

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**İNSAN KANSER HÜCRELERİNDE *İN VİTRO*
UYGULAMALARDA KULLANILABİLECEK BOR
NÖTRON YAKALAMA TERAPİSİ İÇİN
NANOİYOPARÇACIKLARIN SENTEZLENMESİ
VE GELİŞTİRİLMESİ**

Özge KOZGUŞ GÜLDÜ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi :08.09.2016

Bornova, İZMİR

2016

Sayın Özge KOZGUŞ GÜLDÜ tarafından DOKTORA Tezi olarak sunulan “**İnsan Kanseri Hücrelerinde *İn Vitro* Uygulamalarda Kullanılabilecek Bor Nötron Yakalama Terapisi İçin Nanobiyoparçacıkların Sentezlenmesi ve Geliştirilmesi**” 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 08.09.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Raportör Üye : Doç. Dr. E. İlker MEDİNE

Üye : Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

Üye : Prof. Dr. Serdar ÖZÇELİK

Üye : Prof. Dr. Serhan SAKARYA

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**İnsan Kanseri Hücrelerinde *In Vitro* Uygulamalarda Kullanılabilecek Bor Nötron Yakalama Terapisi İçin Nanobiyoparçacıkların Sentezlenmesi ve Geliştirilmesi**” 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.

08 / 09 / 2016

Özge Kozguş Güldü

ÖZET

**İNSAN KANSER HÜCRELERİNDE *İN VİTRO* UYGULAMALARDA
KULLANILABİLECEK BOR NÖTRON YAKALAMA TERAPİSİ
İÇİN NANOBIYOPARÇACIKLARIN SENTEZLENMESİ VE
GELİŞTİRİLMESİ**

KOZGUŞ GÜLDÜ, Özge

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

İkinci Danışman: Prof Dr. Suna TİMUR

Eylül 2016, 153 sayfa

Tez çalışması ile glioblastoma hücrelerine yüksek sensitivite ve spesifitede bağlanma gösteren Bor Nitrür Nanotüp (BNNT) esaslı nanobiyokonjugat oluşturarak glioblastoma hücrelerini gösterecek ve bor nötron yakalama terapisinde (BNCT) kullanılabilecek bir teranostik ajan geliştirilmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen ajanın glioblastoma hücrelerine olan afinitesi *in vitro* olarak incelenmiştir. Bulunan sonuçlar insanda kullanılan BNCT ajanı olan 4-borono-L-fenilalanin (L-BPA) ile karşılaştırılmıştır.

BNNT'ler lityum katalizörlüğünde NH_3 atmosferinde kimyasal buharlaştırma depozisyon (Chemical Vapor Deposition, CVD) yöntemiyle sentezlenmiştir. Sentezlenen BNNT'ler PAMAM ile modifiye edilerek çözünürlüğü artırılmıştır. L-Phe ile EDC-NHS kimyası ile konjuge edilmiştir. Konjugasyon verimi HPLC ile belirlenmiştir. Elde edilen BNNT/PAMAM/L-Phe optimizasyon ve karakterizasyon çalışmaları XRD, SEM, EDX, TEM, FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Nanokonjugatlar $^{125/131}\text{I}$ ile iodojen yöntemine göre radyoiyotlanmıştır. Radyoiyotınasyon kalite kontrolü TLRC ve HPLRC yapılmıştır. Ayrıca radyoiyotlu örneklerin lipofilite tayini ve kağıt elektroforezi gerçekleştirilmiştir. Radyoiyotlu örneklerin oda sıcaklığında stabilite testleri yapılmış ve 24 saate kadar stabilitelerini korudukları görülmüştür.

Nanokonjugatların sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla farklı konsantrasyonlarda ve zaman aralıklarında sitotoksiteleri incelenmiştir. Yapıya giren iyotun hücreler üzerindeki sitotoksisiteye etkisi olup olmadığı incelenmiştir.

U87-MG ve C8-D1A hücreleri için $^{125/131}\text{I}$ ile işaretlenen BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], L-BPA ve L-Phe, örneklerinin hücre tutulumları zamana bağlı olarak incelenmiştir. Nanokonjugatlar fluoresan bir boya olan FITC ile işaretlendikten sonra hücrelerde görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmasında hücrelerin çekirdekleri DAPI ile maviye boyanmıştır ve fluoresan işaretli örnekler yeşil görüntü oluşturmuştur. Görüntüler değerlendirildiğinde fluoresan işaretli nanokonjugatın hücre sitoplazmasında bulunduğu tespit edilmiştir.

U87-MG ve C8-D1A hücrelerinde nanokonjugatların apoptotik etkisi incelenmiş ve herhangi bir apoptotik etkinin olmadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar BNNT'lerin biyouyumlu olduğunu göstermektedir. PAMAM'ın BNNT'lerin çözünürlüğünü ve biyoafinitesini artırıcı etkisi olmuştur. PAMAM ile modifikasyon yapmak sinerjistik etki kazandırmıştır. PAMAM'ın hücre üzerindeki toksik etkisini azaltırken BNNT'lerin çözünürlüğünü ve hücre afinitesini arttırmıştır. Ayrıca L-Phe ile konjugasyon hücre afinitesinde olumlu bir etki sağlamış, U87-MG hücrelerine daha seçici hale getirmiştir. Radyoiyotinasyon da iyi bir taşıyıcı motif sağlamıştır.

Anahtar sözcükler: Bor Nitrür Nanotüp, Kimyasal Buhar Depozisyon Yöntemi, Glioblastom Multiform Hücreler, Bor Nötron Yakalama Terapi Ajanı, Radyoiyotinasyon, ^{131}I , ^{125}I .

ABSTRACT**THE SYNTHESIS AND DEVELOPMENT OF
NANOBIOPARTICLES *IN VITRO* APPLICATIONS WITH HUMAN
CANCER CELL FOR BORON NEUTRON CAPTURE THERAPY**

KOZGUŞ GÜLDÜ, Özge

PhD. in Nuclear Science Department

Supervisor: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Co Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

September 2016, 153 pages

In this thesis project, it is aimed to develop a boron neutron capture therapy (BNCT) agent, boron nitride nanotube basis nanobioconjugate which has high sensitivity and specificity to glioblastoma multiforme cells for monitoring them. The affinity of the synthesized agent to glioblastoma cells was examined *in vitro*. The obtained results were compared with the 4-borono-L-phenylalanine, which is used as BNCT agent in human.

BNNTs were synthesized via chemical vapor deposition (CVD) method with the catalysis of lithium in NH_3 atmosphere. The synthesized BNNTs were modified with PAMAM for increasing the solubility. L-Phe was conjugated by EDC-NHS chemistry. The conjugation yield was determined with HPLC. The optimization and characterization of obtained BNNT/PAMAM/L-Phe were carried out with XRD, SEM, EDX, TEM and FTIR. The nanoconjugates were radioiodinated with $^{125/131}\text{I}$ via iodogen method. The quality control of radioiodination was carried out with TLRC and HPLRC. Furthermore the lipophilicity and paper electrophoresis of radioiodinated samples were performed. The stability tests of radioiodinated samples were carried out at room temperature and the results showed that they were stable in 24 hours. In order to evaluate the cytotoxic effects of the nanoconjugates different concentrations and time were investigated. Whether the cytotoxicity of iodine, which participated in the structure, or not. The incorporation of radioiodinated BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], L-BPA and L-Phe with $^{125/131}\text{I}$ were examined by the time dependent on U87-MG and C8-D1A cells.

The fluorescent cell imaging studies were performed with nanoconjugates after FITC conjugation. In the imaging study the cell nucleus was stained blue with DAPI and fluorescent labeled samples were demonstrated green image. While the images were evaluated the fluorescent nanoconjugates were migrated to the cytoplasm.

The apoptotic effects of nanoconjugates were examined in U87-MG and C8-D1A cells. It was detected that there was no apoptotic effect.

The obtained results were showed that the BNNT was biocompatible. PAMAM increased the solubility and bioaffinity of BNNTs. The modification of PAMAM was supplied synergistic effect to the BNNTs. While PAMAM was reducing the cytotoxic effects on cells, at the same time increase the solubility and cell affinity of BNNTs. In addition, the conjugation of L-Phe also have a positive effect, it has become more selective in U87-MG cells. Radioiodination has provided good carrier motifs.

Keywords: Boron Nitride Nanotube, Chemical Vapor Deposition Method, Glioblastom Multiforme Cells, Boron Nötron Capture Therapy Agent, Radioiodination, ^{131}I , ^{125}I .

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca yılların bilgi birikimi ve deneyimlerini hem akademik ilerleyişimde hem de hayata dair bana her konuda model olurken, benimle özveri ve yüksek maneviyat ile hiçbir fedakarlıktan kaçınmadan gerektiğinde mesai saatleri dışında da değerli zamanını ayıran sevgili ve çok kıymetli Tez Danışmanım Sayın Prof. Dr. **Perihan Ünak**'a, doktora başlama ilhamını aldığım, akademik ilerleyişime her zaman ışık tutan hem akademik hem manevi olan çok kıymetli ve sevgili ikinci danışmanım Sayın Prof. Dr. **Suna Timur**'a, tez yürütülmesi aşamasında altı aylık tez izlemelerde benimle değerli görüşlerini paylaşan tez izleme komitemdeki hocalarım Sayın Prof. Dr. **Serap Teksöz** ve Sayın Prof. Dr. **Serdar Özçelik**'e, akademik tecrübe ve başarılarını benimle içtenlikle paylaşan, her konuda yardım ve emeklerini esirgemeyen, her alanda manevi danışmanlarım Sayın Doç. Dr. **E. İlker Medine** ve Sayın Doç. Dr. **Dilek Odacı Demirkol**'a, sentez aşamasında ekipman ve bilgi desteklerini paylaşan Sayın Doç. Dr. **Arzu Türkler Ege** ve Sayın Doç. Dr. **Mehmet Ayvacıklı**'ya, analizlerde destek olan Sayın Dr. **Hasan Demiroğlu**'na, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi'ne, *in vitro* çalışmalarında bilgi birikimlerini keyifle paylaşan, birlikte çalışmakla gurur duyduğum Sayın Prof. Dr. **Serhan Sakarya**'ya ve *in vitro* çalışmalarında destek olan Sayın Prof. Dr. **Oğuzhan Doğanlar**'a, Enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanı sağlayan Nükleer Bilimler Enstitü Müdürü Sayın Prof. Dr. **Turgay Karalı**'ya, akademik ilerleyişim sırasında her zaman destek olan, yolumu ve günümü aydınlatan Nükleer Bilimler Enstitü Müdür Yardımcısı Sayın Prof. Dr. **F. Zümrüt Biber Müftüler**'e, çalışmalarım sırasında bana teknik olarak yardımcı olan, her sorunumla özveri ile ilgilenen profesyonelliği, dostluğu ve güveni için Sayın Öğr. Gör. **Ayfer Yurt Kılçar**'a, ekip ruhunu hissettiren her an yanımda olan bana inanan Sayın Doç. Dr. **Çiğdem İçhedef**'e, deneyimlerini sabırla paylaşan çok değerli vaktini çekinmeden ayıran Sayın Doç. Dr. **Kübra Durkan**'a, deneysel çalışmalarda özellikle inkorporasyon çalışmalarında emek veren, kendi çalışmalarına rağmen her an yardımcı olan doktora öğrencileri Sayın **Volkan Tekin**'e ve Sayın **Gökhan Takan**'a, doktora sürecimizin ilk gününden son anına kadar her aşamada bir çok paylaşımda bulunduğum kadim dostum Sayın **Eser Uçar**'a, Nükleer Bilimler Enstitüsü ve Biyokimya Bölümündeki değerli Hocalarım ve Arkadaşlarıma bu süreçte yanımda oldukları için çok teşekkür ederim. Ayrıca 2015 NBE 002 no'lu BAP ile maddi desteklerinden ötürü **Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Şube Müdürlüğü**'ne teşekkür ederim.

Tez sürecimde teknik, teşvik ve manevi desteklerini esirgemeyen, gönüllü araştırmacılardan eşim **Ersan Güldü**'ye, sabır, anlayış, heyecan ve özverileri için sevgili ve çok değerli annem **Nazik Kozguş**'a, övgüleri, motivasyonu, neşesi ve fedakarlıkları için sevgili ve çok değerli babam **Ali Osman Kozguş**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Özge KOZGUŞ GÜLDÜ



İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxvii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser	5
2.1.1. Beyin tümörleri	6
2.1.2. Bor nötron yakalama tedavisi.....	8
2.1.3. Bor nötron yakalama tedavi ajanları	11
2.1.4. 4-Boron-L-fenilalanin (L-BPA).....	11
2.1.5. L-Fenilalanin (L-Phe)	12
2.2. Bor Nitrür Nanotüpler	13
2.3. Poliamido Amid Dendrimerler	13
2.4. Radyoiyotinasyon.....	15

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.4.1. Radyoizotopiyasyon yöntemleri	17
2.4.2. I-131.....	20
2.4.3. I-125.....	22
2.5. Radyoizotoplu Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri.....	24
2.5.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)	25
2.5.2. Kağıt elektroforezi	27
2.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC).....	27
2.5.4. Lipofilite	33
2.5.5. Kan Beyin Bariyeri (KBB).....	34
2.6. Sentezlenen Bor Nitrür Nanotüplerin Özelliklerinin İncelenmesi Kullanılan Yöntemler.....	39
2.6.1. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX)	39
2.6.2. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)	40
2.6.3. X-Işınları kırınımı (XRD).....	40
2.6.4. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)	41

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.	MATERYAL METOD	43
3.1.	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	43
3.1.1.	Kullanılan kimyasallar	43
3.1.2.	Kullanılan cihazlar	46
3.2.	Bor Nitrür Nanotüp Sentezi ve Modifikasyonları.....	49
3.2.1.	Bor nitrür nanotüp sentezi.....	49
3.2.2.	Bor nitrür nanotüp sentezi optimizasyonu	50
3.2.3.	Sentezlenen Bor Nitrür Nanotüplerin PAMAM [G-4] / [G-2] ile Konjugasyonu.....	51
3.2.4.	PAMAM ile modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe kojugasyonu	51
3.3.	Sentez ve Konjugasyon Ürünlerinin Karakterizasyonu.....	53
3.3.1.	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)	53
3.3.2.	X-Işını kırınımı (XRD).....	53
3.3.3.	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)	53
3.3.4.	Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	54
3.3.5.	Zeta potansiyel analizi.....	54
3.4.	BNNT'lerin ^{131/125/127} I ile İşaretlenmesi	54

3.4.1. Kalite kontrol çalışmaları.....	55
3.5. <i>İn Vitro</i> uygulamalar	58
3.5.1. U87-MG ve C8-D1A Hücre dizinleri.....	58
3.5.2. Sitotoksisite çalışması.....	58
3.5.3. Hücrelerde bağlanma verimi çalışması.....	59
3.5.4. Zamana bağlı bağlanma verimi çalışması.....	60
3.5.5. Spesifik aktiviteye bağlı bağlanma verimi çalışması.....	61
3.5.6. Floresan görüntüleme çalışması.....	61
3.5.7. Apoptoz çalışması.....	61
3.6. İstatistik Analizleri.....	63
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	65
4.1. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi ve Modifikasyonları	65
4.1.1. Bor Nitrür Nanotüp sentezi.....	65
4.1.2. Bor Nitrür Nanotüp sentezi optimizasyonu.....	68

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

4.1.3. Sentezlenen Bor Nitrür Nanotüplerin PAMAM [G-4] / [G-2] ile konjugasyonu	81
4.1.4. PAMAM ile Modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe konjugasyonu	85
4.1.5. Zeta potansiyel analizi.....	91
4.2. BNNT'lerin ^{131/125/127} I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü	92
4.2.1. İnce Tabaka Kromatografi yöntemi ile radyoizotop kalite kontrolü.....	92
4.2.2. Elektroforez yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	103
4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC) yöntemi ile kalite kontrolü	104
4.2.4. ¹³¹ I İşaretli BNNT'lerin lipofilite tayini	105
4.2.5. ¹³¹ I İşaretli BNNT'lerin stabilite tayini	106
4.3. <i>İn Vitro</i> Uygulamalar	109
4.3.1. U87-MG ve C8-D1A hücrelerin dizini.....	109
4.3.2. Sitotoksite çalışması.....	110
4.3.3. Hücrelerde bağlanma verimi çalışması	116
4.3.4. Zamana bağlı bağlanma verimi sonuçları.....	117
4.3.5. Spesifik aktivite bağımlı bağlanma verimi sonuçları.....	123

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3.6. Floresan görüntüleme çalışması	125
4.3.7. Apoptoz Çalışması	128
5. SONUÇ.....	135
KAYNAKLAR DİZİNİ	141
ÖZGEÇMİŞ	153

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Sağlıklı ve Kansersiz Hücreler.....	5
2.2 Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kanser Daire Başkanlığı, Türkiye Kanser İnsidansları Verileri.....	8
2.3 BNCT ajanları; 1. 4-dihidroksiborilfenilalanin (BPA), 2. Sodyum merkaptodekahidrododekaborat, $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, BSH, 3. Sodium salt of closo- $\text{B}_{10}\text{H}_{10}$, 4. beta-5-o-carbonyl-2'-deoxyuridine, 6. atrimethoxyindole, 7. Porfirin türevi, 8. Maltoz türevi, 9. Bifosfonat, 10. Dequalinium.....	11
2.4 L-BPA'nın yapı formülü.....	12
2.5 L- Phe'nin yapı formülü.....	13
2.6 İodojen molekül yapısı.....	20
2.7 ^{131}I 'un bozunum şeması.....	21
2.8 ^{125}I bozunum şeması.....	23
2.9 İnce Tabaka Kromatografisi ve R_f değerinin hesaplanması.....	26
2.10 HPLC sistemi şeması.....	33
2.11 log P (okt) değerlerine göre beyne ekstraksiyon (geçiş) yüzdesi	34
2.12 KBB modeli.....	36
2.13 SEM bileşenleri.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.14 XRD çalışma prensibi ve bileşenleri.....	40
2.15 FTIR çalışma prensibi.....	41
3.1 BNNT sentez düzeneği.....	50
3.2 Reaksiyon kabının senteze etkisinin incelenmesi.....	50
3.3. a) BNNT/PAMAM[G-2] kolloid ve b) BNNT çökelek görüntüleri.....	51
3.4 L-Phe konjuge PAMAM modifiye BNNT'lerin tasarımı modeli.....	52
3.5 Bağlanma verimi çalışması için Radyoaktif örneklerin U87-MG ve C8-D1A hücrelerine uygulanması.....	60
3.6 Floresan Mikroskop.....	62
3.7 Apoptoz çalışması a) U87-MG b) C8-D1A hücrelerine uygulanan örneklerin chamber slide görüntüsü.....	63
4.1 BNNT'lerin sentez reaksiyonu.....	65
4.2 BNNT a) üst tabaka b) alt tabaka ve c) Referans BNNT XRD modeli.....	66
4.3 BNNT FTIR Spektrumu.....	67
4.4 Alümina dik krozede 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	69
4.5 Alümina dik krozede 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 Alümina dik krozedde 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	71
4.7 Alümina dik krozedde 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	72
4.8 Alümina kayık krozedde 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	74
4.9 Alümina kayık krozedde 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka.....	75
4.10 Alümina kayık krozedde 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüsü.....	76
4.11 Alümina kayık krozedde 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları.....	77
4.12 BNNT'lerin TEM görüntüsü.....	80
4.13 Poli amido amid dendrimerler.....	81
4.14 BNNT/PAMAM[G-4] SEM görüntüsü.....	82
4.15 BNNT/PAMAM[G-4] SEM-EDX sonuçları.....	83
4.16 BNNT/PAMAM [G-2] SEM görüntüsü.....	84
4.17 BNNT/PAMAM[G-2] SEM-EDX sonuçları.....	85
4.18 BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe nanokonjugatının SEM görüntüsü.....	86
4.19 BNNT/PAMAM[G-4] SEM-EDX sonuçları.....	87

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.20 BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe nanokonjugatının SEM görüntüsü.....	88
4.21 BNNT/PAMAM[G-2] SEM-EDX sonuçları.....	89
4.22 L-Phe HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	90
4.23 L-Phe HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi.....	91
4.24 Optimum koşullarda gerçekleştirilen TLRC kromatogramları.....	96
4.25 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları.....	97
4.26 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları.....	99
4.27 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen farklı aktivite miktarlarında ^{125}I ile işaretli örneklerin TLRC kalite kontrol kromatogramları.....	100
4.28 ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve ^{127}I TLC R_f sonuçları.....	101
4.29 Görüntüleme Sistemlerinde gereken kontrast ajan konsantrasyonlar.....	102
4.30 $^{131}\text{I}^-$, $^{131}\text{I}^+$, ^{131}I /L-BPA ve ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe örneklerinin aktivite dedektörü ile elde edilen kromatogramları.....	105
4.31 a) ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2], b) ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, c) ^{131}I /L-Phe ve d) ^{131}I /L-BPA'nın 0, 1, 2, 4, 8 ve 24 saatteki stabilite grafikleri	108
4.32 U87-MG hücrelerinin a) <i>in vitro</i> görüntüsü b) literatür görüntüsü.....	109

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.33 C8-D1A hücrelerinin a) <i>in vitro</i> görüntüsü b) literatür görüntüsü.....	110
4.34 BNNT/PAMAM[G-4] ve BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe'nin 24 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksisite grafikleri.....	111
4.35 BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe örneğinin 1, 2 ve 24 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksisite grafiği.....	112
4.36 BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA'nın U87-MG hücre hattındaki sitotoksisite grafikleri.....	113
4.37 ^{127}I işaretli örneklerin 24 ve 48 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksisite grafikleri i.....	115
4.38 ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-Phe ve ^{127}I /L-BPA'nın C8-D1A hücre hattındaki sitotoksisite grafikleri.....	116
4.39 ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{131}I /L-Phe, ^{131}I /L-BPA ve ^{131}I için 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ilişkin grafikler.....	118
4.40 ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{125}I /L-Phe, ^{125}I /L-BPA ve ^{125}I için 1, 2, 4, 8 ve 24. saatlerde a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ilişkin grafikler.....	120
4.41 a) ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2] ve ^{131}I /L-BPA ve b) ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2] ve ^{125}I /L-BPA örneklerinin U87-MG hücrelerindeki % bağlanma veriminin C8-D1A hücrelerinkine oranı.....	122

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Sekil

Sayfa

- 4.42** 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I ile işaretlenen ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve ^{125}I için 2 saatte a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ilişkin grafikler.....124
- 4.43** BNNT/PAMAM [G-2]/FITC, BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe/FITC, L-Phe/FITC ve L-BPA/FITC için a) U87-MG, b) C8-D1A hücre hattındaki DAPI ve FITC boyalı fluoresan mikroskopi görüntüleri.....127
- 4.44** BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve L-BPA için 24 saatlik U87-MG hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.....129
- 4.45** BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve L-BPA için 24 saatlik C8-D1A hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.....130
- 4.46** ^{127}I /BNNT/ PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve Kontrol (DNaseI) için 24 saatlik C8-D1A hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.....132
- 4.47** ^{127}I /BNNT/ PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve Kontrol (DNaseI) için 24 saatlik C8-D1A hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.....133

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Beyin görüntüleme ajanları ve karakteristikleri.....	37
4.1 BNNT'lerin çeşitli sentez metotları ve SEM görüntüleri.....	78
4.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Koşulları.....	90
4.3 BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], L-BPA ve L-Phe örneklerinin zeta potansiyel sonuçları.....	91
4.4 Banyo çözeltisi optimizasyonuna ilişkin farklı çözeltiler kullanılarak karakterizasyonu yapılan örneklerin işaretlenme verimi ve R_f değerleri.....	95
4.5 ^{131}I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.....	103
4.6 Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC) Koşulları.....	104
4.7 Radyoiyotlu bileşiklerin deneysel ve teorik lipofilite değerleri (n=3).....	106



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler****Açıklama**

sccm

standart santi metre küp

Ex

Eksitasyon

Em

Emisyon



Kısaltmalar**Açıklama**

BNNT	Bor Nitrür Nanotüp
BNCT	Bor Nötron Yakalama Tedavisi
CVD.	Chemical Vapor Deposition, Kimyasal Buhar Depozisyon
L-BPA	4-Boron-L-fenilalanin
L-Phe	L-Fenilalanin
PAMAM	Poli Amido Amid Dendrimer
XRD	X-Işını Kırınımı
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
EDX	Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopi
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi
R_f	Alıkonma mesafesi
R_t	Alıkonma zamanı
^{131}I	İyot-131
^{125}I	İyot-125
KBB	Kan Beyin Bariyeri

Kısaltmalar**Açıklama**

MR	Manyetik Rezonans
BT/CT	Bilgisayarlı Tomografi
LET	Lineer Enerji Transferi
SPECT	Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi
LINAC	Lineer Nötron Hızlandırıcısı
EDC	1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochlorid
NHS	N-hidroksisüksinimid
BMEH	Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri
U87-MG	İnsan beyin glioblastoma-astrocit hücreleri
C8-D1A	Fare beyin astrocit hücreleri
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
WST-8	Hücre canlılık testi
RİPA	Deterjan çözeltisi
FBS	Fetal bovin serum
BCA	Bikinkoninik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit

1. GİRİŞ

Bu tez çalışmasının amacı tümör hedefli Bor Nitrür Nanotüplerin (BNNT) yeni Bor Nötron Yakalama Tedavisi (BNCT) ajanları olarak sentezlenmesidir. Biyouyumluluğu arttırmak için bor nitrür nanotüpler PAMAM dendrimeri ile modifiye edilmiştir. Sentezlenen nanobiyokonjugatlar ^{131}I veya ^{125}I ile radyoişaretlenerek BNCT de kullanılabilecek teranostik ajan haline getirilmeye çalışılmıştır. Bu şekilde orijinal, basit termal substitüsyon yöntemleri ile oluşturulabilecek çözünürlüğü ve biyouyumluluğu mükemmel bor nitrür esaslı nanotüplere dayalı yeni BNCT ajanları geliştirilmeye çalışılmış ve *in vitro* olarak glioblastoma kanser hücreleri üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

BNCT ölümcül tümörlerin tedavisinde erken mortaliteyi önlemede başarılı bir yöntemdir. Bu tedavinin hedefi; Bor'un ilaç formununun intravenöz olarak uygulanarak tümör hedefli ajanlarla tümörlü dokuya ulaşması sağlandıktan sonra nötron bombardımanı yapılmasıdır. Bu yolla tümör hücrelerinin içindeki veya bitişiğindeki ^{10}B , nötron kaynağından gelen nötronları yakaladıktan sonra parçalanmakta ve açığa çıkan yüksek enerjili, yüklü $^7\text{Li}^{3+}$ ve $^4\text{He}^{2+}$ parçacıkları sadece tümör hücrelerine hasar vermektedir. Etraftaki normal hücreler zarar görmemektedir. Tümör hücresinin bor bileşiğini seçici olarak normal hücreden daha yüksek oranda tutması BNCT'nin klinik uygulamalarının başarılı olmasında büyük önem taşır. İlaçların beyne girişi için Kan Beyin Bariyerini geçmeleri gerektiği için beyin tümörlerindeki tutulumun artması da ancak Kan Beyin Bariyerini aşabilen moleküller için geçerlidir. Bu nedenle BNCT'nin glioblastoma hücrelerinde başarılı olabilmesi Kan Beyin Bariyerini aşabilen bor içeren moleküllerin beyin tümörlerinde seçici olarak afinite gösterebilmesi ile mümkün olabilir.

BNCT özellikle yüksek derecede malignant olan tümörlerin tedavisinde erken mortaliteyi önlemede başarılı bir yöntemdir. Bu tedavinin hedefi bor'un ilaç formunun intravenöz olarak tümör arayıcı ajanlarla tümörlü dokuya ulaşması sağlandıktan sonra nötron bombardımanı yapılmasıdır. Bu yolla tümör hücrelerinin içindeki veya hemen bitişiğindeki B-10, nötron kaynağından gelen nötronları yakaladıktan sonra parçalanmakta ve açığa çıkan yüksek enerjili ^7Li ve ^4He parçacıkları sadece tümör hücrelerine zarar vermektedir. Etraftaki normal hücreler zarar görmemektedir. Tümör hücresinin bor bileşiğini seçici olarak normal hücreden daha yüksek oranda tutması BNCT'nin klinik uygulamalarının başarılı olmasında büyük önem taşır. İlaçların beyne girişi için Kan Beyin

Bariyerini geçmeleri gerektiği için beyin tümörlerindeki tutulumun artması da ancak Kan Beyin Bariyerini aşabilen moleküller için geçerlidir. Bu nedenle BNCT nin beyin tümörlerinde başarılı olabilmesi Kan Beyin Bariyerini aşabilen bor içeren moleküllerin beyin tümörlerinde seçici olarak afinite gösterebilmesi ile mümkün olabilir.

BNCT ile ölümcül tümörler tedavi edilebilmekte veya hastanın ömrü uzatılabilmektedir. Bu tedavinin uygulanabilmesi için ^{10}B içeren ajanlar gerekmektedir.

İdeal bir BNCT ajanının beklenen özellikleri:

- Hücrel membranlar boyunca taşınabilir olması,
- Tümör hücrelerindeki birikimin seçiciliği,
- Kan Beyin Bariyeri (KBB) boyunca taşınabilir olması,
- Nükleustaki birikim,
- Yüksek tümör kan ve tümör normal doku oranı,
- Yüksek Bor içeriği,
- Düşük toksisite,
- Katabolizmaya direnç göstermesi.

Dendrimerler farklı nanoparçacıkları stabilize etme ve fonksiyonel olarak kanseri hedeflemek veya görüntülemek için yeni ajanlar geliştirme amacı ile kullanılmışlardır (Liu et al., 2013). BT de kontrast ajan olarak kullanılabilmelerini sağlamak amacıyla Au, Gd nanoparçacıkların iyotlu türevleri hazırlanmış ve dendrimer ile bu nanoparçacıkların birleştirilmesi daha uygun sürelerde görüntüleme sağlanmıştır. İyot ve Gd bu amaçla lipozomlar ile birleştirilerek MR görüntüleme ve BT’de potansiyelleri araştırılmıştır (Zheng et al., 2007). Miyata ve grubu ise liposomları sodyum borokaptat ve iyotlu kontrast ajan ile birlikte kapsüle ederek boron nötron yakalama terapisi ve BT görüntülemeye birlikte kullanılabilecek bir teranostik ajan haline getirmeye çalışmışlardır. Lipozomlar ise

glioma gibi bazı kanserlerde zengin olduğu bilinen transferin reseptörlerine hedeflenmek için kullanılmışlardır. Bu şekilde lipozom ile hedeflendiğinde gliomalı fare beyinde 82,2 µg B/g bulunurken lipozom ile hedeflenmeyen farelerde 22,5 µg B/g göre daha yüksek bir miktar bulunmuştur. İyot ile BT de kontrast sağlama lipozom dağılımını daha iyi görmeyi ve dolayısıyla nötron yakalama tedavi planlamasını daha sağlıklı yapmayı mümkün kılmaktadır (Miyata et al., 2011).

Dallanmış polimer moleküller olarak dendrimerler çeşitli kontrast ajanların biyouyumluluğunu arttırmak ve özelliklerini iyileştirmek için kullanılmıştır. En çok kullanılan dendrimerlerden biri olan PAMAM çoklu amin grupları içerir. Bu durum modifikasyonu ve çok fonksiyonlu yapı elde etmeyi kolaylaştırır. İlk olarak iyot içeren dendrimerlerin BT kontrast ajanı olarak kullanılabilirliğini önermişlerdir (Yordanov et al., 2002). Triiodobenzenepropanoic acid türevini bir PAMAM dendrimeri ile reaksiyona sokmuşlar ve kütlece % 33 iyot içeren bir ajan elde etmişlerdir. Elde ettikleri molekül BT de yeterince kontrast göstermiştir (Yordanov et al., 2005). Fu et al. PEG ile modifiye edilmiş dendrimerleri klinik olarak onaylı bir BT kontrast ajanı olan iobitridol ile birleştirmişlerdir (Fu et al., 2006). Tavşanda yaptıkları görüntüleme çalışmasında enjeksiyondan sonra iki dakika içinde iyi bir damar kontrastı görmüşlerdir. Küçük moleküllerden daha iyi olmasına rağmen sadece 32 dakikalık bir kontrast süresi elde etmişlerdir. Dendrimerlerin diğer bir ilgi çekici özelliği kontrast artırıcı grupların kolayca yapıya sokulabilmesidir. Örneğin Guo ve grubu altın nanoparçacıkları dendrimerler ile birleştirdikten sonra diatrizoic asit ile reaksiyona sokmuşlardır. Bu çift işaretleme yapıya kontrast artırıcı sinerjik etki sağlamıştır (Guo et al., 2011). Dendrimerlere dual mod görüntüleme özelliği kazandırmak için Criscione et al. Hem triiodobenzoic acid ve hem de ^{99m}Tc'ü kullanarak hem SPECT (single photon emission tomography) ve hem de BT'de görüntüleme özelliği kazandırmışlardır (Criscione et al., 2011).

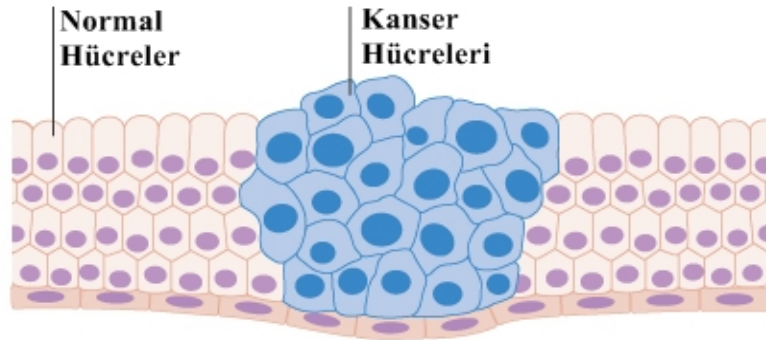
Bu çalışmada ise BN nanotüpler PAMAM ile modifiye edilmiş, PHA ile konjuge edilmiş, ^{125/131}I ile radyoizotoplanmış ve hem BNCT, hem de SPECT de kullanılabilecek teranostik bir yapı elde etmek amaçlanmıştır. ¹³¹I'in hem terapi hem görüntüleme radyonüklidi olması ve uzun yarıömrü terapiyi izleme ve tedaviye ilave terapi dozu sağlayacaktır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Vücudu oluşturan hücreler biraraya gelerek dokuları, dokular bir araya gelerek organları oluşturmaktadır. Organ ve dokular oluşurken hücreler belirli bir düzen içinde, belirli iş bölümleri yaparak bir araya gelirler. Organizmanın temel birimi olan bu hücreler belirli bir hızda ve kontrol altında çoğalırlar. Öte yandan yaşlanan hücrelerde belirli bir hızda yıkılmaktadırlar. Kanser en kısa tanımı ile hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmaları demektir. Bu çoğalma sırasında kanser hücrelerinde, normal hücrelere göre yapısal farklılıklar çıktığı gibi, işlevleri açısından da farklılıklar çıkacaktır; bazen hücre normalde yaptığı işlevlerini yapmazken, bazen de normalde olmayan bazı yeni işlevleri de yapmaya başlayabilecektir. Anormal şekilde çoğalmaya başlayan bu hücreler bulundukları yerdeki doku ve organları işgal edecek hatta daha uzaktaki organları işgal edecek ve işgal ettiği bu bölümlerin görevlerini engelleyecektir. Hücre kontrolünün bozulup bir hastalık olarak kanser tablosu çıkıncaya kadar geçen kanser oluşum süresi, kanser cinslerine göre değişkenlik göstermekle birlikte ortalama 15-20 yıldır. Sebebi iyi bilinmeyen bu hastalıkların oluş mekanizması da tam olarak bilinmemektedir. Ancak bu konuda son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmektedir. Kanserler köken aldıkları doku ve organlara göre isimlendirilirler. Belirti, bulgu ve tedavileri de kanserin cinsine göre değişmektedir (Kutluk ve Kars, 2001).



Şekil 2.1 Sağlıklı ve Kanserli Hücreler(<http://www.cancerresearchuk.org/>).

Kanserin nedenleri; iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, hava kirliliği, kimyasal karsinojenler, beslenme faktörleri, sigara, alkol, virüsler ve genetik faktörler oluşturmaktadır (Kutluk ve Kars, 2001).

2.1.1. Beyin Tümörleri

Kafa içinde yer alan tümörler, beyin tümörleri ve diğer organ tümörlerinin beyin ve beyin zarlarına yayılmaları yani metastazlar olarak ikiye ayrılırlar. Metastatik tümörler en sık akciğer, malin melanom, meme kanserlerinin seyrinde olur ve erişkinlerde sıktır. Birinci tümörler tek kitle olarak kendini gösterirken metastatik olanlar sıklıkla birden fazla kitle oluştururlar. Erkek-kadın oranı 3/2'dir. Beyin tümörlerinin en sık görüldüğü iki yaş grubu, 5-10 ve 50-55 yaşlar olarak tanımlanmıştır. Çocukluk çağında en sık görülen tümörlerdir. Nedenleri 1. Çevresel karsinojenlerin sinir sistemi tümörleri oluşturduğuna ait kanıt yoktur. Radyasyonla karşılaşmanın ve plastik sanayisinde çalışmanın risk faktörü olabileceği ileri sürülmektedir. 2. Bazı kalıtsal hastalıkların seyrinde sinir sistemi tümörleri sıklığında artış görülebilir (Nörofibromatozis, tuberoskleroz, Turcot sendromu), 3. Bağışıklık sistemi baskılanması, transplantasyon (özellikle kalp nakli) yapılan kişilerde ve AIDS'de özellikle beyin birincil lenfomaları riski artmaktadır. Sinir sisteminde tümörlerin %90'ı kafa içinde, %10'u omurilik kanalında yerleşir. Çocuklarda tümörlerin %70'i beyin yarı kürelerinde yerleşir (<http://braintumor.org/brain-tumor-information/understanding-brain-tumors/tumor-types/>; Kutluk ve Kars, 2001). Beyin tümörlerinin seyri yerleştiği bölgeye, büyüme hızlarına, tümör hücrelerinin tipine bağlıdır. Beyni çevreleyen kafatası esneme özelliği olmayan bir yapı olduğundan iyi huylu tümörler bile kafa içi basıncını artırarak ve yaşamsal oluşumlara bası ile yaşamı tehdit ederler. Ölüm nedeni sıklıkta beyin fonksiyonlarının durması ve solunum felcidir. Hızlı büyüyen tümörler kritik çapa daha kısa zamanda ulaşarak, beyin dokusunda sıvı toplanması ve kafa içi basıncın artmasına yol açarlar. Bu durumda başlıca belirtiler kan basıncı yükselmesi, baş ağrısı, bulantı-kusmadır. Yavaş büyüyen tümörler daha sınırlı belirtiler, sıklığı ve şiddeti giderek artan sara nöbetleri yaparlar. Beyin tümörleri çoğunlukla yerel büyüme gösterir, medulloblastomlar beyin-omurilik sıvısı yoluyla gene sinir sistemine sınırlı yayılma yapabilirler. Sinir sistemi dışına yayılım yok denecek kadar azdır. Belirtiler baş ağrısı hızlı büyüyen tümörlerde olur. Yirmi yaşının üzerinde kişilerde gelişen sara nöbetlerinin beşte biri tümöre bağlıdır. Bayılma, baş dönmesi, geçici görme kaybı, uzun süren kafa içi basıncı artması uyku hali ve entellektüel fonksiyon kaybına yol açar. Beyin glial tümörleri duyu, hareket ve kişilik bozukluğuna, beyincik tümörleri denge kaybına yol açabilir. Beyin zarlarının kanser hücreleri ile tutulumu ise baş ağrısı, uyku hali, bilinç kaybına neden olabilir. Omurilik tümörleri, barsak ve idrar torbası kontrolü kaybı, uyluk, bacak ve dış üreme organlarında duyu ve hareket bozukluğu yapabilir. Açıklanamayan baş ağrısı, sara nöbetleri, denge, kişilik ve hareket

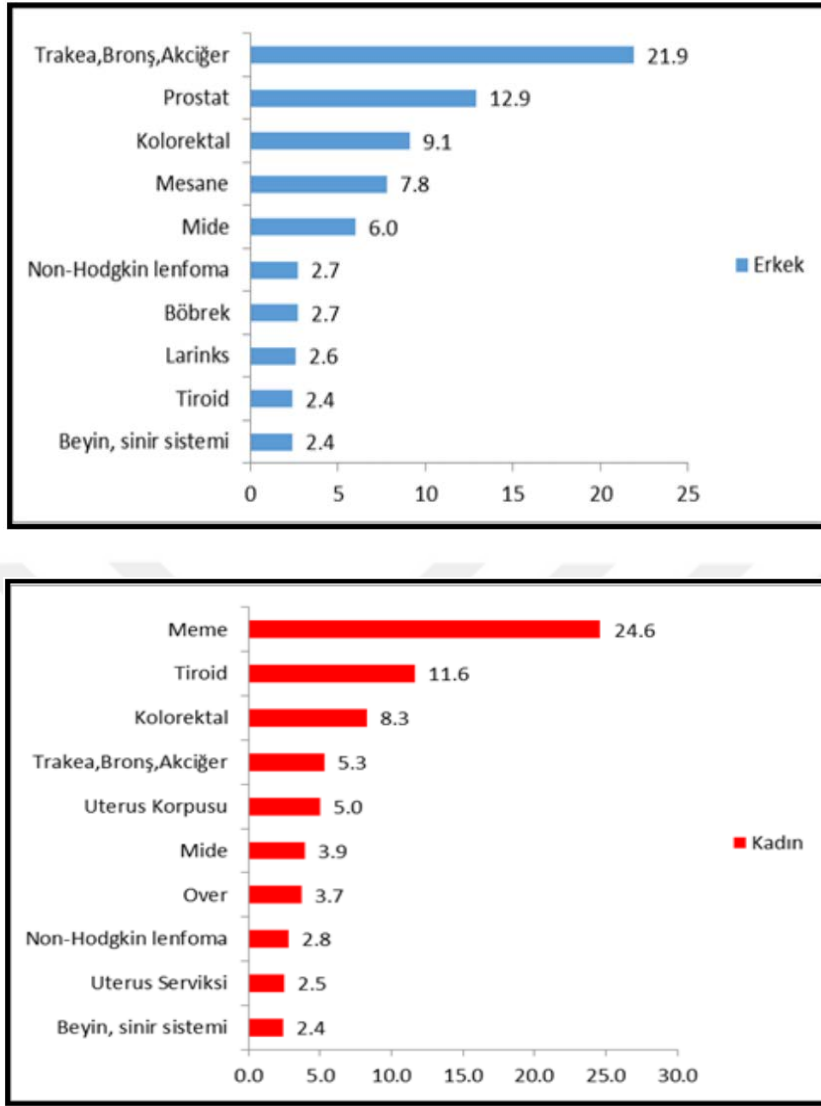
bozukluğu, fışkırır tarzda ve öğürtüsüz kusması olan kişilere bilgisayarlı tomografi yapılarak tanı konabilir. Kafa içinde yer tutan bir kitle öncelikle beynin birinci ve ikinci (metastatik) tümörlerinin ayrımını gerektirir. Başka bir organın tümörünün beyne yayılması sonucu gelişen kitleler çoğunlukla birden fazladır (<http://braintumor.org/brain-tumor-information/understanding-brain-tumors/tumor-types/>; Kutluk ve Kars, 2001). Tedavi yaklaşımı bu iki türde benzerlik gösterir. Tek tümör varsa kitlenin çıkarılması gerekir. Beynin kendi tümörleri çoğunlukla tektir. Beyin dokusunun özelliği nedeniyle tümör geniş emniyet sınırı ile çıkarılamaz. Bu nedenle radyoterapi tedaviye eklenmelidir. Yüksek dereceli, hızlı büyüyen tümörlerde kemoterapi uygulanır. Birincil tümörlerde yaşam, tümörün cinsine, büyüme hızına bağlıdır. Yavaş büyüyen astrositomlarda 5 yıllık yaşam %60 iken, hızlı büyüyen glioblastomlar nadirdir. İkincil tümörler çok kez olduğu gibi birden fazla sayıda ise cerrahi yaklaşımın yeri yoktur. Radyoterapi ve kemoterapi uygulanır. Bu tümörlerde asıl tümörün de tedavisi gereklidir. Prognoz tümörün cinsine ve yayılımına göre değişmekle birlikte beyne yayılmış bir tümör oldukça kısıtlı bir yaşam süresi anlamına gelir.

Beyin tümörlerinin çeşitleri aşağıdaki gibidir;

Akustik nöroma, Astrositoma, Kordoma, CNS lenfoma, Kranyofaranjioma, diğer gliomalar, Medullablastoma, Menenjioma, Metastatik Beyin Tümörleri, Oligodendroglioma, Hipofiz Tümörleri, Birincil Nöroektodermal (PNET) ve Beyin ile ilişkili durumlardır.

Astrositler kendi içlerinde 4 derecede sınıflandırılırlar; Piloitik astrositoma, Düşük dereceli astrositoma, Anaplastik astrositoma ve Glioblastoma'dır.

Dünya'da 100.000 kişiden 270'i kanserdir. Bunlardan Amarikada 650'si, Türkiye'de 400'ü kanserdir. Tüm yaş gruplarında kadın ve erkek için bazı kanser grupları ve yüzdesel dağılımları Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2 Sağlık Bakanlığı Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Kansere Daire Başkanlığı,
Türkiye Kansere İnsidansları Verileri

2.1.2. Bor Nötron Yakalama Tedavisi

Bor Nötron Yakalama Terapisi (BNCT) 1931’de Chadwick’in nötronları keşfinden yalnızca 5 yıl sonra Gordon Locher tarafından 1936 yılında önerilmiştir (Gordon 1936). Bor Nötron Yakalama Terapisinde yüksek LET (Lineer Enerji Transferi) değerli parçacıkların yüksek hasar verici etkisinden yararlanılır. Bunun için hedefe bor içeren moleküller enjekte edilir, daha sonra termal nötronlar ile ışınlanır. Bor atomları oldukça iyi bir tesir kesiti ile (^{10}B) nötron yakalar ve bu reaksiyondan yüksek LET değerli lityum iyonları ve alfa parçacıkları doğar. Bu parçacıklar seçici hücrel cerrahi de denilen hücrel düzeyde zor tedavi edilen

tümörlerde etkili olurken bor içermeyen sağlıklı dokuya hasar vermezler. Bor Nötron Yakalama Terapisi çok farklı disiplinlerden katkı gerektiren zor bir terapi şeklidir. Ancak Dünyadaki çeşitli merkezlerde insanda uygulamaları mevcuttur. Bu terapi şeklinin başarısı toksik olmayan ve kanser hücrelerinde seçici olarak birikebilen bor bileşiklerinin elde edilebilmesine bağlıdır. Şimdiki terapi şekillerinde kullanılan bor bileşikleri sınırlı düzeyde insan kanser hücrelerine seçicidir. Terapinin başarısını belirleyen diğer konular da reaktör ve siklotronların bu amaçla nötron kaynağı kullanılabilmesini sağlayacak şekilde geliştirilmeleri, klinikte kullanılabilecek yeterlilikte ilaç özelliği taşıyan bor içeren amino asitler, porfirinler, nukleositler, aminler, lipoproteinler ve lipozomlar gibi çeşitli bor moleküllerinin geliştirilmesi, bu moleküllerin klinik öncesi farmakokinetik çalışmaları, biyotağılım çalışmaları, radyasyon doz hesapları, hücresel düzeyde radyasyon biyoloji çalışmaları, küçük ve büyük hayvan modellerinde klinik öncesi çalışmalar, faz1 klinik çalışmaları gibi çalışmalarının yapılabilmesidir. Dünyada reaktör nötronları kullanılarak termal nötron yakalama terapisi İsveç (STUDSVIK), Fillandiya (ESPOO), Hollanda (HFR PETTEN), Amerika Birleşik Devletleri (Brookhaven (BNL, MIT), İtalya (TRIGA MARK II, TAPIRO) ve Japonya (JAERI,JRR4) gibi ülkelerde yapılabilmektedir.

Bor Nötron Yakalama Terapisi olarak tanımlanan tedavi şekli günümüzde, özellikle yüksek derecede malignant olduğu bilinen glioblastoma multiforme tip beyin tümörlerinde uygulanmaktadır. Bor kullanılarak yapılan bu tedavinin temel hedefi; Bor'un ilaç formu olan p-bronofenilalanin tümörlü dokuya verildikten sonra, nötron bombardımanı yapılmasıdır.

Bu tedavide radyoaktif olmayan bor bileşiği (^{10}B taşıyan) intravenöz olarak kana verilir ve hedef tümör hücreleri tarafından tercihli olarak hücre içine alınması sağlanır. Daha sonra tümör hücrelerinin içindeki veya hemen bitişiğindeki ^{10}B , nötron kaynağından gelen nötronları yakaladıktan sonra parçalanır ve yüklü parçacıklar ortaya çıkar.

BNCT'de kullanılan bor içeren bileşikler ise sodyum merkaptodekahidrododekaborat ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$, BSH) (Genadya ve Nakamura 2010), 4-dihidroksiborilfenilalanin (BPA) (Bortolussi et al., 2011), Gd içeren bor fenil alanine (GdBPA) (Corti et al., 2011), boronlu porfirin (BOPP) bileşikler ve türevleri (Shinji et al., 2011), B ve Gd içeren karbon nanoparçacıklardır (CNP), (Hwang et al., 2010). Gd nötron yakalama olasılığı çok yüksek olan bir metaldir, B ile birlikte kullanıldığında beta ve gama ışınları vererek bir nevi brakiterapi

kaynağı gibi etkinlik sağlar. Ayrıca MR görüntülemeye kontrast sağladığından ve gama ışınlaması yaptığından MR ve SPECT yöntemlerini kullanarak iki ayrı yöntemle terapinin etkinliğini izlemek mümkündür. BSH Kan Beyin Bariyerini geçemediği için normal beyin hücrelerine giremez. Tümör hücrelerinin Kan Beyin Bariyeri hasarlı olması nedeniyle özellikle hücre membranı üzerinde olmak üzere BSH tümör hücreleri tarafından alınabilir. BPA ise thyrosine ver DOPA'ya - (dihydroxy phenylalanine) benzediği için özellikle malin mellonomada çok daha fazla etkili olur. İlaveten BPA bir amino asit analogu olduğu için amino asit metabolizması ile hücreler tarafından daha fazla tutulur ve Kan Beyin Bariyerini geçebilir. BPA özellikle hücre çekirdeğinde birikir (Mukawa et al., 2011).

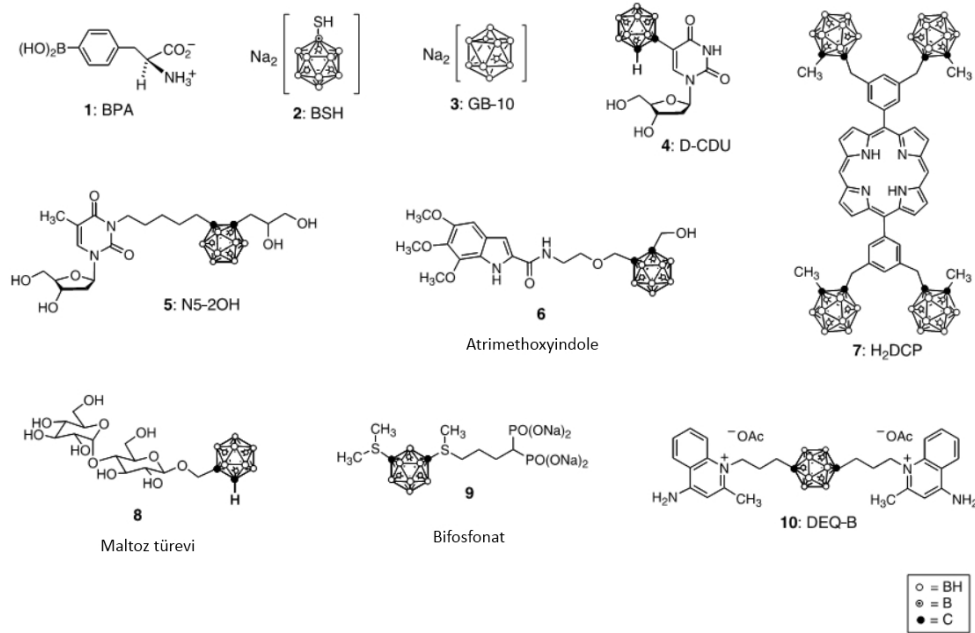
Diğer yöntemler ile tedavi edilemeyen beyin tümörleri, akciğer, karaciğer, melonomada BNCT deneysel olarak denenmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. 1950 yılında başlayan ilk uygulamalardan sonra yalnızca belli merkezlerde yapılan başarılı sonuçlar alınmıştır.

1968 yılından itibaren Japonya'da beyin tümörlü hastalar BNCT ile tedavi edilmektedir. Nakagawa ve Hatanaka 1997 yılında yayınladıkları raporda 1968 yılından itibaren Japonyadaki 5 reaktörü kullanarak 164 hastayı BNCT ile tedavi ettiklerini rapor etmişlerdir. Bu hastalardan 64'ü glioblastoma, 39 hasta anaplastic astrosit ve 17 hasta daha erken evrelerde astrosit (evre 1 veya 2) idi. 30 hasta ise farklı tümörlere sahipti. Gliomablastoma hastalarının ortalama yaşama süresi 640 gün, plastic astrositlerde 1811 gün, erken evre astrositlerde ise 1669 gün idi. 6 hasta 10 yıldan uzun yaşadı. Histolojik evreleme, hastanın yaşı, hedefteki nötron akışı hedefin derinliği veya tümör boyutunun terapinin etkinliğinde önemli parametreler olarak belirlendi. İleriki yıllarda yapılan terapi çalışmalarında yukarıdaki parametrelerde yapılan düzeltmeler ile daha başarılı olduğu ve malign tümörlerde BNCTnin etkili olduğu rapor edilmiştir (Nakagawa and Hatanaka 1997). Yine Japonya'da 2001 yılında Almanya ile işbirliği ile yapılan klinik çalışmada 56 glioblastoma (39 Avrupalı ve 17 Japon) hastası 100 mg/kg sodium borocaptate (BSH: $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) verilerek BNCT ile tedavi edilmiş, kullanılan ilacın farmakokinetiği ve B-10'un insanda tümör/beyin oranı da bu çalışma ile belirlenmiştir. İlaç verildikten 12 saat sonra nötron ışınlamasının optimum olduğu görülmüştür (Kageji et al., 2011). Japonya'da çeşitli reaktörler kullanılarak BNCT uygulamaları ile ilgili başka raporlar daha vardır (Nakagawa et al., 2003). Yaygın olmamakla birlikte Avrupa'da ve Dünyanın diğer başka ülkelerinde de BNCT'nin klinik uygulamaları mevcuttur (Joensuu et al., 2003).

2.1.3. Bor Nötron Yakalama Tedavi Ajanları

1950 ve 1960'lı yılların başlarından beri BNCT' de klinik olarak kullanılan bileşiklerde istenilen özellikler; düşük toksisiteye, yüksek tümör : beyin bor oranına, 20-35 μg bor/g ^{10}B konsantrasyonuna sahip olmasıdır (Türkiye Atom Enerjisi Kurumu, Teknoloji Dairesi).

Son yıllarda seçici tümör hedeflemenin ön plana çıkması ile daha önce tasarlanan ve sentezlenen yapılardan farklı olarak tümör hücresi seçiciliğini sağlayacak (folik asit gibi) daha çok biyokimyasal ve fizyolojik esaslara (lipozomlar, lipidler, DNA bağlayıcıları, hormonlar) sahip bileşikler sentezlenmektedir. Bazı BNCT ajanları aşağıda özetlenmiştir (Şekil 2.3) (Barth et al., 2005).

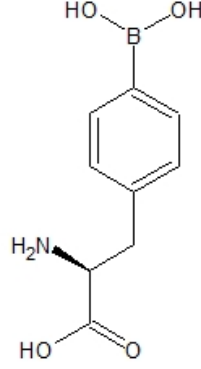


Şekil 2.3 BNCT ajanları; **1.** 4-dihidroksiborilfenilalanin (BPA), **2.** Sodyum merkaptodekahidrododekaborat, Na₂B₁₂H₁₁SH, BSH, **3.** Sodium salt of closo-B₁₀H₁₀, **4.** beta-5-o-carbonyl-2'-deoxyuridine, **6.** atrimethoxyindole, **7.** Porphirin türevi, **8.** Maltos türevi, **9.** Bifosfonat, **10.** dequalinium-B (Barth et al., 2005)

2.1.4. 4-Boron-L-fenilalanin (L-BPA)

Klinik uygulamalarda melonoma tedavisinde BNCT uygulanmaktadır. ^{10}B ile zenginleştirilmiş 4-borono L-fenilalanin (BPA) çeşitli deneylerde kullanılmıştır. İlk melonoma hastası ABD'de bu ajan ile 1985 yılında tedavi

edilmiştir. Beyine metastaz yapan melonoma tedavisinde BNCT uygulanmış ve bu tip metastazlar için bu ajan ve tedavi uygun bulunmuştur (Carpano, et al., 2015). Şekil 2.4'te L-BPA'nın yapı formülü gösterilmektedir.



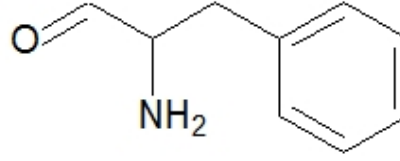
Şekil 2.4 L-BPA'nın yapı formülü

2.1.5. L-Fenilalanin (L-Phe)

Fenilalanin bir α -amino asittir. Bu esansiyel amino asit, nötral ve non-polardır. İçerdiği benzil grubu sayesinde hidrofobik özellik taşımaktadır. L-izomeri DNA tarafından kodlanır ve protein üretiminde kullanılır. Fenilalanin terminal ucuna alanin takılmış bir fenil halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.5).

İnsanlarda ve hayvanlarda de novo ile sentezlenemeyen fenilalanin esansiyel bir amino asittir.

Fenilalanin Kan Beyin Bariyerini geçmek için aktif transport kanallarını kullanmaktadır (Telefoncu, 1992).



Şekil 2.5 L- Phe'nin yapı formülü

2.2. Bor Nitrür Nanotüpler

Bor periyodik tabloda metal ve ametaller arasında sınırda bir yer teşkil eder. Bu özellik borun kimya, teknoloji ve tıpta pek çok farklı kullanım alanında yer bulmasını sağlamıştır. Bununla birlikte önümüzdeki yıllarda teknolojinin gelişmesi ile borun kullanım alanlarının artacağı düşünülmektedir (Ciani and Ristori 2012). Literatürde BNNT'leri sentezlemek için farklı yöntemler denenmiş ve farklı özelliklerde (fiziksel özellik, saflık, boyut vs) BNNT'ler sentezlenmiştir. Bu yöntemler: lazer ablasyon (Golberg et al., 1996), kimyasal, buhar biriktirme (Lourie et al., 2000), öğütme (Duckbong et al., 2013) ve yer değiştirme reaksiyonudur (Han et al., 1998). Bu tez çalışmasında ise kimyasal buhar depozisyon (Chemical Vapor Deposition, CVD) yöntemi üzerinde çalışılmıştır. Kimyasal buhar depozisyon yöntemine göre diğer yöntemlerden daha saf ve istenen boyutta BNNT sentezlemek mümkündür.

2.3. Poliamido Amid Dendrimerler

PAMAM dendrimerler, makromoleküler polimerlerin yeni bir sınıfı olarak, çok dallı ve üç boyutlu yapıları aracılığıyla yüksek derecede yüzey fonksiyonelliği çok yönlülük sağlar. Bu nanoküresel polimerler, kendilerini ilaç taşıma ve gen aktarımı için potansiyel hale getiren seçkin özelliklere sahiptir. PAMAM dendrimerlerin, fonksiyonel grupların boyutu, şekli ve yerleşimi konusunda kesin kontrol sağlaması, birçok yaşam bilim uygulamalarında kullanılma potansiyeli doğurmuştur. Bununla beraber yüzeylerinin pozitif yüklü olması katyonik PAMAM dendrimerlerin sitotoksik olmasına neden olmuştur bu durum da klinik kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Dendrimerin yüzey gruplarının modifikasyonu, toksisiteyi azaltmak ve biyouyumluluğu geliştirmek amacıyla uygulanan mevcut yöntemlerden biridir.

PAMAM Dendrimerlerin Yüzeyine Amino Asitlerin Konjugasyonu:

İlaç molekülleri ile konjuge edilen PAMAM dendrimerlerinin aminoasit motifleri ile kaplandığında çözünürlüğün arttığı sitotoksitenin azaldığı, kemoseçici reaktivite azalmadan hemolitik toksisitenin azaldığı rapor edilmiştir (Navath et al., 2010). Lysin ve ornitin bu amaç için kullanılmış olan aminoasitlerdendir. Aminoasit yüklü PAMAM dendrimerlerinin gen terapide kullanışlı polimerik vektörler olabileceği rapor edilmiştir (Park et al., 2014). Liu ve grubu arginine bileşenlerini triethanolamin (TEA) i-PAMAM dendrimer (G4) e konjuge etti ve arginine zengin motiflerin hücre membrane geçişlerini arttırdığını gösterdi. İlaveten hem *in vivo* hem *in vitro* deneylerde prostat kanseri modellerinde hedefe yönelik olarak fark edilebilir bir toksisite değişimi gözlenmedi (Liu et al., 2014). Arginin modifiye PAMAM dendrimerli diğer bir çalışmada biyotegrede olabilen ester bağının iki avantajı görüldü. İlki yapıya arginin girmesi hücre membrane ve çekirdeğine geçişi olumlu yönde etkiledi. Diğer biyotegrede olabilen polimerler polyplex oluşumunu etkiledi ve hücre canlılığını olumlu yönde etkiledi.

Dendrimerlerin Kan Beyin Bariyerini paraselüler ve transselüler yollar ile geçtiği rapor edilmiştir. (El-Sayed et al., 2002, El-Sayed et al., 2003, Jevprasesphant et al., 2003, Kitchens et al., 2005, Kolhatkar et al., 2007 Saovapakhiran et al., 2009). PAMAM dendrimerlerinin yüzeyinde primer amin grupları ve molekül içinde de tersiyer amin grupları mevcuttur. Primer amin grupları DNaya DNA tutulumu üzerinden hücre içi tutulumda önemli rol üstlenirken, yapı içindeki tersiyer amin grupları endozomlara proton süngeri gibi davranırlar. İlaveten 4 den fazla jenerasyonu olan PAMAM'ın yapısındaki iç bölgedeki hidrofobik boşluklar farklı molekülleri enkapsüle eden ilaç salınımları için kullanılabilirler (Golshaei and Pourianazar, 2013). Suda çözünabilirlik, özgün yapı, yüzeydeki çok sayıdaki aktif gruplar PAMAM dendrimerlerini antikanser ilaçlar dahil terapötik ilaç molekülleri için ideal taşıyıcı moleküller yapar. Katyonik PAMAM dendrimerlerinin yüzeylerindeki pozitif yüklü gruplar (-NH₂ grupları) negatif yüklü hücre membranı ile etkileşirler ve dendrimer hücre geçişi ile sonuçlanır. Bununla beraber çok yüksek pozitif yük katyonik PAMAM dendrimerlerinin klinik kullanımlarını kısıtlar. Bu kısıtlamanın üstesinden gelmek için yüzey modifikasyonu gerekir. Diğer bir deyişle dendrimerlerin yüzeyi farklı fonksiyonel gruplar ile maskelenerek yapı biyoyumlu hale getirilir. Örneğin PEG, asetil, folat, ve peptid konjugasyonu bu amaç için kullanılabilecek yapılardır.

Nötral ve negatif yüklü nanomateriyellerin plazma proteinlerindeki adsorpsiyonu azalttığı ve böylece kan sirkülasyon zamanını uzattığı rapor edilmiştir (Sadekar and Ghandehari, 2012). Bununla beraber bazı hallerde materyalin yüzey yükü protein adsorpsiyonunu önlemeye yeterli olmaz ve RES (reticuloendothelial system) üzerinden atılım olur. Nanomateriyal üzerindeki polimer tabaka hidrofilik koruyucu tabaka oluşturur. Polimer biyouyumlu olmak zorundadır ilaveten nanomateriyalin çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırmalıdır. Literatürdeki farklı biyouyumlu polimerler arasında PEG (polietilen glikol) en çok kullanılmıştır. PEG'lenen moleküller nanomateriyale doğrudan bağlanmıştır veya ligand sentezinin bir bölümü olarak nanomateriyali fonksiyonlaştırmada kullanılmıştır. Her iki durumda da PEG'li nanomateriyaller PEG molekülleri arasında sterik itme yaparak sulu ortamda çözünürlük ve stabilitede iyileşme gösterirler. Bu parametreler PEG'li molekülün moleküler ağırlığından etkilenir. Örneğin 5000 Dalton'dan küçük PEG kaplamada hidrodinamik çap 50-150 nm arasında iken daha uzun kan dolaşım zamanı ve daha az karaciğer tutulumu görülür (Wang et al., 2009 b).

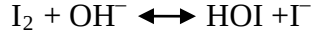
2.4. Radyoiyotınasyon

İyot radyoişaretleme çalışmalarında kullanılan ilk izotop olarak bilinmektedir. Suda çözünmeyen iodojen, iyotür ve proteinlerin sulu çözeltilerinin katı fazda hızlı iyotınasyonuna aracılık eder. Yan reaksiyonların oluş derecesi, bu metodla önemsenecek kadar azdır. Radyoaktif bir atomu büyük bir biyolojik molekülün içine sokmak için kullanılan en yaygın yol elektrofilik radyoiyotınasyon'dur. İyodun bağlanabilmesi için yükseltgenmesi gerektiğinden, işaretleme metodlarında yükseltgeyici ajanlar kullanılmaktadır. İyodınasyon metodu kullanılırken radyofarmasötiklin klinik kullanımdan önce serbest iyotun uzaklaştırılması gerekir. Protein ve hücre membranlarının radyoiyotınasyonunda iyotınasyon ajanı olarak iodojen yaygın olarak kullanılmaktadır ve % 80'nin üzerinde bir işaretleme verimi elde edilir. Direkt radyoiyotınasyon için iodojen ve Kloramin-T bileşikler yükseltgeyici ajanlardır. Ancak iodojen metodu klinik uygulamalar için daha uygun bir methoddur. İodojen ilk olarak Fraker ve Speck tarafından protein ve hücre membranlarını iyotlamak için kullanılan bir ajan olarak tanımlanmıştır (Fraker and Speck, 1978). 1,3,4,6-Tetrachloro-3a,6a-diphenylglycoluril iodojenTM direkt iyonidasyon için Kloramin T'ye alternatif olarak ortaya sunulmuştur. Etkili bir katı faz oksidasyonudur. Bu ajan oksidatif reaksiyonlarda kapta yapışıp kalır çünkü suda çözünmez. Diklorometan içinde steril veya polipropilen tüp içerisine konur ve buharlaştırılır. Ajanın kaba yapışma

yeteneği, sıcaklığa, neme, çözgene, buharlaşma oranına ve kaplanma prosedürüne bağlı olarak zaman alıcıdır. $\text{pH} = 6 - 8,5$ arası verimli iyotınasyon olur. İodojen ile iyotürün oksidasyonu gerçekleşerek I^+ üretilir ve aromatik halkaya elektrofilik yer değiştirmeye iyotun bağlanması gerçekleşir (Farah and Farouk, 1998; Vertes et al., 2004). ^{131}I ile işaretli antikor bileşikler kanser tedavisinde yaygın olarak çalışılmaktadır. Genellikle iodojen yöntemiyle *in vivo* basit bir proses ile gerçekleştirilir. Serbest iyot birikimi kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. Yüksek spesifik aktivitedeki radyoiyotlu antikor bileşikler uzun periyotlarda kararlıdır (Taskar et al., 2004).

İyodınasyon medikal ve biyolojik bileşenlerin işaretlenmesi için sıklıkla kullanılmaktadır. İyot 7A halojen grubuna ait metalik bir elementtir. Atom numarası 53 olan iyotun kararlı izotopu ^{127}I 'tur. ^{123}I 13,2 saat yarı ömrü, 159 keV foton enerjisi ve düşük hasta radyasyon dozu ile *in vivo* diagnostik için en uygun iyot radyoizotopudur. Siklotrona üretilmektedir bu nedenle pahalı bir radyoizotoptur. Antijenlerin ve diğer bileşenlerin radyoişaretlenmesi için uzun yarı ömür (60 gün) avantajıyla genelde ^{125}I kullanılmaktadır. Düşük enerjisinden dolayı (27 – 35 keV) *in vivo* görüntüleme için uygun değildir. ^{131}I radyoizotopu 8 günlük yarı ömrü ve 364 keV foton enerjisi ile tiroid uptake ve taraması için kullanılmaktadır. ^{131}I 'un β emisyonu hastaya ^{123}I 'tan daha geniş radyasyon dozu verdiği için tiroid tedavisinde kullanılmaktadır. ^{123}I hazırlanırken Te hedefin bombardıman edilmesiyle yarı ömrü uzun (4.2 gün) olan ve anihilasyon ile diğer yüksek enerjili radyasyonlara [511 keV (46%), 603 keV (61%), 723 keV (10%), and 1.69 MeV (10.4%)] sahip istenmeyen radyonüklidik safsızlık olan ^{124}I elde edilebilir. Bu yüksek enerji fotonları ^{123}I 'un 159 keV pencereindeki radyasyon saçılması ve kolimatörün septal penetrasyonlarından dolayı sintigrafik görüntü çözünürlüğüne parçalanırlar. Yüksek saflıktaki ^{123}I 'un uygun nükleer reaksiyonlar ile üretilmesine gereksinim duyulmaktadır (Saha, 2003).

Molekülün iyotınasyonu iyotun yükseltgenmesiyle gerçekleşir. Yükseltgen formu çeşitli moleküllere güçlü bir şekilde bağlanabilir. İndirgen formu bağlanmaz. Genelde iyot I^+ ya çeşitli yükseltgen ajanlar ile yükseltgenir. Serbest moleküler iyot sulu çözeltisinde I^+ ve I^- yapılarını içermektedir. Elektrofilik türler I^+ serbest olarak bulunmaz ancak kompleks formda su ya da piridin gibi nükleofilik olarak bulunurlar (Saha, 2003).



İyodinasyon; moleküldeki iyotonyum iyonlarıyla hidrojen iyonunun elektrofilik süstitüsüyonu ya da molekülde var olan kararlı iyot ile radyoaktif iyot atomlarının yer değıştirmesiyle (izotop değışimi) nükleofilik süstitüsüyonuyla oluşur. Reaksiyonları aşağıdaki gibidir:

Nükleofilik Süstitüsüyon



Elektrofilik Süstitüsüyon



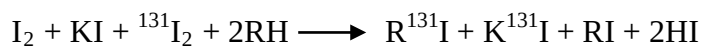
Protein iyotinasyonunda; tirozinin fenolik halkası ve histidinin imidazol halkası birincil ve ikincil iyotinasyon bölgeleridir. Optimum pH 7 – 9'dur. Sıcaklık ve iyotinasyon süresi uygulanan iyotinasyon yöntemine ve molekülün tipine bağılıdır. İyodinasyon derecesi protein molekülünün sağlamlığını etkiler ve genelde iyotinasyon yöntemine ve protein tipine bağılıdır. Protein molekülün başına bir iyot atomu uygundur (Saha, 2003).

2.4.1. Radyoiyotinasyon Yöntemleri

Pek çok iyotinasyon yöntemi mevcuttur, bunlardan birkaçı aşağıda açıklandığı gibidir (Saha, 2003).

Triiodide Yöntemi

Triiodide yöntemi esas olarak iyot ve potasyum karışımına radyoiyotun eklenmesiyle meydana gelen işaretlenmedir:



Yukarıdaki tepkimede bulunan RH işaretlenen organik bileşici ifade etmektedir. Bu yöntemle işaretlenen proteinlerde; protein denatürasyonu

minimumken işaretlenme verimi % 10 – 30 gibi düşüktür. Ortamdaki soğuk iyotun varlığı ile işaretli ürünün spesifik aktivitesi ciddi anlamda azalma gösterir.

İyodin Monoklorid Yöntemi

İyodin monoklorid (ICl) yönteminde, ilk olarak radyoiyot ^{127}I HCl ile seyreltilerek dengelenir. İşaretlemenin gerçekleşeceği spesifik pH ve sıcaklıkta bu karışım işaretlenmek istenen maddeye eklenir. İşaretlenme verimi % 50 – 80 gibi başarılı bir orandadır. ICl deki soğuk iyot molekül ile işaretlendiğinde spesifik aktiviteyi düşürebilir, verim bu noktada tahmin edilememektedir ve eklenen ICl miktarına bağlıdır (Saha, 2003).

Kloramin-T Yöntemi

Kloramin-T N-monokloro-p-toluensülfonamid'in sodyum tuzudur ve ılımlı bir yükseltgen ajandır. Bu iyotinsasyon yönteminde ilk olarak işaretlenecek bileşik konur ve ^{131}I -sodyum iyotür çözeltisine Kloramin-T eklenir. Kloramin-T bileşiği işaretlemek için iyotu reaktif iyot türlerine yükseltir. Bu yöntemde soğuk iyot bulunmadığı için yüksek spesifik aktivite belirlenmiştir, bağlanma verimi % 90 civarında bulunmuştur. Kloramin-T protein denatürasyonuna sebep olabilmektedir. Sodyum nitrid ve sodyum hipoklorid gibi ılımlı bir oksidantlardır (Saha, 2003).

Elektrolitik Yöntem

Pek çok protein elektrolitik yöntem ile radyoiyotlayabilir. Elektrolitik yöntem işaretlenecek madde ve radyoiyot karışımının elektroliziyle gerçekleşmektedir. Elektrolitik hücrede anot ve katot bileşenleri diyaliz membran vasıtasıyla ayrılır. Elektroliz ile bileşiğe bağlanan reaktif iyot ayrılabilir. İyotun yavaş ve kararlı ayrımı hiçbir iyot taşıyıcısı olmadan, bileşenlerin tek tip iyotinsasyonuna sebep olmaktadır ve işaretleme verimi yaklaşık % 80'e ulaşmıştır (Saha, 2003).

Enzimatik Yöntem

Enzimatik iyotinsasyonda, laktoperoksidaz ve kloroperoksidaz gibi, nanomolar miktarındaki H_2O_2 işaretlenecek bileşik ve radyoiyot içeren iyotinsasyon karışımına eklenir. Hidrojen peroksit iyotu reaktif iyot formuna

yükseltger ve böylece bileşik iyotine edimli olur. Protein denatürasyonu ya da organik moleküllerin değişimi çok düşük konsantrasyonlarda hidrojen peroksit düşük olduğu için minimaldir. Bağlanma yüksek spesifik aktivite ve verim ile bağlanmış olup verimi; % 60 – 85'dir. Protein ve hormonların iyotinasyonunda ılımlı ve kullanışlı bir yöntemdir (Saha, 2003).

Konjugasyon Yöntemi

Konjugasyon yönteminde, başlangıç olarak N-succinimidyl-3(4 hydroxyphenyl)-propionate (N-SHPP) kloramin-T yöntemiyle radyoiyotlanır ve reaksiyon ortamından ayrılır. Kuru benzende radyoiyotlu N-SHPP ticari olarak elde edilmektedir. Proteinlerin lizin gruplarıyla amid bağı yapabilen proteinlerle reaksiyona girebilen ajanlar vasıtasıyla proteinler işaretlenir. İşaretlenme verimi çok yüksek değildir ancak bu yöntem protein moleküllerindeki tirozin taşınımını değiştirmeden iyotinasyona olanak tanımaktadır (Saha, 2003).

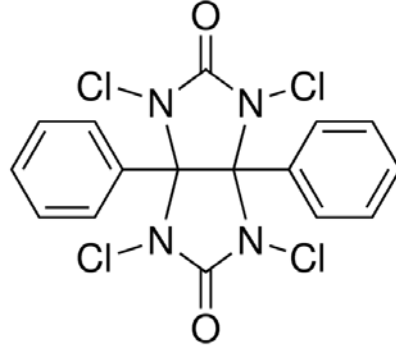
Demetalasyon Yöntemi

İyotlu proteinlerin in vitro stabilitesini geliştirmek organotalyum, organociva, organosilan, organoboran ve organokalay gibi pek çok organometalik kullanılmaktadır. Kloramin-T ve iodojen gibi yükseltgen ajanların varlığında radyoiyotinasyon ile karbon-metal bağı kırılır. Tüm bunların içerisinde organokalay [succinimidyl para-tri-n-butylstanyl benzoate (SBSB)] kolay hazırlanması, stabilitesi ve radyoiyot ile kolay yer değiştirmesinden dolayı en cazip olanıdır. SBSB tributil grupları radyoiyot ile süstitüsyona uygun bir yöntemle radyoiyotlanır. Alkali pH'ta karıştırılarak protein SBSB'ye bağlanır. Tamoxifen, vinyl estradiol ve fenil yağ asitleri bu teknikle iyotlanır (Saha, 2003).

İodojen Yöntemi

Protein ve hücre membranları iodojen yöntemiyle radyoiyotlanabilir. İodojen ya da kloramin (1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenilglikoluril) metilen klorür içerisinde çözülür ve tüpün tabanını film olarak kaplaması için buharlaştırılır. 10 – 15 dakika protein ve radyoiyot karışımı birlikte iodojen kaplı tüpün içine konur ve karışım tüpten yavaşça boşaltılarak ayrılır. İyodojen iyotu yükseltger ve iyot proteine bağlanır. Bağlanmayan iyot sephadex gel ya da DEAE iyon değişim materyali kullanılarak kolon kromatografisi ile ayrılır. İodojenin sudaki

çözünürlüğü az olduğu ve reaksiyon katı fazda gerçekleştiği için protein denatürasyonu minimumdur. İşaretleme verimi % 70 – 80’dir (Saha, 2003).



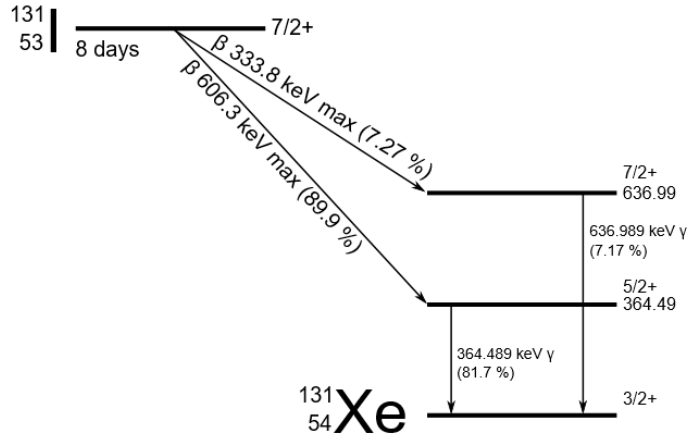
Şekil 2.6 İodojen molekül yapısı

İyodo-Boncuk Yöntemi

İyodo-Boncuk yönteminde, iyotlu boncuklar tirozin içeren protein ve peptidleri iyotlamak için kullanılmaktadır. İyodo-boncuklar 2,8 mm çapında nanoporöz polistiren kürelere immobilize N-klorobenzen sulfonamid yükseltgenini içerir. Bu küreler 6 ay koyu renkli şişede 4 °C’de kararlıdır. Protein ve ^{131}I -sodyum iyotür karışımına 5 – 6 iyoto-boncuk eklenerek radyoiyotinasyon gerçekleştirilir. Reaksiyon 15 dakika için oda sıcaklığında gerçekleştirilir. İyotlanan proteinler konvensiyonel tekniklerle ayrılabilir. Bu yöntemin küçük denatürasyonlarla yüksek verime sahip olduğu idda edilmektedir. İşaretleme verimi % 99 civarındadır (Saha, 2003).

2.4.2. I-131

^{235}U ’in ışınlanmasıyla ^{131}I elde edilir ve % 18’lik NaOH içerisinde ısıtılarak çözülür. Pek çok metal iyonlarının hidroksitleri soğutularak çöktürülür. Kapalı distilasyon düzeneğinde sülfürik asit ile sodyum iyotür içeren süpernatant asitlendirilir. Asitlenerek iyot iyotüre yükseltgenir ve iyotür distilasyon ile NaOH çözeltisinde toplanır. ^{131}I ’un bozunum şeması Şekil 2. 7’de verilmiştir. % 80’i 606 keV’lik beta ışıması ile Xe-131’in 364 keV’lik uyarılmış düzeyine bozunur. Buradan da 364 keV’lik gama ışıması ile bozunmaktadır. Bu nedenle I-131 en yüksek bollukta maksimum enerjisi 606 keV olan beta ışınlarına ve 364 keV olan gama ışınlarına sahiptir (Saha, 2003).



Şekil 2.7 ^{131}I 'un bozunum şeması

^{131}I -Sodyum İyodür

Tellürün nötron bombardımanı ya da uranyum fisyon ürünü olarak elde edilen sodyum iyotürün (NaI) formundan ^{131}I ($t_{1/2} = 8$ gün) ayrılır. ^{131}I -sodyum iyotür kapsül ya da sıvı formda tedavi ve terapötik dozları güvenlik sınırında olacak şekilde radyoaktivitesi % 5'e varan dozlarda çeşitli markalarda piyasada bulunmaktadır. ^{131}I -NaI çözeltisi serum fizyolojik ile izotonik hale getirilir, şeffaf ve renksiz bir çözeltidir. Hava ve radyolitik serbest radikaller (Ör: $\text{HO}_2\cdot$) I'u I_2 'ye yükseltir ki bu formu potansiyel olarak zararlıdır. pH'ı 7,5 – 9,0 aralığında alkali ortama çekmek ya da çözeltiye askorbat, tiyosülfat eklemek ile oksidasyon minimize edilir. Radyasyon (β ışınları) hem çözeltinin hem de cam şişenin kararmasına sebep olabilir. ^{131}I -NaI kalibrasyondan sonraki raf ömrü 4 haftadır. Bu ajan oral uygulama sonrasında genelde tiroid uptake ve görüntüleme için kullanılmaktadır. Çözelti ya da kapsül uygulaması kıyaslandığında fizikçiler radyasyon güvenlik sınırına göre radyoiyotlu radyofarmasötiklerin kapsül formunu tercih etmektedir. ^{131}I -NaI'in bir diğer önemli uygulaması da tiroid karsinom ve hipertiroidi gibi tiroid hastalıklarının tedavisidir. Orta enerjili beta ışıması I-131'i iyi bir terapi radyonüklidi yaparken 364 keV'lik gama ışıması terapiyi izleme olanağı sağlar. Halen iyotür formunda tiroide birikmesi nedeni ile tiroid kanserlerinin en çok kullanılan radyonüklid terapi ajanıdır. Tiroid taramasında da yaygın kullanılmaktadır (Ünak ve Çetinkaya, 2005).

İyot radyonüklidleri için 72 saat ile 14 gün aralığında tiroid uptake uygulanır. Bu uygulamanın sıklığı maruziyet ya da alımdan 6 saat sonra ele

alınmasıyla ilişkilidir. Bazı durumlarda üre analizi gerektirebilir. Biyolojik deneylerde farklı tipte ve miktarda radyonüklid gerektirebilir (Saha, 2003).

2.4.3. I-125

İyot-125 (^{125}I) iyotun biyolojik uygulamalarda, nükleer tıpta görüntülemeye, prostat kanseri, melanomalarda ve beyin tümörlerinin radyasyon terapisinde kullanılan bir iyot radyoizotopudur. ^{129}I iyottan sonra ikinci en uzun yarı ömürlü radyoizotop izotopudur.

Yarı ömrü 59,43 gündür ve EC bozunumu ile ^{125}Te 'un uyarılmış haline geçer. Bu faz telliryumun metastabil hali değildir ancak 25 keV'lik maksimum enerji ile ani bir gama bozunması yapar. Uyarılan ^{125}Te 'un fazla enerjisinin bir kısmı iç dönüşüm ya da x-ışını ile elektronlara dönüşür ve 50 – 500 eV'luk 21 auger elektronu üretilir. En son olarak, kararlı radyoaktif olmayan taban durum ^{125}Te son bozunma ürünü olarak üretilir. İç dönüşüm ve Auger elektronları izotop atomu içeren hücrenin dışında küçük hasara neden olur.

X-ışınları ve gama ışınları yeterli oranda düşük enerjiye sahiptir. Bölgeye bırakılan izotop kapsülleri kalıcı brakiterapideki dokulara seçimli verilen yüksek radyasyon dozu iletir.

Uzun yarı ömrü ve düşük enerji foton emisyonundan dolayı gama sayıcı kristal detektörlerle tayin edilebilir. Radyoimmünoassay'de antikorları işaretlemek için ^{125}I tercih edilir. ^{123}I 'tan daha uzun yarıömre sahip olması proteinlere bağlanması, nükleer tıp taramalarında kullanılan brakiterapi için uygun izotop özelliklerine sahiptir.

^{125}I tiroid tarama ve görüntülemeye kullanılmaktadır, fakat 13 saatlik kısa yarı ömrü, daha iyi radyasyon penetrasyonundan dolayı ^{123}I tercih edilmektedir. Tiroid gibi iyot absorbe eden dokularda beta yayıcı olarak ^{131}I , brakiterapide ise ^{125}I kullanılır.

^{125}I ; sentetik izotopu olan ^{125}Xe 'in elektron yakalanmasıyla elde edilir, ^{124}Xe , nötron yakalamasıyla % 0,1 bir bolluk ile doğal olarak gerçekleşir (Brahimaj et al., 2016, <https://en.wikipedia.org/wiki/Iodine-125>, Ünak ve Ünak, 2008).

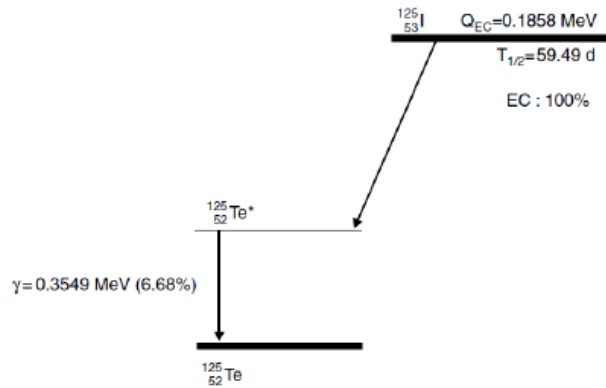
^{125}I -Albümün

Albümün iyot radyoizotoplarıyla işaretlenebilmesine rağmen, ^{125}I ile radyoizotlanan serum albümün (RISA) klinik tıp uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. İnsan serum albümini kloramin-T yöntemiyle 10 °C’de alkali ortamda iyotlanır. Aynı zamanda iodojen yöntemiyle de iyotlanabilir. Serbest iyot anyon değişim reçinesi ile uzaklaştırılır ve ürünü sterilize etmek için membran filtreden geçirilir. Ticari formları koruyucu olarak % 0,9’luk benzil alkol içermektedir. Çözelti, degradasyonu minimize etmek için 2–8 °C’de depolanmalıdır. ^{125}I -RISA için yarı ömür 60 gündür. RISA insan serum albümün içeren steril serum fizyolojik ile seyreltilebilir (Saha, 2003).

RISA’nın klinik uygulamalarında multi doz ya da tek doz şırıngalar uygulanmaktadır. ^{125}I -RISA berrak, renksiz ile sarı aralığında bir çözelti görünümüne sahiptir. Radyasyon albümün çözeltisinin ve tüpün zamanla karamasına sebep olabilir. Çözelti pH’ı 7,0 ile 8,5 aralığında olması ve iyotür ile iyotat total radyoaktivitenin % 3’ünü geçmemesi önerilmektedir. Kan hacmi ve kardiyak çıkış ^{125}I -RISA ile ölçülür (Saha, 2003).

^{125}I -Sodyum Iothalamate

Sodium iothalamat (Glofil) asidik ortamda iyon değişim yöntemiyle ^{125}I ile ($t_{1/2}=60$ gün) ile işaretlenmiştir. 250–300 mCi/mL (9,25–11,1 MBq) radyoaktiviteyle 1 mg/mL sodyum iothalamat işaretlenir. Koruyucu olarak % 0,9 benzil alkol içermektedir. 2–8 °C’de 35–40 gün raf ömrüne sahiptir. İnsan ve hayvanda glomerular filtrasyon hızının ölçümünde kullanılmaktadır. ^{125}I ’un bozunum şeması Şekil 2.8’de verilmiştir (MIRD; <http://www.nds.iaea.or.at>).



Şekil 2.8 ^{125}I bozunum şeması (Ünak ve Ünak, 2008)

2.5. Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri

Radyofarmasötikler insanlarda uygulandığından beri katı kalite kontrol ölçümleri gerçekleştirilmektedir. Temelde kalite kontrol pek çok spesifik test ve ölçümü içermektedir. Bunlar; saflık, tesir, ürün karakteristiği, biyolojik güvenlik ve radyofarmasötik veriminden oluşmaktadır. Tüm kalite kontrol prosedürleri radyoaktif olmayan farmasötiklere uygulanmıştır, buna ek olarak testler radyonüklid içerenler için radyonüklidik ve radyokimyasal saflık testleri de gerçekleştirilir. Bu kalite kontrol testleri üretici tarafından gerçekleştirilmektedir. Genelde radyofarmasötik üretiminde kısa yarı ömürlü olanları tercih edilir. Bunların kalite kontrolleri insan uygulamalarından hemen önce gerçekleştirilmektedir (Saha, 2003).

Kalite kontrol testleri fizikokimyasal testler ve biyolojik testler olmak üzere iki kategoriden oluşmaktadır. pH, iyon şiddeti, ozmolarite ve partikül özellikleri fizikokimyasal testler radyonüklit seviyesi ve radyokimyasal safsızlık kalite kontrol grubunu oluşturur. Malzemenin sterilite, apirojenite ve toksisite testleri de biyolojik kategorisindeki testlerdendir (Saha, 2003).

Radyokimyasal Saflık

Radyokimyasal saflık radyofarmasötiklerin içerdiği total radyoaktivitedeki oranıdır. Radyokimyasal safsızların artması; sıcaklık ya da pH değişimleri, yükseltgen ya da indirgen ajanların varlığı ve radyolizden kaynaklı durumlarda artmaktadır. Radyokimyasal safsızların bulunduğu radyofarmasötikler kullanıldığında görüntü kalitesinin düşmesine, dokularda ve kandaki backgroundun yüksek olmasına ve hastaya gereksiz radyasyon dozu verilmesine sebep olmaktadır. İşaretli bileşiklerin dekompozisyonu radyoaktif materyain spesifik aktivitesine bağlı radyoliz tarafından gerçekleşmektedir. Bozulan elektron çiftleriyle serbest radikal oluşur ve bu da işaretli moleküllerde dekompozisyona sebep olabilmektedir. Suyun radyolizi ile oluşan sekonder ürünler de işaretli moleküllerin dekompozisyonuna sebep olabilmektedir. Parçacıklar maddedeki lokal absorpsiyonu, kısa menzilden dolayı γ -ışınlarından daha çok hasar verirler. Bileşiğin stabilitesi sıcaklık ve radyoliz ile ışığın zamanla yayılmasına bağlıdır. Bileşik daha uzun süre bu koşullara maruz kalırsa bozulabilir. Bunun için, radyofarmasötiklerin bir kullanım ömrü vardır ve bu süreden sonra garanti kapsamından çıkarlar. Sodyum askorbat, askorbik asit ve sodyum sülfid gibi maddeler radyofarmasötiklerde stabiliteyi sağlamak için kullanılırlar. Bazı

radyofarmasötikler soğuk ve karanlık ortamda saklanırlar. Radyofarmasötiklerdeki radyokimyasal safsızlıkları belirlemek için pek çok analitik yöntem mevcuttur (Saha, 2003). Bunlardan bazıları aşağıda verilmiştir;

- Çöktürme
- Kağıt ya da ince tabaka kromatografi
- Jel Kromatografi
- Kağıt ya da poli akrilamid jel (PAGE) elektroforez
- İyon değişim
- Solvent Ekstraksiyonu
- HPLC
- Distilasyon

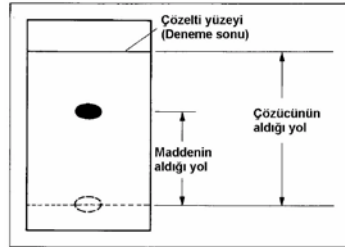
Kimyasal Safılık

Radyofarmasötiklerin kimyasal saflığı kimyasal yapısındaki maddelerin fraksiyonlanmasıdır. Kimyasal safsızlıklar işaretlemiden önce veya sonra maddenin bozunması ile ortaya çıkmaktadır. Örneğin alüminyum ^{99m}Tc elüsyonunda kimyasal bir safsızlıktır. Tamponlardaki asit ya da alkali ilavesi safsızlık olarak düşünülmemektedir. Kimyasal safsızlıkların varlığı diagnostik testlerle girişim yapabilir ya da yapmayabilir. Aynı zamanda kimyasal safsızlıklar toksik etkiye sebep olabilir. Radyofarmasötiklerin saflaştırılması için genelde çöktürme, solvent ekstraksiyonu, iyon değişim ve distilasyon gibi kimyasal ayırma yöntemleri kullanılmaktadır (Saha, 2003).

2.5.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)

Kağıt ve ince tabaka kromatografisi hazırlanan radyofarmasötiğin Whatman kağıda ya da silika jel kaplı TLC'ye damlatılıp uygun solventin bulunduğu tank ya da beherde yürütülmesiyle gerçekleştirilir. Genelde kullanılan solventler; % 85 metanol, aseton, metil etil keton, % 0,9'luk NaCl çözeltisi ve sudur. Kromatografi süreci boyunca örneklerin farklı bileşenleri adsorbanlarla solventin dağılım katsayılarına bağlı olarak dağılırlar. Bu kalite kontrol tekniğinde adsorban

stasyoner faz ve solvent mobil fazdır. Mobil faz taşıma yaparken elektrostatik güçler stasyoner fazdaki bileşenleri yavaşlatma eğilimindedir. Farklı bileşenlerin çeşitli solventlerde taşınma hızları farklıdır ve kağıtta ya da TLC’de farklı mesafelerde yürürler. Polarite maddedeki farklı bileşenlerin kromatografik olarak ayrılmasını etkiler. Kağıt ya da TLC kromatografisi artan ya da azalan tipte olabilir. Artan kromatografide mobil faz yukarı doğru hareket ederken, azalan kromatografide aşağıya doğru hareket eder. Bazı kromatografi teknikleri saatler alırken, TLC sadece birkaç dakikalık gibi hızlı bir yöntemdir. Kağıt ya da TLC kromatografisinde örneklerin karakterizasyonu R_f değeri ile yapılır. R_f değeri örneğin yürüdüğü mesafenin solventin yürüdüğü mesafeye oranı olarak hesaplanır (Şekil 2.9). Bu değerlerde bilinen bileşiklerle farklı deneysel koşullar altında gerçekleştirilmiştir. R_f değerleri verilen örnekteki farklı bileşiklerin karakterizasyonu için kullanılır. Örnekler solventte yürütüldükten sonra tanktan çıkartılır ve kurutulur, daha sonra ölçüm alınabilecek uygun bir sistem ile örneğin NaI(Tl) gibi kağıtlar bölünerek sayılabilir. Her segmentin radyoaktivitesi ile bir histogram elde edilir. Alternatif olarak radyokromatografi tarayıcısı ile ölçülebilir. Radyokimyasal safsızlık orjine uygulanan total radyoaktiviteye istenilmeyen bileşiklerin radyoaktivitesinin oranı olarak hesaplanır. TLRC yöntemi nükleer farmaside bağlanma verimi, serbest radyoizotopu, yükseltgen ya da indirgen halini ve ortamdaki yükseltgen/indirgenin kendisi olmak üzere bu üç bileşiği tahmin etmek için kullanılır. Çünkü kromatografik ayırım farklı sistemlerle elde edilebilen farklı bilgilerdir ve kağıt, solventin tipine bağlıdır. Bazı ince tabaka kromatografisi uygulamalarında artifaktlardan kaçınmak için düşünülüp incelenmelidir. Kromatografi kağıdı kuru olmalıdır. Alınabilecek önlemlerden birisi solventin kağıdın sınırını geçmesinin önlenmesidir. Uygulanan örnek küçük hacimli olmalıdır, radyonüklidin oksidasyona uğramayacak kadar kurutulup tankta solvente bırakılmalıdır (Saha, 2003).



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

Şekil 2.9 İnce Tabaka Kromatografisi ve R_f değerinin hesaplanması (Saha, 2003).

2.5.2. Kağıt Elektrofözezi

Elektrofözezi sulu bir çözeltilde çözülmüş haldeki parçacıkların yüklerine bağılı olarak, uygulanan elektrik akımının etkisiyle göç etmesi ilkesine dayanır. Çözeltildeki iyonlar elektrik alanının etkisi ile kutuplara farklı hızlarla göç ederler. Göç hızı hareketlilik kat sayısı ile orantılıdır. Hareketlilik katsayısı farklı olan iyonların göç hızları farklı olacağı için bu yöntem ile molekülleri ayırt etmek mümkündür.

Elektrofözezi; güç kaynağı iletken bir çözelti içerisine bağlanır, kromatografi kağıtlarına damlatılan örnekler bu çözeltiye daldırılır ve akım uygulanarak gerçekleştirilir (Sakr et al., 2015).

2.5.3. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) radyofarmasötik örneklerin analizlenmesinde; yüksek çözünürlükle bileşenlerin ayrılmasını sağladığı için çok önemlidir. Genel HPLC prensipleri sıvı kromatografisi ile aynıdır. Temel fark, kolonun yönelişi, elektrikli pompa ile örneklerin zorlanarak boyutlarına göre kolondan geri kazanımıdır. Yüksek çözünürlük, ayırım hızı ve çözeltilerin yüksek geri kazanımı HPLC'nin avantajlarındandır. HPLC kolonları 2 – 5 mm çapında cam ya da paslanmaz çelikten, 15 – 30 cm uzunluğunda ve içerisi uygun materyal ile dolu tüplerdir. Tipik bir HPLC yönteminde bir örnek enjeksiyon valfi ya da şırınga ile enjekte edilir ve elüent 6000 psi'ye kadar olan bir basınç ile kontrollü bir hızla pompalanır. Dedektör cevabı örneğin enjeksiyonundan sonra kolondan alındığı zamana göre gelir buna da alıkonma zamanı (R_t) denir. Analitik HPLC için 5 – 10 mm, preparatif HPLC için 20 mm ve üzerinde çapla ince mikroparçacıkları içeren bir materyal kolonu meydana getirir. Kolona verilen örnek hacmi küçük olmalıdır (5 – 250 μ L), yüksek hacimler kromatografik ayırımın çözünürlüğünü düşürür. İki tip pompa mevcuttur; sabit akış hızlı pompa ve sabit basınçlı pompa. Genel olarak, HPLC yöntemleri moleküler ayrıştırma kromatografisi, iyon değişim kromatografisi, sıvı-katı adsorpsiyon kromatografisi, sıvı-sıvı ayırma kromatografisi ve sıvı-katı ayırma kromatografisi gibi pek çok sıvı kromatografisi kullanılabilir. Bu tip kromatografilerde sabit faz silika desteğin yüzeyine kimyasal bağlanan polimerdirler. Bu polimer tabaka sabit sıvı fazla benzer ayrıştırma özelliklerine sahiptir. HPLC yöntemi normal ve ters faz olmak üzere iki tiptedir. Normal faz

HPLC’de; materyaller polardır ve yüksek kararlılıktaki R–Si–C, R–Si–N ya da R–Si–O–C bağlı materyallere silika yüzeyinin –OH grupları reaksiyona girererek hazırlanırlar. Standart bağlı faz materyali siloxane (Si–O–Si–R) ile doldurulmuştur. Organik zincir bölgesindeki polar fonksiyonel grupların çeşitli doğası, farklı seçimliliği silika ile doldurulmasıyla açıklanabilir. Normal faz HPLC’de kullanılan solventler genel olarak hegzan, heptan, aseton ve diğer hidrokarbonlardır. Normal faz HPLC’de iyi ayırma genel olarak güçlü polaritedeki örnekler ile gerçekleştirilir. Ters faz HPLC’de sabit faz alkil zincirleriyle silika mikroparçacıklarla bağlı kimyasal yapılı porlardan oluşur ve apolardır. Oktıl (C8) ve oktadesil (C18) hidrofobik fazlı silika mikroparçacıklardan oluşan bir materyal kolon maddesi olarak kullanılmaktadır. Oktadesilsilan (ODS ya da C18) materyali yaygın olarak kolon dolgu maddesi olarak kullanılmaktadır. Ters faz HPLC’de yaygın olarak su, metanol, asetonitril gibi polar solventler kullanılmaktadır. Solventin gücü, solvent karışımının kompozisyonu ile değişken olarak çeşitlendirilebilir. Apolar ya da zayıf polar bileşikler ters faz HPLC ile çok iyi ayrılabilir. Ultraviyole (UV), NaI(Tl) dedektör gibi radyasyon dedektörleri farklı konsantrasyonlarda ayrımı gözlemlemek için kullanılan dedektörlerdendir. UV dedektör elüsyondaki ışığın absorbans ölçümünü yapar. Radyasyon dedektörü elüsyondaki radyoaktif bileşiklerin konsantrasyonunu ölçmek için kullanılmaktadır. Radyofarmasötik analizlerinde hem UV hem de radyasyon dedektörü ile izleme gerçekleştirilmektedir. Karbohidratlar, ilaçlar, proteinler ve yağ asitleri gibi çeşitli bileşikler HPLC yöntemiyle ayrılabilir. Ters faz HPLC pek çok radyofarmasötüğün analizinde çok güçlü bir yöntemdir (<http://gidaerge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

2.5.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi Sistemleri

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbohidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Degasser; mobil fazlarda mevcut çözünmüş gazların giderilmesini

sağlar (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kısaca HPLC olarak adlandırılır. Analizlenen örnek radyonüklit ile işaretli ise kullanılan dedektörlerden en az birisi aktivite ölçüm dedektörü olmakta ve bu analiz de HPLRC (High Performance Liquid Radio Chromatography) Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi kısaca HPLRC olarak adlandırılmaktadır (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Yüksek performans; yüksek resolüsyonu (ayırımı) ifade eder. Mobil fazın yüksek basınçla ilerlemesi sağlandığı için Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografi olarak da adlandırılır (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Mobil Faz: Analiti taşıyan (Analiz ettiğimiz maddeler) hareketli fazdır. Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik solvanlardan oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayırımı direk etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmelidir (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Degazör: Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar, kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Pompa: Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına göre pompalar Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif olarak gruplandırılabilir. Analitik pompalar genellikle 0.1 – 5 ml akış değerleri arasında kullanılır. Mobil faz adedi ve karıştırma kabiliyetlerine görede İzokratik (Tek Kanallı) , Binary Gradient (Çift Kanallı Mikserli) ve Quaternary

Gradient (Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz) olarak dizayn edilir. İzokratik çalışmalarda mobil faz önceden karıştırılıp hazırlanır. Gradient çalışmalarda karışım değişik zamanlarda değişik oranlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi arttırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Pompa ünitesi genellikle iki pistonlu başlık, basınç dengeleyici, işlemci, inlet ve outlet check valflerden oluşur. Günümüzde Nano ve Ultra Basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Uzun süreli kullanım ve tekrarlanabilir sonuçlar için pompa temizliği ve bakımına dikkat edilmelidir (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Örnekleyici: Örnekleyici Analitlerin (Numunelerin) kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Örnekleyici temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Otoörnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Otoörnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Otoörnekleyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sisteme çabuk kirlenir veya tıkanır. Numuneleri cihaza göndermeden önce muhakkak şırınga filtresinden veya kartuştan geçirmek gerekir, numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olmasını tercih ederiz. Şırınga filtresi, kartuş ve numune vialleri seçimi ve kullanım alanları için [www.labhut.com](http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc) sitesinden daha fazla bilgi alabilirsiniz (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Kolon-Kolon Fırını: Kolon (Sabit Faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle Çelik, PEEK ve Camdan imal edilir, içi belli ölçülerde sabit fazla doldurulur (Silika veya polimer gibi). Kolon Fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılır. Blok ısıtıcı, Fanlı ve Peltier kolon fırınları mevcuttur. Peltier sistemler çok çabuk ısıtılıp soğutulabildiği ve daha stabil sıcaklık sağladığı için tercih edilir. Kaçak sensörlü ve multi kolon teknolojili olanları da mevcuttur (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

Kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolguludur. HPLC nin hayata geçmesiyle kullanılmaya başlanan silika bazlı

kolonlar artık yerini yavaş yavaş hızlı analiz yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlara bırakmaya başlamıştır. Polimer kolonlar silika bazlı olanlara göre ortalama 3 kat daha uzun ömürlüdür ve rejenere edilebilir. Kullanılan mobil faz, sabit faz (kolon) ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC teknikleri aşağıdaki temel gruplarda toplanabilirler;

Normal faz kromatografi: Sabit faz polar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış $-CN$, $-NO_2$ veya NH_2 dolgu maddeleri)

Mobilfaz non-polar ya da düşük polariteye sahip (Etiler, Kloroform, Heksan vb. çözücüler ve karışımları)

Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

Ters faz kromatografi: Sabit faz apolar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve $-NH_2$ gruplu dolgu maddeleri)

Mobil faz polar (Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları)

Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobilfazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

Normal Faz Kromatografide düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

Ters Faz Kromatografide yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

İyon Değiştirme: İyonik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca suda çözünen organik maddelerin analizinde de kullanışlıdır.

Katyonlar için negatif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar, Anyonlar için pozitif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar kullanılır.

İyonun molekül ağırlığı arttıkça kolonda tutunma gücü de artar.

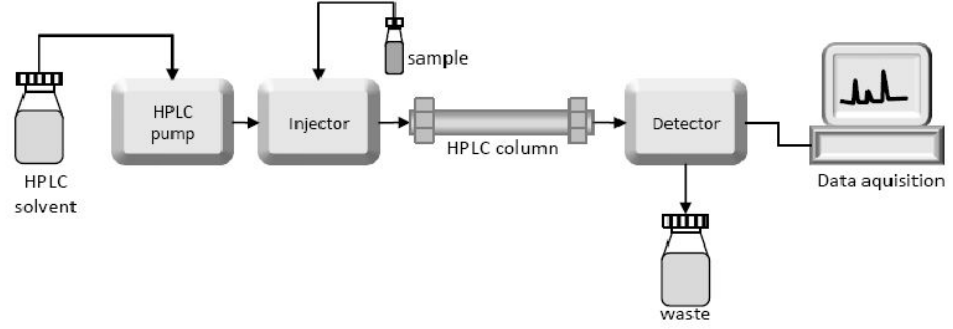
Size Exclusion (Eleme): Molekül ağırlıkları farkı çok büyük olan analitlerin bir arada analizleneceği karışımlar için kullanılan bir tekniktir.

Bu teknikte analitler ve kolon dolgu maddesinde kimyasal değil fiziksel bir etkileşim vardır. Büyük molekül ağırlığı olan analit kolon dolgu maddesindeki porlara sığmadığı için kolonu önce terk eder.

Genellikle polimer, şeker ve protein analizlerinde kullanılır.

Eleme tekniğinde kullanılan mobilfaz organik çözücü ise GPC (Gel Permeation Chromatography), sulu çözelti ise GFC (Gel Filtration Chromatography) adını alır (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

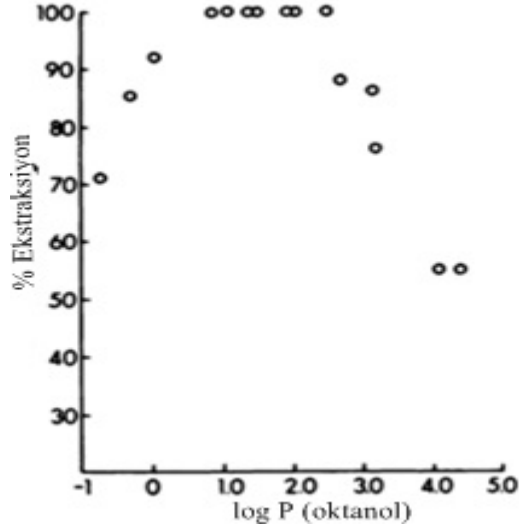
Şekil 2.10’da HPLC / HPLRC sistem bileşenlerinin bir kısmı verilmektedir.



Şekil 2.10 HPLC sistemi şeması (<http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yuksek-performansli-sivi-kromatografisi-hplc>).

2.5.4. Lipofilite

Birçok faktörden etkilenmesine rağmen herhangi bir bileşiğin serbestçe KBB'yi geçebilme durumu o bileşiğin lipid çözünürlüğü, protein bağlama kapasitesi, molekül büyüklüğü ve yükü ile ilişkilidir (Dischino et al., 1983). Kan akışını ölçmek için tasarlanmış bir ajan, tüm debilerde kan beyin bariyerinden geçebilmelidir. Bu amaç doğrultusunda Dischino ve arkadaşlarının bir çalışmasında KBB'yi geçebilen maksimum oktanol/su dağılım katsayısı [$\log P(\text{okt})$] belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmada bir bileşiğin lipofilitesi ile tek bir geçiş esnasında beyne ekstraksiyonu arasındaki ilişki incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda $\log P(\text{okt})$ değerleri 0,9 ile 2,5 arasında değişim gösteren ^{11}C işaretli bileşiklerin tümünün başarıyla beyne ekstrakte edildiği görülmüştür (Dischino et al., 1983). Artan lipofilite ile kan bileşenlerine bağlanma gerçekleşmektedir. Şekil 2.11'de görüldüğü gibi beyne ekstraksiyonun -1'den +1'e kadar olan $\log P(\text{okt})$ değerlerinde lineer bir artış gösterdiği, 1.0-3.0 $\log P(\text{okt})$ değerleri arasında sabit kaldığı ve daha üst değerlerde ise lineer bir düşüş yaşandığı vurgulanmaktadır (Dischino et al., 1983).



Şekil 2.11 log P (okt) değerlerine göre beyne ekstraksiyon (geçiş) yüzdesi (Dischino et al., 1983).

2.5.5. Kan Beyin Bariyeri (KBB)

Nörolojik hastalıkların teşhis veya tedavisi için geliştirilen metotların beklenenden az sayıda olmasının en önemli nedenlerinden biri ilgili aktif maddenin beyne iletilmesi sırasında ortaya çıkan ciddi bir engelin varlığıdır. Bu engel ise nörodejeneratif hastalıklara karşı geliştirilen yolların santral sinir sistemine iletimini sınırlandıran Kan Beyin Bariyeri (KBB) olarak tanımlanır.

KBB, beynin patojen ve toksinlere karşı sahip olduğu bir homeostatik savunma mekanizmasıdır. Almanya’da 19. yüzyılın sonlarına doğru Paul Erlich ve arkadaşları tarafından başlatılan çalışmalar MSS ile dolaşım arasında bir iletişim bozukluğunun ilk kanıtları tespit edilmiştir. Bu çalışma grubu damar içine verilen bazı boyaların beyin ve omurilik dışındaki tüm dokuları boyadığını farketmiştir. Tripan mavisi adlı boyanın, tüm organları boyadığı, yalnızca beyne ait dokuları boyamadığı görülmüştür. Bu deneysel sonuçlar kan ve beyni ayıran seçici geçirgen bir zar olduğunu göstermiştir.

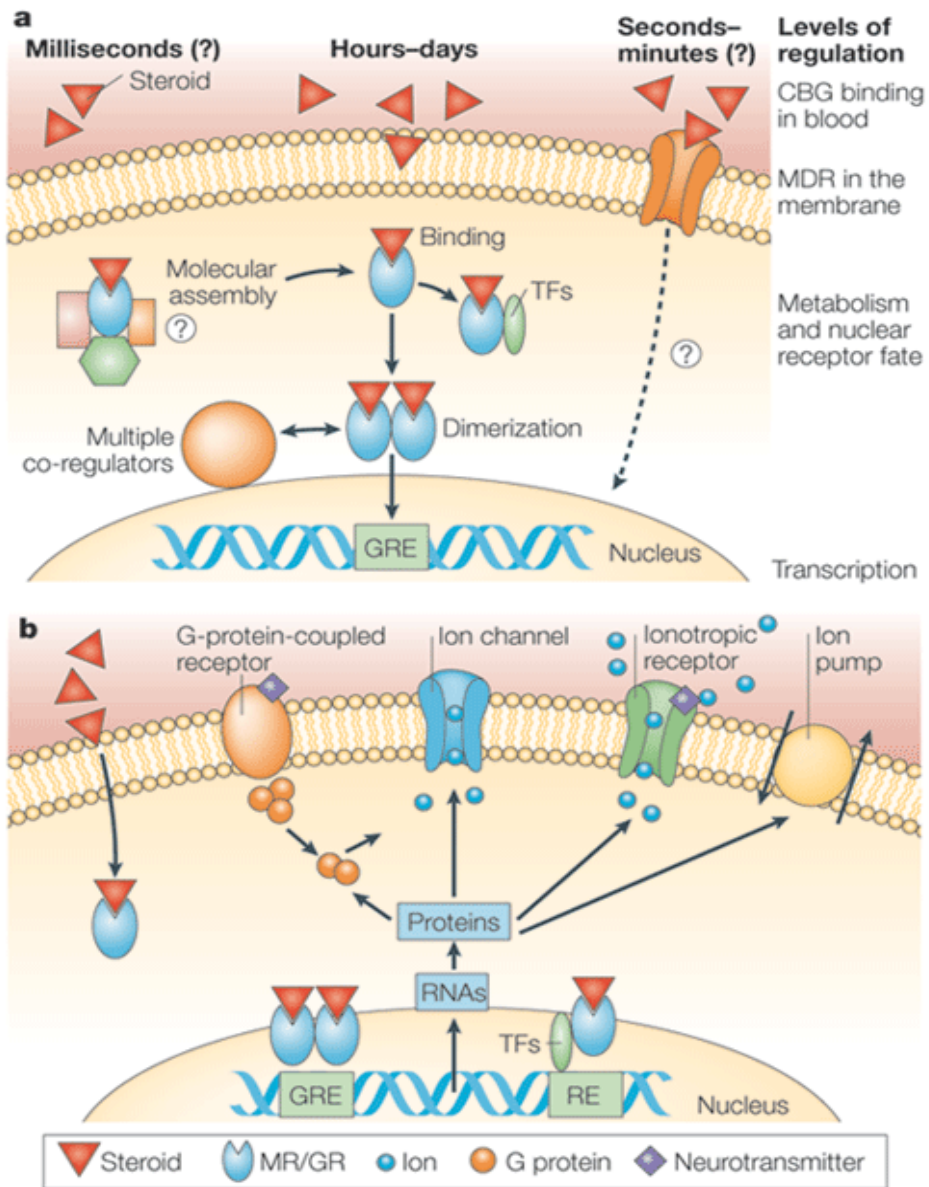
KBB, farklı hücre tiplerinin birbirleri ile temasta olduğu beyin kapillerleri ile lokasyon anlamda aynı seviyededir. KBB’yi oluşturan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinin (BMEH) önemli morfolojik karakteristik özellikleri vardır. Beynin kandan geçiş yapma potansiyeli olan bileşikler engellemesi için yardımcı olan hücreler arası sıkı kavşakların varlığı, KBB’nin morfolojik özelliklerden biridir. KBB’de yer alan sıkı kavşaklar, endotel hücreleri arasındaki elektriksel direnci artırmak suretiyle transsellüler yol ile beyin içine madde girişini

kısıtlamaktadır. Söz konusu kavşaklar BMEH'ye oluşturduğu elektrik direnci sayesinde seçici, dinamik bir filtre görevi üstlenir. Antibiyotikler, antineoplastik ajanlar, peptit-proteinler özellikle de nöropeptitler ve diğer birçok oligo ve makro moleküler aktif madde, olup, suda çözünmektedir.

Beyindeki çeşitli hasarlar nedeniyle oluşan hastalıklara karşı geliştirilmeye çalışılan ilaçlar ve tedavi yöntemlerinin karşısına beyin fizyolojisinde önemli bir yere sahip olan KBB çıkar. Bu bariyer sebebiyle geliştirilen ilaç ve tedavi sayısı ciddi ölçüde sınırlandırılmıştır. Farmakoloji ve nöro bilim alanlarındaki ilerlemeler MSS hastalıkları ve potansiyel tedavileri hakkında ciddi sonuçlar vermesine rağmen beyne ilaç iletimi için yeni yöntemlerin geliştirilmesinin önemli bir ihtiyaç olduğu görülmektedir.

Yeni geliştirilen ilaçların büyük bir kısmının KBB'yi geçememesi nedeniyle beyin için yeni ilaçların geliştirilme süreci, moleküler sinir bilimlerindeki ilerlemeye ayak uyduramamıştır. Yaklaşık olarak büyük moleküllerin (> 400–500 Dalton) % 100'ü KBB'yi geçemezken aynı problem küçük moleküllerin minimum % 98'inde de söz konusudur (Dischino et al., 1983).

KBB modeli ile molekülün hücre içine alımı Şekil 2.12'de gösterilmiştir (Kloet et al., 2005).



Şekil 2.12 KBB modeli (Kloet et al., 2005).

Beyin Görüntüleme

Beyin görüntülemenin temel prensibi KBB'ni aşan bir bileşik geliştirip kullanmak ile mümkün olur. KBB muhtemelen anatomik, fizyolojik ve metabolik olayların fonksiyonel karışımı ve belirli bir örneği, söz konusu maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak etkilidir. Engel beyin kapillerindeki endotelial hücrelerin esnek intraselüler geçişlerinde; ekstraselüler akışkan boşluğun eksikliği, pinositozis eksikliği ve transport mekanizmalarının sınırlı olması ile sonuçlanabilir. KBB su, glukoz, sodyum klorür gibi maddelere ve sodyum nitrit, sodyum iyotür, sükröz, safra pigmentler gibi bileşenlere seçicidir. KBB'nin aşılması tümör ya da diğer hastalık durumlarında bileşiğin beyine geçerek penetrasyonu ile sonuçlanır. KBB prensibine bağlı olarak beyin görüntüleme radyofarmasötikleri difüzlenebilen ve difüzlenemeyen olmak üzere iki kategoriye ayrılmaktadır. Difüzlenebilen ajanlar tipik olarak lipofiliktir ve KBB'ni geçebilecek kadar hızlıdır. Örneğin ^{99m}Tc -HMPAO ve ^{18}F -FDG. Difüzlenemeyen ajanlar hidrofilik ve polardır ayrıca KBB'ni aşamazlar. $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve ^{99m}Tc -DTPA bunlara örnektir. Bunlar önceden difüzlenebilen radyofarmasötiklerin yokluğunda beyin görüntüleme için tercih edilen ajanlardandı. Difüzlenebilen ajanlar arasında ^{99m}Tc -HMPAO, ^{99m}Tc -ECD, ve ^{18}F -FDG beyin görüntülemede yaygın olarak kullanılanlardır. ^{18}F -fluorodopa dopamin reseptörlerine ilişkin serebral hastalıkların teşhisinde beyin görüntüleme için kullanılmaktadır. Beyin görüntüleme için kullanılan radyofarmasötikler ve karakteristikleri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1 Beyin görüntüleme ajanları ve karakteristikleri

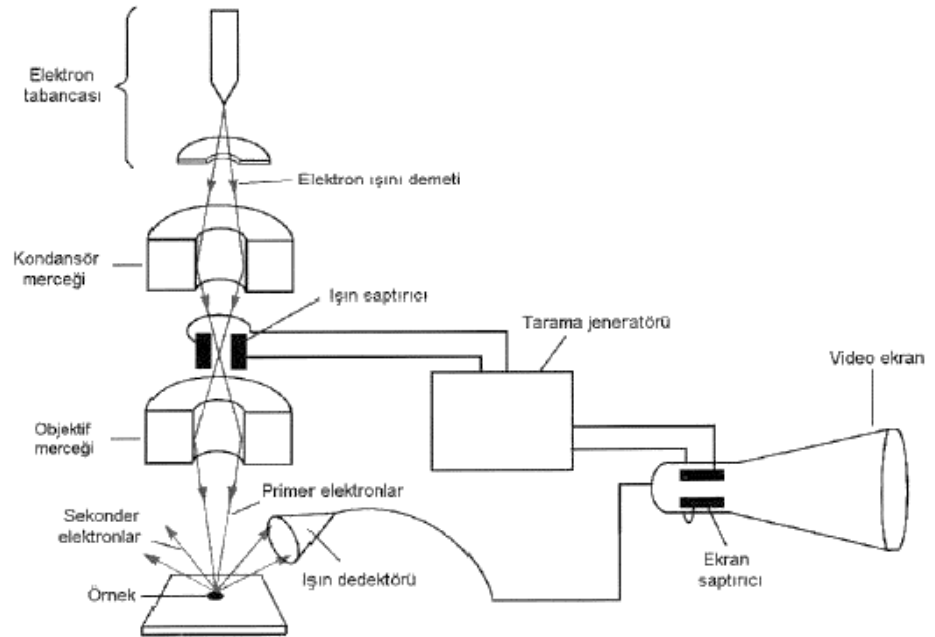
Karakteristik	^{99m} Tc-HMPAO	^{99m} Tc-ECD	¹⁸ F-FDG	¹⁸ F-Fluorodopa
t_{1/2} (fiziksel)	6 saat	6 saat	110 dakika	110 dakika
Foton enerjisi (keV)	140	140	511	511
Doz (mCi)	10 – 20	10 – 20	10 – 15	5 – 10
Doz (MBq)	370 – 740	370 – 740	370 – 555	185 – 370
Görüntüleme zamanı (saat)	0.3 – 2	0.5 – 1	0.6	0.3 – 0.5

2.6. Sentezlenen Bor Nitrür Nanotüplerin Özelliklerinin İncelenmesi Kullanılan Yöntemler

2.6.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)

SEM

SEM’de görüntü oluşturmada görev alan elemanlar; elektron tabancası, kondansör mercekleri, ışın saptırıcı, objektif mercekler, dedektörler, foto çoğaltıcı tüp ve vakum sistemidir (Şekil 2.13). Tungsten, Lantan hegza borit katottan veya alan emisyonlu tabancadan (FEG) ortaya çıkan elektronların kullanımı incelenecek malzeme yüzeyine gönderilmesi sonucu oluşan etkileşimden yararlanılması esasına dayanır. SEM’lerin genel olarak bu elektron enerjisi 200 – 300 eV’den 100 keV’a kadar değişebilir. Net olarak odaklandırılmış elektron merceği tarafından cisim üzerine odaklandırılır. Çarptığı yerden gelen elektronlar toplanır ve güçleri yükseltilir. Mikroskoptaki katot ışını tüpü sayesinde toplanan elektronlardan bir görüntü oluşturulur. Kondansör merceğinde toplanan ve objektif merceklerle odaklanan elektron demeti, elektromanyetik saptırıcı bobinlerle örnek yüzeyinde tarama işlemini gerçekleştirir (Agemura and Morishita, 2016).



Şekil 2.13 SEM bileşenleri (Agemura and Morishita, 2016).

SEM-EDX

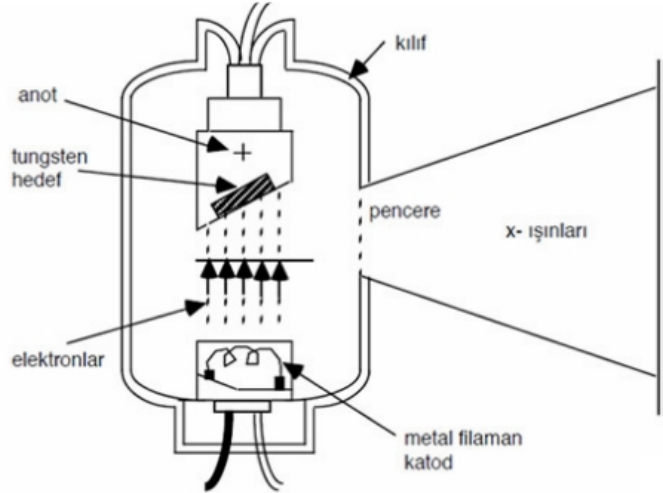
Örneğe gönderilen elektron, örnekteki atomun iç yörüngesinden bir elektron kopmasına neden olur, bu nedenle enerji dengelenmesi gereği bir üst yörüngedeki elektron bu seviyeye geçer ve geçerken de ortama bir X ışını yayar ve buna karakteristik X-ışını denir. Ortaya çıkan X-ışını ve bu ışının enerjisi atoma özeldir. Böylece enerjiden yola çıkılarak malzemenin elementel içeriği nitel ve nicel olarak tespit edilebilmektedir.

2.6.2. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM’de bir elektron mikroskobudur. SEM’de görüntü yansıyan elektronlardan elde edilirken TEM’de cisimden geçen ışınlar görüntüyü meydana getirmektedir (Benjamin 2016).

2.6.3. X-Işınları Kırınımı (XRD)

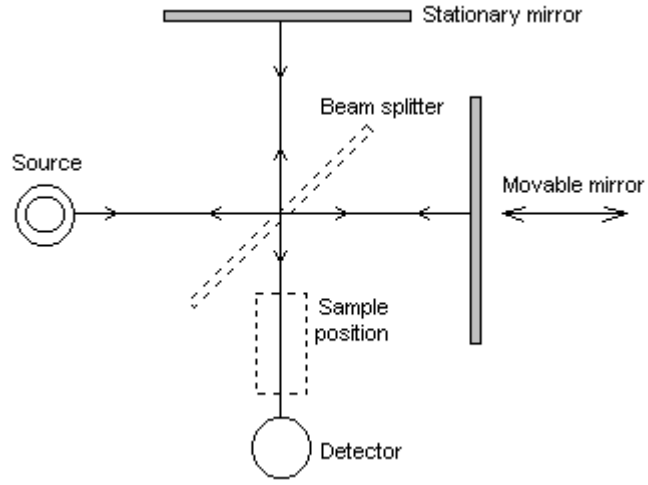
1985’te Wilhelm Röntgen X ışınlarını bulmuştur. X ışınları elektromanyetik dalga kimliğinde oldukları ve kutuplanma özelliği taşıdığı ilk olarak Charles Glover Barkla (1906) tarafından kanıtlanmıştır. X ışınları difraksiyonu ile faz analizi yapan bir cihazdır (Şekil 2.14). Bu cihaz ile kristal yapıları malzemeler incelenebilmektedir. Gönderilen x ışınları x ışınları tüpünden üretilir. XRD ile elektron ve nötron kırınımından; kristalin yapısı, kristalin mükemmeliği veya fazın saflığı, kristalin doğrultuları, örgü sabitleri belirlenebilir. Sentezlenen malzemelerin yapı aydınlatılmasında kullanılmaktadır.



Şekil 2.14 XRD çalışma prensibi ve bileşenleri

2.6.4. Fourier Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Kızılötesi (IR) absorpsiyon spektroskopisi bir tür titreşim spektroskopisidir. IR ışınları molekülün titreşim hareketleri tarafından soğurulmaktadır. FTIR'ın çalışma prensibi; tek ışık yollu spektrofotometrelerde, bileşenlerin tümü aynı ışık yoluna yerleştirilmiştir. Çift ışık yollu spektrofotometrelerde, monokromatörden çıkan ışık eşit şiddette iki demete bölünerek biri örneğe diğeri sadece çözücünün bulunduğu kaba gönderilir. Cihaz ışın kaynakları; UV görünür bölgede döteryum (D₂), tungsten (W), hidrojen (H₂), ksenon (Xe), civa buhar lambası gibi sürekli ışık kaynakları kullanılır. Monokromatörler; ışık kaynağından gelen polikromatik ışıktan tek bir dalga boyunda monokromatik ışık elde edilmesini gerçekleştiren düzeneklerdir. Numune hücresi; cam veya kuartz olabilir. Cam prizma düşük UV ışınlarını iyi geçirmediğinden görünür bölge için uygundur. Dedektörler; maddenin ışığı absorplayıp absorplamadığını anlamak için ışık kaynağından gelen ışığın şiddetinin ölçülmesi amacıyla kullanılan düzendir (Şekil 2.15).



Şekil 2.15 FTIR çalışma prensibi

3. MATERYAL METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan kimyasallar

- Boron kristali (B) (Sigma)
- Lityum dioksit (LiO_2) (Sigma)
- Fenilalanin ($\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{CO}_2\text{H}$) (Sigma)
- 4-Boron-L-Fenilalanin ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{BNO}_4$) (Sigma)
- 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC) ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) (Sigma)
- N-Hidroksisüksinimid (NHS) ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$) (Sigma)
- 2-Merkaptoetanol ($\text{HSC}_6\text{H}_4\text{OH}$) (Sigma)
- Fosfat tamponu (PBS) pH=7.0 (Merck)
- Tris-HCl Tamponu pH= 8.5 (Fluka)
- Amonyak (NH_3) (Merck)
- Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)
- Sodyum azid (NaN_3) (Sigma)
- Poli Amido Amid Dendrimer (PAMAM[G-4] ve PAMAM[G-2]) (Sigma)
- Potasyum iyotür (KI) (Merck)
- 1,3,4,6-Tetrachloro-3 α ,6 α -Diphenyl-Glycoluril ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_2$) (Sigma)
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)

- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- 2-Propanol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) (Merck)
- N-Oktanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{OH}$) (Merck)
- N-Bütanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) (Merck)
- Aseton (CH_3COCH_3) (Merck)
- Asetik asit (CH_3COOH) (Merck)
- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Merck)
- Metil etil keton ($\text{C}_2\text{H}_5\text{COCH}_3$) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Fosforik asit (H_3PO_4) (Sigma)
- Etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) (Merck)
- Piridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) (Merck)
- Kloroform (CHCl_3) (Merck)
- Serum Fizyolojik (% 0,9 NaCl)
- Kalsiyum klorür (CaCl_2) (Merck)
- Dimetilsülfoksit ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) (Merck)
- Sephadex G-25 (Sigma)
- MES (Sigma)

- Triton X100 (Sigma)
- İnce tabaka kromatografi kağıdı ITLC-SG (Merck-5554).
- U87-MG (İnsan Beyin Glioblastom-Astrosit) (HTB-14) (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- C8-D1A (Fare Beyin Astrosit) (CRL-2541) (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD).
- Min. Essential Medium (MEM Eagle) (Merck)
- Dulbecco's MEM (Merck)
- L-Glutamine (Bio.Ind.)
- Sodyum bikarbonat (Bio.Ind.)
- Essential amino asit (Bio.Ind.)
- Sodyum pirüvat (Bio.Ind.)
- Fetal Bovine Serum (Bio.Ind.)
- Penisilin/Streptomisin (Bio.Ind.)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- PBS (Merck)
- Tripsin EDTA (Merck)
- Florescein isotiocyanate (FITC) ($C_{21}H_{11}NO_5S$) (Sigma)
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole Dihydrochloride (DAPI)
($C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$) (Sigma)
- Bichinoninic acid (BCA) protein tayin kiti (Thermo)

- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma)
- Dead End Fluorimetric Tunnel System (Promega)
- ^{131}I (Ege Üniversitesi Hastanesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Bornova, İzmir)
- ^{125}I (Perkin Elmer, USA)
- Argon gazı (HABAŞ, Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş.)

3.1.2. Kullanılan cihazlar

- TLRC Bioscan (AR2000, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- ODS 5- μm RP-C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (GL Sciences Inc.) kolonu
- Kolon fırını (CTO-10ASvp)
- Diyot array dedektör (DAD) (SPD-M20A)
- Otomatik örnekleyici (SIL-20A HT)
- Shimadzu LC-10Atvp (SPD-10AV) sistemi (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- NaI(Tl) dedektörü (Raytest, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Liyofilizatör (Labconco Free Zone 2.5 770, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Doz kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (RAD-501, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Boyut ve potansiyel ölçüm sistemi (Malvern NanoZS, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Üç boyutlu çalkalayıcı (Heidolph, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Santrifüj cihazı (Nüve CN180, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Vorteks cihazı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Ultrasonik homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070), E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Milipor (Milli-Q Gradient A-10, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- FTIR (Perkin Elmer Spectrum BX II, Electrothermal 9200, Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü)
- SEM (Phillips XL30 SFEG, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi)
- HRTEM (JEOL JEM 2100F, USA, Muğla Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarı)
- XRD (Philips X'Pert Pro, the Netherlands, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezi)
- Floresan mikroskop (Olympus BX53, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Mikroplaka okuyucu (Varioskan, Thermo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- İnverted mikroskop (Leica, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Işık mikroskobu (Olympus, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- CO₂ inkübatör (Sanyo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Laminar flow kabin (Thermo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 38R, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Otoklav (Hirayama, JAPAN, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- - 80 °C derin dondurucu (Sanyo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- - 196 °C sıvı azot tankı (Thermo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Atmosferik yüksek sıcaklık fırını (Carbolite CTF-17, UK, Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü)
- Sıvı sintilasyon sayacı (Packard Tri-corb-1200, E. Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı).

3.2. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi ve Modifikasyonları

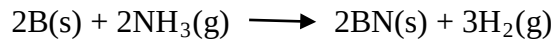
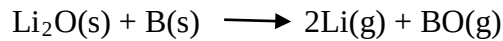
Giriş bölümünde değinilen amaç doğrultusunda Zhi ve arkadaşlarının yöntemi modifiye edilerek Bor Nitrür Nanotüp (BNNT) sentezi gerçekleştirilmiştir.

Sentez aşaması için gerekli olan atmosferik yüksek sıcaklık fırını Doç. Dr. Arzu Türkler Ege ve Doç. Dr. Mehmet Ayvacıklı (Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü) tarafından sağlanmıştır. Ayrıca nanotüplerin sentezi için alternatif yöntemler denenmiştir. Sentezlenen nanotüpler poli amido amid dendrimer (PAMAM) [G-4] veya [G-2] ile modifiye edildikten sonra EDC-NHS kimyası ile L-Phe konjugasyonu gerçekleştirilmiştir. Sentez ve konjugasyon prosedürleri aşağıda verilmiştir.

3.2.1. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi

Bor Nitrür Nanotüp sentezi gaz geçişli yüksek sıcaklık fırınında (Carbolite) katı hal reaksiyonu ile Şekil 3.1' de gösterilen düzenekte sentezlendi. B:LiO₂ (1:1) 7°C/dk ısıtma hızı ile 1100 °C'ye kadar Ar(g) atmosferinde 100 sscm, 1100°C'ye ulaştığında NH₃(g) atmosferine 200 sscm geçilmiştir ve 1400°C'de 3 saat inkübasyon sonrasında Ar(g) atmosferinde 1°C/dk soğutma hızı ile oda koşullarına kadar soğutma yapıldı. Sentez sonrası örnekler desikatörde muhafaza edildi. Sentezlerde Alümina (Sigma) krezeller kullanıldı. Optimum sentez koşulları için geometri faktörü ve reaksiyon süresi optimizasyonu çalışmaları gerçekleştirildi.

Reaksiyon mekanizması aşağıdaki gibidir:





Şekil 3.1 BNNT sentez düzeneği

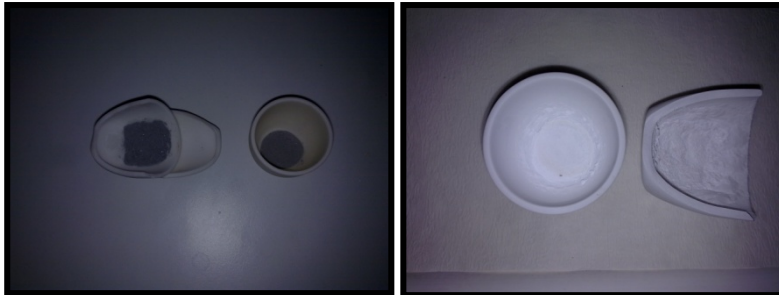
3.2.2. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi Optimizasyonu

3.2.2.1. İnkübasyon Süresi Optimizasyonu

B:LiO₂ (1:1) 7°C/dk ısıtma hızı ile 1100 °C'ye kadar Ar(g) atmosferinde 100 sscm, 1100°C'ye ulaştığında NH₃(g) atmosferine 200 sscm geçilmiştir ve 1400°C'de 3 saat ve 5 saat olmak üzere farklı iki zamanda NH₃(g) atmosferinde inkübasyon sonrasında Ar(g) atmosferinde 1°C/dk soğutma hızı ile oda koşullarına kadar soğutma yapılarak gerçekleştirildi.

3.2.2.2. Reaksiyon Kabı Optimizasyonu

Nanotüp oluşumuna reaksiyon kabı etkisini incelemek amacı ile yatık (kayık) ve normal (dik) kroze olmak üzere Şekil 3.2'de gösterildiği gibi iki tip alümina kroze sentez aşamasında kullanılarak optimizasyon çalışması gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2 Reaksiyon kabının senteze etkisinin incelenmesi

Reaksiyon ürünü olan Bor Nitrür Nanotüplerin yapısal analizlerini ve sentez ürününün karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla SEM, EDX, XRD, TEM ve FTIR yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.3. Bor Nitrür Nanotüplerin PAMAM [G-4]/[G-2] ile Konjugasyonu

Sentezlenen BNNT'lerin 4 mg'ı 3mM PAMAM [G-4] veya [G-2] ile 1 mL Tris-HCl tamponunda (pH=9) 30 dakika 25°C'de sonike edilmiştir. Sonikasyon sonrasında, 24 saat 25°C'de üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Konjugat (BNNT/PAMAM [G-4] veya BNNT/PAMAM [G-2]) üç kez distile su ile yıkanıp, 15000 rpm de santrifüjlenerek bağlanmayan PAMAM uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4°C'de depolanmıştır. BNNT'lerin PAMAM ile modifiye formunun çözünürlük kararlılığı literatüre uygun olarak bi hafta olarak tespit edilmiştir (Chen et al., 2009). PAMAM ile modifiye BNNT'lerin ve modifiye edilmeyen BNNT'lerin sudaki dağılımı Şekil 3.3'de verilmiştir.



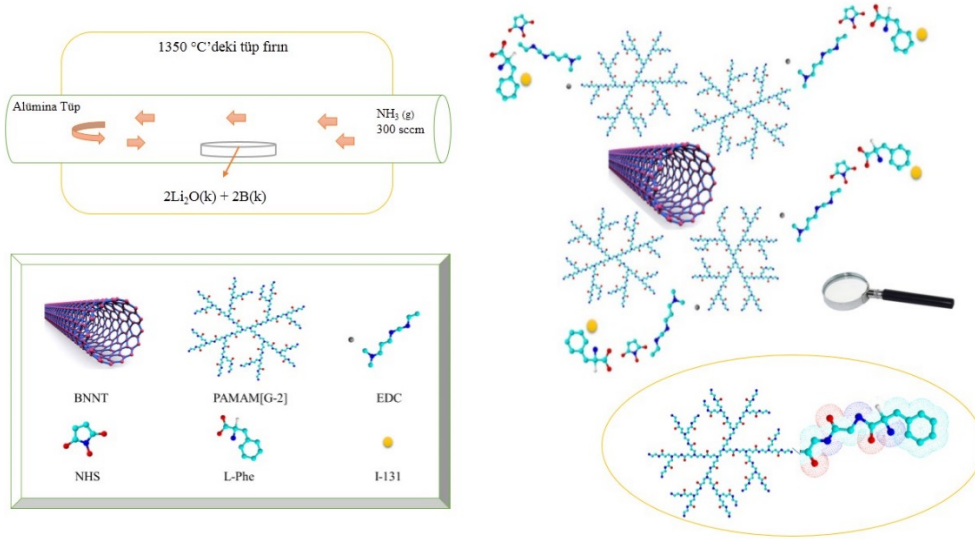
Şekil 3.3. a) BNNT/PAMAM[G-2] kolloid ve b) BNNT çökelek görüntüleri.

3.2.4. PAMAM ile Modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe Kojugasyonu

4 mg BNNT/PAMAM [G-4] veya BNNT/PAMAM [G-2] konjugatı 20 mM EDC, 50 mM NHS, 4 mg L-Phe 1 mL MES tamponunda dağıtıldıktan sonra 15 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. Üzerine 1,4 µL 2-merkaptetanol eklenerek 2 saat oda sıcaklığında üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edildi. Bağlanmayan L-Phe

üç kez distile su ile yıkanıp 15000 rpm’de santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4°C’de depolanmıştır.

BNNT sentezi, modifikasyonları ve radyoiyotinasyonu sonrası ulaşılması tasarlanan model Şekil 3.4’te verilmiştir.



Şekil 3.4 L-Phe konjuge PAMAM modifiye BNNT’lerin tasarımı modeli.

3.2.4.1. L-Phe Bağlanma Veriminin HPLC Yöntemi ile Tayini

L-Phe konjugasyon sonrasında nanoparçacıklar 1 mL distile su ile 1 dakika vortekslelendikten sonra 15000 rpm’ de 25 °C’de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Çökelekler tekrar 1 mL distile suda dağıtılarak bu işlem beş kez tekrarlanmıştır. Ex:340nm Em:450 nm’de Mobil faz A: 40mM Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat pH=7,8, %0,005 Sodyum Azid; Mobil faz B: Asetonitril/Metanol/Su 40:40:20, 1.3 mL/dakika akış hızı koşullarında 0–5–10–20–50 µg/mL konsantrasyonlarında L-Phe için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur ve konjugasyon sonrası süpernatant ile yıkama sularında nanotüplere bağlanmayan L-Phe miktarı izlenmiş, eğri formülünden yararlanılarak bağlanma verimi hesaplanmıştır.

3.3. Sentez ve Konjugasyon Ürünlerinin Karakterizasyonu

BNNT'lerin kimyasal yapısı için Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR) kullanılmıştır. X ışını kırınımı (XRD) sentezlenen nanotüplerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla yapılmıştır.

3.3.1. Fourier Transform Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

BNNT ve türevlerine ait kızılötesi (infrared; IR) soğurma spektrumları Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde (Perkin Elmer Spectrum BX II FTIR spektrofotometresi) alınmıştır. Analiz için minimum parçacık boyutuna sahip potasyum bromür ile örneklerden homojen bir karışım oluşturularak örnek-KBr peletleri hazırlanmıştır. Sisteme yerleştirilen peletlerin ölçümü ile örneklerin 400-4000 cm^{-1} aralığında FTIR spektrumları elde edilmiştir.

3.3.2. X Işını Kırınımı (XRD)

Sentezlenen BNNT'lerin karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla toz formunda İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Malzeme Araştırma Merkezinde XRD spektrumları incelenmiştir.

3.3.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX)

Sentezlenen BNNT ve modifikasyonlarının yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan Phillips XL30 SFEG cihazı ile SEM görüntüleri alınmıştır. Bu analizler için sentezlerin optimizasyonu sırasında alınan örnekler ile numuneler hazırlanmıştır. Numuneler reaksiyon kabının alt ve üst tabakalarından alınarak bir sentez için iki durum içerecek şekilde hazırlanmıştır. Bu doğrultuda analiz için hazırlanan numune katı olarak hazırlanmış, cihaza ait çelik plakalar üzerine yapıştırılan grafit bantların üzerine yayılmıştır. Numunedeki iletkenliği sağlamak amacıyla plakalar üzerine altın kaplama yapılmıştır. Ardından analiz için hazır olan örneğin SEM görüntüleri alınmıştır. SEM'i alınan örneklerin elementel dağılımının incelenmesi amacıyla EDX analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.4. Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Sentezlenen BNNT'lerin detaylı boyut, yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla Muğla Üniversitesi, Merkez Araştırma Laboratuvarında JEOL JEM 2100F, HRTEM cihazında görüntüleri alınmıştır. Bu analiz için hazırlanan numune katı olarak hazırlanmış metanolde dağıtılarak 30 dakika sonikasyonda inkübe edilmiştir. Süspanse edilen örnek bakır gridler üzerinde damlatılmıştır ve 3 dakika çözgenin buharlaşması beklenmiştir. Ardından analiz için hazır olan örneğin TEM görüntüleri alınmıştır.

3.3.5. Zeta Potansiyel Analizi

BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], PAMAM[G-2], L-BPA ve L-Phe örnekleri için yük dağılımını incelemek amacıyla zeta potansiyel analizi Malvern NanoZS ile gerçekleştirilmiştir. Analizlenecek örneklerden (40 µg/µL) 100 µl alınarak 1 mL distile suda disperse edilerek tek kullanımlık berrak zeta küvetinde 25 °C'de ölçüm en az üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.4. BNNT'lerin ¹³¹I ile İşaretlenmesi

¹³¹I ile radyoişaretleme çalışması

BNNT, BNNT/PAMAM[G-2], BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-4], BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe, L-BPA, L-Phe'nin ¹³¹I ile işaretleme çalışmaları için iodojen yöntemi kullanılmıştır. 100 µg örnek, 100 µCi ¹³¹I ile 250 µg/µL iodojen ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

¹²⁵I ile radyoişaretleme çalışması

¹²⁵I ile radyoiyotinasyon için de iodojen yöntemi kullanılmıştır. 250 µg iodojen 250 µL diklorometanda çözölmüş ve cam tüplerin içine konulmuştur. Çözgen hava akımında oda sıcaklığında buharlaştırıldıktan sonra iodojen tüpün tabanını film şeklinde kaplamıştır. Bu film kaplı tüplere 50 µg/50 µL örnek konulmuştur ve 50 µCi ¹²⁵I ilave edilmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek radyoiyotinasyon gerçekleştirilmiştir.

¹²⁷I ile işaretleme çalışması

1 mol BNNT/PAMAM [G-2] ve türevleri, 2 mol KI: 1 mol iodojen oranlarında ilk olarak hazırlanan iodojen tüpüne örnek ve KI ilave edildi. Tüp 4 °C ve karanlıkta 12 saat inkübe edildikten sonra örnek iodojen ortamından ayrıldı.

3.4.1. Kalite Kontrol Çalışmaları

3.4.1.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografisi

İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) için Whatman Kromatografi kağıtlarından, kalınlıkları 0.1 mm olan 20x20 cm boyutlarındaki tabakalar kullanılmış ve bu tabakalar 1.2x10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Kromatografi kağıdı olarak selüloz kağıt kullanılmıştır. Bu kağıtların uygulama noktaları 1 cm mesafe ile 1 µL ¹³¹I⁻, yükseltgenmiş iyot (¹³¹I⁺), ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-4], ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe, ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-2], ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ¹³¹I/L-Phe, ¹³¹I/L-BPA, ¹²⁵I⁻, yükseltgenmiş iyot (¹²⁵I⁺), ¹²⁵I/BNNT/PAMAM[G-4], ¹²⁵I/BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe, ¹²⁵I/BNNT/PAMAM[G-2], ¹²⁵I/BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ¹²⁵I/L-Phe, ¹²⁵I/L-BPA damlatılarak banyo çözeltisinde yürütülmüştür.

Banyo çözeltisi optimizasyonu için örnekler 50 µg/50 µL BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe, 250 µg iodojen ve 100 µCi ¹³¹I; 50 µg/50 µL BNNT/PAMAM [G-4], 250 µg iodojen ve 100 µCi ¹³¹I; L-Phe 5 µg/50 µL, 250 µg iodojen ve 100 µCi ¹³¹I koşullarında iodojen yöntemi ile radyoişaretlenmiştir. 10 farklı banyo çözeltisi kullanılarak bu çözgenlerde yürütülen TLRC'lerin TLC Scanner (Bioscan AR 2000) cihazında aktivite sayımları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan R_f (Relative Front) değeri ve işaretlenme verimleri tespit edilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda verim ve R_f değerleri kıyaslanarak optimum banyo çözeltisi tespit edilmiştir. Aşağıda optimizasyonu yapılan çözelti ve oranları açıklanmıştır.

TLRC-1: n-bütanol/distile su (2:1)

TLRC-2: n-bütanol/distile su/etil asetat (4:2:1)

TLRC-3: n-bütanol/etil alkol/0,2N NH₄OH (5:2:1)

TLRC-4: Distile su

TLRC-5: Aseton

TLRC-6: n-bütanol/distile su/asetik asit (4:2:1)

TLRC-7: izopropil alkol/distile su/asetik asit (4:2:1)

TLRC-8: Diklorometan/metanol (9:1)

TLRC-9: izopropil alkol/n-bütanol/0,2N NH₄OH (4:2:1)

TLRC-10: Metil etil keton

3.4.1.2. Kağıt Elektrofözezi

PAMAM[G-2]/L-Phe ve L-Phe bölüm 3.4’de açıklandığı gibi ¹³¹I ile radyoişaretlenmiştir. TLRC ile kalite kontrolü gerçekleştirilen örneklerin kağıt elektrofözezi ile hem kalite kontrolü hem de örneklerin yük dengeleri belirlenmiştir. Kağıt elektrofözezi çalışmalarında Gelman elektroförez cihazı kullanıldı. Elektroförez işlemi Whatman kağıtları (Whatman 1) kullanılarak yapılmıştır. Kağıtlar 1.5 x 30 cm boyutlarında kesildikten sonra anot, katot ve uygulama yapılacak olan noktalar işaretlenmiştir. Whatman kağıtlar elektroförezde uygulanacak çözelti ile ıslatıldıktan sonra elektroförez kabına yerleştirilmiştir. Uygulama noktasına (15 cm) 5’er µL’lik ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ¹³¹I/L-Phe, ¹³¹I⁻ ve ¹³¹I⁺ uygulanmıştır. Banyo çözeltisi olarak optimum çözelti olan TLRC-1: n-bütanol/distile su (2:1) çözeltisi içinde 300 V’luk gerilim altında 120 dakika elektroförez işlemi uygulanmıştır. Süre sonunda kağıt şeritler elektroförez kabından çıkarılarak kurutulmuştur. Örneklerin TLC Scanner (Bioscan AR 2000) cihazında aktivite sayımları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan R_f (Relative Front) değeri ve işaretlenme verimleri tespit

edilmiştir. Örneklerin uygulama noktasından anot ya da katoda yürümeleri incelenerek yükleri hakkında bilgi edinilmiştir.

3.4.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi Yöntemi

Radyoiyotinasyonun kalite kontrolü için HPLRC yöntemi kullanılmıştır. ^{131}I ile işaretli örneklerin radyoiyotinasyon verimi kalite kontrolünün gerçekleştirilmesi amacıyla TLRC yöntemine referans olarak HPLRC yöntemi kullanılmıştır. Bu amaç doğrultusunda ^{131}I , yükseltgenmiş iyot ($^{131}\text{I}^+$), $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ ve $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ numunelerinin enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ölçümler 1 mL/dakika akış hızında, bidistile su/metanol/izopropanol (50:45:5) mobil fazı kullanılarak C-18 kolon ile gerçekleştirilmiştir. (LC-10ATvp quaternary pump, DAD dedektör, autosampler (SIL-20A HT), Raytest (1x1) NaI dedektörü kullanılarak ölçümler 254 nm’de 25 °C’de gerçekleştirilmiştir.

3.4.1.4. ^{131}I İşaretli BNNT ve Türevlerinin Lipofilite Tayini

Bu çalışmada $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM} [\text{G}-2]$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM} [\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ örneklerinin lipofilite tayini yapılmıştır. Bunun için 3.4’de verilen koşullarda ^{131}I radyoizotopu ile BNNT ve türevlerinin radyoiyotinasyonu gerçekleştirildikten sonra 100 µL işaretli bileşikten alınarak içerisinde 300 µL n-oktanol ve 300 µL pH: 7.0 fosfat tampon çözeltisi bulunan tüplere ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında karıştırmanın ardından 2500 rpm de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında alt faz (su) ve üst faz (oktanol) ayrılarak radyoaktiviteleri Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayılmıştır. Log P değerleri bu fazlardaki aktivite değerleri oranlanarak hesaplanmıştır. Denemeler her bir örnek en az için üç kez tekrar edilmiştir.

3.4.1.5. Stabilite Tayini

$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$ ve $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ ’nın stabilitesini tespit etmek için 50 µg/50 µL örnekler 3.4’de verilen koşullarda iodojen yöntemi ile radyoiyotlandıktan sonra iodojenden uzaklaştırılarak reaksiyon durdurulmuştur. Örnekler 37°C’de 24 saat inkübe

edilmiştir. 0, 1, 2, 4, 8 ve 24. saatte örnekler alınıp, işaretleme verimi n-bütanol/distile su (2:1) banyo çözeltisi kullanılarak TLRC yöntemiyle ile tespit edilmiştir.

3.5. *In Vitro* Uygulamalar

3.5.1. U87-MG ve C8-D1A Hücre Dizinleri

U87-MG (İnsan Beyin Glioblastoma-Astrosit) (HTB-14) hücrelerini çoğaltmak amacıyla % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Non Esansiyel Amino Asit, % 1 Sodyum Pirüvat, % 1 L-Glutamin içeren Min. Essential Medium (MEM Eagle) medium'u kullanılmıştır. C8-D1A (Fare Beyin Astrosit) (CRL 2541) hücreleri için % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Non Esansiyel Amino Asit, % 1 Sodyum Pirüvat, % 1 L-Glutamin içeren Dulbecco's MEM medium'u kullanılmıştır. 75 cm²'lik flasklarda çoğaltılan hücreler % 80 konflue olduktan sonra Tripsin EDTA çözeltisi kullanılarak yüzeyden enzimatik yöntem ile ayrılmıştır. Canlı hücre sayıları tripan mavisi ve neubauer lamı kullanılarak yapılmış ve deneyler için gerekli olan plakalar hazırlanmıştır.

3.5.2. Sitotoksosite Çalışması

BNNT/PAMAM [G-4], BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe, BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe, L-BPA, ¹²⁷I/BNNT/PAMAM [G-2], ¹²⁷I/BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ¹²⁷I/L-BPA ve ¹²⁷I/L-Phe numuneleri için farklı konsantrasyonlarda (10-20-30-50-100-250-500-1000 ng/mL, 1-5-25-100-500-1000 ng/mL, 0,5-1-5-10-50-100 µg/mL) 1, 2, 24 ve 48 saat için canlılık testi WST-8 yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bunun için U87-MG ve C8-D1A hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılmış ve 96 kuyulu plakalara 1x10⁴ hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden 36 saat sonra sitotoksosite çalışması başlatılmıştır. BNNT ve türevleri 15000 rpm'de 10 dakika 25 °C'de santrifüjlendirek nanotüpler çöktürülmüştür, numuneler 2 saat ultraviyole lamba altında inkübe edilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen numuneler pH 7.0 fosfat tamponunda dağıtılarak dozların hazırlanması besiyer ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan farklı konsantrasyonlar (200 µL) kuyulara uygulanmış ve farklı zamanlarda hücrelerdeki % canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 1 set için 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücrelerin ekili olduğu kuyulara besiyer eklenmiştir. Negatif kontrol olarak hücre bulunmayan kuyulara farklı dozlarda hazırlanan numuneler eklenmiştir ve hesaplamalarda kullanılmıştır. 1, 2, 24 ve 48

saat sonra hücrelerin üzerindeki BNNT içeren besiyerler uzaklaştırılmıştır. 100 µL besiyer ve 10 µL WST-8 sitotoksosite kiti eklenip 0, 30, 60, 120, 180 ve 240. dakikalarda 450 nm ve 650 nm’de spektrofotometrik olarak ölçüm alınmıştır. Konsantrasyon ile % canlılık arasındaki ilişki incelenerek grafiği oluşturulmuştur.

3.5.3. Hücrelerde Bağlanma Verimi Çalışması

2×10^4 U87-MG hücresi ve $2,5 \times 10^4$ C8-D1A hücresi 24 kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücre konfluent olduktan sonra inkorporasyon çalışması (36 saat sonra) başlatılmıştır. Sitotoksosite çalışması sonrasında belirlenen toksik olmayan konsantrasyonlarda (2 µg madde/ kuyu) U87-MG ve C8-D1A hücre hatlarında $^{131}\text{I}^-$, $^{131}\text{I}^+$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-4], $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-4]/L-Phe, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-2], $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-2]/L-Phe, $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$, $^{125}\text{I}^-$, $^{125}\text{I}^+$, $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-4], $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-4]/L-Phe, $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-2], $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}$ [G-2]/L-Phe, $^{125}\text{I}/\text{L-Phe}$ ve $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ örneklerinin tutulumu incelenmiştir. 24 kuyulu plakaların örnek uygulama aşamasından sonrası Şekil 3.5’te gösterilmiştir. İodojen yöntemi ile konjugatlar radyoiyotlanmıştır. 2 µCi/kuyu aktivite uygulanmıştır. Belirtilen süre boyunca radyoişaretleli nanokonjugatlar hücrelerin üzerinde 37 °C’de %5 CO₂ ve % 90 nem içeren inkübatörde inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki örnekler uzaklaştırılarak iki kez 500 µL PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 200 µL RİPA çözeltisi eklenmiştir. Üzerinde RİPA çözeltisi bulunan hücreler pipet yardımı ile mekanik olarak yüzeyden kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonunun 100 µL’si alınarak üzerine 900 µL sintilasyon kokteyli eklenmiştir ve sıvı sintilasyon cihazı ile radyoaktivite sayımı gerçekleştirilmiştir. Hücre süspansiyonunun 25 µL’si alınarak üzerine 200 µL BCA kiti eklenip protein tayini yapılmıştır. Elde edilen radyoaktivite sayımı/protein oranlarından hücre başına gerçekleşen tutulum miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.5 Bağlanma verimi çalışması için Radyoiyotlu örneklerin U87-MG ve C8-D1A hücrelerine uygulanması.

3.5.4. Zamana Bağlı Bağlanma Verimi Çalışması

Zaman bağlı tutulum çalışması 8 farklı zamanda U87-MG ve C8-D1A hücreleri için denenmiştir. 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. saatlerde ^{131}I ve ^{125}I işaretli BNNT ve türevleri için % tutulum miktarları hesaplanmıştır. Radyoiyotınasyon 3.4’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir ve kalite kontrolü TLRC ile tayin edilmiştir. Tutulum çalışmaları 3.5.3’de açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.5.5. Spesifik Aktiviteye Bağlı Bağlanma Verimi Çalışması

Radyoaktivite bağımlı tutulum çalışması 5 farklı ^{125}I miktarında gerçekleştirilmiştir. 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I ile radyoişaretli BNNT ve türevlerinin tutulum çalışmaları U87-MG hücre hattında 2 saat için gerçekleştirilmiştir. Radyoiyotınasyon 3.4’de açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir ve kalite kontrolü TLRC ile tayin edilmiştir. Tutulum çalışmaları 3.5.3’de açıklandığı gibi yapılmıştır.

3.5.6. Floresan Görüntüleme Çalışması

BNNT/PAMAM[G-2], BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA her birinin konsantrasyonu 20 µg/mL olacak şekilde hazırlanır ve üzerlerine 50 µg/50 µL FITC/DMSO (5µL/dakika) damla damla ilave edilerek 8 saat 4 °C’de inkübe edilerek işaretleme çalışması gerçekleştirilmiştir. 2×10^4 U87-MG ve 2.5×10^4 C8-D1A hücreleri ekilen chamber slide üzerine örnekler uygulanmıştır ve 2 saat 37 °C % 5 CO₂ % 90 nem içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. Floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışması 10, 20, 40, 100’lük büyütmelerde yeşil ve mavi filtre ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6).

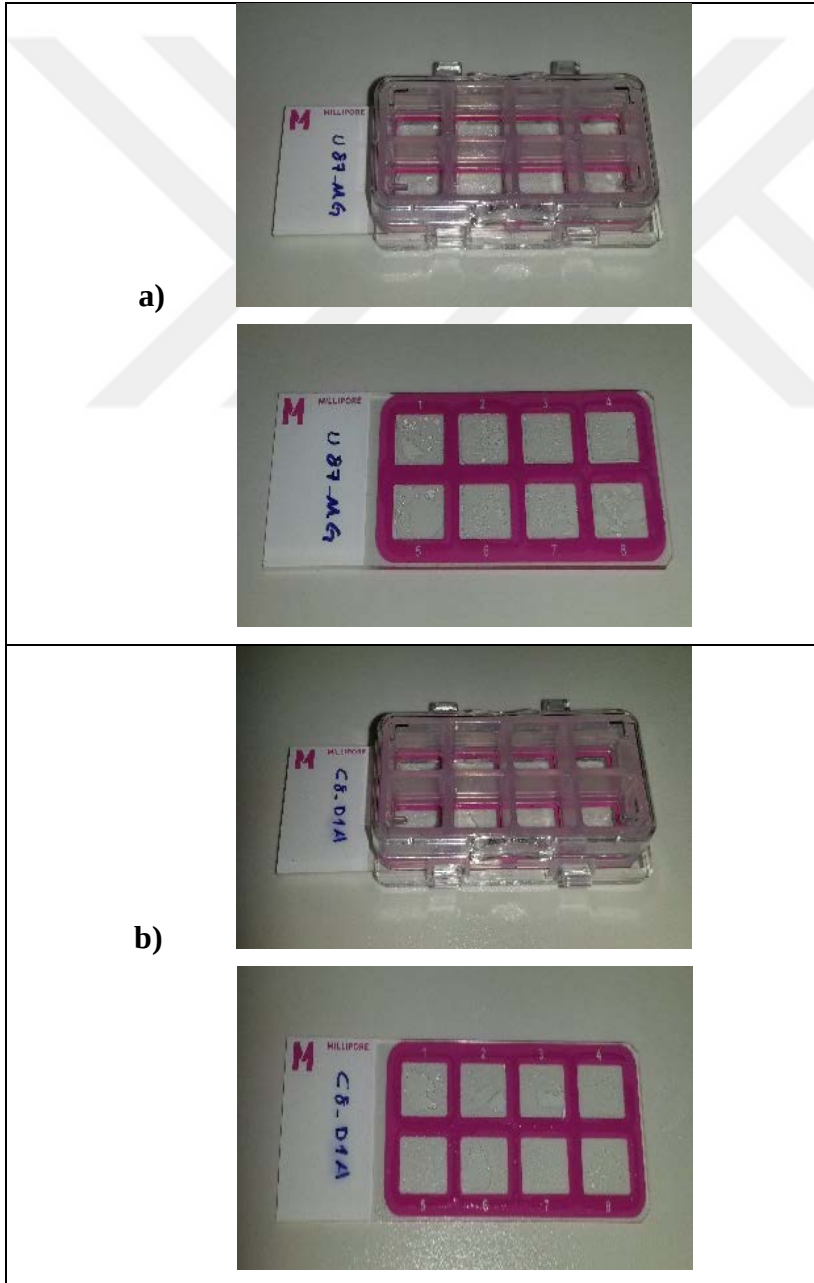


Şekil 3.6 Floresan Mikroskop

3.5.7. Apoptoz Çalışması

2×10^4 U87-MG ve 2.5×10^4 C8-D1A hücreleri ekilen chamber slide (Şekil 3.7) üzerinde hücreler konflue olduktan sonra sitotoksosite çalışması sonucu (24 saat) belirlenen IC₅₀ değerlerinde örnekler uygulanmıştır ve 24 saat 37 °C % 5

CO₂ % 90 nem içeren inkübatörde inkübe edildikten sonra hücreler yüzeye fikse edilmiştir. Fiksasyon işlemi % 4'lük paraformaldehit ve % 0,2 Triton-X100 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklara 100 µL equilibration tamponu eklenip ve 10 dakika bekletilmiştir. 90 µL equilibration tamponu, 10 µL nükleotid karışımı ve 2 µL rTdT enzimi eklenip 10 dakika inkübe edilmiştir. Lam üzerindeki sıvı uzaklaştırılmış ve üzerine plastik koruyucu kapatılmıştır. 37 °C 1 saat inkübe edilmiştir. Reaksiyonu durdurmak için 2xSSC içerisinde 15 dakika bekletilmiştir. Lamlar 5 dakika PBS ile yıkanarak bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Kontrol amacıyla DNase I kullanılarak aynı işlemler uygulanmıştır. Apoptotik etkinin incelenmesi için floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışması 100x büyütmede yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtre ile gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.7 Apoptoz çalışması a) U87-MG b) C8-D1A hücrelerine uygulanan örneklerin chamber slide görüntüsü

3.6. İstatistik Analizleri

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre için 5 ayrı denemede toplam onbeş tekrar yapıp, ortalama bağlanma değerleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Her bir parametre için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. ^{125}I ve ^{131}I 'in farklı spesifik aktivitelerde kullanılması ile elde edilen bağlanma değerlerinin incelenmesinde de lineer regresyon analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken bağlanma değerleri arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi ve Modifikasyonları

4.1.1. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi

Bor içeren pek çok bileşik BNCT ajanı olarak kullanılmaktadır (Zhi et al., 2005). Bu amaç doğrultusunda bor içeren bor nitrür nanotüpler katı hal reaksiyonu ile $\text{NH}_3(\text{g})$ atmosferinde $1400\text{ }^\circ\text{C}$ 'de CVD yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Literatür araştırmaları doğrultusunda Şekil 4.1'de görülen Lityum katalizörlüğünde gerçekleştirilen reaksiyon ile BNNT'ler sentezlenmiştir.

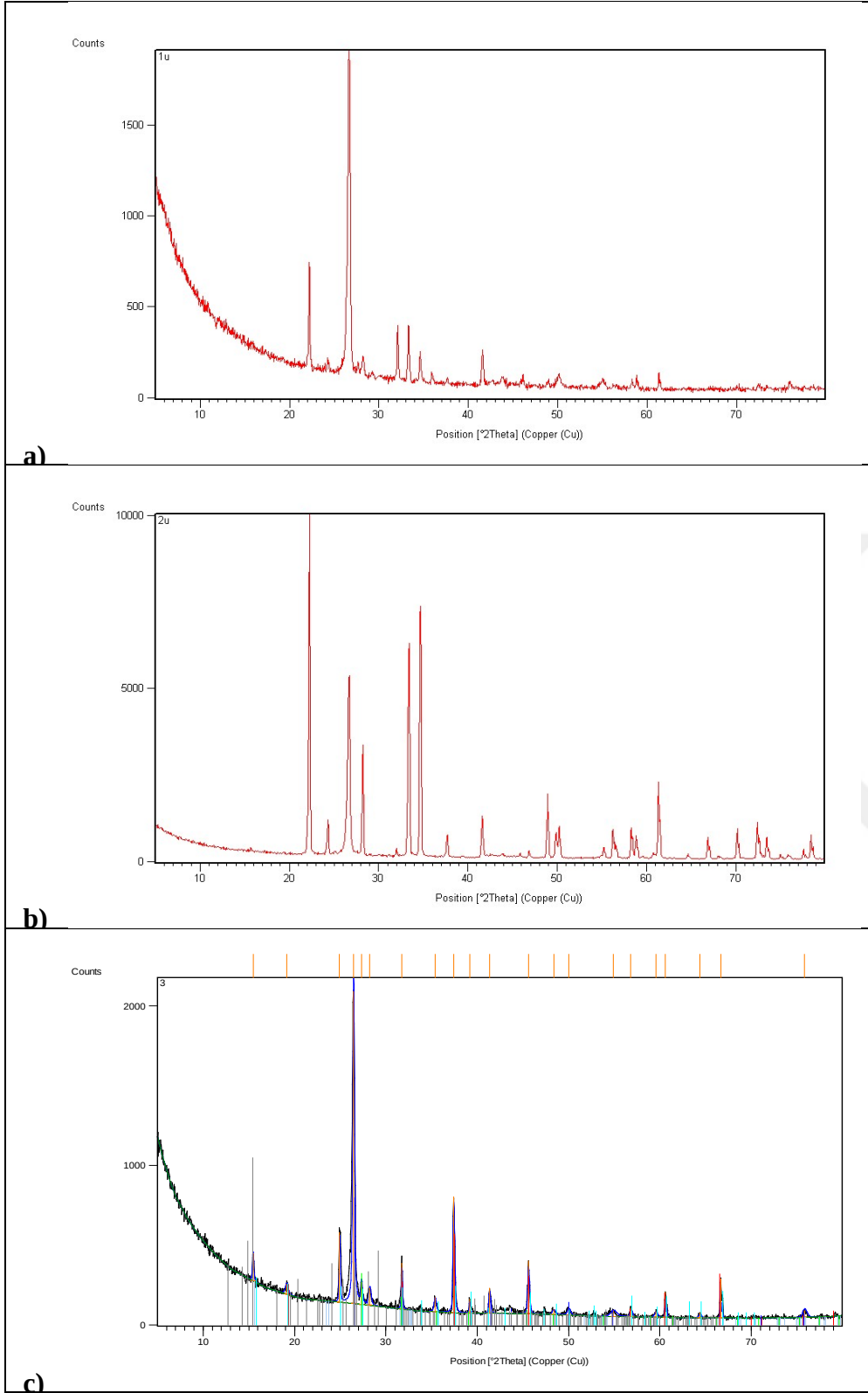


Şekil 4.1 BNNT'lerin sentez reaksiyonu

Sentezlenen BNNT'lerin yüzeysel ve yapısal özellikleri XRD, EDX, FTIR, SEM, TEM yöntemleri ile incelenmiş ve elde edilen sonuçlar literatür bilgisi ile karşılaştırılmıştır.

XRD Analizi:

Yukarıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilen sentezin karakterizasyonu XRD analizi ile gerçekleştirilmiştir. XRD ile elde edilen sonuçlar Şekil 4.2'de verilmiştir.

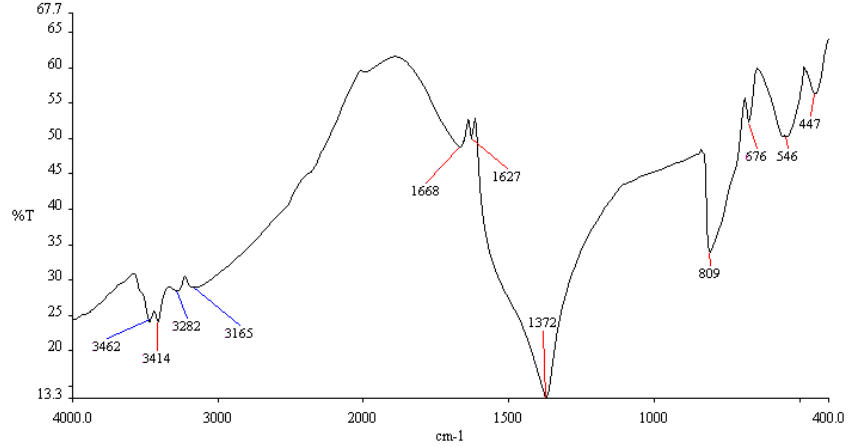


Şekil 4.2 BNNT a) üst tabaka b) alt tabaka ve c) Referans BNNT XRD modeli

XRD ile analizlenen patern (desen) literatür ile karşılaştırıldığında elde edilen kırınım piklerinin BNNT'e ait olduğu tespit edilmiştir. Zhi et al. 2005'da belirtildiği gibi 0,227 Å (Ref. Kodu 01-080-2172), 0,285 Å (Ref. Kodu 01-085-1068), 0,30 ile 0,70 aralığındaki kırınım pikleri ise LiAl_5O_8 'i (Ref. Kodu 00-017-0573) ifade etmektedir (Zhi et al., 2005). Şekil 4.2 incelendiğinde a) üst tabaka literatür ile uyumlu bulunmuştur, b) alt tabakada BN oluşumları mevcuttur ancak Al ve Li'dan kaynaklanan çok fazla safsızlık ve yan ürünün bulunduğu tespit edilmiştir.

FTIR Analizi:

Bölüm 4.1.1'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilen sentezin karakterizasyonunu gerçekleştirmek amacıyla FTIR analizi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.3'te verilmiştir. FTIR ile analizlenen örneklere ilişkin spektrumlar incelendiğinde BNNT'lerin literatür ile uyumlu olarak B-N gerilmesinden kaynaklanan karakteristik pikleri 1380 nm dalga boyunda ve 800 nm dalga boylarında gerilmeler gözlenmiştir (Mills et al., 1991; Xie et al., 2005).



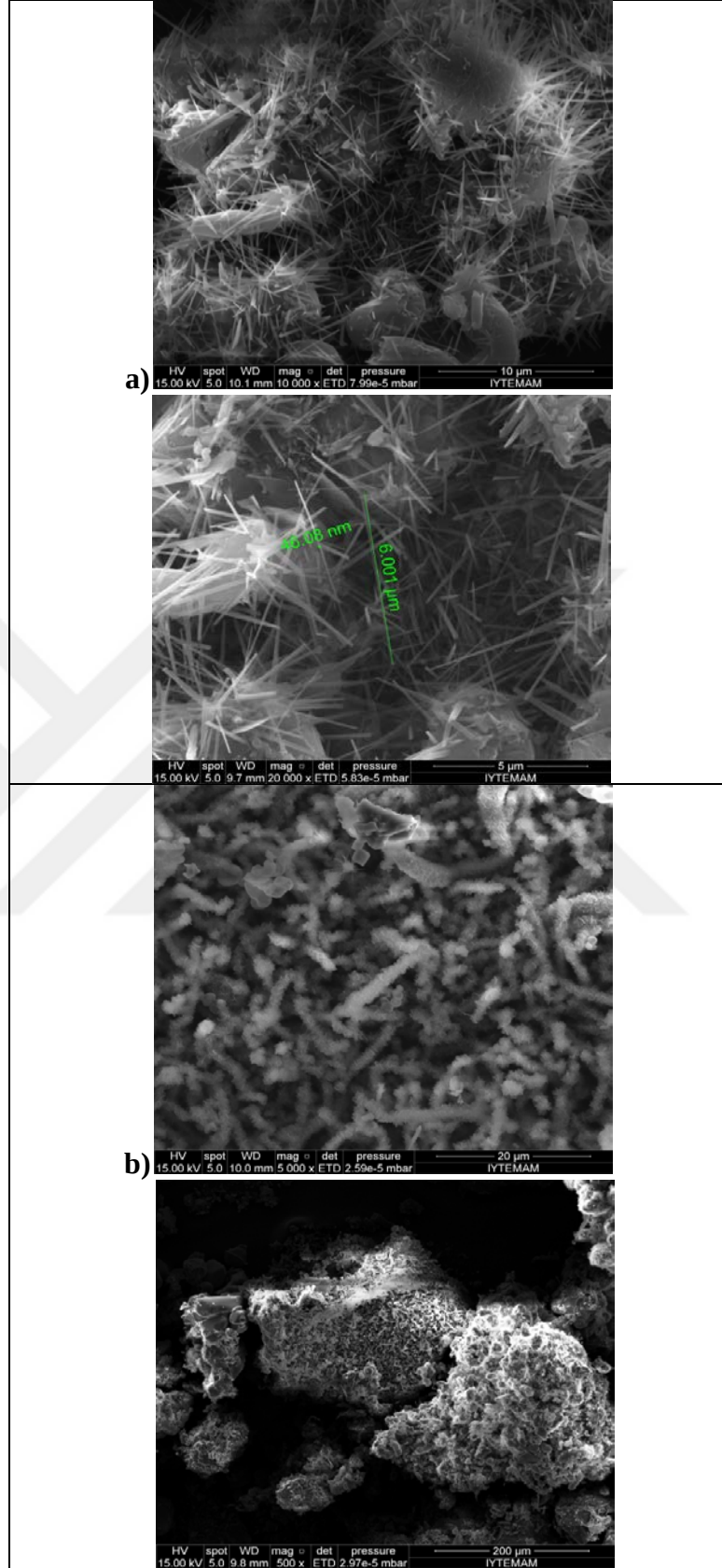
Şekil 4.3 BNNT FTIR Spektrumu

4.1.2. Bor Nitrür Nanotüp Sentezi Optimizasyonu

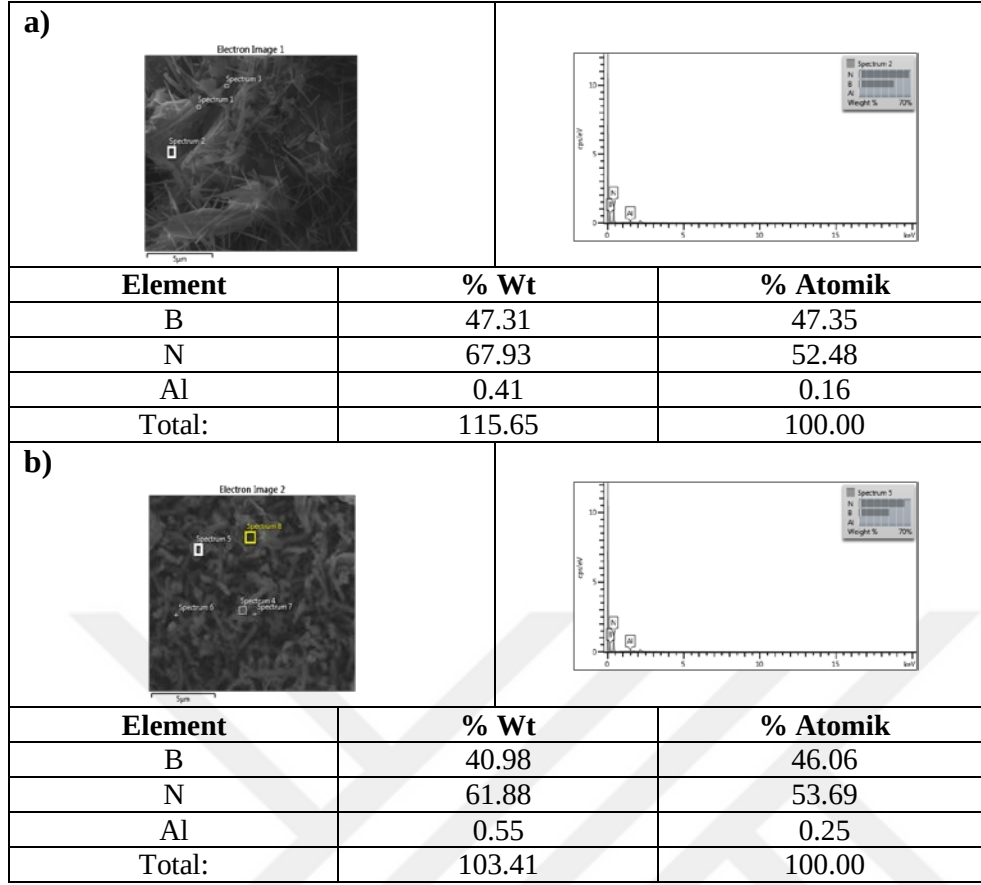
4.1.2.1. İnkübasyon Süresi Optimizasyonu

Reaksiyon süresinin bor nitrür nanotüp sentezine etkisini incelemek amacıyla iki zaman parametresi denenmiştir. İnkübasyon süresinin nanotüp oluşumuna etkisi SEM-EDX ile hem morfolojik hem de elementel içerik olarak incelenmiştir. Her bir sentez kroze yapışık olan gri tabaka (alt) ve gri tabakanın üzerinde bulunan beyaz tabaka (üst) olmak üzere iki durumda incelenmiştir. Gri tabaka $\text{NH}_3(\text{g})$ 'nın ulaşamadığı altta kalan kısım olarak ayrı tutulmuş, karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve ürün olarak kullanılmamıştır.

3 saat için elde edilen SEM sonuçları Şekil 4.4'te verilmiştir. SEM sonuçları irdelendiğinde; üst kısımda tübüler yapıların oluşmaya başladığını ancak tamamlanmadığı, orijinlerinin boyut olarak çok büyük olduğu aynı zamanda oluşan tüplerin çaplarının boyutça (50 nm) büyük olduğu tespit edilmiştir. Alt tabakaya bakıldığında tübüler yapıların oluşmaya başladığı ancak çaplarının mikron mertebesinde olduğu tespit edilmiştir. 3 saat için elde edilen EDX sonuçları Şekil 4.5'te verilmiştir. Elementel kompozisyona bakıldığında bu zaman parametresi atomca içerik için üst tabakada % 47 B ve % 53 N, alt tabakada ise % 46 B, % 54 N olarak tespit edilmiştir.

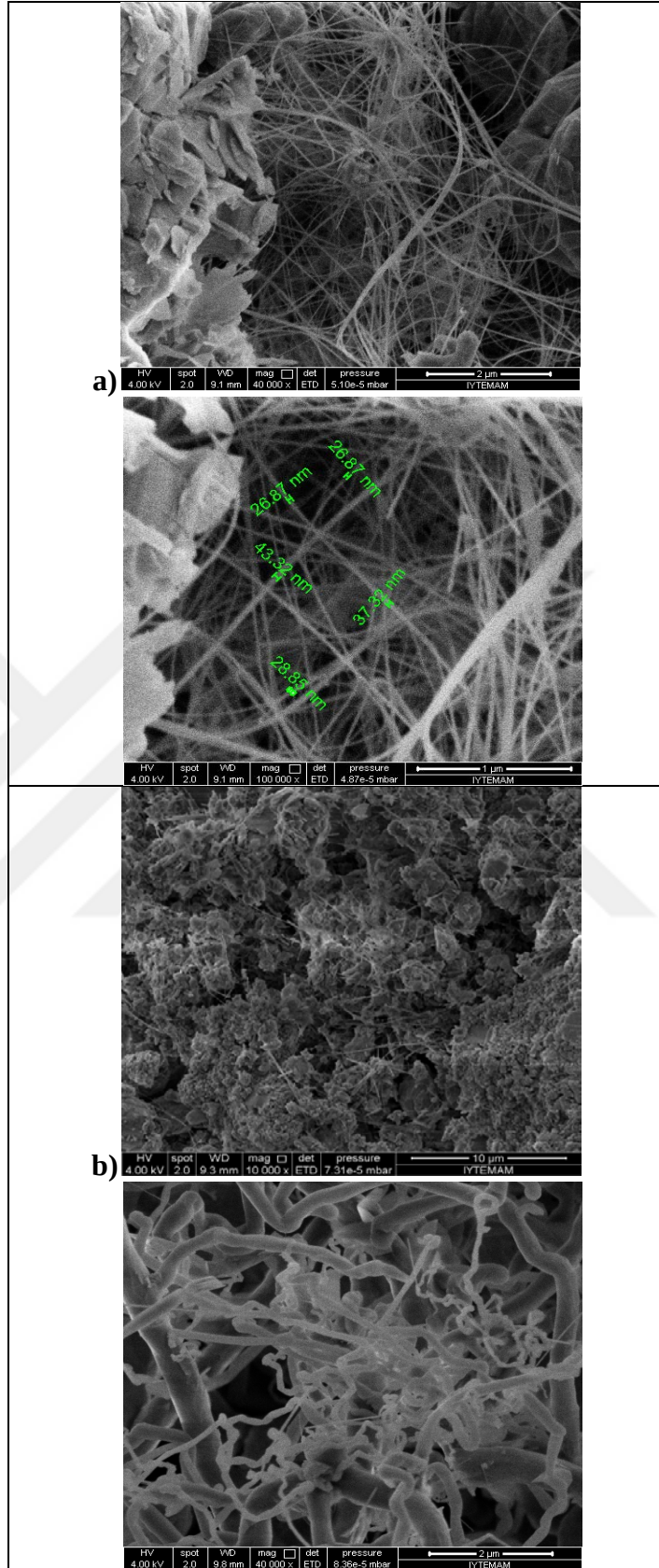


Şekil 4.4 Alümina dik krozed 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka, b) alt tabaka

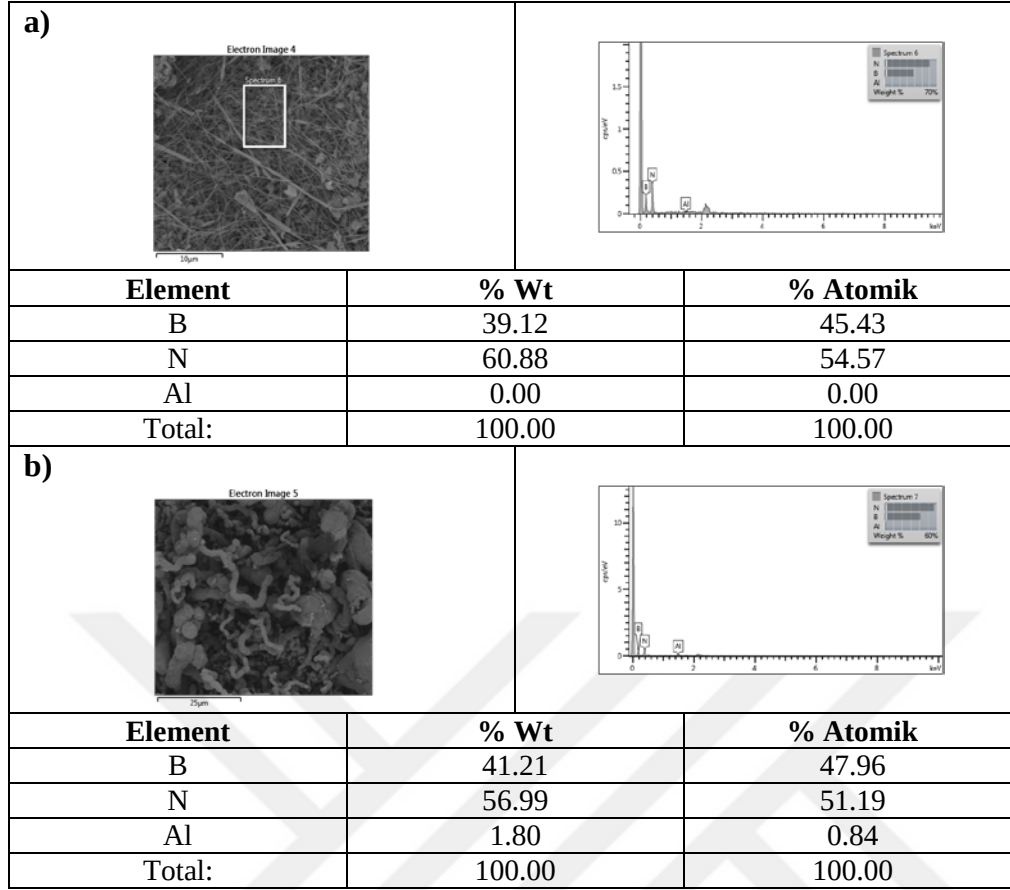


Şekil 4.5 Alümina dik krozede 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka

5 saat için elde edilen SEM sonuçları Şekil 4.6' da verilmiştir. SEM sonuçları irdelendiğinde; üst kısımda tübüler yapıların oluşmaya başladığı, tübüler yapıların 3 saate kıyasla daha iyi form alıp uzadığı ve aynı zamanda tüp çapının 3 saate göre daha (30 nm) küçük olduğu tespit edilmiştir. Alt tabakaya bakıldığında tübüler yapıların oluşmaya başladığı ancak çaplarının mikron mertebesinde olduğu tespit edilmiştir. 5 saat için elde edilen EDX sonuçları Şekil 4.7' de verilmiştir. Elementel kompozisyona bakıldığında bu zaman parametresi atomca içerik için üst tabakada % 45 B ve % 55 N, alt tabakada ise % 48 B, % 52 N olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.6 Alümina dik krozed 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka, b) alt tabaka



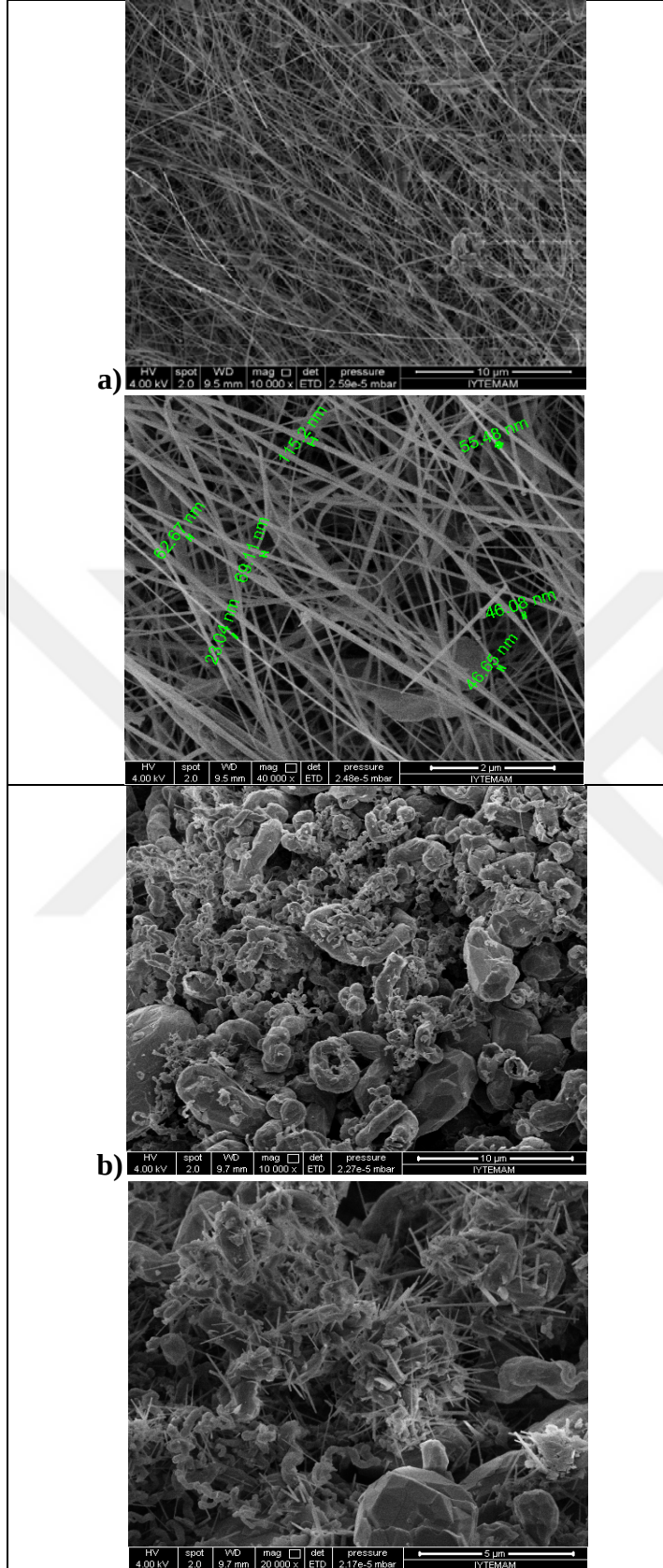
Şekil 4.7 Alümina dik kroze 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka

4.1.2.2. Reaksiyon Kabı Optimizasyonu

Reaksiyon kabının bor nitrür nanotüp sentezine etkisini incelemek amacıyla alümina dik kroze ve alümine kayık kroze olmak üzere 2 farklı tipte reaksiyon kabı denenmiştir. Bu iki tip kroze iki farklı reaksiyon süresi için denenmiştir. Bölüm 4.1.2.1'de 3. ve 5. saat için alümina dik kroze kullanılmıştır. Bu bölümde ise 3. ve 5. saat için alümina kayık kroze kullanılmıştır. Reaksiyon kabının senteze etkisi bor nitrür nanotüplerin oluşum aşamasında gazın daha fazla nüfuz etmesi ve tübüler yapıların uzanışının değişimiyle doğrudan ilişkilidir. Bu etki SEM-EDX ile hem morfolojik hem de elementel içerik olarak incelenmiştir. Her bir sentez kroze yapışık olan gri tabaka (alt) ve gri tabakanın üzerinde bulunan beyaz tabaka (üst) olmak üzere iki durumda incelenmiştir. Gri tabaka $\text{NH}_3(\text{g})$ 'nın ulaşamadığı altta kalan kısım olarak ayrı tutulmuş karakterizasyonları gerçekleştirilmiş ve ürün olarak kullanılmamıştır.

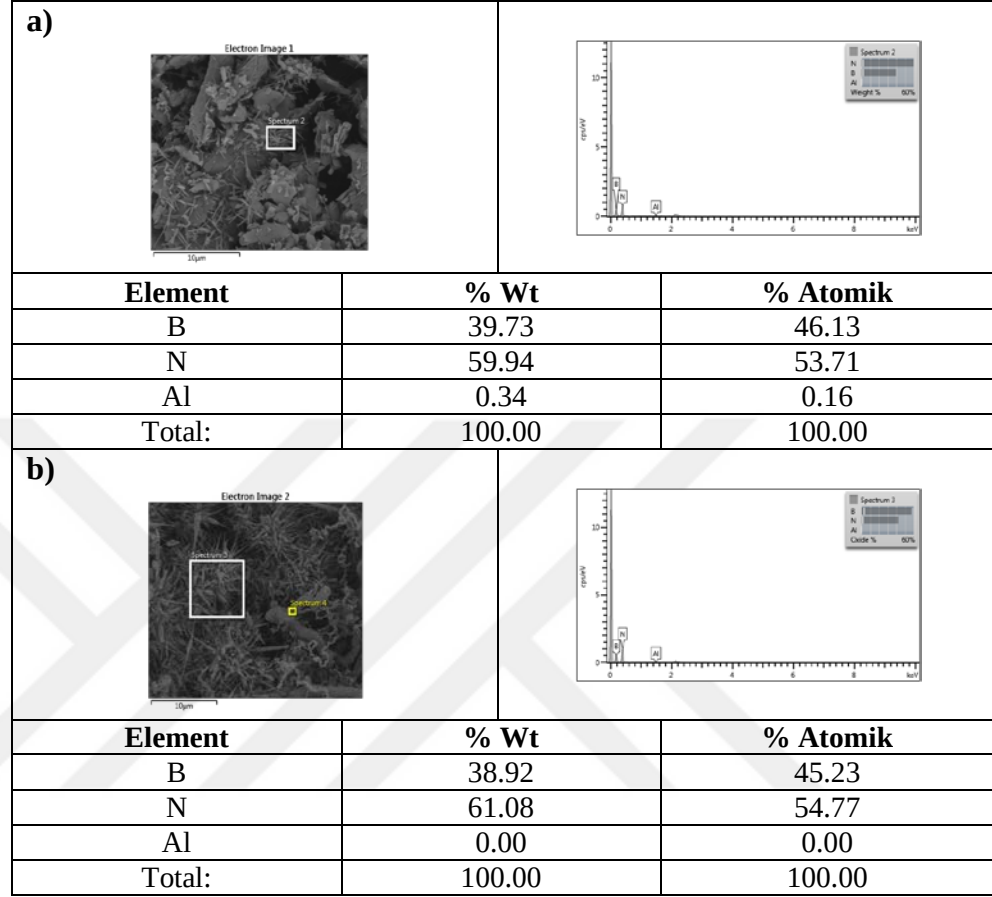
Alümina kayık kroze ile 3 saatte gerçekleştirilen sentez için elde edilen SEM sonuçları Şekil 4.8’ de verilmiştir. SEM sonuçları irdelendiğinde; üst kısımda tübüler yapıların tüp formunun tamamen oluştuğunu ve çaplarının boyutça (50 nm) büyük olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.4’ te verilen 3 saat için alümina dik kroze ile gerçekleştirilen sentez sonuçları ile kıyaslandığında kayık krozenin tübüler oluşuma direk etkisi olumlu olarak tespit edilmiştir. Alt tabakaya bakıldığında tübüler yapıların oluşmaya başladığı ancak çaplarının mikron mertebesinde olduğu tespit edilmiştir.





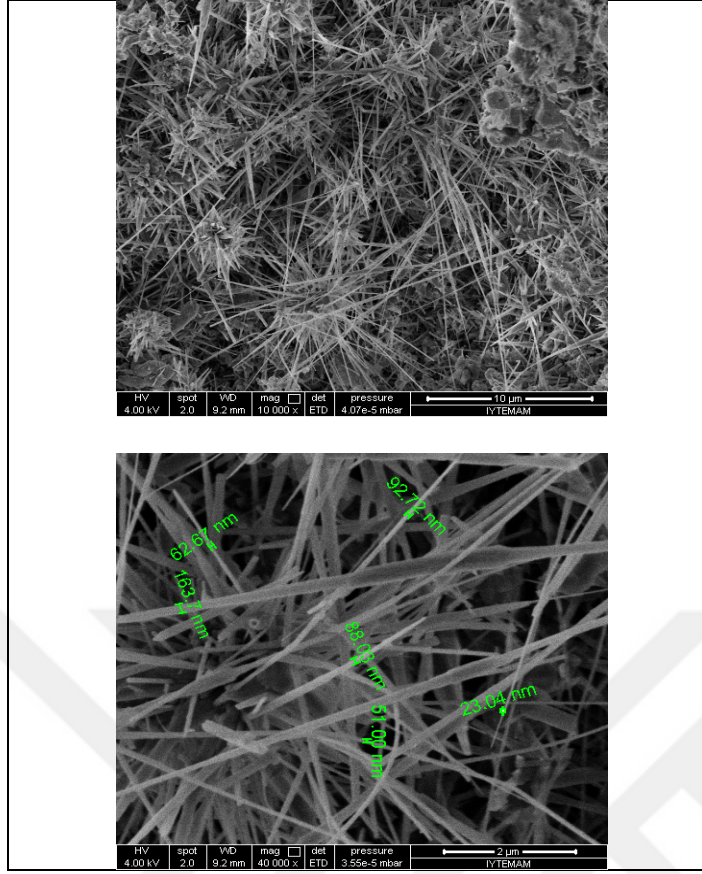
Şekil 4.8 Alümina kayık krozedde 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüleri a) üst tabaka,
b) alt tabaka

3 saat için elde edilen EDX sonuçları Şekil 4.9' da verilmiştir. Elementel kompozisyona bakıldığında bu zaman parametresi atomca içerik için üst tabakada % 46 B ve % 54 N, alt tabakada ise % 45 B, % 55 N olarak tespit edilmiştir.



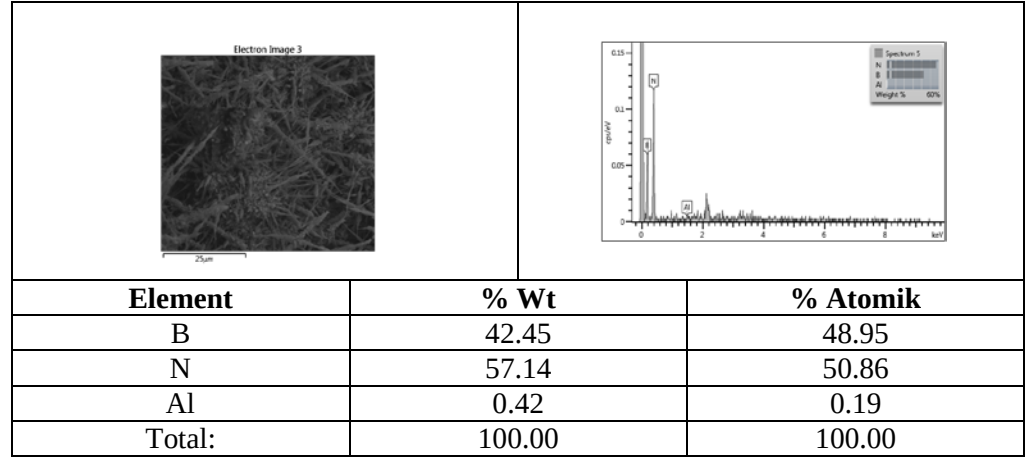
Şekil 4.9 Alümina kayak kroze 3 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları a) üst tabaka, b) alt tabaka

Alümina kayak kroze ile 5 saatte gerçekleştirilen sentez için elde edilen SEM sonuçları Şekil 4.10' da verilmiştir. SEM sonuçları irdelendiğinde; üst kısımda tübüler yapıların tüp formunun tamamen oluştuğunu ve çaplarının boyutça (25 nm) küçük olduğu tespit edilmiştir. Şekil 4.6' da verilen 5 saat için alümina dik kroze ile gerçekleştirilen sentez sonuçları ile kıyaslandığında kayak krozenin ve artan inkübasyon süresinin tübüler oluşuma direk etkisi olumlu olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.10 Alümina kayık kroze 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM görüntüsü

Alümina kayık kroze ile 5 saatte elde edilen EDX sonuçları Şekil 4.11' de verilmiştir. Elementel kompozisyona bakıldığında bu zaman parametresi atomca içerik için üst tabakada % 49 B ve % 51 N olarak tespit edilmiştir.

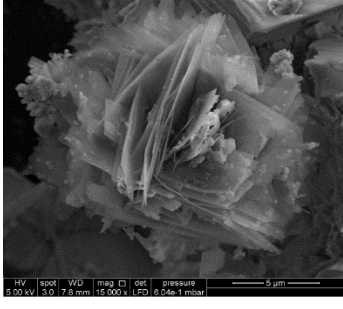
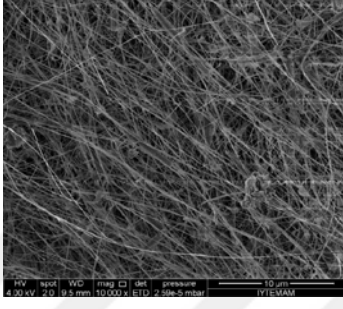
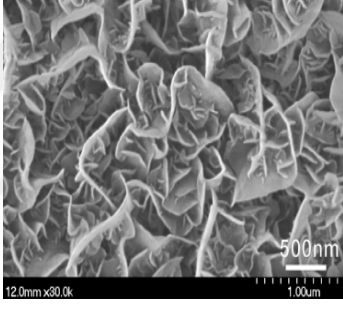
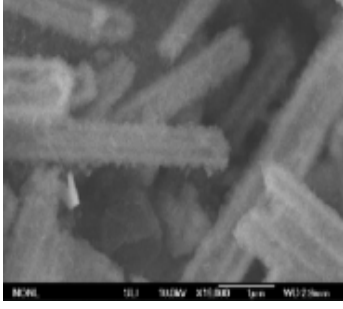
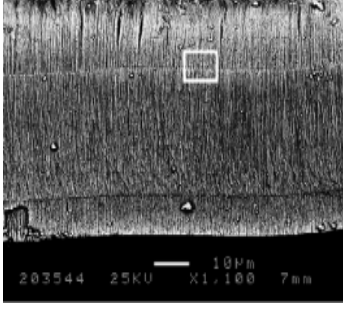


Şekil 4.11 Alümina kayık krozede 5 saatte sentezlenen BNNT'lerin SEM-EDX sonuçları

Bor Nitrür Nanotüp sentezinin tübüler morfolojinin ve boyut dağılımının homojen olduğu, aynı zamanda elementel kompozisyonca yüksek verim elde edilen 5 saat ve alümina kayık kroze kullanılan koşulları optimum olarak tespit edilmiştir.

BNNT'lerin bu tez çalışmasında gerçekleştirilen sentez metodu haricinde pek çok sentez metodu mevcuttur. Mikrodalga Plazma Kimyasal Buhar Depozisyon (MPCVD) metoduna göre reaksiyon 800°C'de gerçekleştirilmiş ve BNNT'lerin morfolojisi yaprak şeklinde bulunmuştur (Teraoa et al., 2008). 1450 °C'de sentezlenen Kimyasal Buhar Depozisyon (CVD) metodunda tübüler yapılar elde edilmiştir (Wang et al., 2007). Daha düşük sıcaklıklarda Mikrodalga Plazma Yüksek Kimyasal Buhar Depozisyon (MW-PECD) metoduyla gerçekleştirilen sentezlerde de tübüler yapılar elde edilmiştir (Guo et al., 2009; Dischino et al., 1983). Bu tez çalışmasında denenen iki metoda ilişkin sonuçlarla birlikte literatürdeki sentezlere ilişkin sonuçlar Çizelge 4.1 'de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1 BNNT'lerin çeşitli sentez metodları ve SEM görüntüleri

Metod	Katalist	Sıcaklık	SEM görüntüsü	Kaynak
Mikrodalga	B (k) HF (s)	250 °C		Mevcut Tez Çalışması
CVD (Kimyasal Buhar Depozisyon)	B (k) LiO ₂ (k) NH ₃ (g)	1350 °C		Mevcut Tez Çalışması
MPCVD (Mikrodalga Plazma Kimyasal Buhar Depozisyon)	BF ₃ (g) N ₂ (g) H ₂ (g)	800 °C		(Teraoa et al., 2008)
CVD (Kimyasal Buhar Depozisyon)	B (k) MgO (g)	1450 °C		(Wang et al., 2007)
MW-PECD (Mikrodalga Plazma Yüksek Kimyasal Buhar Depozisyon)	B ₂ H ₆ (k) Ar (g) NH ₃ /N ₂ (g)	520 °C		(Guo et al., 2009; Dischino et al., 1983)

BNNT'lerin TEM Görüntüleme Çalışması:

Optimum koşullarda sentezlenen BNNT'lerin TEM görüntüleme çalışması nanotüplerin gerçek boyutunu tespit etmek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.12' de görüldüğü gibi morfolojileri literatür ile uyumlu olarak bulunmuş (Wang et al., 2009) ve tüp çapı 25 nm olarak tespit edilmiştir.

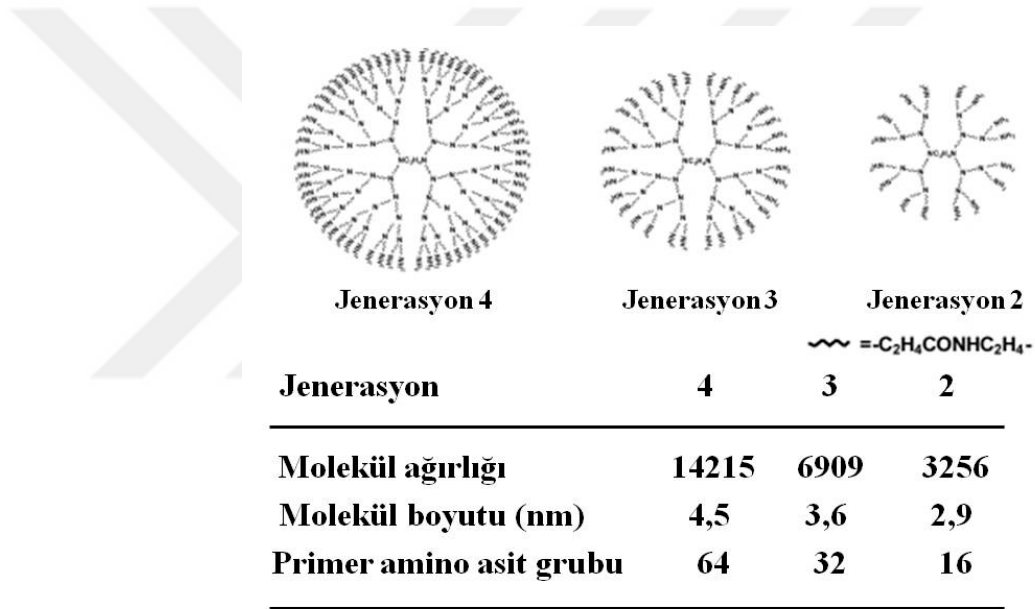




Şekil 4.12 BNNT'lerin TEM görüntüsü

4.1.3. Bor Nitrür Nanotüplerin PAMAM [G-4] / [G-2] ile Konjugasyonu

Sentezlenen nanotüplerin çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırmak, bunun yanında fonksiyonel gruplar eklemek amacıyla poli amido amid dendrimer (PAMAM) ile modifiye edilmiştir (Chen et al., 2009). PAMAM modifikasyonları için optimum koşulların belirlendiği 5 saat ve alümina kayık kroze kullanılan sentezin üst tabakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Modifikasyonlarda jenerasyon 2 ve 4 olmak üzere PAMAM'a ait iki farklı boyut ve dallanmada kullanılmıştır. Şekil 4.13' de PAMAM'a ait üç farklı jenerasyon gösterilmiştir (Arima and Motoyama, 2009).

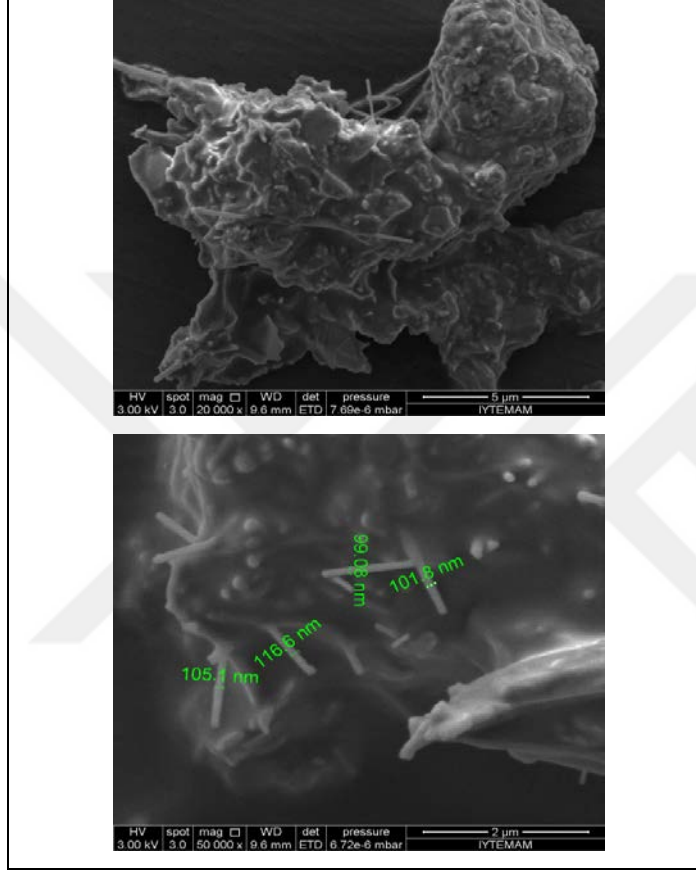


Şekil 4.13 Poli amido amid dendrimerler

Sentezlenen BNNT'lerin PAMAM [G-4] ile Konjugasyonu:

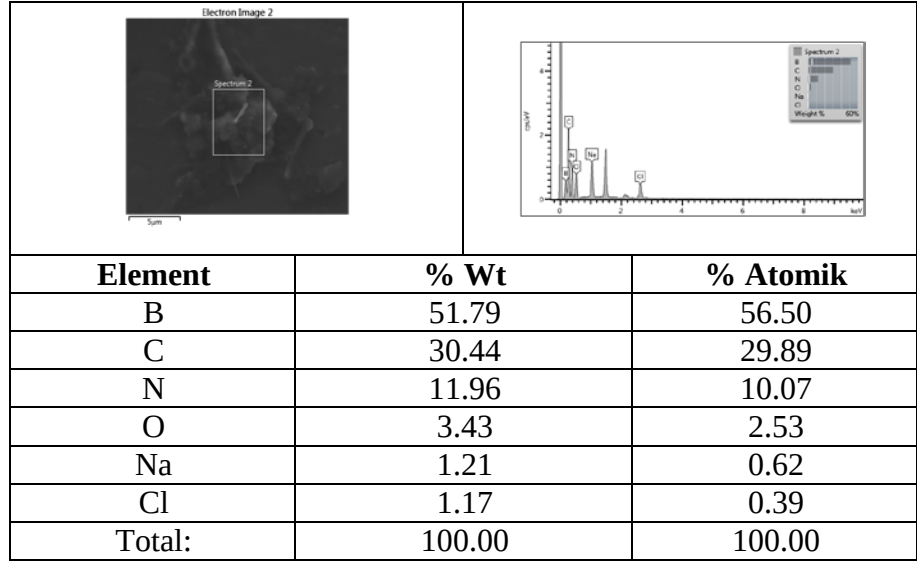
Sentezlenen BNNT'lerin 4 mg'ı 3 mM PAMAM [G-4] ile 1 mL Tris-HCl tamponunda (pH=9.0) 30 dakika 25 °C'de sonikasyon sonrasında, 24 saat 25 °C'de üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Konjugat (BNNT/PAMAM [G-4]) 3 kez distile su ile yıkanmıştır, 12500 rpm de santrifüjlenerek bağlanmayan PAMAM [G-4] uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4 °C'de depolanmıştır.

PAMAM[G-4] ile modifiye edilen BNNT'lerin yüzey ve boyut özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. SEM görüntüleme çalışması sonucunda Şekil 4.14' te görüldüğü şekilde nanotüplerin PAMAM ile kaplandığı ve yapılarında herhangi bir değişiklik olmadığı tespit edilmiştir. Bu modifikasyon sonucunda sentez ürünü olan BNNT'lerin sudaki çözünürlüğü sağlanmış olmaktadır.



Şekil 4.14 BNNT/PAMAM[G-4] SEM görüntüsü

PAMAM[G-4] ile modifiye edilen BNNT'lerin elementel kompozisyonunu karakterize etmek amacıyla EDX analizi gerçekleştirilmiştir. BNNT/PAMAM[G-4] nanokonjugatı atomca % 57 B, %10 N içermektedir. Örnek hazırlamadan kaynaklı olarak ölçüm materyali olarak kullanılan karbon bantlardan kaynaklanan % 30 gibi yüksek bir oranda C atomu içeriğinin girişi tespit edilmiştir. Şekil 4.15' de elde edilen sonuçlar BNNT'lerin (Şekil 4.11) EDX analizi ile kıyaslandığında atomca % B miktarlarının aynı olduğu ancak % N miktarındaki düşüşün ortama girişim yapan diğer atomlardan kaynaklandığı tespit edilmiştir.

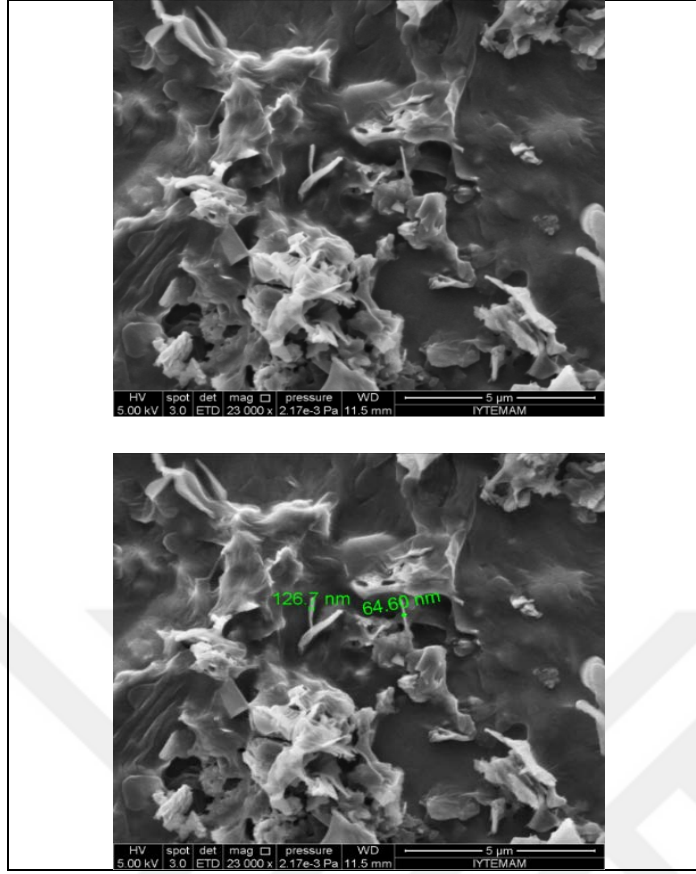


Şekil 4.15 BNNT/PAMAM[G-4] SEM-EDX sonuçları

Sentezlenen BNNT'lerin PAMAM [G-2] ile Konjugasyonu:

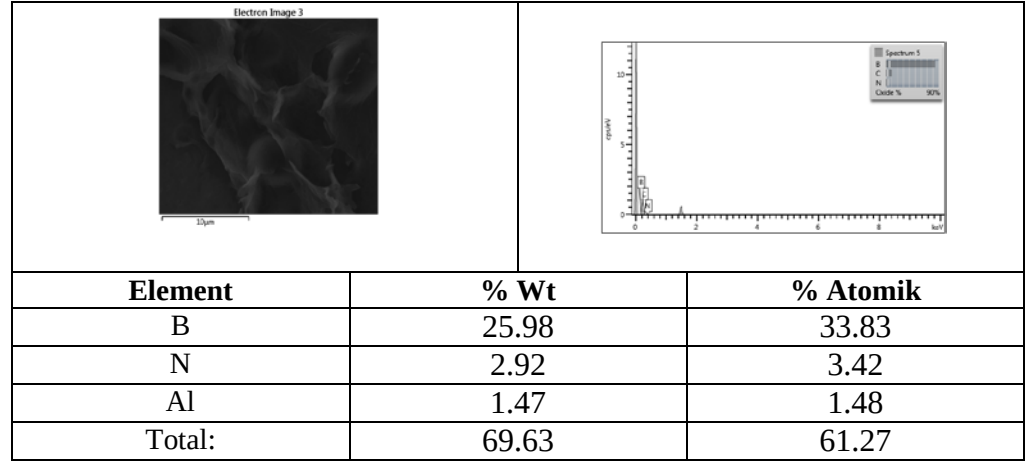
Sentezlenen BNNT'lerin 4 mg'ı 3 mM PAMAM [G-2] ile 1 mL Tris-HCl tamponunda (pH=9.0) 30 dakika 25 °C'de sonikasyon sonrasında, 24 saat 25 °C'de üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Konjugat (BNNT/PAMAM [G-4]) 3 kez distile su ile yıkanmıştır, 12500 rpm de santrifüjlenerek bağlanmayan PAMAM [G-2] uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4 °C'de depolanmıştır.

BNNT'lerin çözünürlüğünün artırılması amacıyla gerçekleştirilen PAMAM modifikasyonları aşamasında dallanmanın az olması, BNNT'leri çevreleyen dendrimerin boyutça daha küçük olması ile nanokonjugat daha küçük boyuta sahip olacaktır. Bu durumun özelliklerini incelemek amacıyla BNNT/PAMAM[G-2] nanokonjugatının yüzey ve morfolojisini izlemek için SEM görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.16' da görüldüğü gibi [G-4] ile modifiye edilen formundan daha küçük yapraklı yapılarda modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.16 BNNT/PAMAM [G-2] SEM görüntüsü

PAMAM[G-2] ile modifiye edilen BNNT'lerin elementel kompozisyonunu karakterize etmek amacıyla EDX analizi gerçekleştirilmiştir. Atomca % 34 B, % 2 N içermektedir. Ortamın inert olmamasından kaynaklı olarak oksijen atomu % 61 oranında bulunmuştur. Şekil 4.17' de elde edilen sonuçlar [G-4] ile modifiye BNNT'lerin (Şekil 4.14) EDX analizi ile kıyaslandığında dallanmalardan kaynaklı olarak jenerasyon azaldığı için ve her dallanma azot içerdiği için atomca azotta azalma tespit edilmiştir.

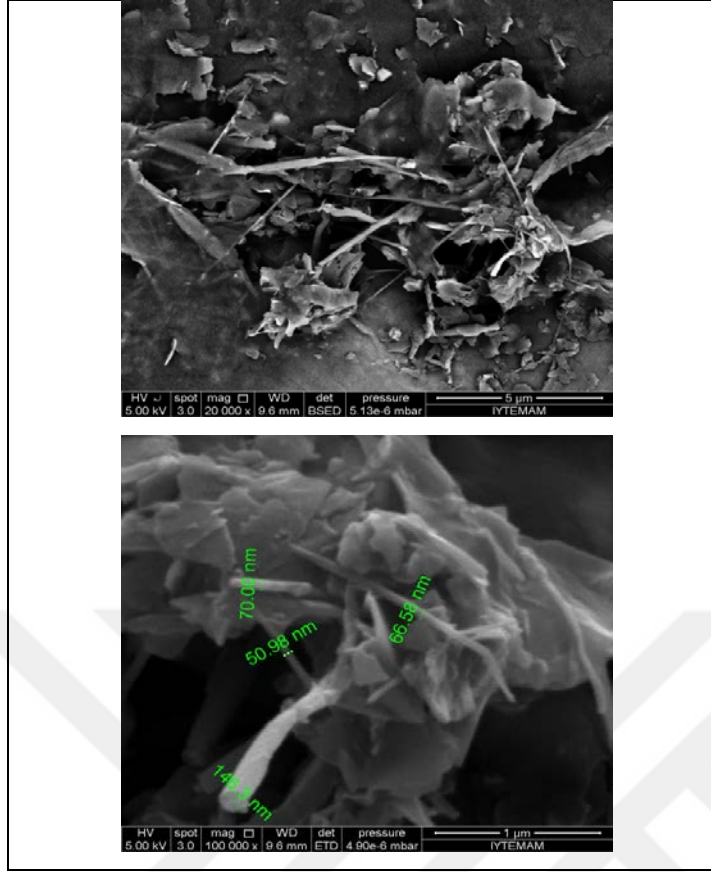


Şekil 4.17 BNNT/PAMAM[G-2] SEM-EDX sonuçları

4.1.4. PAMAM ile Modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe Kojugasyonu

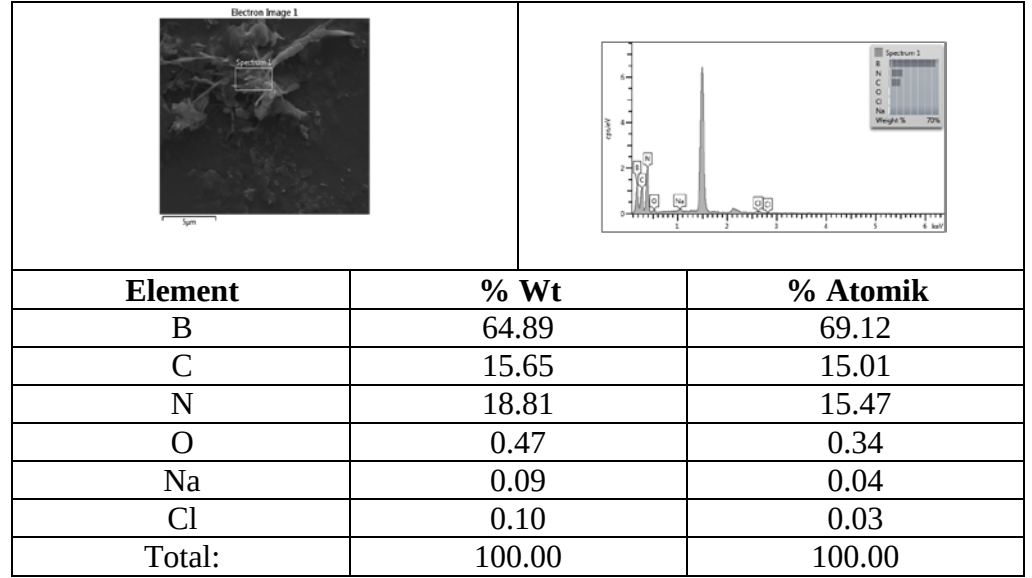
PAMAM [G-4] ile Modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe Kojugasyonu

2 mg BNNT/PAMAM [G-4] konjugatı 20 mM EDC, 50 mM NHS, 0,1 M MES, 0,5M NaCl pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır, üzerine 2 mg L-Phe ilave edilmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Üzerine 1,4 µL 2-merkaptetanol eklenerek 2 saat oda sıcaklığında üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Heister et al., 2009). Bağlanmayan L-Phe üç kez ultra saf su ile yıkanmıştır ve 12500 rpm’de santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4 °C’de depolanmıştır. PAMAM[G-4] modifiye BNNT’lerin L-Phe ile konjugasyonu sonucu elde edilen nanokonjugatın (BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe) yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.18’ de görüldüğü gibi dendrimerle çevreli nanotüplerin boyutunda herhangi bir büyüme ya da bozulmanın mevcut olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.18 BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe nanokonjugatının SEM görüntüsü

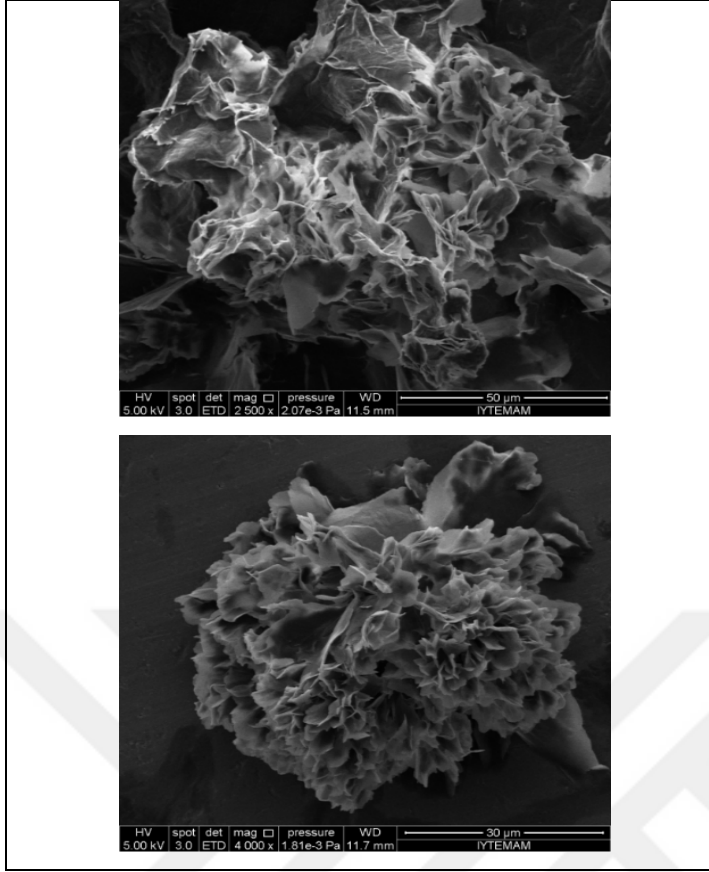
L-Phe konjuge PAMAM[G-4] ile modifiye edilen BNNT'lerin elementel kompozisyonunu karakterize etmek amacıyla EDX analizi gerçekleştirilmiştir. EDX analiz sonuçları Şekil 4.19' da verilmiştir. BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe nanokonjugatı atomca % 69 B, %15 N içermektedir. Örnek hazırlamadan kaynaklı olarak ölçüm materyali olarak kullanılan karbon bantlardan kaynaklanan % 15 gibi yüksek bir oranda C atomu içeriğinin girişimi tespit edilmiştir. Şekil 4.15' de elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında atomca % B ve % N miktarının arttığı tespit edilmiştir. İncelenen bölgelerdeki B ve N miktarlarının farklanmasından kaynaklandığı kabul edilmiştir.



Şekil 4.19 BNNT/PAMAM[G-4] SEM-EDX sonuçları

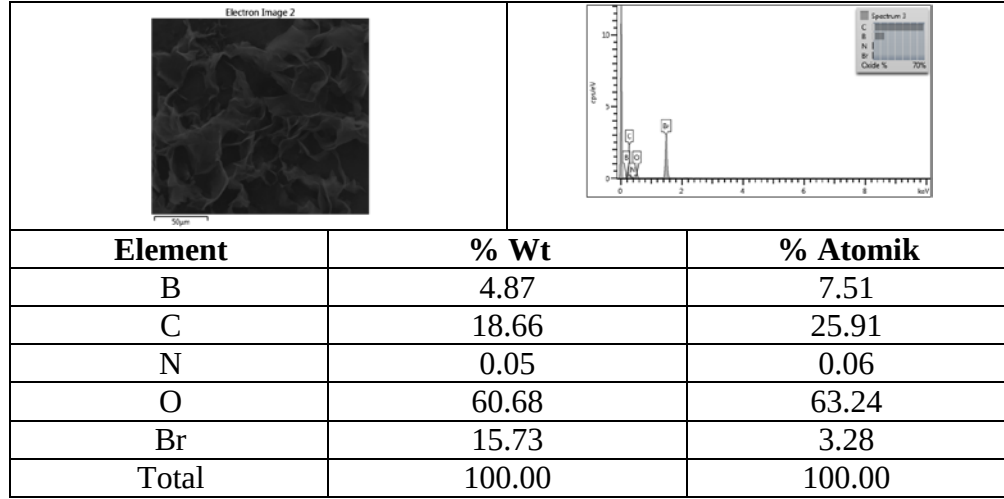
PAMAM [G-2] ile Modifiye Bor Nitrür Nanotüplerle L-Phe Kojugasyonu

2 mg BNNT/PAMAM [G-2] konjugatı 20 mM EDC, 50 mM NHS, 0,1 M MES, 0,5M NaCl pH:7.0 fosfat tamponunda hazırlanmıştır. Üzerine 2 mg L-Phe ilave edilmiştir ve 15 dakika oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Üzerine 1,4 µL 2-merkaptoetanol eklenerek 2 saat oda sıcaklığında üç boyutlu çalkalayıcıda inkübe edilmiştir (Heister et al., 2009). Bağlanmayan L-Phe üç kez ultra saf su ile yıkanmıştır ve 12500 rpm’de santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır. Çökelek ultra saf suda dağıtılarak +4 °C’ de depolanmıştır. PAMAM [G-2] modifiye BNNT’lerin L-Phe ile gerçekleştirilen konjugasyonu sonucu elde edilen nanokonjugatın (BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe) yüzey özelliklerinin incelenmesi amacıyla SEM görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.20’ de görüldüğü gibi dendrimerle çevreli nanotüplerin boyutunda herhangi bir büyüme ya da bozulmanın mevcut olmadığı tespit edilmiştir.



Şekil 4.20 BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe nanokonjugatının SEM görüntüsü

L-Phe konjuge PAMAM[G-2] ile modifiye edilen BNNT'lerin elementel kompozisyonunu karakterize etmek amacıyla EDX analizi gerçekleştirilmiştir. EDX analiz sonuçları Şekil 4.21' de verilmiştir. BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe nanokonjugatı atomca % 8 B, %1 N içermektedir. Örnek hazırlamadan kaynaklı olarak ölçüm materyali olarak kullanılan karbon bantlardan kaynaklanan % 26 gibi yüksek bir oranda C atomu ve % 63 O atomu içeriğinin girişimi tespit edilmiştir. Şekil 4.19' da [G-4] modifiye sonuçlar ile kıyaslandığında atomca % B ve % N miktarının arttığı tespit edilmiştir. İncelenen bölgelerdeki B ve N miktarlarının farklanmasından kaynaklandığı kabul edilmiştir.



Şekil 4.21 BNNT/PAMAM[G-2] SEM-EDX sonuçları

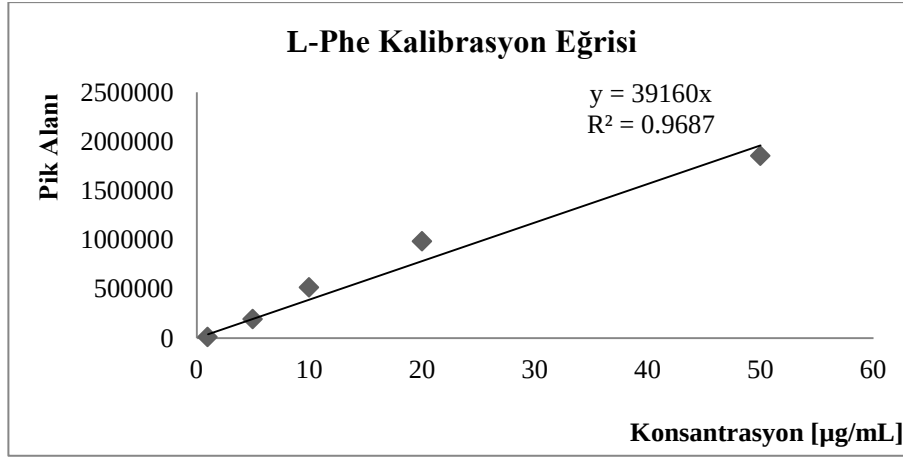
4.1.4.1. L-Phe Bağlanma Veriminin HPLC Yöntemi ile Tayini

L-Phe konjugasyon verimini hesaplamak amacıyla BNNT'lere bağlanmayan amino asitlerin dedeksiyonu izlenmiştir (Pecce et al., 2013; Yu et al., 2010). Konjugasyon sonrası bağlanmayan L-Phe'nin uzaklaştırılması amacıyla gerçekleştirilen ultra saf su ile yıkamaların 12500 rpm'de elde edilen süpernatantları toplanmış ve yıkama sularında L-Phe izlenmiştir. Bu doğrultuda ilk olarak 0,5, 10, 20 ve 50 µg/mL konsantrasyonlar için kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Enjeksiyonu gerçekleştirilen yıkama sularının verdiği spektrumlara bağlı alıkonma zamanı ve pik alanından yola çıkılarak bağlanmayan L-Phe miktarı hesaplanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda uygulanan HPLC koşulları Çizelge 4.2' de özetlenmiştir. Ex: 340 nm Em: 450 nm'de Mobil faz A: 40 mM Sodyum Dihidrojen Fosfat Monohidrat pH=7,8, %0,005 Sodyum Azid; Mobil faz B: Asetonitril/Metanol/Su 40:40:20, 1,3 mL/dakika koşullarında L-Phe ile PAMAM[G-4] modifikasyonu için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.22). Yıkama sularında L-Phe miktarı izlenmiş, kalibrasyon eğrisi kullanılarak bağlanma verimi % $72,50 \pm 3,25$ olarak bulunmuştur (n= 10).

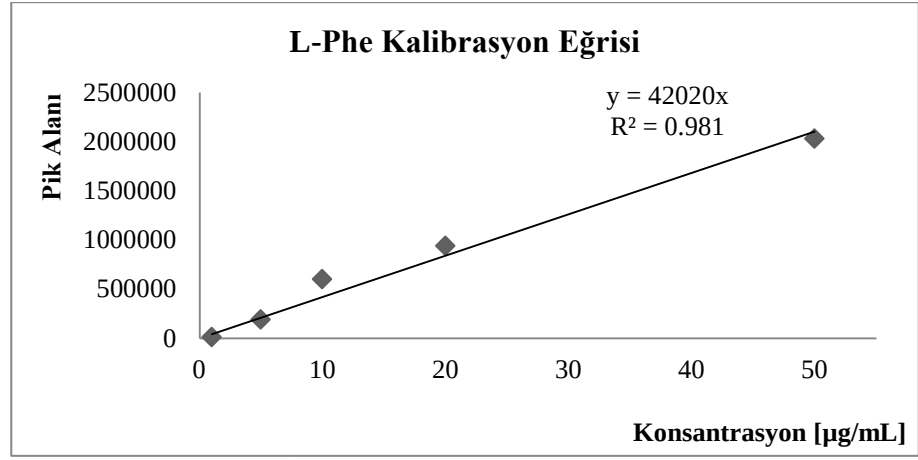
Çizelge 4.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Koşulları

Akış hızı	1,3 mL/dak		
Mobil faz A	40 mM sodyum dihidrojen fosfat monohidrat, % 0,005 sodyum azid, 10 M sodyum hidroksit ile pH 7,8'e ayarlanır		
Mobil faz B	Asetonitril/metanol/ultra saf su (40:40:20)		
Kolon	C18-ODS kolon (250x4.6 mm I.D. Gl sciences Inc.)		
Gradyent Program	Zaman (Dakika)	Mobil faz A	Mobil faz B
	00:00 – 10:00	% 75	% 25
	10:01 – 13:00	% 0	% 100
	13:01 – 20:00	% 54	% 46
Kolon fırın sıcaklığı	40 °C		
Dedektör	SPD-M20A DAD dedektör		
Dalgaboyu	203 nm		

**Şekil 4.22** L-Phe HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

L-Phe ile PAMAM[G-2] modifikasyonu için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur (Şekil 4.23). Yıkama sularında L-Phe miktarı izlenmiş,

kalibrasyon eğrisi kullanılarak bağlanma verimi % $87,50 \pm 2,50$ olarak bulunmuştur (n=10).



Şekil 4.23 L-Phe HPLC yöntemi ile oluşturulan kalibrasyon eğrisi

4.1.5. Zeta Potansiyel Analizi

PAMAM[G-2] ile modifiye edilen ve L-Phe ile konjuge edilen BNNT'ler bölüm 3.3.5'te açıklandığı gibi yük dağılımları zeta potansiyel analizi ile incelenmiştir. Zeta potansiyel analizine ilişkin elde edilen sonuçlar çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], L-BPA ve L-Phe örneklerinin zeta potansiyel sonuçları.

Örnek	Zeta Potansiyel (mV)
BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe	$11,56 \pm 1,13$
BNNT/PAMAM[G-2]	$37,80 \pm 0,61$
PAMAM [G-2]	$-16,90 \pm 0,17$
L-BPA	$22,30 \pm 1,65$
L-Phe	$-8,43 \pm 0,32$

4.2. BNNT'lerin $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

PAMAM[G-4] veya [G-2] ile modifiye edilen BNNT'lerin radyoiyotinasyon çalışmaları Bölüm 3.4'de açıklandığı gibi iodojen yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Radyoiyotinasyon çalışmalarında kullanılan örnekler BNNT ve modifikasyon ara basamaklarını içermektedir. Bununla birlikte hedeflenen nanokonjugatın ticari formu olan L-BPA'da kontrol grubu olarak radyoişaretleme çalışmalarında ve diğer uygulamalarda kullanılmıştır. Radyoiyotinasyon çalışmalarında kullanılan örnekler aşağıdaki gibidir;

$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-4}]$
$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-4}]/\text{L-Phe}$
$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]$
$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]/\text{L-Phe}$
$^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$
$^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$
^{131}I
$^{131}\text{I}^+$
$^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]$
$^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]/\text{L-Phe}$
$^{125}\text{I}/\text{L-Phe}$
$^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$
^{125}I
$^{125}\text{I}^+$

4.2.1. İnce Tabaka Radyo Kromatografi Yöntemi ile Radyoiyotinasyon Kalite Kontrolü

^{131}I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

^{131}I ile radyoişaretleme çalışmaları Bölüm 3.4'de açıklandığı gibi iodojen yöntemine kullanılarak yapılmıştır. 40 μg örnek, 100 μCi ^{131}I ile 250 μg iodojen kaplı tüpte oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

TLC için Whatman Kromatografi kağıtlarından, kalınlıkları 0.1 mm olan 20x20 cm boyutlarındaki tabakalar kullanılmış ve bu tabakalar 1.2x10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Kromatografi kağıdı olarak selüloz kağıt kullanılmıştır. Bu kağıtların uygulama noktalarına $^{131}\text{I}^-$, yükseltgenmiş iyot ($^{131}\text{I}^+$), $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-4}]$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-4}]/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$

ve ^{131}I /L-BPA kapiler boru yardımıyla damlatılarak ayırma çözeltisinde yürütülmüştür. Çözgenlerde yürütülen TLC'lerin TLC Scanner (Bioscan AR 2000) cihazında sayımları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan R_f (Relative Front) değerleri ve verimleri hesaplanmıştır.

BNNT'lerin Radyoişaretleme Çalışmalarının Optimizasyonu:

Örneklerin radyoişaretleme kalite kontrolünün gerçekleştirilebilmesi ve işaretlemenin gerçekleşip gerçekleşmediğinin tespit edilebilmesi amacıyla işaretleme koşullarının optimizasyonun yanı sıra TLRC banyo çözeltisi optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışma Bölüm 3.4'de belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir ve detayları aşağıda açıklanmıştır.

Banyo çözeltisi optimizasyonu için kullanılan BNNT'ler PAMAM[G-4] ile modifiye edilen nanotüplerdir. PAMAM[G-2] modifiye formları optimum koşullarda TLRC kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir.

En uygun ayırma koşullarının tespit edilebilmesi için banyo çözeltisi optimizasyonu yapılmıştır ve 10 farklı çözelti kullanılarak R_f ve işaretleme verimleri tespit edilmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Çizgelge 4.4' te verilmiştir. Optimizasyon çalışması sonucunda verim ve R_f değerleri kıyaslanarak optimum banyo çözeltisi olarak TLRC-1 nolu çözelti tespit edilmiştir. Aşağıda optimizasyonu yapılan çözelti ve oranları açıklanmıştır.

TLRC-1: n-bütanol/distile su (2:1)

TLRC-2: n-bütanol/distile su/etil asetat (4:2:1)

TLRC-3: n-bütanol/etil alkol/0,2N NH_4OH (5:2:1)

TLRC-4: Distile su

TLRC-5: Aseton

TLRC-6: n-bütanol/distile su/asetik asit (4:2:1)

TLRC-7: izopropil alkol/distile su/asetik asit (4:2:1)

TLRC-8: Diklorometan/metanol (9:1)

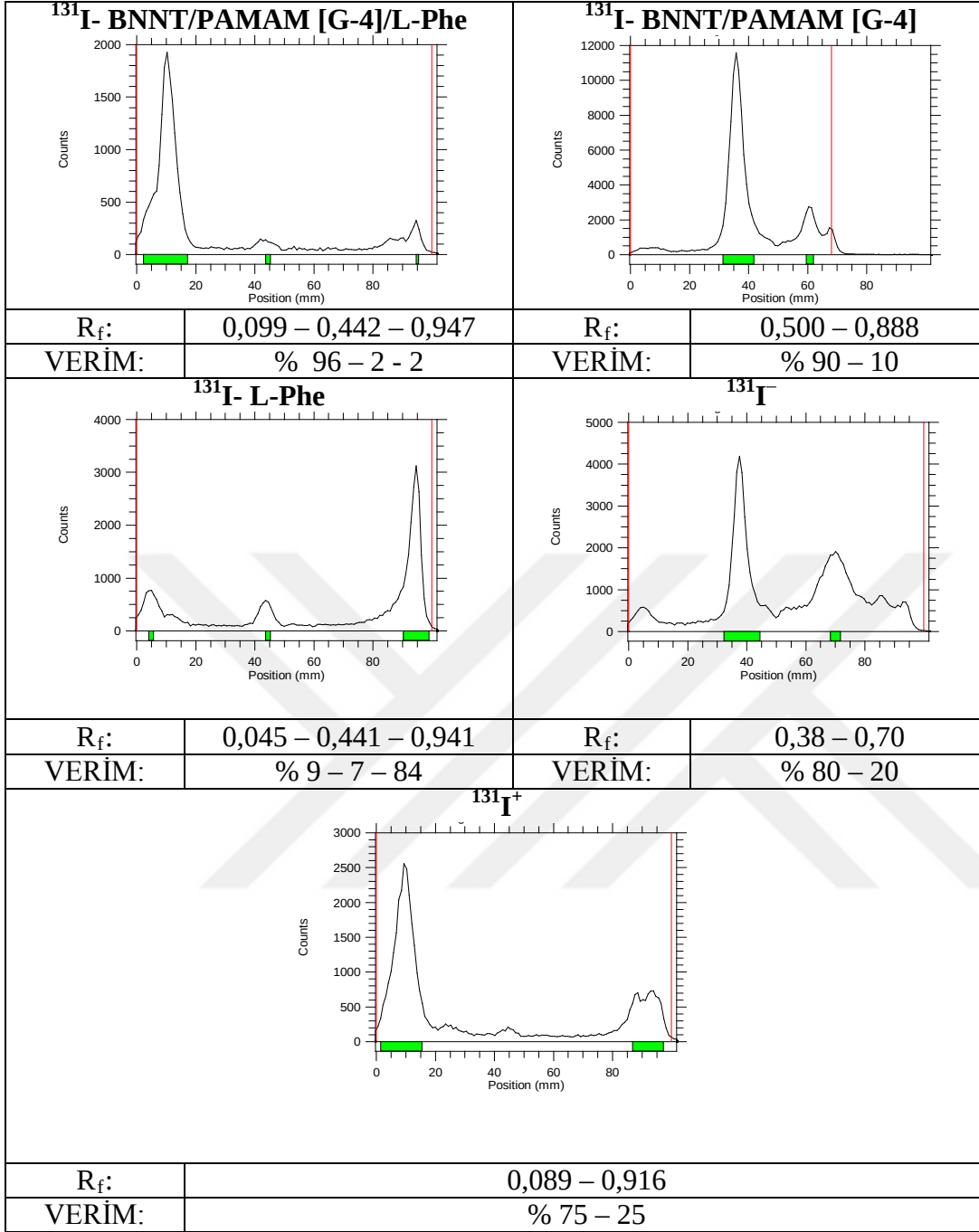
TLRC-9: izopropil alkol/n-bütanol/0,2N NH_4OH (4:2:1)

TLRC-10: Metil etil keton

Çizelge 4.4 Banyo çözeltisi optimizasyonuna ilişkin farklı çözeltiler kullanılarak karakterizasyonu yapılan örneklerin işaretlenme verimi ve R_f değerleri.

Banyo Çözeltileri		$^{131}\text{I}^-/\text{BNNT}/$ [G-4]/L-Phe	$^{131}\text{I}^-/\text{BNNT}/$ [G-4]	$^{131}\text{I}^-/\text{L-Phe}$	$^{131}\text{I}^-$	$^{131}\text{I}^+$
TLRC-1	Rf	0,099	0,500	0,941	0,380	0,089
	Verim	%96	%90	%86	%80	%75
TLRC-2	Rf	0,930	0,940	0,920	0,950	0,140
	Verim	%80	%81	%78	%70	%78
TLRC-3	Rf	0,930	0,920	0,500	0,550	0,050
	Verim	%85	%82	%45	%100	%100
TLRC-4	Rf	0,930	0,920	0,940	0,960	0,950
	Verim	%91	%90	%92	%95	%100
TLRC-5	Rf	0,100	0,200	0,050	0,970	0,073
	Verim	%78	%73	%60	%62	%98
TLRC-6	Rf	0,950	0,920	0,940	0,460	0,100
	Verim	%100	%80	%96	%100	%100
TLRC-7	Rf	0,950	0,900	0,600	0,700	0,100
	Verim	%70	%67	%75	%100	%100
TLRC-8	Rf	0,100	0,120	0,080	0,100	0,150
	Verim	%82	%80	%70	%95	%79
TLRC-9	Rf	0,950	0,920	0,700	0,600	0,100
	Verim	%100	%86	%50	%100	%100
TLRC-10	Rf	0,060	0,050	0,070	0,050	0,062
	Verim	%85	%70	%90	%80	%100

10 farklı banyo çözeltisi kullanılarak gerçekleştirilen optimizasyon sonucunda $^{131}\text{I}^-$ 'in yükseltgenmesinin gerçekleştiğini ve yükseltgenen iyotun BNNT'lere bağlandığını ifade eden sonuç TLRC 1 nolu çözgene ait olduğu tespit edilmiştir. Optimum banyo çözeltisine ilişkin TLRC kromatogramları Şekil 4.24' te gösterilmektedir.

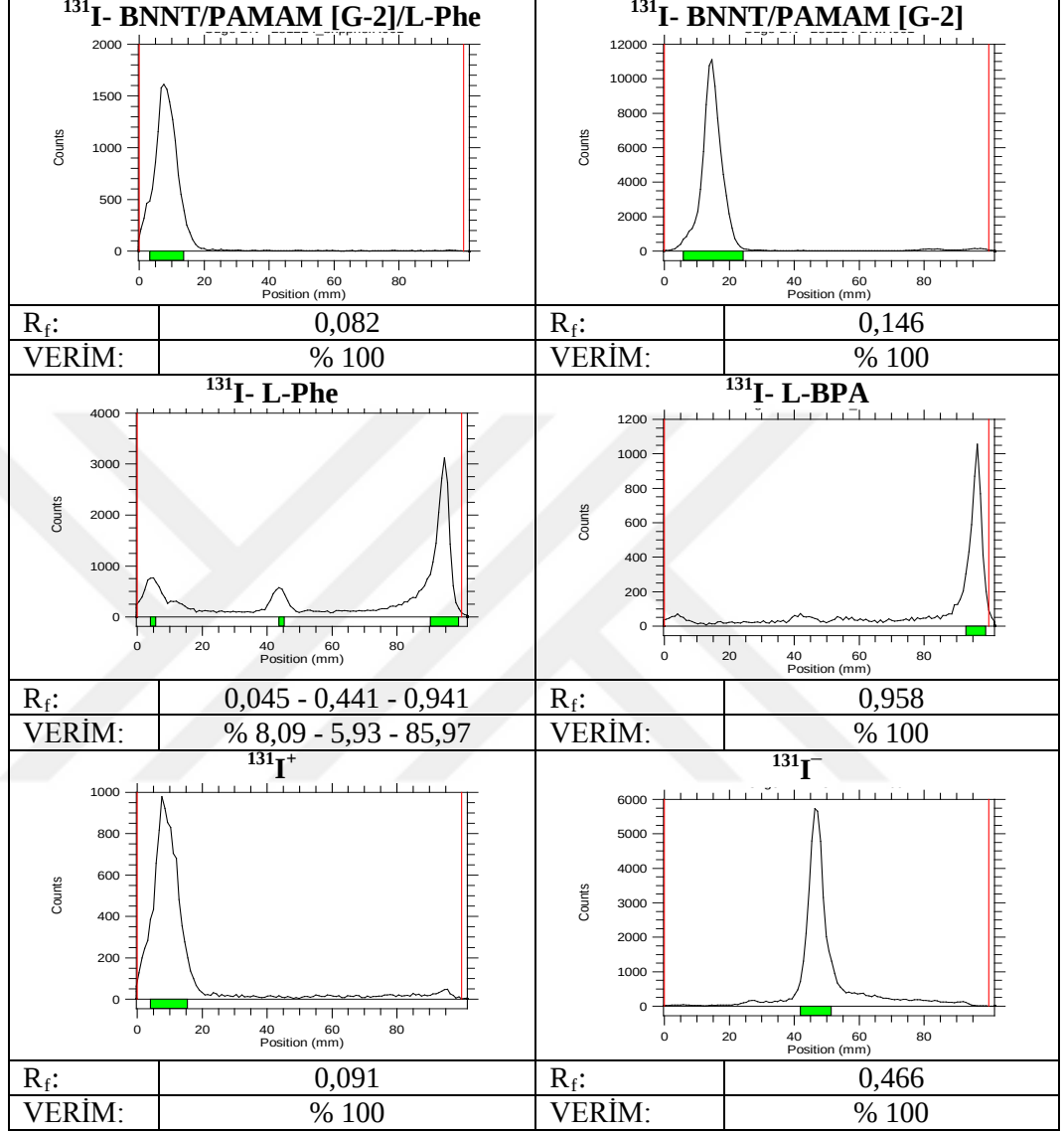


Şekil 4.24 Optimum koşullarda gerçekleştirilen TLRC kromatogramları

Optimum banyo çözeltisi belirlendikten sonra PAMAM[G-2] ile modifiye edilen BNNT'lerin TLRC kalite kontrolleri tekrarlanmıştır. İşaretleme koşulları Bölüm 3.4'de açıklandığı şekilde 100 μCi ^{131}I ile 250 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ iodojen ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

TLRC-1: n-bütanol / distile su (2:1) çözgeninde yürütülen radyoiyotlu örnek damlatılan selüloz Whatman kağıtların TLC Scanner (Bioscan AR 2000)

cihazında radyoaktivite sayımları alınmıştır. Elde edilen kromatogramlardan R_f (Relative Front) değerleri ve işaretleme verimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Şekil 4.25' de verilmiştir.



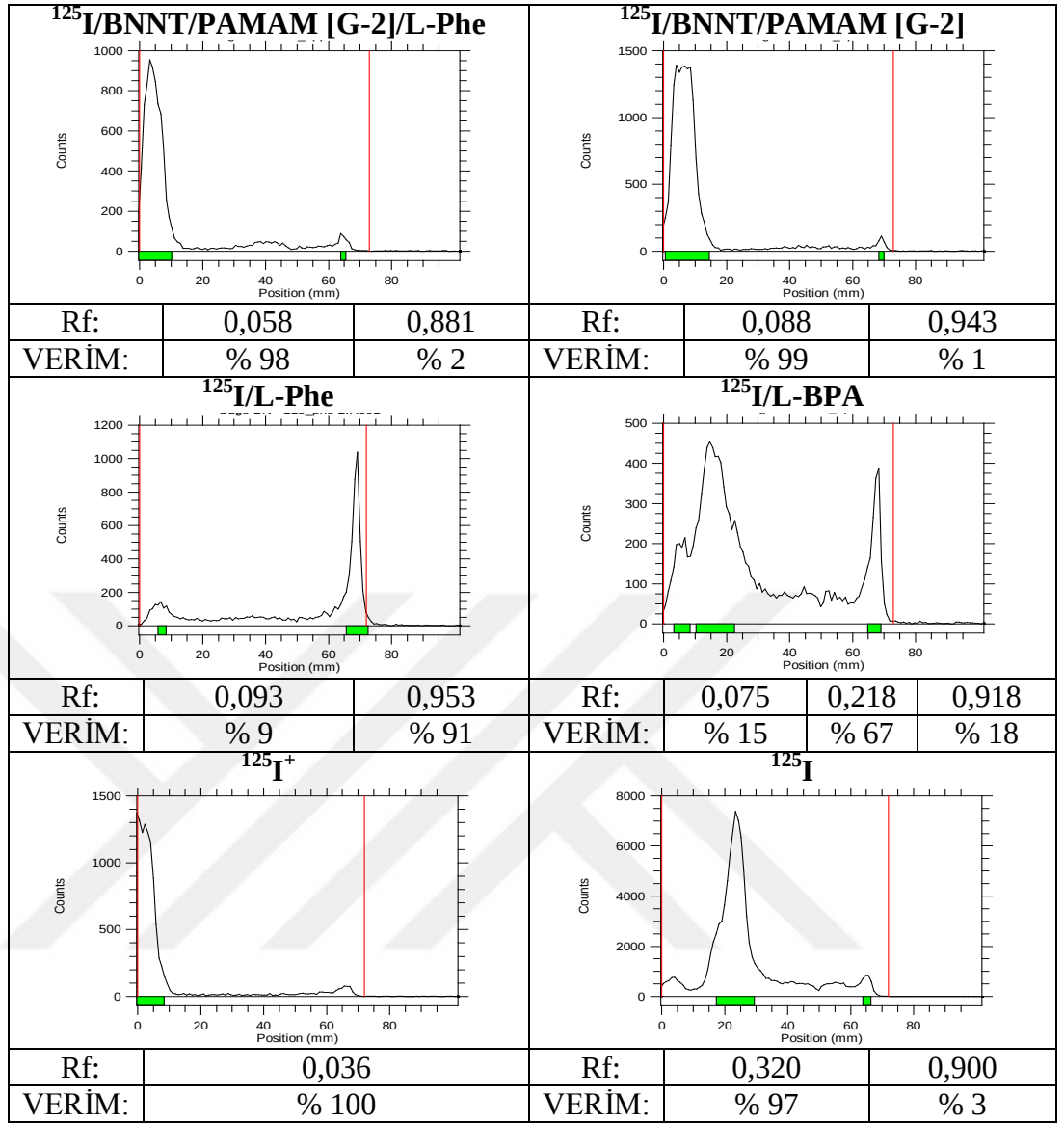
Şekil 4.25 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları

Sentezlenen Nanokonjugatların ^{125}I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

BNNT'ler PAMAM ile modifiye edilerek çözünürleştirildikten ve (BNNT/PAMAM [G-2]) ve EDC-NHS kimyası ile L-Phe ile konjuge edildikten sonra (BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe) ^{125}I ile işaretleme çalışmaları iodojen yöntemine göre yapılmıştır. Bunun için; 50 µg/50 µL örnek ve 50 µCi ^{125}I ile 250 µg iodojen film kaplı tüpte oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. BNNT/PAMAM [G-2] radioişaretlenmesi; 50µg/50 µL örnek, 50 µCi ^{125}I ile 250 µg iodojen film kaplı tüpte oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir. L-Phe radioişaretlenmesi; 5µg/50 µL örnek, 50 µCi ^{125}I ile 250 µg iodojen film kaplı tüpte oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilerek gerçekleştirilmiştir.

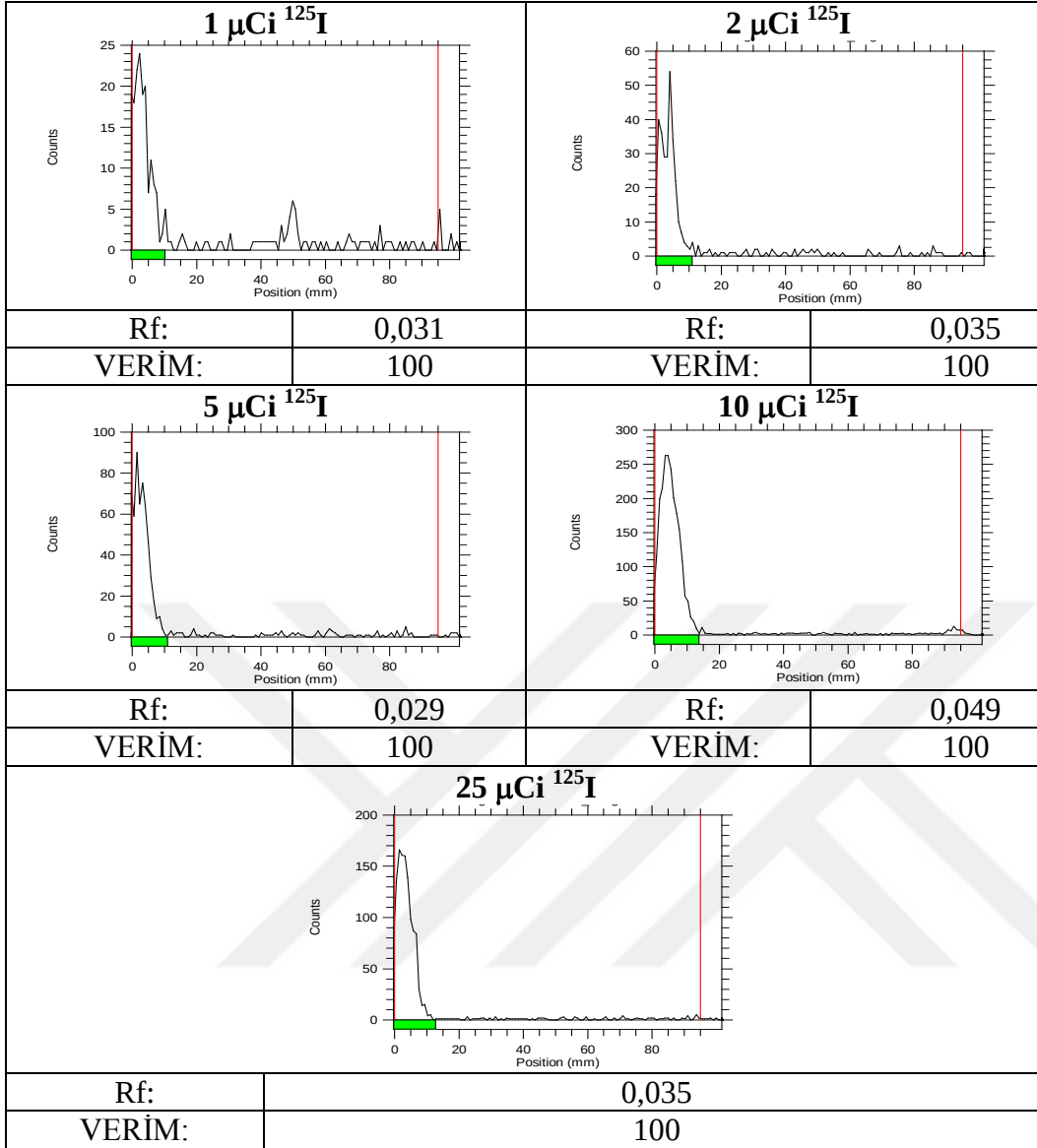
İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) için selüloz tabaka üzerine silika kaplı kağıtlardan, kalınlıkları 0.1 mm olan 20x20 cm boyutlarındaki tabakalar kullanılmış ve bu tabakalar 1.2x10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Bu kağıtların uygulama noktalarına; $^{125}\text{I}^-$, yükseltgenmiş iyot ($^{125}\text{I}^+$), $^{125}\text{I}^-$ /BNNT/PAMAM [G-2], $^{125}\text{I}^-$ /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, $^{125}\text{I}^-$ /L-Phe, $^{125}\text{I}^-$ /L-BPA örnekleri kapiler boru yardımıyla damlatılarak ayırma çözeltisinde yürütülmüştür.

^{125}I ile radyoışaretli örneklerin banyo çözeltisi optimizasyonu sonucu belirlenen TLRC-1 nolu çözelti: n-bütanol/distile su (2:1) kullanılarak radyoışaretleme kalite kontrolü gerçekleştirilmiştir. Elde edilen Rf ve işaretleme verimi değerlerine ilişkin sonuçlar Şekil 4.26' da verilmiştir.



Şekil 4.26 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen TLRC kalite kontrol kromatogramları

Spesifik aktivitenin radyoışaretleme verimine etkisini incelemek amacıyla; 50 µg/50 µL BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, 250 µg iodojen kaplı tüp kullanılarak sırası ile 1, 2, 5, 10 ve 25 µCi ^{125}I ile 20 dakika inkübe edilmiştir ve 5 farklı radyoışaretleme çalışması gerçekleştirilmiştir. ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe (1 µCi), ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe (2 µCi), ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe (5 µCi), ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe (10 µCi) ve ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe (25 µCi) örneklerinin kalite kontrolü TLRC yöntemi ile optimum koşullarda gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.27’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.27 Optimum banyo çözeltisinde gerçekleştirilen farklı aktivite miktarlarında ^{125}I ile işaretli örneklerin TLRC kalite kontrol kromatogramları

Kromatogramlar incelendiğinde optimum koşullarda ve yüksek radyoaktivitede gerçekleştirilen radyoişaretlemedeki gibi (Şekil 4.26) ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe R_f değerinin ve işaretlenme veriminin değişmediği, aktivite bağımlı olarak sayımlarda düşüş olduğu belirlenmiştir.

Sentezlenen Nanokonjugatların ^{127}I ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

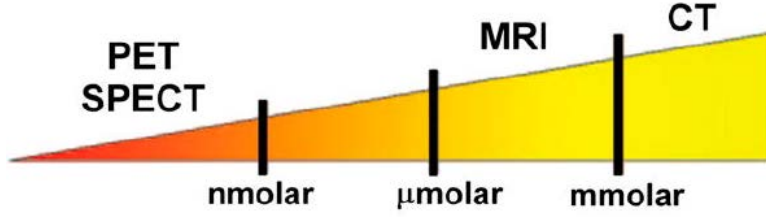
1 mol BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA 2 mol KI ve 1 mol iodojen oranlarında ilk olarak hazırlanan iodojen tüpüne örnek ve KI ilave edilmiştir. + 4 °C ve karanlıkta 12 saat inkübe edildikten sonra örnek iodojen ortamından ayrılmıştır.

İyodinasyonun kalite kontrolü İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile gerçekleştirilmiştir. R_f değerleri bileşiğin uygulama noktasından itibaren kat ettiği mesafenin çözgenin katettiği mesafeye oranı ile hesaplanmıştır. TLC sonuçları Şekil 4.28’ de verilmiştir (n=3).

Örnek	R_f
^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]	0,020
^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe	0,020
^{127}I /L-Phe	0,95
^{127}I /L-BPA	0,96
^{127}I	0,95

Şekil 4.28 ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve ^{127}I TLC R_f sonuçları

İyodun 127 kütle numaralı ağır bir atom olması nedeniyle inaktif iyot ve iyot taşıyan moleküller Bilgisayarlı tomografide kontrast ajanı olarak kullanılmaktadır. Radyoaktif iyot ile yapılan Nükleer Tıp Uygulamalarında kullanılan radyoaktif ajanların kütlece çok küçük miktarlara karşı gelmesine rağmen bilgisayarlı tomografide kontrast ajan olarak kullanılan ajanların kütlece daha büyük miktarları gerekmektedir (Şekil 4.29) (Sadeghi et al., 2010).



Şekil 4.29 Görüntüleme sistemlerinde gereken kontrast ajan konsantrasyonları (Sadeghi et al., 2010).

İnaktif iyot BT görüntüleme sistemlerinde kontrast ajan olarak kullanıldığında büyük miktarlar gerektiğinden iyot hassasiyetinin olduğu durumlarda oluşabilecek toksik etkileri azaltabilecek daha kararlı moleküller gerektiği literatürde belirtilmiştir. Cormode ve ekibi bu amaçla nanoparçacıkların ve iyotlu PAMAM'ın iyi bir BT kontrast ajanı olabileceğini önermişlerdir. Ancak bu konu ile ilgili deneysel data bulunmamaktadır (Cormode et al., 2014). PAMAM [G-4]'ın BT kontrast ajanı olarak kullanılma potansiyeli olan altın NP'lerin de stabilizasyonlarını arttırdıkları rapor edilmiştir (Sutriyo et al., 2015).

Cai ve ekibi iyot içeren nanoparçacıkları kontrast ajan olarak kullanmanın kontrast ajan olarak kullanılan inaktif iyota göre avantajlarını rapor etmişlerdir. Buna göre inaktif iyot sadece dakikalar mertebesinde dolaşım zamanına sahipken nanoparçacıklı kontrast ajanlar 15 saate kadar varan çok daha uzun kan dolaşım zamanlarına sahiptirler. Bu durum özellikle damar görüntülemede önemli bir avantaj sağlamaktadır (Cai et al., 2007). Daha uzun kan dolaşım zamanı olan kontrast ajanlar özellikle stent uygulamalarında büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu durum iyotun kısa sirkülasyon zamanı nedeniyle tekrarlayan iyot enjeksiyonu gerekliliğini ve iyot hassasiyeti olan durumlarda iyotun olumsuz yan etkilerinden kaynaklanan dezavantajları ortadan kaldırmaktadır (Mukundan et al., 2006). Bunun dışında hedefe yönelik BT kontrast ajanları doku içindeki hücrelerde protein ekspresyonunu dedeksiyonunda kullanılabilirler. Cormode ve grubu altın nanoparçacıkları atherosclerotic plaklardaki makrofajların dedeksiyonunda kullanılabileceğini göstermişlerdir (Cormode et al., 2010).

Nanoparçacık kullanımının bir diğer avantajı çok fonksiyonlu olabilmeleridir. Bu durum yeni gelişen hibrit görüntüleme sistemlerinin ihtiyacı olan ajanları geliştirmeye imkan sağlamaktadır. Örneğin aynı bir ajanın uygun tasarlandığında BT, MR, floresan, PET/SPECT görüntülemede kullanılması mümkün olabilmektedir. van Schooneveld ve grubu bu şekilde PEG (polietilen

glükol) ile kaplanmış altın/silika nanoparçacıklar ile MRI, BT ve flüoresans görüntüleme yapılabileceğini göstermişlerdir (van Schooneveld et al., 2015). İlâveten nanoparçacıklara terapötik etki gösteren teranostik potansiyel kazandırılabilir (von Maltzahn et al., 2015).

PAMAM ile modifiye edilmiş BNNT'lerin birlikte veya ayrı olarak radyoizotopasyonu hakkında ise literatür bilgisi bulunmamaktadır.

4.2.2. Elektroforez Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

Elektroforez kromatogramlarında işaretli bileşik elektroforez kağıdına uygulanma noktası 10. cm dir. Örnekler ^{131}I ile iodojen yöntemi kullanılarak Bölüm 3.4'de açıklandığı gibi işaretlenmiştir. $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L}-\text{Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L}-\text{Phe}$, $^{131}\text{I}^-$ ve $^{131}\text{I}^+$ örneklerine ait olan R_f değerlerine göre anyonik ya da katyonik dereceleri belirlenmiş ve sonuçlar çizelge 4.5' te verilmiştir.

Çizelge 4.5 ^{131}I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.

Örnek Banyo Çözeltisi	$^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L}-\text{Phe}$	$^{131}\text{I}/\text{L}-\text{Phe}$	$^{131}\text{I}^+$	$^{131}\text{I}^-$
TLRC-1	+ 1,1	0	+ 1,6	- 4,0

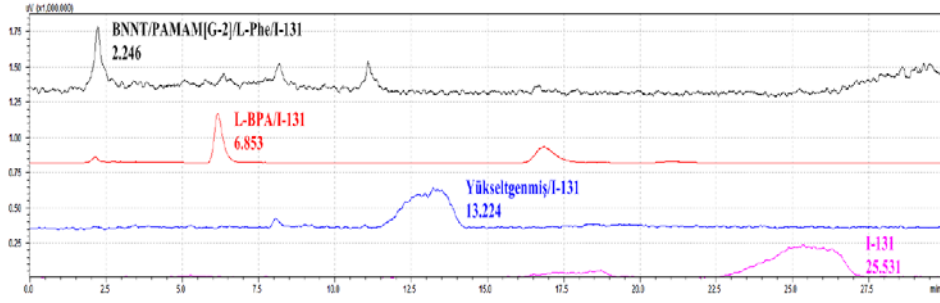
Çizelge 4.4 ve kromatogramlar incelendiğinde $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L}-\text{Phe}$ 'nin katoda; + 1,1 cm'ye yürüdüğü kromatogramlardan görülmüştür. $^{131}\text{I}/\text{L}-\text{Phe}$ nötr olduğu için anoda ya da katoda yürümemiştir, uygulama noktasında kalmıştır. Serbest iyot ($^{131}\text{I}^-$) anoda yürümüştür, anyoniktir ve - 4,0 cm'ye yürümüştür. Yükseltgenmiş iyot ($^{131}\text{I}^+$) katoda yürümüştür, katyoniktir ve kromatogramlardan + 1,6 cm'ye yürüdüğü görülmüştür. PAMAM'ın moleküler yapısında bulunan amino grupları nedeniyle katyonik olduğu bilinmektedir (Medine et al., 2010) Deneysel sonuçlarımız beklenen sonuçlar ile uyumludur.

4.2.3. Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC) Yöntemi ile Kalite Kontrolü

Radyoiyotasyonun kalite kontrolü için HPLRC yöntemi kullanılmıştır. Örneklerin radyoiyotasyonu Bölüm 3.4’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ölçümler 1 mL/dakika akış hızında, bidistile su/metanol/izopropanol (50:45:5) mobil fazı kullanılarak C-18 kolon ile gerçekleştirilmiştir. (LC-10ATvp quaternary pump, DAD dedektör, autosampler (SIL-20A HT), Raytest (1x1) NaI dedektörü kullanılarak ölçümler 254 nm’de 25 °C’de gerçekleştirilmiştir. HPLRC koşulları çizelge 4.6’ da özet olarak gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC)
Koşulları

Akış Hızı	1,3 mL/dak
Mobil Faz	Ultra-saf MilliQ® su/metanol/2-propanol (50:45:5)
Kolon	C18-ODS kolon (250x4.6 mm I.D. Gl sciences Inc.)
Enjeksiyon süresi	20 dakika
Kolon fırın sıcaklığı	25 °C
Dedektör	NaI dedektör ve SPD-M20A DAD dedektör
Dalgaboyu	254 nm



Şekil 4.30 $^{131}\text{I}^-$, $^{131}\text{I}^+$, ^{131}I /L-BPA ve ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe örneklerinin aktivite dedektörü ile elde edilen kromatogramları

Şekil 4.30 serbest iyotun ($^{131}\text{I}^-$) kolonda alıkonma süresi pembe kromatogramda görüldüğü gibi 25.531 dakikadır. İodojen yöntemiyle yükseltgenen $^{131}\text{I}^+$ 'in kolondaki alıkonma süresi 13.224 dakikadır, mavi ile gösterilen kromatograma bakıldığında ortamda serbest iyot yoktur buradan kullanılan iodojen miktarının ve reaksiyon süresinin $^{131}\text{I}^-$ 'in yükseltgenmesi için yeterli olduğu anlaşılmıştır. Kırmızı renk ile gösterilen radyoiyotlu L-BPA örneğinin kolondaki alıkonma süresi 6.853 dakikadır. Bu işaretleme sonucunda da ortamda $^{131}\text{I}^-$ veya yükseltgenmiş iyot ($^{131}\text{I}^+$) mevcut değildir, reaksiyon ortamındaki iyotun yükseltgendiği ve yükseltgenen iyotun L-BPA ile bağlandığı sonucu ortaya çıkmıştır. Siyah renk ile gösterilen ^{131}I işaretli BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe örneğinin kolona olan afinitesi 2.246 dakikadır. Bu kromatogram incelendiğinde $^{131}\text{I}^-$ veya $^{131}\text{I}^+$ ile herhangi bir çakışma söz konusu değildir, işaretleme gerçekleşmiştir.

4.2.4. ^{131}I İşaretli BNNT'lerin Lipofilite Tayini

Bu çalışmada ^{131}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{131}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve ^{131}I /L-BPA örneklerinin lipofilite tayini yapılmıştır. Bunun için 100 μL işaretli bileşikten alınarak içerisinde 300 μL n-oktanol ve 300 μL pH:7.0 fosfat tampon çözeltisi bulunan tüpe ilave edilmiştir. 10 dakika oda sıcaklığında karıştırmanın ardından 2500 rpm de 30 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında alt faz (su) ve üst faz (oktanol) ayrılarak aktiviteleri Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayılmıştır. Log P değerleri bu fazlardaki aktivite değerleri oranlanarak hesaplanmıştır (Çizelge 4.7). Denemeler her bir örnek için üç kez tekrar edilmiştir.

Çizelge 4.7 Radyoiyotlu bileşiklerin deneysel ve teorik lipofilite değerleri (n=3)

Örnek	Deneysel Lipofilite	Teorik Lipofilite
¹³¹ I/BNNT/PAMAM[G-2]	0,45 ± 0,09	-
¹³¹ I/BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe	1,80 ± 0,50	-
¹³¹ I/L-BPA	0,42 ± 0,01	0,48 ± 0,02
¹³¹ I/L-Phe		2,34± 0,42
PAMAM [G-2]		-33,85 ± 1,17
PAMAM[G-2]/L-Phe		-31,83 ± 1,19

Log P ile hesaplanan radyoiyotlu örneklerin lipofilite değerleri teorik lipofilite değerleri ile kıyaslandığında uyumlu olarak bulunmuştur. Örneklerin teorik lipofilite değerleri ACD Lab programı kullanılarak hesaplanmıştır. Lipofilitenin örneklerin beyin kan engelini geçmesi aşamasında büyük önem taşıdığını belirtmişlerdir. 0,9'un üzerindeki değerlerin bu amaç için uygun olduğu tespit edilmiştir (Liu et al., 2015). Bu doğrultuda Çizelge 4.6' dan da görüldüğü üzere ¹³¹I/BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe örneğimizin lipofilite değerlerinin literatürde Kan Beyin Bariyeri için belirtilen eşik değer ile uyumlu olduğu belirlenmiştir.

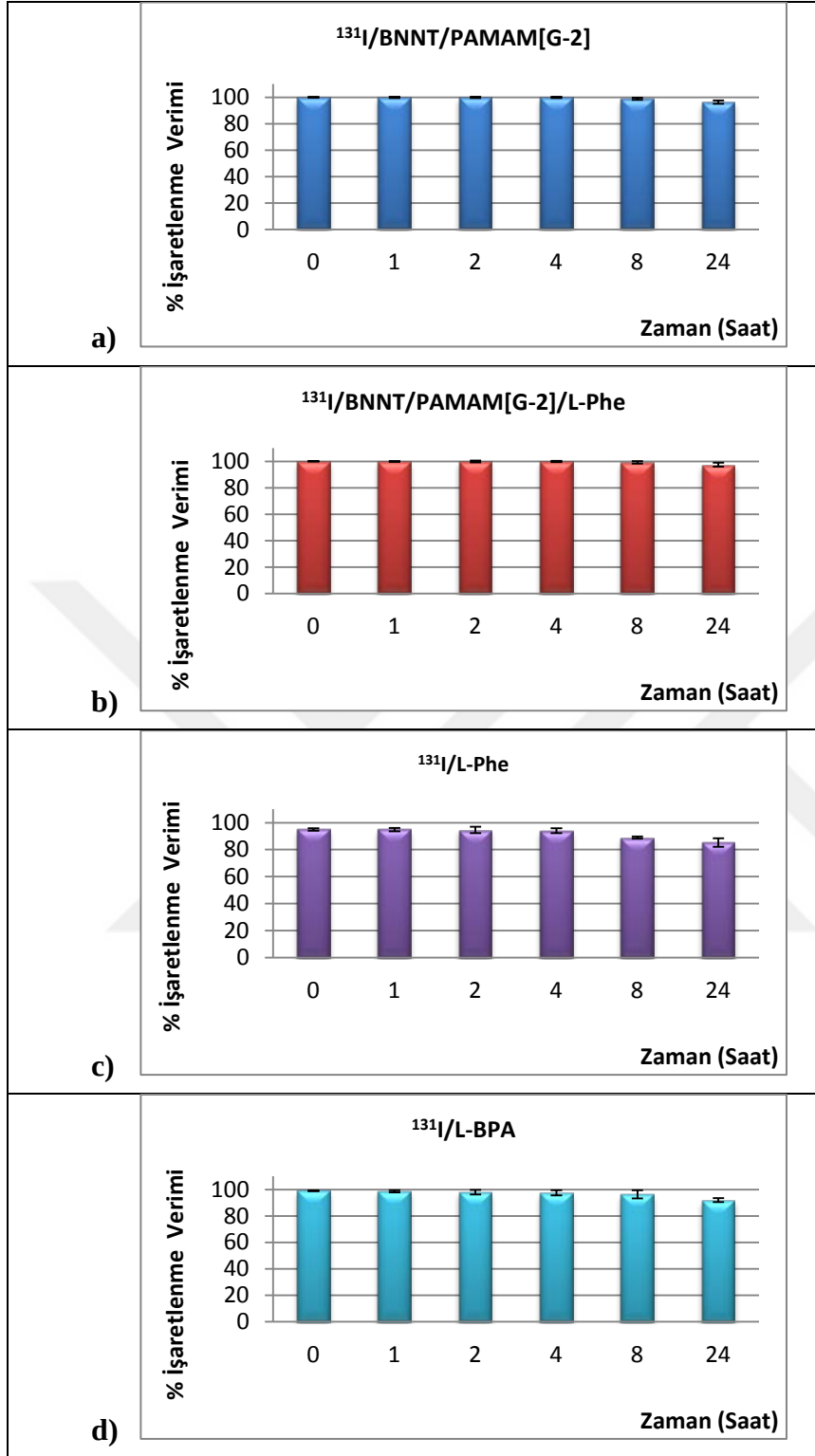
4.2.5. ¹³¹I İşaretli BNNT'lerin Stabilitate Tayini

Bölüm 3.4.1.5'de açıklandığı gibi radyoiyotnasyon sonrası BNNT/PAMAM[G-2], BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA'nın işaretleme stabilitesi 0, 1, 2, 4, 8 ve 24. saatler için incelenmiştir. İşaretleme verimleri n-bütanol/distile su (2:1) banyo çözeltisi kullanılarak TLRC yöntemiyle ile tespit edilmiştir. Sonuçlar Şekil 4.31' de gösterilmiştir.

Şekil 4.31 incelendiğinde tüm radyoiyotlu örneklerin 24 saatte stabilitesini koruduğu tespit edilmiştir. $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$ için işaretlenme verimi % 100'den 24. saatte % 96'ya düşmüştür (Şekil 4.31 a), $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ için işaretlenme verimi; % 100'den 24. saatte % 97'ye düşmüştür (Şekil 4.31 b), $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$ için işaretlenme verimi; % 95'ten 24. saatte % 85'e düşmüştür (Şekil 4.31 c) ve $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ için işaretlenme verimi; % 99'dan 24. saatte % 92'ye düşmüştür (Şekil 4.31 d).

Elde edilen bulgular tüm radyoişaretli konjugatların oda sıcaklığında 24 saat boyunca stabilitelerini koruduğunu göstermektedir.



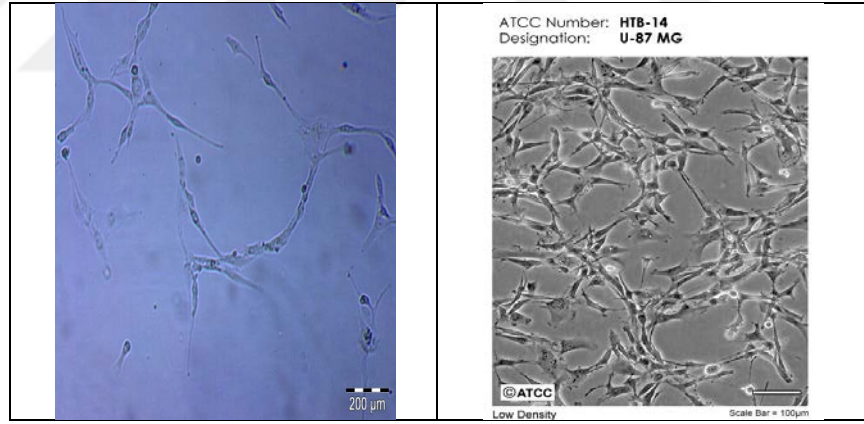


Şekil 4.31 a) $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$, b) $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, c) $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$ ve d) $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ 'nın 0, 1, 2, 4, 8 ve 24 saatteki stabilite grafikleri

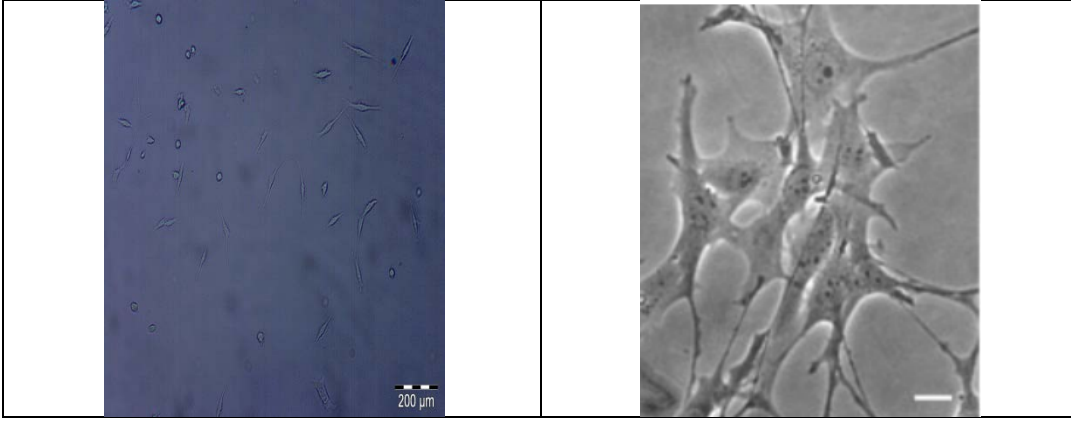
4.3. *İn Vitro* Uygulamalar

4.3.1. U87-MG ve C8-D1A Hücre Dizinleri

Bölüm 3.5.1’de açıklandığı gibi U87-MG (İnsan Beyin Glioblastoma-Astrosit) (HTB-14) hücrelerini çoğaltmak amacıyla % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Non Esansiyel Amino Asit, % 1 Sodyum Pirüvat, % 1 L-Glutamin içeren Min. Essential Medium (MEM Eagle) medium’u kullanılmıştır. C8-D1A (Fare Beyin Astrosit) (CRL 2541) hücrelerini çoğaltmak amacıyla % 10 Fetal Bovin Serum (FBS), % 1 Non Esansiyel Amino Asit, % 1 Sodyum Pirüvat, % 1 L-Glutamin içeren Dulbecco's MEM medium’u kullanılmıştır. 75 cm²’lik flasklarda çoğaltılan hücreler 2 pasaj geçirilerek hücrelerin morfolojilerinin literatürle uyumlanması sağlanmıştır. Şekil 4.32 ve 4.33’te hücrelerin *in vitro* görüntüleri literatür ile karşılaştırmalı olarak verilmiştir. 2 pasaj çoğaltılan hücreler çalışma grubu oluşturularak sitotoksosite, tutulum, fluoresan görüntüleme ve apoptoz gibi *in vitro* uygulamalarda kullanılmıştır.



Şekil 4.32 U87-MG hücrelerinin a) *in vitro* görüntüsü b) literatür görüntüsü



Şekil 4.33 C8-D1A hücrelerinin **a)** *in vitro* görüntüsü **b)** literatür görüntüsü

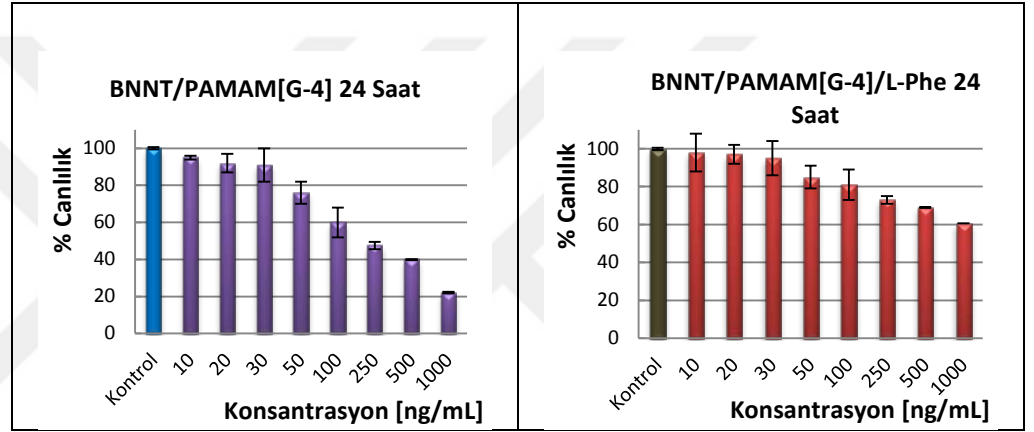
4.3.2. Sitotoksosite Çalışması

Bölüm 3.5.2’de belirtilen koşullarda sitotoksosite çalışması WST-8 yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için U87-MG ve C8-D1A hücreleri uygun besiyerinde çoğaltılmış ve 96 kuyulu plakalara 1×10^4 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ekimden 36 saat sonra sitotoksosite çalışması başlatılmıştır. BNNT ve türevleri 15000 rpm’de 10 dakika 25 °C’de santrifüjlendiren nanotüpler çöktürülmüştür, numuneler 2 saat ultraviyole lamba altında inkübe edilerek sterilize edilmiştir. Sterilize edilen numuneler pH:7.0 fosfat tamponunda dağıtılarak dozların hazırlanması DMEM besiyer ile gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan farklı konsantrasyonlar (200 µL) kuyulara uygulanmış ve farklı zamanlarda hücrelerdeki % canlılık testi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 1 set için 4 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak hücrelerin ekili olduğu kuyulara besiyer eklenmiştir. Negatif kontrol olarak hücre bulunmayan kuyulara farklı dozlarda hazırlanan numuneler eklenmiştir ve hesaplamalarda kullanılmıştır.

Sitotoksositeye etki eden parametreler konsantrasyon, zaman ve iyotinasyon etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. 450 nm ve 650 nm’de spektrofotometrik olarak dedekte edilmiştir. Konsantrasyon ile % canlılık arasındaki ilişki incelenerek sütun grafikleri oluşturulmuştur.

BNNT/PAMAM [G-4], BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe, BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe, L-BPA, ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve ^{127}I /L-Phe numuneleri için farklı konsantrasyonlarda (10-20-30-50-100-250-500-1000 ng/mL, 1-5-25-100-500-1000 ng/mL, 0,5-1-5-10-50-100 µg/mL) 1, 2, 24 ve 48 saat için canlılık testi WST-8 yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

BNNT/PAMAM [G-4] ve BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe nanokonjugatlarının U87-MG hücrelerinde 10-20-30-50-100-250-500-1000 ng/mL konsantrasyonlar için 24 saatteki sitotoksiteleri incelenmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Şekil 4.34' te verilmiştir.

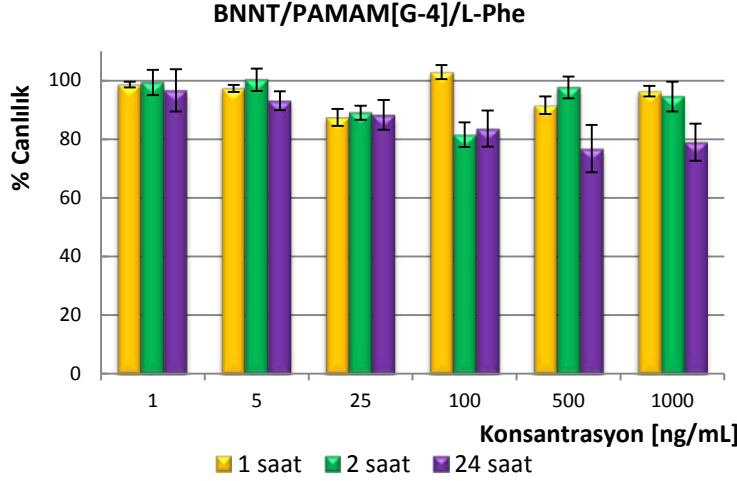


Şekil 4.34 BNNT/PAMAM[G-4] ve BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe'nin 24 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksitite grafikleri

Şekil 4.34 incelendiğinde BNNT/PAMAM[G-4] nanokonjugatı için 50 ng/mL ve üzeri konsantrasyonlar 24 saatte toksik etkiye sahip olduğu, L-Phe ile konjuge edildikten sonra biyouyumluluğun arttığı ve 100 ng/mL üzeri konsantrasyon için % 81 canlılık bulunduğu ve üzeri konsantrasyonlar için 24 saatte toksik etki görüldüğü tespit edilmiştir.

Görüntüleme ve hücre tutulum çalışmalarında uygulanan erken zaman parametrelerindeki nanokonjugatın sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla 1-5-25-100-500-1000 ng/mL konsantrasyonlarda BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe'in 1, 2 ve 24 saatteki U87-MG hücrelerindeki sitotoksiteleri hücre canlılıkları WST-8 yöntemiyle incelenmiştir. Bu çalışmaya ilişkin sonuçlar Şekil 4.35' te verilmiştir.

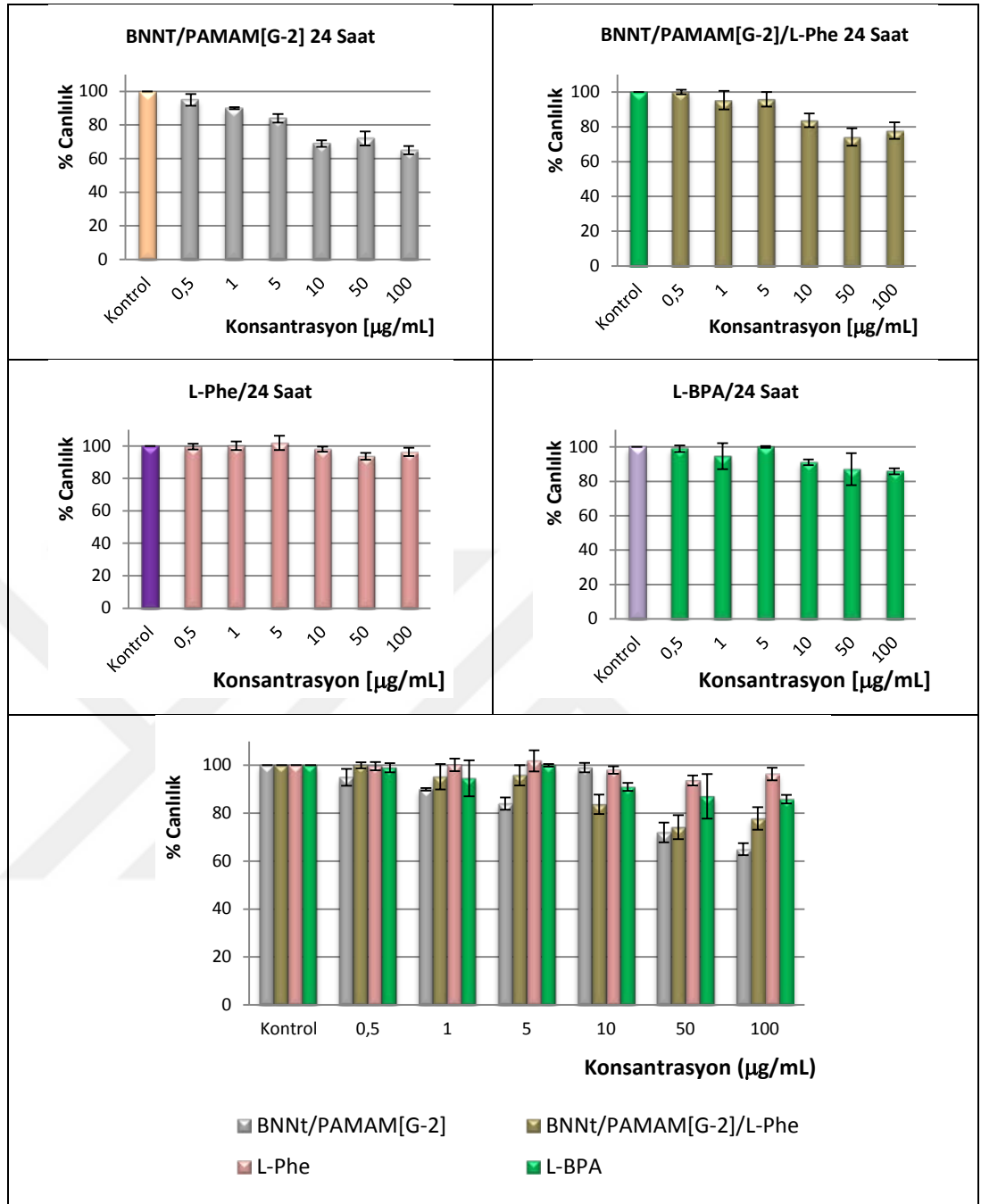
Şekil 4.35 incelendiğinde sarı 1 saat, yeşil 2 saati ifade etmektedir ve bu iki zaman parametresinin U87-MG hücre hattında sitotoksik etki göstermemiştir. Mor sütunlar 24 saati ifade etmektedir ve 1000 ng/mL konsantrasyona kadar önemli bir sitotoksik etki görülmemiştir.



Şekil 4.35 BNNT/PAMAM [G-4]/L-Phe örneğinin 1, 2 ve 24 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksosite grafiği

Hücre tutulum çalışmalarında uygulanan yüksek konsantrasyonlardaki nanokonjugatların sitotoksitesinin belirlenmesi amacıyla 0,5-1-5-10-50- 100 µg/mL konsantrasyonlarda BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA örneklerinin 24 saatte U87-MG hücrelerinde canlılık testleri WST-8 kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (n=8). Sitotoksosite çalışmasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.36’da verilmiştir.

Şekil 4.36 incelendiğinde BNNT/PAMAM [G-2] nanokonjugatı 5 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda toksik etki göstermiştir, BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe nanokonjugatında L-Phe konjugasyonu ile birlikte biyouyumluluğun arttığı ve 10 µg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda toksik etki görülmüştür. L-Phe herhangi bir sitotoksik etkiye sahip değildir ve ticari ürün olan kontrol amacıyla kullanılan L-BPA için hücre canlılık oranı bu çalışmada uygulanan konsantrasyonlar için % 80’in üzerinde olduğu tespit edilmiştir.

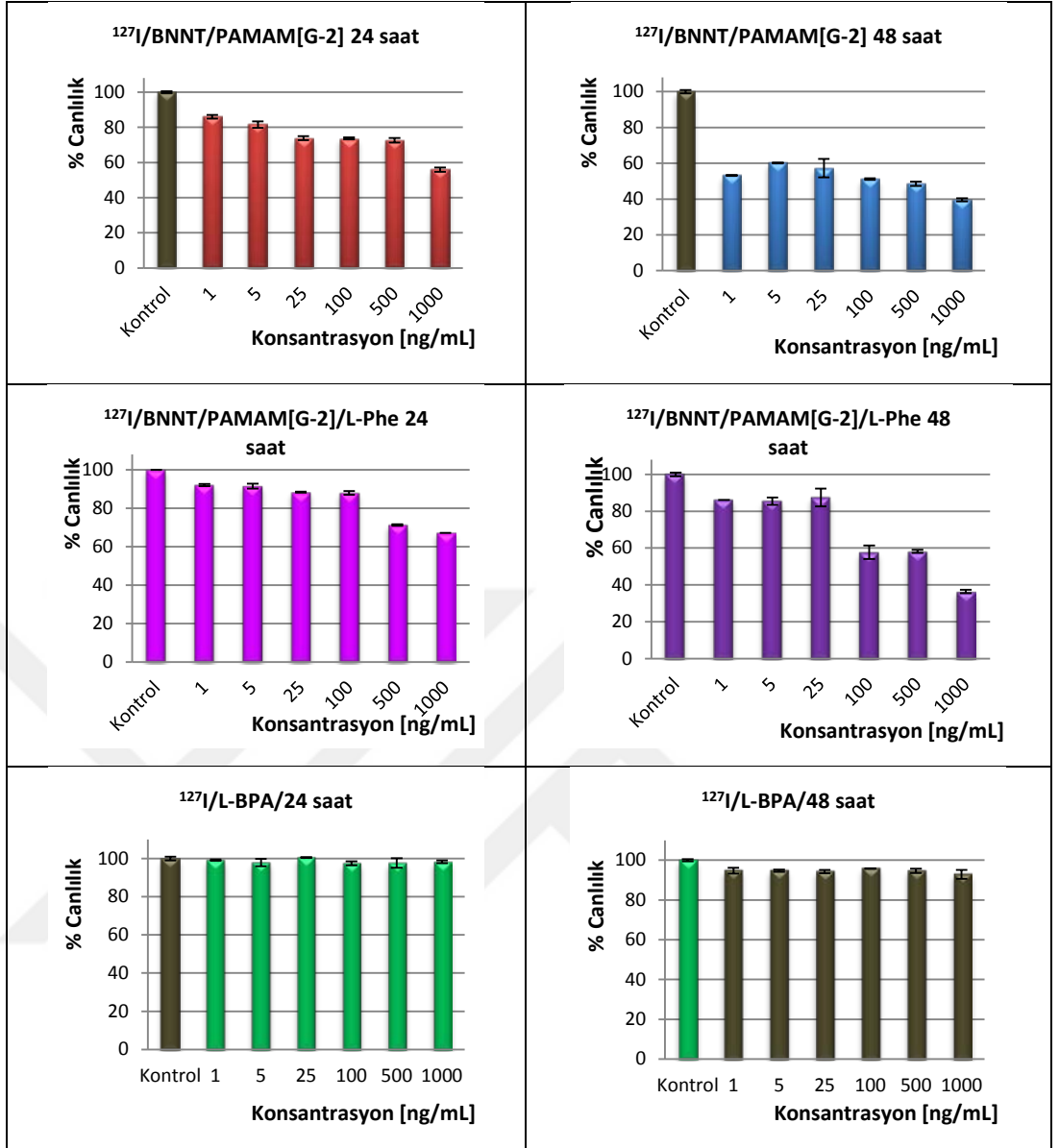


Şekil 4.36 BNNT/PAMAM [G-2], BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, L-Phe ve L-BPA'nın U87-MG hücre hattındaki sitotoksisite grafikleri

¹²⁷I İşaretli Örneklerin Sitotoksitelerinin İncelenmesi:

¹²⁷I/BNNT/PAMAM [G-2], ¹²⁷I/BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ¹²⁷I/L-BPA ve ¹²⁷I/L-Phe örneklerin artan altı konsantrasyonunun (1-5-25-100-500-1000 ng/mL) U87-MG hücre hattında 24 ve 48 saat için hücre canlılık testleri WST-8 kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (n=8). U87-MG hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksitite çalışmasına ilişkin sonuçlar Şekil 36'da verilmiştir.

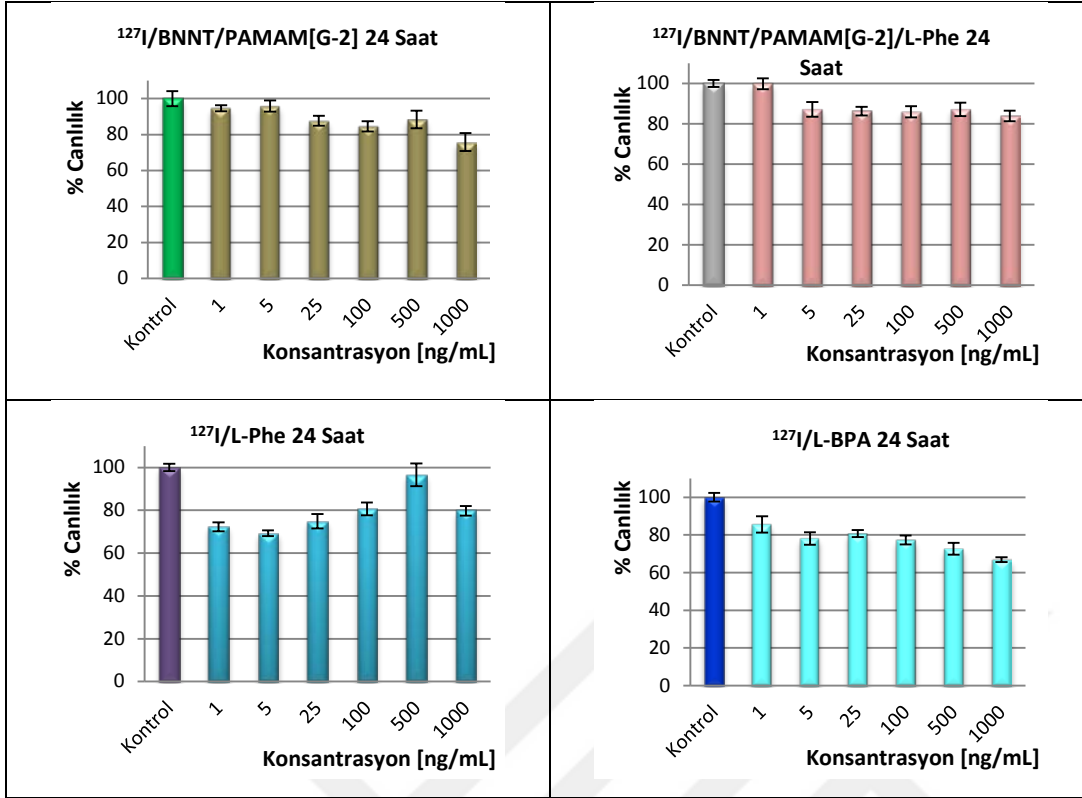
İyodinasyonun sitotoksititeye etkisinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilen bu çalışma sonucunda Şekil 4.34, 4.36 ile 4.37 kıyaslandığında BNNT/PAMAM[G-2] nanokonjugatı 30 ng/mL konsantrasyonda % 91 canlılığa sahipken ¹²⁷I ile iyotinasyonu sonrası aynı konsantrasyondaki canlılık % 75'e düşmüştür. ¹²⁷I/ BNNT/PAMAM[G-2] nanokonjugatı 5 ng/mL konsantrasyonda % 81 canlılığa sahiptir. L-Phe konjuge formu incelendiğinde BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe 100 ng/mL konsantrasyonda % 81 canlılığa sahipken ile iyotinasyonu sonrası aynı konsantrasyondaki canlılık % 90 civarında bulunmuş ve bu konjugat için iyotinasyonun sitotoksititeye etkisinin olmadığı tespit edilmiştir. L-BPA örneği için 100 µg/mL konsantrasyonda % 83 canlılık görülürken, ¹²⁷I/L-BPA örneğinde yine % 90 civarında canlılık görülmüştür. L-BPA örneği için de iyotinasyonun sitotoksik etkisinin mevcut olmadığı tespit edilmiştir. L-Phe için çalışılan tüm konsantrasyonlarda % 90'ın üzerinde canlılık varken ¹²⁷I/L-Phe örneği için de bu oran değişmemiş ve iyotinasyonun L-Phe örneği için sitotoksik etkisinin mevcut olmadığı tespit edilmiştir. Şekil 4.37 incelendiğinde 48. saatteki sitotoksitelerin zamana bağlı olarak arttığı görülmüştür.



Şekil 4.37 ^{127}I işaretli örneklerin 24 ve 48 saatte U87-MG hücre hattındaki sitotoksosite grafikleri

^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2], ^{127}I /BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve ^{127}I /L-Phe örneklerin artan altı konsantrasyonunun (1-5-25-100-500-1000 ng/mL) C8-D1A hücre hattında 24 saat için hücre canlılık testleri WST-8 kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (n=8).

C8-D1A hücre hattında 24 ve 48 saat için hücre canlılık testleri WST-8 kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir (n=8). C8-D1A hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksosite çalışmasına ilişkin sonuçlar Şekil 4.38' de verilmiştir.



Şekil 4.38 $^{127}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]$, $^{127}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]/\text{L-Phe}$, $^{127}\text{I}/\text{L-Phe}$ ve $^{127}\text{I}/\text{L-BPA}$ 'nın C8-D1A hücre hattındaki sitotoksikite grafikleri

Şekil 4.38 incelendiğinde sağlıklı beyin hücre hattında gerçekleştirilen sitotoksikite çalışmasına ^{127}I ile gerçekleştirilen iyotinyasyonun her hangi bir sitotoksik etkisinin mevcut olmadığı tespit edilmiştir. Uygulanan konsantrasyon aralığında $^{127}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]$ konjugatı için hücre canlılığının % 80 ve üzeri olduğu görülmüştür.

$^{127}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G-2}]/\text{L-Phe}$ konjugatı için ise % 90 ve üzeri olduğu görülmüştür. $^{127}\text{I}/\text{L-BPA}$ örneği için ise 5 ng/mL 'de % 80 canlılık ile birlikte üzeri konsantrasyonlar için sitotoksik etki görülmüştür.

4.3.3. Hücrelerde Bağlanma Verimi Çalışması

Bölüm 3.5.3'te açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir. 2×10^4 U87-MG hücresi ve $2,5 \times 10^4$ C8-D1A hücresi 24 kuyulu plakalara ekilmiştir. Hücre konfluent olduktan sonra (36 saat sonra) bağlanma verimi çalışması başlatılmıştır. Toksik olmayan dozlarda örnekler uygulandıktan sonra RİPA çözeltisi ile yüzeyden kaldırılan hücrelerin BCA kiti ile protein tayini ve sıvı sintilasyon cihazı ile radyoaktivite sayımı gerçekleştirilmiştir. Elde edilen radyoaktivite

sayımı/protein oranlarından hücre başına gerçekleşen tutulum miktarı hesaplanmıştır.

4.3.4. Zamana Bağlı Bağlanma Verimi Sonuçları

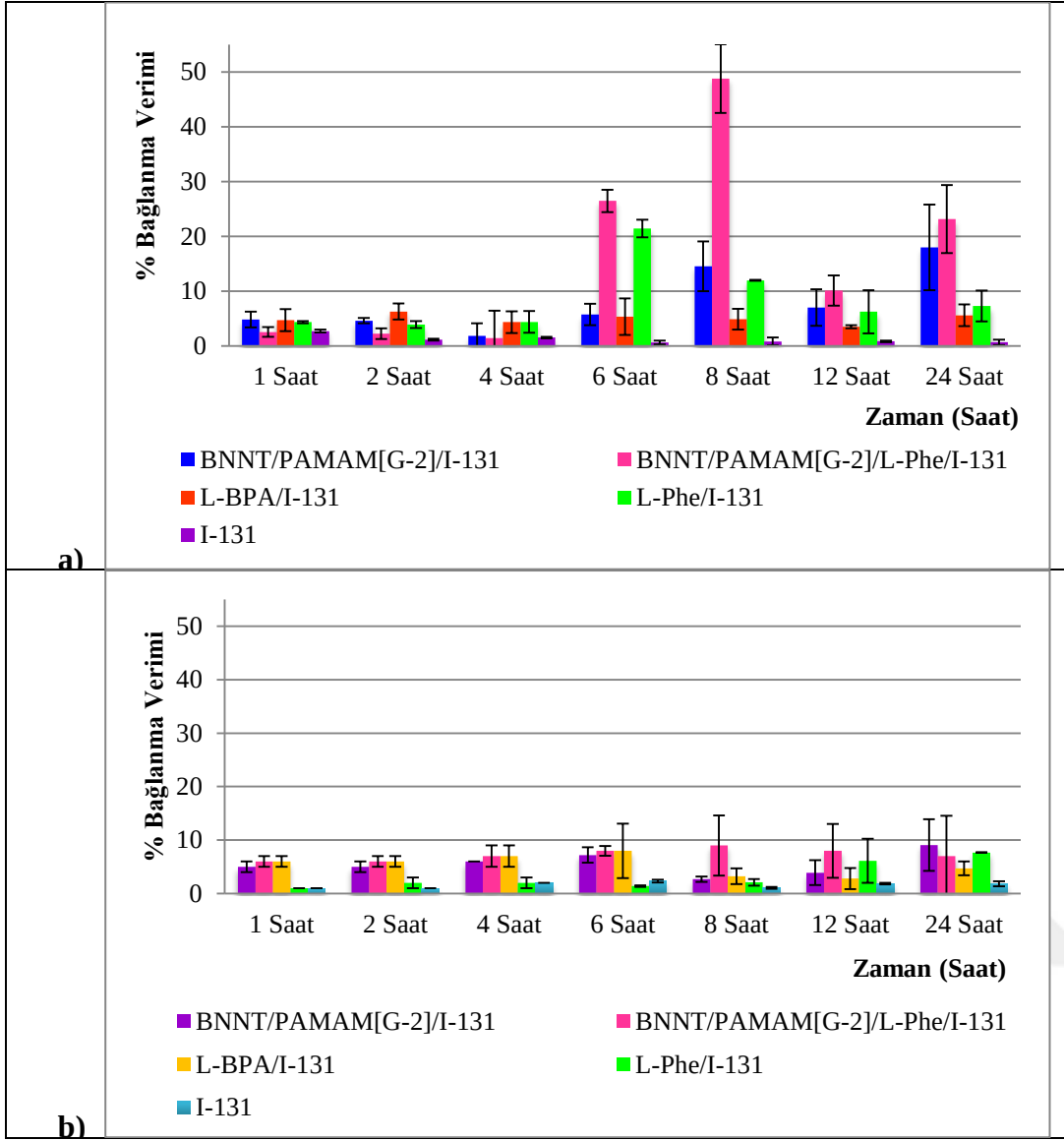
Zaman bağımlı tutulum çalışması Bölüm 3.5.4’de açıklandığı gibi 8 farklı zamanda U87-MG ve C8-D1A hücreleri için denenmiştir. 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. saatlerde $^{131}\text{I}^-$ ve $^{125}\text{I}^-$ işaretli BNNT ve türevleri için % tutulum miktarları hesaplanmıştır. Radyoyotinasyon 3.2.6’da açıklandığı gibi iyodinasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve kalite kontrolü TLRC ile tayin edilmiştir. Hücre bağlanma çalışmaları bölüm 3.5.3’te açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

İodojen yöntemi ile radyoyotinasyonu gerçekleştirilen nanokonjugatlardan 2 $\mu\text{g}/2\mu\text{Ci}$ /kuyu uygulanmıştır. Belirtilen süre boyunca radyoişaretli konjugatlar hücrelerin üzerinde 37 °C’de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerindeki örnekler uzaklaştırılarak iki kez 500 μL PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 200 μL RİPA çözeltisi eklenmiştir. Üzerinde RİPA çözeltisi bulunan hücreler pipetleme yardımıyla mekanik olarak yüzeyden kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonunun 100 μL ’si alınarak üzerine 900 μL sintilasyon kokteyli eklenerek sıvı sintilasyon cihazı ile aktivite sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonunun 25 μL ’si alınarak üzerine 200 μL BCA kiti eklenip protein tayini yapılmıştır. Elde edilen aktivite sayımı / protein oranlarından hücre başına gerçekleşen tutulum miktarı hesaplanmıştır.

^{131}I İşaretli Nanobiyokonjugatların U87-MG ve C8-D1A Hücrelerinde Zamana Bağlı Bağlanma Verimi Çalışmaları

^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{131}I /L-Phe, ^{131}I /L-BPA ve $^{131}\text{I}^-$ örnekleri için 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24 saatte U87-MG hücrelerinde bağlanma verimi çalışması sonuçları Şekil 4.39’ da verilmiştir.

Şekil 4.39 incelendiğinde ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2] örneği için bağlanma verimi 8 saatte maksimum göstererek % 49’a ulaşmış ve 24. saatte % 24 bağlanmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada nanokonjugatın ticari formu olan L-BPA da ^{131}I ile işaretlenerek hücre bağlanma verimleri kıyaslanmak üzere incelenmiştir. ^{131}I /L-BPA örneğinin tüm zamanlarda hücre bağlanma veriminin % 7 civarında olduğu tespit edilmiştir. $^{131}\text{I}^-$ ’in hücre afinitesi olmadığı için bağlanma veriminin beklendiği gibi % 1 civarında olduğu görülmüştür.



Şekil 4.39 ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{131}I /L-Phe, ^{131}I /L-BPA ve ^{131}I 'in a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ait grafikleri

Şekil 4.39 incelendiğinde ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2] örneğinin U87-MG hücrelerindeki bağlanma verimi 24 saatte % 5'lerden 24. saatte % 18'e ulaşmıştır. ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe örneğinde ise hücre bağlanma verimi % 5'lerden 8. saatte maksimum değerine % 49'a ulaşmış ve 24. saatte % 24 bağlanmanın olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada nanokonjugatın ticari formu olan L-BPA da ^{131}I ile işaretlenerek hücre bağlanma verimleri kıyaslanmak üzere incelenmiştir. ^{131}I /L-BPA örneğinin tüm zamanlarda hücre bağlanma verimi % 5-7 civarında olduğu ve nanokonjugatın afinitesinin çok altında kaldığı tespit edilmiştir. ^{131}I 'in hücre afinitesi olmadığı için bağlanma % 1 civarında olduğu

tespit edilmiştir. Şekil 4.39 incelendiğinde $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-Phe}$, $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ ve $^{131}\text{I}^-$ örneklerinin C8-D1A hücre hattındaki bağlanma verimleri zamana bağlı olarak bir seçicilik göstermemiştir ve % 10'un altında bir bağlanma verimi hesaplanmıştır.

^{125}I İşaretli Nanobiyokonjugatlarda U87-MG ve C8-D1A Hücrelerinde Zamana Bağlı Bağlanma Verimi Çalışmaları

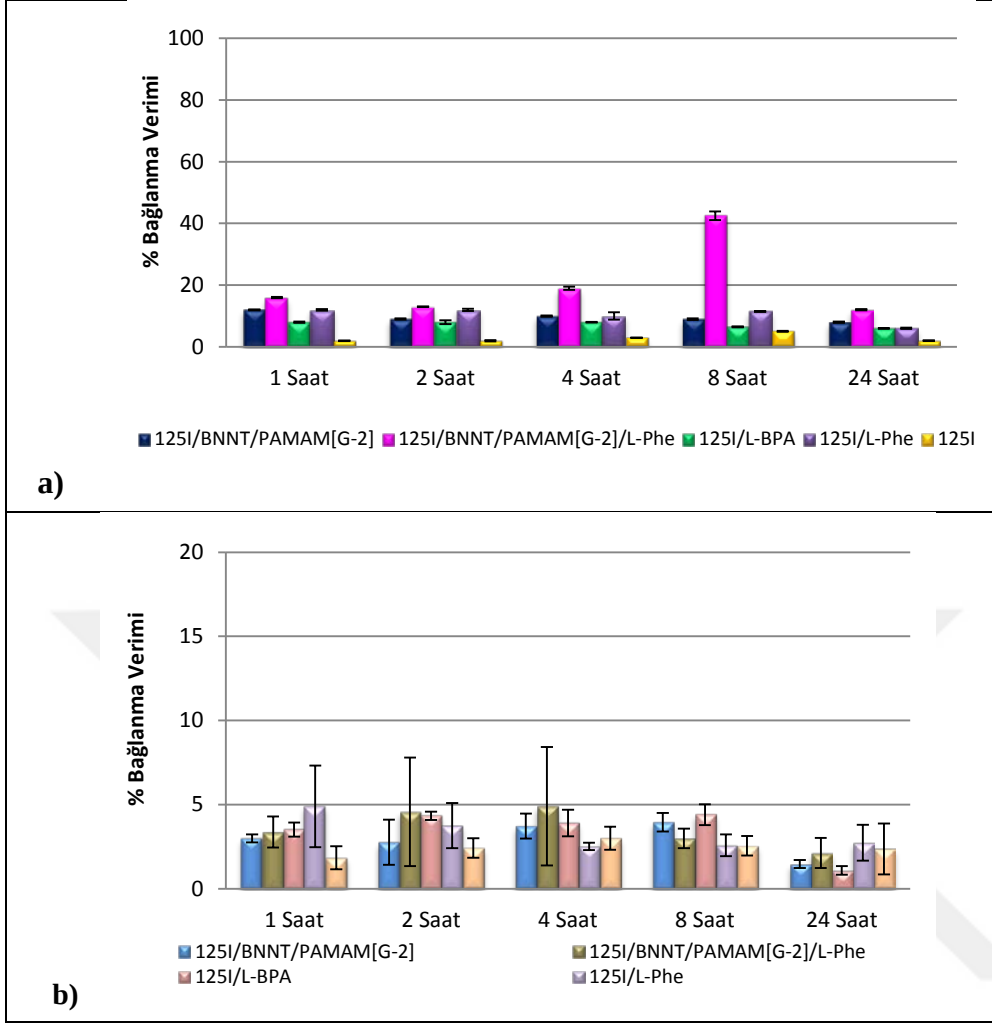
^{125}I ile işaretli örneklerin U87-MG hücrelerinde bağlanma verimi çalışması ^{131}I ile incelenen koşullarda aynı zaman parametrelerinde gerçekleştirilmiştir.

$^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$, $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, $^{125}\text{I}/\text{L-Phe}$, $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ ve $^{125}\text{I}^-$ örnekleri için 1, 2, 4, 8 ve 24 saatte U87-MG ve C8-D1A hücrelerinde bağlanma verimi çalışması sonuçları Şekil 4.40'da verilmiştir.

Şekil 4.40 incelendiğinde $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$ örneği için bağlanma verimi zamanla fazla değişmemiş, % 8-12 arasında bulunmuştur.

$^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ örneğinde hücre bağlanma verimi % 16'lardan 8. saatte maksimum değerine % 35'e ulaşmış ve 24. saatte % 12 bağlanmanın olduğu tespit edilmiştir. Bağlanma verimlerinin hata sınırları içinde ^{131}I ile işaretli olanlar ile benzer olduğu kabul edilmiştir. $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ örneğinin tüm zamanlarda hücre tutulumunun % 6-8 civarında olduğu, ve nanokonjugatın afinitesinin çok altında kaldığı tespit edilmiştir. $^{125}\text{I}^-$ 'in hücre afinitesi olmadığı için bağlanma % 1 civarında olduğu tespit edilmiştir.

C8-D1A hücrelerinde hiçbir radyoişaretli konjugat %5'in üzerinde bağlanma verimi göstermemiştir.

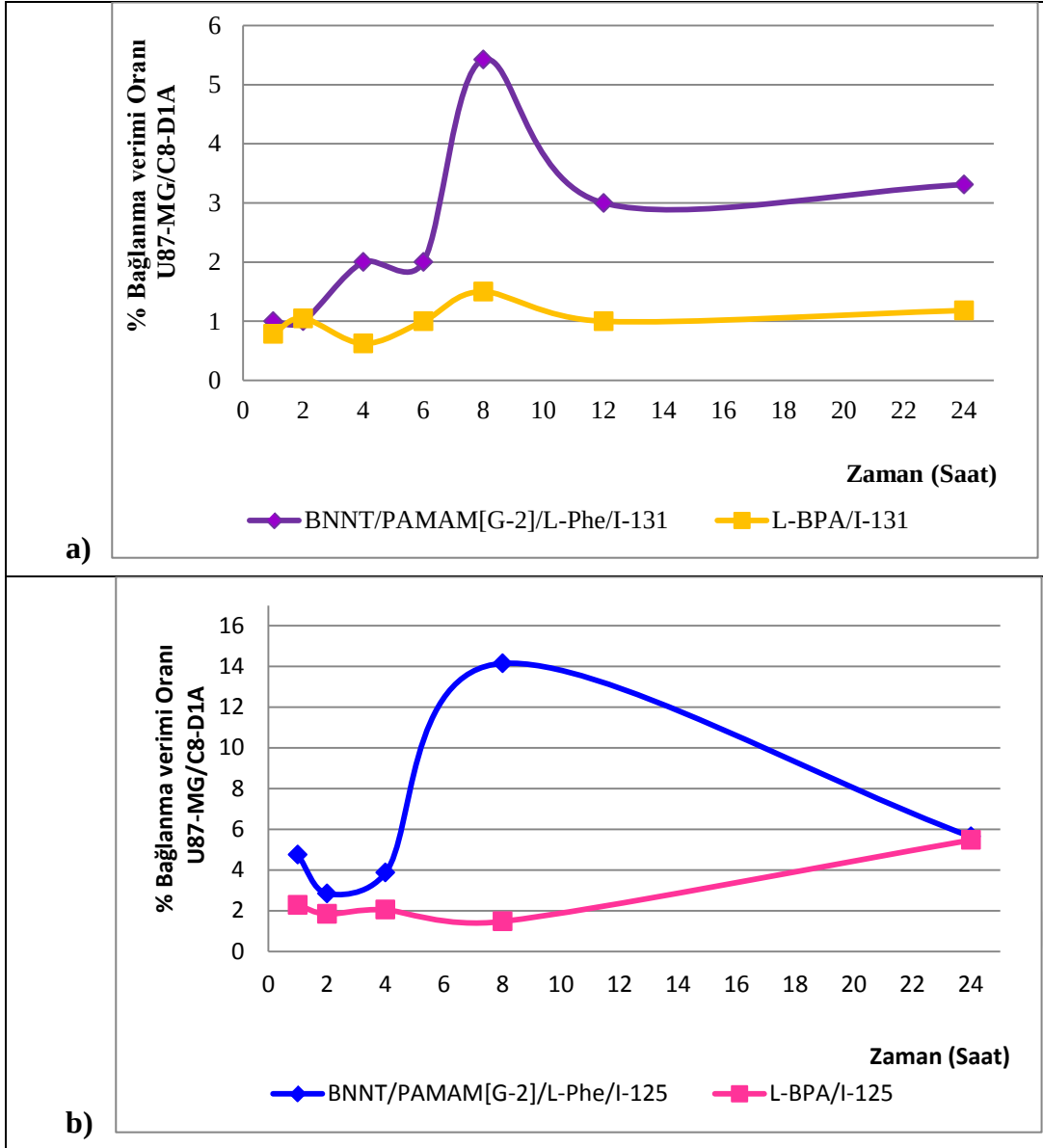


Şekil 4.40 $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]$, $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$, $^{125}\text{I}/\text{L-Phe}$, $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ ve $^{125}\text{I}^-$ 'nin a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ait grafikler

Şekil 4.41 a, $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ 'nin ve $^{131}\text{I}/\text{L-BPA}$ 'nın; Şekil 4.41 b ise $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ 'nin ve $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ 'nın U87-MG ve C8-D1A hücrelerindeki tutulum oranlarını zamanla değişimini kıyaslamalı olarak göstermektedir. $^{131}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ 'nin U87-MG hücrelerindeki tutulumunun C8-D1A hücrelerine oranı 8 saatte 5,44 kat artarak maksimum değere ulaşmıştır. En yakın farmasötik preparat olan L-PPA 8 saatteki oranı ise 2,2 dir. Aynı oran ^{125}I ile işaretli hücrelerde $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM}[\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ için 14,15 ve $^{125}\text{I}/\text{L-BPA}$ için ise 1,47 dir. U87-MG hücrelerinde C8-D1A'ya göre tutulumum artış göstermesi nanokonjugatların BNCT ajanı olarak kullanımı halinde ^{10}B oranı tümörde daha yüksek oranda olmasını ve dolayısı ile hasta

lehine daha etkin terapi sağlamada avantaj oluşturmaktadır. Bu durum geleneksel tedavi ajanı olan BPA ya göre avantaj sağlamaktadır. BNNT'lerin BPA ya göre diğer bir avantajı da içerdiği B oranı olarak gösterdikleri üstünlüktür. EDX analizlerine göre B oranını BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe, atomca % 8 B, % 1 N içermektedir. BPA içinde ise B'un atomik yüzdesi ise yalnızca % 3,7'dir. Doğal B % 19,9 ^{10}B izotopu, % 80,1 oranında da ^{11}B izotopu içermektedir. BNCT'de termal nötron tesir kesiti ^{10}B izotopu (3840b) için en yüksektir. Dolayısı ile BNCT de ^{10}B izotopu ile zenginleştirilmiş ajanları gerekir. BNNT'lerde elementel kompozisyon çok yüksek olduğundan oldukça pahalı ve ileri teknoloji isteyen ^{10}B lehine izotopik zenginleştirme olmasa bile ^{10}B oranı BNNT'lerde hedef doku içindeki ^{10}B konsantrasyonu konvansiyonellerden daha yüksek değere ulaşmaktadır.





Şekil 4.41 a) BNNT/PAMAM[G-2]/I-131 ve L-BPA/I-131 ve **b)** BNNT/PAMAM[G-2]/I-125 ve L-BPA/I-125 örneklerinin U87-MG hücrelerindeki % bağlanma veriminin C8-D1A hücrelerinkine oranı

Bağlanma veriminin en yüksek olduğu 8 saat diğer konvansiyoneller ile karşılaştırıldığında uygun bir süredir. BPA için bu oran 2 saat iken diğer bir BNCT ajanı olan BSH'da 12 saattir.

Japonya'da 2001 yılında Almanya ile işbirliği ile yapılan klinik çalışmada 56 glioblastoma (39 Avrupalı ve 17 Japon) hastası 100 mg/kg sodium borocaptate (BSH: $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) verilerek BNCT ile tedavi edilmiş, kullanılan ilacın farmakokinetiği ve B-10'un insanda tümör/beyin oranı da bu çalışma ile

belirlenmiştir. İlaç verildikten 12 saat sonra nötron ışınlamasının optimum olduğu görülmüştür (Kageji et al., 2011).

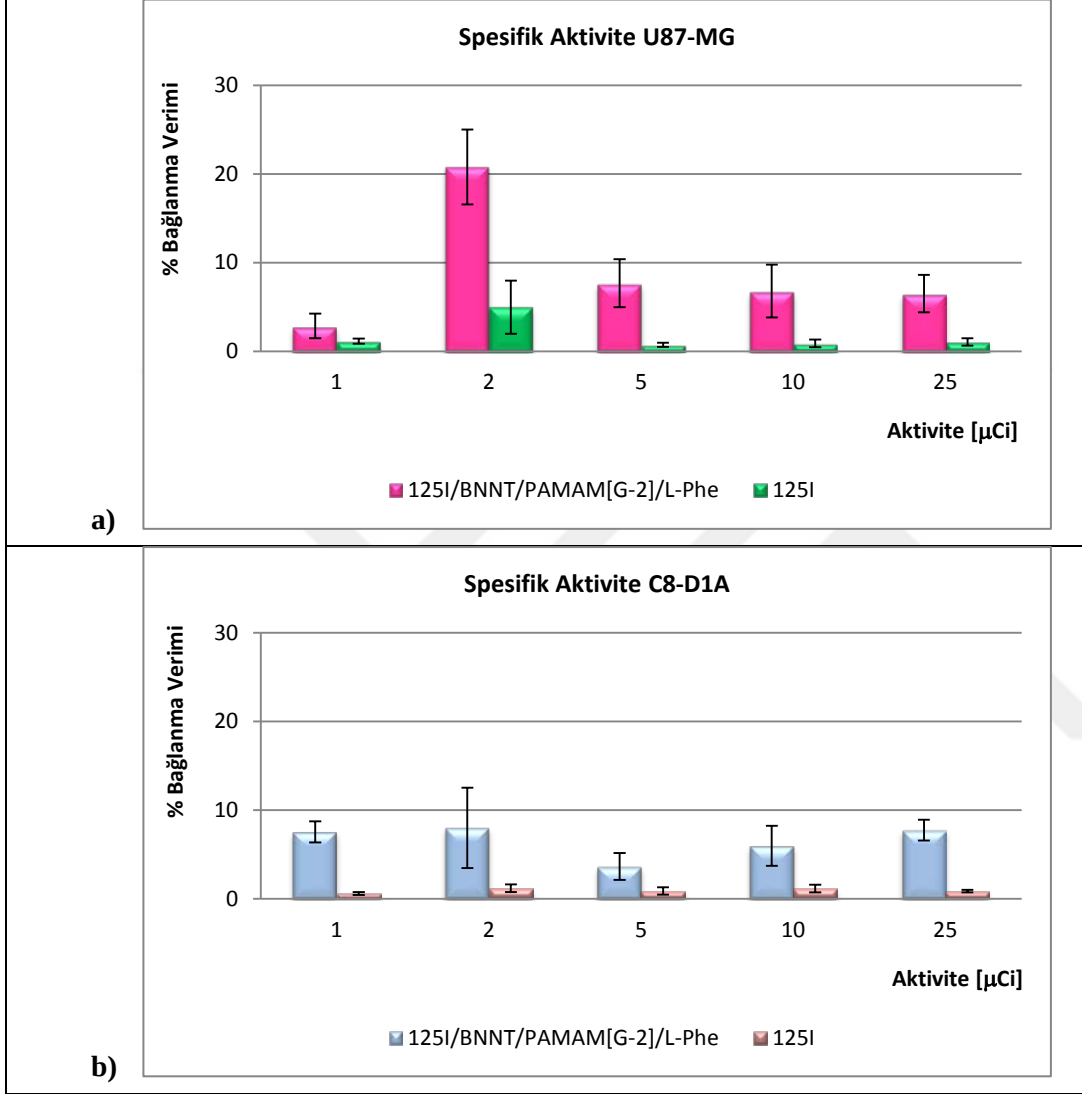
4.3.5. Spesifik Aktiviteye Bağlı Bağlanma Verimi Sonuçları

Zamana bağlı bağlanma verimi çalışması Bölüm 3.5.5’de açıklandığı gibi 8 farklı zamanda U87-MG ve C8-D1A hücreleri için denenmiştir. 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12 ve 24. saatlerde ^{131}I ve ^{125}I işaretli BNNT ve türevleri için % bağlanma verimi miktarları hesaplanmıştır. Radyoiyotinasyon bölüm 3.4’de açıklandığı gibi iyotinasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve kalite kontrolü TLRC ile tayin edilmiştir. Bağlanma verimi çalışmaları bölüm 3.5.3’te açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

Spesifik aktiviteye bağlı bağlanma verimi çalışması bölüm 3.5.5’de açıklandığı gibi farklı aktivitelerde 2 saatte U87-MG ve C8-D1A hücreleri için denenmiştir. 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I işaretli BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe için % bağlanma miktarları hesaplanmıştır. Radyoiyotinasyon 3.4’da açıklandığı gibi iyotinasyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir ve kalite kontrolü TLRC ile tayin edilmiştir. İyot miktarındaki farklanmanın radyoiyotinasyon verimine etkisinin kalite kontrolü TLRC ile gerçekleştirilmiştir. Sonuçları bölüm 4.1.5.1’ de Şekil 4.27 ile verilmiştir. Bağlanma verimi çalışmaları bölüm 3.5.3’te açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

2×10^4 hücre 24’lü kuyulara ekilmiştir. Hücre konfluent olduktan sonra hücre bağlanma çalışması (36 saat sonra) başlatılmıştır. 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I ile işaretlenen, 2 μg madde/kuyu için 2 saatte hücrelerde ^{125}I /BNNT/PAMAM [G-2] ve $^{125}\text{I}^-$ örneklerinin bağlanma verimi incelenmiştir. İodojen yöntemi ile konjugatlar radyoiyotlanmıştır. Belirtilen süre boyunca radyoişaretli konjugatlar hücrelerin üzerinde 37 °C’de % 90 nem ve % 5 CO_2 inkübatörde inkübe edilmiştir. 2 saat sonra hücrelerin üzerindeki örnekler uzaklaştırılarak iki kez 500 μL PBS ile yıkandıktan sonra üzerine 200 μL RİPA çözeltisi eklenmiştir. Üzerinde RİPA çözeltisi bulunan hücreler pipet yardımıyla mekanik olarak yüzeyden kaldırılmıştır. Elde edilen hücre süspansiyonunun 100 μL ’si alınarak üzerine 900 μL sentilasyon kokteyli eklenerek sıvı sentilasyon cihazı ile aktivite sayımı yapılmıştır. Hücre süspansiyonunun 25 μL ’si alınarak üzerine 200 μL BCA kiti eklenip protein tayini yapılmıştır. Elde edilen aktivite sayımı/protein oranlarından hücre başına gerçekleşen bağlanma miktarı hesaplanmıştır. U87-MG

ve C8-D1A hücreleri için hesaplanan sonuçlar ile oluşturulan grafikler Şekil 4.42’ de gösterilmiştir.



Şekil 4.42 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I ile işaretlenen $^{125}\text{I}/\text{BNNT}/\text{PAMAM} [\text{G}-2]/\text{L-Phe}$ ve $^{125}\text{I}^-$ için 2 saatte a) U87-MG ve b) C8-D1A hücre hattındaki % Bağlanma verimine ilişkin grafikler

Şekil 4.42 incelendiğinde U87-MG hücrelerinde 1 μCi ^{125}I ile işaretlenen nanokonjugatın hücre bağlanma verimi % 3 civarında iken 2 μCi ^{125}I ile işaretlenen nanokonjugatın hücre bağlanma veriminin 7 kat daha fazla olduğu (% 21) tespit edilmiştir. Bununla birlikte artan radyoaktivite miktarları için hücre bağlanma verimi % 7 olarak sabit kalmıştır. C8-D1A hücrelerine spesifitesi bulunmayan nanokonjugatın zaman parametresinde elde edilen sonuçları gibi

değişen radyoaktivite miktarları ile yapılan işaretli nanokonjugatların C8-D1A hücrelerindeki bağlanma verimi seçicilik göstermemiş ve % 8'in altında bulunmuştur.

^{125}I 'in bozunma başına 35,5 keV'lik bir enerji salmaktadır. Bu enerji Auger elektronları ve düşük enerjili gama ışını fotonları olarak salınırlar. Bu nedenle salınan enerjinin büyük kısmı hücre ortamında kalır. Salınan enerjinin hepsinin hücre ortamında kaldığını kabul edersek verilen ^{125}I aktivitesi ile μCi başına ortama verilen doz değeri yaklaşık olarak 1 mGy ile 25 mGy arasında doz değerlerine karşı gelir. Bu değerler belirgin hücre ölümü görmek için düşük değerlerdir. Her iki hücre tipinde gözlenen tutulum farkı ^{125}I 'in aktivitesinden çok hücre tipinin farkından kaynaklanmaktadır.

4.3.6. Floresan Görüntüleme Çalışması

Floresan görüntüleme çalışması ön hazırlıkları ve görüntüleme aşaması bölüm 3.5.6'da açıklandığı gibi gerçekleştirilmiştir.

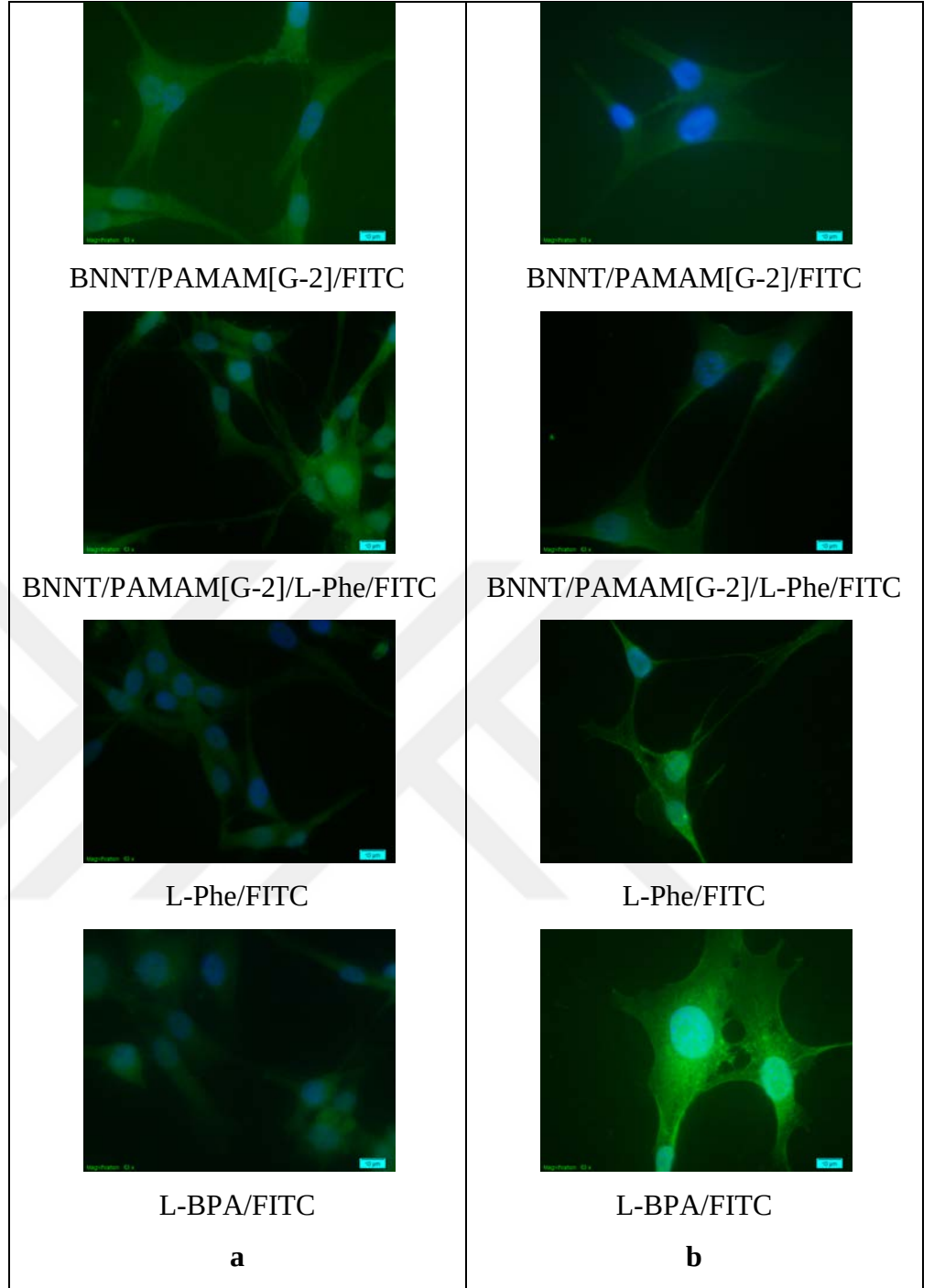
20 $\mu\text{g/mL}$ BNNT/PAMAM[G-2], 20 $\mu\text{g/mL}$ BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, 20 $\mu\text{g/mL}$ L-Phe ve 20 $\mu\text{g/mL}$ L-BPA örnekleri 50 μg / 50 μL üzerine FITC/DMSO (5 μL /dakika) damla damla ilave dilmiştir. FITC eklenen örnekler 8 saat 4°C'de inkübe edilerek işaretleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Örneklerle bağlanmayan FITC'nin uzaklaştırılması amacıyla bir gün önce hazırlanan Sefadeks-G25 kolondan örnekler süzölmüştür. 2×10^4 U87-MG ve 3×10^4 C8-D1A hücreleri ekilen chamber slide üzerine örnekler uygulanmıştır ve 2 saat 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hücreler yüzeye fikse edilip hücre çekirdekleri DAPI ile boyanmıştır. Floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışması 100x'lik büyütmede yeşil ve mavi filtre ile gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.43).

Şekil 4.43 incelendiğinde örneklerin floresan boya olan FITC ile işaretlendiği işaretli örneklerin hücrelerce tutulduğu ve hücrelerin uygulanan zaman süresince toksisiteye maruz kalmadığı morfolojilerinin literatür ile uyumlu olduğu görölmüştür. Çekirdekleri DAPI ile boyanan hücrelerin yeşil dalga boyunda alınan görüntüleri sonrasında mavi filtre ile alınan görüntüleri Image J programı kullanılarak karşılaştırılmıştır. Karşılaştırılan bu görüntüler yeşil görüntülerin hücre olduğunu ve bu hücrelerin canlı olduğunun kontrolü olarak gerçekleştirilmiştir. Floresan görüntüleme çalışması sonucu uygulanan dozun

toksik olmadığı ve bununla birlikte U87-MG ve C8-D1A hücrelerinin karakteristiğinin korunduğu hücrelerin yıldız şeklindeki görüntülerinden de görülmektedir.

Elde edilen görüntüler nanokonjugatın hücre afinitesini görsel olarak da göstermektedir. Bağlanmanın sitoplazmik olduğu görülmektedir. BNNT'ler ile farklı hücreler ile yapılan çalışmalarda da hücre bağlanmasının sitoplazmada olduğu gösterilmiştir. (Ciofani et al., 2010; Danti et al., 2013).



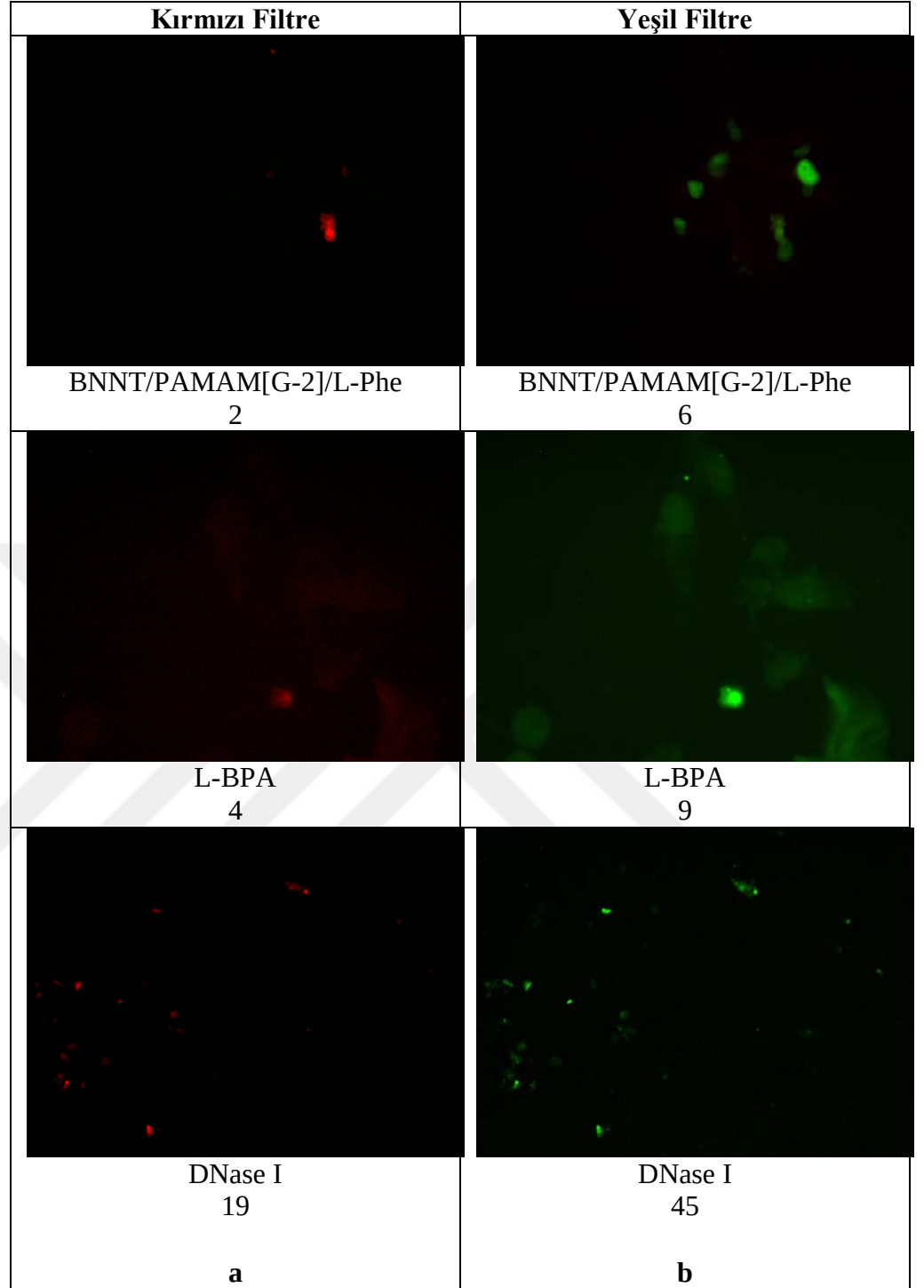


Şekil 4.43 BNNT/PAMAM [G-2]/FITC, BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe/FITC, L-Phe/FITC ve L-BPA/FITC için a) U87-MG, b) C8-D1A hücre hattındaki DAPI ve FITC boyalı fluoresan mikroskop görüntüleri

4.3.7. Apoptoz Çalışması

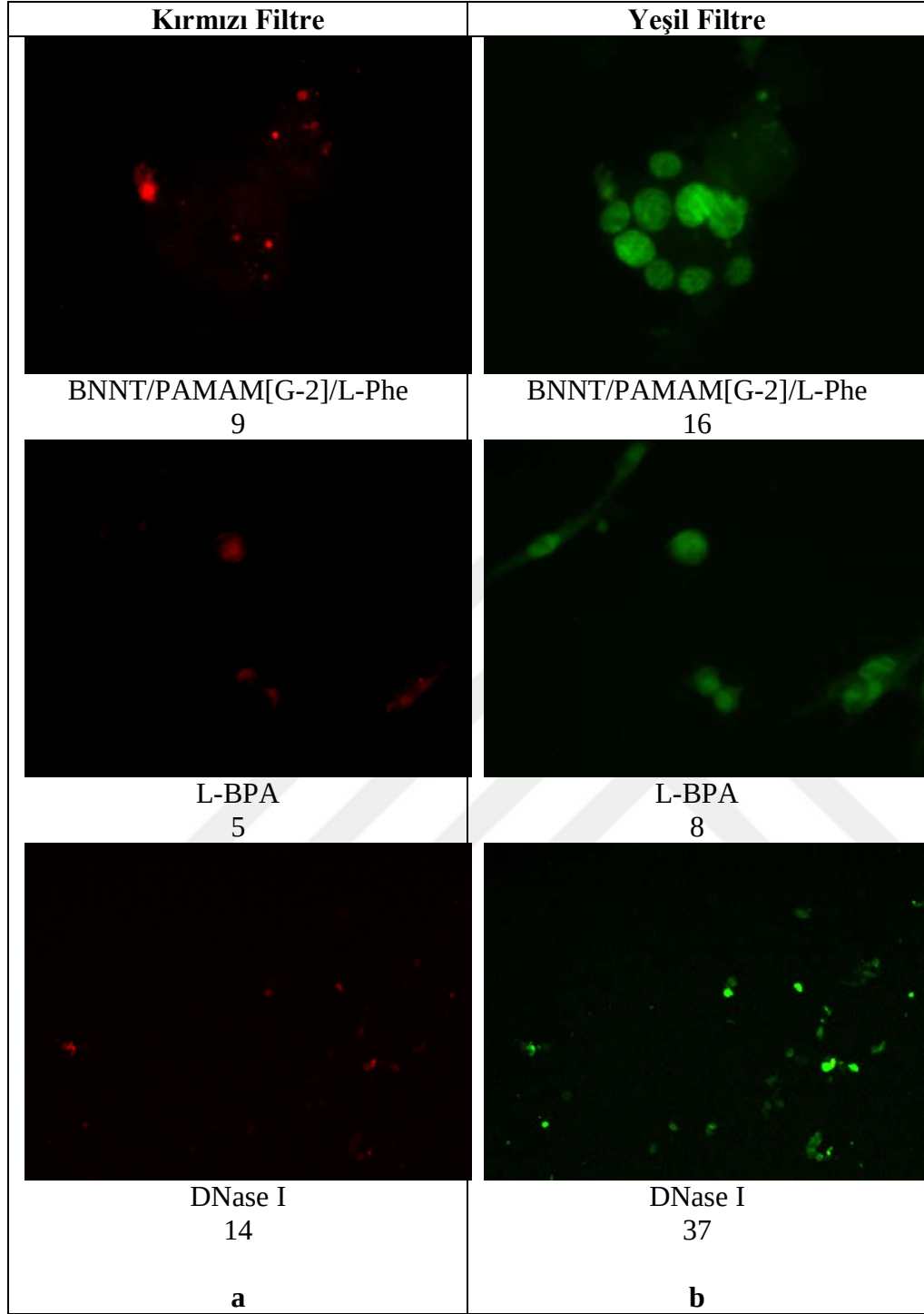
Apoptoz çalışması bölüm 3.5.7’de açıklandığı şekilde gerçekleştirilmiştir.

2×10^4 U87-MG ve 3×10^4 C8-D1A hücreleri ekilen chamber slide üzerine hücreler konflue olduktan sonra (36 saat) IC_{50} değerlerinde örnekler uygulanmıştır ve 24 saat $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’de CO_2 inkübatöründe inkübe edildikten sonra hücreler yüzeye fikse edilmiştir. Dead End Kit protokole uygun olarak uygulanmıştır. Floresan mikroskobu ile görüntüleme çalışması 100x’lik büyütmede yeşil ve kırmızı filtre ile gerçekleştirilmiştir. U87-MG ve C8-D1A hücrelerine uygulanan BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, L-BPA ve Kontrol (DNase I) görüntüleri U87-MG Şekil 4.44 ve C8-D1A Şekil 4.45’te gösterilmiştir.



Şekil 4.44 BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve L-BPA için 24 saatlik U87-MG hücre hattındaki

a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.



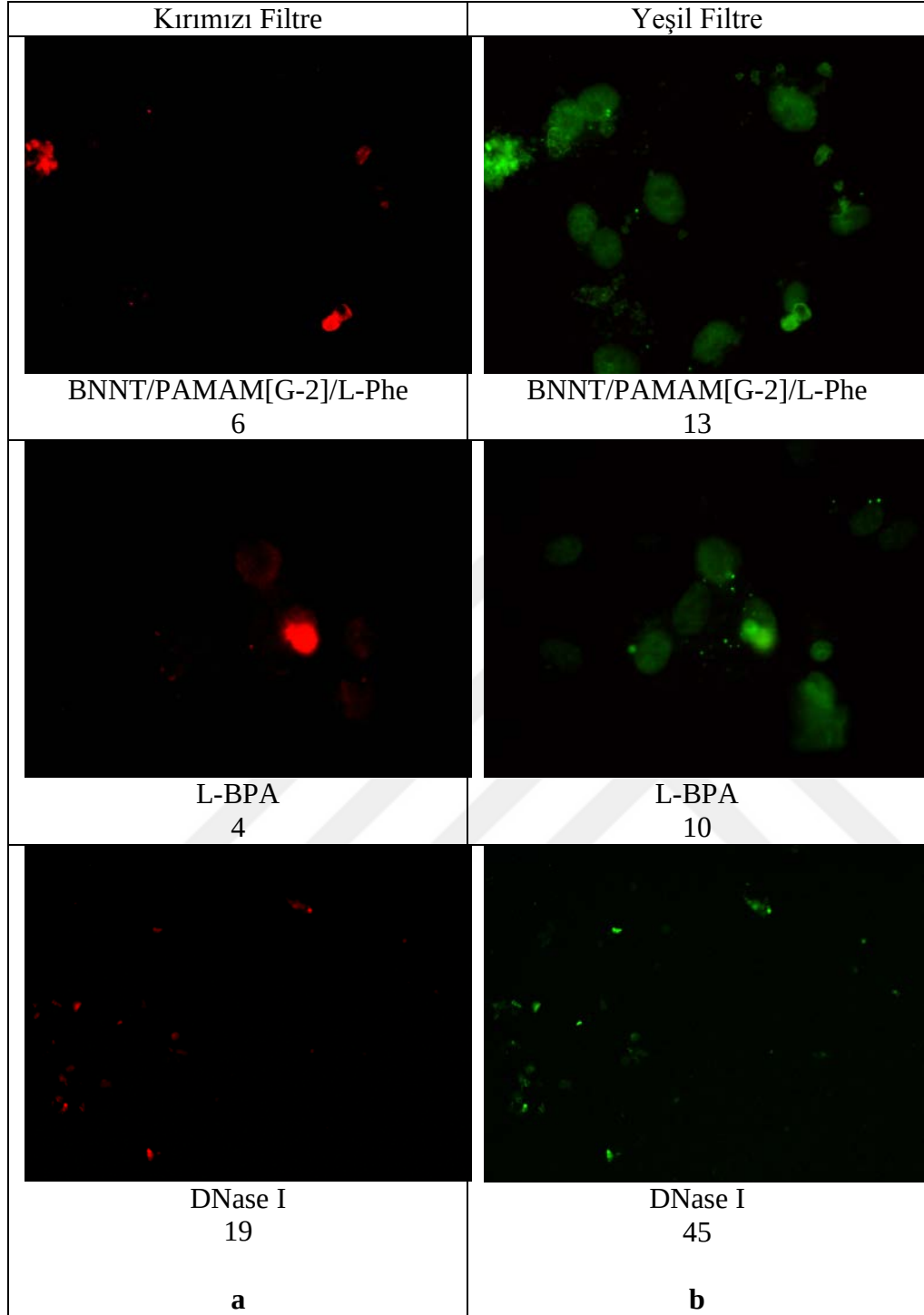
Şekil 4.45 BNNT/PAMAM [G-2]/L-Phe ve L-BPA için 24 saatlik C8-D1A hücre hattındaki
a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.

İyodinasyonun apoptoza etkisini incelemek amacıyla bölüm 3.4’de açıklanan şekilde ^{127}I ile gerçekleştirilen iyotlama çalışmasından elde edilen örnekler bölüm 3.5.7’de açıklandığı gibi apoptoz çalışması için U87-MG ve C8-

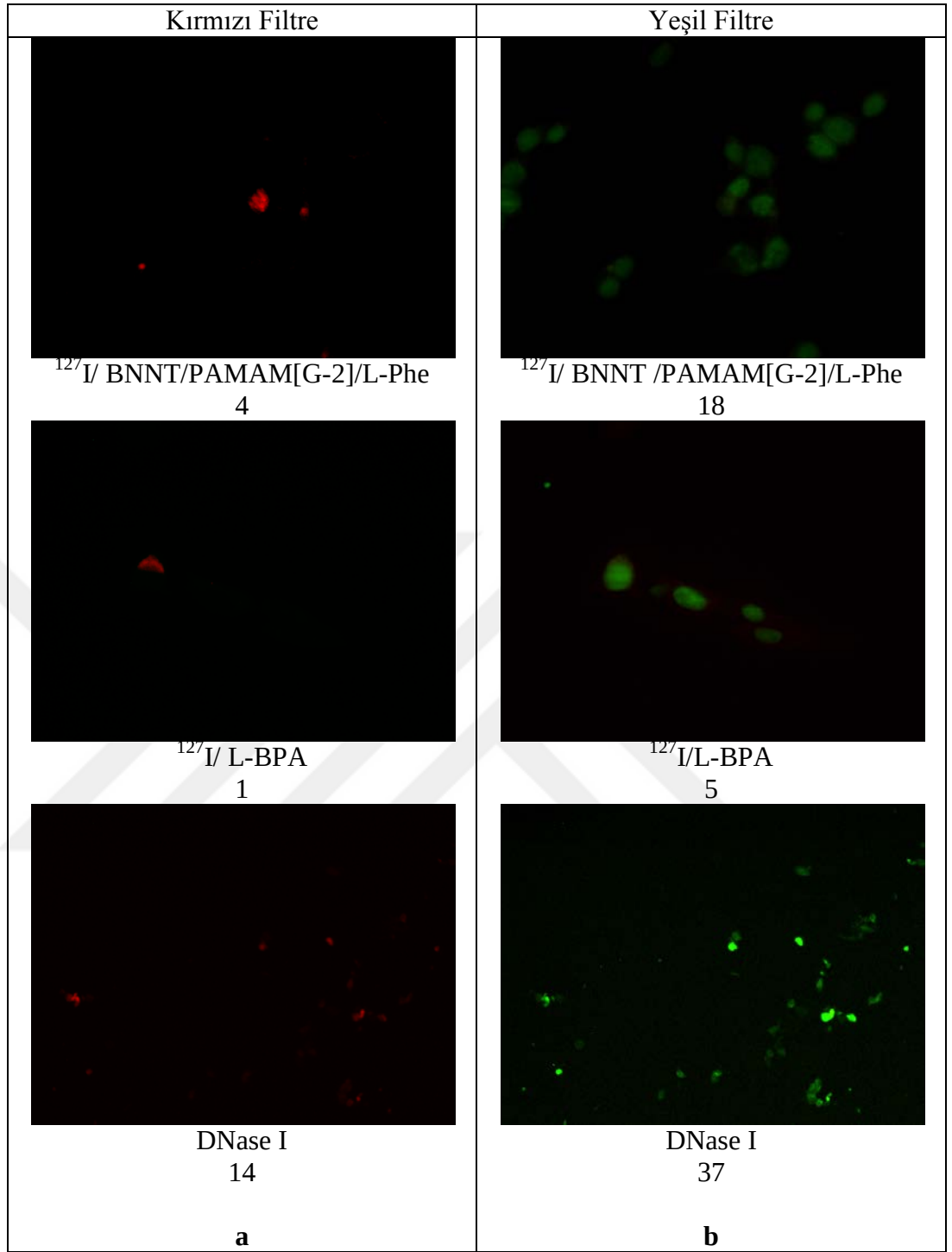
D1A hücrelerinde IC_{50} uygulanmıştır. Örneklerin görüntüleme çalışması 100x'lik büyütmede floresan mikroskobu ile yeşil ve kırmızı filtre ile gerçekleştirilmiştir. U87-MG ve C8-D1A hücrelerine uygulanan ^{127}I / BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve Kontrol (DNase I) görüntüleri U87-MG için Şekil 4.46' da ve C8-D1A için Şekil 4.47' de verilmiştir.

Sonuçlar sentezlediğimiz nanokonjugatların çalıştığımız doz aralıklarında biyouyumlu olduğunu ve apoptotik etkilerinin olmadığını göstermektedir. Farklı hücreler ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Salveti et al., 2015).

PAMAM modifiye nanokonjugatlar ile farklı sonuçlar elde edilebilmiştir. Farklı PAMAM türevlerinin glioma tedavisinde kullanılabilirliği farklı gruplarca incelenmiştir. Gao ve ekibi transferin yüklü PEG modifiye PAMAM'ı hazırlamış ve C6 hücreleri ile yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar ile tümör apoptozisin arttığını ve tümör oluşturulmuş ratlarda medyan değer olarak yaşam süresinin uzadığını rapor etmişlerdir (He et al., 2011).



Şekil 4.46 ^{127}I /BNNT/ PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve Kontrol (DNase I) için 24 saatlik U87-MG hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.



Şekil 4.47 ^{127}I /BNNT/ PAMAM [G-2]/L-Phe, ^{127}I /L-BPA ve Kontrol (DNase I) için 24 saatlik C8-D1A hücre hattındaki a) Kırmızı b) Yeşil Filtre Apoptoz Görüntüleri.



5. SONUÇ

Sentezlenen nanobiyokonjugatın görüntüleme, tedavinin takibi ve BNCT ile tedavide önemli kolaylıklar sağlaması öngörülmektedir. L-Phe'ni taşıyan BNNT'lerin ve yapıya takılan $^{125/131}\text{I}$ radyonüklidinin beyin tümörlerinin tanısında glioblastoma kanser hücresine yüksek affinitesi olan BNNT/PAMAM/Radyonüklid yapısı tez çalışması kapsamında tasarlanmış ve sentezlenmiş olması tez çalışmasının özgünlüğünü teşkil etmektedir.

Lityum katalizörlüğünde yüksek sıcaklıkta $\text{NH}_3(\text{g})$ ortamında CVD yöntemiyle BNNT'ler % 70 verimlilikte sentezlenmiştir. Sentezlenen BNNT'lerin karakterizasyonu XRD, SEM, EDX, TEM ve FTIR ile gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları sonucunda en uygun özellikler; 5 saat alümina kayak kroze ile gerçekleştirilen senteze ilişkin BNNT'ler olarak tespit edilmiştir. BNNT'lerin çapı SEM ve TEM analizleri sonucunda 25 nm olarak tespit edilmiştir. Elementel kompozisyonu incelendiğinde % 49 B, % 51 N içerdiği görülmüştür. FTIR ile karakteristik 800 ve 1300 nm dalga boyunda B-N gerilmeleri tespit edilmiştir.

Optimum koşullarda sentezlenen BNNT'ler PAMAM ile modifiye edilerek çözünürlüğü arttırılmıştır. Jenerasyon 2 ve 4 ile gerçekleştirilen modifikasyonlar SEM ve EDX analizleri ile karakterize edildiğinde yapının boyutunda bir değişiklik olmadığı PAMAM dendrimerlerin nanotüpleri çepeçevre sardığı tespit edilmiştir.

L-Phe, PAMAM modifiye BNNT'lerle EDC/NHS kimyası kullanılarak konjuge edilmiştir. Konjugasyon verimi HPLC yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. BNNT/PAMAM[G-4] ile L-Phe konjugasyonu sonucu elde edilen verim $\% 72,50 \pm 3,25$, BNNT/PAMAM[G-2] ile L-Phe konjugasyonu sonucu elde edilen verim $\% 87,50 \pm 2,50$ olarak tespit edilmiştir. Nanokonjugatın karakterizasyonu SEM, EDX ve FTIR ile incelendiğinde yapısal bir farklanmanın meydana gelmediği boyutun büyümediği SEM ile görülmüştür. EDX analizi incelendiğinde BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe nanokonjugatı için analiz yapılan bölgeye göre % 69 B % 15 N içerdiği,

BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe nanokonjugatı için analiz yapılan bölgeye göre % 8 B % 1 N içerdiği tespit edilmiştir.

Sentezlenen BNNT'lerin ve modifikasyonlarının her bir basamadığı için elde edilen nanokonjugatların zeta potansiyel analizi gerçekleştirilerek yüzey yükleri tespit edilmiştir. BNNT'ler 11,56 mV, BNNT/PAMAM[G-2] 37,80 mV, PAMAM[G-2] – 16,90 mV, L-Phe – 8,43 mV ve ticari formu L-BPA 22,30 mV olarak bulunmuştur.

Elde edilen nanokonjugat $^{125/131}\text{I}$ ile iyotinasyon yöntemi kullanılarak radyoiyotlanmıştır. Radyoiyotinasyon kalite kontrolü TLRC, HPLRC ve kağıt elektroforezi ile yapılmıştır. Kağıt elektroforezi ile örneklerin yükleri belirlenmiş olup, bulunan dğerler zeta potansiyel ölçümü ile bulunan sonuçları desteklemiştir.

TLRC için optimum banyo çözeltisi olarak tespit edilen n-bütanol/distile su (2:1) çözeltisinde radyoişaretleme verimi tüm örnekler için % 86'nın üzerinde bulunmuştur.

^{131}I /BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe, ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-4], ^{131}I /L-Phe, $^{131}\text{I}^-$ ve $^{131}\text{I}^+$ örnekleri için R_f değerleri sırası ile; 0,099, 0,500, 0,941, 0,380 ve 0,089 olarak tespit edilmiştir. R_f değerleri incelendiğinde serbest iyotun yükseltgendiği ve yükseltgenen iyotun nanokonjugata bağlandığı hepsinin farklı R_f değerleri ile kolayca ayırt edilebilmiştir.

^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{125}I /L-Phe, ^{125}I /L-BPA, $^{125}\text{I}^-$ ve $^{125}\text{I}^+$ örnekleri için R_f değerleri sırası ile; 0,058, 0,088, 0,93, 0,075, 0,036 ve 0,320 olarak tespit edilmiştir.

İyodinasyonun nanokonjugat yapısına sitotoksik etkisini incelemek amacıyla iyotun kararlı radyoizotopu olan ^{127}I ile de iyotinasyon gerçekleştirilmiştir.

Radyoiyotlu örneklerin kağıt elektroforez çalışması gerçekleştirilerek örneklerin yükü incelenmiştir. ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{131}I /L-Phe, $^{131}\text{I}^-$ ve $^{131}\text{I}^+$ örnekleri için elde edilen sonuçlar sırası ile + 1,1, 0, – 4,0 ve + 1,6'dır.

Radyoiyotlu örneklerin HPLRC ile gerçekleştirilen kalite kontrol çalışması sonucunda kolondaki alıkonma süreleri (R_t) kıyaslandığında $^{131}\text{I}^-$ 'un 25,531 dakikadır ve iodojen yöntemiyle tamamen yükseltgenerek $^{131}\text{I}^+$ kolonda 13,224 dakika alıkonmuştur. Yükseltgenen iyot L-BPA örneğine bağlanarak kolonda 6,853 dakika alıkonmuştur. Yükseltgenen iyot nanokonjugata

bağlanarak ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe kolonda 2,246 dakika alıkonmuştur. Ortamda serbest iyot ya da yükseltgenmiş iyota ait pik bulunmamaktadır. İşaretleme yüksek verimlilikte gerçekleşmiştir.

Teorik ve deneysel lipofilite değerleri hesaplanan örnekler için ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2] için 0,45, ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe için 1,80 ve ^{131}I /BPA için 0,42 olarak bulunmuştur. Nanokonjugatımız 1,80 gibi yüksek bir lipofilite ile KBB'ni geçmesi için uygun özellik taşıdığı tespit edilmiştir.

Radyoiyotlu örneklerin stabilite testleri 0, 1, 2, 4, 8 ve 24 saat için gerçekleştirildiğinde her zaman için işaretli örneklerden TLRC yöntemi ile kalite kontrol yapılarak verimleri hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde verim % 100'den 24 saatte % 92 gibi yüksek bir işaretleme verimini koruduğu gözlemlenmiştir.

In vitro uygulamalar için temin edilen U87-MG ve C8-D1A hücreleri uygun besiyer ortamında çoğaltılmıştır.

Nanokonjugatların sitotoksik etkilerini incelemek amacıyla 10-20-30-50-100-250-500-1000 ng/mL, 1-5-25-100-500-1000 ng/mL ve 0,5-1-5-10-50-100 µg/mL konsantrasyonlarda 1, 2, 24 ve 48. saatlerdeki sitotoksiteleri WST-8 canlılık test kiti ile incelenmiştir. BNNT/PAMAM[G-4] 50 ng/mL, BNNT/PAMAM[G-4]/L-Phe 100 ng/mL'de 24 saatte % 80 canlılık tespit edilmiştir. BNNT/PAMAM[G-2] 5 µg/mL, BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe 10 µg/mL, L-BPA ve L-Phe tüm konsantrasyonlar için 24 saatte % 80'in üzerinde canlılık göstermiştir. İyodinasyonun sitotoksositeye etkisini incelemek amacıyla kararlı iyot izotopu olan ^{127}I ile işaretlenen örneklerin 24 ve 48 saatteki canlılıkları incelenmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde nanokonjugatların çalışılan konsantrasyon aralıklarında sitotoksik olmadıkları ve iyotinasyonun sitotoksositeye herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

U87-MG ve C8-D1A hücrelerinde BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, BNNT/PAMAM[G-2], L-BPA ve L-Phe örnekleri $^{125/131}\text{I}$ ile işaretlenerek tutulumları % bağlanma verimi olarak incelenmiştir. U87-MG hücreleri için ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{125}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{125}I /L-BPA, ^{125}I /L-Phe ve ^{125}I örneklerinin bağlanma verimleri sırası ile % 39, 8, 11, 7 ve 3 iken ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2]/L-Phe, ^{131}I /BNNT/PAMAM[G-2], ^{131}I /L-

BPA, ^{131}I /L-Phe ve ^{131}I örnekleri için sırası ile % 51, 6, 8, 4 ve 2 olarak tespit edilmiştir. C8-D1A hücrelerinde nanokonjugatların bağlanma verimleri örneğe spesifikite göstermemekte ve tüm örnekler için % 10'un altında seyretmektedir. Radyoiyotinasyonun ^{125}I ya da ^{131}I ile gerçekleştirilmesinin hücre bağlanmasına çok büyük bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Hücre bağlanma verimine radyoiyotun dozunun etkisini incelemek amacıyla 1, 2, 5, 10 ve 25 μCi ^{125}I ile radyoişaretlemeler gerçekleştirilerek verimler incelendiğinde en yüksek bağlanma verimi 2 μCi ile işaretlenen örneklerde görülmüştür bu değer U87-MG hücreleri için % 21 olarak tespit edilmiştir. Bu çalışma için de C8-D1A hücrelerinde iyot aktivitesinin değişiminin bir etkisi tespit edilmemiş, bağlama tüm dozlar için % 7 civarında seyretmiştir.

Nanokonjugatlar floresan bir boya olan FITC ile işaretlendikten sonra U87-MG ve C8-D1A hücrelerinde görüntüleme çalışması gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme çalışmasında örneklerin canlı hücrelere bağlandığını göstermek amacıyla hücrelerin çekirdekleri DAPI ile maviye boyanmıştır ve floresan işaretli örnekler yeşil görüntü oluşturmuştur. Görüntüler değerlendirildiğinde floresan işaretli maddenin hücre sitoplazmasında bulunduğu, hücre çekirdeğine ulaşmadığı tespit edilmiştir.

U87-MG ve C8-D1A hücrelerinde nanokonjugatların apoptotik etkisi Dead End Kiti ile incelenmiştir. Pozitif kontrol olarak DNase I kullanılmıştır. Görüntüler değerlendirildiğinde herhangi bir apoptotik etkinin olmadığı tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlar BNNT'lerin biyoyumlu olduğunu göstermektedir. PAMAM'ın BNNT'lerin çözünürlüğünü ve biyoafinitesini artırıcı etkisi olmuştur. PAMAM ile modifikasyon yapmak sinerjistik etki kazandırmıştır. PAMAM'ın hücre üzerindeki toksik etkisini azaltırken BNNT'lerin çözünürlüğünü ve hücre afinitesini arttırmıştır. Ayrıca L-Phe ile konjugasyon hücre afinitesinde olumlu bir etki sağlamış, U87-MG hücrelerine daha seçici hale getirmiştir. Radyoiyotinasyon da iyi bir taşıyıcı motif sağlamıştır. Bu şekilde oluşturulan nanokonjugat:

BNCT için yüksek B içeren bir taşıyıcı nanokonjugat özelliği ile glioblastomalarda terapi için uygun özelliğe sahip bulunmuştur.

Radyoiyot ile işaretlemek nanokonjugata iyi bir teranostik ajan özelliği olma özelliğini kazandırmıştır. Radyoiyotun bozunma şekline göre;

1) ^{131}I ile işaretlendiğinde ise terapiyi SPECT izleme, görüntüleme veya tedavi dozu kullanıldığında ilave radyonüklid tedavi dozu sağlamaktadır.

2) ^{124}I gibi bir PET radyonüklidi ile işaretlendiğinde de PET görüntüleme veya radyonüklid terapi için uygun özellik kazandırılmaktadır.

Çalışmalarda kullanılan ^{125}I daha çok hücre izleme çalışmaları için uygun özellik göstermektedir.





KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agemura, T., Morishita, H.,** 2016, Patent No: US 2016/0148782, Scanning Electron Microscope.
- Arima, H., Motoyama, K.,** 2009, Recent Findings Concerning PAMAM Dendrimer Conjugates with Cyclodextrins as Carriers of DNA and RNA, Sensors, 9 pp 6346 – 6361.
- Barth, R. F., Coderre, J. A., Vicente, M. G., Blue, T. E.,** 2005, Boron Neutron Capture Therapy of Cancer, Current Status and Future Prospects, Clinical Cancer Research 11 pp.3987 – 4002.
- Benjamin, S.,** 2016, Young Scientists Journal, 18 pp.33 – 35.
- Beyin Tümörleri,** <http://braintumor.org/brain-tumor-information/understanding-brain-tumors/tumor-types/>, 05.07.2016.
- Bortolussi, S., Bakeine, J.G., Ballarini, F., Bruschi, P., Gadan, M. A., Protti, N., Stella, S., Clerici, A., Ferrari, C., Cansolino, L., Zonta, C., Zonta, A., Nano, R., Altieri S.,** 2011, Boron uptake measurements in a rat model for Boron Neutron Capture Therapy of lung tumours, Applied Radiation and Isotopes 69 pp.394 – 398.
- Brahimaj, B., Lamba, M., Breneman, J. C., Warnick, R. E.,** 2016, I odine-125 seed migration within brain parenchyma after brachytherapy for brain metastasis: case report, Journal of Neurosurgery pp. 1 – 4.
- Cai, Q. Y., Kim, S. H., Choi, K. S., Kim, S. Y., Byun, S. J., Kim, K. W., Park, S. H., Juhng, S. K., Yoon, K. H.,** 2007, Colloidal gold nanoparticles as a blood-pool contrast agent for x-ray computed tomography in mice. Invest Radiol., 42(12) pp.797 – 806.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Carpano, M., Perona, M., Rodriguez, C., Nievas, S., Olivera, M., Santa Cruz, G. A., Brandizzi, D., Cabrini, R., Pisarev, M., Juvenal, G. J., Dagrosa, M. A.,** 2015, Experimental Studies of Boronophenylalanine (^{10}BPA) Biodistribution for the Individual Application of Boron Neutron Capture Therapy (BNCT) for Malignant Melanoma Treatment, , Int J Radiation Oncol Biol Phys, 93(2) pp. 344 – 352.
- Chen, X., Wu P., Rousseas, M., Okawa, D., Gartner, Z., Zettl, A., Bertozzi, C. R.,** 2009, Boron Nitride Nanotubes Are Noncytotoxic and Can Be Functionalized for Interaction with Proteins and Cells, Journal of the American Chemical Society 131 pp.890 – 891.
- Ciani, L., Ristori, S.,** 2012, Boron as a platform for new drug design, Expert Opinion on Drug Discovery 7, 11: 1017 – 1027.
- Ciofani, G., Ricotti, L., Danti, S., Moscato, S., Nesti, C., D'Alessandro, D., Dinucci, D., Chiellini, F., Pietrabissa, A., Petrini, M., Menciassi, A.,** 2010 Investigation of interactions between poly-L-lysine-coated boron nitride nanotubes and C2C12 cells: up-take, cytocompatibility, and differentiation Int. J. Nanomed., 5, 285 – 298.
- Cormode, D. P., Roessl, E., Thran, A., Skajaa, T., Gordon, R. E., Schlomka, J. P., Fuster, V., Fisher, E. A., Mulder, W. J. M., Proksa, R., Fayad, Z. A.,** 2010, Atherosclerotic plaque composition: analysis with multicolor CT and targeted gold nanoparticles. Radiology, 256(3) pp.774 – 782.
- Cormode, D. P., Naha, P. C., Fayad, Z. A.,** 2014, Nanoparticle Contrast Agents for Computed Tomography: A Focus on Micelles, Contrast Media Mol Imaging., 9(1) pp.37–52.
- Corti, M., Bonora, M., Borsa, F., Bortolussi, S., Protti, N., Santoro, D., Stella, S., Altieri, S., Zonta, C., Clerici, A. M., Cansolino, L., Ferrari, C., Dionigi, P., Porta, A., Zanoni, G., Vidari, G.,** 2011. Nuclear magnetic resonance study of Gd-based nanoparticles to tag boron compounds in boron neutron capture therapy, Journal of Applied Physics 109.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Criscione, J. M., Dobrucki, L. W., Zhuang, Z. W., Papademetris, X., Simons, M., Sinusas, A. J., Fahmy, T. M.,** 2011, Development and application of a multimodal contrast agent for SPECT/CT hybrid imaging, *Bioconjugate Chem*, 22 (9), pp.1784 – 1792.
- Danti, S., Ciofani, G., Moscato, S., D'Alessandro, D., Ciabatti, E., Nesti, C., Brescia, R., Bertoni, G., Pietrabissa, A., Lisanti, M., Petrini, M., Mattoli, V., Berrettini, S.,** 2013, Boron nitride nanotubes and primary human osteoblasts: in vitro compatibility and biological interactions under low frequency ultrasound stimulation, *Nanotechnology*, 24, pp.465102.
- Dischino, D. D., Welch, M. J., Kilbourn, M. A., Raichie, M. E.,** 1983, Relationship Between Lipophilicity and Brain Extraction of C-11-Labeled Radiopharmaceuticals, *J Nucl Med*, 24 pp.1030 – 1038.
- Duckbong, S., Jaewoo, K., Seong-Hee, P., Young-Uk, J., Young-Soo, S., Sang-Hwa, L., Jaeyong, K.,** 2013, Synthesis of boron nitride nanotubes using thermal chemical vapor deposition of ball milled boron powder, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 19(4) pp.1117 – 1122.
- El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C., Ghandehari, H.,** 2002. Transepithelial transport of poly(amidoamine) dendrimers across Caco-2 cell monolayers, *Journal Of Controlled Release*, 81(3) pp.355 – 365.
- El-Sayed, M., Ginski, M., Rhodes, C.A., Ghandehari, H.,** 2003. Influence of Surface Chemistry of Poly(Amidoamine) Dendrimers on Caco-2 Cell Monolayers, *Journal Of Bioactive And Compatible Polymers* 18(1) pp.7 – 22.
- Farah, K., Farouk, N.,** 1998. Electrophilic Radioiodination of Tyrosine Derivatives, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 41(4) pp.255-259.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Ferraro, J. R., Basile, L. J.**, 1985, Fourier Transform Infrared Spectroscopy, Applications to Chemical Systems, Academic Press, Ins. Orlando San Diego New York London Toronto Montreal Sydney Tokyo, pp. 4 – 9.
- Fraker, P. J., Speck, J. C.**, 1978. Protein and Cell Membrane Iodinations with a Sparingly Soluble Chlroamide 1,3,4,6-tetrachloro 3 α ,6 α -diphenyl glycoluril, Biochemical and Biophysical Research Communications 80(4) pp.849-57.
- Fu, Y., Nitecki, D. E., Maltby, D., Simon, G. H., Berejnoi, K., Raatschen, H. J., Yeh, B. M., Shames, D. M., Brasch, R. C.**, 2006, Dendritic iodinated contrast agents with PEG-cores for CT imaging, synthesis and preliminary characterization, Bioconjugate Chem 17, pp.1043 – 1056.
- Gao, S., Li, J., Jiang, C., Hong, B., Hao, B.**, 2016, Plasmid pORF-hTRAIL targeting to glioma using transferrin-modified polyamidoamine dendrimer, drug Design Development And Therapy, 10.
- Genadya, A. R., Nakamura, H.**, 2010. Undecahydro-closo-dodecaborates as good leaving groups in organic synthesis: generation of substituted styrenes via elimination of aryethyl dodecaborates, Organic and Biomolecular Chemistry 8 pp.4427-4435.
- Glioblastoma hücre morfolojisi,** <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/Attachments/5/0/3/7/1976.ashx>, 20.07.2016.
- Golberg, D., Bando, Y., Eremets, M., Takemura, K., Kurashima, K., Yusa, H.**, 1996, Nanotubes in boron nitride laser heated at high pressure, Applied Physics Letters 69 pp.2045.
- Golshaei, P., and Pourianazar, N.T.**, 2013, Surface Modifications of Cationic Polyamidoamine (PAMAM) Dendrimers Hacettepe J. Biol. & Chem 42(4) pp.485-497.
- Gordon, L. L.**, 1936, Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons, The American Journal of Roentgenology and Radium Therapy, 36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo, L., Singh, R. N.,** 2009, Catalytic growth of boron nitride nanotubes using gas precursors, *Physica E*, 41 pp. 448 – 453.
- Guo, R., Wang, H., Peng, C., Shen, M. W., Zheng, L. F., Zhang, G. X., Shi, X. Y.,** 2011, Enhanced X-ray attenuation property of dendrimer-entrapped gold nanoparticles complexed with diatrizoic acid, *J Mater Chem* 21(13), pp.5120 – 5127.
- Han, W.Q., Bando, Y., Kurashima, K., Sato, T.,** 1998, Synthesis of boron nitride nanotubes by a substitution reaction, *Applied Physics Letters* 73 pp.3085.
- He, H., Li, Y., Jia, X. R., D, J., Ying, X., Lu, W. L., Lou, J. N., Weid, Y.,** 2011, PEGylated Poly(amidoamine) dendrimer-based dual-targeting carrier for treating brain tumors, *Biomaterials*, 32, pp. 478 – 487.
- Heister, E., Neves, V., Tilmaciu, C., Lipert, K., Sanz Beltran, V., Coley, H. M., Silva, S. R. P., McFadden, J.,** 2009, Triple functionalisation of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy, *Carbon* 47, pp.2152–2160.
- Huppmann, S., Römer, S., Altmann, R., Obladen, M., Berns, M.,** 2008, 17-Estradiol Attenuates Hyperoxia-Induced Apoptosis in Mouse C8-D1A Cell Line, *Journal of NeuroscienceResearch*, 86, pp.3420 – 3426.
- Hwang, K.C., Lai, P.D., Chiang, C.S., Wang, P.J., Yuan, C.J.,** 2010, Neutron capture nuclei-containing carbon nanoparticles for destruction of cancer cells, *Biomaterials* 31, pp.8419-8425.
- Jevprasesphant, R., Penny, J., Jalal, R., Attwood, D., McKeown, N.B., D'Emanuele, A.,** 2003, The influence of surface modification on the cytotoxicity of PAMAM dendrimers, *International Journal of Pharmaceutics* 252, pp.263-266.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Joensuu, H., Kankaanranta, L., Seppälä, T.,** 2003, Boron neutron capture therapy of brain tumors: clinical trials at the Finnish facility using boronophenylalanine, *Journal of Neuro-Oncology* 62 pp.123-134.
- Kageji, T., Nagahiro, S., Kitamura, K., Nakagawa, Y., Hatanaka, H., Haritz, D., Grochulla, F., Haselsberger, K., Gabel, D.,** 2011, Optimal Timing Of Neutron Irradiation For Boron Neutron Capture Therapy After Intravenous Infusion of Sodium Borocaptate In Patients with Glioblastoma, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 51 pp.120-130.
- Kesharwani, P., Jain, K., Jain, N.K.,** 2014, Dendrimer as nanocarrier for drug delivery, *Progress in Polymer Science* 39 pp.268–307.
- Kitchens, K.M., El-Sayed, M. E. H., Ghandehari, H.,** 2005, Transepithelial and endothelial transport of poly (amidoamine) dendrimers, *Advanced Drug Delivery Reviews* 57(15) pp.2163-2176.
- Kloet, E. R., Joëls, M., Holsboer, F.,** 2005, Stress and the brain: from adaptation to disease, *Nature Reviews Neuroscience*, 6 pp.463 – 475.
- Kolhatkar, R.B., Kitchens, K.M., Swaan, P.W., Ghandehari, H.,** 2007, Surface acetylation of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers decreases cytotoxicity while maintaining membrane permeability, *Bioconjugate Chemistry* 18(6) pp.2054-2060.
- Kutluk, T., Kars, A.,** 2001, *Kanser Konusunda Genel Bilgiler*, Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, pp. 14 – 92.
- Liu, B., Qi, W., Tian, L., Li, Z., Miao, G., An, W., Liu, D., Lin, J., Zhang, X., Wu, W.,** 2015, *In Vivo* Biodistribution and Toxicity of Highly Soluble PEG-Coated Boron Nitride in Mice *Nanoscale Research Letters*, pp.10 478 – 484.
- Liu, C., Liu, X., Rocchi, P., Qu, F., Iovanna, J.L., Peng, L.,** 2014, Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery in vitro and in vivo, *Bioconjug. Chem* 25:521.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, H., Xu, Y., Wen, S., Chen, Q., Zheng, L., Shen, M., Zhao, J., Zhang, G., Shi, X.,** 2013, Targeted Tumor Computed Tomography Imaging Using Low-Generation Dendrimer-Stabilized Gold Nanoparticles, *Chemistry-A European Journal*, 19 (20) pp.6409 – 6416.
- Lourie, O. R., Jones, C. R., Bartlett, B. M., Gibbons, P. C., Ruoff, R. S., Buhro, W. E.,** 2000, CVD Growth of Boron Nitride Nanotubes, *Chemistry of Materials* 12 pp.1808-1810.
- Medine, E. I., Unak, P., Sakarya, S., Toksöz, F.,** 2010, Enzymatic Synthesis of Uracil Glucuronide, Labeling with $^{125/131}\text{I}$, and *In vitro* evaluation on Adenocarcinoma Cells, *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals* 25(3) pp.335-45.
- Mills, W.J., Sutton, C.H., Baize, M.W., Todd, L.J.,** 1991, Boron Analogues of Valine, Leucine, Isoleucine, and Phenylalanine: Syntheses of Amine-Alkyl(N ethylcarbamoyl) boranes *Inorg. Chem.* 30 pp.1046 – 1052.
- Miyata, S., Kawabata, S., Hiramatsu, R., Doi, A., Ikeda, N., Yamashita, T., Kuroiwa, T., Kasaoka, S., Maruyama, K., Miyatake, S. I.,** 2011, Computed tomography imaging of transferrin targeting liposomes encapsulating both boron and iodine contrast agents by convection-enhanced delivery to F98 rat glioma for boron neutron capture therapy, *Neurosurgery*. 68 (5) pp.1380 – 1387.
- Mukawa, T., Matsumoto, T., Niita, K.,** 2011, Study on Microdosimetry for Boron Neutron Capture Therapy, *Progress in Nuclear Science And Technology* 2 pp.242 – 246.
- Mukundan, S., Ghaghada, K. B., Badea, C. T., Kao, C. Y., Hedlund, L. W., Provanzale, J. M., Johnson, G. A., Chen, E., Bellamkonda, R. V., Annapragada, A. A.,** 2006, Liposomal nanoscale contrast agent for preclinical CT in mice. *Am J Roentgenol*, 186 pp.300 – 307.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Najlah, M., Freeman, S., Attwood, D., D'Emanuele, A., 2007, Synthesis and assessment of first-generation polyamidoamine dendrimer prodrugs to enhance the cellular permeability of P-gp substrates, *Bioconjug. Chem* 18 pp.937-946.

Nakagawa, Y., Hatanaka, H., 1997, Boron neutron capture therapy - Clinical brain tumor studies, *Journal of Neuro-Oncology* 33:105-115.

Nakagawa, Y., Pooh, K., Kobayashi, T., Kageji, T., Uyama, S., Matsumura, A., Kumada, H., 2003, Clinical review of the Japanese experience with boron neutron capture therapy and a proposed strategy using epithermal neutron beams, *Journal of Neuro-Oncology* 62:87-99.

Navath, R. S., Menjoge, A. R., Wang, B., Romero, R., Kannan, S., Kannan, R. M., 2010. "Amino acid-functionalized dendrimers with heterobifunctional chemoselective peripheral groups for drug delivery applications" *Biomacromolecules*, 11, 1544.

Normal **beyin** **hücreleri**
morfolojisi, <https://www.lgcstandardsatcc.org/~media/Attachments/5/0/3/7/1976.ashx>, 20.07.2016.

Park, J. H., Park, J. S., Choi, J. S., 2014, Basic amino acidconjugated polyamidoamine dendrimers with enhanced gene transfection efficiency, *Macromol Res* 22:500.

Pecce, R., Scolamiero, E., Ingenito, L., Parenti, G., Ruoppolo, M., 2013, Optimization of an HPLC method for phenylalanine and tyrosine quantization in dried blood spot, *Clinical Biochemistry* 46, pp.1892 – 1895.

Sadeghi, M. M., Glover, D. K., Lanza, G.M., Fayad, Z. A., 2010, Johnson , Imaging Atherosclerosis and Vulnerable Plaque, *J Nucl Med.*, 51(1): pp.51 – 65.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sadekar, S., Ghandehari, H.,** 2012, Transepithelial transport and toxicity of PAMAM dendrimers: Implications for oral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev* 64:571.
- Saha, G. B.,** 2003, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Springer.
- Sakr, T. M., Motaleb, M. A., Zaghary, W. A.,** 2015, Synthesis, radioiodination and in vivo evaluation of ethyl 1,4-dihydro-7-iodo-4-oxoquinoline-3-carboxylate as a potential pulmonary perfusion scintigraphic radiopharmaceutical, *J Radioanal Nucl Chem*, 303 pp.399 – 406.
- Salveti, A., Rossi, L., Iacopetti, P., Li, X., Nitti, S., Pellegrino, T., Mattoli, V., Golberg, D., Ciofani, G.,** 2015, In vivo biocompatibility of boron nitride nanotubes: Effects on stem cell biology and tissue regeneration in planarians *Nanomedicine*, 10(12) Pp.1911 – 1922.
- Saovapakhiran, A., D'Emanuele, A., Attwood, D., Penny, J.** 2009, Surface Modification of PAMAM Dendrimers Modulates the Mechanism of Cellular Internalization, *Bioconjug. Chem* 20(4):693-701.
- Shinji, K., Weilian, Y., Rolf, F. B., Gong, W., Tianyao, H., Peter, J. B., Kent, J. R., Owendi, O., Vijay, G., Vicente, M. G. H.,** 2011, Convection enhanced delivery of carboranylporphyrins for neutron capture therapy of brain tumors, *Journal of Neuro-Oncology* 103:175-185.
- Society of Nuclear Medicine And Molecular Imaging** (MIRD) <http://www.nds.iaea.org.at>, 22.07.2016.
- Sutriyo, A. M., Ristaniah, E. A., Radji, M., Pujiyanto, A., Purnamasari, P., Joshita, D., Adang, H. G.,** 2015, Synthesis of Gold Nanoparticles with Polyamidoamine (Pamam) Generation 4 Dendrimer as Stabilizing Agent for CT Scan Contrast Agent, *Macromol. Symp.*, 353, 96 – 101.
- Taramalı elektron mikroskobu ve geçirimli elektron mikroskobu,** [http://www.academia.edu/1747599/Taramalı Elektron mikro skobu ve Gecirimli Elektron Mikroskobu Ders notları](http://www.academia.edu/1747599/Taramalı_Elektron_mikro_skobu_ve_Gecirimli_Elektron_Mikroskobu_Ders_notları), 13.07.2016.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Taskar, N. P., Jhaveri, K., Divgi, C.,** 2004, Radioimmunotherapy (RIT) of Cancer, Indian Journal of Nuclear Medicine 19(3):53-67.
- Telefoncu, A.,** 1992, Tıp ve Fen Bilimciler İçin Biyokimya pp. 22 – 32.
- Teowa, H. M., Zhoua, Z., Najlahb, M., Yusof, S. R., Abbott, N. J.,** 2013, D'Emanuele A, Delivery of paclitaxel across cellular barriers using a dendrimer-based nanocarrier, International'' Journal of Pharmaceutics 441, 1-2, 30, 701-711.
- Teraoa, T., Bandoa, Y., Mitome, M., Kurashima, K., Zhi, C. Y., Tang, C. C., Golberg, D.,** 2008, Effective synthesis of surface-modified boron nitride nanotubes and related nanostructures and their hydrogen uptake, Physica E 40 pp. 2551 – 2555.
- Türkiye Atom Enerjisi Kurumu,** Teknoloji Dairesi, 06530 ANKARA, 15.06.2016.
- Unak, P., Cetinkaya, B.,** 2005, Absorbed dose estimates at the cellular level for (131)I, Applied Radiation and Isotopes, 62(6) pp.861 – 869.
- Unak, T., Unak, P.,** 1991, Applied Radiation and Isotopes, 42(3) pp.291 – 295.
- Van Schooneveld, M. M., Cormode, D. P., Koole, R., Van Wijngaarden, J. T., Calcagno, C., Skajaa, T., Hilhorst, J., Hart, D. C., Fayad, Z. A., Mulder, W. J. M., Meijerink, A. A.,** 2015, Fluorescent, paramagnetic and PEGylated gold/silica nanoparticle for MRI, CT and fluorescence imaging., Contrast Media Mol Imaging, 5(4) Pp.231 – 236.
- Vertes, A., Nagy, S., Klencsar, Z.,** 2004, Handbook of Nuclear Chemistry, Ed: Kluwer Academic., Vol: 4, Dordrecht, London.
- Von Maltzahn, G., Park, J. H., Agrawal, A., Bandaru, N. K., Das, S. K., Sailor, M. J., Bhatia, S. N.,** 2009, Computationally guided photothermal tumor therapy using long-circulating gold nanorod antennas. Cancer Res., 69(9) Pp.3892 – 3900.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wang, J., Lee, C. H., Bando, Y., Golberg, D., Yap, Y. K.,** 2009-a, Multiwalled Boron Nitride Nanotubes: Growth, Properties, and Applications B-C-N Nanotubes and Related Nanostructures pp.23 – 44.
- Wang, X. Z., Wu, Q., Hu, Z., Chen, Y.,** 2007, Template-directed synthesis of boron nitride nanotube arrays by microwave plasma chemical reaction, *Electrochimica Acta*, 52 pp.2841 – 2844.
- Wang, W., Xiong, W., Wan, J., Sun, X., Xu, H., Yang, X.,** 2009-b, The decrease of PAMAM dendrimer-induced cytotoxicity by PEGylation via attenuation of oxidative stress, *Nanotechnology* 20:105.
- Xie, S. Y., Wang, W., Shiral Fernando, K. A., Wang, X., Lin, Y., Sun, Y. P.,** 2005, Solubilization of boron nitride nanotubes *Chem. Commun.* pp 3670 – 3672.
- Yordanov, A. T., Lodder, A. L., Woller, E. K., Cloninger, M. J., Patronas, N., Milenic, D., Brechbiel, M. W.,** 2002, Novel iodinated dendritic nanoparticles for computed tomography (CT) imaging, *Nano Lett.* 2 (6), pp.595 – 599.
- Yordanov, A. T., Mollov, N., Lodder, A. L., Woller, E., Cloninger, M., Walbridge, S., Milenic, D., Brechbiel, M. W.,** 2005; A water-soluble triiodo amino acid and its dendrimer conjugate for computerized tomography (CT) imaging, *J Serb Chem Soc* 70 (2) pp.163 – 170.
- Yu, J., Qin, L., Hao, Y., Kuang, S., Ba, X., Chong, Y.M., Zhang, W., Wang, E.,** 2010, Vertically Aligned Boron Nitride Nanosheets: Chemical Vapor Synthesis, Ultraviolet Light Emission, and Superhydrophobicity, *American Chemical Society (ACSNANO)*, 4 (1), pp.414 – 422.
- Yüksek performanslı sıvı kromatografi sistemleri,** <http://gidaarge.akdeniz.edu.tr/cihazlar.i32.yukse-performansli-sivi-kromatografisi-hplc->, 12.05.2016.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, J., Wang, X., 2000, Synthesis of $^{99m}\text{TcN}(\text{IPDTC})_2$ and its biodistribution in mice, Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry 249 (3) pp. 573 – 76.

Zheng, J Z., Liu, J B., Dunne, M., Jaffray, D A., Allen, C., 2007, *In vivo* performance of a liposomal vascular contrast agent for CT and MR-based image guidance applications, Pharm Res, 24 (6) pp.193 – 1201.

Zhi, C., Bando,Y., Tan, C., Golberg, D., 2005, Effective precursor for high yield synthesis of pure BN nanotubes Solid State Communications 13 (5) pp. 67 – 70.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge KOZGUŞ GÜLDÜ

Doğum Yeri : Sivas/Türkiye

Doğum Yılı : 12/09/1985

Öğrenim Durumu

Lisans : 2003 – 2007 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyokimya Bölümü

Yüksek Lisans :2007 – 2009 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyokimya Bölümü

Doktora : 2010 – Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler
Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Akademik ve Mesleki Deneyim:

Araştırma Görevlisi : Aralık 2011 – Ege Üniversitesi Nükleer
Bilimler Enstitüsü

Bilimsel Etkinlikler:

SCI dergilerde yayımlanmış makaleler : 9 adet

Patentler : 1 adet

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Tebliğler :25 adet

Ulusal Kongrelerde Sunulan Tebliğler :12 adet