

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**AZATHIOPRINE İÇİN BİYOUYUMLU MANYETİK  
KATI LİPİD NANOPARÇACIK TAŞIYICI SİSTEMİ  
TASARIMI: KARAKTERİZASYONU,  
RADYOİŞARETLENMESİ VE *IN VITRO*  
ÇALIŞMALAR**

**Gökçe TÜRKKANI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ**

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Yüksek Lisans Programı

Sunuş Tarihi: 10.02.2022

İzmir  
2022



**Gökçe TÜRKKANI** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Azathioprine İçin Biyoyumlu Manyetik Katı Lipid Nanoparçacık Taşıyıcı Sistemi Tasarımı: Karakterizasyonu, Radyoişaretlenmesi Ve *In Vitro* Çalışmalar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10.02.2022 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı** : Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

.....

**Raportör Üye:** Prof.Dr. Fazilet Zümrüt Biber MÜFTÜLER .....

**Üye** : Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

.....



**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Azathioprine İçin Biyoyumlu Manyetik Katı Lipid Nanoparçacık Taşıyıcı Sistemi Tasarımı: Karakterizasyonu, Radyoişaretlenmesi Ve *In Vitro* Çalışmalar**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/02/2022

Gökçe TÜRKKANI



**ÖZET****AZATHIOPRINE İÇİN BİYOUYUMLU MANYETİK KATI LİPİD  
NANOPARÇACIK TAŞIYICI SİSTEMİ TASARIMI:  
KARAKTERİZASYONU, RADYOİŞARETLENMESİ VE *İN VİTRO*  
ÇALIŞMALAR**

TÜRKKAN, Gökçe

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

Şubat 2022, 56 sayfa

Bu Yüksek Lisans tez çalışmasında azathioprine (AZA) yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların sentezlenmesi, teknesyum-99m ile radyoışaretlenme çalışmasının yapılması ve radyoışaretili bu nanokompozit malzemenin *in vitro* ortamda biyolojik davranışının incelenmesi hedeflenmiştir. Sentezlenen manyetik katı lipid nanoparçacıkların (SLMNP) yapısal karakteristik özellikleri Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemi, Zeta Potansiyeli Analizi, Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri ile belirlenmiştir. Azathioprine yüklenmiş radyoışaretili manyetik katı lipid nanoparçacıkların (<sup>99m</sup>Tc-AZA-SLMNP) kalite kontrol çalışmaları, İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) ve doz kalibratörü yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir. Manyetik katı lipid nanoparçacıklar sıcak homojenizasyon tekniği ile sentezlenmiştir. Üç farklı ilaç oranıyla SLMNP yapısına Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi ile Azathioprine ilaç yükleme denemesi yapılmış ve en yüksek ilaç yükleme veriminin %86 ile 2,5 mg azathioprine oranında olduğu bulunmuştur. <sup>99m</sup>Tc ile işaretleme sonrası doz kalibratörü ile alınan ölçüm sonucu elde edilen radyoışaretleme verimi AZA-SLMNP için %90,3 olarak bulunmuştur.

Azathioprine yüklü  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoişaretli manyetik katı lipid nanoparçacıkların *in vitro* ortamda HaCaT insan deri normal keratinosit hücresi biyolojik davranışlarının takip edilmesi sağlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Azathioprine, Manyetik nanoparçacıklar, Katı lipid nanoparçacıklar, Manyetik katı lipid nanoparçacıklar, Teknesyum, Radyoişaretleme, Hücre kültürü.



**ABSTRACT****BIO-COMPATIBLE MAGNETIC SOLID LIPID NANOPARTICLE  
DELIVERY SYSTEM DESIGN FOR AZATHIOPRINE:  
CHARACTERIZATION, RADIOLABELING AND *IN VITRO*  
STUDIES**

TÜRKKANI, Gökçe

MSc. Thesis Department of Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

February 2022, 56 pages

In this master thesis study, it is aimed to synthesize azathioprine (AZA) loaded magnetic solid lipid nanoparticles and radiolabeled with technetium-99m and to evaluate its biological behaviour of designed system *in vitro*. Structural characterization of synthesized magnetic solid lipid nanoparticles (SLMNP) was performed by Dynamic Light Scattering (DLS) method, Zeta Potential Analysis, Scanning Electron Microscopy (SEM) imaging. Azathioprine loaded magnetic solid lipid nanoparticles were radiolabeled with technetium-99m. Quality control studies of azathioprine loaded radiolabeled magnetic solid lipid nanoparticles ( $^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP) were performed by Thin Layer Radiochromatography (TLRC) and dose calibrator methods. Magnetic solid lipid nanoparticles have been synthesized via hot homogenization technique. A trial of azathioprine loading was performed via High Liquid Chromatography (HPLC) on SLMNP structures with three different drug ratios and highest yield has been found as 86 % with 2,5 mg azathioprine ratio. After labeling with  $^{99m}\text{Tc}$ , measurement was taken with the dose calibrator. The radiolabeling yield was obtained as 90.3% for AZA-SLMNP.

The biological behavior of azathioprine loaded radiolabeled magnetic solid lipid nanoparticles ( $^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP) was monitored *in vitro* in HaCaT cell line.

Keywords: Azathioprine, Magnetic nanoparticles, Solid lipid nanoparticles, Magnetic solid lipid nanoparticles, Technetium, Radiolabeling, Cell culture



## ÖNSÖZ

Günümüzde nano boyutlu parçacıklar, ileri teknoloji malzemelerinin en temel hammaddeleri olup, çok farklı sektörlerde uygulamaları yaygınlaşmış durumdadır. Sağlık ve biyoteknoloji alanı nanomalzemelerin en etkin kullanıldığı alanlardan biridir. Nanomalzemeler kanser gibi ölümcül hastalıkların tanı ve tedavisinde ileri teknoloji sistemlerinin kullanılması açısından önemli gelişmeler yaratmıştır.

Nano yapılı kompozit malzemeler, bileşenlerini oluşturan farklı malzeme yapılarının özelliklerini tek bir yapıda birleştirmekte ve böylelikle multifonksiyonel ürünler ortaya çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında da tasarlanan manyetik katı lipid nanoparçacıklar multifonksiyonel malzemelerden birisi olmuştur. Hem manyetik nanoparçacık hem katı lipid nanoparçacıkların sağladığı avantajlar tek bir malzeme yapısında toplanmıştır.

Yoğun çalışmalar sonucu elde edilen bu ileri teknoloji nanomalzemenin, pek çok hastalığın ve çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan azathioprine ilaç etken maddesi için taşıyıcı ve hedefleyici sistem olarak kullanılması bu çalışmayı daha da değerli kılmıştır.

Böylesine değerli ve çeşitli faydalar sağlayacağını düşündüğüm bir çalışmayı yürütmüş olmaktan onur duymaktayım. Çalışmalarım boyunca edindiğim bilgi, tecrübe ve birikimlerin beni geliştirdiğine inanıyorum.

İZMİR

21.01.2022

Gökçe TÜRKKANI



## TEŞEKKÜR

Değerli bilgileri ve tecrübeleriyle bana her zaman yol gösteren, desteğini bütün yüksek lisans eğitimim boyunca hissettiğim saygı değer danışman hocam Prof. Dr. Serap TEKSÖZ' e teşekkürlerimi sunarım.

Eğitimim süresince her türlü imkânı sağlayan Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı Başkanlığına ve Nükleer Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında her türlü imkânı sağlayan Enstitü Müdürlüğüne, tezimin her aşamasında benden hiç bir yardımı ve desteği esirgemeyen, her zaman cesaretlendiren çok değerli hocam Doç.Dr. Çiğdem İÇHEDEF' e, hücre çalışmalarında destek olan Dr. Özge Kozguş GÜLDÜ' ye, birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım Burcu AYDIN ve Oğuz ÇETİN' e bana sağladıkları bütün yardım ve destekler için teşekkür ederim.

Sonsuz sevgi ve anlayışla hep yanımda olan aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ederim.

Gökçe TÜRKKANI



**İÇİNDEKİLER****Sayfa**

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
TEŞEKKÜR.....	xiii
İÇİNDEKİLER.....	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
TABLolar DİZİNİ.....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxii
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler.....	5
2.1.1 Manyetik nanoparçacıklar (MNP).....	6
2.1.2 Katı lipid nanoparçacıklar (SLN).....	7
2.2 Azathioprine.....	9
2.3 Radyofarmasötikler.....	10

**İÇİNDEKİLER (Devam)****Sayfa**

2.4 Teknesyum Kimyası ve Radyoışaretleme.....	12
2.5 Kalite Kontrol Yöntemleri.....	13
2.5.1 İnce tabaka kromatografisi ve ince tabaka radyokromatografisi.....	14
2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	16
2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları.....	17
2.6.1 Zeta potansiyeli analizi.....	17
2.6.2 Dinamik Işık saçılımı (DLS).....	18
2.6.3 Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR).....	19
2.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	20
2.7 Hücre Kültürü.....	22
3. METERYAL VE METOD.....	23
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	23
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	23
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	24

**İÇİNDEKİLER (Devam)****Sayfa**

3.2 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyonu.....	26
3.2.1 Manyetik nanoparçacıkların sentezi.....	26
3.2.2 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların sentezi .....	27
3.2.3 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların karakterizasyonu.....	29
3.2.3.3 SEM analizi.....	30
3.2.3.4 FTIR analizi.....	30
3.2.4 İlaç yükleme kapasitesi.....	31
3.3 Radyoışaretleme.....	31
3.3.1 Radyoışaretleme Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri .....	32
3.4 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları.....	32
3.4.1 Hücre çalışmaları.....	32
3.4.1.1 Hücre ekimi ve pasajlama.....	32
3.4.1.2 İnkorporasyon çalışmaları.....	33

**İÇİNDEKİLER (Devam)****Sayfa**

4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Yapı ve Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi.....	36
4.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) sonuçları.....	39
4.1.3 FTIR sonuçları.....	40
4.1.4 Azathioprine ve Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların HPLC analiz sonuçları.....	41
4.1.5 Manyetik katı lipid nanoparçacıkların Azathioprine yükleme kapasitelerinin belirlenmesi.....	42
4.2 Radyoışaretleme.....	43
4.2.1 İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) analiz sonuçları .....	43
4.3 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları.....	46
4.3.1 İnkorporasyon çalışmaları.....	46
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	48
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	56

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 2. 1 Biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanoparçacık çeşitleri.....	5
Şekil 2. 2 İlaç taşıma için multifonksiyonel nanoparçacıklar (Erdoğan, 2018).....	6
Şekil 2. 3 Manyetik ilaç salınım sisteminin sematik gösterimi. ....	7
Şekil 2. 4 Katı Lipid Nanoparçacık .....	9
Şekil 2. 5 6-[(1-metil-4-nitro-1-H-imidazol-5-il) tiyo] -9-H-pürin .....	10
Şekil 2. 6 <sup>99</sup> Mo/ <sup>99m</sup> Tc jeneratörü.....	13
Şekil 2. 7 TLRC ile örnek karışımın ayırılması.....	15
Şekil 2. 8 HPLC sisteminin şematik gösterimi.....	16
Şekil 2. 9 Sıvı içerisindeki parçacığın şematik gösterimi.....	18
Şekil 2. 10 Stokes-Einstein eşitliği .....	19
Şekil 2. 11 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	20
Şekil 2. 12 Taramalı elektron mikroskobu cihazının şematik yapısı.....	21
Şekil 3. 1 Manyetik nanoparçacık sentezi düzeneği.....	27
Şekil 3. 2 Sıcak homojenizasyon yöntemi ile AZA-SLMNP sentezi.....	28
Şekil 4. 1 MNP boyut dağılım grafiği.....	36
Şekil 4. 2 AZA-SLMNP boyut dağılım grafiği .....	37
Şekil 4. 3 Manyetik nanoparçacıklarının zeta potansiyel dağılım grafiği .....	38

**ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)**

<b><u>Şekil</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 4. 4 AZA-SLMNP zeta potansiyel dağılım grafiği .....	38
Şekil 4. 5 Azathioprine yüklü manyetik lipid nanoparçacıkların 100k x büyütmede SEM görüntüsü.....	39
Şekil 4.6 Azathioprine yüklü manyetik lipid nanoparçacıkların 120k x büyütmede SEM görüntüsü.....	39
Şekil 4.7 SLMNP 'ye ait FT-IR spektrumu.....	40
Şekil 4. 8 Azathioprine'e ait HPLC Kromatogramı. ....	41
Şekil 4. 9 Azathioprine kalibrasyon grafiği.....	42
Şekil 4.10 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların HPLC Kromatogramı.....	43
Şekil 4.11 <sup>99m</sup> Tc-MNP-SLN örneğinin ACN banyosundaki TLRC kromatogramı .....	45
Şekil4.12 <sup>99m</sup> Tc-AZA-MNP-SLN örneğinin ACN banyosundaki TLRC kromatogramı.....	45
Şekil 4.13 Radyoişaretli AZA-SLMNP' ın HACAT hücreleri üzerindeki zamana karşı bağlanma verimleri .....	47

**TABLolar DİZİNİ****Tablo****Sayfa**

Tablo 4.1  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen Rf değerleri..  
.....44

Tablo 4.2  $^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP nanoparçacıklarının ve  $^{99m}\text{Tc}$  'un HACAT hücre  
hattında zamana karşı bağlanma verimleri.....46

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ****Kısaltmalar**

AZA	Azathioprinee
SLN	Katı lipid nanoparçacık
MNP	Manyetik nanoparçacık
AZA-SLMNP	Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacık
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
TLRC	İnce Tabaka Radyokromatografisi
FTIR	Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi
<sup>99m</sup> Tc	Teknesyum
<sup>99m</sup> Tc-AZA-SLMNP	Teknesyum ile radyoişaretleli Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacık
SF	Serum Fizyolojik

## 1.GİRİŞ

Nanoteknoloji ve nanomalzemelerin kanser gibi artan ve ölümcül olan hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanımı gün geçtikçe önem kazanmaktadır. Nanoparçacıklarla hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması özellikle kanser tedavisi için umut verici bir yöntemdir. Bu sayede nanoteknoloji sağlık alanında özellikle kanser tanı ve tedavisindeki uygulamalarda geliştirilmiş özellikleri ile bu alanda kullanılacak üstün özellikli yeni malzemelerin ortaya çıkmasına da olanak sağlamıştır.

Son yıllarda, çeşitli nanoparçacıkların etkili ilaç taşıyıcı sistemler olarak geliştirilmesi konusunda önemli çabalar sarf edilmiştir. Küçük boyut ve geniş yüzey alanına sahip ilaç taşıyıcı sistemler ligand, antikör ve diğer fonksiyonel gruplarla kaplanmaya uygundur. Nanoparçacıklar bu yaklaşımla vücuttaki belirli yerlere veya hücrelere hedeflenebilirler (Rostami, et al., 2014). Katı lipid nanoparçacıklar (SLN'ler), 1991 yılında piyasaya sürülerek lipozomlar, emülsiyonlar ve polimer yapılı mikro ve nanoparçacıklar gibi geleneksel olarak kullanımı yaygın kolloidal taşıyıcılara alternatif ilaç taşıma sistemleri olma amacıyla ortaya çıkmıştır. SLN'ler geleneksel sistemlerin avantajlarını birleştirirken, yarattıkları dezavantajları ortadan kaldırmaktadır. Manyetik nanoparçacıkların tanı veya tedavi amacıyla kullanılması, son yirmi yılda oldukça yaygınlaşmıştır. Demir oksit nanoparçacıklar, manyetik ilaç hedefleme uygulamalarında kullanım alanı bulmuştur (Schwaminger, et al., 2015). Harici bir manyetik alandaki demir oksit nanoparçacıkları istenen hedef alana yönlendirilebilirler.

Manyetik yüklü katı lipid nanoparçacıkları, ilaç hedeflemede uygulamaları olan nanokompozit malzemelerdir. Genellikle inorganik manyetik nanoparçacıklar ve katı lipid nanoparçacıkların kombinasyonlarından oluşan kompleks yapılardır. Biyolojik olarak bozunabilen, manyetik özelliklere sahip manyetik yüklü katı lipid nanoparçacıklar, ilaç hedefleme gibi uygulamalarda başarılı sonuçlar vermektedirler. Lipozomlar, miseller, polimerler, antikörler gibi pek çok bilinen çeşitli ilaç taşıma sistemleri araştırılmaktadır.

Bu nanoboyuttaki taşıma malzemelerinin terapötik uygulamalarda etkinlik ve toksisite dengesini olumlu yönde etkilediği ile ilgili önemli sonuçlar ortaya çıkmıştır. Bu doğrultuda manyetik özellikli katı lipid nanoparçacıklar, ilaç hedeflemede biyouyumlu, biyobozunur ve iyi toleranslı malzemeler olarak literatürde yer almaktadır (Muñoz de Escalona, et al., 2016).

Bu çalışmada, bağışıklık sistemi baskılayıcı etkisiyle pek çok hastalığı tedavi etme amacı ile kullanılan ve bunun yanında bir anti-kanser ajanı olan Azathioprine kullanılmıştır. Bir merkaptopurin türevi olan Azathioprine katı kristal halde bulunur ve formal ismi 6 - [(1-metil-4-nitro-1H-imidazol-5-il) tiyo] - 9H-purin dir (Sodeifian, et al., 2020). Azathioprine; sitotoksik aktiviteye sahip, otoimmün hastalıklarında, akut lenfoblastik lösemi tedavisinde ve organ nakillerinde bağışıklık baskılayıcı olarak kullanılan tiyopurin ailesine ait bir ilaç etken maddesidir (Hernández-Breijo, et al., 2011).

Yapılan literatür çalışmasında hastaların Azathioprine' in oral olarak kullanması, kemik iliği depresyonu, lökopeni veya trombositopeni gibi yan etkilere sebep olduğunu, seyrek olarak da anemi, hepatotoksisite, trombositoz ve ayrıca kanserojenite gibi ciddi yan etkilere neden olabileceğini göstermektedir. Syed ve arkadaşları iltihaplı romatizma tedavisinde Azathioprinein gastrointestinal yan etkilerini önlemek için Azathioprinei katı lipid nanoparçacıklara sıcak homejizasyon yöntemi ile yüklemişlerdir ve transdermal film formunda pasif hedefleme üzerine çalışmışlardır (Syed, et al., 2018).

Radyoışaretli ilaçlar, nükleer tıp alanında tanı ve tedavi amacı ile yaygın olarak kullanılmaktadırlar ve radyofarmasötik olarak tanımlanmaktadır. Radyofarmasötikler, radyoaktiviteyi hedefe taşınmasını sağlayan, hedef dokuya seçici bir ligand ve liganda bağlanmış olarak yaydığı radyasyon sayesinde hedef dokunun tanı amacı ile görüntülenmesine veya tedavi edilmesine olanak sağlayan radyonüklitten meydana gelmektedir. Hastanın en düşük radyasyon dozunu alacağı şekilde tasarımları gerçekleştirilir.

Radyoişaretli nanoparçacıklar kanser araştırmalarında büyük potansiyeli olan yeni bir radyofarmasötik ajan sınıfını temsil eder. Radyoişaretli nanoparçacıklar spesifik tümör görüntüleme veya etkili tümör tedavisi için kullanılabilir (Sanad et al., 2019).

Bu çalışmada kullanılmış olan radyonüklid, 6,01 saatlik yarı ömre sahip, 140,5 keV gama enerjisi yayan Teknesyum-99m (<sup>99m</sup>Tc) dir. Sintigrafik görüntülemeler için sahip olduğu kısa yarıömrü ve uygun gama enerjisi yayma özelliği nedeniyle ideal bir çözünürlüğe sahiptir.

Nükleer Bilimler Enstitüsü' nde radyoişaretli nanoparçacık sistemlerinin sentezi ve bunların biyolojik davranışını içeren çalışmalar yapılmıştır. İç hedef ve arkadaşları tarafından Guanin manyetik nanoparçacıklarının teknesyum (I) koru ile radyoişaretlenmesi sağlanarak, bu yapının biyolojik davranışını *in vivo* ve *in vitro* olarak incelemişlerdir (İç hedef ve ark., 2012). Bir başka çalışmada antikanser ilaç olarak seçilen paklitaksel, katı lipid nanoparçacıklara yüklenerek teknesyum (I) koru ile radyoişaretlenmiş ve oluşturulan bu sistemin biyolojik davranışları *in vitro* ve *in vivo* olarak çalışılmıştır (Uçar ve ark., 2017). İç hedef ve arkadaşları radyoişaretli gemcitabine yüklü polimerik nanoparçacıkların biyolojik davranışlarını *in vivo* olarak Albino Wistar sıçanlar üzerinde incelemişlerdir. Yılmaz ve arkadaşları ise radyoişaretli polimer kaplı manyetik nanoparçacıkların *in vitro* davranışlarının incelenmesini amaçlayan bir çalışma gerçekleştirmişlerdir (İç hedef ve ark., 2020, Yılmaz ve ark., 2021). Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalında yapılan bir çalışmada dosetaksel (DTX) yüklü polimerik nanoparçacık formülasyonu içeren bir malzeme sentezlenerek teknesyum-99m (I) trikarbonil koru ile radyoişaretlenerek bu yapının biyolojik davranışı *in vitro* olarak incelenmiştir (Çetin ve ark., 2020). Diğer bir çalışmada ise demir oksit nanoparçacıkları içeren malzemeye metotreksat (MTX) konjugasyonu sağlanıp radyoişaretli bir ilaç-nanoparçacık sistemi hazırlanmış ve biyolojik davranışları *in vitro* olarak incelenmiştir (Uzuğ 2021).

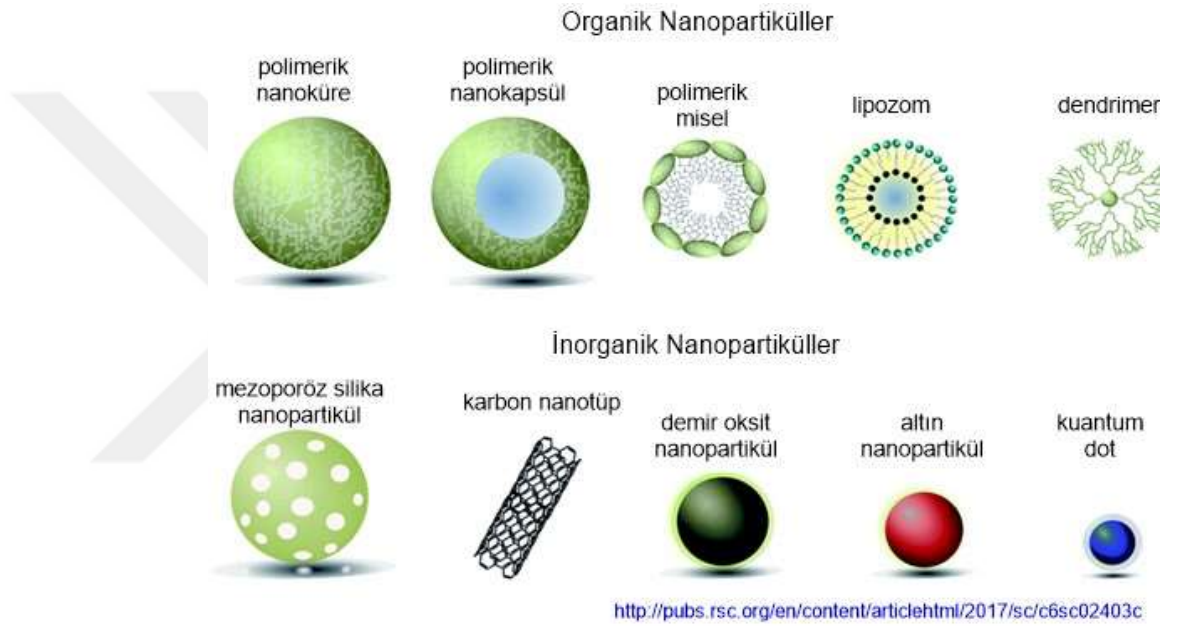
Bu Yüksek Lisans Tez çalışmasında azathioprine, manyetik katı lipid nanoparçacıklara (SLMNP) yüklenip,  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenerek hedefe yönelik bir ilaç taşıma sistemi tasarlanması amaçlanmıştır.  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların inkorporasyon çalışmaları HaCaT insan deri normal keratinosit hücreleri üzerinde yapılmıştır. Böylelikle azathioprine yüklü  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli manyetik katı lipid nanoparçacıkların karakterizasyonu ve *in vitro* biyolojik davranışı çalışılmıştır. Sistemin ileriki zamanlarda yapılacak olan çalışmalarla tanı ve tedavi amacı ile klinik öncesi ve klinikte kullanılacak radyoişaretli ilaç taşıma sistemlerine ışık tutacağı düşünülebilir.



## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Nanoteknoloji ve İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoteknoloji malzemelerin en küçük yapısal biriminde, atomik ve moleküler boyutta sahip olduğu özelliklerinin değiştirilmesi ve yönlendirilmesi ile yeni ve farklı özelliklere sahip yapıların oluşturulmasıdır. Nanoteknoloji ürünü malzemelerin boyutları 1-100 nanometre (nm) aralığındadır (Hong et.al., 2009) .

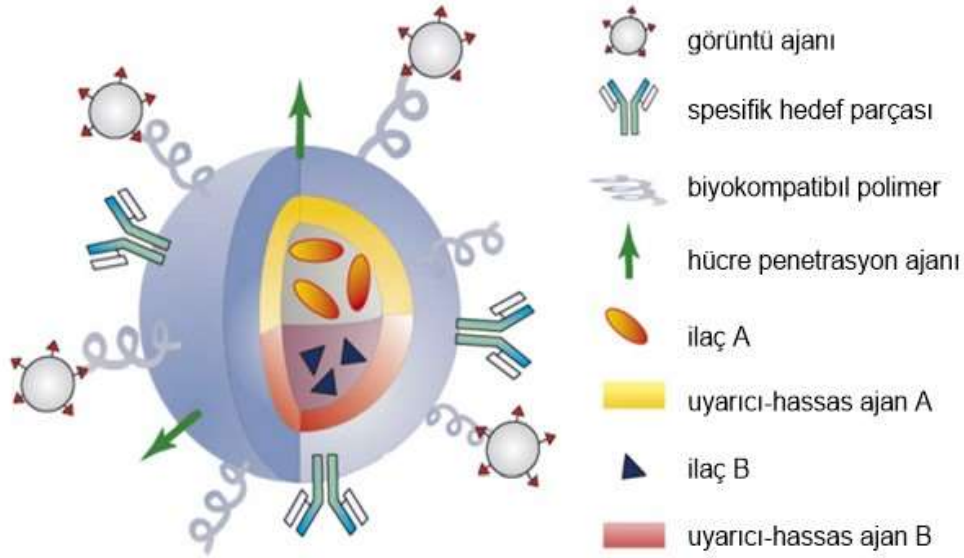


Şekil 2. 1 Biyomedikal uygulamalarda kullanılan nanoparçacık çeşitleri

1959 yılında modern nanoteknolojinin tanımını ilk kez Feynman yapmıştır (Edwards , 2006). Smalley karbon nanotüpleri keşfederek 1996 yılında kimya Nobel ödülünü almaya hak kazanmıştır (Smalley, 2002). Nanoteknoloji, ortaya çıktığından bu yana farklı disiplinler arasında pek çok köklü etkiler yaratmıştır ve tartışmasız sağlık alanı en önemli uygulama alanlarından biri olmuştur(Şekil 2.1).

Hedefe yönelik nano boyutlu ilaç taşıma sistemleri, nanoteknolojinin sağlık alanındaki uygulamalarından birisidir. Tanı ve tedavi için nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler; radyokontrast ajanları ya da ilaçları ilgili hedef doku ve organlara kontrollü, güvenli ve etkili bir şekilde taşınmasını sağlar.

Özellikle kanser araştırmalarında fonksiyon kazandırılmış ve modifiye edilmiş nano-ilaç taşıma sistemlerinin etkinliği hakkındaki yapılan çalışmalar umut vericidir. Byylelikle, ilaç molekülerinin ilgili kanser dokusuna ulaşmasında zorluk yaratan beyin ve kan bariyeri benzeri engelleri aşmasına olanak sağlanmış ve yapılan uygulamalardan başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Nano boyutlu malzemeler ile hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerine ilk adımlar miseller ve lipozomlar ile atılmıştır (Vural vb., 2015). Günümüzde ise bunlara alternatif olarak karbon nanotüpler, katı-lipid nanopartiküller, dendrimerler, fullerenler, manyetik nanoparçacıklar, polimerik sistemler, kristal formda yarı iletken özellikli nano boyutlu yapılar (kuantum dotları), metal oksitler ve benzeri daha geniş yelpazede önümüze çıkan nano-ilaç sistemleri kullanılmaktadır (Maragoz, 2018).

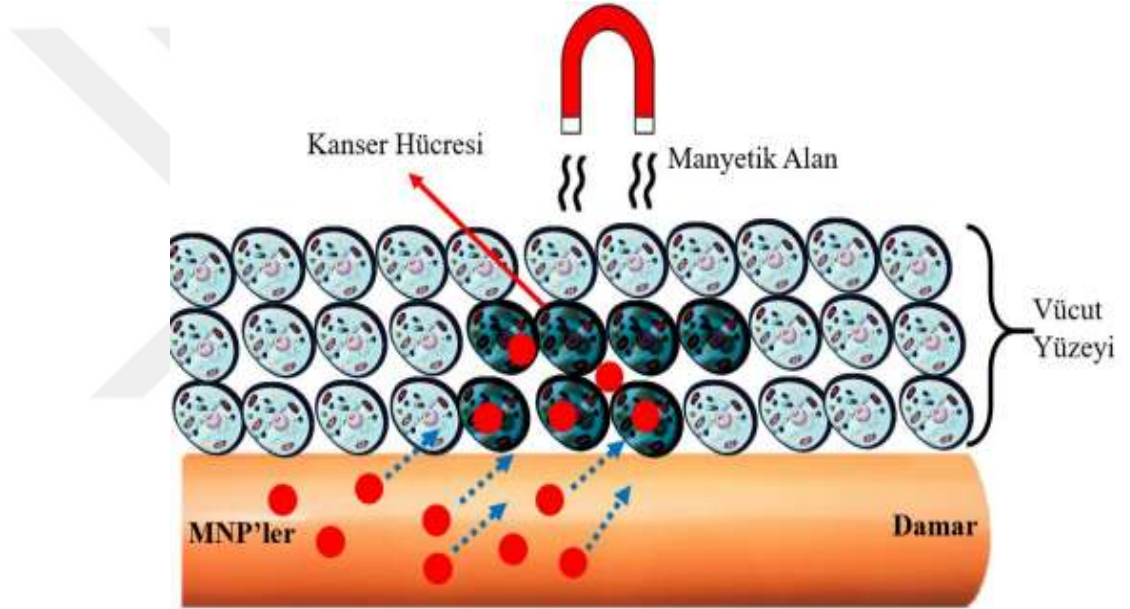


şekil 2. 2 İlaç taşıma için multifonksiyonel nanoparçacıklar (Erdoğan, 2018)

### 2.1.1 Manyetik nanoparçacıklar (MNP)

Manyetik nanoparçacıklar (MNP) , önemli manyetik özelliklere ve kimyasal yapıya sahiptirler. Bu malzemelere örnek olarak ;  $Fe_3O_4$  (manyetit) ,  $Fe_2O_3$  (maghemit) ,  $MO.Fe_2O_3$  (M : Co, Mn, Ni veya Cu) benzeri demir oksit bileşikleri verilebilir. Kimyasal yapıları gereği neredeyse okside olmayan demir oksitler manyetik etki alanlarını kararlı bir şekilde korumaktadırlar.

Demir oksit nanoparçacıkları; nanoboyuttaki önemli manyetik özellikleri sayesinde biyomedikal uygulamalarda çokça tercih edilen nanomalzemelerdir. Demir oksit nanoparçacıkları; dışardan bir manyetik alan varlığında kolayca o bölgede toplanabilir, aynı zamanda manyetik etki ortadan kaldırıldıktan sonra yeniden kolayca dağılabilir. Süperparamagnetik özelliğinden dolayı biyotıp, biyo-ayırma ve saflaştırma, biyosensörler, transfeksiyon, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), hipertermi tedavisi ve hedefe yönelik ilaç taşıma gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Gao et al., 2017).



Şekil 2. 3 Manyetik ilaç salınım sisteminin sematik gösterimi.

### 2.1.2 Katı lipid nanoparçacıklar (SLN)

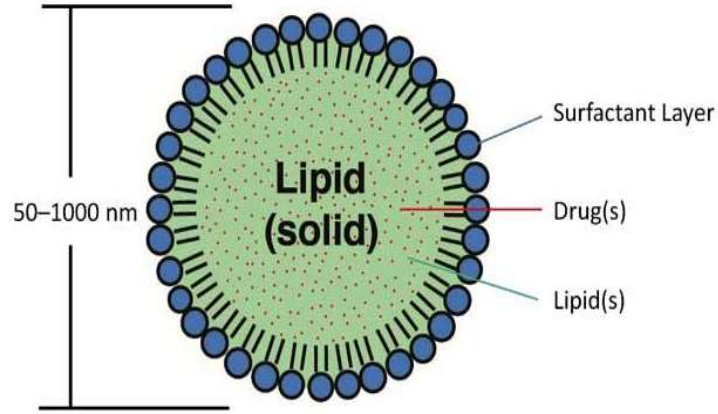
Katı lipid nanoparçacıklar (SLN'ler) 1991 yılında piyasaya sürülmüştür ve geleneksel kolloidal taşıyıcılardan olan lipozomlar, emülsiyonlar ve polimerik mikro nanoparçacıklara alternatif taşıma sistemleri olarak ortaya çıkmıştır. SLN' ler geleneksel sistemlerin avantajlarını birleştirirken, yarattıkları dezavantajları ortadan kaldırır (Rostami, et al.,2014).

Katı lipid nanoparçacıkların (SLN) boyutu 50-1000 nm aralığında değişmektedir. Oda sıcaklığı koşullarında katı olarak bulunan katı lipid nanoparçacıklar, lipid yüzeyinde tek tabaka fosfolipide ve hidrofobik bir çekirdeğe sahiptir.

Katı lipid nanoparçacıkların sağladığı bazı avantajlara; yüksek olmayan sistemik toksisite, organik yapısından dolayı düşük sitotoksisite özelliği göstermesi ve üretiminin büyük ölçekte mümkün olması sayılabilir. Ayrıca etkin maddenin uzun sürede salınımı ve kimyasal bozunmaya karşı etkin maddelerin korunması gibi polimerik nanoparçacıkların özelliklerini de gösterirler (Runge et al., 1998).

Katı lipid nanoparçacıklar, boyutları ve sağladıkları avantajlı özellikleri nedeniyle yeni terapötikleri geliştirme imkanı sağlamaktadır. Son yıllarda, çeşitli nanoparçacıkların etkili ilaç taşıyıcı araçlar olarak geliştirilmesi konusunda önemli çabalar sarf edilmiştir. Katı lipid nanoparçacıklar küçük boyutları ve geniş yüzey alanları nedeniyle; işlevselleştirilmiş ligandlar, antikor ve diğer fonksiyonel gruplarla kaplanmaya uygundur. Nanoparçacıklar, bu yaklaşımla vücuttaki belirli yerlere veya hücrelere hedeflenebilirler.

Katı lipid nanoparçacıklar, içerdiği etken maddenin hareketliliğini kısıtlayarak, sızıntı oluşumunu engeller ve hedeflenen dokuya kadar sağlıklı bir şekilde taşınmasını sağlar.



Şekil 2. 4 Katı Lipid Nanoparçacık

## 2.2 Azathioprine

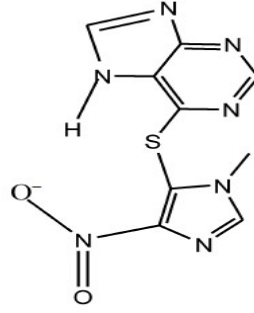
Azathioprine ilk olarak George Herbert Hitchings ve Gertrude Elion tarafından 1957 'de sentezlenmiştir ve kemoterapi ilacı olarak kullanılmıştır. Bağışıklık sistemindeki etkisi 1958 'de keşfedilmiştir. Organ nakillerinden sonra vücudun tepkisini yatıştırması üzere kullanılmaya başlanmıştır.

Azathioprine, kristal katı formda bulunan bir tür merkaptapürin türevidir. Molekül ağırlığı 277.26 g/mol 'dür. Kimyasal ismi 6-[(1-metil-4-nitro-1-H-imidazol-5-il) tiyo] -9-H-pürin 'dir ve moleküler yapısı Şekil 2.5' de verildiği gibidir.

Azathioprine, düşük çözünürlüğe ve düşük geçirgenliğe sahip; immünosupresif, anti-romatizmal bir ilaçtır. Azathioprinein çözünürlüğü su ve sulu çözeltilerde çok düşüktür. Alkol ve kloroformda çözünmez, organik çözücülerde (DMF,DMSO vb.) çözünürlüğü oldukça yüksektir.

T-lenfosit kaynaklı gecikmiş bağışıklık yanıtlarını baskılayan ve öncelikle organ nakillerinde naklin reddini önlemek için kullanılan bir bağışıklık baskılayıcı ilaçtır.

Azathioprine, romatoid artrit, organ nakli, Crohn hastalıkları, kronik aktif hepatit, sistemik lupus eritematozus, poliartitit nodosa tedavilerinde kullanılmaktadır. Ayrıca, Azathioprine bazı kanserlerin ve enflamatuar bağırsak hastalıklarının tedavisi için kullanılmaktadır (Hernández-Breijo et al., 2011).



Şekil 2. 5 6-[(1-metil-4-nitro-1-H-imidazol-5-il) tiyo] -9-H-pürin

Hastaların Azathioprinei oral olarak kullanması, kemik iliği depresyonu, lökopeni veya trombositopeni gibi yan etkilere sebep olmaktadır. Seyrek olarak da anemi, hepatotoksisite, trombositoz ve ayrıca kanserojenite gibi ciddi yan etkilere neden olabilmektedir (Syed,A et al., 2018).

### 2.3 Radyofarmasötikler

Radyofarmasötikler, nükleer tıp alanında tanı ve tedavi amacı ile yaygın olarak kullanılan radyoaktif ilaçlardır. Radyofarmasötikler, radyoaktiviteyi hedefe taşınmasını sağlayan, hedef dokuya seçici bir ligand ve liganda bağlanmış olarak yaydığı radyasyon sayesinde hedef dokunun tanı amacı ile görüntülenmesine veya tedavi edilmesine olanak sağlayan radyonüklitten meydana gelmektedir.

Metabolik taşıyıcılar radyoaktif maddeleri hedeflenen doku veya organlara taşır, radyoaktif madde bu dokularda ışınım yapar ve bu sayede görüntüleme cihazlarında hastalığın tanısı koyulabilir ve tedavisi yapılabilir. Nükleer Tıpta kullanılan radyofarmasötiklerin yaklaşık % 95'i tanı, geri kalanları da tedavi amaçlı kullanılmaktadır (Ertay,T., 2019).

Terapötik amaçlar için uygun olan radyofarmasötikler, tümöre güçlü bir şekilde bağlanır ve aynı zamanda yüksek bir tümör afinitesi olan araçlardır. Gerekli radyasyon dozlarını doğrudan hedeflenen tümörlü bölgelere ve metastazlarına ulaştırabilir ve böylelikle tümör olmayan sağlıklı dokuların radyoaktiviteden zarar görmesi engellenmiş olunur. Radyoaktiviteyi tümör bölgesine taşıyacak uygun molekülün seçilmesi ve kullanılması, tümörün hedef yapısı olan antijen veya reseptörlerine olan afinitesi veya bağlanma gücüne göredir. Taşıma sistemine konjüge olan radyonüklidlerin ilgili bölgede yaydığı iyonlaştırıcı radyasyon, tümör hücrelerinin DNA yapılarında zarar vererek yapısının bozulmasına sebep olur ve tümörlerin küçülmesini sağlar.

Radyofarmasötiğin stabilitesi, radyonüklid işaretleme ve moleküler görüntüleme için oldukça önemlidir. Moleküler görüntülemede kullanılan radyofarmasötikler *in vitro* ve *in vivo* ortamlarda stabil kalmalıdır. Işık, sıcaklık ve pH pek çok bileşiğin kimyasal yapısına zarar vererek bozulmasına sebep olur. Bundan dolayı radyoişaretli malzemeler belirlenen en uygun fizikokimyasal şartlarda hazırlanmalı ve saklanmalıdır. *In vivo* ortamda metabolik olarak bozunmuş radyofarmasötikler biyolojik ortamda istenmeyen radyoaktif dağılımlara neden olur ve görüntü kalitesinin bozulmasına yol açar. Radyofarmasötik tasarımında işaretlemeden sonra dikkat edilmesi gereken durumlardan birisi de radyonüklid malzeme stabil olarak kalmalı ve bozunmamış radyoişaretlenmiş malzeme kararlı metabolik yapıda olmalıdır.

İdeal bir radyofarmasötiğin sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi sayılabilir:

- Uzun süre boyunca ve zorlu şartlar altında stabil kalabilmesi,
- Kolay elde edilebilirlik ve ulaşılabilirlik,
- Fiziksel ve efektif olarak uygun yarı ömür,
- Teşhis veya tedavi hedefine uygun olarak istenilen enerjiye sahip olan radyonüklid,

- Yüksek hedef/hedef dışı aktivite oranı,
- Uygun farmasötik seçimi,
- Metabolik olarak uyumlu özelliğe sahip olması.

Teşhis amacı ile kullanılan radyonüklidlerin yaydığı foton veya gama ışınları insan fizyolojisinde bulunan karbon, azot, oksijen gibi düşük atom numaralı olan elementlerle herhangi bir girişim ve etkileşime girmezler (İçhedef, 2010). Sahip olduğu kimyasal özellikler sebebiyle,  $^{99m}\text{Tc}$  tanı amacı ile kullanımı önde gelen radyonüklidlerdendir.

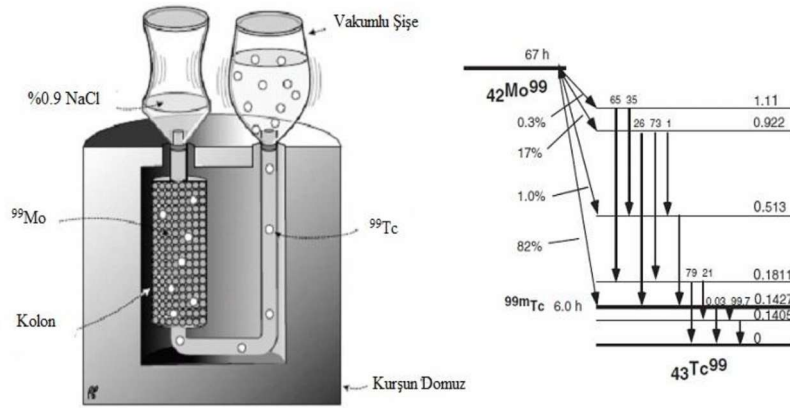
#### 2.4 Teknesyum Kimyası ve Radyoişaretleme

Teknesyum, İtalyan kökenli bilim insanları Carlo Perrier ve Emilio Segre'nin 1937 senesinde keşfettiği, yapay olarak elde edilmiş ilk elementtir. Molibdenin döteronlar ile ışın bombardımanı sonucunda ortaya çıkmıştır. Periyodik cetvelde yedinci grupta yer almaktadır. 43 atom numarasına sahip teknesyum zengin bir koordinasyon kimyasına sahiptir. Tc simgesi ile gösterilmektedir. Nemli ortamda kolayca okside olabilen gri renkli bir metaldir (Abram and Alberto, 2006).

Teknesyum, sekiz farklı yükseltgenme basamağına sahiptir -1'den +7'ye kadar ve bu durum çeşitli ligand oluşumlarına olanak sağlar. Teknesyumun en sık karşılaşılan yükseltgenmiş değerlikleri +7, +5, ve +4'tür. Yükseltgenmiş teknesyum (VII) perteknetat iyonu,  $\text{TcO}_4^-$  şeklinde bulunur. 22 tane teknesyum izotopuna rastlanmıştır (İçhedef, 2010; Abram and Alberto, 2006). Bu izotopların kütle numaraları 90 ile 111 arasında değişmektedir.

Teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) in bütüm izotopları radyoaktiftir. 6 saat yarılanma ömrüne ve 140 keV gama enerjisine sahip olması sebebiyle görüntülemeler için uygun bir rezülasyona özelliği göstermektedir.

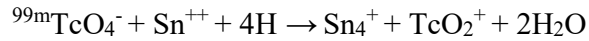
$^{99}\text{Mo}$ ' in bozunması sonucu oluşan  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , sodyum perteknetat ( $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ) halinde,  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  jeneratöründen elde edilmektedir (Şekil 2.6). Teknesyum- $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , sahip olduğu bu özellikleri sayesinde klinik çalışmalarda görüntüleme için oldukça yaygın olarak kullanılması tercih edilen radyonüklidlerden birisidir (Abram and Alberto, 2006).



Şekil 2. 6  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$  jeneratörü

İndirgenen  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{+7}$  ligandlarla bağlanabilmektedir. Kalay klorür, konsantre HCl, sodyum, kalay tartarat, kalay sitrat, demir sülfat gibi bir çok indirgeyici ajan kullanılarak  $^{99\text{m}}\text{Tc}^{+7}$  'nin indirgenmesi sağlanmaktadır. İndirgenmiş  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  şelatlanması oda sıcaklığında ve pH 5-7 arasında bir reaksiyon ile gerçekleştirilir.

Aşağıda asidik ortamda teknesyum (VII) perteknetat iyonunun kalay(II) iyonu ile indirgenmesinin tepkime denklemi verilmiştir. (Ünak vd., 2018).



## 2.5 Kalite Kontrol Yöntemleri

Karışımları tanımlamak amacı ile kullanılan en temel kalite kontrol yöntemlerinden birisi kromatografidir.

Kromatografi ; bir karışımı oluşturan bileşenlerin, biri sabit diğeri hareketli iki faz yardımıyla ayrılması ve saflaştırılması işlemine verilen ayırma yöntemi ismidir. Karışım içerisindeki bileşenlerin ayrılması, hareketli ve sabit faza olan afinitelerine göre olmaktadır (Skoog et al., 1997).

20. yy başlarında, Rus botanikçi Mikhail Tswet bitki pigmentlerini (klorofil, karotenoit) adsorbsiyon kromatografisi ile ayırma çalışması yaparak ilk defa kromatografi terimini kullanmış olmuştur. (Williams, 2002).

En sık kullanılan kromatografi tipleri ; kağıt kromatografisi, gaz kromatografisi, ince tabaka kromatografisi, kolon kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisidir.

### **2.5.1 İnce tabaka kromatografisi ve ince tabaka radyokromatografisi**

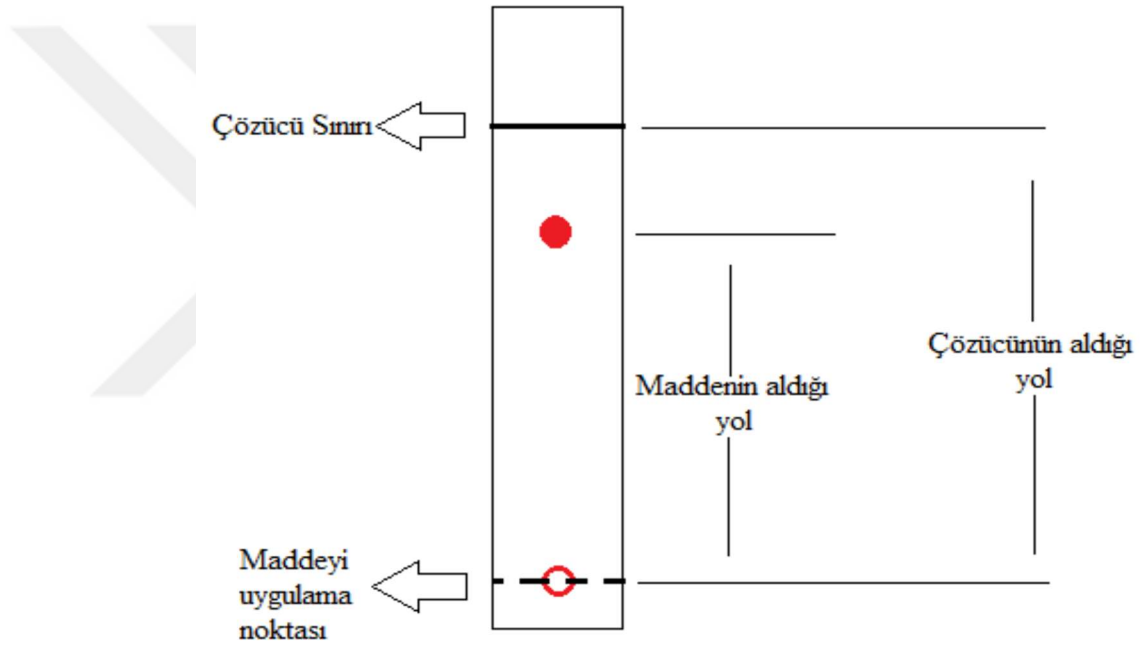
İnce tabaka kromatografisi (TLC) adsorbsiyon esasına dayanan, bir adsorbsiyon kromatografisi tekniğidir.

Sabit faz; cam , alüminyum yada plastik gibi katı destek materyali üzerine ince bir katman olarak yüklenmiş katı adsorbandır. Adsorban madde olarak plakalar; silika jel, sellüloz, poliamid gibi adsorban özellikli malzemelerle kaplanırlar. Hareketli sıvı faz (çözücü), sabit faz boyunca aşağıdan yukarıya yürüyerek bileşenlerin ayrışmasını sağlar.

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) yönteminde ,radyofarmasötik içerikli örneklerin kalite kontrolü yapılır. Örnek karışım , sabit faz üzerine yani plakanın bir ucuna damlatılır. Damlatılan örnek madde, plaka üzerinde kurduktan sonra içerisinde hareketli faz olarak çözücü bulunan TLC/ TLRC banyosuna içerisinde daldırılarak sabit durması için banyo duvarına bantlanır. Çözgen, TLC/ TLRC şeridi üzerinde kapiller etki ile plaka boyunca aşağıdan yukarıya doğru ilerler.

Bu teknikten yararlanılarak adsorbans boyunca radyofarmasötik ve radyokimyasal safsızlıklar ayrılır. Banyodan çıkartılan plakalar oda sıcaklığında kurutularak gazlı dedektörde sayılır (Meyers, 2008).

Damlatılan örnek maddenin içerisindeki her bir bileşenin TLRC şeridi üzerinde yürümesi ile aldığı yolun, çözügenin şerit üzerinde aldığı yola oranı ile bir  $R_f$  değeri hesaplanır (Şekil 2.7) .



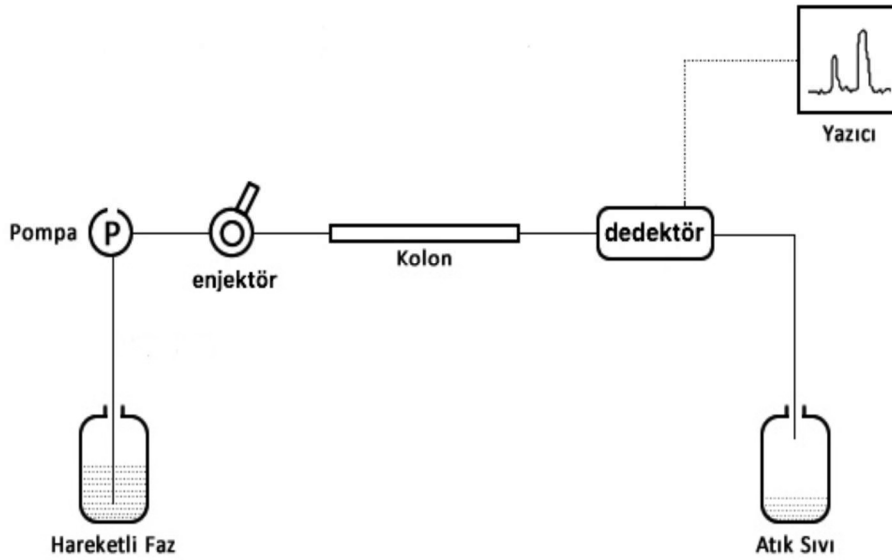
$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$

Şekil 2. 7 TLRC ile örnek karışımın ayrılması

### 2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bir örnek içerisinde karışımı oluşturan maddeleri kantitatif ve /veya kalitatif olarak analiz etmeye yarayan, aynı zamanda bileşenlerin saflaştırılması için kullanılan en yaygın kromatografik tekniklerden birisidir. Bu yöntem ile ilaçlar, pestisitler, amino asitler, antibiyotikler, proteinler, karbonhidratlar, nükleik asitler, hidrokarbonlar, terpenoidler, steroidler, metal-organik türler ve pek çok inorganik bileşiklerin miktar ve kimlik analizleri yapılabilmektedir (Skoog et al., 1997).

HPLC cihazı genel hatlarıyla; hareketli faz, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 2.8 ). Pompa, hareketli fazı kolona pompalayarak kolonda enjekte edilen örneğin ayrılması sağlar. Dedektör, ayrılan bileşenlerin yarattığı sinyalleri ölçer ve bilgisayar ekranında oluşan pikler kromatogramlar olarak kaydedilir .



Şekil 2. 8 HPLC sisteminin şematik gösterimi

Analiz edilecek örneklerin bileşenlerinin özelliklerine göre farklı dedektörler kullanılabilir. HPLC sistemlerinde en çok kullanılması tercih edilen dedektörler; görünür bölge / Ultraviyole (VIS/UV), kütle (MS), floresans (FLD), fotodiyot array (DAD), NaI(Tl) radyoaktivite dedektörleridir. Böylelikle çeşitli isteklere yönelik ölçümler alınabilir (İç hedef, 2010).

Az miktarda numune ile analiz yapabilme olanağı, yüksek duyarlılık, hızlı analiz imkanı, HPLC kolonunun pek çok kez kullanılabilmesi ve yüksek ayırma gücü yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) için sayılabilecek avantajlardır.

## **2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları**

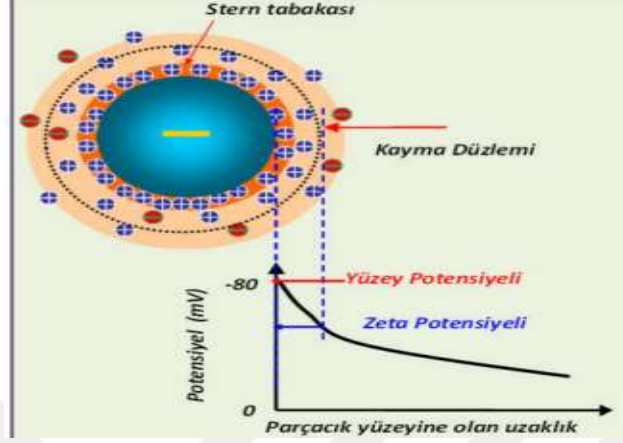
### **2.6.1 Zeta potansiyeli analizi**

Zeta potansiyel ölçümü, elektrik alanı uygulanarak hızlandırılan parçacıkların hızlarının Doppler prensibi ile ölçülmesi temeline dayanan, birimi milivolt olan bir analiz tekniğidir.

Zeta potansiyel, parçacıklar arasındaki itme veya çekme değerini ölçmektedir. Bu da kolloidal dağılımın ne kadar stabil olduğunu belirlemekte fayda sağlar. Bir sıvı içerisinde aynı yüke sahip parçacıklar birbirlerine itme kuvveti uygularken, farklı yüklere sahip parçacıklar çekme eğilimi gösterir. Sıvı içerisindeki tüm parçacıkların negatif yada pozitif zeta potansiyeli çok yüksek değerlerde ise parçacıklar birbirini itme eğiliminde olurlar ve dağılım kararlı olur. Parçacıklar düşük zeta potansiyeline sahip olduğunda ise parçacıkların birbirini itmesini sağlayacak kuvvet olmadığından topaklanma ve çökme oluşacaktır.

Zeta potansiyeli, +30 mV'dan büyük nanoparçacıklar kuvvetli katyonik ve -30 mV'dan küçük olan nanoparçacıklar kuvvetli anyonik olarak tanımlanır. Zeta potansiyeli -30 mV ile +30 mV arasında olan nanoparçacıklar kararlı yapı özelliği göstermezler. Topaklanma eğilimindedirler, dağılım özellikleri zayıftır. (Dobrovolskaia et al., 2013).

Parçacıkların içerisinde bulunduğu sıvı ortamının pH değeri zeta potansiyelini değiştirmektedir. pH değeri ve zeta potansiyel değişiminin sıfır eksenini üzerinde kesiştiği noktaya izoelektrik denir (Şekil 2.9 ).



Şekil 2. 9 Sıvı içerisindeki parçacığın şematik gösterimi.

### 2.6.2 Dinamik Işık saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılımı tekniği (DLS), nanoparçacıkların boyutlarının saptanması için kullanılan bir yöntemdir. Seyreltik sıvı çözelti içerisindeki küçük parçacıkların yaydığı ışık şiddetinin ve bu ışık şiddetinde meydana gelen değişimin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Yayılan ışığın şiddetindeki değişim, brownian hareketi de denilen parçacığın rastgele difüzyon hareketine ve buna da bağlı olarak parçacık boyutuna, ortam vizkozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Küçük boyutlu nanoparçacıklar büyük boyutlu nanoparçacıklara göre daha hızlı hareket ederler. Zamana bağlı korelasyon fonksiyonu ile ışık şiddetindeki değişim hesaplanabilir. Fonksiyon difüzyon katsayısını (D) verir ve Stokes-Einstein denkliği ile parçacığın hidrodinamik çapı bulunmuş olunur (Şekil 2.10).

## Stokes-Einstein Eşitliği

$$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

$d_H$  = Hidrodinamik Çap (m)  
 $k$  = Boltzmann Sabiti (J/K=kg·m<sup>2</sup>/s<sup>2</sup>·K)  
 $T$  = Sıcaklık (K)  
 $\eta$  = Çözelti viskozitesi (kg/m·s)  
 $D$  = Difüzyon Katsayısı (m<sup>2</sup>/s)

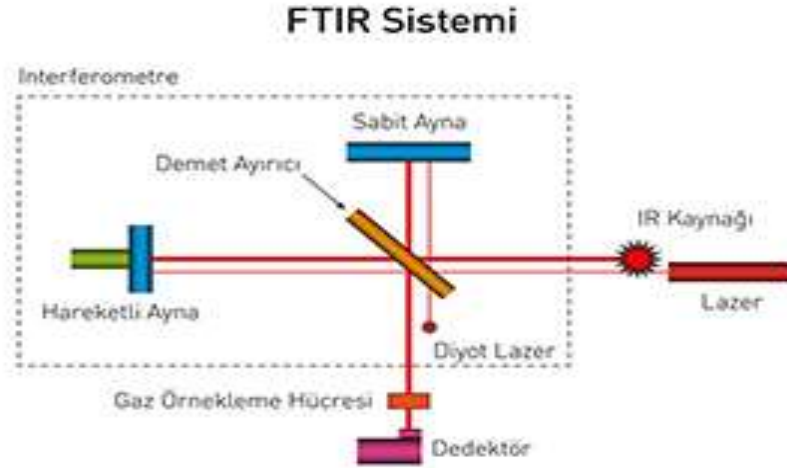
Şekil 2. 10 Stokes-Einstein eşitliği

### 2.6.3 Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Bir çeşit titreşim spektroskopisi tekniği olan Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), malzeme karakterizasyonu için en sık tercih edilen yöntemlerdendir. Matematiksel bir yöntem olan 'Fourier dönüşümü' ile IR ışınlarına karşı, moleküllerin yarattığı titreşimlerden meydana gelen dalga boylarını ölçerek hızlı ve çözünürlüğü yüksek spektrumlar oluşturmaktadır.

Bu yöntem ; kısa sürede sonuç alınması, detaylı bilgi vermesi, sarf malzeme gideri olmadığı için analizleri düşük maliyetle gerçekleştirmek gibi avantajlar sağlamaktadır.

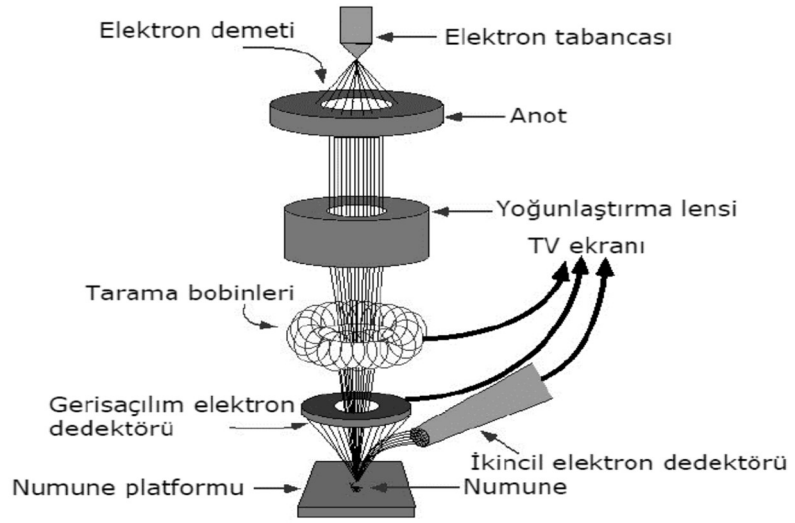
Elektromanyetik ışık spektrumunun kızıl ötesi bölgesi 14000 cm<sup>-1</sup> ile 10 cm<sup>-1</sup> arasında üç ana bölgeden oluşmaktadır. Yakın dalga boylu kızıl ötesi bölgesi (NIR; 4000 - 14000 cm<sup>-1</sup>), orta dalga boylu kızıl ötesi bölgesi (MIR; 400 - 4000 cm<sup>-1</sup>) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi bölgesi (FIR; 4 - 400 cm<sup>-1</sup>) aralığındadır. Molekülün yaptığı titreşim hareketi IR ışınlarını soğurur ve ışıma şiddeti, zamana bağlı bir fonksiyon olarak hesaplanır. Bu teknik sayesinde, moleküller arası bağların karakterizasyonu gerçekleştirilerek ; katı, sıvı, gaz veya çözelti halindeki organik yapılı bileşiklerin yapısında sahip olduğu fonksiyonel gruplar, moleküllerin benzerliği, yapıdaki bağlar hakkında bilgi, bağlanma bölgeleri ve noktaları ve yapının aromatik ya da alifatik yapıda olup olmadığı gibi malzeme ile ilgili bilgiler elde edilir.



Şekil 2. 11 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

#### 2.6.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) 'de , yüksek düzeyde enerjiye sahip elektronlar malzeme ile etkileşime girip yüzeyini tarayarak foton ve elektron sinyalleri yaratırlar. Bu sinyaller numune yüzeyinin topografisi ve kompozisyonu hakkında bilgi vermektedir. Elektronlar farklı açılara saçıldıktan sonra, dedöktörde toplanır ve oluşan sinyallerin mikroskop yazılım sistemi ile işlenmesi sonucu malzeme yüzeyinin 1 nm'den daha yüksek çözünürlükte görüntüleri elde edilmektedir.



Şekil 2. 12 Taramalı elektron mikroskobu cihazının şematik yapısı

Şekil 2.12’de Taramalı elektron mikroskobunun bölümleri gözükmemektedir. Optik kolunu ; elektron demetine kaynaklık eden elektron tabancası, yüksek gerilim sağlayarak elektronları numuneye doğru hızlandıran anot plakası, elektron demetini yönlendirmeye ve toplamaya yarayan objektif mercekleri ve kondenser, demet çapını sınırlamak için kullanılan apertüleri, malzeme yüzeyinin taraması için demeti gerekli biçimde saptıran tarama bobinlerinden oluşmaktadır. Numune ocağı, optik kolunun altında yer alır. Burada üç boyutlu olarak hareket eden numune kızıağı ve algılayıcılar bulunur.

Geri saçılma gösteren elektronlar ; atom numarası ve atomik yapı ile ilgili bilgi verirken, ikincil elektronlar malzeme topografisi hakkında bilgi sağlamaktadır.

Taramalı elektron mikroskobu; kolay örnek hazırlama, çeşitli görüntüleme seçeneklerine sahip olması ve farklı amaçlara yönelik kullanıma olanak sağlaması gibi avantajlarından dolayı yaygın olarak kullanımı tercih edilmektedir. SEM ile hacim olarak yoğun malzemelerde yüksek ayırım gücü sağlanmaktadır. Bir başka üstün özelliği de malzeme görüntüleri üç boyutlu olarak elde edilmektedir.

## 2.7 Hücre Kültürü

Hücre kültürleri, uygun sıvı besi ortamlarında birysel veya kümeler halinde büyüyen hücrelerden oluşmaktadır. Çeşitli hastalık modellerinin hücre kültürlerinde oluşturulması sağlanarak, canlı organizmalarda test edilmesi mümkün olmayan ya da zor olan hücre düzeydeki mekanizma çalışmaları gerçekleştirilebilir. Yeni ajanların canlılar üzerinde denenebilecek test dozajları ile ilgili ön bilgiler hücre kültürü çalışmaları sayesinde edinilebilir.

Farklı yöntemler ile canlı yapılardan çeşitli hücre türleri ayrılabilir. Doğrudan canlı dokudan elde edilen hücre kültürlerine 'primer kültür' adı verilir. Elde edildikleri dokunun özelliklerini taşırlar. Primer kültür, hücre kültürü için başlangıç materyalidir ve şartları uygun olarak sağlanmış bir kültür ortamında (besiyeri) çoğaltılarak pek çok deneyde kullanılabilirler. Primer kültür hücrelerinin bulunduğu besiyeri kültür ortamından alınıp çoğaltılarak oluşturulmasıyla üretilen kültürlere de 'sekonder kültür' denir. Bu yol ile üretilen sekonder hücre topluluğu, primer hücrelerin yani asıl kökenlerinin sahip oldukları özelliklerini taşımaya devam ederler.

Hücre kültürü ; kanser araştırmaları, sitogenetik, biyokimyasal çalışmalarda, gen manüplasyonu gibi moleküler ve biyolojik çalışmalarda, çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavilerinin araştırılmasında, farmasötik proteinlerin üretimi, deri mühendisliği, genetik mühendislik (protein, antikor, aşı üretimi), kök hücreler, tüp bebek ve kısırlık tedavileri, viroloji ve doku kültürü ile yeni bitkilerin üretilmesi gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.

### 3. METERYAL VE METOD

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

##### 3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- Demir(II) klorür tetrahidrat ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Fluka)
- Demir(III) klorür anhidrat ( $\text{FeCl}_3$ ) (Fluka)
- Amonyak ( %25  $\text{NH}_3$ ) (Merck)
- Argon (Ar) gazı
- Asetonitril ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) (Merck)
- Metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (%0.9 NaCl çözeltisi)
- Aseton (Sigma)
- Stearik asit (Sigma)
- Oleik asit (Sigma)
- Azathioprine (Imuran/Eczacıbaşı)
- Potasyum dihidrojen fosfat (Merc)
- Dipotasyum hidrojen fosfat (Merc)
- O- Fosforik Asit (%85) (Merc)
- ITLC-SG Silika kaplı alüminyum şeritler ( Merck-10554)
- ITLC-SG Selüloz kaplı plastik şeritler ( Merck-105565)

### 3.1.2 Kullanılan cihazlar

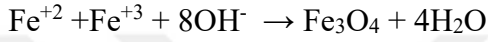
- HPLC Shimadzu (LC-10A tıvıp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Zeta potansiyel ölçümleri ve parçacık boyutu analizi (MALVERN ZETASIZER NANO ZS MODEL DLS) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetler (Sigma) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Scanner (Bioscan AR-2000) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gama sayım sistemi (E.Ü., Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (E. Ü.Nük. Bil. Ens., Nükleer Uygulamalar AD.)
- Fourier Transform Infrared (FT-IR) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) (E.Ü, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)
- Liyofilizasyon Cihazı (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscans Flash) (E.Ü., Nük. Bil. Ens., Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nük. Bil. Ens., Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nük. Uyg. AD.)
- Işık mikroskobu (Olympus) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nük. Uyg. AD.)
- Milipor (Milli-Q Gradient A-10) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü Nük. Uyg. AD)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin Sonopuls) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

## 3.2 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyonu

### 3.2.1 Manyetik nanoparçacıkların sentezi

Manyetik Nanoparçacıklar demir(II) ve demir(III) iyonlarının 1:2 oranlarında karıştırılmasıyla sentezlenmiştir. Tüm sentez çalışmaları argon gazı ortamında yapılmıştır. Aşağıdaki adımlar takip edilerek manyetik nanoparçacık sentezi gerçekleştirilmiştir.



- 0,125 M demir (II) klorür ve 0,250 M demir (III) klorür sulu çözeltileri 25 ml hacminde hazırlanmıştır.
- Üç boyunlu balona önce demir (III) klorür çözeltisi ardından demir (II) klorür çözeltisi eklenerek argon gazı ortamında, 400 rpm' de 90 °C sıcaklığa ayarlanarak karıştırılmıştır.
- Sıcaklık 90 °C'ye gelince çözelti pH' 2 olarak ölçülmüş ve çözeltilere 4 ml amonyak çözeltisi eklenerek pH' ın 11 olması sağlanmıştır.. Çözelti bu pH ayarlaması ile siyah bir renk almıştır ve çözelti 2 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır(Şekil 3.1).



Şekil 3. 1 Manyetik nanoparçacık sentezi düzeneği

- Nanoparçacıklar soğutulduktan sonra iki kez 40 mL ultra saf su ile ve bir kez metanol ile yıkanarak manyetik nanoparçacıkların çöktürülmesi sağlanmış ve sonrasında parçacıklar dondurulmuştur.
- Daha sonra dondurulmuş manyetik nanoparçacıklar  $-43\text{ }^{\circ}\text{C}$ ' de liyofilizasyon cihazında kurutulmuştur.

### 3.2.2 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların sentezi

Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıklar sentezlenirken sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır (Syed, 2018).

Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıklar sentezlenirken öncelikle; 20 mg stearik asit ve  $3\mu\text{L}$  oleik asit 1 mL asetonun içerisinde ultrasonik banyoda 15 dk süresince çözülmeye bırakılmıştır. Sentezlenen manyetik nanoparçacıklardan 5 mg tartılarak 1 ml metanolün içerisinde çözümlenip 15 dk süre ile ultrasonik banyoda çözeltinin homojen olması sağlanmıştır.

Manyetik katı lipid nanoparçacık (SLMNP) yapısını elde etmek için 15 mL suyun sıcaklığı 70 °C ' ye ayarlanmış ve iki çözülden önce stearik asit-oleik asit çözeltisi ardından damla damla MNP çözeltisi 70 °C deki su içerisine eklenerek homojenizatör ile 10 dk boyunca karıştırılmıştır(Şekil 3.2).



Şekil 3. 2 Sıcak homojenizasyon yöntemi ile AZA-SLMNP sentezi

10 dk karışmanın sonunda sentez ürününün soğuması ve SLMNP ların çökmesi için buzdolabında 30 dk bekletilmiştir. SLMNP 15 dk boyunca 10000 rpm de santrüflenerek filtreli falkon yardımıyla ayrılmıştır.

2,5 mg azathioprine; havanda ezilen 8 mg Imuran tabletin 2,5 mL asetonitrilde çözdürülüp ardından safsızlıkların 45µ filtre ile uzaklaştırılmasıyla elde edilmiştir. 10 dk boyunca SLMNP ile 2,5 mg azathioprine çözeltisi homojenizatörde karıştırılmış ve SLMNP yapısına ilaç yüklemesi gerçekleştirilmiştir. 15 dk boyunca 10000 rpm de santrüflenmiş ve azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıklar filtreli falkon ile ayrılmıştır.

### **3.2.3 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların karakterizasyonu**

Sentezlenen AZA-SLMNP' ler liyofilize edilmiş ve karakterizasyon çalışması için Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), Zeta Potansiyeli ölçümü (ZP), Dinamik Işık Saçılımı (DLS), HPLC, ve FIT-IR analizleri yapılmıştır.

#### **3.2.3.1 DLS ve Zeta potansiyeli analizi**

Sentez ürünü olan manyetik nanoparçacıklara DLS ve zeta potansiyel analizi yapılmıştır. 1 mg MNP, 1 mL ultra saf su içerisinde 20 dk ultrasonik banyoyada bekletilmiştir. Örnek küvet içine alınarak parçacık boyutu ve zeta potansiyeli 3 tekrar ile ölçülmüştür. Sonuçlar Bölüm 4.1.1 'de ele alınmıştır.

Sentezlenen azathioprine yüklü SLMNP' den 1 mg tartılmış, 1 mL ultra saf su içerisinde ultrasonik banyoda 5 dk bekleterek dağılması sağlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden 200 µL alınarak üzerine 600 µL ultra saf su ve 200 µL Poloxamer 188 eklenip 5 dk boyunca homojenizatörde karıştırılmıştır. Hazırlanan örnek ölçüm yapılacak kuartz küvete alınıp, parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçümü 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Bölüm 4.1.1 'de detaylı olarak incelenmiştir.

#### **3.2.3.2 HPLC Analizi**

Azathioprine yüklü SLMNP nanoparçacıkları sentezlendikten sonra HPLC analizinde kolon olarak ODS-2 HYPER C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (Thermo) kolonu kullanılmıştır. Dalga boyu 276 nm ve 240 nm (Uv dedektörü), sıcaklık 25°C, akış hızı 1 mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µL ' ye ayarlanmıştır. Mobil faz olarak Asetonitril : Sulu tampon (ph:3.3) (50:50) çözeltisi kullanılmıştır. Sulu tampon; potasyum dihidrojen fosfat (1.48 gr) ve dipotasyum hidrojen fosfat (0.288 gr) 500 mL ultra saf suda çözündürülüp pH' ı o-fosforik asit ile 3.3'e ayarlanarak hazırlanmıştır. Tampon çözeltinin safsızlıkları vakumlu filtrasyon ile giderilmiştir. Ardından 500 mL sulu tampon çözelti 1L' ye asetonitril ile tamamlanarak mobil faz hazırlanmıştır(Sankar et al., 2015).

Örnekleri çözmek için mobil faz kullanılmıştır ve 5 dk ultrasonik banyoda bekletilmişlerdir. Ardından 45 µm filtre ile süzülüp vialle alınarak analiz yapılmıştır.

### **3.2.3.3 SEM analizi**

SLMNP ve azathioprine yüklü SLMNP 'lerin boyut ve morfolojik yapısını analiz etmek amacı ile Taramalı Elektron Mikroskopu görüntülemesi gerçekleştirilmiştir. Azathioprine yüklenmiş manyetik katı lipid nanoparçacıklar liyofilizatör aracılığı ile kurutulmasından sonra SEM cihazının çelik plakalarında mikroskop görüntüleri alınmıştır. Elde edilen görüntüler ayrıntılı olarak Bölüm 4.1.2' de detaylı olarak incelenmiştir.

### **3.2.3.4 FTIR analizi**

Sentezlenen manyetik katı lipid nanoparçacıkların sahip olduğu kimyasal yapısı, 350-6000 cm<sup>-1</sup> dalga boyu arasında ölçüm alabilme kapasitesi olan Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR ile belirlenmiştir. FTIR sonuçları Bölüm 4.1.3' te verilmiştir.

### 3.2.4 İlaç yükleme kapasitesi

Manyetik katı lipit nanoparçacıkların içerisinde hapsolan ilaç miktarını analiz etmek için HPLC yönteminden faydalanılmıştır. Öncelikle beş farklı konsantrasyonda Azathioprine örnekleri hazırlanmış, kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Azathioprine çözeltileri hazırlanırken, Imuran© tablet ilaç ezilip, içerdiği azathioprine oranına göre tartılmıştır (160 mg Imuran© tablet 50 mg azathioprine içermektedir). 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL ve 31.25 µg/mL konsantrasyonlarında azathioprine örnekleri hazırlanmıştır. HPLC yöntemiyle her bir konsantrasyonun kromatogramında verdiği piklerin alanları çizilerek hesaplanmıştır. Bu beş konsantrasyonun verisi ile bir kalibrasyon grafiği çizilmiştir.

AZA-SLMNP sentezinde 3 farklı ilaç oranı ile ilaç yüklemesi denenmiştir. 1 mg, 2.5 mg ve 5 mg azathioprine yüklenmiştir ve verim hesaplanmıştır. İlaç yüklemesi işleminden Bölüm 3.2.2 ' de bahsedilmiştir. Optimum yüklenen ilaç miktarına 2.5 mg azathioprine ile ulaşıldığına karar verilmiştir. Detaylı karşılaştırmalar, elde edilen kromatogramlar ve sonuçlar Bölüm 4.1.4 'te tartışılmıştır.

### 3.3 Radyoişaretleme

Azathioprine yüklü SLMNP 'lar  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenirken,  $\text{SnCl}_2$  ile indirgeme tekniği kullanılmıştır. 1 mg  $\text{SnCl}_2$  1 mL ultra saf suda çözdürülerek kalay klorür çözeltisi hazırlanmıştır. 0,5 mg AZA-MSLP, 50 µL metanolde ultrasonik banyoya koyularak çözünmesi sağlanmıştır.  $\text{SnCl}_2$  çözeltisinden 25 µL numuneye eklendi ve karıştırıldı. Sonrasında çözeltiliye 1 mCi aktiviteye sahip  $^{99m}\text{Tc}$  eklenmiştir. Hazırlanan olan bu çözelti 100 °C sıcaklıkta 1 saat inkübatörde bekletilerek AZA-SLMNP yapısının radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Doz kalibratörü ile işaretlenme verimi hesaplanarak sonuçlar Bölüm 4.2' de incelenmiştir.

### 3.3.1 Radyoşaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri

#### 3.3.3.1 İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC)

TLRC yöntemi için, selüloz kaplı plastik TLC şeritleri ve silikajel kaplı alüminyum TLC şeritleri sabit faz olarak 1,2 x 10 cm boyutlarında kullanılmıştır. Acetonitril ve Metanol: HCL(19:1) çözeltilerini içeren iki farklı TLC banyoları hazırlanmıştır. Örnekler, şeritlerin taban kısmının 0,5 cm üzerinden mikro pipet ile damlatılmıştır. Damlatılan örnekler kurumaya bırakılmış ve ardından kuruyan örnekler dik şekilde her bir banyoların duvarına ayrı ayrı bantlanarak yerleştirilmiştir. Şeritler, çözgen şeritlerin üst noktalarının 1-2 cm altında kalana kadar banyoda tutulmuş ve ardından oda koşullarında kurumaya bırakılmıştır. Kuruduktan sonra, bulaşı engellemek için TLC şeritleri şeffaf streç ile kaplandı ve radyokromatogramları Bioscan AR-2000 TLRC tarayıcısı ile kayıt edildi. Alınan radyokromatogramlardan, radyoşaretlenme verimleri ve Rf değerleri hesaplandı. TLRC radyokromatogram sonuçları Bölüm 4.2.1'de incelenmiştir.

### 3.4 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları

#### 3.4.1 Hücre çalışmaları

Bu tez çalışmasında <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenmiş azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların biyolojik davranışları insan deri normal keratinosit hücre hattında *in vitro* olarak incelenmiştir. Çalışma için HaCaT insan deri normal keratinosit hücresi kullanılmıştır. HaCaT insan deri normal keratinosit hücresi Ege Üniversitesi, Biyomühendislik bölümünden temin edilmiştir.

##### 3.4.1.1 Hücre ekimi ve pasajlama

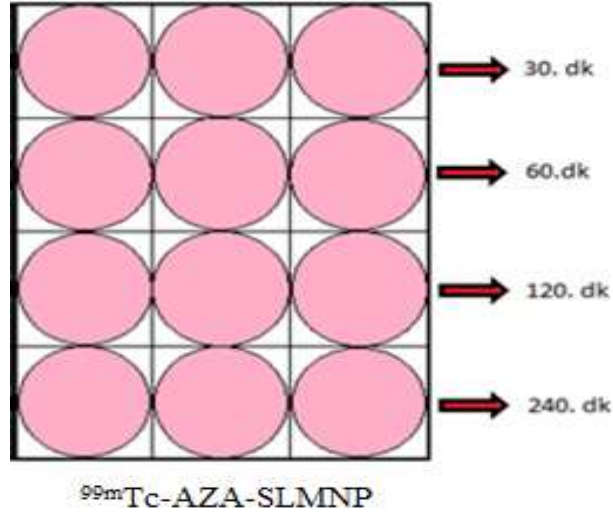
HaCaT hücreleri, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pyruvat ve %10 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda üretilmiştir.

Hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0.25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrılarak çalışmaların yapılacağı 24 kuyucuklu plakalara ekildi.  $4 \times 10^4$  HaCaT hücresi 12 kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücre konfluent olduktan sonra (18 saat sonra) bağlanma verimi çalışması başlatılmıştır.

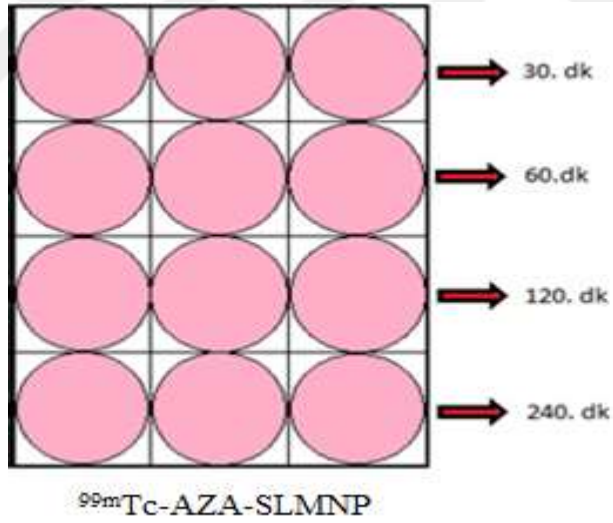
### 3.4.1.2 İnkorporasyon çalışmaları

$^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacık numunelerinin inkorporasyon çalışmaları HaCaT hücre hattı üzerinde yapılmıştır.

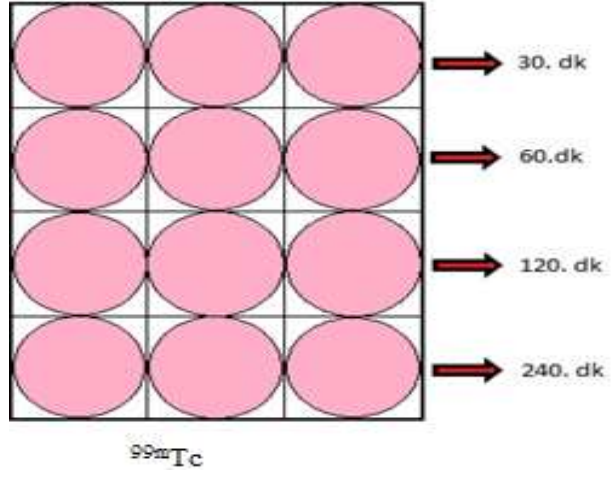
Hücrelerin besiyerleri mikropipet yardımı ile dikkatlice alınıp, SF (Serum Fizyolojik) çözeltisi ile yıkanmasının ardından yirmi dördü plakaların kuyucuklarına 1 mCi aktivite olacak şekilde  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli AZA-SLMNP nanoparçacık çözeltisi eklendi. Hücreler üzerindeki besiyer 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda uzaklaştırılarak yıkama işlemi 2 kez SF ile gerçekleştirildi ve hücrelerde kalan aktivite Cd(Te) dedektör ile sayıldı. İşaretlenmiş ilaç yüklü nanokompozit malzemenin etkisini karşılaştırabilmek amacı ile aynı işlemler  $^{99m}\text{Tc}$  kontrol grubu üzerinde, manyetik ortamda ve manyetik olmayan ortamda gerçekleştirildi. Elde edilen radyoaktivite sayımı/protein oranlarından hücre başına gerçekleşen tutulum miktarı hesaplanmıştır. İnkorporasyon çalışma sonuçları Bölüm 4.3.1' de verilmiştir.



Şekil 3. 3 Radyoışaretili bileşiklerin HaCaT hücrelerinde zamana karşı hücre tutulum deneyinde 12' lik plakaların gösterimi.



Şekil 3. 4 Manyetik ortamda radyoışaretili bileşiklerin HaCaT hücrelerinde zamana karşı hücre tutulum deneyinde 12' lik plakaların gösterimi.



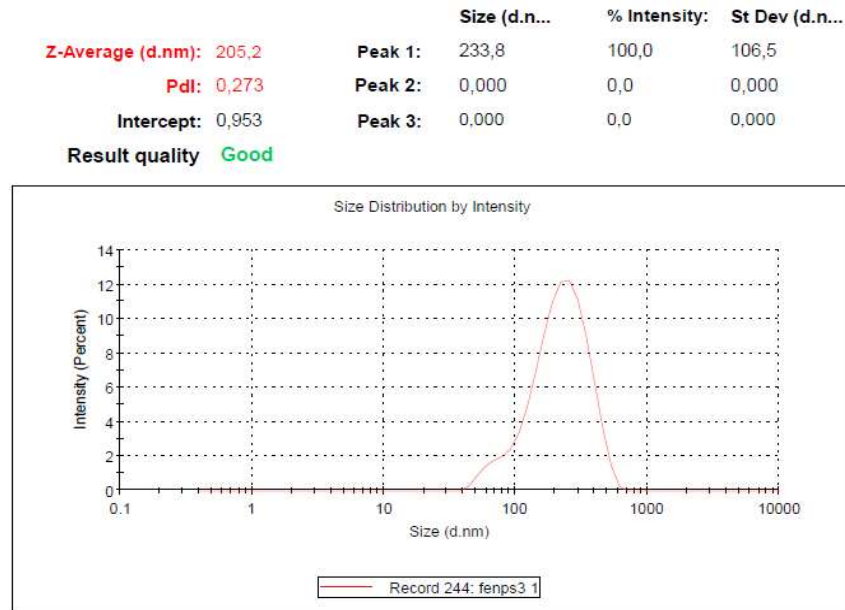
Şekil 3. 5  $^{99m}\text{Tc}$  ' in HaCaT hücrelerinde zamana karşı hücre tutulum deneyinde 12' lik plakaların gösterimi.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Azathioprine Yüklü Manyetik Katı Lipid Nanoparçacıkların Yapı ve Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

#### 4.1.1 Zeta potansiyeli ve boyut analiz sonuçları

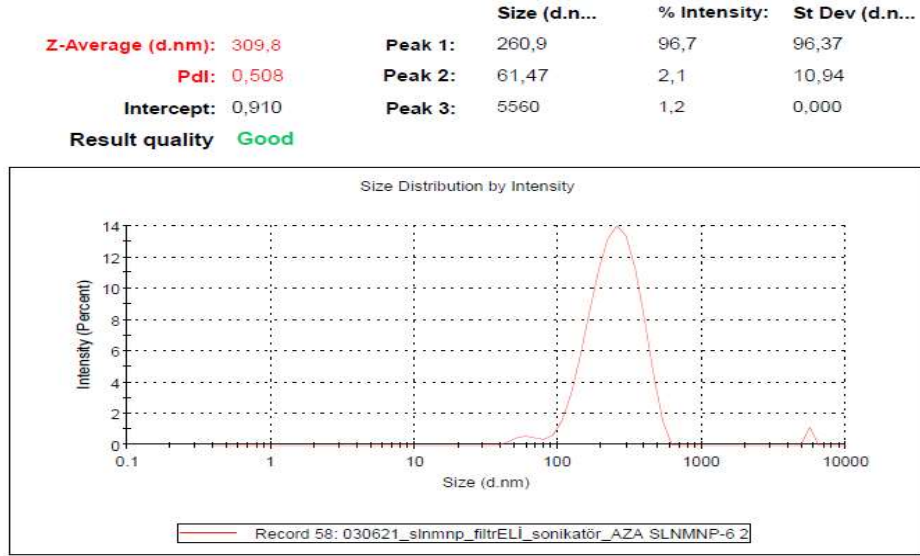
Bölüm 3.2.2 'de anlatılan yöntemle sentezlenen manyetik nanoparçacıkların ve Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların DLS tekniği ile alınan ölçümü sonucunda ortaya çıkan boyut dağılım grafikleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2' deki gibidir.



Şekil 4. 1 MNP boyut dağılım grafiği

Suda dağılmış manyetik nanoparçacıklarının DLS analizi sonucu hidrodinamik çapı 205,2 nm ve polidispersite indeksi de 0,23 olarak bulunmuştur. Polidispersite indeksi (PI), nanoparçacıkların boyut dağılımının kalitesini ifade etmektedir ve 0-1 arasında değer almaktadır. PI değeri  $\leq 0,1$  olan nanoparçacıkların dağılım kalitesi yüksektir.

Literatür bilgisi doğrultusunda PI değeri  $\leq 0,5$  olan nanoparçacıkların dağılımının da kabul edilebilir olduğu anlaşılmaktadır (Shah, 2014).



Şekil 4. 2 AZA-SLMNP boyut dağılım grafiği

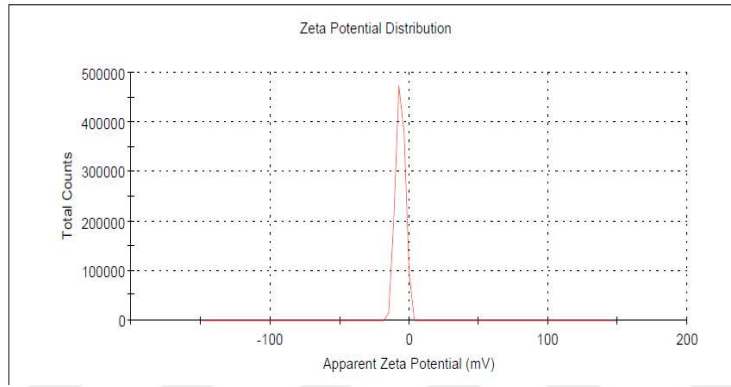
10-1000 nm arasında boyuta sahip kolloidal yapılar nanoparçacık olarak adlandırılmaktadır. Syed ve arkadaşlarının sentezlediği azathioprine yüklü katı lipid nanoparçacıkların boyutları 102,3 nm ile 380,6 nm arasında bulunmuştur. PDI değerleri ise 0,3 ile 1 arasındadır (Syed et al., 2018). Muñoz de Escalona ve arkadaşlarının sentezlediği manyetik katı lipid nanoparçacıkların boyutu ise 180 nm civarındadır (Muñoz de Escalona, et al., 2016). Yapılan bu yüksek lisans tez çalışmasında su içerisine dağılmış halde olan azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların hidrodinamik çapı 309,8 nm ve polidispersite indeksi ise 0,50 olarak bulunmuştur. Analiz sonucu elde edilen veriler, nanoparçacıkların istenilen boyutlarda ve iyi dağılıma özelliğine sahip olduğunu göstermektedir (Şekil 4.2).

Sentezlenen manyetik nanoparçacıkların ve azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların zeta potansiyel dağılımlarını gösteren grafikler Şekil 4.3 ve Şekil 4.4' de verilmiştir. Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların zeta potansiyeli -28,5 mV ölçülmüştür, bu da nanoparçacıkların topaklanma yapmadan iyi bir şekilde disperse olduğunu göstermektedir.

Demir nanoparçacıkların zeta potansiyelleri -6,30 mV olarak ölçülmüştür, bu demir nanoparçacıkların tekbaşına dispersiyon kabiliyetinin düşük olduğunu göstermektedir. Ying ve arkadaşları, solvent difüzyon tekniği ile sentezledikleri manyetik katı lipid nanoparçacıkların zeta potansiyelini -27,6 mV olarak bulmuşlardır (Ying et al.,2011).

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -6,30</b>	<b>Peak 1: -6,30</b>	100,0	3,30
<b>Zeta Deviation (mV): 3,30</b>	<b>Peak 2: 0,00</b>	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,579</b>	<b>Peak 3: 0,00</b>	0,0	0,00

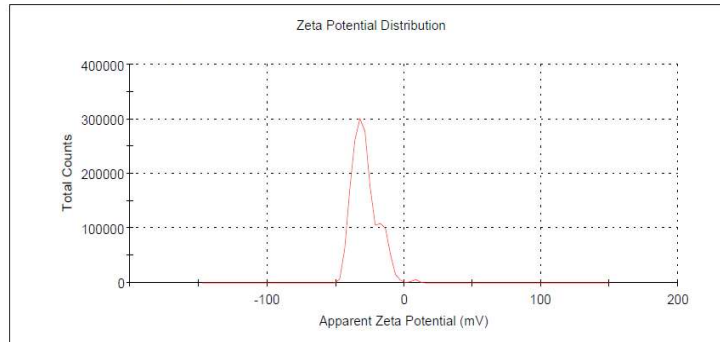
**Result quality Good**



Şekil 4. 3 Manyetik nanoparçacıklarının zeta potansiyel dağılım grafiği

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -28,5</b>	<b>Peak 1: -31,8</b>	77,3	5,98
<b>Zeta Deviation (mV): 9,31</b>	<b>Peak 2: -15,7</b>	22,1	4,54
<b>Conductivity (mS/cm): 0,0615</b>	<b>Peak 3: 7,61</b>	0,7	2,92

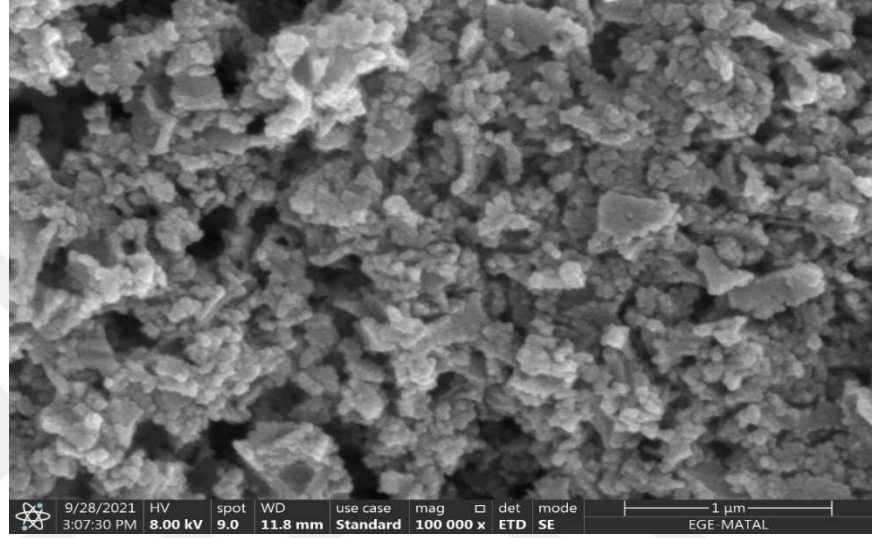
**Result quality Good**



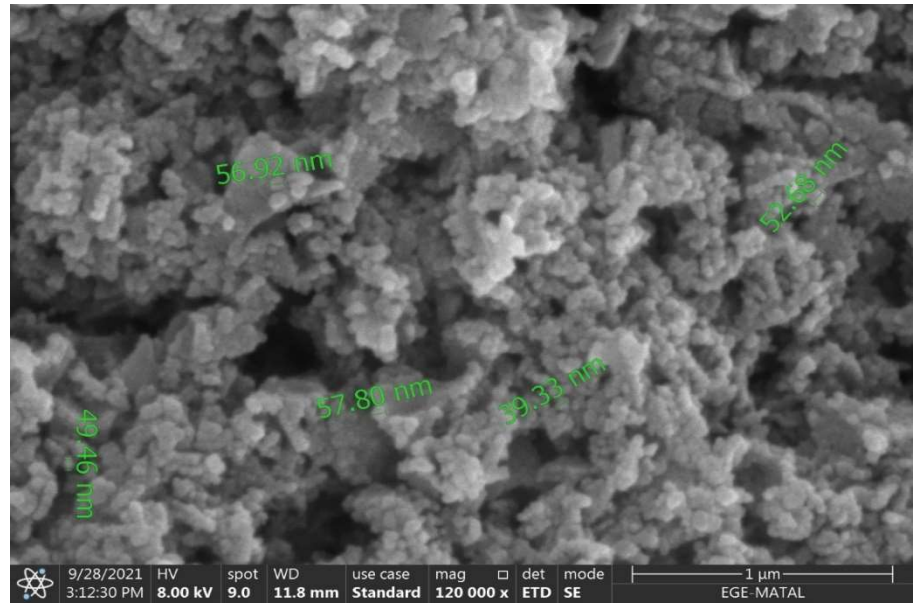
Şekil 4. 4 AZA-SLMNP zeta potansiyel dağılım grafiği

#### 4.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) sonuçları

Azathioprin yüklü SLMNP 'lerin yüzey morfolojisini incelemek ve boyut analizi için alınan SEM görüntüleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6' da görüldüğü gibidir.



Şekil 4. 5 Azathioprine yüklü manyetik lipid nanoparçacıkların 100k x büyütmede SEM görüntüsü



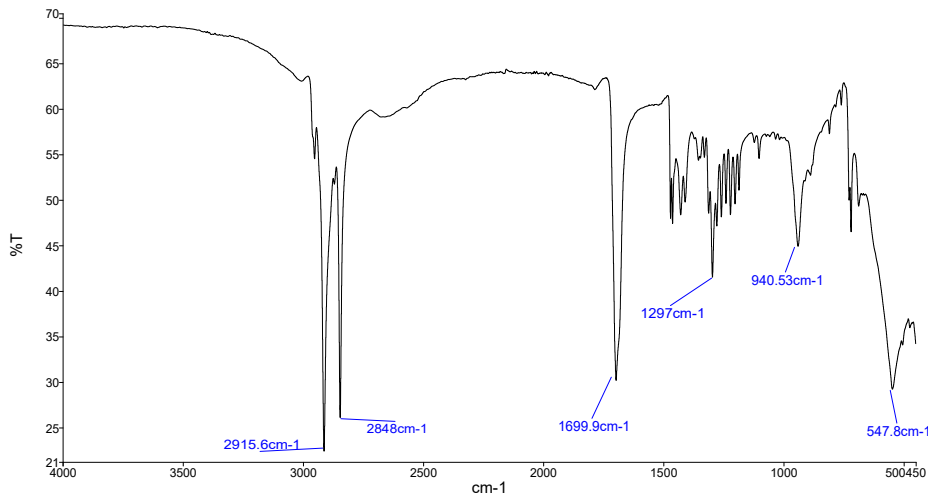
Şekil 4. 6 Azathioprine yüklü manyetik lipid nanoparçacıkların 120k x büyütmede SEM görüntüsü

Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacık boyutlarının 39-57 nm arasında olduğu görülmüştür. Ahmadifard ve arkadaşlarının solvent evaporasyonu-ultrasonikasyon kombine tekniği ile sentezlediği kitosan kaplı manyetik katı lipid nanoparçacıkların DLS ile ölçülmüş hidrodinamik yarıçapı 193.2 nm bulunurken, SEM analizi sonucu nanoparçacıkların boyutu ortalama 50 nm bulunmuştur.

SEM ve DLS sonuçları arasındaki farklılığın sebebi hidrodinamik yarıçap ve parçacığın kendisindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır (Ahmadifard et al.,2020).

#### 4.1.3 FTIR sonuçları

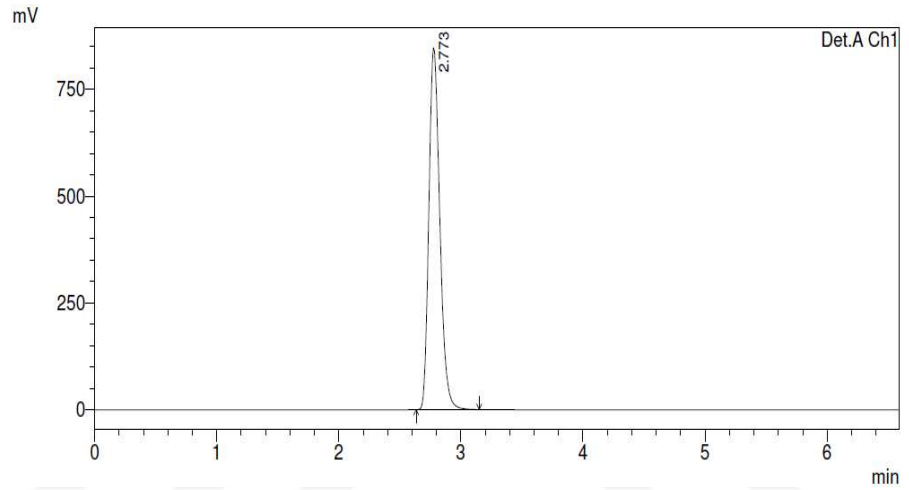
Manyetik lipid nanoparçacıklarının yüzeyinde bulunan fonksiyonel grupların belirlenmesi amacıyla FTIR analizi yapılmıştır. Bu spektrumlar Şekil 4.7’ de görülmektedir. Spektrumda görülen  $547\text{ cm}^{-1}$  absorpsiyon piki Fe-O bağının gerilme titreşimine aittir. Ayrıca simetrik ve asimetrik C-H gerilmesi nedeniyle  $2848$  ve  $2915\text{ cm}^{-1}$ ’de soğurma bandı,  $1699\text{ cm}^{-1}$  bandında  $\text{CO}_2$  gerilmesine ait pikler görülmektedir. FTIR spektrumunda gözlemlenen bu fonksiyonel grupların titreşim ve gerilim bandları literatür ile de uyum içerisindedir (Kelidari et al.,2015) ( Lesiak, B. et al., 2019).



Şekil 4. 7 SLMNP ‘ye ait FT-IR spektrumu

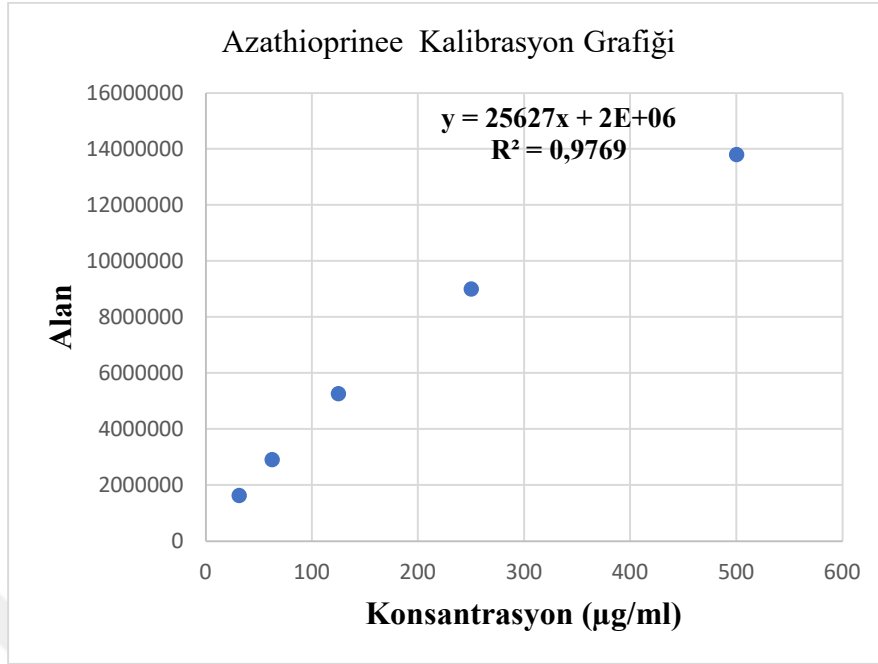
#### 4.1.4 Azathioprine ve Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların HPLC analiz sonuçları

Manyetik katı lipid nanoparçacıklarına Azathioprine yüklenme verimini görmek için yapılan HPLC analizi, Bölüm 3.2.3.2’ de bahsedilen koşullar altında yapılmıştır. Bu şartlarda azathioprine’in alıkonma zamanı (Rt) Şekil 4.8’ de verilen kromatogramda da görüldüğü gibi 2.77 dk dır.



Şekil 4. 8 Azathioprine’e ait HPLC Kromatogramı.

Kalibrasyon grafiği oluşturmak için; Azathioprine 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62.5 µg/mL ve 31.25 µg/mL olmak üzere beş farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. HPLC’ de her bir konsantrasyonun kromatogramında verdiği pikler çizilerek alanları hesaplanmış ve Şekil 4.9’ daki kalibrasyon grafiği çizilmiştir.



Şekil 4. 9 Azathioprine kalibrasyon grafiği

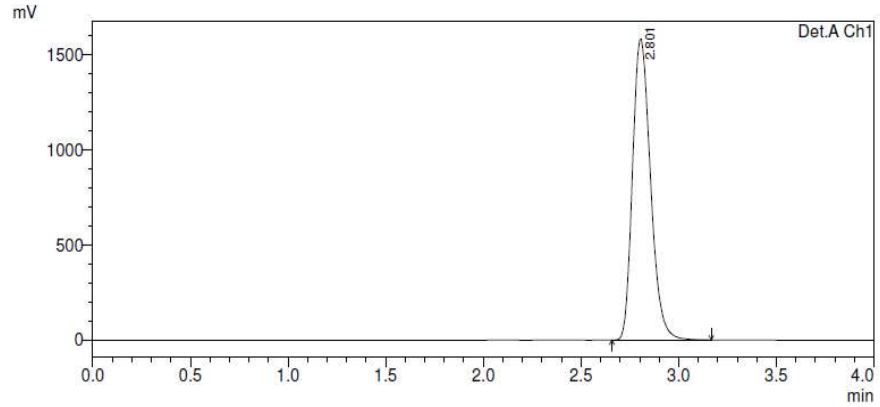
Şekil 4.9' daki kalibrasyon grafiğine göre bir doğru denklemi oluşturularak HPLC analizi sonucu çıkan kromatogramların verdiği alanlardan azathioprinee konsantrasyonları hesaplanmıştır.

#### 4.1.5 Manyetik katı lipid nanoparçacıkların Azathioprine yükleme kapasitelerinin belirlenmesi

Aşağıda yer alan formüle göre azathioprine enkapsülasyon etkinliği (% EE) hesaplanmıştır.

$$\% EE = \frac{\text{Toplam etken madde miktarı} - \text{Yüklenmemiş etken madde miktarı}}{\text{Toplam etken madde miktarı}} \times 100$$

Şekil 4.10' da AZA-SLMNP' nin HPLC kromotagramı görölmektedir.



Şekil 4. 10 Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların HPLC Kromatogramı

Bölüm 3.2.4’ de bahsedildiği üzere 3 farklı ilaç oranıyla SLMNP yapılarına azathioprine yükleme denemesi yapılmıştır. 1 mg ilaç kullanıldığında ilaç yükleme verimi % 64, 2,5 mg ilaç kullanıldığında ilaç yükleme verimi % 86 ve 5 mg ilaç kullanıldığında ilaç yükleme verimi % 90 olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu verimlere göre kullanılması gereken en uygun azathioprine oranın 2,5 mg olduğuna karar verilmiş ve çalışmalara bu miktarla devam edilmiştir.

## 4.2 Radyoışaretleme

AZA-SLMNP ve SLMNP yapılarının radyoışaretlemesi Bölüm 3.3’ te anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. İşaretleme sonrası örnekler üç defa su ile yıkanmış ve doz kalibratöründe ölçüm alınarak işaretleme verimi hesaplanmıştır.  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretleme sonucu elde edilen radyoışaretleme verimi AZA-SLMNP için %90,3 ve SLMNP için %87,45’tir..

### 4.2.1 İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) analiz sonuçları

İnce tabaka radyokromatografisi (TLRC) uygulanarak yapılan radyoışaretleme kalite kontrol çalışmaları neticesinde sağlanan Rf değerleri Tablo 4.1’ de verilmiştir. Hazırlanan iki farklı banyo çözeltisi MNP-SLN ve Azathioprine yüklü MNP-SLN nanoparçacıklarının  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretleme verimlerinin belirlenmesi için kullanılmıştır.

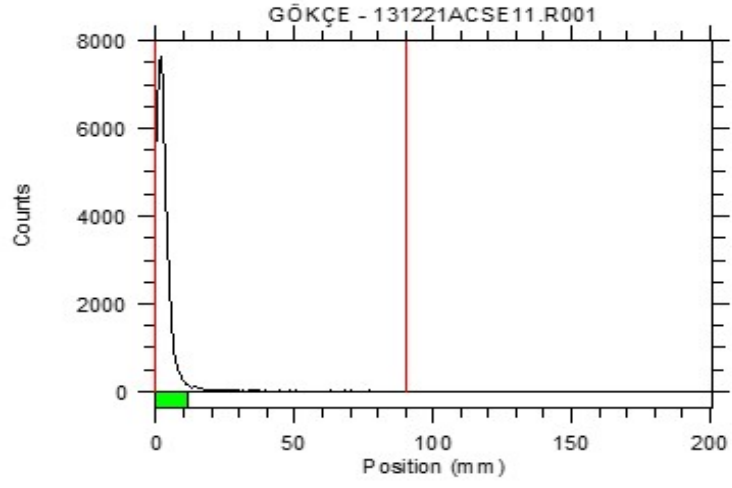
**Tablo 4.1**  $^{99m}\text{Tc}$  ile işaretli örneklerin TLRC yöntemi ile elde edilen Rf değerleri

Banyo Çözeltilisi	Rf Değerleri		
	$^{99m}\text{Tc}$ -MNP-SLN	$^{99m}\text{Tc}$ -AZA- MNP-SLN	Ind Tc
<b>Asetonitril (ACN)</b>	0.027	0.019	0.037
<b>Metanol : HCL (19:1)</b>	0.057	0.024	0.028

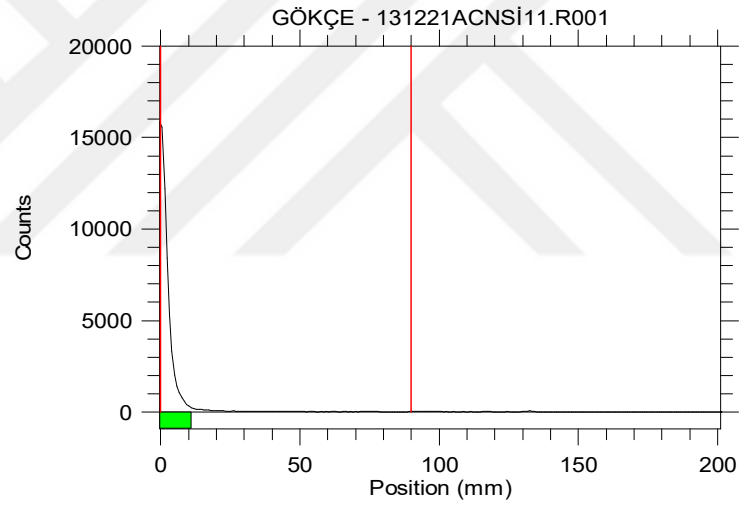
Radyoışaretli demir nanoparçacıkları TLRC banyo çözeltilerinde yürümediği için uygulama noktasında kalmıştır. Aynı şekilde indirgenmiş Tc-99m de uygulama noktasında kalmaktadır. Bu nedenle TLRC yöntemi ile radyoışaretleme verimi belirlenememiştir.

TLRC analizi için mobil faz olarak asetonitril, Metanol : HCl (19:1) banyoları kullanılırken sabit faz olarak selüloz ve silika kaplı TLRC şeritleri kullanılmıştır. Her iki banyo çözeltilisinde de radyoışaretli örnekler uygulama noktasında kalmıştır. Rf değeri 0 ile 1 arasında olmaktadır ve çözücü içine daldırılan şeritler üzerindeki örneklerin alıkonma oranını göstermektedir.

ACN banyosundaki  $^{99m}\text{Tc}$ -MNP-SLN ve  $^{99m}\text{Tc}$ -MNP-SLN yapılarının kromatogramları Şekil 4.11 ve Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4. 11  $^{99m}\text{Tc}$ -MNP-SLN örneğinin ACN banyosundaki TLRC kromatogramı



Şekil 4. 12  $^{99m}\text{Tc}$ -AZA-MNP-SLN örneğinin ACN banyosundaki TLRC kromatogramı

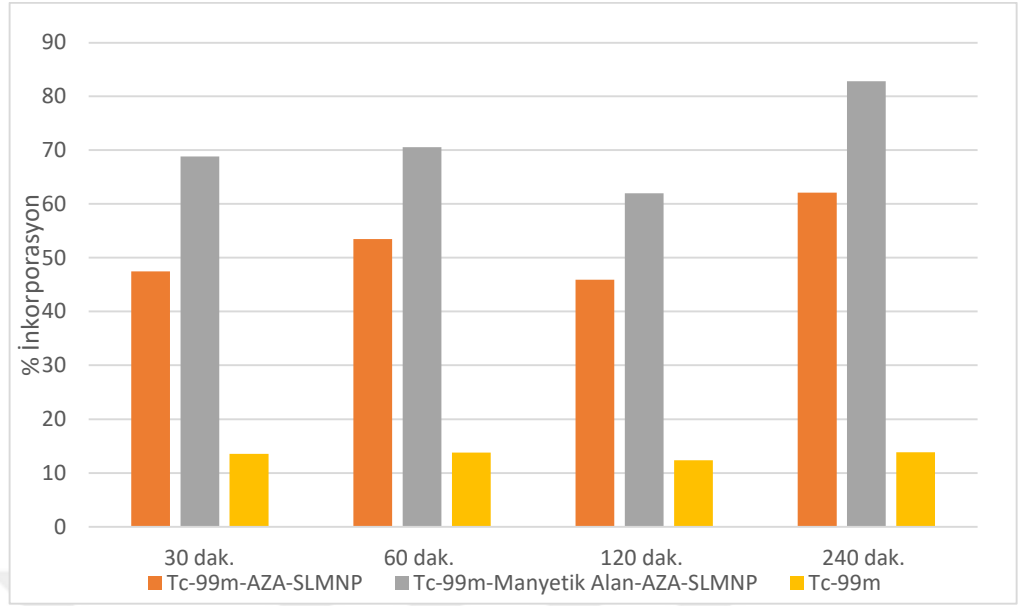
### 4.3 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

#### 4.3.1 İnkorporasyon çalışmaları

$^{99m}\text{Tc}$  ile radyoişaretli AZA-SLMNP nanoparçacıklarının, HaCaT insan deri normal keratinosit hücrelerine manyetik alan uygulanan ortamda ve manyetik alan uygulanmamış ortamda bağlanma veriminin zamanla değişimini Tablo 4.2 ve Şekil 4.13’ te verilmiştir. Zamana bağlı olarak bağlanma verimleri HaCaT hücre hattında artmaktadır. Manyetik alan uygulanması azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların hücre hattında tutunmasına olumlu etki yaratmıştır.

Tablo 4.2  $^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP ,  $^{99m}\text{Tc}$ -SLMNP nanoparçacıklarının ve  $^{99m}\text{Tc}$  ‘un HaCaT hücre hattında manyetik ve normal ortamda zamana karşı bağlanma verimleri.

ZAMAN (Dakika)	%BAĞLANMA VERİMİ HaCaT		
	$^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP	$^{99m}\text{Tc}$ -AZA-SLMNP (Manyetik Alanda)	$^{99m}\text{Tc}$
30	47,46 ±2,72	68,83±4,99	13,54±1,04
60	53,49 ±3,64	70,57±2,13	13,75±0,51
120	45,93 ±1,90	61,97±1,69	12,35±0,37
240	62,08 ±4,30	82,83±3,20	13,85±0,54



Şekil 4. 13 Radyoişaretili AZA-SLMNP ve Tc-99m'in manyetik ne normal ortamda HaCaT hücreleri üzerindeki zamana karşı bağlanma verimleri

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu Yüksek Lisans tez çalışmasında azathioprine (AZA) yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıklar sentezlenerek teknesyum-99m ile radyoişaretlenmiş ve radyoişaretli bu malzemenin biyolojik davranışının *in vitro* olarak incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların karakterizasyonu için boyut analizleri ve zeta potansiyeli yapılarak nanoparçacıkların SEM analizi ile 39 -57 nm arasında boyuta ve yaklaşık olarak -28 mV zeta potansiyeline sahip oldukları görülmüştür. DLS ile alınan ölçüm sonucu azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların hidrodinamik çapı 309,8 nm ve polidispersite indeksi ise 0,50 olarak bulunmuştur. SEM ve DLS sonuçları arasındaki farklılığın sebebi hidrodinamik yarıçap ve parçacığın kendisindeki farklılıktan kaynaklanmaktadır. Elde edilen bu sonuçlar manyetik katı lipid nanoparçacıkların yüksek fiziksel stabiliteye sahip olduğunu ve uygun boyutlarda nanoparçacıkların sentezlendiğini göstermektedir.

Üç farklı azathioprine konsantrasyonu ile SLMNP yapılarına azathioprine yüklemesi çalışılmıştır. En uygun ilaç yükleme veriminin % 86 hesaplandığı 2,5 mg ilaç yüklemesi ile olduğu bulunmuştur. Azathioprine ilaç etken maddesinin yüksek verimlilik ile manyetik katı lipid nanoparçacık yapılarına yüklendiği görülmüştür.

<sup>99m</sup>Tc ile işaretleme sonrası doz kalibratörü ile alınan ölçüm sonucu elde edilen radyoişaretleme verimi AZA-SLMNP için %90,3 ve SLMNP için %87,45'tir. <sup>99m</sup>Tc-AZA-SLMNP kompleksi, TLRC (İnce Tabaka Radyokromatografisi) silika jel ve selüloz kaplı şeritleri üzerine damlatılarak, mobil faz olarak % 100 asetonitril ve Met: HCl (Metanol:Hidroklorik asit 19:1) çözelti banyolarına koyulmuştur. Radyoişaretli demir nanoparçacıkları TLRC banyo çözeltilerinde yürümediği için uygulama noktasında kalmıştır. Aynı şekilde indirgenmiş Tc-99m de uygulama noktasında kalmaktadır. Bu nedenle TLRC yöntemi ile radyoişaretleme verimi belirlenememiştir.

$^{99m}\text{Tc}$  ile işaretlenmiş Azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların inkorporasyon çalışmaları HaCaT insan deri normal keratinosit hücreleri üzerinde yapılmıştır. Zamana bağlı olarak bağlanma verimleri HaCaT hücre hattında manyetik alan uygulanan ortamda ve manyetik alan uygulanmamış ortamda artmaktadır. Manyetik alan uygulanması, radyoışaretli azathioprine yüklü manyetik katı lipid nanoparçacıkların hücre hattında tutunmasına olumlu etki yaratmıştır.  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoışaretli AZA-SLMNP manyetik alan uygulanan ortamda HaCaT hücrelerine bağlanma verimi 30.dk'da %68 iken 240.dk 'da %82,83 olarak bulunmuştur. Manyetik alanın uygulanmadığı ortamda ise bağlanma verimleri 30. dk'da %47,46 ve 240.dk'da %62,08'dir.

Günümüzde manyetik nanoparçacıklar ve solid lipid nanoparçacıklar biyomedikal ve bağlantılı olarak sağlık alanında kullanılabilen nanomalzemeler olarak bilinmektedir. Çalışmamızda azathioprine yüklü  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoışaretli manyetik katı lipid nanoparçacıkların *in vitro* ortamda biyolojik davranışlarını incelenmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen verilerin radyoışaretli kompozit nanomalzemelerin hedefe yönelik ilaç taşıma sistemlerinde tercih edilebilecek nanomalzemelere katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**KAYNAKLAR DİZİNİ**

**Abram, U. and Alberto, R.**, 2006, Technetium and Rhenium - Coordination Chemistry and Nuclear Medical Applications, Journal of Brazilian Chemical Society, 17(8): 1486-1500pp.

**Ahmadifard, Z., Ahmeda, A.**,2020, Rasekhian, M., Moradi, S. & Arkan, E. Chitosan-coated magnetic solid lipid nanoparticles for controlled release of letrozole. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 57, 101621.

**Aydın, B.**, 2018, Metformin için biyoyumlu taşıyıcı sistem tasarımı: karakterizasyonu, radyoişaretleme ve in vitro çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 86s.

**Aydın, B., Uçar, E., Teksöz, S., İçhedef, Ç.,Tekin,V.**, 2020, "Biocompatible Delivery System for Metformin: Characterization, Radiolabeling and In Vitro Studies", Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, vol.20, pp.1626-1634.

**Çetin, O., İçhedef, Ç.,Aydın ,B., Teksöz, S.**,2020, "Design of docetaxel-loaded polymeric nanoparticles: characterization, radiolabeling with <sup>99m</sup>Tc and in vitro evaluation", Journal Of Radioanalytical And Nuclear Chemistry, vol.326, pp.1639-1652.

**Demirel, M., Yazan , Y. ,** 2000 , Katı Lipid Nanopartiküller (SLN), Bilimsel Taramalar, FABAD J. Pharm. Sci., 25, 167-179.

**Dobrovolskaia, Marina A. et al.**, 2013, "Nanoparticle Size and Surface Charge Determine Effects of PAMAM Dendrimers on Human Platelets in Vitro." NIH Public Access 9(3):382–93pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Edwards SA.**, 2006 , The nanotech pioneers: Where are they taking us? Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 15: 244.
- Ertay T.**, 2019 , Yeni Radyofarmasötikler ve Klinik Öncesi Görüntüleme. Nucl Med Semin , 5:1-9.
- Erdoğan, A.** , 2018 , Kanser Tanı ve Tedavisinde Manyetik Nanopartiküller, Natural & Applied Sciences Journal, Vol. I, No. 1,23-30.
- Gong, H., Peng, R. & Liu, Z.**, 2013 , Carbon nanotubes for biomedical imaging: The recent advances. Adv. Drug Deliv. Rev. **65** , 1951–1963.
- Gao, L., Fan, K. & Yan, X.**, 2017 , Iron oxide nanozyme: A multifunctional enzyme mimetic for biomedical applications. Theranostics **7**, 3207–3227 .
- Grillone, A.** et al. Active Targeting of Sorafenib: Preparation, Characterization, and In Vitro Testing of Drug-Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles. Adv. Healthc. Mater. **4**, 1681–1690 (2015).
- Ghasemiyeh, P. & Mohammadi-Samani, S.** Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. Research in Pharmaceutical Sciences vol. 13 (2018).
- Hernández-Breijo, B.** et al. Preclinical evaluation of azathioprine plus buthionine sulfoximine in the treatment of human hepatocarcinoma and colon carcinoma. World J. Gastroenterol. **17**, 3899–3911 (2011).
- Hernández-Breijo, B.** et al. Azathioprine desensitizes liver cancer cells to insulin-like growth factor 1 and causes apoptosis when it is combined with bafilomycin A1. Toxicol. Appl. Pharmacol. **272**, 568–578 (2013).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Hong H, Zhang Y, Sun J, et al.**, 2009 , Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles. *Nano Today* ,4:399- 413.
- İçhedef, Ç.**, 2010, Guanin ve türevlerinin  $M(CO)_3^+$  (M=Tc ve Re) korları ile işaretli manyetik özellikli nanoparçacıklarının oluşturulması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, Doktora Tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 103s.
- İçhedef,Ç., Teksöz,S. , Çetin,O., Aydın,B., Sarıkavak,İ., Parlak,Y.,Bilgin, B.**, 2021, "Design of  $^{99m}Tc$  radiolabeled gemcitabine polymeric nanoparticles as drug delivery system and in vivo evaluation", *Materials Chemistry and Physics*, vol.263.
- İçhedef Ç., Teksöz, S., Unak P., Medine, E. İ., Ertay, T., Bekiş, R.**, 2012, "Preparation and characterization of radiolabeled magnetic nanoparticles as an imaging agent", *Journal of Nanoparticle Research*, vol.14.
- Kelidari, H. R. et al.**, 2015, Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **128**, 473–479.
- Kumar, R.**, 2019, Lipid-Based Nanoparticles for Drug-Delivery Systems. in *Nanocarriers for Drug Delivery* (2019). doi:10.1016/b978-0-12-814033-8.00008-4.
- Lesiak, B. et al.**, 2019, Surface Study of  $Fe_3O_4$  Nanoparticles Functionalized With Biocompatible Adsorbed Molecules. *Front. Chem.* **7**.
- Marangoz Ö.** , 2018 , Nano ilaç ve nano ilaç taşıma sistemleri, Doktora Semineri, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Meyers, C. L. F., & Meyers, D. J.**, 2008, Thin-layer chromatography. Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry, A-3D.
- Muñoz de Escalona, M., Sáez-Fernández, E., Prados, J. C., Melguizo, C. & Arias, J. L.**, 2016 , Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. Int. J. Pharm. 504, 11–19.
- Muñoz de Escalona, M., Sáez-Fernández, E., Prados, J. C., Melguizo, C. & Arias, J. L.**, 2016, Magnetic solid lipid nanoparticles in hyperthermia against colon cancer. Int. J. Pharm. **504**, 11–19 .
- Runge SA, Müller RH.**, 1998 , Solid Lipid Nanoparticles (SLNTM) for Oral Administration-Drug Incorporation and Degradation, Diederichs J.E., Müller R.H. (Eds.), Future Strategies for Drug Delivery with Particulate Systems, CRC Press, Florida, 91-100.
- Rostami, E.** et al. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. Chem. Phys. Lipids 181, 56–61 (2014).
- Schwaminger, S. P.** et al. Nature of Interactions of Amino Acids with Bare Magnetite Nanoparticles. J. Phys. Chem. C 119, 23032–23041 (2015).
- Sanad, M. H., Marzook, F., Saleh, G. M., Farag, A. B. & Talaat, H. M.** , 2019 , Radiolabeling, Preparation, and Bioevaluation of <sup>99m</sup>Tc-Azathioprine as a Potential Targeting Agent for Solid Tumor Imaging. Radiochemistry 61, 478–482 .
- Sankar, P. R. et al.**, 2015, Development and validation of rapid RP- HPLC method for the determination of Paroxetine in bulk and pharmaceutical dosage form. Der Pharm. Lett. 7 (3):85-95.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Sodeifian, G., Razmimanesh, F., Saadati Ardestani, N. & Sajadian, S. A.**,2000, Experimental data and thermodynamic modeling of solubility of Azathioprine, as an immunosuppressive and anti-cancer drug, in supercritical carbon dioxide. *J. Mol. Liq.* 299, 112179.
- Skoog, A.D., Holler, F.J. and Nieman, A.T.**, 1997, Enstrümantal Analiz İlerleri, (Çev, E. Kılıç, F. Köseoğlu, H. Yılmaz), Bilim yayıncılık, Ankara, 675s.
- Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I.**, 2014, Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential, *Journal of Physical Science*, 25(1), 59.
- Smalley RE.**, 2002 , Fullerenes, space, and the world's energy challenge. Caneus 2002: Canada-Europe-US-Japan workshop on micro nanotechnology for aerospace applications, Montreal, Canada.
- Syed, A. & Devi, V. K.** , 2019 , Potential of targeted drug delivery systems in treatment of rheumatoid arthritis. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **53**, 101217.
- Syed, A. & Devi, V. K.**, 2018 , Transdermal Delivery Of Azathioprine By Solid Lipid Nanoparticles: In-Vitro And Ex-Vivo Studies, *International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research*, 2320-5148.
- Unak P., Teksoz S., Altun G. D., Muftuler Z. B.**, 2018, Uygulamalı Temel Radyofarmasi, Nobel Tıp Kitabevleri Yayıncılık, İstanbul, s. 33

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

**Uçar, E., Teksöz, S., İçedef Ç.,Yurt Kilçar, A.,Medine, E. İ.,Ari, K., Parlak,Y., Bilgin,B.E., Ünak P.**, 2017, "Synthesis, characterization and radiolabeling of folic acid modified nanostructured lipid carriers as a contrast agent and drug delivery system", *APPLIED RADIATION AND ISOTOPES*, vol.119, pp.72-79, 2017,

**Vural G, Özer A.** , 2015 , Nükleer tıpta ilaç taşıyıcı sistemler ve teranostik Kullanımları. Nükleer Tıp Seminerleri, (2): 109-19

**Yılmaz,S., İçedef Ç., Karatay,K. B., Teksöz S.**, 2021, "Polymer Coated Iron Nanoparticles: Radiolabeling & In vitro Studies", *Current Radiopharmaceuticals*, vol.14 p.37-45.

**Ying, X. Y., Du, Y. Z.**, 2011, Hong, L. H., Yuan, H. & Hu, F. Q. Magnetic lipid nanoparticles loading doxorubicin for intracellular delivery: Preparation and characteristics. *J. Magn. Magn. Mater.* **323**, 1088–1093.

**Williams, K. R.**, 2002, Colored bands: history of chromatography

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** Gökçe TÜRKKANI

**Öğrenim Durumu:**

**Lise:** Bodrum Anadolu Lisesi (2007-2011)

**Lisans:** Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği (2011-2016)

**Yüksek Lisans:** Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği (2018- )

**Mesleki Durumu:**

Agri Sciences Tarım ve İlaç Ürünleri, ARGE Uzmanı (Haziran 2017 - Mart 2019)

Agri Sciences Tarım ve İlaç Ürünleri, Kalite Kontrol Uzmanı (Mart 2019 - )