

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FDG-KONJUGE MANYETİK
NANOPARÇACIKLARIN BİYOAFİNİTELERİNİN *İN
VİTRO/İN VİVO* OLARAK İNCELENMESİ**

Volkan YASAKÇI

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 24.01.2017

Bornova-İZMİR

2017

Volkan YASAKÇI tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “FDG-Konjuge Manyetik Nanoparçacıkların Biyoafinitelerinin *In Vitro/In Vivo* Olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 24.01.2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı :Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Raportör Üye :Prof. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Üye :Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “FDG-Konjuge Manyetik Nanoparçacıkların Biyoafinitelerinin *İn Vitro/İn Vivo* Olarak İncelenmesi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, döküman, 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.

24/ 01/ 2017

Volkan YASAKÇI

ÖZET**FDG-KONJUGE MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
BİYOAFİNİTELERİNİN *IN VITRO/IN VIVO* OLARAK
İNCELENMESİ**

YASAKÇI, Volkan

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Ocak 2017, 86 Sayfa

Bu tez çalışmasının amacı, dual mod lenf nodu görüntüleme ve hipertermi özellikleri olan bir teranostik ajan oluşturulmasıdır. Bu amaç ile demir oksit içerikli manyetik nanoparçacıklar (MNP) sentezlenmiş, sentezlenen MNP'lerin stabiliteğini arttırmak, sitotoksitelerini azaltmak ve kanser hücrelerine afinitelerini daha seçici hale getirmek için Hyaluronik Asit (HA) ile yüzey modifikasyonu yapılmış ve Florodeoksiglukoz (¹⁹FDG) molekülü ile konjuge edilerek kanser hücrelerindeki afiniteler artırılmaya çalışılmıştır. Sentezlenen MNP'lere daha sonra floresans özellikte optik işaret olan Indocyanine Green (ICG) bağlanarak optikçe izlenir hale getirilmiştir. Ayrıca iodojen yöntemi kullanılarak ¹³¹I radyoişaretleme yapılmış, moleküle terapi ve izlenebilirlik özelliği kazandırılmıştır. Radyoişaretleme yapılan molekülün *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ve biyoafinite testleri PC-3 insan prostat kanseri hücreleri ve MCF7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde yapılmıştır. Sprague Dawley sıçanlar ile *in vivo* hayvan organ tutulum çalışması yapılmıştır. Erkek ve dişi sıçanlar üzerinde, etik kurallar çerçevesinde üç farklı proses denenmiştir. Elde edilen sonuçlar, FDG konjuge Fe₃O₄ nanoparçacıkların kanser hücrelerine tutulumu arttırdığı ve bu parçacıkların MRI ile kanser hücrelerinde görüntüleme ve hipertermi ile terapi için uygun özelliklerinden dolayı teranostik ajan olabileceklerini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Manyetik Nanoparçacıklar (MNP), Fe₃O₄, Hyaluronik Asit (HA), Florodeoksiglukoz (FDG), ¹³¹I, Indocyanine Green (ICG), hipertermi, teranostik ajan.



ABSTRACT***IN VITRO/IN VIVO* BIOAFFINITY DETERMINATION OF FDG
CONJUGATED MAGNETIC NANOPARTICLES**

YASAKÇI, Volkan

MSc in Nuclear Sciences Department

Supervisor : Prof. Dr. Perihan ÜNAK

January 2017, 86 pages

The aim of this thesis is created a theranostic agent with dual mode lymph node imaging and hyperthermia. For this purpose, magnetic nanoparticles (MNP) which contained iron oxide were synthesized and the surface of MNP was modified with Hyaluronic Acid (HA) to increase the stability, to reduce cytotoxicity and to enhance their selective affinity for cancer cells. In addition, the modified molecule was conjugated with Fluorodeoxyglucose (¹⁹FDG). The synthesized FDG-MNPs were optically screened by binding fluorescence-specific optical signal Indocyanine Green (ICG). Additionally, the molecule was radiolabeled with ¹³¹I using the iodogen method so, molecule has been given therapy and traceability. The radiolabeled molecule's *in vitro* cell culture studies and bioaffinity assays were performed on PC-3 human prostate cancer cells and MCF7 human breast cancer cells. Sprague Dawley rats were studied for *in vivo* animal organ involvement. Three different processes have been tested on male and female rats in the framework of ethical rules. The results demonstrate that FDG conjugated Fe₃O₄ nanoparticles enhance the involvement of cancer cells and that these particles may be a theranostic agent due to their favorable properties for imaging with hyperthermia and imaging in cancer cells with MRI.

Keywords: Magnetic Nanoparticles (MNP), Fe₃O₄, Hyaluronic Acid (HA), Fluorodeoxyglucose (FDG), ¹³¹I, Indocyanine Green (ICG), hyperthermia, theranostic agent.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın her koşulunda bilgi ve tecrübeleriyle bana destek olan başta tez danışmanım, sayın hocam Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, *in vivo* hayvan organ tutulum çalışmasında bizlere destek sağlayan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalından sayın hocam Uzm. Dr. Vedat EVREN'e, çalışmalarımın başından sonuna kadar her türlü yardımı ve desteği sağlayan, bu çalışmamın özellikle *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında büyük destek veren Ar. Gör. Dr. Özge KOZGUŞ GÜLDÜ'ye, yine tüm deneyimlerini benimle paylaşan ve *in vivo* hayvan organ tutulum denemesinde büyük katkısı olan Volkan TEKİN'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Bütün eğitim öğretim hayatım boyunca bana her koşulda destek olan sevgili aileme de ayrıca teşekkürü bir borç bilirim.

Volkan Yasakçı



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxiv
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Kanser Nedir?.....	5
2.1.1 Kanser tanı ve tedavi yaklaşımları.....	5
2.2 Nanoteknoloji.....	8
2.2.1 Manyetik Nanoparçacıklar.....	9
2.2.2 Manyetik Nanoparçacıkların ilaç olarak hedeflenebilme özellikleri.....	10
2.2.3 Demir Nanoparçacıklar.....	11
2.3 Florodeoksiglukoz (FDG).....	14
2.3.1 Fasentin.....	17

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4 Hyaluronik Asit.....	18
2.5 İşaretlemede Kullanılan Yöntemler.....	21
2.5.1 İyot ve iyot izotopları.....	21
2.5.2 Radyiodinasyon ve radyoaktif ¹³¹ I ile işaretleme.....	22
2.5.3 İdojen yöntemi.....	23
2.5.4 Indocyanine Green (ICG) optik işaretleme.....	23
2.6 Kalite Kontrol İşleminde Kullanılan Yöntemler.....	25
2.6.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC).....	25
2.6.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	26
2.7 Hücre Kültürü.....	27
2.8 Biyodağılım.....	29
3. MATERYAL VE METHOD.....	31
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	31
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	31
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	32
3.2 MNP (Fe ₃ O ₄) Sentezi.....	34

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.2.1 Sentezlenen MNP'lerin silikalanması.....	35
3.2.2 Silikalanmış MNP'lerin silanlanması.....	36
3.2.3 Silika ve silanlı MNP'lerin hyaluronik asit ile modifikasyonu.....	36
3.3 Mannoz triflat-etilendiamin Konjugasyonu.....	36
3.3.1 Mannoz triflat – etilendiamin'in ¹⁹ F ile süstitüsüyonu.....	36
3.4 ¹⁹ FDG-MNP Sentezi.....	37
3.5 Sentezlenen ¹⁹ FDG-MNP'ye optik işaret (ICG) takılması.....	37
3.6 Sentezlenen FDG-MNP'lerin Karakterizasyonları.....	38
3.6.1 SEM ve TEM analizleri.....	38
3.6.2 Demir nanoparçacık ve türevlerinin hidrodinamik çap ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi.....	38
3.7 FDG-konjuge nanoparçacıkların FT-IR yöntemi ile yapı analizi.....	38
3.8 Kalite Kontrol İşlemleri.....	39
3.8.1 İdojen yöntemi ve ¹³¹ I ile radyoışaretleme.....	39
3.8.2 FDG-konjuge nanoparçacıkların HPLC analizleri.....	39
3.8.3 FDG-konjuge manyetik nanoparçacıkların ince tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi ile kalite kontrol işlemi.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.9 Hücre Kültürü Çalışmaları.....	41
3.9.1 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarının hazırlanması.....	41
3.9.2 İodojen yöntemiyle radyoişaretleme yapılan manyetik nanoparçacık (MNP) ve FDG-MNP bileşiklerinin MCF7 ve PC-3 hücre hatlarında 3 saat boyunca fasentinli ve fasentinsiz inkorporasyonu.....	41
3.9.3 Protein Tayini.....	42
3.10 <i>İn Vivo</i> Organ Tutulum Çalışması.....	42
3.10.1 Perfüzyon ve kesit alma işlemi.....	42
3.10.2 Kesitleri alınan organların histokimya boyası ile boyanması.....	44
3.10.3 Homojenize edilen organların HPLC analizleri.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	47
4.1 Reaksiyon Mekanizmaları.....	47
4.2 Sentezlenen MNP ve Türevlerinin Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular.....	51
4.2.1 SEM ve TEM analiz sonuçları.....	51
4.2.2 Sentezlenen MNP ve türevlerinin DLS analiz sonuçları.....	52
4.3 Sentezlenen ve Konjuge Edilen Nanoparçacıkların FT-IR Yapı Analiz Sonuçları.....	54
4.4 Kalite Kontrol Analiz Sonuçları.....	57

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.4.1 Nanoparçacık ve türevlerinin HPLC analiz sonuçları.....	57
4.4.2 Erkek Sıçanda Homojenize Edilen Organların HPLC Analiz Sonuçları.....	60
4.4.3 TLRC Analiz Sonuçları.....	66
4.5 Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	68
4.6 <i>İn Vivo</i> Organ Tutulum Çalışması Sonuçları.....	69
4.6.1 Erkek ve dişi sıçanda ışık/floresans mikroskop görüntüleri.....	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Tümör mikro çevresi.....	6
2.2 Nanoparçacık ve hücre yüzeyi arasındaki etkileşimleri gösteren şema.....	11
2.3 Fasentin'in açık yapısı.....	17
2.4 Hyaluronik Asit'in açık yapısı	18
2.5 İyot izotoplarının bozunma türleri ve yarı ömürleri	22
2.6 İodojen'in açık yapısı	23
2.7 ICG'nin açık yapısı	24
2.8 HPLC cihazının temel bileşenleri.....	27
3.1 Demir nanoparçacık sentez düzeneği.....	35
3.2 Demir nanoparçacık nanoparçacık sentez sonrası görünümü	35
3.3 Mannoz triflat-etilendiaminin ¹⁹ F ile süstitüsyon deneyi görünümü.....	37
3.4 24'lük plate içerisine ekilmiş hücrelere uygulanan moleküllerin şematik gösterimi.....	42
3.5 Leica CM1900 Kyrostat cihazı ile 30 µm'lik kesit alımı.....	43
3.6 Lam üzerindeki kesitler.....	44
3.7 Histokimya boyama prosesinden bir görüntü.....	45
4.1 Demir nanoparçacık sentez reaksiyonu	46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2 Demir nanoparçacığın silika ile kaplanması reaksiyonu	46
4.3 Demir nanoparçacık silanlanma reaksiyonu	47
4.4 Silanlanmış demir nanoparçacığın hyaluronik asit ile modifikasyon reaksiyonu.....	47
4.5 Mannoz triflat'ın etilendiamin ile konjugasyon reaksiyonu	47
4.6 Mannoz triflat-Etilendiamin'in ¹⁹ F ile süstitüsyon reaksiyonu	48
4.7 FDG-MNP'nin açık yapısı	48
4.8 MNP-HA ile FDG-etilendiamin'in konjugasyonu	49
4.9 ICG ile optik işaretlenmiş FDG-MNP'lerin şematize edilmiş modeli.....	49
4.10 Sentezlenen MNP ve türevlerinin SEM analiz sonucuna ait görüntüsü.....	50
4.11 Sentezlenen MNP ve türevlerinin TEM analiz sonucuna ait görüntüsü.....	50
4.12 Manyetik nanoparçacıkların boyut dağılımı.....	52
4.13 Manyetik nanoparçacıkların zeta potansiyel grafiği.....	52
4.14 Fe ₃ O ₄ 'ün FT-IR yapı analiz sonucu.....	53
4.15 Fe ₃ O ₄ -Silika'nın FT-IR yapı analiz sonucu.....	54
4.16 Fe ₃ O ₄ -Silika-Silan'ın FT-IR yapı analiz sonucu.....	55
4.17 Fe ₃ O ₄ -Silika-Silan-HA'nın FT-IR yapı analiz sonucu.....	55

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.18 Fe ₃ O ₄ -Silika-Silan-HA'nın kromatogramı.....	56
4.19 FDG-MNP kromatogramı.....	57
4.20 FDG-MNP-ICG'nin kromatogramı.....	58
4.21 FDG-MNP-ICG'nin floresans dedektör kromatogramı.....	58
4.22 ICG'nin UV dedektör kromatogramı.....	58
4.23 ICG'nin floresans dedektör kromatogramı.....	59
4.24 FDG-MNP-ICG'nin HPLC kromatogramı.....	60
4.25 ICG kromatogramı.....	60
4.26 FDG-MNP-ICG ile farklı konsantrasyonlarda elde edile kalibrasyon çalışması sonuç grafiği.....	61
4.27 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Böbrek dokusundaki ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	62
4.28 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Prostat dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	62
4.29 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Dalak dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	63
4.30 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Karaciğer dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	63
4.31 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Akciğer dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	64

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.32 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Kalp dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı.....	64
4.33 FDG-MNP- ¹³¹ I ⁺ 'nin TLRC analiz sonuçları.....	65
4.34 ¹³¹ I ⁺ 'nin TLRC analiz sonuçları.....	66
4.35 Serbest iyotun TLRC analiz sonucu.....	66
4.36 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarına uygulanan nanoparçacık türevlerinin bağlanma oranlarının grafiği.....	68
4.37 Erkek sıçan boyanmamış slayttaki prostat organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	69
4.38 Erkek sıçan boyanmış slayttaki testis organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	69
4.39 Erkek boyanmış slayttaki dalak organ kesitinin floresans görüntüsü.....	69
4.40 Dişi boyanmış Karaciğer organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	70
4.41 Dişi boyanmamış böbrek organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	70
4.42 Dişi sıçanda boyanmış meme organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	70
4.43 Dişi sıçanda boyanmamış meme organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü.....	71

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İyot izotoplarından bazılarının üretimi, bozunma cinsi, yarı ömrü ve uygulamaları hakkında genel bilgi.....	22
3.1 HPLC koşulları.....	40
3.2 Homojenize edilmiş organların HPLC çalışma koşulları.....	45
4.1 Manyetik nanoparçacıkların boyut zeta potansiyel ölçüm sonuçları.....	51
4.2 Fe ₃ O ₄ 'ün dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri.....	53
4.3 Silikalanmış Fe ₃ O ₄ 'ün dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri.....	54
4.4 Silanlanmış Fe ₃ O ₄ -Silikanın dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri.....	55
4.5 Hyaluronik Asit ile kaplanmış Fe ₃ O ₄ -Silika-Silan'ın dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri.....	56
4.6 Fe ₃ O ₄ -HA'nın alıkonma zamanı ve alan sonuçları.....	57
4.7 FDG-MNP'nin alıkonma zamanı ve alan sonuçları.....	57
4.8 FDG-MNP-ICG'nin alıkonma zamanı ve alan sonucu.....	58
4.9 ICG'nin alıkonma zamanı ve alan sonuçları.....	59
4.10 FDG-MNP-ICG kromatogramının alıkonma ve alan ortalaması.....	60
4.11 Daha önce elde edilmiş ICG kromatogramının alıkonma ve alan ortalaması.....	60

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.12 Erkek Homojenize edilmiş Böbrek alıkonma ve alan ortalaması.....	62
4.13 Erkek homojenize edilmiş Prostat alıkonma ve alan ortalaması.....	62
4.14 Erkek homojenize edilmiş Dalak alıkonma ve alan ortalaması.....	63
4.15 Erkek homojenize edilmiş Karaciğer alıkonma ve alan ortalaması.....	63
4.16 Erkek homojenize edilmiş Akciğer alıkonma ve alan ortalaması.....	64
4.17 Erkek homojenize edilmiş Kalp alıkonma ve alan ortalaması.....	64
4.18 Çeşitli dokulardaki FDG-MNP-ICG miktarları ($\mu\text{g}/\text{mg}$).....	65
4.19 TLRC sonuçlarının ortalama değerleri tablosu.....	66
4.20 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarına uygulanan nanoparçacık türevlerinin bağlanma oranları.....	67

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
MNP	Manyetik Nano Parçacık
SPION	Süper Paramanyetik Demir Oksit
USPIO	Ultra Süper Paramanyetik Demir Oksit
MMH	Manyetik olarak aracılık eden hipertermi
TAM	Tümöre bağlı makrofajlar
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
HA	Hyaluronik Asit
CD44	Bir hücre zarı adezyon molekülü
AMF	Alternatif Manyetik Alan
ICG	Indocyanine Green
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografisi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy
TEM	Transmission Electron Microscopy
DLS	Dynamic Light Scattering

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
FDG-MNP	Florodeoksiglukoz molekülü ile konjuge edilmiş demir oksit içerikli manyetik nanoparçacıklar
PET	Positron Emission Tomography
GLUT	Glukoz taşıyıcı molekül
NMR	Nükleer Magnetic Resonance
MRI	Magnetic Resonance Imaging
Rt	Alıkonma Süresi
Rf	Alıkonma Mesafesi

1. GİRİŞ

Demir oksit içerikli manyetik nanoparçacıklar (MNP) tanı ve tedavi alanında günümüzde sıkça kullanılan materyallerdir. Bu materyaller tanı ve tedavi yöntemi olarak kişiye özel tıp uygulamalarına olanak sağlamaktadır (Campo et al., 2005). Dışarıdan uygulanan bir manyetik alan ile hedefe yönlendirilebilme özelliğine sahiptirler. Aynı zamanda tanı ve tedavi yaklaşımları içerisinde seçici tümör görüntüleme ile gen iletiminde de fonksiyonel MNP'ler kullanılmaktadır. Süper Manyetik Nanoparçacıkların (SPION) biyoteknolojide ilaç taşıyıcısı olarak kullanımı ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak radyonüklid işaretli MNP'ler ile ilgili çalışmalar daha azdır (Jain et al., 2005, Glaus et al., 2008). ^{18}F 'nin herhangi bir nanoparçacığa takılması ile ilgili ise [^{18}F]Florobenzaldehyt sentezlenmiş, bu molekül affibody molekülüne takılarak Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) ile deneysel tümör görüntüleme çalışmalarında kullanılmıştır (Namavari et al., 2008). Anabilim Dalımızda ^{18}F ile işaretli MNP'ler ile ilgili yapılmış bir Yüksek Lisans tezi ve bu tezden çıkan yayın mevcuttur (Toksöz vd., 2008, Özkaya et al., 2012).

Pozitron Emisyon Tomografisi'nde (PET) genelde kısa ömürlü β^+ verme özelliğine sahip radyonüklidler kullanılır. Gama sintigrafisi ve tek foton salınım sintigrafisi (SPECT) ile karşılaştırıldığında PET daha yüksek atenüasyon düzeltilmesi, çözünürlük ve hassaslık imkanı sağlar. İlaveten MNP'lerin Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) kontrast ajan olarak kullanılabilmesi, yeni gelişen PET/MRI dual mod görüntüleme sistemleri için uygun kontrast ajan oluşturulması imkanı ile sağlanabilecektir. Ancak oluşturulan ajanların biyoyoumluluğunun, sitotoksitelerinin ve biyodağılım mekanizmalarının bilinmesi gerekir.

MRI için süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkların (SPIONs), fizyolojik ortamlar üzerinde mükemmel biyoyoumluluğa ve kimyasal kararlılığa sahip olmasından dolayı, biyomedikal uygulamalar için oldukça ümit vericidir (Lee et al., 2010; Namgung et al., 2011). Süper manyetik demir oksitler (SPION) ile manyetik hipertermi, kanseri tedavi etmek için etkili bir yöntem olarak görülmektedir. Manyetik hipertermi aynı zamanda kemoterapi, radyoterapi ve immünoterapiye de katkıda bulunabilir ve genellikle multimodal stratejiler ile ilişkilidir (Maeng et al., 2010; Yallapu et al., 2011). Süper manyetik demir oksitler kullanılarak ve değişen bir manyetik alan uygulanarak belli bir bölgedeki kanser tedavi edilebilmektedir (Kolosnjaj-Tabi et al., 2014). Alternatif Manyetik Alan (AMF) aralıklarla yön değiştiren, genellikle sinüzoidal, sürekli bir manyetik alan olarak ifade edilebilir. SPION'ların AMF'den kaynaklanan kinetik enerjisi ortam

sıcaklığının artmasına neden olur (Smolkova et al., 2015). Hipertermi süreci boyunca, kanser hücreleri tahrip edilir veya 40 - 45 °C sıcaklık aralığında kanser dokuları daha fazla gelişemeyeceğinden çoğalamayacaktır (Kim et al., 2013). Manyetik hipertermi içerisindeki başlıca zorluklardan bir tanesi bölgesel ısınmanın sağlıklı dokuları da çevrelemesi ve tümör bölgesi hipertermi sıcaklığına ısıtılırken, yan yana olan sağlıklı hücrelerin de hasar görebilmesidir. AMF SPION'ların ısıtma yeteneğine bağlı olarak, manyetik nanoparçacıklar aracılığıyla tedavide kullanılmaktadır (Guardia et al., 2012). SPION'ların AMF kaynaklı ısıtma kabiliyeti çoğunlukla hücreleri apoptosise götürmektedir (Noh et al., 2012).

Hyaluronik Asit (HA), umut verici bir biyomalzeme olması nedeniyle ve doğal bir polisakkarit olarak doğası ve doğada nispeten hızlı çözünebilen özellikleri ile dikkat çekmektedir. HA, CD44 gibi çeşitli tümör hücreleri yüzeyinde normal hücrelerden daha fazla bulunan bir biyopolimerdir. HA'nın normal olanlara göre tümör dokularında yüksek biyolojik dağılımı vardır. Kanser hücrelerinde çok fazla üretilen hyaluronidaz (Hyal) varlığında HA'nın moleküler ağırlığı düşük düzeylere indirilebilir (Deng et al., 2012). Ayrıca kozmetik sektöründen ilaç yapımına kadar çok geniş bir skalada kullanım alanı mevcuttur (Rohrich et al., 2007). Literatürde doksorubisinin anti kanser etkisini arttırmak için, 114 nm boyutundaki HA ile kaplanmış SPION (HA-SPION)'ların kullanılabilirliği incelenmiştir (El-Dakdouki et al., 2012). EDC/HOBt (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit/Hidroksibenzotriazol) kimyası kullanılarak dopamin kaplı SPION'ların devreye girmesi ile HA-SPION sentezi de gerçekleştirilmiştir (Lee et al., 2008), Polietilenglikol (PEG) ile HA-SPION'ların ve baş-boyun kanserinde kendi hipertermi etkisi kullanımı Thomas ve grubu tarafından rapor edilmiştir (Thomas et al., 2015).

Tümör hücrelerinde normal hücrelere göre artmış glukoz metabolizması ¹⁸FDG'nin tümör görüntülemesinde kullanılmasının temelini oluşturmaktadır. Tümör hücrelerindeki artmış glikoliz, glukoz transport proteinlerinin sayısında (özellikle GLUT1) ve intraselüler heksokinaz enzim düzeylerinde artmaya neden olmaktadır. ¹⁸FDG ve glukoz intravenöz verildikten sonra glukoz metabolizmasının belli bir aşamasına kadar aynı yolu izlerler. ¹⁸FDG, glukoz gibi insülin bağımlı olmayan GLUT1 ile tümör hücresi içine alındıktan sonra heksokinaz enzimi ile fosforile edilerek ¹⁸FDG-6P formuna dönüştürülür. ¹⁸FDG-6P, glukoz-6-izomeraz enzimi için uygun bir substrat olmadığı için glikolizin diğer metabolik reaksiyonlarına girmez. ¹⁸FDG-6P, kandan yeni ¹⁸FDG geldiği ölçüde tümör hücresinde giderek artan bir biçimde birikmeye başlar. ¹⁸FDG-6P'nin tümör hücresinden çıkmasının tek yolu fosforilaz enzimleri ile ¹⁸FDG'ye dönüşüp hücre dışına taşınmasıdır. Ancak, ¹⁸FDG-6P'yi ¹⁸FDG'ye

dönüştürecek glukoz-6-fosfotaz enziminin hepatositler dışında dokularda çok az miktarda bulunması nedeniyle geri dönüşüm çok az miktarda olur ve ¹⁸FDG-6P aktif glikoliz gösteren dokularda (özellikle beyin, kalp ve tümör dokusunda) glikoliz hızına bağlı olarak birikmeye devam eder. Bu olaya “metabolik kapan” denmektedir (Pauwels et al., 1998).

Nanoparçacıklar tanısal görüntüleme maddeleri olarak büyük potansiyele sahiptir. Aynı zamanda, görüntüleme ve tedavi yetenekleri ile multimodal ajanların geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. Fakat bazı umut verici nanopartiküller ağır metaller içermesi ve dokuda uzun süre tutulması bakımından olumsuz özelliklere sahiptir. Bu bakımdan ciddi kaygılara sebep olmaktadır. Optimum atılma özellikleri ile nanopartiküllerin oluşturulması, bu maddelere maruz kalma süresini azalatarak toksisite riskini en aza indirecektir (Longmire et al., 2008).

Bu çalışmada, Fe₃O₄ içerikli manyetik nanoparçacıklar (MNP) sentezlenmiş ve sırasıyla bu nanoparçacıkların yüzeyi silika ve silan çifti ajanı ile kaplandıktan sonra Hyaluronik Asit (HA) ile modifiye edilmiştir. Elde edilen MNP’ler, sentezlenen ¹⁹FDG-etilendiamin ile konjuge edilerek ¹⁹FDG-etilendiamin-HA-MNP’ler oluşturulmuştur. Sentez sonrası karakteristik özellikleri belirlenmiştir ve moleküle Indocyanine green (ICG) ile optik işaretleme yapılmıştır. Aynı zamanda iodojen yöntemi kullanılarak ¹³¹I ile radyoışaretleme yapılmıştır. *In vitro* çalışmalarda ¹³¹I işaretli ¹⁹FDG-etilendiamin-HA-MNP molekülü kullanılmıştır. Hücre içine alınan ¹⁹FDG-etilendiamin-HA-MNP miktarı meme ve prostat kanser hücrelerinde incelenmiştir. Glukozun kanserli hücrelere GLUT1 mekanizması yoluyla girebildiği bilinmektedir (Pauwels et al., 1998). Fasentin’in hücre üzerindeki GLUT1 reseptörünün inhibitörü olduğu bilinmektedir. Kanserli hücreler üzerindeki GLUT1 reseptörünün bloğunu kırmak için Fasentin kullanılmıştır. MCF7 ve PC-3 kanser hücre hatlarında Fasentin ile ve Fasentin olmadan yapılan çalışma ile hücrelerdeki glukoz alımı tespit edilmeye çalışılmıştır. Sentezlenen maddenin hücreye hangi kanaldan daha spesifik olduğu ve 3 saat içindeki tutulumu incelenmiştir. Bu çalışma sonrasında Sprague Dawley tipi sıçanlarla *in vivo* organ tutulum çalışması perfüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Perfüzyon işlemi sonrası organlar üç farklı prosesten geçirilmiştir. Frozen kesitler alınmış ve FDG-MNP’lere bağlı ICG molekülünün sahip olduğu floresans özellikten faydalanarak organlardaki tutulum incelenmiştir. Floresans mikroskop kullanılarak doku kesitlerinin görüntüleri alınmıştır. Görüntüler de ICG’den gelen floresans, floresans mikroskop kullanılarak tespit edilmiştir. Aynı zaman da bu organların HPLC analizleri de yapılmıştır. Yapılan HPLC analizi sonucu en yüksek FDG-MNP-ICG tutulumu kalp dokusunda tespit edilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser Nedir?

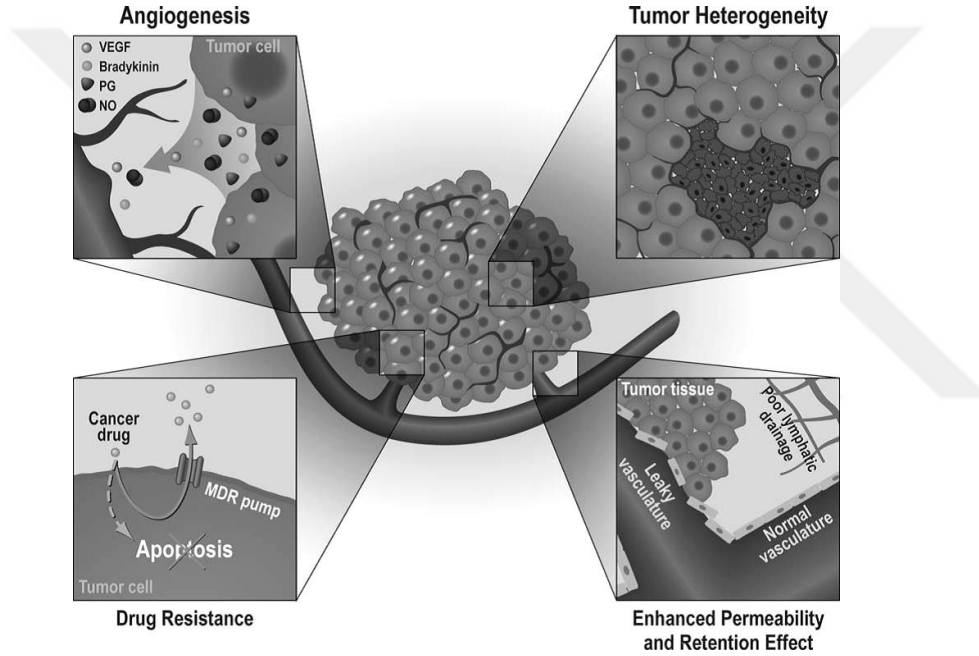
Kanser, bir hücre ve hücre topluluğunun kontrolsüz büyümesini tanımlayan genel bir terimdir. Kanser hücreleri çoğalarak bir kütle haline geldiğinde tümör olarak ifade edilmektedir. İyi huylu tümörler bir organın işlevselliğini engelleyecek basit bir fiziksel tıkanıklıkken, malign (habis) tümörler çevredeki dokuları istila edebilir vücudun çeşitli bölgelerinde yayılıp, büyüebilmektedir. Tümörlerin nasıl ortaya çıktığı veya hücrelerin aniden düzenlenmemiş hale gelme mekanizması tam olarak anlaşılmamıştır, ancak tümörlerin değişken yapısı nedeniyle malign (habis) ve vücuda yayılım olmakta, onkoloji alanında özellikle öldürme çalışması kanserli hücrelerde araştırılmaktadır. Tümörleri tahrip etmenin bir yöntemi de Hipertermi'dir (Wu et al., 2013).

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansının 2008 yılındaki raporuna göre, 1975 yılından bu yana kanser hastalığı nedeniyle ölümlerde 3 kat bir artış olduğu görülmüştür. 2030 yılına gelindiğinde ise dünya çapında 13-17 milyon insanın kanser nedeniyle yaşamını yitireceği öngörülmektedir. Yeni tedavi türleri geliştiren ve farklı tedavi türlerine yanıt almıyorken kanseri temelde önlemek erken tanı, teşhis ve malign hücre büyümesinin tedavisinden geçmektedir. Geçen on yılda, günümüzde yaygın kullanıma sahip olan yeni görüntüleme teknikleri geliştirilmiştir. Floresan görüntüleme ve manyetik rezonans görüntüleme (MRI) yoluyla nano görüntülemenin geliştirilmesi, mevcut görüntüleme yöntemlerinden daha erken bir aşamada kanseri saptama ve teşhis etme potansiyeline sahiptir (Gobbo et al., 2015).

2.1.1 Kanser tanı ve tedavi yaklaşımları

Günümüzde kanser hastalığı için mevcut tedavi seçenekleri, cerrahi müdahale, radyoterapi ve kemoterapi şeklinde sıralanmaktadır. Geçen on yılda, kanser için yeni tedaviler tasarlayabilme kabiliyetimiz, tümör mikro ortamının daha iyi anlaşılmasıyla kolaylaştırılmıştır. Kanser dokusu çevredeki normal dokuya kıyasla belirgin farklılık gösteren nonselüler (yani vasküler ve interstisyel) ve hücrel kompartmanlardan oluşur. Bu bölmelerden her biri, ilaçların tümör hücrelerine lokal olarak verilmesi için bir tepki verebilmektedir. Bu kavram aşağıdaki simüle edilmiş şekil 2.1'den anlaşılmaktadır. Nonselüler bölme içinde, tümör vaskülaritesi belirgin derecede heterojen olup yoğun vaskülarize bölgeler, tümörün hızla büyüyen kısımlarına oksijen ve besin sağlarken, tümör nekroz bölgelerine karşı az miktarda kan tedarik edilebilmektedir. Buna ek olarak, kan damarlarından uzaktaki tümör hücreleri için azalan bir oksijen miktarı mevcuttur;

bunun nedeni kısmen bu hücelere ulaşmak için oksijenin yayılması için artan mesafe ve aynı zamanda kan damarlarına daha yakın olan tümör hücreleri tarafından oksijen tüketiminden kaynaklanmaktadır (Avnesh et al., 2013). Yeni kan damarları anjiyogenez olarak bilinen bir süreçle tümörler tarafından sentezlenir; bununla birlikte, bu damarlar da artan sayıdaki proliferatif endotel hücresi, artmış damar bükülmesi, eksik perisitler ve bitişik membranlardaki anormallikler olağandışıdır ve bitişik endotel hücreleri arasındaki geniş boşluklar 380 ile 780 nanometre arasındadır (Allen and Cullis, 2004, Brigger and Couvreur, 2002). Tümör çevreleyen hücre, bir kollajen ve elastik lif ağı oluşan interstisyel ortamdır.



Şekil 2.1 Tümör mikro çevresi (Avnesh et al., 2013).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar, tümör içerisinde 2 farklı hücre popülasyonunun olduğunu göstermiştir: Kanserli kök hücreler olarak bilinen küçük nadir ve sessiz bir popülasyon ve tümör kütlelerinin çoğunluğunu oluşturan hızla çoğalan hücrelerden oluşan daha büyük bir popülasyon. Kansersiz kök hücrelerin kendi kendini idame ettirebilme veya metastaz yapabilme kapasitelerine sahip olmamasına karşın, kanser kök hücreleri sadece tümörü rejenere etme yeteneğine sahip değildir, aynı zamanda hücre göçü (örn., işgal ve metastaz) ve kendini koruma için genetik programlarını da korurlar. Çünkü en teröpatik tedaviler kanser olmayan kök hücreleri hedef aldığından, geride kalan kanser kök hücreleri tekrardan kanser hücreleri oluşturabilir ve tedaviden sonra

kanserin nüksetmesinin esas sebebi de budur. Bununla birlikte kritik bir terapötik hedef olarak yeni tedavi yaklaşımları, kanser kök hücrelerini hedef alacak şekilde dizayn edilmektedir. Bu hücrelerin yok edilmesi, kanser hücrelerini kalıcı olarak yok edecek ve böylece lokal nüks ve metastazı önleyecektir (Niederhuber et al., 2007). Kanser kök hücreleri etrafındaki mikro ortamın, hücrelerin çoğalmasını ve hücre akıbeti konusunda sinyal oluşturduğu daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Bu nedenle, mikro ortamdaki kansız hücreleri manipüle etme stratejileri, kanserin evrim ve neoplastik doğasını tedavi etmek ve kontrol etmek için başka bir seçenek sağlayabilir. Böyle bir hedef, tümöre bağlı makrofajlardır (TAM'lar). Tümör hücreleri tarafından üretilen kemokinler (yani, koloni stimüle edici faktör-1) büyüme faktörlerine bağlı olarak ortaya çıkar (Brigati et al., 2002). TAM'lar katı tümörler de bol bulunur ve tümör ilerlemesini, tümör invazyonu, migrasyonu ve anjiyogenezi teşvik ederek artırır (Pollard 2004). Bu, yüksek TAM infiltrasyonu ve zayıf hasta sonuçları arasında yapılan bir korelasyon ile desteklenmektedir (Bingle et al., 2002). Dahası, bir çok kemoterapötik ilacın terapötik yararları, sistemik sitotoksikite ve doğrudan tümöre iletilen ilaç konsantrasyonlarıyla sonuçlanan, spesifik olmayan sistemik biyolojik dağılımları ile sınırlıdır (Wang et al., 2008).

Kanser hücrelerinin enzim aktivitesinde, apoptoz düzenlenmesinde ve hücre içi ve hücre dışı taşıma mekanizmalarında değişikliğe neden olan biyokimyasal ve metabolik değişiklikler vardır ve bunların hepsi ilaç direncinin hücrel mekanizmalarına katkıda bulunur.

Mevcut araştırmalar, bu engellerin üstesinden gelmek için daha etkin yerel ilaç dağıtımının veya ilaç hedefli tedavilerin geliştirilmesine odaklanmıştır. Yeni terapiler normal dokulara asgari hasarla daha yüksek konsantrasyonlarda tümöre kemoterapötik ilaçlar sunmak üzere tasarlanmaktadır. Örnekler, kanserli hücreler üzerinde sadece eksprese edilen moleküler hedeflere bağlanan monoklonal antikörlerle konjüge edilmiş ilaçlar içerir. Bu, ilacın bağlanmış antikör ile önemli derecede bağlanmayan normal hücrelere maruz kalmasını sınırlarken, spesifik olarak tümöre yönlendirilmesini sağlar. Bununla birlikte çalışmalar, 100.000 intravenöz olarak uygulanan monoklonal antikör başına sadece 1 ila 10 parçanın parankimal hedeflerine *in vivo* ulaştığını ve benzer sınırlamaların moleküler görüntüleme ajanları için yapıldığını göstermiştir (Wang et al., 2008; Ferrari 2005, Li et al., 2004; Win and Feng, 2006). Bu problemlerin üstesinden gelmek için ortaya çıkan yeni bir strateji, ilaç sunumu, tümör terapisi ve farklı görüntüleme yöntemleri kullanılarak tümör takibi için nanoparçacıkların kullanılmasıdır.

Son yıllarda, nanotıp alanında, kanser gibi hastalıkların teşhisi ve tedavisi için yeni nanopartiküllerin geliştirilmesi ile benzeri görülmemiş bir genişleme olmuştur. Nanopartiküller, diğer parçacıklardan daha büyük bir yüzey alanı/hacim oranı elde etmelerine izin vererek küçük boyutları göz önüne alındığında benzersiz biyolojik özelliklere sahiptir. Geniş fonksiyonel yüzey alanı, küçük molekül ilaçları, DNA, RNA ve proteinler gibi diğer bileşikler bağlama, emme ve taşıma olanağı sağlar. Dahası ayarlanabilen boyutları, şekilleri ve yüzey özellikleri, yüksek kararlılık, yüksek taşıyıcı kapasite, hem hidrofilik hem de hidrofobik maddeleri birleştirme yeteneği ve farklı uygulama yollarıyla uyumluluğunu sağlayarak ilaçların birçok yönüyle cazip hale getirilmesini sağlar. Nanoparçacıkların tasarımı (şekil ve boyut) ve malzemenin nihai olarak fizikokimyasal özelliklerini belirleyeceği halde, nanopartiküller genel olarak geniş sıcaklık ve pH aralıkları boyunca nispeten kararlıdır. Bununla birlikte, bazı nanoparçacıkların biyolojik bozunum eksikliği ve yavaş çözülme oranları, özellikle uzun süreli uygulama için, emniyetleri üzerinde endişe yaratmaktadır. Nanopartiküller biyolojik benzeri materyallerden (yani, fosfolipitler, lipidler, dekstran ve kitozan), karbon bazlı materyallerden (örn. Karbon nanotüpleri) ve inorganik nanopartiküllerden (yani, metaller, metal oksitler, ve metal sülfidler), ayrıca yarı iletken nanopartiküller (yani, kuantum noktalar [QDs]) içerir. Bileşime bağlı olarak, hücrelerle olan etkileşimleri tamamen farklı olmaktadır. Nanoparçacıkların hücre yüzeyi ile etkileşimini gösteren şema şekil 2.2'de verilmiştir (Thakor and Gambhir, 2013).

2.2 Nanoteknoloji

Nanobilim, modern bilim içerisinde çok önemli bir araştırma konusudur. Nanoteknoloji, mühendislik, fizik, kimya alanlarında çalışma yapan bilim adamlarına yaşam bilimleri ve sağlık alanındaki uygulamalarındaki çalışmalarda imkan tanıyabilmektedir.

Nanoboyutlu nesnelere ilgili genel kavramları dikkate almak gereklidir. Bir nanonesne en az 1 nm en fazla 100 nm boyutunda boyuta sahip olmalı ve dökme (bulk) materyallere uygun özellikler içerisinde hissedilebilir farklılıkta olmalıdır. Nanoparçacıkların manyetik özellikleri büyük ölçüde boyuta bağlıdır. Bu nedenle bulk materyeller ile karşılaştırıldığında bilim açısından boyutlarında gözle görülebilir bir farklılık bulunmaktadır. Nanoteknoloji, tek nano nesnelere, malzemeler ve onlara dayalı cihazların nanometre aralığında yer alan işlemleri ile ilgilenen bir teknolojidir. Nano malzemeler, anahtar fiziksel özellikleri içerdikleri nano nesnelere tarafından belirlenen malzemelerdir. Nano malzemeler kompakt malzemeler ve nanodispersanlar olarak sınıflandırılır. Birinci tip nano yapıları

malzemeleri içerir ve bunlar izotropik ve makroskopik bileşimdedirler. Nanoyapılı malzemelerin aksine nanodispersiyonlar homojen bir dispersiyon ortamı (vakum, gaz, sıvı ya da katı) ile nanoboyutlu girişimlerin dispersiyonu, ortam içinde dağılmış ve birbirlerinden izole edilmiş bulunmaktadır. Bu dispersiyonlar içerisindeki nano nesnelere arasındaki mesafe bir nanometrenin alt katlarından nanometrenin üst katlarına kadar geniş sınırlar içinde değişebilmektedir (Gubin, 2009).

2.2.1 Manyetik nanoparçacıklar

Manyetik nanoparçacıkların içsel özellikleri, manyetik zorlama, gevşeme ve sıfır sıcaklıktaki dönüş sıralamasına göre sonlu boyuttaki etkileri üzerine vurgu yapılarak gözden geçirilmiştir. Sıfır sıcaklık dönme düzeni üzerindeki etkileri, 3d geçiş metal parçacıkları içerisindeki bant daralmasından dolayı moment artımını, antiferromanyetik oksit parçacıkların çoklu alt ağ durumunu ve demir parçacıklar içerisindeki yüzey spin dönme bozukluğunu içermektedir. (Gubin, 2009).

Metalik nanopartiküller, birçok uygulama için metal oksitlerle karşılaştırıldığında daha büyük mıknatıslanma özelliklerine sahiptir. Ancak metalik manyetik nanopartiküller kararlı değildir ve kolayca oksitlenerek, mıknatıslanmalarının değişmesi veya kaybolması (tam veya kısmi) ile sonuçlanır. Demir (Fe) yüksek manyetik moment yoğunluğuna (yaklaşık 220 emu/g) sahip bir ferromanyetik malzemedir ve manyetik olarak yumuşaktır. 20 nm altındaki boyut aralığında bulunan demir nanopartikülleri süperparamanyetikdir. Tek dağılımlı Fe nanopartiküllerine yol açan prosedürler iyi bilinmektedir. Bununla birlikte, saf demirden oluşan nanoparçacıkların hazırlanması bir hayli karmaşıktır, çünkü genellikle oksitler, karbürler ve diğer safsızlıkları içerirler. Nanopartikül (10.5 nm) halinde saf demir içeren bir numune, Argon atmosferinde metalin buharlaştırılması ve bunu takiben bir substrat üzerine biriktirilmesiyle elde edilebilir. Buharlaşma bir helyum atmosferinde gerçekleştiğinde, partikül boyutu 10-20 nm aralığında değişmektedir. Saf demirin lazer buharlaştırılmasında gaz fazında nispeten küçük (100-500 atom) Fe nanopartikülleri oluşur.

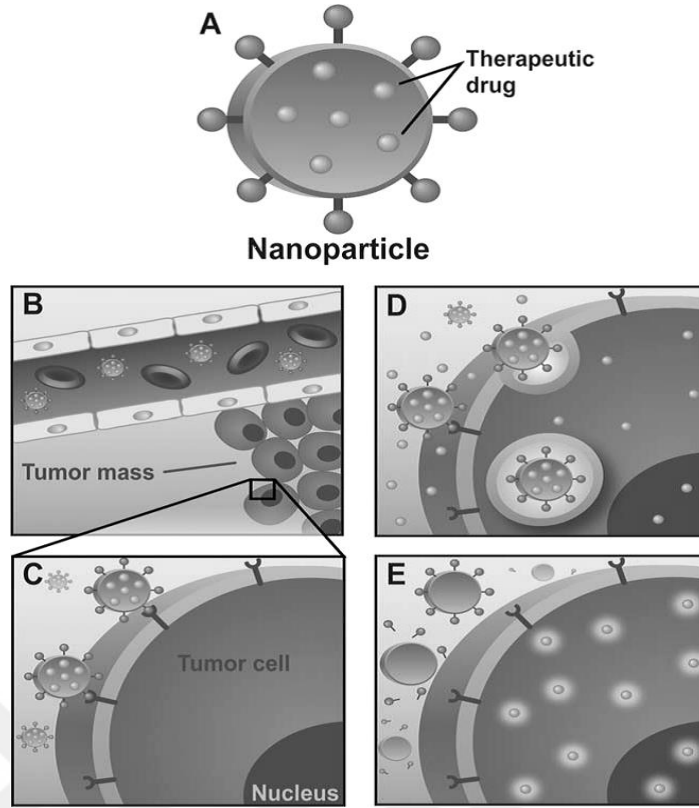
Metalik nanoparçacıkların manyetik özellikleri yüzeyin oksidasyon derecesine bağlıdır. Bu nedenle, nanopartikül oksidasyon derecesinin gerçek bilgisi, elde edilen numunelerin manyetik özelliklerinin tahmini için gereklidir. Bununla birlikte, deneylerin gösterdiği gibi, çoğu zaman zordur. Manyetik metal nanoparçacıklarının sentezi sırasında oksidasyonunun tamamen önlenemeyeceği unutulmamalıdır. Metalin saf bir He ortamında lazerle buharlaştırılmasıyla elde edilen Fe nanopartiküllerin ayrıntılı kütle spektroskopik analizi, en az % 5 partikülün en az bir oksijen atomu içerdiğini ortaya koymuştur. Gaz fazında az

miktarda nanopartikül yüzeyinde bulunan oksijen birikimi bu ‘olağanüstü’ koşullar altında bile önlenemezse, “normal” koşullar altında manyetik metallerin nanopartikülleri her zaman yüzeyde bir miktar oksit içermektedir (Kodama, 2009).

2.2.2 Manyetik nanoparçacıkların ilaç olarak hedeflenebilme özellikleri

İlaç iletimi, nanoteknolojinin kanser tedavisinde devrim yaratmaya yardımcı olduğu önemli alanlardan biridir. Halen geliştirilmekte olan nano ölçekli kompleksler, 2 ana bileşenden oluşur: Taşıyıcı ajan olarak kullanılan nanopartikül ve kemoterapötik ilaç (Ferrari, 2005). İlaç ya nanopartikül kompleksi boyunca adsorbe edilebilir, çözünebilir ya da dağılılabılır ya da alternatif olarak yüzeye kovalent olarak tutturulabilir. İlaç iletimi için nanoparçacıkların mühendislik işlemine ek olarak, kemoterapötik ilaçların kendileri de nanometre düzeyinde formüle edilebilir. Paklitaksel kullanan çalışmalar, geleneksel formülasyonla karşılaştırıldığında, ilacın nanopartikül formülasyonunun hem hücre kültüründe sitotoksitesite profilini hem de canlı bir hayvan modelinde terapötik etkinliğini arttırdığını göstermiştir (Win and Feng, 2006). Bu, ilaç konsantrasyonunun uzun süre asgari etkin değerin üzerinde kalmasını sağlayan, daha büyük biyoyararlanım ve daha uzun süre sürdürülebilir bir terapötik süreye sahip olan nanopartikül formülasyonuna atfedilmiştir. Nanoparçacık-ilaç komplekslerinin, canlı yüklerin doğrudan kanser hücrelerine yüklenmesinde etkili olması için belirli kriterleri yerine getirmelidirler:

- Nanoparçacık, istenen ilacı bağlayabilir veya içermelidir.
- Nanopartikül-ilaç kompleksi, ilacın sistemik olarak verilmesine izin vermek için serumda dengeli kalmalıdır.
- Nanopartikül-ilaç kompleksi tümör hücrelerine (ya reseptör aracılıklı etkileşimler ya da Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutma (EPR etkisi yoluyla) iletilmek zorundadır, böylece hedeflenmemiş doğumdan kaynaklanan istenmeyen komplikasyonları azaltır.
- Nanoparçacık ilacı tümörün bulunduğu yerde bir kez serbest bırakabilmelidir.
- Kalıntı nanoparçacık taşıyıcısı, ideal bir şekilde, biyolojik veya biyolojik olarak inert bir materyalden, sınırlı bir ömre sahip, güvenli bir şekilde bozunmaya izin verecek şekilde yapılmalıdır.
- Alternatif olarak, biyolojik olarak parçalanmayan bir malzeme kullanılıyorsa, ihtiyaç duyulan veya konunun net olduğu dozlarda güvenli olduğu kanıtlanmalıdır.



Şekil 2.2 Nanoparçacık ve hücre yüzeyi arasındaki etkileşimleri gösteren şema(Thakor and Gambhir, 2013).

2.2.3 Demir Nanoparçacıklar

Demir oksitler, manyetik kayıt ortamları, katalizörler, pigmentler, gaz sensörleri, optik cihazlar ve elektromanyetik cihazlar gibi yaygın uygulamalardan ötürü artan bir ilgi görmektedir. Zengin yapı çeşitleri (polimorflar) ve hidrasyon durumlarında bulunurlar. Bu nedenle yakın zamana kadar demir oksitlerin yapısal ayrıntıları, termodinamiği ve reaktivitesi hakkında bilgi eksik olmuştur. Dahası, fiziksel (manyetik) ve kimyasal özellikler, partikül boyutu ve hidrasyon derecesi ile sıklıkla değişir. Tanım olarak, süperparamanyetik demir oksit parçacıkları genel olarak büyüklüğüne göre 30 nm'den daha büyük hidrodinamik çapları gösteren süperparamanyetik demir oksit parçacıkları (SPIO) ve 30 nm'den daha küçük hidrodinamik çaplara sahip çok süperparamanyetik demir oksit parçacıkları (USPIO) olarak sınıflandırılır. USPIO parçacıkları artık yüksek doymuş mıknatıslanma, yüksek manyetik duyarlılık ve düşük toksisite nedeniyle sağlıklı ve patolojik dokular arasındaki gevşeme farklılıklarını arttırmak için kullanılan etkili kontrast maddelerdir. Bu parçacıkların biyolojik dağılımı ve sonuçtaki kontrastı, sentetik yollarına, şekline ve boyutlarına büyük ölçüde bağlıdır. Yüksek kaliteli demir oksit sistemleri üretmek için sentetik yöntemlerin geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Kontrollü boyutlu manyetik nanoparçacıkların sentezi,

bir çok yayında açıklanmaktadır. Yüksek kaliteli demir oksit nanomalzemeleri, yarı iletken kuantum dotlar için kullanılanlara benzer yüksek sıcaklıklı çözelti fazı yöntemleri kullanılarak üretilmiştir. Poliol aracılı, sol-jel ve sonokimyasal gibi diğer sentez yöntemleri de tasarlanabilmektedirler. Manyetik nanokristaller (ve diğerleri) aynı zamanda kuantum dotlar için geliştirilmiş standart yöntemler kullanılarak kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Manyetik nanomalzemelerin özellikleri açısından, küreler, çubuklar, borular, teller, kemerler, küpler, starlike, çiçek benzeri ve diğer hiyerarşik mimarileri içeren farklı morfolojiler çeşitli yaklaşımlarla imal edilmiştir. Son olarak, bazı bakteriler, Fe (III) 'ün azaltılmasını, antropojenik bulaşıkları içerebilen organik materyallerin metabolizmasıyla birleştirir veya solunum esnasında elektron lavabo gibi demir oksitleri basitçe kullanırlar.

Manyetik Fe_3O_4 , tüm demir oksitler arasında, ters spinel yapısında Fe^{2+} ve Fe^{3+} olmak üzere iki değerlik halindeki demir katyonlarının varlığı nedeniyle en ilginç özelliklere sahiptir. Kübik spinel Fe_3O_4 , 858 K'nin altındaki sıcaklıklarda ferromanyetiktir. Bu parçacıklara giden yol çoğunlukla demir tuzlarının (Fe^{2+} ve Fe^{3+}) bir karışımının inert bir atmosfer altında bir baz ile muamele edilmesini içerir. Örneğin, $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ (1:2) solüsyonuna amonyak sulu bir solüsyonu ilavesi, oleik asit ile muamele edilerek bir hekzan solüsyonuna aktarılmış nanopartiküller verir. Tekrarlanan seçici çökeltme, Fe_3O_4 nanoparçacıklarını oldukça dar boyut dağılımı ile verir. Sentez sadece $FeCl_2$ 'den başlayarak yapılabilir, ancak bu durumda, sulu solüsyona alkali dışında belirli miktarda bir oksidan ($NaNO_2$) eklenmelidir. Bu yöntem hem bir parçacık boyutunu (6.5-38 nm) ve parçacık şeklini (bir dereceye kadar) değiştirmeye izin verir. Bazı durumlarda, oksijen yetersiz koşullar altında Fe^{3+} iyonları içeren bileşiklerin termal bozunmasına, Fe^{3+} 'ün Fe^{2+} 'ye kısmi indirgenmesi eşlik eder. Böylece küçük miktarda hekzadekan-1, 2-diol (Fe^{3+} iyonlarının bir kısmının Fe^{2+} 'ye muhtemel indirgeyici) varlığında difenil eter içindeki $Fe(acac)_3$ 'ün termolizasyonu çok ince Fe_3O_4 nanopartikülleri verir (yaklaşık 1 nm); Fazla $Fe(acac)_3$ tepkime karışımına eklenerek büyütülebilir. Fe_3O_4 nanopartikülleri aynı zamanda, $FeCl_3$, etilen glikol, sodyum asetat ve polietilen glikolden oluşan karışımın otoklav ısıtmasıyla yaklaşık 9 nm'lik tek boyutlarda hazırlanabilir. Fe^{3+} iyonlarının kısmi indirgenmesi için, hidrazin de tavsiye edilmiştir. $Fe(acac)_3$ 'ün hidrazin ile reaksiyonu bir yüzey aktif madde varlığında gerçekleştirilir. Bu prosedür, 8 ve 11 nm'lik kontrollü boyutlara sahip süperparamanyetik manyetit nanopartiküllerle sonuçlanmaktadır (Gubin, 2009).

Demir oksit nanoparçacıkları, MR, manyetik hedefleme, hücre ayırma teknikleri, ilaç verme, manyetik olarak aracılık edilen hipertermi (MMH) ve

anemi tedavisinde dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik uygulamalar için araştırılmıştır. MMH'de, demir oksit nanopartiküller enerjiyi alternatif bir manyetik alana (AMF) ısıya, Neel gevşemesi ve Brown dönüşümü yoluyla enerjiye dönüştürür. MMH, 42 - 45°C arasındaki yığın sıcaklık artışını hedefler ve bu durum hücrel etkilere yol açabilir ve MMH kapsamlı olarak incelenmiş olsa da, kliniğe yaptığı çeviri sınırlı olmuştur. Tek katmanlı hücreler veya hücre süspansiyonlarında hipertermi koşullarının sağlanması için *in vitro* olarak tamamlanan MMH çalışmaları, yüksek toplu nanopartikül konsantrasyonlarını (mg/ml düzeyinde) kullanmaktadır ve çoğu *in vivo* deneyler, toplu bir sıcaklık artışı oluşturmak için yüksek lokal konsantrasyonlara ihtiyaç duymaları nedeniyle, nanopartiküllerin tümörlere doğrudan (genellikle deri altı) enjekte edilmesiyle sonuçlanır. Hipertermi koşullarını oluşturmak için bulk sıcaklığının yükselmesine dayanmak yerine, Gordon ve ark. 1979'da hücre zarı tarafından izolasyon ve sıcaklığı tümör dokusundan uzaklaştıran kan akışından konveksiyon eksikliği nedeniyle hücre içi hipertermi daha avantajlı olacağını açıklamışlardır (Gordon et al.). Isı dağılımı, hipertermili küçük metastatik tümörleri tedavi ederken bir takım problemler ortaya çıkarmaktadır. Nanopartiküllerin nano ölçekli ısıtma etkileri Creixell ve ark tarafından gösterildiği gibi hücrel toksisiteyi indüklemeye yeteneğine sahiptir. 2011'de yapılan bir çalışmada, Alternatif Manyetik Alan (AMF) varlığında içe çekilmiş demir oksit nanopartiküllerin ölçülebilir bir sıcaklık artışı olmadan hücre yaşayabilirliklerinde belirgin bir düşüşe yol açtığı gözlemlenmiştir. Bu olay, diğer gruplar tarafından da manganez oksit nanopartikül sistemi kullanılarak gözlemlenmiştir ve parazit enfeksiyonlarına karşı tedavi gibi kanser terapisi dışındaki uygulamalarda kullanılmıştır. Manyetik olarak elde edilen enerji iletimi (MagMED) ifadesi daha sonra manyetik alan enerjisinin, ısı veya döndürme işi gibi diğer formlara, ancak yığın sıcaklığını önemli ölçüde artırmadan dönüştürmesini tanımlamak için kullanıldı. Bu teorik hesaplamaları, Huang ve arkadaşları TRPV1'i eksprese eden hücrelerin zarındaki proteinleri hedef alan demir oksit nanoparçacıklarını yerel olarak ısı ve açık katyon kanalları sağlamak için kullanmıştır (Huang et al., 2013). Yüzeydeki nanopartikül ısıtma, AMF'ye maruz kaldıktan hemen sonra floresan bağlanmış bir termoreponsif florofor kullanılarak teyit edilmiştir.

Bir AMF'deki manyetik nanopartiküllerin yüzey ısıtmasının etkilerine ek olarak, rotasyonel çalışma, MagMED'in deneysel etkilerinin bir açıklaması olarak incelenmiştir. Örneğin; lizozomal permeabilizasyonu indüklemek için mekanik kuvvetler kullanılmıştır. Bu da apoptotik yolları başlatan kathepsinler gibi proteolitik enzimlerin salınımına yol açmaktadır. Sanchez ve diğ. bir G proteinli reseptörün ligandıyla işlevselleştirilen manyetik nanopartiküllerin habis kanser

hücrelerine alındığını ve ölçülebilir sıcaklık artışı olmadan bir lizozom aracılı olarak aracılığıyla apoptozu ve hücre ölümünü indükleyebildiğini kanıtladı (Sanchez et al., 2014). Zhang ve arkadaşları fiziksel nanopartikül rotasyonlarının lizozomal membranları bozup bozmayacağını ve apoptozu indükleyebileceklerini incelemek için aksenlerinde nanopartikül rotasyonlarını başlatmak için bir dinamik manyetik alan üretici geliştirmiştir (Zhang et al., 2014). Nanopartiküllerin lizozomal protein markırı için antikörlerle işlevselleştirilmesiyle salınım yapan torklar tarafından üretilen kesme kuvvetlerinin lizozomal membranlara zarar vermesi için yeterli olduğu tespit edildi ve Magnum-nanoparçacıkların Brown dönüşünün MagMED tedavisinde önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur.

Yukarıda açıklanan termal ve mekanik etkilere ek olarak, demir oksit nanoparçacıklar yoluyla reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, MagMED'in potansiyel bir kimyasal etkisidir. Demir oksit nanopartiküller, Fenton kimyasını kullanan Haber-Weiss reaksiyonunu katalize eder ve bu reaksiyon, biyolojik sistemlerde oldukça reaktif hidroksil kökünün üretildiği önemli bir mekanizma olarak düşünülür. Bu reaksiyon bir AMF ilavesi olmadan devam edilebilmesine rağmen, Wydra ve arkadaşları reaksiyonun bir AMF varlığında demir oksit nanopartikülleri tarafından daha da katalize edildiğini göstermiştir (Wydra et al., 2016). Demir oksit nanopartiküllerinin hücre içi konsantrasyonunu arttırmak ve dolayısıyla MagMED'in etkinliğini arttırmak için manyetik nanopartiküller, hedeflenip hücrelere nüfuz edebilmesi için ligantlar, peptidler veya antikörler ile işlevsel hale getirilmelidirler. Burada, TAT peptidi (sekans: YGRKKRRQRRR) hücre penetrasyon özellikleri ve reseptöre bağlı endositozdan kaçınma yeteneği ve nükleer lokalizasyon sinyali nedeniyle özellikle ilgi çekici olmaktadır. TAT peptidi, karakteristik bir lizin-arginin dizisi içerir ve bu etikete sahip biyomoleküllerin, sitoplazmada, nükleer gözenek kompleksine (NPC) aktif taşımayı kolaylaştırmak için importin- α ve $-\beta$ 'ya bağlandığı bilinir ve yeterince küçük bir yere bağlanırsa molekül veya parçacık, NPC aracılığıyla çekirdeğe yönelebilir (Hauser et al., 2016).

2.3 Florodeoksiglukoz (FDG)

FDG için teori ve kinetik modelleme başlangıçta 2-deoksi-D-glikoz analogisine dayansa da gelişmiş kimyasal analiz yöntemleri FDG metabolizmasının oldukça karmaşık olduğunu göstermiştir. İlk fosforilasyonun ötesinde FDG metabolizmasının keşfi, diagnostik (nükleer) tıpta FDG'nin gelişen kullanım alanına katkıda bulunmaktadır. Örneğin, insanlarda 2-deoksi-2-floro-D-mannoz (FDM) metabolitleri henüz uygulanmamasına rağmen, çeşitli türlerde

metabolik epimerizasyon oluşmuştur ve FDM metabolitlerinin çoğunluğunu oluşturabileceğini bildirmektedir ve belirli zaman aralıklarında dokularda bulunan radyoaktivite, modelin yeniden değerlendirilmesinin uygun olabileceğini düşündürmektedir. FDG yöntemiyle glukoz kullanımının nicelleştirilmesi için güncel kinetik modeller, bu gibi ilave metabolik durumları hesaba katmamaktadır.

Flor, organik moleküllere benzersiz özellikler katar: Büyüklüğü hidrojen ve hidroksil arasında bulunur, polaritesi hidroksilinkine benzerdir ve bir hidrojen verici olarak (hidrojen bağlayıcı olarak değil) hidrojen bağlama kabiliyetine sahiptir. Florlu bileşikler biyokimyasal araştırmalar için caziptir, çünkü biyokimyasal özellikleri bazı açılardan florlanmamış analoglarınıni taklit eder. Florokarbohidrat araması için sentezlenen ilk florokarbonhidrat olan 6-Deoksi-6-floro-D-glukoz'dur (Adamson et al. 1970).

FDG'nin medikal teşhisler ve bölgesel glukoz kullanımının ölçümü için gösterilen uygulanabilirliği (Galagherbm and Atkins, 1977), florlama reaksiyonlarında iyileştirmelere neden olmuştur. Günümüzde nükleofilik yerdeğiştirme reaksiyonlarında ticari olarak temin edilebilen mannoz analoglarından oluşan FDG sentez üniteleri kullanılmaktadır, ancak (Ido et al., 1977) ^{18}F 'in elektrofilik reaksiyonları ise halen bazı yerlerde kullanılmaktadır. (Besell et al., 1973). FDG'nin geçici toksisitesi, hem radyasyon etkilerine hem de ^{18}F çöküşünden kaynaklanan tanımlanamayan geçici kimyasal türlerin biyokimyasal etkilerine bağlanmaktadır. Bununla birlikte, sıçanlarda, MRG çalışmaları için gerekli konsantrasyonların yakınında bulunan ^{19}F -FDG dozlarında 200 mg/kg elektroensefalografik anormallikler (Nakada et al., 1988) ve davranış değişiklikleri (Kanazawa et al., 1996) bildirilmiştir. FDG'nin heksokinaz (Besell et al., 1973) için bir substrat olduğu ve glukoz taşıyıcı GLUT-1 tarafından taşınacağı gösterilmiştir (Brown et al., 1999, Higashi et al., 2000). PET'in hali hazırdaki başarısı, FDG'nin nöroloji, kardiyoloji ve onkolojide tanısal bir ajan olarak yaygın bir şekilde kabul edilmesine bağlanabilir. Sokoloff ve ark. (Sokoloff et al., 1977) farede ^{14}C -2 deoksiglukoz (DG) kullanarak bölgesel glikoz metabolizmasının otoradyografik belirlenmesi için biyokimyasal ve kinetik modeller geliştirmiş ve diğerleri daha sonra DG modelinin insan beyni, kalbi ve bazı tümörlerde glukoz kullanımının belirlenmesinde uygulanabileceğini göstermiştir. Kinetik model, FDG'nin hücrelere (k_1/k_2) ve büyük ölçüde geri döndürülemez heksokinaz aracılı fosforilasyona (k_3/k_4 ; $k_3 \dots k_4$) dönüşebilen, taşınması kolaylaştırılmış bir biyokimyasal modele dayanmaktadır. FDG'den terminal metaboliti olan ^{18}F -FDG-6 fosfatın (FDG-6-P) taşınması sorunu, daha sonraki glukoz taşıyıcılarının bulunmasıyla karmaşık olmasına rağmen orjinal modeller, taşıma yerine geri dönüşü olmayan fosforilasyonla genel kabul

görmüştür. Belki de bugüne kadarki en kritik zorluklar, FDG'nin hücreden kaçmasına (artan k2) izin verecek şekilde glukoz-6-fosfataz ile FDG-6-P'nin FDG'ye muhtemel ters çevrilmesidir. Ek olarak, aktarım aktivitesinin heksokinaz aktivitesine oranları, fosforilasyonun (k3) FDG-6-P birikiminde hız sınırlayıcı adım olmadığı şekilde birleşebilir. FDG-6-P'nin ötesinde FDG metabolizmasının ilk çalışması, FDG-6-P'nin karşılık gelen FDG-fosfoglukonat (FDG-6-PG1)'e anlamlı bir şekilde dönüştürülmediğini ve sıçanlarda *in vivo* Rous sarkom tümörlerinde geçici olarak tanımlanan FDG-nükleotit metabolitlerini içermektedir.

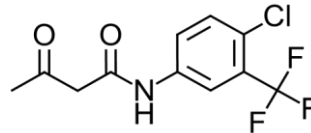
In vivo glukoz metabolizması için modelleme yapmak için MR'da ¹⁹F-FDG kullanma potansiyeli 1980'lerin ortalarından başlayarak bir dizi ¹⁹F-FDG NMR çalışmaları ile devam etmiştir. Farelerde metabolitlerin ¹⁹F NMR analizi yalnızca ¹⁹F-FDG ve ¹⁹F-FDG-6-P varlığını değil, beklenmedik bir şekilde FDM ve 6-fosfat (FDM-6-P)'yi de gösterdi. FDM ve 6-fosfat (FDM-6-P) dokularda ¹⁹F-FDG-6-P'den daha fazladır. ¹⁹F-FDG-6-P'nin fosfor-glukoz izomeraz ile FDM-6-P'ye dönüşümü için kimi çalışmalar mevcuttur. Bu FDG-FDM karşılıklı dönüşümü (6-fosfatları aracılığıyla) denge durumunda FDM lehine 1:4 konsantrasyona ulaştığı gösterilmiştir. Fare beyin çalışmalarında sıçan beyinde bildirilen ¹⁹F-FDG-6-PG1 ve 2-deoksi-2-floro fosfoglukonolakton oluşumu tam olarak anlaşılammıştır. Bununla birlikte, sıçanlarda ¹⁹F-FDG'de olduğu gibi, FDG-6-PG1'in FDG enjeksiyonundan sonra domuz karaciğerinde önemli oranda biriken metabolit olduğu bildirilmiştir ¹⁹F-FDG katabolitinin, 2-floro-2-deoksigliserol oluşumunun ilk ve tek raporu Nakada ve ark. Tarafından bildirilmiştir. Bir başka ¹⁹F NMR çalışması, ¹⁹F-FDG ve FDM'nin heksokinaz, fosfoglikoz izomeraz, fosfoglukomütaz ve uridinedifosfat-glukosepirofosforaz için substrat olduğunu doğrulanmıştır. FDG-6-P, FDM ve FDM-6-P'ye ilaveten altı metabolit (hem ¹⁹F-FDG hem de FDM'nin -1-P, -1,6-di-P ve nükleozid difosfat türevleri) ¹⁹F-FDG dozları sonra sıçan beyinde bulundu. FDG-nükleotit metabolitleri ayrıca bunlar ¹⁹F NMR ile test ve karakterize edilmiştir. Uridin difosfat-FDM'nin önemi hakkındaki NMR kanıtları, dozajlamadan sonra özellikle de daha uzun aralıklarla FDG metabolitlerinin değişken (doku-doku) tutulumunda glikoz-6-fosfataz rolüne rastlanmaktadır. Domuz karaciğindeki FDG metabolizması ile ilgili bu çalışma, daha önceki ¹⁸F ve ¹⁹F çalışmalarının sonuçları da görülmüştür. Mevcut kinetik modeller erken çalışmalar için yeterlidir; buna karşın giderek karmaşık olan metabolik profil, belirli bir dokuda FDG kaynaklı radyoaktivitenin doğru bir şekilde yorumlanması için ek kinetik parametrelerin eklenmesini gerektirir. Çeşitli ayrıntılı FDG incelemeleri ve PET'deki FDG'nin yakın tarihli özeti yayınlanmıştır. Maalesef, bu incelemeler genel olarak glikoz

metabolizmasının mükemmel görüşlerini sunsa da, bugünkü haliyle FDG metabolizmasının kapsamlı bir resmini sunmamaktadır. FDG'nin FDG-6-P'ye basit biyokimyasal modeli, birçok klinik durumda tıbbi görüntüleme ve glukoz tüketiminin tahmini için uygun olabilir, ancak post-FDG-6-P metabolizması göz ardı edilemeyecek bir gerçektir (Pauwels et al., 1998; Muzzi and Neri, 2013).

2.3.1 Fasentin

$C_{11}H_9ClF_3NO_2$ kapalı formülüne sahiptir. Molekül ağırlığı 279,64 g/mol'dür. GLUT 1 reseptörü inhibitörü olarak bilinmektedir. Şekil 2.3'de Fasentin'in açık yapısı görülmektedir.

İskelet kası hücrelerinde GLUT1, antioksidan savunmada rol oynayan glikoz ve dehidroaskopik asitin bazal alımının büyük bir bölümünden sorumludur. GLUT1 aracılı transportu düşürecek koşulların, L6 miyoblastlarda artmış reaktif oksijen türüne (ROS) neden olacağı ve GLUT1 aracılı transportu artıracak koşullar ROS seviyelerinde azalmayla sonuçlanacağını öne sürülmüştür. GLUT1 inhibitörlerinin fasentin ve filoretin'in antimislin A ve süperoksit üretici pirogallol tarafından indüklenen ROS düzeylerini arttırdığı bulunmuştur. Bununla birlikte, GLUT1'i değil GLUT4'ü inhibe eden indinavir, ROS seviyeleri üzerinde hiç bir etkiye sahip değildir. Ataksiya telenjiyektazi mutasyon geçirmiş (ATM) inhibitörleri ve aktivatörleri, daha önce GLUT1 aracılı transportu inhibe ettiği ve arttırdığı gösterildiğinde, sırasıyla ROS düzeylerinde artış ve azalma meydana gelir. Bir ATM hedef sitesinin GLUT1 (GLUT1-S490A) üzerinde mutasyonu, ROS düzeylerini arttırmış ve ATM aktivatörü doksorubisinin ROS düşürücü etkisini engellemiştir. Buna karşılık, GLUT1-S490D'nin ekspresyonu, pirogallol ile mücadele esnasında ROS seviyelerini düşürmüş, ATM inhibe edildiğinde ROS'daki artış önlenmiş ve insülin sinyalizasyonunda ve insülinle uyarılan glukoz taşınımında pirogallol ile indüklenen azalma da önlenmiştir. Birlikte ele alındığında, veriler GLUT1'in ROS'un düzenlenmesinde bir rol oynadığını ve ROS varlığında insülin hareketinin sürdürülmesine katkıda bulunabileceğini düşündürmektedir.



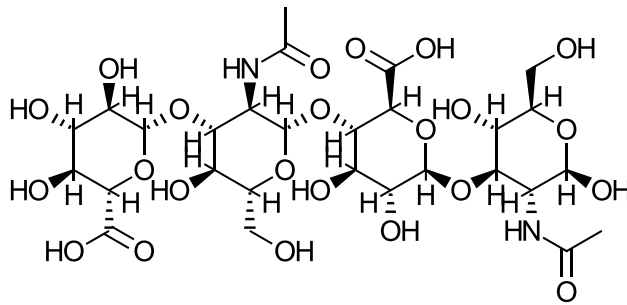
Şekil 2.3 Fasentin'in açık yapısı

Dirençli tümör hücrelerini TNF ailesinde ölüm reseptörlerine ve ligandlarına duyarlı hale getiren, dışsal yolu seçici olarak modüle eden bileşikler

tanımlamak için hücre temelli yüksek verimli bir tarama kullanmıştır (Schimmer et al., 2006). Bu görüntülerde, FLIP mRNA'sının ekspresyonunu azaltarak sensitize hücreleri ölüm ligandlarına 5809354 olarak tespit edilmiştir. Bu görüntüler ayrıca, ölüm ligandlarına seçici olarak sensitize olan ancak FLIP ekspresyonunu azaltmayan yeni FAS duyarlılaştırıcı kimyasal bileşik (N- [4-kloro-3- (triflorometil) -fenil] -3 oksobutanamid fasentin) tespit edilmiştir. Bileşik fasentinin nispeten eşsiz 3-oksobutanilid yapısı bu molekülün olası hücre içi hedefleri hakkında çok az bilgi sağlamıştır. Bu nedenle, bu molekül tarafından etkilenen hedefleri ve yolları daha iyi anlamak için fasentin tedavisinden sonra gen ekspresyonundaki değişiklikleri analiz edilmelidir. Bu deneyler fasentinin besin ve glukoz metabolizması ile ilişkili genlerin ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir. Bu bulguyu temel alarak, fasentinin glukoz metabolizması üzerindeki etkilerini araştırıldı ve bu molekülün glukoz alımını hızla inhibe ettiğini gösterildi. Daha sonraki çalışmalar, fasentinin glukoz alımı inhibisyonunun, hücrelerin ölüm reseptörü uyarılarına duyarlılaşması kabiliyeti açısından işlevsel olarak önemli olduğunu desteklemiştir. Böylece, fasentin, glukoz alımını bloke eden ve hücreleri ölüm ligandlarına hassaslaştırmak için yeni bir mekanizma ortaya koyan, glukoz taşınımının yeni bir inhibitör olduğu ortaya konulmuştur (Wood et al., 2008).

2.4 Hyaluronik Asit

Hyaluronik asit (HA), 1934'te Karl Meyer ve yardımcısı John Palmer tarafından sığır gözünde keşfedilen, yüksek molekül ağırlıklı bir biyopolisakarittir. Hyaluronik asit bakterilerde ve insanlar da dahil olmak üzere daha yüksek hayvanlarda önemli biyolojik fonksiyonlara sahip olan doğal olarak oluşan bir biyopolimerdir. Bağ dokularının çoğunda bulunur ve özellikle gözün vitreus sıvısı olan sinovyal sıvı ve tavuk taraklarında yoğunlaşır. Doğal olarak hyaluronan tarafından sentezlenir ve hyaluronidaz adı verilen bir enzim ailesi tarafından parçalanan bir integral zar proteinleri sınıfıyla sentezlenir. Şekil 2.4'de Hyaluronik Asit'in açık yapısı görülmektedir.



Şekil 2.4 Hyaluronik Asit'in açık yapısı

Hyaluronik asit (HA), tüm organizmalarda doğal olarak bulunan bir karbohidrat, daha spesifik olarak bir mukopolisakkarittir. Diğer moleküllere bağlı olmadığı zaman, suya bağlanır ve "Jello" ya benzer şekilde sert bir viskoz yapıya ulaşır. HA öncelikle hücre dışı matris ve perisellüler matriste bulunur, fakat aynı zamanda hücrelerarası ortaya çıktığı gösterilmiştir. HA'nın biyolojik fonksiyonları arasında, eklem sinovyal ve göz vitreus sıvısı gibi sıvı bağ dokularının elastoviskozitesinin korunması, doku hidrasyonunun ve su taşınmasının kontrolü, hücre dışı matriste proteoglikanların supramoleküler montajı ve hücre ayrılmasında sayısız reseptör aracılı rol vardır. Vücuttaki işlevi, diğer şeylerin yanı sıra, suyun bağlanması ve eklem ve kaslar gibi vücudun hareketli parçalarının yağlanması anlamına gelir. Tutarlılığı ve doku dostu özelliği, cilt bakım ürünlerinde mükemmel bir nemlendirici olarak kullanılmasını sağlar. Hyaluronik Asit doğadaki en hidrofilik (su seven) moleküllerden biridir ve doğanın nemlendiricisi olarak tanımlanabilir.

HA'nın eşsiz viskoelastik doğası, biyolojik olarak uygunluğu ve immünojenitesi olmadığı için artritte eklem sıvısının takviyesi de dahil olmak üzere birçok klinik uygulamada kullanılmasına neden olmuştur. Aynı zamanda göz cerrahisinde cerrahi bir yardımcı olarak ve cerrahi yaraların iyileştirilmesini ve yenilenmesini kolaylaştırmak için kullanılabilir. Daha yakın zamanlarda HA, oftalmik, nazal, pulmoner, parenteral ve topikal dahil olmak üzere çeşitli uygulama yolları için bir ilaç dağıtım maddesi olarak araştırılmıştır.

Hücre dışı bir matris bileşeni olan Hyaluronan, N-asetilglukozamin ve glukuronik asidin disakarit tekrarlarından oluşan yüksek molekül ağırlıklı bir glikosaminoglikandır. Bu nispeten basit yapı tüm memelilerde korunarak HA'nın önemli bir biyomolekül olduğunu önermektedir. Vücutta HA, tuz formunda hyaluronatta bulunur ve cilt, göbek kordonu, sinovyal sıvı ve vitröz mizah da dahil olmak üzere birçok yumuşak bağ dokusunda yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Akciğer, böbrek, beyin ve kas dokularında önemli miktarlarda HA bulunur.

Kimyasal olarak disakaritteki uronik asit ve aminosugar, d-glukuronik asit ve d-N-asetilglukosamindir ve dönüşümlü beta-1,4 ve beta-1,3 glikosidik bağlar vasıtasıyla birbirine bağlıdırlar. Her iki şeker de beta konfigürasyonda, hacimsel olarak glukoz ile ilişkilidir. Bu, gıdaya ait tüm hacimli grupların (hidroksillerin, karboksilat parçasının ve komşu şekerdeki anomerik karbonun) sterik açıdan olumlu ekvatorial konumda olmasına izin verirken, küçük hidrojen atomlarının tamamı sterik olarak uygun eksele pozisyonlar daha azdır. Böylece, disakaritin yapısı enerji bakımından çok karardır.

HA'nın hücrel sentezi eşsiz ve yüksek kontrollü bir süreçtir. Çoğu glukozaminoglikanlar hücrenin Golgi ağlarında yapılır. HA, doğal olarak omurgalıların üç türe sahip hyaluronan sentez adı verilen bir integral zar proteinleri sınıfıyla sentezlenir: HAS1, HAS2, ve HAS3. İkincil yapı tahminleri ve homoloji modellemesi, integral membran proteinini gösterir. Hyaluronan sintaz enzimleri, aktive edilmiş nükleotid şekerleri (UDP = glukuronik asit ve UDP-N-asetilglukozamin) substrat olarak kullanarak artan zincire glukuronik asit ve N-asetilglukozaminin alternatif ilavesi ile hyaluronan tekrarlayan disakarit yapısının geniş doğrusal polimerlerini sentezler.

Memelilerde, HA'nın enzimatik bozunması, üç enzim türünden etkilenir: Hyaluronidaz (hyaz), b-d-glukuronidaz ve β -N-asetil-heksosaminidaz. Genel olarak, hyaz, yüksek molekül ağırlıklı HA'yı küçük oligosakaritlere, β -d-glukuronidaz ve β -N-asetilheksosaminidaz ise, indirgenmeyen terminal şekerleri çıkararak oligosakarit parçalarını daha da parçalamaktadır. Hyaluronan, oligosakaridlerin ve çok düşük moleküler ağırlıklı hyaluronanın bozunma ürünleri, pro-anjiyojenik özellikler sergiler. Hyaluronidaz, interstisyel bariyerin önemli bileşikleri hyaluronik asidin hidrolizini katalize ederek viskozitesini düşürür ve doku geçirgenliğini artırır. Bu nedenle, dağılımını hızlandırmak için tıpta diğer ilaçlarla birlikte kullanılır. En yaygın uygulama, oftalmik cerrahide lokal anestezi ile kombinasyon halinde uygulanmasıdır. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes et pneumoniae* ve *Clostridium perfringens* gibi bazı bakteriler vücudun dokularında hareketliliği artırmak için bir araç olarak hyaluronidaz üretir ve bağışıklık sisteminin fagositler tarafından tanınmasını önleyen antijenik bir kılık değiştirici olarak bulunur.

HA'nın baskın mekanizması bilinmemekle birlikte, *in vivo*, *in vitro* ve klinik çalışmalar, ekzojen HA'nın çeşitli fizyolojik etkilerini göstermektedir. Hyaluronik asit, *in vivo* bazı ilave kondroprotektif etkiler sağlayabilen ve eklem kıkırdağı üzerindeki uzun vadeli etkilerini açıklayabilecek bir takım koruyucu fizyokimyasal işlevlere sahiptir. Hyaluronik asit ağrı ile ilişkili sinir uyarılarını ve sinir duyarlılığını azaltabilir. Deneysel osteoartritte bu glikozaminoglikan, kıkırdak üzerinde koruyucu etkilere sahiptir. Ekzojen hyaluronik asidin kıkırdağa dahil olduğu bilinmektedir. Exogenous HA, kondrosit HA ve proteoglikan sentezini artırır, proinflamatuvar mediatörlerin ve matris metalloproteinazların üretimini ve aktivitesini düşürür ve bağışıklık hücrelerinin davranışını değiştirir. Bu işlevler, reaktif oksijen türevi serbest radikallerin temizlenmesinde, polimorfonükleer hücrelere bağışık kompleks yapışmasının önlenmesinde, lökosit ve makrofaj göçünün ve agregasyonun inhibisyonunda kendini gösterir. Hyaluronan oldukça higroskopiktir ve bu özelliğin doku hidrasyonunu ve ozmotik

dengeyi modüle etmek için önemli olduğu bilinmektedir. Pasif yapısal bir molekül olarak işlevine ek olarak, hyaluronan hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşerek ve hücre proliferasyonunu, göçünü ve farklılaşmasını düzenleyerek sinyalleme molekülü olarak da işlev görür. Hyaluronan embriyogenez için gereklidir ve muhtemelen tümörigenezde de önemlidir (Necas et al., 2008).

2.5 İşaretlemede Kullanılan Yöntemler

2.5.1 İyot ve izotopları

İyot, sembolü I, atom numarası 53 olan bir elementtir. Kimyasal olarak iyot halojenlerin en az reaktif olanı, astatin'den sonra en elektropozitif olanıdır. İyotun 37 izotopu vardır, bunlardan bir tek ^{127}I kararlıdır.

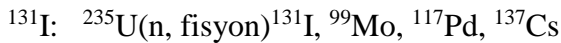
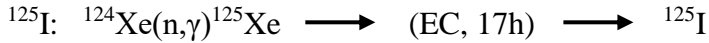
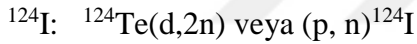
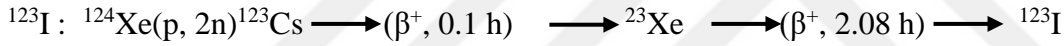
^{129}I pek çok bakımdan ^{36}Cl 'ya benzer. Çok az çözünür, az reaktiftir, ve nükleer reaksiyonlardan meydana gelir. $^{36}\text{Cl}/\text{Cl}$ oranı gibi, doğadaki $^{129}\text{I}/\text{I}$ oranı da çok düşüktür. ^{36}Cl 'dan farklı olarak ^{129}I 'un yarı ömrü daha uzundur (15,7 milyon yıl), canlılara alınma eğilimi yüksektir ve farklı kimyasal özelliklere sahip çeşitli iyonik şekillerde bulunmaktadır (I^- ve IO_3^-). Bu yüzden ^{129}I kolaylıkla biyosfere girebilir. 1960'larda ve 1970'lerde, termonükleer deneylerin yoğun olarak yapıldığı yıllarda, ^{129}I sadece doğal iyotun yaklaşık 10^{-7} 'sini oluşturmuştur. Uyarılan iyot-127 ve iyot-129, Mössbauer spektroskopisinde sıklıkla kullanılır. Diğer iyodin radyoizotoplarının yarılanma ömrü çok daha kısadır. Bazıları vücuda giren iyotun depolandığı ve konsantre olduğu tiroid bezini ilgilendiren tıbbi uygulamalar için kullanılmaktadır. İyot-123 yarı ömrü 13 saattir ve elektron yakalama ile gama ışınımı yayan tellür-123'e kadar bozunur. Tek foton emisyon bilgisayarlı tomografisi (SPECT) ve X-ışını bilgisayarlı tomografisi (X-Ray CT) taramaları da dahil nükleer tıp görüntüleme için kullanılır. İyot-125 yarı ömrü 59 gün, elektron yakalaması ile tellür 125'e kadar bozunur ve düşük enerjili gama ışınımı yayar. Yarı-ömrü 8 gün olan iyot-131, beta/gama ışınımı yayarak zemin durumuna dönen uyarılmış statik xenon-131'e kadar bozunur. Ortak bir fisyon ürünüdür ve bu nedenle radyoaktif serpintide yüksek seviyelerde bulunur. Daha sonra kontamine yiyecek yoluyla emilebilir ve tiroid de birikebilir. Bozunuyorsa, tiroid hasarına neden olabilir. İyot-131 düzeyinin yüksek olmasından kaynaklanan birincil risk, sonraki yaşamda radyojenik tiroid kanseri şansının ortaya çıkmasıdır. Diğer riskler, kanserli olmayan büyüme ve tiroidit olasılığını içerir. İyot-131'in olumsuz etkilerine karşı olağan koruma araçları, günlük optimum propilaksi için alınan potasyum iyodür tabletleri şeklinde tiroid bezini dengeli iyot-127 ile doymuş hale getirmektedir. Bununla birlikte, iyot-131, radyasyon tedavisinde tıbbi amaçlar için de kullanılabilir, Ayrıca radyoaktif bir izleyici olarak da

kullanılabilmektedir (Greenwood and Earnshaw, 1997). Çizelge 2.1’de ve şekil 2.5’de iyot bazı izotoplarına dair reaksiyon şemaları ve bilgiler verilmektedir.

Çizelge 2.1 İyot izotoplarından bazılarının üretimi, bozunma cinsi, yarı ömrü ve uygulamaları hakkında genel bilgi

İzotop	Üretim	Bozunma cinsi	Yarı Ömrü	E γ /E β^a	Spesifik Aktivitesi ^b	Uygulamaları
¹²³ I	Siklotron	EC	13.2 saat	159/--	>600 ^c	Görüntüleme
¹²⁴ I	Siklotron	EC/ β^+ (25%)	4.18 gün	603/1530	>30 ^d	Görüntüleme
¹²⁵ I	Nükleer Reaktör	EC	59.4 gün	35/--	90	<i>In vitro</i> ve terapi
¹³¹ I	Nükleer Reaktör	β^-	8.04 gün	364/606	100	Görüntüleme ve terapi

a: keV/keV, b: GBq mmol, c: 8,780, d: 1,147



Şekil 2.5 İyot izotoplarının bozunma türleri ve yarı ömürleri

2.5.2 Radyoiyodinasyon ve Radyoaktif ¹³¹I ile İşaretleme

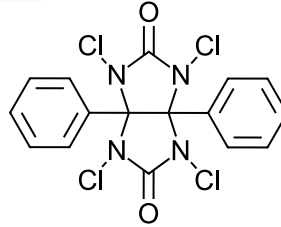
Radyoiyodinasyon, iyot izotoplarının hedef moleküllere radyoişaretlenmesi sırasında günümüzde sıkça kullanılan bir yöntemdir. İyot radyoizotoplarının yaydıkları radyasyon tipi ve enerjileri işaretlemede kullanımlarını kolaylaştırmaktadır.

Proteinlerin, glikoproteinlerin ve peptidlerin radyoizotodinasyonunda yeni ve piyasada bulunan 1,3,4,6-tetrakloro-3a, 6a-difenil glikolüril (İodojen), kloramin-T ve katı fazlı İaktoperoksidaz ile karşılaştırılmıştır. Düşük seviyeli iyotlamaların gerçekleştirilmesi için bir yöntem tarif edilmiş ve maksimum ¹²⁵I birleşmesini belirlemek için kullanılmıştır. İyotlanmış proteinler analitik jel filtrasyon

kolonlarında ve peptidlerinde ters fazlı yüksek performanslı sıvı kromatografisiyle saflaştırılmıştır. Radyoimmunoassay'in sunulmasından bu yana, pikomole ait protein ve peptitlerin konsantrasyonunu ölçmek için yüksek spesifik aktivite izleyicilerine ihtiyaç duyulmaktadır. En yaygın olarak kullanılan radyoaktif işaret ^{125}I 'dir ve bu radyoaktif eteki içeren izleyicilerin yeterli preparatları yapılacaksa, iyotlama mekanizması düşünülmelidir. PH 7 ile 8 arasında, peptidlerin ve proteinlerin tirozin aromatik halkasındaki orto konumu, komşu hidroksil grubunun elektron verici etkisinden dolayı elektrofilik saldırı için aktive edilir. Benzer şekilde, pH 9 da, histidin imidazol halkasındaki iki azot atomu karşılıklı komşu karbon atomu üzerinde bir elektron verici etkiye sahiptir. İyotlu iyon (I^+) formundaki iyot, radyoaktif işaretlenmiş izleyici vermek için elektrofilik ajan olarak görev yapar (Kienhuis et al., 1991).

2.5.3 İodojen yöntemi

İodojen olarak bilinen 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril, radyoiodinasyon çalışmalarında, yükseltgen ajan olarak kullanılan bir maddedir. Moleküler yapısı şekil 2.6'da verilen iodojen, ilk olarak 1978 yılında Fraker ve Benek tarafından, protein ve hücre membranı radyoiodinasyonunda kullanılmıştır (Ünak et al., 2001). Kolay uygulanabilir olması ve ligandın kimyasal yapısını değiştirmemesi ve nedenleriyle sık tercih edilen bir yöntemdir.



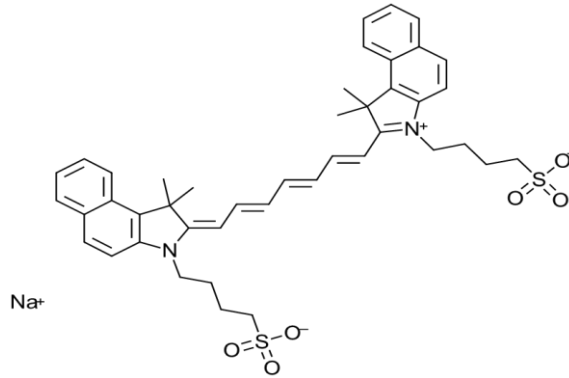
Şekil 2.6 İodojen'in açık yapısı

2.5.4 Indocyanine green (ICG) ile optik işaretleme

Indocyanine green (ICG) tıbbi teşhiste kullanılan bir siyanin boyadır. Kalp debisi, karaciğer fonksiyonu ve karaciğer kan akımı ve oftalmik anjiyografi için kullanılır. Yaklaşık 800 nm'de tepe spektrum emilimine sahiptir. Bu kızıl ötesi frekanslar, retinal katmanlara nüfuz eder ve ICG anjiyografinin floresan anjiyografiden daha derin dolaşım modelleri görüntülemesine izin verir. ICG, plazma proteinlerine sıkıca bağlanır ve vasküler sistemle sınırlı kalır. ICG'nin yarı ömrü 150 ila 180 saniye arasındadır ve dolaşımdan sadece karaciğer tarafından safra suyundan uzaklaştırılır. ICG, tıpta kalp, dolaşım, karaciğer ve oftalmik koşullarda bir indikatör madde (örn. fotometrik hepatik fonksiyon teşhisi ve floresan anjiyografisi) olarak kullanılan floresan bir boyadır. Damar içinden

verilir ve karaciğerin performansına bağlı olarak yaklaşık yarım ömrü olan 3-4 dakika vücuttan atılır. ICG sodyum tuzu normalde toz halindedir ve çeşitli çözücüler içerisinde çözülebilir; % 5 (partiye bağlı olarak <% 5) sodyum iyodür genellikle daha iyi çözünürlüğü sağlamak için eklenir. Bir su-ICG solüsyonunun steril liyofilizatı birçok Avrupa ülkesinde ve Birleşik Devletlerde ICG-Pulsion ve IC-Green adlarıyla intravenöz kullanım için bir teşhis olarak onaylanmıştır.

ICG, İkinci Dünya Savaşı'nda fotoğrafçılıkta bir boya olarak geliştirildi ve 1957'de Mayo Clinic de insan tıbbında kullanım için test edildi. 1959'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı alındıktan sonra, ICG başlangıçta hepatic işlev tanılarında ve daha sonra kardiyolojide kullanıldı. 1964 yılında S. Schilling, ICG'yi kullanarak böbrek kan akışını belirleyebildi. 1969 yılından itibaren ICG, gözdeki subretinal süreçlerin (koroidde) araştırılması ve teşhisinde de kullanıldı. 1980'den sonraki yıllarda yeni kamera türlerinin geliştirilmesi ve daha iyi film malzemesi veya yeni fotometrik ölçüm cihazları birçok teknik zorluğu ortadan kaldırdı. Bu arada ICG'nin tıpta kullanımı (ve özellikle oftalmolojide floresan anjiyografide) standart olarak belirlendi. Floresan anjiyografiyi açıklarken, NA floresan anjiyografi ile ICGA/ICG floresan anjiyografisi arasında da bir ayrım yapılmaktadır. ICG ile ilgili yaklaşık 3.000 bilimsel makale şimdi dünya çapında yayınlanmıştır (Alander et al., 2012). Şekil 2.7'de ICG'nin açık yapısı verilmiştir. Bu yapıya bakılarak, ICG'nin sahip olduğu floresans özelliğinin üzerindeki elektron hareketiyle ortaya çıktığı söylenebilir.



Şekil 2.7 ICG' nin açık yapısı

2.6 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler

2.6.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)

Bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Hareketli faz, örnek bileşenlerini, sabit faz (kolon-tabaka) boyunca taşıyan, çeşitli fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip çözeltiler veya çözücü karışımlarıdır. Sabit faz, mobil faz içerisinde gelen örneğe ait bileşenlerin etkileşime girdikleri ve belirli ölçüde alıkonuldukları fazdır.

Kolon olarak adlandırılan sabit fazlar kromatografi tekniğinin çeşidine göre tasarlanarak çok değişik materyallerden çok farklı ölçülerde imal edilmektedir. İnce tabaka kromatografisinde kolon olarak silika jel ya da selüloz kaplı tabakalar kullanılmaktadır. Özellikle gaz ve sıvı kromatografileri için ticari boyutta oldukça fazla marka ve boyutta kolon üretimi yapılmaktadır.

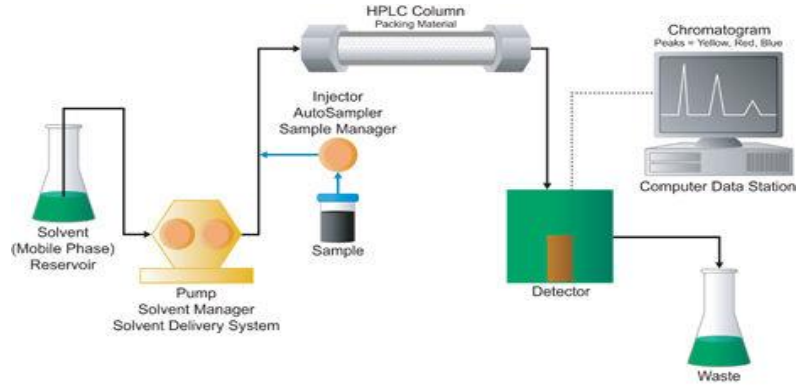
İnce tabaka kromatografisi basit ve kolayca yapılabilir. Kullanılan materyaller genelde ucuzdur. Genellikle bir maddenin bileşenlerini ayırmak ve saflığını belirlemek için kullanılmaktadır. İlaç, boya, gıda gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Radyoaktif maddelerin bağlanma verimlerine ve alıkonma faktörlerine yönelik yapılan uygulamalar için kullanılan yöntem ince tabaka radyo kromatografisi (TLRC) denmektedir. İnce tabaka kromatografisinde sabit faz (absorban) olarak silika jel ya da selüloz kaplı plakalar kullanılmaktadır. Bu plakalar genelde 0.1-5 mm kalınlığındadır. Hareketli faz olarak ise çeşitli solventler tek başına da belli oranlar da karıştırılarak kullanılmaktadır. İşlem sırasıyla kromatografi tankına hareketli fazın konması, 15 dk buhar dengesinin sağlanması, uygun boyutlarda kesilen tabakalara işaretlenmiş maddelerin tabandan 0.5-1 cm mesafe bırakılarak mikro pipet ya da kapiler yardımıyla damlatılması ve tankın içerisine tabakaların (damlatılan bölüm hareketli fazın içerisine gelecek şekilde) dik bir şekilde bırakılması ile sonlanmaktadır. Ağzı kapatılan tankın içerisinde bulunan tabakaların üzerinden hareketli fazın belli bir mesafeye (genelde % 90) yürümesiyle işlem sonlandırılmaktadır. Tank içerisinden bir pens yardımıyla dikkatlice çıkarılan tabakalar, hareketli fazın yürümüş olduğu sınırdan işaretlenerek kurumaya bırakılır. Daha sonra Bioscan2000 TLRC tarayıcı yardımıyla analizi yapılarak bağlanma verimi ve R_f (Retention Factor) değerleri elde edilir (Yurt Kilcar and Biber Muftuler, 2014).

2.6.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

1900'lü yılların başında Rus botanikçi Mikhail S. Tswett, bitki pigmentlerini kalsiyum karbonat dolgulu cam sütunlar kullanarak Sıvı Kromatografisi ile ayırdı.

Sıvının paketlenmiş sütunlardan akmasına izin vermek için yüksek basınç gerektiğinden, HPLC ilk olarak Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi olarak anılmıştır. Bununla birlikte, enstrümantasyon ve paketleme malzemelerindeki gelişmeler devam ederken adı daha önce bilinen teknikler üzerinde karmaşık moleküllerin ayrıştırılması, tanımlanması, saflaştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde iyileştirmelere yol açan Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi olarak değiştirildi. Pompa teknolojisindeki gelişmeler, mobil faz kompozisyonunda daha fazla kontrol ve esnekliğe katkıda bulundu. İzokratik işlem, analitik çalışma boyunca aynı mobil faz kompozisyonunu korurken, dereceleme yıkama modu, analiz gerekliliklerine göre kompozisyon programlamasına izin vermektedir.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir karışım içindeki bileşenleri ayırmak için kullanılan kromatografik bir sistemdir. Bir sütun içindeki katı adsorban maddelerden (kolondan), sıvı fazın geçirilmesi ve bunun sonucunda örneklerin sürüklenmesi olayıdır. Sürüklenme sırasında, kolon ile etkileşime giren örnek bileşenlerinin etkileşimleri zayıf ise kolon dışına çıkması kısa sürede, etkileşimleri güçlü ise uzun sürede olmaktadır. Bu durum sürüklenme farklılıkları yaratarak, kromatogramda farklı pikler elde edilmesini sağlamaktadır Yüksek performanslı bir sıvı kromatografinin temel bileşenleri şekil 2.8'de gösterilmiştir. Enstrüman aşağıdakileri içerir: Eluent: Hareketli faz için kaplar, eluent ve numuneyi taşımak için bir pompa, numunenin verilmesine izin vermek için bir enjeksiyon cihazı, çözünen madde ayrımını sağlayan bir sütun, ayrılmış bileşenler, kullanılan çözücü için bir atık kabı ve sonunda, sonuçların yorumlanmasında ve saklanmasında yardımcı olan bir veri toplama cihazı. Ayrıca sisteme çalışma koşullarına göre bir çok dedektör dahil edilebilir. Başlıca çeşitleri; ateş iyonizasyon dedektörü, UV dedektör, floresan dedektörü, ısı iletkenlik dedektörü, elektron yakalama dedektörü, refraktif indeks (kırılma indis) dedektörü, kiral dedektör, ateş fotometrik dedektör, aerosol tabanlı dedektör, atomik-emisyon dedektörü, kütle spektrometresi (MS) dedektörü, nitrojen fosfor dedektörü, evaporatif ışık saçılması dedektörü, radyoakım dedektörü (radyoaktivite için) ve fotoiyonizasyon dedektörü şeklindedir (Huber, 1978).



Şekil 2.8 HPLC cihazının temel bileşenleri (Sirard, 2012)

2.7 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir. Pratikte hücre kültürü terimi, çok hücreli ökaryotlardan özellikle hayvan hücrelerinden kaynaklanan hücrelerin kültürlenmesi için kullanılmaktadır. Hücre kültürleriyle yapılan çalışmalar günümüzde popüler araştırma konularında önemli bir kısmı oluşturmaktadır. Örneğin, kanser gibi çeşitli patolojik durumlarda belli bir maddenin etkilerini ya da bir hücre veya dokuda üretilen belli bir maddenin işlevlerini belirlemek amacıyla hücre kültürleri yapılabilmektedir. Hücre kültüründe belirli bir hücre hattından çoğaltılan hücrelerde çeşitli çalışmalar yapılarak canlı ortamında (*in vivo*) yapılamayan denemeler yapılabilir ve buradan yola çıkılarak sonuçlara ulaşılabilir. Hücre kültürü, hücrelerin genellikle doğal çevrenin dışında kontrollü koşullar altında yetiştirildiği süreçtir. Hücre kültürü koşulları her hücre tipi için değişebilir, ancak suni ortamlar gerekli besin maddelerini (amino asitler, karbonhidratlar, vitaminler, mineraller), büyüme faktörleri, hormonları ve gazları (CO_2 , O_2) sağlayan substrat veya ortam içeren uygun bir kap'tan oluşur ve fizikimyasal ortamı (pH tamponu, ozmotik basınç, sıcaklık) düzenler. Çoğu hücre bir yüzey veya yapay bir substrat (yapışık veya tek katmanlı kültür) gerektirirken, diğerleri kültür ortamında yüzen olarak yetiştirilebilir. Uygulamada, "hücre kültürü" terimi, bitki doku kültürü, mantar kültürü ve mikrobiyolojik kültür gibi hücreleri de büyüten diğer kültür türlerinin aksine, çok hücreli ökaryotlardan, özellikle hayvan hücrelerinden türetilen hücrelerin kültürlenmesine atıfta bulunmaktadır. Hücre kültürünün tarihsel gelişimi ve yöntemleri, doku kültürü ve organ kültürü ile yakından alakalıdır. Virüs kültürü, virüslere ev sahipliği yaptığı hücrelerle de ilişkilidir. Orijinal hücre kaynaklı dokularından ayrılan canlı hücre hatlarını (tek bir hücreden inen ve aynı genetik yapıyı içeren bir hücre popülasyonu) tutan laboratuvar tekniği 20. yüzyılın ortalarında daha sağlam olmuştur (Freshney, 2010).

Hücreler, çeşitli şekillerde *ex vivo* kültür için dokulardan izole edilebilir. Hücreler kandan kolayca arındırılabilir. Bununla birlikte, sadece beyaz hücreler kültürde büyüme özelliğine sahiptir. Mononükleer hücreler, yumuşak dokulardan, hücre dışı matrisi parçalayan kollajenaz, tripsin veya pronaz gibi enzimlerle enzimatik sindirim yoluyla salınabilir. Alternatif olarak, doku parçaları büyüme ortamına yerleştirilebilir ve büyüyen hücreler kültür için kullanılabilir. Bu yöntem eksplant kültürü olarak bilinir. Doğrudan bir denekten kültürlenmiş hücrelere primer hücreler denir. Bazılarının tümörlerden türetilmesi dışında, birincil hücre kültürlerinin çoğunun ömrü kısadır. Yerleşik veya ölümsüzleştirilen bir hücre hattı, rastgele mutasyon veya telomeraz geninin yapay olarak eksprese edilmesi gibi kasti modifikasyonlar yoluyla sınırsız çoğalma yeteneğini kazanmıştır (Wilson and Hunt, 2003).

İzole edilmiş primer hücrelerin çoğunluğu yaşlanma sürecine girerler ve belirli bir sayıda çoğalma ardından bölünmeyi durdururlar. Hücreler, bir hücre inkübatöründe uygun bir sıcaklık ve gaz karışımında (tipik olarak, 37°C, memeli hücreleri için %5 CO₂) yetiştirilir ve muhafaza edilir. Kültür koşulları, her hücre tipi için çok değişir ve belirli bir hücre türü için koşulların değişimi, farklı fenotiplere neden olabilir. Sıcaklık ve gaz karışımının yanı sıra, kültür sistemlerinde en çok değişen faktör hücre büyüme ortamıdır. Büyüme medyası için tarifler, pH, glukoz konsantrasyonu, büyüme faktörleri ve diğer besin maddelerinin varlığında değişiklik gösterebilir. Ortamı tamamlamak için kullanılan büyüme faktörleri genellikle fetal sıgır serumu (FBS), sıgır buzağı serumu, at serumu ve domuz serumu gibi hayvan kanından elde edilir. Bu kan türevi bileşenlerin bir komplikasyonu, özellikle tıbbi biyoteknoloji uygulamalarında kültürün virüslerle veya priyonlarla kirlenmesi olasılığıdır. Hali hazırdaki uygulama bu maddelerin kullanımını mümkün olduğunca en aza indirmek veya ortadan kaldırmak ve insan trombosit lizatı (HPL) kullanmaktır. Bu, insan hücreleri ile FBS kullanırken çapraz tür kontaminasyonu endişesini ortadan kaldırır. HPL, FBS ya da diğer hayvan serumlarının direkt replasmanı olarak güvenli ve güvenilir bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Buna ek olarak, kimyasal olarak tanımlanmış ortamlar herhangi bir serum izini (insan veya hayvan) yok etmek için kullanılabilir, ancak bu her zaman farklı hücre tipleriyle başarılıdır. Kaplama yoğunluğu (kültür ortamının hacmi başına hücre sayısı) bazı hücre tipleri için kritik bir rol oynamaktadır. Örneğin, daha düşük bir kaplama yoğunluğu, granüloza hücrelerini östrojen üretmesini sağlarken, daha yüksek bir kaplama yoğunluğu onları progesteron üreten theca lutein hücreleri olarak ortaya çıkarmaktadır. Hücreler, süspansiyon veya yapışık kültürlerde yetiştirilebilir. Bazı hücreler, doğal olarak kan dolaşımında bulunan hücreler gibi

bir yüzeye yapışmadan süspansiyon halinde yaşarlar. Süspansiyon kültürlerinde hayatta kalabilmek için modifiye edilmiş hücre hatları vardır, bu nedenle yapışık koşulların sağlayabileceğinden daha yüksek yoğunlukta yetiştirilebilmektedir. Yapışık hücreler yapışma özelliklerini arttırmak ve büyüme ve farklılaşma için gerekli olan diğer sinyalleri sağlamak için hücre dışı matris (kollajen ve laminin gibi) bileşenlerle kaplanabilen doku kültürü plastik veya mikro taşıyıcı gibi bir yüzey gerektirirler. Katı dokulardan elde edilen çoğu hücre yapışiktır. Yapışkan kültüre ait bir başka tip organotipik kültürdür ve iki boyutlu kültür bulaşıkları yerine 3 boyutlu (3 boyutlu) bir ortamda hücrelerin büyümesini içerir. Onun 3B kültür sistemi biyokimyasal ve fizyolojik olarak *in vivo* dokuya daha benzer, ancak birçok faktörden dolayı teknik açıdan bakımı zordur (Portela et al., 2010).

2.8 Biyodağılım

Biyodağılım, bileşiklerin deneysel bir hayvanda veya insanda nerede bulduklarını izlemek için kullanılan bir yöntemdir. Örneğin, PET (pozitron emisyon tomografisi) taraması için yeni bileşiklerin geliştirilmesinde bir radyoaktif izotop kimyasal olarak bir peptit (bir proteinin alt birimi) ile birleştirilir. Bu belirli izotop sınıfı, pozitronlardır (ki bunlar antimadde parçacıklardır, kütle elektrona eşit, ancak pozitif bir yük ile). Çekirdekten çıkan pozitronlar bir elektronla karşılaşır ve zıt yönde ilerleyen iki gama ışını üreten yokoluşa uğrarlar. Bu gama ışınları bir standartla karşılaştırıldığında ölçülebilir ve nicelenir. Örneğin, yeni bir bileşik, 16-20 kemirgen grubuna (tipik olarak fare veya sıçan) intravenöz olarak enjekte edilir. 1, 2, 4 ve 24 saatlik aralıklarla hayvanların küçük grupları (4-5) ötenazi yapılır, daha sonra parçalanır. Önceden tartılmış kaplara, ilgili organlar (genellikle kan, karaciğer, dalak, böbrek, kas, yağ, adrenaller, pankreas, beyin, kemik, mide, ince bağırsak ve üst ve alt ince bağırsak vb) konular. Sonra gama ışınımını ölçen bir cihaza yerleştirilir. Sonuçlar, bileşiğin hayvan üzerinde nasıl hareket ettiğini dinamik bir görünüm kazandırır. Kullanışlı bir bileşik, bazı vücut parçalarının veya tümörlerin (düşük dozlarda radyoaktivitede) medikal görüntüleme veya tümörlerin (yüksek dozda radyoaktivitenin) tedavisi için kullanılabilir.

Gen terapisinde, virüsler gibi gen iletim vektörleri ya partikül biyodağılımına ya da transdüksiyon modeline göre görüntülenebilir. İlki virüsleri bir kontrast maddesi ile etiketlemektir. Bazı görüntüleme yöntemlerinde kullanılabilirler (örneğin MR veya SPECT / PET). İkinci yöntem ise, gen iletim vektörünün işaretleyici genini imünohistokimyasal yöntemlerle, optik görüntüleme yöntemleriyle görselleştirmektir. Görüntüleme donanımı kliniklerden araştırma amaçlı olarak kullanılmaya başlandığından, non-invaziv görüntüleme

popülerlik kazanmıştır. Örneğin, avidin görüntülenen bakulovirüsler, biyotinlenmiş demir parçacıkları ile kaplanarak sıçan beyinlerinde görüntülenerek MR görüntüleme de görünür hale getirilebilir (Raty et al.,2006).



3. MATERYAL VE METHOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- Demir(III) Klorür (% 97 FeCl₃) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum Sülfid Na₂SO₃ (Merck Millipore)
- Amonyak (% 25 NH₃) (Merck Millipore)
- Hidroklorik Asit (% 37 HCl) (Merck Millipore)
- Etanol (% 96 C₂H₅OH) (Teksan Solvent)
- Mannoz triflat (% 98 β-D-Mannopiranoz 1,3,4,6-tetra-O-asetat 2-O triflorometansülfonat) (Sigma-Aldrich)
- Etilendiamin (% 97 N,N'-Bis(2-hidroksetil)etilendiamin) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum siyanoborhidrür (% 95 NaCNBH₃) (Sigma-Aldrich)
- Dimetil formamid (% 99,8 DMF) (Merck Millipore)
- Hyaluronik Asit (Sodium salt from Streptococcus equi) (Sigma-Aldrich)
- Tetraetil ortosilikat (TEOS) (Merck Millipore)
- 3-Aminopropil trietoksi silan (APTES) (Sigma-Aldrich)
- N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC) (Sigma-Aldrich)
- N-hidroksisüksinimid % 98 (NHS) (Sigma-Aldrich)
- 2-Merkapto etanol (Fluka)
- Kryptofix % 98 (4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10 diazabicyclo [8.8.8] hexacosane) (Sigma-Aldrich)
- Potasyum karbonat (K₂CO₃) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum Florür (NaF) (Fluka)
- Dowex 50 katyon reçine (Sigma-Aldrich)
- Ambersep 900 OH anyon reçine (Fluka)
- Amberlite anyon değişim reçine (Sigma-Aldrich)
- C-18 pre kartuş (Sep-pak) (Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge, 360 mg Sorbent per Cartridge, 55-105 µm Particle Size, 50/pk [WAT020515]) (Waters)
- 1,1-Karbonildiimidazol (CDI) (Sigma-Aldrich)
- Indocyanine green (ICG) (Sigma-Aldrich)
- Fasentin % 98 (N-[4-kloro-3-(triflorometil)fenil]-3-oksobütanamid) (Sigma-Aldrich)
- Asetonitril (Chromasolve) (Sigma-Aldrich)

- Dekstroz monohidrat % 20 (Medifleks)
- MCF7 insan meme (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- PC-3 insan prostat (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Lonza)
- L-Glutamine (Lonza)
- Essential amino acid (Lonza)
- Sodyum pruvat (Lonza)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Penisilin/streptomisin (Lonza)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- PBS (Amresco)
- Tripsin EDTA (Lonza)
- Dimetilsülfoksit (CH₃)₂SO (Merck Millipore)
- BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay kit (Thermo ScientificPierce)
- Sintilasyon Kokteyli (Sigma-Aldrich)
- Piridin (Sigma-Aldrich)
- Azur Metilen Blue (Merck)
- Sükröz (Merck)
- Paraformaldehit (Sigma-Aldrich)
- Toluen (Merck)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Brand Transfer Pipetleri (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Thermo Scientific Transfer Pipetleri (Finnpipette) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sentez Ünitesi (Heildolph MR-Hal End Starfish Workstation) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Vorteks Cihazı (Heildolph Reax Top) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (IKA RCT Basic) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

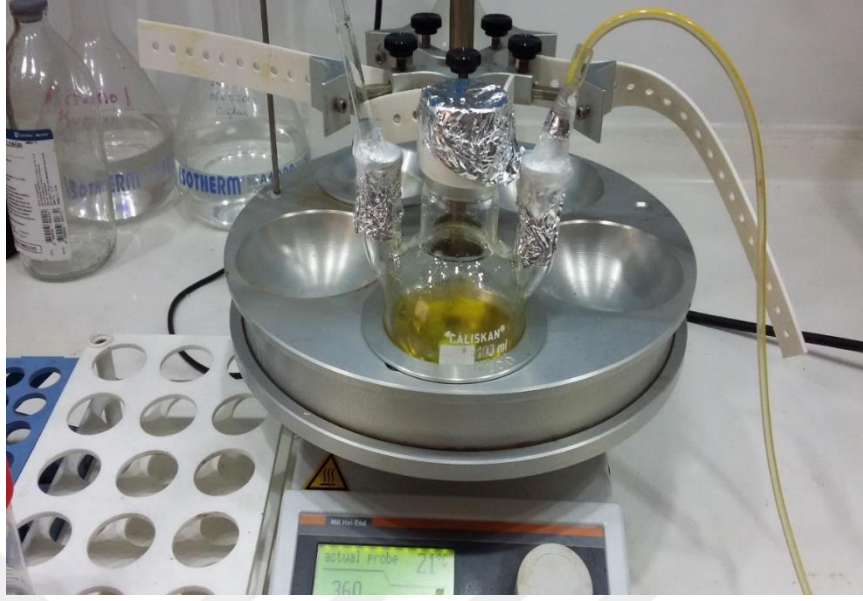
- Ultrasonik Banyo (CEIA CP104 Standard Ultrasonic Cleaner) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Nüve Santrifüj Cihazı (2500 rpm, CN 180) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Nüve Etüv (FN 400 kuru hava sterilizatör) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Pro Research Santrifüj cihazı (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO₂ İnkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus BX53) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Chromafil Xtra PTFE – 45/25 Filtreler (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Vorteks cihazı (IKA Genius 3) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- DLS Zeta Size ve Zeta potansiyel ölçüm cihazı (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Refraktometre (Krüss optronik, AR4 Abbe Refraktometre) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus BX53) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,
- Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler
- Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer
- Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,
- Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Leica CM1900 Kyrostat (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji
- Anabilim Dalı)
- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,
- Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetleri (Sigma) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,
- Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer
- Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (Ege Üniversitesi, Tıp
- Fakültesi, Fizyoloji Anabilim. Dalı.)
- Perkin-Elmer Spektrum Two Infrared IR Spektrofotometresi(Fourier
- Transform Infrared Spectroscopy) (FT-IR) (Ege Üniversitesi, Nükleer
- Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)
- SEM FEI Quanta FEG250 (Namık Kemal Üniversitesi, Merkez
- Laboratuvarı)
- TEM JEOL JEM 2100F HRTEM (Massachusetts, ABD)
- Sonifier Converter Ultrasonik Homojenizatör (Ege Üniversitesi, Tıp
- Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı)

3.2 MNP (Fe₃O₄) Sentezi

6 mL 2 M (1,93 g) FeCl₃ 2 M HCl' de hazırlandı. 100 mL'lik üç boyunlu balona konularak 50 mL saf su ile seyreltildi. 25 mL 0,08 M (0,25 g) Na₂SO₃ 30 dk bir zaman diliminde orantılı olarak yavaş yavaş ilave edildi. Ardından, azot gazı altında, % 28' lik 4 mL NH₃, 20 mL saf su ile seyreltilerek 30 dk boyunca yavaşça ilave edildi. Siyah çökelekler oluştuğundan sonra çözelti sıcaklığı 70 °C' ye çıkarıldı. 30 dk sonunda 45 °C' nin altına kadar soğutuldu.

Reaksiyon tamamlandıktan sonra harici bir mıknatıs ile uzaklaştırılan çökelekler, su ve etanol (2-1) ile birkaç defa yıkandı. En son etanol içerisinde muhafaza edildi (Medine et al., 2011). Şekil 3.1'de hazırlanmış olan Fe₃O₄ deney düzeneği ve şekil 3.2'de elde edilmiş olan Fe₃O₄ içerikli nanoparçacıklar görülmektedir.



Şekil 3.1 Fe₃O₄ nanoparçacık sentez düzeneği

3.2.1 Sentezlenen MNP (Fe₃O₄)'ün silikalanması

Etanol içerisinde muhafaza edilen MNP'lerin % 75'i silikalama için kullanılmıştır. Sentezlenen MNP'lere 2,5 mL TEOS (tetraetil ortosilikat) eklendikten sonra %10' luk 2,5 mL NH₃ ilave edilmiştir. Reaksiyon 40°C' de 12 saat süreyle gerçekleştirildi. Sonrasında çökelek etanol ile yıkandı (Hafid et al., 2010).



Şekil 3.2 Fe₃O₄ nanoparçacık sentez sonrası görünümü

3.2.2 Silikalanmış MNP (Fe₃O₄)' ün silanlanması

Silika kaplı manyetik nanoparçacıkların % 75'ine 3-Aminopropil trietoksisilan ile yüzey modifikasyonu yapıldı. Bunun için MNP-silika süspansiyonu içerisine silan çifti ajanından (3-aminopropil-trietoksisilan) 2,5 mL eklendi. 15 dk ultrasonik banyoda bekletildikten sonra 60°C' de 12 saat boyunca geri soğutma altında bekletildi. Reaksiyon sonunda, reaksiyona girmeyen silan çifti ajanını uzaklaştırmak için etanol ile birkaç kez yıkandı (Wu et al., 2007).

3.2.3 Silika ve silanlı Fe₃O₄'ün hyaluronik asit ile modifikasyonu

21 mg Hyaluronik Asit, 7 mg EDC (~20 mM) ve 11.5 mg NHS (~50 mM) tartıldı. Üzerine 1 mL (21mg/mL) Fe₃O₄-Silan-NH₂ eklendi. Karışım oda sıcaklığında 15 dk karıştırıldı. 1,4 µL Merkapt Etanol (~20 mM), EDC'nin fazlasını inaktive etmek için konuldu. Karışımın pH'ını 7'ye yükseltmek için 40 mg MES tamponu ve 58 mg NaCl kullanıldı. Çözelti PBS ile 2 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Oluşan Fe₃O₄-Silan-NH₂-HA konjugatı santrifüjlenerek PBS ile 2 defa yıkanmıştır. 5 mL PBS içerisinde muhafaza edilmiştir (Carraway and Triplett, 1970).

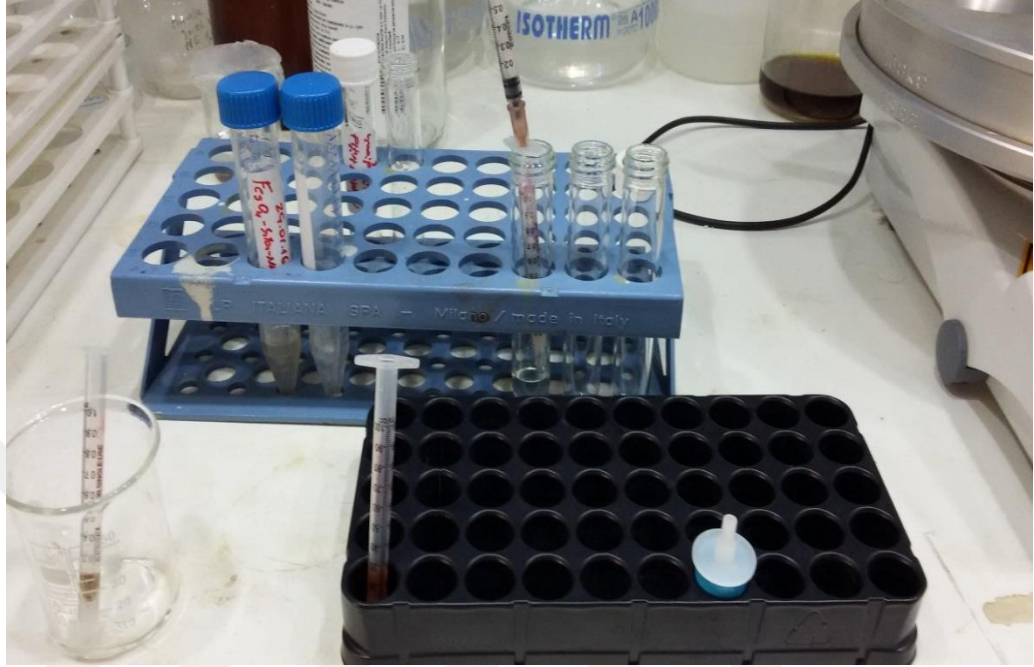
3.3 Mannoz triflat-etilendiamin Konjugasyonu

Literatürdeki mevcut sentez yolu modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir. 19,2 mg mannoz triflate 200 µL distile suda 90°C'de çözülmüştür (Solusyon A). 1 mmol (66 µL) etilendiamin'in üzerine başka bir test tüpünde 70 µL saf su eklenmiştir ve pH 1.0 M HCl ile 7.5'e ayarlanmıştır. 0,63 mmol (40 mg) NaCNBH₃ bu çözeltiye ilave edilmiştir (Solusyon B). Solusyon A ve B 90°C'de 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Çöken reaksiyon ürünü inkübatörde 65°C'de kurutmaya bırakılmıştır (Babu et al., 2007).

3.3.1 Mannoz triflat – etilendiamin'in ¹⁹F ile süstitüsüyonu

1 mL 0,03 M mannoz triflat-etilendiamin çözeltisi yukarıda açıklandığı gibi hazırlanmıştır. DMF içinde 100 µL Kryptofix çözeltisi (H₂O'da 1.0 mg/mL), 200 µL K₂CO₃ çözeltisi (H₂O'da 2.0 mg/mL), 100 µL DMF ve 200 µL NaF (2.0 mg/mL) (16 mM) çözeltisi bir reaksiyon tüpünde birleştirildi ve 90°C su banyosunda 20 dk süre ile ısıtıldı. Bu esnada ¹⁹F süstitüsüyonu ile birlikte mannoz triflat-etilendiamin, FDG amine hidrolizlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra Kryptofix'in aşırısını uzaklaştırmak için Dowex 50 katyon reçinesi kullanıldı. Dowex 50 kolondan sonra nötralizasyonu sağlamak için Ambershep 900 OH reçinesi ve reaksiyona girmeyen florürü uzaklaştırmak için Amberlite anyon değişim reçinesi kullanıldı. En son olarak C-18 pre kartuş (sep-pak) polar

olmayan safsızlıkları gidermek için kullanılmıştır (Gillies et al., 2006). Şekil 3.3’de MannoZ triflat-etilendiaminin ^{19}F ile süstitüsyon reaksiyonu görülmektedir.



Şekil 3.3 MannoZ triflat-etilendiaminin ^{19}F ile süstitüsyon deneyi görünümü

3.4 ^{19}FDG -MNP Sentezi

Daha önceki basamakta saflaştırılan ^{19}FDG -etilendiamin oda sıcaklığında 25 mM hyaluranik asit konjuge MNP ile karıştırıldı. Daha sonra 50 mM NHS çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. İyice vortekslenerek karıştırıldı. Reaksiyon karışımı 2 saat boyunca orbital karıştırıcıda karıştırılarak inkübe edildi ve ^{19}FDG etilendiamin MNP konjugasyonu gerçekleştirildi (Subramanian et al., 2016).

3.5 Sentezlenen ^{19}FDG -MNP'nin ICG ile Optik İşaretlenmesi

1 mL (17 mg) Fe_3O_4 -Silan- NH_2 -HA-FDG üzerine 7 mg CDI (~20 mM) ve 11,5 mg NHS (~50 mM) eklendi. Çözelti oda sıcaklığında 15 dk karıştırıldı. pH'ını 7'ye yükseltmek için 40 mg MES tamponu ve 58 mg NaCl kullanıldı. PBS ile 2 mL'ye tamamlandı. Üzerine 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ICG çözeltisi eklendi ve 25°C 15 dk karıştırıldı. 1,4 μL Merkapt Etanol (~20 mM), EDC'nin fazlasını inaktive etmek için konuldu. Oda sıcaklığında 2 saat karıştırıldı. Oluşan Fe_3O_4 -Silan- NH_2 -HA-FDG-ICG konjugatı santrifüjlenerek PBS ile 2 defa yıkandı. 5 mL PBS içerisinde muhafaza edildi (Carraway and Triplett, 1970).

3.6 Sentezlenen FDG-MNP'lerin Karakterizasyonları

3.6.1 SEM ve TEM analizleri

SEM Analizleri için FDG-MNP'ler Namık Kemal Üniversitesi, Merkez Laboratuvarına gönderilmiş ve SEM FEI QUANTA FEG250 Cihazı ile SEM görüntüleri alınmıştır.

TEM analizleri için FDG-MNP'ler Massachusetts USA Sloan Kettering Kanser Araştırma Merkezine gönderilmiş ve merkez laboratuvarlarında TEM JEOL JEM 2100F HRTEM cihazı ile TEM görüntüleri alınmıştır.

3.6.2 Demir nanoparçacık ve türevlerinin hidrodinamik çap ve zeta potansiyellerinin ölçülmesi

Her aşamadaki sentez son ürünleri, ultrasonik banyo ile 15 dk homojenize edildikten sonra 2 mL' lik eppendorflerin içerisine 10 µL örnek/1 mL dekstroz konsantrasyonunda konulmuştur. Hidrodinamik çap ve zeta potansiyel analizleri 3 tekrarlı olarak Malvern Nano-ZS DLS (Dynamic Light Scattering) cihazı ile incelenmiştir. Manyetik özelliklerinin de etkisiyle solvent içerisinde agregatlaşmaya müsait nanoparçacıkların hidrodinamik çap ve zeta potansiyel ölçümleri, sentez tamamlandıktan hemen sonra yapılmıştır. Örneklerin her biri 0,45 µm' lik filtrelerden geçirilmiştir.

3.7 FDG-konjuge nanoparçacıkların FT-IR yöntemi ile yapı analizi

Fe_3O_4 , Fe_3O_4-SiO , $Fe_3O_4-SiO-Si-NH_2$ ve $Fe_3O_4-SiO-Si-NH_2-HA$ Konjugatının Perkin-Elmer Spectrum Two IR spektrofotometresi (ATR (Attenuated Total Reflection) yöntemi ile) ile yapı analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları yorumlanarak sentezlenen maddeler literatür bilgisiyle doğrulanmıştır.

3.8 Kalite Kontrol İşlemleri

3.8.1 İodojen yöntemi ve ^{131}I ile radyoışaretleme

1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenil-glikoluril diklorometan 1 mg/mL de çözüldü. 250 μL düzeyinde iodojen tüpleri hazırlandı İodojenin tüpler içerisine homojen yayılması için, uçurma esnasında yavaş yavaş karıştırılmıştır. Diklorometan çözeltisi uçuktan sonra tüplerin kapakları kapatılıp buzdolabına kaldırılmıştır.

Birinci iodojen tüpünün içerisine 7,5 mg/mL konsantrasyonundaki MNP'den 7 μL konulmuştur ve 193 μL bidistile su ile 200 μL 'ye tamamlanmıştır. Üzerine 10 μCi (5 μL) aktivitesinde Na^{131}I eklenmiştir ve 45 μL bidistile su ile 250 μL 'ye tamamlanmıştır.

İkinci iodojen tüpünün içerisine 17 mg/mL konsantrasyonundaki FDG-MNP'den 3 μL konulmuştur ve 197 μL bidistile su ile 200 μL 'ye tamamlanmıştır. Üzerine 10 μCi (5 μL) aktivitesinde Na^{131}I eklenmiştir ve 45 μL bidistile su ile 250 μL 'ye tamamlanmıştır.

Üçüncü iodojen tüpünün içerisine 5 μCi (2,5 μL) aktivitesinde Na^{131}I eklenmiştir ve 247,5 μL bidistile su ile 250 μL 'ye tamamlanmıştır.

3.8.2 FDG-konjuge nanoparçacıkların HPLC analizleri

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) (Shimadzu SCL-10AVP) kullanılarak, her bir sentez aşamasının karakterizasyonu yapılmıştır. FDG-MNP ve optik işaretli FDG-MNP_ICG 100 μL /1 mL PBS olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Otomatik örnekleyici yardımıyla kolona 10 μL örnek enjekte edilerek analizle yapılmıştır. Analiz koşulları çizelgedeki gibidir. HPLC koşulları çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 HPLC koşulları

Koşullar	
Mobil Faz (C)	Ultra Saf Su % 40
Mobil Faz (D)	ACN % 60
Akış Hızı	0.7 mL/dk
Sıcaklık	25°C
Enjeksiyon Süresi	30 dk
Dedektör	Photodiode Array Detector (PDA), Floresans Detektör (RF10XL)
Kolon	EC 250 / 4.6 NUCLEODUR 100 – 5 C18 (250 x 4.6 mm I.D.) Analitik kolon (Macherey - Nagel)
Dalga boyu	PDA dedektör için, 210 nm Floresans dedektör için, Eksitasyon dalga boyu: 780 nm Emisyon dalga boyu: 820 nm

3.8.3 FDG-konjuge manyetik nanoparçacıkların ince tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi ile kalite kontrol işlemi

Radyo-TLC için selüloz kaplı, kalınlıkları 0.1 mm olan 20x20 cm boyutlarındaki tabakalar (Merek 5554) kullanıldı. Tabakaların eni 1.5 cm boyu 10 cm olacak şekilde kesilerek çalışıldı. TLC tankında piridin/asetik asit/su (3:5:1.5) hazırlandı ve buhar dengesi sağlanabilmesi için bir süre bekletildi. Hazırlanan tabakalar üzerine tabandan 1 cm kalacak şekilde kapiler yardımıyla aktif bileşenler damlatıldı. Her bileşenden 2 adet damlatma yapılmıştır. Sırasıyla damlatılan aktif bileşenler;



Bileşenler tanktaki çözücü içerisinde selüloz tabakalarda uygulama noktasından yaklaşık % 80 kadar ilerlemesinden sonra tanktan çıkartılıp yürüdüğü üst sınır işaretlendikten sonra oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan TLC tabakaları Bioscan2000 TLRC tarayıcı ile dedekte edildi.

3.9 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarının hazırlanması

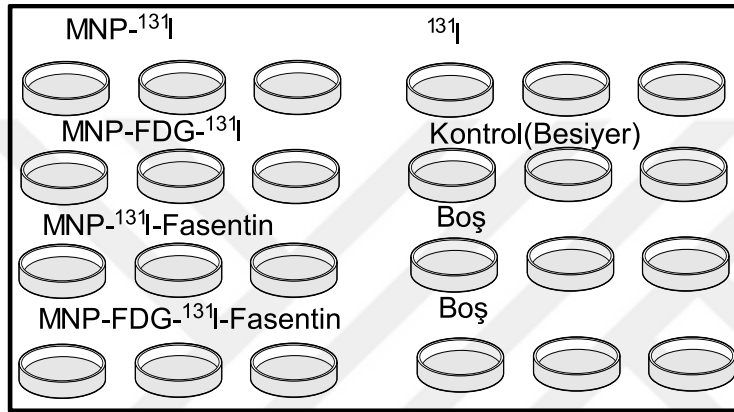
Bu çalışmada kullanılan MCF7 insan meme (adenokarsinoma) epiteli ve PC-3 insan prostat (adenokarsinoma) epiteli American Type Culture Collection'dan (Rockville, MD, ABD) temin edilmiştir. MCF7 ve PC-3 hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)'den oluşan medyunda üretilmiştir. Tüm hücreler, flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0,25 (W/V) Tripsin-EDTA enzimatik reaksiyonu sonucunda flask yüzeyinden ayrıldılar. Toplamda 2 adet 24'lük kuyuya ekilen MCF7 ve PC-3 hücreleri, çalışmada kullanılmak üzere 37°C ve %5 CO₂ ortamında çoğalmaları için bir süre bekletildi. Çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80°C de dondurulup, -196°C'de sıvı azot içinde stoklandı.

3.9.2 İodojen yöntemiyle radyoizaretleme yapılan manyetik nanoparçacık (MNP) ve FDG-MNP bileşiklerinin MCF7 ve PC-3 hücre hatlarında 3 saat boyunca fasentinli ve fasentinsiz inkorporasyonu

250 µg/250 µL olarak hazırlanmış I. iodojen tüpüne 200 µL (5 µg/200 µL) miktarına karşılık gelecek şekilde MNP eklenmiştir. Üzerine aktivitesi 10 µCi (50 µL) Na¹³¹I eklenmiştir. 30 dk inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası MNP'den 5 µg/5 mL besiyer ve 10 µCi aktivite olacak şekilde test tüpü hazırlanmıştır. FDG-MNP içinde 250 µg/250 µL olarak hazırlanmış 2. iodojen tüpüne, 5 µg/5 mL besiyere 10 µCi aktivite olacak şekilde test tüpü hazırlanmıştır. ¹³¹I için ise 5 µCi aktivite/2.5 mL besiyer konsantrasyonunda test tüpü hazırlanmıştır. Vakum pompası yardımıyla hücre hattı üzerindeki besiyerle çekilerek Serum Fizyolojik Sıvı (SF-İzotonik NaCl çözeltisi) ile yıkanıp üzerine hazırlanan örneklerden 500'er µL eklenmiştir. Fasentinli örnekler için her bir kuyuya 1 mg/mL hazırlanmış fasentin çözeltisinden 5 µg eklenmiştir. 3 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3 saat sonunda monolayer hücre hattından vakum pompası yardımıyla örnekler çekilmiştir. İzotonik Sodyum SF ile hücre hattı iki defa yıkanmıştır ve 200 µL RİPA eklenerek 15 dk inkubatörde bekletilmiştir. 15 dk sonrasında her bir kuyu ajite edilerek önceden eppendorflere hazırlanmış sıvı sintilasyon kokteyli (900 µL) üzerine 100'er µL eklenmiştir. Ölçüm için Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Packard Tricorb-1200 sıvı sintilasyon sayacında kullanılmıştır.

3.9.3 Protein Tayini

RİPA yardımıyla yüzeyden kaldırılmış ve ajite edilmiş hücreleri içeren çözeltiden 25'er µL alınarak protein tayini yapılmıştır. Bunun için Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioskan) cihazı 562 nm dalga boyunda Bicinchoninic asit (BCA) yöntemiyle kullanılmıştır. Protein değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiş ve hücre başına düşen aktivite değerleri bulunmuştur. Kontrol grubu sayımları bu değerlerden çıkarılarak % bağlanma değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 3.4 24'lük plate içerisine ekilmiş hücrelere uygulanan moleküllerin şematik gösterimi

3.10 *In Vivo* Organ Tutulum Çalışması

In vivo hayvan deneyleri Sprague Dawley tipi dişi ve erkek sıçanlar ile yapılmıştır. Bu çalışma için Ege Üniversitesi Hayvan Etik kurulunun 30.11.2016 tarih ve 2016-104 sayılı onayı alınmıştır. Yaklaşık 300-350 g ağırlığındaki bir erkek bir dişi Sprague Dawley tipi sıçanlar ile birbirinden ayrı zamanlarda, üç farklı uygulama ile organ tutulum çalışması yapılmıştır. Hayvanlara verilen 100 mL PBS içerisinde toplam 10 mg ¹⁹FDG-MNP bulunmaktadır ve ¹⁹FDG-MNP 300 µg ICG ile işaretlenmiştir.

3.10.1 Perfüzyon ve kesit alma işlemi

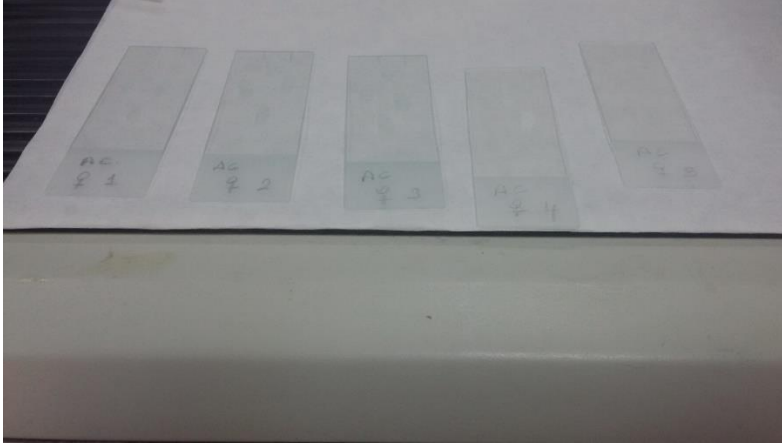
Erkek sıçanla yapılan uygulamada; hayvan sodyum pentobarbital ile anestezi edilmiştir. 1000 mg/kg heparin enjekte edilerek kanın pıhtılaşması engellenmiştir. Sol ventrikül apex bölgesine yapılacak kesi sonrası 14 gauge kanül aorta doğru yerleştirilip klampe edilmiştir. Bu işlem sonrası peristaltik pompa aracılığıyla önce Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) 10 mL/dk hızla perfüze edilmiştir ve akabinde PBS içerisinde süspanse halde bulunan ¹⁹FDG-MNP'ler

geçirilmiştir. Daha sonra organlar tek tek çıkarılmıştır. Çıkarılan organlar simetrik parçalara ayrılmıştır. Bir kısmı direkt -80°C donmaya bırakılmıştır. Bir kısmı Sonifier Converter homojenizasyon cihazı ile PBS içerisinde homojenize edilerek -80°C de Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile analiz yapılmak üzere muhafaza edilmiştir. Kalan kısmı ise bir gece %4 paraformaldehit çözeltisinde bekletildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ üç gün boyunca sükröz çözeltisinde dehidrate edilmiştir. Perfüzyon işlemi sonrası direkt çıkarılarak -80°C de dondurulan organlar ile %4 paraformaldehit içinde bir gece bekletilip sonrasında $+4^{\circ}\text{C}$ üç gece sükröz çözeltisinde bekletilen organ örneklerinin Leica CM1900 Kyrostat cihazı yardımıyla $30\ \mu\text{m}$ boyutunda kesitleri alınmıştır.

Dişi sıçanla yapılan uygulamada; hayvan sodyum pentobarbital ile anestezi edilmiştir. $1000\ \text{mg/kg}$ heparin enjekte edilerek kanın pıhtılaşması engellenmiştir. Sol ventrikül apex bölgesine yapılacak kesi sonrası 14 gauge kanül aorta doğru yerleştirilip klampe edilmiştir. Bu işlem sonrası peristaltik pompa aracılığıyla önce Fosfat Tampon Çözeltisi (PBS) $10\ \text{mL/dk}$ hızla perfüze edilmiştir ve akabinde PBS içerisinde süspanse halde bulunan $^{19}\text{FDG-MNP}$ ' ler geçirilmiştir. Ardından peristaltik pompa aracılığıyla %4 paraformaldehit dolaşıma verilerek organlar fikse edilmiştir ve organlar tek tek çıkarılmıştır. Çıkarılan organlar bir gece %4 paraformaldehit çözeltisinde bekletildikten sonra $+4^{\circ}\text{C}$ üç gün boyunca sükröz çözeltisinde dehidrate edilmiştir ve -80°C muhafaza edilmiştir. Perfüzyon işlemi sonrası organ örneklerinin Leicia CM1900 Kyrostat cihazı yardımıyla $30\ \mu\text{m}$ boyutunda kesitleri alınmıştır. Şekil 3.5'de kesit alma işlemi görülmektedir. Şekil 3.6'da kesitleri alınan organlara ait görüntüler mevcuttur.



Şekil 3.5 Leica CM1900 Kyrostat cihazı ile $30\ \mu\text{m}$ 'lik kesit alımı



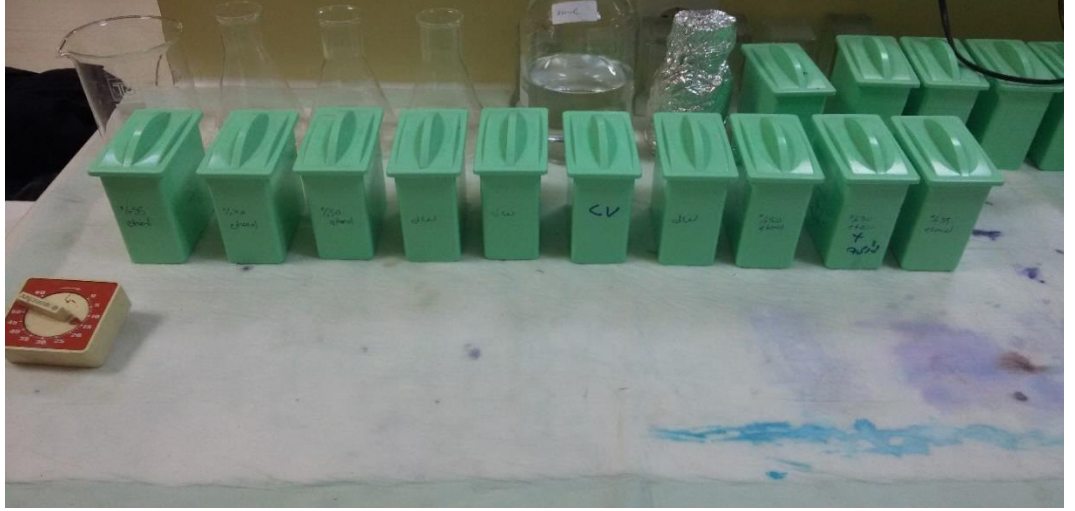
Şekil 3.6 Lam üzerindeki kesitler

3.10.2 Kesitleri alınan organların histokimya boyası ile boyanması

+4°C muhafaza edilen kesitlerin oda sıcaklığına gelmesi beklendi. Slaytlar raka yerleştirildikten sonra 5 dk Toluen tutuldu ve sonrasında;

1. % 95 Etil Alkol içerisinde 15 dk,
2. % 70 Etil Alkol içerisinde 2 dk,
3. % 50 Etil Alkol içerisinde 2 dk,
4. Distile su içerisinde 2 dk,
5. Tekrar distile su içerisinde 2 dk,
6. Azur Eosin Metilen Blue solüsyonunda (boya) 2 dk,
7. Distile su içerisine bir iki defa batırılıp çıkarıldı,
8. Tekrar distile su içerisine bir iki defa batırılıp çıkarıldı,
9. % 50 Etil Alkol içerisinde 2 dk,
10. % 70 Etil Alkol içerisinde 2 dk,
11. % 95 Etil Alkol içerisinde 2 dk tutulduktan sonra 5 dk Toluen karışımında bırakıldı.
12. Son olarak Entellan ile slaytlar kapatıldı ve mikroskopik görüntü almaya hazır hale getirildi.

Kalan kısmı ise boyanmadan görüntülenmiştir. Şekil 3.7'de histokimya boyama prosesinden bir görüntü verilmiştir.



Şekil 3.7 Histokimya boyama prosesinden bir görüntü

3.10.3 Homojenize edilen organların HPLC analizleri

Süspanse halde bulunan organ örneklerinin çizelge 3.2’de yazılı HPLC koşullarında analizleri gerçekleştirilmiştir. Pik şiddeti ve organ ağırlığına bakılarak, FDG-MNP’ler için çıkarılan kalibrasyon eğrisi kullanılarak organ tutulumları HPLC yöntemi ile belirlenmiştir. Böylece bazı organlardaki tutulumun daha fazla olduğu kantitatif olarak tespit edilmiştir.

Çizelge 3.2 Homojenize edilmiş organların HPLC çalışma koşulları

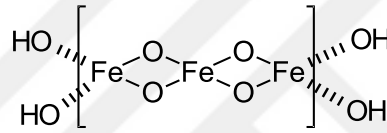
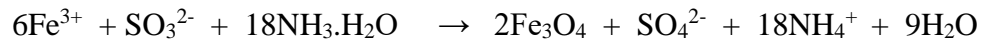
Koşullar	
Mobil Faz (C)	Ultra Saf Su % 40
Mobil Faz (D)	ACN % 60
Akış Hızı	0.7 mL/dk
Sıcaklık	25°C
Enjeksiyon Süresi	30 dk
Kolon	EC 250 / 4.6 NUCLEODUR 100 – 5 C18 (250 x 4.6 mm I.D.) Analitik kolon (Macherey - Nagel)
Dalga boyu	Excitation: 780 nm; Emission: 820 nm
Dedektör	RF10XAL Floresans dedektör
Enjeksiyon Hacmi	20 µL



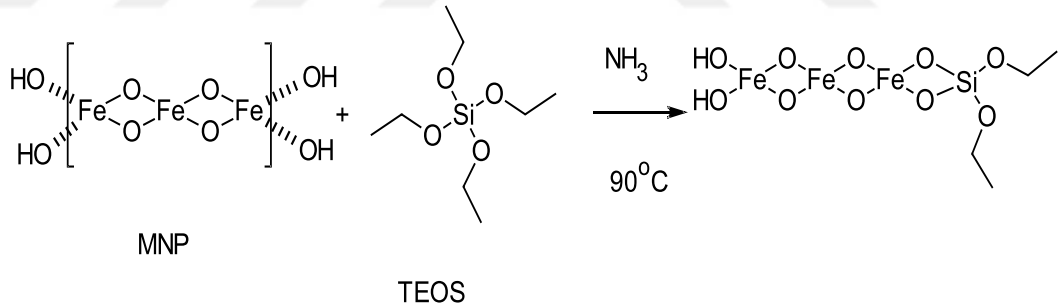
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Reaksiyon Mekanizmaları

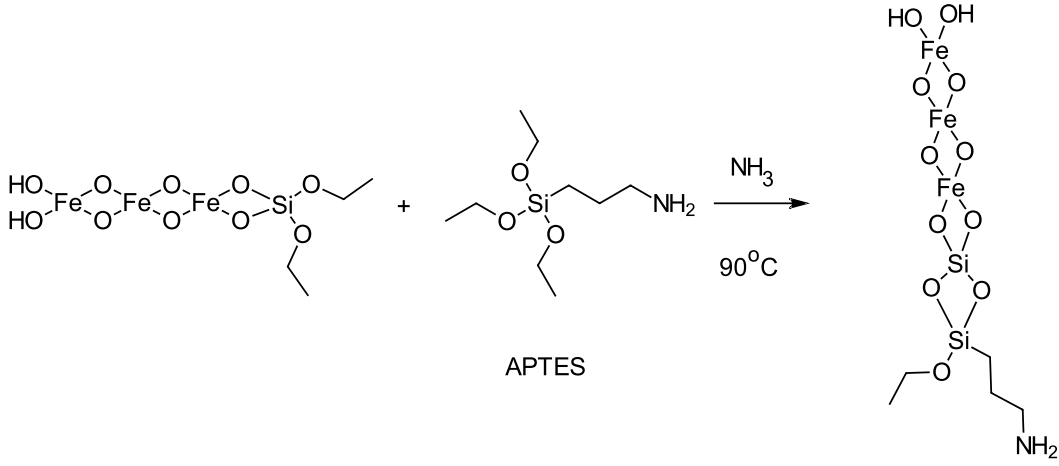
Yapısal analiz sonuçlarına göre önerilen reaksiyon mekanizmaları şekil 4.1'den şekil 4.8'e kadar olan şekillerde görsel olarak gösterilmiştir. Fe_3O_4 'ün ve silan ve silika modifiye Fe_3O_4 'ün yapısal özellikleri literatürden de bilinmektedir (Campo et al., 2005; Cheng et al., 2014; Du et al., 2006; Hafid et al., 2010). Bu çalışma ile amin silan modifiye Fe_3O_4 NP'lere HA ve FDG konjuge edilmiştir.



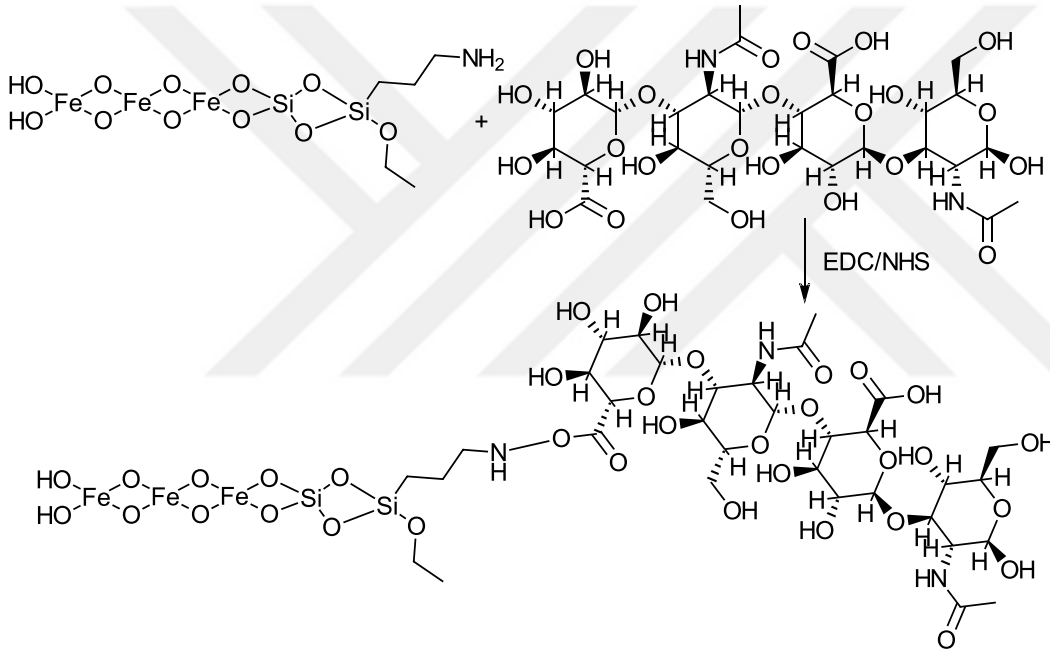
Şekil 4.1 Demir nanoparçacık sentez reaksiyonu



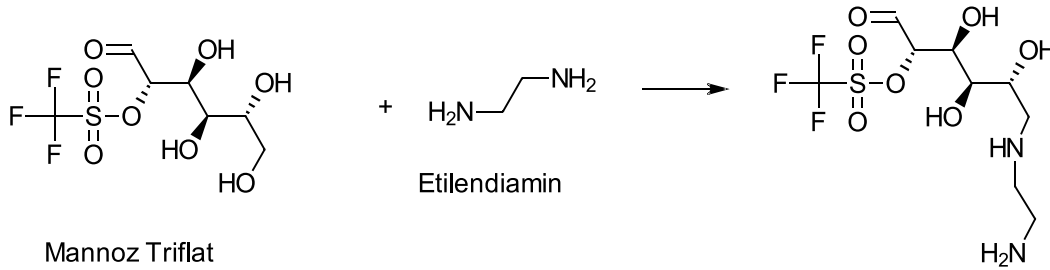
Şekil 4.2 Demir nanoparçacığın silika ile kaplanması reaksiyonu



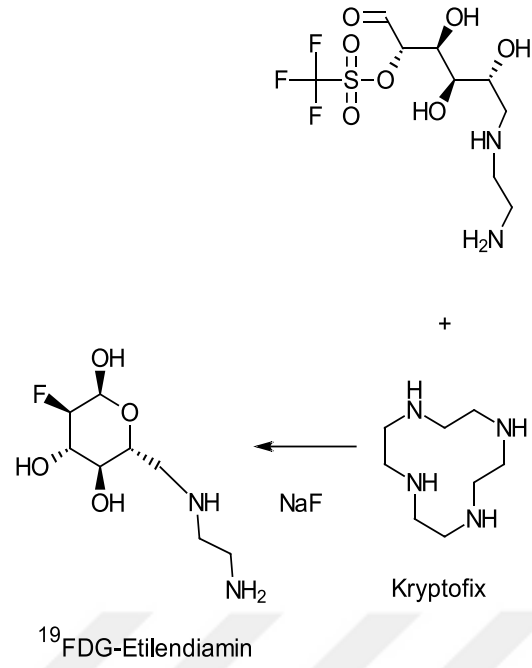
Şekil 4.3 Demir nanoparçacık silanlanma reaksiyonu



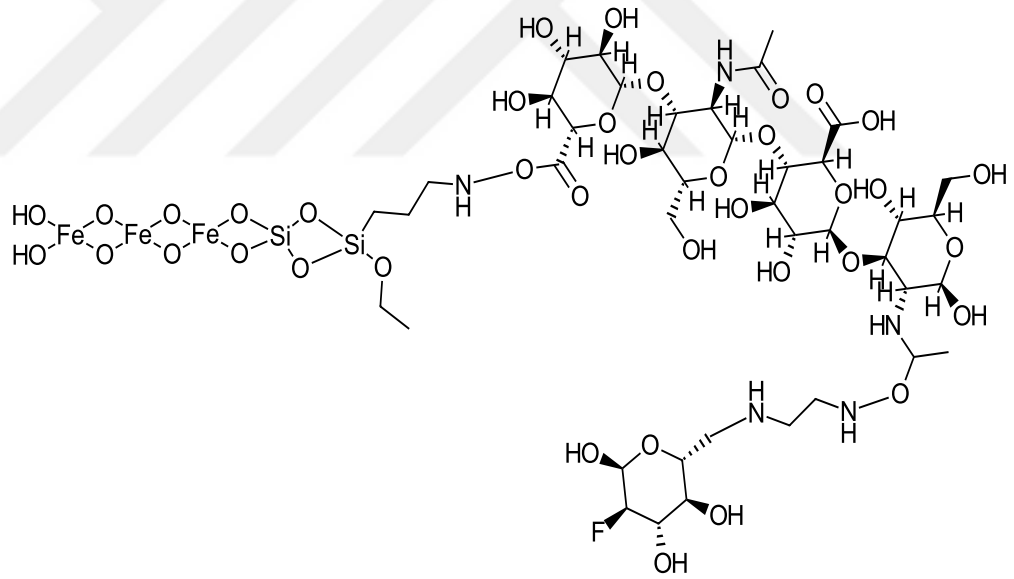
Şekil 4.4 Silanlanmış demir nanoparçacığın hyaluronik asit ile modifikasyon reaksiyonu



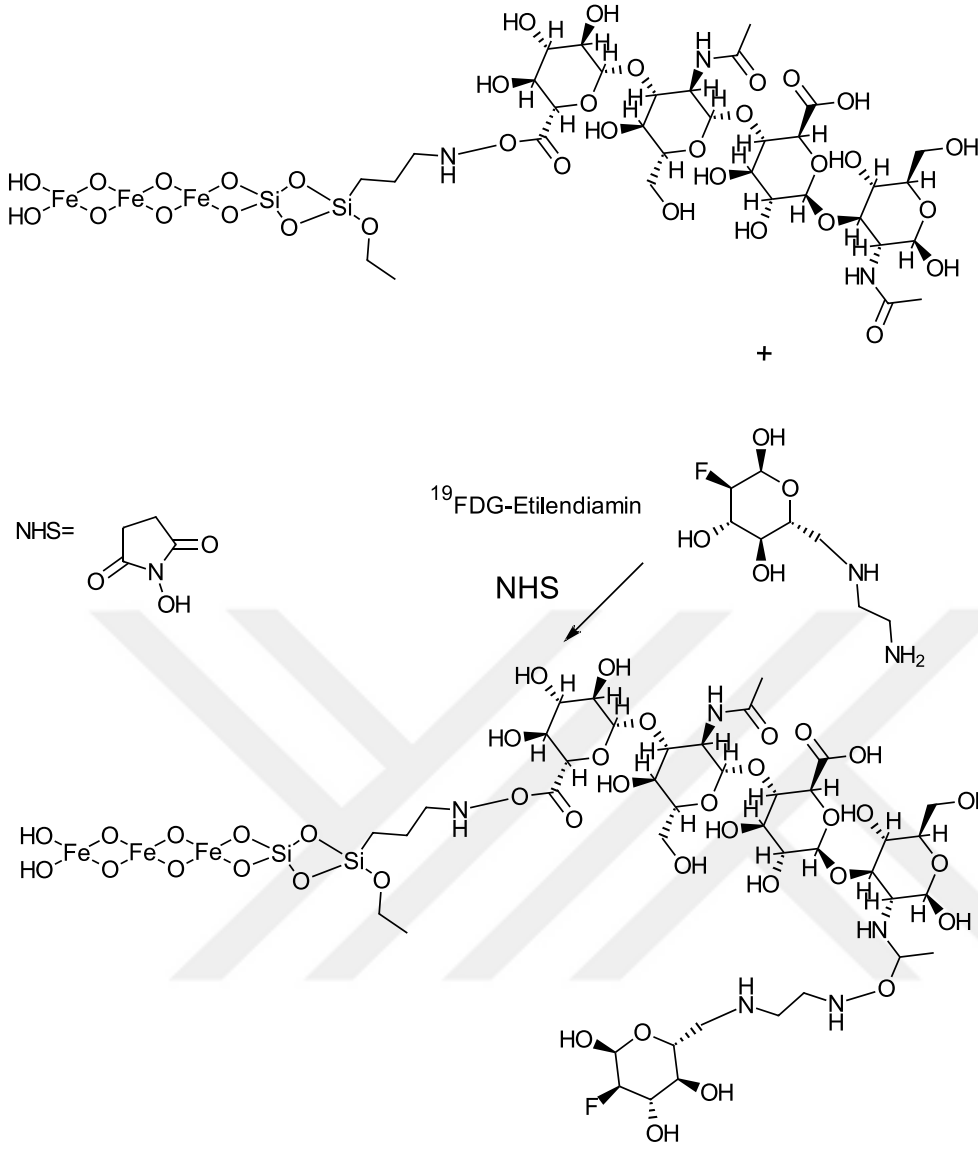
Şekil 4.5 Mannoz triflat'ın etilendiamin ile konjugasyon reaksiyonu



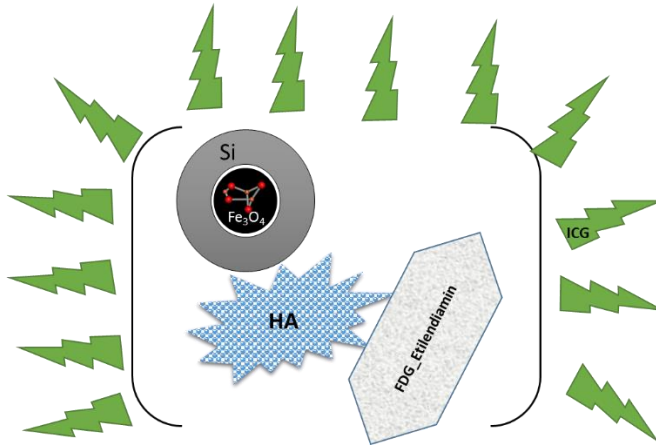
Şekil 4.6 Mannozyl triflat-Ethylendiamin'in ^{19}F ile sübtitüsyon reaksiyonu



Şekil 4.7 FDG-MNP'nin açık yapısı



Şekil 4.8 MNP-HA ile FDG-etilendiamin'in konjugasyonu

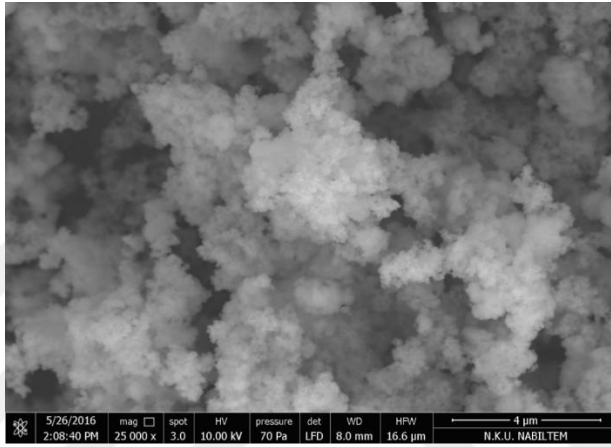


Şekil 4.9 ICG ile optik işaretlenmiş FDG-MNP'lerin şematize edilmiş modeli

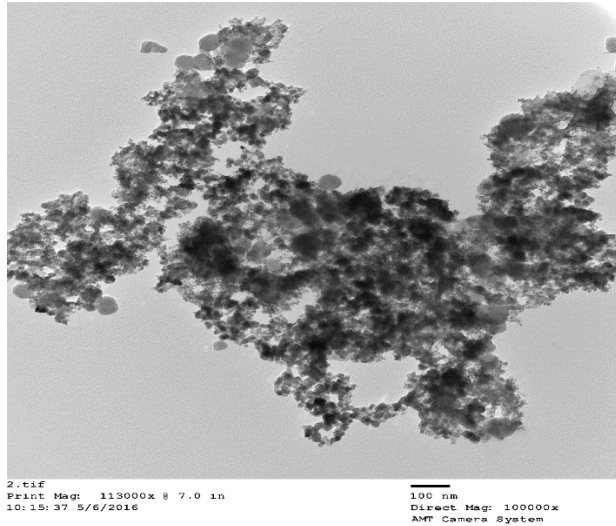
4.2 Sentezlenen MNP ve Türevlerinin Karakterizasyonuna İlişkin Bulgular

4.2.1 SEM ve TEM analiz sonuçları

Sentezlenen FDG-MNP'lerin parçacık boyutu ve morfolojisi SEM ve TEM analizleri Namık Kemal Üniversitesi (Tekirdağ) ve Sloan Kettering Kanser Araştırma Merkezi (ABD) de yapılmıştır. Şekil 4.10 ve şekil 4.11'de görünen analiz sonuçları parçacık boyut ve şeklinin 20-30 nm civarında düzgün homojen kübik kristal yapıda ve literatür ile uyumlu olduğunu göstermiştir (Subramanian et al., 2016).



Şekil 4.10 Sentezlenen MNP ve türevlerinin SEM analiz sonucuna ait görüntü



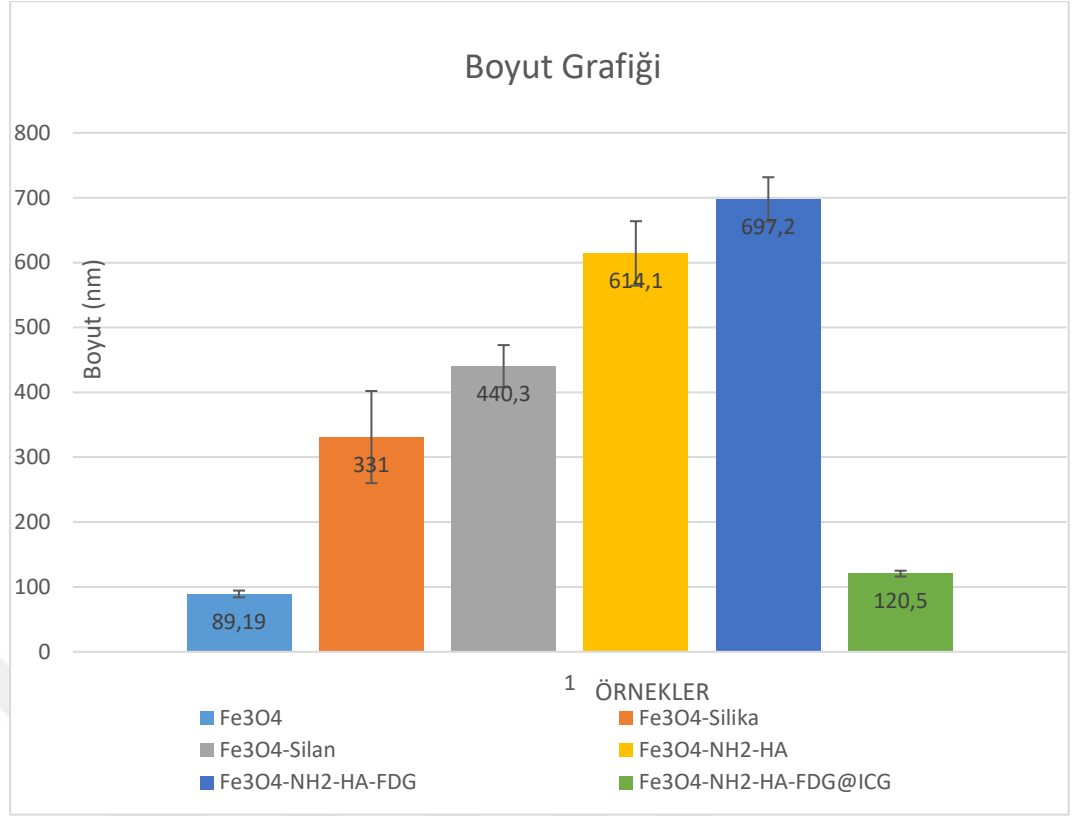
Şekil 4.11 Sentezlenen MNP ve türevlerinin TEM analiz sonucuna ait görüntü

4.2.2 Sentezlenen MNP ve türevlerinin DLS analiz sonuçları

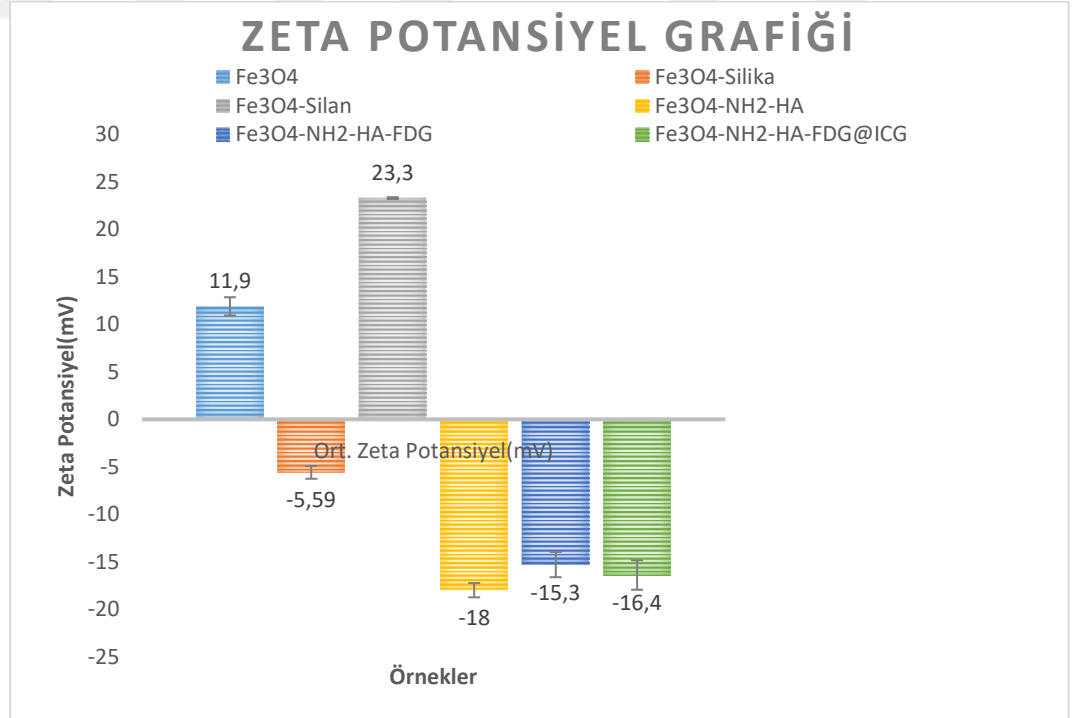
Demir nanoparçacıkların ortalama parçacık boyutu Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda Malvern Nano-ZS DLS (Dynamic Light Scattering) cihazı analizi ile incelenmiştir. 0.45 µm'lik filtreden geçirilerek yapılan analizlerin sonucu Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çözelti ortamında HA, ICG ve FDG konjuge Fe₃O₄ nanoparçacıkların hidrodinamik çaplarını ve zeta potansiyellerini incelemek amacıyla DLS analizleri yapılmıştır. DLS, mikrometrenin altında boyutu olan antikor vs. gibi biyomoleküllerin ve nanoparçacıkların çözelti ortamındaki boyutlarını ve kararlılıklarını (zeta potansiyelleri vasıtasıyla) incelemek için yapılan bir analiz yöntemidir. Bulunan çaplar parçacığın etrafındaki çözgen molekülleri ile birlikte olduğundan ve alınan ölçü boyutun küp kökü ile orantılı olduğundan SEM (scanning elektron mikroskobu) ve TEM (transmisyon elektron mikroskobu) boyutlarından büyük çıkmıştır.

Çizelge 4.1 Manyetik nanoparçacıkların boyut zeta potansiyel ölçüm sonuçları

0,45 µm'lik Filtreden Geçirildikten Sonraki Boyut ve Zeta Potansiyel Ölçümleri						
Örnek (n=3)	Ort. Boyut(nm)	Ort. Boyut Standart Sapmaları	Solvent	Ort. Zeta Potansiyel(mV)	Solvent	Ort. Zeta Pot. Standart Sapmaları
Fe ₃ O ₄	89,19	5,2	Dekstroz	11,9	Dekstroz	0,96
Fe ₃ O ₄ -Silika	331	71,1	Dekstroz	-5,59	Dekstroz	0,67
Fe ₃ O ₄ -Silan	440,3	32,5	Dekstroz	23,3	Dekstroz	0,1
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -HA	614,1	49,7	Dekstroz	-18	Dekstroz	0,75
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -HA-FDG	697,2	34,4	Dekstroz	-15,3	Dekstroz	1,33
Fe ₃ O ₄ -NH ₂ -HA-FDG@ICG	120,5	4,5	Dekstroz	-16,4	Dekstroz	1,55



Şekil 4.12 Manyetik nanoparçacıkların boyut dağılımı

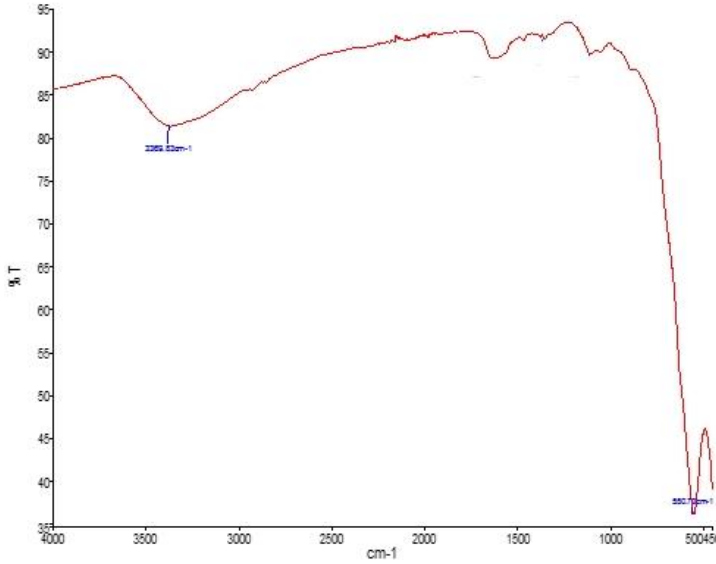


Şekil 4.13 Manyetik nanoparçacıkların zeta potansiyel grafiği

Şekil 4.13’de Fe_3O_4 ve silan modifiye Fe_3O_4 ’lerin zeta potansiyeli $-5,59$ mV değere sahip iken, HA ve FDG modifiye Fe_3O_4 MNP’ler için -18 mV ve $-16,4$ mV gibi daha yüksek negatif değerler elde edilmiştir. HA ve FDG ile konjuge olmuş MNP’lerin zeta potansiyeli değerlerinin eksi yüklü olması oluşan komplekslerin negatif yüklü olduğunu göstermektedir. HA ve FDG konjuge MNPlerin daha yüksek negatif zeta potansiyeli göstermesi daha yüksek hücre afinitesine sahip olabileceklerini göstermektedir. Şekil 4.12’de manyetik nanoparçacık ve türevlerinin boyut dağılımı verilmiştir.

Bulunan sonuçları literatür bilgisi de desteklemektedir. Cheng ve grubu Fe_3O_4 NP’lerin zeta potansiyel değerlerini $+8,74$ mV olarak elde ediyorken $Fe_3O_4@PDA$ (polidopamin) kompleksini polidopaminin fenolik gruplarından gelen eksi yük nedeniyle $-28,23$ mV olarak verilmiştir. Yapıya pozitif yüklü tripsin katılması zeta potansiyel değerinin azalması ile sonuçlanmıştır (Cheng and Zheng, 2014).

4.3 Sentezlenen ve Konjuge Edilen Nanoparçacıkların FTIR Yapı Analiz Sonuçları

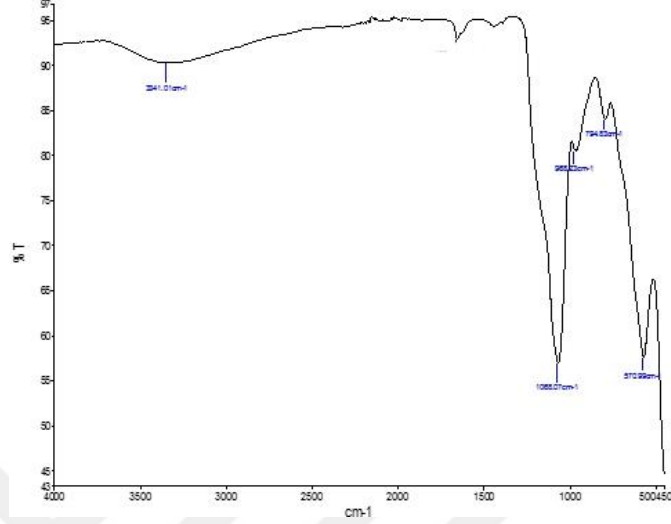


Şekil 4.14 Fe_3O_4 FTIR yapı analiz sonucu

Çizelge 4.2 Fe_3O_4 ’ün dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri

IR Bandı	Özellikler
3369 cm-1	O-H gerilmesi
550 cm-1	Fe-O bandı

Şekil 4.14 ve çizelge 4.2'den anlaşılacağı üzere, 3369 cm^{-1} civarında küçük bir O-H gerilmesi, 550 cm^{-1} civarında ise manyetik nanoparçacıklara ait Fe-O bandı görülmektedir (Burton et al., 2009; Du et al., 2006). (Cheng and Zheng, 2014).

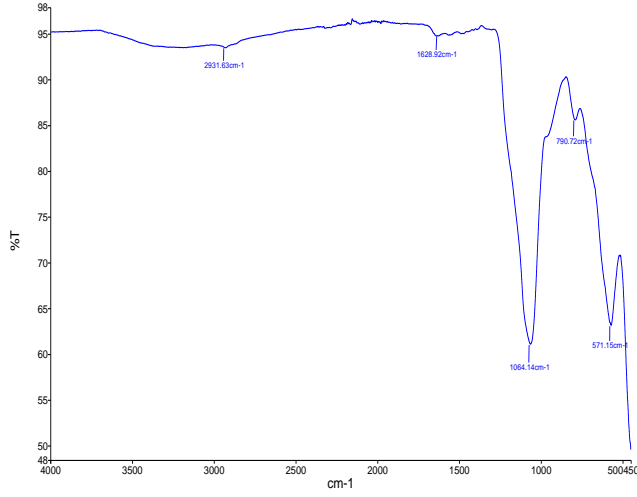


Şekil 4.15 Fe₃O₄-Silika FTIR yapı analiz sonucu

Çizelge 4.3 Silikalanmış Fe₃O₄'ün dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri

IR Bandı	Özellikler
3369 cm^{-1}	O-H gerilmesi
1068 cm^{-1}	Si-O-Si asimetric gerilmesi
794 cm^{-1}	Si-O simetric gerilmesi
570 cm^{-1}	Fe-O bandı

Şekil 4.15'de ve çizelge 4.3'de, 3369 cm^{-1} civarında O-H gerilmesi, 1068 cm^{-1} Si-O-Si asimetric gerilmesi görülmektedir. 794 cm^{-1} Si-O simetric gerilmesi ve 570 cm^{-1} de Fe-O bandı görülmektedir (Du et al., 2006).

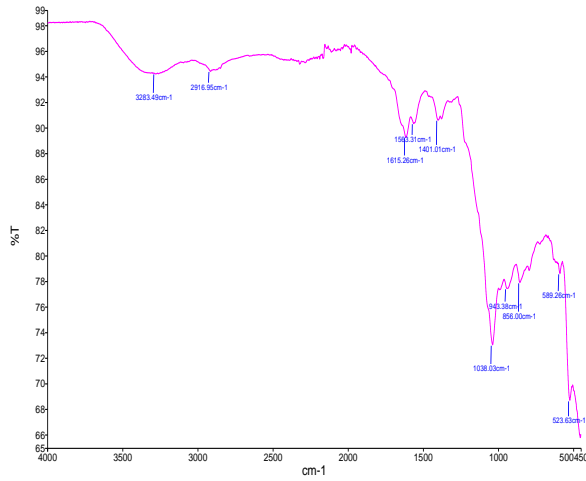


Şekil 4.16 Fe₃O₄-Silika-Silan'ın FTIR yapı analiz sonucu

Çizelge 4.4 Silanlanmış Fe₃O₄-Silikanın dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri

IR Bandı	Özellikler
1068 cm ⁻¹	Si-O-Si asimetrik gerilmesi
790 cm ⁻¹	Si-O simetrik gerilmesi
571 cm ⁻¹	Fe-O bandı

Şekil 4.16'ya ve çizelge 4.4'e bakıldığında 1068 cm⁻¹ Si-O-Si asimetrik gerilmesi, 790 cm⁻¹ Si-O simetrik gerilmesi ve 571 cm⁻¹ de Fe-O bandı görülmektedir (Du et al., 2006).



Şekil 4.17 Fe₃O₄-Silika-Silan-HA'nın FTIR yapı analiz sonucu

Çizelge 4.5 Hyaluronik Asit ile kaplanmış Fe_3O_4 -Silika-Silan'ın dalga sayısına göre tahmin edilen eğilme ve gerilmeleri

IR Bandı	Özellikler
3283 cm^{-1}	N-H ve O-H gerilmesi
2916 cm^{-1}	C-H gerilmesi
1615 cm^{-1}	C=O karboksil amid I
1563 cm^{-1}	Amid II
1401 cm^{-1}	CH ₂ , CH ₃ , C-O-H, C-O ile C=O kombinasyonu
1038 cm^{-1}	C-O-C, C-O ve C-O-H gerilmesi
943 cm^{-1}	C-O gerilmesi, O-H ve C=O deformasyonu
856 cm^{-1}	
589 cm^{-1}	Fe-O bandı
523 cm^{-1}	

Hyaluronik Asit'in IR bandları şekil 4.17 ve çizelge 4.5'deki gibidir. Fe-O bandı da daha önceki IR analizlerinde de görüldüğü gibi 520-590 cm^{-1} band aralığındadır (Du et al., 2006, Alkrad et al., 2002).

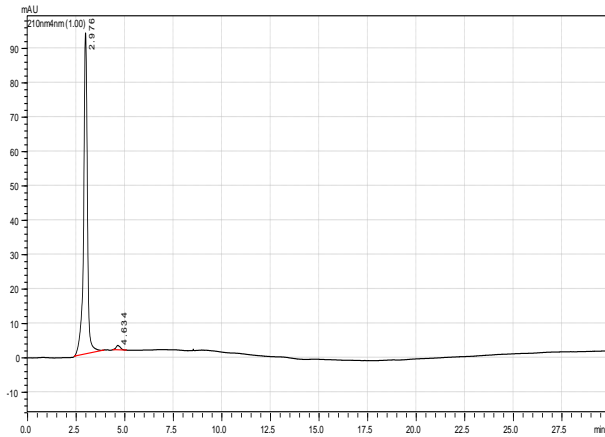
4.4 Kalite Kontrol Analiz Sonuçları

4.4.1 Nanoparçacık ve türevlerinin HPLC analiz sonuçları

Çizelge 4.8' e bakıldığında FDG-MNP'nin alıkonma zamanı 3.899 dakika olarak bulunmuştur. Bu analiz sonucuna bakarak FDG-MNP'nin başarılı bir şekilde ayrıldığı açık bir şekilde görülmektedir.

Şekil 4.18'de Fe_3O_4 -HA'nın FDG ile konjugasyonundan sonraki HPLC kromatogramını göstermektedir.

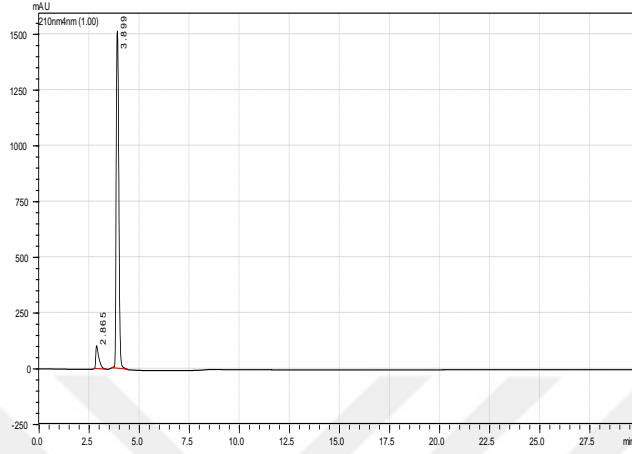
MNP-HA'nın FDG ile konjugasyonunun bağlanma verimi şekil 4.18 ve şekil 4.19 kıyaslandığında %100'e yakın olduğu söylenebilir.



Şekil 4.18 Fe_3O_4 -Silika-Silan-HA'nın kromatogramı

Çizelge 4.6 Fe₃O₄-HA'nın alıkonma zamanı ve alan sonuçları

Fe ₃ O ₄ -HA	Rt (dakika)	Pik Alanı
1	2.976	1265947
2	4.634	19102

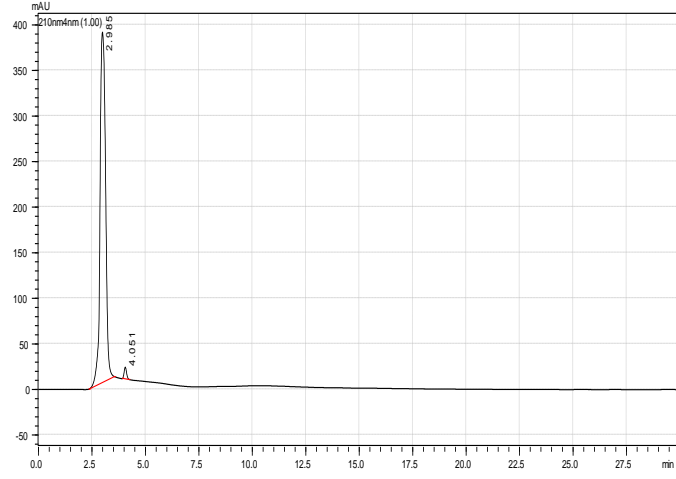


Şekil 4.19 FDG-MNP kromatogramı

Çizelge 4.7 FDG-MNP'nin alıkonma zamanı ve alan sonuçları

MNP-FDG	Rt (dakika)	Pik Alanı
1	2.8655	866811
2	3.899	13828369

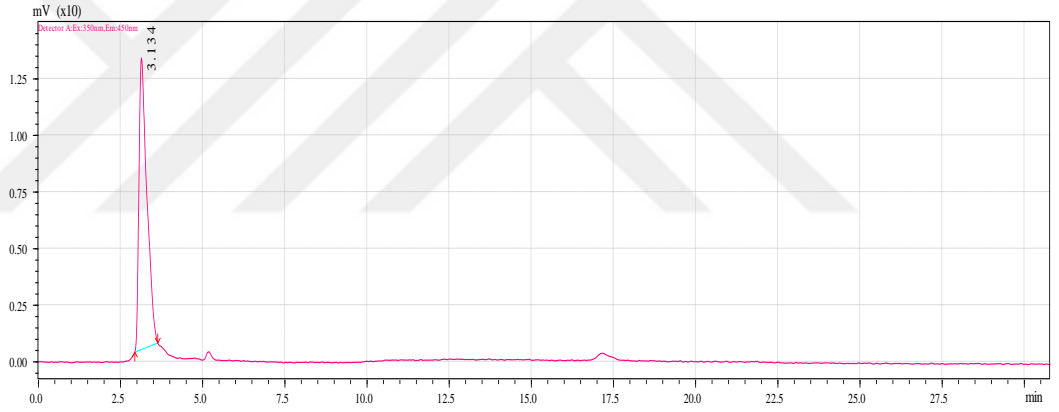
Şekil 4.20'de bulunan FDG-MNP_ICG'nin şekil 4.21'de bulunan ICG ile olan kromatogram alıkonma zamanı farkından, ICG'nin FDG-MNP'ye bağlanma oranı kıyaslanabilmektedir. Ayrıca (FLD) Floresans dedektör ile yapılan şekil 4.22 ve şekil 4.23'deki kromatogram sonuçlarından da görüleceği üzere, son ürünlerin PDA dedektör ile yapılan analizlerle paralel bir sonuç elde edilmiştir.



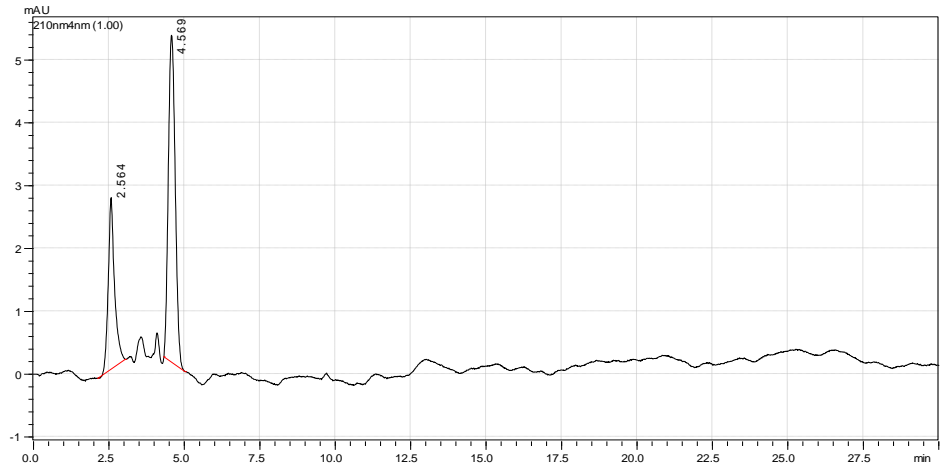
Şekil 4.20 FDG-MNP-ICG'nin kromatogramı

Çizelge 4.8 FDG-MNP-ICG'nin alıkonma zamanı ve alan sonucu

MNP-FDG_ICG	Rt	Alan
1	2.985	7381194



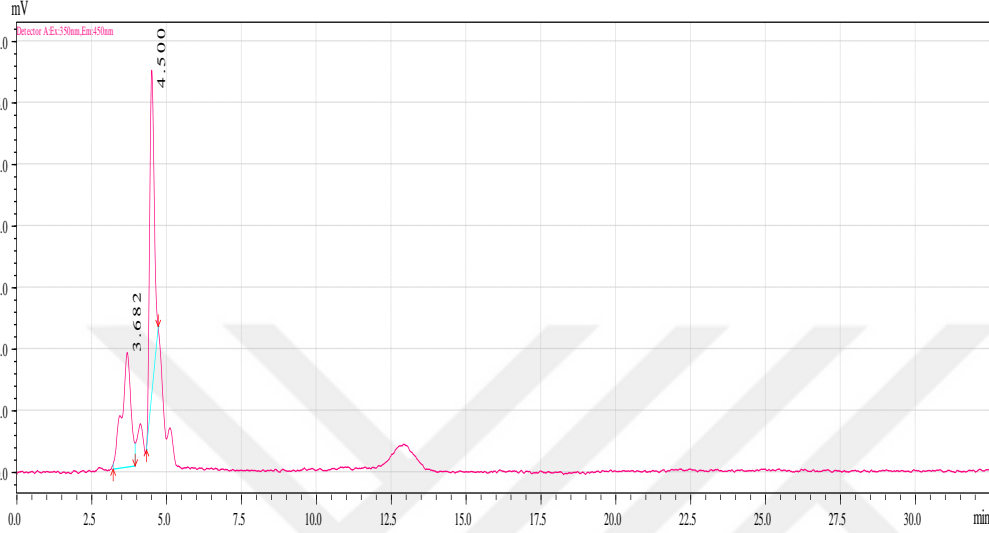
Şekil 4.21 FDG-MNP-ICG'nin floresans dedektör kromatogramı



Şekil 4.22 ICG'nin UV dedektör kromatogramı

Çizelge 4.9 ICG'nin alıkonma zamanı ve alan sonuçları

ICG	Rt	Alan
1	4.569	97312128

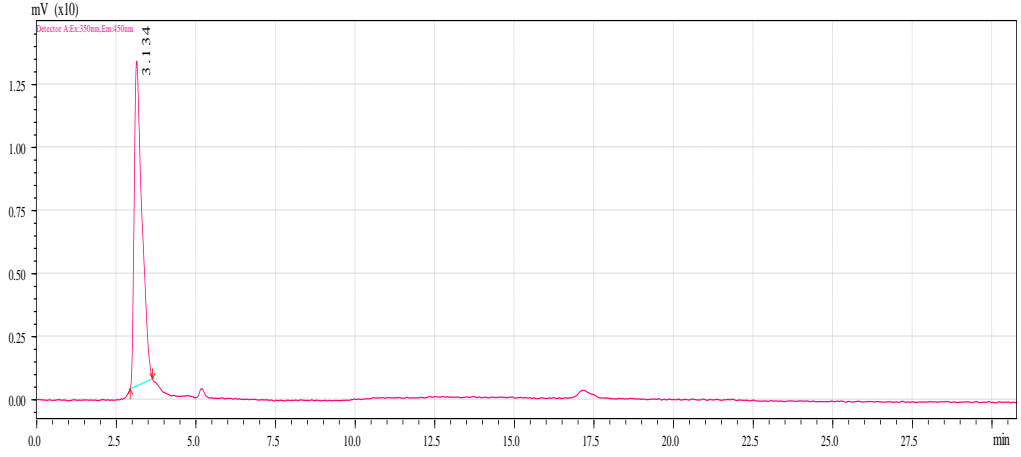


Şekil 4.23 ICG'nin floresans dedektör kromatogramı

4.4.2 Erkek Sıçanda Homojenize Edilen Organların HPLC Analiz Sonuçları

FDG MNP'lerin HPLC analizleri ve kalibrasyon sonuçları:

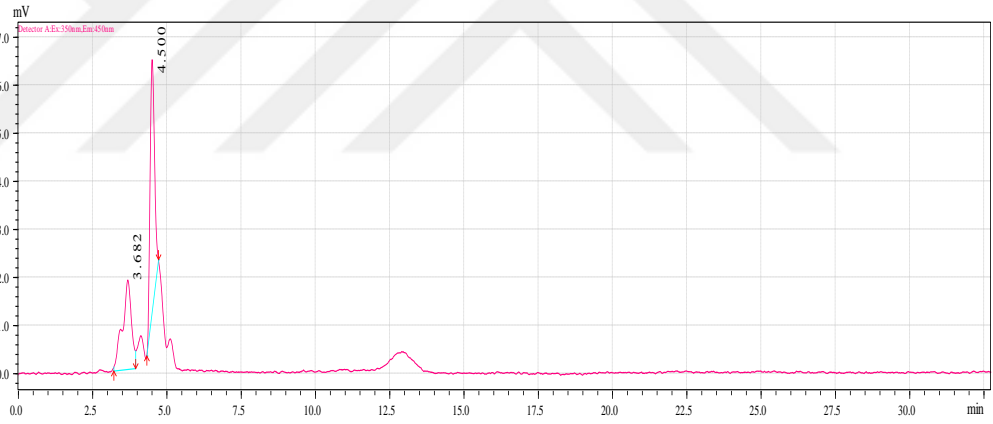
¹⁹FDG-MNP-ICG için yapılan HPLC kalite kontrol çalışması da aynı koşullar altında yapılmıştır. ICG için ayrıca bir kalite kontrol yapılmıştır. Şekil 4.24, şekil 4.25 ve ICG işaretli FDG-MNP'ye ve sadece ICG'ye ait kromatogramlar verilmiştir. Bu kromatogramlardan faydalanarak şekil 4.26'da verilen kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Bu kalibrasyon grafiğini kullanarak organ miktarına eşdeğer tutunan FDG-MNP-ICG miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 4.24 FDG-MNP-ICG'nin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.10 FDG-MNP-ICG kromatogramının alıkonma ve alan ortalaması

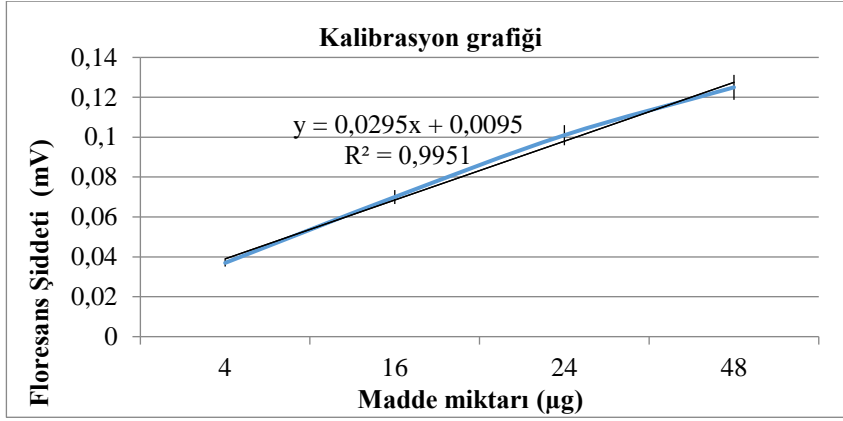
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
¹⁹ FDG-MNP-ICG	3.117	5835101



Şekil 4.25 ICG kromatogramı

Çizelge 4.11 Daha önce elde edilmiş ICG kromatogramının alıkonma ve alan ortalaması

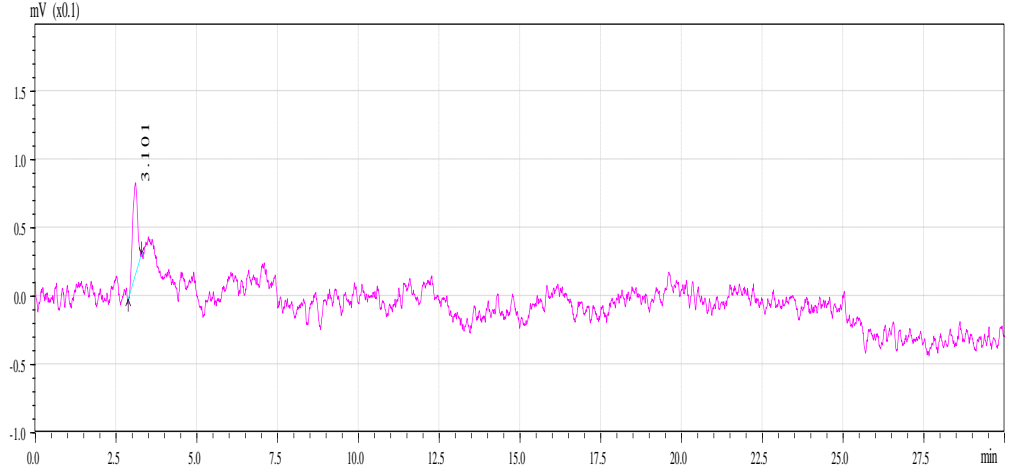
Örnek	Rt	Alan
ICG	4.500	97312128



Şekil 4.26 FDG-MNP-ICG ile farklı konsantrasyonlarda elde edile kalibrasyon çalışması sonuç grafiği

Erkek sıçanda homojenize edilmiş ICG konjuge FDG MNP lerin şekil 4.27 böbrek dokusundaki HPLC Kromatogramını, şekil 4.28 prostat dokusundaki, şekil 4.29 dalak dokusundaki, şekil 4.30 karaciğer dokusundaki, şekil 4.31 akciğer dokusundaki, şekil 4.32 kalp dokusundaki ICG konjuge FDG MNP lerin HPLC Kromatogramlarını vermektedir. Şekil 4.26'daki kalibrasyon grafiği kullanılarak dokular tutulan FDG-MNP miktarları mg doku başına µg FDG-MNP olarak çizelge 4.18'de verilmiştir. FDG-MNP'ler perfüzyon yöntemi ile dokulara verildiği için en yakın organ olarak kalp deki tutulum en yüksek bulunmuştur (250 mg/ µg). Sitotoksitate için hedef organlar olan karaciğer ve böbrek tutulumu nispeten düşük bulunmuştur (92 mg/µg ve 21 mg/ µg). Hedef organ olan prostat dokusunda da 68 mg/µg tutulum görülmüştür.

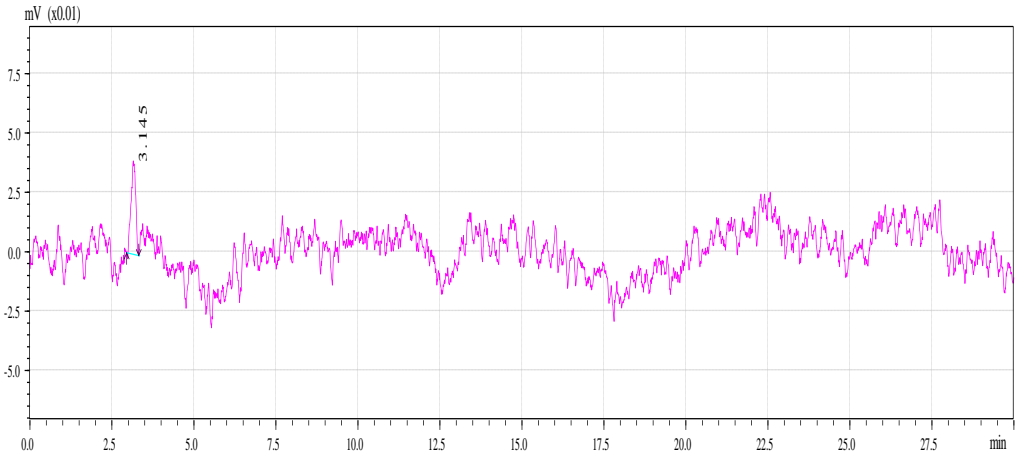
MNP'lerin kanser hücrelerinde mitokondrial elektron transport zinciri ile tutulduğu ve ATP üretimini etkiledikleri, mitokondrial membran potansiyeli etkiledikleri ve kalsiyum mikro dağılımını etkileyerek apoptosisi tetikledikleri rapor edilmiştir. İlaveten mitokondrialarda reaktif oksijen serileri oluştururlar, bu reaktif oksijen serileri de kanser hücrelerinin daha düşük antioksidan kapasiteleri nedeniyle toksik etki oluşturur. Bundan başka DNA dizini ve gen ontoloji analizleri Fe₃O₄ içerikli MNP'lerin metalotiyonin ekspresyonunu hem normal hem kanser hücrelerinde arttırdığını fakat METC gen ekspresyonun kanser hücrelerinde azaldığını gösterdi. Sonuç olarak bütün bu sonuçlara bakıldığında, Fe₃O₄ içerikli MNP ler kanser hücrelerinde METC yi hedefleyerek kanser hücre ölümünü tetikler ve antikanser teranostik nanotaşıyıcı olarak yararlı olabilir (Chengyong et al., 2016).



Şekil 4.27 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Böbrek dokusundaki ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.12 Erkek Homojenize edilmiş Böbrek alıkonma ve alan ortalaması

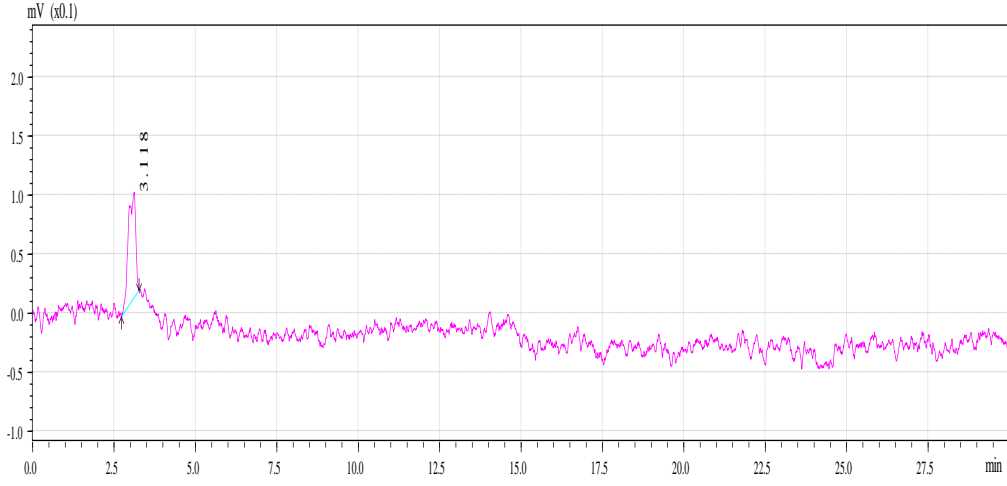
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Böbrek	3.112	835



Şekil 4.28 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Prostat dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.13 Erkek homojenize edilmiş Prostat alıkonma ve alan ortalaması

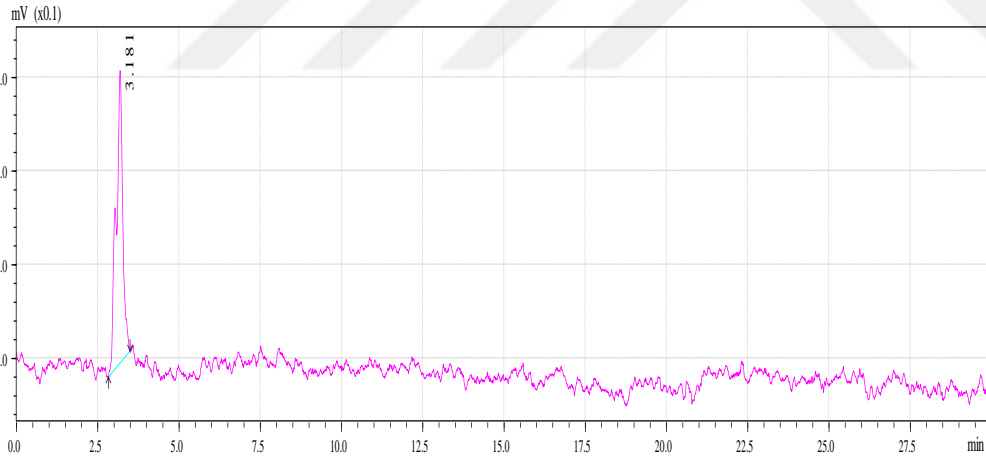
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Prostat	3.134	367



Şekil 4.29 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Dalak dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.14 Erkek homojenize edilmiş Dalak alıkonma ve alan ortalaması

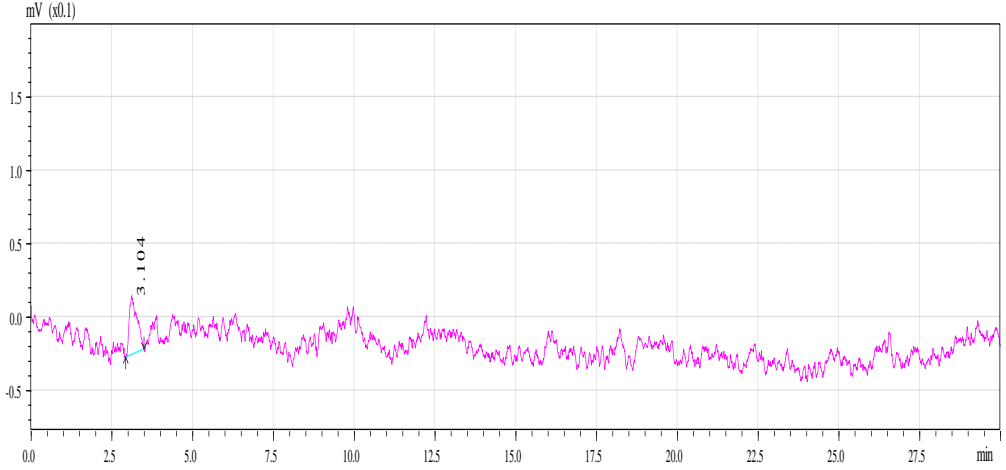
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Dalak	3.141	1668.4



Şekil 4.30 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Karaciğer dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.15 Erkek homojenize edilmiş Karaciğer alıkonma ve alan ortalaması

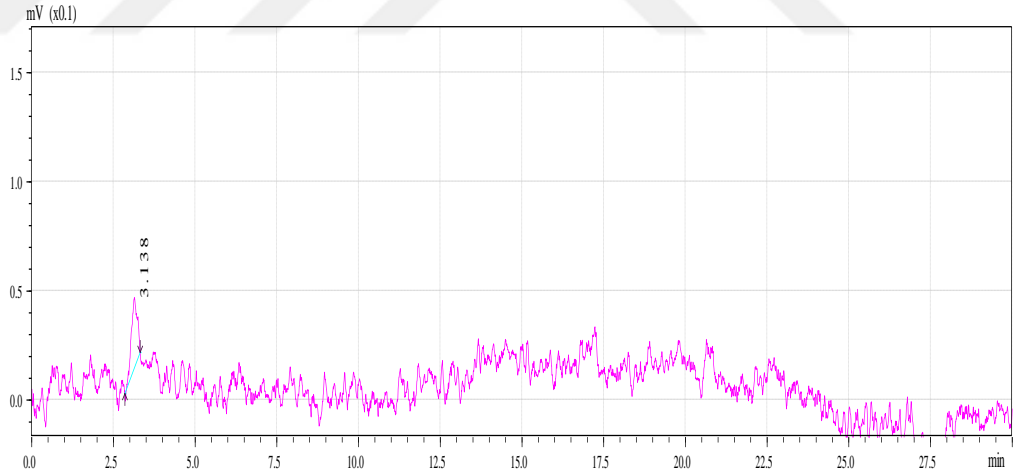
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Karaciğer	3.181	3541.4



Şekil 4.31 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Akciğer dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.16 Erkek homojenize edilmiş Akciğer alıkonma ve alan ortalaması

Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Akciğer	3.115	443.6



Şekil 4.32 Erkek sıçanda homojenize edilmiş Kalp dokusunda ICG konjuge FDG-MNP'lerin HPLC kromatogramı

Çizelge 4.17 Erkek homojenize edilmiş Kalp alıkonma ve alan ortalaması

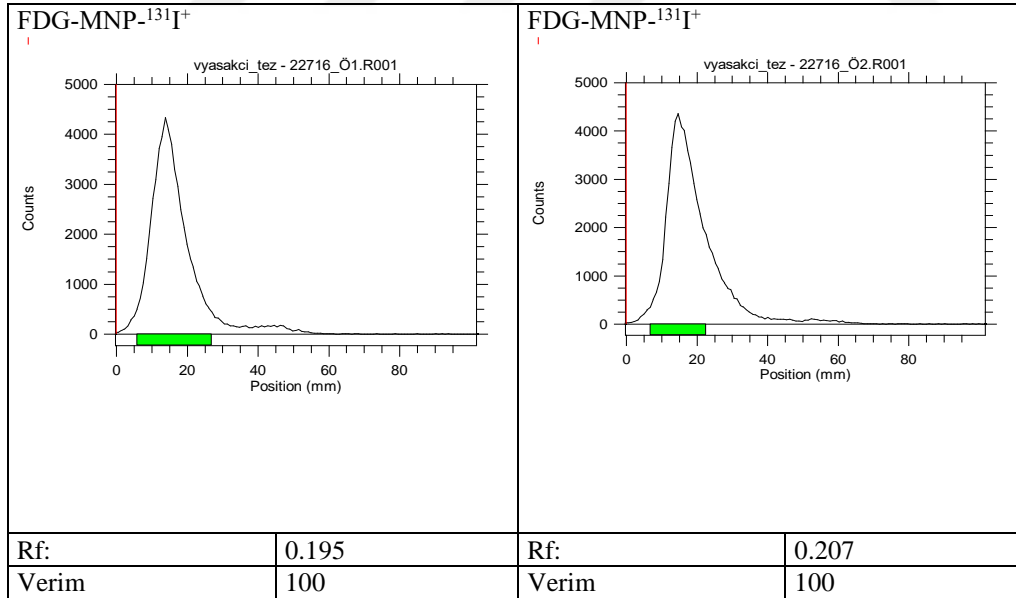
Örnek	Rt (n=2)	Alan (n=2)
Kalp	3.137	491.4

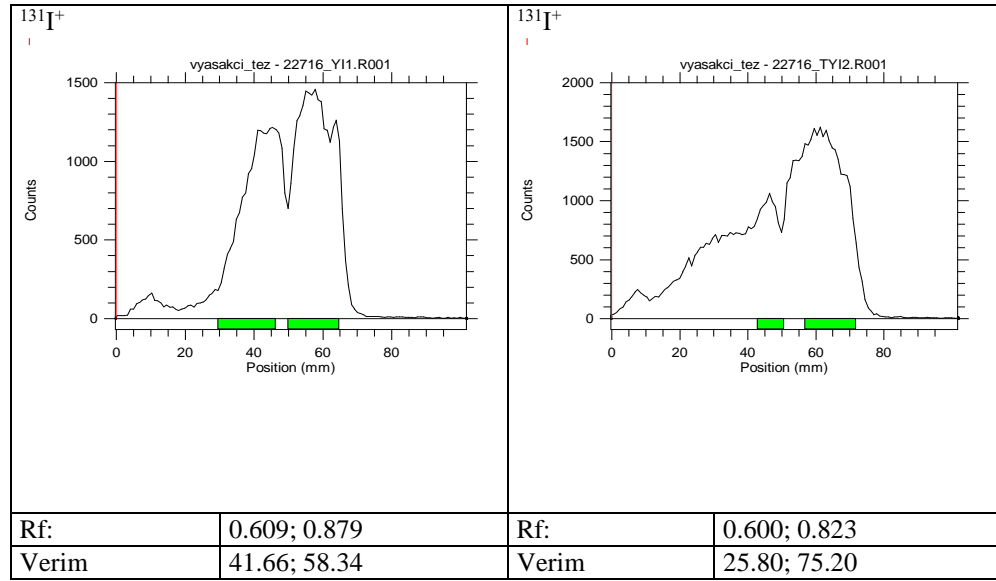
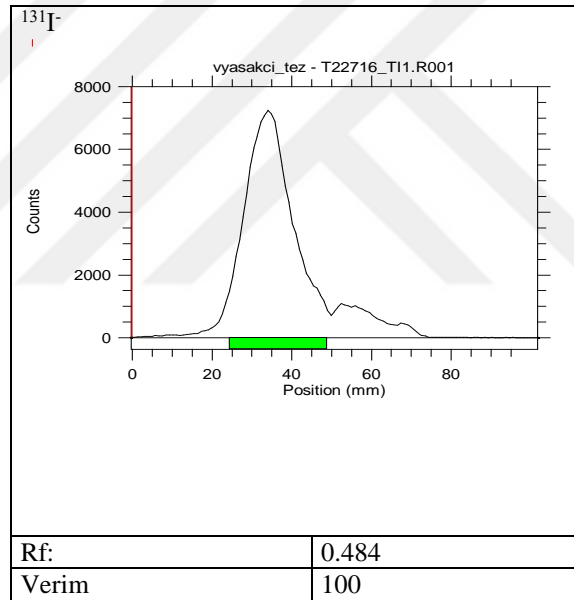
Çizelge 4.18 Çeşitli dokulardaki FDG-MNP-ICG miktarları ($\mu\text{g}/\text{mg}$)

Organ örnekleri (Erkek Sıçan)	Homojenize edilen organ örnekleri miktarı (mg)	Karşılık gelen FDG-MNP-ICG miktarı (μg)	Organ örnekleri miktarının tutunan FDG-MNP-ICG miktarına oranı ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Akciğer	98,3	1,068	92,04
Böbrek	329	2,661	123,63
Dalak	177,8	3,203	55,51
Kalp	318,2	1,271	250,35
Karaciğer	235,9	10,860	21,72
Prostat	68,9	1,000	68,90

4.4.3 TLRC Analiz Sonuçları

ICG'nin floresansından gidilerek yapılan ön deneylerde sapma değeri çok yüksek sonuçlar elde edildiğinden hücre izleme deneyleri radyoışaretleme yöntemi ile yapılmış ve işaretleyici radyonüklid olarak da ^{131}I kullanılmıştır. İlaveten, hücre kültürü ortamında ^{18}F 'nin 110 dakikalık yarıömrü bir iki saaten uzun sürelerde hücre izlenmesine olanak vermediğinden, laboratuvar koşullarımızda kolay elde ettiğimiz bir radyonüklid olan ^{131}I kullanılmıştır.

Şekil 4.33 FDG-MNP- $^{131}\text{I}^+$ 'nin TLRC analiz sonuçları

Şekil 4.34 $^{131}\text{I}^+$ 'nin TLRC analiz sonuçları

Şekil 4.35 Serbest iyotun TLRC analiz sonuçları

Çizelge 4.19 TLRC sonuçlarının ortalama değerleri tablosu

Örnek	Ort. Rf (n=2)	Verim (%)
FDG-MNP- $^{131}\text{I}^+$	0.196	100
$^{131}\text{I}^+$	0.851	100
$^{131}\text{I}^-$	0.484	100

Şekil 4.33 de verilen TLRC grafiği ve Çizelge 4.19 da verilen TLRC analiz sonuçları FDG MNP'lerin ^{131}I ile işaretlenebildiğini göstermektedir.

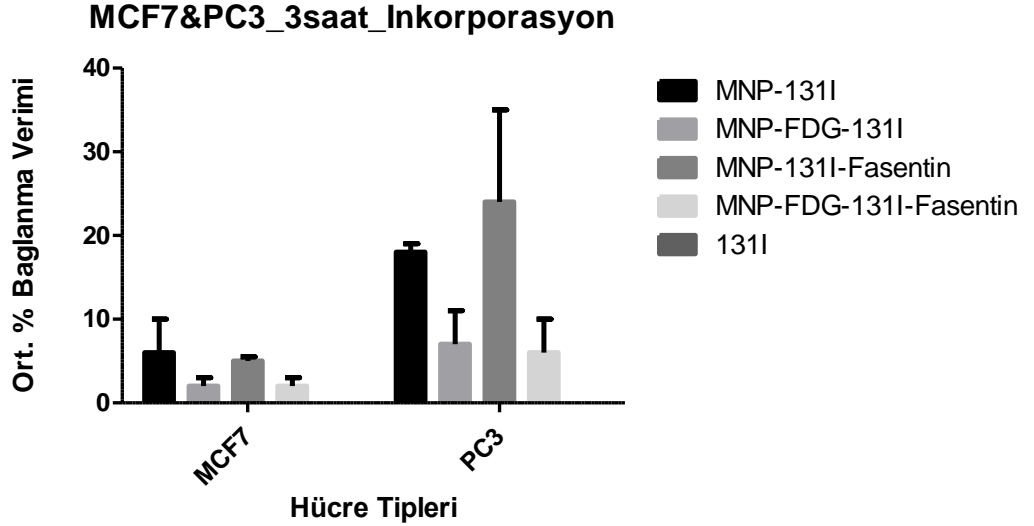
4.5 *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

Çizelge 4.20 ve şekil 4.36 MCF7 meme kanser hücrelerine ve PC-3 prostat kanser hücrelerinde 3 saatlik inkorporasyon sonucundaki bağlanma oranlarını göstermektedir. Buna göre,

- 1) Her iki hücre tipinde de manyetik nanoparçacıkların tutulumu FDG konjuge manyetik nanoparçacıklardan daha fazladır.
- 2) Fasentin istatistiksel olarak MCF7 hücrelerinde MNP'lerin tutulumunu önemli ölçüde değiştirmez iken PC-3 lerde önemli ölçüde azaltmıştır.
- 3) GLUT1 inhibitörü olarak bilinen Fasentin MCF7 hücrelerinde de PC-3 hücrelerinde de FDG konjuge MNP'lerin tutulumunu önemli ölçüde değiştirmemiştir. Manyetik nanoparçacıkların PC-3 hücrelerindeki tutulumunu ise bir miktar arttırmıştır.
- 4) PC-3 hücrelerindeki tutulum bütün konjugatlarda daha yüksek bulunmuştur.

Çizelge 4.20 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarına uygulanan nanoparçacık türevlerinin bağlanma oranları

	MCF7		PC3	
	Ort	ss	Ort	ss
MNP- ¹³¹ I	6	4	18	1
MNP-FDG- ¹³¹ I	2	1	7	4
MNP- ¹³¹ I -Fasentin	5	0	24	11
MNP-FDG- ¹³¹ I-Fasentin	2	1	6	4
¹³¹ I	0	0	0	0

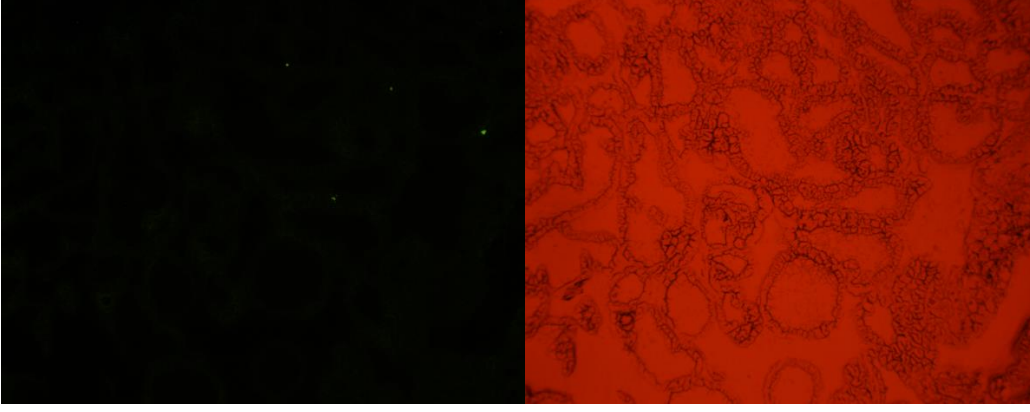


Şekil 4.36 MCF7 ve PC-3 hücre hatlarına uygulanan nanoparçacık türevlerinin bağlanma oranlarının grafiği

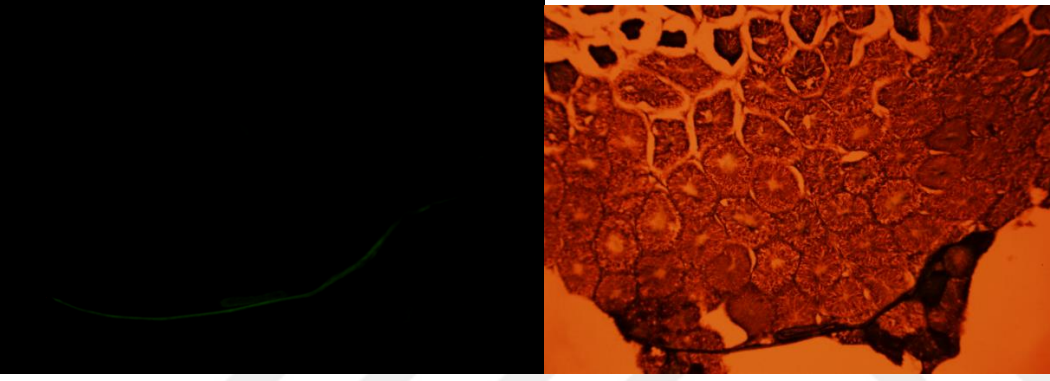
4.6 *In Vivo* Organ Tutulum Çalışması Sonuçları

4.6.1 Erkek ve dişi sıçanda ışık/floresans mikroskop görüntüleri

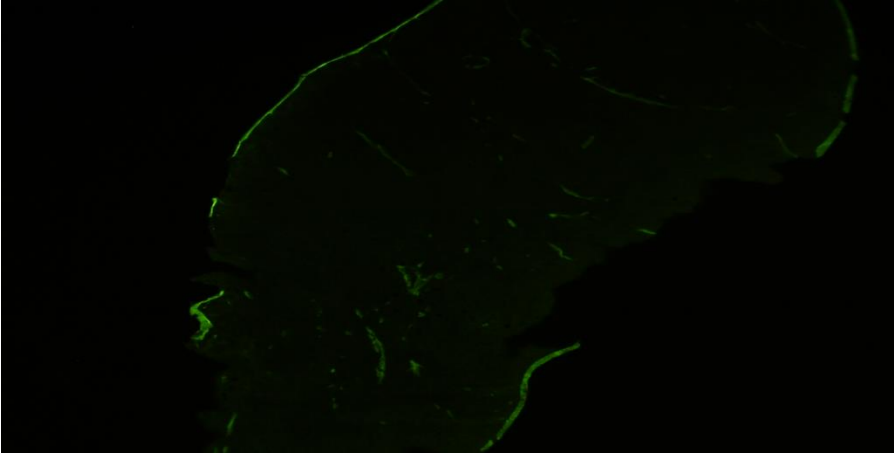
Şekil 4.37 boyanmamış slayttaki prostat organ kesitinin, şekil 4.38 boyanmış slayttaki testis organ kesitinin, şekil 4.39 boyanmış slayttaki dalak organ kesitinin, şekil 4.40 boyanmış karaciğer organ kesitinin, şekil 4.41 boyanmamış böbrek organ kesitinin, şekil 4.42 boyanmış meme organ kesitinin, şekil 4.43 boyanmamış meme organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntülerini vermektedir. Boyanmış kesitlerde organ demir tutulumu ile boyanmamış kesitlerdeki ICG'ninin yeşil floresansından gelen görüntünün birbiri ile uyumlu olduğu görüntülerden anlaşılmaktadır. Diğer organların yanında hedef organ olan prostat ve meme dokularında da FDG konjuge manyetik nanoparçacıkların tutulumu görüntülerden anlaşılmaktadır.



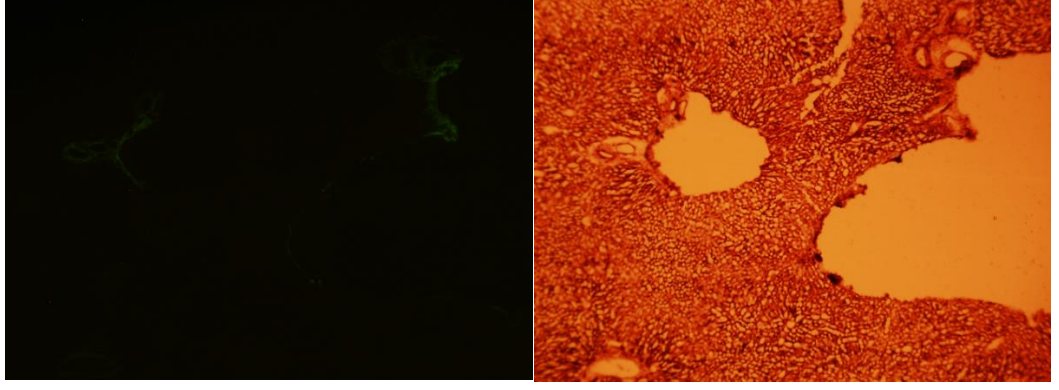
Şekil 4.37 Erkek sıçan boyanmamış slayttaki prostat organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü



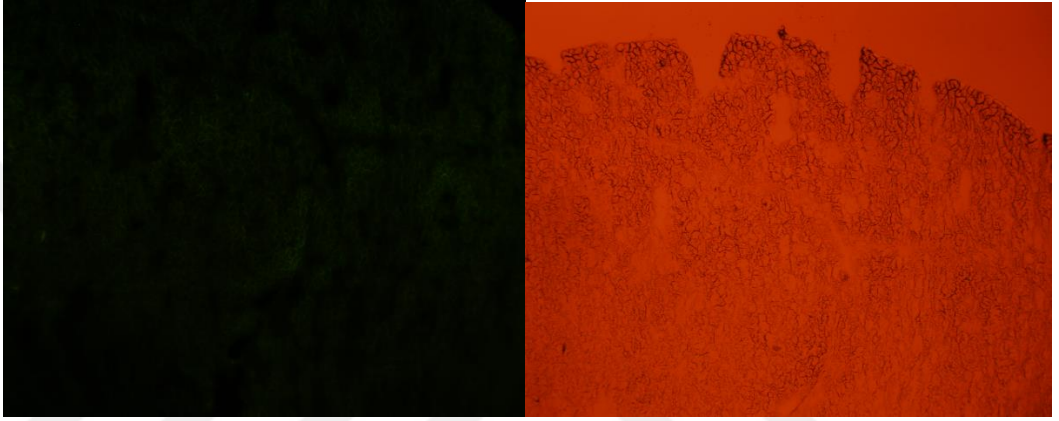
Şekil 4.38 Erkek sıçan boyanmış slayttaki testis organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü



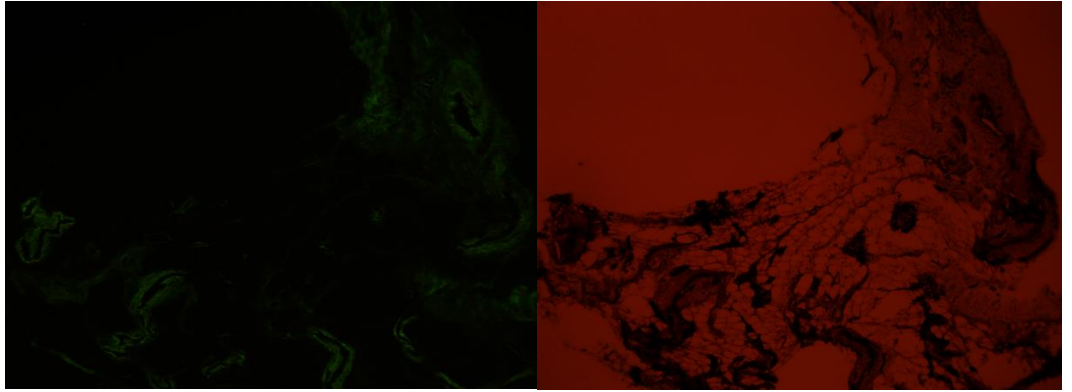
Şekil 4.39 Erkek boyanmış slayttaki dalak organ kesitinin floresans görüntüsü



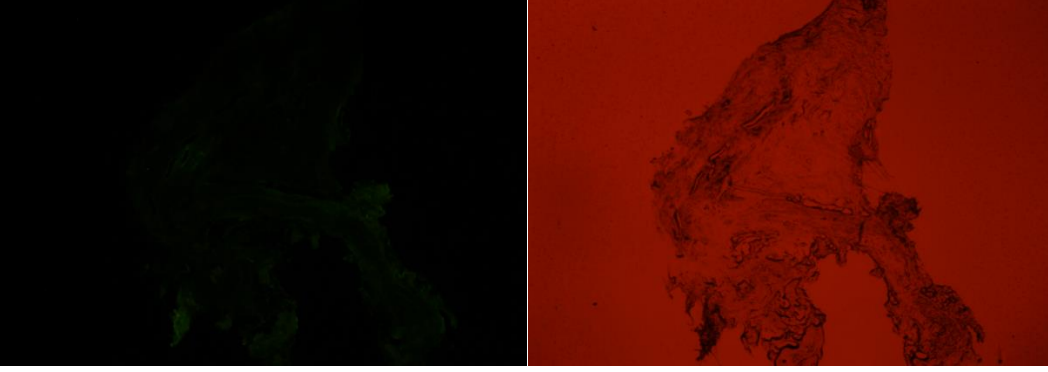
Şekil 4.40 Dişi boyanmış Karaciğer organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü



Şekil 4.41 Dişi boyanmamış böbrek organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü



Şekil 4.42 Dişi sıçanda boyanmış meme organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü



Şekil 4.43 Dişi sıçanda boyanmamış meme organ kesitinin floresans ve ışık mikroskop görüntüsü

Tümör de en fazla araştırılmış metabolik aktivitelerden birisi 1920'lerde Otto Warburg tarafından ileri sürülmüştür. Tümör hücrelerinin normal hücrelerden daha fazla glukoz tüketerek laktik aside dönüşümü olan bu olay Warburk Etkisi olarak bilinir (Kim et al., 2006). Günümüzde yapılan gen analizleri insan kanserlerinin hemem hemen hepsinde GLUT1 ve GLUT4 glikolitik genlerin ve GLUT taşıyıcıların normal hücrelerden fazla olduğu göstermiştir (Kim et al., 2006; Shim et al., 1997; Szablewski et al, 2013). Bu mekanizmayı kullanarak demir içeren manyetik nanoparçacıkları glukoz ile kaplayarak truva atı gibi kanser hücrelerine yönlendirmek ve bu şekilde hem kanseri MRI hem de PET (^{18}F ile işaretli türevi) ile pek çok kanser çeşidini görüntülemek mümkündür. Bu şekilde tasarlanmış nanoparçacıkların kanser hücrelerinde birikebilmesi için glukoz moleküllerinin GLUT1 reseptörleri ile temasını sağlayacak şekilde tasarlanmış olması gerekmektedir. GLUT1 reseptörleri ile etkileşim glukoz moleküllerinin hidroksil gruplarının GLUT1'in transmembran alfa sarmalı üzerinden hidrojen bağları vasıtasıyla olmaktadır (Selvi, et al., 2012). Farklı gruplar glukoz kaplı demir nanoparçacıkların çeşitli kanser hücrelerine tutulumunu incelemişlerdir (Shan et al., 2012; Xiong et al., 2012; Barbaro et al., 2015). Ancak sözü edilen çalışmalarda demir içerikli nanoparçacıklarda kullanılan kaplama materyali ve hazırlama teknikleri bizim çalışmamızdan farklı olmakla birlikte bulunan sonuçlar glukoz ile konjugasyonun kanser hücrelerine tutulumu arttırdığı yönündedir. GLUT1 üzerinden yapılan hücre tutulumu glukoz molekülünün hidroksil grupları üzerinden transmembran alfa kıvrımıyla olan hidrojen bağları ile olmaktadır.

Manyetik nanoparçacıkların hücre tutulum mekanizması olarak ise glukoz kaplı altın nanoparçacıklarda olduğu gibi vesiküler olmayan membranlar arası geçiş ile olduğu ileri sürülmüştür (Gromnicova et al., 2013). Öte yandan çok küçük boyutlu manyetik nanoparçacıkların *in vivo* kullanım potansiyelinde olabilecek bir güçlük vasküler yoldan normal dokuya kaçış ve tümör dokusunda

istenen konsantrasyona ulaşmasının sağlanmasıdır. Diğer yandan düşük vücut tutulumu sağlanırsa böbreklerden düşük toksisite göstererek atılım mümkün olabilir (Hayashi et al. 2013; Urban et al., 2013; Choi et al., 2007).





5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde kanser tedavisinde alternatif olarak tercih edilen tanı ve tedavi yöntemleri içerisinde en sık kullanılan materyaller, manyetik özelliğe sahip nanoparçacıklardır. Manyetik alan etkisiyle hedefe yönlenebilme özelliğine sahip olduklarından kişiye özel tıp uygulamalarına olanak sağlamaktadırlar. Aynı zamanda herhangi bir tümöre spesifik bir kontrast ajan ile konjuge edilerek görüntüleme ve tedavi de yeni yaklaşımlar sunmaktadırlar.

Bu çalışmada, demir oksit (Fe_3O_4) içerikli manyetik nanoparçacıklar (MNP) çöktürme yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen manyetik nanoparçacıkların yüzeyi silikalanmış ve ardından silan çifti ajanı ile silanlanmıştır. Amin uçlarına sahip olan silanlı MNP'ler kanser hücrelerinde önemli ölçüde bulunan polimerik ve halkalı bir yapıya sahip Hyaluronik Asit ile modifiye edilmiştir. İkinci aşamada, mannoz triflat ile etilendiamin konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu işlem sonrasında inaktif Flor (^{19}F) ile florinasyon reaksiyonu gerçekleştirilmiştir ve Florodeoksiglukoz-etilendiamin (^{19}FDG -etilendiamin) molekülü oluşturulmuştur. Son aşamada Hyaluronik Asit ile modifiye edilmiş MNP'ler ile ^{19}FDG -etilendiamin konjuge edilerek ^{19}FDG -MNP molekülü elde edilmiştir.

Bu aşamadan sonra sentezlenen molekülü hücre kültürü ve hayvan organı çalışmalarında kolayca takip edebilmek için iodojen yöntemi kullanılarak ^{131}I ile radyoışaretleme yapılmıştır. Radyoışaretleme sonucu sentezlenen ^{131}I - ^{19}FDG -MNP'lerin kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) ile gerçekleştirilmiştir. Akabinde bu moleküller *in vitro* çalışmalarda kullanılmıştır. Hayvan organ tutulum çalışmasında ise optik işaretli ^{131}I - ^{19}FDG -MNP-ICG molekülü kullanılmıştır ve ICG molekülünün floresans özelliğinden dolayı bu çalışma sonrası dokularda ^{131}I - ^{19}FDG -MNP'ler kolayca tespit edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmaları MCF7 ve PC-3 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Bu sonuçlara göre, PC-3 hücre hatlarındaki tutulumun MCF7 hücrelerindeki tutulumdan neredeyse 2 kat daha fazla olduğunu görülmektedir.

In vivo olarak erkek ve dişi Sprague Dawley sıçanlar üzerinde, etik kurallar çerçevesinde 3 farklı proses denenmiştir. Bu prosesler sonrasında organların Leicia CM1900 Kyoostat cihazı yardımıyla 30 μ m frozen kesitleri alınmıştır. Erkek sıçan kimi organları ise PBS içerisinde Sonifier Converter homojenizasyon cihazı kullanılarak homojenize edilmiştir. Homojenize edilen ve kesitleri alınan dokular içerisindeki ^{131}I - ^{19}FDG -MNP'lerin tutulumu ICG'nin floresans özelliğinden yararlanılarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda homojenize örnekler ile yapılan

HPLC çalışması ile FDG-MNP-ICG ile aynı koşullarda yapılan doku örneklerinden elde edilen alıkonma zamanı 3,100 dk civarında elde edilmiştir. Aynı HPLC koşullarında yapılan kalibrasyon çalışması ile de organlardaki FDG-MNP tutulumu tespit edilmeye çalışılmıştır. Sonuçlara bakıldığında kalp dokusundaki tutulumun en fazla olduğu tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar FDG konjuge Fe_3O_4 nanoparçacıkların kanser hücrelerine tutulumu arttırdığı ve bu parçacıkların MRI ile kanser hücrelerinde görüntüleme ve hipertermia ile terapi için uygun özelliklerinden dolayı teranostik ajan olabileceklerini göstermektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adamson, J., Foster, A. B., Hall, L. D., Johnson, R. N, and Heese, R. H.,** 1970, Fluorinated carbohydrates: Part III. 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose and 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose, *Carbohydrate Research*, 15(3), 351-359pp.
- Alander, J. T., Kaartinen, I., Laakso, A., Pättilä, T., Spillmann, T., Tuchin, V. V, and Välisuo, P.,** 2012, A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery, *Journal of Biomedical Imaging*, 7p.
- Alkrad, J. A., Mrestani, Y., Stroehl, D., Wartewig, S., and Neubert, R.,** 2003, Characterization of enzymatically digested hyaluronic acid using NMR, Raman, IR, and UV–Vis spectroscopies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31(3), 545-550pp.
- Allen, T. M., and Cullis, P. R.,** 2004, Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822pp.
- Babu, P., Sinha, S., and Surolia, A.,** 2007, Sugar-quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins, *Bioconjugate Chemistry*, 18(1), 146-151pp.
- Barbaro, D., Di Bari, L., Gandin, V., Evangelisti, C., Vitulli, G., Schiavi, E., and Salvadori, P.,** 2015, Glucose-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles prepared by metal vapour synthesis are electively internalized in a pancreatic adenocarcinoma cell line expressing GLUT1 transporter, *PloS One*, 10(4), e0123159.
- Bessell, E. M., Courtenay, V. D., Foster, A. B., Jones, M., and Westwood, J. H.,** 1973, Some in vivo and in vitro antitumour effects of the deoxyfluoro-D-glucopyranoses, *European Journal of Cancer*, 9(7), 463-470pp.
- Bingle, L., Brown, N. J., and Lewis, C. E.,** 2002, The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies, *The Journal of Pathology*, 196(3), 254-265pp.
- Brigati, C., Noonan, D. M., Albin, A., & Benelli, R.,** 2002, Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes?, *Clinical and Experimental Metastasis*, 19(3), 247-258pp.
- Brigger, I., Dubernet, C., & Couvreur, P.,** 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(5), 631-651pp.
- Brown, R. S., Leung, J. Y., Kison, P. V., and Zasadny, K. R.,** 1999, Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer, *The Journal of Nuclear Medicine*, 40(4), 556p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Burton, B. B., Kang, S. W., Rhee, S. W., and George, S. M.,** 2009, SiO₂ atomic layer deposition using tris (dimethylamino) silane and hydrogen peroxide studied by in situ transmission FTIR spectroscopy, *The Journal of Physical Chemistry*, 113(19), 8249-8257pp.
- Campo, A. Sen, T. Lellouche, J. P., and Bruce, I. J.,** 2005, Multifunctional Magnetite and Silica–Magnetite Nanoparticles: Synthesis, Surface Activation and Applications in Life Sciences, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 33–40pp.
- Carraway, K. L., and Triplett, R. B.,** 1970, Reaction of carbodiimides with protein sulfhydryl groups, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure*, 200(3), 564-566pp.
- Cheng, G., and Zheng, S. Y.,** 2014, Construction of a high-performance magnetic enzyme nanosystem for rapid tryptic digestion, *Scientific Reports*, 4, 6947p.
- Chengyong H., Shengwei J., Haijing J., Shuzhen C., Gan L., Huan Y., Xiaoyong W., Peng M., Zhiliang J., Yuchun L., Zhongning L., and Gang L.,** 2016, Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer-specific cytotoxicity, *Biomaterials*, 83:102 e114pp.
- Choi H. S., Liu W., Misra P., Tanaka E., Zimmer J. P., and Itty I. B.,** 2007, Renal clearance of quantum dots, *Nature Biotechnology*, (10):1165–1170pp.
- Deng, L., Wang, G., Ren, J., Zhang, B., Yan, J., Li, W., and Khashab, N. M.,** 2012, Enzymatically triggered multifunctional delivery system based on hyaluronic acid micelles, *Royal Society of Chemistry Advances*, 2(33), 12909-12914pp.
- Du, G. H., Liu, Z. L., Xia, X., Chu, Q., and Zhang, S. M.,** 2006, Characterization and application of Fe₃O₄/SiO₂ nanocomposites, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 39(3), 285-291pp.
- El-Dakdouki, M. H., Zhu, D. C., El-Boubbou, K., Kamat, M., Chen, J., Li, W., and Huang, X.,** 2012, Development of multifunctional hyaluronan-coated nanoparticles for imaging and drug delivery to cancer cells, *Biomacromolecules*, 13(4), 1144-1151pp.
- Ferrari, M.,** 2005, Cancer nanotechnology: opportunities and challenges, *Nature Reviews Cancer*, 5(3), 161-171pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Freshney, R. I.**, 1986, *Animal Cell Culture: A Practical Approach Sixth Edition* John Wiley & Sons, 732p.
- Gallagher, A., Ansari A., Atkins H., Casella V., Christman D. R., Fowler J. S., Idot T., MacGregor R.R., Som P., Wan C.N., Wolf A. P., Kuhl D. E., and Reivich M.**, 1977, Radiopharmaceuticals XXVII. ^{18}F -labeled 2-deoxy-2-fluoro-d-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals, *Journal of Nuclear Medicine*, 18, 990-996pp.
- Gillies, J. M., Prenant, C., Chimon, G. N., Smethurst, G. J., Dekker, B. A., and Zweit, J.**, 2006, Microfluidic technology for PET radiochemistry, *Applied Radiation and Isotopes*, 64(3), 333-336pp.
- Glaus, C., Rossin, R., Welch, M. J., and Bao, G.**, 2010, In vivo evaluation of ^{64}Cu -labeled magnetic nanoparticles as a dual-modality PET/MR imaging agent, *Bioconjugate Chemistry*, 21(4), 715-722pp.
- Gobbo, O. L., Sjaastad, K., Radomski, M. W., Volkov, Y., and Prina-Mello, A.**, 2015, Magnetic nanoparticles in cancer theranostics, *Theranostics*, 5(11), 1249p.
- Greenwood, N. N., and Earnshaw, A.**, 1997, *Chemistry of the Elements 2nd Edition*, Oxford, 340p.
- Gromnicova R., Davies H.A., Sreekanthreddy P., Romero I.A., Lund T., and Roitt I.M.**, 2013, Glucose-coated gold nanoparticles transfer across human brain endothelium and enter astrocytes *in vitro*, *PLoS One*, 8(12), 81043p.
- Guardia, P., Di Corato, R., Lartigue, L., Wilhelm, C., Espinosa, A., Garcia-Hernandez, M., and Pellegrino, T.**, 2012, Water-soluble iron oxide nanocubes with high values of specific absorption rate for cancer cell hyperthermia treatment, *American Chemical Society Nano*, 6(4), 3080-3091pp.
- Gubin, S. P.**, 2009, *Magnetic Nanoparticles*, John Wiley & Sons., 466p.
- Hafid, M., Dalili, W., Yazami, S. I., and Merzouk, N.**, 2010, Growth and characterization of Fe_3O_4 nanoparticles in silica matrix, *Phase Transitions*, 83(8), 627-633pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hauser, A. K.**, 2016, Peptide-Functionalized Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy Applications, *Theses and Dissertations--Chemical and Materials Engineering*, 59p.
- Hayashi K, Nakamura M, Sakamoto W, Yogo T, Miki H, and Ozaki S**, 2013, Super paramagnetic nanoparticle clusters for cancer theranostics combining magnetic resonance imaging and hyperthermia treatment, *Theranostics*, 3(6), 366-376pp.
- Higashi, K., Ueda, Y., Sakurai, A., MingWang, X., Xu, L., Murakami, M., and Tonami, H.**, 2000, Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with [¹⁸F] FDG uptake in non-small cell lung cancer, *European Journal of Nuclear Medicine*, 27(12), 1778-1785pp.
- Huang, G., Chen, H., Dong, Y., Luo, X., Yu, H., Moore, Z., and Gao, J.**, 2013, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: amplifying ROS stress to improve anticancer drug efficacy, *Theranostics*, 3(2), 116-126pp.
- Huber, J. F.**, 2011, Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography, Elsevier, (Vol. 13), 204p.
- Ido, T., Wan, C. N., Casella, V., Fowler, J. S., Wolf, A. P., Reivich, M., and Kuhl, D. E.**, 1978, Labeled 2-deoxy-D-glucose analogs. ¹⁸F-labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, 2-deoxy-2-fluoro-D-mannose and ¹⁴C-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 14(2), 175-183pp.
- Jain Tapan K., Morales Marco A., Sahoo Sanjeeb K., Leslie-Pelecky Diandra L., and Labhassetwar Vinod**, 2005, Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents, *American Chemical Society*, 2(3), 194-205pp.
- Kanazawa, Y., Yamane, H., Shinohara, S., Kuribayashi, S., Momozono, Y., Yamato, Y., and Masuda, K.**, 1996, 2-Deoxy-2-Fluoro-d-Glucose as a Functional Probe for NMR: The Unique Metabolism Beyond Its 6-Phosphate, *Journal of Neurochemistry*, 66(5), 2113-2120pp.
- Kienhuis, C. B., Heuvel, J. J., Ross, H. A., Swinkels, L. M., Foekens, J. A., and Benraad, T. J.**, 1991, Six methods for direct radioiodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of nonequivalence in binding behavior between labeled and unlabeled ligand, *Clinical Chemistry*, 37(10), 1749-1755pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kim J.W., and Dang C.V.**, 2006, Cancer's molecular sweet tooth and the Warburg effect, *Cancer Research*, 99(18), 8027–8930pp.
- Kim, Y. J., Ebara, M., and Aoyagi, T.**, 2013, A smart hyperthermia nanofiber with switchable drug release for inducing cancer apoptosis, *Advanced Functional Materials*, 23(46), 5753-5761pp.
- Kolosnjaj-Tabi, J., Di Corato, R., Lartigue, L., Marangon, I., Guardia, P., Silva, A. K., and Decuzzi, P.**, 2014, Heat-generating iron oxide nanocubes: subtle “destructorators” of the tumoral microenvironment, *American Chemical Society Nano*, 8(5), 4268-4283pp.
- Lee, H. J., Jang, K. S., Jang, S., Kim, J. W., Yang, H. M., Jeong, Y. Y., and Kim, J. D.**, 2010, Poly (amino acid) s micelle-mediated assembly of magnetite nanoparticles for ultra-sensitive long-term MR imaging of tumors, *Chemical Communications*, 46(20), 3559-3561pp.
- Lee, Y., Lee, H., Kim, Y. B., Kim, J., Hyeon, T., Park, H., and Park, T. G.**, 2008, Bioinspired surface immobilization of hyaluronic acid on monodisperse magnetite nanocrystals for targeted cancer imaging, *Advanced Materials*, 20(21), 4154-4157pp.
- Li, K. C., Pandit, S. D., Guccione, S., and Bednarski, M. D.**, 2004, Molecular imaging applications in nanomedicine, *Biomedical Microdevices*, 6(2), 113-116pp.
- Longmire M., Choyke Peter L., and Kobayashi Hisataka**, 2008, Clearance Properties of Nano-sized Particles and Molecules as Imaging Agents: Considerations and Caveats, *Nanomedicine (Lond)*, 3(5), 703–717pp.
- Maeng, J. H., Lee, D. H., Jung, K. H., Bae, Y. H., Park, I. S., Jeong, S., and Lee, J.**, 2010, Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer, *Biomaterials*, 31(18), 4995-5006pp.
- Medine, E. I., Ünak, P., Sakarya, S., and Özkaya, F.**, 2011, Investigation of in vitro efficiency of magnetic nanoparticle-conjugated ¹²⁵I-uracil glucuronides in adenocarcinoma cells, *Journal of Nanoparticle Research*, 13(10), 4703-4715pp.
- Nakada, T., Kwee, I. L., Card, P. J., Matwiyoff, N. A., Griffey, B. V., and Griffey, R. H.**, 1988, Fluorine-19 NMR imaging of glucose metabolism, *Magnetic Resonance in Medicine*, 6(3), 307-313pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Namavari, M., De Jesus, O. P., Cheng, Z., De, A., Kovacs, E., Levi, J., and Gambhir, S. S.**, 2008, Direct site-specific radiolabeling of an Affibody protein with 4-[¹⁸F] fluorobenzaldehyde via oxime chemistry, *Molecular Imaging and Biology*, 10(4), 177-181pp.
- Namgung, R., Zhang, Y., Fang, Q. L., Singha, K., Lee, H. J., Kwon, I. K., and Kim, W. J.**, 2011, Multifunctional silica nanotubes for dual-modality gene delivery and MR imaging, *Biomaterials*, 32(11), 3042-3052pp.
- Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., and Kolar, J.**, 2008, Hyaluronic acid (hyaluronan): a review, *Veterinarni Medicina*, 53(8), 397-411pp.
- Niederhuber, J. E.**, 2007, Developmental biology, self-renewal, and cancer, *The Lancet Oncology*, 8(6), 456-457pp.
- Noh, S. H., Na, W., Jang, J. T., Lee, J. H., Lee, E. J., Moon, S. H., and Cheon, J.**, 2012, Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis, *Nano Letters*, 12(7), 3716-3721pp.
- Ozkaya, F., Unak, P., Medine, E. I., Sakarya, S., Unak, G., and Timur, S.**, 2013, ¹⁸FDG conjugated magnetic nanoparticle probes: synthesis and in vitro investigations on MCF-7 breast cancer cells, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 295(3), 1789-1796pp.
- Pauwels, E. K. J., Ribeiro, M. J., Stoot, J. H. M. B., McCready, V. R., Bourguignon, M., and Maziere, B.**, 1998, FDG accumulation and tumor biology, *Nuclear Medicine and Biology*, 25(4), 317-322pp.
- Pollard, J. W.**, 2004, Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis, *Nature Reviews Cancer*, 4(1), 71-78pp.
- Portela, V. M., Zamberlam, G., and Price, C. A.**, 2010, Cell plating density alters the ratio of estrogenic to progestagenic enzyme gene expression in cultured granulosa cells, *Fertility and Sterility*, 93(6), 2050-2055pp.
- Räty, J. K., Liimatainen, T., Wirth, T., Airene, K. J., Ihalainen, T. O., Huhtala, T., and Hakumäki, J. M.**, 2006, Magnetic resonance imaging of viral particle biodistribution in vivo, *Gene Therapy*, 13(20), 1440-1446pp.
- Rohrich, R. J., Ghavami, A., and Crosby, M. A.**, 2007, The Role of Hyaluronic Acid Fillers (Restylane) in Facial Cosmetic Surgery: Review and Technical Considerations, *Plastic Reconstructive Surgery*, 120, 41-54pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sanchez, C., El Hajj Diab, D., Connord, V., Clerc, P., Meunier, E., Pipy, B., and Gigoux, V.,** 2014, Targeting a G-protein-coupled receptor overexpressed in endocrine tumors by magnetic nanoparticles to induce cell death, *American Chemical Society Nano*, 8(2), 1350-1363pp.
- Schimmer, A. D., Thomas, M. P., Hurren, R., Gronda, M., Pellicchia, M., Pond, G. R., and Reed, J. C.,** 2006, Identification of small molecules that sensitize resistant tumor cells to tumor necrosis factor-family death receptors, *Cancer Research*, 66(4), 2367-2375pp.
- Selvi R. B., Chatterjee S., Jagadeesan D., Chaturbedy P., Suma B. S., and Eswaramoorthy M.,** 2012, ATP driven clathrin dependent entry of carbon nanospheres prefer cells with glucose receptors, *Journal of Nanobiotechnology*, 10(35).
- Shan X. H., Hu H., Xiong F., Gu N., Geng X. D., Zhu W.,** 2012, Targeting Glut1-overexpressing MDA-MB-231cells with 2-deoxy-D-glucose modified SPIOs, *European Journal of Radiology*, 81(1), 95–99pp.
- Shim H., Dolde C., Lewis B. C., Wu C. S., Dang G., Jungmann R. A.,** 1997, C-Myc transactivation of LDH-A: implications for tumor metabolism and growth, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 94(13), 6658–6663pp.
- Sirard T.,** 2012, Fundamentals of HPLC, http://www.waters.com/webassets/cms/events/docs/FundamentalsofHPLC_Webinar_TRS_102012.pdf (Erişim tarihi: 20 Aralık 2016).
- Smolkova, I. S., Kazantseva, N. E., Babayan, V., Smolka, P., Parmar, H., Vilcakova, J., and Pizurova, N.,** 2015, Alternating magnetic field energy absorption in the dispersion of iron oxide nanoparticles in a viscous medium, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 374, 508-515pp.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M. H., Patlak, C. S., Pettigrew, K. E. A., and Shinohara, M.,** 1977, The [¹⁴C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat1, *Journal of Neurochemistry*, 28(5), 897-916pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Subramanian M., Pearce G., Guldu O. K., Tekin V., Miaskowski A., and Aras O., Unak P.,** 2016, A Pilot Study Into the Use of FDG-mNP as an Alternative Approach in Neuroblastoma Cell Hyperthermia, *IEEE Transactions On Nanobioscience*, 15(6), 517-525pp.
- Szablewski L.,** 2013, Expression of glucose transporters in cancer, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1835(2), 164–169pp.
- Thakor, A. S., and Gambhir, S. S.,** 2013, Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 63(6), 395-418pp.
- Thomas, R. G., Moon, M., Lee, S., and Jeong, Y. Y.,** 2015, Paclitaxel loaded hyaluronic acid nanoparticles for targeted cancer therapy: In vitro and in vivo analysis, *International Journal of Biological Macromolecules*, 72, 510-518pp.
- Urban C, Urban AS, Charron H, and Joshi A.,** 2013, Externally modulated theranostic nanoparticles, *Translational Cancer Research*, 2(4), 292-308pp.
- Wilson, J. H., and Hunt, T.,** 2003, *Molecular Biology of the Cell* (4th Ed.), A Problems Approach, Garland Science, New York, 2002, 712p.
- Wang, X., Yang, L., Chen, Z. G., and Shin, D. M.,** 2008, Application of nanotechnology in cancer therapy and imaging, *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 58(2), 97-110pp.
- Wiebe, L. I.,** 2001, FDG Metabolism: Quaecumque Sunt Vera, *Journal of Nuclear Medicine*, 42(11), 1679-1681pp.
- Win, K. Y., and Feng, S. S.,** 2006, In vitro and in vivo studies on vitamin E TPGS-emulsified poly (D, L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for paclitaxel formulation, *Biomaterials*, 27(10), 2285-2291pp.
- Wood, T. E., Dalili, S., Simpson, C. D., Hurren, R., Mao, X., Saiz, F. S., and Klip, A.,** 2008, A novel inhibitor of glucose uptake sensitizes cells to FAS-induced cell death, *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(11), 3546-3555pp.
- Wu, J., Ma, X., and Wang, Y.,** 2013, Hyperthermia Cancer Therapy by Magnetic Nanoparticles, <https://pdfs.semanticscholar.org/ac83/006dd392266084e29ad0a0c4a74f486b053b.pdf> (Erişim tarihi: 20 Aralık 2016).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, W., He, Q., Chen, H., Tang, J., and Nie, L.,** 2007, Sonochemical synthesis, structure and magnetic properties of air-stable Fe₃O₄/Au nanoparticles, *Nanotechnology*, 18(14), 145609 (8p).
- Wydra, R. J., Oliver, C. E., Anderson, K. W., Dziubla, T. D., and Hilt, J. Z.,** 2015, Accelerated generation of free radicals by iron oxide nanoparticles in the presence of an alternating magnetic field, *Royal Society of Chemistry Advances*, 5(24), 18888-18893pp.
- Xiong F., Zhu Z. Y., Xiong C., Hua X. Q., Shan X. H., and Zhang Y.,** 2012, Preparation, characterization of 2-deoxyD-glucose functionalized dimercaptosuccinic acid-coated maghemite nanoparticles for targeting tumor cells, *Pharmaceutical Research*, 29(4), 1087–1097pp.
- Yallapu, M. M., Othman, S. F., Curtis, E. T., Gupta, B. K., Jaggi, M., and Chauhan, S. C.,** 2011, Multi-functional magnetic nanoparticles for magnetic resonance imaging and cancer therapy, *Biomaterials*, 32(7), 1890-1905pp.
- Yurt Kilcar A. and Biber Muftuler F.Z.,** 2014, Crucial Role of Radio-Chromatography in Clinical Chemistry of Nuclear Medicine and Radiopharmaceutical Research, *Austin Chromatography*, 1(2), 2p.
- Zhang, E., Kircher, M. F., Koch, M., Eliasson, L., Goldberg, S. N., and Renström, E.,** 2014, Dynamic magnetic fields remote-control apoptosis via nanoparticle rotation, *American Chemical Society Nano*, 8(4), 3192-3201pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Volkan YASAKÇI

Doğum Yeri: Konak/İZMİR

Doğum Yılı: 04.10.1990

Öğrenim Durumu:

Lise: Mustafa Kemal Anadolu Lisesi Bayraklı/İzmir (2004-2007)

Lisans: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya (2008-2013)

Askerlik:

Eğitim Birliği: Kastamonu 5. Jandarma Eğitim Alay Komutanlığı

Esas Birliği: Düzce İl Jandarma Komutanlığı-Çilimli İlçe Jandarma Komutanlığı, Kısa Dönem Er (20 Mart 2014-10 Eylül 2014)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı, Bornova/İzmir (2015- 2017)