2016, Kuersetin'in siklodekstrin nanopartiküllerinin hazırlanması ve in vitro değerlendirilmesi, *Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, III (2), 2016.
- Gülten, A., 2007, Hukuk devletinde kişisel güvenlik, *Yeditepe Üniversitesi Hukuk Fakültesi*, 1–7.
- Gupta, S., Omar, T., Muzzio, F. J., 2022, SEM/EDX and Raman chemical imaging of pharmaceutical tablets: A comparison of tablet surface preparation and analysis methods, *International Journal of Pharmaceutics*, 611(September 2021), 121331.
- Hanani, Z. A. N., Yee, F. C., Nor-Khaizura, M. A. R., 2019, Effect of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel powder on the antioxidant and antimicrobial properties of fish gelatin films as active packaging, *Food Hydrocolloids*, 89 (September 2018), 253–259.
- Hasırcı, C., 2019, Çinko ferrit nanoparçacıkların özelliklerine sentez sıcaklığı ve süresinin etkisinin incelenmesi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı*.
- Hallouard, F., Anton, N., Choquet, P., Constantinesco, A., Vandamme, T., 2010, Iodinated blood pool contrast media for preclinical X-ray imaging applications, *Biomaterials*, 31, 6249–6268.
- Hernández-Hernández, A. A., Aguirre-Álvarez, G., Cariño-Cortés, R., Mendoza-Huizar, L. H., Jiménez-Alvarado, R., 2020, Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer, *Chemical Papers*, 74(11), 3809–3824.
- Hirschle, P., Preib, T., Auras, F., Pick, A., Völkner, J., Valdepérez, D., Witte, G., Parak, W. J., Radler, J. O., Wuttke, S., 2016, Exploration of MOF nanoparticle sizes using various physical characterization methods-is what you measure what you get, *CrystEngComm*, 18(23), 4359–4368.
- Hulla, J. E., Sahu, S. C., Hayes, A. W., 2015, Nanotechnology: History and future, *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318–1321.

- Hutchins, J. B., Barger, S. W., 1998, Nöronlar neden ölü: sinir sisteminde hücre ölümü, *Anatomik Kayıt: Amerikan Anatomistler Birliği'nin Resmi Yayını*, 253 (3), 79-90.
- Husni, E., Wahyuni, F. S., Fitri, H. N., Badriyya, E. 2021, Cytotoxicity study of ethanol extract of Bintangor leaf (*Calophyllum soulattri* Burm.f) on T47D breast cancer cell line (Cytotoxicity study with MTT assay method), *Pharmacognosy Journal*, 13(2), 362–367.
- Honary, S., and Zahir, H., 2013, Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems-a review, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 12(2), 265-273.
- Idris, A. M., El-Zahhar, A. A., 2019, Indicative properties measurements by SEM, SEM-EDX and XRD for initial homogeneity tests of new certified reference materials, *Microchemical journal*, 146, 429-433.
- Iranfar, S., Hekmati, M., Ziyadi, H., Ghasemi, E., Esmaeili, D., 2021, Synthesis of nanocomposite iron oxide modified with *Punica granatum* peel extract and its application in azo dye degradation, *Inorganic Chemistry Communications*, 133(August), 108925.
- Irshada, R., Tahira, K., Lia, B., Ahmada, A., Siddiquia, A. R., Nazirb, S., 2017, Antibacterial activity of biochemically capped iron oxide nanoparticles: A view towards green chemistry, *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, 170, 241–246.
- Israel, L. L., Galstyan, A., Holler, E., Ljubimova, J. Y., 2020, Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain, *Journal of Controlled Release*, 320(November 2019), 45–62.
- Jain, A. K., Thareja, S., 2019, In vitro and in vivo characterization of pharmaceutical nanocarriers used for drug delivery, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 47(1), 524–539.
- Jalali, A., Kiafar, M., Seddigh, M., Zarshenas, M. M., 2020, *Punica granatum* as a source of natural antioxidant and antimicrobial agent: A comprehensive review on related investigations, *Current Drug Discovery Technologies*, 18(2), 207–224.
- Jalili, A., Irani, S., Mirfakhraie, R., 2016, Combination of cold atmospheric plasma and iron nanoparticles in breast cancer: Gene expression and apoptosis study, *OncoTargets and therapy*, 9, 5911.

- Jamkhande, P. G., Ghule, N. W., Bamer, A. H., Kalaskar, M. G., 2019, Metal nanoparticle synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 53.
- Jan, R., Chaudhry, G. S., 2015, Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics, *Journal of Cardiovascular and Thoracic Research*, 7(3), 113–117.
- Jeong, U., Teng, X., Wang, Y., Yang, H., Xia, Y., 2007, Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications, *Adv. Matter*, 19, 33-60.
- Kankaya, B., Büyükaşık, S., Kapan, S., Alış, H., 2019, Meme kanseri tedavisinde güncel yaklaşım, *Tip Fakültesi Klinikleri*, 2019(38), 7–10.
- Karakelle, Avşar, B. S., 2019, Fonksiyonelleştirilmiş Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi ve Boyar Madde Adsorpsiyonunda Kullanılması, *Uludağ Üniversitesi*.
- Keta, O., Deljanin, M., Petkovic, V., Zdunic, G., Jankovic, T., Zivkovic, J., Ristic-Fira, A., Petrovic, I., Savikin, K., 2020, Pomegranate (*Punica granatum L.*) peel extract: Potential cytotoxic agent against different cancer cell lines, *Records of Natural Products*, 14(5), 326–339.
- Kadhim, K. A., Halef, M., 2022, Piromellitik diimid ve imin birimlerinden oluşan yeni düşük bant aralıklı bileşikler, *Kimyasal Metodolojiler*, 6(5), 418-427.
- Khan, S. A., Khan, S. B., Khan, L. U., Farooq, A., Akhtar, K., Asiri, A. M., 2018, Fourier transform infrared spectroscopy: Fundamentals and application in functional groups and nanomaterials characterization, *Handbook of Materials Characterization*, 317–344.
- Kirupakar, B. R., Vishwanath, B. A., Sree, M. P., Deenadayalan, 2016, Vibrating sample magnetometer and its application in characterisation of magnetic property of the anti-cancer drug magnetic microspheres, *International Journal of Pharmaceutics and Drug Analysis*, 4(5), 227–233.
- Koçak, T. B., 2009, Primeri bilinen vertebra metastazi veya şüphesi olan olgularda difüzyon mrg bulguları, *Pamukkale Üniversitesi*.

- Kumar, P., Subbarao, P. M., Kala, V., L. D., Vijay, V. K., 2021, Thermogravimetry and associated characteristics of pearl millet cob and eucalyptus biomass using differential thermal gravimetric analysis for thermochemical gasification, *Thermal Science and Engineering Progress*, 26(October), 101104.
- Kubickova, L., Brazda, P., Veverka, M., Kaman, O., Herynek, V., Vosmanska, M., Kohout, J., 2019, Nanomagnets for ultra-high field MRI: magnetic properties and transverse relaxivity of silica-coated ϵ -Fe₂O₃, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 480, 154-163.
- Kütük, N., 2010, Yeşil sentez ile nanomalzeme üretiminin incelenmesi ve kullanım alanları, *Researchgate*.
- Laurent, S., Forge, D., Port M., Roch, A., Robic, C., Vander Elst, L., Muller, R. N., 2008, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications, *Chemical Reviews*, 108(6), 2064–2110.
- Lemal, P., Balog, S., Geers, C., Taladriz-Blanco, P., Palumbo, A., Hirt, A. M., Rothen-Rutishauser, B., Petri-Fink, A., 2019, Heating behavior of magnetic iron oxide nanoparticles at clinically relevant concentration, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 474, 637–642.
- Lenhardt, T., Vergnault, P., Grenier, D., Scherer, P., Langguth, G., 2008, Evaluation Of Nanosuspensions For Absorption Enhancement Of Poorly Soluble Drugs: In Vitro Transport Studies Across Intestinal Epithelial Monolayers, *The AAPS Journal*, 10, 3, 435-438.
- Lewinski, N., Colvin, V., Drezek, R., 2008, Cytotoxicity of nanopartides, *Small*, 4(1), 26–49.
- Liu, G., Gao, J., Ai, H., Chen, X., 2013, Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles, *Small*, 9(9–10), 1533–1545.
- Liveri, V. T., 2006, Controlled Synthesis of Nanoparticles in Microheterogeneous Systems, *Springer Science and Business Media, Inc., New York*.
- Lu, A. H., Salabas, E. L., Schüth, F., 2007, Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application, *Angewandte Chemie-International Edition*, 46(8), 1222–1244.

- Maheswari, K. C., Reddy., 2016, Green synthesis of magnetite nanoparticles through leaf extract of azadirachta indica, *Journal of Nanoscience and Technology*, 2(4), 189–191.
- Martins, A. S., Batista de Carvalho, A. L. M., Lamego, I., Marques, M. P. M., Gil, M., 2020, Cytotoxicity of platinum and palladium chelates against osteosarcoma, *ChemistrySelect*, 5(20), 5993–6000.
- Majida A., Ahmed, W., Patil-Sen, Y., and Sen, T., 2017, Synthesis and characterisation of magnetic nanoparticles in medicine, *Micro and Nanomanufacturing*, 2, 1–570.
- Mehta, V., Verma, P., Sharma, N., Sharma, A., Thakur, A., Malairaman, U., 2017, Quercetin, ascorbic acid, caffeine and ellagic acid are more efficient than rosiglitazone, metformin and glimepiride in interfering with pathways leading to the development of neurological complications associated with diabetes: A comparative in-vitro stu, *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, 55(1), 115–121.
- Meneceur, S., Hemmami, H., Bouafia, A., Laouini, S. E., Tedjani, M. L., Berra, D., Mahboub, M. S., 2022, Photocatalytic activity of iron oxide nanoparticles synthesized by different plant extracts for the degradation of diazo dyes Evans blue and Congo red, *Biomass Conversion and Biorefinery*, 0123456789.
- Miguel, M. G., Dandlen, S., Neves, M. A., 2009, Antioxidant activities of flower extract and pomegranate juice, *Acta Horticulturae*, 818, 389–394.
- Mohamad Sukri, S. N. A., Shameli, K., Mei-Theng Wong, M., Teow, S. Y., Chew, J., Ismail, N. A., 2019, Cytotoxicity and antibacterial activities of plant-mediated synthesized zinc oxide (ZnO) nanoparticles using Punica granatum (pomegranate) fruit peels extract, *Journal of Molecular Structure*, 1189, 57–65.
- Mohamed, F., Rabia, M., Shaban, M., 2020, Synthesis and characterization of biogenic iron oxides of different nanomorphologies from pomegranate peels for efficient solar hydrogen production, *Journal of Materials Research and Technology*, 9(3), 4255–4271.
- Mundekkad, D., Alex, A. V., 2022, Analysis of structural and biomimetic characteristics of the green-synthesized Fe₃O₄ nanozyme from the fruit peel extract of Punica granatum, *Chemical Papers*, 0123456789.
- Nasseri, B., 2013, Hyperthermia using rf with nanoparticles, *Hacettepe Üniversitesi*.

- Özel, F., 2015, Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıklar: sentezi, yüzey modifikasyonu, yapısal ve manyetik karakterizasyonu ile toksik etkinin incelenmesi, *Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Özgün G., Türker P. F., Kaya. B., 2020, Onkoloji hastalarının kanser türlerine göre yaşam kalitesi, kaygı ve antropometrik ölçümlerinin değerlendirilmesi, *Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi Dergisi*, 0312, 0–3.
- Özlüer, Ö., 2018, Meme kanseri ve meme normal hücre hatlarında, kadmiyum ve çinkonun etkisinin moleküler düzeyde, *Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*.
- Özmert E. S., 2019, Nar Meyvesi (*Punica granatum L.*) ile farklı nar ürünlerinin antioksidan özellikleri, *Akademik Gıda*, 17(2), 243–251.
- Ohkoshi, S. I., Tokoro, H., 2013, Hard magnetic ferrite: ϵ -Fe₂O₃, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 86(8), 897-907.
- Pehanich, M., 2006, Small gains in processing and packaging, *Food Process*, 11, 46-48.
- Salavati-N., Mahmoudi, M. T., Amiri, O., 2012, Easy Synthesis of magnetite nanocrystals via coprecipitation method, *Journal of Cluster Science*, 23(2), 597–602.
- Salimi, M., Sarkar, S., Hashemi, M., Saber, R., 2020, Treatment of breast cancer-bearing balb/c mice with magnetic hyperthermia using dendrimer functionalized iron-oxide nanoparticles, *Nanomaterials*, 10(11), 1–18.
- Salmani, M. H., Abedi, M., Mozaffari, S. A., Mahvi, A. H., Sheibani, A., 2021, Simultaneous reduction and adsorption of arsenite anions by green synthesis of iron nanoparticles using pomegranate peel extract, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 19:603–612.
- Sarkar, S., Kotteeswaran, V., 2018, Green synthesis of silver nanoparticles from aqueous leaf extract of Pomegranate (*Punica granatum*) and their anticancer activity on human cervical cancer cells, *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 9(2).
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D., Boyd, M. R., 1988, Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines, *Cancer Research*, 48(17), 4827–4833.

- Schwaminger, S. P., Surya, R., Filser, S., Wimmer, A., Weigl, F., Fraga-Garcia, P., Berensmeier, S., 2017, Formation of iron oxide nanoparticles for the photooxidation of water: Alteration of finite size effects from ferrihydrite to hematite, *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Seyhan, S. A., 2019, DPPH•Antioksidan analizinin yeniden değerlendirilmesi, *Batman University Journal of Life Sciences*, 9(2), 125–135.
- Sekmen, E., 2019, Bazı metal nanopartiküllerin çeşitli biyoekstreler ile yeşil sentezi, karakterizasyonu ve grafit elektrot modifikasyonunda kullanımı, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Ana Bilim Dalı*.
- Siddiqui, V. U., Ansari, A., Chauhan, R., Siddiqi, W. A., 2019, Green synthesis of copper oxide (CuO) nanoparticles by Punica granatum peel extract, *Materials Today: Proceedings*, 36(February 2021), 751–755.
- Singh, T. D., Sravani, P., Bhattar, S. P. S., Anuradha, K., 2019, Green synthesis of iron, copper and silver nanoparticles and their antibacterial activity on animal pathogens-a comparative study, *International Journal of Scientific Research in Research Paper. Biological Sciences*, 6(1), 19–24.
- Sincai, M., Ganga, D., Ganga, M., Argherie, D., Bica, D., 2005, Antitumor effect of magnetite nanoparticles in cat mammary adenocarcinoma, *Journal of magnetism and magnetic materials*, 293(1), 438-441.
- Sirdeshpande, K. D., Sridhar, A., Cholkar, K. M., Selvaraj, R., 2018, Structural characterization mesoporous magnetite nanoparticles synthesized using the leaf extract of Calliandra haematocephala and their photocatalytic degradation of malachite green dye, *Applied Nanoscience*, 8, 675–683.
- Suleman, M., Riaz, S., 2020, 3D in silico study of magnetic fluid hyperthermia of breast tumor using Fe₃O₄ magnetic nanoparticles, *Journal of thermal biology*, 91, 102635.
- Suturin, S. M., Korovin, A. M., Gastev, S. V., Volkov, M. P., Sitnikova, A. A., Kirilenko, D. A., Sokolov, N. S., 2018, Manyetik olarak sıralanmış α -, γ -, ϵ - Fe₂O₃ ve Fe₃O₄ katmanlarına sahip dördü bir arada GaN üzerinde ferroik sistemde epitaksiyel demir oksitlerin ayarlanabilir polimorfizmi, *Fiziksel İnceleme Materyalleri*, 2 (7), 073403.
- Şahin, B., 2017, Kanserin tedavisine yönelik yeşil sentez ile yeni nesil nanomalzemelerin sentezi ve uygulamaları, *Dumlupınar Üniversitesi Lisansüstü*, 549, 40–42.

- Şahin, M., 2020, Değerli metal içeren nanoparçacıkların sentezi, karakterizasyonu ve kataliz uygulamaları, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimler Enstitüsü*.
- Teja, A. S., Koh, P. Y., 2009, Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles, *Progress in crystal growth and characterization of materials*, 55(1-2), 22-45.
- Thomas, L. A., 2010, Manyetik hipertermi için nanoparçacık sentezi, *UCL (University College London) Degree of Doctor of Philosophy (Chemistry)*.
- Tucek, J., Zboril, R., Namai, A., Ohkoshi, S. I., 2010, ϵ -Fe₂O₃: An advanced nanomaterial exhibiting giant coercive field, millimeter-wave ferromagnetic resonance, and magnetoelectric coupling, *Chemistry of Materials*, 22(24), 6483-6505.
- Tucek, J., Tucek, P., Cuda, J., Filip, J., Pechousek, J., Machala, L., Zboril, R., 2012, Iron (III) oxide polymorphs and their manifestations in in-field 57 Fe Mössbauer spectra, In *AIP Conference Proceedings* (Vol. 1489, No. 1, pp. 56-74).
- Wegmann, M., Scharr, M., 2018, Manyetik demir oksit nanoparçacıklarının sentezi, *Hassas Tıpta* (s. 145-181).
- Wu, M., Huang, S., 2017, Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review), *Molecular and Clinical Oncology*, 738–746.
- Wu, S., Sun, A., Zhai, F., Wang, J., Xu, W., Zhang, Q., Volinsky, A. A., 2011, Fe₃O₄ magnetic nanoparticles synthesis from tailings by ultrasonic chemical co-precipitation, *Materials Letters*, 65(12), 1882–1884.
- Wu, W., He, Q., Jiang, C., 2008, Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategie, *Nanoscale Research Letters*, 3(11), 397–415.
- Wu, W., Wu, Z., Yu, T., Jiang, C., Kim, W. S., 2015, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications, *Science and Technology of Advanced Materials*, 16(2), 23501.
- Van Lehn, R. C., Atukorale, P. U., Carney, R. P., Yang, Y. S., Stellacci, F., Irvine, D. J., Alexander-Katz, A., 2013, Parçacık çapının ve yüzey bileşiminin, tek katmanlı korumalı altın nanoparçacıkların lipid çift katmanları ile kendiliğinden füzyonu üzerindeki etkisi, *Nano harfler*, 13 (9), 4060-4067.

- Venkateswarlu, S., Kumar, B. N., Prathima, B., SubbaRao, Y., b, Jyothi, N. V. V., 2019, A novel green synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanorods using Punica Granatum rind extract and its application for removal of Pb (II) from aqueous environment, *Arabian Journal of Chemistry*, 12, 588–596.
- Yasin, S. A., Abbas, J. A., Saeed, I. A., Ahmed, I. H., 2020, The application of green synthesis of metal oxide nanoparticles embedded in polyethylene terephthalate nanofibers in the study of the photocatalytic degradation of methylene blue, *Polymer Bulletin*, 77(7), 3473–3484.
- Yılmaz, Ö., Boyacıoğlu, M., 2020, Investigation of antioxidant activity by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical sweeping capacity method of some synthetic antioxidant, *Journal of Research in Veterinary Medicine*, 39(2), 67–72.
- Yürüksoy, M. B., 2020, İlaç salımı için mitomisin c baskılanmış manyetik partikül gömülü kriyojellerin hazırlanması, *Hacettepe Üniversitesi*, Ankara.
- Yusefi, M., Shameli, K., Ali, R. R., Pang, S. W., Teow, S. Y., 2020, Evaluating anticancer activity of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using punica granatum fruit peel extract, *Journal of Molecular Structure*, 1204.
- Yusefi, M., Shameli, K., Hedayatnasab, Z., Teow, S. Y., Ismail, U. N., Azlan, C. A., Rasit Ali, R., 2021. Green synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles for hyperthermia, magnetic resonance imaging and 5-fluorouracil carrier in potential colorectal cancer treatment, *Research on Chemical Intermediates*, 47(5), 1789–1808.
- Yusefi, M., Shameli, K., Jumaat, A. F., 2020, Preparation and properties of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A brief review, *Journal of Advanced Research in Materials Science*, 75(1), 10–18.
- Yusefi, M., Shameli, K., Ali, R. R., Pang, S-W., Teow, S. Y., 2020, Evaluating anticancer activity of plant-mediated synthesized iron oxide nanoparticles using punica granatum fruit peel extract, *Journal of Molecular Structure*, 1204, 127539.
- Zhou, H., Yi, R., Li, J., Su, Y., Liu, X., 2010, Microwave-assisted synthesis and characterization of hexagonal Fe₃O₄ nanoplates, *Solid State Sciences*, 12(1), 99–104.
- Zhou, B., Yang, J., Peng, C., Zhu, J., Tang, Y., 2016, PEGylated polyethylenimine-entrapped gold nanoparticles modified with folic acid for targeted tumor CT imaging, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 140, 489–496.