



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



TÜMÖR SPESİFİK MULTİFONKSİYONEL KONTRAST AJAN OLARAK T-HÜCRE KONJUGE MN-AU NANOPARÇACIK SENTEZİ

Yüksek Lisans Tezi

Utku YALÇIN

Nükleer Bilimler Enstitüsü

İzmir
2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TÜMÖR SPESİFİK MULTİFONKSİYONEL KONTRAST AJAN OLARAK T-HÜCRE KONJUGE Mn-Au NANOPARÇACIK SENTEZİ

Utku YALÇIN

Danışman: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Nükleer Uygulamalar Yüksek Lisans Programı

İzmir

2020

Utku YALÇIN tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan “Tümör Spesifik Multifonksiyonel Kontrast Ajan Olarak T- Hücre Konjuge Mn-Au Nanoparçacık Sentezi” 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 30.01.2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza:

Jüri Başkanı: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE



Raportör Üye: Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF



Üye: Doç. Dr. Yasemin PARLAK



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Tümör Spesifik Multifonksiyonel Kontrast Ajan Olarak T- Hücre Konjuge Mn-Au Nanoparçacık Sentezi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

30 / 01 / 2020

Utku YALÇIN



ÖZET**TÜMÖR SPESİFİK MULTIFONKSİYONEL KONTRAST
AJAN OLARAK T – HÜCRE KONJUGE Mn-Au NANOPARÇACIK
SENTEZİ**

YALÇIN, Utku

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emin İlker Medine

Ocak 2020

Son zamanlarda kanser tedavi çalışmalarında T hücreli immünoterapi öne çıkmaktadır. İmmün sisteminin en önemli bileşenlerinden biri olan T hücrelerinin kanser tedavisinde öne çıkmasının nedeni spesifik T hücrelerinin kanserli hücreler ile aktif olarak mücadele etmesidir.

Kanser tedavisi için hastalığı doğru tanımlanması ve erken teşhisi önemlidir. Bunun için görüntüleme yöntemleri klinik sonuçlar açısından önemlidir. Görüntüleme teknolojilerindeki ilerlemeler, manyetik rezonans görüntüleme (MRG)/bilgisayarlı tomografi (BT), pozitron emüsyon tomografi (PET)/BT veya MRG/tek foton emüsyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) gibi birden çok görüntülemeyi aynı anda yapabilecek görüntüleme sistemlerinin gelişmelerine yol açmıştır. Dual modalite olarak isimlendirilen bu sistemler nanoteknolojik ilaçların geliştirilmesinde önemli rol oynamışlardır. Nanoteknoloji ve dual modalite sistemlerinin birleştirilmesi, kanser tanısı için daha iyi görüntülemelerin alınmasını sağlamaktadır. Görüntülme ajanlarında, yüksek kalitede görüntü sağlama ve hastada toksik etki oluşturmaktan güvenli kullanımı istenmektedir.

Bu çalışmada multifonksiyonel prob olarak Mn-Au nanoparçacıklar (Mn-AuNP) kullanılmıştır. Mangan (Mn), sentezlenen nanoparçacıklara konjuge edilerek altın nanoparçacıkların pozitif kontrast görüntülemelerde kullanımı sağlanmıştır. Nanoparçacıkların karakterizasyonu; taramalı elektron mikroskobu (SEM), dinamik ışık saçılımı (DLS) ve X-ışını kırınım spektroskopisi (XRD) analizleri ile yapılmıştır. DLS analizi sonucunda nanoparçacıkların boyut dağılımının homojen olduğu, SEM analizi sonucunda ise nanoparçacıkların ortalama $31,60 \pm 12,92$ nm boyutunda olduğu tespit edilmiştir.

Radyonüklid olarak kullanılan teknesyum-99m (^{99m}Tc) ile işaretlenen Mn-AuNP'in işaretlenme verimi % $98,26 \pm 0,25$ bulunmuştur.

Yapılan *in vitro* çalışmalarda SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatları kullanılmıştır.

Bu çalışmada, sentezlenen multifonksiyonel ajan ile antijen spesifik T hücrelerinin *in vivo* olarak Dual Modalite ile MRG/SPECT görüntülemesinin sağlanacağı ve kanser teşhisi amacıyla T hücrelere transfer edilmiş sistemlerin geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Altın Nanoparçacıklar (AuNP), Mangan (Mn), T-hücresi, nanoparçacıklar, Teknesyum-99m (^{99m}Tc), İmmünoterapi, Dual Modalite

ABSTRACT**THE SYNTHESIS OF T-CELL CONJUGATED Mn-Au
NANOPARTICLES AS TUMOR SPECIFIC MULTIFUNCTIONAL
CONTRAST AGENT**

YALÇIN, Utku

MSc Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emin İlker MEDİNE

January 2020

Recently, T cell immunotherapy has been prominent in cancer treatment studies. T cells, one of the most important components of the immune system, stand out in the treatment of cancer because specific T cells actively fight against cancer cells.

Correct identification and early detection of the disease is important for cancer treatment. For this purpose, imaging methods are important for clinical outcomes. Advances in imaging technologies have led to the development of imaging systems that can simultaneously perform multiple imaging, such as magnetic resonance imaging (MRI)/computer tomography (CT), positron emission tomography (PET)/CT or MRI/single photon emission computer tomography (SPECT). These systems, called dual modality, have played an important role in the development of nanotechnological drugs. The combination of nanotechnology and dual modality systems enables better imaging for cancer diagnosis. In imaging agents, it is desirable to provide high quality images and use them safely without creating toxic effects on the patient.

In this study, Mn-Au nanoparticles (Mn-AuNP) was used as biocompatible multifunctional probe. Manganese (Mn) was conjugated to synthesized nanoparticles and gold nanoparticles were used for positive contrast imaging. Characterization of nanoparticles; scanning electron microscopy (SEM), dynamic light scattering (DLS) and X-ray diffraction spectroscopy (XRD) analysis. As a result of the DLS analysis, the size distribution of the nanoparticles was homogeneous and the results of the SEM analysis showed that the nanoparticles were $31,60 \pm 12,92$ nm in average.

The labeling efficiency of Mn-AuNP labeled with technetium-99m (^{99m}Tc) used as radionuclide was found to be % $98,26 \pm 0,25$.

SKOV3 and SKOV3-CEA cell lines were used in *in vitro* studies.

In this study, it is thought that dual-modality MRI / SPECT imaging of the antigen-specific T cells *in vivo* with the synthesized multifunctional agent will be provided and will contribute to the development of systems transferred to T cells for the diagnosis of cancer.

Keywords: Gold nanoparticles (AuNP), Manganese (Mn), T-cell, Nanoparticles, Technetium (^{99m}Tc), Immunotherapy, Dual Modality



ÖNSÖZ

Bu çalışmada tetrakloroaurik asit tetrahidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)’den yola çıkılarak Turkevich metodu ile Altın Nanoparçacıklar (AuNP) sentezlenmiştir. Sentezlenen altın nanoparçacıklara Mangan (II) Klorür Dihidrat ($\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kullanılarak mangan konjuge edilmiştir. Sonraki aşamada ise mangan konjuge AuNP ler $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile radyoişaretlenmiş ve sonrasında T hücreleri ile birleştirilerek SKOV3 (insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi) ve SKOV3-CEA (karsinoembriyonik antijen ile modifiye edilmiş insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi) hücreleri için hedef ajan olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -(Mn-AuNP) ajanının SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki görüntüleme potansiyeli incelenmiştir.

İZMİR

30 / 01 / 2020

Utku YALÇIN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
ÖNSÖZ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Kanser	3
2.2 Kanser Tanısı	3
2.3 Kanser Tedavi Yöntemleri.....	4
2.4 İmmünoterapi.....	5
2.5 Nanoteknoloji	5
2.5.1 Altın nanoparçacıklar.....	6
2.5.2 Pozitif kontrast ajan olarak mangan	7
2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu.....	8
2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu	8

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.2 Dinamik ışık saçılımı	8
2.6.3 Titreşimli numune manyetometresi	9
2.6.4 X-ışını kırınım spektroskopisi.....	10
2.6.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi	10
2.7 Radyofarmasötikler.....	10
2.7.1 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) kimyası	11
2.8 Kalite Kontrol Yöntemleri	12
2.8.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	12
2.8.2 Lipofilite	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	15
3.1 Kullanılan Kimyasal Ve Cihazlar	15
3.1.1 Kullanılan kimyasallar	15
3.1.2 Kullanılan cihazlar	16
3.2 Altın Nanoparçacıklar	17
3.2.1 Altın nanoparçacıkların sentezi.....	17
3.2.2 Mangan-altın nanoparçacıkların (Mn-AuNP) konjugasyonu	17

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.2.3 Mn-AuNP'nin karakterizasyonu	18
3.3 Yapısal Analiz Çalışmaları	18
3.4 ^{99m} Tc İle Radyoişaretleme Çalışmaları	18
3.5 Kalite Kontrol Yöntemleri	18
3.5.1 İnce tabaka kromatografisi	18
3.5.2 Stabilite çalışması	19
3.5.3 Lipofilite çalışması	19
3.6 Hücre Kültürü Çalışması	19
3.6.1 Sitotoksosite çalışması	20
3.6.2 Apoptozis çalışması	21
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	22
4.1 Mn-AuNP'lerin Karakterizasyonu	22
4.1.1 DLS sonuçları	22
4.1.2 SEM sonuçları	23
4.1.3 EDX sonuçları	23
4.1.4 VSM sonuçları	24

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.1.5 XRD sonuçları.....	25
4.1.6 UV-Vis sonuçları	25
4.2 Mn-Au Nanoparçacıkların Yapısal Analiz Çalışmaları	26
4.2.1 FTIR sonuçları	26
4.3 Kalite Kontrol Çalışmaları	27
4.3.1 TLC sonuçları	27
4.3.2 Stabilite sonuçları.....	30
4.3.3 Lipofilite sonuçları.....	32
4.4 Hücre Kültürü Çalışmaları	32
4.4.1 Sitotoksosite sonuçları	32
4.4.2 Apoptozis sonuçları.....	34
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	39
KAYNAKLAR DİZİNİ	41
TEŞEKKÜR.....	46
ÖZGEÇMİŞ	47

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 SEM'in şematik yapısı.....	8
2.2 DLS'nin şematik yapısı	9
2.3 VSM'nin şematik yapısı	9
2.4 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü	12
2.5 TLC şeridinin uygulanma mekanizması	13
3.1 Altın nanopartiküllerin sitrat ile indirgenme mekanizması	17
3.2 Mn-AuNP'in SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerinde 24. ve 48.saat sitotoksosite çalışması	20
4.1 Mn-AuNP'nin boyut dağılım grafiği	22
4.2 Mn-AuNP'nin zeta potansiyel dağılım grafiği	22
4.3 Mn-AuNP'nin SEM görüntüsü.....	23
4.4 Mn-AuNP'nin EDX diagramı.....	24
4.5 Mn-AuNP'nin VSM diagramı	24
4.6 Mn-AuNP'nin XRD diagramı	25
4.7 Mn-AuNP'nin UV spektrumu	26
4.8 Mn-AuNP'nin FTIR spektrumu	27

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 TLRC1 banyosunda (a) ^{99m}Tc , (b) indirgenmiş ^{99m}Tc , (c) ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'lere ait kromatogramlar	28
4.10 TLRC2 banyosunda (a) ^{99m}Tc , (b) indirgenmiş ^{99m}Tc , (c) ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'lere ait kromatogramlar	29
4.11 ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'in (a) 0. Dakika, (b) 30. dakika, (c) 60. dakika, (d) 120. dakika, (e) 180. dakika, (f) 240.dakika, (g) 360. Dakika, (h) 1440. dakika stabilite çalışmasına ait kromatogramlar.	32
4.12 Mn-AuNP'nin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki sitotoksosite sonuçları	33
4.13 Hücrelerin toplam apoptoz oranları	35
4.14 Kontrol grubu olarak SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücrelerinin apoptozis sonuçları	36
4.15 Mn-AuNP yüklü T hücrelerinin apoptozis sonuçları	37
4.16 Mn-AuNP'nin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları.....	37
4.17 T hücrelerinin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları.....	37
4.18 Mn-AuNP yüklü T hücrelerinin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları.....	38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Mn-AuNP'nin elementel kompozisyonu	23
4.2 Mn-AuNP'nin FTIR incelemesi	26
4.3 ^{99m} Tc-(Mn-AuNP)'nin R _f değerleri	27
4.4 ^{99m} Tc ile işaretli Mn-AuNP'nin işaretlenme verimi	28
4.5 ^{99m} Tc ile işaretli Mn-AuNP'nin stabilite zaman-verimi	30
4.6 Mn-AuNP konsantrasyonuna bağlı % canlılık değerleri	33
4.7 Mn-AuNP'nin IC ₅₀ değerleri	33
4.8 Apoptozis değerleri.....	34

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AuNP	Altın Nanoparçacıklar
Mn-AuNP	Mangan Konjuge Altın Nanoparçacıklar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TLRC	İnce Tabaka Radyokromatografi Yöntemi
TLC	İnce Tabaka Kromatografi Yöntemi
R _f	Alıkonma değeri
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
EDX	Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy
XRD	X-Işını Kırınım Spektroskopisi
VSM	Titreşimli Numune Manyetometresi
UV-Vis	Ultraviyole Ve Görünür Işık Absorbsiyon Spektroskopisi
MRG	Manyetik Rezonans Görüntüleme
SPECT	Tek Foton Emisyon Tomografisi
BT	Bilgisayarlı Tomografi
PET	Pozitron Emüsyon Tomografi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

ACN	Asetonitril
FBS	Fetal Bovine Serum
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu



1. GİRİŞ

Rayofarmasötiklerin hedeflenen bölgeye olan spesifikite sorunları kanserli dokuların tanı ve tedavilerinde karşılaşılan en büyük engellerden bir tanesidir. Bu durum bilim dünyasını yüksek spesifikiteye sahip teşhis yöntemlerini geliştirmeye yöneltmiştir. Bu nedenle tümör spesifik T hücreleri ile immünoterapinin tedavi potansiyeli araştırılmaktadır. Bu çalışmalar ile elde edilen sonuçlar, T hücrelerinin tümör ile birleşmiş antijenleri spesifik olarak tanıyabileceğini ve immün mekanizmaları ile kanseri inhibe edebileceğini öne sürmektedir.

Multifonksiyonel görüntüleme ajanlarının geliştirilmesi ile dual modalite sistemlerin tümör teşhisinde kullanımı büyük önem kazanmıştır. Bu neden ile farklı görüntüleme yöntemlerinin avantajlarını kullanan dual modalite sistemleri multi fonksiyonel görüntüleme ajanlarının kullanımı ile daha da güçlendirilmiş olacaktır.

Erken tümör teşhisi kanser hastalığında çok önemli rol oynamaktadır. MRG sisteminde tümör spesifik kontrast ajan kullanımı tümör teşhisinde net sonuçlar ortaya koymaktadır. Yüksek kalitede görüntü sağlama ve uygulananak hastada toksik etki oluşturmaması istenilen kontrast ajanlar, manyetik rezonans görüntüleme sisteminde oluşturulan manyetik alanda su protonlarının uzunlamasına ve yataylamasına yaptıkları gevşeme hareketlerini hızlandırmalarına göre MRG görüntüsüne pozitif veya negatif kontrast özellik katarak tümör teşhisinde erken tanı uygulamalarına önemli katkı sağlar.

Bu amaçlar doğrultusunda bu çalışmada; T-hücrelerinin spesifik bir antijeni eksprese eden tümörlere hedeflenebilmesini MRG/SPECT dual modalite sisteminde gösterebilmek için multifonksiyonel görüntüleme ajanı yapılması amaçlanmıştır. Bunun için T-hücrelerine konjuge ^{99m}Tc radyoişaretleli kontrast ajan özellikli mangan altın nanoparçacıklar sentezlendi.

Bu çalışmada kontrast ajan olarak mangan kullanılmıştır. Paramanyetik mangan (II) iyonları MRG görüntülerine pozitif kontrast özellik katarak tümör teşhisinde görüntüleme kalitesini arttırmaktadır. Sentezlenen pozitif kontrast ajan özellikli altın nanoparçacıkların karakterizasyon çalışmaları dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı elektron mikroskobu (SEM), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), x-ışını kırınım spektroskopisi (XRD), titreşimli numune manyetometresi (VSM) ve ultraviyole ve görünür ışık absorpsiyon spektroskopisi (UV-Vis) analizleri ile yapılmıştır.

Sentezlenen pozitif kontrast özellikli nanoparçacıklar ^{99m}Tc ile radyo işaretlenmiştir. Radyoişaretleme verimi, stabilite ve radyokimyasal saflık TLC yöntemiyle tespit edildikten sonra son aşama olarak ^{99m}Tc işaretli mangan altın

nanoparçacıklar T hücrelerine protamin sülfat ve heparin varlığında konjuge edilmiştir.

Bu çalışmada sentezlenen multifonksiyonel ajan ile antijen spesifik T hücrelerinin *in vivo* olarak dual modalite ile MRG/SPECT görüntülemesinin sağlanacağı ve bunun sonucunda kanserin teşhisi amacıyla antijen spesifik T hücrelere transfer edilen sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, normal bir hücrede meydana gelen bir dizi genetik ve epigenetik değişiklik tarafından başlatılan kümülatif bir hastalıktır (Prendergast and Jaffe, 2007). Hücrelerin bölünmesi genlerin kontrolündedir. Bu yüzden kromozomlar üzerinde bulunan genlerde gerçekleşen fiziksel ve kimyasal değişimler direkt olarak hücrenin işlevlerini etkileyebilmektedir. DNA'nın oluşan gen bozukluklarını düzeltme yetisi varsada bu işlem her zaman başarılı olmaz ve gen ürünü olan proteinlerin eksik veya hatalı üretilmesine yol açar. Oluşan hasara bağlı olarak hücresel işlevlerde bozulmalar yaşanır (Blackadar, 2016). Kümülatif olarak kontrolsüz çoğalan kanser hücreleri, tek bir doku veya organı etkileyebilecekleri gibi farklı doku ve organlarda da görülebilir ve çoğalabilirler.

Kanser tedavisinde, kanserli dokunun teşhisi, neden olan etmenlerin tespiti, hastanın sosyal ve psikolojik destekler ile rahatlatılması kanser hastalığının karmaşık ve büyük bir problem haline gelmesini engellemektedir (Fitzmaurice et al., 2015; Pavlopoulou et al., 2015).

Günümüzde kanserden korunma yöntemlerinin bilinmesi, bireylerin bilinçlenmesi, erken tanı ve tedavi yöntemleri ile sağlanan başarının artması insanların kansere karşı duyduğu korkuyu içinden atmasını sağlamıştır. Bazı kanser türlerinin tedavisi veya kanserle uzun yıllar beraber yaşamak mümkün olsa da kanser endişe edilen hastalık olmaktan ve ölümlerle anılmaktan kurtulamamıştır.

Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) paylaştığı raporlara göre; yaklaşık altı kişiden biri kanserden yaşamını yitirmektedir. Örgütün raporuna göre 2012'de yaklaşık olarak 14 milyon kanser olguları saptanmış ve önümüzdeki 20 yıl için yeni kanser olgularının %70 artacağı öngörülmektedir.

Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) Mayıs 2018 verilerine göre, Türkiye'de ölüm nedenlerinin yaklaşık %20'sini kanser oluşturuyor. TÜİK'in raporunda; ülkelerin 65 yaş altı ölüm nedenlerinin yaklaşık % 28'ini kanser oluşturmaktadır. Türkiye'de 65 yaş ve üstü bireylerde kanser hastalığı sonucu ölüm oranları 2014 yılında % 17, 2016 yılında % 16 olarak saptanmıştır (TÜİK, 2019).

2.2 Kanser Tanısı

Kanser hastalığında ve tedavisinde en önemli etmenlerden biri kanserli dokunun erken ve doğru teşhisidir. Özellikle ailesinde kanser hastalığı olan kişilerin kontrollerini rutin olarak uygulamaları önemlidir. Röntgen, kan testleri, manyetik rezonans görüntüleme, bilgisayarlı tomografi, tek foton emisyon

tomografi ve pozitron emüsyon tomografi gibi görüntüleme yöntemleri tümör teşhisinde kullanılan görüntüleme yöntemlerinden bazılarıdır. Gelişen teknoloji ve bilim ile görüntüleme teknikleri geliştirilemekte ve tümör spesifik görüntüleme ilaçları geliştirilmektedir (Wagner et al., 2015; Guo et al., 2013).

2.3 Kanser Tedavi Yöntemleri

Radyoterapi, kemoterapi ve cerrahi yöntemler kanser hastalığının tedavisinde en sık kullanılan yöntemler olsada, günümüzde kanserin moleküler özellikleri, genetik mutasyonlar, tümör hücreleri ve immün sistemde görev alan hücrelerden salgılanan moleküller tedavi yönteminde belirleyici olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler şunlardır:

- Radyoterapi
- Kemoterapi
- Cerrahi müdahale
- Gen Terapisi
- Hormon terapisi,
- Hedeflenmiş terapi
- İmmünoterapi

Yapılacak tedavi seçiminde; tümörün konumuna, derecesine, hastalığın aşamasına ve hastanın genel durumuna dikkat edilmelidir. Günümüzde multimodal yaklaşım olarak adlandırılan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaların kombinasyonu pek çok kanserin tedavisinde başarıyı artırmaktadır.

Tümör profillemesi, genetik testler gibi yöntemlerle belirlenen, kişiye ve tümöre özel, hedefe tedavilerin kullanılmasıyla, tedaviye iyi yanıtlar almak ve uzun süreli hastalık kontrolü sağlamak mümkün hale gelmiştir. Başarılı bir kanser tedavisinde, seçilen yöntemin hastaya maksimum yarar sağlaması ve minimum yan etki oluşturmaması beklenmektedir.

Kanser türüne göre cerrahi müdahale hastaların sadece küçük bir bölümünde mümkündür. Cerrahi müdahalenin tek başına yeterli olmadığı durumlarda diğer yöntemler olan radyasyon tedavisi ve kemoterapi ilave edilebilir, bu tedaviler hastada çeşitli yan etkiler ortaya çıkartabilir (Ferrone, 2008).

Hedeflenmiş ilaç tedavisi toksik yan etkileri azaltması ve terapötik etkinliği artırması ile son yıllarda büyük ilgi görmüştür.

Kanserli hücrelerin büyümesini ve yayılmasını engelleyen tedavi yöntemlerinden birisi ise immünoterapidir. İmmünoterapi, hastanın bağışıklık sistemini güçlendirerek vücudunun kanseri kendi kendine yenmesini sağlayan bir tedavi yöntemidir.

2.4 İmmünoterapi

İmmünoterapi; kişinin bağışıklık sistemini kullanarak, içlerinde kanserinde bulunduğu çeşitli hastalıkları tedavi etmek anlamına gelir (American Cancer Society, 2014). İmmünoterapiye olan ilgi; sağlıklı hücelere zarar vermeden doğrudan kanserli dokuları oluşturan anormal hücreleri hedef alması özelliği ile her geçen gün artmakta ve kanserin oluşumu, oluşumun engellenmesi ve yok edilmesi mekanizmalarının daha iyi anlaşılması ile immünoterapik yöntemlerde gelişmeler yaşanmaktadır (Barbaros ve Dikmen, 2015).

İmmünoterapi uygulamalarındaki esas amaç, kanserli hücreler tarafından bastırılmış ve çalışması engellenmiş immün sistemin tümör spesifik olarak tekrar aktif hale getirilmesidir. Bu bağlamda, kanser immünoterapisinde 3 temel kavram vardır.

- Monoklonal antikor aracılı, tümör ile ilgili antijenlerin hedef alınarak yok edildiği hücre ölümü,
- Non-antijen spesifik immün sistem modülasyonu,
- Terapötik kanser aşılardır. Terapötik kanser aşılı; immün sistemin T-helper ve T-sitotoksik hücrelerini uyarak uygun antikor oluşumunu tetikleyen immünoterapik yöntemdir (Öztürk vd., 2017).

2.5 Nanoteknoloji

1959 yılında, bilim insanı Feynmanın yaptığı tanıma göre nanoteknoloji (Smalley, 2002), maddenin atomik ve moleküler düzeyde yönlendirilmesi sonucunda farklı özellikler kazanması ile 1 ile 100 nanometre (nm) boyut aralığında yeni yapıların oluşturulmasıdır (Hong et al., 2009).

Nanoteknoloji, bilimsel araştırmalar için oldukça yeni ve büyük bir alan oluşturmaktadır (Hanks et al., 2015). Yüksek yüzey – hacim oranına sahip nanomateriyaller ilaç taşıma sistemleri, katalizörler, sensörler, enerji depolama sistemleri, bilgisayar teknolojileri gibi pek çok alanda kullanılmaktadır. Kullanım alanları, nanopartiküllerin boyutlarına ve bileşenlerine göre farklılık göstermektedir (Haverkamp and Marshall, 2009)

Nanotıp; nanoteknolojinin insan için kullanımında önemli etkiler yaratmış olup en önem arz eden alanlarından birisidir. Nanotıp, kanserli dokuya spesifik

tedavi ve teşhis uygulamaları, immünoterapi gibi tıbbi amaçlar için nanoteknolojiden faydalanmaktadır (Tartis, 2009).

2.5.1 Altın nanoparçacıklar

Altın (Xe) 4f145d106s1 ile temsil edilen elektronik konfigürasyona sahip yumuşak, dövülebilir bir geçiş metalidir ve kimyasal olarak en az aktif elementlerden biridir. Mücevherat için değerli bir metal olarak kullanılsa da, dökme altından farklı olarak kolloidal altın, yeni uygulamalara olanak tanıyan son derece reaktif olarak kabul edilir.

Altın tuzları güçlü anti-enflamatuar özelliklere sahiptir ve romatoid artrit ve tüberküloz ile ilişkili ağrı ve şişliği azaltmak için uygulanmıştır (Rau, 2005). Altının uygulamaları ayrıca alt mikrometre büyüklüğünde altın parçacıkları olan kolloidal altın ile genişletilir. Yıllar boyunca, sifiliz (Fricker, 1996), alkolizm gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde ve kanser hastalarında acı çekmenin kolaylaştırılmasında (Ochsner, 1927), dünyanın farklı bölgelerinde altın çözümlerinin kullanıldığı tespit edilmiştir.

AuNP'lerin biyomedikal uygulamalar için kullanabilirliği, dökme biçimindeki altın renginden, nano seviyesine indirildiğinde (Dykman and Khlebtsov, 2012) çok çeşitli renklere kadar keskin bir renk değişiminden belirgin olan plazmonik özelliklerine bağlanabilir. Halen, AuNP'ler genomik, immünolojik testler ve klinik kimya gibi moleküler biyoloji uygulamalarında ve mikroorganizmaların ve kanser hücrelerinin tespiti ve fototermolizi ve peptitler veya DNA gibi bileşiklerin hedefli olarak verilmesi gibi tıbbi uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Vicky et al., 2010).

AuNP'lerin büyüklüğü nanopartiküllerin özelliklerini ve kullanıldığı uygulamaları yönetir. Küçük boyutlu AuNP'ler (2 nm-15 nm), immünohistokimya, mikroskopi ve biyobelirteçler gibi uygulamalarda kullanılır.

Orta boy AuNP'ler (20 nm-60 nm) çevresel algılama ve saflaştırma, ilaç verme, biyobelirteçler, kimyasal sensörler, DNA tespitinde kullanılır.

Büyük boyutta olan AuNP'ler (80 nm – 250 nm) adli bilimlerde, elektronik cihazlarda, imalat, optik mamografide vs. kullanılır (Rowles, 2013).

AuNP'ler genel olarak insan hücreleri, fasil sentezi, polietilen glikol (PEG), karboksil grupları, amin gibi çeşitli moleküller ile kolay biyo-konjugasyona sahip olması nedeniyle biyomedikal uygulamalar için diğer inorganik nanoparçacıklar yerine tercih edilir DNA, RNA, antikorlar, peptidler vb, kimyasal stabilite, ayarlanabilir geometri (Cho et al., 2011; Badwaik et al., 2011) vb. Ayrıca, altın

tuzları şu anda romatoid artrit, psoriatik artrit ve bronşiyal astım için bir tedavi seçeneğidir. Buda klinik uygulamalar için biyogüvenlik seviyelerini kanıtlamaktadır.

2.5.2 Pozitif kontrast ajan olarak mangan

Genel anlamda radyolojik kontrast maddeler, x ışınlarını absorbe ederek radyogramda oluşturdıkları dansite ile vücut yapısındaki çeşitli bölümlerin görüntülenmesini sağlayan teşhis ilaçlarıdır. İntravasküler uygulanacak bir kontrast maddede aranan özellikler; sudaki çözünürlüğünün yüksek, osmolalitesinin ve viskozitesinin düşük, aynı zamanda da stabil olmasıdır.

Manyetik rezonans görüntüleme (MRG), vücudun iç yapısını görselleştirmek için kullanılan güçlü görüntüleme ve tanılama tekniklerinden biridir. Yeni kontrast maddelerinin geliştirilmesiyle birlikte, MR görüntüleri geliştirilmiş uzamsal çözünürlüğe sahiptir, artan bir algılama hassasiyeti sergilemektedir (Westbrook et al., 2005) ve belirli organları hedeflemek üzere tasarlanabilmektedir (Strijkers et al., 2007). MRI performansındaki bu gelişmeler, anatomik, fonksiyonel, metabolik, moleküler ve hücresel seviyelerde bilgi sağlayabilir ve böylece MRG'nin görüntülemekten erken tanı ve terapötik ilaca uygulanmasını genişletir.

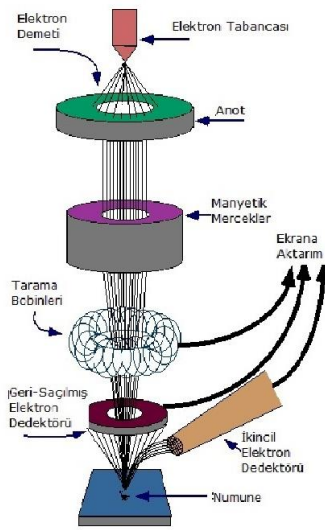
Mevcut klinik uygulamada kullanılan kontrast maddeler, pozitif ve negatif olmak üzere iki ana kategoriye ayrılır.

Negatif kontrast ajanları, T2 özellikleri üzerinde daha belirgin bir etkiye sahip olan protonların lokal boyuna (T1) ve enine (T2) gevşeme özellikleri üzerinde güçlü bir etkiye sahip olan demir oksit gibi süper-paramanyetik bileşiklerdir. Bu ajanlar son görüntüde hippointens veya daha koyu görünür. Pozitif kontrast ajanları, Gd (III) ve mangan Mn (II) iyonları gibi paramanyetik elementleri kullanır. Bu paramanyetik metal iyonları, T1'e duyarlı bir MRI tekniği kullanıldığında daha parlak bir sinyale neden olan su protonlarının uzunlamasına (T1) gevşemesini hızlandırma özelliğine sahiptir (Hu et al. 2010). Ayrıca, kontrastın kalitesi manyetik momentin gücüne bağlıdır. Yapılan çalışmalarda; Mn^{2+} , Gd^{3+} kadar yüksek momente sahip olmasada, yapılan çalışmalarda hem T1, hem de T2 bazlı görüntülemelerde Gd^{3+} iyonuna göre daha avantajlı olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca; Gd ve Mn tabanlı kontrast ajanlar MRI için karşılaştırıldıklarında, Gd^{3+} , hem molar hem de eşdeğer dozaj bazında Mn^{2+} ile kıyaslandığında da toksit değerinin çok daha yüksek olduğu kanıtlanmıştır (Ide et al. 2008; Elizondo et al. 1991).

2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları

2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, Şekil 2.1’de şematik yapısı görüldüğü gibi yüksek çözünürlükte görüntü oluşturmak için yüksek voltaj ortamında hızlandırılmış elektronların analizi yapılacak örnek maddeye hedeflenmesi ve taratılması sırasında elektron ve örnek madde atomları arasında oluşan etkilerin uygun reseptörler tarafından toplanır ve sinyal güçlendiriciden sonra bir katot tüpüne aktarılır (Suzuki, 2002).



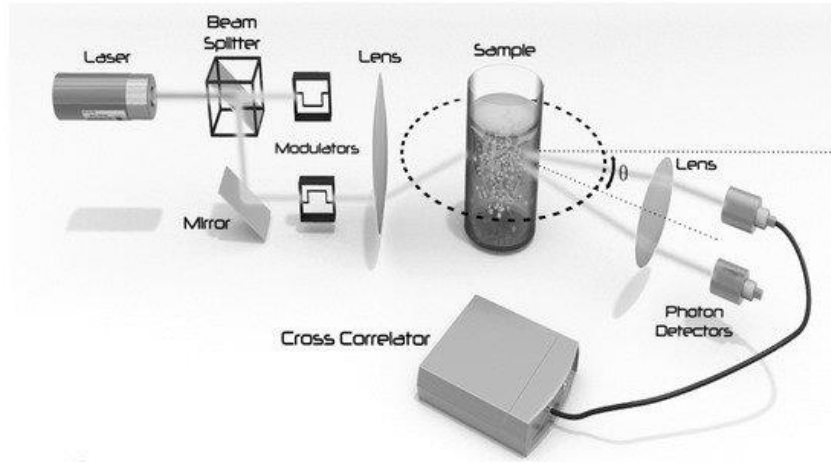
Şekil 2.1 SEM'in şematik yapısı (<http://cbe.ivic.ve/mic250/pdf/thesebook-chap3.pdf>)

2.6.2 Dinamik ışık saçılımı

Dinamik Işık Saçıcısı (DLS) nanopartiküllerin karakterizasyonu için önemli bir araçtır.

DLS, kolloidal çözeltiden geçirilen bir lazerden saçılan ışığın şiddetindeki değişimi zamanın bir fonksiyonu olarak anali eder ve böylelikle parçacık boyutu hakkında bilgi verebilir. Sıvı ortamdaki nanopartiküllerin karakteristik özellikleri açısından DLS analizlerin yapılması önemlidir (Ledin et al., 1994).

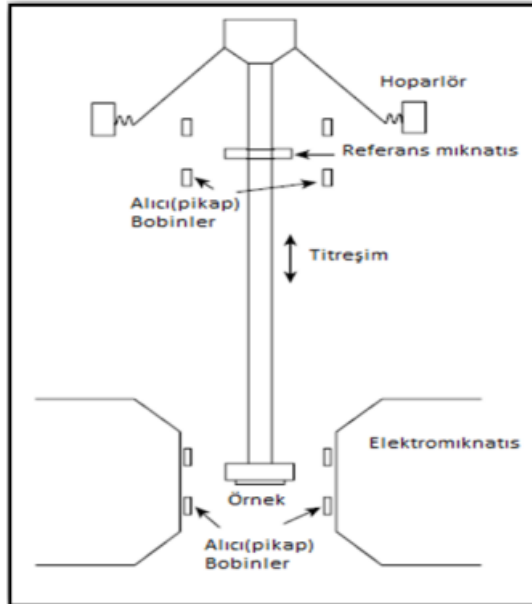
DLS tekniği ile parçacık boyutunun ölçülebilmesi için numunenin viskoitesi ve sıcaklığının bilinmesi gerekmektedir. Aksi takdirde boyut algısı bozulacak ve düzgün ölçüm alınamayacaktır (Patri et. Al., 2006; Sapsford et al., 2011).



Şekil 2.2 DLS'nin şematik yapısı (Nicole, 2018)

2.6.3 Titreşimli numune manyetometresi

Titreşimli Numune Manyetometresi, manyetik örnekte gerçekleşen titreşimler sayesinde değişen akım ile beraber oluşan elektromanyetik kuvveti tanımlayan Faraday yasalarına dayanır ve 1959 yılında S. Foner tarafından geliştirilen Foner manyetometresi olarak da adlandırılmaktadır (Cullity and Graham, 2009).



Şekil 2.3 VSM'nin şematik yapısı

2.6.4 X-ışını kırınım spektroskopisi

X-ışınlarının kullanımı ile yapılan X-ışını Kırınım Spektroskopisi analiz sırasında numuneyi tahrip etmez ve çok az miktar örnekte dahi analizlerinin yapılmasını sağlar. XRD ile maddenin kristal yapısını, tanecik büyüklüğü, faz geçişleri gibi birçok yapısal parametreleri incelenebilmektedir (Zanchet et al., 2011)

2.6.5 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi

Fourier Dönüşümlü Kızıl Ötesi Spektrometre (FT-IR) cihazı; Kızılötesi ışığın dipol momente sahip madde ile etkileşmesi sonucu yapısı içerisindeki bağların titreşim hareketi ile molekül ve bileşiğin yapısında bulunan bağları ve fonksiyonel grupları karakterize edebilir, saflığı, bağların durumunu, bağlanma yerlerini ve maddenin aromatikliği veya alifatikliği hakkında bilgi vermektedir (Cantor and Schimmel, 1980).

2.7 Radyofarmasötikler

Teşhis ve tedavide kullanılan radyoaktif çekirdek içeren ilaç sistemlerine radyofarmasötik denilmektedir. Nükleer tıpta kullanılan radyofarmasötiklerin % 95'i teşhis uygulamaları, % 5'ini ise tedavi amaçlı kullanılan radyofarmasötikler oluşturmaktadır. Genellikle eser miktarda uygulanmalı sebebiyeti ile doz-cevap ilişkisi görsermeyen radyofarmasötiklerin bu özelliği Radyofarmasötikleri diğer farmakolojik ilaçlardan ayıran en önemli özellikleridir.

Radyofarmasötikler insanlara uygulancakları için, diğer ilaçlardan beklenen bütün kalite kontrol uygulamaları geçerlidir. Standart uygulamalara ek olarak radyoaktivite miktarının tayini (radyoessey), radyoizotopik ve radyokimyasal saflığın tespiti, işaretlemenin kararlılığı, biyodağılım gibi bir dizi test de gerekmektedir. Uygulanan kalite kontrol testleri, radyoçekirdeğin fiziksel yarılanma ömrüne bağlıdır.

Radyofarmasötik, bir element (^{133}Xe , ^{85}Kr), bir iyon (^{131}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$) veya işaretli bileşik olabilir (^{131}I proteinler, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bileşikleri). Radyofarmasötiklerin çoğu işaretli bileşiklerdir. Bu durumda radyofarmasötiğin iki komponenti vardır: radyonüklid ve farmasötik. Radyofarmasötiğin ne derece faydalı olacağı bu her iki komponente de bağlıdır. Yapılan radyofarmasötik geliştirme çalışmalarında, farmasötik seçiminde seçilen belirli bir organın fizyolojik fonksiyonlarında yer alan ilaç seçilir. Seçilen farmasötik, radyofarmasötiğin kullanılacağı uygulamaya uygun radyoizotopla kimyasal olarak işaretlenir.

İdeal bir radyofarmasötikte bulunması gereken özellikler şunlardır:

1) Teminindeki kolaylık. Radyofarmasötik kolay hazırlanabilmeli, ucuz olmalı ve her nükleer tıp laboratuvarı faydalanabilmelidir. Radyonüklid üretimi ve işaretlemede kullanılan metodlar kısa ve kolay olmalıdır.

2) Kısa efektif yarı-ömür.

3) İdeal bir radyoizotop ile işaretli olması, yani tek enerjili 7 radyasyonu yayınlayan ve enerjisi 30-300 keV olan. Bu vasıflara uygun radyoizotop ^{99m}Tc 'dur (T_{1/2} = 6 saat, E_γ = 140 keV).

4) Hedef organdaki radyoaktivite konsantrasyonu diğerlerine oranla yüksek olmalıdır.

5) Metabolik uygunluk. Radyofarmasötiğin hedef organdaki tutulumundan önce metabolize olmaması gerekmektedir. Ayrıca radyofarmasötik zararsız olmalı, apirojen ve steril olmalı, toksik olmamalı, hastaya olan radyasyon dozu minimal düzeyde olmalıdır. İlgili organ veya dokunun morfolojik yapısı ve/veya fizyolojik fonksiyonu kullanılan radyofarmasötikte tayin edilebilmelidir (Ercan, 1985; Saha, 1985; Bremer and Motler, 1985).

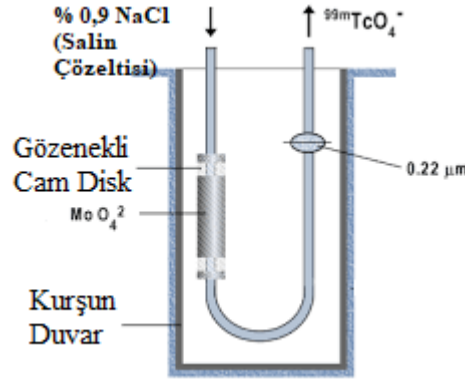
2.7.1 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) Kimyası

1937 yılında Carlo Perrier and Emilio Segrè tarafından keşfedilen teknesyum atom numarası 43 olup atom numarası 42 olan molibdenin proton ve nötronların bombardıman edilmesiyle meydana gelen yapay bir elementtir (Rimshaw 1968).

Teknesyum izotopu Tc-99m, 1979 yılından beri inorganik kimyacılar tarafından araştırmalarda ilgi odağı olmuştur. Başka bir izotop olan Tc-99m nükleer tıpta kullanılan radyofarmasötiklerin % 80 den fazlasını oluşturmaktadır. Düşük maliyet ile elde edilmeleri ve biyolojik etkinliklerinin yüksek olması (hedef organ tarafından maksimum asimilasyon ve uygun farmakinetik), Tc-99m'nin uygulamalarda önemini arttırmıştır (Unak et al., 2007).

Buna bağlı olarak Tc-99m bazı kimyasal formları Amerika Birleşik Devletlerinde %90 oranında, hastalığın teşhis tanılarını bulmak için kullanılmaktadır. Tc-99m'nin radyonüklid yapısı görüntüleme tanılarını bulmada çok idealdir. Teknesyum izotopunun 6 saat yarılanma ömrü ve 140-keV gama ışını yayma özelliği ile hastanelerde kullanılan gama kameraları için çok idealdir. Tc-99m izotopu Alpha veya Beta ışınlarını yaymaz (Rimshaw, 1968).

Şekil 2.4'deki gibi ana radyonüklid sisteminden sağılan ürün radyonüklid birkaç defa kendini yenileyebilir. Radyoizotop jeneratörleri bozunmaya uğrayan ana radyonüklid ve üretilen radyonüklid çiftinden oluşur. Ana radyonüklid iyon değişimine olanak sağlayan alüminyum sütun tarafından absorbe edilir. Daha uzun yarı ömre sahip ana radyonüklid bozunumuyla ürün radyonüklid yenilenir. Ürün radyonüklidin jeneratörden alınması olayına sağım denir (Faik et al., 2013).



Şekil 2.4 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü

2.8 Kalite Kontrol Yöntemleri

2.8.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), katı-sıvı adsorpsiyonu kromatografisidir. TLC, birçok biyolojik örnek türünde çeşitli sınıflardan bileşiklerin güvenilir şekilde ayrılmasını ve analiz edilmesini sağlar. Analizler biyoloji, biyokimya, hematoloji, immünoloji, tıbbi tanı ve moleküler biyoloji alanlarında sıkça kullanılır. TLC'nin yaygın kullanılmasının nedeni işlemin hızlı ve basit olmasından kaynaklanmaktadır.

Radyofarmasötik, alüminyum, cam, plastik gibi maddelerden yapılmış, üzerleri silikajel, selüloz, alüminyum oksit gibi maddeler ile ince bir tabaka halinde kaplanmış TLC tabakaları üzerine damlatılır. Seçilen uygun mobil faz içinde bulunduğu banyoda tabakalar yürütülür. Yaygın olarak kullanılan sıvı fazlar metanol, kloroform, aseton, metil etil keton (MEK), % 0,9 NaCl çözeltileridir. Kromatografik işlem sırasında, numunenin farklı bileşenleri, dağılım katsayılarına bağlı olarak adsorban görevi gören sabit faz (kâğıt veya silika jeli) ve mobil faz arasında dağılırlar.

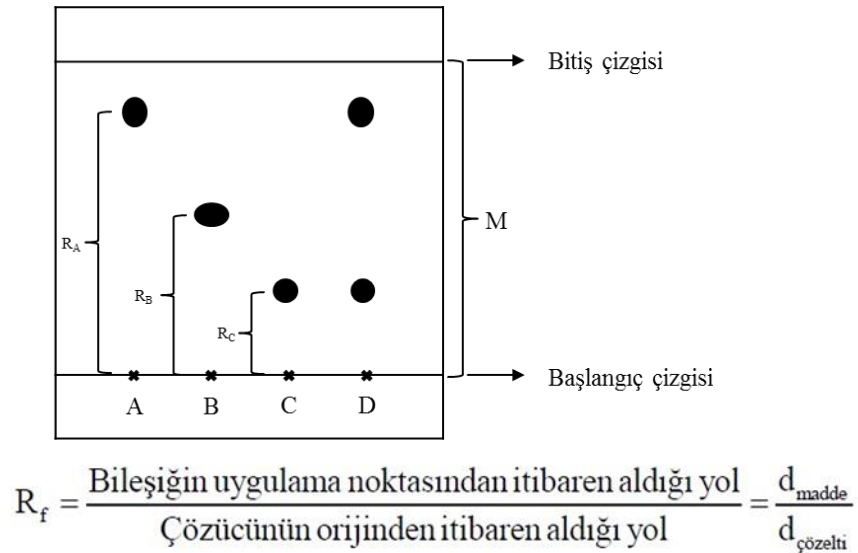
Adsorban sabit faz, çözücü ise hareketli fazdır. Sabit fazın elektrostatik kuvvetleri çeşitli bileşenleri geciktirme eğiliminde olurken hareketli faz onları taşır. Bir çözücü içindeki farklı bileşenlerin bu etkisi ve farklı çözünürlükleri, bireysel bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmesine ve TLC şeridi boyunca farklı

mesafelerde yürümesine neden olur. Çözücünün polaritesi numunedeki diğer bileşenlerin kromatografik ayrışmasını da etkiler (Saha, 2004).

TLC tabakasına uygulanacak numune, kapiler veya mikropipet yardımı ile tabakanın alt kenarından 0,5 cm uzaklıkta damlatılarak kuruması beklenir. Uygun mobil faz, TLC tabakasında numunenin damlatıldığı nokta uzaklığını aşmayacak miktarda tank içerisine doldurulur. Sonrasında TLC şeritleri tank içerisine yerleştirilir ve hareketli fazın tabaka üzerinde yükselmesi sağlanır. Mobil faz, TLC tabakası üzerinde, numune içerisindeki maddelerin birbirinden ayrılması için gereken yüksekliğe kadar yürütülmeli ve TLC tabakasının tamamında yürütülmemesine dikkat edilmelidir. Daha sonra TLC şeridi yürütme kabından alınır. Mobil fazın ulaştığı seviye kurşun kalemle hafifçe işaretlenerek çözücünün buharlaşması beklenir (Medine, 2008).

R_f değeri (alıkonma değeri) TLC’de uygulanan radyofarmasötiklerin karakterizasyonlarını belirler. Örneğin yürüdüğü mesafenin mobil fazın yürüdüğü mesafeye oranı bize R_f değerini verir.

R_f değerleri, belirli bir örnekte farklı bileşenlerin tanımlanmasında kullanılır. Mobil faz TLC tabakasında istenen bir mesafeye hareket ettiğinde, şerit bölmeden çıkarılır ve kurutulur. Şeritler oda sıcaklığında kurutularak gazlı dedektörde (Bioscan 2000 TLC Tarayıcı) R_f değerleri ve işaretlenme yüzdeleri bulunur (Saha, 2004). Şekil 2.5, TLC şeridinin uygulanma mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 2.5 TLC şeridinin uygulanma mekanizması (Çetin, 2018)

2.8.2 Lipofilite

Yağda çözünme eğiliminin ölçüsü olan lipofilite, lipid/partisyon kat sayısı olarak tanımlanmaktadır. Lipofilitesi yüksek maddelerin lipid membrandan absorpsiyonları fazla olur. Suda çözünen moleküller, su akışını sağlayan porlar aracılığı ile membrandan geçerek suda çözünürler. Buna karşı olarak büyük moleküller bu membranın yağ kısmından geçerler.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- SKOV3 İnsan yumurtalık adenokarsinoma epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- RPMI-1640 (Gibco)
- L-Glutamine (Gibco)
- Sodyum pruvat (Gibco)
- Essential amino acid (Gibco)
- Fetal bovine serum (Gibco)
- Streptomisin/Penisilin (Gibco)
- Tripan mavisi (Gibco)
- Fosfat tampon çözeltisi (Gibco)
- Tripsin EDTA (Gibco)
- Tetrakloroaurik asit tatrahidrat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich)
- Metanol (CH_3OH) (Sigma Aldrich)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Sigma Aldrich)
- Asetonitril ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) (Sigma Aldrich)
- SF (Serum Fizyolojik) (%0,9 NaCl)
- ITLC-SG Silika kaplı plastik şeritler (Sigma Aldrich)
- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma-Aldrich)
- Muse Annexin V & Dead Cell Kit (Millipore)
- Sodyum Perteknetant ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) (E. Ü., Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp A.D.)
- Ninhidrin (Sigma Aldrich)
- Glisin (Sigma Aldrich)
- Prolin (Sigma Aldrich)

3.1.2 Kullanılan cihazlar

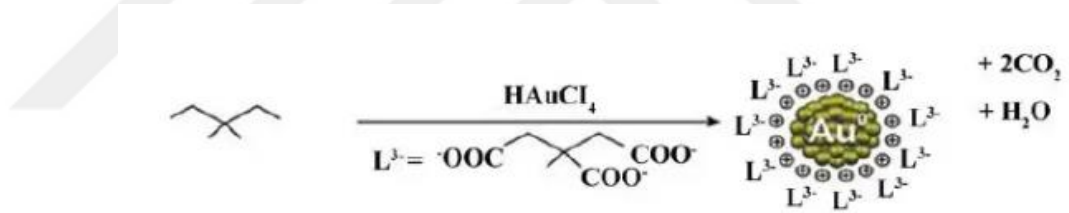
- RadyoTLC (Bioscan 2000) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (E. Ü., Nükleer Bil. Enst.)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- CO₂ inkübatörü (Sanyo) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Işık mikroskobu (Olympus) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Inverted mikroskop (Leica) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Otoklav (Hirayama) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Su banyosu (Mettler) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- Muse Hücre Analiz Cihazı (Millipore) Muse Annexin V / Ölü Hücre Test Kiti (Merck) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- SEM (Scanning Electron Microscopy) (Quanta 250FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)
- DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) (E.Ü., Nükleer Bil. Enst., Nükleer Uyg. A.D.)

3.2 Altın Nanoparçacıklar

3.2.1 Altın nanoparçacıkların sentezi

Altın nanoparçacıkların sentezlenmesinde Turkevich metodu kullanılmıştır. Bu metotta altın nanoparçacıklar, HAuCl_4 bileşiğinin kaynar su içerisinde sodyum sitrat ile indirgenmesi ile hazırlanmaktadır (Jain et al., 2007).

Altın nanoparçacıkların sentezlenmesi için, geri soğutuculu 340 rpm karıştırma sisteminde 0,040 gr. $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 100 mL ultra saf su içerisinde sıcaklık 100°C sıcaklığa gelinceye kadar bekletildi. İndirgeyici ajan olarak sodyum sitrat kullanıldı. 0,493 gr. sodyum sitrat 50 mL ultra saf su içerisine eklendi ve çözelti 60°C sıcaklığa gelene kadar ısıtıldı. 60°C sıcaklığa gelen sodyum sitrat çözeltisi hızlı bir şekilde sarı renkte olan 100°C sıcaklıktaki $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi içerisine eklendi. Sodyum sitrat çözeltisinin eklenmesi ile sarı olan $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi rengi saydam renge dönüştü. Yaklaşık 1 dk. süre içerisinde saydam renk koyu kırmızı rengine dönüştü. Koyu kırmızıya dönüşen renk değişimi; $\text{HAuCl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ bileşiğinin indirgenerek altın nanoparçacıkların oluşumunu göstermektedir.



Şekil 3.1 Altın nanopartiküllerin sitrat ile indirgenme mekanizması (Tan vd., 2012).

Renk değişiminden sonra çözelti 30 dk. 100°C sıcaklıkta geri soğutuculu 340 rpm karıştırma sisteminde bekletildi. 30 dk. sonrasında geri soğutuculu karıştırıcı sisteminden alınan altın nanopartiküller 2 saat boyunca oda koşullarında soğumaya bırakıldı. Sentezlenen altın nanoparçacıklar 4°C sıcaklıkta, karanlık ortamda saklandı.

3.2.2 Mangan-altın nanoparçacık (Mn-AuNP) konjugasyonu

Mangan – altın nanoparçacık (Mn-AuNP) konjugasyonu için; 0,1 mM mangan klorür çözeltisi hazırlandı ve oda koşullarında 1:1 oranında AuNP ile karıştırıldı (Murph et al., 2012).

3.2.3 Mn-AuNP'nin karakterizasyonu

Sentezlenen Mn-AuNP'lerin ortalama partikül boyutları ve zeta potansiyelleri enstitümüz bünyesinde bulunan Malvern Nano-ZS marka DLS cihazı kullanılarak belirlendi. Mn-Au nanoparçacıkların UV kırınım özellikleri, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsünde yapıldı. Mn-Au Manyetik nanoparçacıkların manyetizasyon özellikleri, 9 Eylül Üniversitesinde bulunan VSM cihazı ile yapıldı. Mn-Au nanoparçacıkların kristal yapısının belirlenmesi için yapılan XRD analizleri, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde bulunan Phillips X'Pert Pro cihazı kullanılarak yapıldı. Mn-Au nanoparçacıkların yüzey morfolojileri ve boyutlarının analizi için SEM analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Quanta 250FEG cihazı kullanılarak gerçekleştirildi.

3.3 Yapısal Analiz Çalışmaları

Mn-AuNP'nin yapısal analizi Perkin-Elmer Spectrum 100FT-IR marka FTIR cihazı ile incelendi.

3.4 ^{99m}Tc İle Radyoişaretleme Çalışmaları

Sentezlenen mangan konjuge altın nanoparçacıkların ^{99m}Tc ile işaretleme çalışmaları SnCl₂ indirgeme metodu ile yapılmıştır. 1 mg/mL konsantrasyonda hazırlanan SnCl₂.2H₂O çözeltisinden 40 µL, vial içerisine konulan 200 µL Mn-AuNP üzerine eklendi. İşaretleme pH'ı olan pH 5, NH₃ kullanılarak ayarlandı. Viale vakum uygulanarak içerisinde havasız ortam sağlandı. Son olarak çözeltiye 1 mCi sodyum perteknetat (Na^{99m}TcO₄) ilave edildi. Oda koşullarında 45 dakika inkübe edildi. Kalite kontrol çalışmalarında referans olarak Na^{99m}TcO₄ ve aynı işaretleme koşullarında hazırlanan indirgenmiş teknesyum kullanıldı. Radyoişaretili bileşiğin kalite kontrol çalışmaları ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi.

3.5 Kalite Kontrol Yöntemleri

3.5.1 İnce tabaka kromatografisi

Radyoişaretili bileşiklerin ince tabaka kromatografisi ile kalite kontrol yönteminde sabit faz olarak (10,0 cm x 1,0 cm) boyutunda silika şeritler kullanıldı. Hareketli faz olarak serum fizyolojik (SF) (TLRC1) ve asetonitril (ACN) (TLRC2) banyo çözeltileri kullanıldı. ^{99m}Tc ile işaretili bileşikler, Na^{99m}TcO₄ ve indirgenmiş teknesyum için TLC ile kalite kontrolü hazırlanan örneklerden mikropipet ile 2,5 µL alınıp hazırlanan TLC tabakaların alttan 0,5 cm mesafede belirlenen noktasına tek seferde damlatılması ve mobil faz bulunan

tanklara yerleştirilmesiyle yapıldı. TLC şeritlerine damlatılan örneklerin kuruması beklendi. Daha sonra TLC mobil faz çözeltilerinin bulunduğu tanklara yerleştirildi. Her örnek TLC şeritler üzerinde yeterince yürüdükten sonra tanklardan çıkarıldı yürüme mesafeleri hızlıca işaretlenerek ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Kontaminasyon oluşumunun önüne geçilmesi için kurutulan TLC şeritlerinin sabit faz bulunan yüzeyleri yapışkan bir bant yardımı ile kaplandı. Tarama işlemine başlanmadan önce TLC Scanner (Bioscan AR2000) cihazına örnekler ile ilgili tarama süresi ve TLC tabakasındaki uygulama noktasından yürüme işleminin sonlandığı noktaya kadar olan uzaklık bilgileri cihaza ait programa kaydedilerek ölçümler yapıldı. Kromatogramın y-ekseninde sayım değeri, x-ekseninde ise kromatografi kağıdının uzunluğu verilmektedir. Kromatogramlar sonucunda radyoaktif örneklerin taşındığı Rf değerleri bulunduktan sonra verimler hesaplanmıştır.

3.5.2 Stabilite çalışması

^{99m}Tc işaretli Mn-AuNP'nin stabilitesini tespit etmek için örnekler inkübe edilme süresinden sonra 0, 30, 60, 120, 180, 240, 360. dakikalarda ve 24. saatte örnekler alınarak ve TLC yöntemi ile kalite kontrol çalışmaları yapıldı. İşaretleme verimleri tespit edildi.

3.5.3 Lipofilite çalışması

^{99m}Tc işaretli Mn-AuNP'nin lipofilite analizi n-oktanol/PBS fazlarında gerçekleştirildi. 300 μL PBS, 300 μL n-oktanol bulunan tüpe 100 μL işaretli Mn-AuNP eklendi. 10 dakika boyunca vorteks yardımı ile oda sıcaklığında karıştırıldı ve 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından alt PBS fazı ve üst n-oktanol fazları ayrı tüplere alınıp sahip oldukları radyoaktiviteleri tek kanallı Cd(Te) dedektörlü RAD501 cihazında sayıldı. n-oktanol'ün PBS'e oranıyla log P (log (n-oktanol/PBS)) değerleri hesaplandı. Lipofilite çalışması 3 kez tekrar edildi ve elde edilen değerlerin ortalaması alındı.

3.6 Hücre Kültürü Çalışmaları

In vitro deneylerde kullanılan hücre hatları;

- T hücreleri (Red fluorescence protein (RFP) transfekte)
- SKOV3 (Lusiferaz transfekte insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi)
- SKOV3-CEA (Carcinoembryonic antigen ve lusiferaz transfekte insan yumurtalık adenokarsinoma hücresi)

SKOV3 hücreleri RPMI 1640 medium, sodyum bikarbonat (1,5 g/L), glutamin (2 mM), non-esansiyel amino asitler (0.1 mM), sodyum pirüvattan (1 mM) ve %10 fetal bovine serum (FBS) oluşan medyumda; SKOV3-CEA hücreleri yukarıda hazırlanan medyuma % 0,5 neomycin eklenerek hazırlanan medyumda; T hücreleri RPMI 1640 medium, glutamin (2 mM), glukoz (4,5 g/L), non-esansiyel amino asitler (0.1 mM), sodyum bikarbonat (1,5 g/L), sodyum pirüvat (1 mM), interleukin-15 (10 ng/mL), HEPES (10 mM), ve %10 FBS den oluşan medyumda çoğaltıldı.

Hücreler bulundukları flaskların %80'nini kaplayana kadar çoğaltıldı. % 0,25 (W/V) tripsin/EDTA karışımı kullanılarak flaskın tabanından ayrılmalari sağlandı.

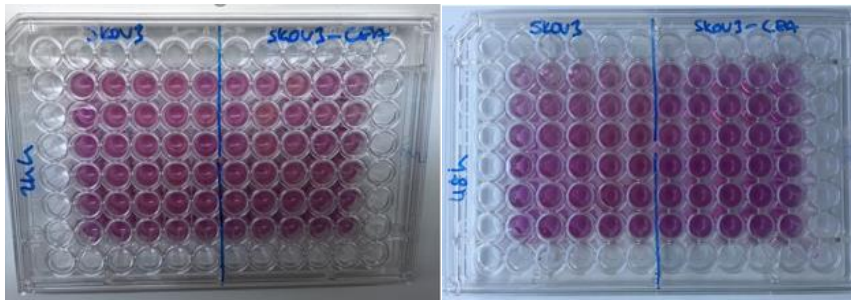
Çalışmada kullanılmayacak hücreler, % 5 DMSO içerikli medyumlar içerisine koyularak -80°C'de stoklandı.

3.6.1 Sitotoksosite çalışması

Mn-AuNP'lerde yapılan sitotoksosite çalışmaları, SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatları kullanılarak gerçekleştirildi.

MTT testi, hücre popülasyonunun %50 sini ölümüne neden olan doz değerini (IC_{50}) hesaplayabilmek için yapıldı. 100 μ L hücre süspansiyonları 96 kuyucuk bulunan mikropatelere her bir kuyucuğa 5×10^3 hücre/kuyu olacak şekilde eklendi. Hücre süspansiyonları bulunan plateler CO_2 inkübatöründe 37°C sıcaklıkta, %5 CO_2 varlığında gece boyunca inkübe edildi.

5 farklı konsantrasyonda Mn-AuNP, inkübasyon sonunda kuyucuklara eklendi. Hücre ve reaktif içermeyen besiyer negatif kontrol olarak kullanıldı. Her parametre beşer defa tekrar edildi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 Mn-AuNP'in SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerinde 24. ve 48.saat sitotoksosite çalışması

CO_2 inkübatöründe bulunan hücreler 37°C sıcaklıkta, CO_2 (% 5) varlığında 24. ve 48. saate kadar inkübe edildi ve inkübasyon işleminden sonra her kuyucuğa 10 μ L MTT solüsyonu eklendi. Dört saat süren inkübasyon süresi sonunda spektrofotometre kullanılarak 690 nm referans aralığı ve 570 nm dalga boyunda olan kuyucukların absorbans değeri ölçüldü. Negatif kontrol grubu sıfır absorbans olarak kabul edildi ve % sitotoksosite verileri hesaplandı.

3.6.2 Apoptozis alışmaları

T hücrelerine enkapsüle edilen mangan konjuge altın nanoparçacıkların SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinde apoptotik etkilerinin incelenmesi için Millipore Muse cihazı kullanıldı.

Millipore Muse cihazında Muse Annexin V / Ölü hücre test kiti (Millipore, Darmstadt, Almanya); canlı, erken / geç apoptotik ve ölü hücrelerin kantitatif analizi için kullanıldı. Yapılan alışmada Annexin V, apoptotik hücrelerin dış zarı üzerindeki fosfatidilserin (PS)'i tespit etmek için kullanıldı. 7-amino-aktinomisin ise ölü hücreleri tespit etmek için kullanıldı.

SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri, T hücrelerine enkapsüle edilen 30 µM Mn-AuNP ile 24 saat boyunca inkübasyona tabi tutuldu. 24 saatlik inkübasyon sonrasında tripsinize edildi. Falcon tüplere aktarılan hücre süspansiyonları 1000 rpm, 5 dakika santrifüj koşullarında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında çökelen hücreler % 1 FBS içeren 100 µL taze besiyerde tekrar süspanse edildi. Hücre süspansiyonu içeren her falkon tüpüne 100 µL olacak şekilde Muse Annexin V / Ölü Hücre Boyası test kiti reaktif maddesi ilave edildi. Oda koşullarında 20 dakika inkübe edilen hücreler, Muse Hücre Analiz Cihazına (Merck Millipore) uygulandı.

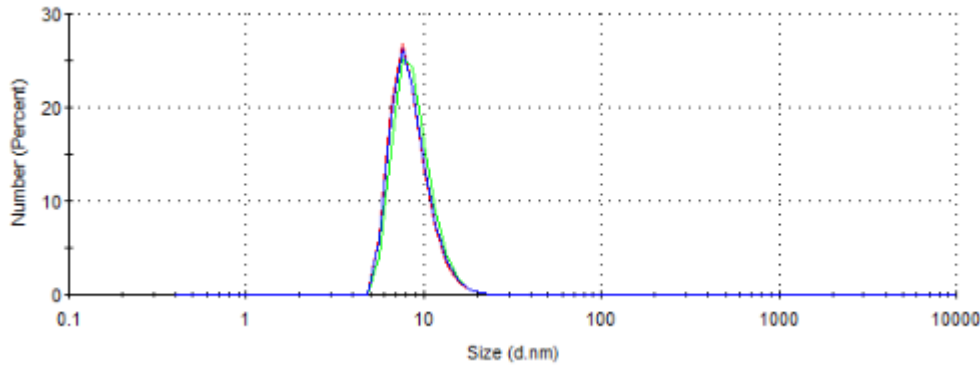
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mn-AuNP'lerin Karakterizasyonu

4.1.1 DLS sonuçları

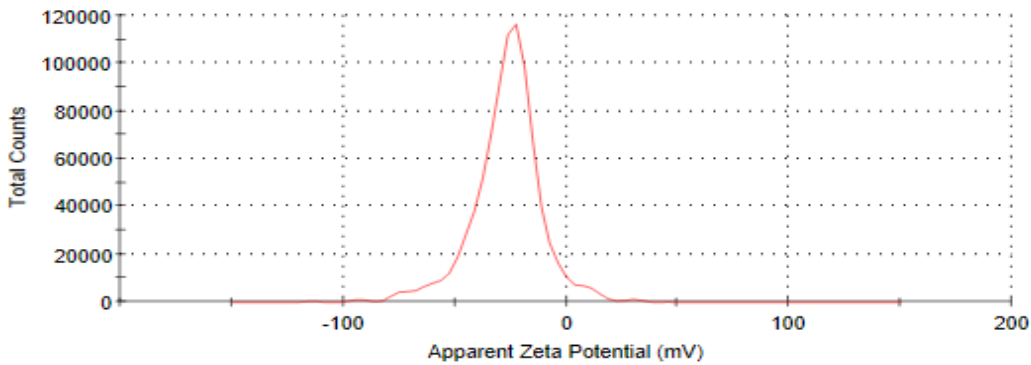
Mn-AuNP'nin ortalama partikül boyutu ve zeta potansiyeli Malvern Nano-ZS marka DLS cihazı ile analiz edildi. Doğru ölçümlerin alınabilmesi için örneğin viskozitesi ve sıcaklığının bilinmesi, aynı zamanda örnek sıcaklığı ile analiz sıcaklığının aynı olması gerekmektedir. Önlemlerin alınmadığı durumlarda numunede oluşacak konveksiyon akımı taneciklerin düzensiz olmayan hareketine yol açarak boyut algısını bozar. Şekil 4.1'de görüleceği üzere uygun koşullar sağladıktan sonra analiz sonucunda hidrodinamik parçacık çapı 32,69 nm olarak bulunmuştur. Parçacık boyutlarının farklı çözeltiler içerisinde değiştiğinin bir göstergesi olan Polydispersity Index (PdI) değeri yapılan analizde $0,478 \pm 0,006$ olarak ölçülmüştür.

Sayıya göre boyut dağılımı



Şekil 4.1 Mn-AuNP'nin boyut dağılım grafiği

Zeta potansiyel dağılımı

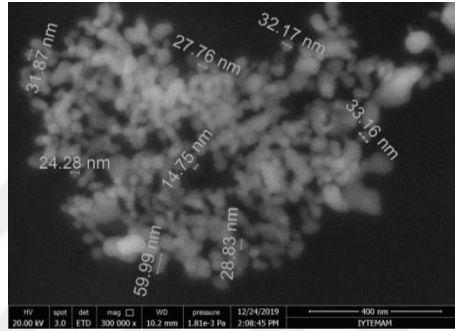


Şekil 4.2 Mn-AuNP'nin zeta potansiyel dağılım grafiği

DLS analizi ile bulunan Mn-AuNP ortalama partikül boyutu yapılan literatür taramalarına uygun çıkmıştır (Murph et al., 2012).

4.1.2 SEM sonuçları

Mn-AuNP'ların boyut ve yüzey morfolojisi analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Analiz sonucunda $31,60 \pm 12,92$ nm çapında nanoparçacıkların varlığı saptanmıştır (Şekil 4.3). Bu sonuçlar Murph ve arkadaşları tarafından yapılan Mn-AuNP sentezi SEM analiz sonuçları ile uyumluluk göstermektedir (Murph et al., 2012).



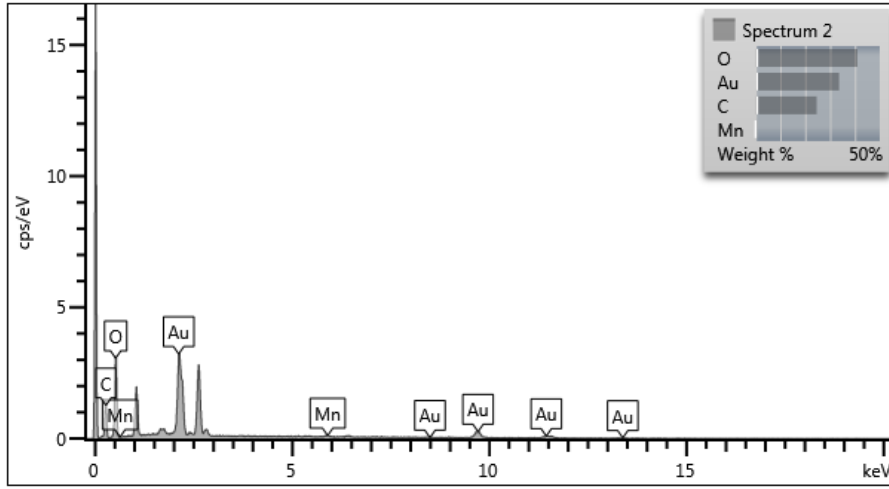
Şekil 4.3 Mn-AuNP'nin SEM görüntüsü

4.1.3 EDX sonuçları

Enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi; örneklerin kimyasal karakterizasyonu veya elementel analizinde kullanılan spektroskopik yöntemidir. Üzerine elektronların gönderildiği örneklerden salınan karakteristik X-ışınlarının dedeksiyonundan sonra Mn-Au nanoparçacıklarına ait elementel kompozisyon yüzdesel olarak belirlendi.

Çizelge 4.1 Mn-AuNP'nin elementel kompozisyonu

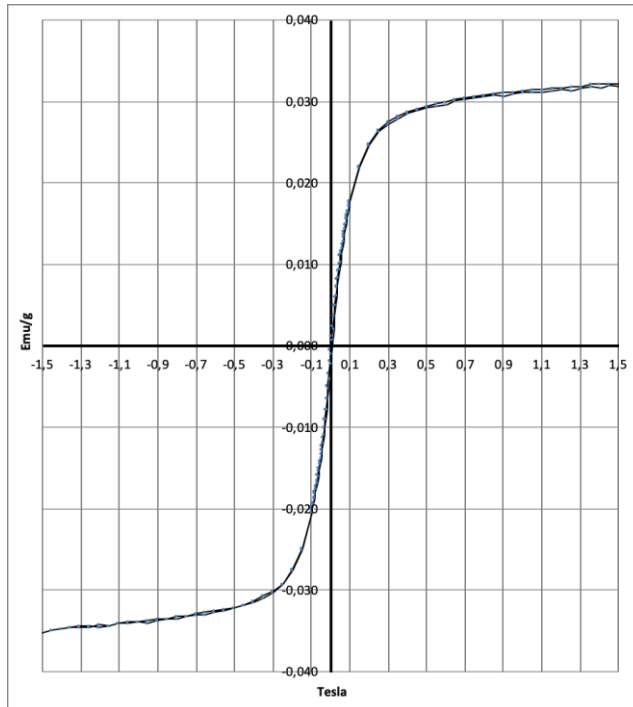
Element	Wt%	Atomik %
C	24,61	42,69
O	41,06	53,47
Mn	0,73	0,28
Au	33,61	3,56
Toplam	100,00	100,00



Şekil 4.4 Mn-AuNP'nin EDX diagramı

4.1.4 VSM sonuçları

Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunan VSM Cryogenic Limited PPMS cihazı ile Mn-Au nanoparçacıkların manyetik özellikleri analiz edilmiştir. Mn-Au nanoparçacıkların manyetizasyon değeri Şekil 4.5' de verilen diyagram incelendiğinde 0,0321 emu/g olarak bulunmuştur.

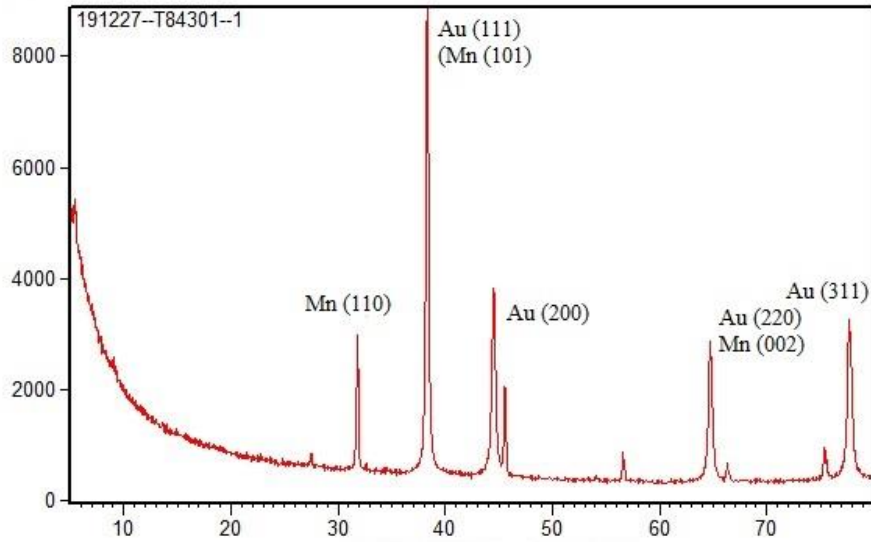


Şekil 4.5 Mn-AuNP'nin VSM diagramı

4.1.5 XRD sonuçları

Mn-AuNP'ların yapısal kompozisyonları İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde XRD (X-Ray diffractometer) (Phillips X'Pert Pro) analizi ile incelendi.

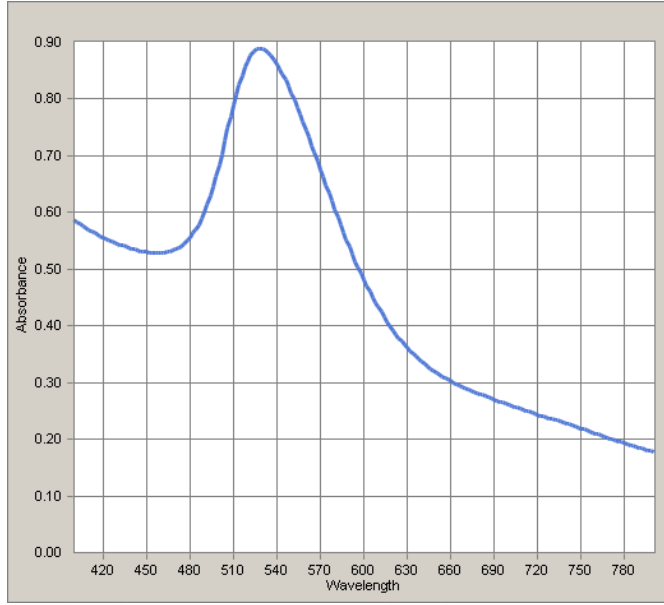
Şekil 4.6'da verilen Mn-Au nanoparçacıkların XRD diagramı, Krishnamurthy ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ve Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığı zaman sırasıyla Mn (110), Au (111)-Mn(101), Au (200), Au (220)-Mn (002) ve Au (311) piklerine denk gelmektedir. Diagramda görünen mangan piklerinin altın pikleri ile baskılandığı görülmektedir. Buna ek olarak yapılan literatür taramalarında diagramdaki piklerin altına ait olduğu tespit edilmiştir. Böylelikle altın nanopartiküllerin mangan ile başarılı bir şekilde konjuge olduğu düşünülmektedir (Krisnamurthy et al., 2014; Wang et al., 2013).



Şekil 4.6 Mn-AuNP'nin XRD diagramı

4.1.6 UV-Vis sonuçları

Şekil 4.7'de verilen Mn-AuNP'lere ait UV spektrumu 528 nm plazmon bandındadır. Murph ve arkadaşlarının yaptığı çalışma incelendiğinde, her iki spektrumda Mn-AuNP spektrumunun ~520 nm plazmon bandında olduğu tespit edilmiştir (Murph et al., 2012).



Şekil 4.7 Mn-AuNP'nin UV spektrumu

4.2 Mn-Au Nanoparçacıkların Yapısal Analiz Çalışmaları

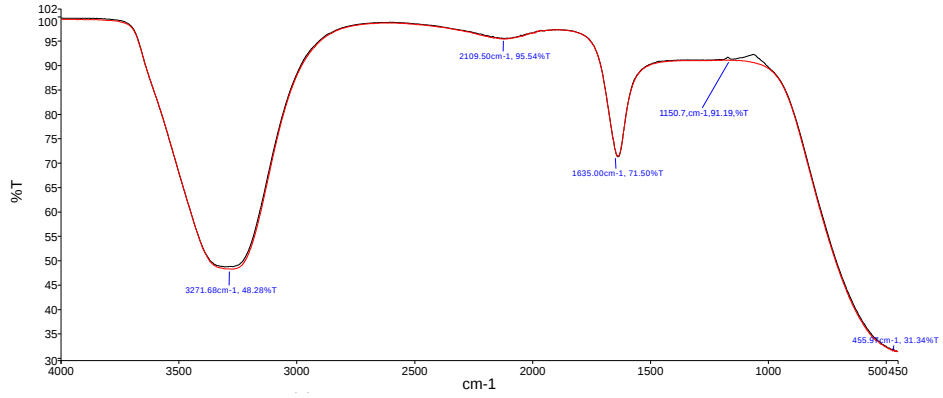
4.2.1 FTIR sonuçları

Fourier dönüşümü ile ışığın infrared yoğunluğuna göre dalga sayısını ölçen FTIR analitik bir yöntemdir. 14000 cm^{-1} ile 10 cm^{-1} arası kızıl ötesi bölgesidir. NIR yakın dalga boylu kızıl ötesi 4000~14000 cm^{-1} , MIR orta dalga boylu kızıl ötesi 400~4000 cm^{-1} ve FIR uzak dalga boylu kızıl ötesi 4~400 cm^{-1} 'dir (Skoog et al., 1998).

Mn-AuNP'nin FTIR analizleri Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsünde, Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR cihazı ile incelendi. Mn-AuNP'nin yapısındaki fonksiyonel gruplar Çizelge 4.2'de verildi.

Çizelge 4.2 Mn-AuNP'nin FTIR incelemesi.

Pik	Gerilim	Açıklama
3200–3600 cm^{-1}	AuO-H	Karbonil ve hidroksil (O-H germe bandı)
2115 cm^{-1}	O-H	Engellenmiş dönme ve O-H bükülmesinin kombinasyonu
1634 cm^{-1}	C=O	C=O gerilme frekansı
1148 cm^{-1}	C-O	Mangan bağlanması (germe) bandı



Şekil 4.8 Mn-AuNP'nin FTIR spektrumu

Şekil 4.8'de AuNP ve mangan konjuge AuNP'lerin IR spektrumları verilmiştir. Kırmızı renkli spektrumlar AuNP, siyah renkli spektrumlar mangan konjuge altın nanoparçacıkların spektrumlarıdır. Spektrumlar incelendiğinde 1500-1700 cm⁻¹ aralığındaki pik C=O gerilme frekansı bölgesine düşer. 3200-3600 cm⁻¹ aralığındaki geniş pik ise karbonil ve hidroksil gruplarına karşılık gelmektedir. Mn-AuNP spektrumunda 1148 cm⁻¹ piki C-O gerilimini vermekte ve bu sonuç bize manganın altın nanoparçacığa karboksil uçlarından bağlandığını göstermektedir (Suresh et al., 2011).

4.3 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

4.3.1 TLC sonuçları

Radyoizotoplama çalışmalarında yapılan ince tabaka kromatografisi deneylerinde elde edilen R_f ve % verim değerleri Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

Mn-AuNP'nin ^{99m}Tc ile işaretlenme veriminin belirlenmesi için SF (TLRC1) ve ACN (TLRC2) banyo mobil faz çözeltileri kullanılmıştır.

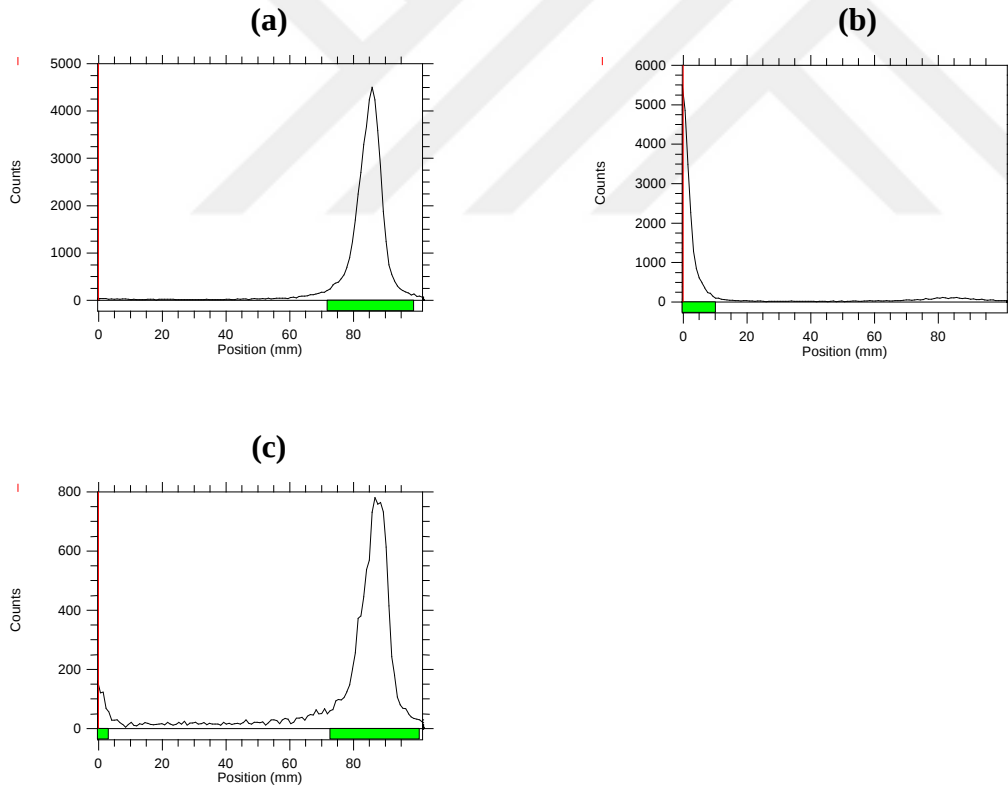
Çizelge 4.3 ^{99m}Tc-(Mn-AuNP)'nin R_f değerleri

Banyo Çözeltisi	^{99m} Tc	İndirgenmiş ^{99m} Tc	^{99m} Tc-(Mn-AuNP)
TLRC1	0,95±0,007	0,018±0	0,96±0,004
TLRC2	1,013±0,01	0,019±0,003	0,026±0,004

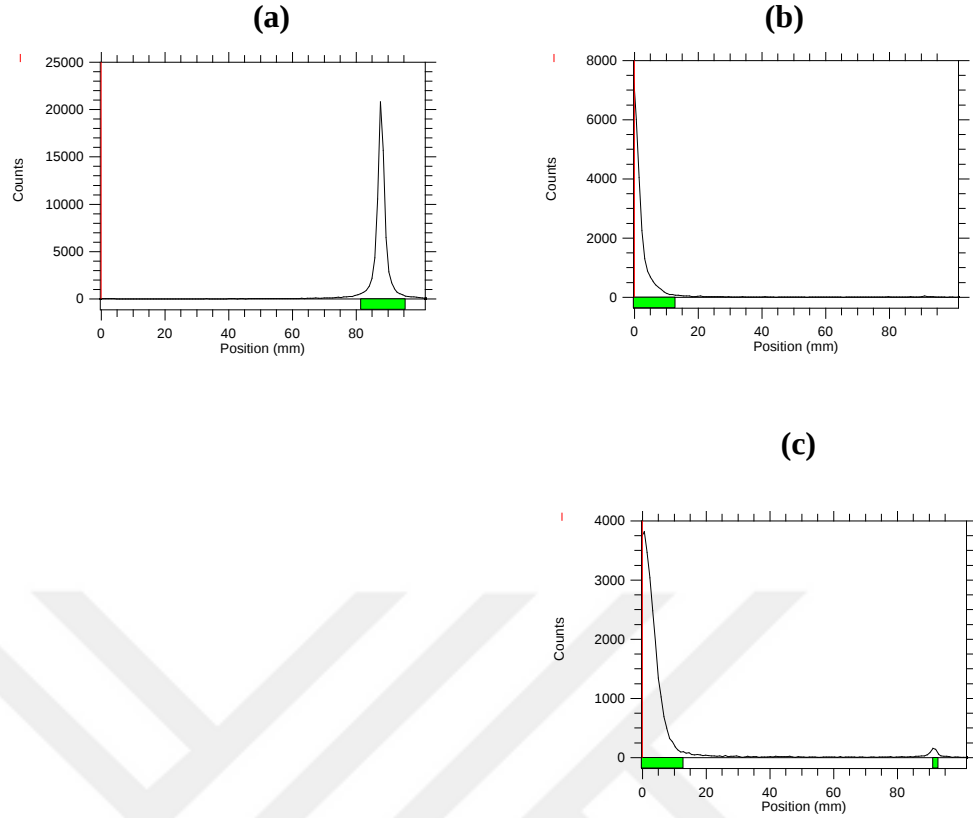
Çizelge 4.4 ^{99m}Tc ile işaretli Mn-AuNP'nin işaretlenme verimi

Banyo Çözeltisi	^{99m}Tc -(Mn-AuNP) Verim (%)
TLRC1	98,44±0,26
TLRC2	98,08±0,87

Sentezlenen mangan konjuge altın nanoparçacıkların TLC analizi ile radyokimyasal verimi hesaplanmıştır. Çizelge 4.1'de verilen TLRC1 ve TLRC2 banyolarındaki radyoişaretli ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'lerin R_f değerleri incelendiğinde örneklerde radyokimyasal safsızlığın olmadığı tespit edilmiştir. Nanopartikül sisteminin işaretleme verimi ise TLRC1 banyosunda %98,44 ± 0,26, TLRC2 banyosunda ise %98,08 ± 0,87 olarak bulunmuştur (n=4). Elde edilen sonuçlara ait kromatogramlar Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'da verilmiştir.



Şekil 4.9 TLRC1 banyosunda (a) ^{99m}Tc , (b) indirgenmiş ^{99m}Tc , (c) ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'lere ait kromatogramlar



Şekil 4.10 TLRC2 banyosunda (a) ^{99m}Tc , (b) indirgenmiş ^{99m}Tc , (c) ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'lere ait kromatogramlar

Şekil 4.9 ve Şekil 4.10'daki kromatogramlardan görüldüğü üzere ^{99m}Tc 'un tamamı indirgenmiştir. Gerçekleştirilen analiz için 2 farklı banyo olarak SF (TLRC1) ve ACN (TLRC2) banyoları kullanılırken sabit faz için silika kaplı TLC tabakaları kullanılmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda TLRC1 ve TLRC2 banyolarının radyoışaretlemede Mn-AuNP kalite kontrolü için uygun olduğu anlaşılmıştır.

İnce tabaka kromatografisi, işaretlenmiş bileşiklerin radyokimyasal verimini değerlendirmek için hızlı, güvenilir ve oldukça pratik bir kromatografik yöntemdir. Radyokimyasal safsızlıkların nükleer tıpta teşhis için görüntü kalitesinde sorunlar oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, radyofarmasötiklerin bağlanma veriminin %90'ın üzerinde olması gerektiği sonucuna varılabilir. Bu sebepten dolayı, ^{99m}Tc -(Mn-AuNP), yüksek bir radyokimyasal verim göstermiştir.

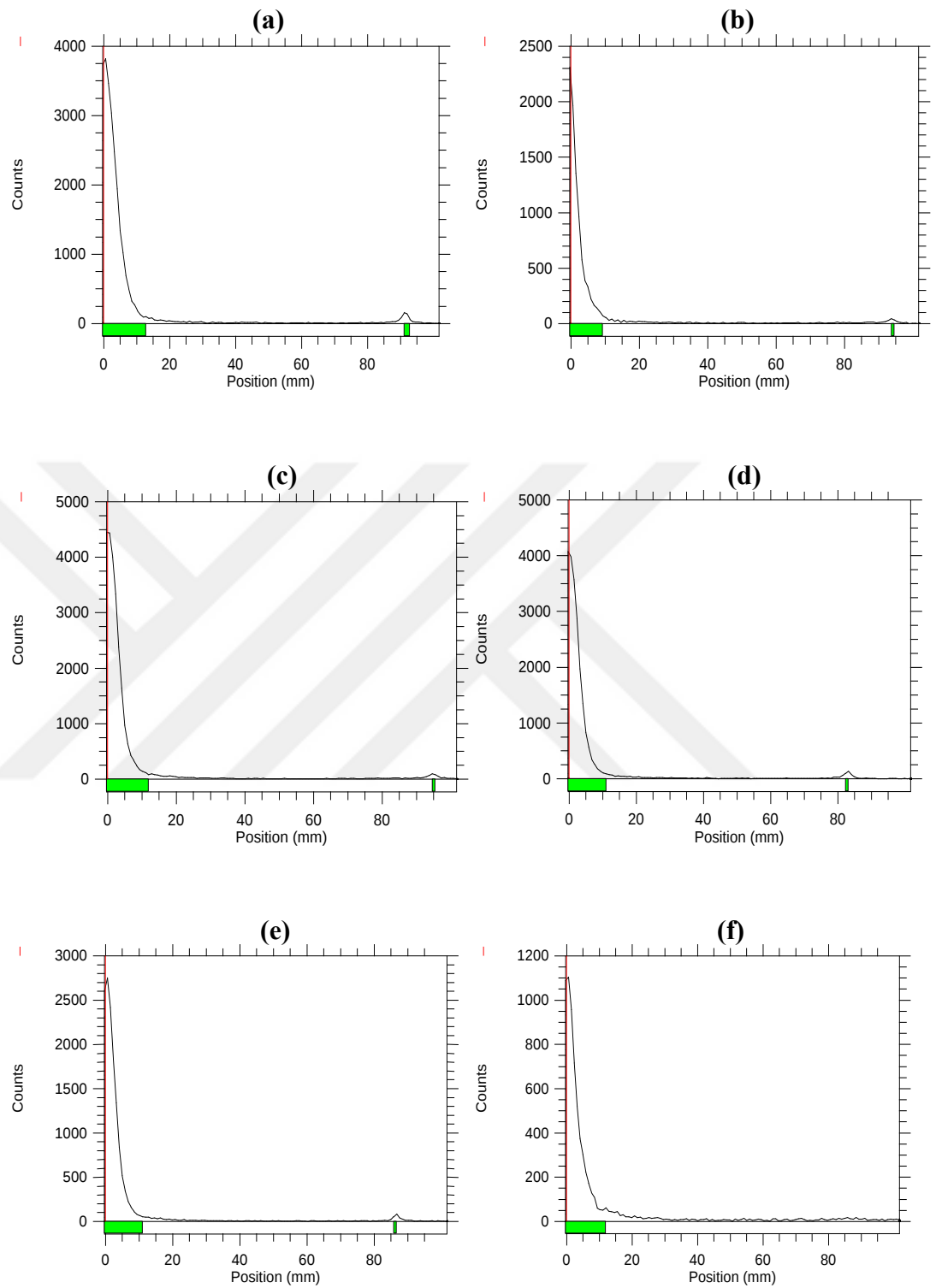
4.3.2 Stabilite sonuçları

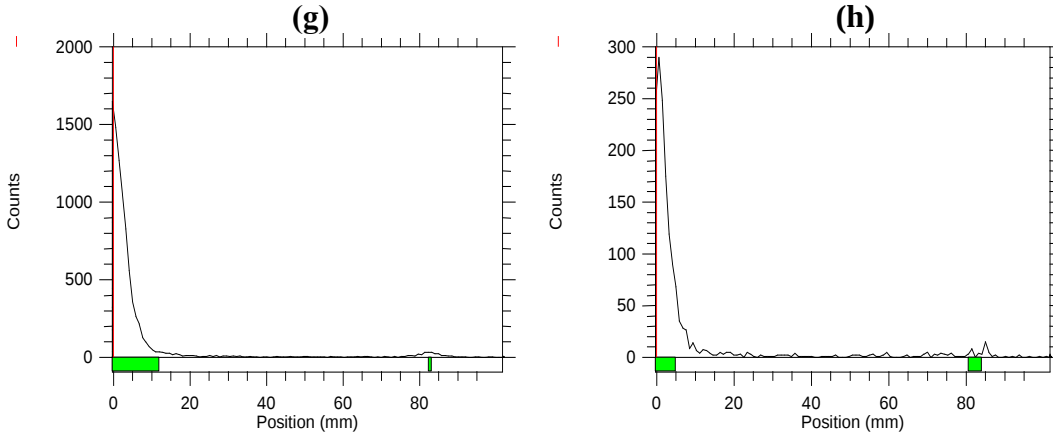
Mn-AuNP ^{99m}Tc ile işaretlendikten sonra oda sıcaklığında, TLRC2 banyosunda 24.saate kadar olan stabiliteleri TLC Scanner (Bioscan 2000) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.11’de ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)’nin 24. saate kadar olan işaretleme verimleri yer almaktadır. Şekil 4.9’de 30. dakikadan 24. saate kadar olan kromatogramlar gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde örneğin 24. saatte radyoişaretleme veriminin % 95’in üzerinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5 ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)’nin stabilite zaman-verimi

Zaman (Dakika)	Radyoişaretleme Verimi (%)
0	98,08 $\pm$ 0,87
30	99,51 $\pm$ 0,02
60	99,49 $\pm$ 0,12
120	99,61 $\pm$ 0,09
180	99,50 $\pm$ 0,09
240	99,49 $\pm$ 0,71
360	99,07 $\pm$ 0,72
1440	97,11 $\pm$ 1,56





Şekil 4.11 ^{99m}Tc -(Mn-AuNP)'in (a) 0. Dakika, (b) 30. dakika, (c) 60. dakika, (d) 120. dakika, (e) 180. dakika, (f) 240.dakika, (g) 360. Dakika, (h) 1440. dakika stabilite çalışmasına ait kromatogramlar

4.3.3 Lipofilite sonuçları

Mn-AuNP'na ait deneysel lipofilite çalışmasında (logP) değeri $-2,73 \pm 0,19$ olarak bulundu. Bu değer bize bileşiğin hidrofilik olduğunu gösterdi.

4.4 Hücre Kültürü Sonuçları

4.4.1 Sitotoksosite sonuçları

Sitotoksosite çalışmasından 100 μM , 250 μM , 500 μM ve 1000 μM konsantrasyonlarında Mn-AuNP kullanılarak SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri kullanılmıştır. Çizelge 4.5'de Mn-AuNP'nin konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri yer almaktadır. Mn-AuNP 1 μM 'ının 24 ve 48 saat içerisinde herhangi bir stotoksik etkisi bulunmazken 24 saatde 100 $\mu\text{g/mL}$ 'sinin canlılık değerlerinin SKOV3 için % 91,27'e ve SKOV3-CEA için % 89,67'e düştüğü gözlenmiştir. Bu değerler göz önüne alındığında Mn-AuNP 100 μM 'ının 24 saat içerisinde stotoksik etkisinin çok düşük olduğu tespit edilmiştir.

Mn-AuNP 100 μM 'sinin 48. saatte her iki hücre hattı için bakıldığında 24. saatte gözlenen sitotoksik etkiye yakın bir değer bulunmuştur. SKOV3 için % 84,18 ve SKOV3-CEA için % 80,58 canlılık gözlenmiştir.

Önceden belirlenen artan konsantrasyon değerlerinde SKOV3 hücre hattı için % hücre canlılığı 24 saatte % 91,27'den % 60,55'e düşmüştür. SKOV3-CEA hücre hattı için bu canlılık değerleri 24 saatte % 69,67'den % 63,28'e düşmüştür.

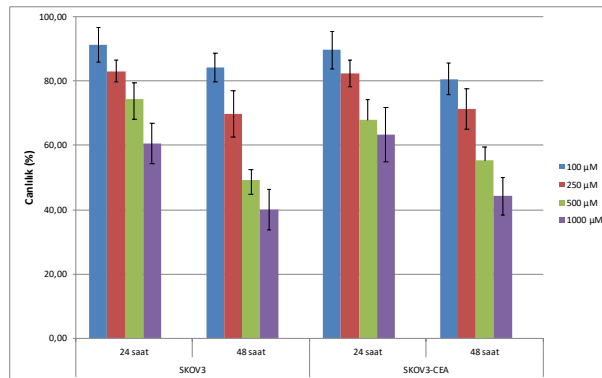
Çizelge 4.6 Mn-AuNP konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri

Konsantrasyon	Mn-AuNP			
	SKOV3		SKOV3-CEA	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
100 μ M	91,27 $\pm$ 5,34	84,18 $\pm$ 4,39	89,67 $\pm$ 5,83	80,58 $\pm$ 4,90
250 μ M	83,13 $\pm$ 3,29	69,78 $\pm$ 7,20	82,33 $\pm$ 4,10	71,32 $\pm$ 6,22
500 μ M	74,43 $\pm$ 4,89	49,21 $\pm$ 3,19	67,87 $\pm$ 6,37	55,23 $\pm$ 4,31
1000 μ M	60,55 $\pm$ 6,18	39,91 $\pm$ 6,33	63,28 $\pm$ 8,49	44,19 $\pm$ 5,77

İstatiksel hesaplamalara göre IC₅₀ değerleri 24. saat için SKOV3’de 1693 μ g/mL, SKOV3-CEA’de 1930 μ M olarak bulunmuştur. 48. saat IC₅₀ değerleri ise; SKOV3’de 575 μ M, SKOV3-CEA’de 721 μ M olarak tespit edilmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Mn-AuNP’nin IC₅₀ değerleri

Zaman	SKOV3	SKOV3-CEA
24.saat	1693 $\pm$ 1,14 μ M	1930 $\pm$ 1,25 μ M
48.saat	575 $\pm$ 1,06 μ M	721 $\pm$ 1,08 μ M



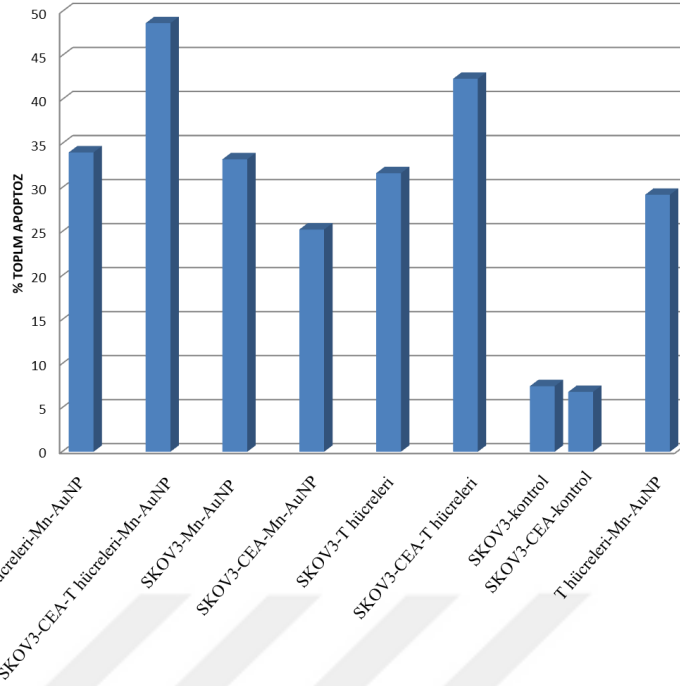
Şekil 4.12: Mn-AuNP’nin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki sitotoksikite sonuçları

4.4.2 Apoptozis sonuçları

Yapılan apoptozis çalışmalarında SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatlarına 0,5 mM örnekler verilip 48 saat inkübasyon sağlanmıştır. Analizler sonucunda elde edilen bulgular aşağıdaki Şekil 4.13’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Apoptozis değerleri

	Canlı (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Ölü (%)	Toplam Apoptoz (%)
SKOV3 T hücresi / Mn-AuNP	61,88	3,35	30,66	4,11	34,01
SKOV3-CEA T hücresi / Mn-AuNP	50,08	8,61	40,08	1,23	48,69
SKOV3 Mn-AuNP	63,86	17,61	15,62	2,92	33,23
SKOV3-CEA Mn-AuNP	73,00	10,70	14,55	1,75	25,25
SKOV3 T hücresi	65,72	4,06	27,59	2,63	31,65
SKOV3-CEA T hücresi	56,16	2,55	39,82	1,48	42,37
SKOV3 kontrol	91,35	4,00	3,45	1,20	7,45
SKOV3-CEA kontrol	92,60	3,80	3,00	0,60	6,80
T hücresi / Mn-AuNP	68,90	17,60	11,60	1,90	29,20



Şekil 4.13 Hücrelerin toplam apoptoz oranları

SKOV3 hücrelerinin (10^5 hücre/ml) 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 91,35, erken apoptozdaki hücre oranı % 4,00, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 3,45 ve ölü hücre oranı % 1,20 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 7,45 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14 a).

SKOV3-CEA hücrelerinin (10^5 hücre/ml) 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 92,60, erken apoptozdaki hücre oranı % 3,80, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 3,00 ve ölü hücre oranı % 0,60 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 6,80 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.14 b).

T hücrelerine 30 μ M Mn-AuNP uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 68,90, erken apoptozdaki hücre oranı % 17,60, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 11,60 ve ölü hücre oranı % 1,90 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 29,20 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.15).

SKOV3 hücrelerine 30 μ M Mn-AuNP uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 63,86, erken apoptozdaki hücre oranı % 17,61, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 15,62 ve ölü hücre oranı % 2,92 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 33,23 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16 a).

SKOV3-CEA hücrelerine 30 μ M Mn-AuNP uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 73,00, erken apoptozdaki hücre oranı % 10,70, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 14,55 ve ölü hücre oranı % 1,75 olmak

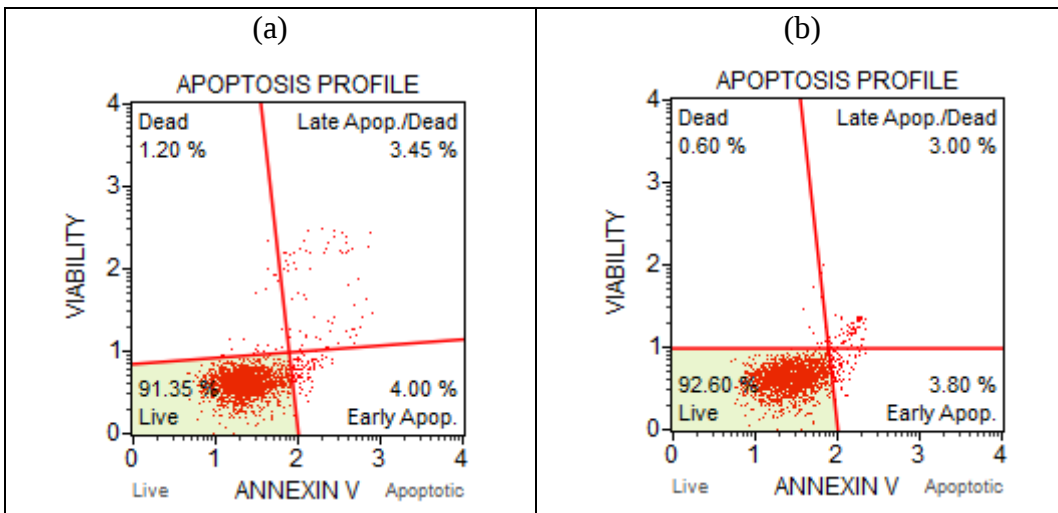
üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 25,25 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.16 b).

SKOV3 hücrelerine T hücresi (10^4 hücre/ml) örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 65,72, erken apoptozdaki hücre oranı % 4,06 geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 27,59 ve ölü hücre oranı % 2,63 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 31,65 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17 a)

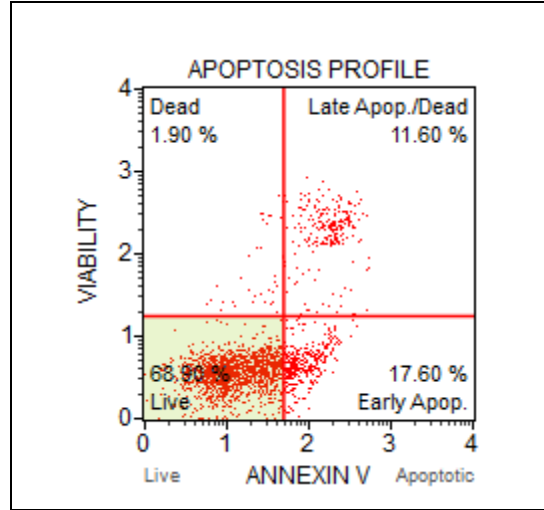
SKOV3-CEA hücrelerine T hücresi (10^4 hücre/ml) örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 56,16, erken apoptozdaki hücre oranı % 2,55 geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 39,82 ve ölü hücre oranı % 1,48 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 42,37 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17 b).

SKOV3 hücrelerine 30 μ M Mn-AuNP enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 61,88, erken apoptozdaki hücre oranı % 3,35, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 30,66 ve ölü hücre oranı % 4,11 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 34,01 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.18 a).

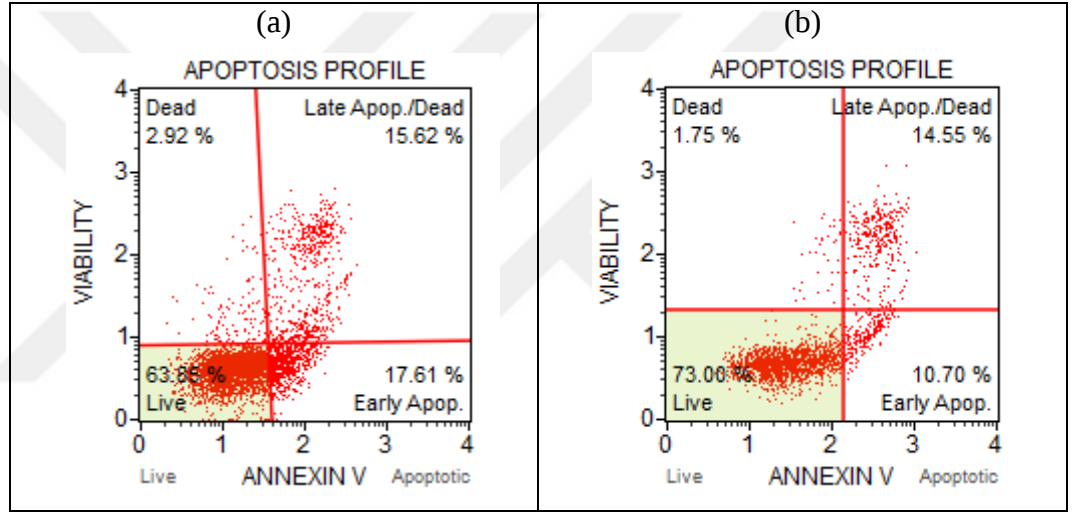
SKOV3-CEA hücrelerine 30 μ M Mn-AuNP enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 50,08, erken apoptozdaki hücre oranı % 8,61, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 40,08 ve ölü hücre oranı % 1,23 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 48,69 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.18 b).



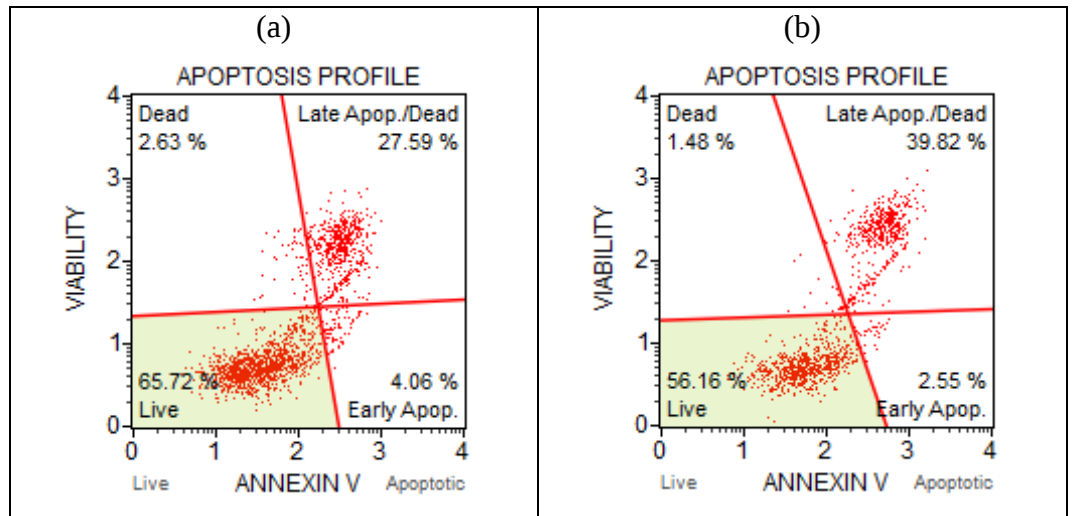
Şekil 4.14 Kontrol grubu olarak SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücrelerinin apoptozis sonuçları



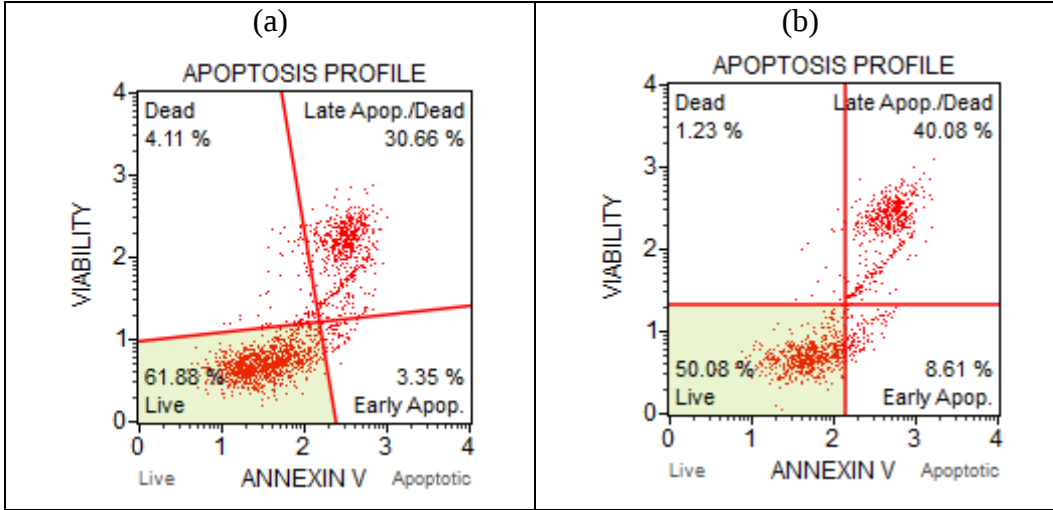
Şekil 4.15 Mn-AuNP'nin yüklü T hücrelerinin apoptozis sonuçları



Şekil 4.16 Mn-AuNP'nin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları



Şekil 4.17 T hücrelerinin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları



Şekil 4.18 Mn-AuNP yüklü T hücrelerinin SKOV3 (a) ve SKOV3-CEA (b) hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları

Yapılan apoptosiz SKOV3 hücre çalışmalarının sonuçları incelendiğinde toplam apoptoz oranının % 7,45 olduğu görülmektedir. Bu hücrelere T hücreleri uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 31,65, Mn-Au nanoparçacıkları uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 33,23 ve T hücrelerine enkapsüle edilmiş Mn-Au nanoparçacıkları uygulandığındaki toplam apoptoz oranının % 34,01 olduğu görülmektedir. Buna göre T hücrelerine enkapsüle edilmiş Mn-Au nanoparçacıkları, SKOV3 hücreleri üzerinde, Mn-AuNP ve T hücresi örneklerinden daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Yapılan apoptosiz SKOV3-CEA hücre çalışmalarının sonuçları incelendiğinde toplam apoptoz oranının % 6,80 olduğu görülmektedir. Bu hücrelere T hücreleri uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 42,37, Mn-Au nanoparçacıkları uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 25,25 ve T hücrelerine enkapsüle edilmiş Mn-Au nanoparçacıkları uygulandığındaki toplam apoptoz oranının % 48,69 olduğu görülmektedir. Buna göre T hücrelerine enkapsüle edilmiş Mn-Au nanoparçacıkları, SKOV3-CEA hücreleri üzerinde, Mn-AuNP ve T hücresi örneklerinden daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir.

Her iki sonuçlarda göz önünde bulundurulduğunda T hücrelerin enkapsüle edilmiş Mn-AuNP örneklerinin, SKOV3-CEA üzerinde SKOV3'ten daha fazla apoptik etkiye yol açtığı tespit edilmiştir. Bu durum T hücrelerinin CEA antijenini tanımasından kaynaklanmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada; multifonksiyonel ilaç taşıyıcı sistem olarak altın nanoparçacıklar sentezlenmiştir. Taşınan ilaç sisteminin canlı üzerindeki toksik etkisinin azaltılması, yüksek yüzey-hacim oranı sayesinde daha yüksek miktarda konjugasyona olanak sağlaması ve biyolojik ortamdaki stabiliteyi arttırması gibi özellikler, ilaç taşıyıcı sistem olarak nanoteknolojiden faydalanmanın başlıca nedenleridir. Yapılan karakterizasyon ve hücre kültürü çalışmaları bu amacın istenilen sonuca vardığını desteklemektedir.

Sentezlenen altın nanoparçacıkların SEM analizleri sonucunda parçacık boyutlarının $31,60 \pm 12,92$ olduğu tespit edilmiştir. Partikül boyutu 20 nm-60 nm aralığında olan altın nanoparçacıklar ilaç taşıma, biyobelirteç ve kimyasal sensör gibi alanlarda kullanılmaktadır (Rowles, 2013). Bu sonuç sentezlenen altın nanopartikülün multifonksiyonel prob olarak kullanımı için ideal boyutta olduğunu göstermektedir.

Multifonksiyonel prob olan altın nanoparçacıkların MRG tekniğinde kullanımları için pozitif kontrast özelliği taşıyan Mn ile konjugasyon çalışması yapılmıştır. FTIR, UV spektroskopisi, XRD, EDX ve VSM çalışmaları sonucunda mangan konjugasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleştiği ve nanoparçacık sistemin manyetik özellik kazanarak MRG tekniğinde pozitif kontrast ajan olarak kullanılabileceği görülmüştür. FTIR analizinde elde edilen spektrum incelendiğinde, Mn-AuNP konjugasyonunun altın nanopartikülün $-COOH$ uçlarından gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Multifonksiyonel pozitif kontrast ajan olan Mn-Au nanoparçacıklara ^{99m}Tc ile radyoişaretleme çalışması yapılmıştır. Radyoişaretleme sonucunda işaretleme verimi kalite kontrolü için TLC, stabilite ve lipofilite çalışmaları yapılmıştır. SF ve asetonitril banyoları kullanılarak yapılan TLC çalışmalarının sonuçları incelendiğinde SF banyosunda $\% 98,44 \pm 0,26$, asetonitril banyosunda ise $\% 98,08 \pm 0,87$ verimde işaretleme gerçekleştiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bize radyoişaretlemenin yüksek verimde gerçekleştiğini göstermiştir. Radyo işaretleme sonrası 24. Saat sonuna kadar yapılan stabilite çalışmalarında ilk 6 saat sonrasında işaretleme veriminin $\% 99,07 \pm 0,72$ olduğu, 24 saat sonrasında ise bu değerin $\% 97,11 \pm 1,56$ 'a düştüğü tespit edilmiştir. Bu sonuç bize altın nanopartikül kullanımının yüksek radyoişaretleme verimi ve radyoişaretleme stabilitesini sağladığını göstermektedir.

SKOV3 ve karsinoembriyjenik antijen işaretli SKOV3 hücre hatları ile sitotoksikite ve apoptozis çalışmaları in vitro ortamda yapılmıştır. Yapılan sitotoksikite çalışmaları sonucunda hücre hatlarına 100 μM Mn-AuNP konsantrasyonunda sitotoksik etkinin az olduğu, daha yüksek konsantrasyonlarda

ise SKOV3-CEA hücre hatlarında Mn-AuNP'nin sitotoksik etkisinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatlarında farklı şartlarda apoptotik etkiler incelenmiştir. Yapılan çalışmalarda, SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatlarının kendi başlarına apoptotik özellikleri incelenmiş ve geç apoptoz sonuçlarının SKOV3 hücreleri için % 3,45, SKOV3-CEA hücreleri için % 3,00 gibi düşük değerlerde olduğu tespit edilmiştir. Sentezlenen Mn-AuNP'lerin kanserli hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri incelendiğinde, SKOV3 hücreleri için geç apoptozun % 15,62, SKOV3-CEA hücreleri için ise % 14,55 olduğu tespit edilerek sentezlenen Mn-AuNP'ların kendi başlarına kanserli hücre hatları üzerindeki apoptotik etkiyi arttırdıkları ortaya konulmuştur. T hücrelerine konjuge edilen Mn-AuNP'ların kanserli hücre hatları üzerindeki apoptotik etkileri incelendiğinde, SKOV3 hücre hattındaki geç apoptozun % 30,66, SKOV3-CEA hücre hattındaki geç apoptozun ise % 40,08 olduğu tespit edilmiştir. T hücreleri kullanımı ile apoptotik etkinin artmasının sebebi, T hücrelerinin kanser hücrelerine spesifik olup bu hücreleri kontrollü olarak yok etmesidir. SKOV3-CEA hücrelerindeki apoptotik etkinin SKOV3 hücrelerine göre daha yüksek olmasının sebebi, daha yüksek miktarda karsinoembriyogenik antijen işaretli olarak üretilen SKOV3-CEA kanser hücrelerinin, SKOV3 kanser hücrelerine göre daha fazla miktarda karsinoembriyogenik antijen içermesinden kaynaklanmaktadır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasında; tümör spesifik multifonksiyonel kontrast ajan olarak T hücre konjuge radyoişaretli Mn-Au nanoparçacık sentezlenmiştir. Sentezlenen bu multifonksiyonel görüntüleme ajanı ile MRG/SPECT dual modalite görüntüleme sisteminde elde edilecek görüntü kalitesi arttırılacak ve böylelikle tümörlü dokunun teşhisindeki doğruluk arttırılacaktır. T hücrelerine konjuge edilen radyoişaretli multifonksiyonel kontrast ajanın teşhis çalışmalarda kaliteyi arttırması ile beraber T hücreleri sayesinde kanserli hücreleri yok ettiği yapılan hücre kültürü çalışmaları ile ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Badwaik, V.D., Bartonojo, J., Evans, J., Sahi, S., Willis, C. and Rajalingam, D.,** 2011, Single step biofriendly synthesis of surface modifiable near spherical gold nanoparticles for applications in biological detection and catalysis. *Langmuir*, 27(9), 5549-5554 p.
- Barbaros, B. ve Dikmen, M.,** 2015, Kanser immünotrapisi, Erciyes Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü Dergisi, 31(4), 177 s.
- Blackadar, C.B.,** 2016, Historical review of the causes of cancer, *World J Clin Oncol*, 7(1), 54-86 p.
- Bremer, K.H., Motler, M.,** 1985, Radiopharmaceuticals. In Fundamentals of Nuclear Medicine, Stuttgart, Gustav Fischer Verlag, 41-48p.
- Cantor, C.R., Schimmel, P.R.,** 1980, Techniques for the study of biological structure and function, San Francisco, W.H. Freeman, 584 p.
- Cho, E.C., Zhang, Q., Xia, Y.,** 2011, The effect of sedimentation and diffusion on cellular uptake of gold nanoparticles, *Nat. Nano.*, 6(6), 385-391 p.
- Cullity, B.D., Graham, C.D.,** 2009, Introduction to Magnetic Materials, Wiley, USA.
- Dykman, L., Khlebtsov, N.,** 2012, Gold nanoparticles in biomedical applications: recent advances and perspectives, *Chem. Soc. Rev.*, 41, 2256-2282 p.
- Edwards. S.A.,** 2006, The nanotech pioneers: Where are they taking us? Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Ercan, M.T.,** 1985, Radyofarmasötikler, Nükleer Tıp Yıllığı I, İstanbul Univ. Cerrahpaşa Tıp Fak. Nük. Tıp Anabilim Dalı, İstanbul, 13, 35-57 s.
- Ferrone, C. R., Brennan, M. F., Gonen, M., Coit, D. G., Fong, Y., Chung, S., & Allen, P. J.,** 2008, Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors, *J Gastrointestinal Surg*, 12(4), 701-706 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fitzmaurice, C., Dicker, D., Pain, A., Hamavid, H., Moradi-Lakeh, M., MacIntyre, MF., Allen C ve ark., 2015, The Global Burden of Cancer, *JAMA Oncol*, 1(4):505-27 p.

Fricker, S.P., 1996, Medical uses of gold compounds: Past, Present and Future. *Gold Bull*, 29(2), 53-60 p.

Guo, C., Manjili, M.H., Subjeck, J.R., Sarkar, D., Fisher, P.B., Wang, X.Y., 2013, Therapeutic cancer vaccines: past, present, and future, *Adv Cancer Res*, 119:421-75 p.

Hanks, N.A., Caruso, J.A., Zhang, P., 2015, *Journal of Enviromental Management*, 164, 41-45 p.

Haverkamp, R.T., Marshall, A.T., 2009, *Journal of Nanoparticle Research*, 11(6), 1453-1463 p.

Hong. H., Zhang, Y., Sun, J., et al., 2009, Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles, *Nano Today*, 4:399- 413 p.

Jain, P.K., El-Sayed, I.H.. El-Sayed, M.A., 2007, Au nanoparticles target cancer, *Nano Today*, 2 : 18-29 p.

Johal, M.S., 2011, Understanding nanomaterials, Boca Raton, CRC Press, FL.

Ledin, A., Karlsson, S., Du'ker, A., Allard, B., 1994, Measurementsin *situ* of concentration and size distributionof colloidal matter in deep ground waters by photon correlation spectroscopy, *Water Res*, 28:1539–154 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Krishnamurthy, S., Esterle, A., Sharma, N.C., Sahi, S.V.**, 2014, Yucca-derived synthesis of gold nanometarial and their catalytic potential, *Nanoscale research letters*, 9:627, 4-9 p.
- Murph, S.E.H., Jacobs, S., Liu, J., Hu, T.C.C., Siegfired, M., Serkiz, S.M., Hudson, J.**, 2012, Manganese-gold nanoparticles as an MRI positive contrast agent in mesenchymal stem cell labeling, *J. Nanopart Res.*, 14:658 6-13 p.
- Nicole, M., Renz, V.E., Ralph, S., Maurice, M., Marcel, V., Nils, K., Ricardo, A., Pascal, B.**, 2017, Flow Cell Coupled Dynamic Light Scattering for Real-Time Monitoring of Nanoparticle Size during Liquid Phase Bottom-Up Synthesis, *Appl. Sci*, 8(1), 108 p.
- Ochsner, E.H.**, 1927, The use of colloidal gold inoperable cancer, *Int J Med Surg*, 40, 100–104 p.
- Öztürk, A.A., Oytun, M.G., Günenç, D.**, 2017, Kanser immünoterapisi, *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi*, 2(1), 21-23 s.
- Patri, A., Dobrovolskaia, M., Stern, S., McNeil, S.**, 2006, Preclinical characterization of engineered nanoparticles intended for cancer therapeutics, In MM Amiji, ed., *Nanotechnology for Cancer Therapy*, Boca Raton, FL: CRC Press/Taylor & Francis, 105–138 p.
- Pavlopoulou, A., Spandidos, DA., Michalopoulos, I.**, 2015, Human cancer databases, *Oncol Rep*, 33(1):3-18 p.
- Prendergast, G.C. and Jaffe, E.M.**, 2007, Cancer immunologists and cancer biologists: Why we didn't talk then but need to now, 67(8):3500-4 p.
- Rau, R.** 2005, Have traditional DMARDs had their day? Effectiveness of parenteral gold compared to biologic agents, *Clin Rheumatol*, 24:189-202 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rowles, D.**, 2013, BBI: <http://www.bbisolutions.com/supportt> (Erişim Tarihi:13 Aralık 2019)
- Saha, G.P.**, 1984, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, 2nd ed., Springer-Verlag, New York.
- Sapsford, K.E., Tyner, K.M., Dair, B.J., Deschamps, J.R., Medintz, I.L.** 2011, Analyzing nanomaterial bioconjugates: a review of current and emerging purification and characterization techniques, *Anal Chem*, 83:4453–4488 p.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A.**, 1998, Enstrümental analiz prensipleri, (Çev. Kılıç, E., Köseoğlu. F., Yılmaz, H.), Bilim Yayıncılık, Ankara, 850 s.
- Smalley, R.E.**, 2002, Fullerenes, space, and the world's energy challenge, Canada-Europe-US-Japan workshop on micro nanotechnology for aerospace applications, Montreal, Canada.
- Suresh, A.K., Pelletier, D.A., Wang, W., Broich, M.L., Moon, J.W., Gu, B., Allison, D.P., Joy, D.C., Phelps, T.J., Doktycz, M.J.**, 2011, Biofabrication of discrete spherical gold nanoparticles using the metal-reducing bacterium *Shewanella Oneidensis*, *Acta Biomater*, 7(5): 2148-2152 p.
- Suzuki, E.**, 2002, High-resolution scanning electron microscopy of immunogold-labelled cells by the use of thin plasma coating of osmium, *J Microsc*, 208, 153–157 p.
- Tan, G., Onur, M.A., SAĞLAM, N.**, 2012, Utilization of gold nanostructures in biomedical applications, *Turk J Biol*, 36: 607- 621 p.
- Tartis, M.**, 2009, Nanotechnology in nuclear medicine, The University of New Mexico Health Sciences Center College of Pharmacy, New Mexico.
- Vicky, V.M., Rodney, S., Ajay, S., Hardik, R.**, 2010, Introduction to Metallic nanoparticles, *J Pharm Bioallied Sci*, 2(4), 282-289 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wagner, S.C., Ichim, T.E., Ma, H., Szymanski, J., Perez, J.A., Lopez, J., Bogin, V., 2015, Cancer anti-angiogenesis vaccines: Is the tumor vasculature antigenically unique?, *J Transl Med*, 13:340.

Wang, L., Deng, M., Ding, G., Chen, S., Xu, F., 2013, Manganese dioxide based ternary nanocomposite for catalytic reduction and nonenzymatic sensing of hydrogen peroxide, *Electrochimica Acta*, 416-423 p.

Zanchet, D., Hall, B.D., Ugarte, D., 2011, Characterization of nanophase materials, Wiley-VCH Verlag, GmbH, 13–36 p.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Fatma Yurt Onaran'a, çalışmalarım sırasında bana yardımlarını esirgemeyen sayın Doç. Dr. İlker Emin Medine'ye, Ar. Gör. Özge Kozguş Güldü'ye ve Doç.Dr. Çiğdem İçhedef'e, gerek laboratuvar çalışmaları süresince benden destek ve yardımlarını esirgemeyen sevgili ekip arkadaşlarıma, çalışmalarım boyunca yanımda olan, hayatımın her kısmında verdikleri destek ile beni yalnız bırakmayıp cesaretlendiren eşime ve aileme sonsuz teşekkür ederim.

Ayrıca tezimi TÜBİTAK 118 S 594 No'lu 1001 araştırma projesi kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na teşekkür ederim.

30/01/2020

Utku YALÇIN

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Utku YALÇIN

Doğum Yeri: AYDIN-Efeler

Doğum Yılı: 17.02.1992

Öğrenim Durumu:

Lise: Aydın Lisesi (2006-2010)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2010-2016)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2017-2020)