T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KANDA OKSİJEN TAŞINIMINDA DESTEK BİOMALZEMENİN GELİŞTİRİLMESİ

Ümit YAŞAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Prof. Dr. Nurten DİKMEN

ADANA-2016

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KANDA OKSİJEN TAŞINIMINDA DESTEK BİOMALZEMENİN GELİŞTİRİLMESİ

Ümit YAŞAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof. Dr. Nurten DİKMEN

Çukurova Üniversitesi, BAP birimi TDK-2014-2686 Nolu projesi ile desteklenmiştir.

Tez no:…….
ADANA-2016

KABUL ONAY

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

"Kanda Oksijen Taşınımında Destek Biomalzemenin Geliştirilmesi"

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 13 / 04 / 2016

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Nurten DİKMEN
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Lülüfer TAMER
Mersin Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Burhan ARIKAN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Ramazan BİLGİN
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Pınar Yılgör HURİ
Ankara Üniversitesi
Üye

Yrd. Doç. Dr. Safiye TAGA
Mersin Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Behice DURGUN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile tezin planlanması, gerçekleştirilmesi, yol göstericiliği ve katkılarından dolayı değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten DİKMEN, tüm laboratuvar olanaklarında desteğini esirgemeyen ikinci Danışman'ım Prof. Dr. Bilgehan GÜZEL ile Prof. Dr. Abdullah TULİ ve Yrd. Doç. Dr. Pınar Yilgör HURİ'ye;

Desteklerinden ötürü ODTÜ'den kıymetli hocalarım Sayın Prof Dr. Vasıf HASIRCI ve Nesrin HASIRCI'ya;

Çalışmalarım sırasında yardımını esirgemeyen, sürekli destek olan, bilgi ve tecrübeleri ile her zaman yanımda olan değerli arkadaşım Kimyager Fatma ULUSAL'a;

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya ve Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi'nde tez çalışmamda maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma;

Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne;

Hayatımı paylaştığım, her anımda yanımda olan, her sıkıntımda yardımıma koşan, beni bu aşamalara getiren başta SEVGİLİ BABAM ve SEVGİLİ ANNEM olmak üzere tüm aileme;

Tüm sevdiklerime..

Çok teşekkür ederim..

Ümit YAŞAR

2016

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY i
TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
ŞEKİLLER DİZİNİ vii
ÇİZELGELER DİZİNİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ xi
ÖZET xiii
ABSTRACT xiv
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Yapay kan nedir 3
2.1.1. Tarihsel süreç 4
2.1.2. İdeal bir yapay kan çözeltisinde istenilen özellikler 5
2.1.3. Genel problemler 5
2.2. Hemoglobin 6
2.2.1. Sentezi 7
2.2.2. Yapısı 7
2.2.3. Oksihemoglobin 9
2.2.4. Deoksihemoglobin 10
2.2.5. İnsanlarda hemoglobin Türleri 12
2.2.6. Hemoglobin ve çeşitlerinin UV-Vis absorpsiyon özellikleri 12
2.3. Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler: 14
2.3.1. Nanoteknolojide gelişim dönemleri 15
2.3.2. Nanopartiküller 16
2.3.3. Metalik nanopartiküller 19
2.3.4. Altın nanopartiküller 19
2.3.5. Gümüş nanopartiküller 20
2.3.6. Metal oksit nanopartikülleri 21
2.3.7. Modifiye edilmiş metal oksit nanopartikülleri 21
2.3.8. Manyetik nanopartiküller 22

2.3.9. Manyetik nanopartiküllerde toksik etki 23
3. MATERYAL ve METOT 24
3.1. Materyal 24
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar 24
3.1.2. Kullanılan cihazlar 25
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler 26
3.2. Metot 26
3.2.1. Destek malzemelerinin sentezi 28
3.2.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi 28
3.2.1.2. Magnetitlerin kaplanması 29
3.2.1.3. Manyetik nanopartiküllere hemoglobin immobilizasyonu 36
3.2.2. Hücre kültürünün hazırlanması 37
3.2.2.1. Endotel hücrelerinin temini 37
3.2.2.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal maddeler 37
3.2.2.3. Endotel hücre hattında kullanılan besiyeri (Hücre medyumu) 37
3.2.2.4. Hücre kültür işlemlerinin yapıldığı ortamlar 38
3.2.2.5. Malzemenin temizliği ve sterilizasyonu 38
3.2.2.6. Dondurulmuş endotel hücrelerinin kültüre edilmesi 38
3.2.2.7. Tripsinizasyon işlemi ve endotel hücrelerinin pasajlanması 39
3.2.2.8. Endotel hücrelerinin sayımı 40
3.2.2.9. Hücrelerin dondurulması ve saklanması 41
3.2.3. Endotel hücrelerinin proliferasyon ve sitotoksisite analizi 41
3.2.3.1. MTT metodu ile hücre proliferasyon ve canlılık analizi deneyi 42
3.2.4. Manyetik nanopartikül komplekslerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi 43
3.2.4.1. Uygulama yapılacak hücrelerin hazırlanması 43
3.2.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ölçümü 44
3.2.4.3. Katalaz (CAT) enzimi aktivite ölçümü 45
3.2.4.4. Glutatyon peroksidaz enzim aktivite ölçümü 45
4. BULGULAR 46
4.1. Manyetik nanopartikül sentezi ve çeşitli ara kollar ile modifikasyonu 46
4.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi 46

4.1.2. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması ve modifikasyonu 48
4.1.2.1. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması..... 48
4.1.2.2. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin karboksilik asit grubunun indirgenmesi..... 52
4.1.2.3. Alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin (TACMNP) alkol gruplarının yükseltgenmesi 53
4.1.2.4. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması..... 57
4.1.3. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması ve modifikasyonu 65
4.1.3.1. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması 65
4.1.3.2. Trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin alkol gruplarının yükseltgenmesi 68
4.1.3.3. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması..... 72
4.1.4. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması ve modifikasyonu..... 80
4.1.4.1. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması 80
4.1.4.2. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu 83
4.1.4.3. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması..... 86
4.1.5. Magnetitin glutaraldehit ile kaplanması..... 94
4.1.5.1. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması..... 97
4.2. Sentezlenen komplekslerin endotel hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi 103
4.3. Sentezlenen komplekslerin, antioksidan savunma mekanizmasına etkisi 105
4.3.1. Saf mnp uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi. 105
4.3.2. Saf Hb uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi ... 106
4.3.3. GAMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi..... 107

4.3.4. 3APGAMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 108
4.3.5. TEALMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 109
4.3.6. TALMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi 110
5. TARTIŞMA 111
5.1. Manyetik nanopartikül sentezi ve çeşitli ara kollar ile modifikasyonu 111
5.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi 111
5.1.2. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması 112
5.1.3. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması 119
5.1.4. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması 125
5.1.5. Magnetitin glutaraldehit ile kaplanması ve hemoglobin bağlanması 132
5.2. Sentezlenen komplekslerin endotel hücre fonksiyonları üzerine etkisi 136
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER 142
KAYNAKLAR 144
EKLER 150
EK-1 150
ÖZGEÇMİŞ 151

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No:		Sayfa No:
Şekil 1.	Oksihemoglobin	9
Şekil 2.	Hemoglobinin R ve S formu	10
Şekil 3.	Deoksihemoglobin	10
Şekil 4.	Deoksihemoglobinin kare düzlem-kubbe geometriye dönüşümü	11
Şekil 5.	UV-Vis bölgede absorpsiyona neden olan aminoasitler	13
Şekil 6.	Hb UV-Vis spektrumlar	14
Şekil 7.	Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar	18
Şekil 8.	Nanopartiküllerin Tedavide Kullanımı	18
Şekil 9.	"Isı Web of Science" arama motorunda "gümüş nanopartikül" kelimeleri ile yapılan arama sonucu	20
Şekil 10.	Gümüş nano partiküller üzerine araştırma alanları	21
Şekil 11.	1999- 2008 arası yayınlanan silika kaplı manyetik nanopartikül araştırmalar	23
Şekil 12.	Magnetit molekülü	28
Şekil 13.	Magnetitin elde edilişi	28
Şekil 14.	Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü	29
Şekil 15.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere alkol yapısı kazandırılması	30
Şekil 16.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin aldehite çevrilmesi	31
Şekil 17.	Magnetitin trietanol amin ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü	32
Şekil 18.	Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül eldesi	33
Şekil 19.	Manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü	34
Şekil 20.	Magnetitlerin 3-(aminopropil)trimetoksisilan ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü	35
Şekil 21.	3-(aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu; moleküler ve deneysel görüntü	36
Şekil 22.	Manyetik nanopartiküllere Hb immobilizasyonu	37
Şekil 23.	Endotel hücre kültürü inverted mikroskop görüntüsü	40
Şekil 24.	Thoma lamı incelemesinde endotel hücreleri	41
Şekil 25.	Magnetitin FT-IR spektrumu	46
Şekil 26.	Manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu	47
Şekil 27.	Magnetitin C-TEM görüntüleri	48
Şekil 28.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	49
Şekil 29.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Spektrumu	49
Şekil 30.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri	50
Şekil 31.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri	51
Şekil 32.	Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	52
Şekil 33.	Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu	53
Şekil 34.	Aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu	54
Şekil 35.	Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri	54
Şekil 36.	Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri	55
Şekil 37.	Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu	56
Şekil 38.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu	57
Şekil 39.	Oksihemoglobine ait UV-Vis spektrumu	57
Şekil 40.	Serbest hemoglobinlerin oda ısısında 3 hafta sonraki UV-Vis spektrumu	58
Şekil 41.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin bağlandıktan 3 hafta sonraki UV-Vis spektrumu	58
Şekil 42.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu	59
Şekil 43.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri	60
Şekil 44.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri	60

Şekil 45. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramı....62
Şekil 46. Siklik voltogramlar....62
Şekil 47. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün FT-IR spektrumu....65
Şekil 48. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD spektrumu....66
Şekil 49. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün C-TEM görüntüleri....67
Şekil 50. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri....67
Şekil 51. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün FT-IR spektrumu....69
Şekil 52. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD spektrumu....69
Şekil 53. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün C-TEM görüntüleri....71
Şekil 54. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün SEM görüntüleri....71
Şekil 55. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu....73
Şekil 56. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu....73
Şekil 57. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu....74
Şekil 58. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri....75
Şekil 59. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri....75
Şekil 60. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramtogramı....77
Şekil 61. Siklik voltogramtogramlar....77
Şekil 62. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu....80
Şekil 63. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu....81
Şekil 64. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri.....82
Şekil 65. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri....82
Şekil 66. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu....83
Şekil 67. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu....84
Şekil 68. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri.....85
Şekil 69. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri....85
Şekil 70. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu....87
Şekil 71. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış oksihemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu....87
Şekil 72. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu....88
Şekil 73. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri....89
Şekil 74. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri....89
Şekil 75. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramı....91
Şekil 76. Siklik voltogramlar....91
Şekil 77. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu....94
Şekil 78. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu....95
Şekil 79. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri....96
Şekil 80. GAMNP'nin SEM görüntüleri....96
Şekil 81. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu....97
Şekil 82. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış oksihemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu....98

Şekil 83. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu 98
Şekil 84. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri. 99
Şekil 85. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin siklik voltogramı....100
Şekil 86. Siklik voltogramlar....100
Şekil 87. Deneysel grupların hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi 104
Şekil 88. Saf mnp'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir....105
Şekil 89. Saf Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.....106
Şekil 90. GAMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir....107
Şekil 91. 3 APGAMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir. 108
Şekil 92. TEALMNP-Hb'in endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir. 109
Şekil 93. TALMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.....110

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge No:		Sayfa No:
Çizelge 1	Oksijen taşıyan çözeltilerin potansiyel klinik uygulamaları	4
Çizelge 2.	Nanoteknolojinin amacı	15
Çizelge 3.	Nanoteknolojinin geçirdiği aşamalar	16
Çizelge 4.	Nanopartikül teknolojisinin uygulamaları	17
Çizelge 5.	Akış şeması	27
Çizelge 6.	Manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri	47
Çizelge 7.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Analiz Verileri	50
Çizelge 8.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları	51
Çizelge 9.	Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Analiz verileri	53
Çizelge 10.	Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları	55
Çizelge 11.	Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri	56
Çizelge 12.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD analiz verileri	59
Çizelge 13.	Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz sonuçları	61
Çizelge 14.	Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD verileri	66
Çizelge 15.	Trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları	68
Çizelge 16.	Trietanal amin Kaplı Manyetik nanopartikülün XRD verileri	70
Çizelge 17.	Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları	72
Çizelge 18.	Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri	74
Çizelge 19.	Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz sonuçları	76
Çizelge 20.	3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri	81
Çizelge 21.	3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış manyetik nanopartiküllere EDX elementel analiz verileri	83
Çizelge 22.	Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz sonuçları	84
Çizelge 23.	3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere EDX elementel analiz verileri.	86
Çizelge 24.	3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri.	88
Çizelge 25.	3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz verileri	90
Çizelge 26.	Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD verileri	95
Çizelge 27.	Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri	99
Çizelge 28.	4 farklı metodla sentezlenen partikül boyutları ve Hb yüzdeleri	103
Çizelge 29.	EDX ve Khejdahl metoduna göre sentezlenen komplekslerin elementel yüzedeleri	103
Çizelge 30.	Deneysel grupların hücre proliferasyonu çalışmasında elde edilen absorban değerleri.	104
Çizelge 31.	Saf mnp uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	105
Çizelge 32.	Saf Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	106
Çizelge 33.	Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartikül uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	107
Çizelge 34.	3APGAMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	108
Çizelge 35.	TEALMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	109
Çizelge 36.	TALMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri	110

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AuNPs : Altın nanopartikül

CAT : Katalaz

C-TEM : Yüksek kontrastlı transmisyon elektron mikroskobu

CV : Siklik Voltogram

EDX : Elementel analiz

ER : Endoplazmik retikulum

FDA : Food and drug administration

FT-IR : Fourier Dönüşümlü Infrared Spektrofotometre

GA : Glutaraldehit

GAMNP : Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartikül

GAMNP-Hb : Glutaraldehit kaplı mnp'lere bağlı hemoglobin

GPx : Glutatyon peroksidaz

Hb : Hemoglobin

HBOCs : Hemoglobin bazlı oksijen taşıyıcılar

HIV : Human immunodeficiency virus

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

ICP-OES : İndüktif eşlenmiş plazma atomik emisyon spektroskopisi

MNP : Manyetik nanopartikül

MONPs : Metal oksit nanopartikül

MTT : Metiltiazol difenil tetrazolyum

NO : Nitrik oksit

$OH^{\cdot}$: Hidroksil radikalleri

PCC : Piridinyum kloro kromat

PFC : Perflorokarbon

ROS : Reaktif oksijen türleri

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SOD : Süperoksit dismutaz

SPE : Solid faz ekstraksiyonu

TA : Tartarik asit

TACMNP	**:** Tartarik asit kaplı mnp'lerden elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartikül
TALMNP	**:** Tartarik asit türevli aldehit kaplı mnp'ler
TALMNP-Hb	**:** Tartarik asit türevli mnp destekli hemoglobinler
TAMNP	**:** Tartarik asit kaplı mnp
TEA	**:** Trietanol amin
TEALMNP	**:** Trietanol amin temelli aldehit kaplı mnp'ler
TEALMNP-Hb	**:** Trietanal amin kaplı mnp destekli hemoglobin
TEAMNP	**:** Trietanol amin kaplı mnp'ler
3APGAMNP	**:** Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(aminopropil) trimetoksi silan kaplı mnp'ler
3APGAMNP–Hb	**:** 3-(aminopropil) trimetoksi silan kaplı mnp destekli hemoglobinler
3APMNP	**:** 3-(aminopropil) trimetoksi silan kaplı mnp'ler
3APTMS	**:** 3-(aminopropil) trimetoksi silan
XRD	**:** X-ray Diffraction Spectroscopy

ÖZET

Kanda Oksijen Taşınımında Destek Biomalzemenin Geliştirilmesi

Kan toplama ve muhafaza etme konusundaki problemler, ek maliyet, dünya çapındaki rezerv noksanlığı gibi sorunlar, kan yerine geçen maddelerin geliştirilmesine yol açmıştır. Yapay kan çalışmaları temel olarak; oksijen taşıyıcı bileşiklerin gerçekleştirilmesini ve geliştirilmesini hedef alır.

Bu çalışmada temel hedef, kan alternatifi olabilecek, kan yokluğunda hayat kurtarması hedeflenen destekleyici ve oksijen taşıyabilen, biyolojik bir malzemenin geliştirilmesidir. Çalışmada öncelikle süper paramanyetik nanopartiküller (Magnetit) sentezlenmiş, sentezlenen bu malzemelerin (Fe_3O_4) boyut stabilizasyonunu sağlamak amacıyla, tartarik asit, glutaraldehit, trietanolamin, 3 amino trimetoksi silan olarak 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Sentezlenen bu nanopartiküller organik moleküllerle bağlanabilmesi için aşamalı olarak yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. FT-IR, Elementel analiz, SEM, XRD, ICP, C-TEM analizleri ile karakterizasyonları yapılan partiküllerin yüzeyine saf hemoglobin molekülleri bağlanıp karakterizasyon çalışmaları tekrarlanmıştır. Ayrıca Siklik voltogram ve UV analizleri ile bağlanan hemoglobin moleküllerinin oksijen bağlama-bırakma kapasitesi incelenmiştir.

Doğal eritrositleri taklit etmek üzere sentezlenen hemoglobin (Hb) bağlanmış süper paramanyetik nano partiküllerin *in vitro* koşullarda toksik etkilerinin saptanması amacı ile de endotel hücre kültürü üzerinde etkileri incelemiştir. Belirli derişimde 10 µl (1mg/10ml) manyetik nanopartiküller belirli zamanlarda (24 saat), hazırlanan hücre hatlarına muamele edilmiştir. Hücrelerin vermiş olduğu olası toksik etkilerin değerlendirilmesi için de hücre proliferasyonu ile endotel hücre süperoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz aktivite değişimleri (n=8) araştırılmıştır.

Bu çalışma kan alternatifi bir yapay biyomalzemenin preoperatif ve operatif olarak kullanılabilmesi amacıyla geliştirilmiştir. Yapılan çalışmanın bu aşamalarının, sentezi gerçekleştirilen hemoglobin bazlı mnp'lerin optimizasyonu/ kullanılabilirliği açısından bir adım olacağı ve ileriki dönemlerde farklı alanlarda uygulama imkanı sağlayacağı düşünülmektedir.

<u>Anahtar Kelimeler:</u> Endotel hücre, hemoglobin, manyetik nanopartikül, yapay kan

ABSTRACT

The Development Of Support Biomaterial That For Transporting of Oxygen In The Blood

Problems on blood collection and storage, excessive costs, reserve deficiency around the world has led to development of the material instead of blood. Artificial blood works base development of the oxygen-carrying compound.

The main objective of this work is development of biological material that will be blood alternative, capable of carrying oxygen and life-saving targeted in the absence of blood. Firstly, superparamagnetic nanoparticles (MNPs) were synthesized, four different methods that are tartaricacid, glutaraldehyde, triethanolamine, 3-aminopropyltriethoxysilane were used for providing size stability of these materials. The surface of nanoparticles were gradually modified for connecting to organic molecules. Magnetic nanoparticles were characterized by FT-IR, elemental analysis, SEM, XRD, ICP, C-TEM. Pure hemoglobin molecules connected to surface of nanoparticles and has made repeated efforts characterization. Cyclic voltammetry and UV-Vis also used for invastigation of oxygen bolding-leaving ability of hemoglobine molecules.

Hemoglobin bonded MNPs that mimic the natural erythrocyte were treated on the cell lines of endothelial cells culture to determine toxic effects of particles *in* vitro condition. 10 ml suspension of MNPs at definite concentration (1 mg/10 ml) treated on prepared cell lines at definite times (24 hours). Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx) activities and cell proliferation were investigated (n=8) for the determining the possible toxic effects of the cells.

Currently, an artificial biomaterial alternative of blood was developed to use in preoperative and operative applications. It is thought that conducted this stage of study is a step for optimization/usability of synthesized hemoglobin-based solution and provide practice opportunities in different areas in future.

Keywords: **Endothelial cell, hemoglobin, magnetic nanoparticles, artificial blood**

1. GİRİŞ

Kan yerine geçebilecek, saklanmasında özel koşullar gerektirmeyen, alıcının kan grubundan bağımsız olarak tüm bireylere uygulanabilen bir madde arayışına uzun süre önce başlanmıştır. İkinci Dünya Savaşı'ndan itibaren ise savaşlarda ve büyük çaplı sivil felaketlerde kullanılacak, kan yerine geçen alternatif bir madde bulma arayışları giderek artmıştır. Yapay kan araştırmaları kan yerine geçebileceği düşünülmüş madde denemelerinin tamamını kapsamaktadır. Bu amaçla denemelerde kullanılmış maddeler arasında süt, kazein türevleri, nişasta, salin ve ringer sayılabilir. Günümüzde kan bileşenleri, bu bileşenlerin işlevleri ve oksijen taşıma kapasiteleri hakkında geniş çaplı bilgiye sahip olunmasına rağmen alternatif yapay kan arayışları ve araştırmaları devam etmektedir (1,2).

Doğal hemoglobinin (Hb) insanda kullanımında toksik etki gösterdiğinin belirlenmesiyle birlikte, modifiye Hb geliştirme çalışmalarına odaklanılmış ve bu çalışmalar gün geçtikçe artmıştır[2]. Kemirgen hayvanlarda gerçekleştirilen yapay kan transfüzyonu çalışmalarında kırmızı kan hücreleri hemoliz edilerek hazırlanan Hb çözeltileri denenmiş; bu çözeltinin dokulara oksijen taşıyabildiği ancak karaciğerde çok toksik etki gösterdiği ve tansiyon yükselmesine neden olduğu belirlenmiştir (2,3). Buna ek olarak, Hb çözeltisi ile yapılan faz 1 kan transfüzyonu çalışmalarında böbrekler ve vazoaktif yapı üzerine toksik etki gösterilmiştir (2,3).

Perflorokarbonlar (PFC), hidrojen atomları yerine flor atomlarının bağlanmış olduğu hidrokarbon benzeri durağan bileşiklerdir. Hb tabanlı kan yerine geçen maddelerin aksine PFC'lar oksijen ve diğer gazlarla reaksiyona girmemesi, plazma hücresindeki oksijen çözünürlüğünü arttırması, oksijenin alyuvarlardan dokuya transferini kolaylaştırması gibi avantajlara sahiptir. Ancak, suda çözünebilir olmaları nedeniyle damar içi kullanım öncesi emülsifikasyon ihtiyacı hissedilmiştir (4).

Bilgi teknolojilerinin gelişmesiyle birlikte yapay kan çalışmalarında "Respirosit" adı verilen, kendi mantığıyla malzeme transferi yapabilecek, istenilen bölgeyi tamir edebilecek yeteneğe sahip, yapay eritrosit otomasyonları üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. Matematik, mekanik ve bilgi teknolojileri ile geliştirilen bu otomasyon sisteminin çip ya da algılayıcı kullanılarak kontrolünün yapılmasına çalışılmaktadır. İnsan denemeleri henüz yapılmamış olan bu sistem sayesinde, enfeksiyon durumunda

vücuttaki durumun değerlendirilmesi ve iyileşme sürecinde gerekli olan ilaçların hedefe taşınımı amaçlanmaktadır (5).

Kök hücreler, erken yaşam ve büyüme döneminde organizmada pek çok farklı hücre tiplerine gelişmek için olağanüstü bir potansiyele sahiptir. Bu hücreler canlının yaşamı boyunca diğer hücrelerin yenilenmesini sağlayarak temelde iç onarım sistemi olarak hizmet vermektedirler. Bir kök hücre bölünmesinden oluşan yeni hücreler kas, beyin, kırmızı kan hücresi gibi birçok özgül işlevlere farklılaşabilecek hücre potansiyeline sahiptirler. Kök hücrelerin bu potansiyelleri *ex vivo* olarak kırmızı kan hücreleri üretiminde kullanılabilmesi fikrinin doğmasına neden olmuştur. İnsan eritroid kök hücrelerin çalışmalarda kullanılmaya başlaması, kan transfüzyonu için eritroid hücrelerinin *in vitro* ortamda büyük miktarda üretimini ve eritropoiez hakkında bilgilerimizin arttırılmasını sağlayacak büyük fırsatlar sunacaktır (6).

Bu çalışmada, doğal kana alternatif olabilecek bir potansiyele sahip biyomalzeme geliştirilebilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın temel öngörüsü, katı destek üzerine biyolojik moleküllerin stabilize olabileceği ve bu katı desteklerin boyut ve yüzey optimizasyonları ile doğal kana destek olabilecek bir biyomalzeme üretilebileceğidir. Çalışmamızda katı destek olarak farklı yüzeye sahip manyetik nanopartiküller ve oksijen taşıyıcı biyolojik molekül modeli olarak Hb kullanılması amaçlanmıştır. İleri çalışma olarak sentez edilen kompleks biyomoleküllerin oksijen taşıma ve bırakma işlevi ile hücre kültüründeki davranışlarının ve antioksidan enzimler üzerine etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Yapay kan nedir

Kan grubuna bakılmaksızın istenilen yerde ve zamanda güvenli bir şekilde nakledilebilecek ve rafta uzun süre saklanabilecek kan yerine geçen uygun bir madde yıllardır aranmaktadır. Kurallara bakıldığında, otolog kan dışında herhangi bir maddenin dolaşıma transfüzyonu gerçekte kan yerine geçen bir maddenin transfüzyonudur. Bu nedenle kan naklinin tarihçesi kan yerine geçen maddenin tarihçesi olarak görülebilir. Süt, kazein türevleri, nişasta, salin ve Ringer çözeltisi insandan insana ilk başarılı kan nakli öncesinde denenmiş maddelerdir. İkinci Dünya savaşı'ndan bu yana savaş benzeri durumlarla ve büyük çaplı sivil felaketlerle başa çıkabilmek için kan yerine geçen alternatif bir madde bulma arayışı artmıştır. Her bir kan bileşeninin fonksiyonları ve bunların derişimi, oksijen taşıma kapasitesi dışında, oldukça iyi bilinmektedir. Zamanla kan yerine geçen bu maddelerin geliştirilmesinde dikkate değer gelişme olmuştur (4).

Özellikle transfüzyon ile bulaşan hastalıklar (HIV ve Hepatit) ve lökosit aracılı allo hassasiyet gibi istenmeyen yan etkilerin giderilmesi modern transfüzyon tıbbının önemli bir amacıdır. Kan toplama ve muhafaza etme konusundaki yüksek maliyet, dünya çapındaki rezerv noksanlığı ve diğer problemler kan yerine geçen maddelerin geliştirmesine yol açan itici güçlerdir. Bu konuda yapılan araştırma alanlarının başlıcaları Hb bazlı oksijen taşıyıcılarıdır (HBOCs) (4).

Kusursuz alyuvarların yerini tam olarak tutmasalar da bu "oksijen taşıyıcı çözeltiler" in klinik ve klinik olmayan birçok potansiyel kullanım alanı bulunmaktadır. Bu maddeler dokulara normal alyuvarlardan daha kolay ulaşıp, direkt olarak oksijeni dokuya iletebilirler, ayrıca bu maddelerin de yan etkileri yok değildir. Güvenilirlikleri ve faydaları konusunda kapsamlı klinik çalışmalar yapılmaktadır. Bu ürünlerin etki şekillerini daha iyi anlamak uygulamalarını ve yararlıklarını tanımlamaya yardımcı olacaktır (Çizelge 1). Ancak klinik çalışmalardan ve FDA (Food and Administration) tarafından onaylandıktan sonra hastalar üzerinde uygulanabileceklerdir (4,8).

Çizelge 1 Oksijen taşıyan çözeltilerin potansiyel klinik uygulamaları (4).

1. Terapi
(a) Kan yerine geçen maddeler: Hemorajik şok, kanama (savaş, ameliyat), anemi.
(b) Bütün vücuttaki kan değişmi: Akut ilaç zehirlenmesi, akut karaciğer yetmezliği.
(c) Bölgesel anemi: Akut miyokard enfarktüs, gelişen miyokard enfarktüs, kalp yetmezliği, beyin enfarktüsü, akut artelyel trombozlar ve emboli, koroner atardamar perkutan transluminal koroner anjiyoplastisi.
(d) Genel iskemi: Gaz embolizmi, karbon monoksit zehirlenmesi
(e) Organların iyileşmesine yardımcı olarak: Akut böbrek yetmezliği, akut pankreatit.
(f) Bulaşıcı hastalık: Anaerobik ve aerobik hastalıklar.
(g) Yardımcı terapi: Tümör radyoterapi, kemoterapi.
2. Ameliyat esnasında organların perfüzyonel korunumu - kardiyopulmoner bypass, derin hipotermi, kalp durması, kardiyopleji.
3. Bağışlanan organın muhafazası.
4. İlaç taşıyıcı – İlaç bağlı Hb ve perfloro kimyasallar
5. Kontrast madde - (Perfloro-oktilbromid)
Klinik olmayan uygulamalar
1. Kültür ortamı.
2. Kimyasal muayene – oksijen sensörü – oksijen kalibratörü için standart çözelti.
3. Biyoreaktör.
(Yüksek oksijen duyarlıklı) paradoksal kullanımları
1. Oksijen absorbanı.
2. Maling tümör için radyoterapi ve kemoterapi ile kombine olarak oksijen tedavisi.

2.1.1. Tarihsel süreç

Yapay kan, vücutta doğal kan kıtlığında yaşamı kurtarabilme kapasitesine sahip oksijen taşıyan bir maddedir. Bu maddeler doğal kana oranla çok yönlü özelliklere sahip maddelerdir. Bu özelliklerinin başında uzun raf ömrü, soğuk muhafaza edilmeye ihtiyaç duymaması ve sterilizasyon yeteneği sayılabilir. Kan üzerine çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir (7,8):

1- 1616, William Harvey tarafından kanın keşfi ile birçok araştırıcı idrar, bira, süt gibi sıvıları kan yerine kullanmayı denemişlerdir.

2- 1989, Fluosol-DA-20 olarak isimlendirilen ilk oksijen taşıyan perflorokarbon tabanlı yapay kanın onaylanması. Japonya'da üretilmiştir. Gıda ve ilaç idaresi tarafından onaylanmıştır.

3- 1990, haemopure isimli Hb tabanlı oksijen taşıyıcıları üretilmiş ve faz III çalışmalarına kadar onaylanmıştır.

4- 2003, Poliheme adı verilen yeni bir Hb tabanlı oksijen taşıyıcısının üretilmesi ve deneme çalışmalarında kullanımları söz konusudur (7,8).

2.1.2. İdeal bir yapay kan çözeltisinde istenilen özellikler

1- Güvenle kullanılabilmelidir,

2- İnsan vücuduna uyumlu olmalıdır,

3- Oksijen taşıyabilmeli ve gerekli yerlerde oksijeni serbestleştirebilmelidir,

4- İmmün sistem tarafından oluşabilecek herhangi bir patojenik ve toksik etkisi olmamalıdır,

5- Yapay ya da sentetik kan "oksijen taşıyıcılar" olarak bilinir. Hücresel yapıları, koagülasyon faktörleri ve antikorlara sahip olmadığından bu taşıyıcılar doğal kanın diğer fonksiyonlarını yerine getiremezler. Taşıyıcıların esas işlevleri kaybedilen kan replasmanını sağlamaları ve oksijen taşıyabilmeleridir,

6- İdeal bir yapay kan bağışlanan donör kanına rakip olabilmeli hatta ondan daha avantajlı olabilmelidir.

7- Oksijen taşıma kapasitesi biyolojik kan gibi olabilmelidir,

8- Minimum yan etkisi olmalıdır,

9- Geniş sıcaklık aralıklarında bozulmamalıdır,

10- Raf ömrü yüksek olmalıdır,

11- Maliyeti uygun olmalıdır (7,8).

2.1.3. Genel problemler

1- İmmün sistemin olumsuz tepki gösterebilmesi,

2- Sıklıkla alıcı olarak kullanılan travma hastalarında meydana gelebilecek olumsuz etkilerin henüz anlaşılamamış olmasının getirdiği zorluklar (7).

2.2. Hemoglobin

Hb molekülü mol kütlesi 64.500 dalton (Da) olan temel işlevi oksijen taşıma olan metallo protein yapıda moleküldür (10). Yetişkin insan Hb molekülü, globin olarak bilinen 4 polipeptid zincirinden oluşur. Bunlardan ikisi her biri 141 aminoasitten oluşan alfa zinciri ve diğer ikisi 146 aminoasitten oluşan beta zincirlerinden meydana gelmiştir (8-11).

Hb ilk defa 1840 yılında Hunefeld tarafından bulunmuştur (12). 18. yüzyılda J.F.Engelhard, birçok türdeki Hb'de demir atomlarının proteine oranını belirlemiştir (9). Gilbert Smithson Adair 1925 yılında Hb çözeltisinin osmotik basıncını ölçmüştür. Felix Hoppe-Seyler Hb'nin tersinir oksijenasyonunu keşfetmiştir. 1959'da Max Perutz miyoglobinin molekül yapısını X-ray kristalografisiyle belirlemiştir (9,13).

Hb oksijeni solungaç veya akciğerlerden dokulara taşıma görevini yapar (14), memelilerde kuru kan hücrelerinin kütlece %96-97'sini (15), toplam içeriğin ise %35'ini oluşturur (16). Oksijen plazmada $1x10^{-4}$ M çözünür ancak bu değer hayvanların metabolik ihtiyaçları için yetersizdir. Memelilerde Hb molekülü 4 oksijen molekülü taşıyabilir. Tam kanın litresinde yaklaşık 150 g Hb bulunur. Hb gram başına 1,34 mL O_2 taşıma kapasitesine sahiptir (17,18). Bu değer kanda çözünmüş toplam oksijen miktarının 70 katından fazladır.

Hb oksijen dışında diğer gazların da taşınımı görevini yapar; solunumda karbon dioksiti (CO_2) (toplamın %10'u) globin proteinine bağlayarak karbaminohemoglobin adı verilen yapıyı oluşturur ve bu şekilde karbondioksiti taşıma görevi yapar. Molekül aynı zamanda önemli bir nitrik oksit (NO) molekülü düzenleyicisi ve taşıyıcısı olarak davranır. NO globin proteinindeki tiol grubuna bağlandığında diğer yandan da oksijen serbest hale geçer. Ayrıca, 2,3 bifosfogliseratta eritrositlerde oldukça yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. 2,3-bifosfogliseratın hemoglobinin oksijen için ilgisini büyük ölçüde düşürdüğü bilinmektedir. 2,3-bifosfogliserat hemoglobinin oksijene olan ilgisini hemoglobinin T halini stabilize ederek düşürür (11,19,20).

İnsanda Hb temel olarak kırmızı kan hücrelerinde bulunur. Hb ve Hb benzeri moleküller birçok omurgasız, mantar ve bitkide gösterilmiştir. Oksijen taşıyıcısı olan bu metalloprotein (Hb) tüm omurgalılarda mevcuttur. Hb'nin temel görevi akciğerlerden periferal dokulara oksijenin iletilmesini; periferal dokulardan akciğerlere ise karbon dioksitin taşınmasını ve düzenlenmesini sağlamaktır (12).

İnsan Hb'i, 11. ve 16. kromozomlar üzerinde bulunan α benzeri ve β benzeri gen bölgesi olmak üzere iki gen dizisi tarafından kodlanır. Yetişkin Hb'i olan HbA_1 iki α globin zinciri ve iki β globin zincirinden oluşan bir tetramerdir. Her globin zinciri bir hem parçası içerir, bu kısımda bulunan demir atomu sayesinde zincirler oksijen taşıyabilmektedir. Dört polipeptit zinciri tuz köprüleri, hidrojen bağları ve hidrofobik etkilerle birbirlerine bağlanır (12).

İnsanlarda altı tip Hb bulunur; bunlar, embriyonik, Gower-I, Gower-II, Portland, fetal Hb (HbF) ve yetişkin hemoglobinleridir (HbA_1 ve HbA_2) (21).

Hemoglobinlerdeki globin proteinlerinin aminoasit sırası, türlerde farklılık gösterir. Örneğin evrimsel açıdan yakın olan insan ve şempanze hemoglobini benzerlik gösterir, alfa ve beta globinleri sadece birer aminoasit farklıdır. Hb genlerinin mutasyonları da Hb proteinlerinde çeşitliliğine neden olur (22). Hemoglobinlerin mutant formlarının bazıları hastalığa neden olmazken bir bölümü hemoglobinopatilere neden olur. En yaygın hemoglobinopati hastalıkları orak hücre anemisi ve talasemilerdir (23).

2.2.1. Sentezi

Hb birçok kompleks adımda sentezlenir. Hem parçası, olgunlaşmamış kırmızı kan hücrelerinin mitokondri ve sitosolün de bir dizi tepkime sonrasında porfirin biyosentezi denilen enzimatik tepkimelerle elde edilirken, globin protein parçaları sitosolde ribozomlar tarafından yapılmaktadır. Kemik iliğinde proeritroblastın retikulosite dönüşümü sırasında Hb üretimi devam eder (24).

2.2.2. Yapısı

Hb, globin adı verilen 4 globüler protein zincirin bir araya gelerek oluşturduğu karakteristik kuaterner yapıya sahiptir (25). Aminoasitlerin çoğu, helikal yapıda olmayan kısa parçalarla birbirine bağlanmış alfa heliks özelliktedirler. Globinlerin içerisindeki bu bölgeler hidrojen bağları ile stabilize edilerek zincirler spesifik şeklini alır. Hemoglobinin kuaterner yapısı, 4 altbiriminin tetrahedral düzenlenmesiyle oluşmaktadır. Bu zincirlere bir protein olmayan hem grubu eşlik eder. Globin zincirlerinin alfa heliks katlanmaları hem grubunun kuvvetlice bağlanması ve paket haline gelmesine neden olur (26,27).

Bir hem grubu, bir demir iyonunun porfirin olarak bilinen heterosiklik halkaya bağlanmasıyla oluşur. Hem çekirdeği Ferroprotoporfirin IX olarak da adlandırılır (17). Demir iyonu, pirol halkalarındaki merkezinde 4 azot ile bağlanır, böylece atomlar aynı düzlemde bulunur. Demir, ayrıca porfirin halkasının alt kısmında bulunan F8 konumundaki histidin aminoasidinin imidazol halkası üzerinden globüler proteine kuvvetli bir şekilde bağlanır. Demirin 6.pozisyonuna ise koordine kovalent bağ ile oksijen bağlanır ve böylece oktahedral geometri tamamlanmış olur. Bir oksijen molekülünün demire bağlanmasıyla geometride değişimler olur ve diğer demir atomları açığa çıkar. Oksijen bağlanmadığında ise koordinasyon boşluklarına su molekülleri zayıf bir şekilde bağlanır ve oktahedral geometri bozulur (28).

Oksijen vücutta kan yolu ile taşınırken karbondioksitin bir bölümü de hemoglobinle taşınır. Bu taşıma oksijenin bağlandığı noktadan olmaz ancak yapıdaki protein zincirlerinin amino gruplarına bağlanmasıyla gerçekleşir.

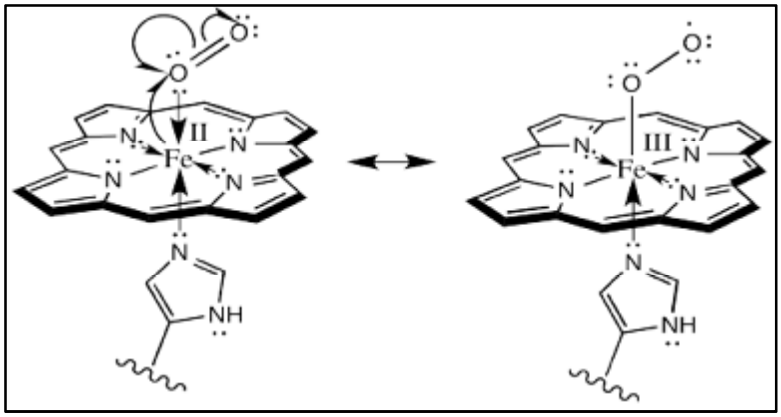
Demir atomu Hb içerisinde Fe^{2+} veya Fe^{3+} şeklinde olabilir. Ancak ferrihemoglobin (methemoglobin) (Fe^{3+}) oksijeni bağlayamaz (29). Oksijen geçici olarak bağlanırken ve Fe^{2+}, Fe^{3+}'ya çevrilir, bu sırada oksijen de süperoksit radikaline dönüşür. (30). Eğer süperoksit iyonu protonlanırsa, Hb demiri oksit formunda kalır ve oksijen bağı zayıflar. Bu durumda, methemoglobin reduktaz enzimi merkezdeki demiri Fe^{+2} formuna dönüştürerek hemoglobinin yeniden oksijen taşıyabilir duruma gelmesini sağlar.

Yetişkin insanlarda bilinen Hb tipi, birbirlerine kovalent olmayan bağlarla bağlı 4 globin ünitesinden oluşan ve HbA_1 olarak adlandırılan bir tetramerdir. Bu alt ünitelerden ikisi 141 aminoasit artığından oluşan α ve diğer ikisi 146 aminoasit artığından oluşan β zincirleridir. HbA_1 kısaca $\alpha_2\beta_2$ şeklinde gösterilir. Bu alt üniteler yapısal olarak benzer ve yaklaşık olarak aynı boyuttadır. Her bir alt ünitenin mol kütlesi 16.000 daltondur. Tetramerin mol kütlesi ise ~64.500 daltondur (64458 g/mol). Böylece 1 g/L = 0,1551 mmol/L'ye denk gelir. HbA_1 üzerinde en çok çalışma yapılan Hb molekülüdür. Yeni doğanlarda Hb moleküllerinin büyük bölümü HbF olarak tanımlanır. Bu molekül 2 α zinciri ve 2 γ zincirinden oluşur. Gama zinciri yeni doğan büyüdükçe zamanla β gen aktivasyonu ile β zincirine dönüşür. (31).

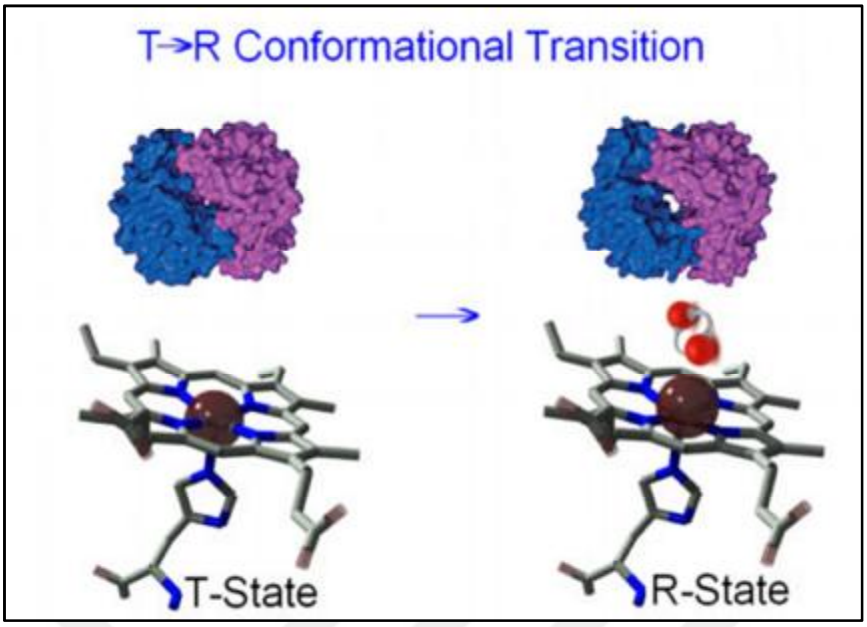
2.2.3. Oksihemoglobin

Oksihemoglobin solunum sırasında, hemoglobindeki hem grubuna oksijen bağlanmasıyla oluşur. Bu proses akciğer alveollerindeki kılcal boşluklarda gerçekleşir. Oksijen kan akışıyla birlikte hücrelere gider ve mitokondrilerde oksidatif fosforilasyon sırasında ATP'nin üretiminde terminal elektron alıcısı olarak kullanılır (Şekil 1).

Eritrositlerde Hb iki formda bulunur; gergin formu (T formu) ve serbest formu (R formu) (Şekil 2). Düşük pH, yüksek CO_2 derişimi ve yüksek 2,3-bisfosfogliserik asit (2,3-BPG) derişimi gibi çeşitli faktörlerin varlığıyla Hb T formundadır. Bu durum düşük oksijen afinitesi göstermesine neden olur ve dokulara verilmek üzere oksijen serbest hale geçer. Buna karşın, yüksek pH, düşük CO_2 derişimi ve düşük 2,3-BPG gibi faktörler ise R formunda olmasına, dolayısıyla oksijeni daha sıkı bağlamasına neden olur. Sistemin kısmi basıncı O_2 afinitesini etkileyen faktörlerden biridir; oksijenin kısmi basıncı yükseldiğinde (alveollerde olduğu gibi) R formu etkin olur. Oksijenin kısmi basıncı azaldığında ise (dokularda olduğu gibi) T formu etkindir. Buna ek olarak, oksijen-Fe^{2+} arasındaki bağ, solunumda konformasyonel olarak değişmelere neden olur. Bu konformasyondaki değişimle diğer 3 hem grubu açığa çıkar. Böylece diğer oksijenler de moleküle bağlanır. Hemoglobindeki konformasyonel değişimle oksijen-demir arasındaki bağ açılır ve oksijen serbest hale geçer. T-R arasındaki geçiş oksijen-protein arasındaki bu reaksiyonla birlikte molekül içi harekete bağlı olarak kuaterner yapıdaki değişimden kaynaklanmaktadır (32-34).



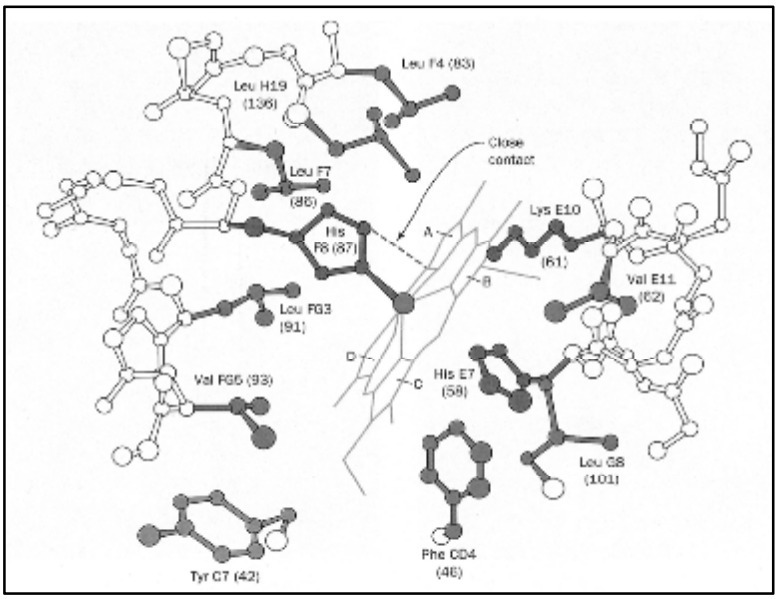
Şekil 1. Oksihemoglobin



Şekil 2. Hemoglobinin R ve S formu (35).

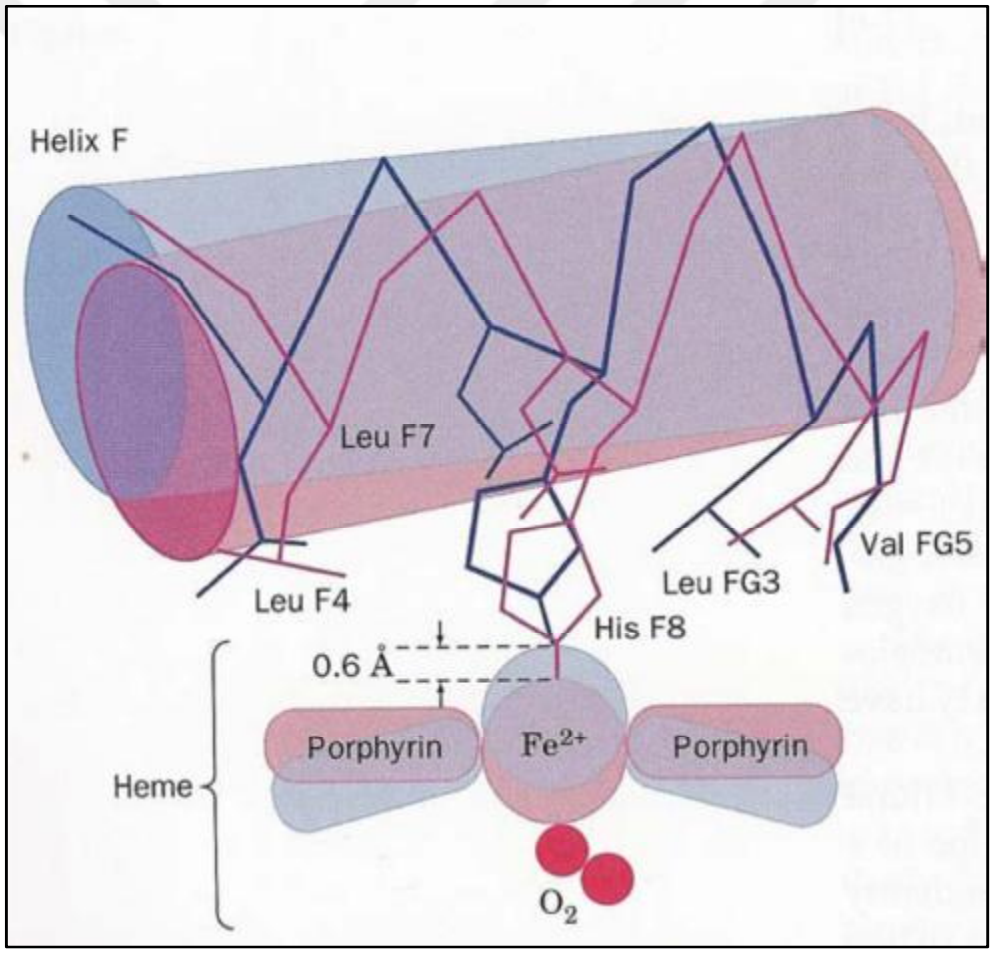
2.2.4. Deoksihemoglobin

Deoksihemoglobin, hemoglobinin oksijen molekülü ile bağlanmamış formudur. Oksihemoglobin ve deoksihemoglobinin absorpsiyon spektrumları birbirinden farklıdır. Oksihemoglobinin 660 nm'de absorpsiyonu deoksihemoglobinden daha düşükken 940 nm'deki absorpsiyonu daha yüksektir (36).



Şekil 3. Deoksihemoglobin (35).

Hb'de deoksijenize haldeki hem paketine yakın olan histidin (F8) merkezdeki demire bağlanarak kare piramit geometride yapı oluşturur (Şekil 3). Uzaktaki histidin (E7) ise oksijene haldeyken ligandın stabil olmasını sağlar. Bu histidinin eksikliğinde hem grubu kubbe şeklini alır. Oksijen bağlandığında ise demir oktahedral geometri kazanır. Burada E7 konumundaki histidin bağlanmış olan oksijenle hidrojen köprüsü oluşturarak stabil olmasını sağlar. Deoksi formda iken merkezdeki demir yakındaki histidin tarafından, hem grubunun kare düzleminden dışa doğru yaklaşık olarak 0,6 Å iterek kubbe şeklini almasına yol açar. Ancak oksijen bağlandığında eski haline dönerek kare düzlem olmasını sağlar (Şekil 4) (17).



Şekil 4. Deoksihemoglobinin kare düzlem-kubbe geometriye dönüşümü (17).

2.2.5. İnsanlarda hemoglobin Türleri

Normal embriyonik ve fetal gelişiminin değişik evrelerinde farklı Hb çeşitleri sentezlenir. Bunlar;

Embriyodaki türleri;

- Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$)
- Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$)
- Hb Portland I ($\zeta_2\gamma_2$)
- Hb Portland II ($\zeta_2\beta_2$)

Fetal türleri;

- HbF ($\alpha_2\gamma_2$)

Doğumdan sonraki türler;

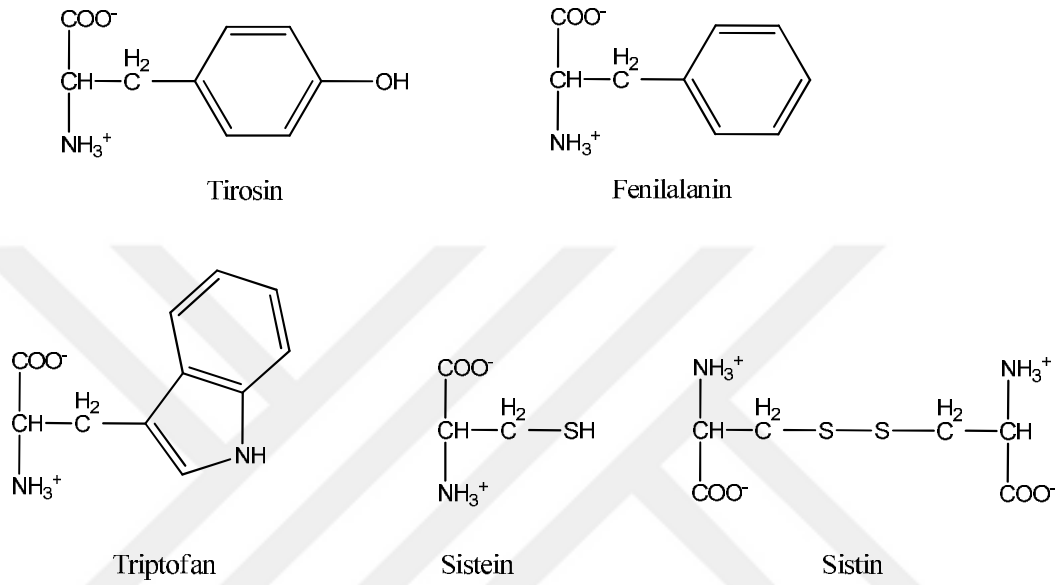
- HbA_1 ($\alpha_2\beta_2$) - Yaklaşık %95'lik oranla en yoğun bulunan Hb'dir.
- HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$)- δ zinciri doğumdan sonra üç aylık dönemden itibaren sentezlenir. Normalde %2,5-3,7 oranındadır.
- HbF ($\alpha_2\gamma_2$); Yetişkinlerde çok az miktarda bulunur. Eritrositlerde F-hücreleri olarak adlandırılan hücrelerde yer alır. 1 yaşında %1'in altına düşer ancak HbF seviyesi beta-talasemi ve orak hücre anemisi olan insanlarda artar (37).

2.2.6. Hemoglobin ve çeşitlerinin UV-Vis absorpsiyon özellikleri

Biyolojik sistemlerde, proteinler kimyasal bileşenlerinden kaynaklı olarak, UV-Vis spektroskopisinde birçok dalga boyunda absorbansa sahip olabilirler. Bunun nedeni aminoasitlerdeki kromofor gruplardır. Başlıca; tirozin, triptofan ve fenilalanin gibi aromatik kalıntılar, sistein ve onun türevi olan sistin gibi tiol içeren aminoasitler UV-Vis bölgede absorpsiyona neden olurlar; en bilineni 280nm'deki absorbans pikidir.

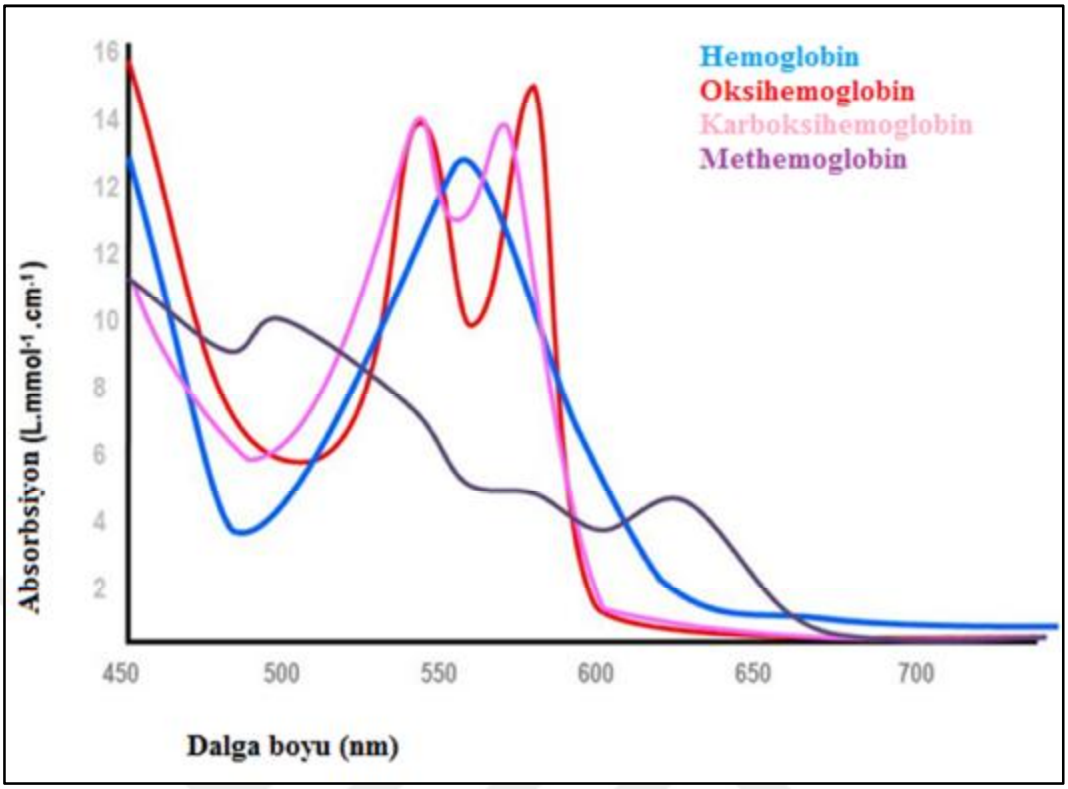
Triptofan, fenilalanin ve tirozin aromatik hidrofobik kalıntılar içerirler. Bunlar konjuge halka sistemine sahiptir ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinden kaynaklı olarak absorpsiyon gösterirler. Triptofanın indol tarafındaki bölgesi en yoğun absorpsiyonu verir. Fenilalanin kimyasal olarak aromatik kalıntıya sahiptir. Tirozinse ilave hidroksil grupları sayesinde kısmen daha polardır ve stabil olmak için hidrojen bağı yapar (Şekil

5). Dahası, hidroksil grupları bazik pH'da iyonlaşır ve bu sayede spektroskopik olarak verdikleri absorbans kullanılabilir. Sistein polar tiol grupları içerir ve başka bir sisteinin tiol grubu ile redoks reaksiyonu sonucu sistini oluşturur. Bu bağ proteinin stabil olmasını, üçüncül ve dördüncül yapısının oluşmasını sağlar.



Şekil 5. UV-Vis bölgede absorpsiyona neden olan aminoasitler (17).

Oksihemoglobin 270, 337, 417, 540, 575 nm'de karakteristik absorpsiyon pikleri verir. Methemoglobin ise 400 nm civarında geniş pik verir, bu pik oksihemoglobinin 417 nm'deki pikinin kayması sonucu meydana gelir. Yanısıra methemoglobin, oksihemoglobinin karakteristik pikleri olan 547 ve 575 nm'deki pikleri de vermez (17). Deoksihemoglobin formu ise 550 nm'de maksimum absorpsiyon yapar. Karboksihemoglobin ise oksihemoglobine benzer şekilde ikili pik verir ancak farklı olarak bu piklerin daha düşük dalga boylarına kaydığı ve 540-568 nm'de pik verdiği gözlenmiştir (Şekil 6) (38,39).



Şekil 6. Hb UV-Vis spektrumları (38).

2.3. Nanoteknoloji ve Nanomalzemeler:

Bir fiziksel büyüklüğün milyarda biri 'nano' olarak ifade edilir. 2–3 atomun yan yana dizilmesiyle oluşan uzunluk ise yaklaşık bir nanometredir. Günümüzde yüz nanometre boyutundan daha küçük yapıların araştırılıp incelendiği disipline nanoteknoloji adı verilmektedir. Nanometre boyutundaki bu yapıların üretilerek bir araya getirilmesiyle oluşturulan nanoparçacıkların sahip oldukları fizikokimyasal özelliklerinin kullanılması nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır (40,41).

Madde boyutunda bir araya gelmiş olan atomlar nano boyutlarda farklı bazı özellikler göstermeye başlamaktadırlar. Bu özelliklerden bazıları şunlardır;

- Oluşturulan partikül büyüklüğüne bağlı olarak parçacıklar optik ve yarı iletken özelliğe sahip olurlar.
- Nanoparçacıklar geniş yüzey/hacim oranına sahiptirler ve bu durum parçacıkların manyetik özelliklerini etkileyerek depolama kapasitelerinin artmasına neden olur.

- Yüzey alanının genişlemesi ve aktif merkezlerin yüzeyde bulunması nanomalzemelerin katalitik özellikte olmasını sağlar.

Materyallerin nano boyutlarda yüzey alanının artmasıyla birlikte daha aktif hale geçmesi çevrelerindeki diğer atom ve moleküllerle farklı etkileşimlere girmesini sağlar. Nano materyallerin yukarıda bahsettiğimiz, sahip oldukları farklı özelliklerinden dolayı farklı alanlarda uygulanma imkânı sağlamaktadır. Nano ölçeğe gidildikçe kazanılan bu fiziksel ve kimyasal özellikler değişik alanlarda uygulanma imkanı sağlamaktadır. Bu da Nanoteknolojinin amacını belirlemektedir (Çizelge 2) (42).

Çizelge 2. Nanoteknolojinin amacı (42).

Nanometre ölçekli yapıların analizi,
Nanometre boyutunda yapıların fiziksel özelliklerinin anlaşılması,
Nanometre ölçekli yapıların imalatı,
Nano hassasiyetli cihazların geliştirilmesi,
Nano ölçekli cihazların geliştirilmesi,
Uygun yöntemler bulunarak nanoskopik ve makroskopik dünya arasındaki bağın kurulmasıdır.

Bu malzemeler elde edilişlerine göre doğal ve yapay, kimyasal yapılarına göre inorganik, organik ve karışık, homojenitelerine göre tekli ya da hibrit kompozisyonlu olarak sınıflandırılabilirler. Farklı alanlardaki nanomalzeme uygulamaları son dönemlerde çok sayıda yayında gösterilmiştir (43-46).

2.3.1. Nanoteknolojide gelişim dönemleri

Nano boyuttaki malzemelerin biyoloji, fizik ve kimya gibi temel alanlarda önemli gelişmelere yol açması, buna bağlı olarak endüstriyel ülkelerin gelecek ile ilgili planlarında oldukça önemli bir yer tutması ve bir devrim oluşturabilecek güce sahip olduğu fikrinin var olması; günümüzde nanoteknolojinin öneminin gittikçe artmasını sağlamıştır. Yakın tarihte ülkelerin elinde bulunduracağı nanoteknolojik gücün ülkenin

gelişmişlik derecesini belirleyeceği düşünülmektedir. Aşağıda gösterilen tabloda nanoteknolojinin tarih boyunca geçirdiği aşamalar görülmektedir (Çizelge 3) (47).

Çizelge 3. Nanoteknolojinin geçirdiği aşamalar (47).

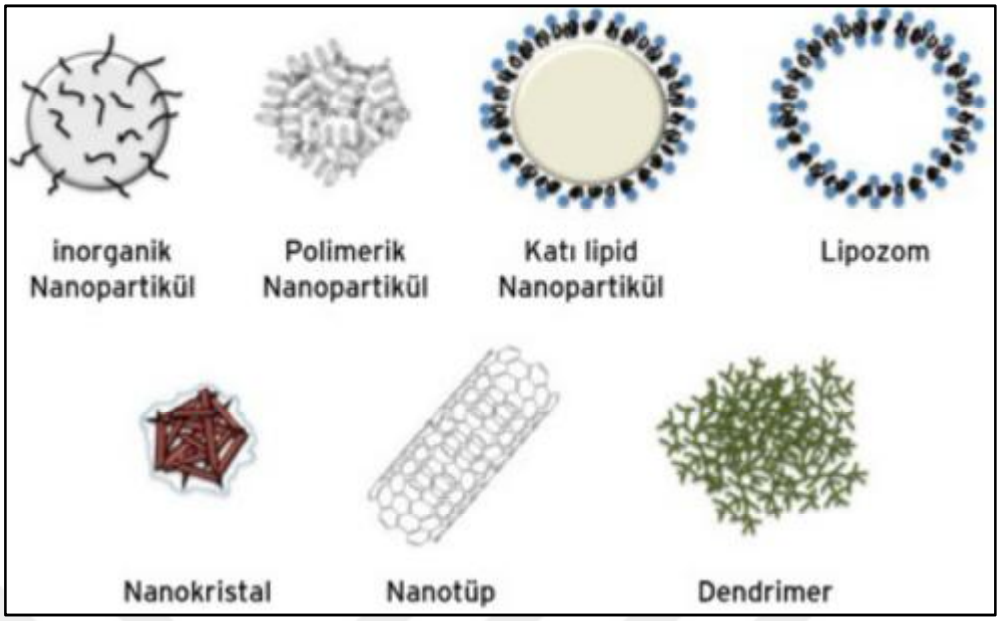
1959	Feynman'ın "Temelde birçok oda var" adını verdiği konferans
1974	"Nanoteknoloji" teriminin bulunması
1981	Taramalı tünelleme mikroskobunun bulunması
1985	Küre yapılıların keşfi
1986	Atomik güç mikroskobunun bulunması
1989	"IBM" kelimesinin bireysel atomların üzerine yazılması
1990	Küre yapılıların makroskopik boyutlarda ilk üretimi
1991	Nanotüplerin keşfi
1990'ların ortaları	Devletlerin nanoteknolojiyi başlıca araştırma ve geliştirme alanı olarak desteklemeye başlaması
2007	Tuv-Sud ve the Innovationsgesellschaft tarafından geliştirilen "Onaylanabilir Nanospesifik Risk Yönetimi ve Monitoraj Sistemi"nin ilk kalite damgası olarak - dünya çapında onaylanması (El-Samny, 2008)
2009	0,3 nm büyüklüğünde S ve U harflerinin yazılması (IBM'den 40 kat küçük)

2.3.2. Nanopartiküller

Çapları 100 nm'nin altında olan parçacıklara nanopartikül denir. Nanopartikül halindeki malzeme (Şekil 7), kütle halindekine göre üstün özelliklere sahiptir. Nanopartiküller doğada yaygın karbon ve gümüş çeşitleri halinde bulunmaktadır Biyomedikal, optik ve elektronik alandaki geniş uygulama alanı çok büyük bir ilgi uyandırmaktadır (Çizelge 4) (48).

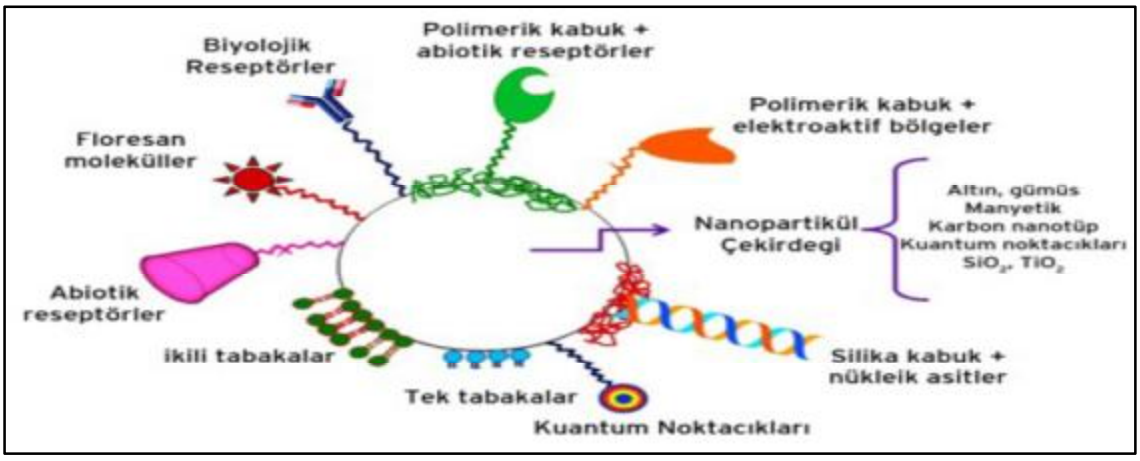
Çizelge 4. Nanopartikül teknolojisinin uygulamaları (48).

Uygulama Alanı	**Kullanım Şekilleri**
Kanser Tedavisi	Moleküler görüntüleme, moleküler tanı ve hedeflendirilmiş ilaç tedavisi
Tanı için Görüntüleme	Biyopsi, cerrahi müdahale ve diğer zor tanı tekniklerinin daha kolay hale getirilmesi
Mikro - Akışkan Bilimi	Mikro/nano düzeydeki akışkan özelliklerinden yararlanabilme
Biyonanoelektromekanik	Tam fonksiyonel elektromekanik sistemler
Gen Tedavisi	Uzun ekspresyon süreleri ve yüksek transfeksiyon etkinliği sağlandığına ilişkindir.
Akıllı Barkotlar	Nano ölçekte düzenlenmiş paketlerin vücudun ilgili bölgesine ulaştırılması
Biyoanalitik nanosensörler	Eser miktarlarda kimyasal kontaminasyonun, patojenlerin veya virüslerin belirlenmesi
Nanomalzeme	Nano ölçekte farklı özellikler gösteren kompozit malzemelerin kullanımı
Biyoselektif Yüzeyler	Kimyasal ve biyolojik etkileşimlerin meydana geldiği organizmaların veya moleküllerin tutunabilmesi ve bağlanabilmesini sağlayan seçici yüzeyler



Şekil 7. Nanoboyutlu malzeme olarak tanımlanan yapılar (48).

Son dönemlerde yapılan nanopartikül araştırmaları yalnızca polimer ya da lipozomal çalışmalarla sınırlandırılmamış, kanserde dendrimerik yapılarla ilaç hedeflemesinden seçici yüzey oluşturulmasına kadar tıp, biyoteknolojik, fizik, kimya gibi multi disipliner çok sayıda bilim dalının kesiştiği bir araştırma alanı olarak karşımıza çıkmıştır. Özellikle, nanopartiküllerin biomimik kazandırılmasıyla denenen ilaç tasarımları ileri dönemlerde çığır açabilecek potansiyeli göstermektedir (49,50). (Şekil 8).



Şekil 8. Nanopartiküllerin Tedavide Kullanımı (48).

2.3.3. Metalik nanopartiküller

Metalik nano partiküller metal oksit nanopartikülleri ve metal nanopartiküller gibi birçok inorganik/organik hibrid ve organik nanopartikülleri içermektedir. Yüzey yapılarındaki karakteristikleri, boyutları ve kimyasal kompozisyonlarından dolayı örnek hazırlamada dikkatli olunmalıdır. Son 10 yılda, manyetik nanoparitikül üzerine çalışan araştırmacılar şekil ve boyutun kontrolü, reaksiyon aktivitesi, selektif katalizin potansiyeli üzerinde odaklanmışlardır (51-53).

2.3.4. Altın nanopartiküller

Altın (Au), normalde pek çok kimyasal reaksiyonda inert bir metal olmasına karşın nanopartiküler haldeyken benzersiz optik özelliklere ve çok yüksek oranda biyouyumluluğa sahip nitelikler kazanmaktadır. Nanopartiküler haldeyken değişen kimyası sayesinde kataliz reaksiyonlarında dikkate değer yetenek kazanması, başta görüntüleme ve tespit çalışmaları olmak üzere biyoloji ve farmakoloji alanlarında altın nanopartikülleri (AuNPs) çekici hale getirmektedir (54).

Altın nanopartiküller-biomoleküllerle uyumu, kolay sentezi, uzun dönem stabilitesi, yüksek yüzey-hacim oranından dolayı-güvenilir ve ümit verici nano malzemelerdendir. Amino grupları içeren organik moleküller, altın yüzeylere tek tabaka oluşturacak formda spontan olarak adsorbe edilebilirler.

Altın nanopartiküllerin çok yönlü yüzey kimyası çeşitli biyofonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilmektedir. Biyofonksiyonel gruplara polimerler, silanoller, şekerler, nükleik asitler ve proteinler örnek gösterilmektedir (40,55).

Günümüzde birçok dendrimerik molekül altın nanopartiküllerde stabiliteyi arttırmak amacıyla kullanılmaktadır. Dendrimer kullanmanın en önemli avantajlarından biri etkili bir şekilde partikül aggregasyonunu engelleyerek nanopartiküllerin stoikiyometrik boyut kontrolüne izin vermesidir (56).

AuNPs'in karakterizasyon ve applikasyon çalışmaları bu nano boyuttaki partiküllerin çok kısa zaman içerisinde ve çok düşük hacimlerdeki örnek analizlerinde kullanılabileceğini göstermiştir.

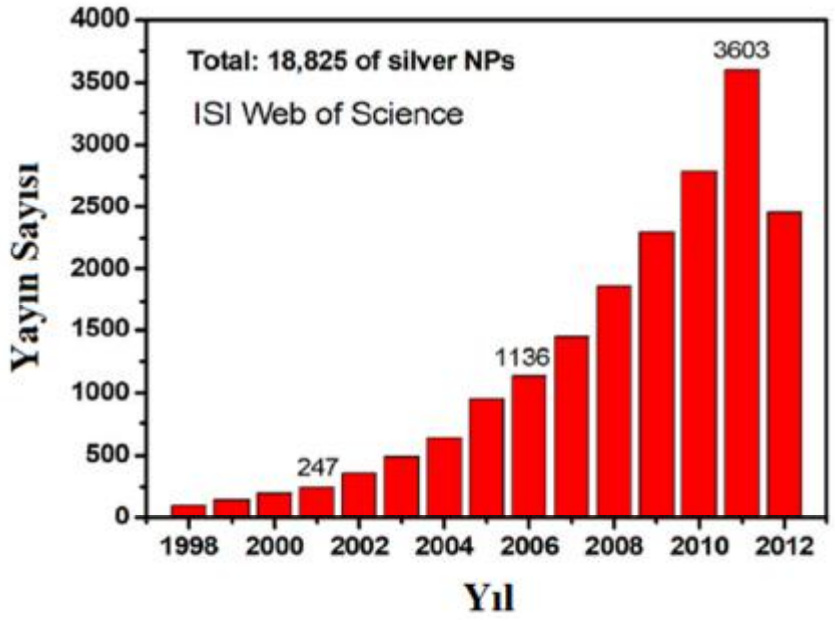
Altın hem insan hem hayvan uygulamaları için toksik olmaması, biyouyumlu olması, kimyasal kararlı olması, yüzey bağlanma dinamiğine sahip olması, UV ve görünür bölgede bir absorpsiyon bandı göstermesi gibi özellikleri nedeniyle en çok

tercih edilen kabuk malzemesi olmuştur. Ayrıca enzim, protein, DNA gibi biyolojik moleküller altın yüzeyine kovalent olarak daha güçlü bağlanabilmektedir (40,55,57).

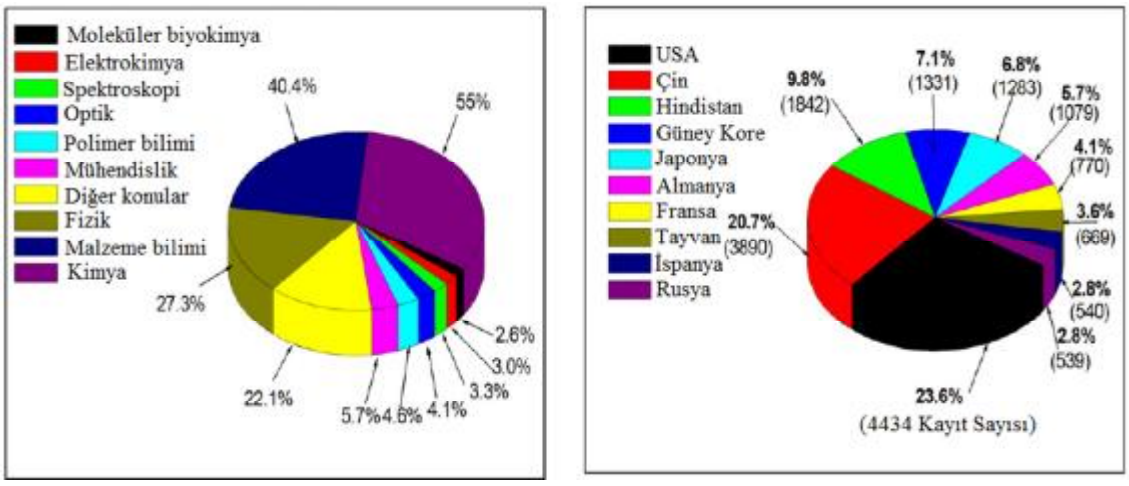
2.3.5. Gümüş nanopartiküller

Gümüş nanopartiküllere olan ilgi özellikle makro ölçeklerdeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleriyle karşılaştırıldığında diğerlerine göre daha ön plana çıkmıştır. Ayrıca, bu yapılar yüksek bakterisidal ve fungisidal spektrum gösteren nanopartiküllerdir. Özgün fiziko-kimyasal özellikleri, farklı termal iletkenlikleri, yüzey modifikasyonu imkanı, kimyasal kararlılığı, katalitik aktivite ve optik davranışları gibi özelliklere sahip nanopartiküllerdir (58).

Antibakteriyel ve antifungal özellikleri bu partiküllerin plastik, sabun, macun, yiyecek ve tekstil ürünlerinde kullanımını ve market değerini arttırmıştır. Bu nedenle günümüzde nano gümüş partikül teknolojileri prosesleri ve ürünleri üzerine araştırmalar artmaktadır (Şekil 9-10) (59,60). Bu partiküller bazı teknolojilerde bakteri ve fungal yapıların üremesini engellemek amacı ile nem oranına bağlı olarak uygulamalarda kullanmaktadır. Bu şekilde kontaminant ajanlara karşı bir bariyer oluşturmaktadırlar (58-60).



Şekil 9. "Isı Web of Science" arama motorunda "gümüş nanopartikül" kelimeleri ile yapılan arama sonucu, gümüş nanopartikül üzerine yapılan çalışmaların yönü, Eylül, 2012 (58).



Şekil 10. Gümüş nano partiküller üzerine araştırma alanlarına (a) ve ülke/ bölge (b) göre bölünmüş veri tabanı (58).

Gümüş iyonunun altın ile benzer özellikleri göstermesi nedeni ile kaplama yöntemleri kullanılarak sıvı fazdan mikro ekstraksiyon çalışmaları da yapılmış olup absorbasyon yeteneklerinin son derece yüksek oldukları belirtilmiştir (58).

2.3.6. Metal oksit nanopartikülleri

Metal oksit nanopartiküller (MONPs) kirleticilerin separasyonu ve ekstraksiyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Birçok durumda bu MONP'ler toksik metal iyonları ve organik bileşenlerinin separasyonu için kullanılmaktadır. MONP'ler, SPE (Solid Faz Ekstraksiyonu) sorbentlerinin gereksinimini karşılamada, düşük sıcaklıkta modifikasyon yeteneği, yüksek adsorbsiyon kapasitesi, büyük spesifik yüzey alanı sağlama, mekanik ve kimyasal stabilite, yüksek sıcaklık gibi özgün özelliklere sahiptir (61-64).

2.3.7. Modifiye edilmiş metal oksit nanopartikülleri

Seçiciliği artmış olan Metal oksit nanopartikülleri**,** polimerle ya da küçük organik ve inorganik bileşimlerle işlevsel özellik kazanır. Yeni metotlarla birlikte sıvı faz mikro ektraksiyon için sorbent bazlı nanopartiküller hazırlanabilmektedir. Kaplanacak kabuk moleküller nanopartikül yüzeylerine serbest polimerize edilebilir. Hazırlanan çekirdek-kabuk nanopartikülleri, çözelti içersinde daha kararlı ve ayırıcı olmaktadır. Kaplama yüzeyinin alanı ve nanopartiküllerin çekirdek boyutu kaplanan

kabukların agregasyonunu önleyebilmektedir. Modifiye edilmiş nanopartikül çekirdekli yapıların kanser çalışmalarındaki başarıları literatürde rapor edilmiştir (61,62).

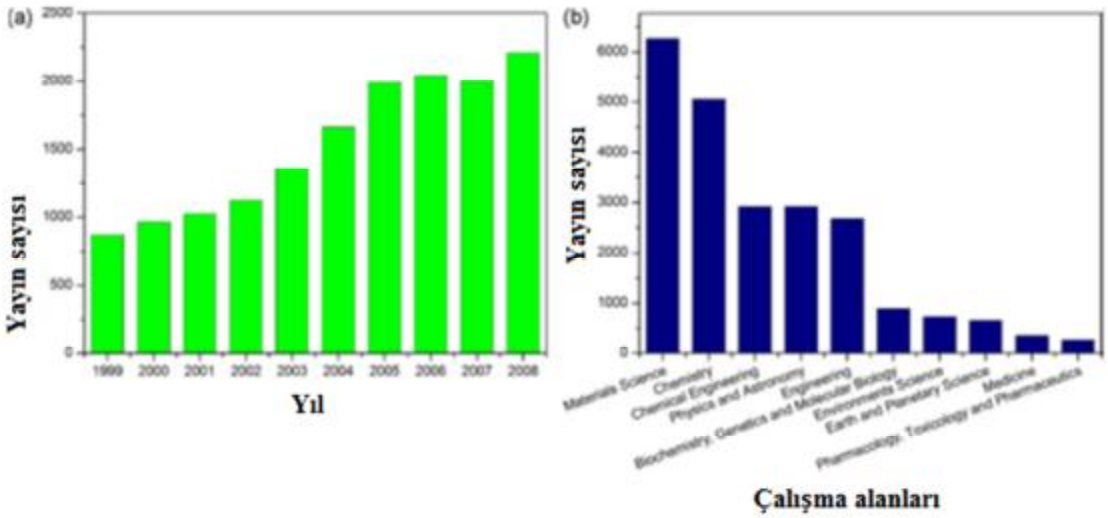
Aynı zamanda, metal oksit/metal oksit- hibrit metal/metal oksit kompozisyonları, organik ve inorganik analitlerin selektif ayırımları için sorbent olarak kullanılmaktadır (61,65,66).

2.3.8. Manyetik nanopartiküller

Nano boyuttan mikron boyutuna kadar sentezlenebilen manyetik partiküller geniş bir kullanım alanına sahiptir. Günümüzde manyetik nanoparçacıklar uygulama alanlarının çokluğu nedeniyle araştırmacılar tarafından büyük ilgi görmektedir. Bu nanoparçacıklar, kritik değerin altında (10-20 nm) uygulama alanları açısından oldukça elverişli hale gelirler ve süperparamagnetik özellik gösterirler. Manyetik nanopartiküllerin manyetik alana cevap vererek istenilen şekilde hareket ettirilebilmeleri, uygulamada avantaj sağlamaktadır. Manyetik nanopartiküllerin:

1- İlaç hedefleme çalışmaları
2- DNA taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi
3- İmmobilizasyon çalışmaları
4- Biyosensör ve elektrot çalışmaları
5- Hücresel hedefleme
6- Gen transferi

Gibi biyolojik ve biyomedikal alanlarda çok geniş uygulamaları söz konusudur . Silika kaplanmış manyetik partiküller en popüler partikül çalışmaları arasında olup her geçen yıl araştırma sayısı artmaktadır (Şekil 11) (67-69).



Şekil 11. 1999- 2008 arası yayınlanan silika kaplı manyetik nanopartikül araştırma makale sayısı (a); çalışma alanı (b) (69).

2.3.9. Manyetik nanopartiküllerde toksik etki

Biyolojik ortamda nanomateryallerin başarılı uygulanması için biyolojik kaderini ve nanopartiküllerin potansiyel toksik etkilerini anlamak önemlidir. Yüzey modifikasyonları yapılan mnplerin incelendiği bazı *in vivo* deneysel çalışmalarda; muamele edilen farelerde vücut ağırlığına yönelik herhangi bir kötü etki gözlenmediği, anormal klinik işaret ve davranışa rastlanmadığı ve toksik bir etki yaratmadığından bahsedilmiştir. Deneylerde mnp'lerin beyin, akciğer, karaciğer, böbrek, kalp, testis, uterus ve dalak gibi farklı organlarda varlığı belirlenmiştir. Partiküller bütün organlara yayılmıştır ve dağılımın zamana bağlı olduğundan bahsedilmiştir. Toksik etki ile ilgili bilgi elde etmek için kan kimyası, serum biyokimyasal analizleri, histopatalojik incelemeler yapılmıştır. *İn vitro* mutajenik ölçümleri yapılan sıçan gruplarında da hematolojik testler, klinik biyokimyasal testler ile beyin, akciğer, böbrek, kalp, karaciğer, dalak, testis ve uterus gibi çeşitli organları içeren histolojik analizler çalışılmıştır. Hematolojik ve klinik biyokimyasal testlerde mnp muamele edilmiş gruplarda herhangi önemli bir değişime rastlanmadığından bahsedilmiş dahası, mnp muamelesinin mutlak organ kütlesinde ve ilişkilerinde herhangi bir değişime neden olmadığı belirlenmiştir (70).

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar

- Etanol (C_2H_5OH) (Sigma Aldrich),
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Sigma Aldrich),
- Hidroklorik asit(HCl) (Merck),
- Sodyum klorür(NaCl) (Sigma Aldrich),
- Azot(N_2),
- Tartarik asit ($C_4H_6O_6$) (Sigma Aldrich),
- Demir(II) sülfat mono hidrat ($FeSO_4.H_2O$) (Sigma Aldrich),
- Demir(III) klorür hekza klorür ($FeCl_3.6H_2O$) (Sigma Aldrich),
- 3-(aminopropil)trietoksi silan ($H_2N(CH_2)_3Si(OCH_2CH_3)_3$) (Sigma Aldrich),
- 3-(aminopropil)trimetoksi silan ($H_2N(CH_2)_3Si(OCH_3)_3$) (Sigma Aldrich),
- Glutaraldehit ($C_5H_8O_2$) (Sigma Aldrich),
- Trietanol amin ($C_6H_{15}NO_3$) (Sigma Aldrich),
- Sodyum bor hidrür ($NaBH_4$) (Sigma Aldrich),
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Sigma Aldrich),
- Dipotasyum monohidrojen fosfat (K_2HPO_4) (Sigma Aldrich),
- Piridinyum kloro kromat (PCC) (Sigma Aldrich),
- Fetal Sığır Serum (FBS)(Biochrome)
- Penicilin-Streptomycin (Hyclone J101651)
- Tripsin (Hyclone J102851)
- Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) (Sigma Aldrich),
- Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM)
- Fosfat Buffer Saline (Biochrome 1418 W)
- HEPES (Sigma)
- HBSS (Biochrome L2055)
- MTT-(3-[4,5-Dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide;Thiazolyl blue)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- **Elementel Analiz** (Thermo Scientific Flash 2000, CHNS elementel analyses)
- **FT- IR Spektroskopisi** (Thermo FT-IR spectrophotometer; Smart ITR diamond attenuated total reflection (ATR); 4000-400cm^{-1})
- **Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM);** Jeol JSM-5500 LV
- **Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM);** FEI Tecnai G^2 Spirit BioTwin C-TEM
- **X- Işınları difratometre (XRD);** Rigaku Miniflex CuKα , λ=0.154nm
- **UV-vis spektrometre;** Perkin Elmer Lambda 25
- **Manyetik karıştırıcılı ısıtıcı;** Velp, WiseStir
- **Etüv;** Binder
- **Schelenk düzeneği**
- **Elektronik terazi; Shimadzu;** ATX224
- **Vakum desikatörü**
- **Siklik voltogram;** CHI 604, Seri No:64721A
- **Mekanik karıştırıcı;** WiseMix
- **Rotatör;** Bio RS-24
- **Ultrasonik homojenizatör;** Bandelin Sonopuls
- **Ultrasonik banyo**
- **Biyogüvenlik Kabini Class II;** Berner B-$(MaxPro)^2$-130
- **Inverted Mikroskop;** Nikon ELWD
- **Binoküler Mikroskop;** Nikon, Japan 157812
- **CO_2 İnkübatör;** Heal Force
- **Derin Dondurucu** (-80 ^oC)
- **Otoklav**
- **Santrifüj;** Hettich- EBA 21
- **Serolojik Pipet;** (5-10-25ml.Sarstedt)
- **Otomatik Pipetler;** Eppendorf
- **Mikroplate Okuyucu;** Biotek Eon
- **Steril Filtre** (0.22μ)
- **Santrifüj Tüp** 15/50 ml

- **Vidalı Kapaklı Flasklar;** T-25,T75 cm^2/yüzey Sarstedt/Corning
- **Plate;** (12-96 kuyucuklu/Costar)
- **Çalkalamalı su banyosu;** Memmert
- **Elektromıknatıs**

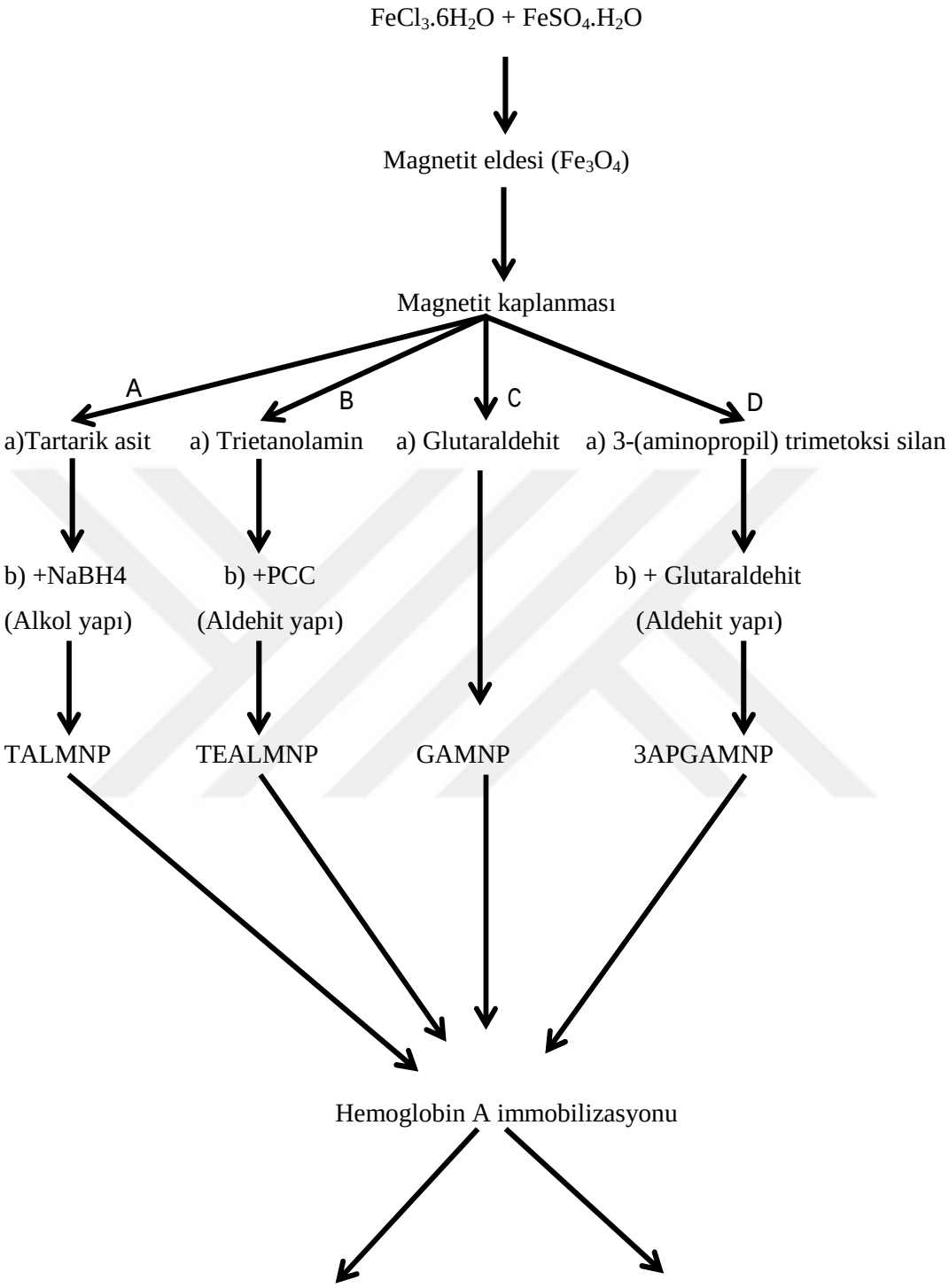
3.1.3. Çalışmada kullanılan kitler

- Katalaz (CAT) Ölçüm Kiti - Biovision
- Süperoksit Dismutaz ölçüm Kiti – Biovision
- Glutatyon Peroksidaz Ölçüm Kiti – Randox

3.2. Metot

Bu çalışmada, magnetit olarak bilinen Fe_3O_4 manyetik nanopartiküller sentezlenerek yüzeyleri; tartarik asit, trietanol amin, glutaraldehit ve 3-(aminopropil)trietoksi silan ile çeşitli teknikler kullanılarak kaplandı. Sentezlenen tüm bileşiklerin yapıları; FT-IR, elementel analiz, XRD, TEM, SEM ve diğer tekniklerle analiz edildi. Elde edilen nanopartiküller üzerine Hb molekülü Schiff bazı oluşturularak bağlandı. İmmobilize hemoglobinin oksijen taşıma yeteneği incelenip, endotel hücre kültürü üzerine antioksidan ve hücre canlılık araştırmaları yapıldı (Çizelge 5). Bu proje, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi "Girişimsel Olmayan Etik Kurulu"nun 4 Nisan 2014 tarih ve 3 nolu izin kararı ile yapılmıştır.

Çizelge 5. Akış şeması



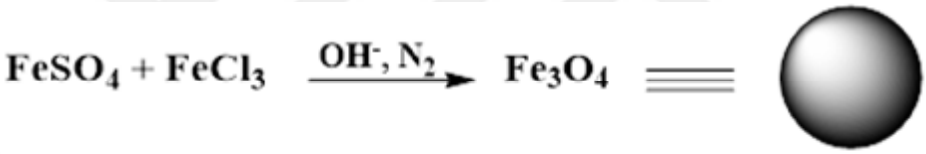
1) MTT testi- Endotel hücre vitalite testi

2) Antioksidan enzimlere etkiler
   a) Süperoksit dismutaz
   b) Katalaz
   c) Glutatyon peroksidaz

3.2.1. Destek malzemelerinin sentezi

3.2.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi

Demir (II, III) oksit manyetik nanopartikülleri Mahmood ve arkadaşlarının kullandığı yöntem uyarınca elde edildi (71). 2,3377 g (8,6 mmol) $FeCl_3.6H_2O$ ve 0,7347 g (4,33 mmol) $FeSO_4.H_2O$ 100 mL saf su içerisinde çözülerek mekanik karıştırıcı ile azot atmosferinde şiddetli şekilde karıştırılarak 90^oC'ye ısıtıldı. Bu karışım üzerine başlangıçta 0,1 M NaOH çözeltisinden 12 mL damla damla, yavaş bir şekilde eklenerek karıştırıldı. Demir tuzlarının karışımı başlangıçta sarı renkteyken NaOH damlalarının düştüğü yerlerde siyah renkli nanopartiküller oluştu. Ardından 0,3 M NaOH çözeltisinden 12 mL eklenerek çökelmenin bitmesi sağlandı. Çökme tamamlanınca bu karışım manyetik dekantasyon yardımıyla ayrıldı. Saf su ile yıkandı. Elde edilen manyetik nanopartiküller vakum desikatöründe kurutuldu (Şekil 12-13).



Şekil 12. Magnetit molekülü



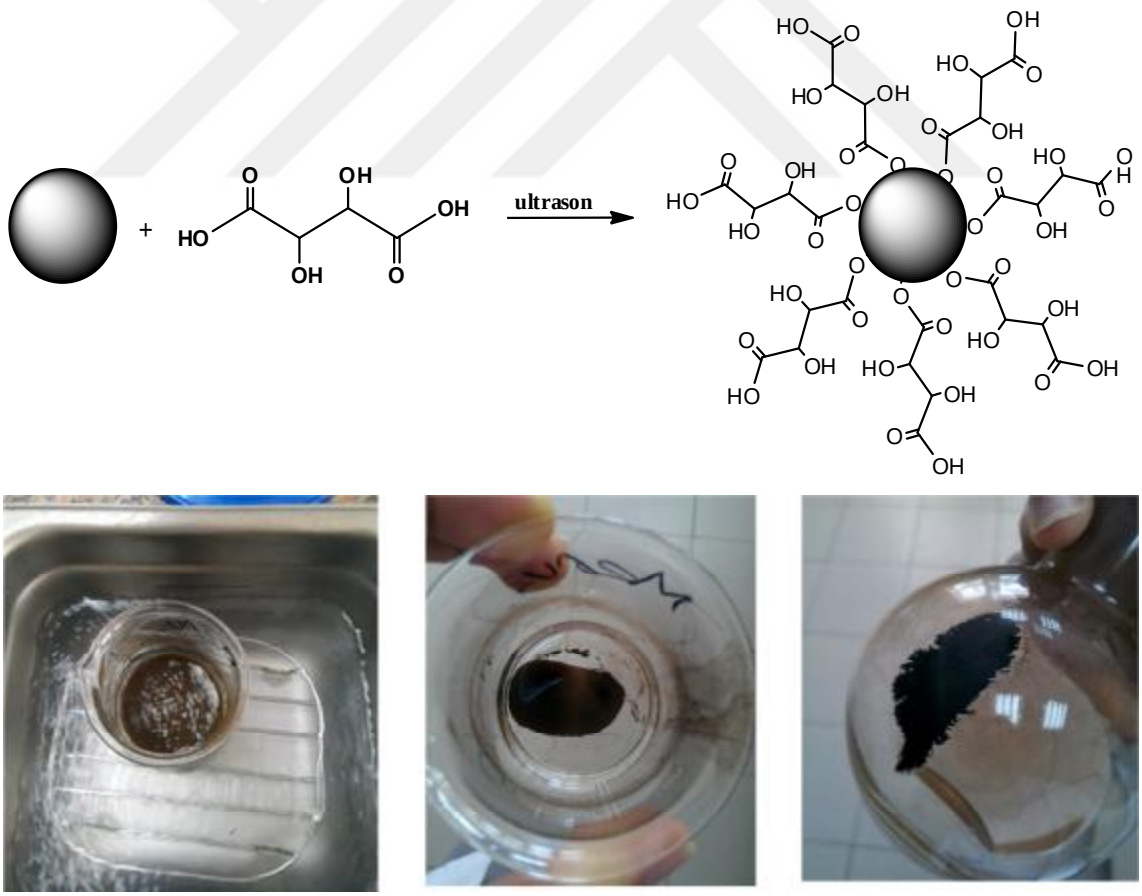
Şekil 13. Magnetitin elde edilişi

3.2.1.2.Magnetitlerin kaplanması

A. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması ve modifikasyonu;

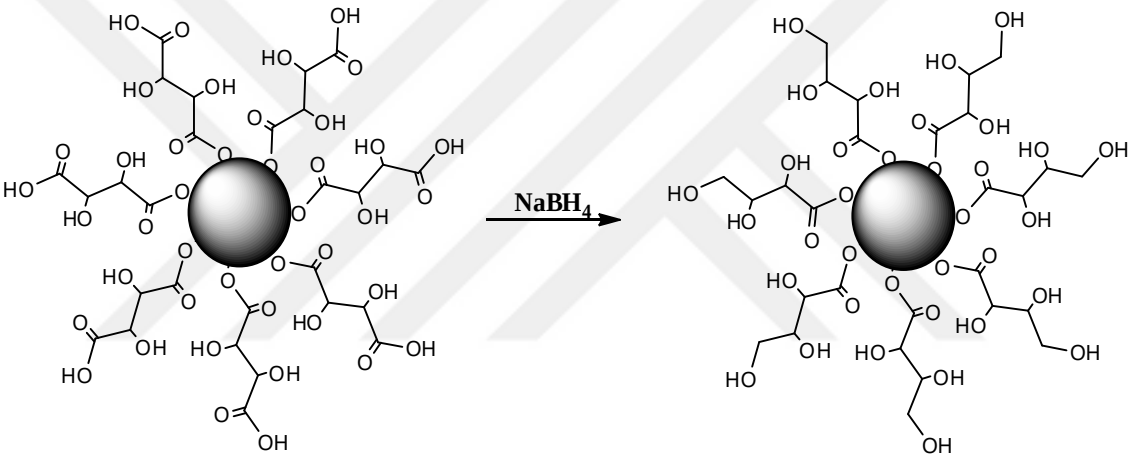
Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması, Mahmood ve arkadaşlarının kullandığı yöntem çerçevesinde gerçekleştirilmiştir (71).

a) Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması için, 1 g manyetik nanopartikül 100 mL saf su içerisinde ultrasonik banyo ile 30 dakikada süspansiyon haline getirildi. 0,5 g tartarik asit bu karışıma eklenerek şiddetli bir şekilde mekanik karıştırıcı ile 1 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Ardından ultrasonik banyoda 1 saat karıştırılarak manyetik dekantasyonla ayrıldı. Son olarak saf su ile serbest tartarik asit kalmayana kadar yıkandı. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartikül (TAMNP) vakum desikatöründe kurutularak analiz edildi (Şekil 14).



Şekil 14. Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü

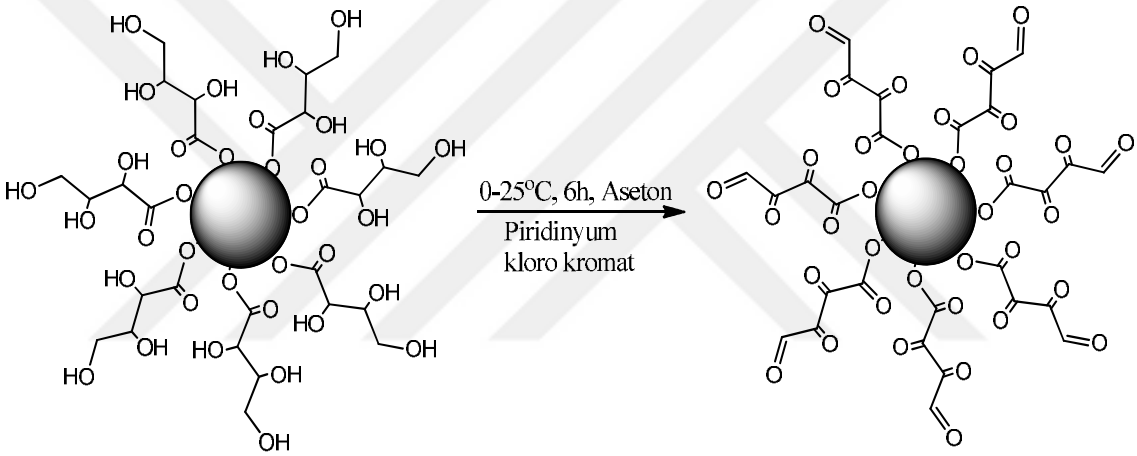
b) Elde edilen tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin (TAMNP) Hb immobilizasyonunda kullanılabilmesi için bazı yüzey modifikasyonları yapılması gerekir. Bu nedenle yaklaşık 1 g TAMNP 100 mL distile su içerisinde ultrasonik banyo ile süspansiyon haline getirildi. Bu karışım içerisine 0,1g $NaBH_4$ eklenerek mekanik karıştırıcı ile 2 saat boyunca şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküller (TACMNP) manyetik dekantasyon ile ayrıldı (Şekil 15). Vakum desikatöründe kurutulduktan sonra FT-IR, SEM-EDX, CTEM ile incelenerek karakterize edildi (72).





Şekil 15. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere alkol yapısı kazandırılması

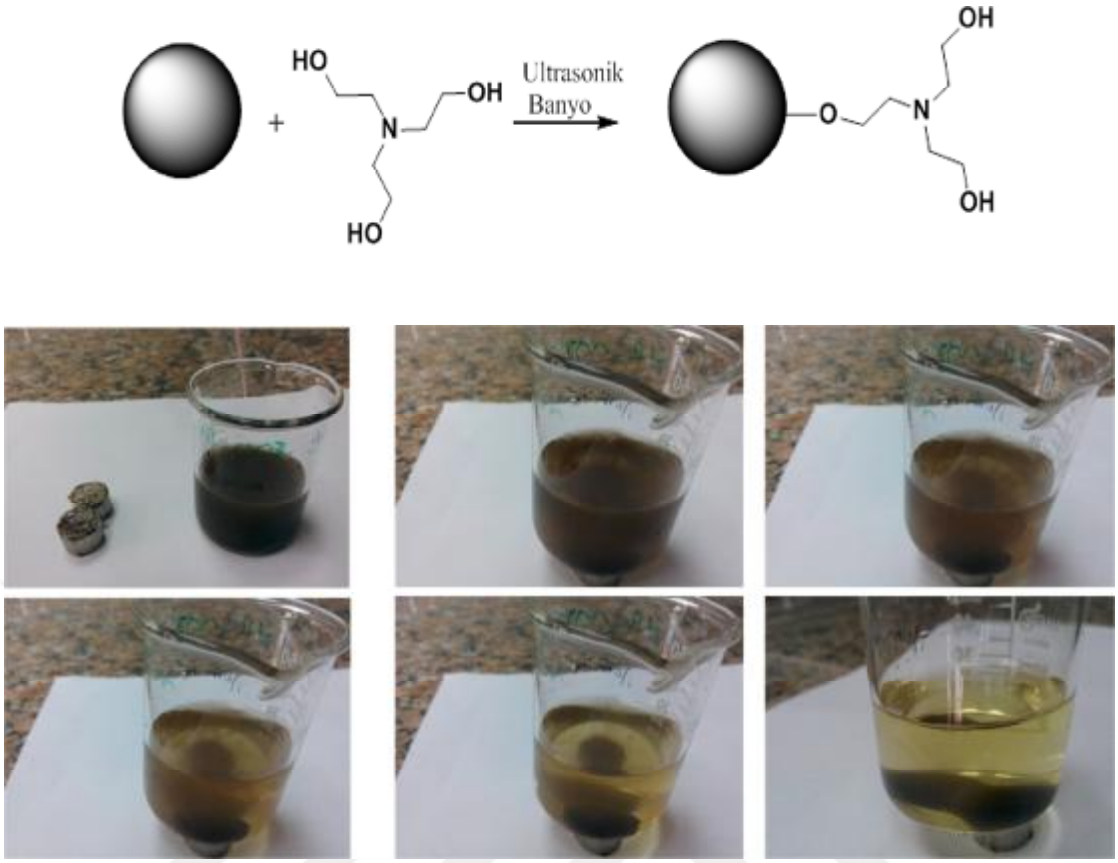
c) Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin uçlarının aldehit yapı kazanması için de yaklaşık 1g TACMNP tozu 100 mL aseton içerisinde ultrasonik banyo ile süspansiyon hale getirildi. Üzerine 0,1 g piridinyum kloro kromat (PCC) eklenerek 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı ve alkol gruplarının bu süre içerisinde aldehite dönüştürülmesi sağlandı (73). Elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküller (TALMNP) manyetik olarak ayrılarak aseton ile PCC kalıntısı kalmayana kadar yıkandı. TALMNP vakum desikatöründe kurutularak FT-IR, SEM-EDX, CTEM ile karakterize edildi (Şekil 16) .



Şekil 16. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin aldehite çevrilmesi

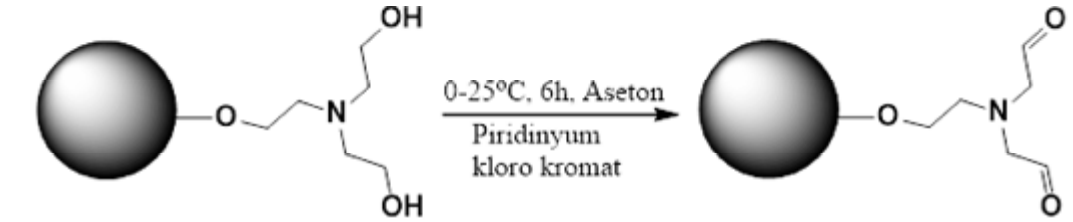
B. Magnetitin trietanol amin ile kaplanması ve modifikasyonu;

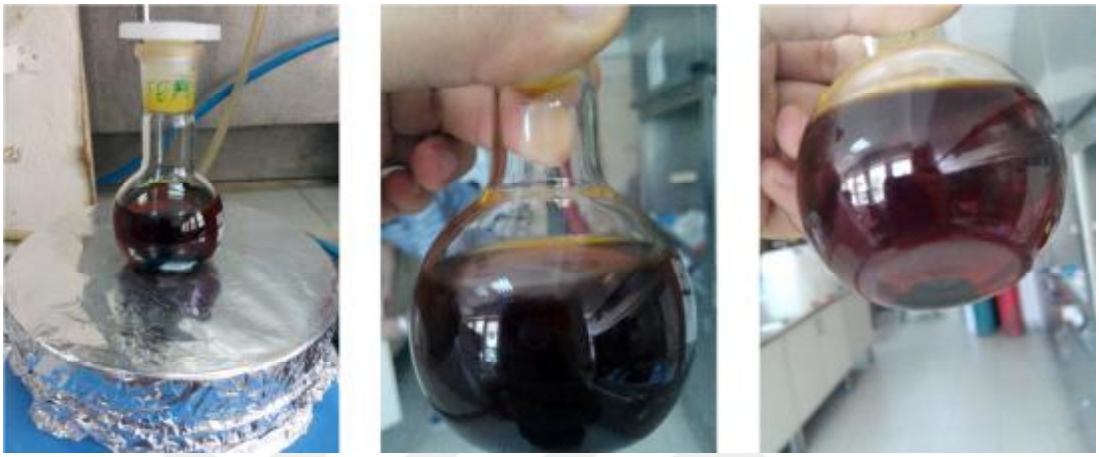
a) Manyetik nanopartiküllerin Trietanol amin ile kaplanması için, 1,0564 g manyetik nanopartikül 25 mL saf su içerisinde ultrasonik banyo ile 30 dakikada süspansiyon haline getirildi. Üzerine 10 mL saf suda çözülmüş 1,0437g (5,95 mmol) %85'lik trietanol amin eklendi ve 2 saat ultrasonik banyoda 40^{o}C'de karıştırıldı. Elde edilen trietanol amin kaplı manyetik nanopartiküller (TEAMNP) manyetik dekantasyon ile ayrılarak önce saf su ve ardından aseton ile yıkanarak 50^{o}C etüvde 1 gece boyunca kurutuldu (Şekil 17) (74).



Şekil 17. Magnetitin trietanol amin ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü

b) Alkol uçların aldehite dönüştürülmesi için, elde edilen TEAMNP nanopartiküllerinden yaklaşık 0,5 g alınarak 50 mL aseton içerisinde süspansiyon haline getirildikten sonra üzerine yaklaşık 1 g PCC eklenerek 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküller (TEALMNP) aseton ile PCC kalıntısı kalmayana kadar yıkanıp vakum desikatöründe kurutularak FT-IR, SEM-EDX, CTEM ile karakterize edildi (Şekil 18) (73).

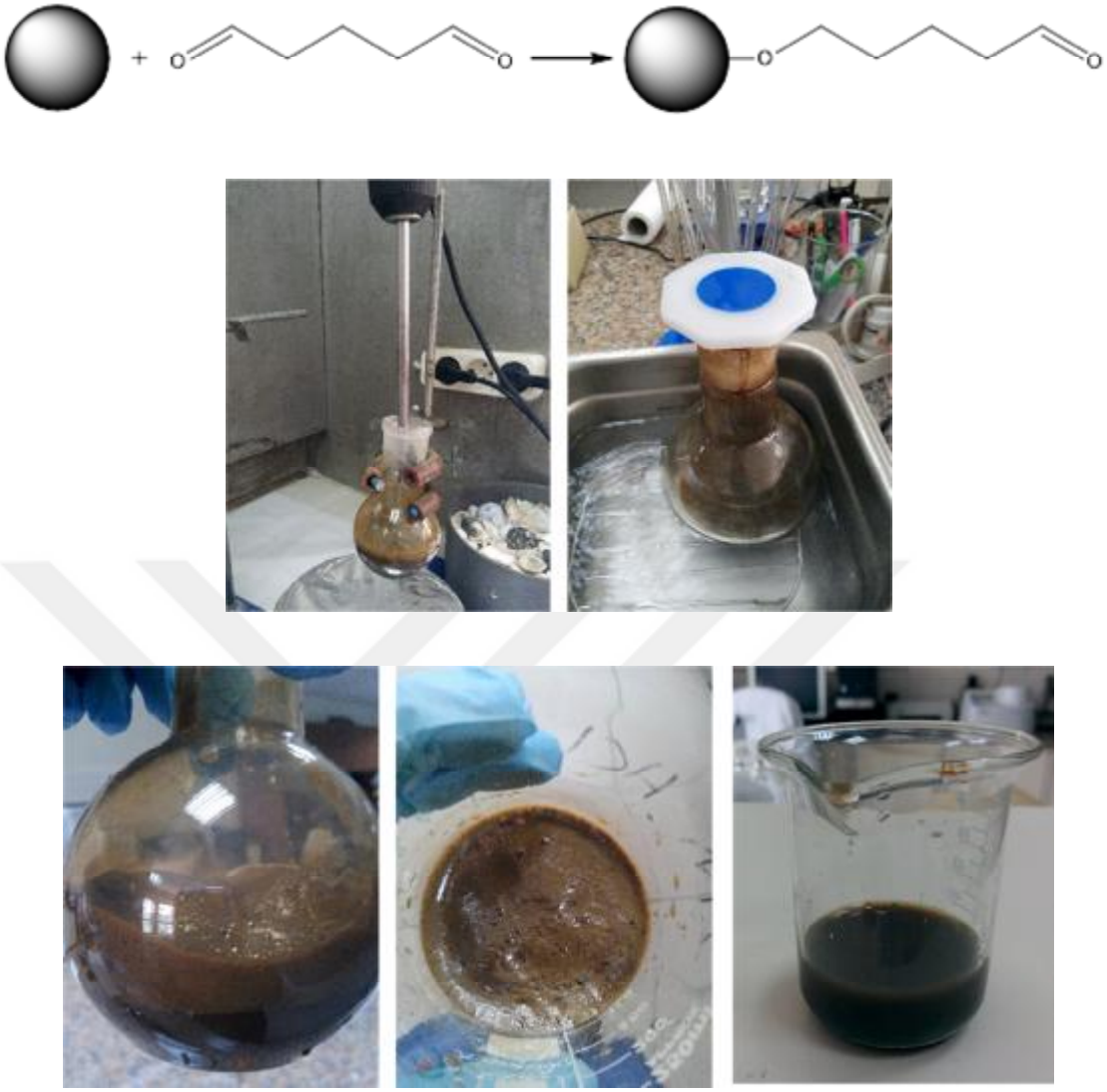




Şekil 18. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül eldesi

C. Magnetitin glutaraldehit ile kaplanması;

a) Manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile kaplanması için, 1,0074 g manyetik nanopartikül 100 mL saf su içerisinde ultrasonik banyoda süspansiyon haline getirilerek üzerine % 25'lik glutaraldehit çözeltisinden 5,1528 g (12,87 mmol) eklendi. Bu karışım oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı ile şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Başlangıçta siyah renkli olan manyetik nanopartiküller zamanla kahverengi oldu. Kahverengi bir karışım ve üzerinde kahverengi bir köpük tabakası meydana geldi. Köpük fazı su ile karışmazken üzerine aseton eklendiğinde süspansiyon haline geldi. Bu faz serbest glutaraldehit kalmayana kadar aseton ile yıkandı. Su fazı ise önce saf su ardından aseton ile yıkandı. Örnekler vakum desikatöründe kurutularak FT-IR, SEM-EDX, CTEM karakterize edildi (Şekil 19).



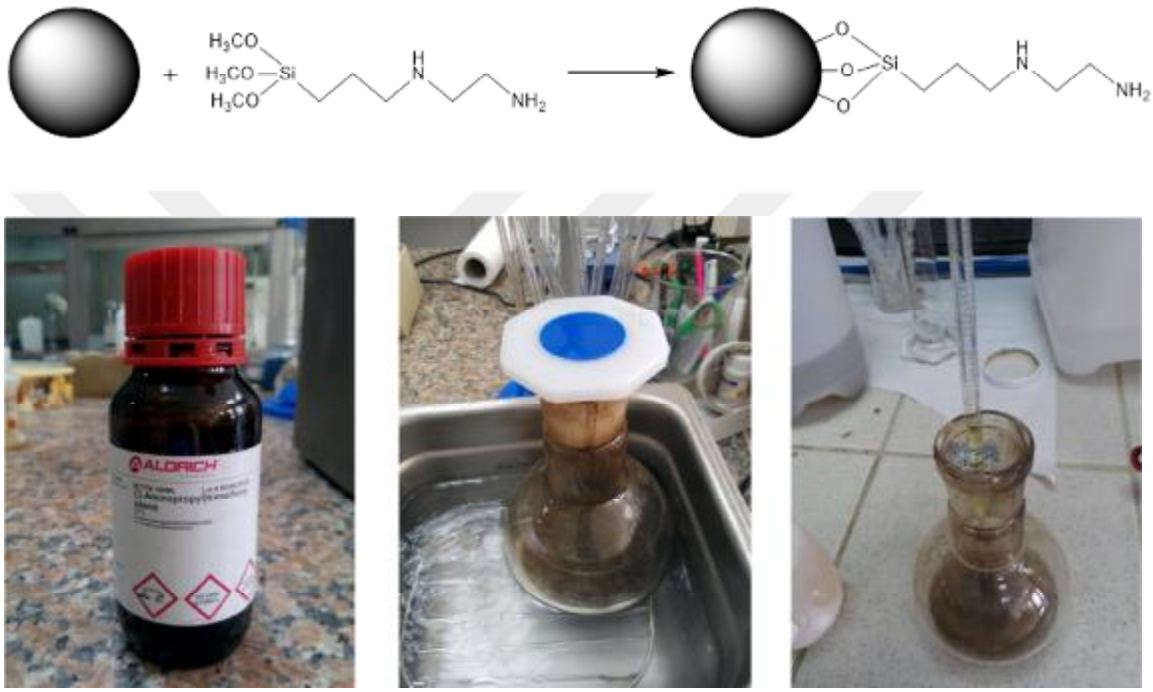
Şekil 19. Manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü

D. Magnetitin 3-(aminopropil) trimetoksi silan ile kaplanması ve glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu;

Magnetik nanopartiküllerin 3-(aminopropil) trimetoksi silan ile kaplanması ve glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu işlemi Tang ve arkadaşlarının kullandığı yöntem çerçevesinde gerçekleştirilmiştir.

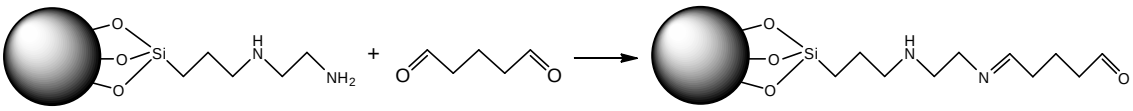
a) 2,0082 g manyetik nanopartikül 100 mL aseton içerisinde ultrasonik banyo kullanılarak süspansiyon haline getirildi. 10 dakika sonikasyondan sonra üzerine saf su içerisinde hazırlanmış % 4'lük 3-(aminopropil) trimetoksi silan

(3APTMS) çözeltisinden 4 mL eklendi. Bu karışım 45^{o}C'de 24 saat boyunca manyetik olarak karıştırıldı. Bu süre sonunda elde edilen 3-(aminopropil) trimetoksi silan kaplı manyetik nanopartiküller (3APMNP) saf su ile serbest 3APTMS kalıntısı kalmayana kadar yıkanarak 115 ^{o}C'de bir gece etüvde kurutuldu (Şekil 20).



Şekil 20. Magnetitlerin 3-(aminopropil)trimetoksisilan ile kaplanması; moleküler ve deneysel görüntü

b) Amin grupların aldehite dönüştürülmesi için, 1,9645g manyetik nanopartikül üzerine 25 mL fosfat tamponu (pH 7,4) eklenerek ultrasonik banyoda süspansiyon haline getirildi. Üzerine % 25'lik glutaraldehit çözeltisinden 25,116 g (62,7 mmol) oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı ile şiddetli bir şekilde 3 saat boyunca karıştırıldı. Bu süre sonunda manyetik dekantasyon yardımıyla serbest glutaraldehit kalmayana kadar saf su ile yıkandı. Elde edilen glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(aminopropil) trimetoksi silan kaplı manyetik nanopartiküller (3APGAMNP) 50 ^{o}C'de etüvde kurutularak FT-IR, SEM-EDX, CTEM ile karakterize edildi (Şekil 21) (75).

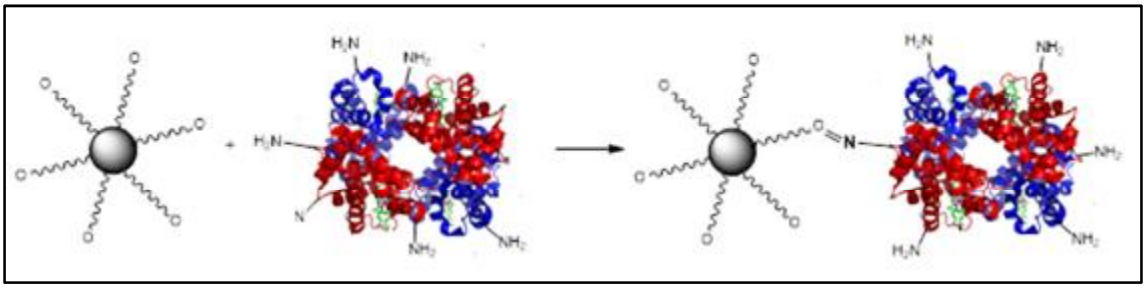




Şekil 21. 3-(aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu; moleküler ve deneysel görüntü

3.2.1.3. Manyetik nanopartiküllere hemoglobin immobilizasyonu

Bu aşamada, daha önce belirtilen kimyasallar ile çeşitli basamaklar üzerinden kaplanarak modifiye edilen manyetik nanopartiküllerin farklı ara kollar kullanılarak Hb molekülleri ile Schiff bazı bileşiği oluşturularak stabilizasyonu ve immobilizasyonu hedeflendi. Hemoglobinin modifiye manyetik nanopartiküller üzerine immobilizasyonu amacıyla, Azot (N_2) gazı sirkülasyonu altında 3 mL pH 7,4 fosfat tamponunda ultrasonik homojenizatörde süspansiyon haline getirilmiş 1 mg modifiye aldehit kaplı manyetik nanopartiküller kullanıldı. Üzerine içerisinde 7 mg ultra saf Hb çözünmüş pH 7,4 fosfat tamponundan 10 mL eklendi. Hb molaritesi $8{,}35 \times 10^{-9}$ M olan karışım rotatörle oda sıcaklığında 5 saat boyunca 100 rpm'de karıştırıldı, süre sonunda, tüm mnp-Hb'lerin ayrılması amacıyla manyetik alana maruz bırakıldı. Bu işlem pH 7,4 fosfat tamponuyla 5 defa yıkanarak tekrar edildi. Elde edilen mnp-Hb'ler, pH 7,4 fosfat tamponu içerisinde flow kabinde gerektiğinde kullanılmak üzere muhafaza edildi (Şekil 22).



Şekil 22. Manyetik nanopartiküllere Hb immobilizasyonu

3.2.2. Hücre kültürünün hazırlanması

3.2.2.1. Endotel hücrelerinin temini

Deneyler Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. Deneylerde Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilen İnsan Umblikal Vasküler Endotel Hücre (HUVEC) hattı kullanıldı.

3.2.2.2. Hücre kültüründe kullanılan kimyasal maddeler

Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS) ve Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) Biochrome'dan; HEPES, Penisilin Streptomisin Antibiyotikleri (PSA), Tripsin/EDTA, metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT), fosfat tamponu (PBS), fetal sığır serumu (FBS) ve dimetil Sülfoksid (DMSO) Sigma Aldrich'den temin edilmiştir.

3.2.2.3. Endotel hücre hattında kullanılan besiyeri (Hücre medyumu)

Çalışmamızda hücre medyumu olarak glutaminli Dulbecco's Modification of Eagle's Medium (DMEM) kullanıldı. Medyuma ek olarak HEPES, FBS ve PSA eklendi. Final hacimde hücre medyumu % 10 FBS (v/v), % 1 PSA ve 25 mM HEPES içermektedir. HEPES öncelikle bir miktar DMEM ile çözülüp daha sonra 0,20 µm'lik steril filtreden geçirilerek steril hale getirilmiştir.

3.2.2.4. Hücre kültür işlemlerinin yapıldığı ortamlar

Hücreler 37^{o}C'lik %95 nem ve %5 CO_2 içeren inkübatörde (Heal Force) inkübe edildi. Hücre kültür çalışmaları ise ultraviyole ile sterilize edilen Laminar sınıf II kabin (Berner FlowSafe) içerisinde yapıldı.

3.2.2.5. Malzemenin temizliği ve sterilizasyonu

Cam malzemeler bir gece hipokloritte bekletildi. Daha sonra deterjanlı suda bir gece bekletilen malzemeler ertesi gün önce deterjanla yıkandı daha sonra çeşme altında bol su ile durulanarak bir gece distile suda bekletildi. Tek kullanımlık pipet uçları, ependorflar, pipetler ve falkon tüplerinin sterilizasyonu, Çukurova Üniversitesi, Balcalı Hastanesi, Sterilizasyon Ünitesi'nde gerçekleştirildi.

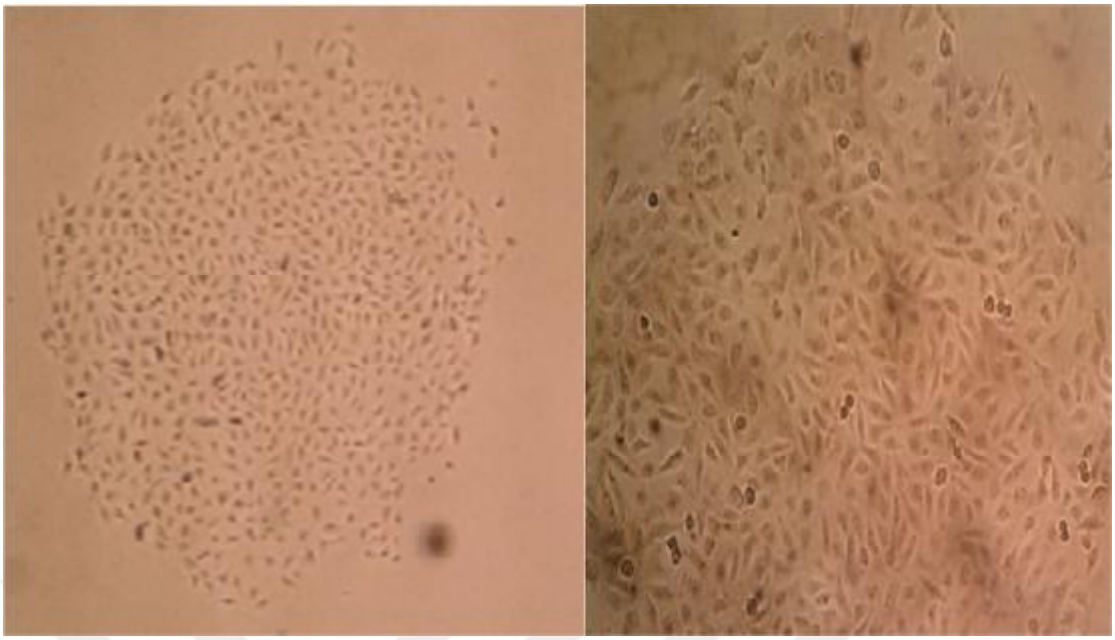
İnkübatörün nemlendirilmesi amacıyla inkübatöre konulan distile su otoklavda 121^{o}C'de 3 atm basınçta 15 dakika steril edildi. Doku kültürü laboratuvarı yerleri ve çalışma alanları, gün aşırı, periyodik olarak % 70 alkol çözeltisi ile silindi. Laboratuvar kullanılmadığı zamanlarda ve içeriye girilmeden en az kırk beş dakika önce biyogüvenlik kabininde bulunan ve duvara monte edilmiş UV lambalar kullanılarak ortamın sterilizasyonu sağlandı.

3.2.2.6. Dondurulmuş endotel hücrelerinin kültüre edilmesi

HUVEC hattının soğuk zincir içerisinde muhafaza edilerek şehirler arası transfer yolu ile ODTÜ'den doku kültürü laboratuvarımıza ulaştırılması sağlandı. Soğuk zincir içerisindeki kriyotüpler çıkartılarak 37°C'deki su banyosunda kısa sürede çözdürüldü ve olası kontaminasyonu önlemek için tüpler hızlı bir şekilde %70'lik alkolle silinerek laminar flow kabine alındı. Kriyotüpteki hücre süspansiyonunun hafifçe pipetaj işlemi ile homojenizasyonu sağlandı ve içerisinde hücre medyumunun bulunduğu steril 15 ml'lik falkon tüp içerisine alındı ve hafifçe çalkalandı. Daha sonra 3 dakika süreyle 1450 rpm devirde santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüp tekrar alkolle silinerek laminar flow kabine alındı. Santrifüj sonrası üstte kalan medyum uzaklaştırıldıktan sonra 1 ml hücre medyumu ile resüspanse edilerek 25 cm^{2}'lik hücre kültürü üretme kabına (flask) alındı ve 37°C'deki % 5 karbondioksit (CO_2) içeren inkübatöre koyuldu. Yerleştirilen hücrelerin besiyerleri ertesi gün değiştirilerek taze hücre medyumu eklendi. Sonraki beş gün boyunca hücrelerin flask yüzeyine tamamen yayılmalarına izin verildi.

3.2.2.7. Tripsinizasyon işlemi ve endotel hücrelerinin pasajlanması

Beşinci günün sonunda invert mikroskop altında hücreler kontrol edildiklerinde yüzeyi tamamen kapladıkları saptandı ve çalışmada kullanılmak üzere daha fazla hücre ihtiyacı olacağı düşünülerek hücrelere tripsinizasyon işlemi uygulanmasına ve daha geniş olan 75 cm^2'lik flaska alınmasına karar verildi. Bu amaçla 25 cm'lik flask alkolle silinerek flow kabine alındı. Flask içerisindeki hücre medyumu uzaklaştırıldıktan sonra kültür ortamındaki hücre metabolizma yan ürünlerinin ve serum artıklarının uzaklaştırılması amacıyla kalsiyum iyonu içermeyen Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Biochrome) ile hücrelerin yüzeyi yıkandı. HBSS ile yıkama işleminin bir diğer nedeni ise, serumun tripsin enziminin etkisini inhibe etme ihtimalini ortadan kaldırmaktır. Daha sonra hücreler üzerindeki HBSS uzaklaştırıldı ve yerine 2 ml tripsin/EDTA solüsyonu ilave edilerek 90 saniye süreyle 37C^o'de inkübe edildi. Bu süre sonunda makroskobik ve mikroskobik olarak incelenen hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ve birbirlerinden ayrıldıkları, solüsyon içerisinde yüzdükleri görüldü. Sonra üzerine 4 ml kadar hücre medyumu ilave edildi ve hücre süspansiyonu 1450 rpm devirde 3 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan medyum steril şartlarda uzaklaştırıldıktan sonra, kalan pellet kısmı üzerine hücre medyumu konularak pipetaj yapıldı ve süspansiyon 75 cm^2'lik flaska alınarak 37°C'lik inkübatörde 10 gün süreyle günaşırı hücre medyumu değiştirilerek inkübe edildi. Böylece hücrelerin pasajlanması gerçekleştirilmiş oldu. Onuncu günün sonunda hücrelerin 75 cm'lik flask yüzeyini tamamen kapladığı invert mikroskop altında belirlenmesinin ardından tripsinizasyon işleminin tekrarlanmasına ve elde edilen hücre süspansiyonun, hücre proliferasyon ve antioksidan deney çalışmalarında kullanılmasına karar verildi (Şekil 23).

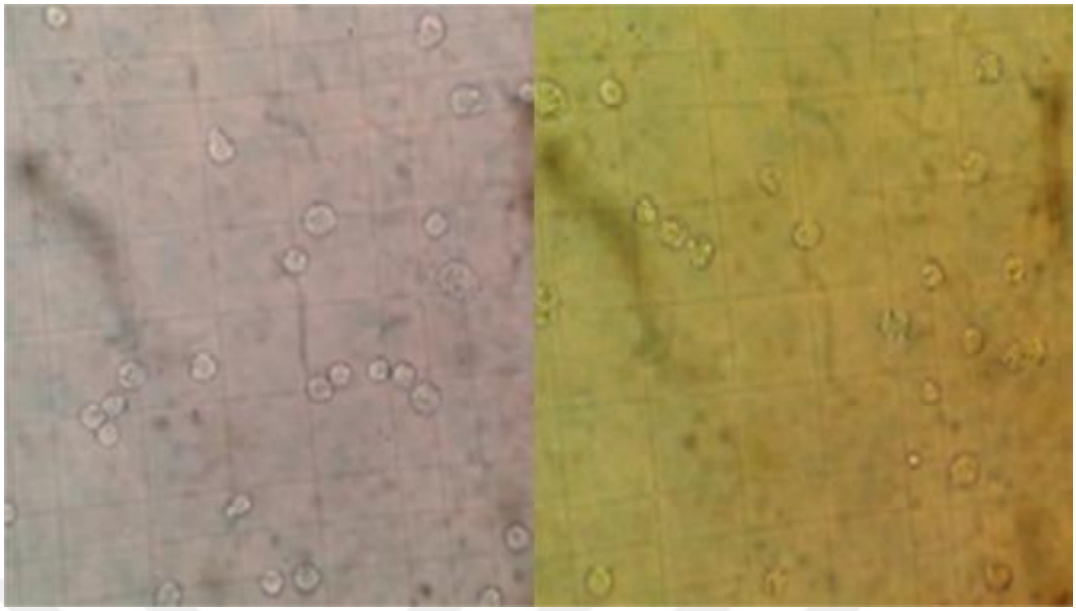


Şekil 23. Endotel hücre kültürü inverted mikroskop görüntüsü (X10 ve X40)

3.2.2.8. Endotel hücrelerinin sayımı

75 cm^2'lik flask yüzeyini tamamen kaplayan endotel hücrelerin deneye alınmaları amacıyla sayıları manuel olarak belirlendi. Sayımı için derinliği ve hacmi bilinen özel thoma lamı ve inceleme için binoküler mikroskop (Nikon) kullanıldı (Şekil 24). Hazırlanılan hücre süspansiyonu lam üzerine alındı ve mikroskop altında, birim hacimde ne kadar hücre olduğu sayıldı. Bu amaçla öncelikle, endotel hücreleri yayıldıkları flask yüzeyinden ve birbirlerinden ayrılmaları için inkübatörden flow kabine alındı ve flask içerisindeki hücre medyumu uzaklaştırıldı. Hücreler kalsiyum içermeyen HBSS ile yıkama sonrası hücreler üzerine 5 ml Tripsin/EDTA (%25) solüsyonu eklendi ve 90 saniye 37C'de inkübe edildikten sonra üzerine 10 ml hücre medyumu eklenerek resüspanse edildi. Elde edilen süspansiyon 15 ml'lik falkon tüpüne alınarak 1450 rpm devirde 3 dakika santrifüj edildi ve pellet kısmına 1 ml hücre medyumu eklenerek resüspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 1 damla alınarak thoma lamında lam ve lamel arasına bırakıldı. Mikroskop altında büyük kare içerisindeki tüm hücreler sayıldı. Büyük karenin her bir kenarı 1 mm ve lam ile lamel arasındaki mesafe de 1/10 mm olduğundan büyük karenin hacmi 0,1 mm^3 olmaktadır. Sayım sonucu elde edilen değer 10^4 ile çarpılarak mililitredeki hücre sayısı belirlendi.

Toplam hücre sayısı/ml = Hemositometre sayım sonucu x 10^4 x Medyum miktarı (ml)



Şekil 24. Thoma lamı incelemesinde endotel hücreleri

3.2.2.9. Hücrelerin dondurulması ve saklanması

Flask yüzeyini tamamen kaplayan hücrelere uygulanan tripsinizasyon işlemi sonunda elde edilen hücre süspansiyonu dondurularak daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -80^{o}C'lik dondurucuda saklandı. Endotel hücrelerinin dondurulma işlemi şu şekilde yapıldı; tripsinizasyon işlemi sonucu elde edilen pelete 1 mililitre hücre medyumu eklendi ve resüspanse edildi. Hemositometrik yöntem ile hücre sayımı yapıldıktan sonra süspansiyon dondurma medyumu olarak adlandırılan ve içerisinde %20 FBS ve %10 DMSO bulunan DMEM ile muamele edilerek eşit miktarda soğuğa dayanıklı saklama tüplerine (kriyotüp) alındı. Daha sonra bir kap içerisindeki buza oturtularak soğumaları sağlandı. Yaklaşık 10 dakika sonra kriyo tüpler -20^{o}C'de 4 saat muhafaza edildi. Son işlem olarak, kriyo tüpler saklanmak üzere -80^{o}C'deki dondurucular a yerleştirildi.

3.2.3. Endotel hücrelerinin proliferasyon ve sitotoksisite analizi

Endotel hücre proliferasyonu ve sitotoksisite tayini Metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) metodu ile yapıldı. MTT metodu Tetrazolyum bromid tuzuna dayanan kolorimertrik bir metoddur. Tetrazolyum bromid normalde sarı renktedir ve metabolik olarak aktif, çekirdekli hücre mitokondrilerinde süksinat dehidrogenaz enzim

aktivitesi sonucu mor renkte olan formazana dönüşmektedir. Görülen renk değişimi 570 nm. absorbansta spektrofotometre yardımı ile ölçülerek hücre proliferasyon ve canlılığı analiz edilmektedir. Canlı hücre sayısı ne kadar fazla ise oluşan mor rengin yoğunluğu artmaktadır.

3.2.3.1. MTT metodu ile hücre proliferasyon ve canlılık analizi deneyi

a) 75 cm^2'lik flask içerisindeki hücrelere tripsinizasyon işlemi yapıldıktan sonra elde edilen hücreler manuel olarak sayıldı ve $8x10^4$ adet hücre olduğu tespit edildi. Falkon tüpü içerisindeki hücre süspansiyonu üzerine hücre medyumu eklenerek süspansiyon dört kat seyreltildi. Analizin gerçekleştirileceği spektrofotometreye özel 96 kuyucuklu flat plağa her kuyuya eşit ve homojen olacak şekilde 30µl hücre süspansiyonu ve üzerine 100µl hücre medyumu eklenerek homojenize edildi. Kültür plağı daha sonra inkübatöre yerleştirilerek 24 saat süresince hücrelerin plak yüzeyine tutunmaları sağlandı.

b) Plak yüzeyine tutunan hücreler üzerindeki medyum ertesi gün uzaklaştırılarak endotel hücre proliferasyon ve canlılığı üzerine etkisi araştırıldı. Uygulanacak olan saf Hb, saf mnp, TEALMNP-Hb, TALMNP-Hb, GAMNP-Hb ve 3APGAMNP-Hb kompleksleri sentezlendikten sonra PBS ile sulandırılarak (1mg/10ml) 0,20 µm çaplı steril filtreden geçirildiler. Oluşturulan her bir çözeltilerden 10'ar µl alınarak 96 kuyucuklu plağın 8 kuyucuğundaki hücreler üzerine eklendi. Daha sonra her kuyucuğa 100 µl hücre medyumu eklenerek homojenizasyon sağlandı.

Sonuçta, plaktaki 8'er adet kuyuya sırasıyla;

1- Hücre medyumu (kontrol),
2- 10 µl saf Hb çözeltisi içeren hücre medyumu,
3- 10 µl saf mnp çözeltisi içeren hücre medyumu
4- 10 µl 3APGAMNP-Hb çözeltisi içeren hücre medyumu
5- 10 µl GAMNP-Hb çözeltisi içeren hücre medyumu
6- 10 µl TEALMNP-Hb çözeltisi içeren hücre medyumu
7- 10 µl TALMNP-Hb çözeltisi içeren hücre medyumu eklenerek toplamda yedi grup oluşturuldu. 1 adet 96 kuyucuklu plak kullanıldı. Komplekslerin

eklenmesi sonrasında 96'lık plak tekrar inkübatöre yerleştirildi ve hücrelerin uygulanan komplekslerle 24 saat inkübasyonu sağlandı.

c) İnkübasyon süresinin sonunda kuyular içerisindeki medyumlar uzaklaştırılarak her kuyuya, 10 µl MTT içeren 100µl hücre medyumu eklendi ve inkübatörde 4 saat inkübasyona devam edildi.

d) MTT uygulaması tamamlandıktan sonra kuyular dikkatli bir şekilde boşaltıldı ve 100 µL DMSO eklenerek 30 dakika beklendi. Plağın 570 nm de EON mikrospektrofotometrede O.D. okunması yapılarak, hazırlanan komplekslerin endotel hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine olan etkileri belirlendi.

MTT'nin hazırlanmasında çözücü olarak PBS (5mg/ml) kullanılmıştır. İyice çözünene kadar vortekslenmiş ve uygulama yapılmadan hemen önce 0.22 µm çaplı filtreden geçirilmiştir.

3.2.4. Manyetik nanopartikül komplekslerinin antioksidan enzim aktiviteleri üzerine etkilerinin incelenmesi

3.2.4.1. Uygulama yapılacak hücrelerin hazırlanması

75cm^2'lik flask içerisindeki endotel hücrelerine uygulanan tripsinizasyon işlemi sonrası elde edilen hücre süspansiyonundaki hücre miktarı mikroskobik olarak sayıldı. Daha sonra, 24 kuyucuklu 4 adet kültür plağının her kuyusuna eşit ve homojen olacak şekilde 30'ar µl hücre süspansiyonundan eklendi ve üzerine 1'er mililitre hücre medyumu konularak hücrelerin kuyu içerisinde homojen olarak dağılmaları sağlandı. Kültür plakları inkübatöre yerleştirilerek 24 saat süresince hücrelerin plak yüzeyine yayılmasına izin verildi. İnkübasyon sonrası hücreler üzerindeki medyum uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 10'ar µl (1mg/10ml PBS), saf mnp, saf Hb, 3APGAMNP-Hb, GAMNP-Hb, TEALMNP-Hb ve TALMNP-Hb çözeltileri ve 1'er ml hücre medyumu eklendi. 12 kuyucuğa da 1'er ml sadece hücre medyumu eklenerek kontrol grubu oluşturuldu. Proliferasyon analizinde olduğu gibi her deney seti sekizer adet deneysel grup üzerine çalışıldı. Hücrelerin çözeltilerle 72 saatlik inkübasyonu için kültür plakları inkübatöre yerleştirildi. İnkübasyon süresinin sonunda plak içerisindeki

hücre medyumları dikkatli bir şekilde uzaklaştırılarak hücreler PBS ile iki defa yıkandı. PBS uzaklaştırıldıktan sonra her kuyuya 1'er mililitre lizis tamponu eklenerek 5 dakika 37^{o}C'de inkübe edildi. İnvert mikroskop altında hücrelerin parçalandığı gözlendikten sonra her kuyu içerisindeki hücre parçalarını içeren solüsyon çekilerek 2 ml'lik steril ependorf tüplerine alınarak 10,000 g'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatan kısımları steril ependorflara alınarak örnekler oluşturuldu ve -20 derecelik dondurucuya antioksidan çalışmaları yapılmak üzere yerleştirildi.

3.2.4.2. Süperoksit dismutaz (SOD) enzim aktivitesi ölçümü

SOD önemli antioksidan enzimlerden biridir. Süperoksit radikaline bağlı yıkıma karşı savunmada ilk adım olarak bilinen SOD enzimleri aktif bölgelerinde transisyon metali (Fe, Mn, Cu) içerirler. SOD, süperoksit radikalini dismutasyon reaksiyonu ile ortadan kaldırır. Enzim bütün aerobik organizmalarda mitokondri ve sitozolde bulunur ve tek bilinen substratı süperoksit radikalidir. SOD süperoksit anyonunu dismutasyon ile H_20_2'e katalizler. Yöntemde kullanılan test kiti süperoksit anyonu ile indirgenerek suda çözülebilen formazon boya oluşturan WST-1'i kullanır. SOD inhibisyon aktivitesi kolorimetrik yöntemle 450 nm'de belirlenebilir.

Test prosedürü hazırlığı;

1- Her bir örnek için kör 2' ye 20 µl örnek Solüsyonu, kör 1 ve kör 3'e ise 20 µl su eklendi.
2- Her bir kuyu için 200 µl WST çalışma çözeltisi eklendi.
3- Kör 2 ve kör 3' e 20 µl seyreltme tamponu eklendi.
4- Her bir örnek ve Blank 1 için 20 µl Enzim çalışma solüsyonu eklendi ve iyice karıştırıldı.
5- Plakların 37° C'de 20 dk inkübasyonu yapıldı.
6- Okuma EON mikrospektrofotometre kullanılarak 450 nm absorbanstta gerçekleştirildi.
7- Aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı:

$$\text{SOD Aktivitesi (inhibisyon oranı \%)} = \frac{(A_{blank1} - A_{blank3}) - (A_{sample} - A_{blank2})}{(A_{blank1} - A_{blank3})} \times 100$$

3.2.4.3. Katalaz (CAT) enzimi aktivite ölçümü

Katalaz (EC 1.11.1.6) hemen hemen tüm canlılarda bulunan antioksidan enzimdir. Eritrositlerde yüksek oranda bulunurken kalp, kas ve endotelde de gösterilmiştir. Bu enzim toksik hidroksil radikalini oluşturmadan, hidrojen peroksiti direk olarak suya çevirir. Reaksiyonda, öncelikle katalaz enzimi su ve oksijen üretmek amacıyla H_2O_2 ile tepkimeye girmektedir. Tepkimeye girmeyen H_2O_2, OxiRed^{TM} ile EON mikrospektrofotometre 570 nm' de ölçülebilir bir ürün üretmek için reaksiyon verir.

3.2.4.4. Glutatyon peroksidaz enzim aktivite ölçümü

Glutatyon peroksidazlar peroksit redüksiyonunu kataliz eden enzimlerdir. Glutatyonun peroksit ve disülfitlerle reaksiyonu sonucu glutatyon disülfitler (GSSH) meydana gelmekte ve bu durumun tekrar redüklenmesi kofaktör olarak NADPH kullanan glutatyon redüktaz katalizi ile olmaktadır. Çalışmada NADPH'nin azalmasına bağlı olarak 340 nm'de meydana gelen absorbans değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplanmıştır.

Prosedür:

1- Seyreltilmiş örnek: 0,02 ml örnek + 1 ml reaktif + 0,04 ml kumen
2- Reaktif kör: 0,02 ml distile su + 1 ml reaktif + 0,04 ml kümen konulur.

Karıştırılır ve 340 nm'de ölçümleri yapıldı.
Glutatyon Peroksidaz Konsantrasyon aşağıdaki formülle hesaplandı.
Lizat U/I = 8412 x ΔA 340 nm / dakika
XRD, FT-IR, UV-vis, siklik voltogram analizleri Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi; C-TEM analizleri ODTÜ Merlab; Sem, elementel analizler Mersin Üniversitesi Meitam, Hücre kültürü ve UV-vis analizleri Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD.' da yapılmış ve değerlendirilmiştir. Tüm istatistiksel analizle SPSS 16.0 versiyonunda analiz edilmiştir.

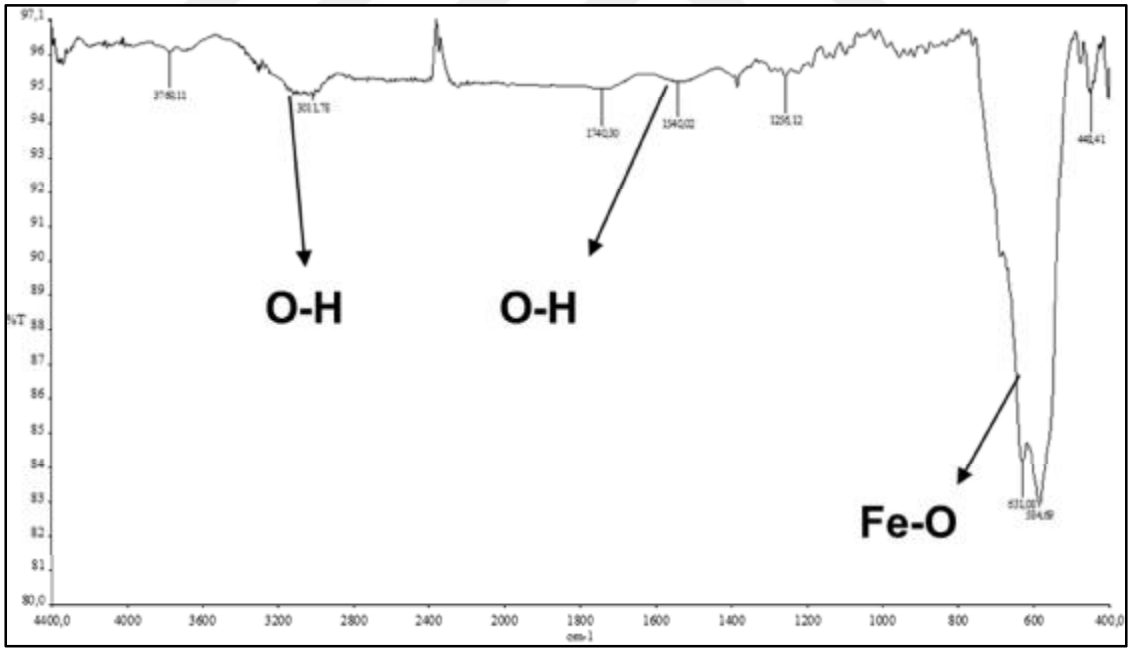
4. BULGULAR

4.1. Manyetik nanopartikül sentezi ve çeşitli ara kollar ile modifikasyonu

4.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi

Manyetik nanopartiküllerin sentezi için demirin $FeSO_4$ ve $FeCl_3$ tuzları kullanılmıştır. Başlangıçta bu tuz karışımlarının renkleri sarı iken NaOH eklenmesi ile birlikte siyah renkli manyetik nanopartiküller (mnp) oluşmuştur. Oluşan manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri mıknatıs ile test edilerek değerlendirilmiştir. Elde edilen mnp; FT-IR, XRD, SEM ve C-TEM gibi spektroskopik tekniklerle analiz edilmiştir.

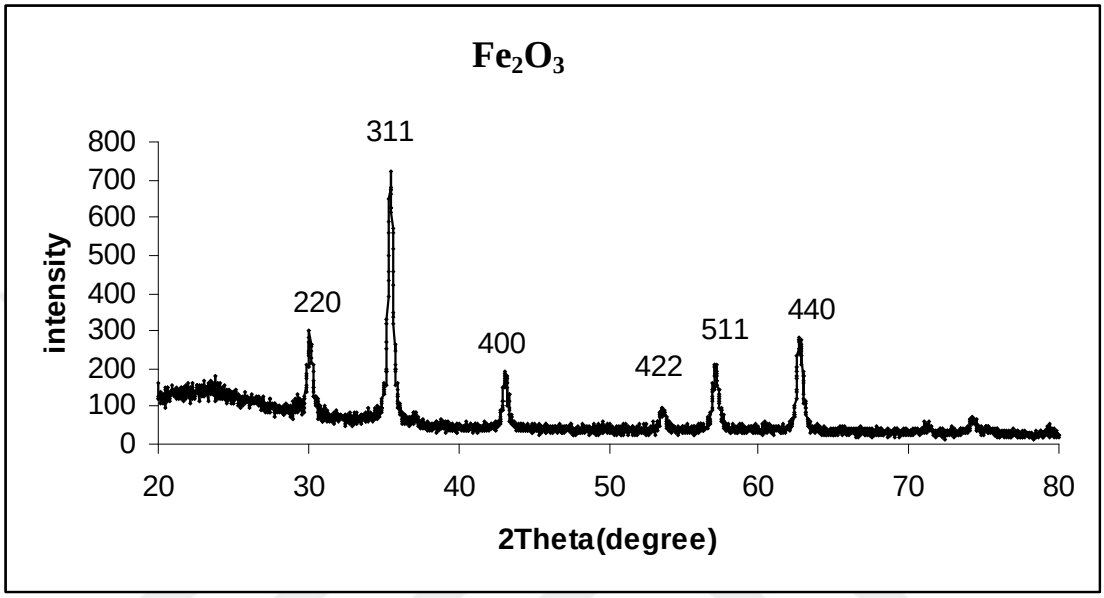
Mnp'nin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3450 cm^{-1} ve 584 cm^{-1} iki karakterstik pik gözlenmiştir. mnp'ye ait FT-IR spektrumu Şekil 25'te verilmiştir.



Şekil 25. Magnetitin FT-IR spektrumu

Mnp'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden

hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 20 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 6 ve Şekil 26'da verilmiştir.

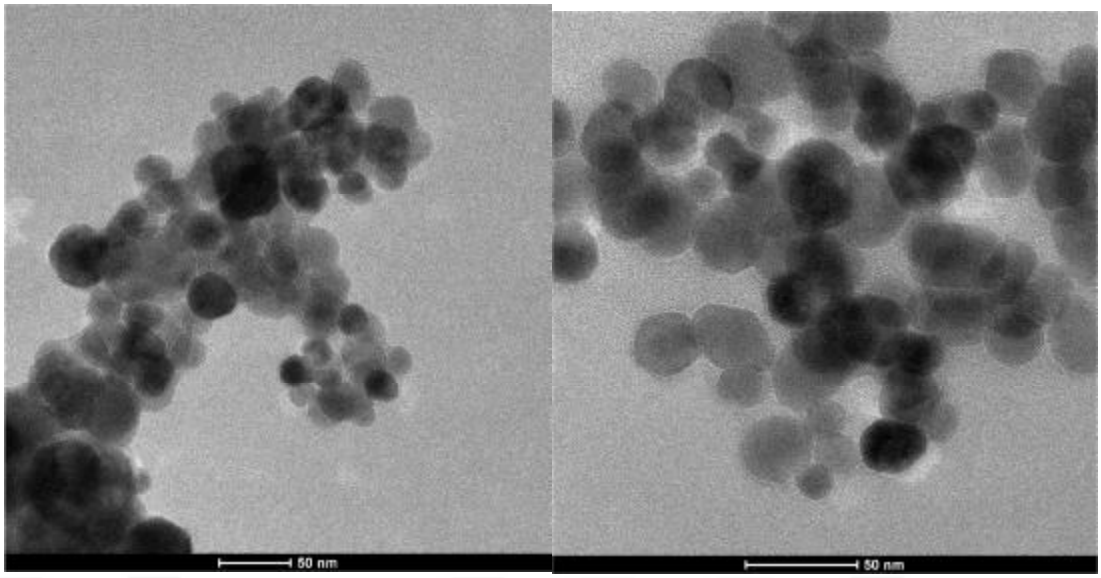


Şekil 26. Manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

Çizelge 6. Manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri

No.	2theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size (A)
1	30,170(15)	2,9369(14)	301(22)	153(3)	0,390(13)	221(±7)
2	35,461(7)	2,5100(5)	982(40)	526(4)	0,389(6)	200(3)
3	37,48(5)	2,398(3)	37(8)	13.6(19)	0,34(4)	261(32)
4	43,38(2)	2,0828(9)	213(19)	109(2)	0,361(17)	247(12)
5	53,69(3)	1,7022(10)	86(12)	46(2)	0,46(2)	204(11)
6	57,23(16)	1,6057(4)	245(20)	143(2)	0,478(12)	198(5)
7	62,77(15)	1,4751(3)	410(26)	224(3)	0,418(11)	233(6)
8	74,49(4)	1,2728(6)	66(10)	38(2)	0,43(5)	240(30)
9	75,42(3)	1,2594(4)	33(7)	9,5(12)	0,20(4)	532(98)

Mnp'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde boyutları 10-50 nm aralığında olduğu görülmektedir. C-TEM görüntülerinden, her bir partikül kümesinin boyutunun 100-250 nm aralığında olduğu görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 27'de verilmiştir.

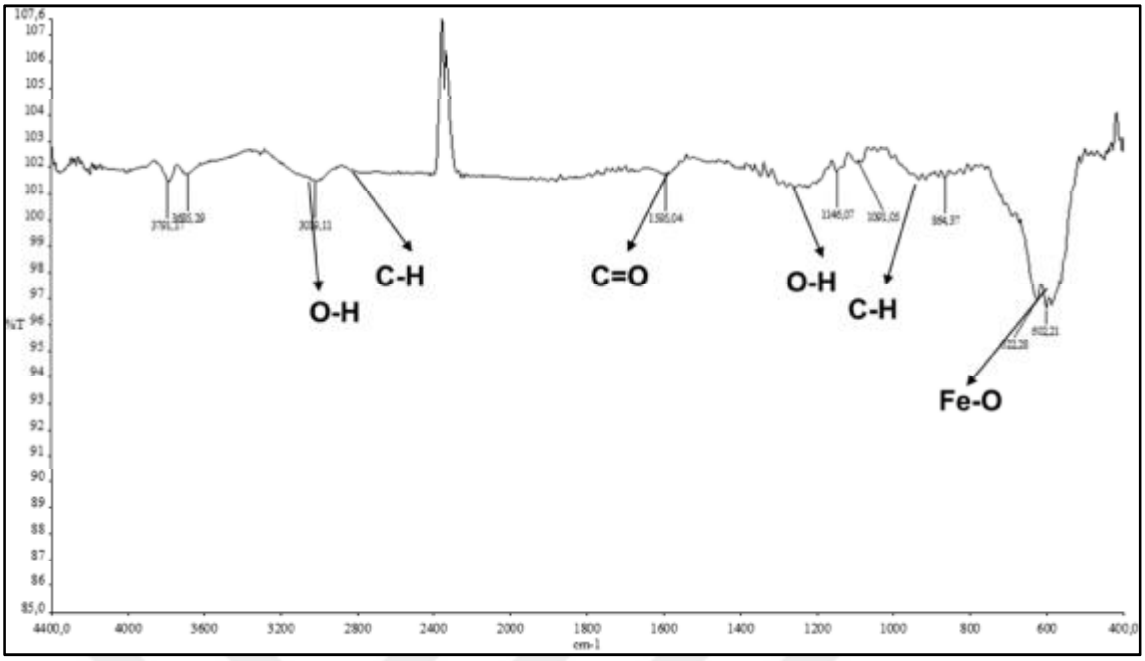


Şekil 27. Magnetitin C-TEM görüntüleri

4.1.2. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması ve modifikasyonu

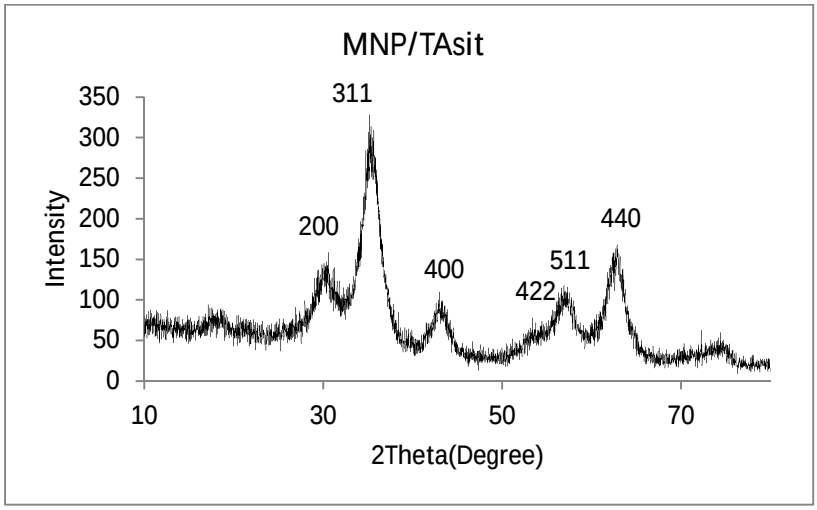
4.1.2.1. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması

Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması aşamasında elde edilen tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin (TAMNP) karakterizasyonunda FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3300 cm^{-1}, 1595 cm^{-1}, 1084 cm^{-1} ve 602 cm^{-1}'de karakteristik pikler gözlenmiştir. TAMNP'e ait FT-IR spektrumu Şekil 28'de verilmiştir.



Şekil 28. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

TAMNP'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. XRD piklerinde sağa doğru bir kayma olduğu saptanmıştır. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 21,1 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 7 ve Şekil 29'da verilmiştir.

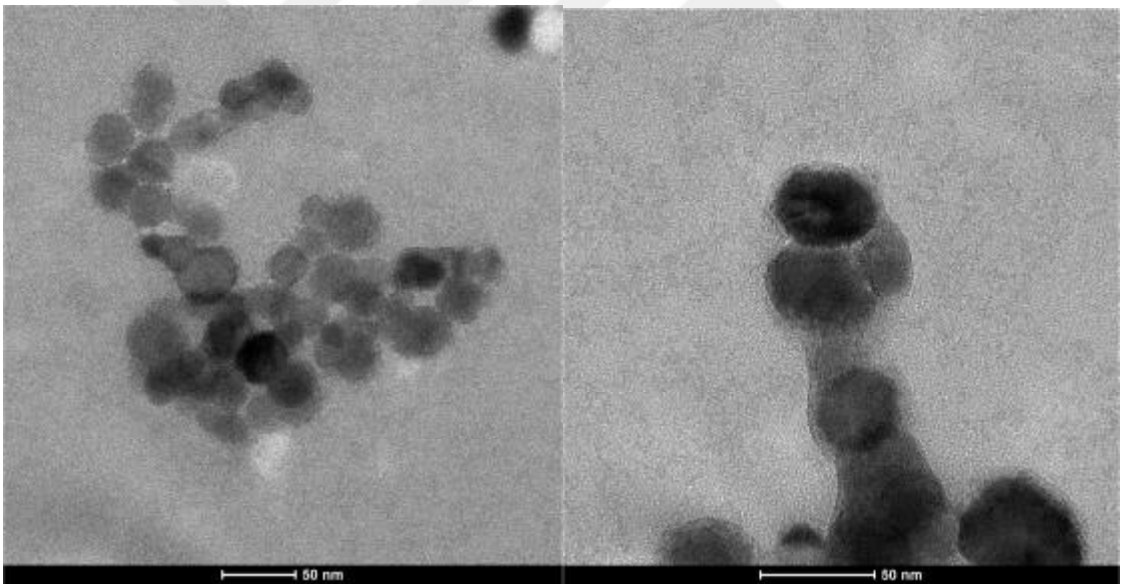


Şekil 29. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Spektrumu

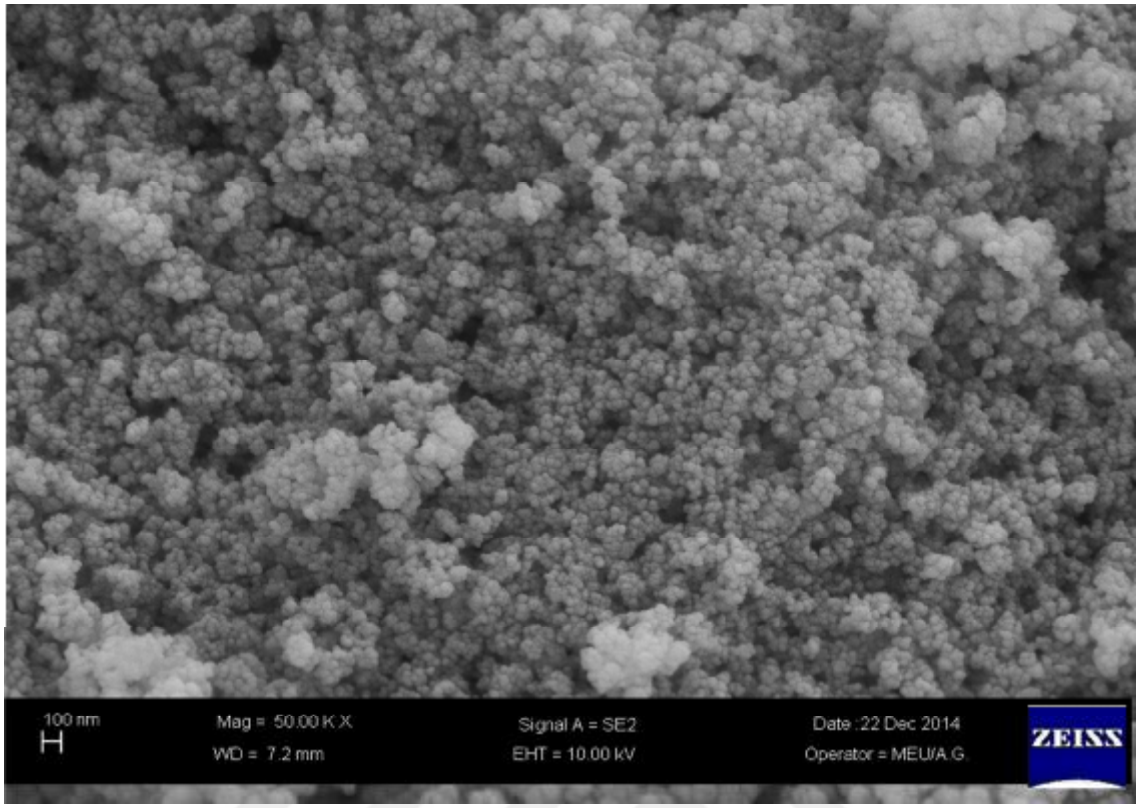
Çizelge 7 Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Analiz Verileri

No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size(A)
1	29,95(10)	2,981(10)	36(5)	141(6)	3,33(18)	25,8(14)
2	35,30(4)	2,541(3)	125(10)	383(9)	2,58(4)	33,7(5)
3	43,30(3)	2,0878(15)	23(4)	49(3)	1,99(9)	44,9(19)
4	57,11(13)	1,612(3)	30(5)	155(3)	4,87(14)	19,4(6)
5	62,55(5)	1,4838(11)	60(7)	167(4)	2,63(5)	36,9(7)
6	74,3(2)	1,276(3)	7(2)	21(2)	2,7(2)	39(3)

TAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın azaldığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. C-TEM görüntülerinden nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının eşit olmadığı saptanmaktadır. C-TEM görüntüleri Şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri



Şekil 31. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri

TAMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde ise topaklanmanın azaldığı, XRD ve C-TEM verileri ile uyumlu şekilde boyutların 50 nm'den küçük olduğu belirlenmiştir. SEM görüntüleri Şekil 31'de verilmiştir. Kaplama yapıldıktan sonra alınan EDX verilerinden kaplama miktarı yüzdesel olarak bulunmuştur, buna göre $1{,}7x10^{-3}$ mol tartarik asit/g mnp kaplama gerçekleşmiştir (Çizelge 8).

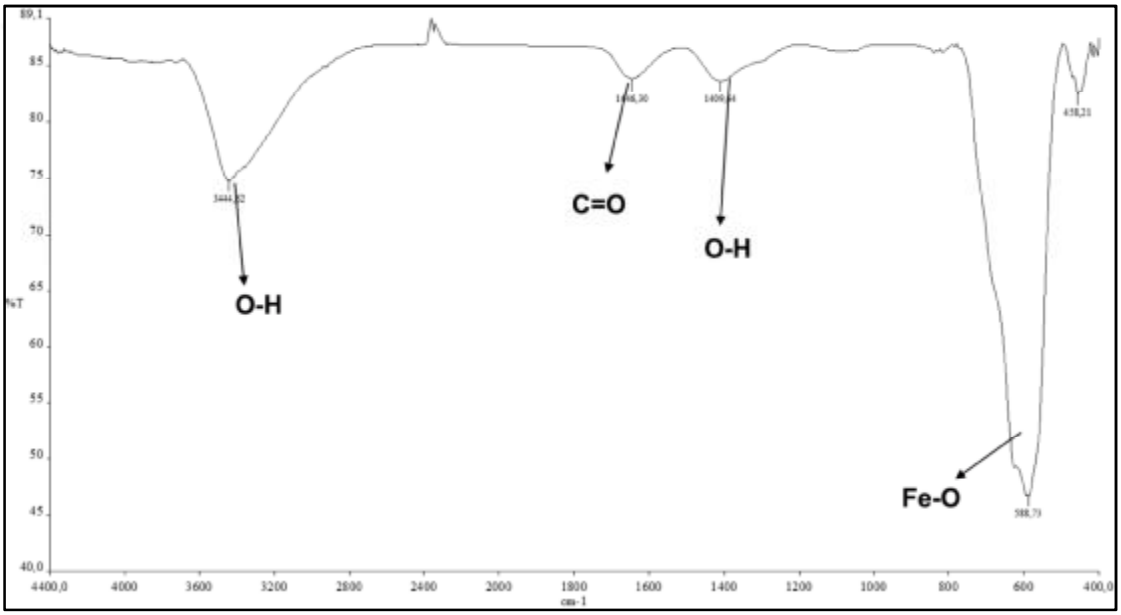
Çizelge 8. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları

El	AN	Series	Net unn. [wt.%]	C norm. [wt.%]	C Atom. [at.%]	C Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	79910	51.70	54.97	37.68	2.28
O	8	K-series	270115	22.27	23.68	56.64	2.42
Pt	78	M-series	164881	14.26	15.16	2.98	0.57
C	6	K-series	8252	5.83	6.19	2.70	0.29

4.1.2.2. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin karboksilik asit grubunun indirgenmesi

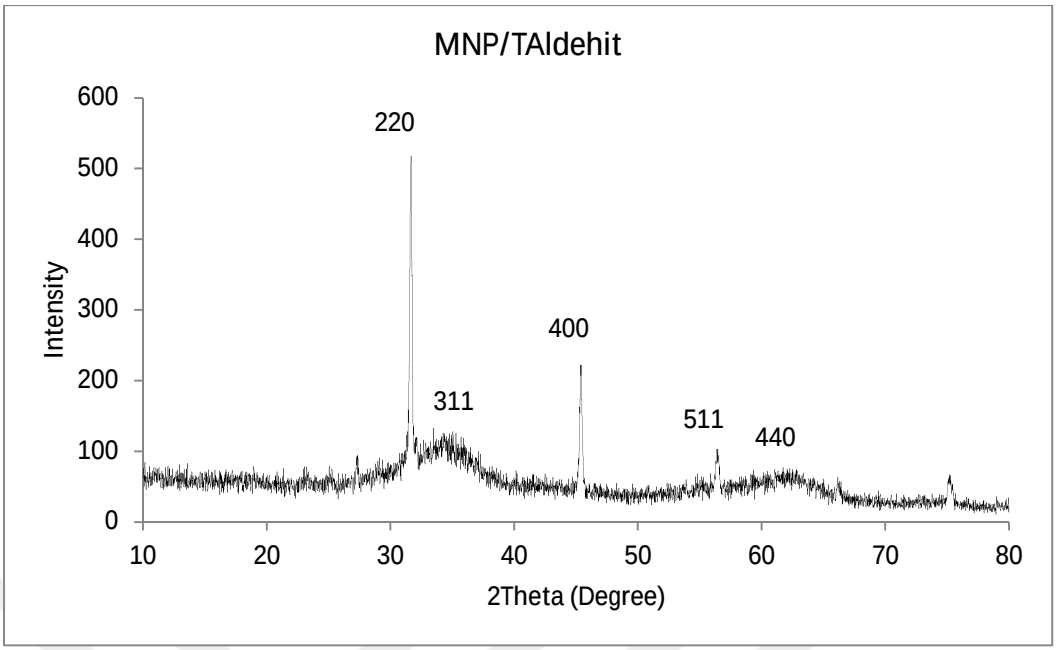
Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu aşamasında kullanılan indirgenme ajanı $NaBH_4$ kuvvetli bir indirgen olup, karboksilik asitlerin alkol basamağına kadar indirgenmesini sağlar.

Elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin (TACMNP), FT-IR sonuçları incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}, 1646 cm^{-1}, 1409 cm^{-1}, 1083 cm^{-1} ve 588 cm^{-1}'de pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 32'de verilmiştir.



Şekil 32. Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

Alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD sonuçları ile karşılaştırıldığında piklerin genel olarak sağa kaydığı söylenebilir. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 21,1 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 9 ve Şekil 33'te verilmiştir.



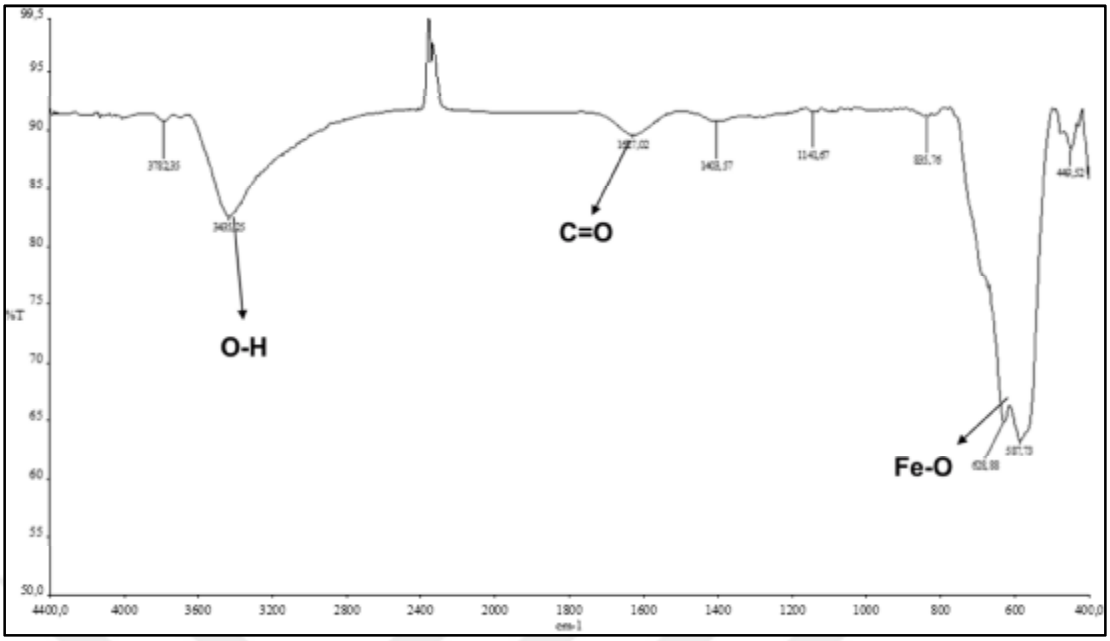
Şekil 33. Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

Çizelge 9. Tartarik Asitten elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD Analiz verileri

No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cpsdeg)	FWHM(deg)	Size(A)
1	31.649(11)	2.8247(9)	274(15)	61.6(15)	0.180(8)	47(21)
2	45.387(14)	1.9966(6)	111(10)	27.2(9)	0.192(14)	46(35)
3	75.14(4)	1.2632(5)	28(5)	10.7(8)	0.28(5)	37(61)

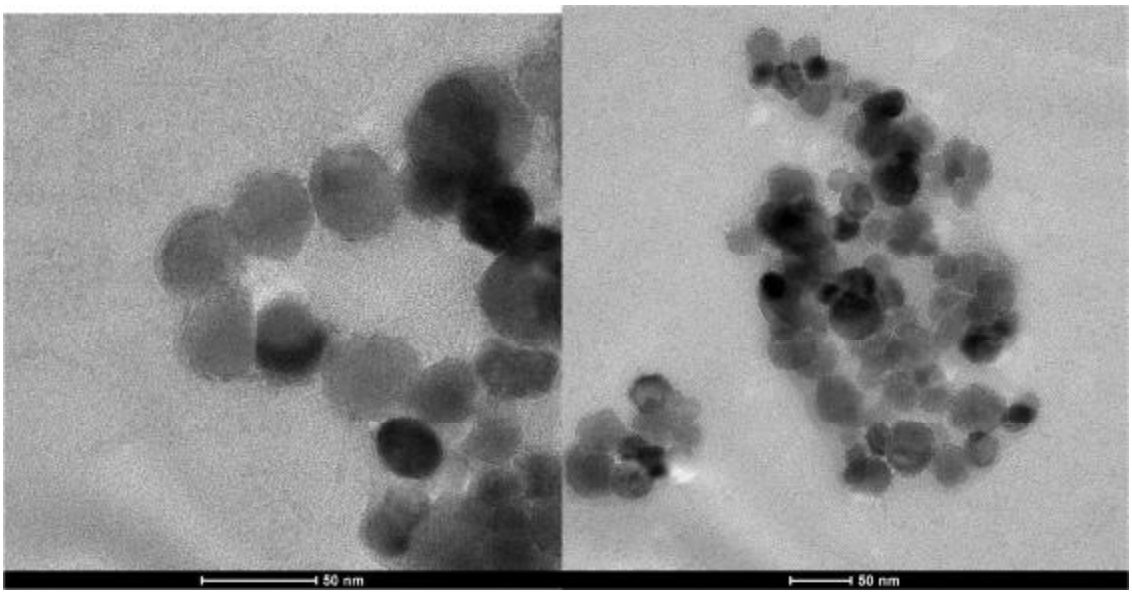
4.1.2.3. Alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin (TACMNP) alkol gruplarının yükseltgenmesi

Aldehit ve keton kaplı manyetik nanopartiküllerin (TALMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}, 1403 cm^{-1}, 587 cm^{-1}, 1627 cm^{-1} ve 587 cm^{-1}'de karakteristik pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 34'te verilmiştir.



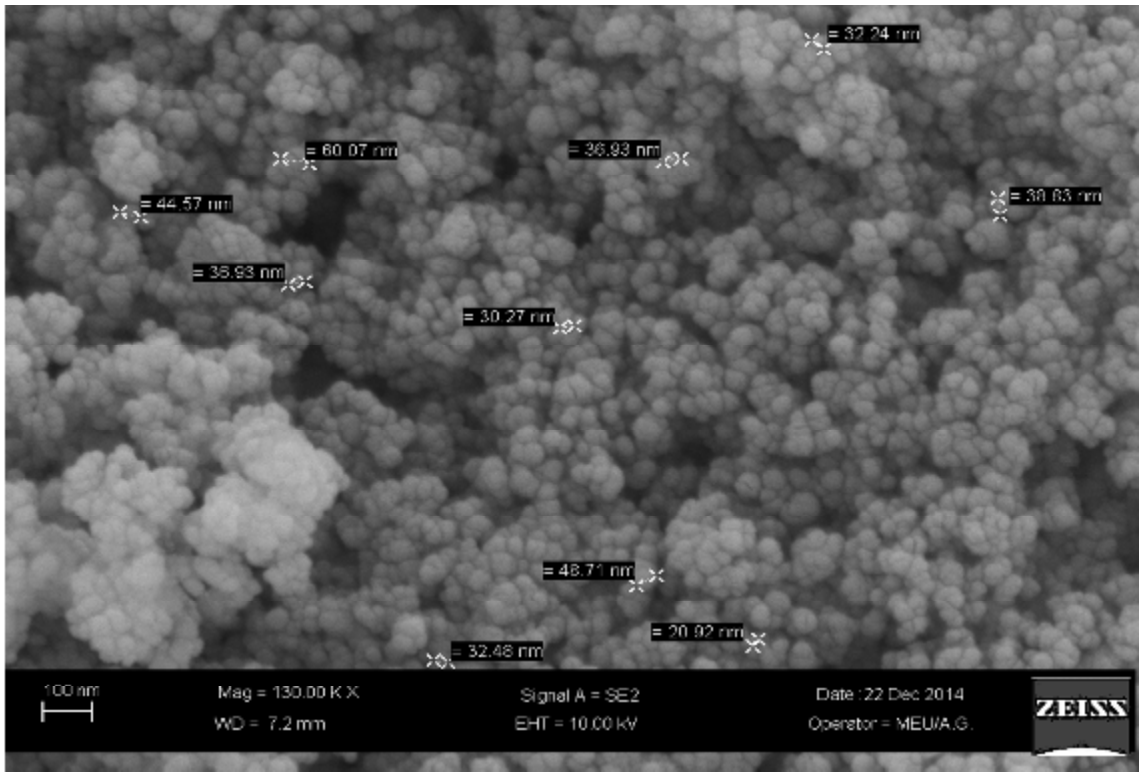
Şekil 34. Aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

TALMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın az olduğu ve topaklanan partiküllerin de yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu C-TEM verilerinde görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 35'te verilmiştir.



Şekil 35. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri

TALMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde partiküllerin çok az topaklandığı ve elde edilen partikül kümelerinin 50-200 nm aralığında olduğu sonucuna varılmıştır. C-TEM verileri ile uyumlu şekilde boyutların ortalama olarak 38.2 nm olduğu belirlenmiştir. SEM görüntüleri Şekil 36'da, EDX elementel analiz sonuçları Çizelge 10'da verilmiştir.

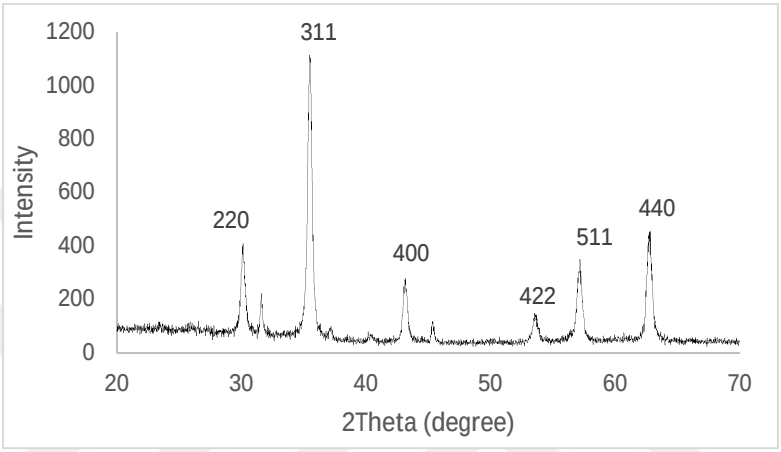


Şekil 36. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri

Çizelge 10. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları

El	AN	Series	Net unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	79910	51.70	55.67	38.08	2.28
O	8	K-series	270115	22.27	24.08	57.00	2.42
Pt	78	M-series	164881	14.26	15.60	3.05	0.57
C	6	K-series	8252	5.83	4.65	1.87	0.29

Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik XRD spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 21,3 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 11 ve Şekil 37'de verilmiştir.



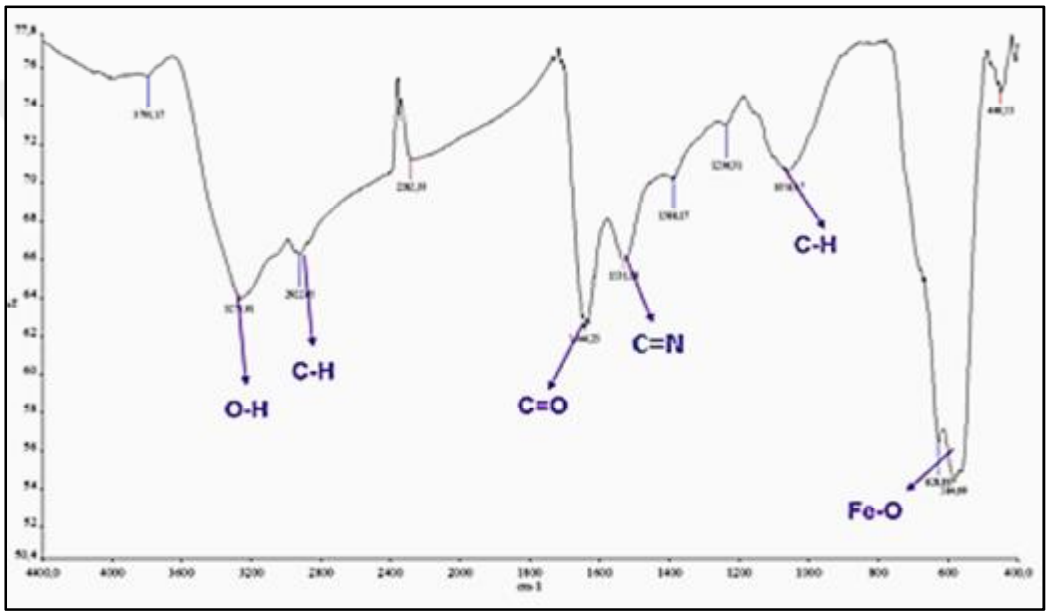
Şekil 37. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

Çizelge 11. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri

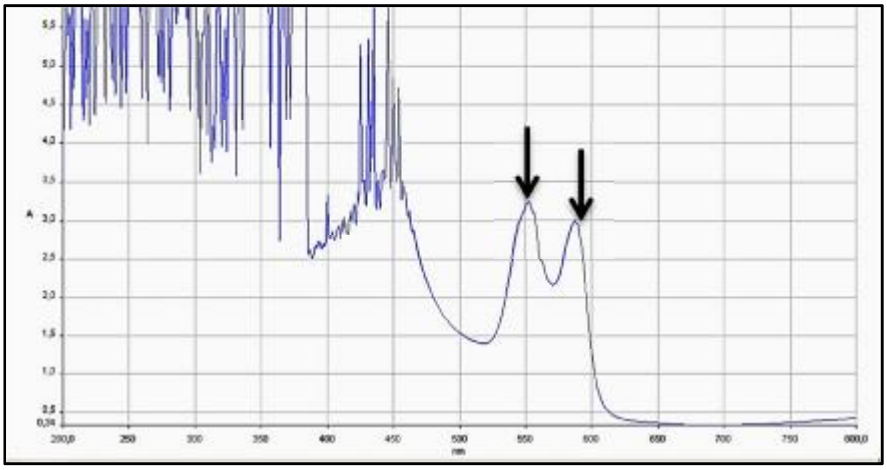
No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.110(15)	2.9662(14)	179(12)	0.379(13)	91.6(18)	0.51(5)	221
2	31.622(11)	2.8274(9)	92(9)	0.163(14)	19.9(13)	0.22(3)	123
3	35.365(11)	2.5362(7)	390(18)	0.30(6)	175(58)	0.45(17)	213
4	35.486(15)	2.5270(10)	337(17)	0.28(3)	138(58)	0.41(19)	235
5	43.144(16)	2.0952(7)	133(11)	0.376(13)	64.3(13)	0.48(5)	262
6	45.338(9)	1.9989(4)	59(7)	0.13(2)	12.7(7)	0.22(4)	25.6
7	53.52(3)	1.7074(7)	56(7)	0.43(4)	31.6(13)	0.56(9)	198
8	57.080(19)	1.6121(5)	164(12)	0.440(17)	95.5(17)	0.58(5)	236
9	62.727(16)	1.4800(3)	242(14)	0.423(13)	132.3(19)	0.55(4)	256

4.1.2.4. Tartarik asitten elde edilen aldehit kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması

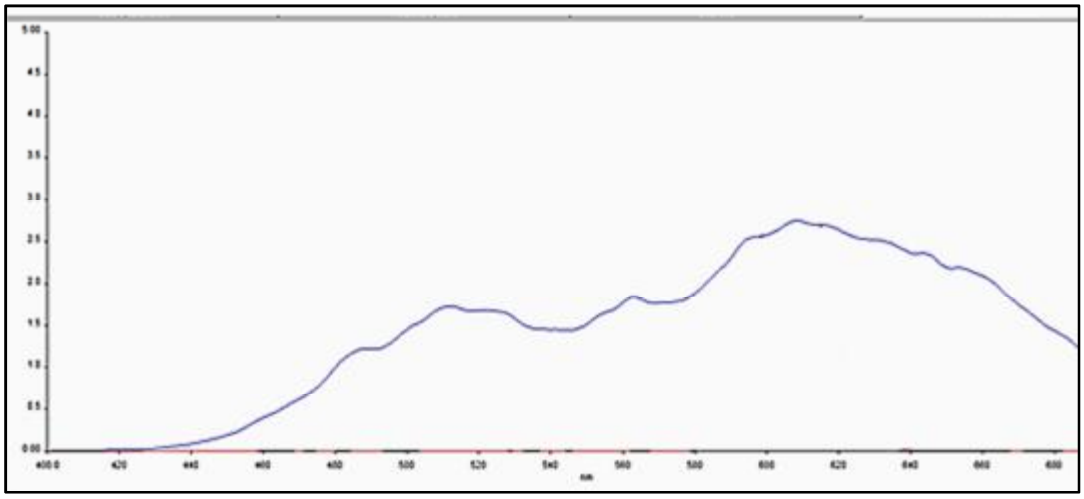
Manyetik nanopartiküllere tartarik asit bağlanması ve modifikasyonları sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TALMNP), Hb bağlanmıştır. Elde edilen manyetik nanopartikül destekli hemoglobinlerin (TALMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3600 cm^{-1}, 3050-3100 cm^{-1}, 2922 cm^{-1}, 1644 cm^{-1}, 1531 cm^{-1} ve 584 cm^{-1}'de pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 38'de verilmiştir.



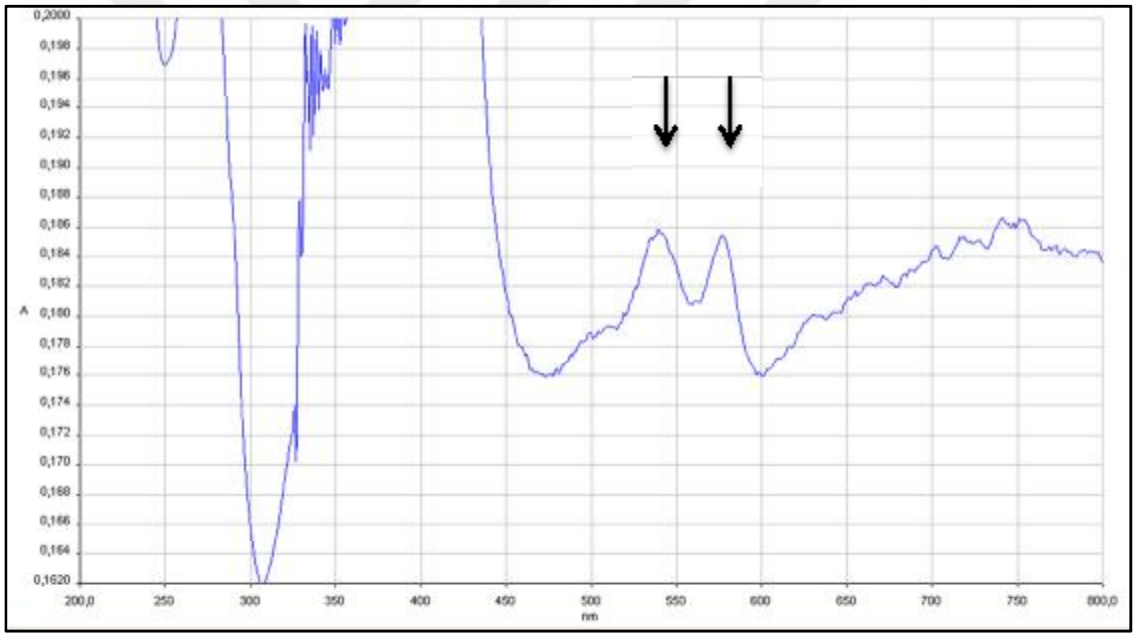
Şekil 38. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu



Şekil 39. Oksihemoglobine ait UV-Vis spektrumu



Şekil 40. Serbest hemoglobinlerin oda ısısında 3 hafta sonraki UV-Vis spektrumu

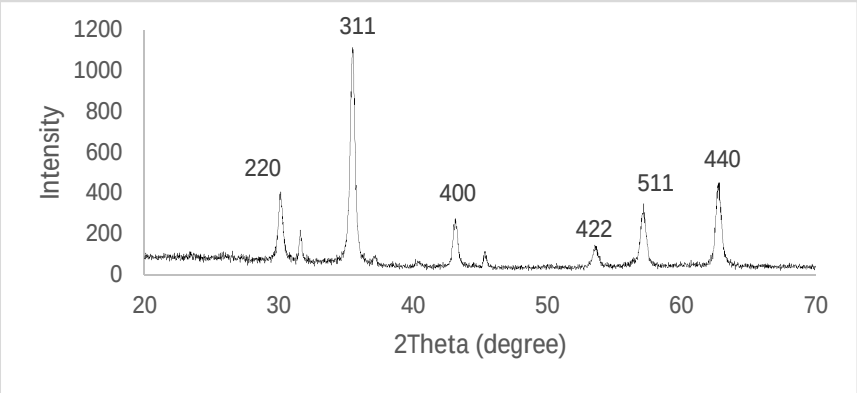


Şekil 41. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin bağlandıktan 3 hafta sonraki UV-Vis spektrumu

Manyetik nanopartiküllere tartarik asit bağlanması ve modifikasyonları sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TALMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin hemen sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 539,72 ve 577,18 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (Şekil 38). Bağlamadan 3 hafta sonra yapılan UV-Vis ölçümlerinde elde edilen spektrum incelendiğinde saf Hb ile aynı yerlerde pikler

vermeye devam ettiği gözlenmiştir (Şekil 41). Ancak bağlaması yapılmayan saf Hb'lerde karakteristik pikler kaybolmuştur (Şekil 40).

Hb bağlanmış manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 24,2 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 12 ve Şekil 42'de verilmiştir.

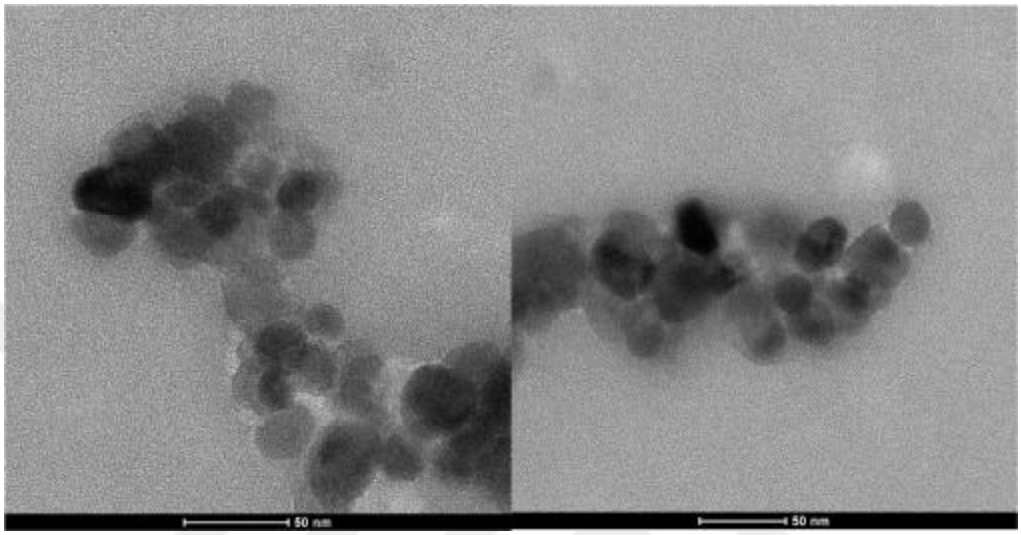


Şekil 42. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu

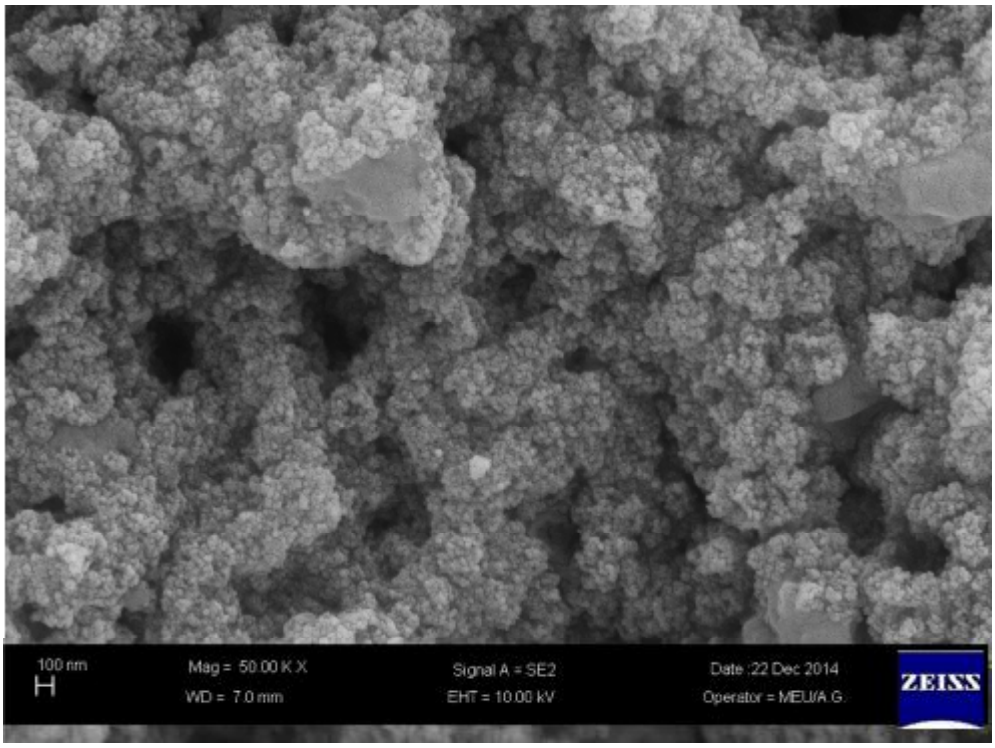
Çizelge 12. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD analiz verileri

No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.103(15)	2.9662(14)	179(12)	0.379(13)	91.6(18)	0.51(5)	227
2	31.619(11)	2.8274(9)	92(9)	0.163(14)	19.9(13)	0.22(3)	120
3	35.362(11)	2.5362(7)	390(18)	0.30(6)	175(58)	0.45(17)	232
4	35.494(15)	2.5270(10)	337(17)	0.28(3)	138(58)	0.41(19)	233
5	43.140(16)	2.0952(7)	133(11)	0.376(13)	64.3(13)	0.48(5)	256
6	45.331(9)	1.9989(4)	59(7)	0.13(2)	12.7(7)	0.22(4)	23.1
7	53.63(3)	1.7074(7)	56(7)	0.43(4)	31.6(13)	0.56(9)	190
8	57.087(19)	1.6121(5)	164(12)	0.440(17)	95.5(17)	0.58(5)	225
9	62.727(16)	1.4800(3)	242(14)	0.423(13)	132.3(19)	0.55(4)	235

TALMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu C-TEM görüntülerinden görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 43'te verilmiştir.



Şekil 43. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri



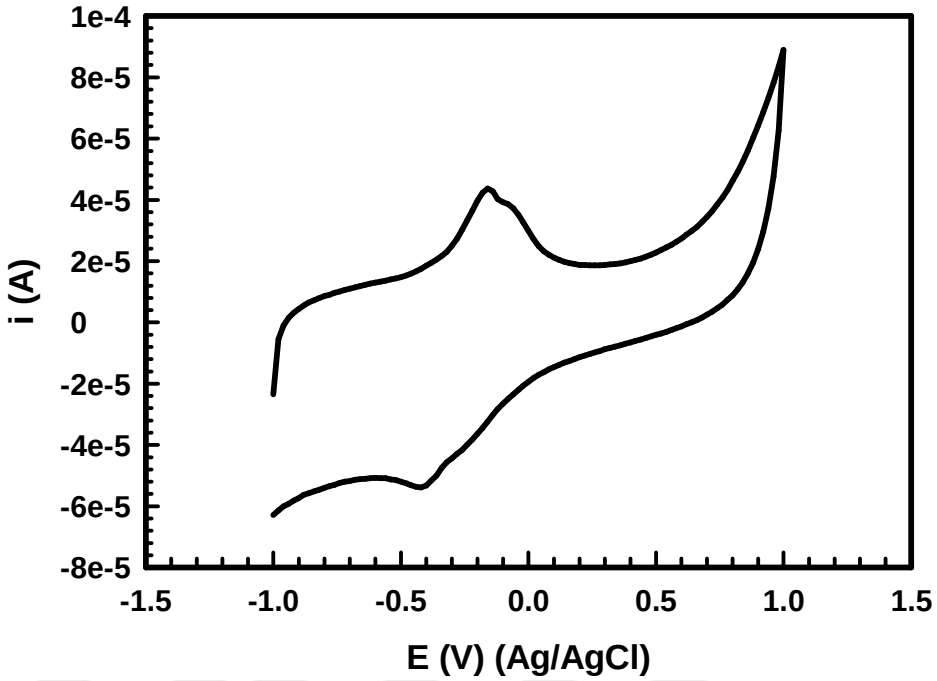
Şekil 44. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri

TALMNP-Hb'nin SEM görüntüleri Şekil 44'de verilmiştir. TALMNP ve TALMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında elementel analiz sonuçlarındaki C atomu miktarındaki artış vardır (Çizelge 13).

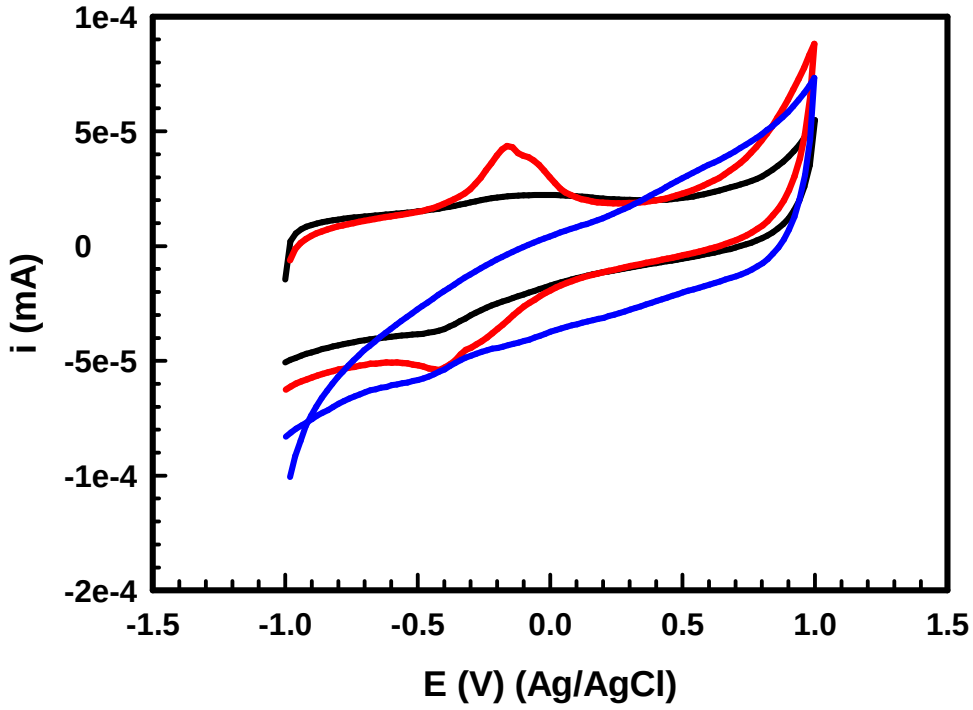
Çizelge 13. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz sonuçları

El	AN	Series	Net	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	53708	40.49	43.82	25.30	1.80
O	8	K-series	175845	19.87	21.91	42.85	2.19
Pt	78	M-series	183043	17.58	18.86	3.14	0.69
C	6	K-series	52453	14.81	13.22	26.00	1.13
N	7	K-series	3533	1.82	2.21	2.71	0.20
		Total:		94.57	100.00	100.00	

TALMNP-Hb'nin siklik voltogram çalışması pH 7,4 fosfat tamponunda 3mg TALMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış olan süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler aynı çözelti içerisinde 3 döngü tekrarı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Hb oksijen alarak Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde pik vermiştir. Hemoglobin aldığı oksijenleri vererek -0,145 V anodik potansiyelde pik vermiştir. Sadece hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. TALMNP-Hb'ye ait voltogram Şekil 45-46'da verilmiştir.



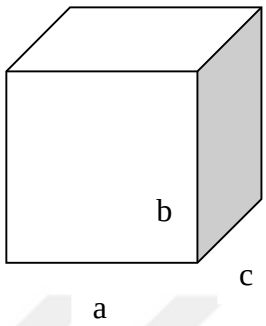
Şekil 45. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramı



Şekil 46. Siklik voltogramlar (▬ saf Hb, ▬ tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış Hb, ▬ tartarik asit kaplı manyetik nanopartikül)

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre TALMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %58,878'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 3,233 azot bulunmaktadır.

Nanopartikül başına düşen Hb miktarı hesaplanması:



a = b = c = 8,39 Å

a.b.c = 590,5 Å = $590{,}5.10^{-24}$ cm^{-3} (10^8 Å= 1 cm)

Her bir magnetit birim hücresi kenar uzunluğu 8,39 Å olduğuna göre bir hücrenin hacmi a.b.c formülünden 590,5 Å'a, o da $590{,}5x10^{-24}$ cm^3'e denk gelir.

Her bir Fe_3O_4 hacmi; $590{,}5x10^{-24}$ cm^3 / 8 = $73{,}8.10^{-24}$ cm^3

Her birim hücrede 8 tane Fe_3O_4 birimi bulunur. Buradan Fe_3O_4 başına hacim; $73{,}8.10^{-24}$ cm^3'tür.

1 tane Fe atomu kütlesi: 55,84 g / ($6{,}02.10^{23}$) = $9{,}275.\ 10^{-23}$ g

1 tane O atomu kütlesi: 16 g / ($6{,}02.10^{23}$) = $2{,}657.\ 10^{-23}$ g

Her bir birim hücrede 24 tane Fe ve 32 tane O atomu bulunur. Bu durumda her bir birim hücrenin kütlesi;

(24. $9{,}275.\ 10^{-23}$ g) + (32. $2{,}657.\ 10^{-23}$ g) = $307{,}6.\ 10^{-23}$ g

Deneylerde kullanılan magnetitlerin ortalama boyutu 20 nm olduğuna göre, bir nanopartikülün hacmi;

$(4\pi r^3/3) = (4\pi(10nm)^3/3) = 4188\ nm^3 = 4{,}188.\ 10^{-18}\ cm^3$

20 nm'lik bir partiküldeki birim hücre sayısı;

$4{,}188.\ 10^{-18}$ cm^3 / ($590{,}5.10^{-24}$ cm^{-3}) = 7092 tane birim hücre

20 nm'lik bir partiküldeki Fe atomu sayısı;

24. 7092 = 170208 tane Fe atomu

20 nm'lik bir partiküldeki O atomu sayısı;

32. 7092 = 226944 tane O atomu

20 nm'lik bir partikülün kütlesi;

(170208. 9,275. 10^{-23} g) + (226944. 2,657. 10^{-23} g) = 2,182.10^{-17} g

1 g magnetitte bulunan partikül sayısı ise;

1/ (2,182.10^{-17} g) = 4,58. 10^{16} tane partikül

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre TALMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %58,878'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 3,233 azot bulunmaktadır.

Malzeme içerisindeki Fe_3O_4 kütlesi;

58,877g Fe. (1 mol Fe/55,84 g Fe). (1 mol Fe_3O_4/3 mol Fe). (232 g Fe_3O_4/1 mol Fe_3O_4) = 81,539 g

100 g malzeme içerisindeki magnetit partikülleri sayısı;

81,539 g/ 2,182.10^{-17} g= 37,37.10^{17} tanecik

Bir Hb molekülü kütlesi $C_{2932}H_{4724}N_{828}O_{840}S_8Fe_4$ ve mol kütlesi 64500 kDa yani 64500 g/mol'dür (20).

100 g malzeme içerisindeki Hb molekülü sayısı;

3,233 g N. (1 mol N/14 g N). (1 mol Hb/ 828 mol N). (6,02.10^{23} tane Hb/ 1 mol Hb)= 1,68.10^{20} Hb

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı;

(1,68.10^{20} Hb) / (37,37.10^{17} tanecik)= 45 Hb/nanopartikül

Teorik olarak bir partiküle bağlanabilecek Hb sayısını hesaplamak için, küresel olarak nanopartiküllerin kaplanmış ve modifiye edilmiş son halinin yarıçapı 19,1 nm olduğu düşünülürse kürenin yüzey alanı;

$4.\pi.r^2 = 4.\ \pi.\ (19{,}1\ nm)^2 = 4729{,}5\ nm^2$

Bir Hb molekülü boyutları ise 6x5x5 nm'dir (20). Ancak iki Hb molekülünün molekül merkezleri arasındaki mesafe 6,9 nm'dir[21]. Bu durumda bağlanmış olan hemoglobinin partikül üzerinde temas edecek yüzey alanı en fazla bir küp olarak düşünüldüğünde;

$6{,}9\ nm.\ 6{,}9\ nm = 47{,}61\ nm^2$

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı teorik olarak;

$4729{,}5\ nm^2 / 47{,}61\ nm^2 = 99$

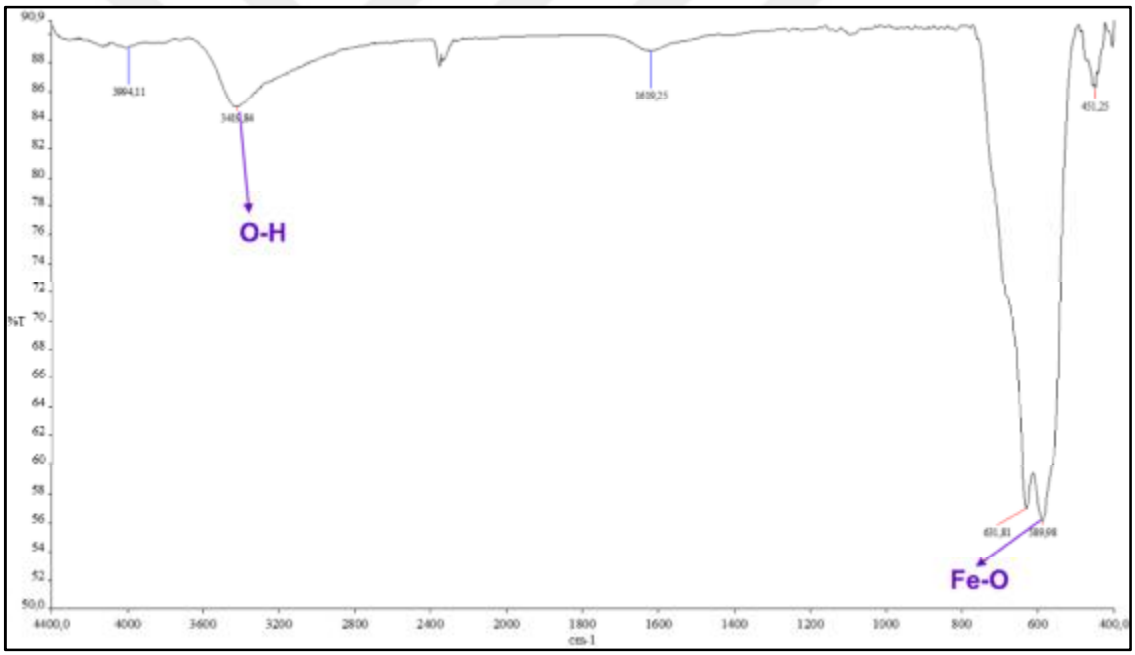
Yüzde bağlanma başarısı;

(Deneysel olarak bağlanan Hb) / (Teorik olarak bağlanan Hb) . 100 = (45 / 99) . 100 = % 45,45

4.1.3. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması ve modifikasyonu

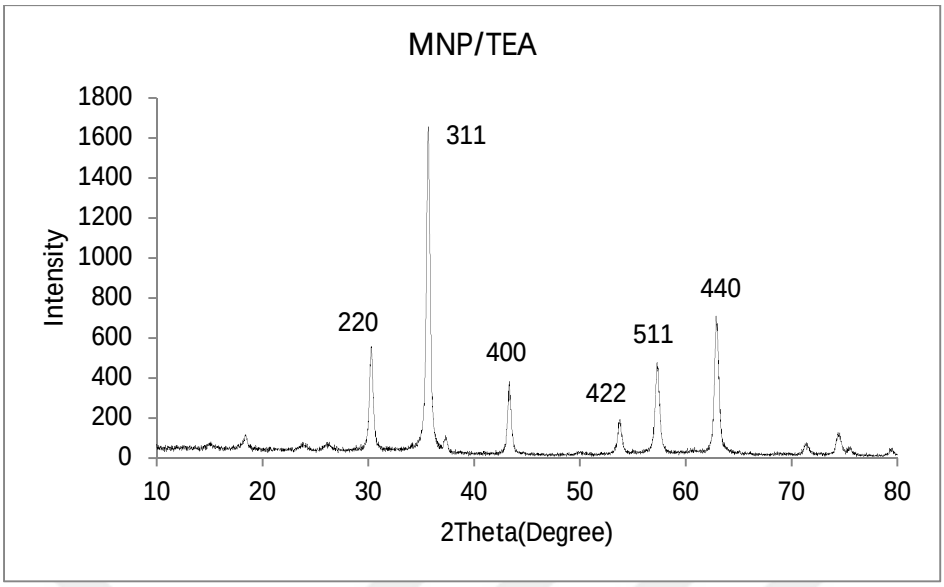
4.1.3.1. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması

Manyetik nanopartiküllerin trietanolamin ile kaplanması aşamasında elde edilen trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin (TEAMNP), FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}, 590 cm^{-1} pikler çıkmıştır. TEAMNP'e ait FT-IR spektrumu Şekil 47'de verilmiştir.



Şekil 47. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün FT-IR spektrumu

TEAMNP'ye ait XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22,6 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 14 ve Şekil 48'de verilmiştir.

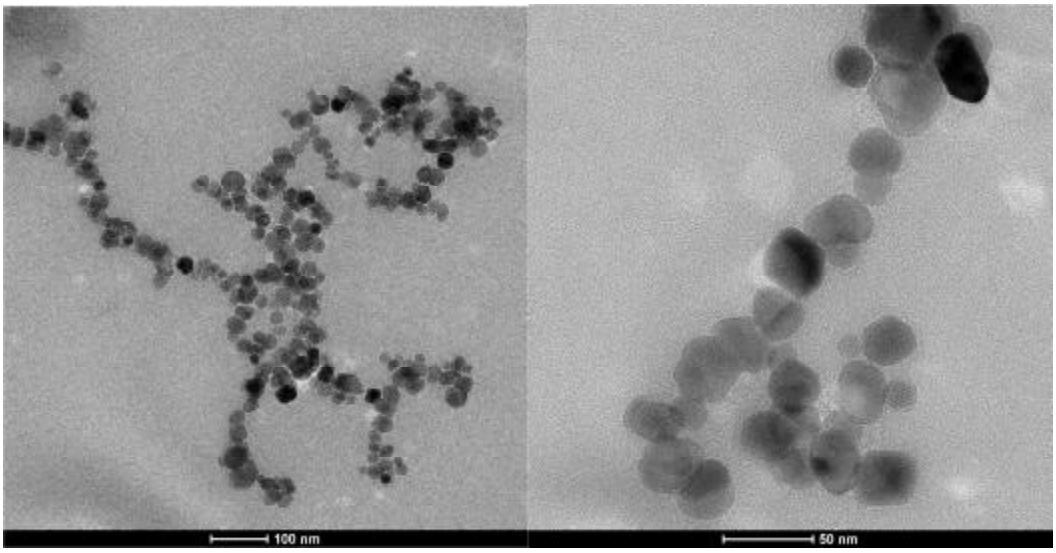


Şekil 48. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD spektrumu

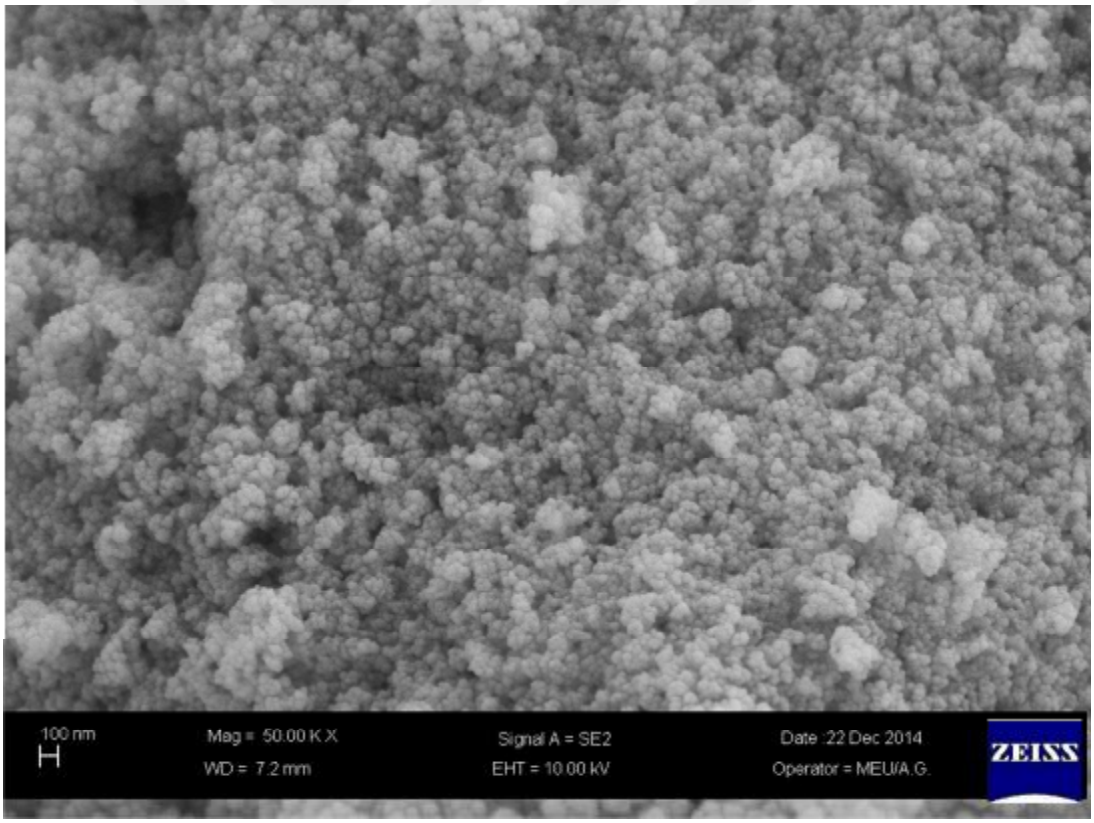
Çizelge 14 Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD verileri

No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size (A)
1	30.141(12)	2.9625(11)	239(14)	129.8(17)	0.399(10)	215(6)
2	35.487(6)	2.5276(4)	829(26)	448(3)	0.386(5)	226(3)
3	37.16(4)	2.418(2)	32(5)	10.6(11)	0.31(3)	284(25)
4	43.143(15)	2.0951(7)	190(13)	95.2(14)	0.362(11)	247(8)
5	53.57(2)	1.7092(7)	75(8)	43.1(12)	0.482(18)	193(7)
6	57.050(11)	1.6130(3)	237(14)	132.1(17)	0.429(13)	220(7)
7	62.713(12)	1.4803(2)	369(18)	202.7(19)	0.412(8)	236(5)
8	71.19(5)	1.3235(7)	25(5)	14.8(8)	0.55(3)	185(11)
9	74.23(3)	1.2765(4)	54(7)	35.0(11)	0.54(2)	194(8)
10	75.19(3)	1.2626(5)	22(4)	8.8(6)	0.33(4)	317(43)

TEAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın azaldığı görülmüştür. C-TEM ve XRD'den elde edilen veriler incelendiğinde, partiküllerin 50 nm'den küçük olduğu saptanmıştır. C-TEM görüntüleri Şekil 49'da verilmiştir.



Şekil 49. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartikülün C-TEM görüntüleri



Şekil 50. Trietanol amin kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri

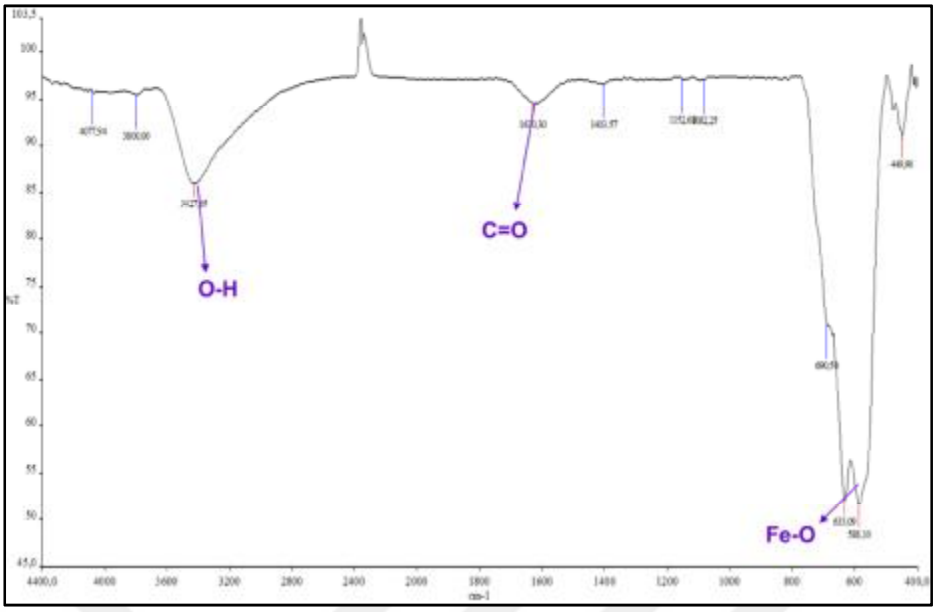
TEAMNP'nin SEM görüntülerinden, topaklanan her bir kümenin yaklaşık olarak 20-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. SEM görüntüleri Şekil 50'de verilmiştir. EDX verilerinden manyetik nanopartiküllerin trietanol amin ile kaplandığı sonucuna varılmıştır. EDX verilerinden, $3{,}3x10^{-4}$ mol trietanol amin/1 g mnp olacak şekilde kaplamanın gerçekleştiği söylenebilir (Çizelge 15).

Çizelge 15. Trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları

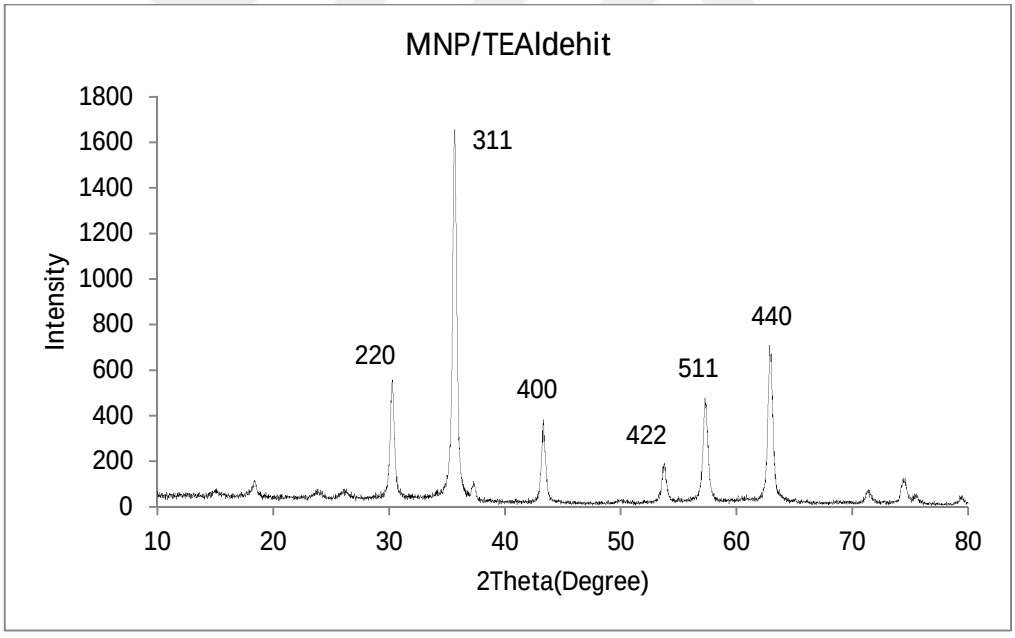
El	AN	Series	Net unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	83749	54.66	58.01	38.43	2.41
O	8	K-series	256735	21.41	23.60	53.90	2.33
Pt	78	M-series	150364	13.48	14.86	2.78	0.54
C	6	K-series	8252	1.16	1.27	3.88	0.19
		Total:		96.27	100.00	100.00	

4.1.3.2. Trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin alkol gruplarının yükseltgenmesi

Elde edilen aldehit manyetik nanopartiküllerin (TEALMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}, 1630 cm^{-1}, 1403 cm^{-1}, 588 cm^{-1} pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 51'de verilmiştir.



Şekil 51. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün FT-IR spektrumu



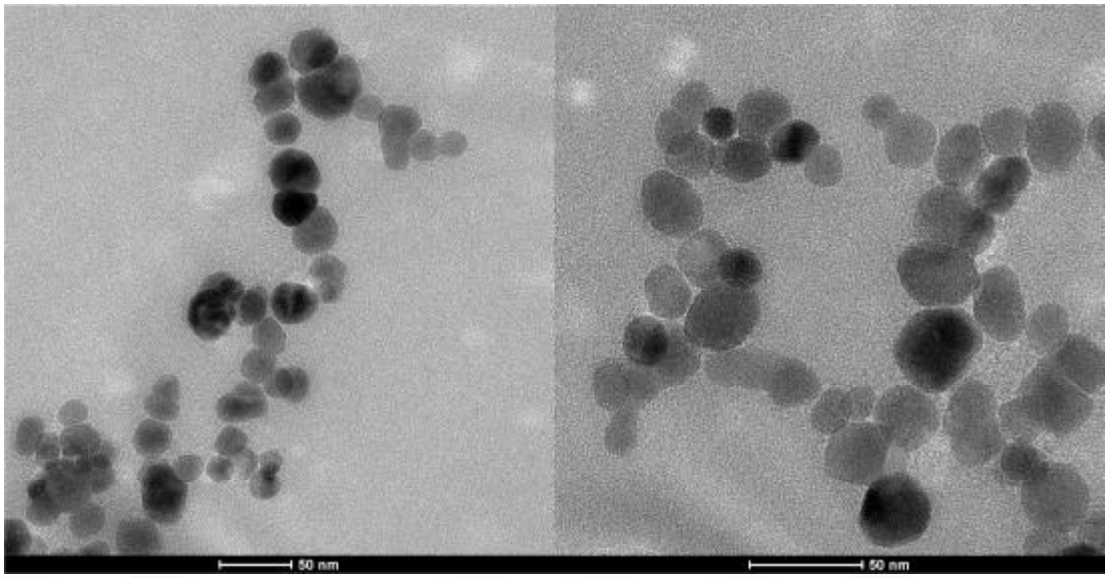
Şekil 52. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün XRD spektrumu

Çizelge 16. Trietanal amin Kaplı Manyetik nanopartikülün XRD verileri

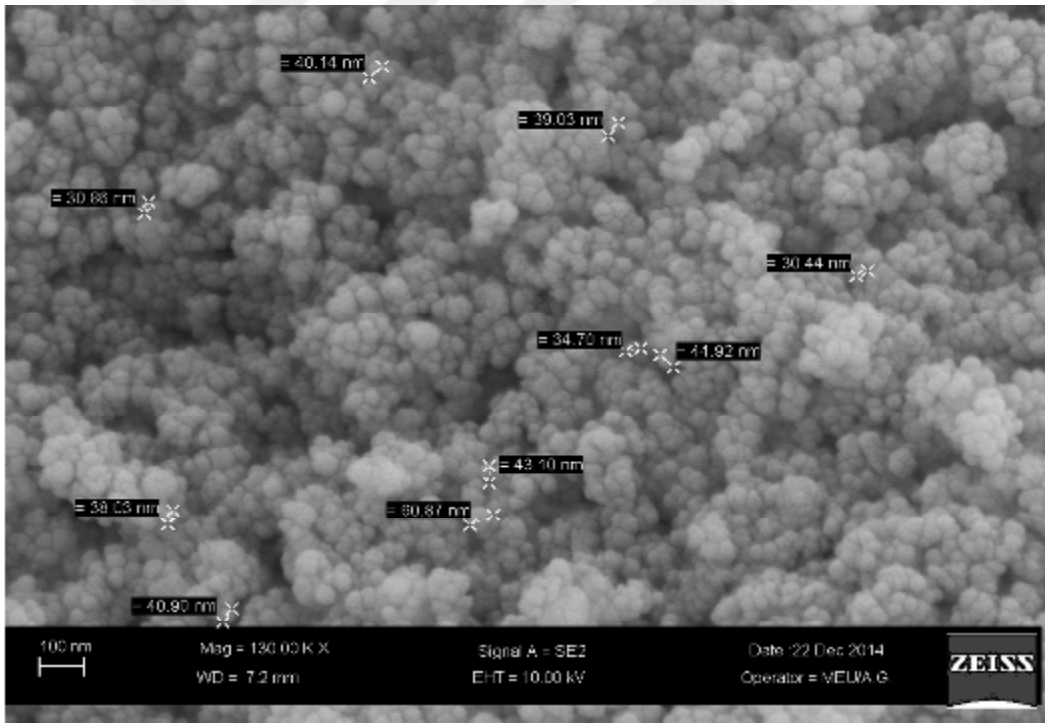
No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size (A)
1	15.00(5)	5.902(18)	8(3)	6.0(15)	0.67(15)	125(27)
2	30.152(11)	2.9615(10)	255(15)	135.6(18)	0.409(9)	210(4)
3	35.538(6)	2.5240(4)	871(27)	468(3)	0.384(5)	227(3)
4	37.18(4)	2.416(2)	33(5)	10.5(12)	0.30(3)	296(29)
5	43.182(15)	2.0933(7)	188(13)	95.4(13)	0.364(12)	245(8)
6	53.65(2)	1.7069(7)	86(8)	48.1(12)	0.43(2)	214(10)
7	57.090(7)	1.61197(19)	248(14)	131.1(19)	0.410(11)	230(6)
8	62.802(12)	1.4784(2)	389(18)	207.4(19)	0.402(9)	242(6)
9	74.38(2)	1.2744(3)	65(7)	36.9(12)	0.44(3)	236(16)
10	75.36(2)	1.2602(4)	24(4)	7.7(7)	0.25(3)	423(60)

Aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin (TEALMNP) XRD spektrumu incelendiğinde beklendiği gibi Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu, temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22,7 nm olarak bulunmuştur. XRD spektrumu Çizelge 16 ve Şekil 52'de verilmiştir.

TEALMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın azaldığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Nanopartiküllerin tanecik boyutunun 10-50 nm aralığında değiştiği saptanmıştır. Her bir nanopartikül kümesinin boyutunun 20-100 nm aralığında olduğu C-TEM görüntülerinden görülebilmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 53'te verilmiştir.



Şekil 53. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün C-TEM görüntüleri



Şekil 54. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikülün SEM görüntüleri

TEALMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde topaklanan her bir kümenin yaklaşık olarak 20-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. SEM görüntülerinden

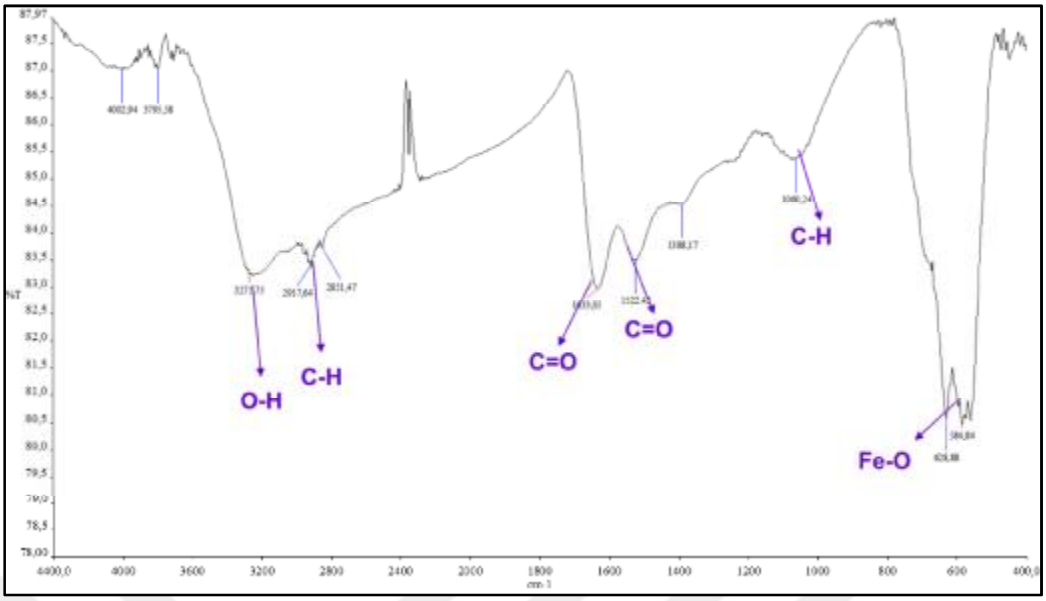
ortalama partikül büyüklüğü 38,01 nm olarak hesaplanmıştır. SEM görüntüleri Şekil 54'te, EDX elementel sonuçları Çizelge 17'de verilmiştir.

Çizelge 17. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllerin EDX elementel analiz sonuçları

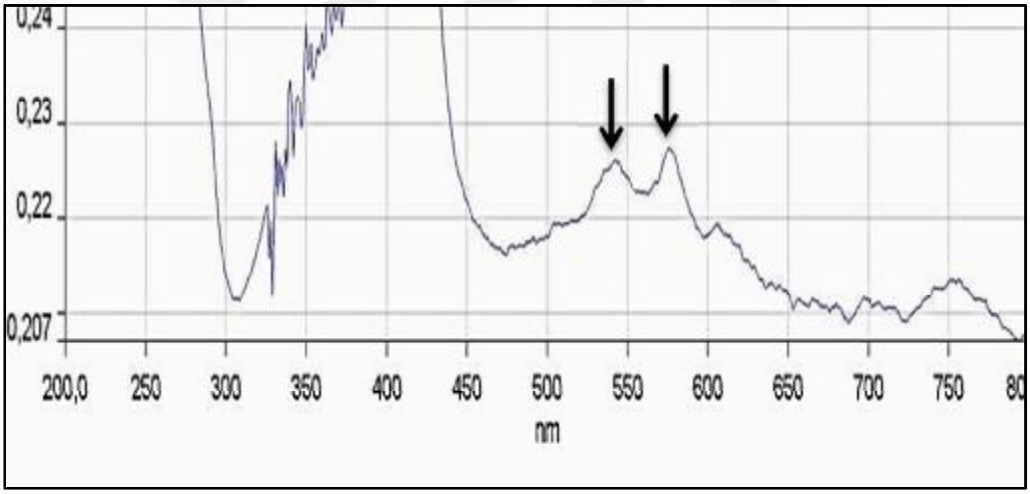
El	AN	Series	Net	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	83749	54.66	59.01	39.13	2.41
O	8	K-series	256735	21.41	21.68	51.62	2.33
Pt	78	M-series	150364	13.48	18.02	4.44	0.54
C	6	K-series	8252	1.16	1.29	4.81	0.19
		Total:		96.27	100.00	100.00	

4.1.3.3. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması

Trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül destekli hemoglobinlerin (TEALMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde bağlandığı destekten tamamen farklı bir spektrum elde edildiği görülmektedir. 3000-3600 cm^{-1}, 3050-3100 cm^{-1}, 2917 cm^{-1}, 1633 cm^{-1}, 1522 cm^{-1}, 585 cm^{-1} pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 55'te verilmiştir.



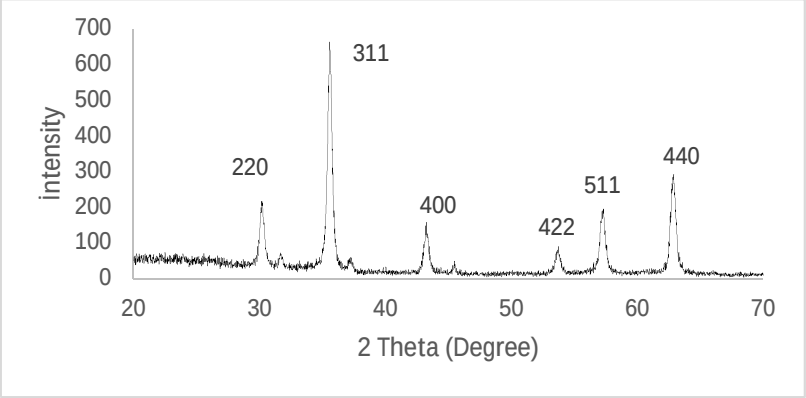
Şekil 55. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu



Şekil 56. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu

Manyetik nanopartiküllere trietanal amin bağlanması sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TEALMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin 3 hafta sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 540,37 ve 578,47 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (Şekil 56).

TEALMNP-Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde benzer şekilde Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden 27,1 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 18 ve Şekil 57'de verilmiştir.

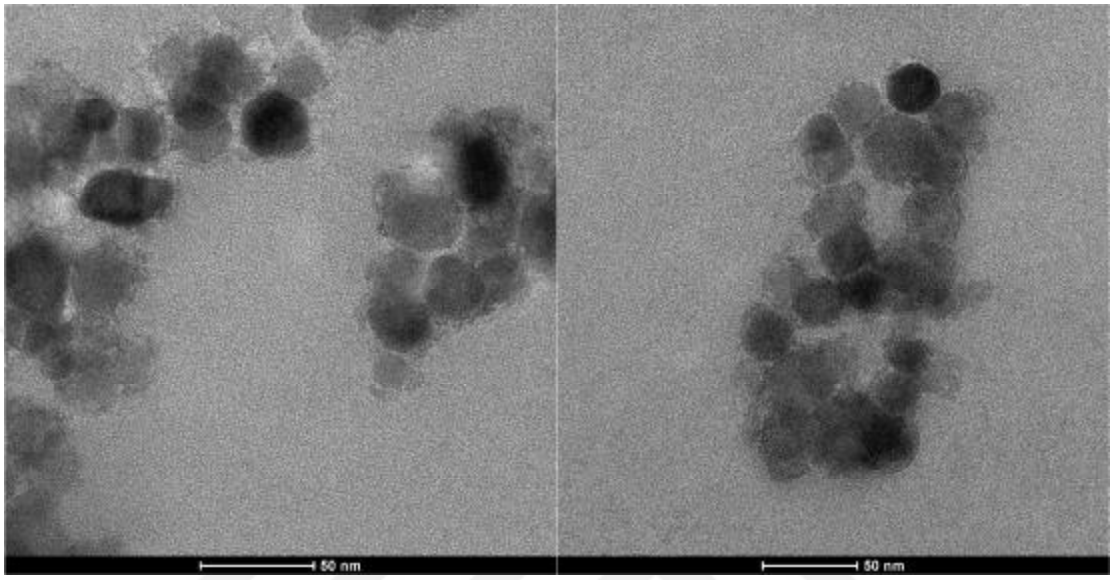


Şekil 57. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu

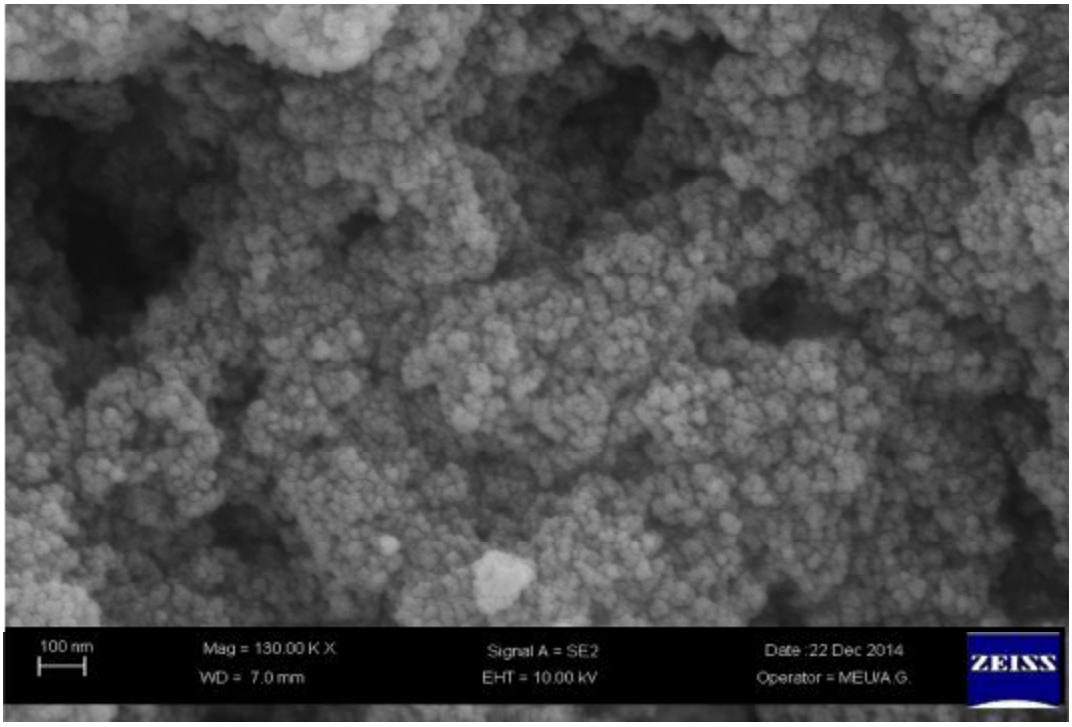
Çizelge 18. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri

No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.164(16)	2.9603(15)	199(18)	0.396(14)	106(2)	0.53(6)	213
2	31.67(4)	2.823(4)	36(8)	0.27(3)	10.1(14)	0.28(10)	120
3	35.558(12)	2.5227(8)	687(34)	0.409(10)	379(5)	0.55(3)	271
4	43.25(2)	2.0903(10)	138(15)	0.434(19)	75.4(19)	0.55(7)	250
5	45.36(4)	1.9978(19)	28(7)	0.22(5)	8.3(11)	0.29(11)	256
6	53.67(3)	1.7064(9)	67(11)	0.51(2)	37.5(17)	0.56(11)	230
7	57.14(2)	1.6107(5)	203(18)	0.44(2)	117(2)	0.58(6)	236
8	62.812(17)	1.4782(4)	327(23)	0.433(12)	180(3)	0.55(5)	251

TEALMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde partikül kümelerinin de yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu görüntülerden izlenmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 58'de verilmiştir.



Şekil 58. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri



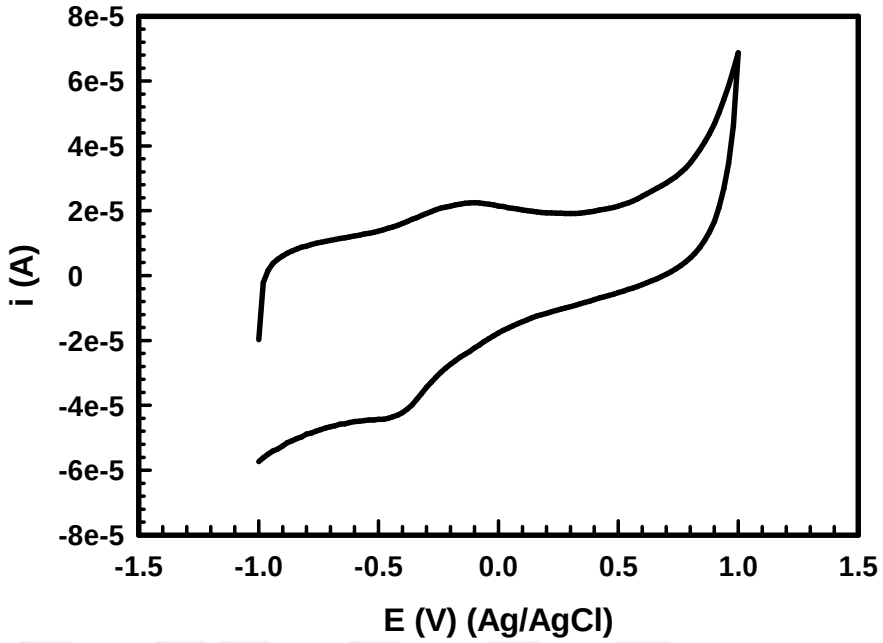
Şekil 59. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri

TEALMNP-Hb'nin SEM görüntüleri Şekil 59'da verilmiştir. TEALMNP ve TEALMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında elementel analiz sonuçlarındaki C artış gözlenmiştir (Çizelge 19).

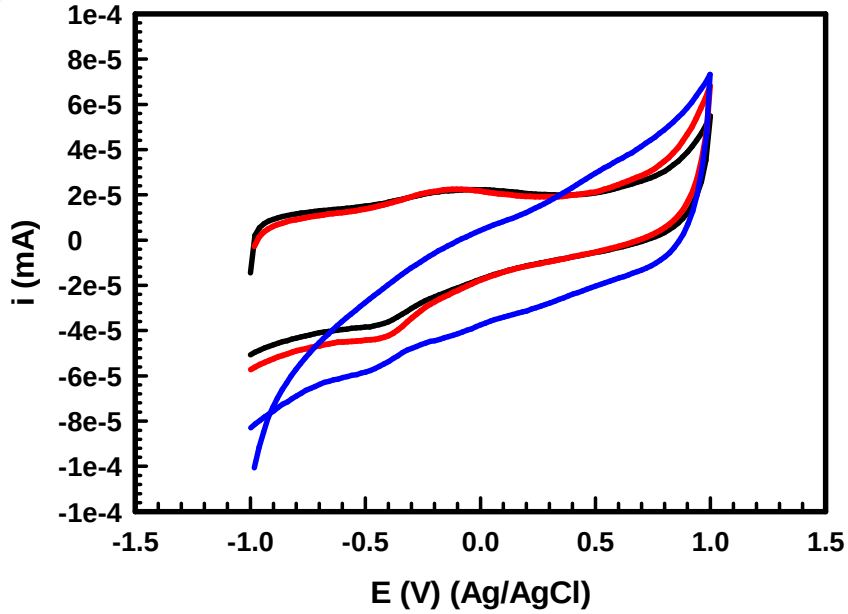
Çizelge 19. Trietanal aminden kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz sonuçları

El	AN	Series	Net unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	53708	41.13	44.02	25.30	1.80
O	8	K-series	175845	20.01	22.32	43.16	2.19
Pt	78	M-series	183043	18.30	20.59	4.04	0.69
C	6	K-series	52453	13.12	11.22	25.85	1.13
N	7	K-series	3533	1.91	1.85	2.51	0.20
		Total:		94.57	100.00	100.00	

TEALMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg TEALMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış olan süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler en az 3 tekrarlı döngü şeklinde uygulanmıştır. Hb molekülü, oksijen alarak Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde pik vermiştir. Hemoglobinin aldığı oksijenleri vererek -0,142 V anodik potansiyelde pik vermiştir. Aynı çözelti içerisinde yapılan tekrarlarda voltogramların birebir aynı olduğu gözlenmiştir. Sadece hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik saptanmıştır. TEALMNP-Hb'ye ait voltogram Şekil 60-61'de verilmiştir.



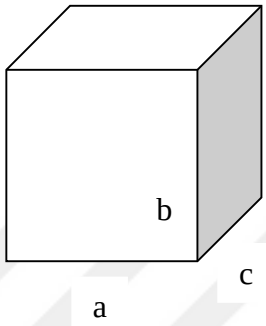
Şekil 60. Trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramtogramı



Şekil 61. Siklik voltogramtogramlar (▬ saf Hb, ▬ trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobin, ▬ trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül)

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre TEALMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %40,397'dir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 5,578 azot bulunmaktadır. Yine aynı metoda göre yapılan ölçüme göre bu azotun %0,4554'ü destek malzemesinden gelmektedir. Farkı alındığında hemoglobinden kaynaklı N miktarı %5,1226

Nanopartikül başına düşen Hb miktarı hesaplanması:



a = b = c = 8,39 Å

a.b.c = 590,5 Å = $590,5.10^{-24}$ cm^{-3} (10^{8} Å= 1 cm)

Her bir magnetit birim hücresi kenar uzunluğu 8,39 Å olduğuna göre bir hücrenin hacmi a.b.c formülünden 590,5 Å'a, o da $590,5x10^{-24}$ cm^3'e denk gelir.

Her bir Fe_3O_4 hacmi; $590,5x10^{-24}$ cm^3 / 8 = $73,8.10^{-24}$ cm^3

Her birim hücrede 8 tane Fe_3O_4 birimi bulunur. Buradan Fe_3O_4 başına hacim; $73,8.10^{-24}$ cm^3'tür.

1 tane Fe atomu kütlesi: 55,84 g / ($6,02.10^{23}$) = $9,275. 10^{-23}$ g

1 tane O atomu kütlesi: 16 g / ($6,02.10^{23}$) = $2,657. 10^{-23}$ g

Her bir birim hücrede 24 tane Fe ve 32 tane O atomu bulunur. Bu durumda her bir birim hücrenin kütlesi;

(24. $9,275. 10^{-23}$ g) + (32. $2,657. 10^{-23}$ g) = $307,6. 10^{-23}$ g

Deneylerde kullanılan magnetitlerin ortalama boyutu 20 nm olduğuna göre, bir nanopartikülün hacmi;

($4\pi r^3/3$) = ($4\pi(10nm)^3/3$) = 4188 nm^3 = $4,188. 10^{-18}$ cm^3

20 nm'lik bir partiküldeki birim hücre sayısı;

$4,188. 10^{-18}$ cm^3 / ($590,5.10^{-24}$ cm^{-3}) = 7092 tane birim hücre

20 nm'lik bir partiküldeki Fe atomu sayısı;

24. 7092 = 170208 tane Fe atomu

20 nm'lik bir partiküldeki O atomu sayısı;

32. 7092 = 226944 tane O atomu

20 nm'lik bir partikülün kütlesi;

(170208. 9,275. 10^{-23} g) + (226944. 2,657. 10^{-23} g) = 2,182.10^{-17} g

1 g magnetitte bulunan partikül sayısı ise;

1/ (2,182.10^{-17} g) = 4,58. 10^{16} tane partikül

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre TEALMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %40,397'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 5,578 azot bulunmaktadır.

Malzeme içerisindeki Fe_3O_4 kütlesi;

40,397g Fe. (1 mol Fe/55,84 g Fe). (1 mol Fe_3O_4/3 mol Fe). (232 g Fe_3O_4/1 mol Fe_3O_4) = 55,946 g

100 g malzeme içerisindeki magnetit partikülleri sayısı;

55,946 g/ 2,182.10^{-17} g= 25,64.10^{17} tanecik

Bir Hb molekülü kütlesi $C_{2932}H_{4724}N_{828}O_{840}S_8Fe_4$ ve mol kütlesi 64500 kDa yani 64500 g/mol'dür (19,20).

100 g malzeme içerisindeki Hb molekülü sayısı;

5,122 g N. (1 mol N/14 g N). (1 mol Hb/ 828 mol N). (6,02.10^{23} tane Hb/ 1 mol Hb)= 2,66.10^{20} Hb

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı;

(2,66.10^{20} Hb) / (25,64.10^{17} tanecik)= 104 Hb/nanopartikül

Teorik olarak bir partiküle bağlanabilecek Hb sayısını hesaplamak için, küresel olarak nanopartiküllerin kaplanmış ve modifiye edilmiş son halinin yarıçapı 20,505 nm olduğu düşünülürse kürenin yüzey alanı;

$4.\pi.r^2 = 4.\ \pi.\ (20{,}505\ nm)^2 = 5283{,}6\ nm^2$

Bir Hb molekülü boyutları ise 6x5x5 nm'dir (20). Ancak iki Hb molekülünün molekül merkezleri arasındaki mesafe 6,9 nm'dir (21). Bu durumda bağlanmış olan hemoglobinin partikül üzerinde temas edecek yüzey alanı en fazla bir küp olarak düşünüldüğünde;

$6{,}9\ nm.\ 6{,}9\ nm = 47{,}61\ nm^2$

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı teorik olarak;

$5283{,}6\ nm^2 / 47{,}61\ nm^2 = 111$

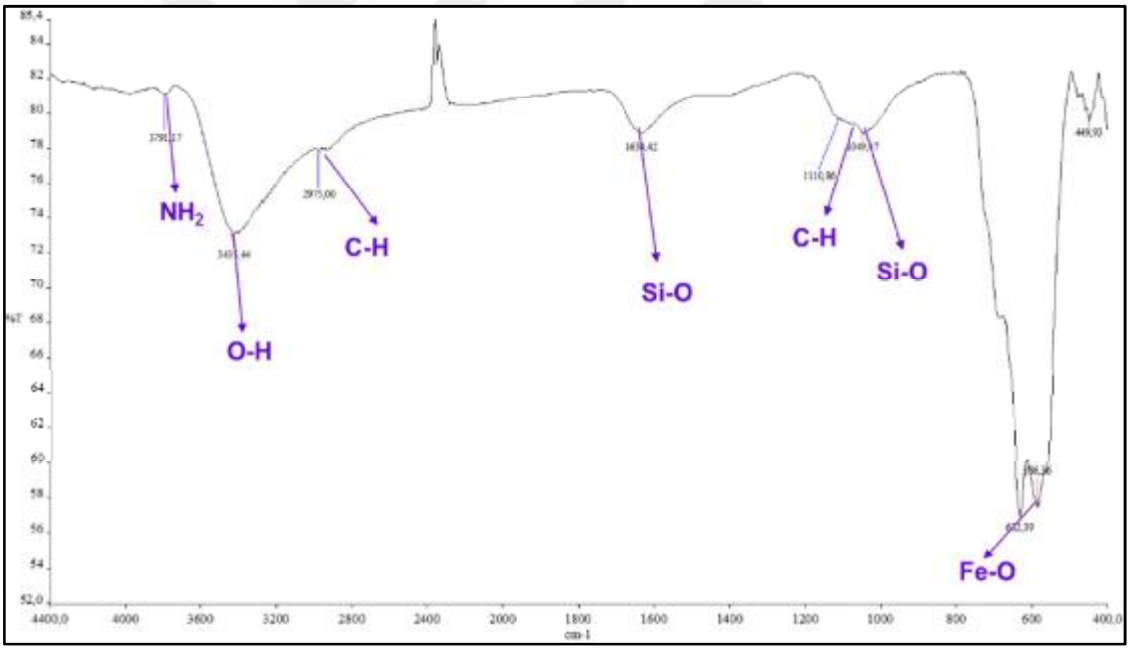
Yüzde bağlanma başarısı;

(Deneysel olarak bağlanan Hb) / (Teorik olarak bağlanan Hb) . 100 = (104 / 111) . 100 = % 93,69

4.1.4. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması ve modifikasyonu

4.1.4.1. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması

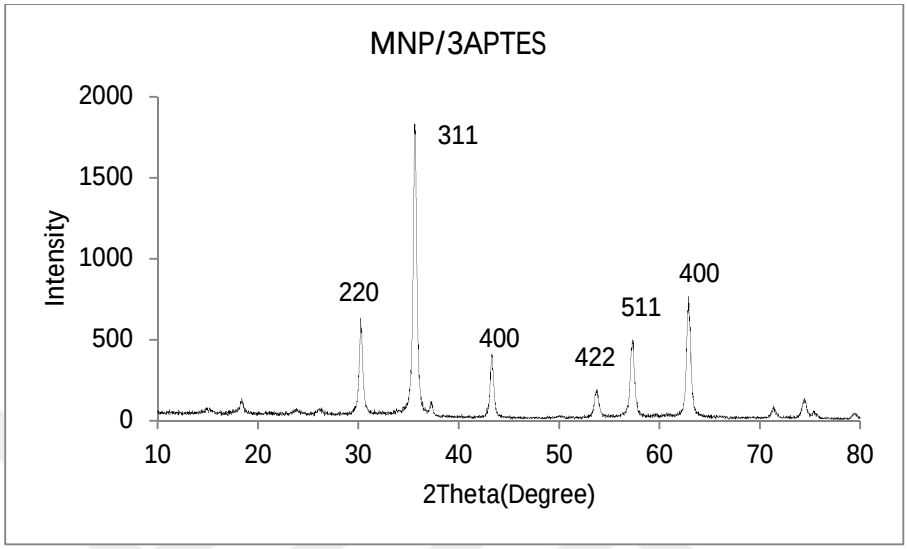
3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin (3APMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde 1634 cm^{-1}, 1049 cm^{-1}, 2975 cm^{-1}, 1110 cm^{-1} ve 586 cm^{-1}'de pikler gözlenmiştir. 3APMNP'e ait FT-IR spektrumu Şekil 62'de verilmiştir.



Şekil 62. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

3APMNP'ye ait XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait altı temel pik gözlenmiştir. Bu pikler; 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleridir. Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311

pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22,8 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 20 ve Şekil 63'te verilmiştir.



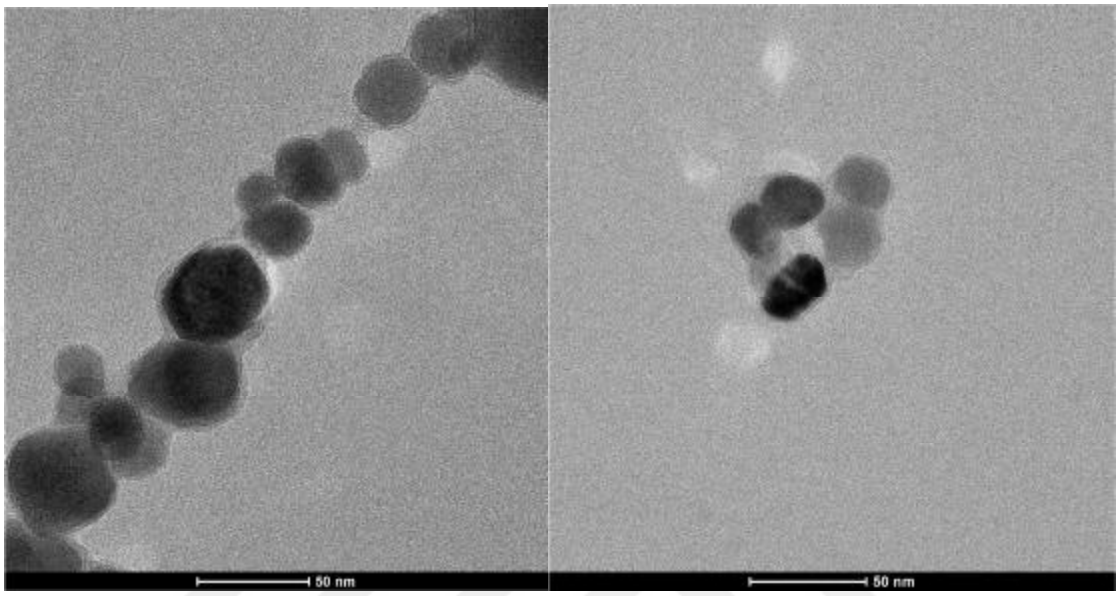
Şekil 63. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

Çizelge 20. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz verileri

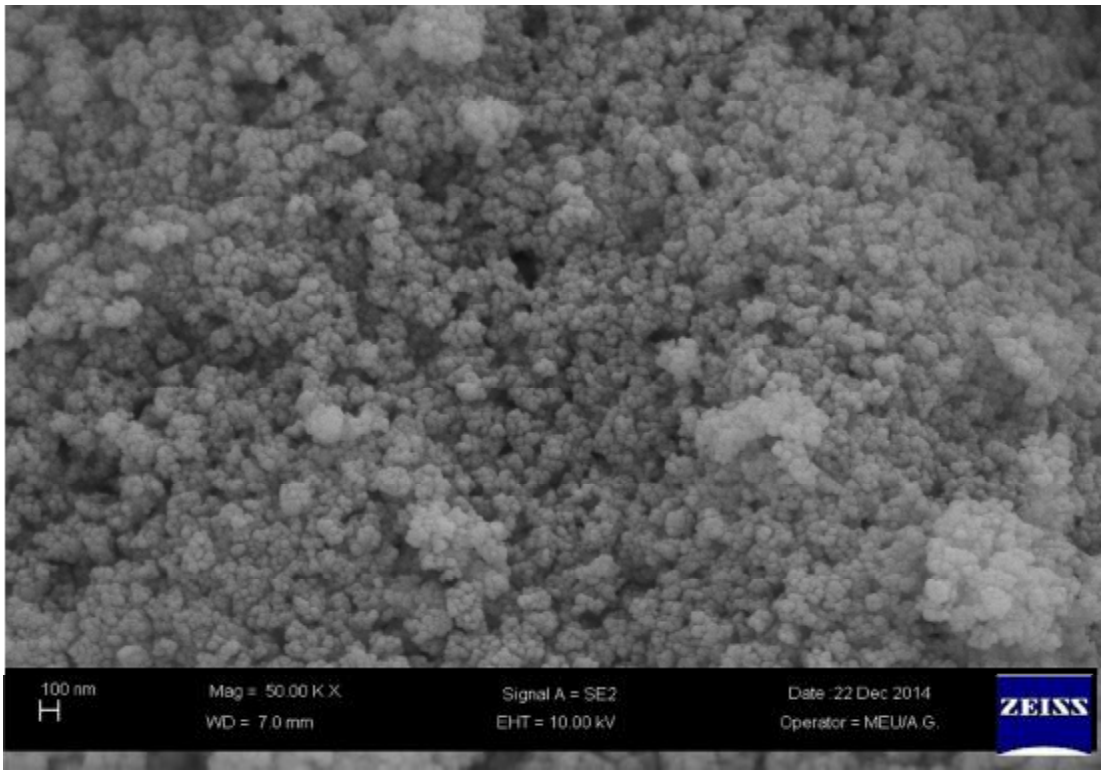
No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size (A)
1	14.9(2)	5.92(9)	10(3)	9(2)	0.7(2)	120(38)
2	30.233(9)	2.9537(9)	315(16)	166.0(17)	0.379(8)	227(5)
3	35.596(6)	2.5200(4)	1023(29)	541(3)	0.382(5)	228(3)
4	37.23(3)	2.413(2)	36(6)	11.2(10)	0.29(2)	305(26)
5	43.245(14)	2.0904(6)	227(14)	111.6(14)	0.350(11)	255(8)
6	53.707(19)	1.7052(6)	91(9)	51.7(13)	0.497(14)	187(5)
7	57.180(13)	1.6097(3)	276(15)	150(2)	0.424(15)	223(8)
8	62.851(11)	1.4774(2)	426(19)	231(2)	0.423(8)	230(4)
9	74.45(3)	1.2733(5)	63(7)	36(2)	0.49(3)	215(14)
10	75.44(8)	1.2590(11)	17(4)	10.6(15)	0.52(12)	203(46)

3APMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde tanecik boyutunun 10-50 nm aralığında değiştiği söylenebilir. Her bir nanopartikül kümesinin boyutunun 50-200 nm aralığında olduğu C-TEM görüntülerinden görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 64'te verilmiştir.

3APMNP’nin SEM görüntülerinden, her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. SEM görüntüleri Şekil 65’te, EDX sonuçları Çizelge 21’de verilmiştir.



Şekil 64. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri.



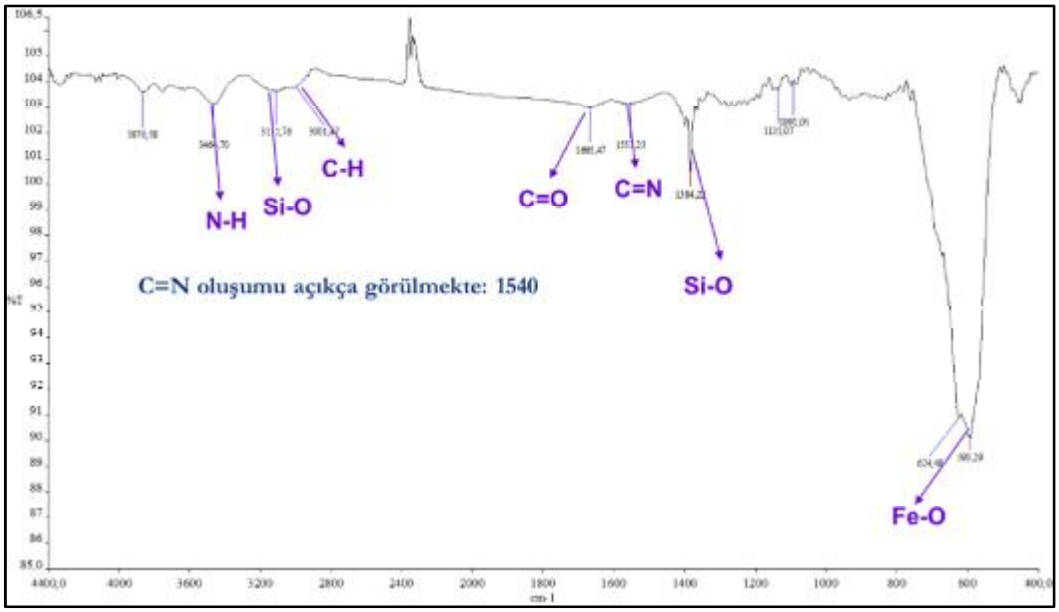
Şekil 65. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri

Çizelge 21. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış manyetik nanopartiküllere EDX elementel analiz verileri

El	AN	Series	Net	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	76075	54.10	55.47	36.89	2.31
O	8	K-series	212105	19.82	20.65	48.42	2.17
Pt	78	M-series	164062	12.23	18.01	4.16	0.62
C	6	K-series	17589	3.18	3.25	8.72	0.37
Si	14	K-series	20679	2.32	2.62	1.81	0.08
		Total:		91.65	100.00	100.00	

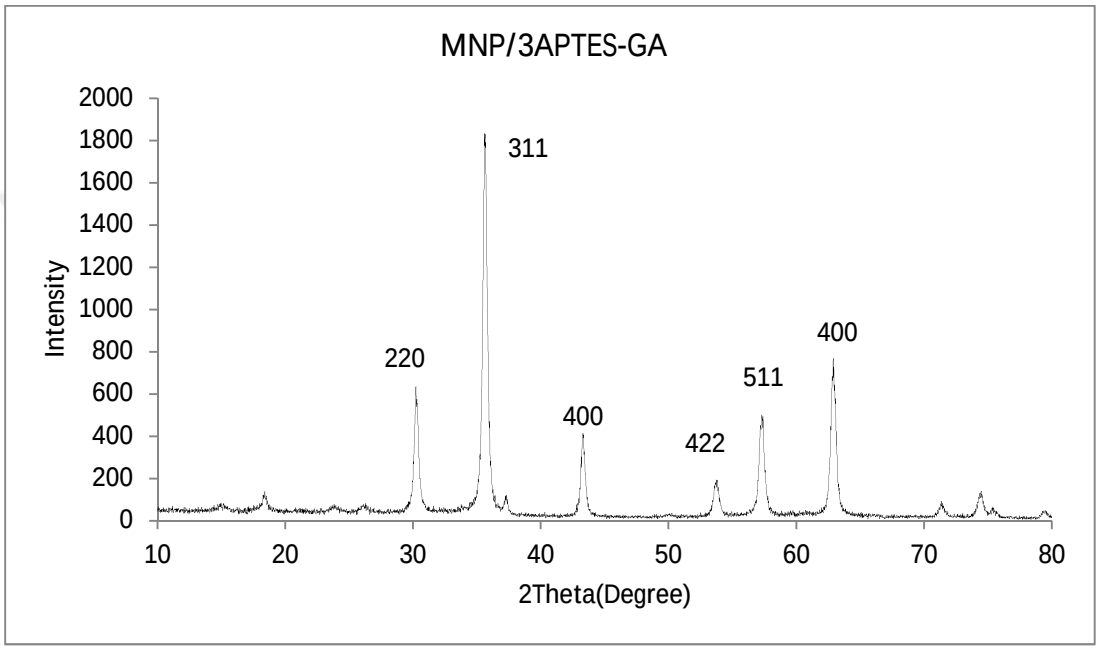
4.1.4.2. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu

Elde edilen aldehit manyetik nanopartiküllerin (3APGAMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3001 cm^{-1}, 1665 cm^{-1}, 1553 cm^{-1}, 1091 cm^{-1}, 593 cm^{-1} pikler gözlenmiştir. 3APGAMNP'e ait FT-IR spektrumu Şekil 66'da verilmiştir



Şekil 66. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu

3APGAMNP'nın XRD spektrumu incelendiğinde beklendiği gibi Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 23,3 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 22 ve Şekil 67'de verilmiştir.

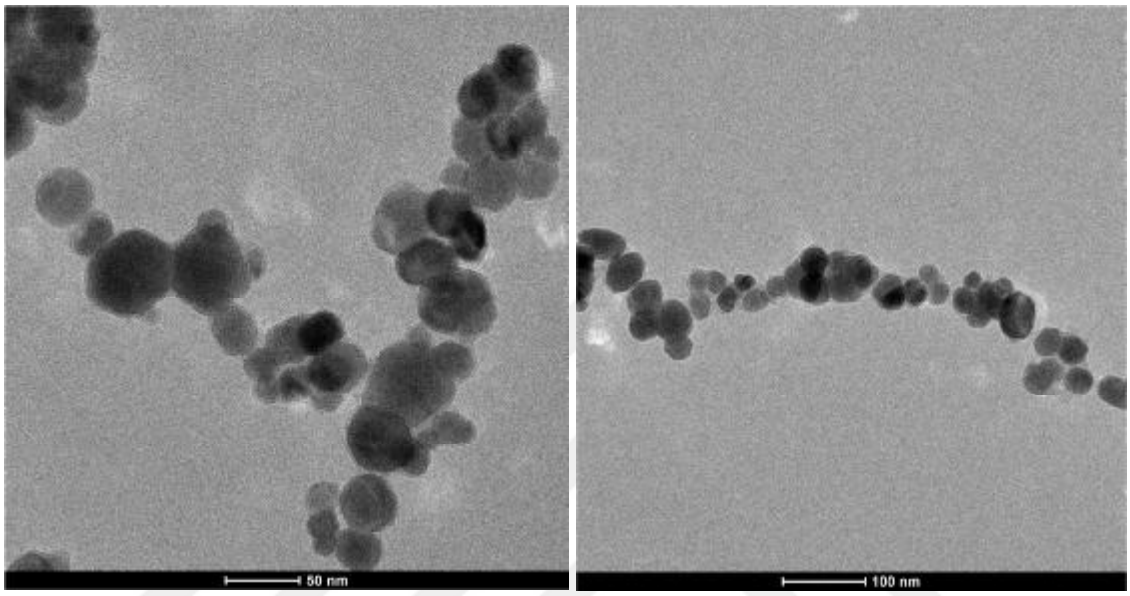


Şekil 67. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

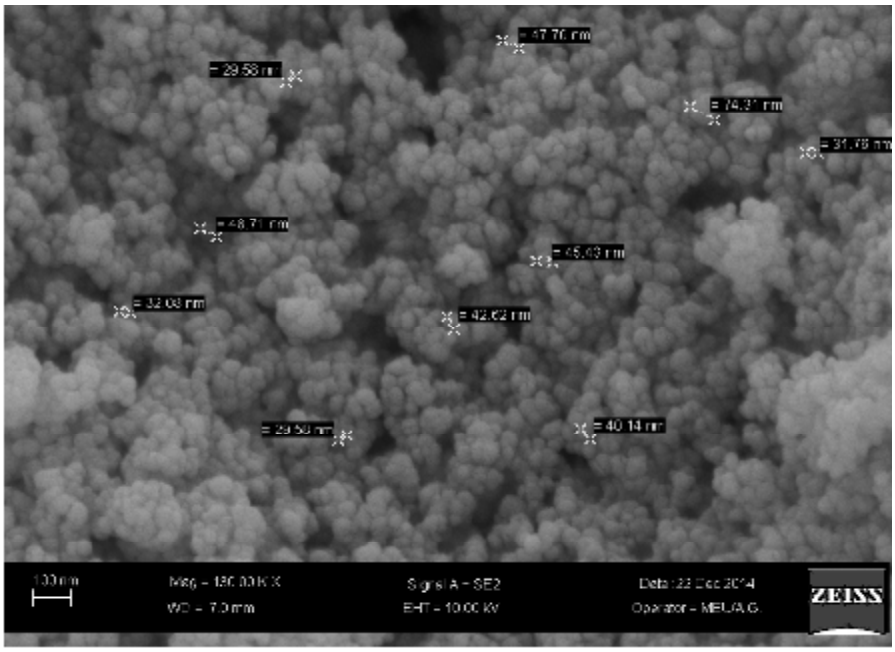
Çizelge 22. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD analiz sonuçları

No.	2-theta(deg)	d (A)	Height(cps)	Int. I(cps deg)	FWHM(deg)	Size (A)
1	30.256(9)	2.9515(9)	289(16)	150.5(17)	0.388(8)	221(4)
2	35.620(6)	2.5184(4)	939(28)	490(3)	0.374(5)	233(3)
3	37.23(3)	2.413(2)	36(5)	11.9(10)	0.31(3)	279(22)
4	43.293(14)	2.0882(6)	195(13)	100.6(14)	0.377(11)	237(7)
5	53.653(18)	1.7068(5)	97(9)	49.2(12)	0.39(2)	241(14)
6	57.230(13)	1.6084(3)	253(15)	139.2(18)	0.443(11)	213(5)
7	62.874(11)	1.4769(2)	407(18)	220(2)	0.414(8)	235(5)
8	74.37(3)	1.2745(5)	61(7)	36.7(16)	0.53(3)	198(9)
9	75.43(7)	1.2591(10)	19(4)	9.1(9)	0.42(7)	250(39)

3APGAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu bir şekilde 10-50 nm aralığında olduğu izlenmektedir. Elde edilen nanopartikül kümelerinin boyutları 50-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 68'de verilmiştir.



Şekil 68. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri.



Şekil 69. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin SEM görüntüleri

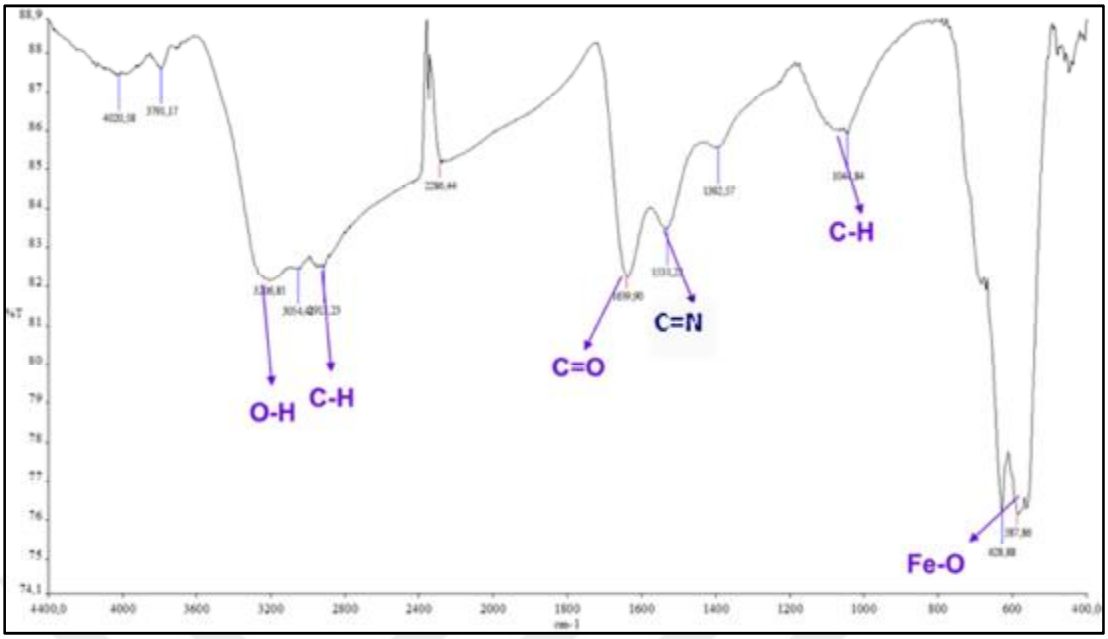
3APGAMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. Tanecik boyutu, ortalama 38,6 nm olarak hesaplanmıştır. SEM görüntüleri Şekil 69'da verilmiştir. 3APMNP ve 3APGAMNP'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında, elementel analiz sonuçlarında temel olarak C atomu miktarındaki artış görülmektedir (Çizelge 23).

Çizelge 23. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere EDX elementel analiz verileri.

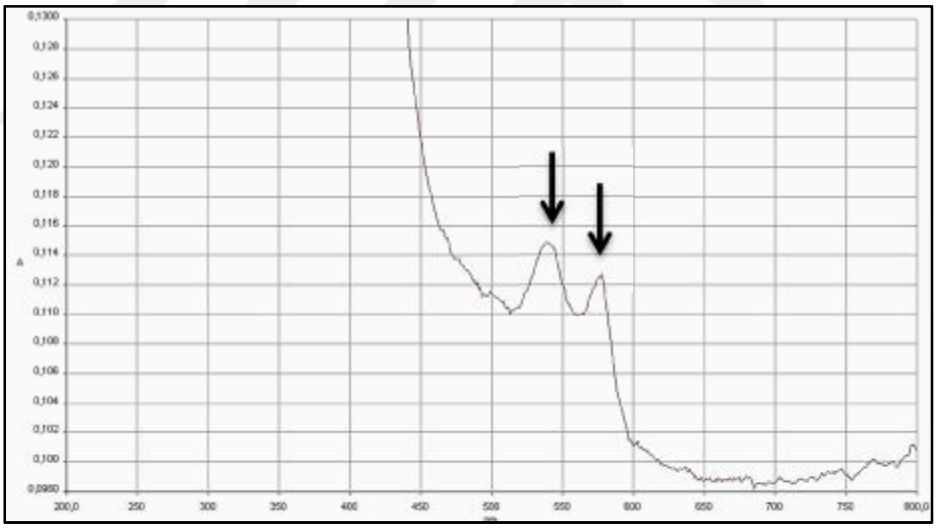
El	AN	Series	Net unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	76075	53.26	55.09	36.54	2.31
O	8	K-series	212105	19.74	20.43	48.18	2.17
Pt	78	M-series	164062	12.71	18.26	3.99	0.62
C	6	K-series	17589	3.68	3.94	9.57	0.37
Si	14	K-series	20679	2.23	2.28	1.72	0.08
		Total:		96.63	100.00	100.00	

4.1.4.3. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması

Manyetik nanopartiküllere 3-(Aminopropil)trimetoksisilan bağlanması ve glutaraldehit ile modifikasyon sonucu elde edilen aldehit gruplarına (3APGAMNP) Hb moleküllerinin bağlanmasıyla elde edilen FT-IR spektrumunda, 3000-3600 cm^{-1}, 3054 cm^{-1}, 2913 cm^{-1}, 1639 cm^{-1}, 1531 cm^{-1} ve 587 cm^{-1}'de pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 70'te verilmiştir.



Şekil 70. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu

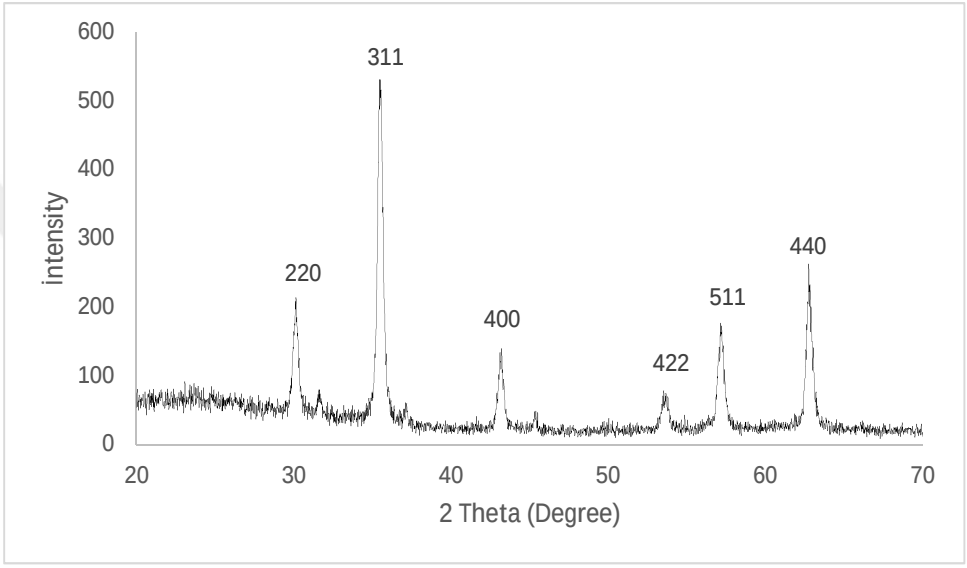


Şekil 71. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış oksihemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu

Manyetik nanopartiküllere 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması ve glutaraldehit ile modifiye edilmesiyle elde edilen manyetik nanopartiküllerdeki aldehit gruplarına (3-APGAMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin 3 hafta

sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 539,72 ve 577,18 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (Şekil 71).

3-APGAMNP -Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden partikül boyutu 25,3 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 24 ve Şekil 72'de verilmiştir.

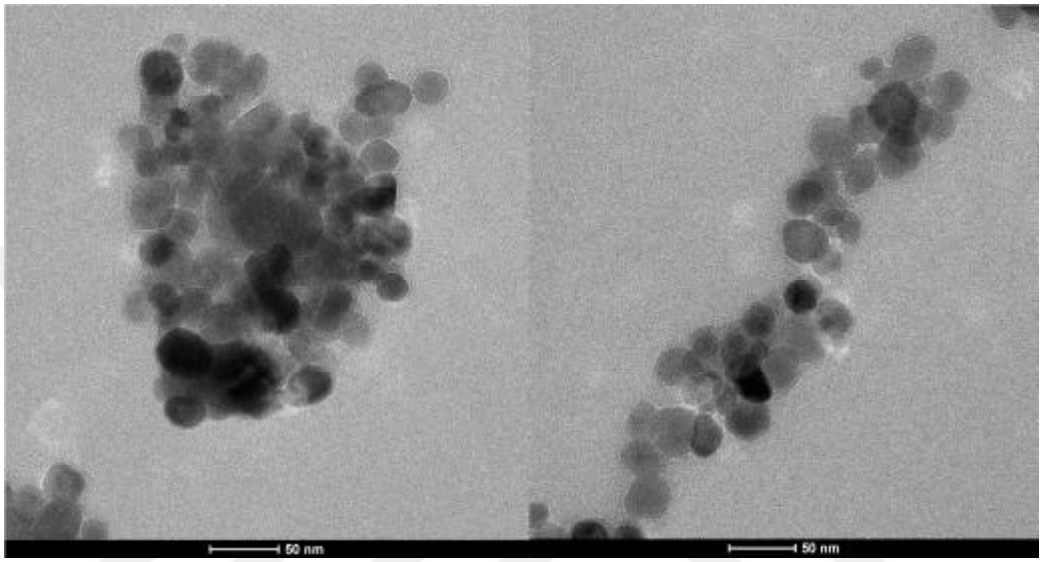


Şekil 72. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu

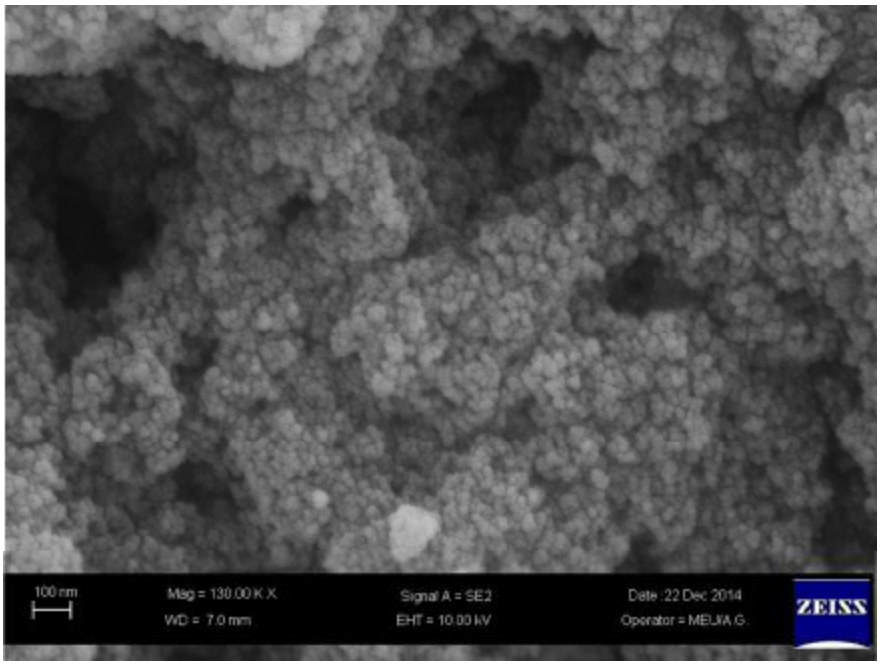
Çizelge 24. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri.

No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.114(19)	2.9652(19)	177(17)	0.375(18)	94(2)	0.53(6)	223
2	31.60(8)	2.829(7)	34(7)	0.26(6)	11.9(18)	0.35(13)	126
3	35.458(12)	2.5295(9)	574(31)	0.373(10)	288(4)	0.50(3)	253
4	43.17(2)	2.0937(11)	114(14)	0.403(19)	53(2)	0.47(7)	235
5	53.63(5)	1.7075(16)	56(10)	0.49(5)	34.2(19)	0.61(14)	156
6	57.10(3)	1.6116(7)	172(17)	0.42(2)	102(2)	0.59(7)	132
7	62.73(2)	1.4798(5)	256(21)	0.388(19)	138(3)	0.54(5)	138

3-APGAMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde bağlı olan hemoglobinler görülmektedir. Partikül kümelerinin de yaklaşık olarak 100-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu saptanmıştır. C-TEM görüntüleri Şekil 73'te verilmiştir.



Şekil 73. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin C-TEM görüntüleri



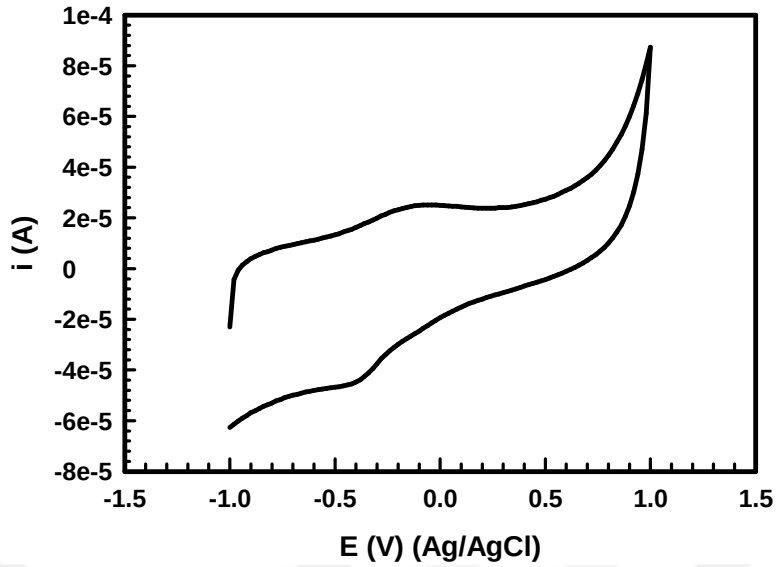
Şekil 74. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin SEM görüntüleri

3APGAMNP-Hb'nin SEM görüntüleri Şekil 74'te verilmiştir. 3APGAMNP ve 3APGAMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında, elementel analiz sonuçlarında temel olarak C atomu miktarında artış gözlenmiştir (Çizelge 25).

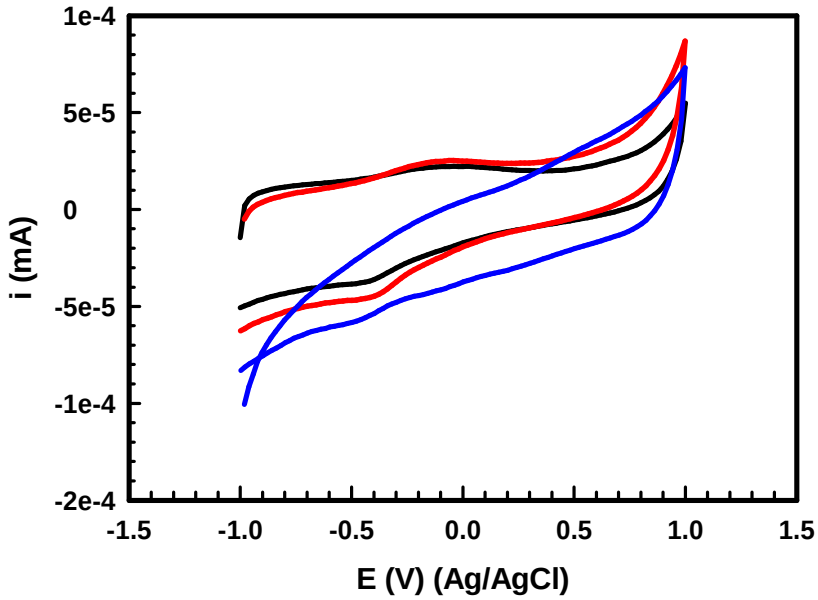
Çizelge 25. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin EDX elementel analiz verileri

El	AN	Series	Net unn. C	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]	Error (1 Sigma) [wt.%]
Fe	26	K-series	53708	40.49	44.08	24.70	1.86
O	8	K-series	175845	19.87	22.12	43.02	2.23
Pt	78	M-series	183043	17.58	19.13	3.56	0.59
C	6	K-series	52453	14.81	12.36	25.23	1.63
N	7	K-series	3533	1.82	1.96	2.56	0.32
Si	14	K-series	20679	1.35	1.35	1.93	0.11
		Total:		94.57	100.00	100.00	

3APGAMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg 3APGAMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler en az 3 tekrarlı döngü alınarak uygulanmıştır. Hb molekülü, Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,398 V katodik potansiyelde yükseltgenme piki vermiştir. Hemoglobin aldığı oksijenleri vererek -0,136 V anodik potansiyelde pik vermiştir. Saf hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. 3APGAMNP-Hb'ye ait voltogram Şekil 75 ve 76'da verilmiştir.



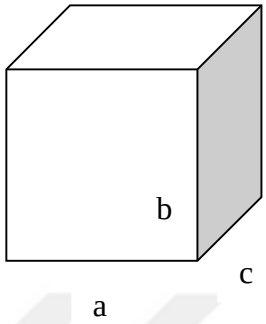
Şekil 75. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin siklik voltogramı



Şekil 76. Siklik voltogramlar (▬ saf Hb, ▬ 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobin, ▬ 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküller)

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre 3APGAMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %38,699'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 4,037 azot bulunmaktadır.

Nanopartikül başına düşen Hb miktarı hesaplanması:



a = b = c = 8,39 Å

a.b.c = 590,5 Å = $590{,}5.10^{-24}$ cm^{-3} (10^{8} Å= 1 cm)

Her bir magnetit birim hücresi kenar uzunluğu 8,39 Å olduğuna göre bir hücrenin hacmi a.b.c formülünden 590,5 Å'a, o da $590{,}5x10^{-24}$ cm^3'e denk gelir.

Her bir Fe_3O_4 hacmi; $590{,}5x10^{-24}$ cm^3 / 8 = $73{,}8.10^{-24}$ cm^3

Her birim hücrede 8 tane Fe_3O_4 birimi bulunur. Buradan Fe_3O_4 başına hacim; $73{,}8.10^{-24}$ cm^3'tür.

1 tane Fe atomu kütlesi: 55,84 g / ($6{,}02.10^{23}$) = $9{,}275.\ 10^{-23}$ g

1 tane O atomu kütlesi: 16 g / ($6{,}02.10^{23}$) = $2{,}657.\ 10^{-23}$ g

Her bir birim hücrede 24 tane Fe ve 32 tane O atomu bulunur. Bu durumda her bir birim hücrenin kütlesi;

(24. $9{,}275.\ 10^{-23}$ g) + (32. $2{,}657.\ 10^{-23}$ g) = $307{,}6.\ 10^{-23}$ g

Deneylerde kullanılan magnetitlerin ortalama boyutu 20 nm olduğuna göre, bir nanopartikülün hacmi;

($4\pi r^3/3$) = ($4\pi(10nm)^3/3$) = 4188 nm^3 = $4{,}188.\ 10^{-18}$ cm^3

20 nm'lik bir partiküldeki birim hücre sayısı;

$4{,}188.\ 10^{-18}$ cm^3 / ($590{,}5.10^{-24}$ cm^{-3}) = 7092 tane birim hücre

20 nm'lik bir partiküldeki Fe atomu sayısı;

24. 7092 = 170208 tane Fe atomu

20 nm'lik bir partiküldeki O atomu sayısı;

32. 7092 = 226944 tane O atomu

20 nm'lik bir partikülün kütlesi;

(170208. 9,275. 10^{-23} g) + (226944. 2,657. 10^{-23} g) = 2,182.10^{-17} g

1 g magnetitte bulunan partikül sayısı ise;

1/ (2,182.10^{-17} g) = 4,58. 10^{16} tane partikül

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre 3APGAMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %38,699'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 4,037 azot bulunmaktadır.

Malzeme içerisindeki Fe_3O_4 kütlesi;

38,699g Fe. (1 mol Fe/55,84 g Fe). (1 mol Fe_3O_4/3 mol Fe). (232 g Fe_3O_4/1 mol Fe_3O_4) = 53,596 g

100 g malzeme içerisindeki magnetit partikülleri sayısı;

53,596 g/ 2,182.10^{-17} g= 24,56.10^{17} tanecik

Bir Hb molekülü kütlesi $C_{2932}H_{4724}N_{828}O_{840}S_8Fe_4$ ve mol kütlesi 64500 kDa yani 64500 g/mol'dür (19,20).

100 g malzeme içerisindeki Hb molekülü sayısı;

4,037 g N. (1 mol N/14 g N). (1 mol Hb/ 828 mol N). (6,02.10^{23} tane Hb/ 1 mol Hb)= 2,097.10^{20} Hb

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı;

(2,097.10^{20} Hb) / (24,56.10^{17} tanecik)= 85 Hb/nanopartikül

Teorik olarak bir partiküle bağlanabilecek Hb sayısını hesaplamak için, küresel olarak nanopartiküllerin kaplanmış ve modifiye edilmiş son halinin yarıçapı 19,3 nm olduğu düşünülürse kürenin yüzey alanı;

$4.\pi.r^2 = 4.\ \pi.\ (19{,}3\ nm)^2 = 4680{,}85\ nm^2$

Bir Hb molekülü boyutları ise 6x5x5 nm'dir (20). Ancak iki Hb molekülünün molekül merkezleri arasındaki mesafe 6,9 nm'dir. Bu durumda bağlanmış olan hemoglobinin partikül üzerinde temas edecek yüzey alanı en fazla bir küp olarak düşünüldüğünde;

$6{,}9\ nm.\ 6{,}9\ nm = 47{,}61\ nm^2$

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı teorik olarak;

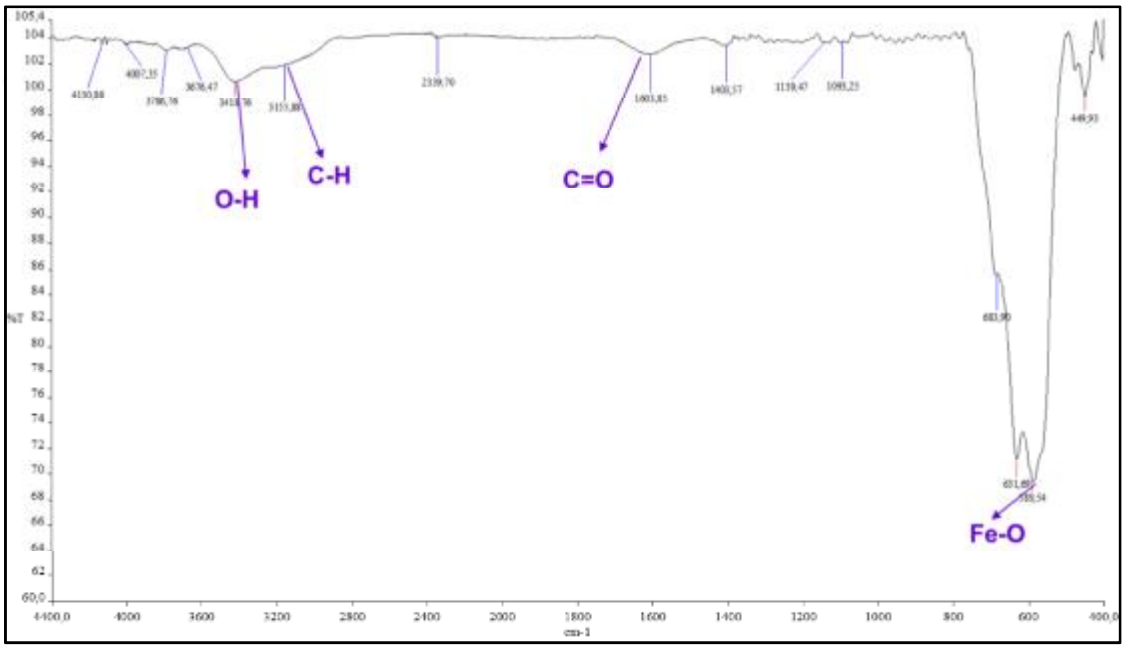
$4680{,}85\ nm^2 / 47{,}61\ nm^2 = 98$

Yüzde bağlanma başarısı;

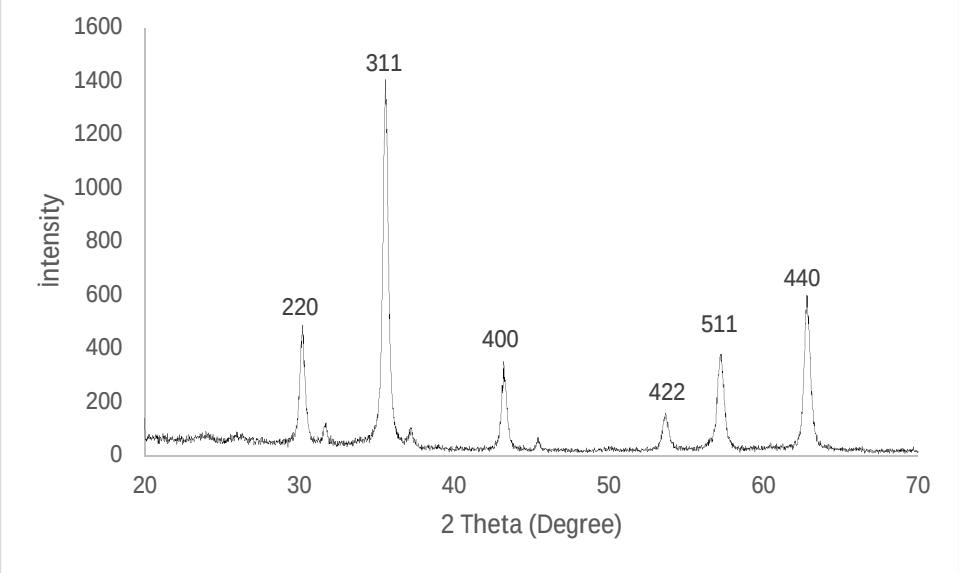
(Deneysel olarak bağlanan Hb) / (Teorik olarak bağlanan Hb) . 100 = (85 / 98) . 100 = % 86,73

4.1.5. Magnetitin glutaraldehit ile kaplanması

Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin (GAMNP) IR spektrumları incelendiğinde 3000-3600 cm^{-1}, 1403 cm^{-1}, 1603 cm^{-1}, 1139 cm^{-1} ve 589 cm^{-1} pikler gözlenmiştir. GAMNP'e ait FT-IR spektrumu Şekil 77'de verilmiştir.



Şekil 77. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin FT-IR spektrumu



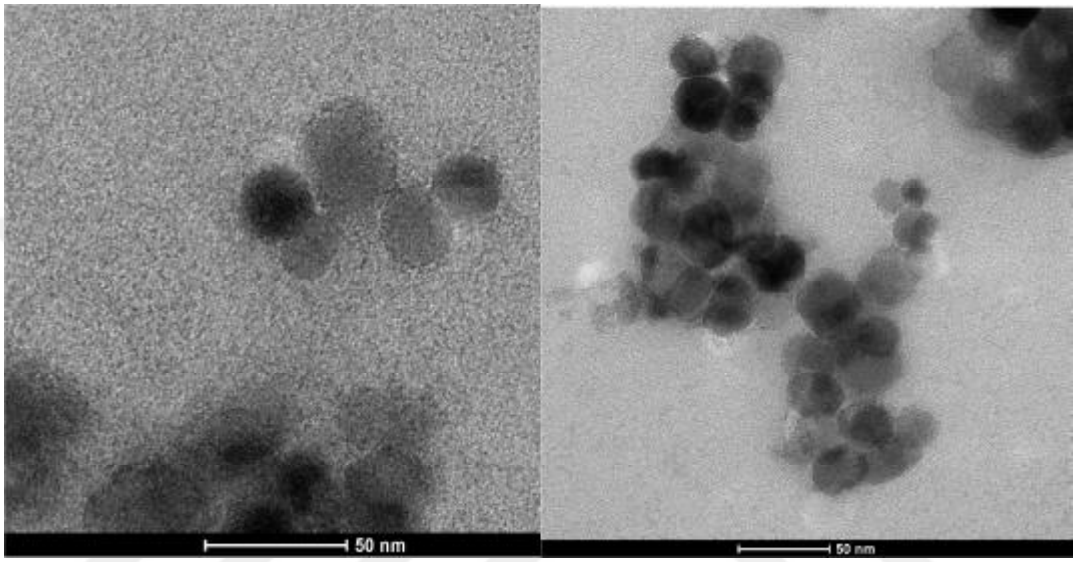
Şekil 78. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu

Çizelge 26. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD verileri

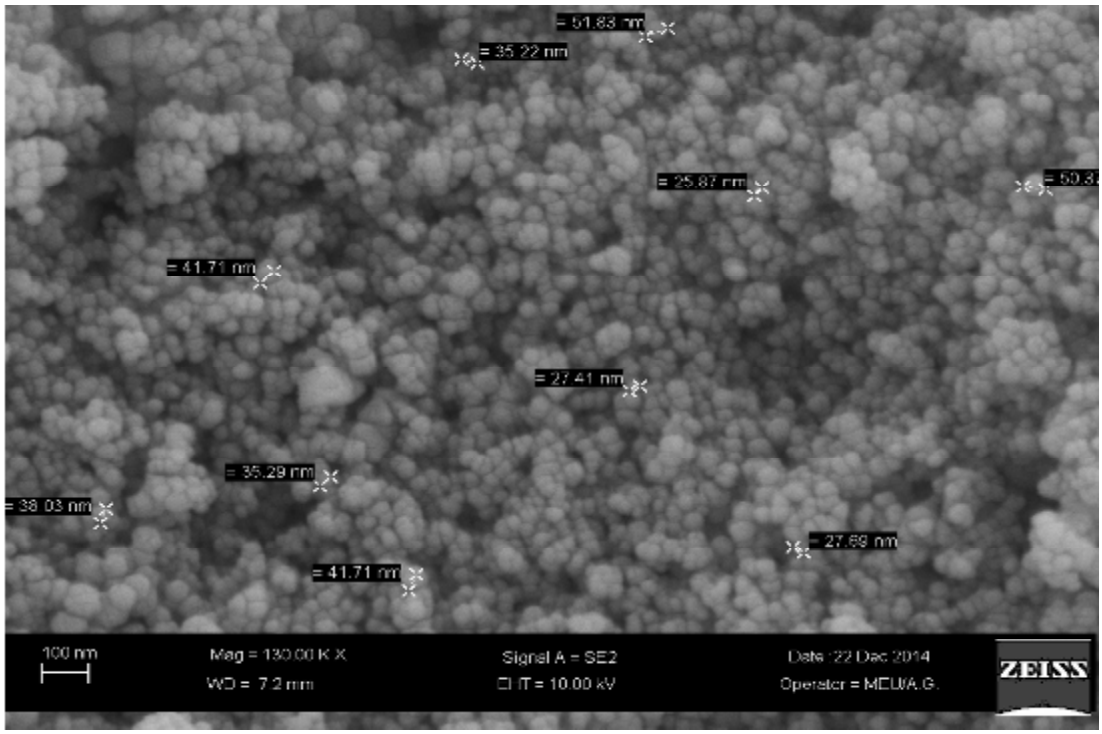
No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.112(11)	2.9612(11)	231(14)	0.389(9)	118.1(18)	0.51(4)	186
2	30.92(3)	2.819(3)	42(6)	0.23(3)	11.2(10)	0.27(6)	115
3	35.538(6)	2.5243(4)	771(25)	0.380(5)	405(2)	0.52(2)	225
4	37.26(4)	2.417(3)	27(5)	0.34(3)	9.8(11)	0.36(10)	212
5	43.74(18)	2.0941(9)	167(12)	0.371(15)	81.2(17)	0.49(4)	164
6	54.04(2)	1.7074(6)	72(8)	0.451(16)	37.4(11)	0.52(7)	113
7	57.125(16)	1.6109(4)	211(13)	0.438(16)	123.1(17)	0.58(4)	135

Fe_3O_4'e ait altı temel piki de GAMNP'nin XRD spektrumunda görülebilmektedir. Bu pikler; 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleridir. Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 24,8 nm olarak bulunmuştur. XRD spektrumu Çizelge 26 ve Şekil 78'de verilmiştir.

GAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın olmadığı görülmüştür. GAMNP'nin köpük fazından alınan nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri incelendiğinde tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu bir şekilde 10-50 nm aralığında olduğu görülmektedir. C-TEM görüntüleri Şekil 79'da verilmiştir.



Şekil 79. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri

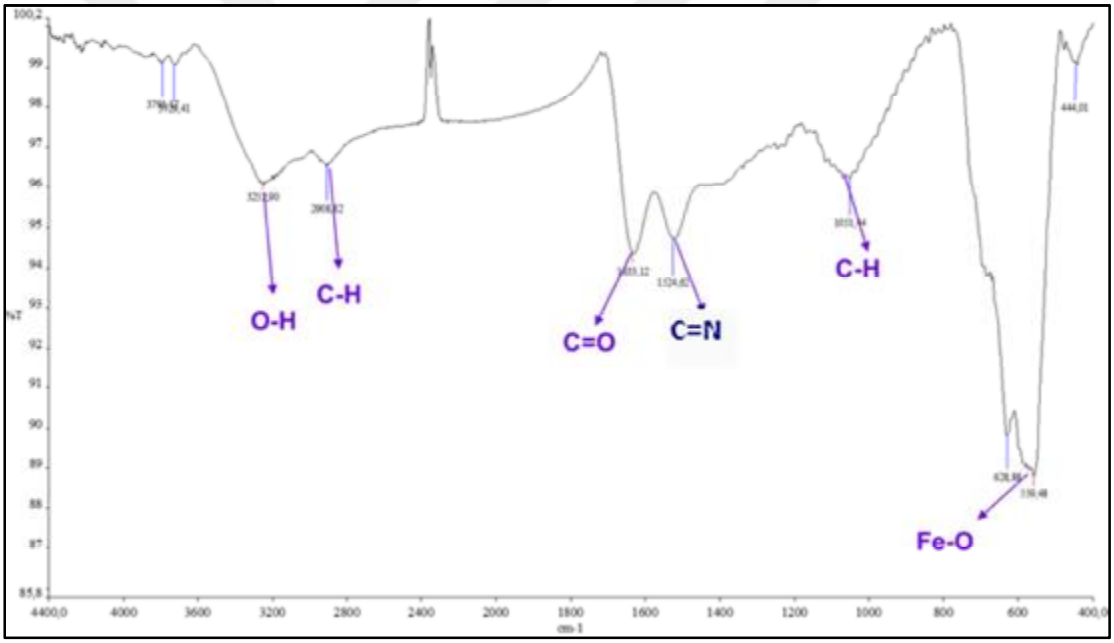


Şekil 80. GAMNP'nin SEM görüntüleri.

GAMNP'nin SEM görüntülerinden, her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. XRD ve C-TEM verileri ile uyumlu şekilde boyutların 37,5 nm olduğu belirlenmiştir. SEM görüntüleri Şekil 80'de verilmiştir.

4.1.5.1. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere hemoglobin bağlanması

Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlı hemoglobinlerin (GAMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde, 3000-3650 cm^{-1}, 3050-3100 cm^{-1}, 2908 cm^{-1}, 1633 cm^{-1}, 1524 cm^{-1} ve 559 cm^{-1}'de pikler gözlenmiştir. FT-IR spektrumu Şekil 81'de verilmiştir.



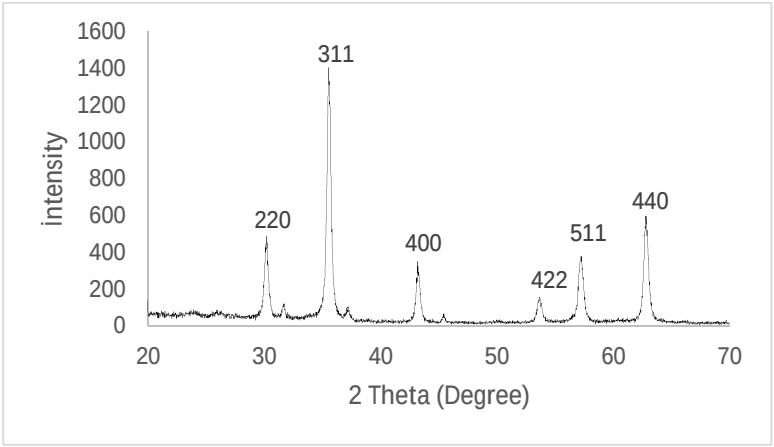
Şekil 81. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin FT-IR spektrumu



Şekil 82. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış oksihemoglobinlerin bağlandıktan üç hafta sonraki UV-Vis spektrumu

Manyetik nanopartiküllere glutaraldehit kaplanmasıyla elde edilen manyetik nanopartiküllerdeki aldehit gruplarına (GAMNP-Hb), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin üç hafta sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde, 542,30 ve 575,89 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (Şekil 82).

GAMNP-Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde ise destek malzemesi olan Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden partikül boyutu 26,2 nm olarak hesaplanmıştır. XRD spektrumu Çizelge 27 ve Şekil 83'te verilmiştir.

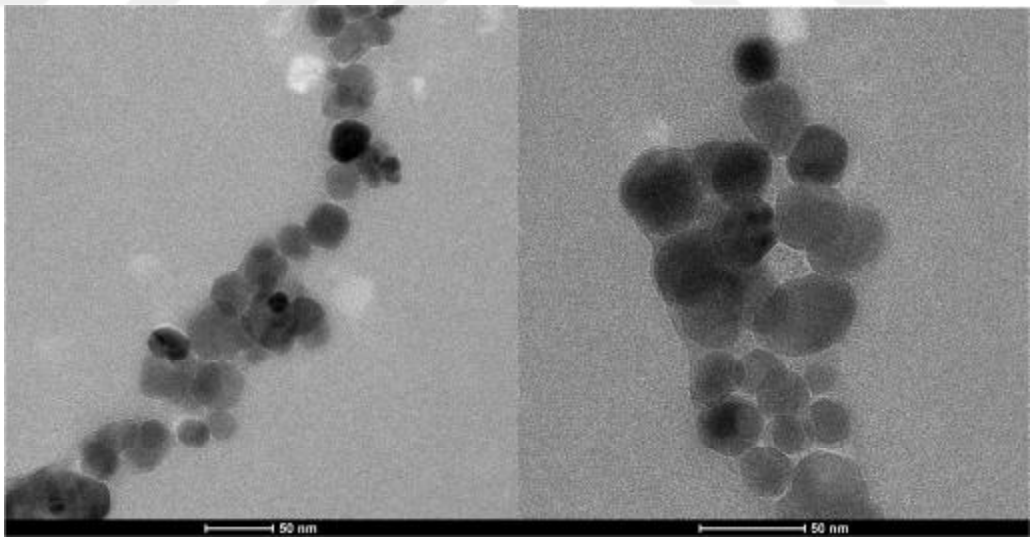


Şekil 83. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD spektrumu

Çizelge 27. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin XRD verileri

No.	2-theta(deg)	d(ang.)	Height(cps)	FWHM(deg)	Int. I(cps deg)	Int. W(deg)	Size (A)
1	30.155(11)	2.9612(11)	231(14)	0.389(9)	118.1(18)	0.51(4)	193
2	31.72(3)	2.819(3)	42(6)	0.23(3)	11.2(10)	0.27(6)	128
3	35.534(6)	2.5243(4)	771(25)	0.380(5)	405(2)	0.52(2)	262
4	37.17(4)	2.417(3)	27(5)	0.34(3)	9.8(11)	0.36(10)	212
5	43.164(18)	2.0941(9)	167(12)	0.371(15)	81.2(17)	0.49(4)	180
6	53.64(2)	1.7074(6)	72(8)	0.451(16)	37.4(11)	0.52(7)	129
7	57.134(16)	1.6109(4)	211(13)	0.438(16)	123.1(17)	0.58(4)	148

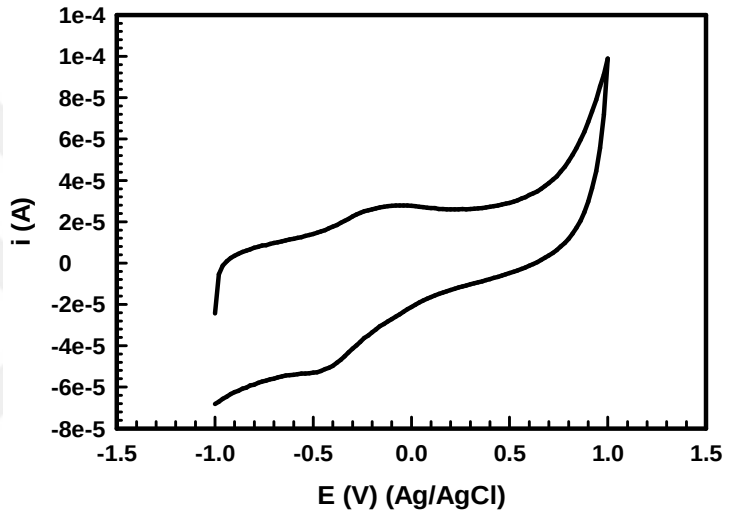
GAMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde yaklaşık boyutu 100-200 nm olan GAMNP-Hb nanopartikül kümelerinin, GAMNP'e göre daha hacimli olduğu C-TEM görüntülerinden anlaşılmaktadır. C-TEM görüntüleri Şekil 84'te verilmiştir.



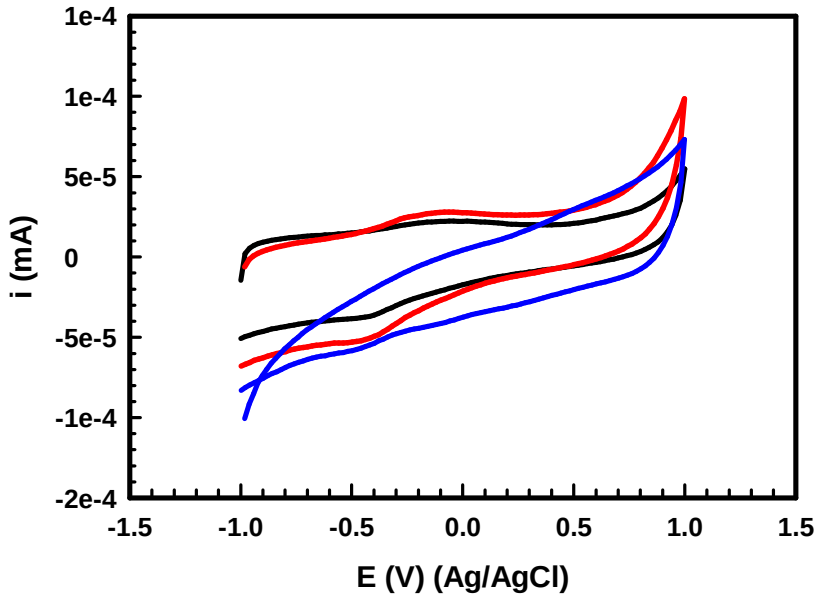
Şekil 84. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri.

GAMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg GAMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Her ölçüm en az 3 tekrarlı döngü alınarak yapılmıştır.

Voltogramlar incelendiğinde, Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde ve indirgenme reaksiyonu -0,06 V anodik potansiyelde pik şeklinde görülmektedir. Sadece GAMNP içeren süspansiyonun CV'si incelendiğinde herhangi bir pik elde edilememiştir. Saf Hb'i içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde ise, Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. GAMNP-Hb'ye ait voltogram Şekil 8 ve 86'da verilmiştir.



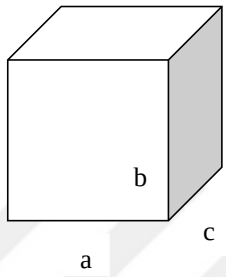
Şekil 85. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin siklik voltogramı



Şekil 86. Siklik voltogramlar (▬ saf Hb, ▬ glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlanmış Hb, ▬ glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküller)

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre GAMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %40,397'dir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 5,578 azot bulunmaktadır. Yine aynı metoda göre yapılan ölçüme göre bu azotun %0,4554'ü destek malzemesinden gelmektedir. Farkı alındığında hemoglobinden kaynaklı N miktarı %5,1226

Nanopartikül başına düşen Hb miktarı hesaplanması:



a = b = c = 8,39 Å

a.b.c = 590,5 Å = $590,5.10^{-24}$ cm^{-3} (10^8 Å= 1 cm)

Her bir magnetit birim hücresi kenar uzunluğu 8,39 Å olduğuna göre bir hücrenin hacmi a.b.c formülünden 590,5 Å'a, o da $590,5x10^{-24}$ cm^3'e denk gelir.

Her bir Fe_3O_4 hacmi; $590,5x10^{-24}$ cm^3 / 8 = $73,8.10^{-24}$ cm^3

Her birim hücrede 8 tane Fe_3O_4 birimi bulunur. Buradan Fe_3O_4 başına hacim; $73,8.10^{-24}$ cm^3'tür.

1 tane Fe atomu kütlesi: 55,84 g / ($6,02.10^{23}$) = $9,275. 10^{-23}$ g

1 tane O atomu kütlesi: 16 g / ($6,02.10^{23}$) = $2,657. 10^{-23}$ g

Her bir birim hücrede 24 tane Fe ve 32 tane O atomu bulunur. Bu durumda her bir birim hücrenin kütlesi;

(24. $9,275. 10^{-23}$ g) + (32. $2,657. 10^{-23}$ g) = $307,6. 10^{-23}$ g

Deneylerde kullanılan magnetitlerin ortalama boyutu 20 nm olduğuna göre, bir nanopartikülün hacmi;

$(4\pi r^3/3) = (4\pi(10nm)^3/3) = 4188$ nm^3 = $4,188. 10^{-18}$ cm^3

20 nm'lik bir partiküldeki birim hücre sayısı;

$4,188. 10^{-18}$ cm^3 / ($590,5.10^{-24}$ cm^{-3}) = 7092 tane birim hücre

20 nm'lik bir partiküldeki Fe atomu sayısı;

24. 7092 = 170208 tane Fe atomu

20 nm'lik bir partiküldeki O atomu sayısı;

32. 7092 = 226944 tane O atomu

20 nm'lik bir partikülün kütlesi;

(170208. 9,275. 10^{-23} g) + (226944. 2,657. 10^{-23} g) = 2,182.10^{-17} g

1 g magnetitte bulunan partikül sayısı ise;

1/ (2,182.10^{-17} g) = 4,58. 10^{16} tane partikül

ICP-OES ölçüm sonuçlarına göre GAMNP-Hb'de mevcut Fe atomları miktarı %41,242'tir. Buna paralel olarak azot-protein tayin cihazı (Kjeldahl metodu) ile yapılan ölçüme göre % 4,994 azot bulunmaktadır.

Malzeme içerisindeki Fe_3O_4 kütlesi;

41,242g Fe. (1 mol Fe/55,84 g Fe). (1 mol Fe_3O_4/3 mol Fe). (232 g Fe_3O_4/1 mol Fe_3O_4) = 57,116 g

100 g malzeme içerisindeki magnetit partikülleri sayısı;

57,116 g/ 2,182.10^{-17} g= 26,178.10^{17} tanecik

Bir Hb molekülü kütlesi $C_{2932}H_{4724}N_{828}O_{840}S_8Fe_4$ ve mol kütlesi 64500 kDa yani 64500 g/mol'dür (19,20).

100 g malzeme içerisindeki Hb molekülü sayısı;

4,994 g N. (1 mol N/14 g N). (1 mol Hb/ 828 mol N). (6,02.10^{23} tane Hb/ 1 mol Hb)= 2,594.10^{20} Hb

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı;

(2,594.10^{20} Hb) / (26,178.10^{17} tanecik)= 99 Hb/nanopartikül

Teorik olarak bir partiküle bağlanabilecek Hb sayısını hesaplamak için, küresel olarak nanopartiküllerin kaplanmış ve modifiye edilmiş son halinin yarıçapı 19,75 nm olduğu düşünülürse kürenin yüzey alanı;

$4.\pi.r^2 = 4.\ \pi.\ (19{,}75\ nm)^2 = 4901{,}7\ nm^2$

Bir Hb molekülü boyutları ise 6x5x5 nm'dir (20). Ancak iki Hb molekülünün molekül merkezleri arasındaki mesafe 6,9 nm'dir (21). Bu durumda bağlanmış olan hemoglobinin partikül üzerinde temas edecek yüzey alanı en fazla bir küp olarak düşünüldüğünde;

$6{,}9\ nm.\ 6{,}9\ nm = 47{,}61\ nm^2$

20 nm'lik Fe_3O_4 nanopartikülü başına düşen Hb sayısı teorik olarak;

$4901{,}7\ nm^2 / 47{,}61\ nm^2 = 103$

Yüzde bağlanma başarısı;

(Deneysel olarak bağlanan Hb) / (Teorik olarak bağlanan Hb) . 100 = (99 / 103) . 100 = % 96,12

Oluşturulan deneysel grupların toplu nanopartikül boyutları, Hb bağlama yüzdeleri ve EDX element hesaplamaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 28 ve 29).

Çizelge 28. 4 farklı metodla sentezlenen partikül boyutları ve Hb yüzdeleri

Destek	$Tutunabilecek_{max}$ Hb (tane)	Tutunan Hb (verim)	% tutunan Hb	Tanecik boyutu (nm)	Mnp-Hb tanecik boyutu (nm)
TALMNP	99	45	45,45	21,3	24.2
TEALMNP	111	104	93,69	22,7	27.1
3APGAMNP	98	85	86,73	23,3	25,3
GAMNP	103	99	96,12	24,8	26,2

Çizelge 29. EDX ve Khejdahl metoduna göre sentezlenen komplekslerin elementel yüzedeleri

Destek	% Fe	% C	% Si	% N
TALMNP	43,82	13,22	-	2,21
TEALMNP	44,02	11,22	-	1,85
3APGAMNP	44,08	12,36	1,35	1,96

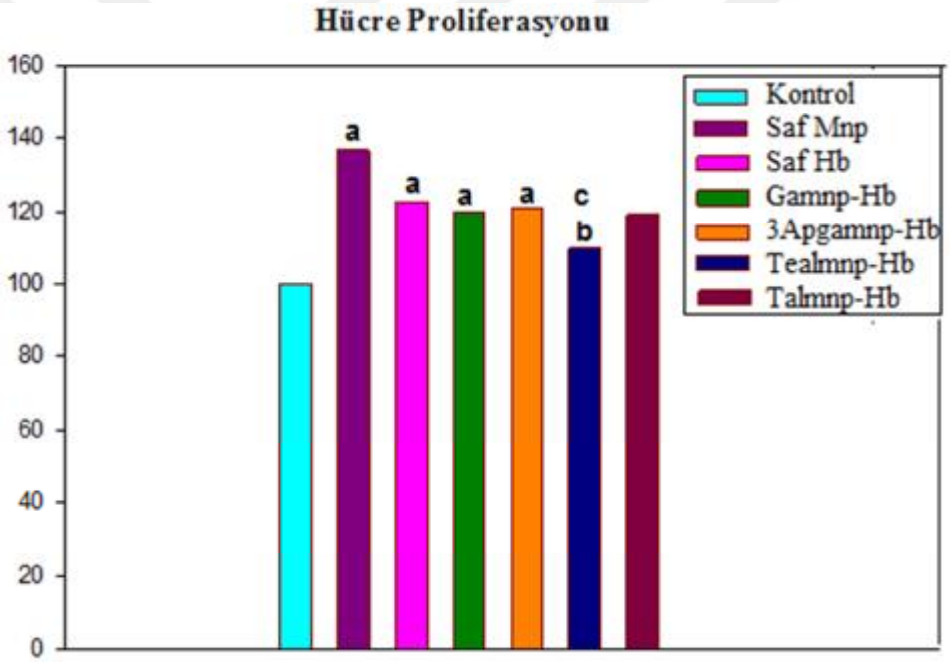
4.2. Sentezlenen komplekslerin endotel hücre canlılığı ve proliferasyonu üzerine etkisi

Çalışmamızda, endotel hücresi üzerine uygulanan, saf mnp, saf Hb, GAMNP-Hb ve 3APGAMNP-Hb komplekslerinin hücrenin canlılık ve proliferasyonunu artırdığı saptandı ($p<0,01$), (Çizelge 30; Şekil 87).

TEALMNP-Hb ve TALMNP-Hb kompleksi uygulaması ise, proliferasyon ve hücre canlılığında istatistiksel olarak anlamlı bir artışa neden olmadı, (Şekil 87). Hücreler üzerine uygulanan TEALMNP-Hb kompleksi saf mnp ve 3APGAMNP-Hb kompleksine göre hücre proliferasyonunda daha az artışa neden oldu ($p<0,05$), (Çizelge 30; Şekil 87).

Çizelge 30. Deneysel grupların hücre proliferasyonu çalışmasında elde edilen absorbans değerleri (OD).

Örnekler	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Kontrol	8	0,56	0,76	0,63	0,07
Saf mnp	8	0,58	1,14	0,86	0,18
Saf Hb	8	0,63	0,95	0,77	0,12
GA	8	0,61	0,90	0,75	0,10
APTES	8	0,62	0,84	0,76	0,07
TEA	8	0,58	0,79	0,69	0,06
TA	8	0,45	1,27	0,75	0,27



Şekil 87. Deneysel grupların hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi. Sonuçlar kontrolün yüzdesi olarak gösterilmiştir. a: Kontrole göre $p<0,05$; b: Saf mnp'ye göre $p<0,05$; c: 3APGAMNP'ye göre $p<0,05$

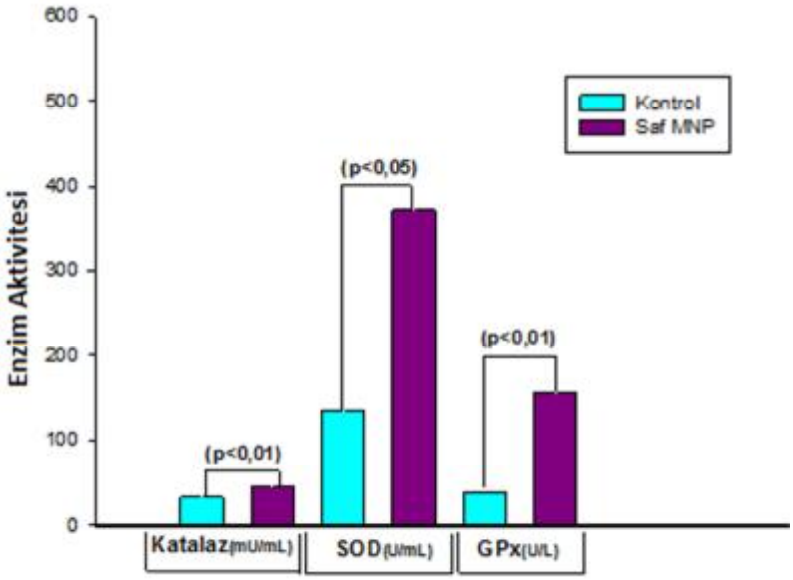
4.3. Sentezlenen komplekslerin, antioksidan savunma mekanizmasına etkisi

4.3.1. Saf mnp uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Saf mnp uygulaması CAT ($p<0,01$), SOD($p<0,05$) ve glutatyon peroksidaz ($p<0,01$) enzim aktivitesinde kontrole göre anlamlı artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 88). Her kuyucuğa 10 µl saf mnp uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 31).

Çizelge 31. Saf mnp uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (n=8) (Saf mnp)	KATALAZ (mU/mL)	SOD(U/mL)	GPx (U/l)
Minimum	17	63	118
Maksimum	66	700	185
Ortalama	45	372	156
Std. Sapma	19	260	24



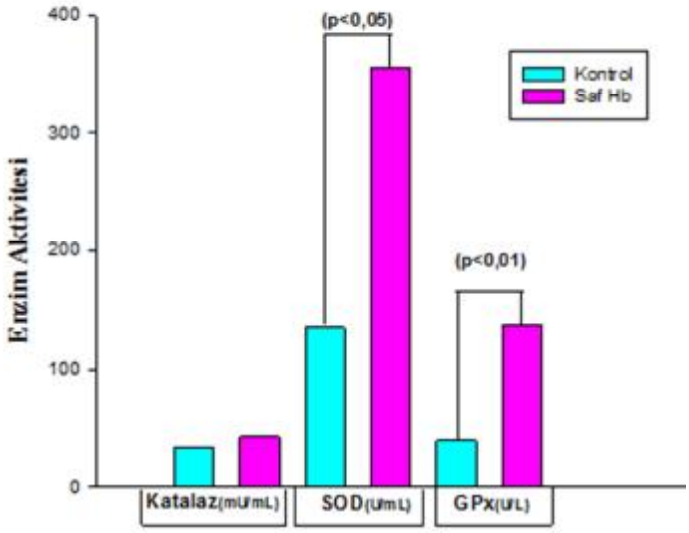
Şekil 88. Saf mnp'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir

4.3.2. Saf Hb uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Endotel hücrelerine saf Hb uygulaması CAT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadı. SOD ($p<0,001$) ve glutatyon peroksidaz ($p<0,01$) aktivitesinde ise anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 89). Her kuyucuğa 10 µl saf Hb uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 32).

Çizelge 32. Saf Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (n=8) (Saf Hb)	KATALAZ (mU/mL)	SOD(U/mL)	GPx (U/l)
Minimum	20	200	101
Maksimum	62	563	186
Ortalama	42	356	137
Std. Sapma	17	137	31



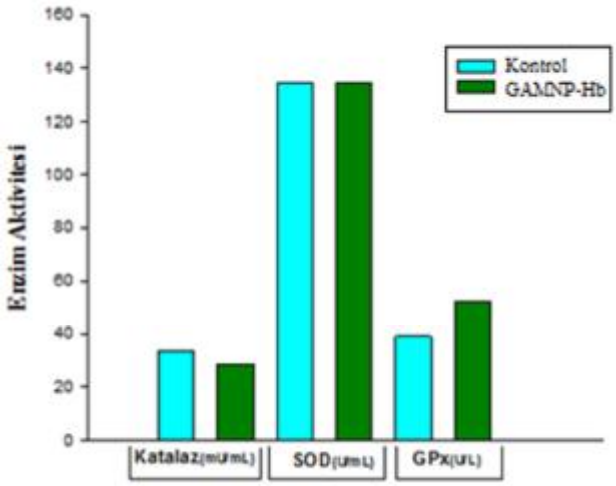
Şekil 89. Saf Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.

4.3.3. GAMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

GAMNP-Hb kompleksi uygulaması her üç enzim aktivitesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe neden olmadı (Şekil 90). Her kuyucuğa 10 µl GAMNP-Hb uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 33).

Çizelge 33. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartikül uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (n=8) (GAMNP-Hb)	KATALAZ (mU/mL)	SOD(U/mL)	GPx (U/l)
Minimum	20	88	25
Maksimum	41	188	76
Ortalama	29	134	53
Std. Sapma	6	37	18



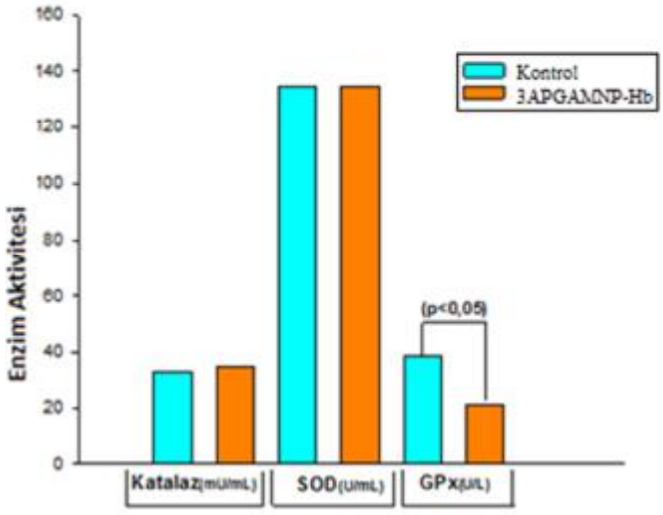
Şekil 90. GAMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.

4.3.4. 3APGAMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

3APGAMNP-Hb uygulaması endotel hücresinin CAT ve SOD enzim aktivitesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmazken, GPX aktivitesini azalttı ($p<0,05$), (Şekil 91). Her kuyucuğa 10 µl saf 3APGAMNP-Hb uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 34).

Çizelge 34. 3APGAMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (n=8) (3APGAMNP-Hb)	KATALAZ (mU/mL)	SOD(U/mL)	GPx (U/l)
Minimum	11	113	8
Maksimum	54	188	34
Ortalama	35	134	21
Std. Sapma	13	28	12



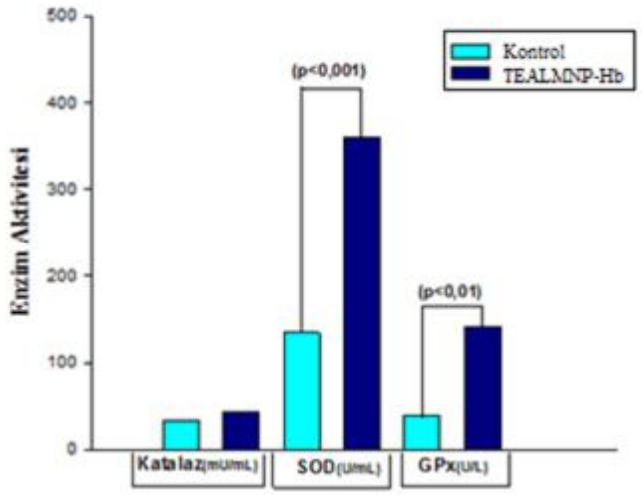
Şekil 91. 3APGAMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.

4.3.5. TEALMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Endotel hücreleri üzerine uygulanan TEALMNP-Hb kompleksi CAT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadı. SOD ($p<0,001$) ve GPX ($p<0,01$) aktivitesinde ise anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi (Şekil 92). Her kuyucuğa 10 µl saf TEALMNP-Hb uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 35).

Çizelge 35. TEALMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (n=8) (TEALMNP-Hb)	**KATALAZ (mU/mL)**	**SOD(U/mL)**	**GPx (U/l)**
Minimum	20	200	93
Maksimum	66	600	193
Ortalama	44	358	142
Std. Sapma	17	150	35



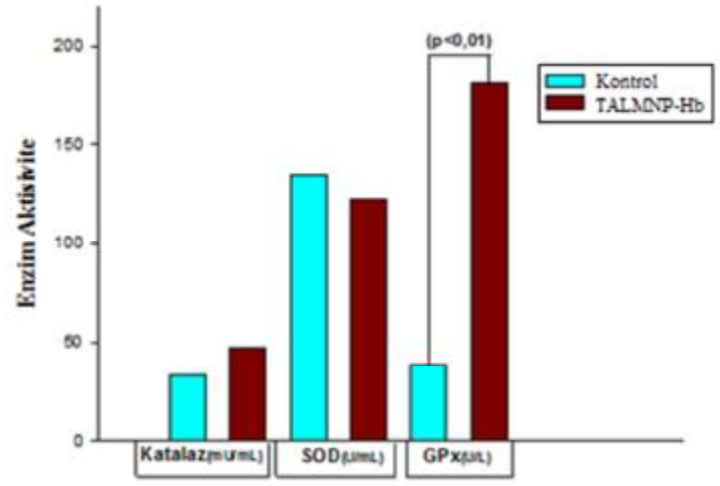
Şekil 92. TEALMNP-Hb'in endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.

4.3.6. TALMNP-Hb kompleksi uygulamasının antioksidan enzim aktivitesi üzerine olan etkisi

Çalışmamızda, endotel hücreleri üzerine TALMNP-Hb kompleksi uygulamasının CAT ve SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadı ancak GPX aktivitesini anlamlı olarak artırdı ($p<0,01$), (Şekil 93). Her kuyucuğa 10 µl saf TALMNP-Hb uygulanmıştır. Antioksidan enzim aktiviteleri 8 kez tekrarlanarak, ortalama, minimum, maksimum değerleri ve standart sapmaları aşağıda verilmiştir (Çizelge 36).

Çizelge 36.TALMNP-Hb uygulanan 8 tekrarlı örneğin enzim aktivite değerleri

Örnekler (TALMNP-Hb)	KATALAZ (mU/mL)	SOD(U/mL)	GPx (U/l)
Minimum	26	75	126
Maksimum	73	168	206
Ortalama	47	121	181
Std. Sapma	18	37	35



Şekil 93. TALMNP-Hb'nin endotel hücresinin CAT, SOD ve GPX enzim aktivitesi üzerine etkisi. Barlarda ortalama aktiviteler işlenmiştir.

5. TARTIŞMA

5. 1. Manyetik nanopartikül sentezi ve çeşitli ara kollar ile modifikasyonu

Çalışmamızda temel hedefimiz acil kanamalı durumlarda kullanılabilecek raf ömrü uzun, antijen bulundurmayan ve nanoboyutlarda bir biyomalzeme geliştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda, Hb moleküllerinin immobilize edileceği nanoboyutlarda magnetitlerin sentezlenmesi yapılmış ve katı destek olarak kullanılan mangnetitlerin immobilizasyon sonrası karakterizasyonları belirlenmiştir.

5.1.1. Demir (II, III) oksit (Magnetit, Fe_3O_4) sentezi

Manyetik nanopartiküllerin sentezi için demirin $FeSO_4$ ve $FeCl_3$ tuzları kullanıldı. Başlangıçta bu tuz karışımlarının renkleri sarı iken NaOH eklenmesi ile birlikte siyah renkli manyetik nanopartiküller oluştu. Oluşan manyetik nanopartiküllerin manyetik özellikleri mıkanatıs ile test edildiğinde, manyetik özellik taşıdığı gözlemlendi. Elde edilen mnp; FT-IR, XRD, SEM ve C-TEM gibi çeşitli spektroskopik tekniklerle analiz edildi. Mnp'nin FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3450 cm^{-1}'de O-H titreşiminin olduğu belirlendi. Mnp'nin kimyasal formülü Fe_3O_4 olmasına karşın Tang ve arkadaşları mnp yüzeyinin bir OH tabakası ile kaplandığını bildirmişlerdir. Bu O-H piki mnp yüzeyindeki OH tabakasından kaynaklanmaktadır (71). Karakteristik Fe-O gerilme piki 584 cm^{-1}'de gözlenmiştir (75,97)

Mnp'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir (71,75). Bu piklerden yola çıkarak Fe_3O_4 kristal örgüsünün spinel yapıda olduğu sonucuna varılmıştır (71). Bu kristal yapı genellikle manyetik yapıların kristal örgüsü olarak karşılaşılmaktadır. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır (97,100) . Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 20 nm olarak hesaplanmıştır.

Mnp'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde boyutların XRD sonuçları uyumlu şekilde 10-50 nm aralığında olduğu ancak Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerinin topaklanarak gerçekten çok daha büyük boyutlara ulaştığı görülmektedir. Literatürlerde de rastlandığı gibi manyetik nanopartiküller kaplama yapılmadan önce topaklanmaktadır (76,77). C-TEM görüntülerinden, her bir partikül kümesinin boyutunun 100-250 nm aralığında olduğu görülmektedir. 50 nm'den daha küçük

boyuttaki manyetik nanopartiküllere süperparamanyetik partikül denilir (97,100). Buna göre, C-TEM ve XRD sonuçlarından yola çıkılarak, deneylerimizde elde edilen manyetik nanopartiküllerin süperparamanyetik özellikte olduğu sonucuna varılmıştır (78). C-TEM görüntülerinden manyetik nanopartiküllerin küresel morfolojide olduğu açıkça görülmektedir.

5.1.2. Magnetitin tartarik asit ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması

Manyetik nanopartiküllerin tartarik asit ile kaplanması aşamasında elde edilen tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin (TAMNP) karakterizasyonunda FT-IR spektrumunda beklenen bazı pikler vardır. Bu pikler tartarik asitten kaynaklı C=O çift bağı, alifatik C-H titreşim pikleri ve O-H gerilme pikidir. FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3300 cm^{-1}'de O-H titreşim pikleri gözlenmiştir. Bu pik tartarik asidin karboksilik asit grubundaki O-H piki olmasına karşın Fe_3O_4 etrafındaki OH tabakasından da kaynaklanmaktadır (71). Ancak TAMNP spektrumunda oluşan O-H piki belirgindir. FT-IR spektrumunda çıkması beklenen temel piklerden biri de C=O grubuna ait piklerdir. Fonksiyonel grup bölgesinde 1595 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Hem OH hem de C=O piklerinin varlığı, yapıdaki karboksilik asidi işaret eder. Tartarik asitten kaynaklı diğer bir pik ise alifatik C-H titreşim pikleridir. Mnp'den farklı olarak 1084 cm^{-1}'de C-H gerilme piki çıkmıştır. Mnp'de olduğu gibi Fe-O gerilme piki 602 cm^{-1}'de çıkmıştır (71,75,76). Bu mnp ile karşılaştığında daha yüksek bir dalga frekansında görülmüştür. Bu etkinin nedeni tartarik asidin bağlanması ile oluşan Fe-O-C(=O)-R yapısında karboksilat grubunun elektrofil olması yani elektron çekici olmasıdır. Elektrofil özelliği oksijendeki elektron yoğunluğunun azalmasına bu da Fe-O bağının kısalmasına neden olur. Bağ kısaldıkça bağın uyarılması için gereken enerjinin artmasına neden olur. Enerjinin artması dalga boyunu azaltır bu da frekans ile ters orantılı olduğundan frekans artar (42). Mnp ve TAMNP'nin FT-IR spektrumları incelendiğinde bu etki görülmektedir.

TAMNP'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir (71,74,75). Bu veriler kaplanma sonrasında Fe_3O_4 kristalinin spinel örgüsünü koruduğunu göstermiştir (75). XRD piklerinde sağa doğru bir kayma olduğu görülmüştür. Genel olarak XRD piklerinin sağa

doğru kaymasının iki nedeni bulunmaktadır. Bunlardan ilki katı materyaller arasındaki kalıntı stresin azalmış olmasıdır. Diğer bir etki ise kristal örgü içerisinde bulunan atomların birbirine göre konumlarının değişmiş olması ve standart kristal içerisindeki atomların bağ uzunlukları, açıları gibi parametrelerin değişmesidir. Manyetik nanopartiküllerde kaplama sonrası temel piklerindeki kaymalar kristal örgüdeki atomların konumlarının değişmesinden kaynaklanmaktadır (79). Bu bilgilerden yola çıkılarak manyetik nanopartiküller arasında mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplama işlemi sırasında hiç bozulmadan kaldığı söylenebilir. Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır (98). Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 21,1 nm olarak hesaplanmıştır.

TAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın çok azaldığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmektedir. XRD piklerinin sağa doğru kaymış olması topaklanmadaki azalış olduğunu desteklemektedir. Tartarik asit kaplamasının karboksilik asit gruplarının birbirlerini itme eğilimlerinden dolayı manyetik nanopartiküllerde topaklanma kaplama olmayan manyetik nanopartiküllerden daha azdır. C-TEM ve XRD'den elde edilen tanecik boyutu verileri ele alındığında, partiküllerin kritik boyut olan 50 nm'den küçük olduğu ve süperparamanyetik özelliğini koruduğu söylenebilir. Bu veriler manyetik nanopartiküllerin kaplama sonrası geometrik şeklini koruduğunu göstermektedir. C-TEM görüntülerinden nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının eşit olmadığı görülmektedir.

TAMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın azaldığı, XRD ve C-TEM verileri ile uyumlu şekilde boyutların 50 nm'den küçük olduğu belirlenmiştir. EDX verilerinden kaplama miktarı yüzdesel olarak bulunmuştur ve buna göre $1{,}7 \times 10^{-3}$ mol tartarik asit/g mnp kaplama gerçekleşmiştir.

TAMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin tartarik asitle kaplandığı açık bir şekilde görülmektedir.

Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin $NaBH_4$ ile yüzey modifikasyonu aşamasında kullanılan indirgenme ajanı kuvvetli bir indirgen olup karboksilik asitlerin alkol basamağına kadar indirgenmesinde kullanılır. Çalışmada, $NaBH_4$ tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin karboksilik asit grubunun indirgenmesinde kullanılmıştır. Elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin (TACMNP), FT-IR

sonuçları incelendiğinde alkol gruplarına ait O-H titreşim piklerinin beklendiği gibi 3000-3650 cm^{-1}'de çıktığı görülmüştür. Parmak izi bölgesinde de yine O-H bağı 1409 cm^{-1}'de çıkmıştır. Mnp ve TAMNP'de olduğu gibi Fe-O piki 588 cm^{-1}'de gözlenmiştir. C=O gerilme piki TAMNP'de olduğu gibi 1646 cm^{-1}'de gözlenmiştir (71,75,80). Ancak TAMNP'ye göre daha zayıf ve daha yüksek dalga sayısında görünmektedir. Bunun nedeni fonksiyonel grup değişimleri sonucu karboksilik asidin kendisinden daha az elektrofil özelliği olan alkole indirgenmesidir. Elektrofil özelliğin azalması Fe-O-C(=O)-R yapısındaki oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğunun artmasına neden olur. Bu da bağın uzaması dolayısıyla bağın uyarılması için gereken enerjinin azalması anlamına gelir. Enerjinin azalması da dalga boyunu artırıp dalga sayısını azaltır (42,81). Bu etki FT-IR spekrumundan açıkça görülebilmektedir. TAMNP'ye ait Fe-O piki 602 cm^{-1}'de gözlenirken TACMNP'nin Fe-O piki 588 cm^{-1}'de gözlenmiştir. TACMNP spektrumunda 1646 cm^{-1}'de gözlenen C=O piki, Fe-O-C(=O)-R yapısında oluşan esterdeki C=O bağındaki titreşim pikleridir. 1083 cm^{-1}'de TACMNP'ye ait alifatik C-H grupları TAMNP'den daha yüksek dalga sayısında ve daha kuvvetli gözlenmiştir.

Alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin XRD sonuçları ile karşılaştırıldığında piklerin genel olarak sağa kaydığı söylenebilir. Bunun nedeninin kristal örgü içerisindeki atomların yüzey modifikasyonu ile birlikte birbirleri arasındaki bağlarının ve konumlarının değişmesinden kaynaklanmaktadır. XRD verileri, manyetik nanopartiküllerin kristal örgüsünün spinel yapısında kaldığını göstermiştir (71). Mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplama ve modifikasyon işlemleri sırasında bozulmadan kaldığı söylenebilir (98,99). Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 21,3 nm olarak hesaplanmıştır.

TACMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin tartarik asit grubunun alkole indirgendiği açık bir şekilde görülmektedir.

Tartarik asit kaplı manyetik nanopartiküllerden elde edilen alkol kaplı manyetik nanopartiküllere (TALMNP) Hb bağlanması için fonksiyonel grup değişimi ile alkol gruplarının aldehit ve ketonlara yükseltgenmesi gerekir. Ancak burada dikkat edilmesi

gereken husus primer alkol grubunun aldehit yerine karboksilik aside yükseltgenmesini engellemektir. Bu nedenle kullanılacak olan yükseltgenme ajanının iyi seçilmesi gerekir. Bunun için gerekli olan yükseltgenme ajanı olarak piridinyum kloro kromattır (PCC) kullanılmıştır. PCC, ılımlı şartlarda primer alkollerin aldehitlere ve sekonder alkollerin ketonlara yükseltgenmesini sağlar (73). TACMNP'de biri primer, ikisi sekonder olmak üzere üç adet alkol grubu mevcuttur. TACMNP'nin PCC ile muamelesi sonucu primer alkol grubu aldehite ve sekonder alkol grupları ise ketonlara dönüşmüştür. Elde edilen aldehit ve keton kaplı manyetik nanopartiküllerin (TALMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde alkol gruplarına ait O-H titreşim piklerinin beklendiği gibi 3000-3650 cm^{-1}'de çıktığı görülmüştür. Parmak izi bölgesinde de yine O-H bağı 1403 cm^{-1}'de çıkmıştır. Ancak bu iki pik de TACMNP'nin OH pikine göre daha zayıf bir piktir. Bu pikteki zayıflama alkol gruplarının yükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Mnp, TAMNP ve TACMNP'de olduğu gibi Fe-O piki 587 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Bu pik, TACMNP'ye göre daha düşük dalga sayısında görünmektedir. Dalga sayılarındaki (frekans) bu azalmanın nedeni fonksiyonel grup değişimleridir. Yükseltgenme sonucu alkol grupları kendinden daha elektrofil olan keton ve aldehitlere yükseltgenmiştir. Elektrofil özellik arttığından Fe-O-C(=O)-R yapısındaki oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğu azalır. Bu da Fe-O bağının kısalmasına neden olur. Bağın kısalması enerjinin artmasına dolayısıyla dalga sayısının azalmasına neden olur (42,81). Nitekim TACMNP'de Fe-O piki 588 cm^{-1}'de gözlenirken TALMNP'de 587 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Yeni oluşan aldehit ve keton yapısından beklendiği gibi C=O piki, 1627 cm^{-1}'de gözlenmiştir.

TALMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın az olduğu ve tanecik boyutunun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Görüntülerden yola çıkarak, neredeyse her bir nanopartikülün tek başına bulunduğu topaklanan partiküllerin de yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu C-TEM görüntülerinden görülmektedir.

TALMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları sonucunda küresel yapısını hala koruduğu ve partiküllerin çok az topaklandığı ve elde edilen partikül kümelerinin C-TEM görüntüleri ile uyumlu şekilde 50-200 nm aralığında olduğu sonucuna varılmıştır. C-TEM verileri ile uyumlu

şekilde boyutların ortalama olarak 38.2 nm olduğu belirlenmiştir. EDX verilerinden kaplanan tartarik asidin modifiye olduğu anlaşılmaktadır.

TACMNP'ye ait tüm spektroskopik ve analitik veriler incelendiğinde alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin alkol gruplarının, aldehit ve keton gruplarına yükseltgeme işleminin gerçekleştirildiği açık bir şekilde görülmektedir.

Manyetik nanopartiküllere tartarik asit bağlanması ve modifikasyonları sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TALMNP), Hb bağlanmıştır. Aldehit gruplarına bağlanan hemoglobinler, yapılarında bulunan aldehit grupları ile Hb zincirlerindeki asparajin, glutamin, lisin ve arjinin aminoasitlerindeki amin ($-NH_2$) gruplarına, Schiff bazı (C=N) oluşturarak bağlanmaktadır. Elde edilen manyetik nanopartikül destekli hemoglobinlerin (TALMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde bağlandığı destekten tamamen farklı bir spektrum elde edildiği görülmektedir. FT-IR spektrumu incelendiğinde, literatürde karşılaşılan ve saf hemoglobinlerden elde edilen FT-IR spektrumu ile benzer olduğu görülmüştür (82). 3000-3600 cm^{-1}'de gözlenen yayvan ve şiddetli pik yapıdaki O-H gruplarının varlığını göstermektedir. Bu OH pikleri Hb molekülündeki alkol gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu pik hemoglobinin bağlandığı destek malzemesindeki OH gerilme pikinden çok daha şiddetli ve yayvandır. Bu da karboksilik asit varlığından kaynaklanmaktadır. 3050-3100 cm^{-1}'de gözlenen pik, fenilalanin, triptofan, trosin ve histidinden kaynaklı aromatik halkanın C-H titreşim pikidir. 584 cm^{-1}'de gözlenen pik diğerlerinde olduğu gibi Fe-O titreşiminden kaynaklanan piktir. 2922 cm^{-1}'de Hb ve destek malzemesinden kaynaklanan alifatik C-H titreşim pikleri beklendiği gibi gözlenmiştir. Hemoglobinleri oluşturan aminoasitlerin yapısından kaynaklanan temel gruplardan biri olan karboksilik asitteki C=O grubu 1644 cm^{-1}'de gözlenmiştir. OH ve C=O bağının her ikisi birden bulunması yapıda karboksilik asidi dolayısıyla Hb varlığını göstermektedir (98). Hb, destek malzemesine Schiff bazı yani C=N bağı oluşturarak bağlanmaktadır. Bunun yanı sıra Hb moleküllerinin merkezinde bulunan ***hem*** gruplarının yapısında da yine C=N bağı bulunmaktadır. C=N bağı 1531 cm^{-1}'de kuvvetli bir pik şeklinde gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak Hb molekülünün manyetik nanopartiküllere bağlandığı söylenebilir.

Manyetik nanopartiküllere tartarik asit bağlanması ve modifikasyonları sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TALMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin

hemen sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 539,72 ve 577,18 nm'de iki karakteristik pik vermiştir. Bu pikler incelendiğinde hemoglobinin oksihemoglobin formunda olduğu söylenebilir (38). Bu pikler oksihemoglobin 540,37 ve 578,47 nm'de iki karakteristik piki ile örtüşür. Bu da hemoglobinin bağlandıktan sonra işlevini kaybetmediğini göstermektedir. Bağlanmadan 3 hafta sonra yapılan UV-Vis ölçümlerinde elde edilen spektrum incelendiğinde aynı yerlerde pikler verdiği gözlenmiştir. Ancak bağlanmamış haldeki hemoglobinin 3 hafta sonundaki spektrumu incelendiğinde ise bu iki pikin kaybolduğu ve methemoglobin ile aynı şekilde spektrum verdiği görülmüştür. Bu da manyetik nanopartiküle Hb bağlanmasının stabiliteyi artırdığı söylenebilir.

Hb bağlanmış manyetik nanopartiküllerin XRD spektrumu incelendiğinde diğerleri ile benzer şekilde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak manyetik nanopartiküllerin kristal örgüsünün spinel yapıda kaldığı söylenebilir (71). Mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplama, modifikasyon ve bağlanma işlemleri sırasında bozulmadan kaldığı söylenebilir. Partikül boyutu temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 24,2 nm olarak hesaplanmıştır.

TALMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde tanecik boyutunun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Destek malzemesi ve Hb bağlanmış nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri karşılaştırıldığında Hb varlığı net bir şekilde görülmektedir. Hemoglobinin bağlanmasından sonra destek malzemesine nazaran topaklanma olduğu ancak bu topaklanan partiküllerin de yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu C-TEM görüntülerinden görülmektedir. Her bir nanopartikülün etrafındaki organik tabakanın kalınlığındaki farklılıktan yola çıkarak, her nanopartiküle eşit sayıda Hb bağlanmadığı söylenebilir.

TALMNP-Hb'nin SEM görüntülerinden, hemoglobinlerin destek malzemesine bağlandığı net bir şekilde görülmektedir. Bağlanma sonucunda küresel yapıda ancak daha hacimli Hb kaplı manyetik nanopartiküllerin varlığı görülmektedir. TALMNP ve TALMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında elementel analiz sonuçlarındaki C atomu miktarındaki fark hemoglobinden kaynaklandığı ve TALMNP'de daha önce var olmayan ve aminoasitlerin temel gruplardan biri olan amin grubundan kaynaklanan N

atomunun verilerinin elde edilmesinden yola çıkılarak, destek malzemesine hemoglobinlerin bağlandığı sonucuna varılmıştır.

TALMNP-Hb'nin siklik voltogram pH 7,4 fosfat tamponunda 3mg TALMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış olan süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler aynı çözelti içerisinde 3 döngü tekrarı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Siklik voltogram ölçümlerin sonuçları incelendiğinde, voltogramlarda hemoglobinin *hem* gruplarının merkezinde bulunan demir atomunun Fe(III)/Fe(II) indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları görülmektedir. Hb oksijen alarak Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde pik vermiştir. Hemoglobinin aldığı oksijenleri vererek -0,145 V anodik potansiyelde pik vermiştir. Buna göre anodik ve katodik pil potansiyelleri arasındaki fark 0,273 V'tur, bu da hızlı bir elektron transferi olduğunu göstermektedir (83,84). Anodik ve katodik yarı pil potansiyellerinin ortalaması olan formal potansiyel -0,2815 V'tur (84). Anodik ve katodik pikler neredeyse simetrik ve eşit akıma sahiptir. Buradan yola çıkarak, hemoglobinlerin negatif tarama sırasında elektron alarak indirgendiği ve pozitif tarama yapıldığında verdiği kadar potansiyeli geri alarak tamamen yükseltgendiği söylenebilir (83). Yapılan tekrar çalışmalarında, voltogramların üst üste çakıştığı ve buradan yola çıkarak beklenilen indirgenme yükseltgenme reaksiyonun, hemoglobinin yapısında hiç değişim yaratmadan süregeldiğini göstermektedir. Sadece destek malzemesini (TALMNP) içeren süspansiyonun CV'si incelendiğinde herhangi bir pik elde edilmediği görülmektedir. Bu da destek malzemesinde redoks tepkimesinin gerçekleşmediğini göstermektedir. Sadece hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. TALMNP-Hb'nin anodik ve katodik potansiyeli pikleri hemoglobinden elde edilen piklerden daha yüksektir. Bu, immobilizasyon sonrası hemoglobinin neredeyse hiç değişmeden kaldığı hatta TALMNP'ye bağlanmış olan Hb sayısının aynı hacimdeki saf hemoglobin çözeltisinden daha fazla Hb molekülü içerdiği söylenebilir (83).

TALMNP-Hb'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde tartarik asitten yola çıkılarak elde edilmiş aldehit kaplı manyetik nanopartiküllere Hb moleküllerinin bağlandığı söylenebilir.

Teorik olarak partikül başına düşen Hb sayısı, Hb molekülleri kübik olarak düşünüldüğünde ve moleküller arasında herhangi bir sterik engelin olmadığı ideal şartlar için geçerli bir durumdur. 99 Hb molekülünün bir partiküle bağlanması durumunda, partikül yüzeyi olduğu gibi hemoglobinle kaplanmış olur. Bu durumda oksijen taşıma görevi sınırlanmış olabilir. Çünkü ilk oksijen atomunun bağlanmasıyla molekül dönme hareketi yaparak diğer oksijenlerin bağlanmasını katalizler. Hareketin sınırlandırılması bu olayı engelleyebilir.

5.1.3. Magnetitin trietanolamin ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması

Manyetik nanopartiküllerin trietanolamin ile kaplanması aşamasında elde edilen trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin (TEAMNP) karakterizasyonunda FT-IR spektrumundan bazı karakteristik piklerin gözlenmesi beklenmektedir. Bu pikler trietanolaminden kaynaklı alifatik C-H titreşim pikleri ve O-H gerilme pikidir. FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}'de O-H titreşim pikleri gözlenmiştir. Bu pik, manyetik nanopartiküller üzerine kaplanmış olan trietanolamine ait serbest iki adet alkol grubundaki O-H piki olmasına karşın Fe_3O_4 etrafındaki OH tabakasından da kaynaklanmaktadır (71, 101). Ancak TEAMNP spektrumunda oluşan O-H piki daha geniş ve belirgindir. Mnp'de olduğu gibi Fe-O gerilme piki 590 cm^{-1}'de çıkmıştır (71,75,76). Bu mnp ile karşılaştığında daha yüksek bir frekansta görülmüştür. Bu etkinin nedeni trietanolaminin bağlanması ile oluşan Fe-O-R yapısında bağlanmış olan trietanol amindeki OH grubunun elektron çekici grup olmasıdır. Elektron çekici grubun varlığı oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğunun azalmasına neden olur. Böylece Fe-O bağı kısalır ve bağ kısaldıkça bağın uyarılması için gereken enerjinin artmasına neden olur. Enerjinin artması dalga boyunu azaltır, dalga boyu ile frekans ters orantılı olduğundan frekans artar (42,80). Mnp ve TEAMNP'nin FT-IR spektrumları incelendiğinde bu etki görülmektedir.

TEAMNP'ye ait XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir. Bu verilerden yararlanarak Fe_3O_4 kristal örgüsünün spinel yapıda kaldığı sonucuna varılmıştır (71,74,75). Tartarik asit ile kaplamada olduğu gibi manyetik nanopartiküllerin trietanolamin ile kaplanması sonrası temel piklerindeki kaymalar kristal örgüdeki atomların konumlarının, açılarının ve

aralarındaki etkileşimlerin değişmesinden kaynaklanmaktadır (79). Bu bilgilerden yola çıkılarak manyetik nanopartiküllerin trietanolamin ile kaplandığını ve mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplama işlemi sırasında hiç bozulmadan kaldığı söylenebilir. Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır (101). Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22,6 nm olarak hesaplanmıştır.

TEAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın azaldığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Trietanolamin kaplamasındaki alkol gruplarının birbirlerini itme eğilimlerinden dolayı manyetik nanopartiküllerde topaklanma azalmıştır. XRD piklerin sağa doğru kayması şeklindeki değişimler de, mnp'nin yüzeyinin kaplandığını ve topaklanmanın azaldığını göstermektedir. C-TEM ve XRD'den elde edilen veriler incelendiğinde, partiküllerin, süperparamanyetiklik için kritik boyut olan 50 nm'den küçük olduğu ve süperparamanyetik özelliğini koruduğu söylenebilir. Bu veriler manyetik nanopartiküllerin kaplama sonrası geometrik şeklini koruduğunu ve hala spinel geometride olduğunu göstermektedir. C-TEM görüntülerinden, nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının farklı olduğu görülmektedir. Bu manyetik nanopartiküllerin kullanılabilirlikleri açısından büyük avantaj sağlamaktadır.

TEAMNP'nin SEM görüntülerinden, kaplama sonucunda nanopartiküllerin küresel yapısının bozulmadığı ve topaklanmanın çok az olduğu görülmektedir. Topaklanan her bir kümenin yaklaşık olarak 20-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. EDX verilerinden manyetik nanopartiküllerin trietanol amin ile kaplandığı sonucuna varılmıştır. EDX verilerinden, $3{,}3x10^{-4}$ mol trietanol amin/1 g mnp olacak şekilde kaplamanın gerçekleştiği söylenebilir.

TEAMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin trietanolamin kaplandığı açık bir şekilde görülmektedir.

Trietanolamin kaplı manyetik nanopartiküllerin (TEAMNP) Hb immobilizasyonu için aldehit veya keton grupları içermesi gerekmektedir. Çünkü manyetik nanopartiküllere immobilizasyon işlemi, Fe_3O_4 yüzeyindeki aldehit veya keton grubu ile hemoglobindeki primer amin gruplarının Schiff bazı (azometin) oluşturarak bağlanması sonucu gerçekleşir. Bu nedenle manyetik nanopartikül yüzeyinde fonksiyonel grup değişimi ile alkol gruplarının aldehit yükseltgenmesi gerekir. Primer alkol gruplarının aldehit yerine karboksilik aside yükseltgenmesini

engellemek için yükseltgenme ajanı olarak PCC kullanılmıştır. TEAMNP'de iki adet primer alkol grubu mevcuttur ve TEAMNP'nin PCC ile muamelesi sonucu primer alkol grupları aldehite yükseltgenmiştir. Elde edilen aldehit manyetik nanopartiküllerin (TEALMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3000-3650 cm^{-1}'de O-H titreşim pikleri çıkmıştır. Parmak izi bölgesinde de yine O-H gerilme piki 1403 cm^{-1}'de çıkmıştır. Bu iki pik de mnp etrafında oluşan OH tabakasından kaynaklanmaktadır. Ancak bu iki pik de TEAMNP'nin OH pikine göre daha zayıf piklerdir. Bu pikteki zayıflama alkol gruplarının yükseltgenmesinden kaynaklanmaktadır. Mnp, TEAMNP'de olduğu gibi Fe-O piki 588 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Fe-O titreşim piki TEAMNP'e göre daha düşük dalga sayısında görünmektedir (71,75,76). Dalga sayılarındaki (frekans) bu azalmanın nedeni fonksiyonel grup değişimleridir. Yükseltgenme sonucu alkol grupları kendinden daha elektrofil olan aldehitlere yükseltgenmiştir. Elektrofil özellik arttığından Fe-O-R-C=O yapısındaki oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğu azalır. Bu da Fe-O bağının kısalmasına neden olur. Bağın kısalması enerjinin artmasına dolayısıyla dalga sayısının azalmasına neden olur (42,80,85,86). Nitekim TEAMNP'de Fe-O bağı 590 cm^{-1}'de gözlenirken, TEALMNP'de 588 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Yeni oluşan aldehit yapısından beklendiği gibi C=O piki, 1630 cm^{-1}'de gözlenmiştir (71).

Aldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin (TEALMNP) XRD spektrumu incelendiğinde beklendiği gibi Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir (38,71,75,76). Elde edilen temel pikler Fe_3O_4 kristal örgüsünün spinel yapıda kaldığını ve bozulmadığını göstermektedir. TEAMNP'nin yüzey morfolojisinin modifikasyon işlemleri sırasında hiç bozulmadan kaldığı sonucuna varılabilir. Yüzey modifikasyonu sonrasında temel piklerde sağa doğru kaymalar gözlenmiş, bunun kristal örgüdeki atomların konumlarının, açılarının ve aralarındaki etkileşimlerin değişmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır[79]. Partikül boyutu, temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22.7 nm olarak hesaplanmıştır.

TEALMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın azaldığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Yeni oluşan aldehit gruplarının birbirini itmesi topaklanmanın azalmasına neden olmuştur. Nanopartiküllerin tanecik boyutunun 10-50 nm aralığında değiştiği ve süperparamanyetik özelliğini koruduğu söylenebilir. Her bir nanopartikül kümesinin

boyutunun 20-100 nm aralığında olduğu C-TEM görüntülerinden görülebilmektedir. C-TEM ve SEM görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının farklı olduğu görülmektedir.

TEALMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde yüzey modifikasyonu sonucunda nanopartiküllerin küresel yapının bozulmadığı ve topaklanmanın azaldığı görülmektedir. Topaklanan her bir kümenin yaklaşık olarak 20-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. SEM görüntülerinden ortalama partikül büyüklüğü 38,01 nm olarak hesaplanmıştır. SEM ve XRD boyut analizleri arasındaki fark XRD analizde kullanılan madde miktarının çok olması sebebiyle geneli ifade etmesi ancak SEM'in sadece küçük bir bölgeyi analiz ederek yalnızca o bölgenin sonuçlarını vermesindendir. XRD sonucunda elde edilen değerler gerçek değerlere daha yakındır. EDX verilerinden manyetik nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarının gerçekleştiği sonucuna varılmıştır.

TEALMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde alkol kaplı manyetik nanopartiküllerin alkol gruplarının, aldehit gruplarına yükseltgeme işleminin gerçekleştirildiği açık bir şekilde görülmektedir.

Manyetik nanopartiküllere trietanol amin bağlanması ve alkol gruplarının yükseltgenmesi sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TEALMNP) Hb molekülleri bağlanmıştır. Bu aldehit gruplarına bağlanan hemoglobinler, tartarik asitte olduğu gibi yapılarında bulunan aldehit grupları ile Hb zincirlerindeki asparajin, glutamin, lisin ve arjinin aminoasitlerindeki amin gruplarına Schiff bazı oluşturarak bağlanmaktadır. Elde edilen trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül destekli hemoglobinlerin (TEALMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde bağlandığı destekten tamamen farklı bir spektrum elde edildiği görülmektedir. FT-IR spektrumu incelendiğinde, literatürde karşılaşılan ve saf hemoglobinlerden elde edilen FT-IR spektrumu ile benzer olduğu görülmüştür (82). 3000-3600 cm^{-1}'de gözlenen yayvan ve şiddetli pik yapıdaki O-H gruplarının varlığını göstermektedir. Bu OH pikleri Hb molekülündeki alkollerden kaynaklanmakla birlikte temel olarak aminoasitlerin yapısındaki ve molekülün merkezinde bulunan *hem* grubundaki karboksilik asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu pikin hemoglobinin bağlandığı destek malzemesindeki OH gerilme pikinden çok daha şiddetli olması nedeniyle hemoglobindeki karboksilik asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. 3050-3100 cm^{-1}'de gözlenen pik, fenilalanin,

triptofan, trosin ve histidinden kaynaklı aromatik halkanın C-H titreşim pikidir. 585 cm^{-1}'de gözlenen pik manyetik nanopartiküllerdeki Fe-O titreşiminden kaynaklanan piktir. Hb ve trietanol aminden kaynaklanan alifatik C-H titreşim pikleri beklendiği gibi 2917 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Hemoglobindeki temel taşlardan biri olan aminoasitlerin yapısından kaynaklanan temel gruplardan biri olan karboksilik asitteki C=O grubu 1633 cm^{-1}'de gözlenmiştir. FT-IR spektrumundan elde edilen sonuçlara göre yapıda OH ve C=O bağının her ikisinin birden bulunması yapıda karboksilik asidi dolayısıyla Hb varlığını göstermektedir. Hb, destek malzemesine Schiff bazı yani C=N bağı oluşturarak bağlanmaktadır. C=N bağı 1522 cm^{-1}'de kuvvetli bir pik şeklinde gözlenmiştir. Bu pikin diğer bir kaynağı da hemoglobinin ***hem*** grubundaki C=N bağıdır. Bu verilerden yola çıkarak Hb molekülünün manyetik nanopartiküllere bağlandığı söylenebilir.

Manyetik nanopartiküllere trietanal amin bağlanması sonucu elde edilen aldehit gruplarına (TEALMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin hemen sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 540,37 ve 578,47 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (38). Bu pikler incelendiğinde hemoglobinin oksihemoglobin formunda olduğu söylenebilir. Çünkü oksihemoglobin 540,37 ve 578,47 nm'de iki karakteristik pik verir. Bu bilgiler ışığında hemoglobinin bağlandıktan sonra işlevini kaybetmediği söylenebilir. Bağlanma işleminden 3 hafta sonra yapılan UV-Vis ölçümlerinde elde edilen spektrumlar incelendiğinde aynı yerlerde pikler verdiği gözlenmiştir. Bağlanmamış haldeki hemoglobinin 3 hafta sonundaki spektrumu incelendiğinde ise bu iki pikin kaybolması ve methemoglobin ile aynı şekilde spektrum vermesi, manyetik nanopartiküle Hb bağlanmasının stabiliteyi artırdığı göstermektedir.

TEALMNP-Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde benzer şekilde Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. Bu veriler, kaplama, bağlanma ve modifikasyon işlemleri sonrası manyetik nanopartiküllerin kristal örgüsünü koruduğu ve spinel yapıda kaldığı göstermektedir[71]. Partikül boyutu temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden 27,1 nm olarak hesaplanmıştır. Bu da Hb bağlanması sonucu tanecik büyüklüğünün artış gösterdiği söylenebilir.

TEALMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde tanecik boyutunun XRD'den elde edilen boyutla uyumlu olduğu görülmüştür. TEALMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde bağlı olan hemoglobinler açıkça görülmektedir. TEALMNP

ile TEALMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri karşılaştırıldığında, hemoglobinin bağlanmasından sonra destek malzemesine nazaran topaklanma olduğu ancak bu topaklanan partiküllerin daha çok organik kısımlardan yani hemoglobinlerden meydana geldiği söylenebilir. Partikül kümelerinin de yaklaşık olarak 50-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu görüntülerden görülmektedir. Her bir nanopartikülün etrafındaki organik tabakanın kalınlığındaki farklılıktan yola çıkarak, her nanopartiküle eşit sayıda Hb bağlanmadığı söylenebilir.

TEALMNP-Hb'nin SEM görüntüleri incelendiğinde, Hb moleküllerinin trietanal amin kaplı manyetik nanopartikül destek malzemesine bağlandığı açık bir şekilde görülmektedir. TEALMNP'nin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında, küresel yapıda ancak destek malzemesine göre daha hacimli Hb kaplı manyetik nanopartiküllerin varlığı görülmektedir. TEALMNP ve TEALMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında elementel analiz sonuçlarındaki C atomu miktarındaki fark hemoglobinden kaynaklandığı, destek malzemesinde daha önce var olmayan ve aminoasitlerin temel gruplardan biri olan amin grubundan kaynaklanan N atomunun verilerinin elde edilmesinden yola çıkılarak, destek malzemesine hemoglobinlerin bağlandığı sonucuna varılmıştır.

TEALMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg TEALMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış olan süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler en az 3 tekrarlı döngü şeklinde gerçekleştirilmiştir. Voltogramlar incelendiğinde, hemoglobinin ***hem*** bölgesinin merkezinde bulunan demir atomunun Fe(III)/Fe(II) indirgenme ve yükseltgenme reaksiyonları görülmektedir. Hb molekülü, oksijen alarak Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde pik vermiştir. Hemoglobinin aldığı oksijenleri vererek -0,142 V anodik potansiyelde pik vermiştir. Buna göre anodik ve katodik pil potansiyelleri arasındaki fark 0,276 V'tur, bu da hızlı bir elektron transferi olduğunu göstermektedir (83,84). Formal potansiyel -0,2815 V olarak hesaplanmıştır (84). Anodik ve katodik reaksiyonlara ait pikler neredeyse simetrik ve eşit akıma sahiptir. Bu verilerden yola çıkılarak, hemoglobinlerin negatif tarama sırasında elektron alarak indirgendiği ve pozitif tarama yapıldığında verdiği kadar potansiyeli geri alarak tamamen yükseltgendiği söylenebilir (83). Aynı çözelti içerisinde yapılan tekrarlarda voltogramların birebir aynı olduğu gözlenmiştir, bu da demir atomunun Fe(III)/Fe(II)

dönüşümünün sürekli olduğunu göstermektedir. Bu durum Hb molekülünün işlevsel olarak değişmediğinin göstergesidir. Sadece destek malzemesini (TEALMNP) içeren süspansiyonun CV'si incelendiğinde, beklenildiği gibi herhangi bir pik elde edilmemesi, TEALMNP'de redoks tepkimesinin gerçekleşmediğini göstermektedir. Sadece hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. TEALMNP-Hb'nin anodik ve katodik potansiyeli pikleri hemoglobinden elde edilen piklerden daha yüksektir. Bu, immobilizasyon sonrası hemoglobinin neredeyse hiç değişmeden kaldığı söylenebilir (83). Bunun diğer bir nedeni ise, eşit hacimde artan Hb miktarı olarak gösterilebilir.

TEALMNP-Hb'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde trietanal amin kaplı manyetik nanopartiküllere Hb moleküllerinin bağlandığı söylenebilir.

Teorik olarak partikül başına düşen Hb sayısı, moleküller arasında herhangi bir sterik engelin olmadığı ideal şartlar için geçerli bir durumdur. 111 Hb molekülünün bir partiküle bağlanması durumunda, partikül yüzeyi olduğu gibi hemoglobinle kaplanmış olur. Önceki durumdakine benzer olarak oksijen taşıma görevi sınırlanmış olacaktır. Çünkü ilk oksijen atomunun bağlanmasıyla molekül dönme hareketi yaparak diğer oksijenin bağlanmasını katalizler. Hareketin sınırlandırılması bu olayı engeller.

5.1.4. Magnetitin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması, modifikasyonu ve hemoglobin bağlanması

Manyetik nanopartiküller çok küçük boyutlarda üretilmesine karşın kullanımında karşılaşılan en büyük sorun topaklanmadır. Buna engel olmak için bazı kimyasal işlemler yapılmaktadır. Bu kimyasal işlemlerin başında da 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplama gelmektedir (75). Manyetik nanopartiküllerin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması aşamasında elde edilen 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin (3APMNP) karakterizasyonunda FT-IR spektrumundan bazı karakteristik piklerin gözlenmesi beklenmektedir. Bu pikler başlıca 3-(Aminopropil) trimetoksisilanın manyetik nanopartiküllere bağlanması ile oluşan Fe-O-Si bağının titreşim pikleri ve C-H titreşim pikidir. FT-IR spektrumu incelendiğinde Fe-O-Si titreşim piki 1634 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Parmak izi bölgesinde de yine Fe-O-Si piki 1049 cm^{-1}'de gözlenmiştir (75). Bu pikler 3-(Aminopropil)

trimetoksisilanın manyetik nanopartiküller üzerine kimyasal bağ yaparak bağlandığını gösterir. Ancak burada dikkat edilmesi gereken husus 3-(Aminopropil) trimetoksisilanın bağlanması sırasında hidrolize olarak metoksi gruplarının ayrılması ve silisyum atomu üzerinden magnetite bağlanmasıdır (76). 3-(Aminopropil) trimetoksisilanın kaplı manyetik nanopartiküllerin (3APMNP) spektrumunda elde edilen diğer bir pik ise alifatik C-H titreşim pikleridir. Bu pik mnp'nin 2975 cm^{-1} de titreşim ve 1110 cm^{-1}'de gerilme piki şeklinde görülmüştür. Mnp ile benzer şekilde Fe-O gerilme piki 586 cm^{-1}'de çıkmıştır (71,75,76,86). Bu pik mnp ile karşılaştığında daha düşük bir dalga sayısında görülmüştür. Pik kaymasının nedeni 3-(Aminopropil) trimetoksisilanın bağlanması ile oluşan Fe-O-Si-R yapısında bağlanmış olan grubun elektron sağlayıcı grup olmasıdır. Elektron sağlayıcı grubun varlığı oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğunun artmasına neden olur. Böylece Fe-O bağı uzar ve bağ uzadıkça bağın uyarılması için gereken enerjinin azalmasına neden olur. Enerjinin azalması dalga boyunu artırır bu da frekans ile ters orantılı olduğundan frekans düşer (71,75,80,86). Mnp'de Fe-O piki 590 cm^{-1}'de gözlenirken, 3APMNP'de 586 cm^{-1}'de gözlenmiştir.

3APMNP'ye ait XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait altı temel pik gözlenmiştir. Bu pikler; 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleridir (71,75,76,86). Bu veriler 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplamasının Fe_3O_4 kristal örgüsünü değiştirmediği ve spinel yapıda kaldığını göstermektedir (75). Mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplama işlemleri sırasında hiç bozulmadan kaldığı söylenebilir. Yüzey kaplama sırasında Fe_3O_4'e ait temel piklerde sağa doğru kayma olmuş ve bu kaymaların kristal örgüdeki atomların konumlarının, açılarının ve aralarındaki etkileşimlerin değişmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (79). Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 22,8 nm olarak hesaplanmıştır.

3APMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak daha az topaklanma olduğu ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olarak 10-50 nm aralığında değiştiği ve hala süperparamanyetik özelliğini koruduğu söylenebilir. 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplaması yapıldıktan sonra mnp yüzeyinin en uç kısımlarında amin grupları yer alır. Bu amin grupları arasında zayıf moleküller arası itme kuvvetleri topaklanmanın azalmasını sağlamaktadır. Her bir nanopartikül kümesinin boyutunun 50-200 nm aralığında olduğu C-TEM

görüntülerinden görülmektedir. C-TEM ve SEM görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının farklı olduğu görülmektedir.

3APMNP'nin SEM görüntülerinden, nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplandığı görülmektedir. Görüntülerden topaklanmanın az olduğu ve her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. Görüntülerdeki nanopartikül boyutları, XRD ve C-TEM verileri ile uyumludur.

3APMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplandığı açık bir şekilde görülmektedir.

3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerinin (3APMNP), en uç kısmında amin grupları bulunur. Bu amin grupları yardımıyla hemoglobinin yüzeye immobilzasyonu için hemoglobinde aldehit veya keton gruplarının bulunması gerekmektedir. Ancak hemoglobinin yapısı incelendiğinde aldehit ve keton gruplarından ziyade amin gruplarının çok daha fazla bulunduğu söylenebilir. Bu nedenle, 3APMNP yüzeyinde aldehit gruplarının oluşturulması ve immobilizasyonda kullanımında glutaraldehit tercih edilmiştir. Çünkü manyetik nanopartiküllere immobilizasyon işlemi, Fe_3O_4 yüzeyindeki aldehit veya keton grubu ile hemoglobindeki primer amin gruplarının Schiff bazı (azometin) oluşturarak bağlanması sonucu gerçekleşir. Elde edilen aldehit manyetik nanopartiküllerin (3APGAMNP) FT-IR spektrumu incelendiğinde başlıca gözlenen pikler; 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerde oluşan Fe-O-Si bağının titreşim pikleri, Schiff Bazından kaynaklı C=N titreşim piki, glutaraldehitteki aldehitten kaynaklı C=O piki ve C-H titreşim pikidir. FT-IR spektrumu incelendiğinde Fe-O-Si ve C=O titreşim pikleri 1665 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Parmak izi bölgesinde 1091 cm^{-1}'de gözlenen pik C-O varlığının bir göstergesidir (71). Bu pik aynı zamanda Fe-O-Si pikine de aittir (75). Bu pik Fe-O-Si ve C-O piklerinin üst üste çakışmasıyla oluşmuştur. Bu pik 3APMNP'deki Fe-Si-O pikine göre daha şiddetli görülmektedir. Bu pikler göz önünde bulundurulduğunda glutaraldehitin, 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküller üzerine Schiff Bazı oluşturarak bağlandığını gösterir. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin (3APGAMNP) spektrumunda elde edilen diğer bir pik ise 3001 cm^{-1} cm^{-1}'de gözlenen alifatik C-H titreşim pikleridir. 3APMNP ile benzer şekilde Fe-O gerilme piki 593 cm^{-}

^{1}'de çıkmıştır. 3APMNP'den farklı olarak glutaraldehit ve 3APMNP'nin bağlanması sonucu oluşan Schiff bazına ait C=N titreşim pikidir. Bu pik literatürle uyumlu şekilde 1553 cm^{-1}'de çıkmıştır (71,75,76,86).

3APGAMNP'nın XRD spektrumu incelendiğinde beklendiği gibi Fe_3O_4'e ait 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleri gözlenmiştir (71,75,86). Bu veriler, Fe_3O_4 kristal örgüsünün yüzey modifikasyonundan etkilenmediğini ve spinel yapıda olduğunu göstermiştir (75). Glutaraldehit ile yüzey modifikasyonu sırasında XRD'de Fe_3O_4'e ait temel piklerin sağa doğru kaydığı ve bu kaymaların kristal örgüdeki atomların konumlarının, açılarının ve aralarındaki etkileşimlerin değişmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (79). Partikül boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden hesaplanmıştır. Boyut için temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılmıştır. Buna göre tanecik boyutu 23,3 nm olarak hesaplanmıştır.

3APGAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın çok az olduğu ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu bir şekilde 10-50 nm aralığında olduğu görülmektedir. Elde edilen nanopartikül kümelerinin boyutları 50-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. Bu verilerden yola çıkarak nanopartiküllerin hala süperparamanyetik özellik gösterdiği söylenebilir. C-TEM ve SEM görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının farklı olduğu görülmektedir.

3APGAMNP'ye ait SEM görüntüleri incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin yüzeylerindeki kaplanan tabakanın etkisiyle topaklanmanın az olduğu ve her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu görülmektedir. Tanecik boyutu, ortalama 38,6 nm olarak hesaplanmıştır. Görüntülerdeki nanopartiküllerin boyutları, XRD ve C-TEM verileri ile uyumludur. 3APGAMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler 3-(Aminopropil) trimetoksisilan kaplı manyetik nanopartiküllerin (3APMNP) amin gruplarına glutaraldehitin Schiff Bazı oluşturarak bağlandığı açık bir şekilde görülmektedir. 3APMNP ve 3APGAMNP'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında, elementel analiz sonuçlarında temel olarak C atomu miktarındaki fark bağlanmış olan glutaraldehitten kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna bağlı olarak silisyum, demir ve oksijen miktarındaki orantısal azalış da glutaraldehit bağlandığını desteklemektedir.

Manyetik nanopartiküllere 3-(Aminopropil) trimetoksisilan bağlanması ve glutaraldehit ile modifikasyon sonucu elde edilen aldehit gruplarına (3APGAMNP) Hb molekülleri bağlanmıştır. Bu aldehit gruplarına bağlanan hemoglobinler, tartarik asit ve trietanol aminde olduğu gibi glutaraldehitten gelen aldehit grupları ile Hb zincirlerindeki asparajin, glutamin, lisin ve arjinin aminoasitlerindeki amin gruplarına Schiff bazı oluşturarak bağlanmaktadır. Elde edilen 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlanmış hemoglobinlerin (3APGAMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde 3APGAMNP'den tamamen farklı ve hemoglobine benzer bir spektrum elde edildiği görülmektedir. FT-IR spektrumu incelendiğinde, literatürde karşılaşılan ve saf hemoglobinlerden elde edilen FT-IR spektrumu ile benzer olduğu görülmüştür (82). 3000-3600 cm^{-1}'de gözlenen yayvan ve şiddetli pik, 3APGAMNP-Hb yapısındaki O-H gruplarının varlığını göstermektedir. Bu OH pikleri, Hb molekülündeki aminoasitlerin yapısındaki alkollerden kaynaklanmakla birlikte temel olarak molekülün merkezinde bulunan ***hem*** grubundaki karboksilik asitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir (9). 3054 cm^{-1}'de gözlenen pik, fenilalanin, triptofan, trosin ve histidinden kaynaklı aromatik halkanın C-H titreşim pikidir. 587 cm^{-1}'de gözlenen pik manyetik nanopartiküllerdeki Fe-O titreşiminden kaynaklanan piktir. Hb ve 3APGAMNP'den kaynaklanan alifatik C-H titreşim pikleri 2913 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Aminoasitlerin yapısındaki temel gruplardan biri olan karboksilik asitteki C=O grubu 1639 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, yapıda OH ve C=O gruplarının her ikisinin birden bulunması yapıda karboksilik asidi yani Hb varlığını göstermektedir. Hb, 3APGAMNP'ye Schiff bazı yani C=N bağı oluşturarak bağlanmaktadır. Hemoglobinin ***hem*** grubunda da C=N bağı mevcuttur. Bu her iki kaynaktan gelen C=N bağı 1531 cm^{-1}'de kuvvetli bir pik şeklinde gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak Hb molekülünün 3APGAMNP'ye bağlandığı söylenebilir.

Manyetik nanopartiküllere 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanması ve glutaraldehit ile modifiye edilmesiyle elde edilen manyetik nanopartiküllerdeki aldehit gruplarına (3APGAMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin hemen sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde 539,72 ve 577,18 nm'de iki karakteristik pik vermiştir (38). Bu pikler Hb'in oksihemoglobin formunda olduğunu göstermektedir. Çünkü 3APGAMNP-Hb 'nin bu pikleri oksihemoglobin 540,37 ve

578,47 nm'de iki karakteristik pikiyle örtüşmektedir. Bu bilgiler ışığında hemoglobinin bağlandıktan sonra işlevini kaybetmediği söylenebilir. Bağlanma işleminden 3 hafta sonra yapılan UV-Vis ölçümlerinde elde edilen spektrumlar incelendiğinde aynı pikleri verdiği gözlenmiştir. Bağlanmamış haldeki hemoglobinin 3 hafta sonundaki spektrumu incelendiğinde ise bu iki pik kaybolmuş ve methemoglobin ile aynı şekilde spektrum vermiştir. Bu bilgiler manyetik nanopartiküle Hb bağlanmasının stabiliteyi artırdığı göstermektedir.

3APGAMNP -Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. Bu veriler, kaplama, modifikasyon ve bağlanma işlemleri sonrası manyetik nanopartiküllerin kristal örgüsünü koruduğu ve spinel geometride kaldığı göstermektedir (71). 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden partikül boyutu 25,3 nm olarak hesaplanmıştır. Hb bağlanması sonucu tanecik büyüklüğünün artış göstermiştir.

3APGAMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde bağlı olan hemoglobinler görülmektedir. 3APGAMNP ile 3APGAMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri karşılaştırıldığında, hemoglobinin bağlanmasından sonra destek malzemesine nazaran topaklanma olduğu ancak bu topaklanan partiküllerin daha çok organik kısımlardan yani hemoglobinlerden meydana geldiği söylenebilir. 3APGAMNP-Hb, 3APGAMNP'e göre daha hacimli olduğu görüntülerden anlaşılmaktadır. Partikül kümelerinin de yaklaşık olarak 100-200 nm boyutlarında kümeler oluşturduğu görülmektedir. Hb bağlı önceki mnp'lerde olduğu gibi 3APGAMNP-Hb'de de bir nanopartikülün etrafındaki organik tabakanın kalınlığı farklılık göstermektedir ve buradan yola çıkarak, her nanopartiküle eşit sayıda Hb bağlanmadığı söylenebilir.

3APGAMNP-Hb'nin SEM görüntüleri incelendiğinde, Hb moleküllerinin 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere bağlandığı görülmektedir. 3APGAMNP'nin SEM görüntüleri ile karşılaştırıldığında, küresel yapıyı koruduğu ancak destek malzemesine göre daha hacimli olan Hb kaplı manyetik nanopartiküllerin varlığı açıkça görülmektedir. 3APGAMNP ve 3APGAMNP-Hb'ye ait EDX verileri karşılaştırıldığında, elementel analiz sonuçlarında temel olarak C atomu miktarındaki farkın hemoglobinden kaynaklandığı düşünülmektedir. 3APGAMNP'de daha önce var

olmayan ve aminoasitlerin temel gruplardan biri olan amin grubundan kaynaklanan N atomunun elementel analiz sonucunda elde edilmesinden yola çıkılarak, destek malzemesine hemoglobinlerin bağlandığı sonucuna varılmıştır.

3APGAMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg 3APGAMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Ölçümler en az 3 tekrarlı döngü ve ters döngü alınarak gerçekleştirilmiştir. Voltogramlar incelendiğinde, hemoglobinin dört *hem* bölgesinin merkezinde bulunan demir atomlarında, Fe(III)/Fe(II) indirgenme ve yükseltgenme tepkimeleri görülmektedir. Hb molekülü, Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,398 V katodik potansiyelde yükseltgenme piki vermiştir. Bu pik demir atomuna oksijenin bağlanması basamağı olduğu açıkça görülmektedir. Hemoglobin yükseltgenme ile aldığı oksijenleri vererek -0,136 V anodik potansiyelde pik vermiş ve Fe(II) formuna indirgenmiştir. Bu verilere göre anodik ve katodik pil potansiyelleri arasındaki fark 0,262 V'tur, bu da hızlı bir elektron transferi olduğuna işarettir (83,84). Formal potansiyel -0,267 V olarak hesaplanmıştır (84). Anodik ve katodik tepkimelere ait pikler neredeyse simetrik ve eşit akıma sahiptir. Bu verilerden yola çıkılarak, hemoglobinlerin negatif tarama sırasında elektron alarak indirgendiği ve pozitif tarama yapıldığında verdiği kadar potansiyeli geri alarak tamamen yükseltgendiği söylenebilir (83). Aynı çözelti içerisinde yapılan tekrarlarda voltogramların üst üste çakışması, demir atomunun Fe(III)/Fe(II) dönüşümünün sürekli olduğunu göstermektedir. Sadece 3APGAMNP içeren süspansiyonun CV'si incelendiğinde herhangi bir pik elde edilememiştir. Destek malzemesinde redoks tepkimesi verebilecek metallerin olmayışından dolayı herhangi bir pike rastlanmamıştır. Saf Hb'i içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. 3APGAMNP-Hb'nin anodik ve katodik potansiyeli pikleri saf hemoglobinin pikleri ile neredeyse eşittir. Bu, immobilizasyon sonrası hemoglobinin neredeyse hiç değişmeden kaldığı söylenebilir (83).

3APGAMNP-Hb'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ile kaplanmış, glutaraldehit ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllere, Hb moleküllerinin bağlandığı söylenebilir.

Teorik olarak partikül başına düşen Hb sayısı, moleküller arasında herhangi bir sterik engelin olmadığı ideal şartlar için geçerli bir durumdur. 98 Hb molekülünün bir partiküle bağlanması durumunda, partikül yüzeyi olduğu gibi hemoglobinle kaplanmış olur. Bu durumda oksijen taşıma görevi sınırlanmış olacaktır. Çünkü ilk oksijen atomunun bağlanmasıyla molekül dönme hareketi yaparak diğer oksijenin bağlanmasını katalizler. Hareketin sınırlandırılması bu olayı engeller.

5.1.5. Magnetitin glutaraldehit ile kaplanması ve hemoglobin bağlanması

Manyetik nanopartiküller yüzeylerinde Hb'ye bağlanabilecek nitelikte bir fonksiyonel grup bulundurmadıklarından doğrudan Hb immobilizasyonu yapılamamaktadır. Ayrıca Fe_3O_4 yapısındaki demir atomlarının indirgenmesini engelleyip süper paramanyetik özelliğini korumasını sağlamak için yüzeyleri glutaraldehit ile kaplanmıştır. Glutaraldehitin seçilmesinin nedeni iki ucunun aldehit olması, bu sayede bir ucu mnp'ye bağlı iken diğer ucuna Schiff bazı eldesi ile hemoglobinin bağlanabilmesidir. Diğer bir neden ise topaklanma eğiliminde olan magnetit nanopartiküllerinin etrafının birbirini iten gruplarca kaplanmasıdır. Bu nedenlerden dolayı manyetik nanopartiküller glutaraldehit ile kaplanmıştır. Kaplama esnasında iki faz oluşmuştur; su fazı ve köpük fazı. Köpük fazı su içerisinde hiçbir şekilde karışmazken (çalkalama, ısıtma, soğutma vb.), köpük fazı ayrılıp üzerine aseton eklendiğinde homojen bir şekilde karıştığı görüldü. Yıkama işlemleri aseton ile yapıldı. Su fazı ise su ve ardından aseton ile yıkanıp kurutuldu. Çalışmalar köpük fazı üzerinden devam ettirilmiştir. Glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllerin (GAMNP) FT-IR spektrumları incelendiğinde beklenen piklerin çıktığı görülebilmektedir. Diğer yöntemlerde olduğu gibi magnetit yüzeyi OH tabakası ile kaplanmıştır. Bu 3000-3600 cm^{-1}'deki yayvan pikten yola çıkarak söylenebilir. Bunun yanı sıra parmak izi bölgesinde 1403 cm^{-1}'deki pik de bunu desteklemektedir. GAMNP'den beklenen en önemli piklerden biri de fonksiyonel grup bölgesinde ki aldehite ait C=O pikidir. Keza 1603 cm^{-1}'de beklenen bu pik görülebilmektedir (71). Mnp yüzeyinin kaplaması sonucu yüzeye alifatik karbon içeren glutaraldehit molekülleri bağlanmıştır. Alifatik C-H gruplarının görülmesi beklenen yerden biri de parmak izi bölgesinde 1139 cm^{-1}'deki pikidir. Bütün magnetit yapı içeren maddelerde olduğu gibi Fe-O gerilme piki 589 cm^{-1}'de çıkmıştır. Bu pik mnp ile karşılaştığında daha düşük bir dalga sayısında

görülmüştür. Pik kaymasının nedeni glutaraldehit bağlanması ile oluşan Fe-O-R yapısında bağlanmış olan grubun elektron çekici grup olmasıdır. Elektron çekici grubun varlığı oksijen atomu üzerindeki elektron yoğunluğunun azalmasına neden olur. Böylece Fe-O bağı uzar ve bağ uzadıkça bağın uyarılması için gereken enerjinin azalmasına neden olur. Enerjinin azalması dalga boyunu artırır bu da frekans ile ters orantılı olduğundan frekans düşer (71,75,77,86). Mnp ve GAMNP'nin FT-IR spektrumları incelendiğinde beklendiği gibi GAMNP'nin Fe-O dalga sayısının daha düşük olduğu görülmektedir.

Fe_3O_4'e ait altı temel piki de GAMNP'nin XRD spektrumunda görülebilmektedir. Bu pikler; 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 karakteristik pikleridir (71,75,85,86). Bu verilerden yola çıkarak Fe_3O_4 kristal örgüsünün glutaraldehit ile kaplama esnasında zarar görmediği ve spinel yapıda olduğu sonucuna varılmıştır (75). Mnp'nin kristal örgüsünün yüzey kaplaması işlemleri sırasında hiç bozulmadan kaldığı görülmektedir. Tanecik boyutu Debye-Scherrer eşitliğinden temel pik olan 311 pikinin verileri kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre tanecik boyutu 24,8 nm olarak hesaplanmıştır.

GAMNP'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde mnp'den farklı olarak topaklanmanın olmadığı ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüştür. Glutaraldehit kaplaması yapıldıktan sonra mnp yüzeyine kaplanan glutaraldehitler arasındaki itme kuvvetlerinden dolayı nanotanecikler bireysel şekilde bulunma eğilimindedir. Bu manyetik nanopartiküllerin kullanılabilirlikleri açısından büyük avantaj sağlamaktadır.

GAMNP'nin köpük fazından alınan nanopartiküllerin C-TEM görüntüleri incelendiğinde topaklanmanın çok az olduğu ve tanecik boyutun XRD'den elde edilen verilerle uyumlu bir şekilde 10-50 nm aralığında olduğu görülmektedir. Nanopartiküllerin boyutları incelendiğinde 50 nm'den küçük oldukları için hala süperparamanyetik özellikte oldukları söylenebilir. C-TEM ve SEM görüntüleri incelendiğinde nanopartiküllerin boyutları ve kaplama kalınlıklarının farklı olduğu görülmektedir.

GAMNP'nin SEM görüntülerinden, manyetik nanopartiküllerin yüzeylerinin kaplandığını organik tabakanın varlığından anlaşılmaktadır. Bu görüntülerden topaklanma az olduğu ve her bir nanopartikül kümesinin 100-200 nm aralığında olduğu

görülmektedir. XRD ve C-TEM spektroskopileri ile yapılan 10 ölçümün ortalaması ile uyumlu şekilde boyutların 37,5 nm olduğu belirlenmiştir. Görüntüler incelendiğinde manyetik nanopartiküllere göre topaklanmanın daha az olduğu söylenebilir.

GAMNP'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde manyetik nanopartiküllerin glutaraldehit ile kaplandığı görülmektedir.

Manyetik nanopartiküllere glutaraldehit bağlanması sonucu elde edilen aldehit gruplarına (GAMNP) Hb molekülleri bağlanmıştır. Bu aldehit gruplarına bağlanan hemoglobinler, tartarik asit, 3-(Aminopropil) trimetoksisilan ve trietanol aminde olduğu gibi glutaraldehitteki aldehit grupları ile Hb zincirlerindeki asparajin, glutamin, lisin ve arjinin aminoasitlerindeki amin gruplarına Schiff bazı oluşturarak bağlanmaktadır. Elde edilen glutaraldehit kaplı manyetik nanopartiküllere bağlı hemoglobinlerin (GAMNP-Hb) FT-IR spektrumu incelendiğinde, GAMNP'den farklı, literatürde karşılaşılan ve saf hemoglobine benzer bir spektrum elde edildiği görülmektedir (82). GAMNP-Hb yapısındaki O-H grupları, 3000-3650 cm^{-1}'de yayvan ve şiddetli bir pik şeklinde görülmüştür. Bu OH piki, Hb molekülündeki aminoasitlerin karboksilik asit gruplarındaki OH'lardan kaynaklandığı düşünülmektedir (9). 3050-3100 cm-1'de gözlenen pik, hemoglobinin yapısında bulunan triptofan, histidin, fenilalanin ve trozinden kaynaklı aromatik C-H bağından kaynaklanmaktadır. 559 cm^{-1}'de gözlenen pik, destek malzemesi olan manyetik nanopartiküllerdeki Fe-O titreşiminden kaynaklanan piktir. Organik yapıda olan Hb ve GAMNP'den kaynaklanan alifatik C-H titreşim pikleri 2908 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Aminoasitlerin yapısından kaynaklanan karboksilik asitteki C=O grubu 1633 cm^{-1}'de gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, yapıda OH ve C=O gruplarının her ikisinin birden bulunması yapıda karboksilik asidi yani Hb varlığına işaret etmektedir. Hb, GAMNP'ye Schiff bazı oluşturmasıyla meydana gelen ve hemoglobinin ***hem*** grubunda mevcut olan C=N bağı 1524 cm^{-1}'de kuvvetli bir pik şeklinde gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak Hb molekülünün GAMNP'ye bağlandığı söylenebilir.

Manyetik nanopartiküllere glutaraldehit kaplanmasıyla elde edilen manyetik nanopartiküllerdeki aldehit gruplarına (GAMNP), Hb bağlanmasıyla elde edilen malzemenin hemen sonrasındaki UV-Vis spektrumu incelendiğinde, 542,30 ve 575,89 nm'de hemoglobinin oksihemoglobin formunda olduğunu gösteren iki karakteristik pik vermiştir. Çünkü GAMNP-Hb 'nin bu pikleri oksihemoglobin 540,37 ve 578,47 nm'de

iki karakteristik pikiyle örtüşmektedir. Bu bilgiler ışığında hemoglobinin bağlandıktan sonra işlevini kaybetmediği söylenebilir (38). Bağlanma işleminden 3 hafta sonra yapılan UV-Vis ölçümlerinde elde edilen spektrumlar incelendiğinde aynı pikleri verdiği gözlenmiştir. Bağlanmamış haldeki hemoglobinin 3 hafta sonundaki spektrumu incelendiğinde ise bu iki pik kaybolmuş ve methemoglobin ile aynı şekilde spektrum vermiştir. Bu bilgiler manyetik nanopartiküle Hb bağlanmasının stabiliteyi artırdığı göstermektedir.

GAMNP-Hb'nin XRD spektrumu incelendiğinde destek malzemesi olan Fe_3O_4'e ait karakteristik 220, 311, 400, 422, 511 ve 440 pikleri gözlenmiştir. Bu verilerden yola çıkarak, glutaraldehit ile kaplama ve Hb bağlanma işlemleri sonrası manyetik nanopartiküllerin kristal örgüsünü koruduğu ve spinel geometride olduğunu göstermektedir (71). 311 pikinin verileri kullanılarak Debye-Scherrer eşitliğinden partikül boyutu 26,2 nm olarak hesaplanmıştır. Hb bağlanmasından kaynaklı olarak tanecik büyüklüğünde artış gözlenmiştir.

GAMNP-Hb'nin C-TEM görüntüleri incelendiğinde bağlı olan hemoglobinlerin varlığı, manyetik nanopartiküllerin etrafına kaplanmış olan organik tabakadan anlaşılmaktadır. GAMNP ile GAMNP-Hb'nin görüntüleri karşılaştırıldığında, hemoglobinin bağlanmasından sonra destek malzemesine nazaran topaklanma olduğu ancak bu topaklanan partiküllerin daha çok hemoglobinlerden meydana geldiği söylenebilir. Yaklaşık boyutu 100-200 nm olan GAMNP-Hb nanopartikül kümelerinin, GAMNP'e göre daha hacimli olduğu C-TEM görüntülerinden anlaşılmaktadır. Her bir nanopartikülün etrafındaki organik tabakanın kalınlığı farklılık göstermektedir ve buradan yola çıkılarak, her nanopartiküle eşit sayıda Hb bağlanmadığı söylenebilir.

GAMNP-Hb'nin siklik voltogramı pH 7,4 fosfat tamponunda 3 mg GAMNP-Hb/10 mL fosfat çözeltisi olacak şekilde hazırlanmış süspansiyonda, 100 $mV.s^{-1}$ tarama hızında gerçekleştirilmiştir. Her ölçüm en az 3 tekrarlı döngü alınarak gerçekleştirilmiştir. Voltogramlar incelendiğinde, hemoglobinin ***hem*** bölgesinin merkezinde bulunan demir atomunda, Fe(III)/Fe(II) yükseltgenme reaksiyonu Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,418 V katodik potansiyelde ve indirgenme reaksiyonu -0,06 V anodik potansiyelde pik şeklinde görülmektedir. Bu pik demir atomuna oksijenin bağlanması basamağında yükseltgenme olur ve indirgenme esnasında hemoglobinin aldığı oksijenleri vererek demir(II) oluşturur. Bu verilere göre anodik ve

katodik pil potansiyelleri arasındaki fark 0,358 V'tur, bu da hızlı bir elektron transferi olduğuna işarettir (83,84). Formal potansiyel -0,239 V olarak hesaplanmıştır (84). Anodik ve katodik tepkimelere ait pikler neredeyse eşit akıma sahip ve görüntü olarak simetriktir. Bu verilerden yola çıkılarak, hemoglobinlerin negatif tarama sırasında elektron alarak indirgendiği ve pozitif tarama yapıldığında verdiği kadar potansiyeli geri alarak tamamen yükseltgendiği söylenebilir (83). Aynı çözelti içerisinde yapılan tekrarlarda voltogramların üst üste çakışmıştır. Bu bilgiler ışığında, demir atomunun Fe(III)/Fe(II) dönüşümünün sürekli olduğu söylenebilir. Sadece GAMNP içeren süspansiyonun CV'si incelendiğinde herhangi bir pik elde edilememiştir. Destek malzemesinde redoks tepkimesi verebilecek metallerin olmayışından dolayı voltogramda herhangi bir pike rastlanmamıştır. Saf hemoglobini içeren çözeltinin CV'si incelendiğinde ise, Ag/AgCl standart elektroduna karşı -0,468 V katodik potansiyelde pik ve -0,06 V anodik potansiyelde pik gözlenmiştir. GAMNP-Hb'nin anodik ve katodik potansiyeli pikleri saf hemoglobinin pikleri ile neredeyse eşittir ve voltogramları neredeyse üst üste çakışık durumdadır. Buradan yola çıkılarak, immobilizasyon sonrası hemoglobinin neredeyse hiç değişmeden kaldığı söylenebilir (83).

GAMNP-Hb'ye ait tüm spektroskopik veriler incelendiğinde glutaraldehit ile kaplanmış manyetik nanopartiküllerden her bir taneciğe 85 tane Hb molekülünün bağlandığı söylenebilir.

5.2. Sentezlenen komplekslerin endotel hücre fonksiyonları üzerine etkisi

Nanomateryaller, 100 nm'den daha küçük boyutlu, geniş yüzey alanına ve farklı fiziko-kimyasal özelliklere sahip maddeler olarak tanımlanmaktadır. Fiziksel ve kimyasal özelliklerinden dolayı çeşitli tüketici ürünler ve sanayideki kullanımlarının yanı sıra son zamanlarda, tıp alanında da sıkça kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde nanomateryallerin kullanımı modern teknolojide giderek artan bir hızda ilerleme gösteriyor olsa da, üretilen çevre ve özellikle insan sağlığı üzerine olan etkileri ile ilgili bilgiler oldukça yetersiz bulunmaktadır. Nanomateryallere maruz kalma sonucu oluşacak olan potansiyel tehlikeler hakkında yapılan çalışmalar ne yazık ki yetersiz ve hala tartışma aşamasındadır (87). Literatür araştırmalarımız sonucunda, bu konu üzerine yapılmış olan *in vivo* ve *in vitro* çalışma sonuçlarının birbirleriyle çeliştiği de

gözlenmiştir. Örneğin, bazı çalışmalarda demiroksit nanopartiküllerin minimum toksisiteye veya ağır hücre ölümüne neden olduğu bildirilmiş iken**,** son yapılan çalışmalarda toksik olmadığı ileri sürülmüştür (87). Fareler üzerine yapılan farklı bir çalışmada mnp'lerin ciddi bir toksik etkiye neden olmadığı ancak kan-beyin bariyerinin fonksiyonunu etkilediği ileri sürülmektedir (88). Üretilen materyallerin insan hayatını kolaylaştırma ve kaliteli yaşam standardına ulaştırmada yardımcı unsur olarak görülmesi önemli bir nokta olmasına karşın, üretilen bu materyallerin sağladığı faydaların yanında neden olduğu zararların araştırılması amacıyla sitotoksisite, oksidatif stres ve genotoksisite gibi değerlendirmelerinin yapılması gerektiği aşikardır.

Hidroksil radikalleri ($OH^{\cdot}$), süperoksit anyon ve hidrojen peroksit (H_2O_2) içeren reaktif oksijen türlerinin (ROS), hücre metabolizması üzerinde etkinlik göstererek kanser ve çeşitli hastalıkların oluşumunda önemli olduğu kabul edilmektedir (89). Aşırı ROS üretimi ve oksidatif stres artışının ateroskleroz, alzheimer hastalığı (90), parkinson hastalığı gibi çeşitli dejeneratif hastalıklar ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (89). Reaktif oksijen türleri (ROS) aerobik hücresel reaksiyonlar sırasında oluşur ve redoks homeostazisinin korunması amacıyla hücrenin süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleri gibi detoksifikasyon savunma sistemleri tarafından etkili bir şekilde temizlenirler (91). Ancak ROS üretimi hücre detoksifikasyon kapasitesini aştığı zaman, geri dönüşü olmayan bir oksidatif modifikasyonla sonuçlanan lipid, protein, DNA veya sinyal transdüksiyon yolaklarını etkileyebilir. ROS'lar protein ekspresyonlarında değişikliklere neden olarak, mitojen ile aktive edilmiş protein kinazı (MAPK 'ler), redoks duyarlı transkripsiyon faktörleri [yani, NF-kB, hipoksi nedenli faktörü I (HIF-I) ve aktivatör protein I (AP-I)'] gibi hücre içi sinyal yolaklarını modüle edebilirler.

Endoplazmik retikulum (ER), tüm hücresel proteinlerin yaklaşık olarak üçte birinin, posttranslasyonel sentez sonrası modifikasyonundan, katlanmasından ve iletiminden sorumludur. ER'ye giren tüm proteinler, disülfid bağı oluşumu ve N-bağlantılı glikosilasyon gibi, çok sayıda sentez sonrası modifikasyonlara tabi tutulurlar. Katlanmamış / yanlış katlanmış proteinler, ER-ilişkili bozulmaya uğrarlar ve fizyolojik koşullar altında, ER katlanmış veya yanlış katlanmış proteinler arasındaki dengeyi korumayı sağlar. ER işleme kapasitesi aşıldığı zaman, katlanmamış / yanlış katlanmış proteinler ER homeostazını bozarak ve böylece ER stresini uyararak birikirler. ER stresi

katlanmamış protein yanıtı (UPR, unfolded protein response) aktive eder. UPR; transkripsiyon faktörü (ATF) -6 aktive eden, inositol gerektiren enzim (IRE) -1 ve PKR-benzeri ER kinaz (PERK) olarak bilinen trans-membran ER proteinleri tarafından başlatılan üç çatallı sinyal kaskadıdır. Bu yolların başlatılması, normal protein sentezini azaltarak, ER şaperon düzeylerini arttırarak ve geri dönüşümsüz olan yanlış katlanmış proteinlerin bozulmasını kolaylaştırarak ER üzerindeki stresi hafifletmek için çalışır. Kronik ER stres şartları altında, lipid birikimi (SREBP), enflamasyon (NF-kB) ve apoptozla [C/EBP homologous protein (CHOP), Jun N-terminal kinase (JNK)] ilişkili yolakların upregülasyonu meydana gelebilir. Buna ek olarak, protein katlama reaksiyonları yüksek enerji bağımlı işlemlerdir ve protein yanlış katlanması-kaynaklı ATP tükenmesi, ATP sentezini artırmak için mitokondriyal oksidatif fosforilasyonu ve dolayısıyla ROS üretimini teşvik edebilir. Alternatif olarak, katlanmamış protein birikimi ER lümeninden sitozole Ca^{2+} sızmasına da yol açabilir ve artan sitozolik Ca^{2+} düzeyi mitokondriyal ROS üretimini uyarır (92). Bütün bu hücresel olaylar endotel hücre fonksiyonlarının bozulmasına neden olur.

Bu amaçla çalışmamızda, üretmiş olduğumuz, manyetik Hb taşıyıcılarının, insan umblikal ven endotel hücreleri üzerine olan potansiyel toksik etkileri belirli parametreler ile tespit edilmeye çalışılmıştır. Hücre proliferasyonu ve canlılığı üzerine olan etkilerinin incelenmesi amacıyla MTT metodu kullanılmış, antioksidan savunma sistemi üzerine olan etkilerini araştırmak amacıyla ise endotel hücrelerin katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx) ve süperoksid dismutaz (SOD) enzim aktivitelerine etkileri değerlendirilmiştir.

Elde ettiğimiz verilere göre, saf Hb uygulaması, vasküler endotel hücreleri üzerine kontrole göre pozitif bir proliferatif etkiye, SOD ($p<0,001$) ve glutatyon peroksidaz ($p<0,01$) enzim aktivitesinde de anlamlı bir artışa neden olduğu belirlendi. Farklı konsantrasyonlarda Hb uygulamasının, kolon kanserinin temel hücreleri olan HT-29 hücre proliferasyonu ve ROS üzerindeki etkisinin incelendiği bir çalışmada, Hb konsantrasyonun artışına bağlı olarak proliferasyonun ve ROS konsantrasyonunun arttığı gösterilmiştir (93). Bu sonuçlar bizim çalışmamızı destekler niteliktedir. Hücrede ROS artışı ve buna bağlı olarak antioksidan savunma mekanizmasının aktivitesi hücre proliferasyonunda artışa neden olmuş olabilir. Serbest hemoglobinlerdeki hem grubunun demiri, endojen hidrojen peroksit ile tepkime vererek

oksidatif hücre zararlarına neden olan serbest radikallerin üretilmesine ve hidroksil radikallerinin birikmesine neden olabilir (94). Buna bağlı olarak saf Hb uygulamasının, hücre proliferasyonunu artırmasıyla birlikte hücrenin savunma mekanizmasını oluşturan GPx ve SOD enzim aktivitesini artırdığını ileri sürebiliriz. Hücresel sistemde redoks homeostazisini korumak için ROS süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) gibi detoksifikasyon savunma sistemi tarafından etkili bir şekilde temizlenir. Ancak ROS üretimi hücre detoksifikasyon kapasitesinin üstünde olduğu zaman, aşırı üretilen ROS DNA, proteinler ve hücre zarının lipidlerinde ciddi hasara neden olur. ROS'ların burada muhtemelen protein kinazlar ve transkripsiyonel faktörlerin aktivasyonu yoluyla hücre çoğalmasında ikinci haberci olarak hareket ettiği öne sürülebilir (91).

Vasküler endotel hücrelerine uygulanan saf mnp, endotel hücre proliferasyonunda ($p<0,01$), CAT'lerinde ($p<0,01$), SOD ($p<0,05$) ve glutatyon peroksidaz ($p<0,01$) enzim aktivitesinde ciddi artışa neden olmuştur. Akciğer epitelyum hücrelerinin 0,5, 2,5, 5,0 µg konsantrasyonlarda manyetik nanopartikül ile muamelesi antioksidan enzim aktivitesinde artışa neden olmazken 15 ve 20 µg manyetit uygulamasının anlamlı artışa neden olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada konsantrasyon artışına bağlı olarak hücre proliferasyonun da arttığı gösterilmiştir (87). Çalışmamızda, saf mnp uygulamasında her üç enzim aktivitesinde de artışının hücre içindeki ROS konstrasyonunun artışından kaynaklandığını ileri sürebiliriz. Hücredeki ROS birikiminin hücre proliferasyonuna neden olması yukarıdaki mekanizmalarla ilaveten yapılan farklı çalışmaların incelenmesiyle de aydınlatılabilir. Örneğin ROS'un mitojen tarafından aktive edilen protein kinaz (MAPK) yolunu aktive edebildiği ortaya konmuştur. Özellikle, ERK1 / 2 ve p38 MAPK içeren MAPK ailesinin osteoblastların proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli roller oynadığı bildirilmiştir. Ayrıca ROS, AP-1 ve NF-kB aktivasyonu ile sonuçlanan, PKC artışında işlev görebilen Ca^{2+}'un hücre içi konsantrasyonunda bir artışa neden olabilir. Bir anti apoptotik protein olan NF-kB'nin redoks-duyarlı nükleer bir transkripsiyon faktörü olduğu bilinmektedir. ROS, NF-kB'yi direk olarak aktif hale getirerek, hücre proliferasyonuna neden olabildiği çalışmalarda gösterilmiştir (95). Mekanizmayı açıklamak amacıyla ileriki çalışmalarda moleküler düzeyde incelemelerin yapılması konuya açıklık getirebilir.

Sentezlediğimiz manyetik nanopartiküle bağlı Hb taşıyıcılardan 3APGAMNP-Hb ve GAMNP-Hb, endotel hücre proliferasyonunda artışa neden olmuştur ($p<0,01$), ancak GAMNP-Hb antioksidan savunma enzimlerinin aktivitesinde kontrole göre bir fark göstermemiş, 3APGAMNP-Hb ise sadece GPx enzim aktivitesinde kontrole göre azalmaya neden olmuştur ($p<0,05$). Proliferasyon sonuçlarına baktığımızda GAMNP-Hb ve 3APGAMNP-Hb'nın saf mnp uygulamasına oranla proliferasyona daha az meyil gösterdiği dikkat çekmektedir. Bu nedenle, saf mnp'nin komplekslerle (GAMNP-Hb, 3APGAMNP-Hb ve yüzey modifikasyon ajanları) kaplanmasının, saf mnp'nin ve saf hemoglobinin proliferasyonu artırıcı etkisini zayıflatmış olduğunu göstermektedir.

TEALMNP-Hb kompleksine maruz kalmış olan hücrelerin canlılığı ve proliferasyonunda, istatistiksel olarak anlamlı olmasa da hafif bir artış eğilimi söz konusudur. Bununla birlikte TEALMNP-Hb uygulamasının saf mnp ve 3APGAMNP-Hb uygulamasına oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde proliferasyonda daha az artışa neden olduğu dikkat çekmektedir ($p<0,01$) TEALMNP-Hb kompleksi CAT enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmazken, SOD ($p<0,001$) ve GPx ($p<0,01$) aktivitesinde ise anlamlı bir artışa yol açtığı belirlendi.

Çalışmamızda, endotel hücreleri üzerine TALMNP-Hb kompleksi uygulaması ise hücre proliferasyonu, CAT ve SOD enzim aktivitesinde istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmadı ancak GPx aktivitesini artırdı ($p<0,01$). CAT, SOD enzim aktivitesinin ve hücre proliferasyonun kontrole göre değişmemesinin sonucu olarak, uygulanan TALMNP-Hb kompleksinin istenilen ölçüde sentezlendiğini ve hücre sitotoksisitesine neden olmadığını ileri sürebiliriz. Bir çalışmada, demiroksit salisilik asit kaplı manyetik nanopartiküllerin (0,25 µg / ml) 48 saat inkübe edilen insan glioblastoma hücrelerinde proliferasyonu etkilemediğini ve sitotoksik etkisi olmadığını bildirmişlerdir (96). Aynı çalışmada mnp'ler ile 72 saatlik inkübasyon hücre proliferasyonunda %8'lik bir azalmaya neden olmuştur. İnkübasyon sürelerindeki farklılığın hücre proliferasyonunu etkilemesi, sentezlemiş olduğumuz mnp'lerin hücre sitotoksisitesi üzerindeki net etkisinin ortaya konması için, farklı konsantrasyonlarda ve farklı inkübasyon sürelerinde hücre üzerindeki etkisinin incelenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

İşlevlendirilmiş yani çeşitli kimyasallarla ile kaplanmış olan mnp'ler üzerine araştırma yapılan çalışmalarda, mnp'lerin düşük konsantrasyonlarda hücresel düzeyde

güvenli olduğunu ancak konsantrasyon artışına bağlı olarak antioksidan aktivitenin artışı ile birlikte sitotoksik etkinin de arttığı bildirilmiştir (96).

Çalışmamızda GAMNP-Hb ve 3APGAMNP-Hb komplekslerinin hücre proliferasyonu üzerindeki pozitif etkisi, kullandığımız dozun yüksek olabileceği ve hücrenin bu duruma antioksidan savunma mekanizmasını aktive ederek karşılık vermiş olabileceğini göstermektedir. Artan antioksidan seviyesine bağlı olarak büyüme ile ilgili sinyalizasyonun anormal aktivasyonu yoluyla hücre büyümesini ve üremesini teşvik etmiş olabilir (91).

TEALMNP-Hb ve TALMNP-Hb komplekslerinin ise hücre proliferasyonunu etkilemeyip antioksidan sistemin bazı parametrelerinde artışa neden olması hücrede, ROS'dan kaynaklanan hasarlardan korunma ile ROS üretimi arasındaki dengenin korunduğunu gösterebilir. Bu durumda çalışmamızın daha iyi desteklenebilmesi için ilerde yapılacak diğer çalışmalarda, antioksidan düzeyleriyle birlikte hücrenin ROS konsantrasyonunun da takip edilmesi yararlı olacaktır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Bu tez çalışmasında acil durumlarda kanda oksijen transferi yapabilecek hemoglobin bağlı manyetik nanopartiküllerden oluşan ve yarı sentetik olarak hazırlanmış biyomalzemelerin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için, öncelikle Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlenip yüzeylerinde çeşitli modifikasyonlarla serbest aldehit grupları oluşturulması ve bu yapılara schiff bazı tepkimesinden yararlanılarak ultra saf hemoglobin immobilize edilmesi düşünülmüştür. Bu işlemler yapılırken hemoglobin moleküllerinin konformasyonel değişiminin mümkün olduğunca az olması, böylelikle moleküllerin oksijen taşıma potansiyellerinin korunması hedeflenmiştir.

Aldehit grubunun hazırlanması için 4 farklı yöntem kullanılmıştır. Bunlar; a) Trietanol amin kaplı b) Tartarik asit kaplı c) 3APTES kaplı d) Glutaraldehit kaplı partiküllerdir. Çalışma sonuçlarımızı değerlendirmek üzere XRD, C-TEM ve SEM analizlerinden yararlanılmıştır. Sonuçlarımız partiküllerin proje öncesinde öngördüğümüz boyutlarda sentezlendiğini doğrulamaktadır ve birbirine yakın olduğunu göstermektedir. Sırasıyla; a) 22,6 nm b) 21,1nm c) 22,8nm d) 24,8 nm.'dir.

Uygulanan 4 farklı metot ile elde edilen partiküller infrared (FT-IR) ve elementel analiz (EDX) spektroskopileri ile incelendiğinde, hemoglobin moleküllerinin bağlanacağı aldehit uçlarının oluşturulduğu belirlenmiştir.

Hemoglobin bağlı nanopartiküllerin CV ve UV analizleri, hemoglobin moleküllerinde yapısal bütünlüğünün değişmediğini, biyomoleküllerin oksijen taşıma-bırakma yeteneklerinin korunduğunu, bu durumun uzun süre stabil kaldığını göstermiştir.

Serbest manyetik nanopartiküller ve serbest hemoglobin (1mg/10ml) *in vitro* insan endotel hücre hatları üzerinde istatistiksel açıdan anlamlı hücre proliferasyonuna neden olurken; aynı dozda uygulanan hemoglobine bağlı manyetik nanokomplekslerin türlerine bağlı olarak farklı oranda proliferasyona yol açtığı ve herhangi bir inhibitör etki göstermedikleri belirlenmiştir.

Endotel hücre lizatlarına serbest manyetik nanopartikül eklenmesi (1mg/10ml) ile antioksidan enzim aktivitelerinde (SOD, CAT, GPx) kontrol grubuna göre ciddi bir artış gözlenirken, hemoglobinli nanopartiküllerde bu etki çok daha sınırlı kalmıştır. Özellikle, Gamnp-Hb ve 3APGAMNP-Hb başta olmak üzere 4 farklı yöntemde de anlamlı değişiklik görülmeyen enzim aktiviteleri belirlenmiştir..

6.2. Öneriler

1- Bu çalışma oksijen taşımak üzere doğal kanın yerine geçebilecek alternatif bir biyomalzeme geliştirme çalışmasının ilk basamak sentez denemeleridir. Bu nedenle bu çalışmanın optimizasyon çalışmalarına devam edilmelidir.

2- 4 farklı metot ile immobilize edilen moleküllerin stereokimyaları daha derinlemesine incelenmeli; en stabil ve ideal boyuttaki modifiye partiküller tercih edilmelidir.

3- Damar yüzeyine yapılacak etkilerin minimalize edilebilmesi için yüzeyine hemoglobin immobilize edilen partiküllerin açıkta kalan (Hb bağlanmamış) fonksiyonel grupları ile hemoglobinlerdeki olası reaktif grupların tespiti ve kapatılabilme seçenekleri değerlendirilmeli, gerekirse enkapsülasyon ya da lipozomal paketlemelere yönlenmelidir.

4- Bu araştırma projesi ileri dönemlerde yeni nesil biyomalzemelerin geliştirilmesi için ilk basamak çalışması olmuştur. Aynı yöntemlerden yararlanılarak protein yapıda birçok biyomalzeme üretimi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

1. **Chang SMT.** Evolution of artifical cells using nanobiotechnology of hemoglobin based rbc blood substitute as an example. *Artif Cell Blood Sub*, **2006**; 34: 551– 66.

2. **Chang SMT.** Blood substitutes in 2010 [1]. *Artif Cell Blood Sub*, **2010**; 38: 295– 6.

3. **Chang SMT.** Hemoglobin-based Red Blood Cell Substitutes. *Artif Organs*, **2004**; 28(9):789– 94.

4. **Goorha BYC, Deb MP, Chatterjee LCT, Dhot CPS, Prasad BRS**. Artifical blood. *MJAFI*, **2003**; 59: 45- 50.

5. **Chang SMT**. Future prospects for artificial blood. *Trends in Biotech*, **1999**;17:61-7.

6. Stem cell basics. Erişim: (http://stemcells.nih.gov/info/basics/basics1.asp.) Erişim Tarihi: 18. 04. **2012**.

7. **Takeoka S.** Developmental trend of artificial blood (Artificial red blood cells). *JMAJ*, **2005**; 48(3): 135–39.

8. **Yasar U, Yilgor Huri P, Dikmen N.** Yapay Kan. *Archives Med Rev J*, **2012;** 21(2): 95-108.

9. Hemoglobin. Erişim: (http://www.eoht.info/page/Hemoglobin) Erişim tarihi: 14.04.**2012.**

10. **Harold P.E.** Size and shape of protein molecules at the nanometer level determined by sedimentation, gel filtration, and electron microscopy. *Biol Proced Online*, **2009;** 15(11): 32-51.

11. Haemoglobin structure & function Erişim: (http://www.diatronic.co.uk/nds/webpub/haemoglobin_structure.htm). Erişim tarihi: 22.12.**2015**.

12. **Saha D, Patgaonkar M, Shroff A, Ayyar K, Bashir T, Reddy K.V.** Hemoglobin expression in nonerythroid cells: Novel or ubiquitous?. *Int J Inflam*, **2014**;2014:1-8.

13. **Thom C.S, Dickson C.F, Gell D.A, Weiss M.J.** Hemoglobin variants: Biochemical properties and clinical correlates. *Cold Spring Harbor pets in med*, **2013;**3(3):a011858.

14. Haemoglobin/oxygen binding. Erişim: (http://www.austincc.edu /emeyerth/hemoglob.htm). Erişim tarihi: 06.08.**2014**.

15. Blood-dedection, identification and age determination. Erişim: (http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://www.fortechs.com/technology.html &gws_rd=cr&ei=goE-VtaxK8m9ygPk9pDACg). Erişim tarihi: 08.03.**2015**.

16. **Weed R.I.R, Claude F.B.** Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes?. *J Clin Invest*, **1963**; 42 (4): 581–8.

17. **Nonoyama A.G.L, Luis H.G.R, German F.L, Potter R.L.** Hypochromicity in red blood cells: an experimental and theoretical investigation. *Biomed Opt Exp*, **2011**; 2(8): 2126–2143.

18. **Dominguez de Villota E.D, Ruiz Carmona M.T, Rubio J.J, de Andres S.** Equality of the in vivo and in vitro oxygen-binding capacity of haemoglobin in patients with severe respiratory disease. *Br J Anaesth*, **1981**; 53 (12): 1325–8.

19. **Hsia C.C.** Respiratory function of hemoglobin".*N Engl J of Med*, **1998;** 338 (4): 239–247.

20. **Biagioli M, Pinto M, Cesselli D, Zaninello M, Lazarevic D, Roncaglia P, Simone R, Vlachouli C, Plessy C, Bertin N, Beltrami A, Kobayashi K, Gallo V, Santoro C,Ferrer I, Rivella S, Beltrami C.A, Carninci P, Raviola E, Gustincich S.** Unexpected expression of alpha- and beta-globin in mesencephalic dopaminergic neurons and glial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*, **2009**; 106 (36): 15454–15459.

21. **Irwin J.J, Kirchner J.T.** Anemia in children. *AAFP,* **2001;**64(8):1379-1386.

22. **Hardison R.C, Chui D.H, Riemer C.R, Miller W, Carver M.F, Molchanova T.P, Efremov GD, Huisman TH.** A Syllabus of human hemoglobin variants (1996) via the world wide web. *Hemoglobin,* **1998;** 22(2): 113-127.

23. **Clarke G.M, Higgins T.N.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem,* **2000;** 46:1284-1290.

24. **Khan J, Quigley G.** Control of intracellular heme levels: Heme transporters and Heme oxygenases. *Biochim biophys Acta,* **2011;**1813(5):668-682.

25. **Lukin J.A, Kontaxis G, Simplaceanu C, Yuan Y, Bax A, Ho C**. Quaternary structure of hemoglobin in solution. *Proc Natl Acad Sci*, **2003;** 100(2): 517–520.

26. **Bunn H.F, Forget B.G.** *Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects*, 3. Baskı, Philadelphia: W.B.Saunders Company: **1986.**

27. **Steinberg M.H, Forget B.G, Higgs D.R, Nagel R.L.** Disorders of hemoglobin: Genetics, pathophysiology, and clinical management. *J R Soc Med,* **2011;** 94(11): 602–603.

28. Wikipedians. Hemolytic anemia. Erişim: (https://books. google. com.tr/books?id=oz8inTVuxngC&printsec=frontcover&hl=tr#v=onepage&q&f=false). Erişim Tarihi: 05.09.**2015.**

29. **Linberg R, Conover C.D, Shum K.L, Shorr R.G.** Hemoglobin based oxygen carriers: how much methemoglobin is too much. *Art Cel Bl Sub Im Biotech,* **1998;** 26 (2): 133–48.

30. **Van Beekvelt M.C, Colier W.N, Wevers R.A, Van Engelen B.G.** Performance of near-infrared spectroscopy in measuring local O2 consumption and blood flow in skeletal muscle. *J Appl Phy,* **2001;** 90 (2): 511–519.

31. **Lawrence A.K, Amadeo J.P,** *Clinical chemistry*, 3. Baskı, Missouri: Mosby near book Inc. : **1996.**

32. Hemoglobin-miyoglobin. Erişim: (http://themedicalbiochemistrypage.org/ hemoglobin-myoglobin.php). Erişim tarihi: 03.07.**2015.**

33. **Koçoğlu H.** Doku oksijenasyonu. *Türk YBD Derg*, **2006**; 4(2): 6-10.

34. **Yarkın T.** Solunum yetmezliği: Fizyopatoloji ve klinik yaklaşım. *Toraks Derg,* **2000**; 2: 76-84.

35. Hemoglobin. Erişim: (http://jr.stryker.tripod.com/hemoglobin.html.) Erişim tarihi: 11.11.**2015.**

36. **Ahrens T, Rutherford K. A, Basham R.** *Essentials of oxygenation: Implication for Clinical Practice*, 1. Ed, USA: Jones & Bartlett Learning, **1993**.

37. **Lee G.R, Bithell T.C, Foerster J, Athens J.W, Lukens J.N,** *Wintrobe's Clinical Hematology*, 9 Baskı, London: Lea & Febiger: **1993.**

38. Proteins: prufication and characterization. Erişim: (http://cbc.arizona.edu /classes/bioc462/462a/NOTES/Protein_Properties/protein_ purification.htm). Erişim tarihi: 12.12.**2015**.

39. Whitford D. Proteins: structure and function. *John Wiley & Sons*, 2013.

40. Sayar F. Nanopartikül Üretimi ve Nanotıp Uygulamaları. Hacettepe Üniversitesi. Doktora tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010.**

41. Şahan N. Faz Değiştiren Maddelerin Nano Malzemelerle Kullanımının Araştırılması. Yüksek Lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana,**2011**.

42. Ulusal F. Yeni Florlu Vic-dioksim Türevi Metal Komplekslerin Sentezi ve Süper Kritik Karbondioksit Çözücü Ortamında Depozisyon İşlemlerinde Kullanılabilirliklerinin İncelenmesi. Yüksek Lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2013.**

43. Lucena R, Simonet B.M, Cardenas S, Valcarcel M. Potential of nanoparticles in sample preparation. *J Chromatogr.* **2011;** 1218(4): 620-637.

44. Von der Kammer F, Legros S, Hofmann T, Larsen E.H, Loeschner K. Separation and characterization of nanoparticles in complex food and environmental samples by field-flow fractionation. *Trend Anal Chem,* **2011;** 30(3): 425-436.

45. Wang F, Banerjee D, Liu YS, Chen X.Y, Liu X.G. Upconversion nanoparticles in biological labeling, imaging, and therapy. *Analyst,* **2010;** 135(8): 1839-1854.

46. Mehdinia M.O, Zanjani A. Recent advances in nanomaterials utilized in fiber coatings for solid-phase microextraction. *Trend Anal Chem,* **2013;** 42: 205-15.

47. Gür M. Nanomimarlık bağlamında nanomalzemeler. *Uludağ Üni Müh-Mimarlık Fak Derg,* **2010;** 15(2): 81-90.

48. Kavaz D. Nanopartiküller. *Nanobülten derg,* **2011;** 73: 12- 19.

49. Yalçın N. Budak C E, Arı S. Tıpta 3 Moleküler Yapının Geleceği. *AJIT,* **2013;** 4(2):61-70.

50. Kocaefe Ç. NanoTıp: Yaşam bilimlerinde nanoteknoloji uygulamaları. *Hacettepe Tıp Derg*, **2007;** 38: 33-38.

51. Uzio D, Berhault G. Factors governing the reactivity of metallic nanoparticles. *Cat Rev Sci & Eng, **2010;** 52 (1): 106-131*.

52. Li Y.Y, Liu S.J, Yao T, Sun Z.H, Jiang Z, Huang Y.Y, Cheng H, Huang Y.Y, Jiang Y, Xie Z, Pan G.Q, Yan W.S, Wei S.Q. Controllable synthesis of gold nanoparticles with ultrasmall size and high monodispersity *via* continuous supplement of precursor. *Dalton Trans,* **2012;** 41: 11725-11730.

53. Rodriguez J.A, Liu G, Jirsak T, Hrbek J, Chang Z.P, Dvorak J, Maiti A.J. Activation of gold on titania: adsorption and reaction of SO(2) on Au/TiO(2)(110). *Am Chem Soc*, **2002;** 124(18): 5242-5250.

54. Tian J, Xu J, Zhu F, Lu T, Su C, Ouyang G. Application of nanomaterials in sample preparation. *J Chrom A,* **2013;**1300: 2– 16

55. Wang H.Y, Campiglia A.D. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water samples by solid-phase nanoextraction and high-performance liquid chromatography. *Anal, Chem*, **2008;** 80 (21): 8202-8209.

56. Lo S.I, Chen P.C, Huang C.C, Chang H.T. Gold nanoparticle-aluminum oxide adsorbent for efficient removal of mercury species from natural waters. *Environ. Sci. Technol,* **2012;** 46(5): 2724-2730.

57. Wang H.Y, Campiglia A.D. Direct determination of benzo[a]pyrene in water samples by a gold nanoparticle-based solid phase extraction method and laser-excited time-resolved Shpolskii spectrometry. *J Talanta*, **2010;** 83(1): 233-40.

58. Tran Q.H, Nguyen V.Q, Le A.T. Silver nanoparticles: Synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, **2013;** 4: 1-20.

59. Garcia-Barrasa J, Lopez-de-luzuriaga J.M, Monge M. Silver nanoparticles: Synthesis through chemical methods in solution and biomedical application. *Cent Eur J Chem*, **2011;** 9(1): 17-19.

60. Fabrega J, Luoma S.N, Tyler C.R, Galloway T.S, Lead J.R. Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ. Internat*, **2011;** 37(2): 517-31.

61. Tian J, Xu J, Zhu F, Lu T, Su C, Ouyang G. Application of nanomaterials in sample preparation. *J Chromatography A*, **2013;** 1300: 2– 16

62. Shen W.W, Xiong H.M, Xu Y, Cai S.J, Lu H.J, Yang P.Y. ZnO-poly(methyl methacrylate) nanobeads for enriching and desalting low-abundant proteins followed by directly maldi-tof ms analysis. *Anal Chem*, **2008;** 80(17): 6758-63.

63. Baytak S, Zereen F, Arslan Z. Preconcentration of trace elements from water samples on a minicolumn of yeast (Yamadazyma spartinae) immobilized TiO_2 nanoparticles for determination by ICP-AES. Talanta, **2011;** 84(2): 319-23.

64. Garcia-Ruiz S, Petrov I, Vassileva E, Quetel C.R. Cadmium determination in natural waters at the limit imposed by European legislation by isotope dilution and TiO_2 solid-phase extraction. *Anal Bioanal Chem*, **2011;** 401(9): 2785-2792.

65. Costa L.M, Ribeiro E.S, Segatelli G.M, Do Nascimento D.R, De Oliveira F.M, Tarley C.R.T. Adsorption studies of Cd(II) onto Al_2O_3/Nb_2O_5 mixed oxide dispersed on silica matrix and its on-line preconcentration and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Spectroch Acta Part B*, **2011;** 66(5): 329-37.

66. Lima G.F, Ohara M.O, Clausen D.N, Nascimento D.R, Ribeiro E.S, Segatelli M.G, Bezerra M.A, Tarley C.R.T. Flow injection on-line minicolumn preconcentration and determination of trace copper ions using an alumina/titanium oxide grafted silica matrix and FAAS. *Microchimica Acta*, **2012**; 178(1): 61-70.

67. Linemann T, Thomsen L.B, Kristian G, Jardin D, Laursen J.C, Jensen J.B, Lichota J, Moos T. Development of a Novel Lipophilic, Magnetic Nanoparticle for in Vivo Drug Delivery. *Pharmaceutics*, **2013**; 5: 246-260.

68. Yılmaz T. DNA Taşıyıcı Sistem Geliştirme Amacıyla Manyetik Nanopartikül Formülasyonların Hazırlanması. Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İzmir, **2012**.

69. Knopp D, Tang D, Niessner R. Bioanalytical applications of biomolecule-functionalized nanometer-sized doped silica particles. *Anal. Chim. Acta*, **2009**; 647: 14–30.

70. Kim S.J, Yoon TJ, Yu K.N, Kim B.G, Park S.J, Kim H.W, Lee K.H, Park S.B, Lee J.K, Cho M.H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *J. Toxicol Sci*, **2006;** 89(1): 338–347.

71. Mahmood I, Ahmad I, Chen G, Huizhou L. A surfactant-coated lipase immobilized in magnetic nanoparticles for multicycle ethyl isovalerate enzymatic production, *Biochem Eng J*, **2013;** 73: 72–79.

72. Simek J.W, Tuck T, Bush K.C. Reduction of carboxylic acids with sodium borohydride and an electrophile. *J Chem Educ*, **1997;** 74(1): p107.

73. Al-Hamdany A.J, Jihad T.W. Oxidation of some primary and secondary alcohols using pyridinium chlorochromate, *Tikrit J Pure Sci*, **2012;** (4): 1-17.

74. Polshettiwar V, Varma R.S. Nanoparticle-supported and magnetically recoverable ruthenium hydroxide catalyst: efficient hydration of nitriles to amides in aqueous medium, *Chem Eur J,* **2009;** 15: 1582-1586.

75. Tang T, Fan H, Ai S, Han R, Qiu Y. Hemoglobin (Hb) immobilized on amino-modified magnetic nanoparticles for the catalytic removal of bisphenol A, *Chemosphere,* **2011;** 83: 255–264.

76. Liu C.H, Sahoo S.L, Tsao M.H. Acridine orange coated magnetic nanoparticles for nucleus labeling and DNA adsorption. *Coll and Surf B. Biointerfaces,* **2014**; 115: 150–156.

77. Rezaeifard A, Jafarpour M, Naeimi A, Haddad R. Aqueous heterogeneous oxygenation of hydrocarbons and sulfides catalyzed by recoverable magnetite nanoparticles coated with copper(II) phthalocyanine. *Green Chem,* **2012;** 14: 3386-3394.

78. Lu Y, Yin Y, Mayers B.T, Xia Y. Modifying the surface properties of superparamagnetic iron oxide nanoparticles through a Sol-Gel Approach. *Nanoletters,* **2002;** 2:183-186.

79. Özdemir M.D. Atmalı Plazma Katodik Ark Yöntemi ile Elde Edilen ZnO İnce Filmlerin Optik ve Yapısal Özellikleri, Yüksek Lisans tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çukurova Üniversitesi Adana, **2006.**

80. Jadhav N.V, Prasad A.I, Kumar A, Mishra R, Dhara S, Babu K.R, Prajapat C.L, Misra N.L, Ningthoujam R.S, Pandey B.N, Vatsa R.K. Synthesis of oleic acid functionalized Fe3O4 magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications. *Coll and Surf B: Biointerfaces,* **2013;** 108: 158– 168.

81. Shriver D.F, P.W. *Anorganik Kimya.* 3. Baskı, Ankara: Bilim Yayıncılık: **1999.**

82. Polakovs M, Mironova-Ulmane N, Pavlenko A, Reinholds E, Gavare M, Grube M. EPR and FTIR spectroscopies study of human blood after irradiation. *J Spectroscopy,* **2012**; 27(5-6): 367-371.

83. Xu M.Q, Wu J.F, Zhao G.C. Direct electrochemistry of hemoglobin at a graphene gold nanoparticle composite film for nitric oxide biosensing. Sensors, **2013;** 13: 7492-7504.

84. Pei S, Qu S, Zhang Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin at mesoporous carbon modified electrode. *Sensors,* **2010;** 10: 1279-1290.

85. Miessler D, Tarr A. *İnorganik Kimya Kitabı*. 1. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık: **2007.**

86. Chawla S, Pundir S.C. An electrochemical biosensor for fructosyl valine for glycosylated hemoglobin detection based on core–shell magnetic bionanoparticles modified gold electrode. *Biosens and Bioelect,* **2011**; 26: 3438–3443.

87. Ravichandran R.V Copeland P, Gopikrishnan C.L, Biradar R, Goornavar S, V.G.T, Ramesh, Hall J.C. Magnetite induces oxidative stress and apoptosis in lung epithelial cells. *Mol Cell Biochem,* **2012;** 363(1-2): 225-34.

88. Kim J.S, Yoon T.J, Yu K.N, Kim B.G, Park S.J, Kim H.W, Lee K.H, Park S.B, Lee J.K, Cho M.H. Toxicity and tissue distribution of magnetic nanoparticles in mice. *Toxicol Sci,* **2006;** 89(1): 338-47.

89. Lin C.W, Yang L.Y, Shen S.C, Chen Y.C. IGF-I plus E2 induces proliferation via activation of ROS-dependent ERKs and JNKs in human breast carcinoma cells. *J Cell Physiol,* 2007; 212(3): 666-74.

90. Zhu X, Lee H.G, Moreira P.I, Smith M.A, Perry G. Presenilin mutation: A deadly first hit in Alzheimer disease - A commentary on "aging sensitizes towards ROS formation and lipid peroxidation in PS1M146L transgenic mice". *Free Rad Bio and Med,* **2006;** 40(5): 737-739.

91. Oh P.S, Lim K.T. Blocking of intracellular ROS production by phytoglycoprotein (30 kDa) causes anti-proliferation in bisphenol A-stimulated Chang liver cells. *J Appl Toxicol,* **2008;** 28(6): 749-58.

92. Fiorentino T.V, Prioletta A, Zuo P, Folli F. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des,* **2013;** 19(32): 5695-5703.

93. Lee R.A, Kim H.A, Kang B.Y, Kim K.H. Hemoglobin induces colon cancer cell proliferation by release of reactive oxygen species. *World J Gastroenterol,* **2006;** 12(35): 5644-5650.

94. Melamed-Frank M, Lache O, Enav B.I, Szafranek T, Levy N.S, Ricklis R.M, Levy A.P. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. *Blood,* **2001;** 98(13): 3693-3698.

95. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Reno F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci,* **2014;** 29(4): 1463-1467.

96. Buteica S.A, Mindrila I, Mihaiescu D.E, Purcaru S.O, Dricu A, Nicolicescu C, Neamtu J. *In vitro* and *in vivo* effects of Fe3O4/salicylic acid magnetic nanoparticles on the human glioblastoma cells. *Digest J Nanomat and Biostruct,* **2014;** 9(3): 959-965.

97. Yasar U, Ulusal F, Guzel B, Huri P.Y, Dikmen N. Synthesis of novel surface coating support based on magnetite for use in immobilization and stabilization of organic molecules. Int. Sem. on Adv. In Pre. & Per. Med. Istanbul/ Turkey, 2-3 April **2015: 52**

98. Yasar U, Ulusal F, Guzel B, Huri P.Y, Dikmen N. Hemoglobinin tartarik asit kaplı magnetite immobilizasyonu, karakterizasyonu ve redoks özellikleri. 27. Ulusal Biyokimya Kong, Antalya/Turkiye, Kasım 3-6, **2015**: 40(S1): 251.

99. Yasar U, Ulusal F, Guzel B, Huri P.Y, Dikmen N. Enzim İmmobilizasyonunda Kullanılma Amacıyla Tartarik Asit Kaplı Süperparamanyetik Demir Oksit Nanopartikül Sentezi. 7. Ulusal Vet. Biyokimya ve Kli. Biyokimya Kong. Samsun/ Türkiye, 28- 30 Mayıs **2015:** 79.

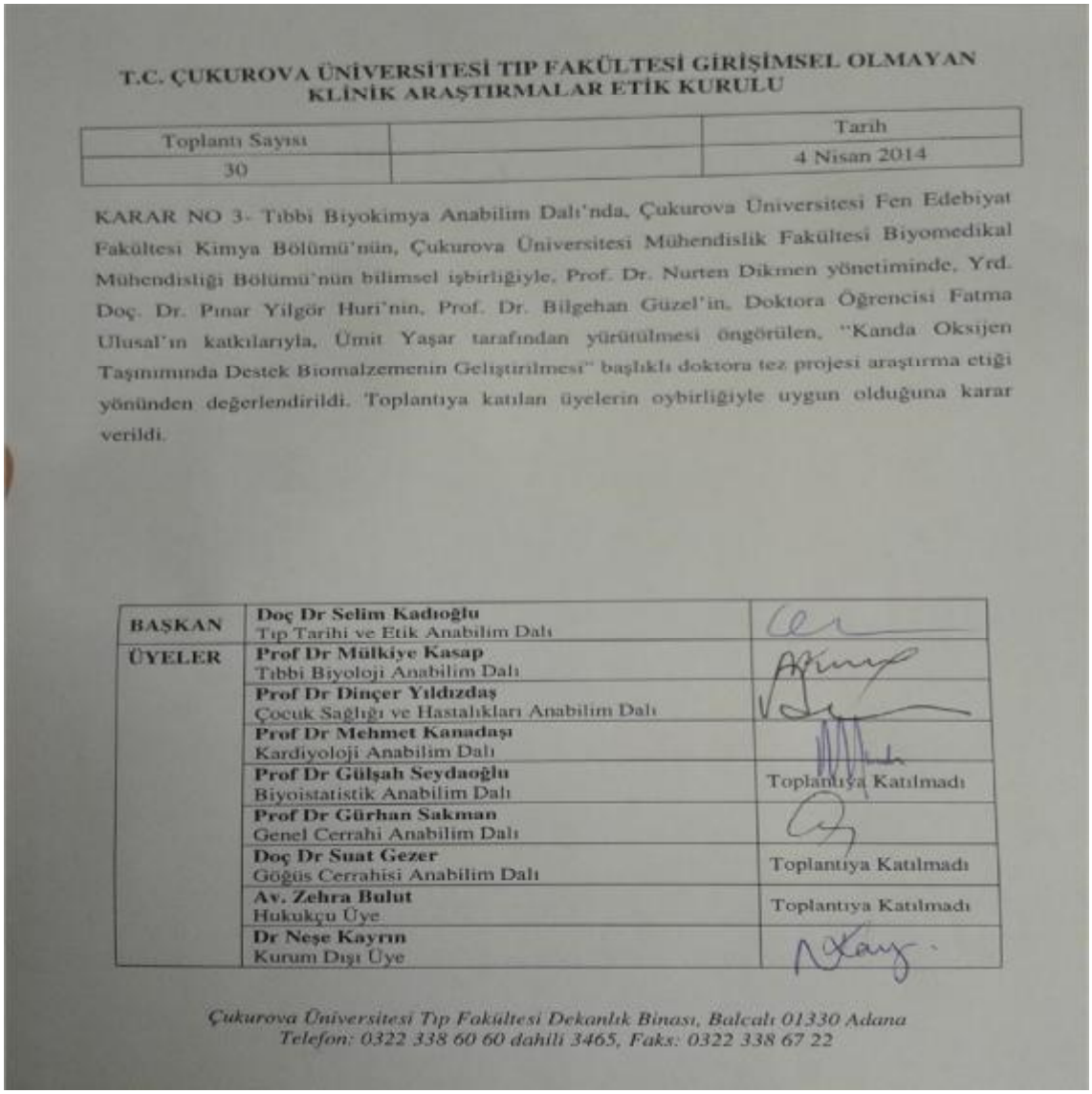
100. Ulusal F, Yasar U, Guzel B, Huri P.Y, Dikmen N. Enzim immobilizasyonunda yüzeyi değiştirilmiş magnetitlerin boyut ve yüzey karşılaştırması. 27. Ulusal Biyokimya Kong, Antalya/Turkiye, Kasım 3-6, **2015**: 40(S1): 210.

101. Yasar U, Ulusal F, Guzel B, Huri P.Y, Dikmen N. Organik molekül immobilizasyonunda magnetit temelli yeni bir yüzey kaplama desteği. Malatya Lab yönetimi Semp. Malatya/Türkiye, 16-18 Ekim, **2014: 39(SI):** 86.

EKLER

EK-1

ARAŞTIRMA ETİĞİ



T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı		Tarih
30		4 Nisan 2014

KARAR NO 3- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nün, Çukurova Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Bölümü'nün bilimsel işbirliğiyle, Prof. Dr. Nurten Dikmen yönetiminde, Yrd. Doç. Dr. Pınar Yilgör Huri'nin, Prof. Dr. Bilgehan Güzel'in, Doktora Öğrencisi Fatma Ulusal'ın katkılarıyla, Ümit Yaşar tarafından yürütülmesi öngörülen, "Kanda Oksijen Taşınımında Destek Biomalzemenin Geliştirilmesi" başlıklı doktora tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	**Doç Dr Selim Kadıoğlu** Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	**Prof Dr Mülkiye Kasap** Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	Toplantıya Katılmadı
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Ordu'da doğdu. İlköğrenimini Erzincan Cumhuriyet İlkokulu ve Şeker İlkokulu, Adana Orhan Gazi İlköğretim Okulu ve Sabancı İlköğretim Okulu'nda gördü.

Lise öğrenimini Ankara Hasanoğlan Anadolu Öğretmen Lisesi, Adana Mithat Topal Lisesi ve Abdulkadir Paksoy Lisesi'nde tamamladı.

2001-2006 yılında Mersin Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde Lisans eğitimi gördü

2006-2010 yılında Mersin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Bölümü'nde Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimi gördü.

2011 yılında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Doktora programına başladı.

Türk Biyokimya Derneği Adana Şubesi'ne üyeliği devam eden Ümit YAŞAR akademik çalışmalarına devam etmektedir.