

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

**18F-FDG-GRAYANOTOKSİN-GADOLİNYUM-  
NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE *İN VİTRO*  
BİYOETKİNLİKLERİN İNCELENMESİ**

**Talha Sıddık AKKAYA**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK**

**İkinci Tez Danışmanı: Öğr.Gör.Dr. İskender İnce**

**Nükleer Bilimler Anabilim Dalı**

**Sunuş Tarihi: 18.12.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**



Talha Sıddık AKKAYA tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “18F-FDG-Grayanotoksin-Gadolinium-Nanoparçacıkların Sentezi ve *In Vitro* Biyoetkinliklerin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 18.12.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza**

**Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK**

.....

**Raportör Üye : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER** .....

**Üye : Prof. Dr. Serhan SAKARYA**

.....



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “18F-FDG-Grayanotoksin-Gadolinium-Nanoparçacıkların Sentezi ve *In Vitro* Biyoetkinliklerin İncelenmesi” 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.

18/ 12 / 2015

Talha Sıddık AKKAYA



**ÖZET****18F-FDG-GRAYANOTOKSİN-GADOLİNYUM-  
NANOPARÇACIKLARIN SENTEZİ VE *İN VİTRO*  
BİYOETKİNLİKLERİN İNCELENMESİ**

AKKAYA, Talha Sıddık

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

İkinci Tez Danışmanı: Öğr.Gör.Dr. İskender İNCE

Aralık 2015, 80 Sayfa

Bu çalışmada, Ericaceae familyasına ait *Rhododendron ponticum L.* (mor çiçekli orman gülü) cinsi otlar ve deli bal içerisinde doğal olarak bulunan grayanotoksin III (GTX-III) bileşiği mor çiçekli orman gülü yaprağı, çiçeği ve deli baldan ekstrakte edildikten sonra Gadolinyum Nanoparçacıklar (GdO@Si-NP) ile konjuge edilmiş daha sonra sentezlenen Gadolinyum Nanoparçacıklar 2deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz (18F-FDG) ile konjuge edilerek radyoişaretlenmiştir. İnsan Meme Adenokarsinom (MCF7) ve Prohormone Konvertaz 3 (PC3) hücrelerinde in vitro olarak biyoetkinlikleri biyoetkinlikleri Gd MR kontrastından yararlanarak incelenmiştir.

Grayanotoksin-III bileşikleri, orman gülü yaprağı ve çiçeği kurutulduktan sonra metanol ile ekstraksiyon, etil asetat ile kristallendirme işlemi ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) cihazı ile saflaştırılmıştır. Grayanotoksin III bileşiğinin deli baldan eldesi ise metanol ile ekstrakte edilip katı faz ekstraksiyonu (SPE) kartuşundan geçirilerek HPLC cihazı ile saflaştırılmıştır. Grayanotoksin-III (GTX-III) bileşiği Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile tanımlanmıştır. Gadolinyum Nanoparçacıklar (Gd-NP) birlikte çöktürme yöntemi ile sentezlenmiş ve silikalama işlemi gerçekleştirildikten sonra Dynamic Light Scattering (DLS) ile boyut ölçümü gerçekleştirilmiştir. Gd-NP' in yapı tayini Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen silikalı Gadolinyum nanoparçacıkları (GdO@Si-NP)

1,1'Karbonildiimidazol/N-Hidroksi Süksinimid (CDI/NHS) metodu kullanılarak orman gülü yaprağı, çiçeği ve deli baldan elde edilen GTX-III-Yaprak (GTX-III-Y) GTX-III-Çiçek (GTX-III-Ç) ve GTX-III-Bal (GTX-III-B) bileşikleri ile konjuge edilmiştir. GTX-III bileşiklerinin GdO@Si-NP ile konjugasyon verimi HPLC analizi ile % 100 olarak saptanmıştır. Konjugasyon ürünü olan GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP'in, PC3 ve MCF7 hücrelerine sitotoksik etkisi ve inkorporasyonu incelenmiştir. Sitotoksikite çalışmalarında, PC3 ve MCF7 hücreleri 0,25-0,5-1-5-10-25 µg/mL konsantrasyonlarında konjugasyon ürünü ile muamele edilip 24 saat inkübe edildikten sonra IC<sub>50</sub> oranları belirlenmiştir. İnkorporasyon çalışmalarında PC3 ve MCF7 hücrelerine 96'lık kuyular içerisinde 10 µg/mL konsantrasyonda, 0,2 mL madde ile muamele edilmiş ve 1, 4, 8 ve 24 saatlerde inkorporasyon değerleri hücrelerin MR görüntülemesinden elde edilen kontrast değerleri ile belirlenmiştir. GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP'in 18F-FDG ile konjugasyonu CDI/NHS metodu kullanılarak gerçekleştirilmiş ve bağlanma verimi ince tabaka radyokromatografisi (Thin Layer Radiochromatography) (TLRC) ve HPLC analizleri ile belirlenmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda, orman gülü ve deli baldan izole edilen GTX-III bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine sitotoksik etkisi olduğu gösterilmiştir. GdO@Si-NP' in MCF7 hücreleri için bu sitotoksik etkiyi düşürdüğü PC3 hücreleri için sitotoksik etkiyi arttırdığı gösterilmiştir. Sentezlenen GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP ile MCF7 ve PC3 hücrelerinin MR görüntüleri alınarak inkorporasyon veriminin hesaplanabileceği gösterilmiştir. CDI/NHS metodunun GTX-III, GdO@Si-NP ve 18F-FDG bileşiklerinin konjugasyonu için uygun olduğu gösterilmiştir. Sentezlenen GTX-III-GdO@Si-NP' ların PC3 ve MCF7 hücre hatlarında MR kontrastı verdiği gösterilmiş ve 18F-FDG ile işaretlenmiştir. Elde edilen sonuçlar sentezlenen bileşiklerin teranostik ajan olarak kullanımında umut vaatmektedir.

**Anahtar sözcükler:** *Rhododendron ponticum L.*, Deli Bal, Grayanotoksin, Gadolinyum nanoparçacıklar, MCF7, PC3, Meme kanseri, Prostat kanseri, MRI, 18F-FDG, Radyoişaretleme

**ABSTRACT*****IN VITRO* BIOACTIVITY EVALUATION OF SYNTHESIZED 18F-FDG-GRAYANOTOXIN-GADOLINIUM- NANOPARTICLES**

AKKAYA, Talha Siddik

MSc in Nuclear Sciences

Supervisor : Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Co-Supervisor : Dr. İskander İNCE

December 2015, 80 pages

In this study, Grayanotoxin III (GTX-III) compounds which can be found naturally in *Rhododendron ponticum L.* (purple coloured forest rose plant, which belongs to Ericaceae family) and “mad honey”, were extracted from the leaves and flowers of the forest rose and mad honey. The extracted compound then conjugated with Gadolinium nanoparticles (GdO@Si-NP). Synthesized Gadolinium nanoparticles were conjugated and radiolabelled with 2deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz (18F-FDG). Afterwards, bioactivity of the conjugation product was investigated by applying to Breast Adenokarsinom (MCF7) and Prohormone Konvertaz 3 (PC3) cell lines and evaluated together with the MR image contrasts.

Grayanotoxin-III compounds were removed from dried leaves and flowers of the forest rose extracted with methanol and crystalized with etil acetate and then purified by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). However, mad honey was mixed with methanol and, the extract was passed through solide phase extraction (SPE) cartridge for seperation of the compounds and then the extract was purified by HPLC. Grayanotoxin-III (GTX-III) compound was identified with Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (LC-MS) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy method. Gadolinium nanoparticles (Gd-NP) were synthesized by co-precipitation method and silicated. Size of the nanoparticles was measured by using Dynamic Light Scattering (DLS) and characterization of the nanoparticles was defined by using Scanning Electron Microscopy (SEM). By using 1,1’carbonyldiimidazole/N-Hydroxysuccinimide (CDI/NHS) conjugation method, synthesized gadolinium nanoparticles (GdO@Si-

NP) were conjugated with GTX-III-Yaprak (GTX-III-Y) GTX-III-Çiçek (GTX-III-Ç) ve GTX-III-Bal (GTX-III-B) compounds. The yield of the conjugation process was determined with HPLC analysis and found to be 100 %.

Bioactivity of the conjugated nanoparticles (GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP) was investigated by carrying out cytotoxicity and incorporation tests on PC3 and MCF7 cell lines. Cytotoxicity tests were done with 0.25-0.5-1-5-10-25 µg/mL substance concentrations, after 24 for hours of observation in the incubation process, IC<sub>50</sub> values were determined. In the incorporation studies, 0.2 mL of the substance concentrated with 10 µg/mL were added into the 96 well plate which was having PC3 and MCF7 cells. The cells were observed for the 1<sup>st</sup>, 4<sup>th</sup>, 8<sup>th</sup> and 24<sup>th</sup> hours and incorporation values were evaluated by using contrast values from MR image of the PC3 and MCF-7 cell cultures.

Conjugation of 18F-FDG with GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP and GTX-III-B-GdO@Si-NP, were carried out with CDI/NHS method and yield of the conjugation process was determined by Thin Layer Radiochromatography (TLRC) and HPLC analysis.

In conclusion, GTX-III compounds extracted from forest rose and mad honey, were found to be cytotoxic to MCF7 and PC3 cell lines. However, GdO@Si-NP decreased the cytotoxicity to MCF7 while increasing PC3 cells. It was shown that incorporation studies can be carried out by using Gadolinium NP contrasts of MCF7 and PC3 cell lines, that was determined MR image technique. CDI/NHS method may be used for conjugation of GTX-III-GdO@Si-NP with 18F-FDG . As a result of the study, the synthesized 18F-FDG-GTX-III-GdO@Si-NP compounds have the potential of being used as theranostic agents.

**Keywords :** *Rhododendron ponticum L.*, Mad Honey, Grayanotoxin, Gadolinium nanoparticles, MCF7, PC3, Breast cancer, Prostate cancer, MRI, 18F-FDG, Radiolabeling

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince engin bilgisi ve deneyimlerini, her türlü maddi ve manevi destek ve yardımlarını esirgemeyen Tez Danışmanım ve Nükleer Bilimler Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, bilgi ve deneyimleri ile bana destek veren ikinci Tez Danışmanım Sayın Öğr.Gör.Dr. İskender İNCE'ye, enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Turgay KARALI'ya, çalışmalarımın tüm aşamalarında tecrübeleri ile bana her zaman yardımcı olan ve destek veren Sayın Ar. Gör. Özge Kozguş GÜLDÜ ve Doktora öğrencisi Sayın Volkan TEKİN başta olmak üzere Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'ndaki tüm Hocalarım, araştırma görevlileri ve arkadaşlarıma, Eczacılık Fakültesindeki çalışmalarımda yardımcı olan Eczacılık Fakültesi Doktora öğrencisi Sayın Selin Aktar'a, bitki öğütme çalışmalarımda yardımcı olan Eczacılık Fakültesi Farmakognozi Bölümünden Prof. Dr. Hüsniye KAYALAR'a, 18F-FDG sağlayan ve hücre MR görüntülemelerine imkan sağlayan Şifa Üniversitesi Hastanesi'ne, 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında eğitim hayatıma destekte bulunan TÜBİTAK'a

Teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her an desteklerini yanımda hissettiğim anne-babama ve eşim Aida' ya çok teşekkür ederim.

Talha Sıddık AKKAYA



## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxvii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Orman Gülü Hakkında Genel Bilgiler .....	3
2.2 Deli Bal Hakkında Genel Bilgiler .....	3
2.3 Grayanotoksin (GTX) Bileşikleri .....	4
2.3.1 Grayanotoksin-III (GTX-III) bileşiği .....	5
2.4 Ayırma ve Saflaştırma Yöntemleri .....	5
2.4.1 Ekstraksiyon .....	5
2.4.2 Kristallendirme .....	7
2.5 Kromatografik Yöntemler .....	7
2.5.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) .....	7
2.6 Kimyasal Yapı Tayini Yöntemleri .....	9

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.1 Sıvı kromatografî – kütle spektrometresi (LC-MS).....	9
2.6.2 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi .....	11
2.7 Nano İlaç Teknolojisi.....	12
2.7.1 Gadolinyum nanoparçacıklar .....	13
2.8 Nanoparçacıkların Yapı Analiz Yöntemleri .....	13
2.8.1 Dinamik ışık saçılması (DLS) .....	13
2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	14
2.9 Kanser .....	15
2.9.1 Meme kanseri.....	16
2.9.2 Prostat kanseri.....	16
2.10 Hücre Çalışmaları .....	16
2.11 Manyetik Rezonans Görüntüleme ( MRI ) .....	17
2.12 <sup>18</sup> F Radyoizotopu .....	18
2.13 <sup>18</sup> F-FDG Radyofarmasötiği .....	19
2.14 Radyofarmasötikler İçin Kalite Kontrol Yöntemleri .....	19
2.14.1 İnce tabaka radyokromatografisi (Thin layer radiochromatography) (TLRC) yöntemi.....	20
3. MATERYAL METOD .....	21
3.1 Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlar.....	21

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1.1 Malzemeler .....	21
3.1.2 Kimyasallar.....	21
3.1.3 Cihazlar.....	21
3.2 Orman Gülü Yaprak, Çiçek ve Deli Bal Ekstraksiyonu .....	23
3.2.1 Orman gülü yaprağından Grayanotoksin-III' ün (GTX-III) ekstraksiyonu ...	23
3.2.2 Orman gülü çiçeğinden Grayanotoksin-III (GTX-III) ekstraksiyonu .....	24
3.2.3 Deli baldan Grayanotoksin-III' ün (GTX-III) ekstraksiyonu .....	26
3.3 Grayanotoksin-III Bileşiğinin HPLC Analizi ile Saflaştırma İşlemi .....	27
3.3.1 GTX-III bileşiğinin orman gülü yaprağından HPLC analizi ile saflaştırma işlemi.....	27
3.3.2 GTX-III bileşiğinin orman gülü çiçeğinin HPLC analizi ile saflaştırma işlemi.....	28
3.3.3 GTX-III bileşiğinin deli baldan HPLC analizi ile saflaştırma işlemi .....	28
3.4 GTX-III bileşiğinin LC/MS ve NMR Yöntemi ile Yapı Analizi .....	29
3.4.1 GTX-III bileşiğinin LC/MS yöntemi ile yapı analizi .....	29
3.4.2 GTX-III bileşiğinin NMR yöntemi ile yapı analizi .....	29
3.5 Gadolinyumoksit Nanoparçacıkların (GdO-NP) Sentezi ve Silikalanması.....	30
3.5.1 GdO-NP bileşiğinin sentezi .....	30
3.5.2 GdO-NP'lerin silikalanması .....	31

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.6. GdO-NP ve GdO@Si-NP' ın Yapı Analizleri .....	31
3.6.1 GdO-NP ve GdO@Si-NP' ın DLS ile boyut ölçüm çalışmaları.....	31
3.6.2 GdO@Si-NP' ın SEM analizi çalışmaları.....	31
3.7 Grayanotoksin-III-Yaprak (GTX-III-Y), Grayanotoksin-III-Çiçek (GTX-III-Ç) ve Grayanotoksin-III-Bal (GTX-III-B) ile GdO@Si-NP konjugasyonu .....	32
3.8 GTX-III bileşiğinin GdO@Si-NP ile Bağlanma Verimi Tayini .....	32
3.9 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerinin DLS Yöntemi ile Boyut Ölçüm Çalışmaları .....	33
3.10 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B Bileşiklerine Ait Hücre Kültürü Çalışmaları .....	33
3.10.1 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si- NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücreleri üzerinde stotoksisite çalışmaları .....	33
3.10.2 GdO, GdO@Si, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi.....	34
3.11 GdO, GdO@Si, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX- III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerine Ait MR Görüntüleme Çalışmaları.....	35
3.12 18F-FDG ile GTX-III-GdO@Si-NP' ın Konjugasyonu .....	35
3.13 Kalite Kontrol Yöntemleri .....	35
3.13.1 TLRC yöntemi ile kalilite kontrol analizi .....	36

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.13.2 HPLRC yöntemi ile kalilite kontrol analizi .....	36
4. BULGULAR VE TARTIŞMA .....	37
4.1 Orman Gülü Yaprağı, Çiçeği ve Deli Baldan GTX-III Bileşiğinin Eldesinin HPLC Analiz Sonuçları .....	37
4.1.1 GTX-III bileşiğinin orman gülü yaprağından HPLC analizi ile saflaştırılması .....	37
4.1.2 GTX-III bileşiğinin orman gülü çiçeğinden HPLC analizi ile saflaştırılması .....	37
4.1.3 GTX-III bileşiğinin deli baldan HPLC analizi ile saflaştırılması .....	38
4.2 GTX-III Bileşiğinin LC/MS ve NMR Yöntemi ile Yapı Analizi Sonuçları ...	39
4.2.1 GTX-III bileşiğinin LC/MS yöntemi ile yapı analizi .....	39
4.2.2 GTX-III Bileşiğinin NMR yöntemi ile yapı analizi sonuçları.....	40
4.3 GdO@Si-NP Bileşiğinin DLS ve SEM Analizi Sonuçları.....	46
4.3.1 GdO@Si-NP bileşiğinin DLS analizi sonuçları .....	46
4.3.2 GdO@Si-NP bileşiğinin SEM analizi sonuçları.....	47
4.4 GTX-III ile GdO@Si-NP Bileşiğinin Bağlanma Verimi .....	48
4.4.1 GTX-III-Y ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi .....	48
4.4.2 GTX-III-Ç ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi.....	49
4.4.3 GTX-III-B ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi.....	50

## İÇİNDEKİLER (devam)

### Sayfa

4.5 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerinin DLS Yöntemi ile Boyut Ölçüm Analizi Sonuçları .....	50
4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	52
4.6.1 MCF7 ve PC3 hücrelerinde sitotoksosite çalışmasının sonuçları.....	52
4.6.2 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi.....	56
4.7 GdO@Si-NP MR Görüntüleme Çalışmalarının Sonuçlarının İncelenmesi.....	58
4.7.1 GdO@Si-NP MCF 7 hücrelerine muamelesinin MR görüntüleme çalışmalarının görüntülerinin incelenmesi .....	58
4.7.2 GdO@Si-NP PC3 hücrelerine muamelesinin MR görüntülerinin incelenmesi.....	59
4.8 18F-FDG Radyoışaretleme Çalışmalarının TLRC ve HPLRC Analizi Sonuçları .....	61
4.8.1 18F-FDG radyoışaretleme çalışmalarının TLRC analizi sonuçları .....	61
4.8.2 18F-FDG radyoışaretleme çalışmalarının HPLRC analizi sonuçları.....	63
5. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	67
KAYNAKLAR DİZİNİ .....	69
ÖZGEÇMİŞ .....	79
EKLER .....	

**ŞEKİLLER DİZİNİ**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Mor çiçekli orman gülü .....	3
2.2 Grayanotoksin bileşiklerinin moleküler yapısının genel gösterimi .....	4
2.3 Grayanotoksin III bileşiğinin moleküler yapısı .....	5
2.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi sistemi .....	8
2.5 Kütle Spektrometresi sistemi .....	9
2.6 Nanoparçacıklar için ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi.....	12
2.7 SEM görüntülemesinde saçılan ışınların gösterimi.....	14
2.8 <sup>18</sup> F radyoizotopunun bozunma şeması .....	18
2.9 <sup>18</sup> F-FDG molekül yapısı.....	19
3.1a Orman gülü yaprağı .....	23
3.1b Kurutulmuş yaprak .....	23
3.1c Öğütülmüş yaprak tozu .....	23
3.2a Orman gülü yaprağının metanol ile çözülmesi .....	24
3.2b Evaporasyon işlemi .....	24
3.2c Etil asetat ile çözülme işlemi .....	24
3.3a Orman gülü çiçeği örneği .....	25
3.3b Kurutulmuş çiçek örnekleri .....	25
3.3c öğütülmüş çiçek tozu .....	25
3.4a Çiçek tozunun metanol ile çözülmesi .....	25

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.4b Evaperasyon işlemi .....	25
3.4c Kristallenmiş görüntüsü.....	25
3.5a Deli balın ultra saf su ve metanol çözülmesi ve santrifüj işlemi .....	26
3.5b Santrifüj sonrası etanol ile karıştırma .....	26
3.5c Argon gazı ile kurutma işlemi .....	26
3.6 GdO-NP sentezi geri akımlı inkübasyon düzeneği.....	30
4.1 Orman gülü yaprağı özütünün HPLC kromatogramı .....	37
4.2 Orman gülü çiçeği özütünün HPLC kromatogramı .....	38
4.3 Deli bal özütünün HPLC kromatogramı.....	38
4.4 Orman gülü yaprağı LC/MS analizi sonucu .....	39
4.5 GTX-III bileşiğinin karbon atomu ve fonksiyonel gruplarının numaralandırılmış yapısı .....	40
4.6 Deli Bal özütünün C-NMR çalışması sonuçları .....	41
4.7 Deli Bal özütünün H-NMR çalışması sonuçları .....	41
4.8 Yaprak pik-1 örneğinin C-NMR çalışması sonuçları .....	43
4.9 Yaprak pik-1 örneğinin H-NMR çalışması sonuçları .....	43
4.10 Yaprak pik-2 örneğinin C-NMR çalışması sonuçları .....	45
4.11 Yaprak pik-2 örneğinin H-NMR çalışması sonuçları .....	45
4.12 GdO-NP' in DLS ile yapılan boyut analiz sonucu. ....	46

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 GdO@Si-NP' in DLS ile yapılan analiz sonucu. ....	47
4.14 GdO@Si-NP bileşiğinin SEM görüntüsü. ....	48
4.15 GdO@Si-NP' ın SEM analizinde görüntülenen karakteristik Gd, Si ve O pikleri .....	48
4.16 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Y ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları. ....	49
4.17 GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları. ....	49
4.18 GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-B ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları. ....	50
4.19 GTX-III-Y-GdO@Si-NP' ın DLS analizi sonucu. ....	51
4.20 GTX-III-Ç-GdO@Si-NP' ın DLS analizi sonucu. ....	52
4.21 GTX-III-B-GdO@Si-NP' ın DLS analizi sonucu. ....	52
4.22 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF7 hücreleri ile yapılan sitotoksosite çalışmalarının sonuç grafikleri. ....	54
4.23 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin PC3 hücreleri ile yapılan sitotoksosite çalışmalarının sonuç grafikleri .....	55
4.24 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP örneklerinin MCF7 hücrelerinde zamanla bağlanma verimi değişim grafiği. ....	57

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.25 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP örneklerinin PC3 hücrelerinde zamanla bağlanma verimi değişim grafiği. ....	58
4.26 GdO@Si-NP ile muamele edilmiş MCF7 hücrelerinin MR çekim görüntüsü.....	58
4.27 MCF7 hücrelerine uygulanan GdO@Si-NP'in MR Kontrast –Konsantrasyon grafiği. ....	59
4.28 GdO@Si-NP ile muamele edilmiş PC3 hücrelerinin MR çekim görüntüsü. ....	60
4.29 PC3 hücrelerine uygulanan GdO@Si-NP'in MR Kontrast– Konsantrasyon grafiği. ....	60
4.30 18F-FDG bileşiğinin TLRC kromatogramı .....	62
4.31 18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı .....	62
4.32 18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı .....	62
4.33 18F-FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı .....	63
4.34 GdO@Si-NP' na ait HPLC kromatogramı. ....	64
4.35a 18F-FDG bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (a1) DAD dedektör analizi	64
4.35b 18F-FDG bileşiğinin HPLRC analiz sonucu b) (a2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu .....	64
4.36a 18F-FDG-GTX-III-Y-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (b1) DAD dedektör analizi .....	65
4.36b 18F-FDG-GTX-III-Y-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu b) (b2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu .....	65

**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.37a 18F-FDG-GTX-III-Ç-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (c1) DAD dedektör analizi .....	65
4.37b 18F-FDG-GTX-III-Ç-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu b) (c2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu .....	65
4.38a 18F-FDG-GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (d1) DAD dedektör analizi .....	66
4.38b 18F-FDG-GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu b) (d2) Radyoaktivite dedektörü analiz sonucu .....	66



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 LC-MS sistemi iyonizasyon kaynakları. ....	10
2.2 MS sistemi kütle analizörleri. ....	10
3.1 Orman gülü yaprağı özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları .....	27
3.2 Orman gülü çiçeği özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları .....	28
3.3 Deli bal özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları. ....	29
4.1 GTX-III bileşiğine ait teorik ve deneysel parçalanma ürünlerinin LC/MS sonucunun karşılaştırılması .....	40
4.2 Deli bal özütü C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması .....	42
4.3 Yaprak pik-1 C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması .....	44
4.4 Yaprak pik-2 C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması .....	46
4.5 GdO@Si-NP % ağırlık ve % atomik değerlerinin oranı .....	48
4.6 GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin DLS ile belirlenen parçacık boyutları .....	51
4.7 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF-7 ve PC3 hücreleri için IC50 oranları .....	56
4.8 18F-FDG, 18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP, 18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve 18F-FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin TLRC analizi verileri .....	61
4.9 18F-FDG ile GdO@Si-NP' ın işaretleme çalışması Rt değerleri .....	63



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Rf	Rezolüsyon faktörü
Gd	Gadolinium
Si	Silisyum
T <sub>1</sub>	Boylamsal gevşeme zamanı
eV	Elektron Volt
<u>Kısaltmalar</u>	
GTX	Grayanotoksin
GTX-III	Grayanotoksin-III
GTX-III-Y	Grayanotoksin-III-Yaprak
GTX-III-Ç	Grayanotoksin-III-Çiçek
GTX-III-B	Grayanotoksin-III-Bal
GdO-NP	Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
GdO@Si-NP	Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
18F-FDG	2-deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz
GTX-III-Y-GdO@Si-NP	Grayanotoksin-III-Yaprak-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
GTX-III-Ç-GdO@Si-NP	Grayanotoksin-III-Çiçek-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
GTX-III-B-GdO@Si-NP	Grayanotoksin-III-Bal-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları

18F-FDG-GTX-III-Y-GdO@Si-NP	2-deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz- Grayanotoksin-III-Y aprak-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
18F-FDG-GTX-III-Ç-GdO@Si-NP	2-deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz- Grayanotoksin-III-Çiçek-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
18F-FDG-GTX-III-B-GdO@Si-NP	2-deoksi-2-(F-18) floro-D-glukoz- Grayanotoksin-III-Bal-Silikalı Gadolinium Oksit Nanoparçacıkları
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
VGSC	Voltaj Bağımlı Sodyum Kanalları
LC-MS	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
SEM	Tarayıcı (scanning) Elektron Mikroskobu
MCF7	İnsan Meme Adenokarsinom
PC3	Prohormone Konvertaz 3
NP	Nanoparçacık
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
MR	Manyetik Rezonans
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans
TEOS	Tetra Etil Orto Silikat
CDI	1,1'Karbonildiimidazol
NHS	N-Hidroksi Süksinimid

cTABr	Hekzadesiltrimetilamonyum Bromür
PSA	Prostat Spesifik Antijen
ASCO	American Society of Clinical Oncology
IARC	Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı
PBS	Fosfat tampon Çözeltisi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
MTT	Mikrokültür Tetrazolium Testi
RIPA	Radio Immuno Precipitation Assay
BCA	Binchoninic Acid
RID	Refraktif İndeks Dedektör
DAD	Diode Array Dedektör
TCSB	Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı
LAF	Laminar Air Flow
EDS	Enerji-dağılım X-ışını spektroskopisi
BPC	British Pharmacopoeia Commission



## 1.GİRİŞ

Kanser hastalığı ülkemizde ve dünyada en çok ölüme neden olan hastalıklardan birisidir. Kanser hastalığı üzerine bir çok çalışma yapılarak hastalığı iyileştiren veya ilerleyişini yavaşlatan ilaçlar bulunuyor olsa bile bu ilaçların yan etkileri hastalar üzerinde bir çok olumsuz etkiye neden olmaktadır. Bu nedenle kansere karşı üretilen ilaçların sağlıklı hücrelerin tahribatını en aza indirmek çok önemlidir. Günümüzde bu olumsuz etkinin en aza indirilmesi için bilim insanları doğal bileşikler ve hedefe yönelik ilaç çalışmalarına yönelmişlerdir.

Bazı Rhododendron türlerinden elde edilen ekstraktların anti-kanser özelliği bulunmaktadır. (Fu et al., 2012, Jang et al., 2005, Byun et al., 2008, Popsescu and Kopp'dan, 2013). GTX-III bileşiğinin p38 MAP kinaz ve hücre içi  $Ca^{2+}$  akışını arttırdığı, ve HL-60 hücre hattında voltaj bağımlı sodyum kanallarına (VGSC) bağlı apoptozise neden olduğunu göstermişlerdir (Popescu et al., 2009). P38 MAP kinaz aktivasyonunun kanser hücrelerinde apoptozise neden olduğu bilinmektedir; retinoids, cisplatin ve kemoterapi ilaçları kansere karşı bu enzimi aktive etmektedir (Olson and Hallahan, 2004). Bununla birlikte, GTX-II ve GTX-III bileşiklerinin insan lenfositlerinde herhangi bir kromozom hasarına neden olmadığı gösterilmiştir (Cucer ve Eröz, 2010). GTX-I bileşiğinin 5 çeşit insan kanser hücresinde orta derece sitotoksik etkiye neden olduğu gösterilmiştir (Jang et al., 2005, Popescu and Kopp, 2013).

Sikes ve arkadaşlarının *in vitro* olarak yaptıkları çalışmalarda, metastatik prostat kanseri ve VGSC arasındaki etkileşimi grayanotoksin ve diğer sodyum iyon kanalını bloke eden bileşiklerle yaptıkları çalışmada metastatik PC3 hücrelerinin büyümesini inhibe ettiğini göstermişlerdir (Sike et al., 2003).

Birçok terapötik, uyuşturucu ve farmakolojik ajan iyon kanallarını hedef almaktadır. Bundan dolayı GTX bileşiklerinin iyon kanalları üzerindeki biyoaktiviteye sahip olması önemlidir. Örneğin, voltage-gated kalsiyum, sodyum ve potasyum kanallarını düzenleyen ilaçlar ağrı, kalp hastalıkları, migren, epilepsi, kanser, ve otoimmün hastalıkları gibi hastalıkların iyileştirilmesi için kullanılmaktadır (Kaczorowski et al., 2008, Wulff et al., 2009, Triggle, 2007, Eijkelkamp, 2012, Zhorov and Tikhonov'den, 2013)

Nanoparçacıklar, yüksek konsantrasyonda ilaç kullanımını gerektiren spesifik hücre ve organların yada kanda bulunan bir çok hastalığın tedavi ve görüntülenmesinde kullanılmak için tasarlanmaktadır (Moghimi et al., 2001; Panyam and Labhasetwar, 2003; Behrouzkie'den 2015). Özellikle MR görüntülemesinde kontrastı artırma özelliğinden dolayı Gd nanoparçacıklar biyoetkinliği olan uygun bileşikler ile konjuge edilerek bir çok *in vitro* ve *in vivo* MR görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmektedir.

Yoon ve arkadaşları gadolinyum hidroksit nanoparçacıklarına polietilen glikol konjuge ederek MTT metodu ile MCF7 hücreleri üzerinde *in vitro* stotoksisite ve *in vivo* MRI çalışmaları gerçekleştirmiştir (Yoon et al., 2009). Bir başka çalışmada Gadolinyum oksit nanoparçacıklarına dietilen glikol polimeri konjuge edilerek insan deri kanser hücrelerine stotoksik etkisi incelenmiştir (Behrouzkie et al., 2015). Tseng ve arkadaşları Gadolinyum heksandion nanoparçacıklarını insan mezenkimal kök hücreleri ile işaretleyerek *in vitro* MR görüntüsü almayı başarmışlardır (Tuseng et al., 2010).

Aynı zamanda nanoparçacıklar ile hastalıklı dokuların MR görüntüsünü elde ederken tedavi edebilecek teranostik ajanlar için çalışmalar gerçekleştirilmektedir. Bhakta ve arkadaşları silikalı Gadolinyum oksit nanoparçacıkları DNA üzerine konjuge ederek terapötik gen taşınması gerçekleştirerek aynı zamanda MR görüntüsü alabilmişlerdir (Tang and Cheng, 2013). Gadolinyum endohedral metallofullerenol nanoparçacıkların normal hücrelere düşük toksik etki yaparken güçlü bir şekilde karaciğer tümörü, Lewis akciğer kanseri ve MCF7 hücrelerinin aktivitesini güçlü bir şekilde durdurduğu gözlenmiştir (Chen et al., 2005; Liu et al., 2009b; Meng et al., 2011)

Yapılan bu çalışmanın amacı doğal toksik bir madde ile nanoparçacıklar ve radyoizotop bağlı bir ajanın sentezi ve kanser hücreleri üzerindeki etkisini araştırarak MR görüntüsü ve aynı zamanda PET görüntülemesinde kullanılabilecek teranostik bir ajan geliştirme çalışmalarına katkı sağlamak.

## 2.GENEL BİLGİLER

### 2.1 Orman Gülü Hakkında Genel Bilgiler

Mor çiçekli orman gülü (*Rhododendron ponticum L.*), yaprak dökmeyen çalı şeklinde, Karadeniz bölgesinde, Akdeniz ülkelerinde ve Britanya adalarında görülen ve ormanları tehdit eden istilacı bir bitki olarak bilinir (Şekil 2.1) (Küçük et al., 2007).



Şekil 2.1 Mor çiçekli orman gülü (Nurettin Akkaya – 14.06.2014)

*Rhododendron ponticum L.* daki toksik içerik özellikle yüksektir (Jordan, 2006) Kuzey Anadolu bölgesinde analjezik olarak romatizmal veya diş ağrısı, soğuk algınlığı ve ödem gibi rahatsızlıklara karşı dahili ve harici olarak kullanılmaktadır (Taşdemir vd., 2004). *Rhododendron ponticum L.* dan elde edilen bazı bileşiklerin HL- 60 hücreleri ile yapılan *in vitro* çalışmalarda apoptozisi indüklediği ve Lewis akciğer kanserinde katı kanser büyümesini önlediği görülmüştür (Li et al., 2008). Diğer bir çalışmada antimikrobiyal aktivitesinin olduğu ve yaprağından elde edilen aseton ekstraktının prostat kanseri epitel hücrelerine (PC3) karşı oldukça etkili olduğu görülmüştür (ManiKumar et al., 2011)

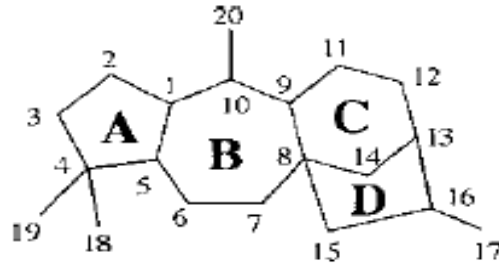
### 2.2 Deli Bal Hakkında Genel Bilgiler

Rhododendron bal, Türkiye'nin Karadeniz Bölgesinde yetişen Rhododendron türü çiçeklerden toplanan bir bal çeşididir (Gündüz vd., 2007). Deli ya da yabani bal olarakta adlandırılır. Deli bal, kaynağı *Rhododendron*

*ponticum L.* bitkisi olan ve grayanotoksin olarak bilinen asetilandromedol ve andromedotoxin bileşikleri içermektedir. Grayanotoksin içeriğinden dolayı deli balın fazlaca tüketilmesi siddetli baş dönmesi, tansiyon düşüklüğüne ve kalp atışının düşmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte deli balın şeker düzeyini ve kolesterolü düşürdüğü hayvan deneyleri ile gösterilmiştir (Öztaşan vd., 2005). Aynı zamanda antibakteriyel, anti mantar ve antioksidan özelliği olduğu belirlenmiştir (Ertürk, 2009, Silici vd., 2010).

### 2.3 Grayanotoksin (GTX) Bileşikleri

Grayanotoksinler, Rhododendron bitki türlerinde bulunan ana toksin bileşikleridir (Wong et al., 2002). GTX' ler özel tetrasilik diterpenoid karbon iskeletine sahiptir ve A, B, C ve D halkaları üzerinde hidroksil grupları bulunan bir yapıları vardır (Şekil 2.2 ) (Terai et al., 2000).

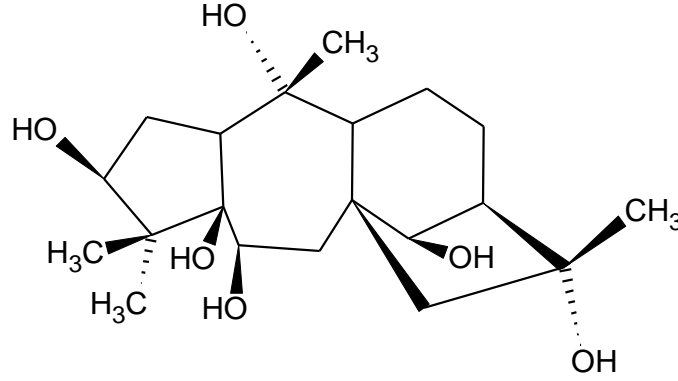


Şekil 2.2 Grayanotoksin bileşiklerinin moleküler yapısının genel gösterimi (Terai'den 2003).

GTX' ler aynı zamanda andromedotoxin, asetilandromedol ve rhodotoksin olarak adlandırılır. Su ve yağda çözünebilir GTX' ler uçucu değildir ve 300 °C sıcaklığa kadar bozunma göstermezler. Rhododendron bitki türlerindeki ana toksik izomer, Grayanotoksin III (GTX-III) bileşiğidir, grayanotoksin I (GTX-I) ve grayanotoksin II (GTX-II) daha az toksik özellik gösterir. Bunlarla birlikte, daha az toksik olan literatürde belirtilen 18 farklı grayanotoksin bulunmaktadır (Wong et al., 2002). GTX-I, GTX-II ve GTX-III için *in vivo* çalışmalarla belirlenen LD<sub>50</sub> değerleri GTX-I ve GTX-III için sırası ile 1,28 ve 0,91 mg/kg olarak bulunmuştur. Fakat GTX-I 4 mg/kg uygulandığı halde toksisite göstermemiştir (Scott et al., 1971). Grayanotoksin hücre membranında bulunan sodyum kanallarını bloke ederek aksiyon potansiyeli geçirgenliğine etki eden bir nörotoksindir. GTX-I ve GTX-III bunun için ideal yapıya sahiptir. Fakat GTX-II bu özelliği göstermez (Wong et al., 2002).

### 2.3.1 Grayanotoksin-III (GTX-III) bileşiği

GTX-III bileşiği (Şekil 2.3) rhodendron bitkilerinde ve bu bitkilerden üretilen balda bulunan ana toksik izomerdir (Wong et al., 2002, Gunduz et al., 2007, Kurtoglu 2014). Bitki ve bal gibi doğal ürünlerden doğal olarak elde edildiği için doğal bir toksindir. GTX-III' ün 5,7,6,5 üyeli halkalı karbon iskelet yapısına sahip olarak biyoaktivite göstermesi önemli bir özelliğidir (Fukumoto et al., 1993). GTX-III bileşiğinin hücre üzerindeki etkisi, ilk olarak voltaj bağımlı kalsiyum kanallarını etkileyerek  $Ca^{2+}$  akışının artmasını sağlar, daha sonra voltaj bağımlı  $Na^+$  kanallarını inhibe ederek sinir sisteminde uyarılmaya neden olur ve zehirlenmeye yol açar (Kim et al., 2010). GTX-III bileşiğinin ayrıca anti kanser, antimikrobiyal, doğal böcek öldürücü etkisi göstermektedir. (Popescu et al., 2009, Sakata et al., 1977). Bununla birlikte GTX-III bileşiğinin insan lenfosit kromozomal hasara yol ağmadığı bilinmektedir (Cucer ve Eröz, 2010).



Şekil 2.3 Grayanotoksin III bileşiğinin moleküler yapısı

## 2.4 Ayırma ve Saflaştırma Yöntemleri

### 2.4.1 Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, çözeltilerden, katı karışımlardan bir maddeyi ayırmak ve çözünen, istenmeyen safsızlıkları karışımlardan uzaklaştırmak için yapılan işlemdir (Özden vd., 2004) . Dört şekli vardır:

- I. Çözeltilerden yapılan ekstraksiyonlar
- II. Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyonlar
- III. Sürekli çekmeye dayanan sıvı-sıvı ekstraksiyonları
- IV. Katılardan yapılan ekstraksiyonlar

#### **2.4.1.1 Cözeltilerden yapılan ekstraksiyonlar**

Birbiri ile karışmayan iki sıvının ayırma hunisi içerisinde çalkalanarak sıvılardan birinde bulunan maddenin diğer sıvıya geçirilmesi ile yapılan ekstraksiyon işlemidir. Bu işlem sonrasında sıvıların dengeye gelmesi beklenir ve denge halinden sonra her iki çözücüde çözünen maddenin dağılma oranı sabittir (Nerst dağılma kanunu). Organik maddeler genellikle organik çözücülerde sudakinden daha fazla çözünür. Buna göre, organik maddeler sulu çözeltilerden bir organik çözücü ile çekilebilir. Sulu çözeltiye elektrolit maddeler (NaCl veya  $\text{CaCl}_2$  gibi) ilave edilirse organik maddenin sulu fazdaki çözünürlüğü azalır. Aynı miktarda çözücü ile daha fazla madde istenilen çözücü fazına alınır. Ekstraksiyon işlemi esnasında çalkalama dolayısı ile oluşabilecek buhar basıncından dolayı huni ters çevirilip musluğu açılarak denge sağlanır. Ekstraksiyon işleminde fazların birbirinden ayrılmaması yada emülsiyon halinde, sulu fazı NaCl ile doyurmak, çözücü uygun ise birkaç damla alkol damlatmak, bir süre beklemek, sıvı faza pipetle hava üfleme veya çözücü uygun ise ısıtmak gibi işlemler fazların ayrılmasına yardımcı olur (Özden vd., 2004).

#### **2.4.1.2 Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyonlar**

Bu tür ekstraksiyonlarda ayrılacak madde ekstraksiyon çözeltisi ile kimyasal bir reaksiyon verir. Karışımlardaki bileşenleri ayırmak veya organik madde içindeki safsızlıkları uzaklaştırmak için uygulanır (Özden vd., 2004).

#### **2.4.1.3 Sürekli çekmeye dayanan sıvı-sıvı ekstraksiyonları**

Organik maddeler su içerisinde organik çözücülerden daha fazla çözündüklerinde veya bir katı fazla bulunup organik çözücülerde az çözündüklerinde sürekli ekstraksiyon işlemi uygulanır (Özden vd., 2004).

#### **2.4.1.4 Katılardan yapılan ekstraksiyonlar**

Ham katının, uygun çözücü içinde belirli şartlarda muamele edilmesi ile yapılan ayırma işlemidir. Etkin maddeler hücre içinde bulunur. Katı çözücü içine atıldığında çözücü difüzyon olayı ile hücre içine girerek içindeki etkin maddeyi çözer, hücre gerilir ve parçalanır. Sıvının hücre içine girmesinin hızlanması için çeperin parçalanması gerekir (Özden vd., 2004).

## 2.4.2 Kristallendirme

Safsızlık içeren organik kimyasal bileşiklerin saflaştırılması genellikle uygun çözücü veya çözücü karışımlarından kristallendirilerek yapılır. Safsızlığı fazla olan ham ürünlere direk kristalizasyon işlemi uygulanmadan ekstraksiyon veya distilasyon gibi ön saflaştırma işlemleri uygulanır. Katıların kristallendirilerek saflaştırılmaları uygun çözücü veya karışımlardaki farklı çözünürlük özelliklerine dayanır. Kristalizasyon işleminin safhaları şu şekildedir:

1. Saf olmayan maddenin uygun çözücüde kaynama noktası veya kaynama noktasına yakın bir sıcaklıkta çözülmesi.
2. Sıcak çözeltinin çözünmemiş madde veya tozlardan süzülerek ayrılması.
3. Sıcak çözeltinin soğumaya bırakılıp, çözülmüş maddenin kristalizasyonunun sağlanması.
4. Kristallerin çözücü fazından süzülerek alınması ve kurutulması. Oluşan kristallerin kurutulduktan sonra saflıkları, erime noktasına bakılarak kontrol edilir, saf değilse çözücü ile yeniden kristallendirilir. Bu işleme rekristalizasyon denir. Erime noktası sabitleşene dek bu işleme devam edilir (Özden vd., 2004).

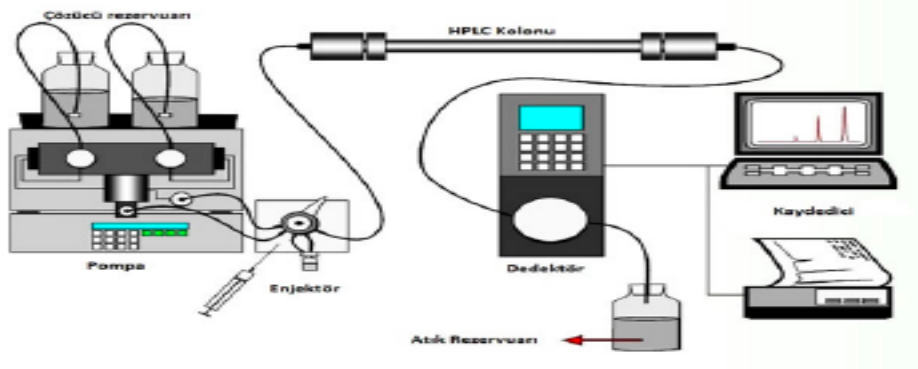
## 2.5 Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, bir karışımı oluşturan farklı kimyasal maddelerin, birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine veya farklı etkileşmelerine dayanarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir. Bu dağılım dengeleri maddelerin, iki ayrı faz arasında adsorbsiyon, çözünürlük, kapillarite, iyon değişimi veya moleküler eleme gibi esaslara dayanmaktadır. Kromatografi maddelerin tanımlanması ve saflaştırılmasında kullanılan kalitatif ve kantitatif bir ayırma yöntemidir. Kromatografik yöntemlerde sabit faz (katı, sıvı) hareketli faz (sıvı, gaz) bulunmaktadır. Karışımları oluşturan bileşikler bir biri ile karışmayan bu iki faz arasında farklı göç sergileyerek birbirlerinden ayrılırlar (Özden vd., 2004).

### 2.5.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC çalışma prensibi, sıvı veya uygun bir çözücüde çözülmüş olan katı bir örneğin yüksek basınç uygulanarak uygun bir mobil faz içerisinde kromatografik bir kolon içinden geçirilerek çeşitli dedektörler yardımı ile analiz edilmesine dayanır. Bu ayırma işleminin temeli çözünen/sabit faz etkileşimi, sıvı-katı

adsorpsiyonu, sıvı-sıvı ayrılması, iyon değişimi ve çözünen mobil faz etkileşimlerine dayanır (Harvey, 2000). Genel olarak bir HPLC sistemi (Şekil 2.4) çözelti rezarvuarı, enjektör ünitesi (manual veya autosampler), kolon, dedektör ve data sağlayıcı kontrol sisteminden oluşmaktadır (Kazakevich and Lobrutto, 2007).



Şekil 2.4 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi sistemi

HPLC cihazlarında kolon ve dedektörler en önemli kısımlardır. Analizi yapılacak olan bileşiğe göre kolon ve dedektör seçimi yapılır. Temel olarak HPLC dedektörleri evrensel ve seçici olarak ikiye ayrılır. Seçici dedektörler çözgenin bazı fizikokimyasal özelliklerine göre sonuç verir. Evrensel dedektörler ise tüm çözgenlerin fizikokimyasal özelliklerinden bağımsız olarak sonuç vermektedir (Kazakevich and Lobrutto, 2007). Refraktif İndeks Dedektörü (RID), ultraviyole dedektörü, floresans dedektörü, elektrokimyasal dedektör, elektrik iletkenlik dedektörü, sıvı ışık saçılma dedektörü yaygın olarak kullanılan dedektörlerdir (Bak, 2011, Anroop et al., 2011).

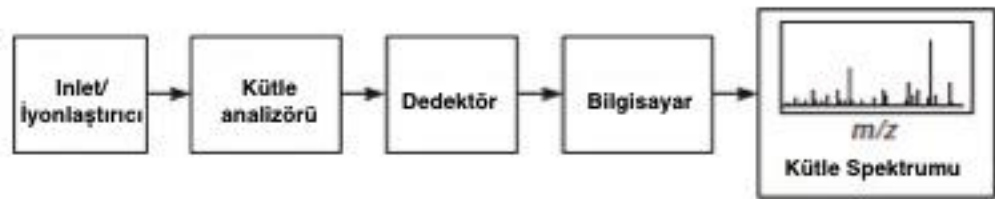
RID dedektörü duyarlılığı düşük olmasına (100 ng-1 µg) rağmen evrensel bir dedektör olduğu için özellikle UV ve floresans dedektörlerde dedekte edilemeyen non-iyonik maddeler için uygundur (Harvey, 2000, Arti et al., 2011).

Ultraviyole dedektörü HPLC sistemlerinde en çok kullanılan dedektörlerdir. Bir çok organik bileşik ışığı UV bölgede (190-400 nm) ve görünür bölgede (400-750 nm) ışığı absorbe eder. UV dedektörler sabit dalgaboyu, değişken dalga boyu ve Diod Array Dedektörler (DAD) olarak üç kısma ayrılır. Tüm bu dedektör tipleri, maddenin kimyasal yapısı ve sahip olduğu fonksiyonel gruplara bağlı olarak ışığı absorblama değerine göre ayırım yapmaktadır. Sabit dalga boyu UV dedektörler 254 veya 280 nm'de çalışır. Değişken dalga boyu UV dedektörler ise tüm UV-Görünür bölgede 3 nm fark ile dedekte edebilmektedir. DAD dedektörleri ise maddenin absorbansını tüm dalga boylarında aynı anda yapma özelliğine sahiptir (Arti et al., 2011).

## 2.6 Kimyasal Yapı Tayini Yöntemleri

### 2.6.1 Sıvı kromatografi – kütle spektrometresi (LC-MS)

Kütle spektrometresi (MS), bileşiklerin moleküler formülü ve moleküler ağırlığının belirlenmesinde kullanılan hassas bir yöntemdir. Bu yöntem enerjik elektronların enerji transferi sonucu moleküllerin iyonizasyonuna sebep olması ile oluşan iyonların kütlelerinin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Fonksiyonel olarak bazı farklılıklar olsada MS sisteminin genel gösterimi Şekil 2.5' deki gibidir (Mohrig et al., 2010).



Şekil 2.5 Kütle Spektrometresi sistemi

MS sistemine örnek numunenin verilmesi için öncesine yerleştirilen sıvı kromatografisi (LC), gaz kromatografisi (GC) veya sistem üzerinde opsiyonel olarak bulunan direk enjeksiyon yöntemi, direk yükleme probu ve direk iyonizasyon yöntemi kullanılabilir (Bramer, 1998). Kütle spektrometresi ile birlikte kullanılan sıvı kromatografisi sisteme verilecek örneklerin kimyasal içeriğine göre ayrıştırılmasını sağlamaktadır. LC sistemine verilen bir örnek karışımı katı durağan fazın geniş yüzey alanı ile sıvı hareketli faz arasındaki etkileşim ile ayrıştırır. Bu şekilde örnekte bulunan bileşiklerin kütle spektrometresine giriş sırası belirlenir. Kütle spektrometresi sisteme giren ürünün iyonizasyonu ve kütle analizini yapar (TFS, 2010). Analiz edilecek örnekler MS sistemini verildiği sırada iyonizasyon işlemi gerçekleşir. İyonizasyon için kullanılan çeşitli iyon kaynakları Çizelge 2.1' de gösterilmektedir (Skoog et al., 1998).

Çizelge 2.1 LC-MS sistemi iyonizasyon kaynakları.

Temel Tip	Adı ve Kısaltılması	İyonlaştırıcı
Gaz fazı	Elektron impakt (EI)	Enerjik elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek-potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyonu (FD)	Yüksek-potansiyelli elektrot
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matris yardımlı desorpsiyon/iyonlaştırma (MALDI)	Lazer demeti
	Plazma desorpsiyonu (PD)	<sup>252</sup> Cf'nin fisyon ürünleri
	Hızlı atom bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil iyon kütle spektrometresi (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termosprey iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık

İyon oluşumundan sonra numune bir elektrik alan oluşumu ile hızlandırılarak kütle/yük ( $m/z$ ) değerine göre ayrılacağı kütle analizörü içerisine yönlendirilir (Mohrig et al., 2010; Bramer, 1998). MS sistemlerinde kullanılan çeşitli kütle analizörleri ayırma temellerine göre Çizelge 2.2' de verilmiştir (Hoffman and Stroobant, 2007).

Çizelge 2.2 MS sistemi kütle analizörleri.

Analizör tipi	Sembol	Ayırma prensibi
Elektrik sektör	E or ESA	Kinetik enerji
Magnetik sektör	B	Momentum
Kuadropol	Q	$m/z$ (yörünge stabilitesi)
İyon tuzağı	IT	$m/z$ (rezonans frekansı)
Zaman-Yol bağımlı analizör	TOF	Hız (Uçuş süresi)
Fourier dönüşümlü iyon siklotron rezonansı	FTICR	$m/z$ (rezonans frekansı)
Fourier dönüşümlü orbitrap	FT-OT	$m/z$ (rezonans frekansı)

Ayrıştırılan iyon molekülleri yükleri veya momentum değerlerine göre bir dedektör ile değerlendirilir. MS sistemlerinde genel olarak faraday kabı, elektron çoğaltıcısı, fotoğraf plakası veya elektrikli-optik iyon dedektörleri kullanılmaktadır (Bramer, 1998; Hoffman and Stroobant, 2007).

## 2.6.2 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi

Belirli element ve izotopların çekirdekleri, bir eksen etrafında dönmekte olan mıknatıslar gibi davranırlar. Hidrojen ( $^1\text{H}$ ) ve karbon-13 ( $^{13}\text{C}$ ) çekirdekleri bu özelliğe sahiptir.  $^1\text{H}$  ve  $^{13}\text{C}$  atomlarını içeren bir molekül çok kuvvetli bir manyetik alana yerleştirilir ve aynı zamanda elektromanyetik enerji ile ışınlanırsa bileşikteki çekirdekler enerji soğurabilir. Bu olaya manyetik rezonans adı verilir. Bu enerji soğurması kuantlaşmıştır ve moleküller için karakteristik spektrumlar oluşturur, manyetik alan kuvveti ve elektromanyetik ışınının frekansı uygun değerlerde olmadıkça soğurulma gerçekleşmez. NMR cihazlarında çok kuvvetli mıknatıslar kullanılır ve numuneler, radyo frekans bölgesindeki manyetik ışınla ışınlanır. Taramalı (veya sürekli dalga (CW)) ve Fourier transform (FT) olarak iki tip NMR spektrometresi kullanılır (Solomons and Fryhle, 2002).

### 2.6.2.1 Sürekli dalga (CW) NMR spektrometreleri

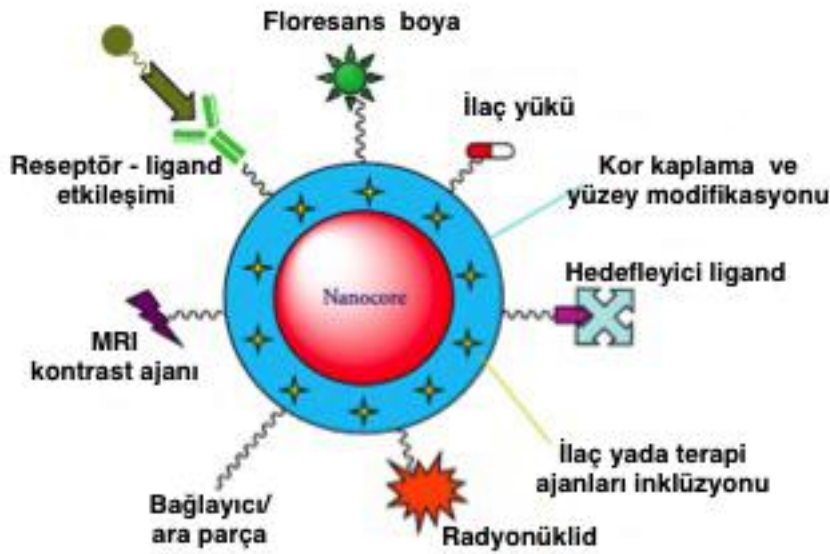
Nükleer manyetik rezonans spektrometreleri, numune sabit frekansta bir elektromanyetik dalga ile ışınlanırken, manyetik alan şiddeti sürekli olarak değiştirilecek şekilde tasarlanabilir. Manyetik alan şiddeti uygun değere ulaştığında, bileşikteki çekirdekler enerji soğururlar ve rezonans gerçekleşir. Bu soğurma numuneyi kuşatan alıcı bobinde zayıf bir elektrik akımına yol açar. Cihaz, oluşan bu elektrik akımını kuvvetlendirerek, frekans (Hz) birimleri cinsinden ayarlanmış özel kağıtlar üzerine bir sinyal (pik veya pikler serisi) olarak kaydeder (Solomons and Fryhle, 2002).

### 2.6.2.2 Fourier transform (FT) NMR spektrometreleri

Fourier transform cihazlarında alan şiddeti çok yüksek süper iletken mıknatıslar kullanılır. Bundan dolayı NMR sinyalleri kuvvetlidir. CW NMR cihazlarına göre daha yüksek ayırma gücü ve duyarlılığa sahiptir. FT cihazlarında, numune kısa bir radyo frekans ışınım pulsu ile ışınlanarak bütün çekirdekler aynı anda uyarılır. Puls yöntemi ile 5 saniye gibi kısa bir sürede spektrum elde edilebilmektedir ve bulgular zamanın bir fonksiyonu olarak toplanır. Numuneye puls gönderildikten sonra, propta eş zamanlı olarak belirlenen piklerin tümü hakkındaki bilgileri içeren bir tek sinyal elde edilir. Bu sinyalin bir bilgisayar ile frekansın fonksiyonu şekline dönüştürülmesi ile veri elde edilir (Solomons and Fryhle, 2002).

## 2.7 Nano İlaç Teknolojisi

Nanoparçacıklar, hedefe yönelik ilaç üretimi, kontrast ajanı, manyetik hipotermia, manyetik taşıyıcıların terapötik uygulamaları, manyetik taşıyıcıların *in vivo* uygulamaları, *in vitro* manyetik ayırma ve saflaştırma, moleküler biyoloji araştırmalarında, hücre biyolojisi ve ayrıştırmasında immünomagnetik metotlar gibi bir çok biyomedikal uygulamalarda kullanılan maddelerdir. Nanoparçacıklar oluşturuldukları maddelerin özelliklerinden kayda değer bir şekilde farklılaşmış ve boyutları (Şekil 2.6 ) 1nm – 150 nm arasında değişen maddelerdir (Gubin, 2009; Dong et al., 2015) .



Şekil 2.6 Nanoparçacıklar için ilaç taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi (Liu, 2009a)

Nanoparçacıkların manyetik özellikleri kimyasal bileşimi, kristal yapıdaki özürülük derecesi, parçacık boyutu ve şekli, biçim bilgisi (homejen olmayan parçacıkların yapısı için), bulunduğu ortam ile etkileşimi ve onu çevreleyen parçacıklara göre belirlenmektedir. Manyetik nanoparçacıkları, metal nanoparçacıklar (Fe, Co, Ni vb.), nadir yeryüzü metalleri (Gd, Dy, Tb, Ce vb.), basit ve karmaşık manyetik oksitler ve manyetik alışımlar olarak ayırabiliriz (Gubin, 2009; Dong, et al., 2015). Nadir yeryüzü metallerinin nanoparçacıkları biyosensörler, bio görüntüleme ve terapi amaçlı kullanıldığı gibi özellikle Gd nanoparçacıklarının MR görüntülemesi için kullanımı oldukça yaygındır (Gubin, 2009; Dong et al., 2015; Zhu et al., 2013).

### 2.7.1 Gadolinyum nanoparçacıklar

Paramanyetik Gd kompleksleri MRI klinik uygulamalarında en çok kullanılan  $T_1$  (boylamsal gevşeme zamanı) kontrast ajanlarıdır (Caravan et al., 1999; Lee et al., 2014, Sivasubramanian'dan, 2014). Gd elementinin uzun elektronik gevşeme süresine sahip olması ve periyodik tabloda bulunan elementler arasında en yüksek çiftleşmemiş elektrona sayısına sahip olması nedeni ile MRI uygulamalarında  $T_1$  görüntülemesi için en uygun element olarak belirlenmiştir (Dong, et al., 2015). Gd komplekslerin görüntü hassasiyetini arttırmak için genellikle nanotaşıyıcılar içerisinde veya dendrimerler gibi sentetik polimerlere kimyasal olarak konjuge edilerek kullanılır (Kobayashi and Brechbiel, 2003,2005; Luo et al., 2011; Sivasubramanian'dan, 2014). Ayrıca serbest Gd toksik olduğu için genel olarak şelatlama ajanları kullanılarak stabilize edilir. Günümüzde Gd elementinin kapsüle edilmesi için silica,  $CaF_2$ , hidroksiapatit, karbon nanotüpler ve karbon nanodotlar ve yarı iletken nanokristaller gibi bir çok inorganik nanoyapılar üzerinde araştırma yapılmıştır (Dong, et al., 2015). Hedefleme amacı ile Gd kompleksleri hedef liganda kovalent olarak konjuge edilir ve bu şekilde kanser hücrelerinde bulunan spesifik reseptörlere etki eder (Sivasubramanian et al., 2014).

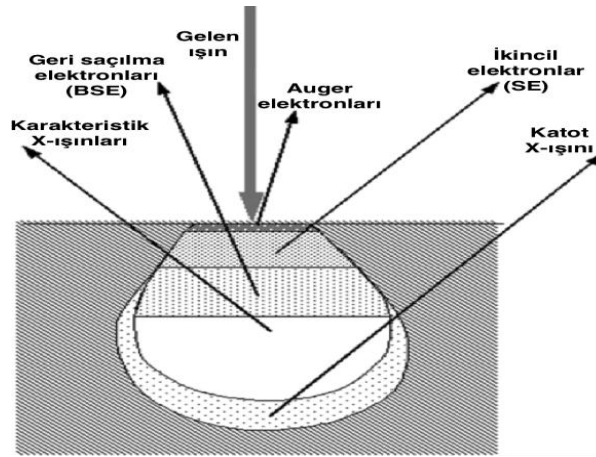
## 2.8 Nanoparçacıkların Yapı Analiz Yöntemleri

### 2.8.1 Dinamik ışık saçılması (DLS)

Dinamik ışık saçılması (DLS), çözelti veya süspansiyon içerisinde bulunan parçacıkların (manyetik nanoparçacıklar, polimer,protein, koloid gibi) boyut dağılımlarını belirlemek için kimya, biyokimya ve fizik alanlarında kullanılan spektroskopi yöntemidir. Photon correlation spectroscopy (PCS) veya kuasi elastic ışık saçılması (QLS) olarakta bilinir. DLS' in çalışma prensibi partikül hareketleri sonucu saçılan ışık yoğunluğunun dalgalanmasını ölçmesine dayanır. Brownian motion içerisinde, içinde küçük parçacıklar bulunan solüsyon üzerine lazer yardımı ile tek renkli ışık gönderilir. Daha sonra Rayleigh saçılmasına uygun olarak, oluşan ışık dalgalarına göre yeterince küçük boyutlu parçacıklar ışığın farklı dalga boyu ve yoğunlukla zamanla saçılmasına neden olar. Saçılan ışın belirlenmiş bir polarizasyon değerinde analizör içinden geçerek detektörde tanımlanır. DLS yöntemi ile 1 nm ile 5  $\mu m$  boyut aralığında ölçüm yapılabilmektedir (Müller et al., 2000; Lim et al., 2013; Jans et al, 2009; Li and Barron, 2014).

## 2.8.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) mikro yapıların morfolojisi ve kimyasal kompozisyon karakterisasyon analizi için en yaygın kullanılan cihazdır. Yüksek enerjili elektron ışınları ile görüntü üretilen bir yöntemdir. SEM cihazı elektron ışınını örnek üzerine sistemli olarak odaklayarak, örnek ile ışın etkilemi sonucunda İkincil Elektronlar (SE), Geri Saçılma Elektronları (BSE), Karakteristik X-ışınları, Auger elektronları ve Katot X-ışını sinyalleri oluşturmaktadır (Şekil 2.7). Daha sonra oluşan sinyaller Katot Işın Tüpü (CRT) ile görüntü elde edilir (Zhou et al., 2006).



Şekil 2.7 SEM görüntülemesinde saçılan ışınların gösterimi.

### 2.8.2.1 İkincil elektronlar (SE)

İkincil elektronlar yüksek rezolüsyon ile örneğin yüzey yapısı ile ilgili bilgi vermektedir. Örnek üzerine gönderilen ışın (birincil ışın) örnek yüzeyinde bulunan atomlarla etkileşerek iyonizasyona oluşmasını sağlamaktadır. Bu etkileşim sonucu gevşeyen bağ elektronları yayılım yaparak ikincil elektronları (SE) oluşturur. İkincil elektronlar 3-5 eV aralığında düşük enerji ile örnekten ayrılabilir. Bundan dolayı örnek üzerinde bir kaç nanometre yer değiştirebilerek doğru elektron pozisyonu belirler ve görüntü oluşturur. (Zhou et al., 2006).

### 2.8.2.2 Geri saçılma elektronları (BSE)

Geri saçılma elektronları uygulanan örneğin yüzey yapısı ve kompozisyonu ile ilgili bilgi sağlamaktadır. Geri saçılma elektronları 50 eV değerinden daha yüksek enerji saçılımı gösteren elektronlardır. Örneğin atom çekirdeği ile bir

elektronun arasında elastik çarpışma meydana gelerek, geniş-açı yönünde değişimi ile elektronun geri sekmesine neden olarak görüntü sağlamaktadır. Yüksek atom numaralı elementler çekirdeklerinde daha fazla pozitif yüklü bulundurmasından dolayı, BSE ile daha büyük pikler sağlamaktadır(Zhou et al., 2006).

### **2.8.2.3 Karakteristik X-ışınları**

Birincil ışın ile örnek arasında oluşan etkileşim sonucunda oluşan ışınlardır. Birincil ışından gelen bir elektronun örnekte bulunan atomların iç kabuk elektronları ile yer değiştirmesi sonucu dış kabuk elektronları stabil duruma geçmek için iç kabuk orbitaline düşerek iyonizasyon oluşumuna neden olur. İyonizasyon sonucunda oluşan karakteristik X- ışınları uygulandığı örneğin kimyasal yapısı ile ilgili bilgi sağlamaktadır (Zhou et al., 2006).

## **2.9 Kanser**

Kanser, hücrelerin kontrolsüz bir biçimde çoğalarak doku, kan ve lenflerde yayılması veya diğer organlara yayılmasıdır. Hücrelerdeki bu bozulma çevresel, genetik ve çeşitli virüsler nedeni ile oluşabilmektedir. Vücutta normal hücrelerin gelişimi mitozla ve özel doku hücrelerine farklılaşarak gerçekleşmektedir. Bu süreç hücresel genler ile kontrol edilmektedir. Hücresel genlerin mutasyonu veya anormal aktiviteleri kanser oluşumuna neden olur. Mutasyon sonrası oluşan hücreler başladığı bölge dışındaki farklı dokulara yayılım gösterebilir. Kanser hücreleri mikroskop altında normal hücrelerle karşılaştırıldığında, büyük çekirdeğe sahip olma, kontrolsüz olarak çoğalarak buldukları dokuda yayılma gibi karakteristik özellikleri vardır. Normal hücreler buldukları dokularad birlikte kalabilir fakat kanser hücreleri birbirine daha az bağlı ve doku ve kanda dolaşabilir ve böylece tüm vücuda yayılabilirler. Kanser moleküler düzeyde incelendiğinde hücre büyümesinde aktive eden genlerin (proto-onkogen) aktif olduğu bununla birlikte hücre büyümesini kontrol etmeyi sağlayan genlerin (suppressor gen) inaktif veya kaybolduğu görülmektedir. Kanser tipleri başlangıcı oldukları dokulara göre Sarkom, karsinoma, lenfoma veya lösemi olarak adlandırılır (Stephen, 2005).

### 2.9.1 Meme kanseri

Uluslararası Kanser Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre meme kanseri Dünyada ve ülkemizde kadınlar arasında görülen kanser tipleri arasında ilk sırayı almaktadır (Ferlay et al., 2010; T.C. Sağlık Bakanlığı, 2014). Kadınlarda menopoz sonrasında görüldüğü gibi genç kadınlarda görülme oranında oldukça yüksektir. Meme kanserinin % 10-20 oranı kalıtsal olarak görülmektedir. Bilinen diğer risk faktörleri hayat boyu maruz kalınan östrojen hormonu, iyonize radyasyon maruziyeti, sigara kullanımı ve yüksek yağlı yiyecek tüketimi gibi çevresel nedenlerdir (Schulz, 2005).

### 2.9.2 Prostat kanseri

Prostat erkek üreme sisteminde bulunan kısmen bağ dokusu ve bezeden oluşan ceviz büyüklüğünde sert bir cisimdir (Schulz, 2005, Amerika Klinik Onkoloji Topluluğu, 2015). Prostat kanseri prostat bezinde başlar. Bazen çok yavaş gelişebilir ve yıllarca anlaşılabilir. Bir çok prostat kanseri aşırı miktarda prostat spesifik antijen (PSA) olarak bilinen bir protein üretir. Prostatta gelişen bir çok tümör türü prostattan yayılmamaktadır. Bu özellik prostat kanseri ile diğer kanser türleri arasındaki önemli bir farktır (Amerika Klinik Onkoloji Topluluğu, 2015). Uluslararası Kanser Araştırma Ajansı (IARC) tarafından yayınlanan Globocan 2012 verilerine göre prostat kanseri Dünya’ da ve ülkemizde erkekler arasında en sık görülen ikinci kanser tipidir. Bununla birlikte prostat kanseri AB ve ABD’ inde erkeklerde en çok görülen kanser olarak belirlenmiştir (Ferlay et al., 2010; T.C.Sağlık Bakanlığı, 2014). Prostat kanseri genç yaşlarda nadir görülür, görülme sıklığı yaş ile doğrusal olarak artmaktadır (Schulz, 2005, ASCO, 2015).

### 2.10 Hücre Çalışmaları

Hücre kültürü hayvan doku ve organlarında alınan hücrelerin, yaşamalarına uygun yapay bir ortam içerisinde yetiştirilmesi işlemidir. Hücre kültürü çalışmaları ilk olarak Fransız bilim adamı Roux tarafından 1885 yılında tavuk embriyo hücrelerinin serum fizyolojik içerisinde yetiştirilmesi ile başlamıştır. Günümüzde, kaser biyolojisi, monoklonal antikor üretimi, rekombinan protein üretimi, kök hücre biyolojisi, gen terapisi, aşı üretimi, ilaç araştırma ve geliştirmesi gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (Nema and Khare, 2012). Hücre kültürü çalışmaları organizmadan ayrı olarak hücre ve organlara büyüme ortamı

sağlar. Hücre kültürü çalışmaları katı veya sıvı olarak besin karışımları içeren besiyeri ortamlarında gerçekleştirilir. Günümüzde ki modern laboratuvarlarda hücre kültürü çalışmaları yapabilmek için öncelikle uygun ortamın sağlanması gerekmektedir. Bunun için gerekli olan temel malzemeler ve özellikleri şu şekildedir (Nema and Khare, 2012):

- I. Çalışmalar esnasında hücreleri ve kullanılan malzemeleri kontaminasyondan koruyacak şekilde dizayn edilmiş ve yatay veya dikey hava akışı sağlayan tezgah.
- II. Hücrenin inkübe edildiği ortam atmosferinde bulunan CO<sub>2</sub> oranının (%5-10), pH değerinin ve sıcaklığın ( 37 °C) stabil kalmasını sağlayan inkübatör cihazı.
- III. Hücre sayılarının ve gelişiminin takip edilebilmesi için uygun mikroskoplar.
- IV. Biyolojik olarak inert, toksik olmayan, hücrelerin yüzeyine tutunarak büyüme sağlayan steril petri kapları, kuyucuklu plaka, silindirik şişeler ve vidalı kapaklara sahip kaplar.
- V. Sıcaklık kontrollü santrifüj cihazı.
- VI. Derin dondurucu cihazı.

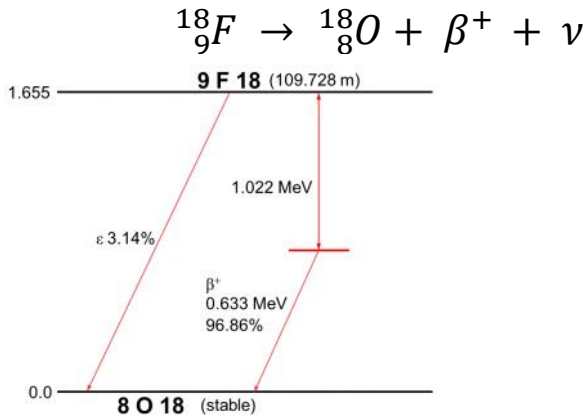
## **2.11 Manyetik Rezonans Görüntüleme ( MRI )**

Kanserli dokuların görüntülenmesi için kullanılan (Yu et al., 2012, Glunde et al., 2007) ve kullanımı esnasında vücut dokularına herhangi bir zarar vermeyen bir görüntüleme tekniğidir. Statik manyetik alan ile radyofrekans (RF) titreşimlerinin doku üzerine gönderilmesi ile gerçekleştirilir. RF titreşimleri dokularda bulunan atomların çekirdek spinlerini uyararak daha yüksek enerji seviyelerine geçmesini sağlar. Daha sonra yüksek enerjili atomlar başlangıç enerji seviyelerine döner, bu esnada cihaz tarafından dedekte edilebilen RF sinyalleri yayar. Yayılan RF sinyalleri, görüntülenen dokunun moleküler özelliklerini yansıtan bir görüntü sağlar. Belli bir manyetik alan gücünde, MR sinyallerinin yoğunluğu uyarılmış çekirdeğin magnetik-kimyasal çevresine ve çekirdek spinlerinin konsantrasyonuna bağlıdır (Glunde et al., 2007). MR görüntüleme tekniği mikromolar seviyelerindeki uygulamalarda ölçüm yapabilecek hassasiyete sahiptir (Glunde et al., 2007, Fass, 2008,) yüksek düzeyde yumuşak doku kontrastı ve detaylı anatomik değerlendirme sağlayan bir yöntem olduğu için yaygın olarak kullanılmaktadır (Erdem vd., 2008, Hasbek, vd., 2013). MRI

kullanımında görüntü almak için veya görüntü kalitesini arttırmak için manyetik nano nanoparçacıklar (MNP) kullanılmaktadır. (Yu et al., 2012)

## 2.12 $^{18}\text{F}$ Radyoizotopu

$^{18}\text{F}$ , siklotron cihazı ile  $^{18}\text{O}$  hedef alınarak üretilen 110 dakika yarı ömürlü bir radyoizotoptur. Genellikle  $^{18}\text{O}$  (p,n)  $^{18}\text{F}$  nükleer reaksiyonu ile üretilir. Foton enerjisi 511 keV' dir (Saha, 2010, Vallabhajosula, 2011).  $^{18}\text{F}$  düşük pozitron enerjisine sahip (0,64 MeV), doku girişkenliği düşük (Maks. 2.4 mm), yüksek çözünürlüklü görüntü, yüksek spesifik aktivite ile üretilebilirliğinden dolayı PET cihazlarında kullanımı oldukça yaygındır. Florin elektronegatifliği en yüksek elementtir, bundan dolayı birçok organik ve in organik madde ile reaksiyona girebilmektedir. Elektrofil veya nötrofil kimyasal türleri ile reaksiyona girebilir  $^{18}\text{F}$  radyoizotopu eşitlikte verilen  $\beta^+$  ışınmasını gerçekleştirir (Şekil 2.8) (Saha, 2010).

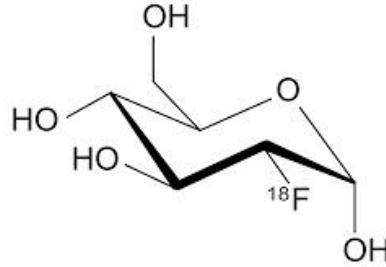


Şekil 2.8  $^{18}\text{F}$  radyoizotopunun bozunma şeması (Nucleonica, 2015)

Florin atomu hidrojen (H) atomundan hafifçe büyük olduğu için bir molekül üzerindeki  $\text{H}^+$  atomu veya  $\text{OH}^-$  grubu ile yer değiştirmesi herhangi bir sterik etkiye neden olmaz fakat florlanmış molekülün *in vivo* etkisinde değişikliğe neden olabilir (Saha, 2010).  $^{18}\text{F}$  radyoizotopu özellikle  $^{18}\text{F}$ -işaretli fluorodeoksiglikoz üretmek için kullanılmaktadır (Saha, 2010, Vallabhajosula, 2011). Florinasyon reaksiyonlarında yüksek spesifik aktivite (SA) ile ürün elde edildiği için en başarılı olan yöntem nükleofilik florinasyon reaksiyonlarıdır. Elektrofilik florinasyon reaksiyonlarında ise  $^{18}\text{F}$  öncülünde sadece bir molekül  $^{18}\text{F}$  ve diğeri stabil  $^{19}\text{F}$  atomu olduğu için her zaman % 50'den daha az verim elde edilir (Saha, 2010).

### 2.13 <sup>18</sup>F-FDG Radyofarmasötüğü

İlk <sup>18</sup>F-FDG (Şekil 2.9) üretimi 1976 yılında Brookhaven grubu tarafından elektrofilik reaksiyon ile yapılmıştır. Bu günlerde kullanılan bir çok sentez prosedürü 1986 yılında geliştirilen nükleofilik substitusyon prosedürüdür (Vallabhajosula, 2011). <sup>18</sup>F-FDG, bir asetilli şeker türevinin hidrolizi ile nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonu gerçekleştirilmesi sonucu <sup>18</sup>F radyoizotopunun deoksiglukoza bağlanması ile oluşturulur (Saha, 2010). FDG onkoloji, nöroloji ve kardioloji alanlarında PET cihazı ile görüntü almak için kullanılır (Ido et al., 1977,1978, Gallagher et al., 1977, Hamacher et al., 1986, Füchtner et al., 1996, Sols and Crane, 1954, Pacak and Cerny, 2002, Delbeke and Martin, 2004, Wadsak and Mitterhauser'den, 2010).



Şekil 2.9 <sup>18</sup>F-FDG molekül yapısı

### 2.14 Radyofarmasötikler İçin Kalite Kontrol Yöntemleri

Radyofarmasötiklerin kalite kontrolünde temel olarak saflık, ürün tanımlaması, biyolojik güvenliği, radyofarmasötiklerin etkinliğinin kontrolü ile yapılmaktadır. Bundan dolayı radyoişaretleme ve radyoişaretili ürün sentezlerinde ürün kalitesini ve stabilitesini belirlemek için bu kalite kontrol testleri uygulanmaktadır. Radyoaktif olmayan farmasötikler için uygulanan tüm kalite kontrol prosedürleri radyofarmasötikler için uygulanabilir; bunlara ek olarak radyonüklidik ve radyokimyasal saflık analizleri gerçekleştirilmelidir. Radyokimyasal saflık, radyoaktif ürünün istenilen kimyasal formdaki radyoaktivitesinin toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanır. Bu analiz sonucunda safsızlıkların yüksek bulunması, sentez işlemi esnasında ki solvent etkisi, sıcaklık, pH, ışık faktörlerindeki değişiklikler, indirgen veya yükseltgen ajanların varlığı veya tamamlanmamış reaksiyon ve radyoliz dolayısı ile olabilir. İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) ve Yüksek Performanlı Sıvı Radiokromatografisi (HPLRC), radyokimyasal saflık ölçümü için en çok kullanılan yöntemlerdir (Saha, 2010).

### **2.14.1 İnce tabaka radyokromatografisi (Thin layer radiochromatography) (TLRC) yöntemi**

TLRC yöntemi radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığının belirlenmesi için en yaygın kullanılan kalite kontrol analizlerindedir (Saha, 2010, Vallabhajosula, 2011). Aynı zamanda  $^{18}\text{F}$ -FDG'nin radyokimyasal saflığının belirlenmesi için uygulanan kalite kontrol analizidir (Wadsak and Mitterhauser, 2010). TLRC analizinde bir miktar radyoaktif örneğin silika jel veya polisilik asit kaplı ince tabaka kromatografisi üzerine damlatılır ve damlatma noktası dışarıda kalacak şekilde uygun bir çözelti içerisine bırakılarak yürütülür. Kromatogramın ilerlemesi esnasında örneğin içerdiği bileşikler dağılım sabitlerine göre solvent ve adsorban arasında dağılım gösterir. Bu işlemde adsorban sabit faz solvent hareketli fazdır. Farklı bileşiklerin solvent içerisindeki farklı çözünürlükleri, adsorban üzerinde farklı bir uzaklıklara ilerlemesini sağlar. Solventin polariteside kromatogramdaki ayrışmayı etkiler. Yürütme işlemleri yukarı veya aşağı doğru olabilir. TLRC kromatografisinde bileşiğin damlatma noktasından yürüdüğü noktanın aralığının solventin yürüdüğü nokta aralığına oranı her bileşik karakteristik olan  $R_f$  değerine verir. Yürütme işlemi sonrası tabaka solvent içerisinden alınıp kurutulur. Daha sonra radyokromatografik tarayıcı ile yürütme uzunluğuna karşı radyoaktivite grafiği elde edilir (Saha, 2010).

### 3. MATERYAL METOD

#### 3.1 Kullanılan Malzemeler, Kimyasallar ve Cihazlar

##### 3.1.1 Malzemeler

C18 HPLC kolon (Nucleodur, Macherey-Nagel), Vakumlu filtrasyon düzeneği (Sartorius), SPE kartuş (Sep-Pak), 0,22 µm filtre (Ministar), 0,45 µm filtre (Millex) 0,2 µm membran filter (Alltech), Cam malzeme.

##### 3.1.2 Kimyasallar

Metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Merck, Sigma Aldrich), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck, Sigma Aldrich), Kloroform (CHCl<sub>3</sub>) (Merck), Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck), Aktif karbon (C) (Fisher Scientific), Etil asetat (CH<sub>3</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) (Merck), Aseton (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>) (Merck), Gadolinyum Nitrat (Gd(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) (Sigma Aldrich), Magnezyum Nitrat (Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O) (Merck), Sodyum Hidroksit (NaOH) (Merck), 2-propanol (CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub>) (Merck), Amonyum Hidroksit (NH<sub>4</sub>OH (%25)) (Merck), TEOS (C<sub>5</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si) (Merck), Hekzadesiltrimetilamonyum Bromür (CTAB, C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN) (Sigma Aldrich), N-hidroksisüksinamid (C<sub>4</sub>H<sub>5</sub>NO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich), 2-(4-morpholino) etan sülfonic asit (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S) (Sigma Aldrich), Sodyum Klorür (NaCl) (Merck), Di-sodyum hidrojen fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (Merck), 2-merkaptan etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS) (Fluka), Argon gazı (HABAŞ), BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce), RIPA çözültisi, MCF7 insan meme adenokarsinoma epitel hücreleri (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD), PC3 insan prostat adenokarsinoma epitel hücreleri (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD), Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Lonza), Dulbecco's MEM (Lonza), L-Glutamine (Lonza), Essential amino acid (Lonza), Sodyum pirüvat (Lonza), Fetal bovine serum (Biowest), Penisilin/streptomisin (Lonza), Tripan mavisi (Bio. Ind.), Tripsin EDTA (Lonza), 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) (Sigma Aldrich).

##### 3.1.3 Cihazlar

Vorteks cihazı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Mekanik öğütücü (E.Ü.

Eczacılık Fakültesi), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (IKA-RH Basic 2, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Soğutmalı santrifüj (Hettich 31 Marka Rotina 38 R Model, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Evaporatör (Heidolph, Hei- VAP, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Ultrasonik banyo (Ceia, CP104, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Buzdolabı (Arçelik, No frost 5231 NFY, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Homojenizatör (IKA, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Santrifüj Cihazı (Nüve, CN180, CP104, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), HPLC cihazı (Shimadzu, LC-10AT quaterner pompa, SCL-10A vp sistem kontrolörü, SIL-20 HT Auto Sampler, RID-10A Refraktif İndeks Dedektörü, SPD-M20A Diode Array dedektörü, CTO-10AS vp kolon fırını, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), LC-MS cihazı (Thermo scientific, TSQ Quantum Access MAX, E.Ü. Eczacılık Fakültesi, FABAL), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Heidolph, MR Hei-End, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), İnfüzyon pompa sistemi (Hospira, Gemstar, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Partikül boyutu ve molekül ağırlığı ölçüm cihazı (Malvern, Nano ZS, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Liyofilizatör (Labconco Free Zone 2.5 770 E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Üç boyutlu çalkalayıcı (Heidolph, Polymax 1040, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), MRI cihazı (Simens- Magnetom Avanto, Şifa Hastanesi Üniversitesi), Mikro Plaka Okuyucu (Thermo Varioscans, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Laminar Flow Kabin (Thermo) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), CO<sub>2</sub> inkübatörü (Sanyo) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Inverted mikroskop (Leica) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), SEM (Scanning Electron Microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü), Işık mikroskobu (Olympus) (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), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) (Varian mercury 400 MHz Spektrometre) (Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü), Hızlı Vakum (Speed

Vacuum, Christ, RVC-2-25) (Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinde, Farmasötik Botanik Anabilim Dalı)

### 3.2 Orman Gülü Yaprak, Çiçek ve Deli Bal Ekstraksiyonu

Orman gülü ( Familya : Ericaceae Tür : *Rhododendron ponticum*, Cins: *Rhododendron ponticum* L.) çiçeği ve yaprağı Karadeniz bölgesinde bulunan Düzce şehrinde 1300 m yükseklikte Bolu dağı Topuk yaylası lokasyonundan toplanmış ve deli bal aynı bölgeden temin edilmiştir. Orman gülü'nün tanımlanma işlemi İstanbul Üniversitesi, Orman Fakültesi, Orman Mühendisliği bölümünde, Orman Botaniği Anabilim Dalında gerçekleştirilmiştir ve tanımlama raporu EK 1'de verilmiştir. Orman gülü yaprak ve çiçeklerinin kurutma işlemi oda şartlarında gerçekleştirildi.

#### 3.2.1 Orman gülü yaprağından Grayanotoxin-III' ün (GTX-III) ekstraksiyonu

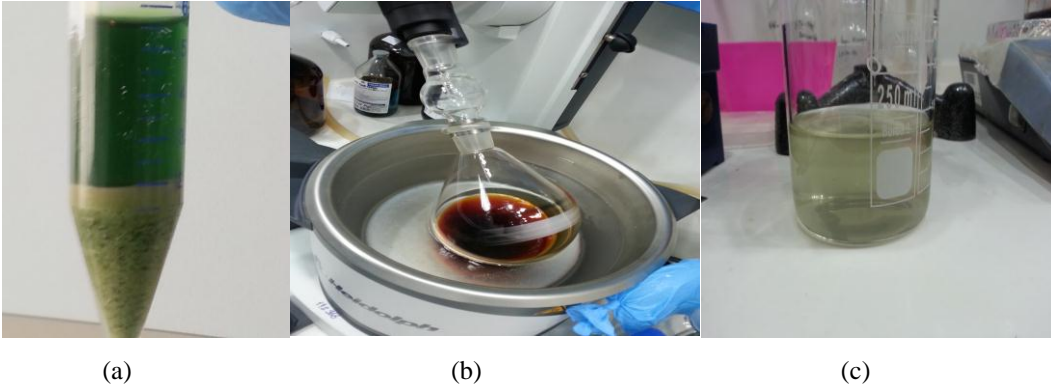
Ekstraksiyon işleminde Terai ve arkadaşlarının (Terai et al., 2000) metodu uygulanmıştır. Orman gülü yaprak örnekleri oda koşullarında tamamen kurutulup Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde, Farmakognozi Anabilim Dalında mekanik değirmen kullanılarak öğütülüp toz haline getirilmiştir. Toplanan orman gülü yaprak örneği (a), kurutulmuş yaprak örnekleri (b) ve öğütülmüş yaprak tozu (c) Şekil 3.1' de gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Orman gülü yaprağı (a), kurutulmuş yaprak (b) ve öğütülmüş yaprak tozu (c)

Yaprak tozu boyutu 1 mm olarak ölçülmüştür. Elde edilen yaprak tozundan 8 adet santrifüj tüpü (50 mL) içerisine 3,5'ar g yaprak tozu eklendi. Yaprak tozu üzerine 35 mL metanol eklenerek 30 dakika vortex ile karıştırıldı. Örnek 5dk. 2000 rpm'de santrifüj edilip üst faz ayrıldı. Elde edilen yeşil renkli sıvı faz ısıtıcı karıştırıcıda 50 °C 1000 rpm'de karıştırılarak yeşil renk giderilinceye kadar aktif

karbon ile muamele edildi. Elde edilen kırmızımsı (çay renginde) çözelti 0,45 µm filtre ile süzüldü. Süzüntü, 40 °C 1000 rpm’de karıştırılarak uçurma işlemine tabi tutulup metanol evaporetörde uçuruldu. Elde edilen kırmızı yağimsı kalıntı üzerine 150 mL kloroform eklenerek karıştırıldıktan sonra tekrar 40 °C 200 rpm’de karıştırılarak uçurma işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen kırmızı renkli kalıntı üzerine 100 mL etil asetat eklenerek çözüldü. Çözelti ısıtıcıda ısıl işleme tabi tutulup kaynamaya başladıktan sonra 1,5 g aktif karbon eklendi. 10 dakika sonra rengin kaybolduğu gözlemlendi ve çözelti adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Kristallendirme işlemi için LAF kabini içerisine bırakıldı. Şekil 3.2’de ekstraksiyon işleminin metanol ile çözme (a), evaporasyon (b) ve etil asetat ile çözülme işlemleri (c) gösterilmektedir.

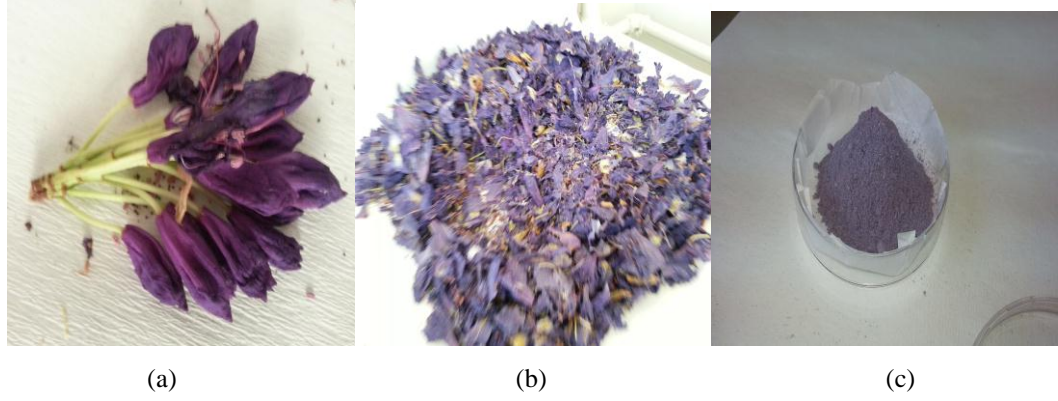


Şekil 3.2 Orman gülü yaprağının metanol ile çözülmesi (a), evaporasyon işlemi (b) ve etil asetat ile çözülme işlemi (c)

Kristallendirme işleminden sonra numune metanol içerisinde çözülerek alındı. Filtre edildikten sonra saflaştırma işlemi için +4°C’de saklandı.

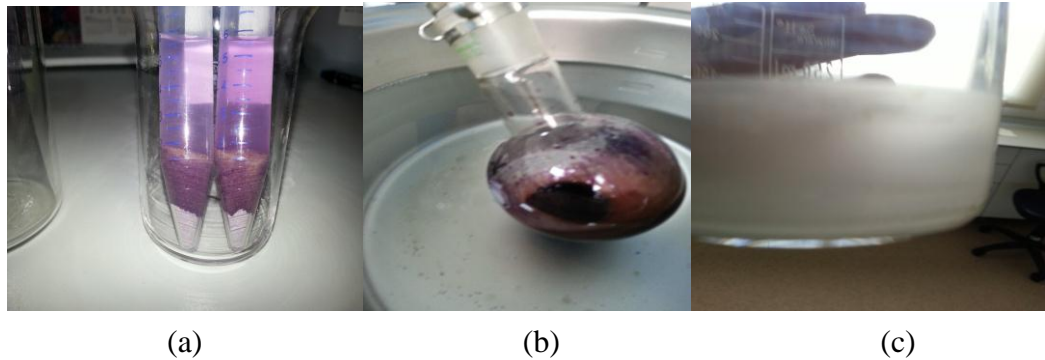
### 3.2.2 Orman gülü çiçeğinden Grayanotoksin-III (GTX-III) ekstraksiyonu

Ekstraksiyon işleminde Terai ve arkadaşlarının (Terai et al., 2000) metodu uygulanmıştır. Toplanan çiçek örnekleri oda sıcaklığında tamamen kurutuldu. Daha sonra bilyeli öğütme cihazı ile toz haline getirildi. Şekil 3.3’ te orman gülü çiçeği örneği (a), kurutulmuş çiçek örnekleri (b) ve öğütülmüş çiçek tozu (c) gösterilmektedir.



Şekil 3.3 Orman gülü çiçeği örneği (a), kurutulmuş çiçek örnekleri (b) ve öğütülmüş çiçek tozu (c)

Elde edilen çiçek tozundan 8 adet santrifüj tüpü (50 mL) içerisine 3,5 g çiçek tozu eklendi. Çiçek tozu üzerine 35 mL metanol eklenerek 30 dk. vortex ile karıştırıldı. Örnek 5dk. 2000 rpm’de santrifüj edilip üst faz ayrıldı. Elde edilen mor renkli sıvı faz 50 °C 1000 rpm’de karıştırılarak renk giderilinceye kadar aktif karbon ile muamele edildi. Elde edilen kırmızımsı (çay renginde) çözelti adi süzgeç kağıdı ile filtre edildi. Filtrat, 40 °C 1000 rpm’de karıştırılarak uçurma işlemine tabi tutulup metanol evaporatörde uçuruldu. Elde edilen kırmızı yağimsı kalıntı üzerine 150 mL kloroform eklenerek karıştırıldıktan sonra tekrar 40 °C 200 rpm’de karıştırılarak rotary evaporatörde evaporasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen kırmızı renkli kalıntı üzerine 100 mL etil asetat eklenerek çözüldü. Çözelti ısıl işleme tabi tutulup kaynamaya başladıktan sonra 1,5 g aktif karbon eklendi. 10 dakika sonra rengin kaybolduğu gözlemlendi ve çözelti adi süzgeç kağıdı ile süzüldü. Kristallendirme işlemi için LAF kabini içerisine bırakıldı. Şekil 3.4’te çiçek tozunun methanol ile çözülmesi (a), evaporasyon işlemi (b) ve kristallenmiş görüntüsü (c) verilmiştir.

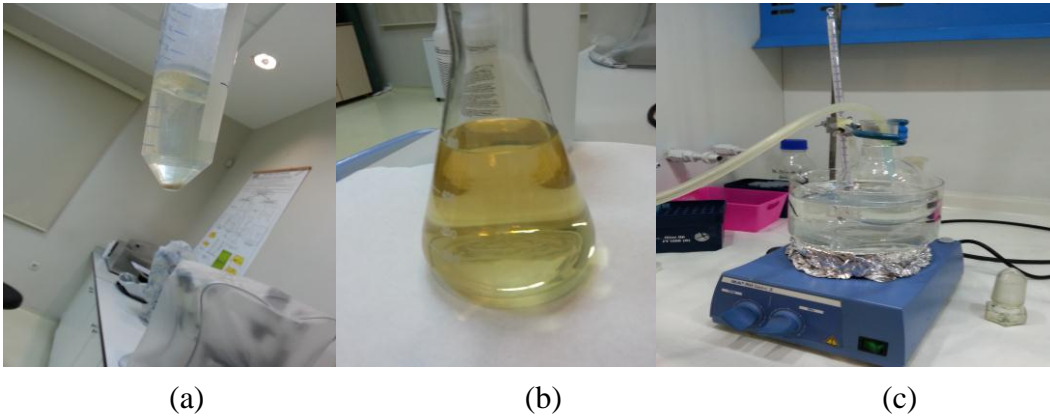


Şekil 3.4 Çiçek tozunun methanol ile çözülmesi (a), evaporasyon işlemi (b) ve kristallenmiş görüntüsü (c)

Kristallendirme işleminden sonra numune methanol içerisinde çözülecek toplandı ve saflaştırma işlemi için +4°C’ de saklandı.

### 3.2.3 Deli baldan Grayanotoksin-III' ün (GTX-III) ekstraksiyonu

Deli bal ekstraksiyon işlemi Kurtoğlu ve arkadaşlarının (Kurtoğlu vd., 2014) metodu ile gerçekleştirildi. 100 g deli bal örneği cam bir beher içerisine alınıp üzerine 100 mL ultra saf su eklendikten sonra manyetik balık ile 10 dakika karıştırıldı. Üzerine 500 mL methanol eklenerek 10 dakika daha homejen bir çözelti oluşması için beklendi. Elde edilen çözelti santrifüj tüplerine (50 mL) alınarak 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Şekil 3.5 (a)'da santrifüj sonrasında oluşan fazlar verilmiştir. Üst faz cam beher içerisinde toplandıktan sonra 0,22 µm filtre kullanılarak vakumlu filtrasyon işlemi uygulandı (1. Filtrasyon). Elde edilen filtrat üzerine 500 mL ethanol eklenerek 10 dakika karıştırılıp 50 mL santrifüj tüplerine alınıp 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi Şekil 3.5 (b) de ethanol eklenmesinden sonraki çözelti gösterilmektedir. Üst faz cam beher içerisinde toplandıktan sonra 0,22 µm filtre kullanılarak vakumlu filtrasyon işlemi uygulandı (2. Filtrasyon). Elde edilen filtrat üzerine 500 mL etanol eklenerek 10 dakika karıştırılıp 50 mL santrifüj tüplerine alınıp 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Üst faz cam beher içerisinde toplandıktan sonra 0,22 µm filtre kullanılarak vakumlu filtrasyon işlemi uygulandı (3. Filtrasyon). Elde edilen filtrat daha önce 2x5 mL etanol ve 2x5 mL ultra saf su geçirilerek şartlanmış olan SPE kartuştan geçirildi. 12 adet kartuş kullanıldı. Daha sonra 5 mL ultra saf su ve 5 mL 20/80 (aseton:saf su) ile yıkanan her bir kartuştan 6 mL methanol geçirilerek istenilen bileşiklerin katı faz ekstraksiyonu (SPE) kartuştan ayrılması sağlandı.



Şekil 3.5 Deli balın ultra saf su ve methanol çözülmesi ve santrifüj işlemi (a), santrifüj sonrası etanol ile karıştırma (b) ve Argon gazı ile kurutma işlemi (c)

Süzüntü  $40 \pm 5$  °C'de argon gazı ile kurutma işlemine tabi tutuldu Şekil 3.5 (c). Kalıntı üzerine 12 mL ethanol eklenerek çözüldü. Daha sonra 3000 rpm'de santrifüj işlemi gerçekleştirildi. Üst faz ayrılarak 0,45 µm filtre ile süzülüp saflaştırma işlemi için +4 °C'de saklandı. Elde edilen ekstraktın bir kısmı Ege

Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinde, Farmasötik Botanik Anabilim Dalında Hızlı Vakum (Christ, RVC-2-25) cihazı ile kurutulmuş NMR analizi için ayrılmıştır.

### 3.3 Grayanotoksin-III Bileşiminin HPLC Analizi ile Saflaştırma İşlemi

Grayanotoksin III (GTX-III) bileşiminin saflaştırılması için Meguri ve arkadaşlarının (Meguri et al., 1993) uyguladığı HPLC metod koşulları referans alınmıştır. Elde edilen yaprak, çiçek ve bal özütlerinin her biri için HPLC metodu revize edilerek uygulanmıştır.

#### 3.3.1 GTX-III bileşiminin orman gülü yaprağından HPLC analizi ile saflaştırma işlemi

Elde edilen yaprak özütünden GTX-III bileşiği HPLC analiz yöntemi ile fraksiyonlama kollektörü kullanılarak saflaştırılmıştır. HPLC metod koşulları Çizelge 3.1’de verilmiştir. Yapılan saflaştırma işlemi sonrası elde edilen grayanotoksin yaprak (GTX-III-Y) bileşiği çözelti olarak +4 °C’de saklanmıştır. Analiz sonuçları bölüm 4.1.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Orman gülü yaprağı özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları

Kolon	C18 kolon (250x4,6 mm),	
Dedektör	DAD	
Dalga boyu	204 nm	
Mobil faz	Metanol / Su ( Gradient)	
Akış	0.7 mL / dak	
Fırın sıcaklığı	25 °C	
Enjeksiyon	100 µL	
Zaman Programı	Pompa	Metanol (% B)
0,01	B	34
0,01	C	66
11	B	53
11	C	47
19	B	70
19	C	30
22	B	100
22	C	0
33	B	100
33	C	0
35	B	40
35	C	60
45	Bitiş	-

### 3.3.2 GTX-III bileşiminin orman gülü çiçeğinin HPLC analizi ile saflaştırma işlemi

Elde edilen çiçek özütünden GTX-III bileşiği HPLC analiz yöntemi ile fraksiyonlama kollektörü kullanılarak saflaştırılmıştır. HPLC metod koşulları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Yapılan saflaştırma işlemi sonrası elde edilen grayanotoksin çiçek (GTX-III-Ç) bileşiği çözelti olarak +4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.2. Orman gülü çiçeği özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları

Kolon	C18 kolon (250x4,6 mm), Nukleodur	
Dedektör	DAD	
Dalga boyu	204 nm	
Mobil faz	Metanol / Su ( Gradient)	
Akış	0.7 mL / dak	
Fırın sıcaklığı	25 °C	
Enjeksiyon hacmi	100 µL	
Zaman Programı	Pompa	Metanol (% B) - Su (% C)
0,01	B	34
0,01	C	66
11	B	53
11	C	47
14	B	100
14	C	0
22	B	100
22	C	0
24	B	40
24	C	60
28	B	40
28	C	60
30	Bitiş	-

### 3.3.3 GTX-III bileşiminin deli baldan HPLC analizi ile saflaştırma işlemi

Elde edilen bal özütünden GTX-III bileşiği HPLC analiz yöntemi ile fraksiyonlama kollektörü kullanılarak elde edilmiştir. HPLC metod koşulları Çizelge 3.3’ de verilmiştir. Yapılan saflaştırma işlemi sonrası elde edilen GTX-III-B çözelti olarak +4 °C’de saklanmıştır.

Çizelge 3.3. Deli bal özütü HPLC analizi ve saflaştırma koşulları.

Kolon	C18 kolon (250x4,6 mm), Nukleodur	
Dedektör	RID	
Mobil faz	Metanol / Su ( Gradient)	
Akış	0.7 mL / dak.	
Fırın sıcaklığı	25 °C	
Enjeksiyon hacmi	100 µL	
Zaman Programı	Pompa	Metanol (% B) - Su (% C)
0,01	B	34
0,01	C	66
11	B	53
11	C	47
13	B	100
13	C	0
21	B	100
21	C	0
22	B	40
22	C	60
29	Bitiş	-

### 3.4 GTX-III bileşiğinin LC/MS ve NMR Yöntemi ile Yapı Analizi

#### 3.4.1 GTX-III bileşiğinin LC/MS yöntemi ile yapı analizi

Orman gülü yaprağının saflaştırma işleminden elde edilen maddelerin yapı analizleri Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FABAL bölümünde LC-MS (Thermo Scientific, TSQ Quantum Access MAX) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Örnekler sisteme direk enjeksiyon yöntemi ile verilmiş ve elektron sprey iyonizasyonu ile iyonlaştırılmıştır. Tarama modu Q1MS olarak uygulanarak tarama aralığı 300-900 (m/z) olarak belirlenmiştir. Analizi sonuçları bölüm 4.2.1' de verilmiştir.

#### 3.4.2 GTX-III bileşiğinin NMR yöntemi ile yapı analizi

Deli bal özütü ve orman gülü yaprak özütünden (HPLC yöntemi ile saflaştırılan pik 1 ve pik 2 örnekleri için Erzurum Atatürk Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya bölümünde karbon ve proton NMR (Varian mercury 400 MHz Spektrometre) analizleri gerçekleştirilmiştir. Çözücü olarak metanol kullanılarak analiz 'overnight' modunda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen analiz sonuçları bölüm 4.2.2' de verilmiştir.

### 3.5 Gadolinyumoksit Nanoparçacıkların (GdO-NP) Sentezi ve Silikalanması

Gadolinyumoksit nanoparçacıkların (GdO-NP) sentez ve silikalama işleminde Stefanakis ve arkadaşlarının (Stefanakis et al., 2014) uyguladığı birlikte çöktürme yöntemi uygulanmıştır.

#### 3.5.1 GdO-NP bileşiminin sentezi

2,5343 g (0,225 M)  $Gd(NO_3)_3$  ve 4,3218 g (0,675 M)  $Mg(NO_3)_2$  bir cam beher içine tartılıp 25 mL ultra saf su ile çözüldü. 10 mL 0,5 M NaOH,  $CO_2$ 'siz ultra saf su ile hazırlandı. 50 mL 3 boyunlu bir balon içerisine 16,68 mL  $CO_2$ 'siz ultra saf su eklendi. Manyetik balık kullanılarak reaksiyon cihazı 24 °C'de 800 rpm'de çalıştırıldı. 0,225 M  $Gd(NO_3)_3$  ve (0,675 M)  $Mg(NO_3)_2$  çözeltisinin 10 mL'si cihaz yardımıyla 30 mL/saat hızla üç boyunlu balona eklendi. Bu esnasında damla damla 0,5 M NaOH eklenerek reaksiyon pH değeri 6,85 – 7,00 arasında tutuldu. İşlem bitiminde toplam 1,5 mL NaOH çözeltisi harcandı. Elde edilen süspansiyon 120 °C sıcaklıkta şekil 3.6'de gösterilen düzenekte 24 saat geri akım koşullarında inkübe edildi.



Şekil 3.6 GdO-NP sentezi geri akımlı inkübasyon düzeneği.

İşlem bitiminde oluşan beyaz süspansiyon 10,000 rpm 15 dakika karbondioksit içermeyen ultra saf su (inert ortam) ile 2 kez yıkandı. Ürün -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizatör cihazında kurutularak toz haline getirildi. Elde edilen GdO-NP ( $Gd_2(OH)_5NO_3$ ) + 4°C'de saklandı.

### 3.5.2 GdO-NP'lerin silikalanması

5 mL (10 mg)  $Gd_2(OH)_5NO_3$  su içinde 20 mL 2-propanol ile karıştırılıp 10 dakika sonikasyon işlemine tabi tutuldu. Daha sonra çözelti içerisinde 500 rpm'de oda sıcaklığında karıştırılarak 250  $\mu$ L % 25'lik  $NH_4OH$  ve 8  $\mu$ L TEOS eklenerek 6 saat inkübasyon işlemine tabi tutuldu ve işlem bitiminde 10000 rpm'de 15 dakika süre ile ultra saf su ile 2 kez yıkandı. Elde edilen pellet içerisinde 0,075 g CTAB ve 250  $\mu$ L % 25'lik  $NH_4OH$  çözeltisi bulunan 15 mL 2-propanol çözeltisi içerisinde aktarıldı. Çözelti oda sıcaklığında 30 dakika karıştırıldıktan sonra damla damla 150  $\mu$ L TEOS eklendi ve oda sıcaklığında 15 saat 500 rpm'de inkübe edildi. Elde edilen beyaz süspansiyon 10000 rpm 15 dakika karbondioksit içermeyen ultra saf su (inert ortam) ile 2 kez yıkandı. Elde edilen silikalı gadolinyumoksit nanoparçacıkları (GdO@Si-NP) -80 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizatör cihazında kurutulurak toz haline getirildi ve + 4 °C'de saklandı.

### 3.6. GdO-NP ve GdO@Si-NP' in Yapı Analizleri

Sentezlenen GdO-NP ve GdO@Si-NP bileşiklerinin boyut ölçümü DLS (Dynamic Light Scattering, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. GdO@Si-NP için ayrıca SEM (Scanning electron microscope, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü) cihazı ile yapı analizi gerçekleştirilmiştir.

#### 3.6.1 GdO-NP ve GdO@Si-NP' in DLS ile boyut ölçüm çalışmaları

GdO-NP ve GdO@Si-NP' in boyut ölçümleri DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) analizi ile gerçekleştirildi. 10  $\mu$ g /1 ml (GdO@Si-NP/ $H_2O$ ) konsantrasyonda hazırlan örnek 5 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra DLS cihazı ile ölçümü alınmıştır. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.3.1' verilmiştir.

#### 3.6.2 GdO@Si-NP' in SEM analizi çalışmaları

Elde edilen silikalı gadolinyum nanoparçacıkların yapı analizi Elektron Tarama Mikroskobu (SEM) ile Enerji-dağılım X-ışını spektroskopisi (EDS) dedektörü kullanılarak elementel yüzdesi, kimyasal karakterizasyonu belirlenerek görüntüsü alındı. Yapılan analizde bir miktar kuru-toz GdO@Si-NP örneği karbon

bant üzerine yayıldı ve görüntüleme işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.3.2' de verilmiştir.

### **3.7 Grayanotoksin-III-Yaprak (GTX-III-Y), Grayanotoksin-III-Çiçek (GTX-III-Ç) ve Grayanotoksin-III-Bal (GTX-III-B) ile GdO@Si-NP konjugasyonu**

GTX-III ve GdO@Si-NP konjugasyon işleminde Patel ve arkadaşlarının (Patel et al., 2011) ve Akın ve arkadaşlarının (Akın et al., 2012) yöntemi kullanılmıştır. 20 mM CDI, 50 mM NHS, 0,2 M MES ve 0,99 M NaCl bir kap içerisine aktarılıp bir adet 2 mL'lik ve iki adet 1,5 mL' lik PBS çözeltileri hazırlandı. 9 mg/ mL konsantrasyonda  $Gd_2(OH)_5NO_3-SiO_2$  çözeltilisinden ayrı ayrı 2 mL, 1,5 mL ve 1,5 mL 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi ve sıvı kısım atıldı. Elde edilen katı beyaz kısım üzerine, birinci kap için 2 mL, diğer kaplara ise 1,5 mL PBS çözeltilisi ayrı ayrı eklenerek karıştırıldı. Oluşan süspansiyonlar üzerine birinci kaba 2 mL (400 µg) yaprak GTX-III-Y, kinci kaba 1,5 mL (300 µg) GTX-III-Ç ve üçüncü kaba 1,5 mL (300 µg) GTX-III-B çözeltileri ayrı ayrı eklendi ve 5 dakika karıştırıcıda tutuldu. Daha sonra birinci kap üzerine 2,8 µL, ikinci ve üçüncü kaba 2,1 µL merkaptta ethanol eklenenip 2 saat boyunca 3 boyutlu çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonra tüm numuneler ardışık olarak beş kez 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Birinci santrifüj işlemi sonrası supernatant ayrıldı. Daha sonraki üç santrifüjleme işleminde kalıntı üzerine 1'er mL metanol eklenerek yıkama gerçekleştirildi. Bu üç yıkama süresinde elde edilen sıvı kısım ayrıldı. Beşinci yıkama işleminde kalıntı üzerine 1 mL ultra saf su eklendi ve santrifüj işlemi sonrası sıvı kısım ayrıldı. Elde edilen kalıntı buzlukta - 20 °C'de dondurulduktan sonra liyofilizasyon işlemi gerçekleştirildi. Toz haline gelen ürün + 4 °C'de saklandı.

### **3.8 GTX-III bileşiğinin GdO@Si-NP ile Bağlanma Verimi Tayini**

Yaprak, çiçek ve bal numuneleri içerisinden özütlenen GTX-III örneklerinin GdO@Si-NP ile bağlanma (GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP sentezi) verimi HPLC yöntemi ile hesaplanmıştır. Çalışmada ana ürünlerin yıkanmasından elde edilen supernatant çözeltilerindeki bağlanmayan GTX-III miktarı analiz edilerek bağlanma verim hesabı yapılmıştır. Analizlerde her bir GTX-III bileşiği için ayrı olarak sıra ile GTX-III numuneleri, ürünler ve supernatant numunelerinin enjeksiyonları yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.4' te verilmiştir.

### **3.9 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerinin DLS Yöntemi ile Boyut Ölçüm Çalışmaları**

GTX-III bileşikleri ve GdO@Si-NP' in komjugasyonu sonucu elde edilen GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşikleri için boyut ölçümleri DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) analizi ile gerçekleştirilmiştir. Her numune için 10 µg /1 ml (GdO@Si-NP/H<sub>2</sub>O) konsantrasyonda hazırlan örnekler 5 dakika ultrasonik banyoda bekletildikten sonra DLS cihazı ile ölçümü alınmıştır. Elde edilen sonuçlar bölüm 4.3.1' verilmiştir.

### **3.10 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B Bileşiklerine Ait Hücre Kültürü Çalışmaları**

Çalışmada kullanılan MCF7 insan meme adenokarsinoma epitel hücreleri American Type Culture Collection'dan temin edilmiştir.

MCF7 hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda; PC3 hücreleri Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyumda üretildi.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrıldılar ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine koyularak - 80 °C'de dondurulup, -196 °C sıvı azot içinde stoklandı.

#### **3.10.1 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücreleri üzerinde sitotoksite çalışmaları**

GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B örneklerinin sitotoksite çalışmaları MCF7 ve PC3 hücreleri üzerinde 24 saat için yapılmıştır.

Çalışmada IC<sub>50</sub> (%50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı) değerleri MTT testi ile kolorimetrik olarak belirlendi. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolatelerde her bir kuyucuğa 10<sup>4</sup> hücre/mL olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 µl hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara yedi farklı konsantrasyonda (0,25-0,5-1-5-10-25 µg/mL) örnekler eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre dörder tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37°C % 5 CO<sub>2</sub> ortamında 24 saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 µl MTT solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % sitotoksosite değerleri hesaplandı. Elde edilen konsantrasyona bağlı % canlılık grafikleri bölüm 4.6.1' de verilmiştir.

% sitotoksosite=1 – (ölçülen optik dansite değeri / kontrol değeri) x 100

### **3.10.2 GdO, GdO@Si, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP , GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi**

GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP örneklerinin hücreler üzerindeki tespit edilen optimum zamanın parametresinde % bağlanma verimini belirlemek için MCF7 ve PC3 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yeteri kadar çoğalmasından sonra hücreler 96'lık plakalara alınmıştır.

Çalışmada plakalardaki her bir göz için kullanılacak ligand miktarı 10 µg/mL olarak belirlenmiştir. 96'lık plakalarda her bir kuyucuktaki hücrelerin üzerine 2 µg (0,2 mL) GdO-NP içeren medyumlar uygulanmıştır. Kontrol grubu olarak 96'lık plakalardaki hücrelerin üzerine GdO-NP içermeyen medyum konulmuştur. 1, 4, 8 ve 24 saatlerde kuyucukların üzerindeki GdO-NP örnekleri içeren örnekler uzaklaştırılmış üç kez PBS ile yıkanmış ve 0,2 mL RİPA çözeltisi ilave edilmiştir. RİPA ile hücreler yüzeyden kaldırılmıştır. 0,1 mL'si MR görüntüleme çalışması için kullanılmıştır. RİPA ile alınan hücrelerin 25 µL'si ile BCA yöntemi kullanılarak protein miktarı belirlenmiştir. Tespit edilen MR kontrast değerleri oranlanarak ve protein miktarları da değerlendirmeye alınarak % bağlanma değerleri tespit edilmiştir. Elde edilen % bağlanma-zaman grafikleri bölüm 4.6.2' de verilmiştir.

### **3.11 GdO, GdO@Si, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP , GTX-III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerine Ait MR Görüntüleme Çalışmaları**

Bağlanma etkisinin incelenmesi için yapılan hücre kültürü çalışmalarının aynı zamanda MRI çekimleri gerçekleştirilmiştir. MR görüntüleme çalışmaları Şifa Üniversitesi Hastanesi MR görüntüleme merkezinde Siemens-Magnetom Avanto (1.5 T) cihazı ile yapılmıştır. Görüntüleme parametreleri T1 de 3D boyutlarında  $TE_{MCF7}= 6.43$ ,  $TE_{PC3}= 2.87$  ms,  $TR= 32$  ms, alan görüntüsü $_{MCF7}= 170 \times 220$  mm, alan görüntüsü $_{PC3}= 210 \times 270$  mm, düzey boyutu=500x640, kesit kalınlığı= 0.47 mm, flip açısı= 16 ° ve bant genişliği= 160 Hz/Px olarak uygulanmıştır. MR görüntüleme çalışmaları koronel olarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçların kontrast değerleri Image J yazılımı ile okunarak ortalama değerlerine göre grafik çizimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada MCF7 ve PC3 hücrelerine besiyerleri içerisinde ve 7 farklı konsantrasyonda GdO@Si-NP uygulanıp kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. MCF7 ve PC3 hücre görüntülemeleri ve kalibrasyon grafikleri sırası ile bölüm 4.7.1 ve 4.7.2' de verilmiştir.

### **3.12 18F-FDG ile GTX-III-GdO@Si-NP' in Konjugasyonu**

20 mM CDI, 50 mM NHS, 0,2 M MES ve 0,99 M NaCl'ün bir kap içerisinde 2 mL'lik 3 ayrı PBS çözeltisi hazırlandı. 1 µg/µL konsantrasyon ile hazırlanan GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP çözeltilerinden 50 µL alınıp 2 mL PBS çözeltisine ayrı ayrı kaplarda eklenerek karıştırıldı. Oluşan süspansiyon üzerine 2 mCi/200 µL 18F-FDG çözeltisi eklendi ve 5 dakika karıştırıcıda tutuldu. Daha sonra 2,8 µL merkaptan etanol eklenip 2 saat boyunca 3 boyutlu çalkalayıcıda inkübe edildi. Sonra ardışık olarak 3 kez 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Birinci santrifüj işlemi sonrası süpernatant ayrıldı. Daha sonraki iki santrifüjleme işleminde kalıntı üzerine 0,5'er mL metanol eklenerek yıkama gerçekleştirildi. Bu iki yıkama süresinde elde edilen sıvı kısım ayrıldı. Daha sonra kalıntı üzerine 0,5 mL metanol eklenip numune kalite kontrol analizleri için ayrıldı.

### **3.13 Kalite Kontrol Yöntemleri**

18F-FDG' nin GTX-III-GdO@Si nanoparçacıklara bağlanma verimini belirlemek için TLRC ve HPLRC yöntemleri gerçekleştirildi.

### 3.13.1 TLRC yöntemi ile kalilite kontrol analizi

Radyoişaretleme çalışmasından sonra bulk 18F-FDG ve elde edilen ve GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP numunelerinin her birinden 10 µL numune alınıp 1 cm x 11 cm boyutlarında kesilen ince tabakalar (TLC Silica gel 60F<sub>254</sub>) üzerine damlatma yapıldı. Başlangıç noktası 0,5 cm ve bitiş noktası 10,5 cm olarak belirlendi. Tabakalar, içerisinde H<sub>2</sub>O/ACN (5:95) çözeltisi bulunan tank içerisinde yürütüldü ve TLRC (Bioscan 2000) cihazı ile 5 dakika ölçüm yapılarak analiz işlemi gerçekleştirildi. Elde edilen TLRC analizi sonuçları bölüm 4.8.1' de verilmiştir.

### 3.13.2 HPLRC yöntemi ile kalilite kontrol analizi

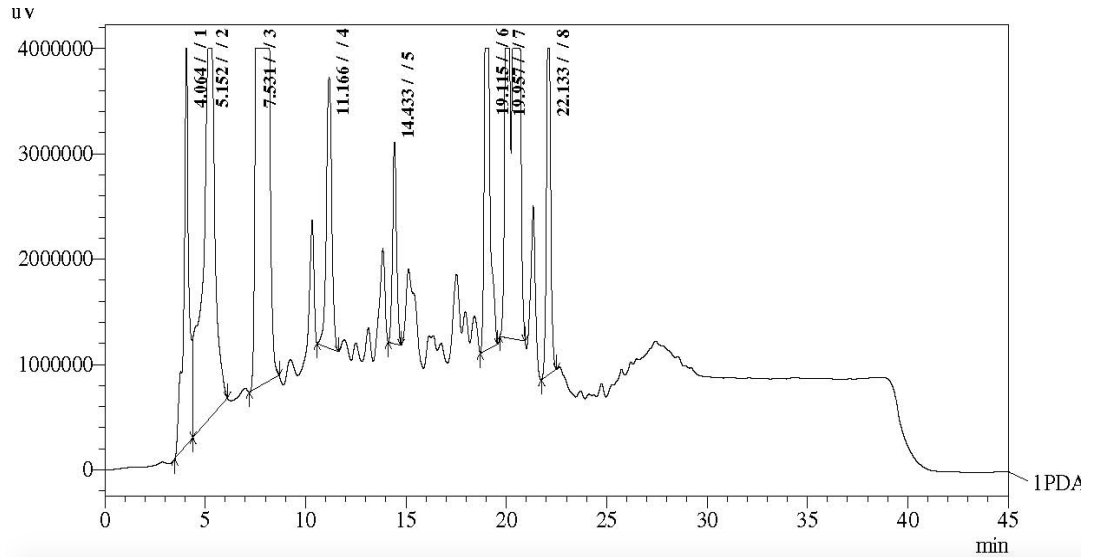
Radyoişaretleme çalışmasından sonra bulk 18F-FDG ve elde edilen ve GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP numuneler filtre edildikten sonra 100 µL HPLRC cihazına enjeksiyonları gerçekleştirildi. HPLRC şartları, Kolon: C18 kolon (250x4,6 mm) (Nukleodur), Dedektör 1: DAD, Dalga boyu : 204, Dedektör 2: Radyoaktivite dedektörü (NaI 1x1" Pinhole), Mobil faz: Metanol/Su (45/55), Akış: 0.7 mL/min. olarak uygulandı. Elde edilen HPLC analiz sonuçları bölüm 4.8.2' de verilmiştir.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Orman Gülü Yapağı, Çiçeğı ve Deli Baldan GTX-III Bileşiminin Eldesinin HPLC Analiz Sonucları

#### 4.1.1 GTX-III bileşiminin orman gülü yapağından HPLC analizi ile saflaştırılması

Metanol içinde çözülmüş olan yaprak örneğinden elde edilen elde edilen özüt HPLC ile analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen kromatogram Şekil 4.1 de verilmiştir. Grafikte bulunan numaralandırılmış pikler saflaştırılarak bu pikler için yapılan LC-MS çalışmalarında 3 numaralı pikin GTX-III bileşimi olduğu belirlenmiştir. 3 numaralı pik için LC-MS sonucu Şekil4.4' te verilmiştir.

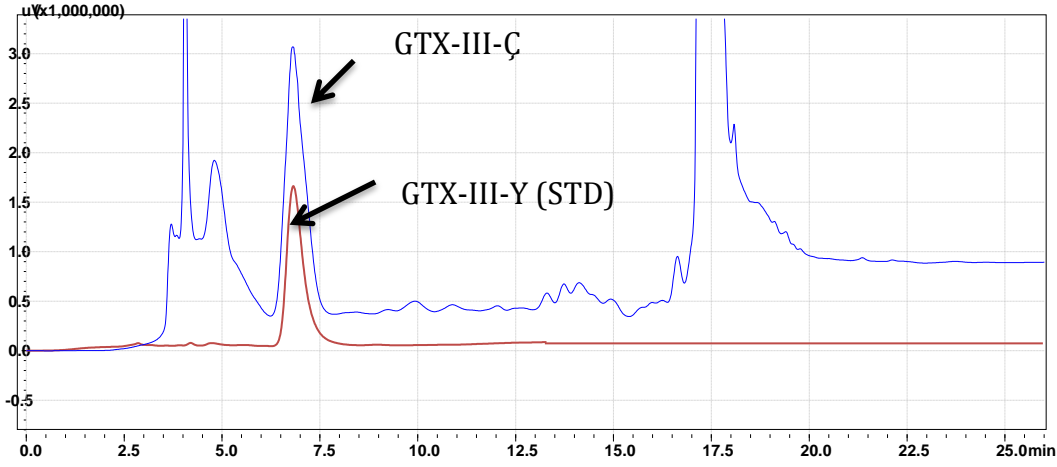


Şekil 4.1 Orman gülü yapağı özütünün HPLC kromatogramı.

#### 4.1.2 GTX-III bileşiminin orman gülü çiçeğinden HPLC analizi ile saflaştırılması

Çiçek örneğinden elde edilen özüt metanol ile çözümlenerek HPLC analizi yapılmıştır. Bu çalışmada orman gülü yapağından saflaştırılıp tanımlanan GTX-III bileşi, orman gülü çiçeğinde bulunan GTX-III bileşiminin tanımlanması ve saflaştırılması için standard olarak kullanılmıştır. Orman gülü çiçeğı için yapılan HPLC analiz sonucu ile orman gülü yapağından elde edilen saflaştırılmış GTX-III bileşiminin HPLC analizinden elde edilen sonuçlar karşılaştırılmış ve çakışan pik GTX-III-Çiçek ( GTX-III-Ç) bileşimi olarak saflaştırılmıştır. Çiçek analizi ve

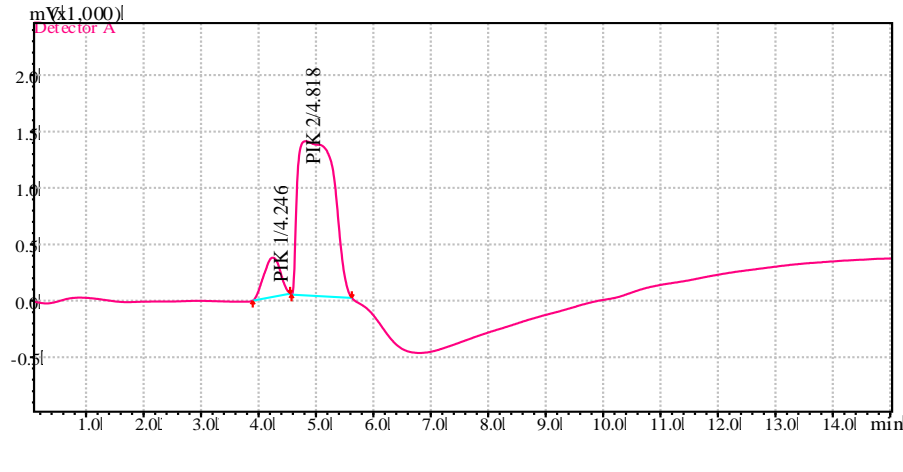
GTX-III-Y bileşiği piki ile çakışmasını gösteren grafik Şekil 4.2’de verilmiştir.



Şekil 4.2 Orman gülü çiçeği özütünün HPLC kromatogramı.

#### 4.1.3 GTX-III bileşiğinin deli balardan HPLC analizi ile saflaştırılması

Deli bal örneğinin özütlenmesinden elde edilen sıvı kısmının HPLC analizi sonucu Şekil 4.3 te verilmiştir. Refraktif İndeks Dedektör (RID) ile alınan bu sonuca göre deli bal özütü, ana pikten (2.pik) hemen önce gelen küçük bir miktar safsızlık içermesine rağmen tek bir ana pik (2.pik) içerdiği görülmektedir. RID ile özellikle glikozitli bileşiklerin dedeksiyonu gerçekleştirilmektedir. Buna göre elde edilen bal özütünün HPLC analiz sonucu ile karbon ve proton NMR analizi sonucu (Bkz. Şekil 4.6 ve 4.7 ) değerlendirildiğinde, elde edilen bileşiğin GTX-III’ün glikozitli bileşiği olduğu belirtilmiştir. Yaprak ve çiçekten elde edilen GTX-III-Y ve GTX-III-Ç bileşikleri RID dedektörde pik sinyali vermemiştir.

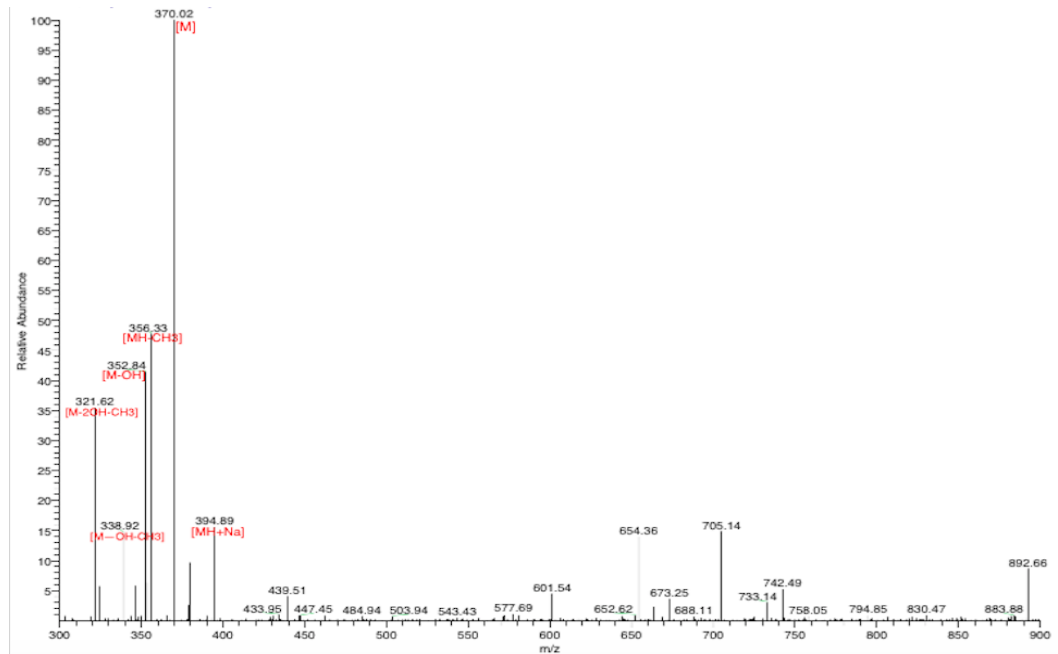


Şekil 4.3 Deli bal özütünün HPLC kromatogramı.

## 4.2 GTX-III Bileşiminin LC/MS ve NMR Yöntemi ile Yapı Analizi Sonuçları

### 4.2.1 GTX-III bileşiminin LC/MS yöntemi ile yapı analizi sonuçları

GTX-III bileşiminin eldesi Terai ve arkadaşlarının (Terai et al., 2000) GTX-III bileşiminin eldesini gerçekleştirdiği ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Meguri ve arkadaşlarının GTX-I, GTX-II ve GTX-III bileşiklerinin tanımlanması için uyguladığı HPLC analizi uygulanarak saflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir (Meguri et al., 1993). Bu çalışmalar sonucunda saflaştırılan ürünler için LC/MS analizi yapılarak GTX-III bileşiği tanımlanmıştır. GTX-III bileşiminin molekül ağırlığı 370,48 g/mol olarak belirlenmiştir. Moleküler yapısı incelenerek olası parçalanma grupları belirlenmiştir. Buna göre Şekil 4.4'da verilen LC/MS analizinden elde edilen sonuç analiz edilerek Çizelge 4.1' de verilen GTX-III bileşiminin teorik parçalanma ürünleri ile karşılaştırma yapılmıştır. Sonuç olarak orman gülü yaprağından saflaştırılarak elde edilen 3. pikin LC/MS çalışmasında alınan sonuçlarda GTX-III bileşiği ve parçalanma ürünleri ile çakıştığı görülmektedir. Bu saflaştırma sonucu elde edilen GTX-III-Y bileşiği çiçek özütünden GTX-III-Ç bileşiminin HPLC ile tanımlanması için kullanılmıştır.



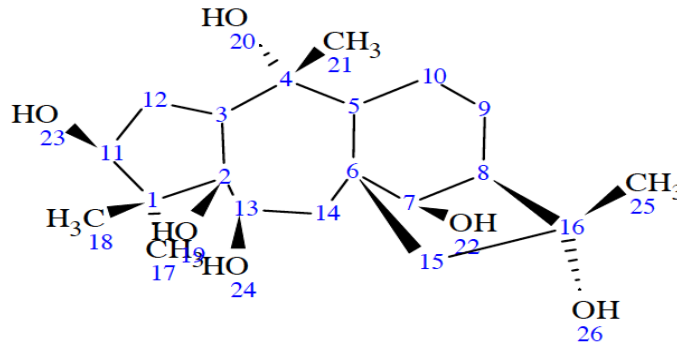
Şekil 4.4 Orman gülü yaprağı LC/MS analizi sonucu

Çizelge 4.1 GTX-III bileşiğine ait teorik ve deneysel parçalanma ürünlerinin LC/MS sonucunun karşılaştırılması

PARÇALANMA ÜRÜNÜ	TEORİK PARÇALANMA	GTX-III PARÇALANMA	% BAĞIL BOLLUK
M	370,48	370,02	100
MH+Na	394,48	394,89	48
MH-CH <sub>3</sub>	356,48	356,33	42
M-OH	353,48	352,84	35
M-OH-CH <sub>3</sub>	338,48	338,92	15
M-2OH-CH <sub>3</sub>	321,48	321,62	15

#### 4.2.2 GTX-III Bileşiğinin NMR yöntemi ile yapı analizi sonuçları

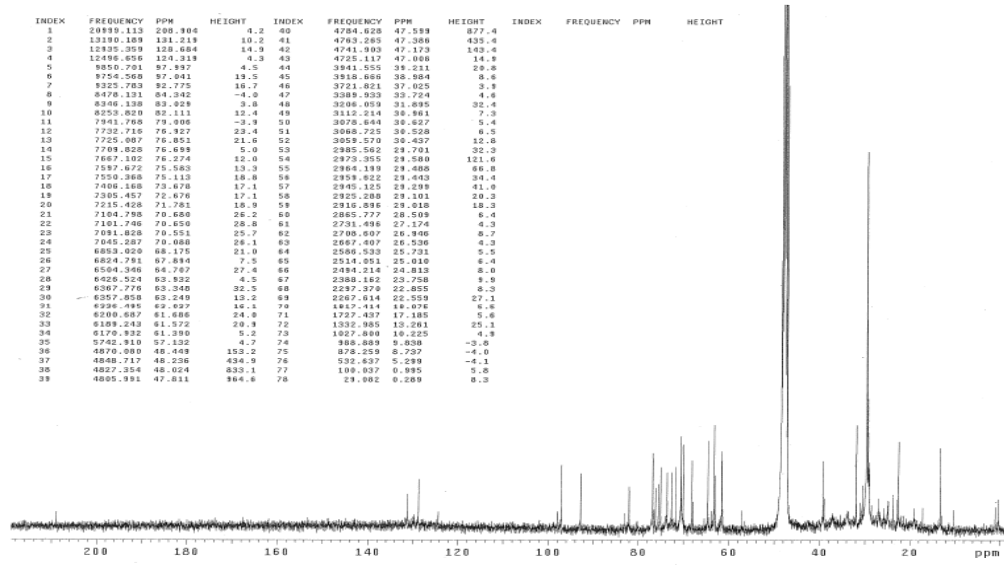
Deli bal özütü ve Yaprak özütü HPLC saflaştırması pik 1 ve pik 2 (Bkz. Şekil 4.1) için yapılan NMR sonuçları sırası ile bölüm 4.2.2' de verilmektedir. Teorik GTX-III NMR sonuçlarının alındığı ACD yazılım programı ile çizilen GTX-III bileşiğinin kimyasal yapısı numaralandırılmış olarak Şekil 4.5' te verilmektedir.



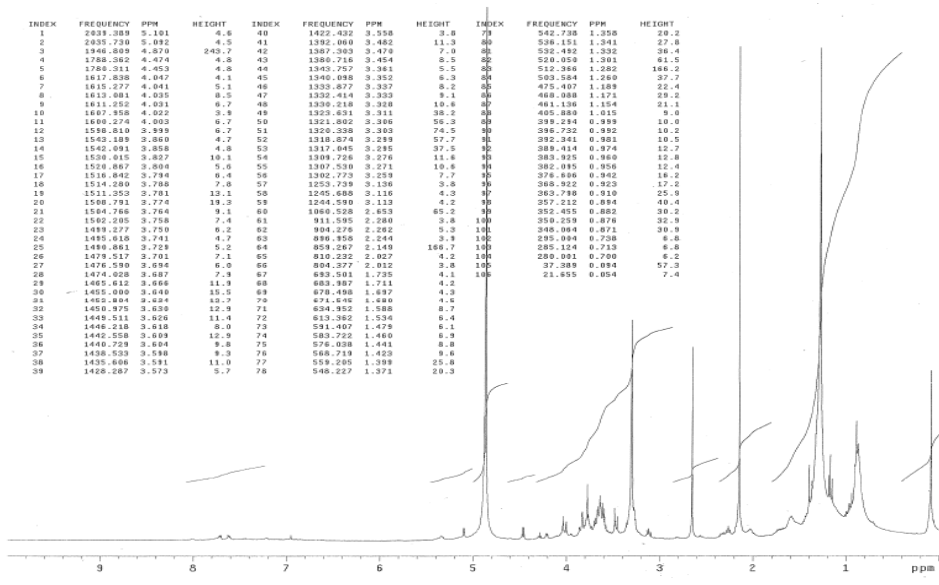
Şekil 4.5 GTX-III bileşiğinin karbon atomu ve fonksiyonel gruplarının numaralandırılmış yapısı

##### 4.2.2.1 Deli bal özütünün NMR analizi sonuçları

Deli bal özütünün metanol ile çözülerek alınan proton ve karbon NMR sonuçları sırası ile Şekil 4.6 ve Şekil 4.7' de verilmektedir. Sonuçlar ACD yazılımı ile çizilen teorik GTX-III proton ve karbon NMR'ı ile karşılaştırıldığında (Bkz. Çizelge 4.2) deneysel yapı ile örtüştüğü görülmektedir.



Şekil 4.6 Deli Bal özütünün C-NMR çalışması sonuçları



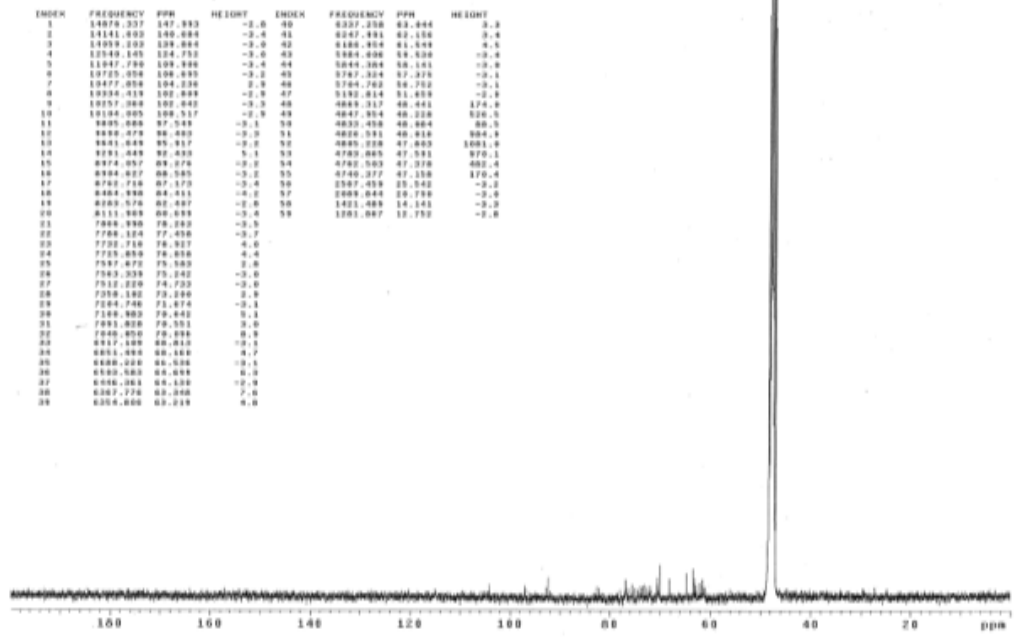
Şekil 4.7 Deli Bal özütünün H-NMR çalışması sonuçları

Çizelge 4.2 Deli bal özütü C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması

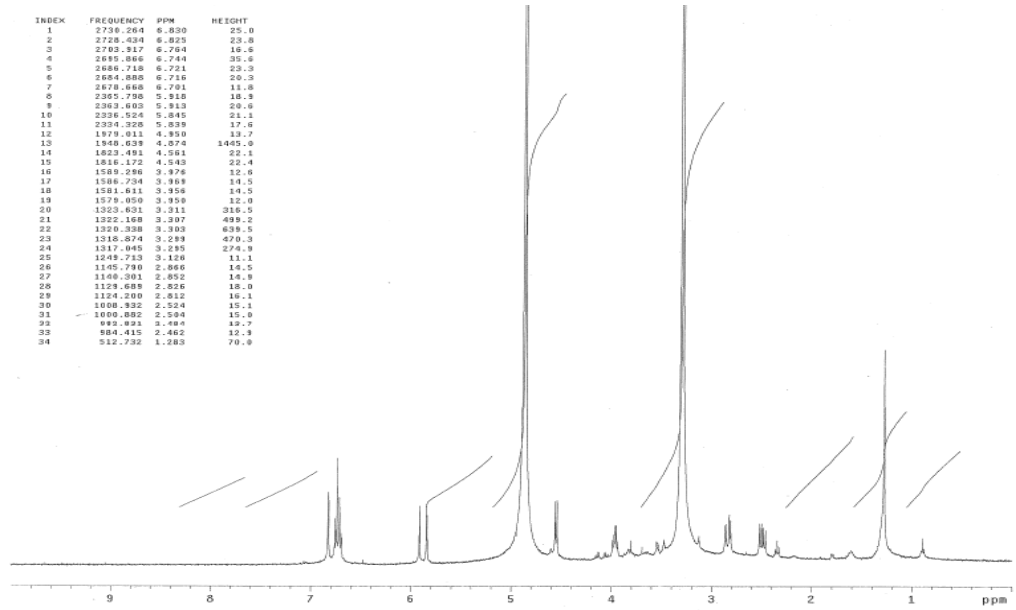
<b>Deli Balı Özütü GTX-III C-NMR</b>				<b>Deli Balı Özütü GTX-III H-NMR</b>		
<b>13C No:</b>	<b>CHn</b>	<b>DENEYSEL</b>	<b>TEORİK</b>	<b>Grup</b>	<b>DENEYSEL</b>	<b>TEORİK</b>
1	C	47,5	51,8	3	3,48	3,48
2	C	84,3	84,6	5	1,70	1,80
3	CH	47,8	51,7	7	3,99	3,96
4	C	79,0	78,1	8	2,14	2,27
5	CH	57,1	55,2	9<">	2,65	2,66
6	C	48,0	52,6	9<'>	1,69	1,67
7	CH	82,1	79,5	10<">	1,71	1,72
8	CH	57,1	56,4	10<'>	0,94	0,94
9	CH2	27,1	27,0	11	3,82	3,82
10	CH2	17,1	16,0	12<">	2,65	2,58
11	CH	82,1	82,6	12<'>	2,65	2,55
12	CH2	31,8	35,8	13	4,03	4,03
13	CH	73,6	74,2	14<">	2,14	2,19
14	CH2	47,5	44,4	14<'>	1,73	1,73
15	CH2	61,5	60,4	15<">	2,02	2,03
16	C	83,0	79,7	15<'>	1,73	1,77
17	CH3	22,5	21,5	17	1,15	1,11
18	CH3	22,5	21,5	18	1,58	1,56
21	CH3	25,5	28,3	19,20,22,23,24,26	3,77	3,76
25	CH3	23,7	23,9	21	1,73	1,83
				25	1,47	1,49

#### **4.2.2.2 HPLC ile saflaştırılmış Yaprak pik-1 örneği NMR analizi sonuçları**

HPLC analizi ile saflaştırılan yaprak özütünden elde edilen 1. pik numunesinin (Bkz. Bölüm 4.1.1, Şekil 4.1) karbon ve proton NMR analizleri sırası ile Şekil 4.8 ve Şekil 4.9' da verilmiştir. ACD yazılımı ile elde edilen GTX-III karbon ve proton NMR'ı verileri (Çizelge 4.3) ile yapılan karşılaştırmada deneysel karbon yapısının GTX-III teorik karbon yapısı ile örtüştüğü fakat proton yapısı incelendiğinde farklılıklar olduğu gözlenmiştir. Karbon yapısında ki uyum bu bileşiğin GTX izomeri olabileceğini göstermektedir.



Şekil 4.8 Yaprak pik-1 örneğinin C-NMR çalışması sonuçları



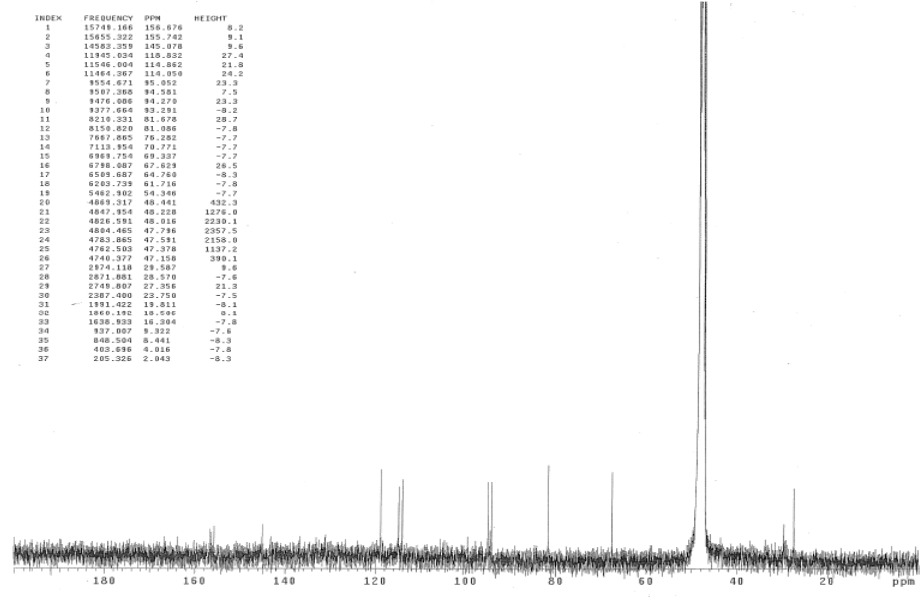
Şekil 4.9 Yaprak pik-1 örneğinin H-NMR çalışması sonuçları

Çizelge 4.3 Yaprak pik-1 C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması

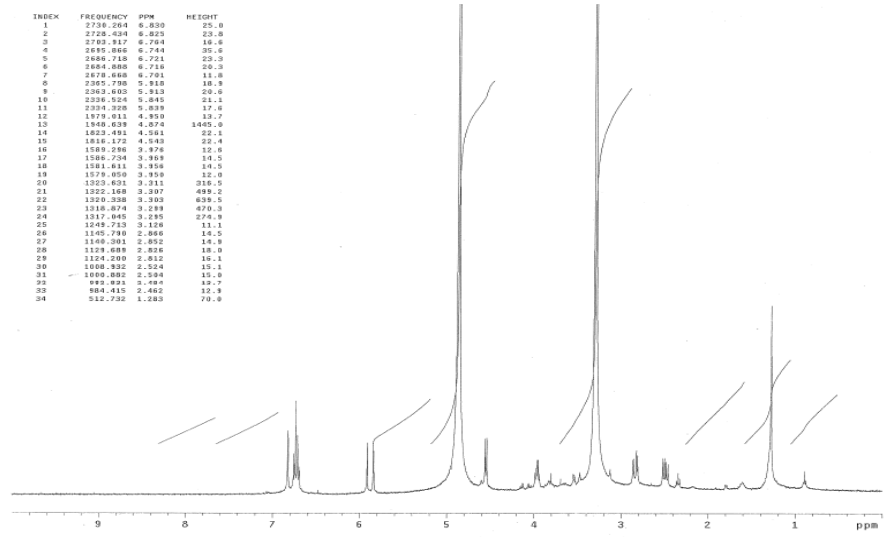
YAPRAK-HPLC- PİK1- GTX-III C-NMR				YAPRAK-HPLC- PİK1- GTX-III H-NMR		
13C No:	CHn	DENEYSEL	TEORİK	Grup	DENEYSEL	TEORİK
1	C	51,6	51,8	3	3,48	3,48
2	C	84,4	84,6	5	-	1,80
3	CH	51,6	51,7	7	3,95	3,96
4	C	78,2	78,1	8	-	2,27
5	CH	56,7	55,2	9<">	2,66	2,66
6	C	51,6	52,6	9<'>	-	1,67
7	CH	78,3	79,5	10<">	-	1,72
8	CH	57,4	56,4	10<'>	-	0,94
9	CH2	25,5	27,0	11	3,82	3,82
10	CH2	14,1	16,0	12<">	2,65	2,58
11	CH	82,4	82,6	12<'>	2,65	2,55
12	CH2	-	35,8	13	4,03	4,03
13	CH	74,7	74,2	14<">	-	2,19
14	CH2	47,1	44,4	14<'>	-	1,73
15	CH2	61,5	60,4	15<">	-	2,03
16	C	80,7	79,7	15<'>	-	1,77
17	CH3	20,8	21,5	17	1,21	1,11
18	CH3	20,8	21,5	18	-	1,56
21	CH3	-	28,3	19,20,22,23,24,26	3,76	3,76
25	CH3	25,5	23,9	21	-	1,83
				25	-	1,49

#### **4.2.2.3 HPLC ile saflaştırılmış Yaprak pik-2 örneği NMR analizi sonuçları**

HPLC analizi ile saflaştırılan yaprak özütünden elde edilen 2. pik numunesinin (Bkz. Bölüm 4.1.1, Şekil 4.1) karbon ve proton NMR analizleri Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de verilmiştir. ACD yazılımı ile elde edilen GTX-III karbon ve proton NMR'ı verileri (Çizelge 4.4) ile yapılan karşılaştırmada deneysel karbon yapısının GTX-III'ün teorik karbon yapısında bulunan 8 adet karbonun dedekte edilemediği görülmektedir. Bu bileşiğin yapı analizi için daha fazla çalışma yapmak gerekmektedir.



Şekil 4.10 Yaprak pik-2 örneğinin C-NMR çalışması sonuçları



Şekil 4.11 Yaprak pik-2 örneğinin H-NMR çalışması sonuçları

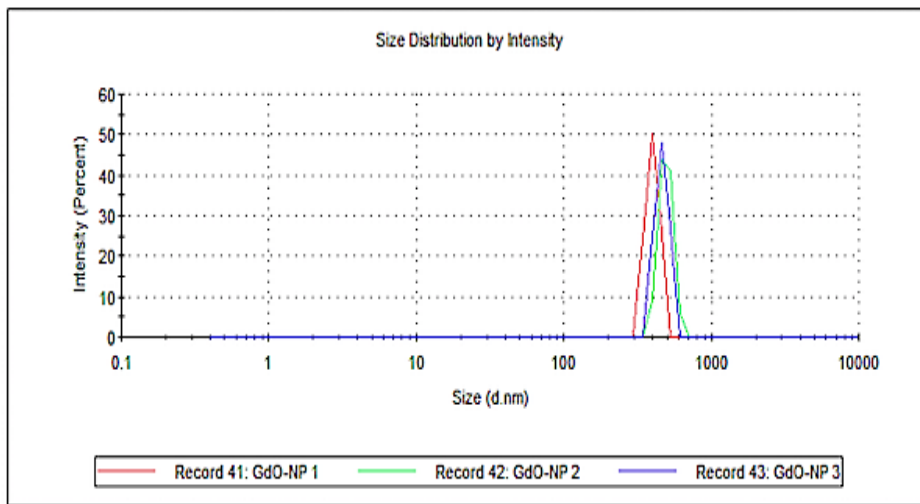
Çizelge 4.4 Yaprak pik-2 C-NMR ve H-NMR sonuçlarının teorik GTX-III C-NMR ve H-NMR değerleri ile karşılaştırılması

YAPRAK-HPLC- PİK2- GTX-III C-NMR				YAPRAK-HPLC- PİK2- GTX-III H-NMR		
13C No:	CHn	DENEYSEL	TEORİK	Grup	DENEYSEL	TEORİK
1	C	-	51,8	3	3,31	3,48
2	C	81,7	84,6	5	-	1,80
3	CH	-	51,7	7	3,96	3,96
4	C	76,3	78,1	8	2,46	2,27
5	CH	54,3	55,2	9<">	2,52	2,66
6	C	-	52,6	9<'>	-	1,67
7	CH	81,1	79,5	10<">	-	1,72
8	CH	-	56,4	10<'>	-	0,94
9	CH2	27,3	27,0	11	3,95	3,82
10	CH2	16,3	16,0	12<">	2,50	2,58
11	CH	81,7	82,6	12<'>	2,50	2,55
12	CH2	-	35,8	13	3,98	4,03
13	CH	70,8	74,2	14<">	2,46	2,19
14	CH2	-	44,4	14<'>	-	1,73
15	CH2	61,7	60,4	15<">	-	2,03
16	C	-	79,7	15<'>	-	1,77
17	CH3	19,8	21,5	17	1,28	1,11
18	CH3	19,8	21,5	18	-	1,56
21	CH3	27,3	28,3	19,20,22,23,24,26	-	3,76
25	CH3	23,7	23,9	21	-	1,83
				25	1,28	1,49

### 4.3 GdO@Si-NP Bileşiğinin DLS ve SEM Analizi Sonuçları

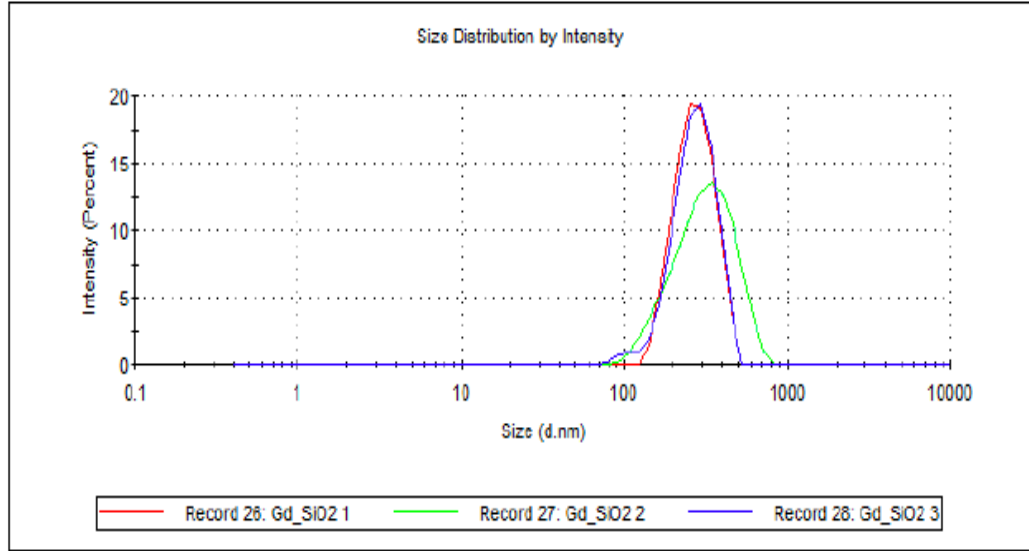
#### 4.3.1 GdO@Si-NP bileşiğinin DLS analizi sonuçları

GdO-NP'in DLS ile yapılan boyut analiz sonucu Şekil 4.12'de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre sentezlenen nanoparçacıkların boyutları 451,3 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.12 GdO-NP' in DLS ile yapılan boyut analiz sonucu.

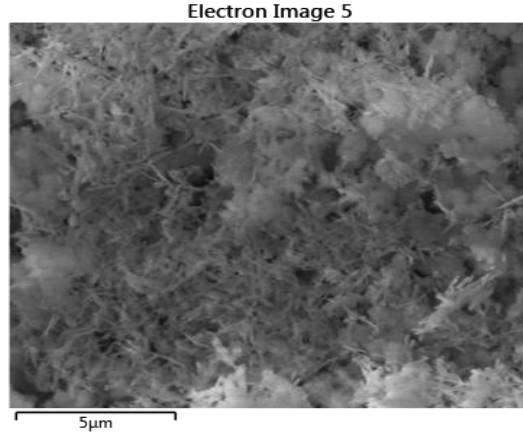
GdO@Si-NP' in DLS ile yapılan analiz sonucu Şekil 4.13' de gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlara göre sentezlenen nanoparçacıkların boyutları 369,1 nm olarak belirlenmiştir. GdO-NP' in silikalanma işlemi sonrası parçacık boyutlarının küçüldüğü görülmektedir.



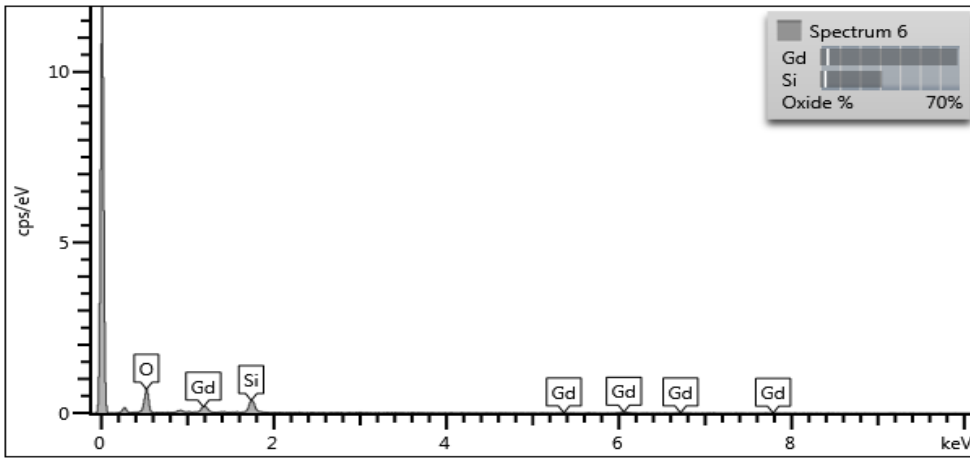
Şekil 4.13 GdO@Si-NP' in DLS ile yapılan analiz sonucu.

### 4.3.2 GdO@Si-NP bileşiğinin SEM analizi sonuçları

Sentezlenen GdO@Si-NP için yapılan SEM analizinde EDS dedektör ile elde edilen parçacık görüntüsü ve içerdiği karakteristik piklerin grafiği sırası ile Şekil 4.14 ve Şekil 4.15' te verilmiştir. Şekil 4.14 incelendiğinde GdO@Si-NP' ın amorf iğneli yapıya sahip olduğu görülmektedir. Jana ve arkadaşları SEM analizi ile GdO@Si-NP' ın amorf yapıya sahip olduğunu benzer görüntüyü elde ederek göstermiştir (Drbohlavova et al., 2009). Açık renkli olan kısımlar bileşiğin yüzeyinin daha fazla çıkıntı yapmış kısımlarının gösterirken koyu gri kısımlar yüzeyin derin olan kısımlarını göstermektedir. Şekil 4.15 incelendiğinde gadolinyum pikleri nanoparçacıklardaki Gd atomlarının varlığını ve Si (Silisyum) pikleri nanoparçacıkların silikalanmasının gerçekleştirildiğini göstermektedir. Stefanakis ve Ghanotakis sentezledikleri GdO@Si-NP için EDS ile yaptıkları kimyasal analizde benzer olarak 5 -8 keV aralığında yoğun olarak Gd atomlarını ve 0 – 2 keV aralığında O (Oksijen) , Gd ve Si atomlarını görüntülenmiştir. Çizelge 4.5'de SEM-EDS analizi yapılan GdO@Si-NP karakteristik elementlerinin % ağırlık oranları ve % atomik dağılım oranları verilmiştir.



Şekil 4.14 GdO@Si-NP bileşiğinin SEM görüntüsü.



Şekil 4.15 GdO@Si-NP' in SEM analizinde görüntülenen karakteristik Gd, Si ve O pikleri.

Çizelge 4.5 GdO@Si-NP % ağırlık ve % atomik değerlerinin oranı

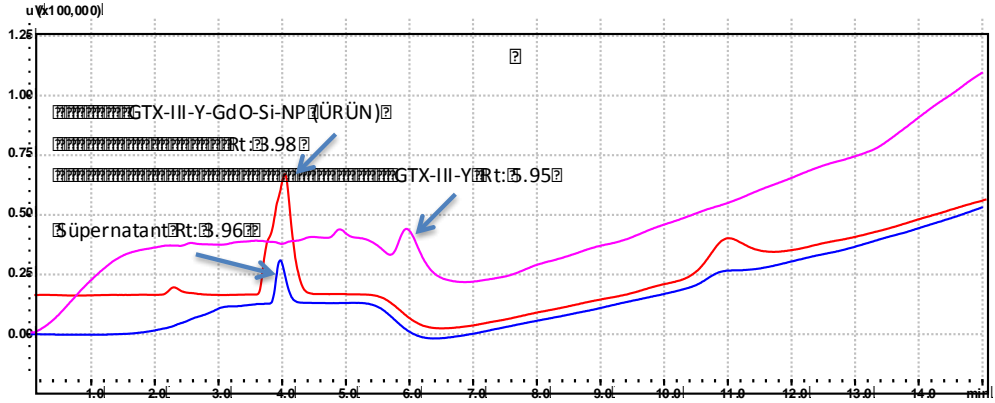
Element	Wt%	Atomic %
O	25.71	64.14
Si	14.57	20.71
Gd	59.71	15.15
Total:	100.00	100.00

#### 4.4 GTX-III ile GdO@Si-NP Bileşiğinin Bağlanma Verimi

##### 4.4.1 GTX-III-Y ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi

Yapraktan elde edilen GTX-III-Y bileşiğinin GdO@Si-NP bağlanma verimi HPLC analizi ile belirlenmiştir. Konjugasyon işlemi sonrası santrifüjleme

işleminde elde edilen üst faz (süpernatant), GTX-III-Y ve ürün numunelerinin HPLC analiz sonuçları Şekil 4.16’da verilmiştir.

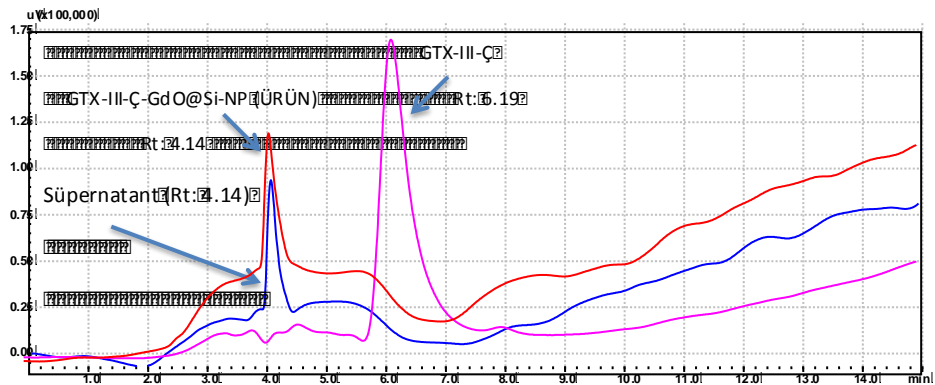


Şekil 4.16 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Y ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları.

Her numune için bir enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 25  $\mu$ L olarak belirlenmiştir. Elde edilen HPLC analizi sonuçlarına göre sentezlenen ürünün yıkama işleminden elde edilen süpernatant örneği için (Rt: 3.96) yapılan HPLC analiz çalışmalarında serbest GTX-III-Y (Rt: 5.95) bileşiği dedekte edilmemiştir. Buna göre reaksiyona katılan 400  $\mu$ g GTX-III-Y bileşiğinin GdO@Si-NP bileşiğine % 100 verim ile bağlandığı belirlenmiştir.

#### 4.4.2 GTX-III-Ç ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi

Çiçekten elde edilen GTX-III bileşiğinin gadolinium parçacıklarla bağlanma verimi HPLC analizi ile belirlenmiştir. Konjugasyon işlemi sonrası santrifüjleme işleminden elde edilen üst faz (süpernatant), GTX-III-Ç ve ürün numunelerinin HPLC analiz sonuçları Şekil 4.17’de verilmiştir.

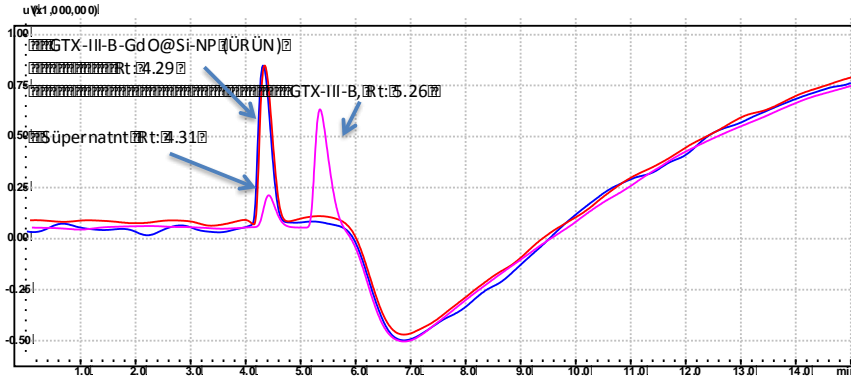


Şekil 4.17 GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları.

Her numune için bir enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 25 µL olarak belirlenmiştir. Elde edilen HPLC analizi sonuçlarına göre sentezlenen ürünün yıkama işleminden elde edilen süpernatant örneği (Rt: 4.14) için yapılan HPLC analiz çalışmalarında serbest GTX-III (Rt: 6.19) bileşiği dedekte edilmemiştir. Buna göre reaksiyona katılan 300 µg GTX-III-Ç bileşiği GdO@Si-NP bileşiğine % 100 verim ile bağlandıği belirlenmiştir.

#### 4.4.3 GTX-III-B ile GdO@Si-NP bileşiğinin bağlanma verimi

Deli baldan elde edilen GTX-III bileşiğinin gadolinium parçacıklarla bağlanma verimi HPLC analizi ile belirlenmiştir. Konjugasyon işlemi sonrası santrifüjleme işleminden elde edilen üst faz (süpernatant), GTX-III-B ve ürün numunelerinin HPLC analiz sonuçları Şekil 4.18’ de verilmiştir.



Şekil 4.18 GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-B ve üst faz (süpernatant) örneklerine ait HPLC analiz sonuçları.

Her numune için bir enjeksiyon yapılmıştır. Enjeksiyon hacmi 25 µL olarak belirlenmiştir. Elde edilen HPLC analizi sonuçlarına göre sentezlenen ürünün yıkama işleminden elde edilen süpernatant örneği (Rt: 4.31) için yapılan HPLC analiz çalışmalarında serbest GTX-III (Rt: 5.26) bileşiği dedekte edilmemiştir. Buna göre reaksiyona katılan 300 µg GTX-III-B bileşiğinin GdO@Si-NP bileşiğine % 100 verim ile bağlandıği belirlenmiştir.

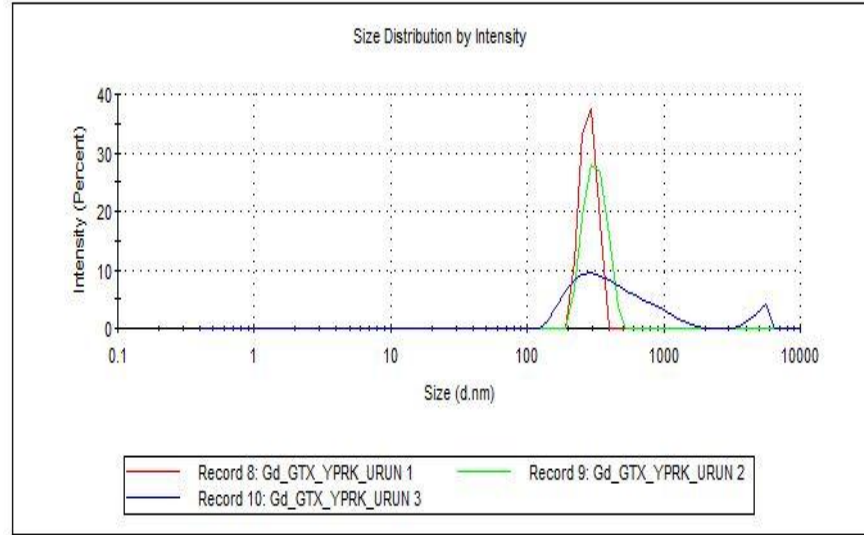
#### 4.5 GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP Bileşiklerinin DLS Yöntemi ile Boyut Ölçüm Analizi Sonuçları

Sentezi gerçekleştirilen GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin DLS ile yapılan boyut analiz sonuçları sırası ile Şekil 4.19, Şekil 4.20 ve Şekil 4.21’de gösterilmektedir.

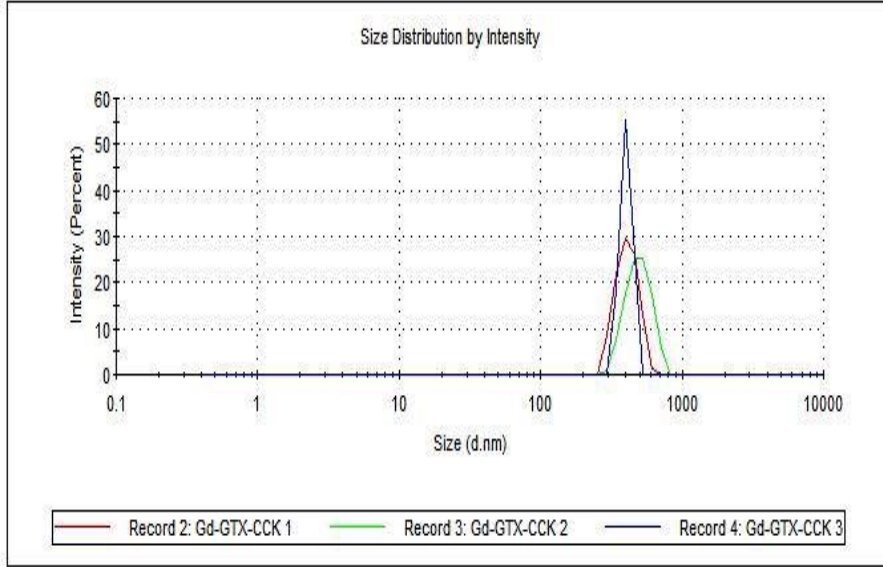
Nanoparçacıkların parçacık boyutları Çizelge 4.6’ da verilmiştir. Grafikler GdO@Si-NP’in boyutları ile karşılaştırıldığında GTX-III-Y bileşiği konjugasyonunun parçacık boyutlarında küçülmeye neden olduğu fakat GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin parçacık boyutlarını arttırdığı görülmektedir.

Çizelge 4.6 GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin DLS ile belirlenen parçacık boyutları.

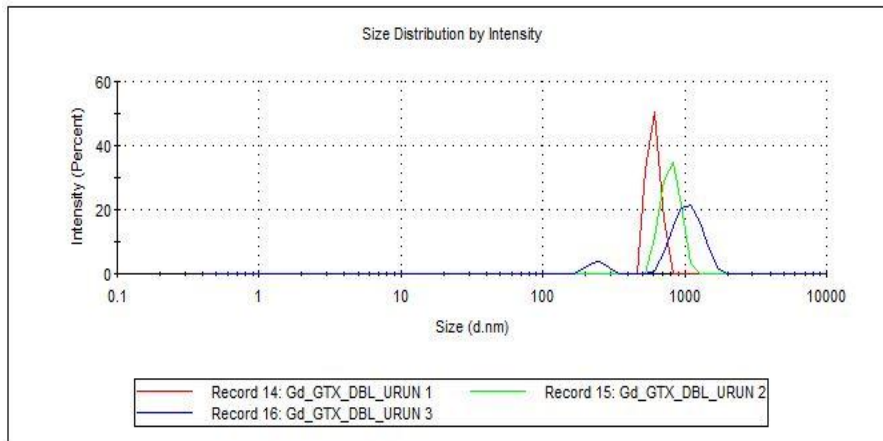
Numune	Parçacık Boyutu (nm)
GdO@Si-NP	369,1
GTX-III-Y-GdO@Si-NP	351,9
GTX-III-Ç-GdO@Si-NP	437,2
GTX-III-B-GdO@Si-NP	824,3



Şekil 4.19 GTX-III-Y-GdO@Si-NP’ in DLS analizi sonucu.



Şekil 4.20 GTX-III-Ç-GdO@Si-NP' in DLS analizi sonucu.



Şekil 4.21 GTX-III-B-GdO@Si-NP' in DLS analizi sonucu.

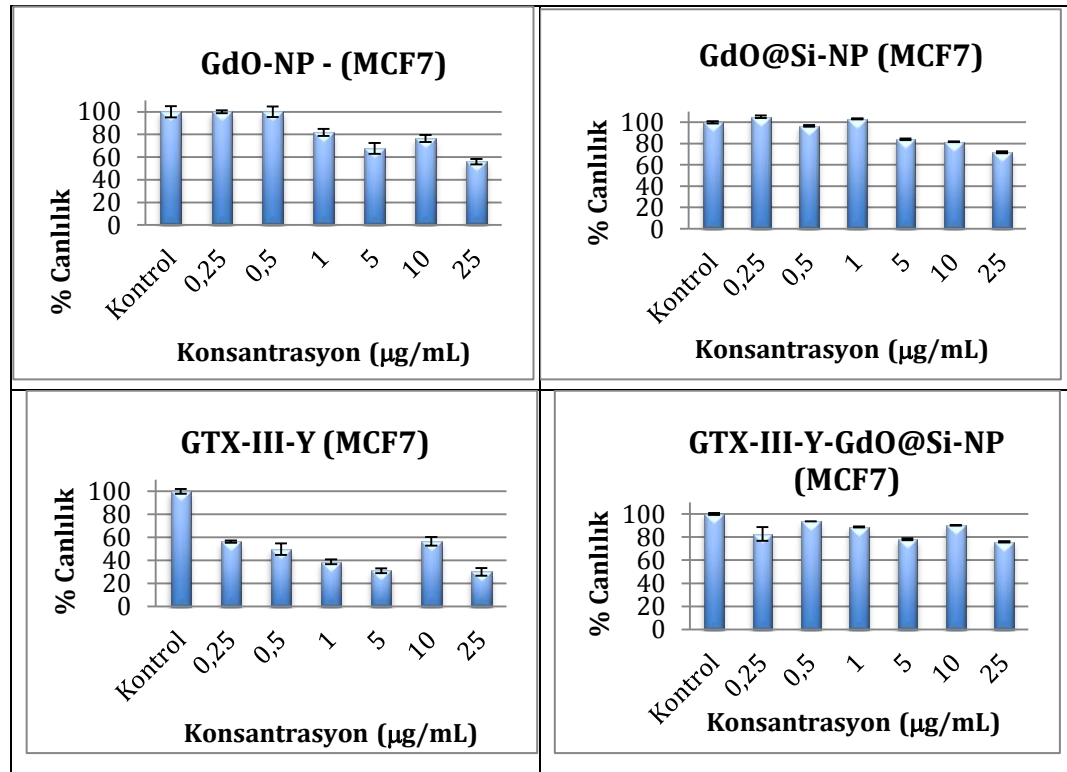
## 4.6 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

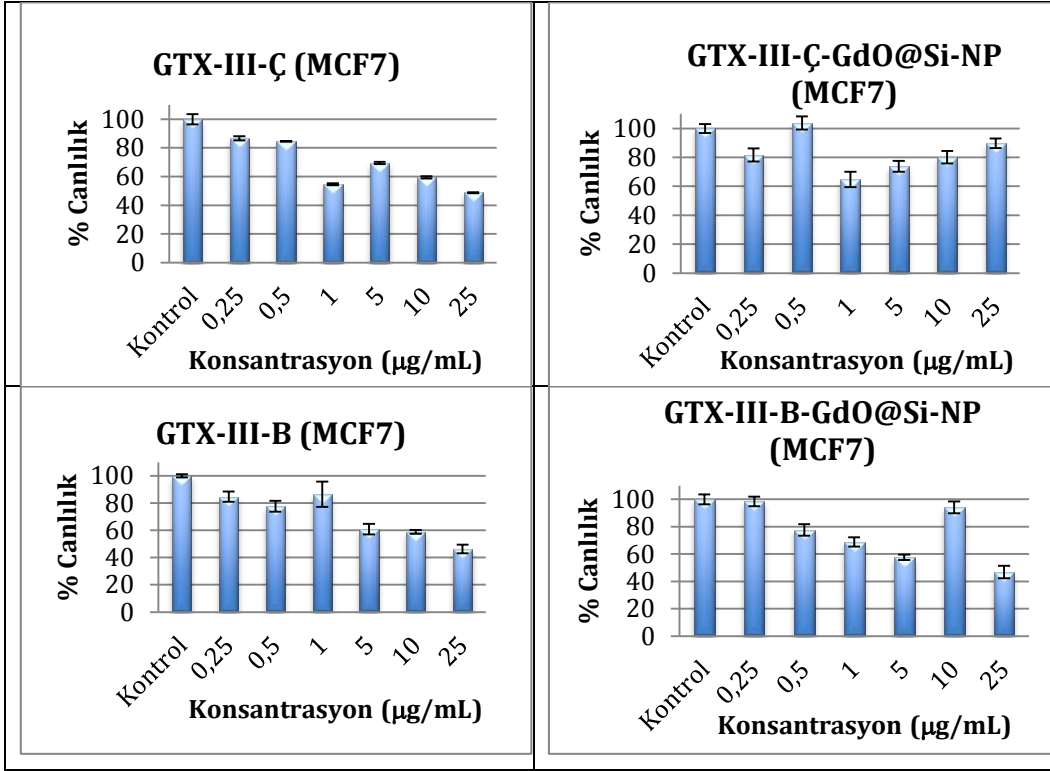
### 4.6.1 MCF7 ve PC3 hücrelerinde sitotoksosite çalışmasının sonuçları

Şekil 4.22 ve Şekil 4.23' te GdO, GdO@Si, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarda (0,25-0,5-1-5-10-25  $\mu\text{g/mL}$ ) MCF7 ve PC3 hücreleri ile yapılan sitotoksosite testlerinde 24 saatlik izleme sonucunda elde edilen hücre canlılık oranlarının uygulanan konsantrasyon aralığına karşı

grafikleri verilmiştir. Elde edilen grafikler ile yapılan hesaplama sonucu Çizelge 4.7’ de verilen IC50 sonuçları elde edilmiştir.

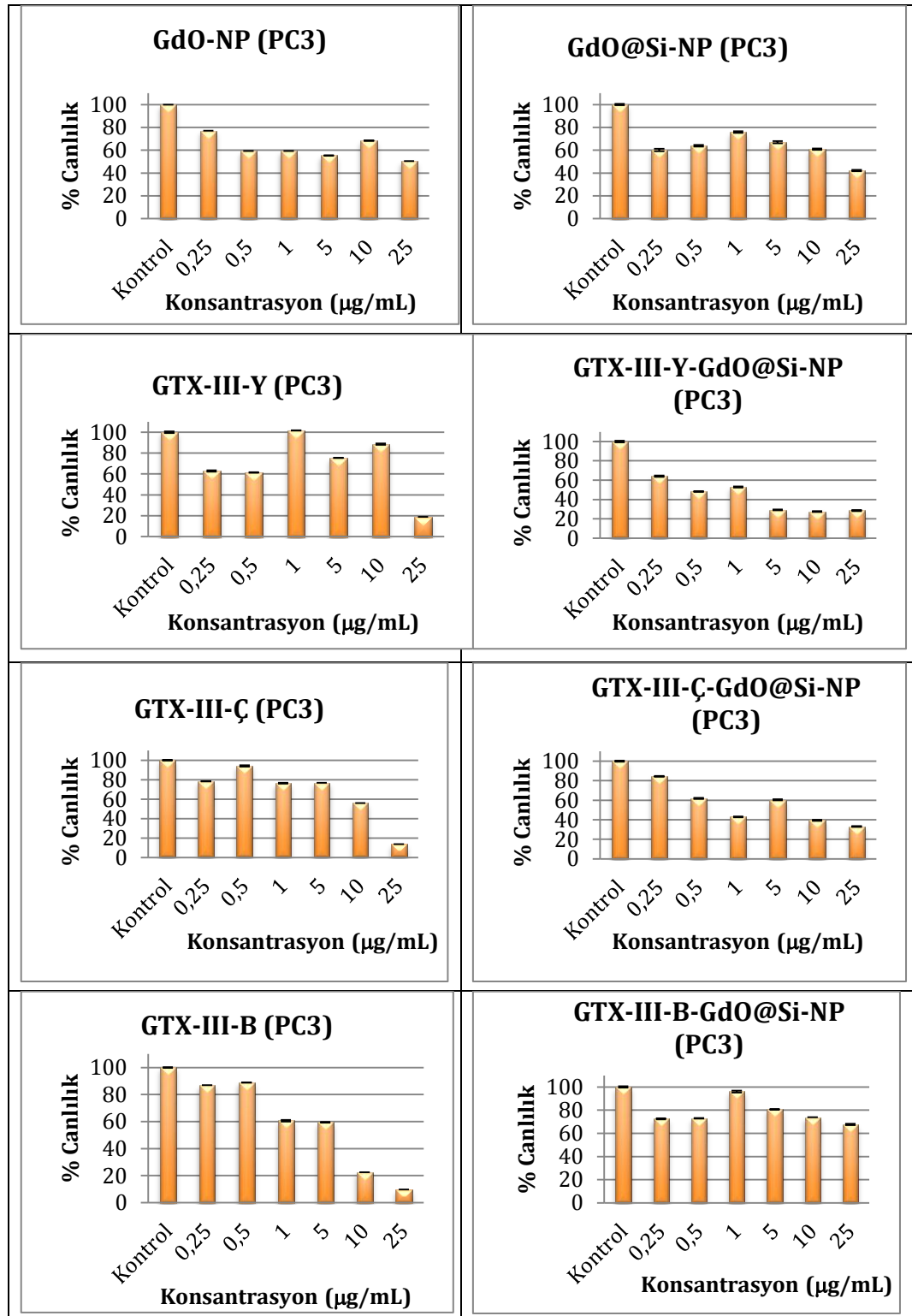
Şekil 4.22’de GdO-NP-MCF7 ile GdO@Si-NP-MCF7 grafikleri inceleniğinde silikalamanın GdO-NP’ın MCF7 hücrelerine sitotoksik etkisini bir miktar azalttığı görülmektedir. GTX-III-Y-MCF7 ve GTX-III-Ç-MCF7 grafiklerinde konsantrasyon artışı ile birlikte hücre canlılık oranında anlamlı bir azalma görülmektedir. GTX-III-Y-GdO@Si-NP-MCF7 ve GTX-III-Ç-GdO@Si-NP-MCF7 grafiklerinde ise hücre canlılık oranlarında anlamlı bir azalma görülmemektedir. Buna göre GdO@Si-NP’ın GTX-III-Y ve GTX-III-Ç bileşiklerinin sitotoksik etkisini düşürdüğü görülmektedir. GTX-III-B-MCF7 grafiği incelendiğinde MCF7 hücreleri üzerinde anlamlı sitotoksik etki göstermediği görülmektedir.





Şekil 4.22 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF7 hücreleri ile yapılan sitotoksikite çalışmalarının sonuç grafikleri.

Şekil 4.23' de GdO-NP-PC3 ile GdO@Si-NP-PC3 grafikleri incelendiğinde silikalamanın GdO-NP' in PC3 hücrelerine sitotoksik etkisinde anlamlı bir değişim oluşturmadığı görülmüştür. GTX-III-Y-PC3, GTX-III-Ç-PC3 ve GTX-III-B-PC3 grafiklerinde konsantrasyon artışı ile birlikte hücre canlılık oranında anlamlı bir azalma görülmektedir. GTX-III-Y-GdO@Si-NP-PC3 ve GTX-III-Ç-GdO@Si-NP-PC3 grafikleri incelendiğinde GdO@Si-NP' in GTX-III-Y ve GTX-III-Ç bileşiklerinin sitotoksik etkisini arttırdığı görülmektedir. GTX-III-B-GdO@Si-NP-PC3 grafiği incelendiğinde GdO@Si-NP' in GTX-III-B bileşiğinin PC3 hücrelerine sitotoksik etkisini düşürdüğü görülmüştür.



Şekil 4.23 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin PC3 hücreleri ile yapılan sitotoksosite çalışmalarının sonuç grafikleri.

Çizelge 4.7 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP, GTX-III-Y, GTX-III-Ç ve GTX-III-B bileşiklerinin MCF-7 ve PC3 hücreleri için IC50 oranları

Hücre Hattı	GdO-NP (µg/mL)	GdO@Si-NP (µg/mL)	GTX-III-Y-GdO@Si-NP (µg/mL)	GTX-III-Ç-GdO@Si-NP (µg/mL)
MCF7	39,53	90,64	66,28	0
PC3	40,53	56,93	0,81	3,63
Hücre Hattı	GTX-III-B-GdO@Si-NP (µg/mL)	GTX-III-Y (µg/mL)	GTX-III-Ç (µg/mL)	GTX-III-B (µg/mL)
MCF7	74,02	0,38	26,85	19,19
PC3	78,17	30,3	9,354	3,41

Çizelge 4.7 incelendiğinde MCF7 hücre hattında GdO-NP' in silikalanmasının IC50 değerlerinin artmasına neden olduğu görülmüştür. GdO@Si-NP' in GTX-III-Y ve GTX-II-B bileşiklerinin IC50 değerlerinin artmasına neden olduğu gözlenmiştir. GTX-III-Ç bileşiğinde ise GdO@Si-NP' in etkisi ile IC50 değerlerinin düştüğü görülmelidir. PC3 hücre hattında ise GdO-NP' in silikalanmasının IC50 değerlerinde MCF7 hücrelerine oranla daha az artmasına neden olduğu görülmüştür. Buna göre GdO@Si-NP PC3 hücrelerine MCF7 hücrelerinden daha fazla sitotoksik etki göstermektedir. GdO@Si-NP' in GTX-III-Y ve GTX-III-Ç bileşiklerinin IC50 değerlerinde anlamlı azalmaya neden olduğu görülmüştür. GTX-III-B bileşiğinin GdO@Si-NP' in bağlanması sonucu PC3 hücrelerine sitotoksik etkisinin azaldığı görülmektedir.

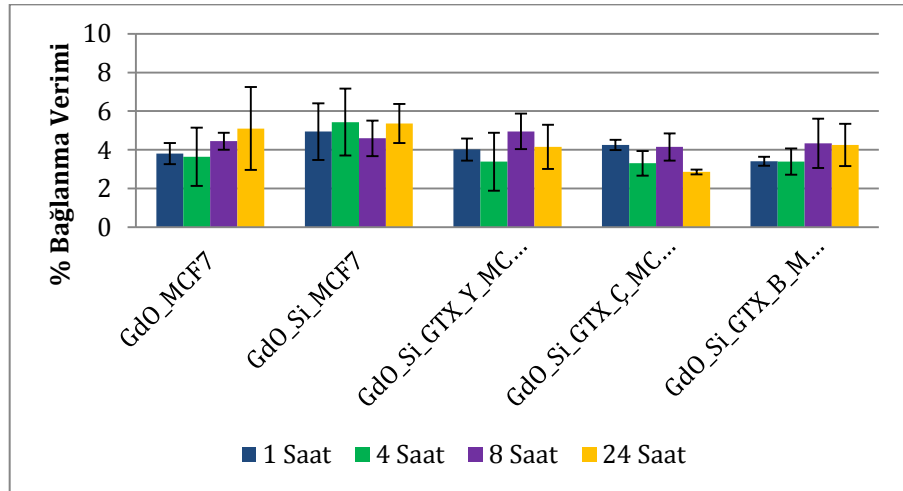
Sonuç olarak, 0,25- 25 µg/mL konsantrasyon aralığında, GTX-III bileşiklerinin MCF7 hücrelerine toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Gd NP' in GTX-III bileşiklerinin MCF7 hücrelerine toksik etkisini düşürdüğü belirlenmiştir. GTX-III bileşiklerinin PC3 hücrelerine toksik etkisinin olduğu gösterilmiştir. Bu etkinin Gd-NP' in GTX bileşikleri ile konjugasyonu ile arttığı belirlenmiştir.

#### **4.6.2 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi**

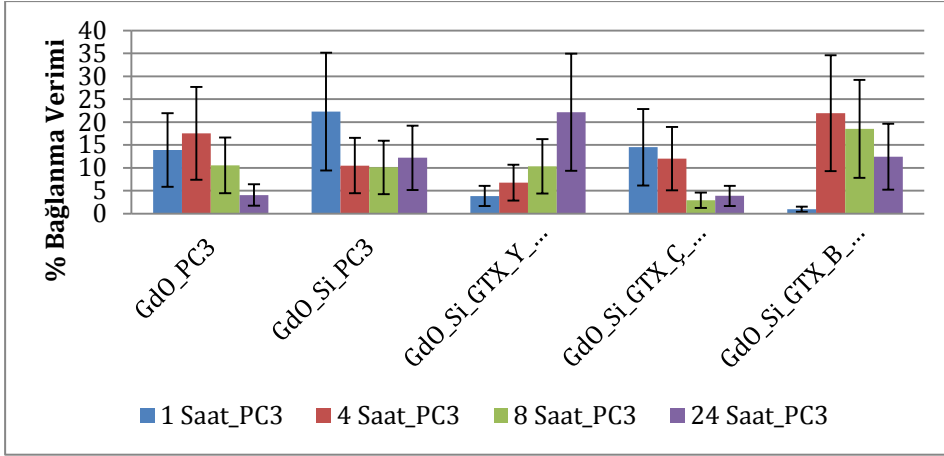
GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi çalışmaları sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.24 ve Şekil 4.25' te verilmiştir. Yapılan çalışmada tüm numuneler için 10 µg/mL konsantrasyonda

madde kullanılmıştır. Şekil 4.24 ve Şekil 4.25 incelendiğinde GdO-NP' in PC3 hücrelerine bağlanma oranının MCF7 hücrelerine oranla daha yüksek olduğu görülmektedir. GdO@Si-NP' in MCF7 hücrelerine bağlanma oranında zamanla anlamlı bir değişim görülmemiştir. PC3 hücrelerinde ise GdO@Si-NP' in bağlanma oranı birinci saat için % 20' nin üzerinde olduğu gösterilmiş. 4., 8., ve 24. saatlerde bağlanma oranında anlamlı bir azalma gözlenmiştir. GTX-III-Y-GdO-Si-NP' in PC3 hücrelerine bağlanma oranı zamanla artarak 24. saatte % 20' nin üzerine ulaşmıştır. MCF7 hücrelerinde ise bağlanma oranı düşük ve zamanla herhangi bir değişim gözlenmemiştir. GTX-III-Ç-GdO-Si-NP' in PC3 hücrelerine bağlanma oranı 1. saatte % 10 değerine ulaşmış zamanla bu değer azalarak bağlanma yüzdesi düşmüştür. MCF7 hücrelerinde ise düşük değerlerde bağlanma gerçekleşmiş ve zamanla anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. GTX-III-B-GdO-Si-NP PC3 hücrelerine 4. saatte % 20' nin üzerinde bağlanma göstermiş 8. ve 24. saatlerde bağlanma yüzdesinin azaldığı gözlenmiştir. MCF7 hücrelerinde ise bağlanma yüzdesi düşük ve zamanla bağlanma yüzdesinde anlamlı bir değişim gözlenmemiştir.

Yapılan çalışma sonucunda GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin PC3 ve MCF7 hücrelerine bağlanma verimlerine bakıldığında tüm bileşiklerin PC3 hücrelerindeki tutulumunun MCF7 hücrelerine göre pozitif yönde daha fazla olduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.24 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP örneklerinin MCF7 hücrelerinde zamanla bağlanma verimi değişim grafiği.

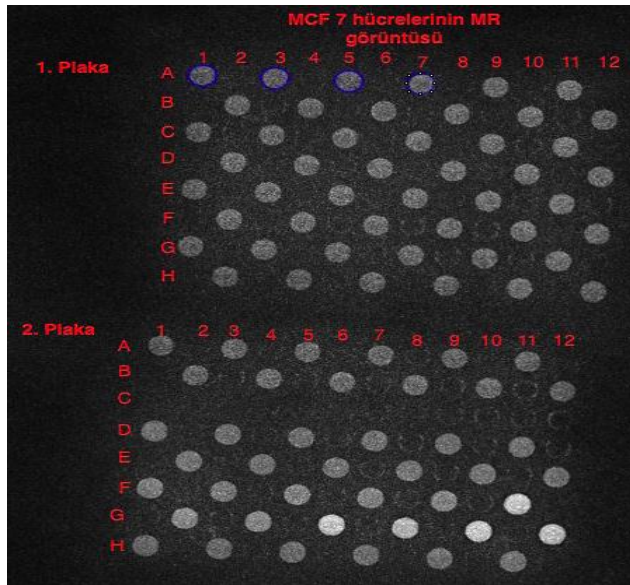


Şekil 4.25 GdO-NP, GdO@Si-NP, GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP, GTX-III-B-GdO@Si-NP örneklerinin PC3 hücrelerinde zamanla bağlanma verimi değişim grafiği.

## 4.7 GdO@Si-NP MR Görüntüleme Çalışmalarının Sonuçlarının İncelenmesi

### 4.7.1 GdO@Si-NP MCF 7 hücrelerine muamelesinin MR görüntüleme çalışmalarının görüntülerinin incelenmesi

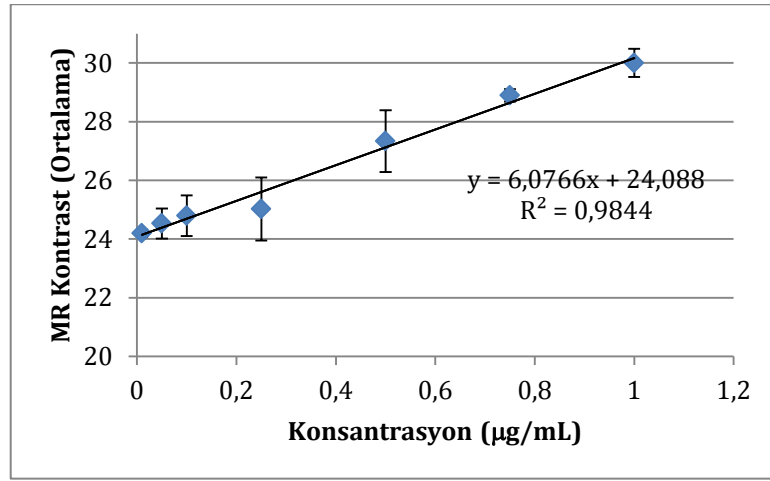
MCF7 hücrelerine GdO-NP ( $Gd_2(OH)_5NO_3$ ), GdO@Si-NP ( $Gd_2(OH)_5NO_3-SiO_2$ ), GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin muamelesi sonrasında 1., 4., 8., ve 24., saatlerde hücre üzerlerinden içerisinde örnek bulunan besiyerleri çekilerek yapılan MR görüntüleme çalışmaları Şekil 4.26' da verilmiştir.



Şekil 4.26 GdO@Si-NP ile muamele edilmiş MCF7 hücrelerinin MR çekim görüntüsü

MR görüntüleme çalışması sonucunda elde edilen görüntülerin Image J yazılımı ile belirlenen kontrast değerleri her bir kuyucuk içindeki hücrelerde bulunan protein miktarları ile oranlanarak MCF7 hücrelerine bağlanma verim hesabı Bkz. Şekil 4.24' te gösterilen grafikte verilmiştir.

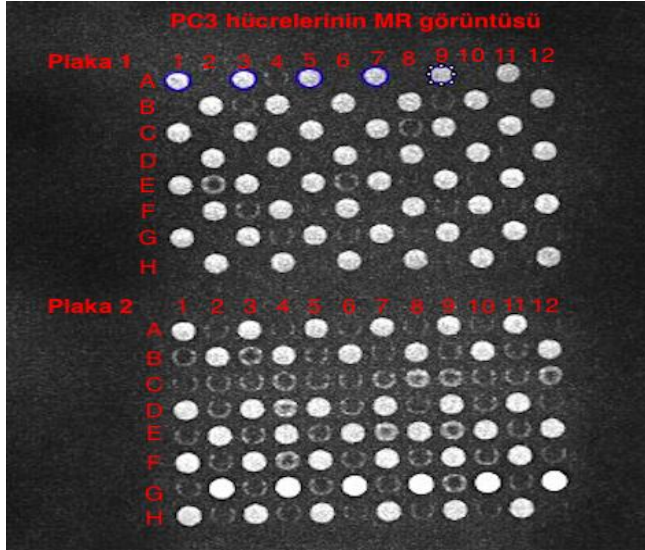
MR çalışmasında, MCF7 hücrelerine Şekil 4.26' da 2.plakada D,E,F ve G sıralarındaki kuyucuklara GdO@Si-NP uygulanarak alınan görüntüler ile 7 farklı konsantrasyon için paralel olarak 3' er tekrarlı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.27' deki gösterilmektedir. Kalibrasyon grafiği için  $R^2$  değeri 0,98443 bulunmuştur. Elde edilen  $R^2$  değerinin 0,9 değerinden büyük olması MCF7 hücreleri için elde edilen kontrast değerlerinin bağlanma verimi hesabında kullanılmasının güvenilir sonuçlar verebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.27 MCF7 hücrelerine uygulanan GdO@Si-NP'nin MR Kontrast – Konsantrasyon grafiği.

#### 4.7.2 GdO@Si-NP PC3 hücrelerine muamelesinin MR görüntülerinin incelenmesi

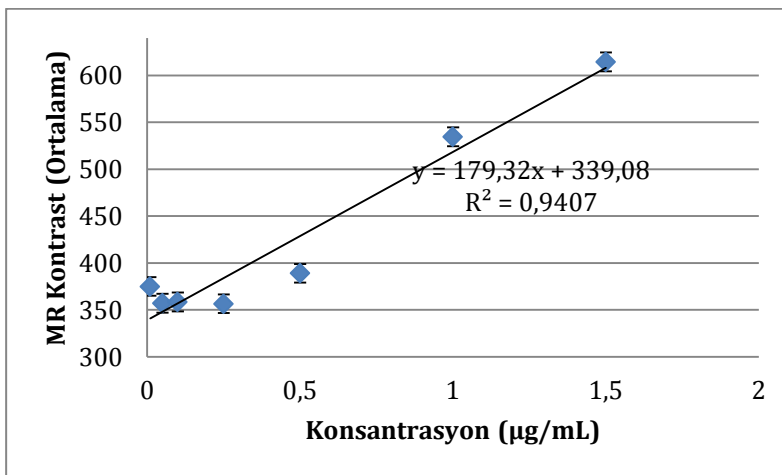
PC3 hücrelerine GdO-NP ( $Gd_2(OH)_5NO_3$ ), GdO@Si-NP ( $Gd_2(OH)_5NO_3-SiO_2$ ), GTX-III-Y-GdO@Si-NP, GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin muamelesi sonrasında 1., 4., 8., ve 24. saatlerde hücre üzerlerinden besiyerleri çekilerek yapılan MR görüntüleri Şekil 4.28'de verilmiştir.



Şekil 4.28 GdO@Si-NP ile muamele edilmiş PC3 hücrelerinin MR çekim görüntüsü.

MR görüntüleme çalışması sonucunda elde edilen görüntülerin Image J yazılımı ile belirlenen kontrast değerleri hücrelerde bulunan protein miktarları ile oranlanarak PC3 hücrelerine bağlanma verim hesabı Bkz. Şekil 4.25' te gösterilen grafikte verilmiştir.

MR çalışmasında, PC3 hücrelerine Şekil 4.28' da 2.plakada D,E,F ve G sıralarındaki kuyucuklara GdO@Si-NP uygulanarak alınan görüntüler ile 7 farklı konsantrasyon için paralel olarak 3'er tekrarlı kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Elde edilen grafik Şekil 4.29' deki gösterilmektedir. Kalibrasyon grafiği için  $R^2$  değeri 0,94072 bulunmuştur. Elde edilen  $R^2$  değerinin 0,9 değerinden büyük olması hesaplanan kontrast değerlerinin bağlanma verimi hesabında kullanılmasının güvenilir sonuçlar verebileceğini göstermektedir.



Şekil 4.29 PC3 hücrelerine uygulanan GdO@Si-NP'in MR Kontrast – Konsantrasyon grafiği.

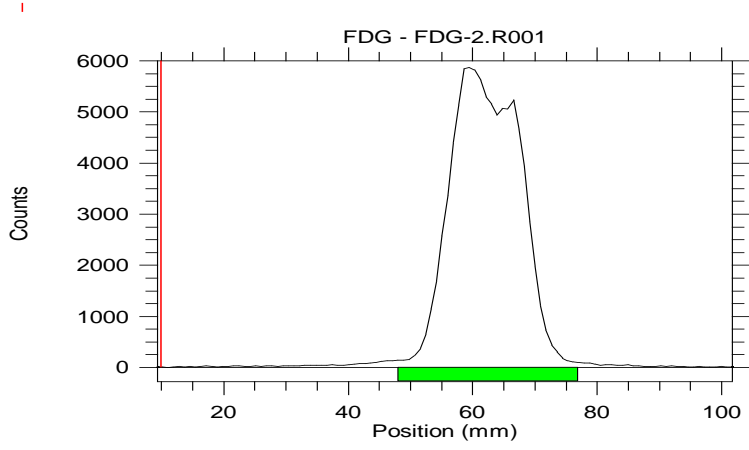
## 4.8 18F-FDG Radyoışaretleme Çalışmalarının TLRC ve HPLRC Analizi Sonuçları

### 4.8.1 18F-FDG radyoışaretleme çalışmalarının TLRC analizi sonuçları

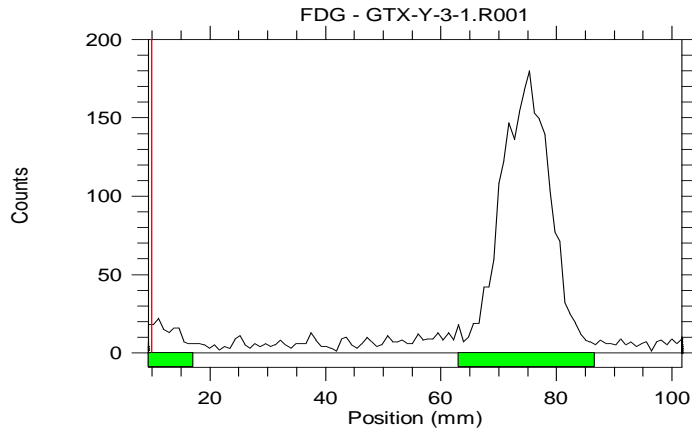
TLRC yöntemi ile yapılan analizlerin sonuçları Şekil 4.30, 4.31, 4.32 ve 4.33' de verilmektedir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde (Çizelge 4.8) 18F-FDG bileşiğinin Rf değeri 0.56 bulunmuştur. Radyoışaretleme işlemi sonrası 18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP, 18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve 18F-FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP'ına ait Rf değerleri sırası ile 0.72 , 0.68 ve 0.61 olarak belirlenmiştir. Rf değerlerinde görülen değişiklik GTX-III bağlı bileşiklerin 18F-FDG bileşiğine başarı ile bağlandığını göstermektedir. Şekil 4.31, 4.32 ve 4.33 de sırası ile Rf değerleri 0.02, 0.04 ve 0.04 olarak dedekte edilen pikler 18F-FDG bileşiğinin zamanla kararlılığının azalması sonucu serbest kalan <sup>18</sup>F radyoizotopudur (BPC, 2000, Yu'den, 2006).

Çizelge 4.8 18F-FDG, 18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP, 18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP ve 18F-FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiklerinin TLRC analizi verileri

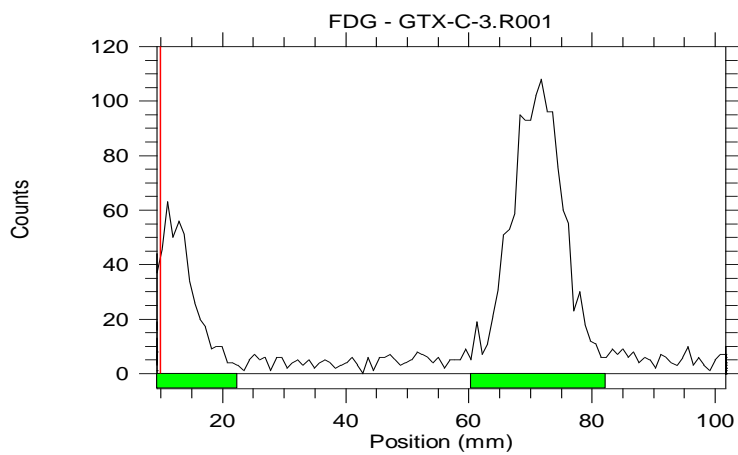
Örnek	Bileşik	Rf Değeri	Verim
Saf 18F-FDG	18F-FDG	0,56	100
18F-FDG ile GTX-III-Y-GdO@Si-NP konjugasyonu	<sup>18</sup> F	0,02	6
	18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP	0,72	94
18F-FDG ile GTX-III-Ç-GdO@Si-NP konjugasyonu	<sup>18</sup> F	0,04	26
	18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP	0,68	74
18F-FDG ile GTX-III-B-GdO@Si-NP konjugasyonu	<sup>18</sup> F	0,04	26
	18F-FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP	0,61	74



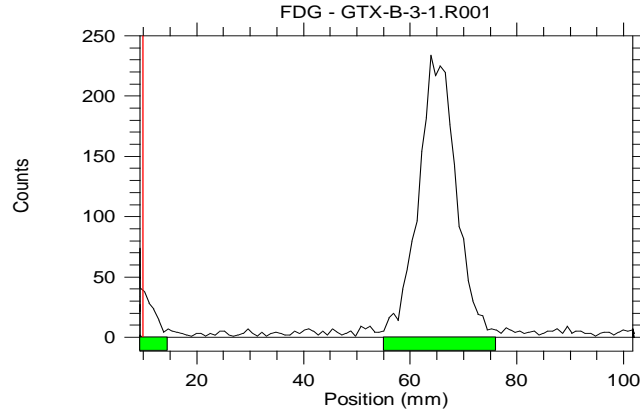
Şekil 4.30 18F-FDG bileşiğinin TLRC kromatogramı



Şekil 4.31 18F-FDG- GTX-III-Y-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı



Şekil 4.32 18F-FDG- GTX-III-Ç-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı



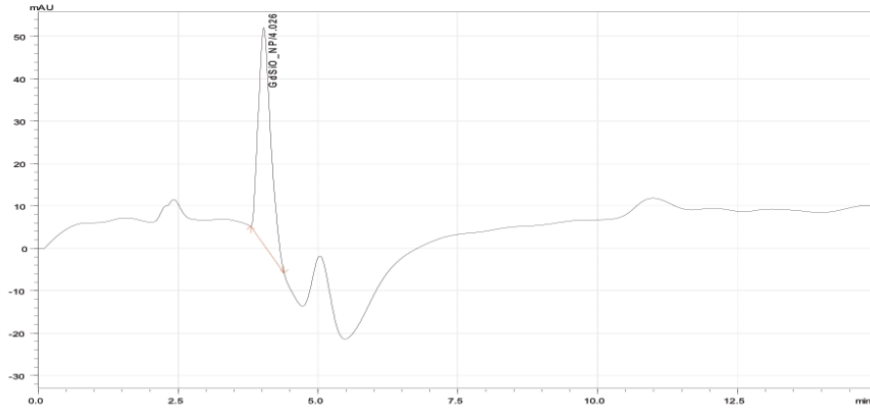
Şekil 4.33  $^{18}\text{F}$ -FDG- GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiğinin TLRC kromatogramı

#### 4.8.2 $^{18}\text{F}$ -FDG radyoışaretleme çalışmalarının HPLRC analizi sonuçları

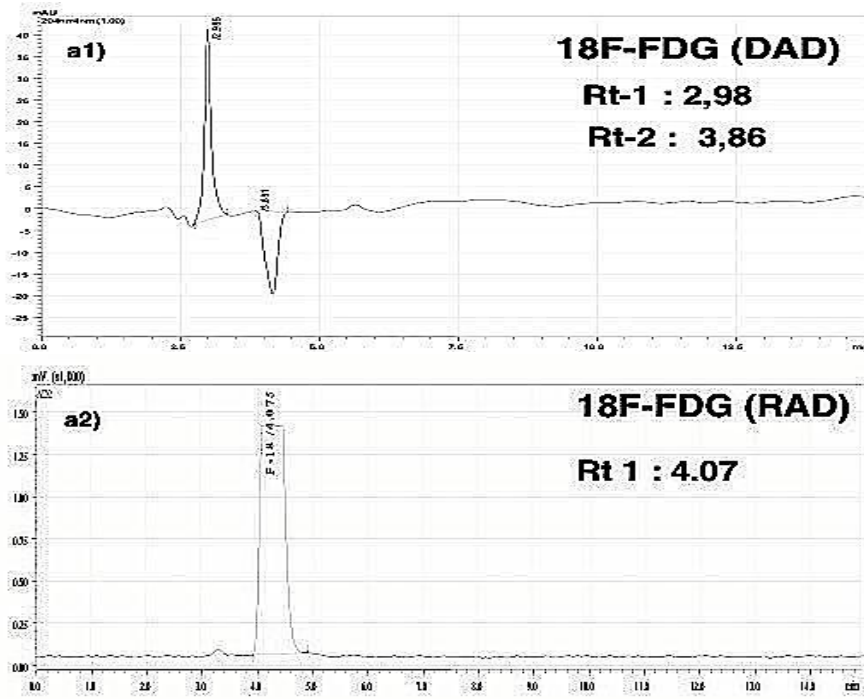
HPLRC yöntemi ile yapılan analizlerin sonuçları Şekil 4.34, 4.35, 4.36 ve 4.37’ de verilmektedir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde bileşikler için Çizelge 4.9’ da verilen Rt (Alıkonma zamanı) değerleri tablosunda elde edilmiştir. Sentezlenen  $^{18}\text{F}$ -FDG-GTX-III-GdO@Si-NP ile  $^{18}\text{F}$ -FDG ve GdO@Si-NP’ ın tutunma zamanlarında oluşan zaman farkı konjugasyonun gerçekleştirildiğini göstermektedir.  $^{18}\text{F}$  radyoizotopunun yarılanma ömrü kısa olduğu için sentez çalışmalarının uzun sürmesi nedeni ile Radyoaktivite Dedektörü (RAD) ile  $^{18}\text{F}$ -FDG-GTX-III-GdO@Si-NP için  $^{18}\text{F}$  piki dedekte edilememiştir.

Çizelge 4.9  $^{18}\text{F}$ -FDG ile GdO@Si-NP’ ın işaretleme çalışması Rt değerleri

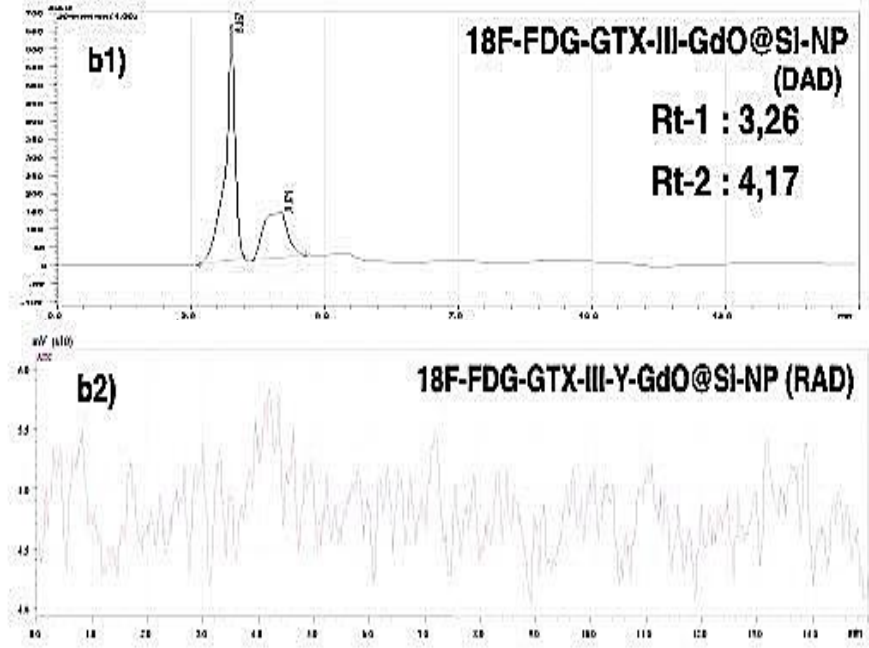
<i><b><math>^{18}\text{F}</math>-FDG Radyoışaretleme - HPLC</b></i>	<i><b>DAD</b></i>	<i><b>RAD</b></i>
	<i><b>RT(2) min</b></i>	<i><b>RT(1) min</b></i>
<i><b>GdO@Si-NP</b></i>	4,02	-
<i><b><math>^{18}\text{F}</math>-FDG</b></i>	3,84	4,10
<i><b><math>^{18}\text{F}</math>-FDG-GTX-III-GdO@Si-NP (ortalama)</b></i>	4,10	-



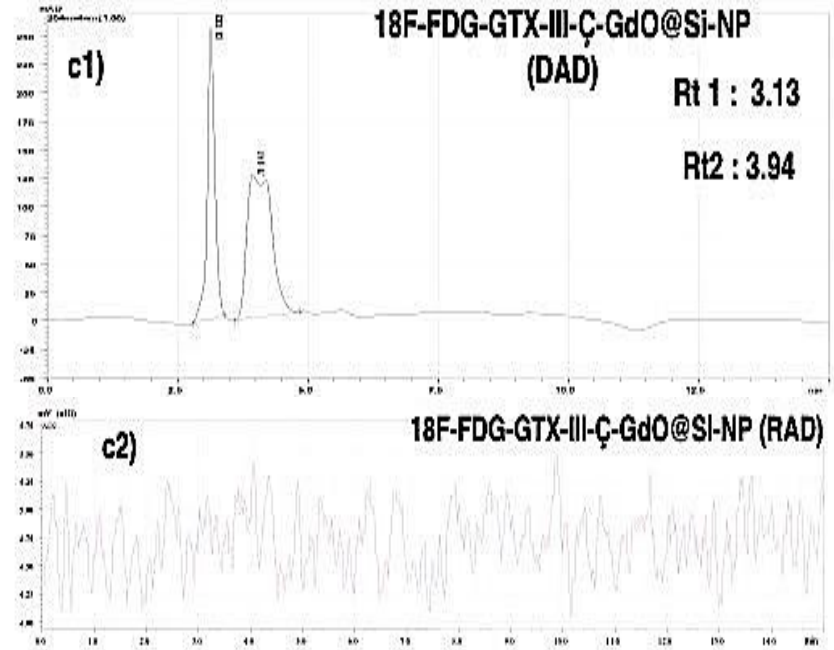
Şekil 4.34 GdO@Si-NP' na ait HPLC kromatogramı.



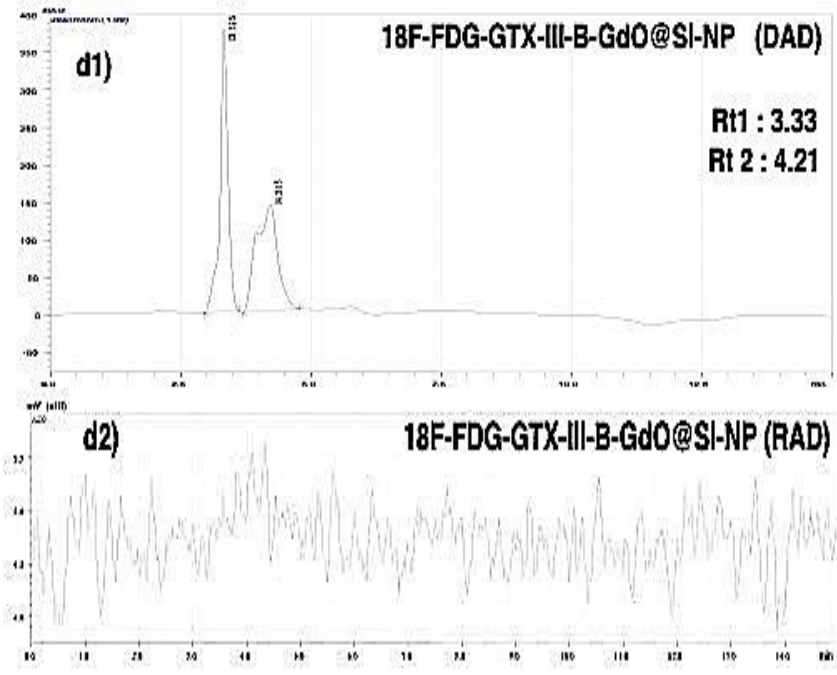
Şekil 4.35 18F-FDG bileşiğinin HPLC analiz sonucu a) (a1) DAD dedektör analizi b) (a2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu



Şekil 4.36 18F-FDG-GTX-III-Y-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (b1) DAD dedektör analizi b) (b2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu



Şekil 4.37 18F-FDG-GTX-III-Ç-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (c1) DAD dedektör analizi b) (c2) Radyoaktivite dedektörü analizi sonucu



Şekil 4.38 18F-FDG-GTX-III-B-GdO@Si-NP bileşiğinin HPLRC analiz sonucu a) (d1) DAD dedektör analizi b) (d2) Radyoaktivite dedektörü analiz sonucu

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, ilk defa GTX-III bileşikleri ile konjuge GdO nanoparçacıklar sentezlenmiş FDG ile inaktif ve aktif olarak konjuge edilmiş prostat ve meme kanser hücreleri üzerinde *in vitro* etkinlikleri incelenmiş, gadolinyum kontrastından yararlanılarak MRI görüntüleri alınmıştır. Daha önce trityum ( $^3\text{H}$ ) ile GTX-I bileşiği işaretlenmiştir fakat bu çalışmada GTX-III bileşiği  $^{18}\text{F}$ -FDG bileşiği ile işaretlenmiştir (Iwasa et al., 1994).

GTX III bileşiği *Rhododendron ponticum L.* bitkisinin yaprak ve çiçeklerinden ve deli balından izole edilmiştir ayrıca LC-MS ve NMR ile yapı tayini yapılmıştır.

GdO@Si-NP'larının sentezi çöktürme yöntemi ile gerçekleştirilip. SEM cihazı ile görüntüsü alınmıştır. Elde edilen SEM görüntüleri ve parçacık karakterizasyonu referans çalışma ile karşılaştırıldığında sonuçların paralel olduğu gözlenmiştir.

GdO@Si-NP'larının %100 verim ile GTX bileşiklerine bağlandığı HPLC analizi ile belirlenmiştir. Uygulanan CDI/NHS metodunun silikalı nanoparçacıklar ile polihidroksiller içeren bileşiklerin konjugasyonunda başarılı sonuç verdiği gösterilmiştir. HPLC çalışmalarında GdO@Si-NP'ların PDA ve RID dedektörlerin her ikisinde dedekte edilebildiği görülmüştür.

Sitotoksosite çalışmalarında, 0,25 – 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyon aralığında GdO-NP, GdO@Si-NP, GdO@Si-GTX-III-Y ve GdO@Si-GTX-III-Ç bileşiklerinin MCF7 hücrelerinde toksik özellik göstermediği sadece GdO@Si-GTX-B bileşiğinin toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Buna rağmen, GTX bileşikleri MCF7 hücrelerine aynı konsantrasyon aralığında toksik özellik gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen bu veriler GdO@Si-NP'ların GTX-III-Y ve GTX-III-Ç bileşiklerinin MCF7 hücrelerine olan toksik özelliğini azaltırken GTX-B bileşiğinde etkilemediğini göstermiştir. GdO@Si-NP'lerin GTX-III-Y ve GTX-III-Ç ile konjugasyonunun PC3 hücrelerine toksik özelliği arttırdığı fakat GTX-B konjugasyonu ile toksisitenin azaldığı gösterilmiştir.

GdO@Si-GTX-NP'ların MCF7 ve PC3 hücrelerine bağlanma etkisi MR görüntüleme yöntemi ile kontrast değerlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

Elde edilen verilerde sentezlenen nanoparçacıkların PC3 hücrelerine tutulumu MCF7 hücrelerine tutulumuna göre oldukça yüksek olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar  $^{18}\text{F}$ -FDG-GTX-III-GdO@Si-NP'nin prostat ve meme kanserlerinin PET/MR görüntülenmesinde kullanılabilirliğinin meme ve prostat kanser tedavisinde umut verici olduğunu göstermektedir.

Ayrıca bulgular bu nanaoparçacıkların teranostik potansiyeli olduğunu da göstermektedir. İleride yapılacak *in vivo* düzeyde daha ileri çalışmalardan elde dılecek bulgular konu ile ilgili daha aydınlatıcı sonuçlar elde etmemize faydalı olabilecektir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- American Society of Clinical Oncology (ASCO)**, Prostate Cancer – Overview, <http://www.cancer.net/cancer-types/prostate-cancer/overview> (Erişim tarihi: 2 Aralık 2015).
- Anroop, N., Devanshu, S., Rahul, M., Annu, G., and Kishan, S.**, 2010, Quantitative Bioanalysis by LC-MS/MS: A Review, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 7(01), 1-9pp.
- Bak, I.**, 2011, Modern Analytical Techniques in the Pharmaceutical and Bioanalysis, University of Debrecen Medical and Health Science Center Faculty of Pharmacy Department of Pharmacology Pharmaceutical- and bioanalytical division, Budapest, 55-60pp.
- Behrouzkia, Z., Agdam, R.Z., Alam, N.R., and Refahi, S.**, 2015, In vitro cytotoxicity of Gd<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with diethylene glycol polymer in human melanoma cell line, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 6(1), 906-912pp.
- Bramer, S.E.V.**, 1998, An Introduction to Mass Spectrometry, Department of Chemistry of Widener University, Chester, 4-23pp.
- British Pharmacopoeia Commission (BPC)**, 2000, Monographs: Radiopharmaceutical preparation, Fludeoxyglucose [18F] injection. British Pharmacopoeia 2000. London: British, Pharmacopoeia Commission.
- Byun, K.S., Lee, Y.W., Jin, H.J., Lee, M.K., Lee, H.Y., Lee, K.J., Heo, M.Y., Yu, C.Y. and Lee, J.H.**, 2005, Genotoxicity and cytotoxicity in human cancer and normal cell lines of the extracts of *Rhododendron brachycarpum* D Don leaves, *Korean Journal of Medicinal Crop Science*, 13(4), 199–205pp.
- Caravan, P., Ellison, J.J., McMurry, T.J., and Lauffer, R.B.**, 1999, Gadolinium (III) chelates as MRI contrast agents: structure, dynamics and applications, *Chem. Review*, 99, 2293-2352pp.
- Chen, C., Xing, G., Wang, J., Zhao, Y., Li, B., Tang, J., Jia, G., Wang, T., Sun, J., Xing, L., Yuan, H., Gao, Y., Meng, H., Chen, Z., Zhao, F., Chai, Z., and Fang, X.**, 2005, Multihydroxylated [Gd@C<sub>82</sub>(OH)<sub>22</sub>]<sub>n</sub> nanoparticles: Antineoplastic of high efficiency and low toxicity, *American Chemical Society*, 5(10), 2050-2057pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cucer, N., and Eroz, R.,** 2010, Investigation of Mutagenic Effects Of Grayanotoxin II and III On Cultered Human Lymphocytes, *An US National Library of Medicine Enlisted Journal*, 3(4), 293-299pp.
- Delbeke, D. and Martin, W.H.,** 2004, Metabolic imaging with FDG: a primer, *The Cancer Journal*, 10(4), 201–213pp.
- Dong, H., Du, S.R., Zheng, X.Y., Lyu, G.M., Sun, , L.D., Li, L.D., Zang, P.Z., Zhang, C., and Yan, C.H.,** 2015, Lanthanide nanoparticles: From design toward bioimaging and therapy, *American Chemical Socieity*, 115(19), 10732–10738pp.
- Drbohlavova, J., Hrdy, R., Adam, V., Schneeweiss, O., and Hubalek, J.,** 2009, Preparation and properties of various magnetic nanoparticles, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 9, 2355p.
- Eijkelkamp, N., Linley, J.E., Baker, M.D., Minett, M.S., Cregg, R., Werdehausen R., Rugiero, F. and Wood, J.N.,** 2012, Neurological perspectives on voltage-gated sodium channels, *Brain*, 135, 2585–2612pp.
- Erdem, G., Işık, B., Karakaş, H.M. ve Fırat, A.K.,** 2008, Subareoler meme absesi: ileri manyetik rezonans görüntüleme bulguları, *Meme Sağlığı dergisi*, 4(3), 174-176ss.
- Erturk, O., P. Karakaş F., Pehlivan D. and Nas N.,** 2009, The Antibacterial and Antifungal Effects of Rhododendron Derived Mad Honey and Extracts of Four Rhododendron Species, *Turkish Journal of Biology*, 33, 151-158pp.
- Fass, L.,** 2008, Imaging and Cancer: A Review, *Molecular Oncology*, 2(2), 115-152pp.
- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D.M.,** 2010, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2893-2917pp.
- Fu, Y., Zhang, L., and Chen, G.,** 2012, Far infrared-assisted extraction followed by MEKC for the simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Rhododendron mucronulatum* Turcz, *Journal of Separation Science*, 35(3), 468–475pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Fukumoto, K., Tetsumi, T., Nishikawa, Y., Katakawa, J., Meguri, H., Katai, M., and Kawaraya, T.,** 1993, Acute toxicity of grayanotoxin III on total protein and electrophoresis fraction in rat serum, *J. Urb. Liv. Health Assoc.*, 37, 73p.
- Füchtner, F., Steinbach, J., Mäding, P. and Johannsen, B.,** 1996, Basic previous term hydrolysis next term 2-[18F]fluoro-1,3,4,6-tetra-O-acetyl-image-glucose in the preparation of 2-[18F]fluoro-2-deoxy-Image-glucose, *Applied Radiation and Isotopes*. 47, 61–66pp.
- Gallagher, B.M., Ansari, A. and Atkins H.,** 1977, Radiopharmaceuticals.27. F-18-labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose-metabolism invivo—tissue distribution and imaging studies in animals, *J Nucl Med*, 18(10), 990–996pp.
- Glunde, K., Pathak, A.P. and Bhujwalla, Z.M.,** 2007, Molecular-functional imaging of cancer: to image and imagine, *Trends in Molecular Medicine*, 13(7), 287-294pp.
- Gubin, P.S.,** 2009, Magnetic nanoparticles, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Strauss GmbH, Mörlenbach 1-20pp.
- Gunduz, A., Bostan, H., Turedi, S., Nuhoglu, I. and Patan, T.,** 2007, Wild flowers and mad honey, *Wilderness Environ Med*. 18(1), 69-71pp.
- Harvey, D.,** 2000, Modern Analytical Chemistry, Quebecor Printing Book Group, The USA, 578-589pp.
- Hamacher, K., Coenen, H.H. and Stöcklin, G.,** 1986, Efficient stereospecific synthesis of no-carrier-added 2-[18F]-fluoro-2-deoxy-d-glucose using aminopolyether supported nucleophilic substitution, *Journal of Nuclear Medicine* 27(2): 235–238pp.
- Hasbek, Z., Şalk, İ., Yücel, B., ve Babacan, N.A.,** 2013, Kemik metastazları tespitinde hangi görüntüleme yöntemini seçelim? Kemik sintigrafisi, BT, 18F-FDG PET/BT veya MR?, *Bozok Tıp Dergisi*, 3(3), 44-50ss.
- Jans, H., Liu, X., Austin, L., Maes, G., and Huo, Q.,** 2009, Dynamic light scattering as a powerful tool for gold nanoparticle bioconjugation and biomolecular binding studies, *Analatical Chemistry*, 81, 9425p.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hoffman, E. and Stroobant, V.**, 2007, Mass Spectrometry Principles and Applications, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 86p.
- Ido, T., Wan, C.N. and Casella, V.**, 1978, Labeled 2-deoxy-d-glucose analogs- F-18-labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-d-mannose and C-14-2-deoxy-2-fluoro-d-glucose. *J Label Compd Radiopharm*, 14(2), 175–183pp.
- Ido, T., Wan, C.N., Fowler, J.S., Wolf, A.P.**, 1977, Fluorination with F<sup>2</sup>— convenient synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose, *Journal of Organic Chemistry*. 42(13), 2341–2342pp.
- Iwasa J., Yamamoto, S., Kamano, H., Nakajima, S., Baba, N., Yakehiro, M. and Seyama, I.**, 1994, Synthesis of Photoaffinity and Tritium-labeled Grayanotoxin via reductive Amination, *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 58(5), 972p.
- İnovatif Kimya Dergisi**, “HPLC ve İlaç Sanayinde Uygulamaları”, <http://www.inovatifkimyadergisi.com/hplc-ve-ilac-sanayinde-uygulamalari> (Erişim tarihi : 19 Aralık 2015)
- Jang, G.K., Choi, S.U., and Lee, K.R.**, 2005, Cytotoxic Constituents of *Rhododendron brachycarpum*, *The Pharmaceutical Society of Korea*, 49(3), 244p.
- Jordan, J.**, 2006, Research highlights from the literature, *Clinical Autonomic Research*, 16, 198-201pp.
- Kaczorowski, G.J., McManus, O.B., Priest, B.T. and Garcia, M.L.**, 2008, Ion channels as drug targets: The next GPCRs. *J. Gen. Physiol.* 131, 399–405pp.
- Kaushal, R., Kaur, N., Upadhyay, A., Suri, O.P. and Thakkar, A.**, 2011, High Performance Liquid Chromatography Detectors: A review. *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (5), 1–7pp.
- Kazakevich, Y., Lobrutto, R.**, 2007, HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, New Jersey, 8-10p, 654pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim, S.E., Shin, M.C., Akaike, N., and Kim, C.J.**, 2010, Presynaptic effects of grayanotoxin III on excitatory and inhibitory nerve terminals in rat ventromedial hypothalamic neurons, *Neuro Toxicology*, 31, 230-231pp.
- Korkusuz, H., Ulbrich, K., Welzel, K., Koeberle, V., Watcharin, W., Bahr, U., Chernikov, V., Knobloch, T., Petersen, S., Huebner, F., Ackermann, H., Gelperina, S., Kromen, W., Hammerstingl, R., Hauptenthal, J., Gruenwald, F., Fiehler, J., Zeuzem, S., Kreuter, J., Vogl, T.J. and Piiper, A.**, 2013, Transferrin-coated gadolinium nanoparticles as MRI contrast agent, *Molecular Imaging and Biology*, 15, 148-154pp.
- Kobayashi, H., and Brechbiel, M.**, 2003, Dendrimer-based macromolecular MRI contrast agents: characteristic and application. *Mol. Imaging*, 2, 1-10pp.
- Kobayashi, H., and Brechbiel, M.**, 2005, Nano-sized MRI contrast agents with dendrimer cores. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 57, 2271-2286pp.
- Kurtoglu, A.B., Yavuz, R., and Evrendilek, G.A.**, 2014, Characterisation and fate of grayanotoxins in mad honey produced from *Rhododendron ponticum* nectar, *Food Chemistry*, 161, 47-52pp.
- Küçük, T., Kolaylı, S., Karaoglu S., Ulusoy, E., Baltacı, C. and Candan, F.**, 2007, Biological activities and chemical composition of three honeys of different types from Anatolia, *Food Chem.*, 100, 526-534pp.
- Lee, S.H., Kim, B.H., Na, H.B., and Hyeon, T.**, 2014, Paramagnetic inorganic nanoparticles as T1 MRI contrast agents. *Angew. Chem. Int. Ed.* 120, 2846-2849pp.
- Li, C.L., Wu, H.Z., Huang, Y.P., Yang, Y.F., Liu, Y.W. and Liu, J.W.**, 2008, 6-O Angeloylenolin induces apoptosis through a mitochondrial/caspase and NF- $\kappa$ B pathway in human leukemia HL60 cells, *Biomed. Pharmacother.*, 62, 401-409pp.
- Li, Y., and Barron**, 2014, “Dynamic light scattering” <http://cnx.org/contents/P8mNrZNN@1/Dynamic-Light-Scattering> (Erişim tarihi: 17 Aralık 2015)

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Lim, J.K., Yeap, S.P., Che, H.X., and Low, S.C.**, 2013, Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering,. *Nanoscale Research Letters*, 8(381), 2p.
- Liu, Z., Kiessling, F. and Gatzjens, J.**, 2009a, Advanced Nanomaterials in Multimodal Imaging: Design, Functionalization, and Biomedical Applications, *Journal of Nanomaterials*, 2010, 6p.
- Liu, Y., Jialo, F., Qui, Y., Li, W., Lao, F., Zhou, G., Sun, B., Xing, G., Dong, J., Zhao, Y.**, 2009b, The effect of Gd@C82(OH)22 nanoparticles on the release of Th1/Th2 cytokines and induction of TNF- $\alpha$  mediated cellular immunity, *Biomaterials*, 30(23), 3934-3945pp.
- Luo, K., Liu, G., She, W., Wang, Q., Wang, G., He, B.**, 2011, Gadolinium-labeled peptide dendrimers with controlled structures as potential magnetic resonance imaging contrast agents. *Biomaterials*, 32, 7951-7960pp.
- Meguri, H., Katakawa, J., Tetsumi, T., Uchida, S., Sumi, M., Katai, M, Terai T. and Fukumato, K.**, 1993, Simple and Rapid Determination of Grayanotoxins by High-Performance Liquid Chromatography, *Shoyakugaku Zasshi*, 47(4), 429p.
- Meng, J., Xing, J., Wang, Y., Lu, J., Zhao, Y., Gao, X., Wang, P.C., Jia, L., and Liang, X.**, 2011, Epigenetic modulation of human breast cancer by metallofullerenol nanoparticles: *in vivo* treatment and *in vitro* analysis, *Nanoscale*, 3, 4713-4719pp.
- Moghimi, S.M., Hunter, A.C., Murray, J.C.**, 2001, Long-circulation and target-specific nanoparticles: theory to practice, *Pharmacological Reviews*, 53(2), 283-318pp.
- Mohrig, J.R., Hammod, C.N. and Schatz, P.F.**, 2010, Techniques in Organic Chemistry, W. H. Freeman and Company, New York, 406p.
- Müller, R.H., Mader, K., and Gohla, S.**, 2000, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of drug delivery the state of art, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50, 167p.
- Nema, R. and Khare, S.**, 2012, Animal cell culture: Advances technology for modern research, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 219-226pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Nucleonica**, “Decay Schemes”  
[http://www.nucleonica.net/wiki/index.php?title=Decay\\_Schemes](http://www.nucleonica.net/wiki/index.php?title=Decay_Schemes) Erişim tarihi: 15 Aralık 2015).
- Olson, J.M. and Hallahan, A.R.**, 2004, p38 MAP kinase: a convergence point in cancer therapy, *Trends Mol. Med.*, Vol.10(3), 126-129pp.
- Oztasan, N., Altinkaynak, K., Akcay, F., Gocer, F. and Dane, S.**, 2005, Effects of mad honey on blood glucose and lipid levels in rats with streptozocin-induced diabetes, *Turk J. Vet. Anim. Sci.* 29, 1093-1096pp.
- Özden, S., Ertan, R., ve Şener, E.**, 2004, Farmasötik Kimya Pratikleri, Ankara Üniversitesi, Ankara, 17-57ss.
- Pacák, J. and Cerny, M.**, 2002, History of the first synthesis of 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose the unlabeled forerunner of 2-deoxy-2-[18F]fluoro-d-glucose, *Mol. Imaging Biol.*, 4(5), 352–354pp.
- Panyam, J., and Labhasetwar, V.**, 2003, Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue, *Advance Drug Delivery Reviews*, 55, 329–347pp.
- Popescu, R., Krupitza, G. and Kopp, B.**, 2009, Novel insight into the mechanism of action of Grayanotoxin III, 57th International Congress and Annual Meeting of the GA, 970p.
- Popescu, R., and Kopp, B.**, 2013, The Genus *Rhododendron*: An ethnopharmacological and toxicological review, *Journal of Ethnopharmacology*, 147, 42-62pp.
- Saha, G.B.**, 2010, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, Springer Science+Business Media, London, 14-145pp.
- Sakata, K., Hattori, M., Sakurai, A., Hosotsuji, T.**, 1977, Isolation and identification of biologically active constituents of *Leucothea catesbaei* A. Gray, *J. Pesticide Sci.* 2, 454-456pp.
- Schulz, W.A.**, 2005, Molecular Biology of Human Cancer, Springer Science - Business Media, Inc., ABD, 357-358pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Scott, P.M., Coldwell, B.B., and Wilberg, G.S.,** 1971, Grayanotoxins. Occurrence and analysis in honey and a comparison of toxicities in mice, *Food and Cosmetics Toxicology*, 9(2), 179–184pp.
- Sikes, R.A., Walls, A.M., Brennen, W.N., Anderson, J.D., Mukherjee, I.C., Schenck, H.A. and Brown, M.A.,** 2003, Therapeutic Approaches Targeting Prostate Cancer Progression Using Novel Voltage-Gated Ion Channel Blockers, *Clinical Prostate Cancer*, 184p.
- Silici, S., Sagdic, O. and Ekici, L.,** 2010, Total phenolic content, antiradical, antioxidant and antimicrobial activities of Rhododendron honeys, *Food Chem.*, 121, 238-234pp.
- Sivasubramanian, M., Hsia, Y., and Lo, L.W.,** 2014, Nanoparticle-facilitated functional and molecular imaging for the early dedection of cancer, *Frontiers in Molecular Biosciences*, 15, 21p.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., and Niema, T.A.,** 1998, Enstrümantal Analiz İlkeleri, (Çev. E. Kılıç ) Özkan Matbaacılık LTD. STI., Ankara, 500p.
- Slomons, G., and Fryhle, C.,** 2002, Ornanik Kimya, (Çev. E. G. Okay ve Y. Yıldırım) Mart Matbaacılık, 1258, İstanbul, 370-371pp.
- Sols, A. and Crane, R.K.,** 1954, Substrate specificity of brain hexokinase, *J. Biol. Chem.*, 210, 581–595pp.
- Stefanakis, D. and Ghanotakis, D.,** 2014, Synthesis and characterization of nanoparticles, consisting of a gadolinium paramagnetic core and a mesoporous silica shell, for controlled delivery of hydrophobic drugs, *J Nanopart Res*, 16, 2211p.
- Stephen, S.,** 2005, Biology, Tamil Nadu Textbook Corporation, Chennai, 77-80p.
- Tang, L., and Cheng, J.,** 2013, Nonporous silica nanoparticles for nanomedicine application, *Nano Today*, 8, 301p.
- Taşdemir, D., Dönmez, A.A., Calis, I. and Rüedi, P.,** 2004, Evaluation of biological activity of Turkish plants. Rapid screening for the antimicrobial, antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory potential by TLC bioautographic methods, *Pharm. Biol.*, 42, 374-383pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Terai, T., Araho, D., Osakabe, K., Katai, M., Narama, I., Matsuura, T., Katakawa, J., Tetsumi, T. and Sato, M.,** 2000, Isolation of iso-grayanotoxin II from leaves of *Leucothoe grayana* MAX. Its X-Ray crystallographic analysis and acute toxicity in mice, *Chem. Pharm. Bull.*, 48(1), 142-144pp.
- Terai, T., Osakabe, K., Katai, Sakaguchi, K., M., Narama, I., Matsuura, T., Katakawa, J. and Tetsumi, T.,** 2003, Preparation of 9-hydroxy grayanotoxin derivatives and their acute toxicity in mice, *Chem. Pharm. Bull.*, 51(3), 351-553pp.
- Thermo Fisher Scientific,** 2010, TSQ Series Hardware Manual, ABD, 16-18 p.
- Triggle, D.J.,** 2007, Calcium channel antagonists: clinical uses – past, present and future, *Biochem. Pharmacol.* 74, 1–9pp.
- Tseng, C.L., Shih, I.L., Stobinski, L., and Lin, F.H.,** 2010, Gadolinium hexanedione nanoparticles for stem cell labeling and tracking via magnetic resonance imaging, *Biomaterials*, 31, 5427-5434pp.
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı (T.C.S.B.),** 2014, Türkiye Kanser İstatistikleri, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Ankara, 40p.
- Vallabhajosula, S.,** 2011, The Evolution of PET Radiochemistry: Synthesis and Clinical Application of Radiopharmaceuticals, UNM Collage of Pharmacy, New Mexico, 9-12pp.
- Vishwanath P.B., Laxmi, V., Madhavi Yadav, M. and Ramya Lakshmi, P.,** 2011, Phytochemical screening, antimicrobial & anti proliferative properties of rhododendron ponticum on prostat epithelial cancer cells, *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, Vol.3(11), 1552-1555pp.
- Wadsak, W. and Mitterhauser, M.,** 2010, Basics and principles of radiopharmaceuticals for PET/CT, *European Journal of Radiology*, 73, 464p.
- Wikipedia,** Fluorodeoxyglucose (18F), [https://en.wikipedia.org/wiki/Fludeoxyglucose\\_\(18F\)](https://en.wikipedia.org/wiki/Fludeoxyglucose_(18F)) (Erişim tarihi: 2 Aralık 2015).

**KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)**

- Wang, L., Meng, J., Cao, W., Li, Q., Qiu, Y., Sun, B., and Li, L.M.,** 2014, Induction of apoptosis through ER stress and TP53 in MCF-7 cells by the nanoparticle  $[\text{Gd}@\text{C}_{82}(\text{OH})_{22}]_n$  : A system biology study, *Methods*, 67, 394p.
- Wong, J., Youde, E., Dickinson, B. and Hale, M.,** 2002, Report on the rhododendron feasibility study. School of Agriculture and Forest Sciences, University of Wales, Bangor.
- Wulff, H., Castle, N.A. and Pardo, L.A.,** 2009, Voltage-gated potassium channels as therapeutic targets, *Natural Review Drug Discovery.*, 8, 982–1001pp.
- Yoon, Y., Lee, B., Lee, S.K., Im, G.H., Byeon, S.H., Lee, J.H., and Lee, I.S.,** 2009, Surface modification of exfoliated layered gadolinium hydroxide for the development of multimodal contrast agents for MRI and fluorescence imaging, *Advanced Functional Materials*, 19, 3377p.
- Yu, K.M., Park, J. and Jon, S.,** 2012, Targeting strategies for multifunctional nanoparticles in cancer imaging, *IVYSPLING*, 2(1), 3-37pp.
- Yu, S.,** 2006, Review of  $^{18}\text{F}$ -FDG synthesis and quality control, *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, 2(4), 7p.
- Zhorov, B.S. and Tikhonov, D.B.,** 2013, Ligand Action On Sodium, Potassium and Calcium Channels: Role of Permeant Ions, *Trens in Pharmacological Sciences*, (34)3, 158p.
- Zhou, W., Apkarian, R.P., Wang, Z.L., and Joy, D.,** 2006, Scanning Microscopy for Nanotechnology Techniques and Applications, Springer Science -Business Media, Inc., ABD, 1-8pp.
- Zhu, D., Liu, F., Ma, L., Liu, D. and Wang, Z.,** 2013, Nanoparticle-based systems for T1-weighted magnetic resonance imaging contrast agents, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10591-10607pp.

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı :** Talha Sıddık Akkaya

**Doğum Yeri :** İSTANBUL

**Doğum Yılı :** 16/04/1984

**Öğrenim Durumu :**

**Üniversite (Lisans) :** Kocaeli Üniversitesi – Fen Fakültesi – Kimya Bölümü

**İş Bilgileri**

**Kalite Kontrol Uzmanı** - Eczacıbaşı – Monrol Nükleer Ürünler A.Ş. - Gebze Tesisi - Haziran 2013 – Haziran 2014

**Sorumluluklar :** Radyoaktif ( FDG, Iyot-131, Jeneratör (Tc-99m) ,Talyum-201, Ga-67, MIBI, DMSA, DTPA, MDP,ECD) ve Liyofilize kit (MIBI, MDP, DTPA, DMSA ve ECD) görüntüleme ajanlarının kimyasal ve radyokimyasal kalite kontrol çalışmalarının gerçekleştirilmesi.

**Sorumlu Kalite Kontrol Uzmanı** - Eczacıbaşı – Monrol Nükleer Ürünler A.Ş. Kuveyt Tesisi - Nisan 2009 – Haziran 2013

**Sorumluluklar :** Radyoaktif FDG, NaF, görüntüleme ajanlarının kimyasal, radyokimyasal ve mikrobiyolojik kalite kontrol çalışmalarının gerçekleştirilmesi. Kalite kontrol birimi cihaz kalibrasyon, validasyon ve bakımlarının takibi. Enjeksiyonluk su, kimyasal ve mikrobiyolojik analizlerinin gerçekleştirilmesi. Tesis sarf malzeme ve kimyasal malzeme takibi.

**Kalite Kontrol Yardımcısı** - Eczacıbaşı – Monrol Nükleer Ürünler A.Ş. – Adana Tesisi - Şubat 2008 – Nisan 2009

**Sorumluluklar :** Radyoaktif FDG görüntüleme ajanlarının kimyasal, radyokimyasal ve mikrobiyolojik kalite kontrol çalışmalarının gerçekleştirilmesi. Kalite kontrol birimi cihaz kalibrasyon, validasyon ve bakımlarının takibi. Su sistemi ve Havalandırma sistemi validasyonları. Enjeksiyonluk su, kimyasal ve

mikrobiyolojik analizlerinin gerçekleştirilmesi. Tesis sarf malzeme ve kimyasal malzeme takibi.

**Kalite Kontrol Teknisyeni** - Monrol Nükleer rnler A.ř. - Adana Tesisi  
Eylül 2007 – şubat 2008

Sorumluluklar : Radyoaktif FDG görüntüleme ajanının kimyasal, radyokimyasal ve mikrobiyolojik kalite kontrol çalışmalarının gerçekleştirilmesi. Kalite kontrol birimi cihaz kalibrasyon, validasyon ve bakımlarının takibi. Su sistemi ve Havalandırma sistemi validasyonları. Enjeksiyonluk su, kimyasal ve mikrobiyolojik analizlerinin gerçekleştirilmesi. Tesis sarf malzeme ve kimyasal malzeme takibi.

## EKLER

### EK 1 Orman Gülü Bitkisinin Tanımlanma Raporu

I.Ü.Orman Fakültesi  
Orman Mühendisliği Bölümü  
Orman Botaniği Anabilim Dalı  
Tel: 0.212.226.11.00  
Fax: 0.212.226.11.1.3

30.06.2014

Sayın Talha Sıddık Akkaya,

30.06.2014 tarihli yazınızla birlikte gönderdiğiniz ve yüksek lisans tezinizde kullanmak istediğiniz, aşağıda fotoğrafı verilen bitki örneği *Rhododendron ponticum* L. (Mor Çiçekli Orman Gülü) olarak teşhis edilmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

  
Prof. Dr. Ünal Akkemik  
Anabilim Dalı Başkanı

Teşhis edilen bitki örneği:

