



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**RADYONÜKLİD İŞARETLİ MANYETİK
NANOPARÇACIKLARIN VE TÜREVLERİNİN
SENTEZLENMESİ VE TERANOSTİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Doktora Tezi

Elif Tutun

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

İzmir
2025

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**RADYONÜKLİD İŞARETLİ MANYETİK
NANOPARÇACIKLARIN VE TÜREVLERİNİN
SENTEZLENMESİ VE TERANOSTİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Elif TUTUN

Danışman: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı
Nükleer Uygulamalar Doktora Programı

Bornova, İzmir
2025

Elif TUTUN tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Radyonüklid işaretli manyetik nanoparçacıkların ve türevlerinin sentezlenmesi ve teranostik potansiyellerinin araştırılması**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yünergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 10/02/2025 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK
Raportör Üye : Prof. Dr. Çiğdem İÇHEDEF
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Coşkun HARMANŞAH
Üye : Prof. Dr. Türkan ERTAY
Üye : Prof. Dr. Fikriye Gül GÜMÜŞER

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

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “Radyonüklid işaretli manyetik nanoparçacıkların ve türevlerinin sentezlenmesi ve teranostik potansiyellerinin araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

10/02/2025

Elif TUTUN

ÖZET
RADYONÜKLİD İŞARETLİ MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
VE TÜREVLERİNİN SENTEZLENMESİ VE TERANOSTİK
POTANSİYELLERİNİN ARAŞTIRILMASI

TUTUN, Elif

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Şubat 2025, 102 sayfa

Bu tez çalışmasında, hedefe yönelik tedavi için radyonüklid işaretli manyetik nanoparçacık sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. HER2 reseptör pozitif kanser hücrelerini hedeflemek üzere, trastuzumab antikoru ve [¹⁹F]FDG-(2-deoksi-2-[florin-19]floro-D-glukoz) (FDG) molekülü ile konjuge edilmiş, yüzey modifikasyonları optimize edilmiş kübik demir oksit nanoparçacıkları tasarlanmıştır. Çalışma kapsamında, nanoparçacık sentezinden sistemin biyolojik etkinliğinin değerlendirilmesine kadar tüm süreçler sistematik bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

İlk aşamada, kübik demir oksit nanoparçacıkları (C-Fe₃O₄) başarıyla sentezlenmiştir. Bu nanoparçacıkların yüzey stabilitesini ve fonksiyonelliğini artırmak amacıyla, nanoparçacık yüzeyleri sırasıyla tetraetil ortosilikat (TEOS), (3-aminopropil)triethoksisilan (APTES) ve polietilen glikol (PEG) kullanılarak modifiye edilmiştir (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG). Yüzey modifikasyonu tamamlanan nanoparçacıklar, FDG molekülü ile konjuge edilerek tümör spesifikliği ve biyouyumluluğu optimize edilmiştir (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG). Reseptör spesifitesi, hem C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG hem de C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkları için ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Yapılan *in vitro* testler sonucunda, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının daha yüksek tutulum gösterdiği belirlenmiş ve bu nedenle hücre deneylerinde bu nanoparçacıkların kullanılması tercih edilmiştir.

Ardından, trastuzumab antikoru, p-NCS-Bz-DOTA (DOTA) şelatörü ile konjuge edilmiş ve bu yapı, optimize edilmiş koşullarda lutesyum-177 (¹⁷⁷Lu) ile radyoışaretlenmiştir (¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras). Son olarak ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras, modifiye

edilmiş FDG konjuge manyetik nanoparçacıklarla birleştirilerek hedefe yönelik terapötik bir sistem oluşturulmuştur (^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG).

Geliştirilen nanoparçacık sisteminin biyolojik etkinliği, HER2 pozitif SKOV-3 (yumurtalık) ve BT474 (triple pozitif meme kanseri) hücre hatlarında *in vitro* olarak test edilmiştir. Radyokonjugat, HER2 pozitif kanser hücrelerinde 20 MBq/mL dozda 48 saatlik inkübasyon sonrası radyoaktif olmayan kontrollere kıyasla belirgin bir şekilde hücre canlılığını azaltmıştır. Radyokonjugatın hedef hücrelerde yüksek spesifik alımı ve belirgin radyoterapi etkinliği gözlemlenmiştir. Triple negatif MDA MB231 meme kanseri hücreleri, sistemin seçiciliğini doğrulamak amacıyla negatif kontrol grubu olarak kullanılmış ve bağlanma deneylerinde herhangi bir spesifik etki gözlenmemiştir. Bu sonuçlar, sistemin hedefe yönelik ve seçici bir terapötik ajan olarak etkinliğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması, HER2 pozitif kanserlerin tedavi ve tanısında kullanılabilecek, biyouyumlu ve düşük yan etkili radyonüklid işaretli manyetik nanoparçacıkların geliştirilmesiyle, kanser tedavisinde yeni nesil teranostik yaklaşımlara önemli bir katkı sunmaktadır.

Anahtar sözcükler: demir oksit nanoparçacıklar, HER2 hedefli tedavi, trastuzumab, lutesyum-177

ABSTRACT
SYNTHESIS OF RADIONUCLIDE LABELED MAGNETIC
NANOPARTICLES AND THEIR DERIVATIVES AND
INVESTIGATION OF THEIR THERANOSTIC POTENTIALS

TUTUN, Elif

PhD in Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

February 2025, 102 pages

In this thesis, the development of radiolabeled magnetic nanoparticle systems for targeted therapy has been aimed. To target HER2 receptor-positive cancer cells, surface-modified cubic iron oxide nanoparticles conjugated with trastuzumab antibody and [^{19}F]FDG-(2-deoxy-2-[fluorine-19]fluoro-D-glucose) (FDG) molecule were designed. Throughout the study, all processes, from nanoparticle synthesis to the evaluation of the system's biological activity, were systematically carried out.

In the initial stage, cubic iron oxide nanoparticles ($\text{C-Fe}_3\text{O}_4$) were successfully synthesized. To enhance the surface stability and functionality of these nanoparticles, their surfaces were modified sequentially using tetraethyl orthosilicate (TEOS), (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES), and polyethylene glycol (PEG), resulting in $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-PEG}$. The surface-modified nanoparticles were then conjugated with the FDG molecule to optimize tumor specificity and biocompatibility ($\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ and $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-PEG-FDG}$). Receptor specificity was evaluated separately for both $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-PEG-FDG}$ and $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparticles. *In vitro* tests revealed that $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparticles exhibited higher uptake; therefore, these nanoparticles were preferred for further cell studies.

Subsequently, the trastuzumab antibody was conjugated with the p-NCS-Bz-DOTA (DOTA) chelator, and this structure was radiolabeled with lutetium-177 (^{177}Lu) under optimized conditions, forming ^{177}Lu -DOTA-Tras. Finally, ^{177}Lu -

DOTA-Tras was combined with the modified FDG-conjugated magnetic nanoparticles to develop a targeted therapeutic system (^{177}Lu -DOTA-Tras@C- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$).

The biological efficacy of the developed nanoparticle system was evaluated *in vitro* using HER2-positive SKOV-3 (ovarian) and BT474 (triple-positive breast cancer) cell lines. The radioconjugate significantly reduced cell viability in HER2-positive cancer cells after a 48-hour incubation at a dose of 20 MBq/mL, compared to non-radioactive controls. The radioconjugate demonstrated high specific uptake in target cells and notable radiotherapy efficacy. Triple-negative MDA MB231 breast cancer cells were used as a negative control group to verify system selectivity, and no specific effect was observed in binding experiments. These results highlight the system's effectiveness as a targeted and selective therapeutic agent.

In conclusion, this thesis contributes significantly to next-generation theranostic approaches in cancer treatment by developing biocompatible and low-toxicity radiolabeled magnetic nanoparticles for the diagnosis and treatment of HER2-positive cancers.

Keywords: iron oxide nanoparticles, HER2-targeted therapy, trastuzumab, lutetium-177

ÖNSÖZ

Kanser tedavisinde hedefe yönelik yaklaşımlar, modern tıbbın en önemli araştırma alanlarından biri olarak öne çıkmaktadır. Tez çalışmamda, trastuzumab antikoru ile konjuge edilmiş ve lutesyum-177 (^{177}Lu) ile radyoışaretlenmiş manyetik demir oksit nanoparçacıklarını kullanarak, hedefe yönelik kanser tedavisinde etkinliği artırmayı amaçladım. Bu sistemle, kanser hücrelerine spesifik şekilde etki ederek sağlıklı dokular üzerindeki yan etkileri azaltmayı ve tedavi edici etkinliği arttırmayı hedefledim.

Geliştirilen nanoparçacık sistemi teranostik uygulamalar için büyük bir potansiyel taşımaktadır. Multimodal bir yapıya sahip olan bu sistem, hedefe spesifik olması sebebiyle kanser tedavilerinin daha güvenli ve etkili hale gelmesine olanak sağlamaktadır.

Bu araştırmanın bir bölümünü, lisansüstü eğitimimi tamamladığım Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde gerçekleştirdim. Radyoışaretleme ve hücre kültürü çalışmaları ise TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Bursu desteğiyle, Polonya'nın Varşova şehrindeki Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü'nde yürütülmüştür. Bu süreçte kazandığım akademik ve teknik birikimler çalışmamın değerine önemli katkılar sağlamıştır.

Bu çalışmanın, kanser tedavisinde hedefe yönelik yenilikçi yaklaşımların geliştirilmesine ve gelecekteki araştırmalara ilham vermesine katkıda bulunmasını umut ediyorum. Bu uzun ve zorlu süreçte desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Perihan Ünak'a, araştırmalarımda bana rehberlik eden tüm bilim insanlarına ve çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İZMİR

10/02/2025

Elif TUTUN



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	ii
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xxiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Nanoparçacıklar.....	5
2.1.1 Manyetik Nanoparçacıklar.....	6
2.2 Florodeoksiglukoz.....	6

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

2.3 Aktif ve Pasif İlaç Hedefleme.....	8
2.3.1 Trastuzumab Antikoru.....	9
2.4 Lutesyum-177 (¹⁷⁷ Lu).....	11
2.5 Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri.....	12
2.5.1 İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC).....	14
2.6 Lipofilite.....	14
2.7 Stabilité.....	15
2.8 Karakterizasyon Yöntemleri.....	16
2.8.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR).....	16
2.8.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS).....	17
2.8.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM).....	18
2.8.4 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM).....	19
2.8.5 Taramalı Uç Mikroskobu (SPM).....	20
2.8.6 Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM).....	21
2.8.7 X-Işını Difraktometresi (XRD).....	22

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.8.8 Tandem Uçuş/Uçuş Zamanlı Matriks-Yadımlı Lazer Desorpsiyon/ionlaştırma Spektroskopisi (MALDI TOF/TOF).....	23
2.9 <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	25
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	25
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	27
3.2 Kübik Demir Oksit (C-Fe ₃ O ₄) İçerikli Nanopartikül Sentezi.....	28
3.3 C-Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerin Silikalanması ve Silanlanması (C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂)	29
3.4 Polietilen Glikol (PEG) ile Yüzeyin Kaplanması (C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG)	29
3.5 Mannoz Trifilat – Etilendiamin Konjugasyonu.....	30
3.6 Mannoz Trifilat- Etilendiamin'in ¹⁹ F ile Süstitüsüyonu.....	30
3.7 ¹⁷⁷ Lu ile Radyoişaretleme.....	31
3.7.1 ¹⁷⁷ Lu-DOTA-Tras Bileşiğinin C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG Nanoparçacıklarla Konjugasyonu.....	32

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

3.8 Kalite Kontrol Çalışmaları.....	32
3.8.1 TLRC ile kalite kontrol çalışmaları.....	32
3.9 Lipofilite.....	33
3.10 Stabilite Testi.....	33
3.11 Karakterizasyon Çalışmaları.....	34
3.11.1 FTIR Analizi.....	34
3.11.2 Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyel Ölçümleri	34
3.11.3 SEM Görüntüleme.....	34
3.11.4 TEM Görüntüleme.....	35
3.11.5 SPM Görüntüleme.....	35
3.11.6 VSM Analizi.....	35
3.11.7 XRD Analizi.....	36
3.11.8 MALDI TOF/TOF analizi.....	36
3.12 <i>In Vitro</i> Çalışmalar.....	37
3.12.1 Sitotoksosite.....	38

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.12.2 Hücre Bağlanma Deneyi.....	38
3.12.3 Internalizasyon Deneyi.....	39
3.12.4 3D Hücre Kültürü.....	39
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
4.1 Reaksiyon Şemaları.....	40
4.1.1 Nanoparçacık Sentez Reaksiyon Şemaları.....	40
4.1.2 ¹⁷⁷ Lu ile Radyoşaretleme Reaksiyon Şeması.....	41
4.1.3 Radyokonjugasyon Reaksiyon şeması.....	42
4.2 Kalite Kontrol Sonuçları.....	42
4.2.1 TLRC sonuçları.....	42
4.3 Lipofilite sonuçları.....	44
4.4 Stabilite sonuçları.....	44
4.5 Karakterizasyon Sonuçları.....	45
4.5.1 FTIR sonuçları.....	45
4.5.2 Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları.....	50

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.5.3 SEM analiz sonuçları.....	52
4.5.4 TEM analiz sonuçları.....	54
4.5.5 SPM görüntü analiz sonuçları.....	56
4.5.6 VSM analiz sonuçları.....	59
4.5.7 XRD analiz sonuçları.....	60
4.5.8 MALDI TOF/TOF analiz sonuçları.....	61
4.6 <i>In Vitro</i> Çalışma Sonuçları.....	63
4.6.1 Sitotoksisite Sonuçları.....	63
4.6.2 Hücre Bağlanma Sonuçları.....	70
4.6.3 Internalizasyon Sonuçları.....	72
4.6.4 3D Hücre Kültür Sonuçları.....	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	80
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	84
TEŞEKKÜR.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Florodeoksiglukozun açık yapısı.....	7
2.2 Normal ve kanser hücrelerinde HER2 ekspresyonu (National Cancer Institute, 2023).....	9
2.3 HER2 ana iletim yolları (Wu et al., 2022).....	10
2.4 ^{177}Lu 'nun basitleştirilmiş bir bozunma şeması (Dash et al., 2015).....	12
2.5 İnce tabaka kromatografisinin şematik gösterimi (Biotech Reality, 2024).....	14
2.6 Hücre Kültürü çalışması prensibinin şematik gösterimi.....	25
4.1 C-Fe ₃ O ₄ sentezi ve yüzey modifikasyonlarının reaksiyon şeması (Yasakci et al., 2018).....	40
4.2 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ 'nin FDG ile konjugasyonuna ait reaksiyon şeması (Aras et al., 2018).....	41
4.3 ^{177}Lu -DOTA-Trastuzumab'a ait reaksiyon şeması.....	41
4.4 ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG ile konjugasyonu.....	42
4.5 $^{177}\text{LuCl}_3$ (a), ^{177}Lu +Tras (b), ^{177}Lu -DOTA-Tras (c) ve ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG (d) radyokromatogramları.....	43

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.6 ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG nanoparçacıkların stabilite sonuçları.....	45
4.7 C-Fe ₃ O ₄ 'ün FTIR spektrumu.....	46
4.8 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ 'nin FTIR spektrumu.....	47
4.9 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG'in FTIR spektrumu.....	47
4.10 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG'nin FTIR spektrumu.....	48
4.11 FDG'nin FT-IR spektrumu.....	49
4.12 C-Fe ₃ O ₄ nanoparçacıkların SEM görüntüsü.....	52
4.13 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ nanoparçacıkların SEM görüntüsü.....	53
4.14 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG nanoparçacıkların SEM görüntüsü.....	53
4.15 C-Fe ₃ O ₄ nanoparçacıkların TEM görüntüsü.....	54
4.16 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ nanoparçacıkların TEM görüntüsü.....	54
4.17 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG nanoparçacıkların TEM görüntüsü....	55
4.18 C-Fe ₃ O ₄ nanoparçacıkların SPM görüntüsü.....	56
4.19 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ nanoparçacıkların SPM görüntüsü.....	57
4.20 C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG nanoparçacıkların SPM görüntüsü.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.21 VSM analiz sonuçları.....	60
4.22 C-Fe ₃ O ₄ ve C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG nanoparçacıkların XRD sonuçları.....	61
4.23 Trastuzumab'a ait MALDI TOF/TOF analiz sonucu.....	62
4.24 DOTA-Trastuzumab'a ait MALDI TOF/TOF analiz sonucu.....	63
4.25 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	64
4.26 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ¹⁷⁷ Lu-DOTA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	65
4.27 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ¹⁷⁷ Lu-DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	65
4.28 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	66
4.29 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ¹⁷⁷ Lu-DOTA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	67

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.30 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	67
4.31 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	68
4.32 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	68
4.33 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%).....	69
4.34 SKOV-3 hücrelerinde hücre bağlanma sonuçları(%).....	70
4.35 BT474 hücrelerinde hücre bağlanma sonuçları(%).....	71
4.36 MDA MB231 hücrelerinde hücre bağlanma sonuçları(%).....	71
4.37 SKOV-3 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin internalizasyon kinetiği.....	73
4.38 BT474 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin internalizasyon kinetiği.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.39 MDA MB231 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG'nin internalizasyon kinetiği.....	74
4.40 BT474 3D sferoidlerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG uygulamasının zamana bağlı hücresel etkisi.....	76
4.41 MDA MB231 3D sferoidlerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG uygulamasının zamana bağlı hücresel etkisi.....	77
4.42 Farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG uygulamasının BT474 3D sferoid modelleri üzerindeki zamana bağlı etkisi (Proliferasyon sebebiyle, 11 ve 18. günlerde kontrol grubu ve 5 MBq/mL dozunun görüntüleri 4x objektif ile alınmıştır).....	78
4.43 Farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG uygulamasının MDA MB231 3D sferoid modelleri üzerindeki zamana bağlı etkisi (Sferoid dağılımını göstermek amacıyla, 6. günde 20 MBq/mL ve 10 MBq/mL dozlarının görüntüsü 4x objektif ile alınmıştır).....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 Şekil 4.5'e göre radyoişaretleme verim yüzdeleri (n=2) (L6: L6'nın (başlangıç) yüzdesi ile karşılaştırılan sonuç; L5: L5'in (başlangıç) yüzdesi ile karşılaştırılan sonuç)	43
4.2 Sentezlenen nanokonjugatların hidrodinamik çapları (d. nm) (n=3) ve zeta potansiyel sonuçları.....	50
4.3 C-Fe ₃ O ₄ , C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ ve C) C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG nanoparçacıkların Taramalı Uç Mikroskobu (SPM) yüzey alan ve R _{max} değerleri tablosu.....	58
4.4 ¹⁷⁷ Lu-DOTA-NCS radyobileşiği ve ¹⁷⁷ Lu-DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG nanoparçacıklar için IC ₅₀ değerleri (MBq/mL)	69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
^{177}Lu	Radyoaktif Lutesyum 177
^{176}Lu	Radyoaktif Lutesyum 176
^{176}Yb	Radyoaktif İtriyum 176
^{177}Yb	Radyoaktif İtriyum 177
^{177}Hf	Radyoaktif Hafniyum 177
^{18}F	Radyoaktif Flor 18
^{19}F	İnaktif Flor 19
β	Beta parçacık
γ	Gama fotonu
Fe_3O_4	Magnetit
$[\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4]$	Maghemit
$\text{Fe}(\text{acac})_3$	Demir(III) asetiasetonoat
NaCNBH_3	Sodyum siyanoborhidrür
HCl	Hidroklorik asit
NaOH	Sodyum hidroksit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

MNP	Manyetik nanoparçacık
NP	Nanoparçacık
TEOS	Tetra etil orto silikat
APTES	(3-Aminopropil)trioksisilan
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo-Kromatografisi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
TLRC	İnce Tabaka Radyo-Kromatografisi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
VSM	Titreşimli Örnek Manyetometresi
SPM	Taramalı Prop Mikroskobu
STM	Taramalı Tünel Mikroskobu
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskobu

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

DLS	Dinamik Işık Saçılımı
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
PEG	Polietilen glikol
FDG	Florodeoksiglukoz
SPECT	Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi
PET	Pozitron Emisyon Tomografi
PET-MRI Görüntüleme	Pozitron Emisyon Tomografi – Manyetik Rezonans
EDX	X-Işını Enerjisi Yayılımı
XRD	X-Işını Difraktometresi
MALDI	Matris Destekli Lazer İyonizasyon
TOF	Uçuş Zamanlı
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
SPIO	Süper paramanyetik demir oksit
SPION	Süper paramanyetik demir oksit nanoparçacıklar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

EDC/NHS	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorit/N-Hidroksisüksinimid
MTS	2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((4-isothiocyanatobenzyl)amino)- 4-oxobutyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triyl)triacetic acid
DOTA	1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''- tetraacetic acid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute - 1640
FBS	Fetal bovin serum
DMSO	Dimetil sülfoksit
IC50	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyonu
GLUT	Glukoz taşıyıcı proteinler
EPR	Geliştirilmiş geçirgenlik ve tutulum
HER2	İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü
EGFR	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
ADCC	Antikor bağımlı hücrel sitotoksiste
PI3K	Fosfoinozitid 3-kinaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

Kısaltmalar

PTEN	Kromozom 10'da silinmiş fosfataz ve tensin homologu
PIP2	Fosfatidilinozitol-4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinozitol-3,4,5-trisfosfat
PKD1	3-Fosfoinozidit bağımlı protein kinaz
AKT	Protein kinaz B
mTOR	Memelilerde rapamisin hedefi
MAPK	Mitojenle aktive olan protein kinaz
JAK	Janus-aktive edilmiş kinaz
STAT	Sinyal transdüksiyon ve transkripsiyon aktivatörü
RAS	Hücrel büyüme, farklılaşma ve hayatta kalma süreçlerini düzenleyen sinyal yolu
RAF	Hücre sinyalizasyonunda önemli bir rol oynayan bir serin/treonin kinaz ailesi
MEK	Mitojenle Aktive Edilen Protein Kinaz Kinaz
ERK	Hücre Dışı Sinyal Düzenleyici Kinaz
C-Fe ₃ O ₄	Kübik demir oksit nanoparçacıklar

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)**Kısaltmalar**

C-Fe₃O₄-SiO₂ Silika kaplı kübik demir oksit nanoparçacıklar

C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ Silika ve silan kaplı kübik demir oksit nanoparçacıklar

C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG PEG ile modifiye edilmiş, silika ve silan kaplı kübik demir oksit nanoparçacıklar

C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG FDG konjuge, PEG ile modifiye edilmiş, silika ve silan kaplı kübik demir oksit nanoparçacıklar

DOTA-Tras DOTA konjuge Trastuzumab

¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras Lutesyum 177 işaretli, DOTA konjuge Trastuzumab



1.GİRİŞ

Teranostik nanoparçacıkların kullanımı, tedavi ve teşhis özelliklerini tek bir uygulamada birleştirerek biyomedikal alanı kişiselleştirilmiş tıbbı doğru taşımaktadır. Kanseri gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde, tümörün hücre fenotiplerini ve heterojenliğini anlamak için önceden yapılan tanısal görüntüleme büyük önem taşımaktadır. Tedavi ve görüntüleme için ayrı ajanların geliştirilip kullanılması yerine, teranostikler, biyolojik dağılım ve seçicilikteki istenmeyen farklılıkları ortadan kaldırarak bu özellikleri tek bir uygulamada birleştirmektedir. Teranostik nanoparçacıkların en umut verici yönlerinden biri, hastalık bölgesine özgül şekilde lokalize olma (veya hedeflenme) potansiyelidir; bu sayede olası birçok yan etkidenden kaçınılabılır veya en aza indirilebilir (Kelkar ve Reineke, 2011).

Manyetik demir oksit nanoparçacıklar (Fe_3O_4), tıbbi araştırmalarda klinik tanı, hücre işaretleme, sıvı hipertermi, kanser tedavisinde hedefe yönelik tedavi ajanı ve PET-MRI (Pozitron Emisyon Tomografisi-Manyetik Rezonans Görüntüleme) tekniklerinde kontrast verici ajanlar olarak çeşitli uygulamalara sahiptir (Ozkaya et al., 2012). Fe_3O_4 nanoparçacıklar aracılığıyla ilaç kemoterapisi uygulama olasılığı araştırılan bir çalışmada, kanserli dokulara uygulanan harici manyetik alan sayesinde, Fe_3O_4 'lerin yüksek konsantrasyonu ve dolayısıyla kanser hücrelerinde daha yüksek ilaç konsantrasyonu tutulumu sağlanmıştır (Nacev et al., 2011). Fe_3O_4 nanoparçacıkları kullanılarak kemoterapötik bir ilaç olan doksorubisinin lipozomlara bağlı olarak hedeflenmesi incelenen bir diğer çalışmada ise, manyetik alan uygulamaları, kemoterapötik ilacın serbest bırakılmasını sağlamak için nanoparçacıklar tarafından üretilen ısıyla bağların kırılmasını sağlamıştır. Bu teknik, kanserli hücreleri yok ederken çevredeki sağlıklı dokulara zarar verme riskini önemli ölçüde azaltmıştır (Huang et al., 2013).

Kanser hücrelerinin normal hücrelerden daha hızlı artan metabolik aktiviteleri, hücre zarında bulunan glukoz taşıyıcılarının aşırı ekspresyonuyla ilişkilidir. Bu durum, kanserli hücrelerde glukoz alımının artmasına neden olur. Çeşitli glukoz taşıyıcı proteinler (GLUT) bulunsada özellikle kanserli hücrelerde yoğun olarak bulunan GLUT-1 reseptörü proliferasyonda önemli bir role sahiptir. GLUT-1 reseptörlerinin tümör hücrelerinde görüntülenmesi, kontrast ajanı olarak

süper paramanyetik demir oksit nanoparçacıkları (SPION) kullanılarak MRI taramalarıyla mümkündür (Shana et al., 2012).

Nanoparçacıkların biyospesifik ligandlar ile bağlanması, yani biyokonjugasyonu, biyoteknoloji ve nanoteknolojinin evrimini temsil eder ve nanoparçacıkların biyolojik bir bileşeni, hem benzersiz optik ve manyetik özelliklerini hem de hücrelere oldukça seçici bağlanmasını kullanabilen, hibrit biyoyumlu malzemelerin geliştirilmesine olanak tanımaktadır (Wang et al., 2002). Antikorların nanoparçacıklar ile konjugasyonu, nanoparçacıkların özelliklerini antikorların antijenlere karşı spesifik ve seçici tanıma yeteneği ile birleştirir ve onlara geliştirilmiş yeni multifonksiyonel özellikler sağlar. Ayrıca, hücresel alımdaki iyileşme ve ana hücre içi stabilite, antikor konjuge nanopartikül kullanmanın başlıca avantajlarından ikisi olabilir (Arruebo et al., 2009).

Bu tez çalışmasında kullanılan FDG (Florodeoksiglukoz, [^{19}F]FDG), yapısal olarak glukoz molekülüne benzeyen, ancak flor-18 (^{18}F) radyoizotopu yerine kararlı bir izotop olan flor-19 (^{19}F) içeren bir glukoz analogudur. FDG, glukoz metabolizması yüksek olan hücrelerde birikerek hücre içi tutulumu arttırabilir. Tıpkı ^{18}F içeren FDG molekülü gibi, glukoz taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücre içine alınır ve burada hekzokinaz enzimi tarafından fosforlanarak FDG-6-fosfata dönüştürülür. Ancak, normal glukozun aksine FDG-6-fosfat glikoliz yoluna devam edemez ve hücre içinde birikir. Bu birikim, FDG'nin metabolik olarak aktif hücrelerde spesifik tutulumu arttırmasını sağlamaktadır (Sokoloff, 1977).

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2), hücre yüzeyinde bulunan bir protein ailesine ait bir reseptördür. HER2 aşırı ekspresyonu, daha agresif bir hastalık, daha yüksek nüks oranları ve kısalmış sağkalım ile ilişkilidir. Başta meme kanseri (meme kanseri tümörlerinin yaklaşık %20-30'unda) olmak üzere mide kanseri, yumurtalık kanseri, akciğer kanseri, endometriyal (rahim) kanseri ve bazı baş-boyun kanserleri gibi birçok kanser türünde görülmektedir. Trastuzumab (Herceptin), HER2 reseptörünü hedefleyen, insanlaştırılmış bir monoklonal antikordur ve 1998 yılında ilaç kullanımı için onaylanmıştır. Trastuzumab'ın etki mekanizmaları tam olarak tanımlanmamış olsa da muhtemelen antikor bağımlı hücresel sitotoksiste (ADCC) gibi ekstraselüler mekanizmaları ve apoptoz, hücre

döngüsü duraklatılması, anjiyogenezin inhibisyonu ve kemoterapi kaynaklı hasar sonrası DNA onarımının engellenmesi gibi intraseküler mekanizmaları içermektedir. Trastuzumab, HER2 pozitif erken evre ve metastatik meme kanserinin tedavisinde, kemoterapi ile kombinasyon halinde etkilidir.

HER2, epidermal büyüme faktörü (EGF) ailesinin bir parçasıdır ve bu ailede 3 başka reseptör bulunmaktadır: epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER1, erbB1), HER2 (erbB2), HER3 (erbB3) ve HER4 (erbB4). HER2 geni, 17. kromozomun uzun kolunda yer alır ve 185 kDa'lık bir transmembran proteini kodlamaktadır. HER2 reseptörünün ekstraselüler domeni, diğer EGF ailesi reseptörlerinin aksine tanımlanabilir bir liganda sahip değildir. Bu durum, HER2'nin aktif bir konformasyona sahip olmasını sağlar ve diğer EGF reseptörleriyle ligand-bağımsız dimerizasyon yapabilir. En aktif ve tümör teşvik eden kombinasyonun HER2/HER3 dimeri olduğu düşünülmektedir (Mitri and O'Regan, 2012).

Beta parçacıkları (β^-), alfa parçacıkları (α) veya Auger ve dönüşüm elektronları yayarak bozunan birkaç radyoizotop hem radyofarmasötik geliştirme hem de klinik değerlendirme aşamasında terapötik radyoizotoplar olarak incelenmektedir. Hedefe yönelik tedavi için önerilen radyoizotoplar arasında, Lutesyum-177 (^{177}Lu) tabanlı radyofarmasötiklerle yapılan araştırmalar son yıllarda büyük bir gelişme göstermiştir. Monoklonal antikolar, peptitler, fosfonat liganları, partiküller, steroidler ve diğer küçük moleküller, ^{177}Lu ile rayoişaretlenerek geniş bir terapötik radyofarmasötik yelpazesi geliştirilmiştir. ^{177}Lu ile rayoişaretlenmiş DOTA-Tyr3-octreotate (DOTA-TATE) adlı somatostatin analogu peptidi ile nöroendokrin tümörleri tedavi etme başarısı, ^{177}Lu 'nun terapötik bir radyoizotop olarak dünya çapında ilgi görmesini ve büyümesini sağlayan en önemli örneklerden biridir (Banerjee et al., 2015).

Bu tez çalışmasında kullanılacak olan radyonüklid olan ^{177}Lu , 6.9 günlük yarı ömrüyle özellikle kanser tedavisinde kullanılan, 0.498 MeV'lik β^- parçacık enerjisi ($E_{\beta\text{max}}$) yayarak hücreleri hedef alan bir radyoizotoptur. ^{177}Lu 'nin birincil kullanımı, kanser hücrelerini hedefleyen bir radyoimmunoterapi aracı olarak, özellikle nöroendokrin tümörler ve prostat kanseri gibi hastalıkların tedavisinde öne

çıkılmaktadır. Ayrıca, ^{177}Lu taşıyıcı moleküllerle bağlandığında, tümörlere yönelik görüntüleme yapılabilir, böylece tedavi etki alanları da belirlenebilir (Zhang et al., 2021).

Bu tez çalışmasının amacı, kanser tedavisinde istenmeyen yan etkiler olmadan potansiyel olarak düşük maliyetli, etkili ve verimli bir görüntüleme ve tedavi ajanının oluşturulmasıdır. Literatüre göre, FDG konjuge manyetik kübik demir oksit nanoparçacıkların kanser hücre hatlarını kullanarak *in vitro* olarak çalıştığını ve güvenilirliğini önceki çalışmalar göstermektedir (Subramanian et al., 2016; Watkins et al., 2018; Aras et al., 2018). Bu çalışmada bir multimodal teşhis ve tedavi ajanı olarak radyoişaretli ve manyetik bir nanoparçacık sistemi oluşturmak amaçlanmıştır. Bu amaçla ^{177}Lu ile radyoişaretli, FDG bağlı manyetik demir oksit nanoparçacıkları içeren bir ürün hazırlanmıştır. Manyetik nanoparçacıkların hedef hücreye seçici bir şekilde yönlendirilmesi için nanoparçacıklar trastuzumab antikoru ile konjuge edilmiştir. Ayrıca, FDG ile yapılan konjugasyonun kanser hücrelerinde spesifik tutulumunu artıracığı öngörülmektedir. Daha sonra bu sistemin *in vitro* olarak biyolojik davranışları izlenmiş ve HER2 reseptör pozitif ve negatif kanser hücre hatlarına olan affiniteleri incelenmiştir. Tasarlanan nanoparçacık sistemi ek olarak, manyetik alana sahiptir. MRI görüntüleme ve tümörlerin lokal tedavisi için manyetik hipertermide kullanım potansiyeli de vardır. Bu sayede oluşturulacak yeni radyoişaretli taşıyıcı sistemin gelecekte yapılacak olan çalışmalarda teşhis ve tedavi amaçlı kullanılabileceği düşünülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji, maddeyi atomik ve moleküler seviyelerde düzenleyerek yeni özellikler kazandırmayı hedefleyen disiplinler arası bir alandır. Bu teknolojiadaki çalışmalar genellikle 1 ila 100 nanometre (nm) aralığında yapılmaktadır. Bu boyut aralığında maddelerin özellikleri (örneğin, optik, elektriksel, mekanik özellikler) makro boyuttakilerden farklıdır, bu da yenilikçi uygulamalara olanak tanımaktadır. Nanoparçacıklar, ilaç taşıyıcı sistemler için ideal bir platform sunarak biyoyararlanımın artırılması, kontrollü salınımın sağlanması ve hedefe yönelik ilaç iletiminde devrim yaratmıştır (Buzea et al., 2007).

Nanoparçacıkların ilaç taşıma uygulamalarındaki avantajları, öncelikle boyutları ve yüzey özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Küçük boyutları, biyolojik bariyerleri aşmalarını kolaylaştırırken, yüzey modifikasyonları ile biyoyumluluk artırılabilir ve spesifik hedefleme sağlanmaktadır. Örneğin, polimerik nanoparçacıklar, kanser tedavisinde ilacın kontrollü salınımını sağlayarak toksisiteyi azaltırken etkinliği de artırır (Kumari et al., 2010). Ayrıca, Fe_3O_4 nanoparçacıklar, dış manyetik alan kullanılarak belirli bir hedefe yönlendirilebilir ve hem görüntüleme hem de tedavi amacıyla kullanılabilir. Radyoışaretlenmiş nanoparçacıklar ise, nükleer tıp uygulamalarında hem tanı hem de tedavi (teranostik) için önemli bir potansiyele sahiptir (Gupta & Gupta, 2005).

Son yıllarda, trastuzumab gibi monoklonal antikorlarla fonksiyonelleştirilmiş nanoparçacıklar, özellikle HER2 pozitif meme kanseri gibi spesifik hedeflere yönelik tedavilerde umut vadetmektedir. Bu tür nanoparçacıklar, kanser hücrelerine özgü reseptörlere bağlanarak etkin bir hedefleme sağlamak ve sistemik yan etkileri en aza indirmektedir. Ayrıca, ilaç taşıyıcı sistemlerde nanoparçacıkların kullanımı, ilaçların çözünürlüğünü ve stabilitesini artırmakta, böylece farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini iyileştirmektedir (Rasaneh et al., 2014).

2.1.1 Manyetik Nanoparçacıklar

Manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler), nanometre ölçeğinde manyetik özellikler sergileyen malzemelerden oluşur ve genellikle demir oksitler (örneğin, magnetit [Fe_3O_4] ve maghemit [$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$]) gibi manyetik çekirdeklerden meydana gelir. Boyutlarının küçüklüğü ve yüzeylerinin özelleştirilebilir olması, bu nanoparçacıkları biyomedikal, çevresel ve endüstriyel uygulamalarda oldukça cazip hale getirmiştir. Manyetik çekirdek, genellikle polimerler, lipitler veya biyomoleküllerle kaplanarak biyoyumluluk ve stabilite artırılır (Gupta & Gupta, 2005). Türlerine göre kıyaslandığında, demir oksit nanoparçacıklar en yaygın kullanılan tür olup, biyoyumlu ve düşük toksisiteye sahiptir. Tıbbi görüntüleme ve ilaç taşıyıcı sistemlerde sıklıkla tercih edilmektedir. Metal bazlı (Fe, Co, Ni) nanoparçacıklar yüksek manyetik doygunlukları ile öne çıkar, ancak genellikle toksik oldukları için biyomedikal uygulamalarda sınırlı kullanılmaktadır. Kompozit manyetik nanoparçacıklar ise manyetik çekirdeğin polimer, karbon veya silika gibi malzemelerle kaplanmasıyla elde edilir ve hem stabilite hem de çok işlevlilik sunmaktadır (Lu et al., 2007).

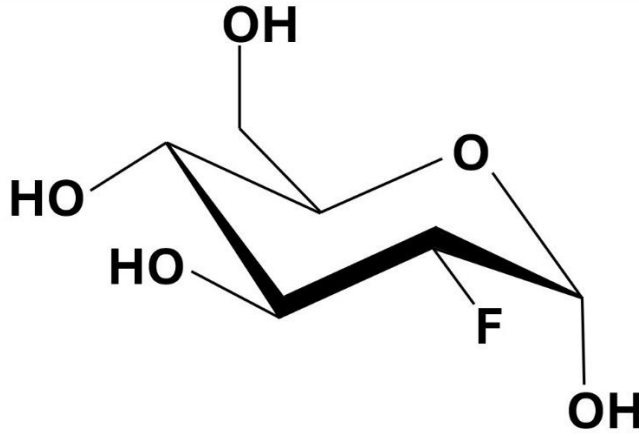
MNP'lerin temel özellikleri, manyetik doygunluk, yüzey modifikasyonu, boyut ve süperparamanyetizmdir. Süperparamanyetik nanoparçacıklar, manyetik alan varlığında güçlü bir manyetizasyon sergilerken, alan kaldırıldığında artık manyetizma göstermez. Bu özellik, biyomedikal uygulamalarda, özellikle manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve hedefli ilaç taşıma sistemlerinde önemlidir (Pankhurst et al., 2003). Süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları (SPION'lar), kontrast artırıcı ajan olarak yaygın kullanılırken, manyetik alan kullanılarak belirli bir hedef bölgeye yönlendirilen MNP'ler, kanser tedavisinde hedefe yönelik yüksek etkinlik göstermektedir. Ayrıca MNP'ler, manyetik alan altında ısı üreterek kanser hücrelerini yok etmek için kullanılmaktadır (Jordan et al., 1999).

2.2 Florodeoksiglukoz

Fluorodeoksiglukoz (^{19}F FDG ya da FDG), glukoz molekülünün radyoaktif olmayan bir analogudur ve glukoz ile benzer yapıda olması nedeniyle metabolik olarak aktif hücrelere giriş yapmaktadır. Bununla birlikte, yapısal modifikasyonu

nedeniyle normal glukoz metabolizmasını tamamlayamaz ve bu nedenle hücrelerde birikerek spesifik tutulumu arttırmaktadır (Yasakci et al., 2018).

Kanser hücreleri, normal hücelere göre metabolik olarak çok daha aktiftir. Artmış enerji ihtiyacını karşılamak ve kontrolsüz bir şekilde büyümek için hücreler, aşırı derecede GLUT ekspresyonuna sahiptir. Bu durum, FDG'nin kanser hücrelerine daha fazla alınmasına neden olur. FDG, glukoz gibi hücre içine girdikten sonra hexokinaz enzimi tarafından fosforile edilir ve glikolizin sonraki adımlarına katılamadığı için hücrede birikir. Bu birikim, hedefe yönelik terapilerde kullanıldığında kanser hücrelerinde spesifik tutulumu da arttırabilir (Aras et al., 2018).



Şekil 2.1 Florodeoksiglukozun açık yapısı

Ek olarak, kanser hücrelerinin enerji metabolizmasında Warburg etkisi olarak bilinen bir durum gözlenmektedir. Bu etki, kanser hücrelerinin oksijen varlığında bile enerji üretimini glikoliz yoluyla yapmasıdır. Oysa normal hücreler, oksijenli ortamda mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ile daha verimli bir enerji üretim yolunu tercih eder. Kanser hücreleri ise glikolizden elde edilen hızlı enerji üretimi ve metabolik ara ürünlerin biyosentezinde kullanılması gibi avantajlar nedeniyle bu yolu benimsemektedir. Ayrıca hipoksik ortamlarda yaşamını sürdürebilme yeteneği, bu adaptasyonu desteklemektedir (Warburg, 1956).

2.3 Aktif ve Pasif İlaç Hedefleme

Pasif hedefleme ve aktif hedefleme, ilaçların hedef dokuya veya hücreye taşınmasında kullanılan iki temel yöntemdir. Her iki yaklaşım da özellikle kanser tedavisi, inflamatuvar hastalıklar ve gen terapisi gibi alanlarda yaygın olarak uygulanmaktadır. Pasif hedefleme, ilaçların fizyolojik ve anatomik farklılıklardan yararlanarak doğal olarak hedef bölgeye ulaşmasını sağlar. Örneğin, kanserli dokularda görülen geliştirilmiş geçirgenlik ve tutulum etkisi (EPR), pasif hedefleme için kritik bir mekanizmadır. Tümör dokularında anjiyogenez sonucu oluşan anormal ve geçirgen damar yapısı, nanoparçacıkların tümör mikroçevresine daha kolay geçmesine olanak tanır. Bunun yanı sıra, lenfatik drenajın yetersiz olması nedeniyle, nanoparçacıklar tümör dokusunda birikerek uzun süre kalabilmektedir (Maeda et al., 2001). Pasif hedefleme stratejileri, liposomlar, polimerik nanoparçacıklar ve diğer nano-taşıyıcı sistemlerle sıklıkla kullanılır. Ancak bu yaklaşım, hedefe özgü olmadığı için sağlıklı dokulara sınırlı da olsa toksisite riskini barındırmaktadır.

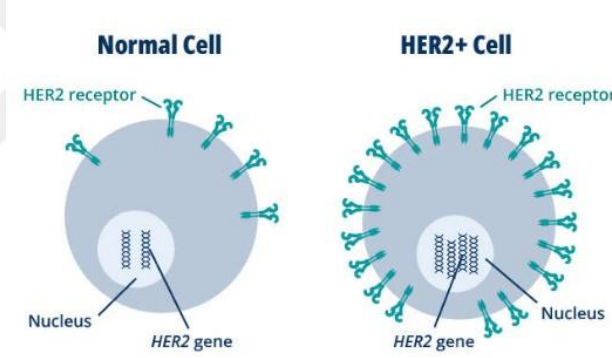
Aktif hedefleme, ilaç taşıyıcılarının yüzeyine biyomoleküller (antikorlar, peptitler, aptamerler veya ligandlar gibi) eklenerek spesifik hedef moleküllere veya hücrelere bağlanmasını içermektedir. Bu yöntemde, taşıyıcı sistemde bulunan ligandlar, hedef dokunun veya hücrenin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak ilacın yalnızca hastalıklı bölgeye taşınmasını sağlar. Örneğin, HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinde, trastuzumab gibi antikorlarla işlevselleştirilmiş nanoparçacıklar HER2 reseptörlerine bağlanarak yüksek bir hedefleme etkinliği sağlamaktadır (Rasaneh et al., 2014). Aktif hedefleme, pasif hedeflemeye kıyasla daha yüksek spesifisiteye sahiptir ve sağlıklı dokular üzerindeki toksisiteyi önemli ölçüde azaltabilmektedir.

Pasif hedefleme, tümör mikroçevresi gibi belirli anatomik ve fizyolojik farklılıklardan yararlanırken, aktif hedefleme, moleküler düzeyde daha spesifik hedefleme sağlamaktadır. Her iki yaklaşım da kombine edilerek ilaç taşıma sistemlerinin etkinliği artırılabilir. Örneğin, pasif hedefleme ile tümör mikroçevresinde biriken bir ilaç taşıyıcı, yüzeyindeki ligandlar sayesinde aktif hedefleme yoluyla tümör hücrelerine spesifik olarak bağlanabilir. Bu kombinasyon,

kanser terapisi gibi zorlu tedavi alanlarında umut verici sonuçlar sunmaktadır (Torchilin, 2006).

2.3.1 Trastuzumab Antikoru

İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü (HER2), hücre yüzeyinde bulunan ve hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını ve hayatta kalmasını düzenleyen bir reseptör tirozin kinazdır. Epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ailesine ait olan HER2, diğer aile üyeleri olan EGFR (HER1), HER3 ve HER4 ile etkileşime girerek hücrel sinyal yollarını aktive eder (Moasser, 2007). Normal hücrelerde kontrollü bir şekilde üretilen HER2, kanser hücrelerinde aşırı eksprese edildiğinde patolojik bir rol oynar. Özellikle meme kanseri, mide kanseri ve bazı akciğer kanseri türlerinde HER2 gen amplifikasyonu veya protein aşırı ekspresyonu sıkça gözlenmektedir.



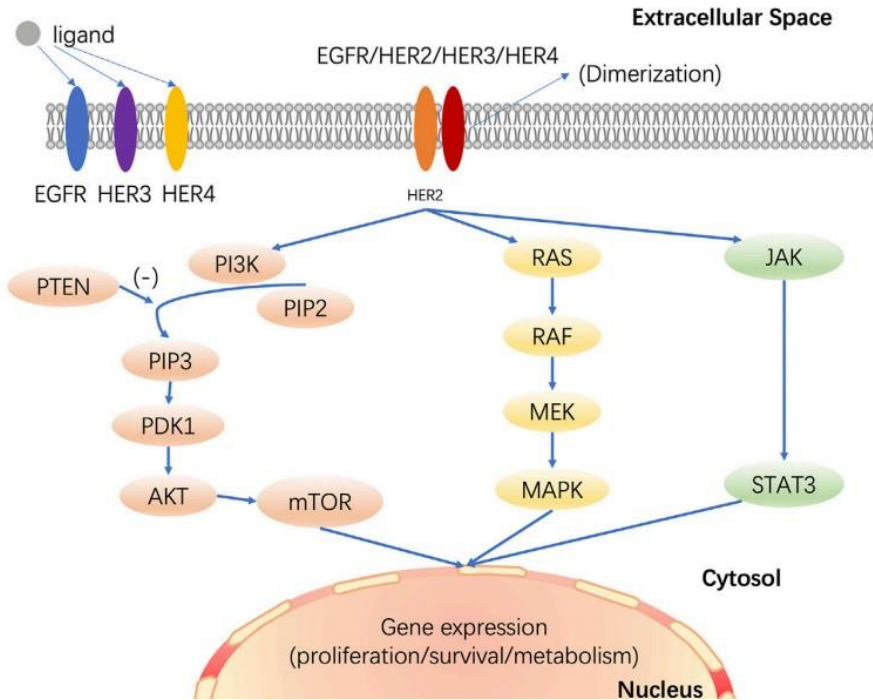
Şekil 2.2 Normal ve kanser hücrelerinde HER2 ekspresyonu (National Cancer Institute, 2023)

HER2 ligand bağlamaksızın diğer HER ailesi üyeleriyle dimerleşerek hücre içi sinyal yollarını aktive eder. Bu aktivasyon, hücre proliferasyonu, hayatta kalması ve farklılaşması gibi biyolojik süreçleri düzenler (Baselga and Swain, 2009). HER2'nin aktive ettiği ana sinyal yollarından biri, RAS/RAF/MEK/ERK yoludur. Bu yol, hücre büyümesi ve bölünmesinde önemli bir role sahiptir. HER2 aktivasyonu sonrası, Grb2 ve SOS adaptor proteinleri aracılığıyla RAS proteinleri aktive olur. RAS, sırasıyla RAF, MEK ve ERK kinazlarını tetikleyerek fosforilasyon kaskadını başlatır. Fosforile ERK, hücre çekirdeğine girerek büyüme ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırır. Bu sinyal yolunun hiperaktivasyonu,

hücrelerin kontrolsüz şekilde çoğalmasına ve kanser gelişimine yol açabilir (Hynes and Lane, 2005).

Bir diğer önemli yol ise PI3K/Akt/mTOR yoludur. HER2'nin dimerizasyonu, PI3K aktivasyonunu tetikler. PI3K, membran lipidlerini fosforile ederek Akt'ın aktif hale gelmesini sağlar. Akt, hücre ölümü sinyallerini baskılayan anti-apoptotik proteinlerin aktivasyonunu sağlar ve aynı zamanda mTOR yolunu aktive ederek protein sentezini ve hücre büyümesini teşvik eder. Bu yolun aşırı aktivasyonu, tümör hücrelerinin hayatta kalma ve metabolik avantaj sağlamasına neden olur. HER2 pozitif kanserlerde bu yol, terapötik hedeflerin başında gelir (Baselga and Swain, 2009).

HER2, ayrıca JAK/STAT yolunu da aktive ederek hücre büyümesi ve farklılaşmasını düzenler. HER2 aktivasyonu sonrası, JAK kinazları aracılığıyla STAT proteinleri fosforile edilir. Fosforile STAT proteinleri çekirdeğe girerek büyüme ile ilişkili genlerin ekspresyonunu artırır. Bu yol, kanser hücrelerinin büyümesi ve metastaz potansiyelini destekler (Olayioye et al., 2000).



Şekil 2.3 HER2 ana iletim yolları (Wu et al., 2022)

HER2'nin bu yollar üzerindeki etkisi, onu hedefe yönelik tedavilerin merkezine yerleştirir. Trastuzumab gibi monoklonal antikorlar ve lapatinib gibi

tirozinkinaz inhibitörleri, HER2'nin aşırı aktivitesini bloke ederek kanser hücrelerinin büyümesini ve hayatta kalmasını engellemeyi hedefler. Bu hedefli terapiler, HER2 pozitif kanserlerin tedavisinde çığır açıcı bir rol oynamıştır. HER2'nin bu kompleks sinyal ağları üzerindeki rolü, kanser biyolojisinin anlaşılmasında ve yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesinde önemli bir yere sahiptir (Baselga and Swain, 2009; Hynes and Lane, 2005).

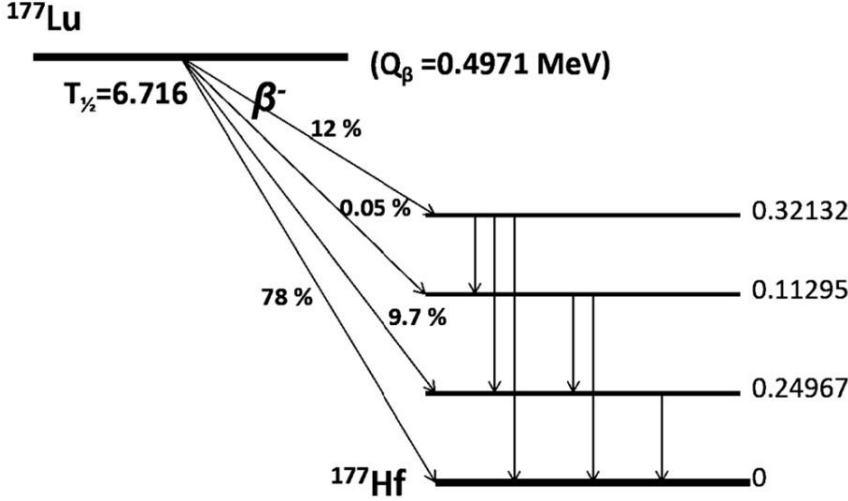
Trastuzumab, insanlaştırılmış bir monoklonal antikordur ve HER2 proteinine özgü olarak çalışmaktadır. HER2, meme kanseri ve diğer bazı kanser türlerinde aşırı eksprese edilir ve tümör hücrelerinin büyüme, proliferasyon ve metastazını teşvik eder. Trastuzumab, HER2'nin ekstraselüler domenine bağlanarak, bu reseptörün dimerizasyonunu ve aşağı akış sinyal yollarını (örneğin, PI3K/Akt ve RAS/MAPK yolları) inhibe eder. Bu, hücre büyümesinin durdurulması, apoptozun teşvik edilmesi ve immün sistemi aktive ederek antikora bağımlı hücresel sitotoksiste (ADCC) yoluyla kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlar. Trastuzumab, HER2 pozitif meme kanseri ve metastatik mide kanserinde etkili bir tedavi olarak Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) tarafından onaylanmıştır ve klinik kullanımı yaygınlaşmıştır (Slamon et al., 2001; Baselga et al., 2010).

2.4 Lutesyum-177 (¹⁷⁷Lu)

Lutesyum (Lu), atom numarası 71 ve atom ağırlığı 175.0 g/mol olan lantanidler grubuna ait bir elementtir. Beyaz-gümüş renkli, sert, sünek bir metaldir. Nadir toprak elementleri arasında yer alır. Lutesyumun birçok izotopu bulunmakla birlikte, lutesyum-177 (¹⁷⁷Lu), nükleer tıp alanında özellikle önemli bir izotoptur. ¹⁷⁷Lu'nun yarı ömrü yaklaşık 6,7 gün (160,4 saat) olup, hem beta ($\beta_{\max} = 0,497$ MeV, $\beta_{\text{avg}} = 0,134$ MeV) hem de gama ($\gamma = 208$ keV) radyasyonu yaymakta ve DOTA (1,4,7,10-Tetraazacyclododecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) türevi şelatlar ile kararlı kompleksler oluşturmaktadır. Bu özellikler, hedefe yönelik tedavi ajanlarına radyoaktivite taşıyabileceğinden, ¹⁷⁷Lu'nun sadece kanser tedavisinde değil, aynı zamanda tıbbi görüntüleme amacıyla (özellikle Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi, SPECT) da kullanılmasına olanak tanır.

^{177}Lu elde etmek amacıyla yaygın olarak hem “doğrudan” hem de “dolaylı” reaktör üretim yolları izlenmektedir. Doğrudan üretim yolu, ^{176}Lu hedeflerinin $^{176}\text{Lu} (n,\gamma) ^{177}\text{Lu}$ reaksiyonu ile nötron ışınlamasına dayanır. Dolaylı üretim yolu ise $^{176}\text{Yb}(n,\gamma) ^{177}\text{Yb} \rightarrow ^{177}\text{Lu}$ reaksiyonunu içerir ve bu, ^{177}Lu 'nun hedef ^{176}Yb hedef atomlarından kimyasal olarak ayrılmasını gerektirir.

^{177}Lu , bozunma olaylarının %76'sında ($E_{\beta(\max)} = 0,497 \text{ MeV}$) 6,65 günlük bir yarı ömre sahip olan kararlı Hafniyum-177 (^{177}Hf) zemin durumuna, %9,7'sinde ($E_{\beta(\max)} = 0,384 \text{ MeV}$) ve %12'sinde ($E_{\beta(\max)} = 0,176 \text{ MeV}$) zemin durumunun 0,24967 MeV ve 0,32132 MeV yukarısında bulunan ^{177}Hf 'nin uyarılmış haline bozunur. Bu uyarılmış haller, foton yayılımı ile zemin durumuna de-eksitasyon yapar. Bu radyoaktif bozunma olayları sırasında, ^{177}Lu β^- parçacıkları yayar; bu parçacıklar $E_{\beta(\max)} = 497 \text{ keV}$ (%78,6), 384 keV (%9,1) ve 176 keV (%12,2) enerjilerine sahiptir ve düşük enerjili gama fotonları yayar [$E_\gamma = 113 \text{ keV}$ (%6,6), 208 keV (%11)]. ^{177}Lu 'nun basitleştirilmiş bir bozunma şeması Şekil 2.4'te gösterilmiştir (Dash et al., 2015)



Şekil 2.4 ^{177}Lu 'nun basitleştirilmiş bir bozunma şeması (Dash et al., 2015)

2.5 Radyoişaretleli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri

Radyofarmasötikler, radyoaktif izotoplar içeren ve tanı veya tedavi amacıyla kullanılan farmasötik bileşiklerdir. Bu ajanlar, tıbbi görüntüleme (örneğin PET ve SPECT) veya radyonüklid tedavisinde kullanılmak üzere tasarlanmaktadır.

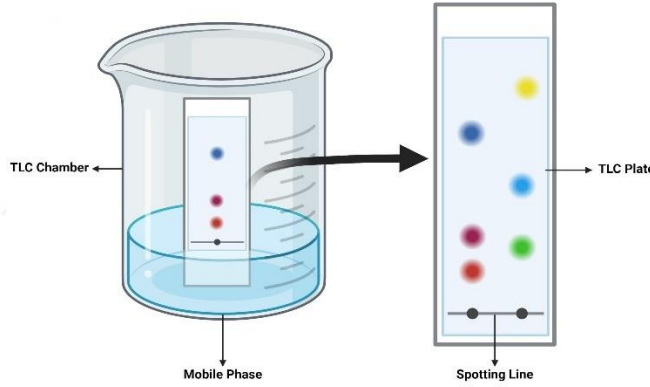
Radyofarmasötiklerin etkili ve güvenli olabilmesi için yüksek saflıkta, biyouyumlu ve hedef spesifik olmaları gerekir (Jain, 2017). Radyofarmasötiklerin üretiminden sonra, güvenlik ve etkinliğini belirlemek amacıyla kalite kontrol testlerine tabi tutulması gereklidir. Üretilen radyofarmasötiğin ilk olarak radyoaktivite ölçümü yapılmalı ve numunedeki spesifik radyoaktivite miktarı belirlenmelidir. Ardından kullanılan izotopun kimyasal formunun saflığını belirlemek amacıyla radyokimyasal saflık testleri gerçekleştirilmektedir (serbest radyoizotop oranı). Son olarak ürünün biyolojik sistemlere uygunluğu pH ve osmolarite analizi ve sterilite ve apirojenite testleri ile belirlenmektedir. Sterilite ve apirojenite testleri mikrobiyal kontaminasyon riskini en aza indirmek için yapılmaktadır (Silva et al., 2014).

Radyokimyasal saflık, bir radyofarmasötikte hedef bileşiğin toplam radyoaktiviteye oranıdır. Bu saflık, radyofarmasötiklerin etkinliğini ve güvenliğini doğrudan etkilemektedir. Saflık testleri genellikle kromatografik yöntemler ile gerçekleştirilir. Örneğin, İnce Tabaka Radyokromatografisi (Thin Layer Radiochromatography, TLRC) yöntemiyle radyoaktif bileşikler sabit faz ve mobil faz arasındaki farklı afiniteye göre ayrılır ve her bir bileşenin radyoaktivitesi tespit edilerek hesaplanır (Schwarz et al., 2009). Radyokimyasal saflık, düşük olduğunda istenmeyen biyolojik etkiler, toksisite ve hedef dışı radyasyon maruziyeti gibi sorunlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, klinik uygulamalarda %90-95'in üzerinde radyokimyasal saflık radyofarmasötikler için standart bir gerekliliktir (International Atomic Energy Agency, 2013).

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin sabit faz (örneğin, silika jel) ve mobil (çözücü) faz (örneğin, su) arasındaki farklı dağılım özelliklerine dayanarak ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Bu yöntem, kimyasal ve radyokimyasal saflık testlerinde, özellikle radyofarmasötiklerde, oldukça etkilidir. İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Radiochromatography, TLC) genellikle hızlı ve maliyeti düşük olduğu için radyofarmasötik analizinde tercih edilirken, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) daha yüksek ayırma kapasitesi sağlar (Jain, 2017). Radyofarmasötiklerin kalite kontrolü, radyasyon güvenliği ve hasta sağlığını garanti etmek için kritik öneme sahiptir. Yetersiz kontrol, tedavi etkinliğini düşürebilir, yan etki riskini artırabilir ve yanlış tanıya neden olabilmektedir.

2.5.1 İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC)

İnce tabaka radyokromatografisi (Thin Layer Radiochromatography, TLRC), radyoaktif bileşiklerin saflığını analiz etmek ve tanımlamak için kullanılan bir kromatografi yöntemidir. TLRC, TLC prensiplerine dayanır ancak radyoaktif izotop içeren numunelerin analizi için kullanılmaktadır. Bu yöntem, radyonüklidlerin farklı fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak hareket ettiği bir sabit faz (genellikle silika jel, alümina veya selüloz) ve bir mobil faz (genellikle su, asetonitril, metanol veya çözücü karışımı) kullanır. TLRC, özellikle radyoaktif ilaçların saflık kontrolünde ve radyoaktif etiketleme verimliliğinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Silva et al., 2014). Bu, terapötik ve tanısal amaçlar için güvenilir ürünlerin elde edilmesi açısından kritik öneme sahiptir (Schwarz et al., 2009).



Şekil 2.5 İnce tabaka kromatografisinin şematik gösterimi (Biotech Reality, 2024)

2.6 Lipofilite

Lipofilite, bir maddenin yağda çözünme eğilimini ifade eder ve genellikle "yağ sevenlik" olarak tanımlanmaktadır. Lipofilik maddeler, su gibi polar maddeler yerine, yağlar gibi apolar çözücülerde daha iyi çözünmektedir. Bu özellik, molekülün hidrojen bağları kuramaması veya su molekülleriyle güçlü etkileşimler yapamaması nedeniyle oluşmaktadır (Ciccione, 2012). Örneğin, organik çözücüler, ilaçlar veya zararlı maddeler genellikle lipofilik özellikler göstermektedir.

Lipofilisite ise bu özelliğin derecesini belirtmektedir. Lipofilik bir molekül, apolar çözücülerle güçlü etkileşimlere girerken, su gibi polar çözücülerle zayıf etkileşime girer. Lipofiliklik, molekülün yapısal özelliklerinden, örneğin karbon-zincir uzunluğu ve çift bağ yapısından etkilenebilmektedir (Berg et al., 2015). Bu terim özellikle biyokimya ve farmasötik alanlarda önemlidir, çünkü ilaçların biyoyararlanımını, hücre zarından geçişini ve metabolizma hızını etkileyebilmektedir. Lipofilisite testi, radyofarmasötiklerin vücutta nasıl dağıldığını, hücre zarlarını geçme yeteneklerini ve hedef dokuya ulaşma potansiyellerini belirlemektedir. Lipofilik özellik gösteren radyofarmasötikler, hücre zarlarını daha kolay geçebilir ve dokulara daha hızlı ulaşabilirken, hidrofilik (su seven) bileşikler genellikle vücutta daha hızlı bir şekilde atılmaktadır. Bu nedenle lipofilisite, radyofarmasötiklerin biyoyararlanımını, dokularda birikme eğilimlerini ve atılım hızlarını tahmin etmek için kritik bir parametre olup, klinik etkinliklerinin değerlendirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Hochgurtel et al., 2017; Gupta et al., 2019).

2.7 Stabilité

Stabilite, bir bileşiğin zamanla kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerinin bozulmadan korunma yeteneğini ifade etmektedir. Kimyasal stabilite, bir bileşiğin yapısal bütünlüğünü koruyarak etkinliğini sürdürmesini sağlarken, fiziksel stabilite ise formülasyonun görünüm, çözünürlük ve diğer fiziksel özelliklerinin değişmemesini sağlar. Biyolojik stabilite, özellikle biyolojik sistemlerdeki etkileşimler ve farmakokinetik özelliklerin bozulmadan devam etmesi ile ilgilidir. Stabilite, ilaçların etkinliğini, güvenliğini ve tedavi edici gücünü doğrudan etkileyen önemli bir parametredir (Bajwa et al., 2014).

Radyofarmasötikler için stabilite testi, bu bileşiklerin etkinliğini ve güvenliğini sağlamak açısından büyük önem taşımaktadır. Radyofarmasötikler, genellikle yüksek radyoaktif bileşikler içerdiğinden, zamanla bozulabilir veya radyoaktif özelliklerini kaybedebilir. Stabilite testleri, bu bileşiklerin vücutta gerekli süre boyunca etkin ve güvenli bir şekilde kullanılabilir olmasını sağlamaktadır. Nanoparçacıklar ise, özellikle biyoteknolojik ilaçlar ve tedavi yaklaşımlarında, hücrelere taşıma ve biyoyararlanım avantajları sunan sistemlerdir. Ancak, nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal stabilitesi, hedefleme yetenekleri ve

etkinlikleri üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Stabilite testleri, nanoparçacıkların formülasyonun bozulmadan kalmasını, etkinliğini yitirmemesini ve istenmeyen toksik etkiler oluşturmamasını sağlar (Tiwari et al., 2016). Bu testler, özellikle ilaç geliştirme sürecinde, üretim sırasında oluşabilecek olası değişimlerin önlenmesi ve tedaviye yönelik uzun süreli etkinlik sağlanması açısından gereklidir.

2.8 Karakterizasyon Yöntemleri

Nanoparçacıkların özelliklerinin belirlenmesi için çeşitli karakterizasyon tekniklerinden yararlanılmıştır. Bu yöntemler, nanoparçacıkların elementel içeriğinin hem nitel hem de nicel olarak analiz edilmesinde, boyutlarının tespit edilmesinde ve bu boyuttaki parçacıkların görüntülenmesinde etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Aşağıda, bu yöntemlere genel hatlarıyla değinilmiştir.

2.8.1 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR), bir molekülün kimyasal yapısını ve fonksiyonel gruplarını analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. FTIR, kızılötesi (IR) ışığın moleküller tarafından nasıl emildiğini ölçerek, molekülün titreşim modlarını belirler. Temel prensibi, ışığın bir örnek üzerinden geçirilmesi ve örneğin belirli frekanslardaki ışığı emme özelliklerinin incelenmesidir. Her bir molekül, belirli bir titreşim frekansında ışık absorbe eder, bu frekanslar ise molekülün kimyasal yapısı ve fonksiyonel gruplarına bağlıdır. IR spektroskopisinin zaman alıcı ve sınırlı verimlilikle yapılan analizlerini Fourier dönüşümü geliştirmektedir, böylece FTIR tekniği daha hızlı ve daha hassas sonuçlar elde edilmesini sağlamaktadır (Carter, 2004).

FTIR spektroskopisinin önemli bir özelliği, aynı anda geniş bir dalga boyu aralığında veri toplama yeteneğidir. Fourier dönüşümü, geleneksel yöntemlerde tek tek dalga boyları ölçülürken, tüm spektrumun tek bir ölçümde alınmasını sağlar. Bu da daha yüksek çözünürlük, daha hızlı veri analizi ve daha iyi sinyal-gürültü oranı anlamına gelir. FTIR cihazı, örnekten gelen yansıyan veya geçiş yapan ışığın, Fourier dönüşümüyle sayısal olarak analiz edilmesi sayesinde karmaşık spektral bilgilerin doğru bir şekilde elde edilmesine olanak tanımaktadır (Harris, 2013).

FTIR, moleküller arasındaki kimyasal bağları ve fonksiyonel grupları tanımlamada son derece etkilidir. Örneğin, karbonil grubu (C=O), alkol grubu (-OH) ve amine grubu (-NH) gibi fonksiyonel gruplar, belirli dalga boylarında karakteristik emilim göstermektedir. Bu özellik sayesinde FTIR tekniği organik kimya, biyoteknoloji, farmasötik ve malzeme bilimleri gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, FTIR, bir maddeyi saflaştırırken veya bir formülasyonu test ederken, bileşenlerin varlığını ve saflığını doğrulamak için de kullanılmaktadır. Çünkü farklı bileşiklerin her biri, FTIR spektrumunda özgün bir "parmak izi" bırakır, bu da bileşenlerin tanımlanmasını sağlar (Silverstein et al., 2014).

FTIR'nin avantajları arasında, örneğin sıvılar, katılar ve gazlar gibi farklı örneklerin analiz edilebilmesi yer alır. Ayrıca, örnek hazırlama gereksinimleri genellikle minimaldir ve örnekler genellikle doğrudan analiz edilebilir. Bu, FTIR'yi hızlı, verimli ve güvenilir bir yöntem haline getirir. Ancak, FTIR'nin bazı sınırlamaları da vardır; örneğin, çok benzer yapıya sahip bileşiklerin spektrumları bazen birbirine çok yakın olabilir, bu da ayırt edici analiz yapmayı zorlaştırabilmektedir (Morris, 2012).

2.8.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Dinamik Işık Saçılımı (Dynamic Light Scattering, DLS), nanoparçacıkların ve kolloidal sistemlerin boyutlarını ve hareketlerini analiz etmek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. DLS, bir ışık kaynağının (genellikle lazer) bir numuneye yönlendirilmesi ve bu ışığın numunedeki parçacıklardan nasıl saçıldığına izlenmesi prensibine dayanır. Saçılan ışığın frekansı, parçacıkların hareketine (Brown hareketi) bağlı olarak değişmektedir. Parçacıkların hızla hareket etmesi, saçılan ışığın frekansını değiştirebilir; bu değişim, parçacıkların boyutları hakkında bilgi verir. DLS, genellikle nanometre ölçeğindeki parçacıkların boyut dağılımını, yoğunluğunu ve polidispersitesini belirlemek için kullanılmaktadır (Lumpkin et al., 2003).

DLS yöntemi, Brown hareketi adı verilen fenomeni kullanarak çalışmaktadır. Bu hareket, sıvı içindeki küçük parçacıkların rastgele hareket etmesidir ve bu hareketin hızı, parçacıkların boyutuyla doğru orantılıdır. Yavaş hareket eden büyük

parçacıklar, daha hızlı hareket eden küçük parçacıklara göre daha az frekans kayması göstermektedir. Işığın saçılma hızındaki bu değişiklikler, matematiksel bir işlemle (özellikle Stokes-Einstein denklemi) parçacıkların ortalama çapını ve dağılımını belirlemeye yardımcı olur. Bu nedenle DLS, özellikle polidispers (homojen) sistemlerin analizinde etkili bir yöntemdir (Stetefeld et al., 2016).

DLS'nin avantajları, örnek hazırlama sürecinin basitliği ve geniş bir boyut aralığında (1 nm ila birkaç mikrometre) parçacıkların analiz edilmesidir. Ayrıca, bu yöntem sıvı ve katı parçacıkların analizinde kullanılabilir ve oldukça hızlıdır. Bununla birlikte, DLS'nin sınırlamaları da vardır. Örneğin, çok büyük veya çok küçük parçacıklar arasındaki farkları ayırt etmek bazen zor olabilir ve numunedeki heterojenlik (yani, parçacıkların farklı boyutlarda olması) ölçüm sonuçlarını etkileyebilmektedir. Ayrıca, yüksek viskoziteye sahip sıvılar veya yoğun çözücülerde DLS ölçümleri daha zor hale gelebilir (Berne and Pecora, 2000).

DLS, biyoteknoloji ve ilaç endüstrisi gibi alanlarda nanoparçacıkların özelliklerinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanoparçacıkların boyutu, farmasötik etki, biyoyararlanım ve hücre içine penetrasyon gibi faktörler üzerinde büyük bir etkiye sahiptir. Ayrıca, DLS, polimerler, proteinler ve diğer biyolojik makromoleküllerin çözünürlük, stabilite ve formülasyon özelliklerini incelemek için de kullanılmaktadır.

2.8.3 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy, SEM), yüzeylerin yüksek çözünürlükle incelenmesi için kullanılan güçlü bir mikroskopik analiz tekniğidir. SEM, numuneye elektron ışını göndererek çalışır ve bu elektronlar numunenin yüzeyine çarptığında yansıyan veya saçılan elektronlar toplanarak görüntü oluşturulur. Elektron ışını, numunenin yüzeyine odaklanarak, özellikle yüzey morfolojisi, topografya ve kompozisyon hakkında bilgi sağlar. SEM, genellikle çok yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etme yeteneği ile tanınır ve bu özellik, özellikle nanoteknoloji, malzeme bilimi, biyoteknoloji ve mikrobiyoloji gibi alanlarda yaygın olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

SEM'nin çalışma prensibi, bir elektron ışınının numuneye vurmasıyla başlar. Elektronlar, numunede farklı derinliklerde etkileşime girerek, geri saflama

(backscattering) ve karakteristik X-ışını salınımı gibi çeşitli süreçlere yol açar. Yansıyan elektronlar, bir dedektör tarafından toplanır ve bu bilgiler, numunenin yüzey morfolojisini yansıtan görüntülere dönüştürülür. SEM'de kullanılan yüksek çözünürlüklü elektron ışını, genellikle 1-10 nm arasında çözünürlük sağlayabilir, bu da SEM'yi atomik seviyedeki yapıların incelenmesinde çok değerli kılar (Reimer and Kolb, 2008).

SEM'nin avantajları arasında, örnek hazırlama sürecinin genellikle basit olması ve analiz edilen örneğin doğal haliyle, yani numune yüzeyine zarar vermeden incelenebilmesi bulunur. SEM, özellikle yüzeyin üç boyutlu yapısını ve morfolojisini yüksek hassasiyetle gösterebilir. Bu, yüzeydeki pürüzlülük, çatlaklar, porozite ve diğer topografik özelliklerin ayrıntılı bir şekilde incelenmesini sağlar. Bununla birlikte, SEM'nin bazı sınırlamaları da vardır. Elektron mikroskobu, genellikle vakum ortamında çalıştığı için nemli ve yüksek basınçlı ortamlar için uygun değildir. Ayrıca, numunenin iletken olması gereklidir, bu yüzden iletken olmayan numuneler üzerinde SEM uygulaması yapılmadan önce yüzeyin iletken hale getirilmesi için genellikle ince bir metal tabaka ile kaplanması gerekir (Bozzola and Russell, 1999).

2.8.4 Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

Geçirimli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscopy, TEM), atomik düzeydeki yapıların ve çok ince detayların incelenmesi için kullanılan son derece güçlü bir mikroskopik analiz yöntemidir. TEM, bir elektron ışınının numuneden geçirilmesi ve bu ışının numune tarafından etkileşime girerek görüntü oluşturması prensibine dayanır. Elektronlar, çok kısa dalga boylarına sahip oldukları için, bu mikroskoplar oldukça yüksek çözünürlük sağlar ve genellikle nanometre altı çözünürlükle çalışabilir. TEM, özellikle malzeme bilimi, biyoloji, nanoteknoloji ve fizik gibi alanlarda kullanılır ve numunenin iç yapısını, kristal yapısını, bileşimsel özelliklerini ve organik olmayan yapıları detaylı bir şekilde incelemeye olanak tanır (Bozzola and Russell, 1999).

TEM'nin çalışma prensibi, bir yüksek enerjili elektron ışınının numuneye gönderilmesiyle başlar. Elektronlar, numuneye girdiğinde, çeşitli etkileşimler meydana gelir. Elektronlar ya numune tarafından tamamen geçer ya da farklı

derecelerde saçılır. Numuneden geçen elektronlar bir dedektörle toplanır ve görüntü haline getirilir. TEM, elektronların dalga özelliklerini kullanarak çok ince detayları görmeyi sağlar. TEM'nin sağladığı görüntüler, numunenin ince kesitlerini analiz ederek, atomik düzeydeki yapıların görselleştirilmesine imkân tanır. Bu nedenle, TEM'nin çözünürlük gücü, genellikle 0,1 nm civarına kadar inebilir (Reimer, 2013).

TEM'nin avantajları arasında, özellikle atomik yapıların ve çok küçük boyutlardaki nanomühendislik ürünlerinin çözünürlükle analiz edilmesi yer alır. Numuneler, çok ince kesitler halinde hazırlanarak, numunenin iç yapısına dair bilgi edinilebilir. TEM'nin sunduğu çözünürlük seviyesi hem yüzey hem de iç yapının detaylarını gözler önüne serer, bu da malzemelerin mikro yapıları hakkında derinlemesine bilgi sağlar. TEM, ayrıca elementel ve kimyasal analizler yapmak için de kullanılır; X-ışını enerjisi yayılımı (EDX) ve elektron enerji kaybı spektroskopisi (EELS) gibi ek tekniklerle numunenin bileşenlerinin kimyasal analizleri yapılabilir (Egerton, 2011).

Ancak TEM'nin bazı sınırlamaları da vardır. TEM'nin çalışabilmesi için numunelerin çok ince, genellikle birkaç nanometre kalınlığında olması gerekir. Bu, numune hazırlama sürecinin oldukça zahmetli olmasına yol açar. Ayrıca, TEM genellikle vakum ortamında çalıştığı için nemli veya sıvı örneklerle çalışmak daha zordur. TEM görüntüleri elde etmek, ayrıca oldukça pahalı ekipman ve uzmanlık gerektirebilir. Bunun yanı sıra, numune üzerindeki yüksek enerji elektron ışını, bazı malzemelere zarar verebilir veya değiştirebilir (Williams & Carter, 2009).

2.8.5 Taramalı Uç Mikroskobu (SPM)

Taramalı Uç Mikroskobu (Scanning Probe Microscopy, SPM), özellikle yüzey morfolojisinin atomik düzeyde incelenmesi için kullanılan güçlü bir teknik olup, mikro ve nanoyapıların karakterizasyonunda önemli bir araçtır. SPM, bir numune yüzeyi üzerinde çok ince bir uç (probe) kullanarak, yüzeyin topografyasını, mekanik özelliklerini, elektriksel özelliklerini ve kimyasal bileşenlerini yüksek çözünürlükle ölçer. Bu mikroskopi türü, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) gibi geleneksel mikroskoplardan farklı olarak, yüzeyin atomik seviyedeki etkileşimlerini doğrudan ölçerek görüntüler oluşturur (Binnig et al., 1986). SPM'nin çeşitli varyasyonları arasında Atomik

Kuvvet Mikroskobu (AFM), Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM) ve Diğer Uç Mikroskobu teknikleri bulunur.

SPM'nin temel amacı, nanoteknoloji, malzeme bilimi, biyofizik ve elektronik gibi alanlarda yüzeylerin detaylı analizini yapmaktır. Yüzey pürüzlülüğü, malzeme bileşimi, atomik düzeydeki yapı ve yüzey etkileşimlerini anlamak için kullanılır. Örneğin, biyolojik moleküllerin (DNA, proteinler) yapılarını incelemek, nanomalzemelerin özelliklerini anlamak veya yarı iletkenlerin üretim süreçlerini kontrol etmek için tercih edilir (Sauer et al., 2003). SPM'nin çalışma prensibi, bir probun yüzeye çok yakın mesafede hareket ederken yüzey-prob etkileşimlerinin ölçülmesine dayanır. Bu prob, yüzeyde tarama yaparken atomik kuvvetler (AFM için) veya tünelleme akımları (STM için) gibi yüzeye özgü özellikleri algılar. Algılanan sinyaller, bilgisayar tarafından işlenerek yüzeyin üç boyutlu bir haritasını oluşturur. Teknik, numuneye zarar vermeden atomik düzeyde çözünürlük sağlar (Radmacher et al., 1997).

SPM, nanoteknolojide malzemelerin atomik düzenlerini ve yüzey yapılarını anlamak için kullanılır. Elektronik cihaz üretiminde yarı iletken yüzeylerin analizi, biyolojik moleküllerin yapı ve dinamiklerinin incelenmesi veya pürüzlülüğün etkisinin anlaşılması gibi birçok alanda uygulanır. Örneğin, AFM kullanılarak hücre zarlarının mekanik özellikleri ölçülebilirken, STM ile yüzeydeki atomik yapı ve elektron yoğunluğu haritalanabilir (Huang et al., 2005).

2.8.6 Titreşimli örnek manyetometresi (VSM)

Titreşimli Numune Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM), manyetik malzemelerin manyetik özelliklerini incelemek için kullanılan bir analiz cihazıdır. VSM, manyetik numunelerin bir manyetik alan içinde belirli bir frekansta titreştirilmesiyle oluşturulan manyetik momentin ölçülmesine dayanır. Manyetik malzemelerin mıknatıslanma, manyetik doyumluk, koersivite (zorlayıcı kuvvet) ve remanans (kalan mıknatıslanma) gibi önemli manyetik özelliklerini analiz etmek için kullanılır. Bu cihaz, malzemelerin manyetik davranışlarını anlamak ve optimize etmek amacıyla geliştirilmiştir (Foner, 1959).

VSM'nin amacı, manyetik malzemelerin temel özelliklerini belirlemek ve bu özelliklerin uygulamalardaki etkilerini anlamaktır. Örneğin, biyomedikal alanda manyetik nanoparçacıkların ilaç taşıma veya manyetik rezonans görüntülemeye kullanılabilirliğini değerlendirmek için VSM kullanılır. Bunun yanında, enerji depolama, manyetik sensörler ve hafıza cihazlarında kullanılan manyetik malzemelerin performans analizi için de kritik bir araçtır (Mamiya et al., 2013).

VSM'nin çalışma prensibi, manyetik bir numunenin belirli bir frekansta titreştirilmesi sırasında manyetik alanın değişiminden kaynaklanan indüklenmiş voltajın ölçülmesine dayanır. Numune, sabit bir manyetik alan içinde bir elektromıknatıs yardımıyla titreştirilir. Titreşim sonucu oluşan manyetik akı değişimi, bir algılayıcı tarafından ölçülür ve bu veriler manyetik moment hesaplamalarında kullanılır. Numunenin mıknatıslanma eğrisi (histerezis döngüsü) cihaz tarafından detaylı bir şekilde kaydedilir, bu da malzemenin manyetik özelliklerini görselleştirir (Foner, 1959; Liu et al., 2017).

VSM, nanoteknoloji, biyomedikal mühendislik, enerji depolama ve elektronik gibi geniş bir yelpazede uygulamalara sahiptir. Örneğin, manyetik nanoparçacıkların hipertermi tedavisi gibi biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliği, manyetik histerezis döngüleri ile değerlendirilebilir. Ayrıca, manyetik ince filmler ve alaşımların enerji dönüşüm cihazlarındaki performans analizi için de kullanılır (Mamiya et al., 2013).

2.8.7 X-Işını Difraktometresi (XRD)

X-ışını difraktometresi (X-Ray Diffraction, XRD), katı hal malzemelerinin kristal yapısını incelemek için yaygın olarak kullanılan analitik bir tekniktir. Bu yöntem, malzemenin atom düzeyindeki düzeni ve faz bileşimi hakkında bilgi sağlar. XRD, genellikle kristalografik fazların tanımlanması, kristal yapının belirlenmesi, tane boyutu analizi ve malzeme üzerindeki streslerin ölçülmesi için kullanılır. XRD analizi, malzemenin atomlarının X-ışınlarıyla etkileşiminden kaynaklanan kırınım desenlerinin ölçülmesiyle gerçekleştirilir. Bu kırınım desenleri, her malzemenin kendine özgü olan ve parmak izi gibi benzersiz bir deseni temsil eder (Cullity, 1978).

XRD'nin temel prensibi, Bragg yasasına dayanır:

$$n\lambda=2d\sin\theta$$

Burada n bir tam sayı, λ X-ışınının dalga boyu, d atom düzlemleri arasındaki mesafe ve θ kırınım açısını ifade eder. Bu denklem, X-ışınlarının kristal düzlemlerinden belirli açılarda kırıldığını ifade eder ve bu bilgiler, kristalin yapısal özelliklerini anlamak için kullanılır. XRD analizinde, bir toz difraktometresi veya tek kristal XRD cihazı kullanılarak malzemenin kırınım desenleri toplanır ve daha sonra bu desenler, JCPDS veri tabanı gibi referanslarla karşılaştırılarak yorumlanır. (Cullity and Stock, 2001).

XRD, çeşitli disiplinlerde çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Örneğin, malzeme biliminde seramikler, metaller ve polimerler gibi malzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılır. Jeolojide, minerallerin kimyasal ve yapısal özelliklerini anlamak için değerli bir araçtır. Ayrıca, farmasötik endüstrisinde, ilaçların kristal yapılarını belirlemek ve polimorfizmini analiz etmek için kullanılır. Bu teknik, özellikle nanomalzemelerin incelenmesinde de popüler hale gelmiştir; çünkü XRD, nanomalzemelerin kristal fazlarını ve kristal boyutlarını doğru bir şekilde belirleyebilir (Warren, 1990).

XRD analizinin avantajları arasında hızlı ve doğru sonuçlar vermesi, numune hazırlığının genellikle basit olması ve analiz edilen malzemelerin tahrip edilmemesi bulunur. Ancak, bu yöntemin bazı sınırlamaları da vardır; örneğin, amorf malzemelerin analizinde sınırlıdır ve kompleks karışımlarda zayıf fazları tespit etmek zor olabilir. Buna rağmen, XRD, malzeme bilimi ve mühendisliği alanlarında vazgeçilmez bir karakterizasyon tekniği olmaya devam etmektedir. (Klug and Alexander, 1974).

2.8.8 Tandem Uçuş/Uçuş Zamanlı Matriks-Yardımlı Lazer Desorpsiyon/İyonlaştırma Spektroskopisi (MALDI TOF/TOF)

Tandem uçuş/uçuş zamanlı matriks-yardımlı lazer desorpsiyon/iyonlaştırma (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight/Time-of-Flight, MALDI TOF/TOF), kütle spektrometresinin bir türü olup, biyomoleküller (örneğin proteinler, peptitler, lipitler) gibi karmaşık numunelerin analizi için kullanılan güçlü bir tekniktir. Bu yöntemde, lazer ışını bir matriks yardımıyla numuneyi iyonize eder. İlk uçuş zamanı (TOF) analizinde, iyonlar kütle-yük oranlarına (m/z) göre

ayrılır. Daha sonra, belirli bir iyon seçilerek parçalanma işlemi gerçekleştirilir ve ikinci uçuş zamanı analizinde parçalanmış iyonlar analiz edilir. Bu tandem (birbirine bağlı olarak sıralı çalışan) yapı hem ana molekülleri hem de bu moleküllerin yapısal bilgilerini inceleme imkânı sunmaktadır (Karas and Hillenkamp, 1988; Loo et al., 2002).

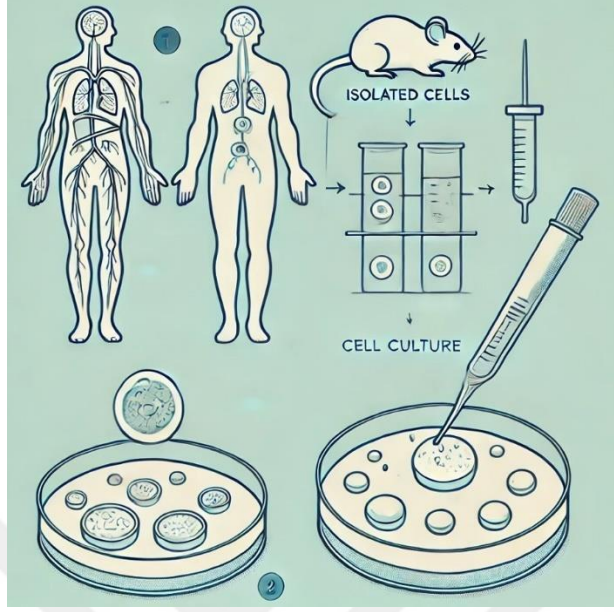
Bu yöntemin temel amacı, biyomoleküllerin kütlesini yüksek hassasiyetle ölçmek ve parçalanma ürünleri üzerinden molekülün yapısal özelliklerini detaylı bir şekilde belirlemektir. Özellikle protein dizilimi, post-translasyonel modifikasyonlar, kompleks karışımların bileşenleri ve biyomoleküllerin etkileşimlerinin incelenmesinde oldukça değerlidir. MALDI-TOF/TOF, yüksek duyarlılığı ve hızlı analiz yeteneği sayesinde biyomedikal araştırmalar, ilaç geliştirme ve proteomik çalışmalarda kritik bir araç olarak kullanılır (Zhu et al., 2003).

MALDI-TOF/TOF, protein dizilimlerinin belirlenmesi, mikroorganizmaların tanımlanması, biyobelirteç keşfi ve ilaç araştırmalarında yaygın olarak kullanılır. Örneğin, bakteriyel veya fungal patojenlerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasında mikroorganizmaların protein profillerinin analizinde sıklıkla kullanılır. Ayrıca, kanser gibi hastalıklarda potansiyel biyobelirteçlerin keşfedilmesi ve karakterizasyonunda da önemli bir rol oynar. Tandem yapı, moleküllerin sadece kütlesini değil, aynı zamanda yapısal detaylarını da ortaya koyduğu için, post-translasyonel modifikasyonların veya ilaç-biyomolekül etkileşimlerinin analizinde de tercih edilir (Li et al., 2005).

2.9 *In Vitro* Çalışmalar

In vitro deneyler, laboratuvar ortamında, canlı organizmanın dışındaki kontrollü koşullarda gerçekleştirilen deneylerdir. Bu deneylerde hücreler, dokular veya biyomoleküller gibi biyolojik materyaller genellikle kültür kapları, mikropalakalar veya biyoreaktörler gibi araçlar kullanılarak incelenmektedir. "*In vitro*" terimi, Latince "cam içinde" anlamına gelir ve bu yöntemlerin cam laboratuvar kaplarında yapılmasına atıfta bulunmaktadır. *In vitro* deneylerin temel amacı, belirli biyolojik süreçleri veya tedavi stratejilerini izole bir ortamda detaylı olarak incelemek, kontrol edilen koşullarda etkilerini değerlendirmek ve genellikle

daha karmaşık *in vivo* (canlı organizma içinde) deneyler için ön bilgi sağlamaktır (Kern et al., 2017).



Şekil 2.6 Hücre kültürü çalışması prensibinin şematik gösterimi

In vitro deneyler, ilaç geliştirme, toksisite testleri, gen ekspresyon analizi, hücresel mekanizmaların araştırılması ve biyomateryal değerlendirme gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Örneğin, yeni bir ilaç geliştirilirken, ilacın etkisi öncelikle hücre kültürleri üzerinde test edilir. Bu, ilacın etkinliğini ve güvenliğini *in vivo* testlerden önce değerlendirmek için ekonomik ve etik açıdan önemli bir adımdır. Ayrıca, biyomateryallerin hücrelerle uyumluluğunu veya potansiyel toksik etkilerini değerlendirmek için kullanılmaktadır. *In vitro* deneyler, karmaşık organizmaların müdahalesini ortadan kaldırarak, daha net ve odaklanmış sonuçlar elde edilmesini sağlar (McNeal et al., 2016).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Demir(III) asetilasetonat ($\text{Fe}(\text{acac})_3$), dekanolik asit, dibenzil eter, tetraetil ortosilikat (TEOS), (3-aminopropil)trioksasilan (APTES), etilendiamin, sodyum

Sodyum siyanoborohidrür (NaBH_3CN), EDC (N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil) karbodiimit hidroklorit), NHS (N-hidroksisüksinimid), etanol, amonyok (NH_3 , 10%), polietilen glikol (PEG-6000, Mw: 5600-6600 g/mol; $n \approx 140$), tetrahidrofuran (THF), mannoz triflat, Kryptofix ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_4$), potasyum karbonat (K_2CO_3), dimetil formamid (DMF), sodyum florür (NaF), Ambershep 900 OH reçinesi, Amberlite anyon değişim reçinesi, C-18 pre-kartuş (sep-pak), 2-merkaptotanol, Vivaspin 500 (100 kDa) santrifüj filtrasyon tüpü, Trastuzumab (Herceptin®, Roche Pharmaceuticals, Basel, İsviçre), sodyum bikarbonat (NaHCO_3), amonyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$), sitrat tamponu (pH = 5), dimetil sülfoksit (DMSO), CellTiter96®Aqueous One Solution Reagent (Promega, ABD) MTS kiti (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium), hidroklorik asit (HCl, 37%), sodyum hidroksit (NaOH), *p*-NCS-benzyl-DOTA-GA (2,2',2''-(10-(1-carboxy-4-((4-isothiocyanatobenzyl)amino)-4-oxobutyl)-1,4,7,10tetraazacyclodecane -1,4,7-triyl)triacetic acid), DMF (*N,N*-dimethylformamide), glisin ($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), Fetal bovin serum (FBS), Penisilin/streptomisin çözeltisi, Roswell Park Memorial Institute Medium-1640 (RPMI-1640), McCoy's 5A Medium, L-glutamin, tirypsin-EDTA, Sodyum pirüvat, Fosfat tamponu (PBS, pH 7,4).

3.1.2 Kullanılan cihazlar

Hassas terazi (Ohaus Pioneer PA214C, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Radwag XA 52/2X, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Sentez Ünitesi (Heildolph MR-Hal End Starfish Workstation, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Vorteks (Heildolph Reax Top, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Heildolph P/N-541-100000-1, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Manyetik Karıştırıcı Isıtıcı (IKA RCT Basic, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; IKA RCT Basic ETS-D5, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Ultrasonik Banyo (CEIA CP104 Standard Ultrasonic Cleaner, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Polsonic Sonic-2, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Santrifüj Cihazı (Nüve CN 180, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Eppendorf 5452, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Etüv (Nüve FN 400 kuru hava sterilizatör, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Venti-Line VL-53, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Perkin-Elmer Spectrum Two IR FTIR spektrofotometresi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Multimode Mikroplaka Okuyucu (Biotek Synergy H1, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Laminar Flow Kabin (BioAir Safe Flow 1.2, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), CO₂ İnkübatörü (Euroclone Safe Grow New 188Pro, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), DLS Zeta Size ve Zeta potansiyel ölçüm cihazı (Malvern Nano, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Inverted mikroskop (Zeiss AxioCam 105 colour, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Sıvı azot tankı (Worthington Industries, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), Su banyosu (Memmert, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü), Radio-TLC cihazı (Perkin Elmer Storage Phosphor System Cyclone Plus, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), TLC bantları ve kuvvetleri (Sigma, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova); Doz Kalibratörü (Biodex Atomlab TM500, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), TEM (JEOL-2100 196-8558, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (MATAL)),

SPM (BRUKER Dimension Edge with ScanAsyst, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (MATAL)), VSM (Dexing Magnet 550 cihazı, Dokuz Eylül Üniversitesi Elektronik Malzemelerin İmalat ve Uygulama Merkezi (EMUM)), SEM (Thermo Scientific Apreo S cihazı, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı) (MATAL)), UV-Vis spektrofotometre (JASCO V-750 UV-Visible Spektrofotometre, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), MALDI TOF/TOF (Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems 4800 Plus analiz cihazı, Łukasiewicz Endüstriyel Kimya Enstitüsü, Varşova), otomatik γ -sayacı (Perkin Elmer 2480 Automatic Gamma Counter Wizard, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), rotator (Stuart SB3, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova), saf su cihazı (Milli-Q water, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı; Hydrolab, Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü, Varşova).

3.2 Kübik Demir Oksit (C-Fe₃O₄) İçerikli Nanopartikül Sentezi

Manyetik kübik demir oksit nanoparçacıklar (C-Fe₃O₄) literatüre göre hazırlanmıştır (Martinez-Boubeta et al., 2013). Demir oksit nanoparçacıklar, demir (III) asetilasetonat (Fe(acac)₃), dekanolik asit ve dibenzil eter karışımının ısıtılmasıyla sentezlenmiştir. Bu yöntem, demir (III) dekanat kompleksinin ara birikimi sayesinde nükleasyon ve büyüme aşamalarının net bir şekilde ayrılmasını sağlamaktadır. Böylece, boyutlar (15 nm ile 180 nm arasında) uygun ısıtma hızıyla ayarlanabilir. Sentez için sırasıyla 0.353 g (1 mmol) Fe(acac)₃, 0.688 g (4 mmol) dekanolik asit ile 25 mL dibenzil eter karıştırılmıştır. Çözelti kısa bir vakum uygulandıktan sonra kuvvetlice karıştırılarak çözeltinin sıcaklığı 6°C/dakika hızla yükseltilmiş ve kaynama noktasına (300°C) getirilmiştir. 1 saatlik ısıtmanın ardından çözeltinin sıcaklığı düşürülerek etanol eklenmiştir. Nanopartiküller mıknatıs kullanılarak toplanmış ve etanol içinde yeniden dağıtılarak 4°C'de saklanmıştır.

Sentezlenen demir oksit manyetik nanoparçacıkları için yapı analizleri FTIR ile yapılmıştır. FTIR analizi, Nükleer Bilimler Enstitüsü'nde bulunan Perkin-Elmer Spectrum 100 FTIR cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.3 C-Fe₃O₄ Nanopartiküllerin Silikalanması ve Silanlanması (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂)

Yüzey modifikasyonları literatüre göre yapılmıştır (Yasakci et al., 2018; Hafid et al., 2010). Hazırlanan C-Fe₃O₄ nanopartiküllerinin %75'i silika kaplama için kullanılmıştır. Sentezlenen 50 mg C-Fe₃O₄'e sırasıyla 2,5 mL tetraetil ortosilikat (TEOS) ve 2,5 mL %10'luk amonyak çözeltisi eklenerek pH değeri 9'a ayarlandı. Bu çözeltinin reaksiyonu, 90 °C'de geri akış koşullarında 14 saat boyunca sürdürülmüştür. Ardından, çökelti mıknatıs yardımıyla toplanmış ve birkaç kez etanol ile yıkanmış ve etanol-su karışımında yeniden dağıtılmıştır. Ertesi gün, silan bağlayıcı ajan olarak (3-aminopropil)trioksosilan (APTES) 2,5 mL miktarında silikalanmış kübik demir oksit nanoparçacık (C-Fe₃O₄-SiO₂) süspansiyonuna eklenmiştir. Süspansiyon, ultrasonik banyoda 15 dakika sonikasyona tabi tutulduktan sonra 90 °C'de 14 saat boyunca geri akış altında karıştırılmıştır. İnkübasyon sürecinin ardından, reaksiyona girmemiş olan silan bağlayıcı ajanı uzaklaştırmak amacıyla çözelti manyetik ayırma yöntemi kullanılarak birkaç kez etanol ile yıkanmıştır. Son adımda, silika ve silan kaplı demir oksit nanoparçacıklar (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂) etanol içerisinde yeniden dağıtılarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.4 Polietilen Glikol (PEG) ile Yüzeyin Kaplanması (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG)

Polietilen glikol (PEG) yüzey modifikasyonu işlemi literatüre göre emülsiyon-çözücü buharlaştırma tekniği ile hazırlanmıştır (Bakandritsos et al., 2010). Bu yöntemle göre, ağırlıkça 1:1 (w/w) oranında PEG-6000 (Mw: 5600-6600 g/mol; n ≈ 140) ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanoparçacıklar, 500 µL tetrahidrofur (THF) içerisinde çözülüp, sonikasyon altında yavaşça 5 mL damıtılmış suya eklenmiştir. Sulu faz hemen kahverengiye dönse de optik olarak berrak kalmıştır. Karışım, 40 °C'de bir gece boyunca bırakılmış ve THF'nin buharlaşması tamamlanmıştır. Ertesi gün, PEG ile modifiye edilmiş demir oksit nanoparçacıklar (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG), mıknatısla toplanarak birkaç kez etanol ile yıkanmış ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.5 Mannoz Triflat – Etilendiamin Konjugasyonu

[¹⁹F]FDG, literatürde belirtilen yöntemlere göre sentezlenmiştir (Yasakci et al., 2018; Babu et al., 2007). Sentez, iki aşamadan oluşmaktadır. İlk aşama, Sodyum siyanoborohidrür (NaCNBH₃) ile mannoz triflatın etilendiamine bağlanmasını içerir. İkinci aşamada, etüvde kurutulmuş ürün, Kryptofix (C₁₂H₂₄N₂O₄), potasyum karbonat (K₂CO₃), dimetil formamid (DMF) ve sodyum florür (NaF) çözeltileri kullanılarak ¹⁹F ikamesiyle FDG-amine hidrolize edilmiştir. Sentezin ilk aşamasında 19,2 mg mannoz triflat, 200 µL distile suda 90 °C'de çözölmüştür (Çözelti 1). 1 mmol (66 µL) etilendiamin, başka bir test tüpüne eklenen 70 µL saf su ile karıştırılmış ve pH 1.0 M HCl ile 7,5'e ayarlanmıştır. Ardından, 0,63 mmol (40 mg) NaCNBH₃ bu çözeltiye eklenmiştir (Çözelti 2). 1 ve 2 çözeltileri, 90 °C'de 1 saat karıştırılmıştır. Karışım, inkübatörde 65 °C'de kurutulmuş ve çöken reaksiyon ürünü elde edilmiştir.

3.6 Mannoz Triflat – Etilendiamin'in ¹⁹F ile Sübstitüsyonu

1 mL 0,03 M mannoz triflat-etilendiamin çözeltisi, ilk aşamada açıklanan yöntemle hazırlanmıştır. Bir reaksiyon tüpünde, 100 µL Kryptofix çözeltisi (ultra saf suda 1,0 mg/mL), 200 µL K₂CO₃ çözeltisi (ultra saf suda 2,0 mg/mL), 100 µL DMF ve 200 µL NaF çözeltisi (2,0 mg/mL; 16 mM) birleştirilmiş ve karışım, 90°C'de su banyosunda 20 dakika süreyle ısıtılmıştır. Bu süreç sırasında, mannoz triflat-etilendiamin çözeltisi, ¹⁹F ile yer değiştirmiş ve FDG amine hidrolize edilmiştir. Reaksiyon tamamlandıktan sonra, fazla Kryptofix'i uzaklaştırmak için Dowex 50 katyon değişim reçinesi kullanılmıştır. Ardından, nötralizasyon işlemi için Ambershep 900 OH reçinesi, reaksiyona girmeyen florürü uzaklaştırmak amacıyla ise Amberlite anyon değişim reçinesi kullanılmıştır. Son adımda, C-18 pre-kartuş (sep-pak) filtre ile polar olmayan safsızlıklar giderilmiştir (Yasakci et al., 2018).

Sentezlenen C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanoparçacıklar EDC/NHS konjugasyon metodu kullanılarak FDG ile konjuge edilmiştir (Heister et al., 2009; Subramanian et al., 2016). Önceden saflaştırılan FDG-etilendiamin çözeltisi, oda sıcaklığında 25 mM C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ manyetik nanoparçacıklara eklenmiştir. Ardından, sırasıyla

50 mM NHS ve 25 mM EDC çözeltileri (PBS = 7,4) yavaşça ilave edilerek çözelti iyice karıştırılmıştır. Reaksiyon, orbital çalkalayıcıda 2 saat boyunca karıştırılarak inkübe edilmiştir. Fazla EDC'yi söndürmek için, 20 mM'lik bir nihai konsantrasyona 70 µL 2-merkaptetanol eklenmiştir. Böylece FDG-etilendiamin, manyetik nanoparçacıklara konjuge edilmiştir (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG).

Aynı konjugasyon yöntemi, FDG-etilendiamin ile C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG nanoparçacıklarının konjugasyonu için de uygulanmıştır. Ancak C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklarının *in vitro* testlerde HER2 reseptör affinitesi daha düşük bulunduğundan, hücre kültürü deneylerine C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar ile devam edilmesi uygun görülmüştür.

3.7 ¹⁷⁷Lu ile Radyoişaretleme

Trastuzumaba antikoru, Vivaspin 500 (100 kDa) konsantratörü kullanılarak ticari ilaç ürününden (Herceptin®, Roche Pharmaceuticals, Basel, İsviçre) izole edilmiştir. Saflaştırılmış trastuzumab konsantrasyonu, 280 nm'de 225000 M⁻¹·cm⁻¹ molar sönüm katsayısı (ε) kullanılarak UV-VIS spektrofotometresi ile belirlenmiştir (Cędrowska et al., 2020).

DOTA-Trastuzumab (DOTA-Tras) konjugasyonu için, 1 mg p-NCS-Bz-DOTA-GA (DOTA) DMSO-su karışımında iyice vortekslenerek çözülmüştür. Bu çözeltiden 50 kat moleküler DOTA fazlası (50x) konjugasyon için kullanılmıştır. Daha sonra, 400 µg Trastuzumab ve DOTA, karbonat tamponunda (pH = 8,9) karıştırılmıştır. Çözelti, oda sıcaklığında gece boyunca 800 rpm'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Ertesi gün, çözelti damıtılmış suda Vivaspin 500 (100 kDa) santrifüj filtresiyle yıkanarak saflaştırılmıştır (n=5). Konjugasyonun antikor konsantrasyonu 280 nm'de UV-VIS spektrofotometresi ile ölçülerek literatüre göre hesaplanmıştır (Guleria et al., 2020).

Ardından ¹⁷⁷Lu ile radyoişaretleme, literatürdeki yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Guleria et al., 2020). Taşıyıcı formda ¹⁷⁷Lu radyoizotopu, ¹⁷⁷LuCl₃ olarak 0,04 M HCl çözeltisi içinde, Polonya'nın Świerk kentindeki Radioisotope Centre POLATOM'dan temin edilmiştir (spesifik aktivite > 370 GBq/mg Lu, radyoizotop saflığı > %99,9). Kısaca 400 µg DOTA-Tras çözeltisi, 150

μL 0,1 M amonyum asetat tamponu ($\text{pH}=5/5,5$) içerisinde 10 MBq $^{177}\text{LuCl}_3$ ile karıştırılmıştır. Antikor-şelat konjugasyonu 2 saat 42°C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, ^{177}Lu -DOTA-Tras, 100 kDa moleküler ağırlık kesme membranlı Vivaspın 500 santrifüj filtresi kullanılarak saflaştırılmıştır ($n=5$). Konjugasyondan sonra, bir trastuzumab molekülü başına şelat oluşturan grup sayısı MALDI TOF/TOF analizi ile belirlenmiştir.

3.7.1 ^{177}Lu -DOTA-Tras Bileşiğinin C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG Nanoparçacıklar ile Konjugasyonu

İlk adımda, PBS ($\text{pH}=7,4$) içinde 50 mM NHS ve 25 mM EDC çözeltileri hazırlanarak sırasıyla 500 μg Trastuzumab içeren ^{177}Lu -DOTA-Tras (50x) ve 500 μg C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacık çözeltileri ile karıştırılmıştır. Konjugasyon reaksiyonu, oda sıcaklığında bir rotatör üzerinde 4 saat boyunca inkübe edilmiştir. Son olarak, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıkları, mıknatıs kullanılarak manyetik yöntemle üç kez yıkanmış ve istenmeyen suda çözünür ürünler dekantasyon yoluyla uzaklaştırılmıştır (Mozafarinia et al., 2021). Son aşamada manyetik radyokonjugat aktivitesi bir doz kalibratörü ile ölçülmüştür.

3.8 Kalite Kontrol Çalışmaları

3.8.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) Yöntemi ile Kalite Kontrol Çalışmaları

Silika jel kaplı cam elyaf şeritler ve 0,1 M sitrat tamponu ($\text{pH} = 5$), TLRC yöntemi için sırasıyla durağan ve hareketli fazlar olarak kullanılmıştır. Radyoişaretli nanokonjugatlar, silika jel kaplı TLC şeritlerine 2 μL olarak damlatılmış ve uygulama noktasından 1 cm yukarıya yerleştirilmiştir. TLC şeritleri, uygulama noktasından yaklaşık %80 ilerledikten sonra banyodan çıkarılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Radyoişaretleme süresi parametreleri 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 4 saat olarak optimize edilmiştir. Maksimum işaretleme verimi 2. saatte elde edilmiştir. TLC bantları Perkin Elmer Storage Phosphor System Cyclone Plus cihazı ile taranarak radyoişaretleme verimleri elde edilmiştir. Daha iyi ayırma sağladıkları için radyo-TLC için silika jel kaplı bantlar tercih edilmiştir.

3.9 Lipofilite

Bu deneyin temel prensibi, bileşiğin polar olmayan (n-oktanol) ve polar (PBS) fazlar arasındaki dağılım katsayısını belirlemektir. Radyoişaretli nanokojugatın lipofilite tayini, önceki çalışmamıza benzer şekilde belirlenmiştir (Tutun et al., 2021). Kısaca, başlangıç aktivesi 10 MBq olan ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ konjugatların 100 μL 'lik çözeltileri, 300 μL n-oktanol ve 300 μL PBS (pH = 7,4) ile karıştırılarak bir test tüpüne konmuştur. Ardından, karışım oda sıcaklığında 1 dakika süreyle vortex edilerek manyetik ayırma ile ayrılmıştır. Ayrım sonunda üst faz (n-oktanol) ve alt faz (PBS) radyoaktivitesi ayrı ayrı sayılarak n-oktanol/tampon oranı (logP) belirlenmiştir. Aynı işlemler üç kez tekrarlanmıştır.

Konsantrasyon verileri kullanılarak dağılım katsayısı (LogP) aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\text{LogP} = \log ((\text{Bileşik})_{n\text{-oktanol}} / (\text{Bileşik})_{\text{PBS}})$$

Burada, radyoişaretli bileşiğin saniyedeki sayım cinsinden radyoaktivitesi ölçülmüştür.

3.10 Stabilité Testi

^{177}Lu -DOTA-Tras@C- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparçacıkların stabilite testi farklı zaman dilimlerinde (0, 1, 2, 4 saat ve 6. güne kadar) 42°C'de PBS (pH=7,4) ve insan serumu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 100 μL su içinde başlangıç aktivitesi 10 MBq olan iki farklı ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparçacık çözeltisi hazırlanmış ve bu çözeltiler, 900 μL insan serumu (human serum, HS) ve PBS (pH=7,4) içeren iki ayrı deney tüpünde karıştırılmıştır. İnkübasyon sürelerinin sonunda, üst faz manyetik ayırma ile ayrılmış ve alt fazdaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparçacıkların aktivitesi, doz kalibratörü ile ölçülmüştür.

3.11 Karakterizasyon Çalışmaları

3.11.1 FTIR Analizi

FTIR analizleri için, hazırlanan C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG, FDG ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG örnekleri, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'ndeki NÜVE FN 400/500 serisi kuru hava sterilizatörü kullanılarak 40°C'de kurutulmuştur. Numunelerin FTIR spektrumları, Perkin-Elmer Spectrum Two IR spektrometresi ile Zayıflatılmış Toplam Yansıma (ATR) yöntemi uygulanarak kaydedilmiştir.

3.11.2 Hidrodinamik çap ve zeta potansiyel ölçümleri

DLS tekniğiyle sentezlenen nanoparçacıkların hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri analiz edilmiştir. Sentezlenen C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG örneklerinin her biri için hidrodinamik çap (d. nm) ve zeta potansiyeli (mV) ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Analizler için örnek hazırlama aşamasında, hidrodinamik çap ölçümleri için 1995 µL ultra saf su içerisine 5 µL numune eklenmiş, zeta potansiyel ölçümleri için ise 1990 µL ultra saf suya 10 µL numune ilave edilmiştir. Tüm numuneler, homojenizasyonu sağlamak amacıyla ultrasonik banyoda 30 dakika bekletildikten sonra ölçüm küvetine aktarılmış ve analizler tamamlanmıştır.

3.11.3 SEM görüntüleme

SEM analizleri, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (MATAL) bünyesindeki Thermo Scientific Apreo S cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analiz öncesi numuneler Leica EM CPD300 model Otomatik Kritik Nokta Kurutucu ile kurutulmuştur. Kurutma işleminin ardından, numuneler Leica EM ACE600 cihazında argon gazı ve elektrik alanı kullanılarak kaplama işlemine tabi tutulmuştur. Bu işlem sırasında %80 altın (%Au) ve %20 paladyum (%Pd) içeren bir hedef plaka kullanılarak, numune yüzeyinde 5-15 nm kalınlığında bir kaplama

elde edilmiştir. Hazırlık süreci tamamlanan C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.11.4 TEM Görüntüleme

TEM analizleri, Konya Selçuk Üniversitesi İleri Araştırmalar Merkezi'nde bulunan JEOL-2100 Çok Amaçlı 200 kV TEM (196-8558, Tokyo/Japonya) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. TEM görüntülemesi için C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklar, karbon kaplı bakır ızgaralar üzerine seyreltik etanol süspansiyonu içerisinde hazırlanmış ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Ortalama parçacık boyutları ve boyut dağılımı, en az 100 parçacığın en uzun iç çapı ölçülerek analiz edilmiştir.

3.11.5 SPM Analizi

SPM analizleri, Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM) ve Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yöntemlerini içeren BRUKER Dimension Edge with ScanAsyst cihazı kullanılarak Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı (MATAL) bünyesinde gerçekleştirilmiştir. Numunelerin parçacık boyutu, bir mika plakası üzerinde gözlemlenen çıkıntı yüksekliğinden ölçülmüştür. Her bir örnekten 10 µL alınarak 1,5x1,5 boyutlarındaki bir mika plakası üzerine damlatılmıştır. Numuneler, NÜVE FN 400/500 serisi kuru hava sterilizatöründe 40°C'de 1 gün boyunca kurutulduktan sonra yüzeye fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Analizler, cihazın iğnesinin yüzeye dokunarak veri topladığı Tapping Mode (Dokunma Modu) kullanılarak yapılmıştır. Yüzeye fikse edilen örneklerin yüzey morfolojisi ve yüzey alanı tespit edilmiştir.

3.11.6 VSM Analizi

VSM ölçümleri, Dokuz Eylül Üniversitesi Elektronik Malzemelerin İmalat ve Uygulama Merkezi bünyesindeki Dexing Magnet VSM 550 cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Numuneler ölçüm öncesinde 40°C'de kurutulmuş ve toz haline getirilmiştir. C-Fe₃O₄ nanoparçacıkları 37 mg olarak tartılmış ve 30 emu biriminde manyetik alana tabi tutulmuştur. Benzer şekilde, C-Fe₃O₄-SiO₂ örneği 25 mg, C-

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-PEG-FDG}$ ise 7,5 mg olarak ölçülmüş ve her biri 30 emu biriminde manyetik alan altında analiz edilmiştir. Manyetik moment 0,1 emu/g hassasiyetle, -3000 Gauss ile +3000 Gauss arasında uygulanan manyetik alan aralığında ölçülmüştür. Elde edilen moment (emu) değerleri, numune miktarına bölünerek emu/g cinsinden ifade edilmiştir.

3.11.7 XRD Analizi

XRD analizleri, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan Panalytical Empyrean XRD analiz cihazı ve Empyrean difraktometre sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizde, bakır (Cu) anotlu bir X-ışını tüpü tercih edilmiş olup, kullanılan dalga boyları K-Alpha1 (1.5405980 Å) ve K-Alpha2 (1.5444260 Å) olarak belirlenmiştir. Bu iki dalga boyunun oranı (K-Alpha2/K-Alpha1) 0.500 olarak tespit edilmiştir. Jeneratör ayarları, optimum analiz koşullarını sağlamak amacıyla 45 kV voltaj ve 40 mA akım olarak ayarlanmıştır. Analiz sırasında monokromatör kullanılmamıştır.

Toz haline getirilen $\text{C-Fe}_3\text{O}_4$ ve $\text{C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-PEG-FDG}$ nanoparçacıklarının ölçümleri, yansıma-iletim spinner düzeninde ve Theta/Theta gonyometre konfigürasyonu ile gerçekleştirilmiştir. Tarama, 2 θ eksen boyunca 5.0038° ile 89.9961° aralığında yapılmış ve tarama adım boyutu 0.0131303° olarak belirlenmiştir. Tarama türü sürekli (continuous) olup, her adım için ölçüm süresi 29.070 saniye olarak ayarlanmıştır. Ölçüm sonuçları, toplamda 6473 veri noktası elde edilerek şiddet (intensity)/açı (angle) formatında ifade edilmiştir.

3.11.8 MALDI TOF/TOF analizi

MALDI TOF/TOF analizi Polonya Varşova'da bir araştırma enstitüsü olan Łukasiewicz Endüstriyel Kimya Enstitüsü'nde gerçekleştirilmiştir. Ölçümler, "Lineer Mod, pozitif iyonizasyon" modunda CHCA matriksi (α -siyano-4-hidroksisinamik asit) kullanılarak Thermo Fisher Scientific Applied Biosystems 4800 Plus MALDI TOF/TOF kütle spektrometresiyle yapılmıştır. Spektrometrenin kalibrasyonu, Laser Biolabs'tan ProMix3 standardı kullanılarak yapılmıştır (Trypsinojen 23980,9 Da, Maya enolaz 46670,9 Da, Sığır serum albümini 66429,9 Da). Örneklerin kütle profilleri 20.000 ile 180.000 Da arasındaki bir aralıkta

kaydedilmiştir. Her örnek için 24 ölçüm noktası alınmış ve incelenen proteinlerin moleküler kütlesi, faydalı kütle profilleri veren ölçüm noktalarından hesaplanan moleküler kütlelerin aritmetik ortalaması olarak belirlenmiştir.

Trastuzumab ve DOTA-Tras örneklerinin kütle profillerinde moleküler iyon (M^+H)⁺ gözlemlenmiş, ancak bu asla en yoğun sinyal olmamıştır. En yüksek yoğunluğa sahip sinyal, proteine iki protonun bağlanmasıyla oluşan 2+ yüke sahip sinyal olarak tespit edilmiştir ($M^{+2}H$)²⁺. Bu nedenle, proteinlerin moleküler kütlesi, çift yüklenmiş molekülün gözlemlenen kütesine dayalı olarak hesaplanmıştır.

2+ yüke sahip iyonların dışında, her kaydedilen kütle profilinde, incelemiş proteinle üç, dört ve bazen beş protonun bağlanması sonucu oluşan iyonlara ait sinyaller de bulunmuştur. Bu sinyallerin yoğunluğu, yük sayısının artmasıyla birlikte azalmaktadır.

3.12 *In Vitro* Çalışmalar

Yapılan *in vitro* çalışmalarda, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının hücre kültür ortamındaki etkinliği HER2 reseptör pozitif SKOV-3 yumurtalık (adenokarsinom), triple pozitif insan meme kanseri BT474 ve triple negatif MDA MB231 meme kanseri (adenokarsinom) hücreleri kullanılarak incelenmiştir. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan SKOV-3, BT474 ve MDA MB231 hücreleri, Varşova'da bulunan Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü'nden temin edilmiştir.

SKOV-3 ve MDA MB231 hücreleri için %10 sığır fetal serumu içeren McCoy's ve Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyeri, BT474 hücreleri için ise %10 sığır fetal serumu içeren Roswell Park Memorial Institute Medium-1640 (RPMI-1640) besiyeri kullanılmıştır. İki besiyer içerisine de 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum piruvat ve penisilin streptomisin ayrıca eklenmiştir. Tüm hücreler, flaskların %80'ini kaplayacak şekilde düşük oksijen ortamında (%5 CO₂) 37°C'de kültür edildikten sonra, %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu ile enzimatik olarak flask tabanından ayrılmış ve çalışma grupları oluşturulmuştur. Kullanılmayan hücreler ise %5 DMSO içeren hücre besiyeriyle dondurulmuş ve -80 °C'de saklanmıştır, ardından sıvı azot içinde -190 °C'de muhafaza edilmiştir. Bu

bölüm sitotoksosite, hücre bağlanma (reseptör spesifitesi), internalizasyon ve 3D hücre kültür (sferoids) deneylerini içermektedir.

3.12.1 Sitotoksosite

^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının sitotoksosite çalışmaları, literatüre göre MTS testi ile yapılmıştır (Gawęda et al., 2020). SKOV-3, BT474 ve MDA-MB231 hücreleri, deneyden 24 saat önce 96-well platelere her kuyuda 3×10^3 hücre olacak şekilde ekilmiştir. Ardından hücre besiyeri radyoişaretli ve radyoaktif olmayan farklı nanokonjugat konsantrasyonları ile değiştirilmiştir. Hücreler, nanokonjugatlar ile 24 saat, 48 saat ve 72 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra, 20 μL CellTiter96®AQueous One Solution Reagent (Promega, MDN, ABD) kiti eklenmiş ve 2 saat inkübe edilmiştir. Absorbans, metabolik olarak aktif hücrelerin yüzdesini (MAC%) hesaplamak için 490 nm'de ölçülmüştür.

^{177}Lu -DOTA ve ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların IC₅₀ değerleri, GraphPad Prism v.8 Yazılımı (GraphPad Software, San Diego, CA, ABD) kullanılarak hesaplanmıştır. Hücre kültürü çalışmalarına ait istatistiksel analiz sonuçları değerlendirilirken bağlanma değerleri arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0,05'ten küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

3.12.2 Hücre Bağlanma Deneyi

^{177}Lu -DOTA-Trastuzumab@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların HER2 reseptörlerine olan afinitesini belirlemek amacıyla hücre bağlanma testleri SKOV-3 ve BT474 hücreleri kullanılarak yapılmıştır. MDA MB231 hücreleri negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyden iki gün önce, kuyu başına 6×10^5 hücre, 6-well platelere ekilmiştir. Hücrelere çeşitli konsantrasyonlarda radyokonjugat (100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, 0.78 ve 0.40 nM) eklenmiş ve 1,5 saat inkübe edilmiştir. Hücresel alım, reaksiyon süpernatantı süzülerek durdurulmuş ve ardından 1 mL soğuk PBS ile iki kez yıkanmıştır. Son olarak, hücreler 1 M NaOH kullanılarak lizlenmiş ve plakadan ayrılmıştır. Spesifik olmayan bağlanmayı belirlemek için hücreler, 300 kat fazla radyoişaretlenmemiş

Trastuzumab antikoru ile inkübe edilmiştir. Toplanan örneklerin, hücre peletleri ve süpernatantları ile radyoaktivitesi, Perkin Elmer otomatik γ -sayacı kullanılarak ölçülmüştür (Majkowska et al., 2018).

3.12.3 İnternalizasyon Deneyi

İnternalizasyon çalışmaları, SKOV-3, BT474 ve MDA MB231 hücrelerinde yapılmış ve bağlanma oranının MDA MB231 hücrelerinde diğer hücre hatlarına göre daha düşük olduğu gözlemlenmiştir. Kısaca, deneyden bir gün önce, kuyu başına 6×10^5 hücre, 6-well platelere ekilmiştir. Bu adımın ardından, hücreler bir kez PBS ile yıkanmış ve test edilen ^{177}Lu -DOTA-Trastuzumab@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar son hacmi 1 mL olacak şekilde hazırlanmış ve IC50 dozlarına göre eklenmiştir. Internalizasyonu engellemek amacıyla bu adımda 1 saat 4 °C'de inkübasyon yapılmıştır. Daha sonra, besiyer, bağlanmamış fraksiyon olarak toplanmış ve üzerine 1 mL taze besiyer eklenmiştir. Plakalar ardından sırasıyla 1, 6, 18 ve 24 saat inkübe edilmiştir. Membran-bağlı fraksiyonu belirlemek için, hücreler iki kez glisin-HCl tamponu (pH ~2.8; 0.05 M) ile yıkanmış ve 4 °C'de 5 dakika inkübe edilmiştir. Son olarak, internalize olmuş fraksiyon, hücreler 1 M NaOH ile önceden lizlenerek toplanmıştır. Spesifik olmayan bağlanma, reseptör bağlanma afinitesi için uygulanan aynı prosedürle değerlendirilmiştir (Gharibkandi et al., 2023).

3.12.4 3D Hücre Kültürü

3D hücre kültür (sferoid) modelleri, daha önceki bir prosedürle benzer şekilde hazırlanmıştır (Wawrowicz et al., 2022). Sferoid oluşumu için, kuyu başına 3×10^3 BT474 ve MDA MB231 hücreleri, deneyden on gün önce 96-well platelere 200 μL besiyer ortamında ekilmiştir. İnkübasyon sırasında, her iki günde bir ortamın 100 μL 'si değiştirilmiş ve hücrelerin büyüklükleri 250–350 μm çap aralığına kadar belirli aralıklarla ölçülerek kontrol edilmiştir. Ardından, hücrelerin üç boyutlu (3D) agregatları 5, 10 ve 20 MBq/mL dozda ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarla ile (n=5) muamele edilmiştir. Sferoidler, radyokonjugat ile 24 saat inkübe edilmiştir. 24 saatlik inkübasyonun ardından, sferoidler taze bir besiyer ortamında süspanse edilmiş ve uygulamadan sonra 9 güne kadar her gün 3D hücre kültürü modellerinin büyümesi ölçülmüştür.

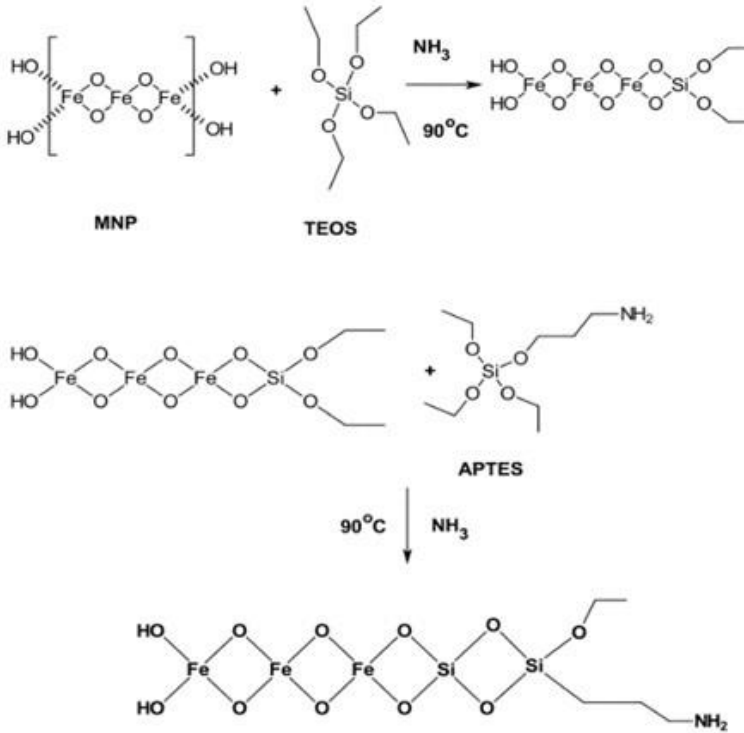
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Reaksiyon Şemaları

Sentezlenen nanoparçacıkların modifikasyon ve konjugasyonlarına ait reaksiyon şemaları bu bölüm başlıkları altında verilmiştir.

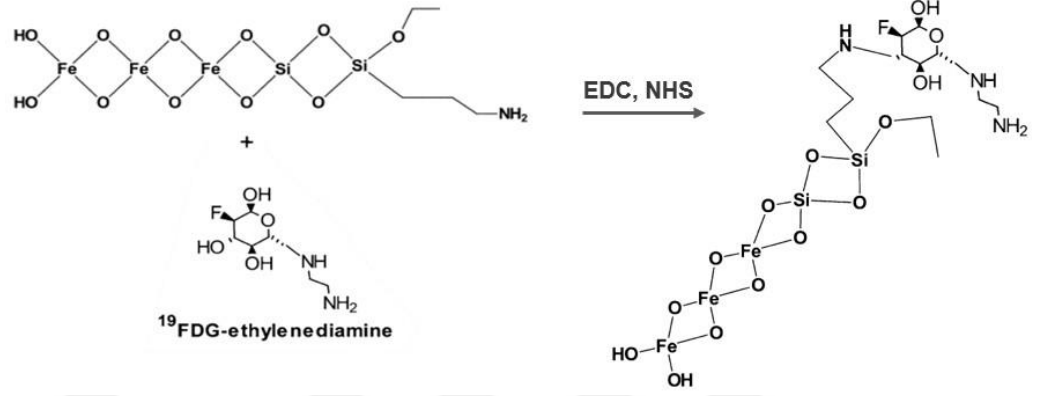
4.1.1 Nanoparçacık Sentez Reaksiyon Şemaları

Kübik yapıda demir oksit nanoparçacıkların sentez süreci ve yüzey modifikasyonları Şekil 4.1’de şematize edilmiştir. Gerçekleştirilen karakterizasyon çalışmaları, elde edilen nanoparçacıkların kübik morfolojide olduğunu doğrulamıştır. Silikalama ve silanlama işlemleri, daha önce yüksek lisans tezimde uygulanan yöntemle gerçekleştirilmiştir (Tutun et al., 2021). C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanoparçacıkları, biyoyumluluklarının artırılması amacıyla PEG ile yüzey modifikasyonuna tabi tutulmuştur. Bu işlemlerin ardından elde edilen yapı, Şekil 4.1’de sunulmuş olup karakterizasyon verileri ile yapıların doğruluğu teyit edilmiştir.



Şekil 4.1 C-Fe₃O₄ sentezi ve yüzey modifikasyonlarının reaksiyon şeması (Yasakci et al., 2018)

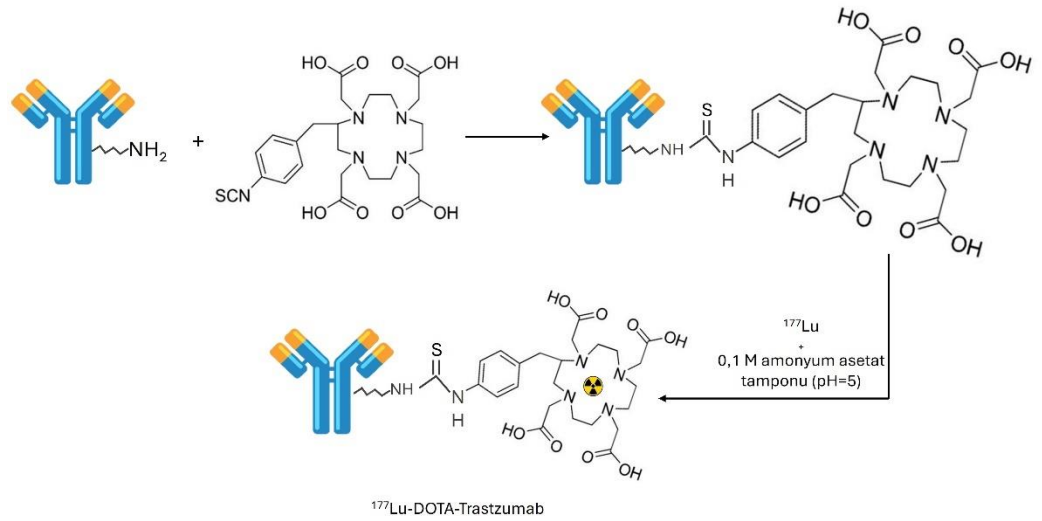
C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ nanoparçacıklarına FDG konjugasyonu, literatüre göre EDC/NHS kimyası kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Yasakci et al., 2018). Bu süreç sonucunda elde edilen nanoparçacık yapısının şeması Şekil 4.2’de gösterilmiş ve karakterizasyon çalışmaları sonucunda yapı doğrulanmıştır.



Şekil 4.2 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂’nin FDG ile konjugasyonuna ait reaksiyon şeması (Aras et al., 2018)

4.1.2 ¹⁷⁷Lu ile Radyoişaretleme Reaksiyon Şeması

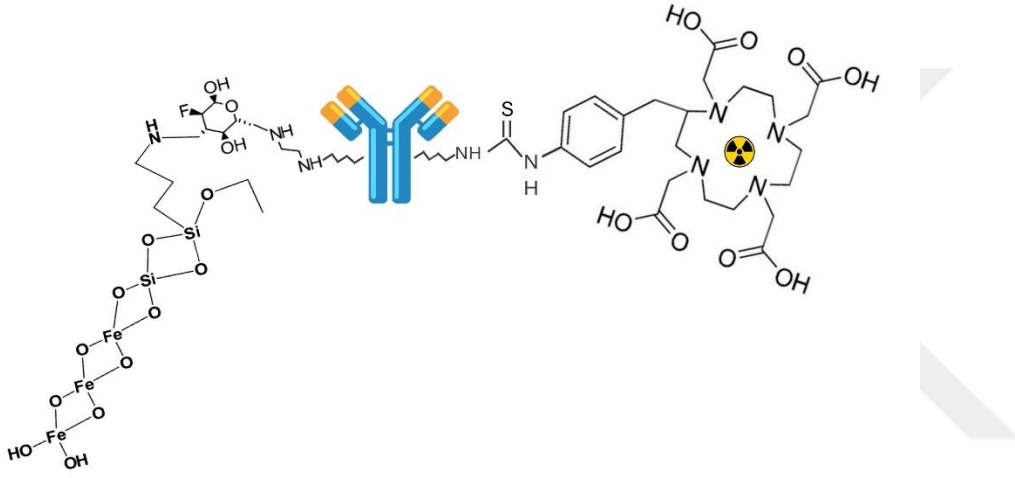
p-NCS-Bz-DOTA-GA ve Trastuzumab konjugasyonu ve ¹⁷⁷Lu ile radyoişaretleme, literatürdeki yöntem modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir (Guleria et al., 2020). ¹⁷⁷Lu-DOTA-Trastuzumab’a ait reaksiyon şeması Şekil 4.3’te şematize edilmiştir. Elde edilen kalite kontrol sonuçlarına radyoişaretleme başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4.3 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Trastuzumab’a ait reaksiyon şeması

4.1.3 Radyokonjugasyon Reaksiyon Şeması

Trastuzumab antikoru iki karboksilik fonksiyonel gruba sahiptir ve amin ile modifiye C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkları ile konjuge edilmesi mümkündür. Şekil 4.4'te verildiği gibi EDC/NHS kimyası kullanılarak ¹⁷⁷Lu-DOTA-Trastuzumab ile C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar ile konjugasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Mozafarinia et al., 2021). Konjugasyonlar TLRC ve radyoişaretleme sonrası manyetik ayırma yöntemleri kullanılarak doğrulanmıştır.



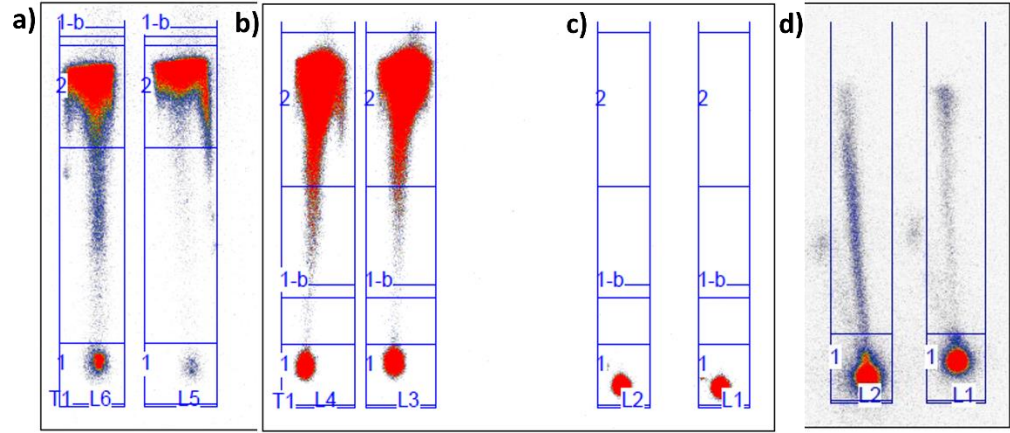
Şekil 4.4 ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG konjugasyonu

4.2 Kalite Kontrol Sonuçları

4.2.1 TLRC Sonuçları

Şekil 4.5 ¹⁷⁷Lu-klorür (¹⁷⁷LuCl₃) (a), ¹⁷⁷Lu+Tras (b), ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras (c) ve ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG (d) radyokromatogramlarını göstermektedir. Kromatogramlara ait radyoişaretleme verimi yüzdeleri ise Çizelge 4.1'de özetlenmiştir. ¹⁷⁷LuCl₃ ve ¹⁷⁷Lu+Tras molekülleri daha yüksek R_f değerleri ile hareket ederken, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras konjugasyonu başlangıç noktasında kalmıştır. Bu durum, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras molekülünün stabil yapısını ve hareket kabiliyetinin sınırlı olduğunu göstermektedir. Burada, ¹⁷⁷Lu+Trastuzumab

molekölü, Lu^{2+} iyonları ile Trastuzumab molekülü arasında herhangi bir spesifik olmayan bağlanma olmadığını doğrulamak için test edilmiştir.



Şekil 4.5 $^{177}\text{LuCl}_3$ (a), $^{177}\text{Lu}+\text{Tras}$ (b), $^{177}\text{Lu-DOTA-Tras}$ (c) ve $^{177}\text{Lu-DOTA-Tras@C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ (d) radyo kromatogramları

Çizelge 4.1 Şekil 4.5'e göre radyoişaretleme verim yüzdeleri (n=2) (L6: L6'nın (başlangıç) yüzdesi ile karşılaştırılan sonuç; L5: L5'in (başlangıç) yüzdesi ile karşılaştırılan sonuç)

	$^{177}\text{LuCl}_3$		$^{177}\text{Lu}+\text{Tras}$		$^{177}\text{Lu-DOTA-Tras}$		$^{177}\text{Lu-DOTA-Tras@C-Fe}_3\text{O}_4\text{-FDG}$	
	L6 (%)	L5 (%)	L4 (%)	L3 (%)	L2 (%)	L1 (%)	L2 (%)	L1 (%)
Başlangıç	11.2	4.6	6.8	6.4	96.8	97.4	100	100
Uç noktası	88.8	95.4	93.2	93.6	3.2	2.6	0	0
Verim	-	-	-	-	>85.6 (L6)	>86.2 (L6)	>88.8 (L6)	>88.8 (L6)
					>92.2 (L5)	>92.8 (L5)	>95.4 (L5)	>95.4 (L5)

Trastuzumab, doğrudan ^{177}Lu ile işaretleme yapmayan bir antikordur; bu nedenle ^{177}Lu ile kararlı bir bağ oluşturabilmek için bir şelatör kullanılarak modifiye edilmesi gerekmektedir. Bu bağ, trastuzumab'daki lizin ϵ amino gruplarının (primer amin) *p*-NCS-benzil-DOTA'nın izotiyosiyanat gruplarıyla kondenzasyon reaksiyonuna girmesi ve tiyoüre bağının oluşmasıyla açıklanabilir. $^{177}\text{LuCl}_3$ ve $^{177}\text{Lu}+\text{Tras}$ 'ın TLC sonuçları oldukça benzerdir, bu da $^{177}\text{Lu}+\text{Tras}$ molekülü için herhangi bir radyoişaretleme olmadığını doğrular (Bhusari et al., 2017).

Radyoişaretli DOTA-Tras ve DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG, antikorun lipofilikliği nedeniyle uygulama noktasında kalmıştır ve bağlanmamış ¹⁷⁷Lu³⁺ çözücü ön yüzeyinde tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, ¹⁷⁷Lu'nun DOTA-Trastuzumab konjugatına başarılı bir şekilde bağlandığını ve ardından C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarıyla konjugasyonunun gerçekleştiğini doğrulamaktadır (Thakral et al., 2014; Salvanou et al., 2024).

4.3. Lipofilite

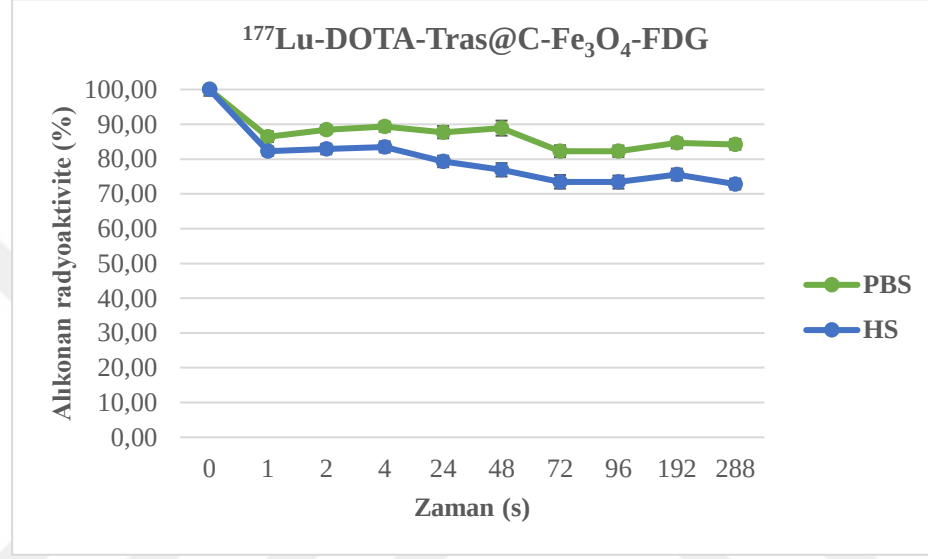
Lipofiliklik, bir molekülün hidrofobik (su sevmeyen) ve lipofilik (yağda çözünen) özelliklerini tanımlayan bir kavramdır. Kimyasal ve biyolojik süreçlerde kritik bir parametre olup, bir bileşiğin biyolojik membranlardan geçişini, biyoyararlanımını, doku dağılımını, metabolizmasını ve toksikolojisini etkilemektedir. Genellikle, bir molekülün lipofilikliği, n-oktanol/su dağılım katsayısı (LogP) ile ifade edilir. Lipofiliklik, özellikle ilaç geliştirme süreçlerinde önemlidir, çünkü moleküllerin hücre membranlarını geçerek hedef bölgelerine ulaşabilmesi için belirli bir lipofiliklik derecesine sahip olması gerekir. Çok düşük lipofiliklik suyla sınırlı çözünürlüğe yol açabilirken, aşırı yüksek lipofiliklik plazma proteinlerine bağlanmayı ve toksisiteyi artırabilir (Rasaneh et al., 2014; Avdeef 2003).

¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin deneysel lipofilisite (logP) değeri $-4,74 \pm 0,17$ (n = 3) olarak bulunmuştur ve bu değer, bileşiğin sulu faza (hidrofilik) daha yüksek bir afinitesi olduğunu göstermektedir. Bu sonuç literatürle uyumludur (Salvanou et al., 2024).

4.4 Stabilite

Sentezlenen ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanokonjugatın stabilitesi PBS (pH 7.4) ve insan serumunda 6 gün boyunca test edilmiştir (Şekil 4.6). Deney süresince serum proteinlerine veya tüp yüzeyine maksimum %30 oranında radyoaktivite adsorpsiyonu gözlemlenmiştir. Sentezlenen ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG radyokonjugat, 6 gün boyunca PBS'de (pH = 7,4) $84,23 \pm 1,51$ ve insan serumunda $72,81 \pm 1,55$ oranında ¹⁷⁷Lu'yu tutmuştur. Radyobiyo-konjugat, her iki çözeltide de bir gün sonra inkübasyon parametreleri

boyunca benzer şekilde stabil kalmıştır. Stabilité çalışmaları, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanokonjugatının ^{177}Lu 'nun yarı ömrü boyunca stabil olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, literatürde, ^{177}Lu ile işaretlenmiş demir oksit nanopartiküllerinin farklı antikörlerle fonksiyonelleştirildiği ve radyoişaretlemeden sonra 2 saat ile 7 gün arasında $77,29 \pm 1,69$ ile $70,72 \pm 1,75$ arasında serum stabilitesi gösterdiği bildirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, literatürle uyumludur (Salvanou et al., 2024) (Rasaneh et al., 2014).



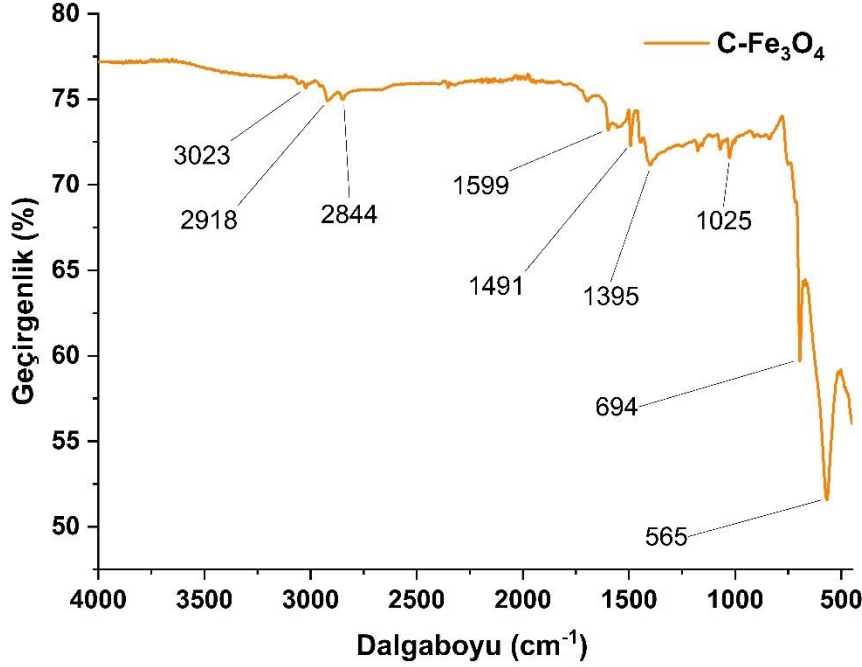
Şekil 4.6 ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların stabilite sonuçları

4.5 Karakterizasyon Sonuçları

4.5.1 FT-IR Sonuçları

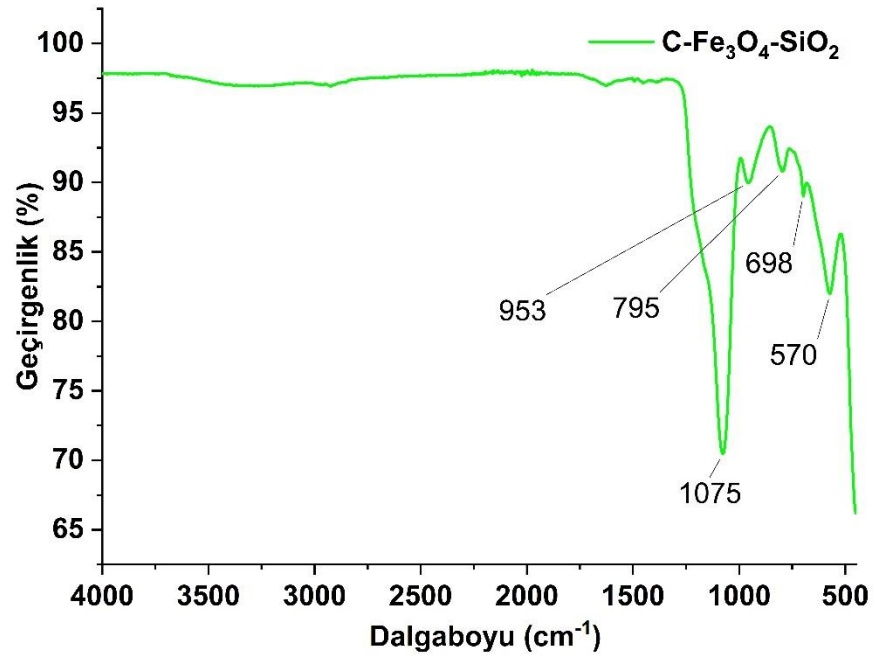
Şekil 4.7’de sentezlenen C-Fe₃O₄ nanoparçacıkların FTIR spektrumu verilmiştir. Bu analiz, Perkin-Elmer Spectrum Two IR spektrofotometresi kullanılarak ATR (Attenuated Total Reflection) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Literatür bilgileri ile uyumlu olarak elde edilen spektrumda karakteristik pikler belirlenmiştir (Dutta et al., 2018) (Yasakcı et al., 2018). 565 cm⁻¹ civarı Fe-O titreşimlerine karşılık gelir ve manyetit (Fe₃O₄) yapıların oluşumunu doğrulamaktadır. Bu bandın varlığı, sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ve manyetik özelliklere sahip kübik nanoparçacıkların oluştuğunu göstermektedir. 694 cm⁻¹ civarı Fe-O ve O-Fe-O bağlarına işaret eden bu bant, sentezlenen nanoparçacıkların kristal yapısı hakkında bilgi sağlamaktadır. 1395 ve 1491

cm^{-1} 'de elde edilen pikler, C-H bükülme titreşimleri veya C=C çift bağlarının varlığı ile ilişkilendirilebilir. Yüzeyde karbon temelli organik grupların bulunabileceğini göstermektedir.

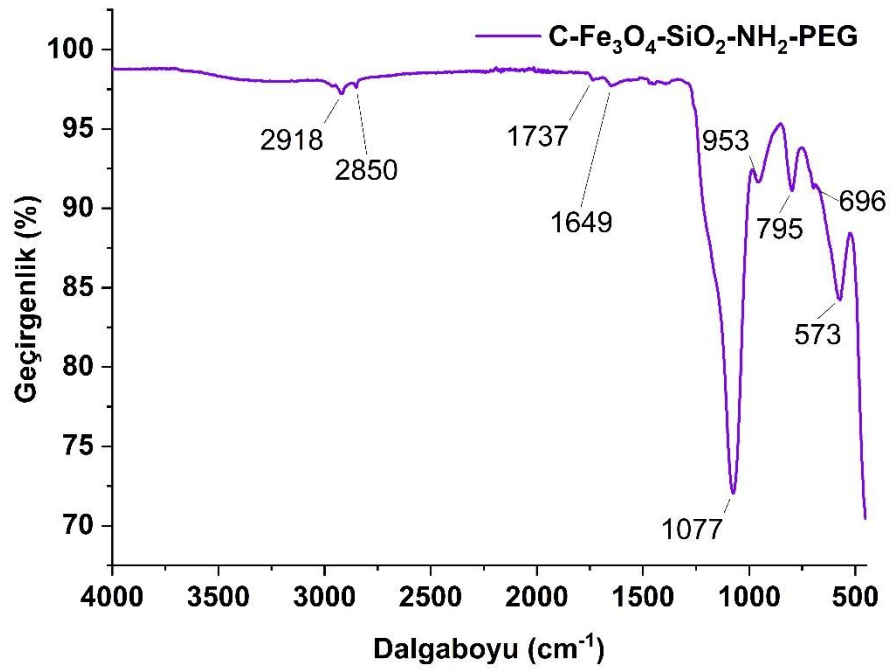


Şekil 4.7 C-Fe₃O₄'ün FTIR spektrumu

Şekil 4.8'de, silikalanmış C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıklarının FTIR spektrumu verilmiştir. Literatür ile uyumlu olarak spektrumda silikalanma ve manyetik yapı ile ilişkili karakteristik pikler gözlemlenmiştir (Yasakcı et al., 2018). 570 cm^{-1} 'de Fe-O bağının titreşiminden kaynaklanan bu pik, Fe₃O₄ yapıların nanoparçacıklarda başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir. Bu, manyetik özelliklerin korunmuş olduğunu ifade eder. 1075 cm^{-1} civarı elde edilen pik, Si-O-Si gerilme titreşimlerine işaret eder ve yüzey modifikasyonu sırasında SiO₂ kaplamanın başarıyla gerçekleştiğini doğrular. SiO₂'nin varlığı, nanoparçacıkların kimyasal kararlılığını ve biyouyumluluğunu artırdığı bilinmektedir. 795 ve 953 cm^{-1} bölgesinde ise Si-O titreşimlerinden kaynaklanan pikler gözlemlenmiştir. Bu, SiO₂ kaplamanın daha detaylı bir şekilde varlığını ortaya koymaktadır. 698 cm^{-1} 'de Si-OH veya Si-O-Fe bağlarının varlığına işaret edebilir. Bu bağlar, silikalanma sırasında yüzeyde oluşabilecek interaktif bölgeleri temsil etmektedir.



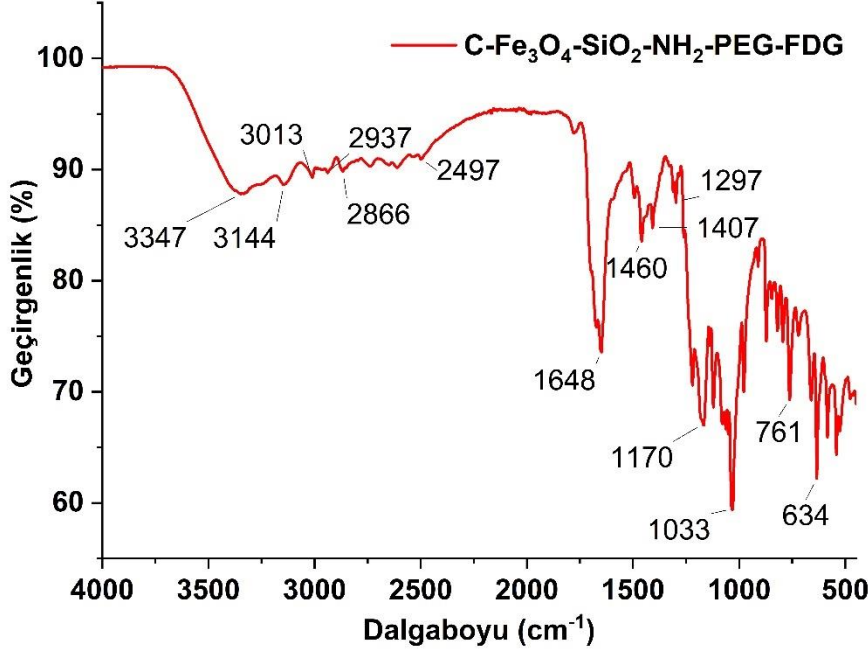
Şekil 4.8 C-Fe₃O₄-SiO₂'ün FTIR spektrumu



Şekil 4.9 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG'in FTIR spektrumu

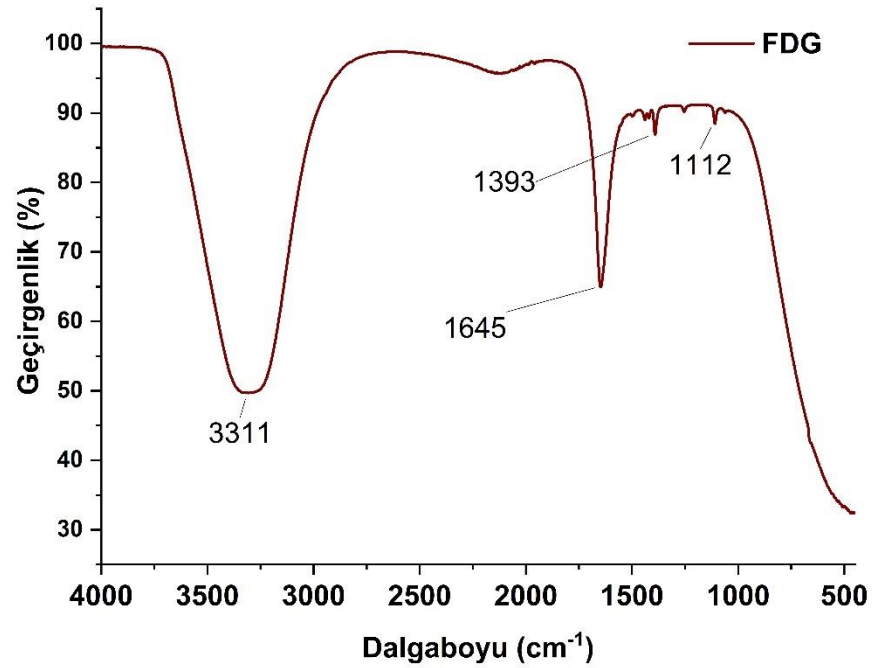
Şekil 4.9'a bakıldığında C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG nanokojugatlarının FTIR analiz sonuçlarını göstermektedir. 573 cm⁻¹ bandında Fe-O bağları

gözlemlenmiştir. 1077 cm^{-1} civarında Si-O bağları, 1649 cm^{-1} civarında C=C gerilmesi, 2850 cm^{-1} civarı C-H gerilmeleri ve 2918 cm^{-1} civarı PEG yüzey kaplamasından gelen -OH piklerini göstermektedir (Sigma-Aldrich, 2019; Glaser, 2010).



Şekil 4.10 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG'nin FTIR spektrumu

Şekil 4.10 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanokongugatına ait FTIR analiz spektrumunu göstermektedir. Spektrumda, 3347 cm^{-1} ve 3144 cm^{-1} 'de O-H gerilme titreşimleri görülmüş, 1648 cm^{-1} 'de C=O karbonil gruplarının varlığı ve 1033 cm^{-1} 'de C-O titreşimleri gözlemlenmiştir. Bu pikler, PEG yüzey modifikasyonunun ve FDG'nin yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Ayrıca, 634 cm^{-1} 'de Fe-O gerilme titreşimleri de gözlenmiştir. 1297 cm^{-1} ve 1170 cm^{-1} 'deki O-H ve C-O-H gerilme titreşimlerinin varlığı, PEG ile modifikasyonun başarıyla gerçekleştiğini ve bu sayede nanoparçacıkların biyouyumluluğunun ve çözünürlüğünün artırıldığını doğrulamaktadır (Wu et al., 2014; Zahir et al., 2019).



Şekil 4.11 FDG'nin FTIR spektrumu

Şekil 4.11'de FDG'ye ait FTIR sonucu görülmektedir. Bu sonuca göre FDG'ye ait bu FT-IR spektrumu, molekülün temel fonksiyonel gruplarını doğrulayan karakteristik zirveler içermektedir. 3311 cm^{-1} dalga boyunda görülen geniş bant, FDG molekülündeki hidroksil (O-H) gruplarına ait gerilme titreşimlerini temsil etmektedir. Spektrumda 1645 cm^{-1} 'de belirgin bir zirve, FDG'nin yapısında bulunan karbonil (C=O) gruplarının gerilme titreşimlerini göstermektedir. Karbonil grupları, genellikle FDG'nin glukoz türevi yapısını doğrulamak ve yüzey modifikasyonlarını değerlendirmek için önemli bir göstergedir. Bu gruplar, aynı zamanda molekülün kimyasal reaktivitesinde de kilit bir rol oynar (Yasakcı et al., 2018). 1393 cm^{-1} dalga boyundaki zirve, FDG'nin yapısındaki C-H bağlarının gerilme titreşimlerini yansıtır. 1112 cm^{-1} 'deki zirve ise, C-O bağlarının titreşimlerini temsil eder ve FDG'nin glukoz türevine özgü bir özelliği olarak dikkat çeker (Zahir et al., 2019).

Hidroksil, karbonil ve karbon-oksijen bağlarının titreşim bantlarının varlığı, FDG'nin biyomedikal uygulamalara uygun yapısını destekler niteliktedir. Ayrıca, bu spektrum, FDG'nin yüzey modifikasyonu gibi işlemlere uygun bir molekül olduğunu göstermektedir. Spektrumdaki zirveler, literatürdeki benzer çalışmalarla

uyumlu olarak FDG'nin yapısal bütünlüğünü doğrulamaktadır (Wu et al., 2014; Zahir et al., 2019).

4.5.2 Hidrodinamik Çap ve Zeta Potansiyel Analiz Sonuçları

Nanoparçacıkların hidrodinamik çapları, farklı yüzey modifikasyonları sonrasında önemli ölçüde değişiklik göstermiştir. Sentezlenen nanokonjugatların distile su içerisinde ölçülen hidrodinamik çapları ve zeta potansiyel sonuçları Çizelge 4.2'de verilmiştir. C-Fe₃O₄ nanoparçacıkları, homojen parçacık boyutu dağılım eğrileri ve oldukça düşük bir polidispersite indeksine (PDI=0.081) sahiptir. Ortalama hidrodinamik boyutlar, C-Fe₃O₄ için 263.2 nm ve C-Fe₃O₄-SiO₂ için 162.6 nm olarak ölçülmüştür. C-Fe₃O₄'dan C-Fe₃O₄-SiO₂'ye çapın azalması, büyük olasılıkla C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının yüzeyine yerleşen silika moleküllerinin yüzey yükünden kaynaklanmaktadır. Bu yüzey yükü, nanoparçacıkların su ortamında kümeleşmesini azaltarak kolloidal yapıyı korumasını sağlamaktadır. Bu durum literatürde, silika kaplamanın nanoparçacık boyutlarını kontrol etmekte etkili olduğu bulgularıyla paralellik göstermektedir (Yasakci et al., 2018; Dutta et al., 2019).

Çizelge 4.2 Sentezlenen nanokonjugatların hidrodinamik çapları (d. nm) (n=3) ve zeta potansiyel sonuçları

Nanokonjugatlar	Hidrodinamik çap (d. nm) (n=3)	Ort. zeta potansiyel (mV)
C-Fe ₃ O ₄	263.2±8	+3.44±1.0
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	162.6±4	-19.1±0.6
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂	163.2±5	-36.0±0.7
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG	256.1±9	-20.4±1.2
C-Fe ₃ O ₄ -PEG-[¹⁹ F]FDG	314.0±4	-24.0±0.3
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -FDG	321.0±7	+2.8 ±0.6

Amin gruplarının yüzeye eklenmesiyle (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂) çap hafif bir artış göstermiş ve 163.2 ± 5 nm olmuştur. Bu artış, amin gruplarının kimyasal bağlanması sırasında nanoparçacık yüzeyinde minimal bir genişlemeye neden olduğunu göstermektedir. PEG molekülleriyle yapılan modifikasyon (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG), hidrodinamik çapta belirgin bir artışa yol açarak 256.1 ± 9 nm

değerine ulaşmıştır. PEGleme, nanoparçacıkların biyouyumluluğunu artırmanın yanı sıra çözünürlüklerini de önemli ölçüde artırmaktadır (Zahir et al., 2019).

FDG'nin yüzeye eklenmesi, boyutun daha da artmasına neden olmuştur. C-Fe₃O₄-PEG-FDG nanoparçacıklarının çapı 314.0 ± 4 nm olarak ölçülmüş, bu da FDG'nin büyük ve polar yapısının yüzeyde yer kapladığını göstermektedir. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar ise 321.0 ± 7 nm ile en büyük hidrodinamik çapa sahip olmuştur. Bu durum, silika kaplama, amin grupları ve FDG'nin birleşiminin yüzeyde birikime yol açtığını göstermektedir. Bu bulgular, FDG'nin nanoparçacık yüzeyindeki fonksiyonel gruplarla güçlü bir şekilde bağlandığını doğrulamaktadır (Yasakcı et al., 2018).

C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının zeta potansiyel değeri $+3.44 \pm 1.0$ mV iken, PEGleme ve FDG modifikasyonu yapılan C-Fe₃O₄ nanoparçacıkları için daha yüksek negatif değerler, sırasıyla -20.4 ± 1.2 mV ve -24.0 ± 0.3 mV elde edilmiştir. Yüzey modifikasyonlarının negatif yükle sonuçlanması, süspansiyonda kolloidal stabiliteyi ve dağılımı artırmıştır. Literatürdeki veriler de negatif yüklü bileşiklerin daha yüksek hücre afinitesine sahip olduğunu göstermektedir (Shagholani et al., 2015; Cheng ve Zheng, 2014).

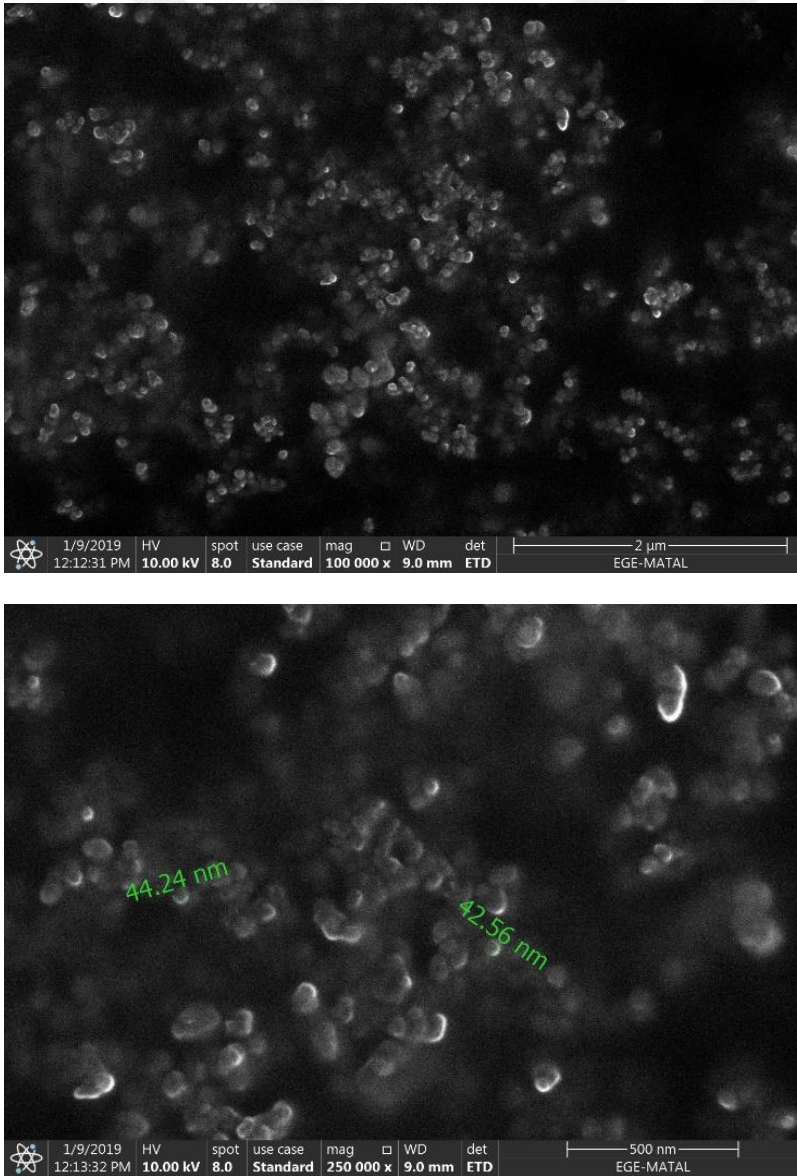
C-Fe₃O₄-SiO₂ için zeta potansiyel değeri -19.1 mV olarak ölçülürken, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂ için bu değer -36.0 mV olarak bulunmuştur. Yapıya NH₂ gruplarının dahil edilmesi, zeta potansiyelini pozitif değerlere kaydırması beklenirken, yüzeydeki NH₂ gruplarının dağılımı ve yoğunluğu bu değeri etkileyebilmektedir. NH₂ gruplarının düşük yüzey yoğunluğu veya heterojen dağılımı, SiO₂ yüzeyinin doğal negatif yükünün baskın olmasına neden olabilir.

Bondarenko ve çalışma arkadaşları, APTES ile modifiye edilen Fe₃O₄ nanoparçacıklarının zeta potansiyelinin, yüzeydeki OH gruplarının varlığına ve modifikasyon sürecinin koşullarına bağlı olarak negatif değerlere kaydığını göstermiştir. Özellikle, silanol gruplarının deprotonasyonu ve NH₂ gruplarının hidrojen bağı oluşturması, pH'a bağlı olarak bu sonuçlarda etkili olmuştur. Düşük pH'da (<7), NH₂ grupları protonlanarak (NH₃⁺) pozitif yük taşıırken, yüksek pH'da (>7) silanol grupları deprotonlanarak negatif yük (Si-O⁻) oluşturur. Bu durum,

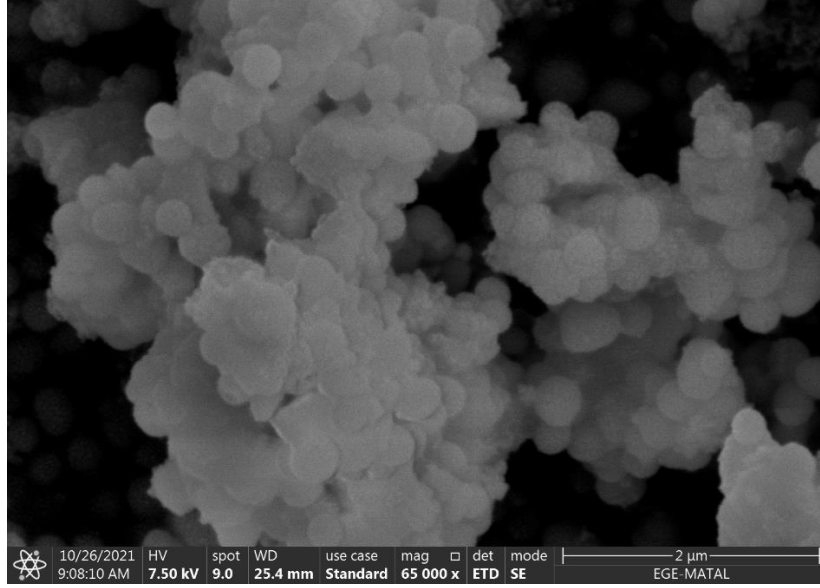
APTES modifikasyonunun her zaman pozitif zeta potansiyeli ile sonuçlanmadığını ve yüzeydeki kimyasal heterojenliğin önemini vurgulamaktadır (Bondarenko et al., 2021).

4.5.3 SEM analiz sonuçları

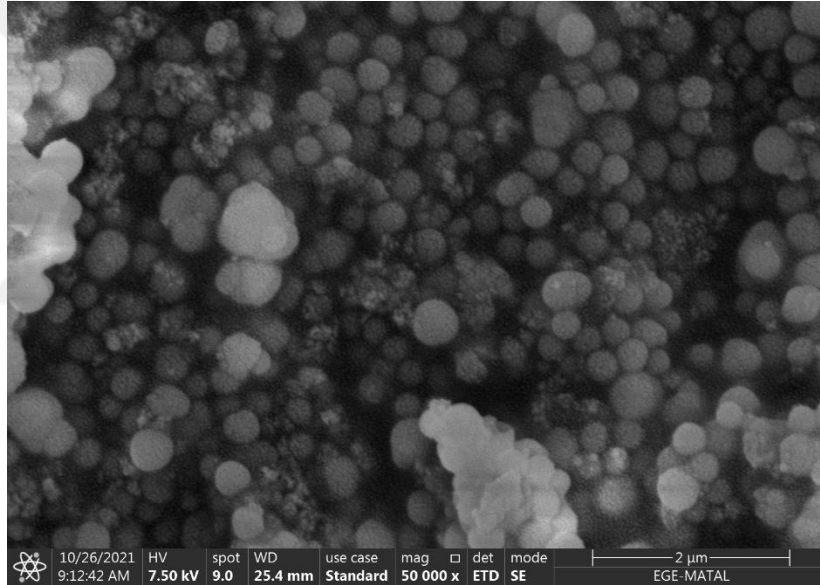
Şekil 4.12 C-Fe₃O₄ nanoparçacıklara ait SEM analiz sonuçlarını göstermektedir. SEM görüntülerine göre, nanoparçacık kümelerinin tamamı küresel yapıdadır ve ortalama parçacık boyutu 60.12 ± 28 nm olarak ölçülmüştür. Silika kaplama uygulanmış nanoparçacıklar (C-Fe₃O₄-SiO₂) için ise bu değer 66.41 ± 10 nm'ye yükselmiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.12 C-Fe₃O₄ nanoparçacıkların SEM görüntüsü



Şekil 4.13 C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıkların SEM görüntüsü

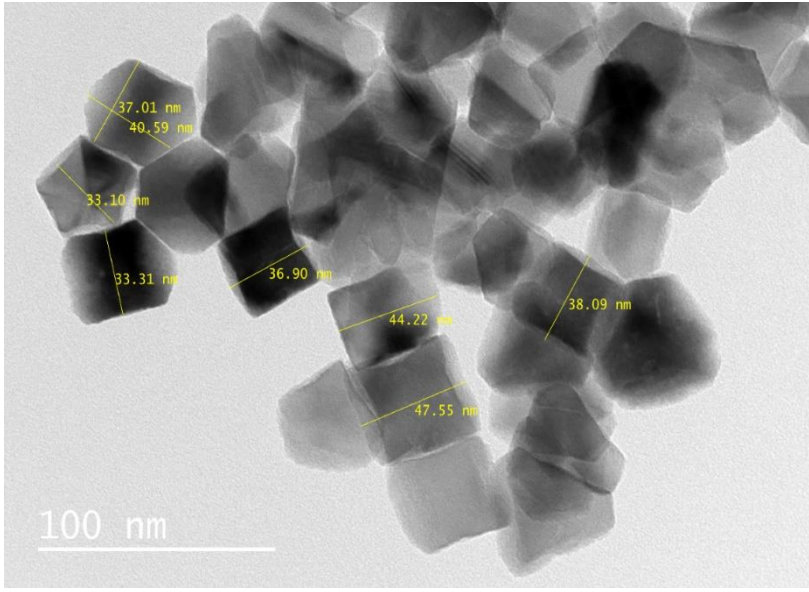


Şekil 4.14 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların SEM görüntüsü

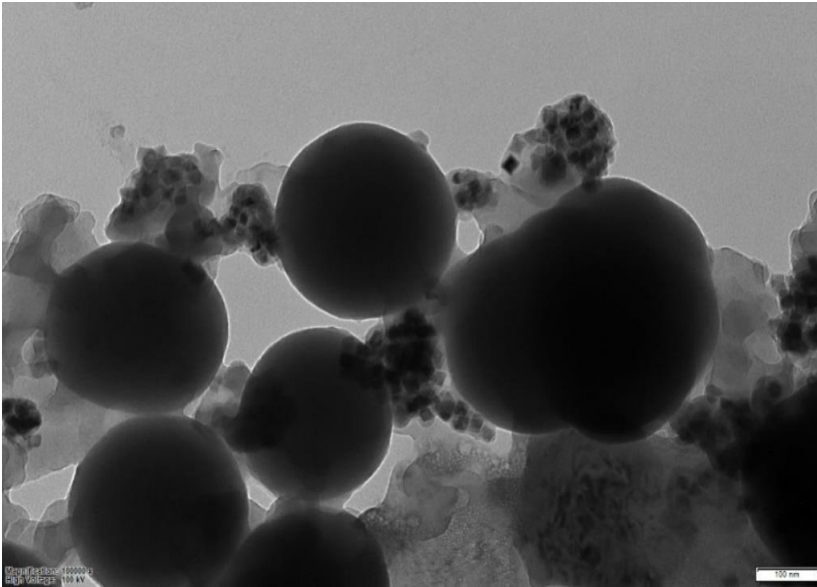
Şekil 4.14 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklarına ait SEM analiz görüntüsünü sunmaktadır. Analiz sonuçlarına göre, C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkları için ortalama parçacık boyutu 303.20 ± 5.0 nm olarak ölçülmüştür. Bu boyut artışı, PEG yüzey modifikasyonu sonrasında beklenen bir sonuçtur. Elde edilen veriler, yüzey modifikasyonlarının nanoparçacıkların boyutlarını anlamlı bir şekilde artırdığını ortaya koymaktadır. Bu tür modifikasyonlar, nanoparçacıkların biyomedikal uygulamalarda kullanılabilirliğini artırarak biyoyumluluk, stabilite ve çözünürlük gibi özelliklerin geliştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır.

4.5.4 TEM görüntü analiz sonuçları

Şekil 4.15 net kenarlara ve yaklaşık 30–50 nm arasında değişen ortalama boyutlara sahip, homojen bir şekilde dağılmış kristal yapıları C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının TEM görüntüsünü göstermektedir. Bu görüntüdeki C-Fe₃O₄ nanoparçacıkları, TEM analizine göre tekdüze homojen kübik kristal yapıya sahip olup literatürle uyumlu bulunmuştur (Subramanian et al., 2016; Martinez-Boubeta et al., 2013).

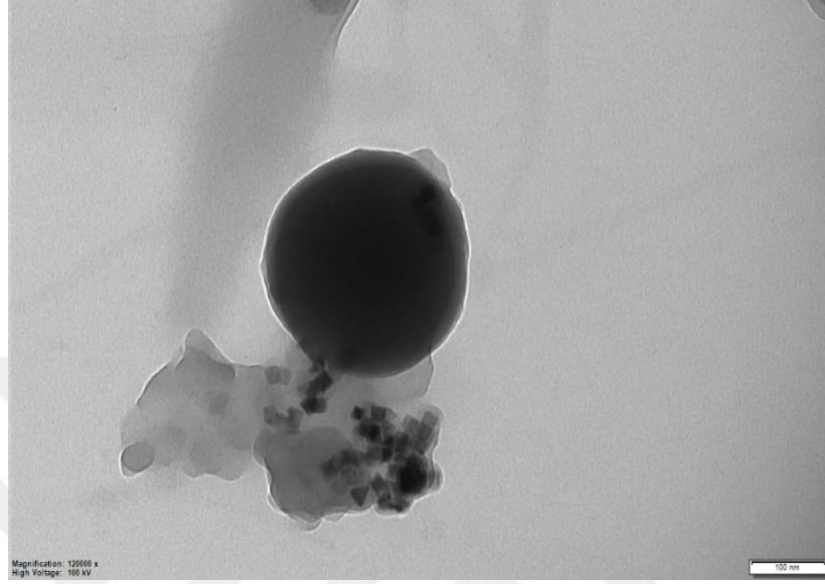


Şekil 4.15 C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının TEM görüntüsü



Şekil 4.16 C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıklarının TEM görüntüsü

Şekil 4.16, daha büyük bir toplam boyuta (~200 nm) sahip, kümeleşmiş küresel yapılar göstermektedir. Bu görüntü, nanoparçacıkların bir araya gelerek küme oluşturduğunu ve bu durumun sentez sırasında parçacıkların birikmesiyle ilişkili olabileceğini göstermektedir.

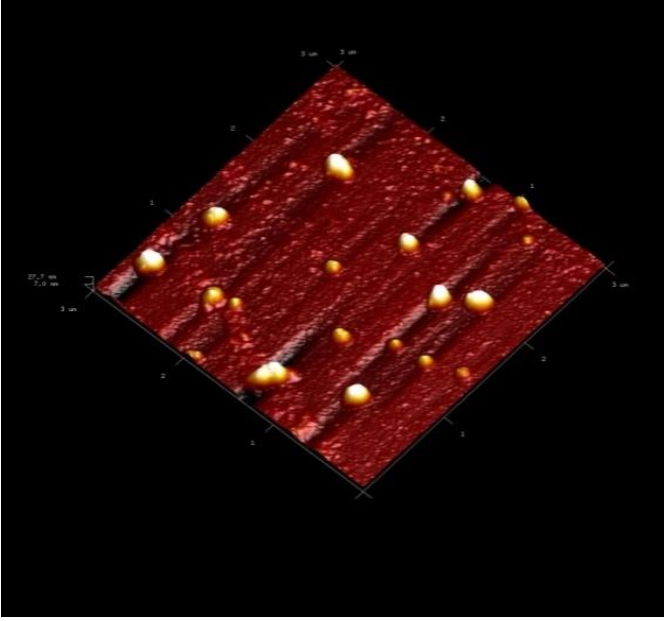


Şekil 4.17 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların TEM görüntüsü

Şekil 4.17, bir büyük küresel parçacık ile daha küçük kümeleşmiş parçacıkları yan yana göstermektedir. Bu görüntü, numunede boyut dağılımı ve heterojenlik olabileceğini işaret etmektedir. Özellikle yüzey modifikasyonları ve sentez parametrelerindeki farklılıklar, bu çeşitliliğe neden olmaktadır. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklarında, yüzey modifikasyonlarının boyutu hafifçe artırdığı ve ortalama boyutun 142.04 ± 3.0 nm'ye ulaştığı görülmüştür. Yüzey kaplamaları nedeniyle kübik nanoparçacıkların yüzey tabakaları içinde sıkıştığı TEM görüntülerinde açıkça görülmektedir. Bu görüntüler, parçacıkların boyut, şekil ve kümeleşme davranışlarındaki değişimlerin büyük ölçüde sentez koşulları veya yüzey modifikasyonlarından kaynaklandığını göstermektedir.

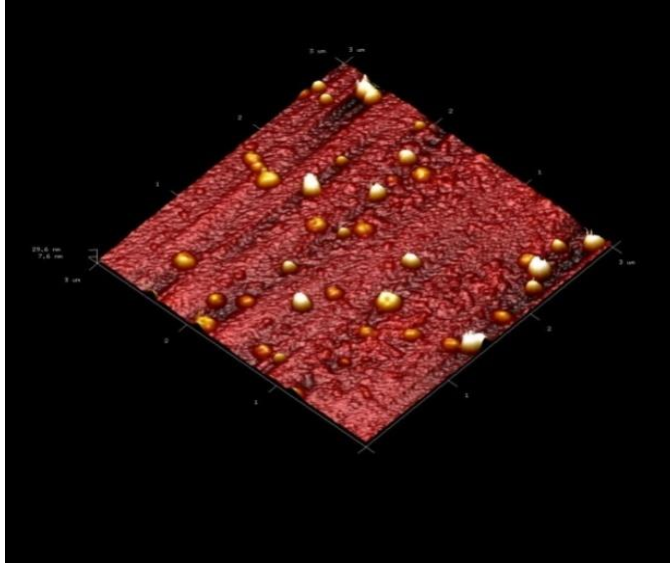
4.5.5 SPM görüntü analiz sonuçları

Şekil 4.18 C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının SPM yöntemiyle elde edilen üç boyutlu yüzey topografisi, parçacıkların yüzeydeki heterojen dağılımını ve morfolojisini detaylı bir şekilde ortaya koymaktadır. C-Fe₃O₄ nanoparçacıklar, genel yapısı oldukça düzgün bir profile sahiptir ve yüzey topografyasındaki bu düzen, parçacıkların sentez sürecinin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermektedir.



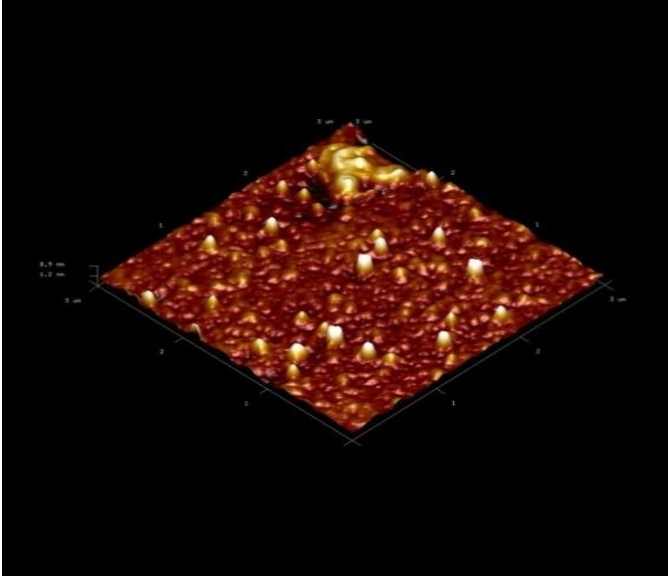
Şekil 4.18 C-Fe₃O₄ nanoparçacıkların SPM görüntüsü

Yükseklik ölçeği, nanoparçacıkların boyutlarının nanometre seviyesinde olduğunu (maksimum ~27,7 nm) ve yüzeyde belirgin çıkıntılar oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum, parçacıkların birbirinden bağımsız bir şekilde dağıldığını ve agregasyon yapmadığını ortaya koymaktadır. Nanoparçacıkların bu şekilde tekil ve düzenli bir dağılım göstermesi, manyetik özelliklerin optimize edilmesi ve biyomedikal uygulamalarda hedefleme gibi potansiyel kullanım alanları için büyük bir avantaj sağlamaktadır.



Şekil 4.19 C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıkların SPM görüntüsü

Şekil 4.19 C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıkların SPM yüzey görüntüsünü göstermektedir. Yüzey topografyası, SiO₂ kaplamasının parçacıkların agregasyonunu azaltarak daha dengeli bir dağılım sağladığını ortaya koymaktadır. Bu düzenli dağılım, kaplama işleminin başarılı olduğunu ve parçacıkların yüzeyle etkili bir şekilde bağlandığını göstermektedir. C-Fe₃O₄ nanoparçacıklarının görüntüsü ile karşılaştırıldığında, C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıkları daha düşük tepe yüksekliğine (maksimum ~23,4 nm) ve daha homojen bir yüzey dağılımına sahiptir. SiO₂ kaplaması, nanoparçacıklar arasındaki yüzey etkileşimlerini düzenleyerek daha tutarlı bir morfoloji sağlamıştır. Bu durum, SiO₂ kaplamasının yüzey stabilitesini artırdığını ve nanoparçacıkların homojen kaplamalarını kolaylaştırdığını göstermektedir.



Şekil 4.20 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların SPM görüntüsü

Şekil 4.20 C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklarının SPM görüntüsünü göstermektedir. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklar, C-Fe₃O₄ ve C-Fe₃O₄-SiO₂ nanoparçacıklarına kıyasla yüzey topografisinde daha karmaşık ve homojen bir yapı sergilemektedir. Görüntüde, yüzeydeki parçacıkların daha küçük boyutlara sahip olduğu ve oldukça düzenli bir şekilde dağıldığı dikkat çekmektedir. Bu, PEG ve FDG molekülleri ile yapılan modifikasyonun, yüzeyde daha homojen bir kaplama sağlayarak nanoparçacıklar arasındaki agregasyonu önemli ölçüde azalttığını göstermektedir. Ayrıca, maksimum yükseklik değerinin (~8,7 nm) azalması, yüzey modifikasyonunun topografik farklılıkları düzelttiğini ve parçacıkların daha stabil bir yapıya ulaştığını ortaya koymaktadır.

Çizelge 4.3 C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂ ve C) C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların Taramalı Uç Mikroskobu (SPM) yüzey alan ve R_{max} değerleri tablosu

Nanokonjugat	Yüzey alanı (µm ²)	R _{max} (nm)
C-Fe ₃ O ₄	9,05	27,7
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	9,13	23,4
C-Fe ₃ O ₄ -SiO ₂ -NH ₂ -PEG-FDG	9,20	8,7

Çizelge 4.3'teki verilere göre, C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklarının yüzey alanı artarken, maksimum yükseklik (R_{max})

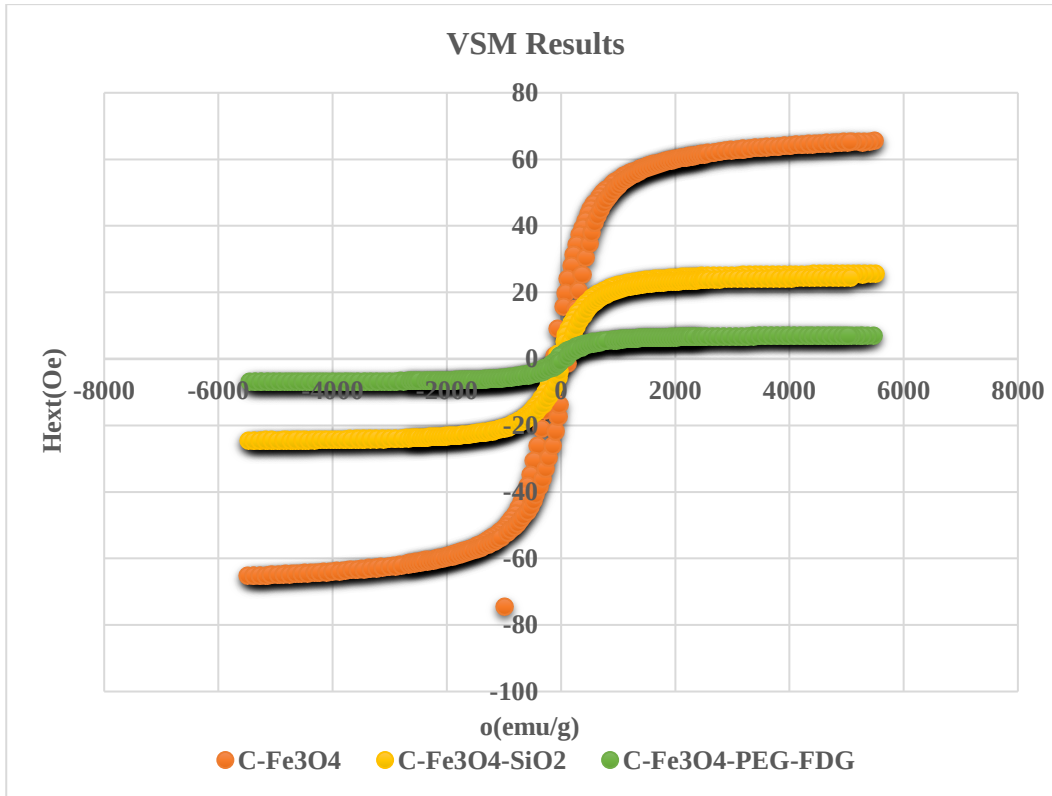
değerleri, her bir yüzey modifikasyonu ile kademeli bir azalış göstermektedir. Yüzey alanı, C-Fe₃O₄ için 9,05 μm^2 iken, SiO₂ kaplaması ile 9,13 μm^2 'ye, PEG ve FDG modifikasyonu ile 9,20 μm^2 'ye yükselmiştir.

Kaplama ve modifikasyonlarla birlikte, yüzeydeki maksimum yükseklik (R_{max}) azalırken, daha homojen bir yüzey olduğu gözlemlenmiştir. C-Fe₃O₄'deki yüksek R_{max} , parçacıkların düzensiz ve büyük çıkıntılara sahip olduğunu işaret ederken, C-Fe₃O₄-SiO₂ ile bu yüzey pürüzlülüğü azalmıştır. Son modifikasyon olan C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG, yüzeydeki en düşük R_{max} değeri ile en homojen yüzey yapısını sağlamıştır. Bu, PEG ve FDG modifikasyonlarının yüzeyde stabilite ve düzen oluşturduğunu göstermektedir.

4.5.6 VSM analiz sonuçları

Kübik nanoparçacıkların ve türevlerinin manyetik özellikleri, VSM analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. C-Fe₃O₄, C-Fe₃O₄-SiO₂ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıklara ait VSM analiz sonuçları Şekil 4.21'de verilmiştir. Bu numunelerden sırasıyla 37 mg, 38 mg ve 7,5 mg ağırlığında örnekler tartılarak ölçüm yapılmıştır. Manyetik doygunluk değerleri, her bir numune için emu/g cinsinden hesaplanmıştır.

C-Fe₃O₄ için manyetik doygunluk değeri, yaklaşık 60 emu/g olarak kaydedilmiştir ve bu değer turuncu renk ile temsil edilmiştir. Silika ile kaplama sonrasında (C-Fe₃O₄-SiO₂) manyetik doygunluk yaklaşık 25 emu/g seviyesine düşmüştür. Yüzeyin PEG ve FDG ile modifikasyonu (C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG) ise manyetik doygunluğun daha da azalmasına neden olmuş ve yaklaşık 10 emu/g değerine ulaşmıştır. Bu sonuçlar, yüzey modifikasyonlarının manyetik özellikler üzerinde önemli bir etkisi olduğunu ortaya koymaktadır (Pourmiri et al., 2019; Wang et al., 2010).



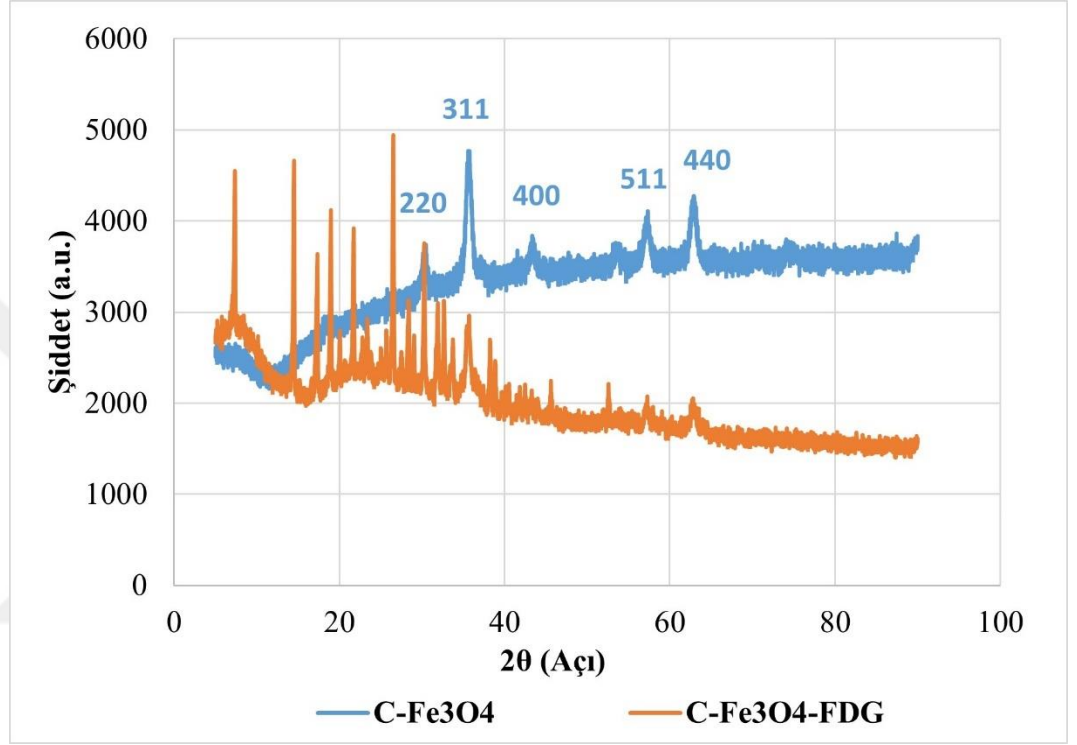
Şekil 4.21 VSM analiz sonuçları

Elde edilen veriler, yüzey modifikasyonlarının manyetik doygunluğu azalttığını ve bu durumun, yüzeyde kullanılan kaplama materyallerinin manyetik çekirdeği kısmen izole etmesiyle ilişkili olduğunu göstermektedir. Bu analizler, nanoparçacıkların manyetik özelliklerini optimize etme ve biyomedikal uygulamalardaki potansiyellerini değerlendirme açısından kritik bilgiler sunmaktadır.

4.5.7 XRD analiz sonuçları

Şekil 4.22 C-Fe₃O₄ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların XRD sonuçlarını göstermektedir. C-Fe₃O₄'e ait altı karakteristik pik sırasıyla (220), (311), (400), (422), (511) ve (440) indisleriyle belirtilmiştir. Bununla birlikte, her iki numune için (210), (211) ve (311) konumlarında görülen üç ek pik oldukça benzerdir. Bu durum, Fe₃O₄'ün spinel fazına bağlanmakta olup, literatüre göre Fe₃O₄ nanoparçacıklarının kübik bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir (Shagholani et., 2015; Ruíz-Baltazar et., 2015).

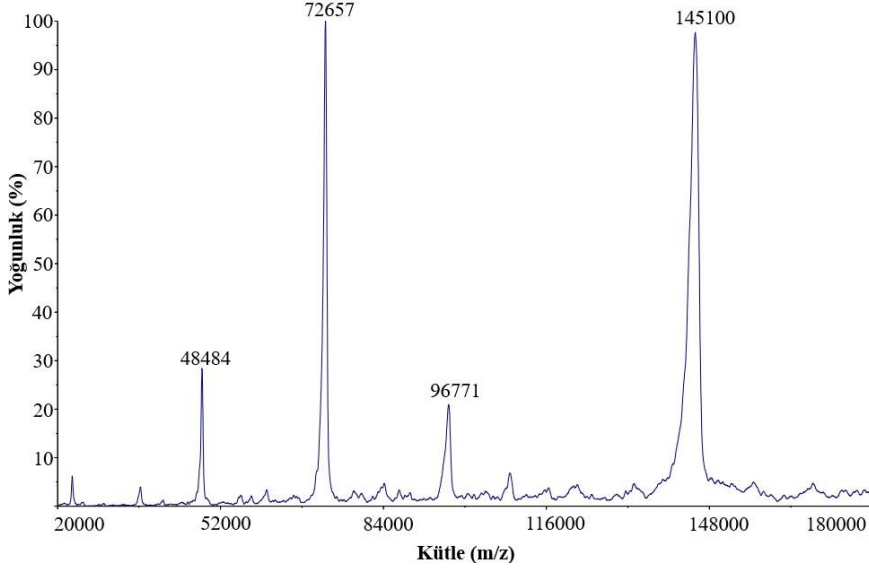
C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanokonjugatının XRD spektrumunda, yüzey modifikasyonlarının C-Fe₃O₄ yapısını etkilemediği gözlemlenmiştir. Bunun yanı sıra, FDG ile modifiye edilmiş nanoparçacıkların analiz sonuçlarında PEG pikleri ağırlıklı olarak görülmüştür. Bu bulgular, literatürdeki diğer çalışmalarla uyumlu olup, yüzey modifikasyonlarının yapısal özellikleri koruduğunu ve Fe₃O₄'ün temel kristal yapısının değişmediğini göstermektedir (Jayaramudu et al., 2015).



4.22 C-Fe₃O₄ ve C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-PEG-FDG nanoparçacıkların XRD sonuçları

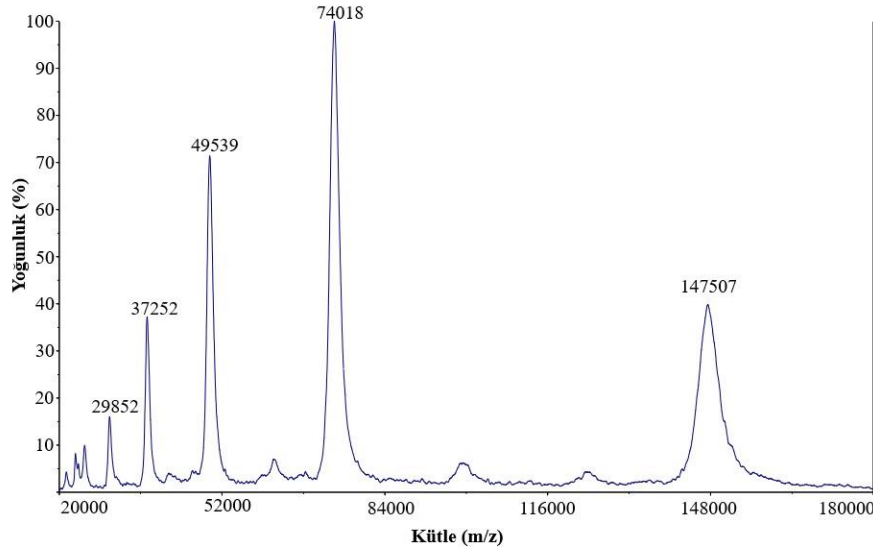
4.5.8 MALDI TOF/TOF analiz sonuçları

Şekil 4.23 Trastuzumab antikoruna ait MALDI TOF/TOF analiz sonucunu göstermektedir. 145,100 m/z'deki ana pik, Trastuzumab'ın ana molekül ağırlığını temsil etmektedir. Bu, literatürde belirtildiği gibi, Trastuzumab'ın moleküler ağırlığına (yaklaşık 145 kDa) uygun bir değerdir (Leavy, 2010). 48,484 m/z gibi daha küçük m/z değerlerinde görülen diğer pikler, muhtemelen molekülün iyonize olmuş parçalarına veya matris etkisiyle ortaya çıkan olası fragmanlara işaret etmektedir. Maksimum pik yüksekliği, bu molekülün en bol bulunan iyonize formunu temsil etmektedir. Trastuzumab'ın yapısal bütünlüğü bu spektrumda korunmuş görünmektedir.



Şekil 4.23 Trastuzumab'a ait MALDI TOF/TOF analiz sonucu

Şekil 4.24 Trastuzumab'a p-SCN-Bn-DOTA molekülünün bağlanması ardından elde edilen kütle spektrumunu göstermektedir. Ana pik (147,507 m/z), DOTA bağlanmış Trastuzumab'ın moleküler ağırlığını temsil etmektedir. DOTA modifikasyonu sonrasında molekül ağırlığında belirgin bir artış meydana gelmiştir, bu da DOTA'nın moleküle başarıyla bağlandığını göstermektedir (Brechbiel, 2008). 74,018 m/z gibi daha küçük pikler, muhtemelen modifiye edilmiş molekülün parçalanmış halleri veya DOTA'nın bağlı olduğu daha küçük protein parçalarına işaret etmektedir. DOTA-Tras konjugasyonunda, ana pik pozisyonundaki kayma (145,100 m/z'den 147,507 m/z'ye) modifikasyonun başarılı olduğunu ve DOTA'nın antikora kovalent olarak bağlandığını doğrulamaktadır. Bu, literatürdeki DOTA modifikasyonlarıyla uyumludur (Cheng et al., 2014). Trastuzumab'ın DOTA ile konjugasyonu sırasında protein yapısının genel bütünlüğünün korunduğu, her iki spektrumda da yüksek çözünürlüklü ana piklerin varlığı ile desteklenmektedir. DOTA modifikasyonu, nanoparçacıkların radyoışaretleme potansiyelini artırabilir ve bu, özellikle hedefe yönelik tedavilerde (örneğin, Lu-177 ile) kullanım için önemli bir avantaj sağlar (Brechbiel, 2008).

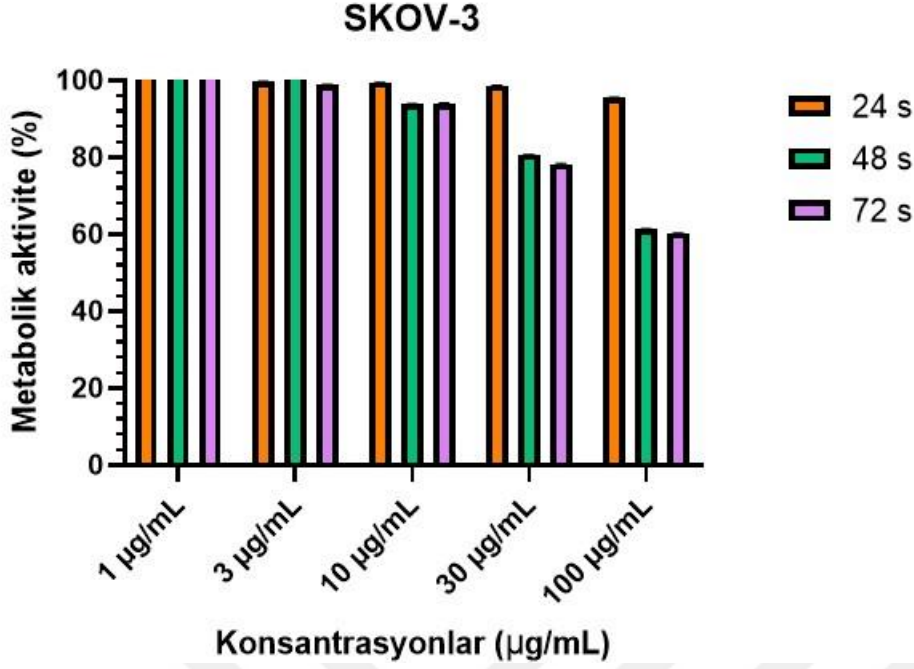


Şekil 4.24 DOTA-Trastuzumab'a ait MALDI TOF/TOF analiz sonucu

4.6 *In Vitro* Çalışma Sonuçları

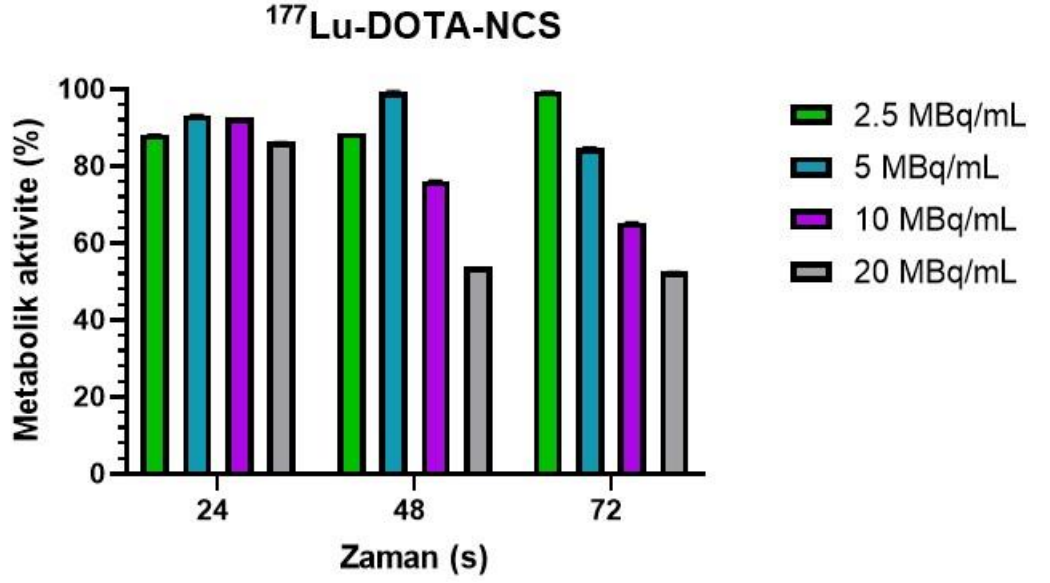
4.6.1 Sitotoksosite Sonuçları

Sitotoksosite çalışmalarında, radyoişaretleli olmayan C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG ve radyoişaretleli ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının hücre kültür ortamındaki etkinliği HER2 reseptör pozitif SKOV-3 yumurtalık (adenokarsinom), triple pozitif insan meme kanseri BT474 ve triple negatif MDA MB231 meme kanseri (adenokarsinom) hücreleri kullanılarak ayrı ayrı incelenmiştir. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının sitotoksosite çalışması 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL, 100 µg/mL konsantrasyonlarda C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacık çözeltileri hazırlanarak üç tekrarlı olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat zaman parametreleri denererek gerçekleştirilmiştir. Radyoaktif sitotoksosite çalışması ise 2,5 MBq/mL, 5 MBq/mL, 10 MBq/mL ve 20 MBq/mL konsantrasyonlarda ¹⁷⁷Lu-DOTA ve ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacık çözeltileri hazırlanarak üç tekrarlı olacak şekilde 24, 48 ve 72 saat zaman parametreleri denererek gerçekleştirilmiştir. Her üç hücre hattı üzerinde ¹⁷⁷Lu-DOTA bileşiğinin sitotoksik etkisi ile ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının sitotoksik etkisinin kıyaslanması metabolik aktivitedeki kayda değer düşüşün radyasyon ve nanoparçacık kombinasyonundan kaynaklandığını göstermek açısından önemlidir.

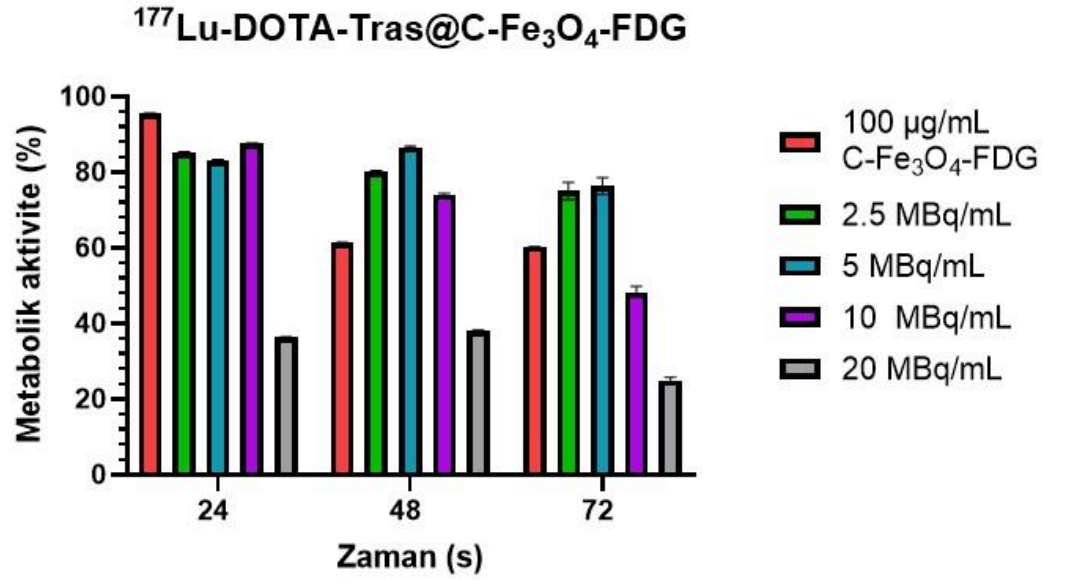


Şekil 4.25 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

Şekil 4.25 radyoaktif olmayan farklı C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacık konsantrasyonlarının SKOV-3 hücre hattı üzerindeki 24 saat, 48 saat ve 72 saatlik muamele sonrası metabolik canlılık yüzdelerini göstermektedir. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar 100 µg/mL konsantrasyonda ve 72 saatlik inkübasyon sonrasında tüm kanser hücrelerinde kayda değer bir toksisite göstermemiştir. SKOV-3 hücreleri için 100 µg/mL C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanokonjugatı kullanıldığında hücre canlılığı %96'dan %60'a düşmüş ve 72 saatlik inkübasyonun ardından metabolik olarak aktif hücrelerin yaklaşık %60'ı varlığını sürdürmüştür. Bu oran diğer hücre hatları için de oldukça benzer bulunmuştur. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının sitotoksik etkisi, 72 saatlik inkübasyon sonucunda BT474 hücreleri için %62, MDA MB231 hücreleri için ise %63 olarak tespit edilmiştir. Tüm konsantrasyonlarda ve aynı koşullar altında metabolik olarak aktif hücre oranı %50'nin üzerinde kalmış ve tüm kanser hücre hatlarında önemli bir zararlı etki gözlenmemiştir.



Şekil 4.26 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA nanoparçacıklarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

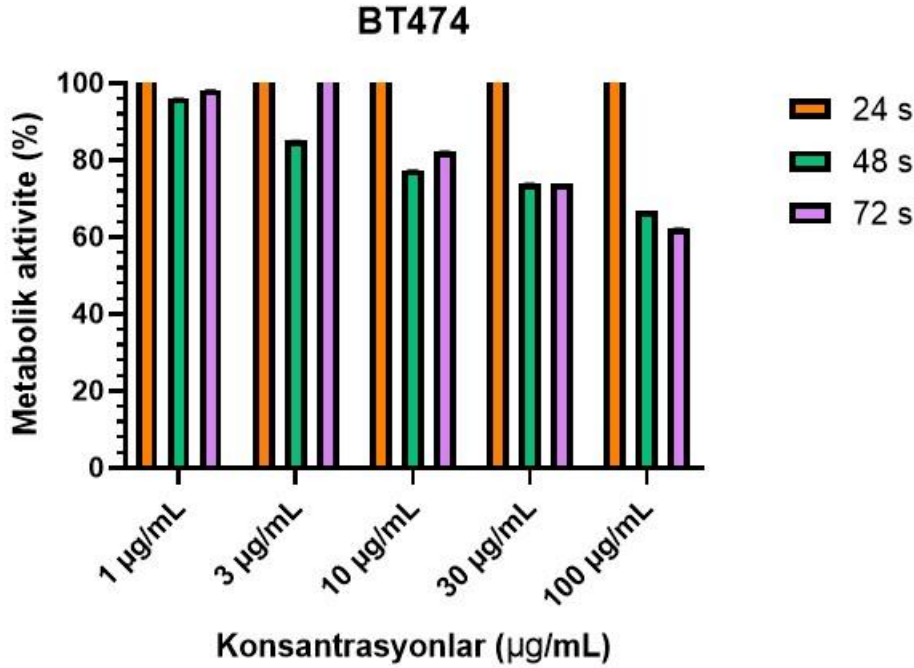


Şekil 4.27 SKOV-3 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin nanoparçacıklarının 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin sitotoksik aktivitesini değerlendirmek amacıyla, MTS testi kullanılarak *in vitro* hücre sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.27). Beklendiği gibi, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar radyoaktivite konsantrasyonuna ve inkübasyon süresine bağlı olarak kanser hücrelerinin metabolik aktivitesinde

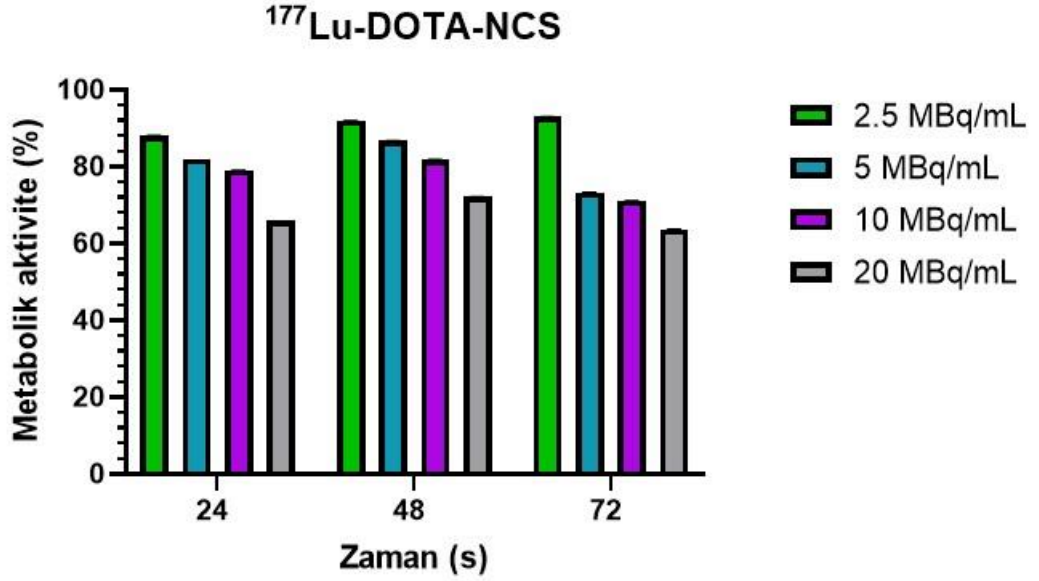
azalmaya neden olmuş; ayrıca ^{177}Lu -DOTA'ya kıyasla daha toksik bulunmuştur. Elde edilen toksisite sonuçları, ^{177}Lu -DOTA'nın SKOV-3 hücreleri için toksik olmadığını göstermiştir (Şekil 4.26).

Ayrıca, 100 $\mu\text{g/mL}$ C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG'nin toksisitesi ile radyoışaretili ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıklarının toksisitesi kıyaslandığında, hücre hasarının ^{177}Lu 'dan yayılan β^- emisyonundan kaynaklandığı çıkarımı yapılabilir. 72 saatlik inkübasyonun ardından, ^{177}Lu -DOTA radyoileşiminin SKOV-3 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisi %52,56 olarak belirlenirken, bu değer ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıkları için %24,97 olarak belirlenmiştir. Ayrıca, 20 MBq/mL konsantrasyonda ^{177}Lu -DOTA-Tras@C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıklar, 24, 48 ve 72 saatlik zaman aralıklarında SKOV-3 hücrelerinin metabolik aktivitesini önemli ölçüde azaltmıştır.

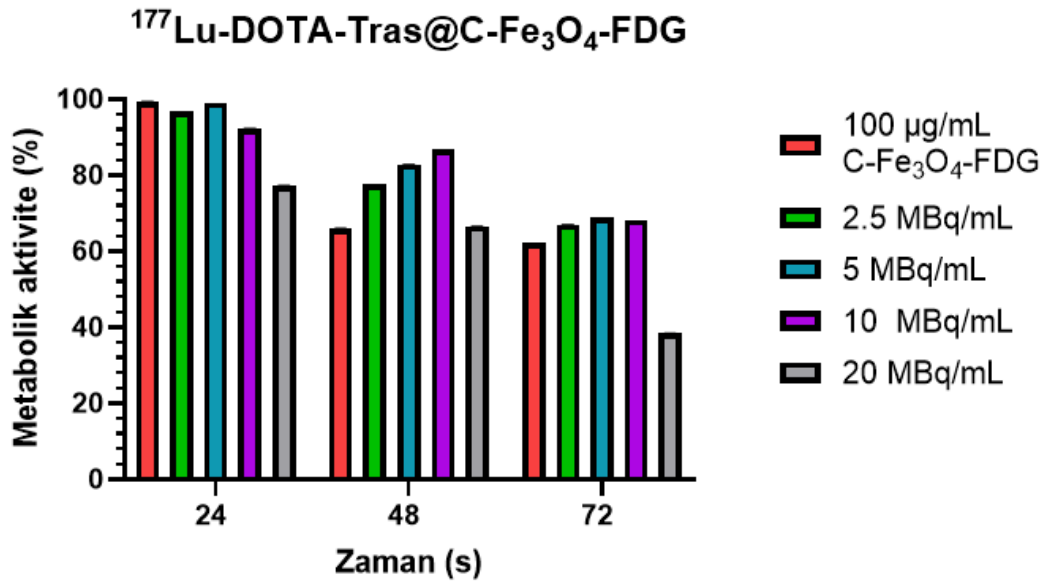


Şekil 4.28 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

Şekil 4.28 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıklarını (%) göstermektedir.



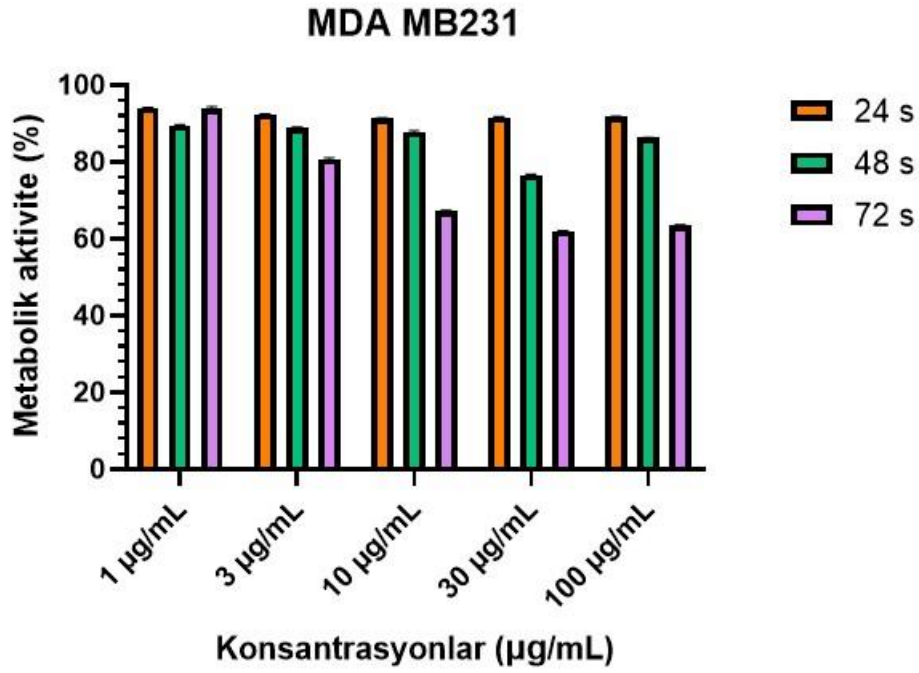
Şekil 4.29 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)



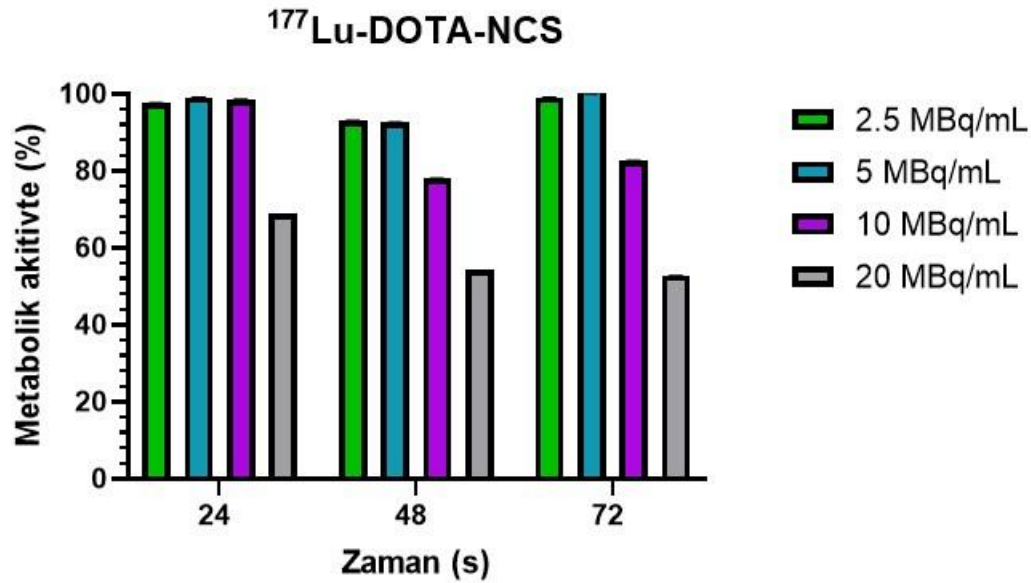
Şekil 4.30 BT474 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

Beklendiği üzere, ^{177}Lu -DOTA, BT474 hücreleri için ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin nanoparçacıklara kıyasla daha az toksik bulunmuştur (Şekil 4.29 ve Şekil 4.30). 72 saatlik inkübasyon sonrasında, metabolik olarak aktif hücre yüzdesi ^{177}Lu -DOTA için %63,74, radyokonjugat için ise %38,42 olarak belirlenmiştir. Elde edilen IC₅₀ dozları, SKOV-3 hücreleri için 9,49 MBq/mL ve

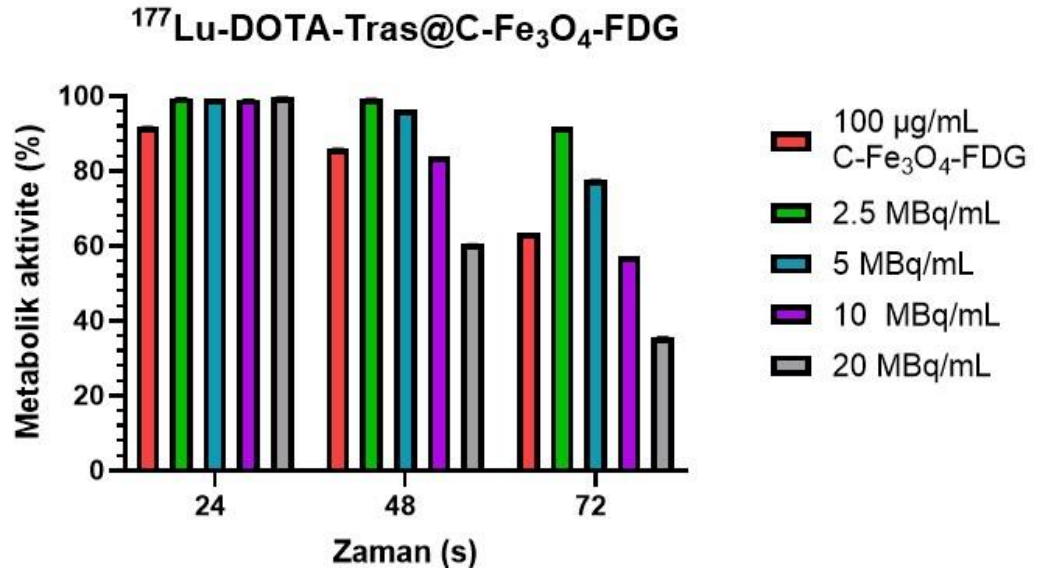
BT474 hücreleri için 21,23 MBq/mL olup, bu değerler MTS testi sonuçları ile uyumludur.



Şekil 4.31 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki C-Fe₃O₄- SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)



Şekil 4.32 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ¹⁷⁷Lu-DOTA'nın 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)



Şekil 4.33 MDA MB231 hücreleri üzerinde farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin nanoparçacıkların 24, 48 ve 72 saatlik inkübasyon sonrası metabolik canlılıkları (%)

MDA MB231 hücreleri için, ^{177}Lu -DOTA ve ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-FDG bileşiklerinin her ikisinde de artan konsantrasyon ve inkübasyon süresiyle birlikte hücre canlılığında azalma gözlenmiştir (Şekil 4.32 ve Şekil 4.33). Ancak, 72 saatlik inkübasyon sonunda metabolik olarak aktif hücre yüzdesi ^{177}Lu -DOTA için %52,75 iken, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar için ise %35,65 olarak tespit edilmiştir. ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkları için hücre canlılığı, SKOV-3, BT474 ve MDA MB231 hücrelerinde 20 MBq/mL konsantrasyonda 72 saat inkübasyon sonrasında %50'nin oldukça altında kalmıştır.

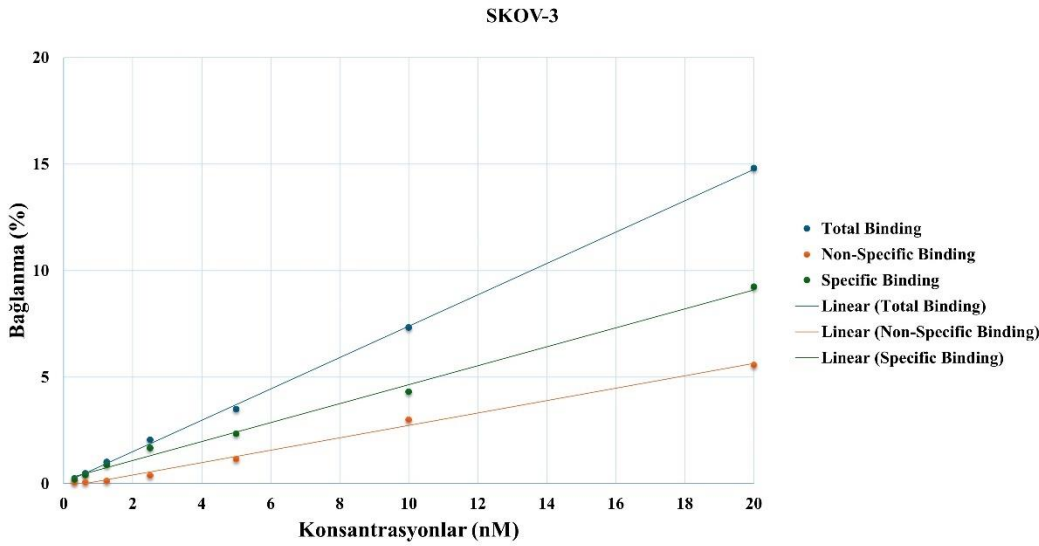
Çizelge 4.4 ^{177}Lu -DOTA radyobileşiği ve ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar için IC50 değerleri (MBq/mL)

^{177}Lu -DOTA-NCS bileşiği için IC50 değerleri (MBq/mL)			
	SKOV-3	BT474	MDA MB231
24 s	42,28±3,0	65,10±4,5	23,58±1,8
48 s	22,40±1,7	55,87±4,0	22,57±1,6
72 s	19,07±1,4	49,48±3,5	20,86±1,5
^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe ₃ O ₄ -FDG nanoparçacıklar için IC50 değerleri (MBq/mL)			
	SKOV-3	BT474	MDA MB231
24 s	17,22±1,5	49,31±3,5	-
48 s	16,94±1,2	35,26±3,0	24,85±2,0
72 s	9,49±0,9	21,23±2,0	12,67±1,1

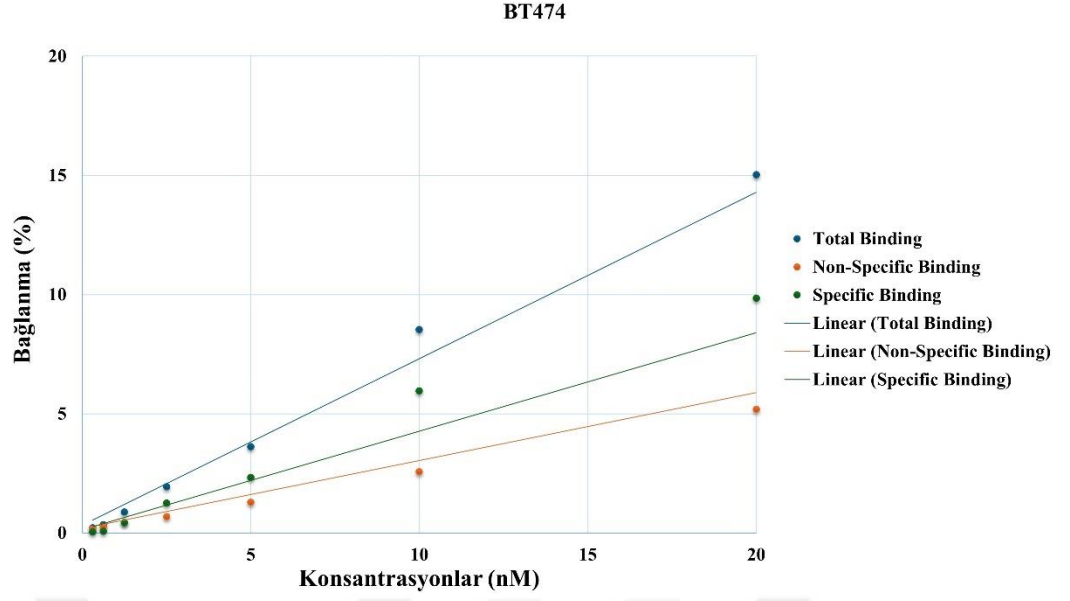
4.6.2 Hücre Bağlanma Sonuçları

Hücre bağlanma deneyi, biyolojik ajanların, özellikle ilaçlar, antikorlar veya nanoparçacıklar gibi moleküllerin, hedef hücrelere bağlanma yeteneğini değerlendirmektedir. Bu deney, moleküllerin belirli hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanma etkinliğini ölçerek, tedavi edici ajanların hedefe yönelik etkinliğini ve hücreler tarafından alınıp alınmadığını belirlemektedir. Ayrıca, hedef hücrelere bağlanma ve internalizasyon arasındaki ilişkiyi inceleyerek tedavi süreçlerinin nasıl işlediğini anlamaya yardımcı olmaktadır.

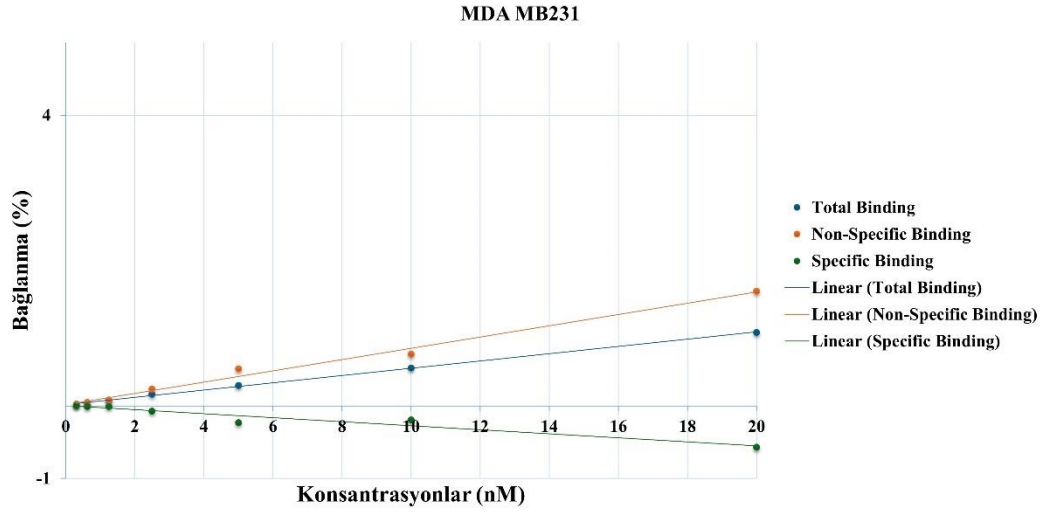
Reseptör afinitesini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen hücre bağlanma deneylerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının reseptör spesifitesi HER2 reseptör pozitif SKOV-3 yumurtalık (adenokarsinom), triple pozitif insan meme kanseri BT474 ve triple negatif MDA MB231 meme kanseri (adenokarsinom) hücreleri kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.34, 4.35 ve 4.36).



Şekil 4.34 SKOV-3 hücrelerinde bağlanma sonuçları (%)



Şekil 4.35 BT474 hücrelerinde bağlanma sonuçları (%)



Şekil 4.36 MDA MB231 hücrelerinde bağlanma sonuçları (%)

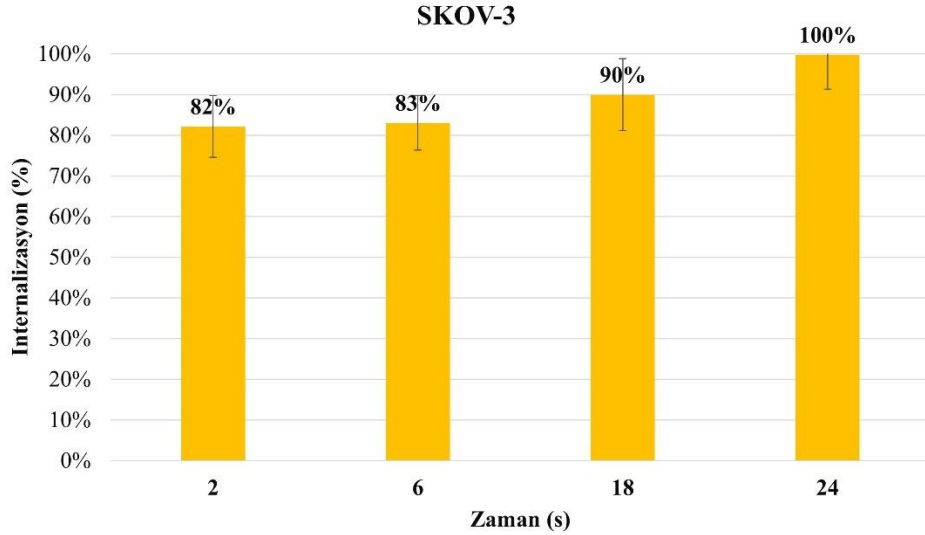
C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının Trastuzumab antikoru ile biyokonjugasyonu, SKOV-3 ve BT474 hücrelerine spesifik bağlanma ve internalizasyon oranını artırmak amacıyla gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, HER2 pozitif hücre hatlarının her ikisinde de bağlanma yüzdesinin konsantrasyona bağlı olarak arttığını ve 100 nM konsantrasyonda SKOV-3 hücreleri için %3,57 ile BT474 hücreleri için %25,07 arasında değiştiğini göstermiştir (Şekil 4.34 ve Şekil 4.35). Negatif hücre hattı (MDA-MB-231) için elde edilen değerler ölçüm

hatalarından bile daha küçüktür (Şekil 4.36). Bu, tespit edilen radyoaktivitenin background düzeyine yakın olmasından kaynaklanmaktadır ve bu durum, MDA-MB-231 hücrelerinde spesifik bağlanma olmadığını doğrulamıştır. Benzer sonuçlar, literatürde MDA-MB-231 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen sonuçlarla uyumludur (Wawrowicz et al., 2022; Żelechowska-Matysiak et al., 2023).

4.6.3 İnternalizasyon Sonuçları

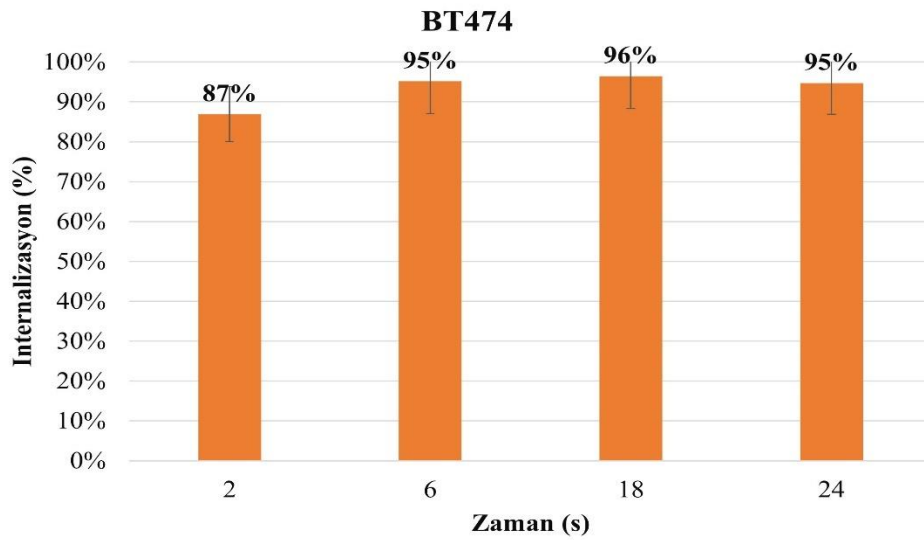
İnternalizasyon deneyi, genellikle bir ilaç, nanoparçacık, biyokonjugat veya biyolojik molekülün hücre zarı tarafından alınıp hücre içine taşınma yeteneğini değerlendirmek için yapılmaktadır. Bu deneyin temel amacı, molekül veya biyokonjugatın belirli bir biyolojik hedefe spesifik olarak bağlanma yeteneğini, hücre içine hangi mekanizma ile alındığını, terapötik ajanların hedef hücrelerde yeterli konsantrasyonda birikip birikmediğini, yalnızca hedef hücrelere özgül olup olmadığını ve en etkin hücre içi alımın hangi zaman ve konsantrasyon aralıklarında gerçekleştiğini değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilmektedir.

Bu çalışmada, $^{177}\text{Lu-DOTA-Tras@C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ nanoparçacıkların transmembran HER2 reseptörlerini tanıyıp bu reseptörlere özel olarak bağlanma yeteneği sayesinde, hücre zarını geçme ve hedef hücrelerin içinde başarılı bir şekilde lokalize olma kapasitesi incelenmiştir. Elde edilen internalizasyon sonuçları, $^{177}\text{Lu-DOTA-Tras@C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ 'nin HER2+ reseptörlerine özgül bağlanmasını doğrulamıştır. SKOV-3, BT474 ve MDA MB231 hücrelerinde $^{177}\text{Lu-DOTA-Tras@C-Fe}_3\text{O}_4\text{-SiO}_2\text{-NH}_2\text{-FDG}$ 'nin internalizasyon kinetikleri, 2 saat, 6 saat, 18 saat ve 24 saat olmak üzere dört farklı zaman aralığında (% ile ifade edilen) hücre içi alım oranları değerlendirilmiştir. Her bir zaman noktası için ortalama değerler $\pm$ standart sapma ile sunulmuştur ($n = 3$).



Şekil 4.37 SKOV-3 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin internalizasyon kinetiği

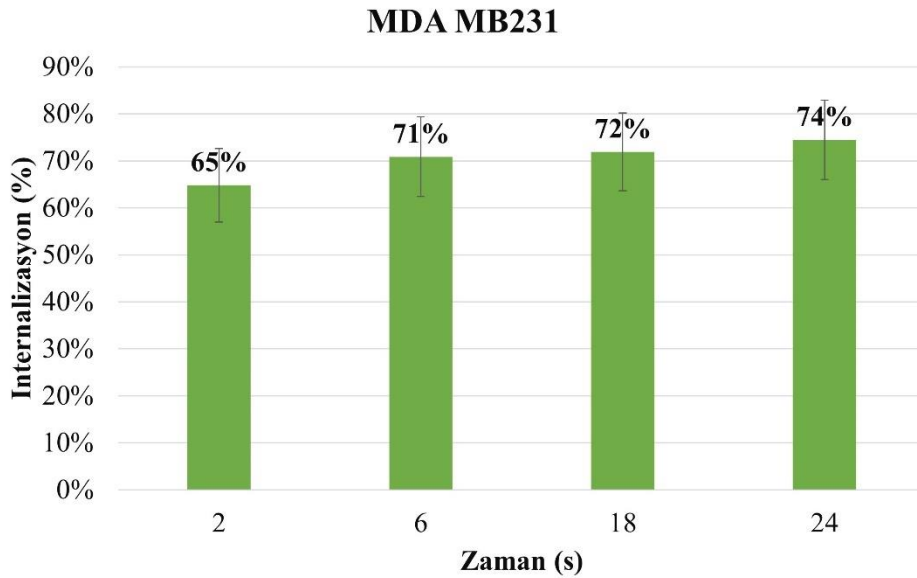
SKOV-3 hücreleri HER2 pozitif bir hücre hattıdır. Bu nedenle, ^{177}Lu ile işaretlenmiş Trastuzumab konjuge manyetik demir oksit nanoparçacıklarına yüksek oranda spesifik bağlanma ve internalizasyon göstermektedir. İlk 2 saatte %82 gibi yüksek bir internalizasyon oranına ulaşıldığı ve 24 saat sonunda bu oranın %100'e çıktığı görülmektedir. Bu sonuçlar, konjugatın SKOV-3 hücrelerinde etkin bir şekilde hedeflemeyi başardığını ve içselleştirildiğini göstermektedir (Şekil 4.37). İlerleyen saatlerde artan internalizasyon, nanoparçacıkların zaman içinde hücre içine alındığını ve uzun süre hücre içinde kaldığını kanıtlamaktadır.



Şekil 4.38 BT474 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin internalizasyon kinetiği.

BT474 hücreleri de triple reseptör pozitif bir hücre hattıdır. Bu nedenle Trastuzumab konjugatına karşı güçlü bir bağlanma ve internalizasyon göstermiştir. İlk 2 saatte %87 gibi yüksek bir internalizasyon oranına ulaşıldığı görülmektedir. Bu oran 6. saat itibarıyla %95'e çıkarak zirveye ulaşmış, 18. ve 24. saatlerde %96 ve %95 ile bu seviyelerde kalmıştır. 18. ve 24. saatlerde değerlerin sabit kalması, nanoparçacıkların belirli bir düzeye ulaştıktan sonra hücre içinde stabil bir şekilde kaldığını göstermektedir. SKOV-3 hücrelerine göre internalizasyon oranlarının daha hızlı zirve yaptığı ancak maksimum kapasitenin %96 civarında olduğu gözlenmektedir (Şekil 4.38).

Ancak, MDA MB231 hücrelerinde bu oran 2. saatin sonunda %64,80, 24. saatin sonunda ise %74,47 olarak belirlenmiştir. MDA MB231 hücrelerinde 2 saat ile karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir. MDA MB231 hücreleri triple negatif hücreler olmasına rağmen, internalizasyon yüzdesinin demir alım mekanizması veya FDG tutulumu aracılığıyla gerçekleşebileceği ve bu durumun bu hücrelerdeki internalizasyonu açıklayabileceği düşünülmektedir (Lazaro-Carrillo et al., 2020; Chaves et al., 2017) (Şekil 4.39).



Şekil 4.39 MDA MB231 hücrelerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin internalizasyon kinetiği.

İnternalizasyon kinetiğinde gözlenen artışın spesifik olarak HER2'ye bağlı olmadığı, bunun yerine nanoparçacıkların FDG molekülüyle ilişkili glukoz metabolizması ve taşıma mekanizmaları üzerinden gerçekleştiği literatürde bilinmektedir (Direcks et al., 2008).

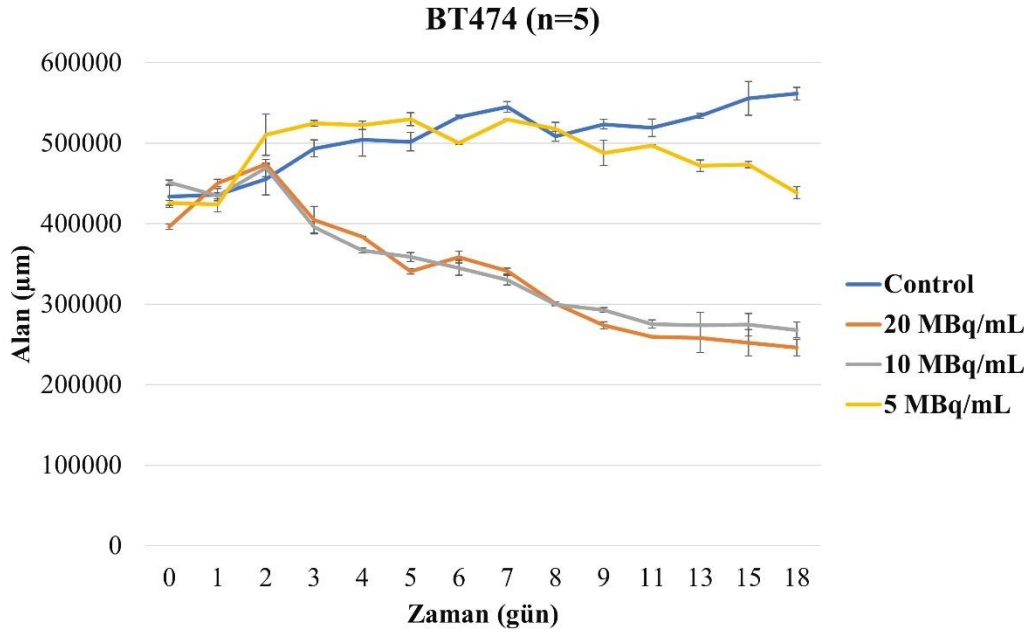
4.6.4 3D Hücre Kültürü Sonuçları

3D hücre kültürü, hücrelerin doğal dokulardaki üç boyutlu ortamı taklit eden bir matriks veya ortam içinde yetiştirilmesini ifade etmektedir. Bu yöntem, hücrelerin doku benzeri yapılar oluşturmalarını sağlar ve hücreler arasındaki etkileşimleri, mikroçevreyi, besin/gradyan dağılımını daha iyi modellemeyi amaçlar. 3D kültürlerde hücreler, düz yüzeylere yapışmak yerine sferoidler (küresel yapılar), organoidler (organ benzeri yapılar) veya hidrojel gibi destekleyici malzemeler içinde büyüebilmektedir.

3D hücre kültürü, hücrelerin doğal dokulara benzer bir üç boyutlu ortamda büyümesini sağlayarak hücreler arası etkileşimlerin, hastalık modellerinin, ilaç geliştirme süreçlerinin ve biyolojik davranışların daha gerçekçi bir şekilde incelenmesine olanak tanır.

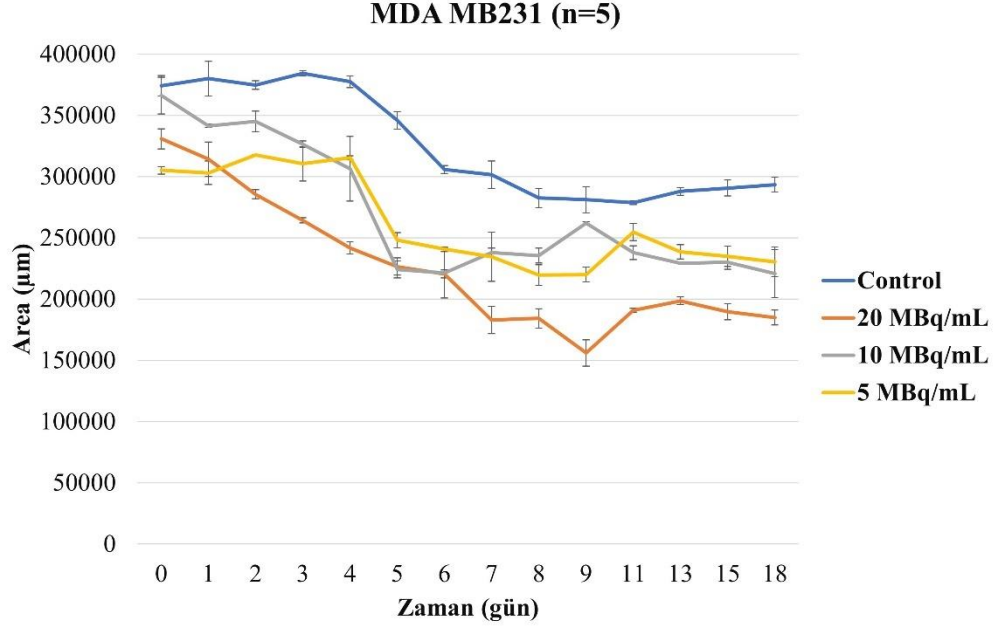
Her iki hücre hattı için oluşturulan sferoidlerde, BT474 hücrelerinin küresel bir şekil sergilediği, MDA MB231 3D sferoidlerinin ise düzensiz şekiller gösterdiği gözlemlenmiştir. Sonuçlar farklı konsantrasyonlarda ve zaman noktalarında sferoid boyutundaki değişim (ortalama ϕ , μm) olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin sferoid büyüklüğünü azaltıcı etkisini ve hücrelerin morfolojik bütünlüğündeki değişimleri göstermektedir. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak sunulmuştur (n = 5).

Test edilen ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin, her iki kanser hücresi için de ilk iki gün boyunca herhangi bir toksisiteye neden olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 4.40 ve 4.41). Ancak, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG'nin inkübasyon süresi ^{177}Lu 'nun yarı ömrüne kadar uzatıldığında, sferoid alanlarında belirgin bir azalma gözlenmiştir. Beklendiği gibi, bu durum radyobileşiğin tümör dokusuna nüfuz edebileceği beklentimizle tutarlıdır.



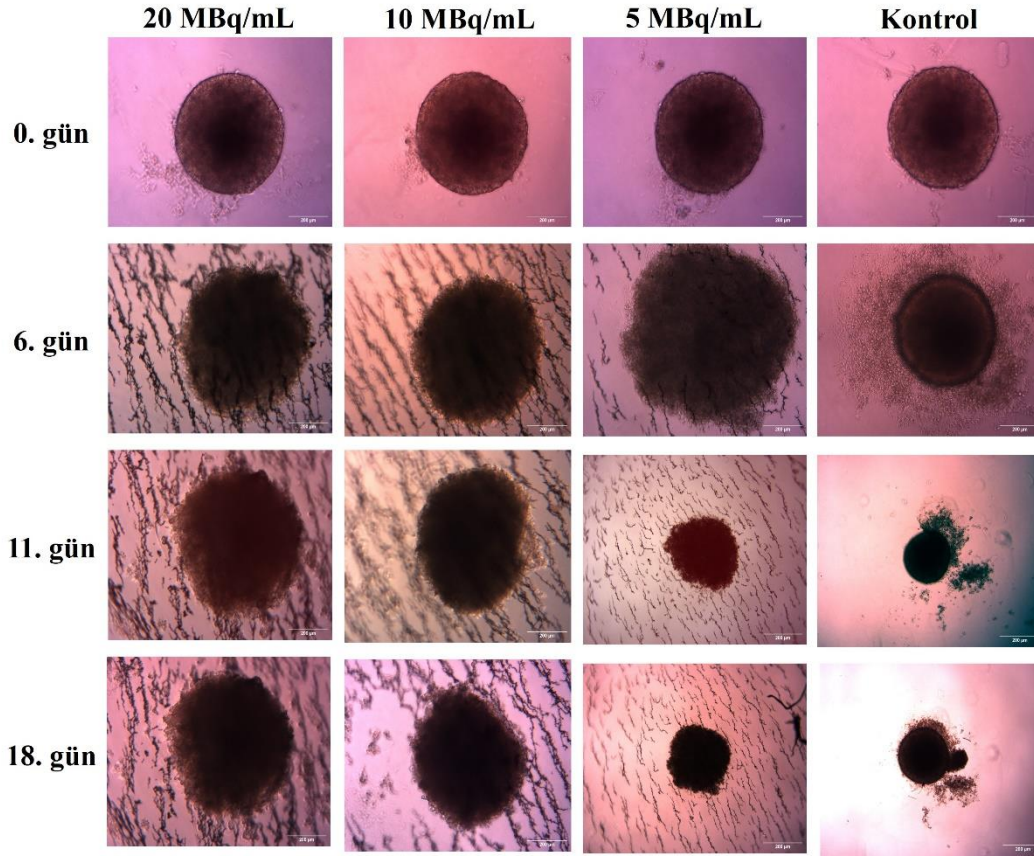
Şekil 4.40 BT474 3D sferoidlerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG uygulamasının zamana bağlı hücresel etkisi.

Ayrıca, MDA MB231 hücrelerinde tedavinin 3. günü sonunda en yüksek konsantrasyonda sferoidlerin parçalanma veya bütünlüğünü kaybetme eğiliminde olduğu görülmüştür. BT474 hücrelerinde ise kontrol grubuna kıyasla sferoid boyutlarında azalma gözlemlenmiştir. Şekil 4.42 ve 4.43, BT474 ve MDA MB231 hücrelerine ait sferoid görüntülerini göstermekte olup, bu görüntüler Zeiss mikroskobu ve Axiocam 105 color kamera ile alınmıştır. Aksi belirtilmedikçe, görüntülerde 10x objektif kullanılmıştır. Ölçümler, ZEN 3.0 lite yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiş ve sferoidlerin boyutları ImageJ programı ile hesaplanmıştır.



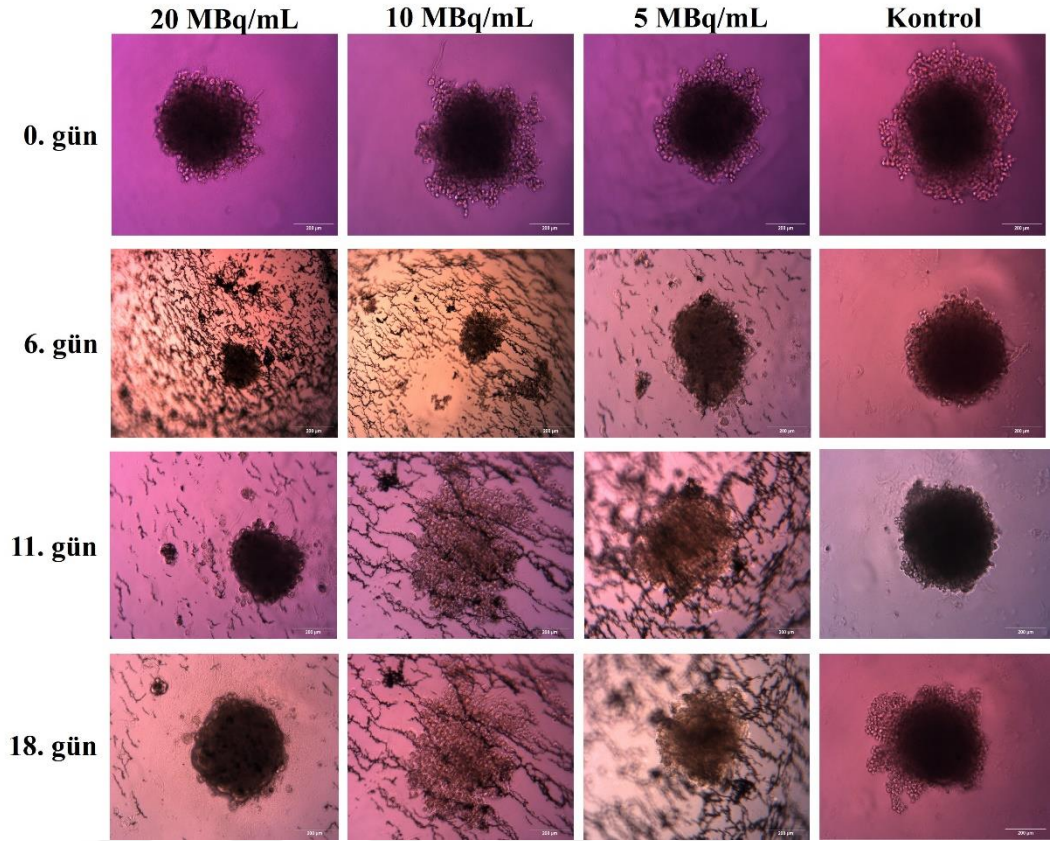
Şekil 4.41 MDA MB231 3D sferoidlerinde ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG uygulamasının zamana bağlı hücresel etkisi.

Şekil 4.39 ve Şekil 4.40'ta BT474 ve MDA MB231 hücrelerinde farklı radyasyon dozlarının (5, 10 ve 20 MBq/mL) sferoid alanlarına etkisi değerlendirilmiştir. Kontrol gruplarında her iki hücre hattında da sferoid alanlarının zamanla düzenli bir şekilde büyüme gösterdiği, dış bir etki olmadığında hücrelerin sağlıklı şekilde çoğaldığı gözlenmiştir.



Şekil 4.42 Farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG uygulamasının BT474 3D sferoid modelleri üzerindeki zamana bağlı etkisi (Proliferasyon sebebiyle, 11 ve 18. günlerde kontrol grubu ve 5 MBq/mL dozunun görüntüleri 4x objektif ile alınmıştır)

MDA MB231 hücrelerinde, 5 MBq/mL dozunda sferoid alanları başlangıçta kontrol grubuna benzer bir büyüme sergilemiş, ancak 5. günden itibaren azalma eğilimine girmiştir. 10 ve 20 MBq/mL dozlarında ise sferoid alanlarının 2. günden itibaren hızla küçüldüğü, özellikle 20 MBq/mL grubunda hücre ölümünün daha hızlı ve belirgin olduğu görülmüştür. HER2-negatif olan bu hücre hattının, hedefleme moleküllerine daha düşük yanıt verdiği ancak artan radyasyon dozu ile benzer şekilde etkilendiği gözlemlenmiştir.



Şekil 4.43 Farklı konsantrasyonlardaki ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG uygulamasının MDA MB231 3D sferoid modelleri üzerindeki zamana bağlı etkisi (Sferoid dağılımını göstermek amacıyla, 6. günde 20 MBq/mL ve 10 MBq/mL dozlarının görüntüsü 4x objektif ile alınmıştır)

BT474 hücrelerinde, HER2 pozitif yapısı nedeniyle hedefleme moleküllerine daha hassas bir yanıt verilmiştir. 5 MBq/mL dozunda sferoid alanları başlangıçta büyümeye devam etmiş, ancak 5. günden sonra küçülme başlamıştır. 10 ve 20 MBq/mL dozlarında ise sferoid alanları 2. günden itibaren hızlı bir şekilde azalmış, 20 MBq/mL dozunda bu etkinin daha belirgin olduğu tespit edilmiştir. Sonuç olarak, her iki hücre hattında da artan radyasyon dozu, sferoid alanlarında belirgin bir küçülmeye yol açmıştır. HER2 pozitif BT474 hücrelerinde bu etki daha spesifik ve hızlı gerçekleşirken, HER2 negatif MDA-MB231 hücrelerinde etkiler kontrol grubuna kıyaslandığında daha dirençli bir yapı göstermiştir. Bu sonuçlar, radyasyon dozunun ve hücre tipinin radyoterapötik etkinlikte kritik öneme sahip olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, FDG ve Trastuzumab ile konjuge edilmiş kübik demir oksit (^{177}Lu -DOTA-Tras@C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -FDG) nanokonjugatının sentezi gerçekleştirilmiş ve SKOV-3, BT474 ve MDA MB231 hücre hatları üzerindeki biyolojik etkileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. Radyokonjugat, Lu-177 ile radyoişaretlenerek terapötik etkileri değerlendirilmiş ve karakterizasyonları ile biyolojik aktiviteleri analiz edilerek teranostik uygulamalardaki etkinlikleri detaylı bir şekilde incelenmiştir.

Kübik demir oksit sentezi, $\text{Fe}(\text{acac})_3$ molekülü kullanılarak ve dekanolik asit varlığında yaklaşık 300°C sıcaklıkta benzil eter solüsyonu içinde gerçekleştirilmiştir. Oluşan demir-dekanoat kompleksleri, kübik yapıyı stabilize etmiştir. Nanoparçacıkların agregasyonunu önlemek amacıyla TEOS ve APTES ile kaplanmış ve daha sonra biyouyumlu bir yapı sağlamak için polietilen glikol (PEG) ile modifiye edilmiştir.

FDG (florodeoksiglukoz), glukoz taşıyıcıları aracılığıyla hücrelere kolayca alınabilen bir molekül olup, kanser hücrelerinde yüksek metabolik aktivite nedeniyle etkili bir şekilde birikmektedir. FDG, nanoparçacıklarla EDC/NHS kimyası kullanılarak amin gruplarından bağlanmıştır. Bu işlemle elde edilen FDG-konjuge PEG-kaplı kübik demir oksit nanoparçacıklarının (C- Fe_3O_4 - SiO_2 - NH_2 -PEG-FDG) katmanlı yapısı, FTIR, XRD, SEM, TEM ve SPM gibi ileri karakterizasyon teknikleriyle doğrulanmıştır.

Nanoparçacıkların kristal yapısının doğrulanması için XRD (X-ray Difraksiyon) analizi yapılmıştır. Elde edilen difraktogramda, C- Fe_3O_4 yapısına özgü karakteristik pikler gözlemlenmiş ve kristal fazın başarılı bir şekilde elde edildiği doğrulanmıştır. Ayrıca, XRD analizi ile TEOS ve PEG kaplama işlemlerinin kristal yapı üzerinde herhangi bir olumsuz etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Bu, kübik demir oksit nanoparçacıklarının kristal yapısının kaplama sonrası da korunduğunu göstermektedir.

Kaplama ve modifikasyon işlemleri sonrası nanoparçacıkların manyetik özellikleri, VSM analizi ile emu cinsinden belirlenmiş ve manyetik özelliklerde bir miktar azalma gözlemlenmiştir. Buna rağmen, nanokojugatların MRI ile etkili bir şekilde görüntüleme sağladığı daha önceki çalışmalarımızdan bilinmektedir. Ayrıca, SPM analizleri de kaplama sonrası yüzey morfolojisindeki değişimleri doğrulamıştır.

C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıkların radyoişaretleme lutesyum-177 (¹⁷⁷Lu) ile gerçekleştirilmiş ve TLRC yöntemi kullanılarak optimal işaretleme koşulları belirlenmiştir. Bu süreçte, trastuzumab antikoru, p-NCS-Bz-DOTA şelatörü ile başarılı bir şekilde konjuge edilmiş ve optimize edilmiş koşullarda ¹⁷⁷Lu ile radyoişaretlenmiştir. ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras olarak adlandırılan bu yapı, modifiye edilmiş ve FDG konjuge edilmiş nanoparçacıklarla birleştirilerek hedefe yönelik terapötik bir sistem oluşturulmuştur (¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG). İşaretleme işlemi sonucunda, %88'in üzerinde radyoişaretleme verimi elde edilmiştir ve bu yüksek verim, sistemin stabilitesi ve etkinliğini göstermektedir.

Lipofilisite tayini, n-oktanol/PBS (pH 7,4) fazları arasındaki dağılım katsayısı (logP) belirlenerek yapılmış ve nanoparçacıkların polar faza daha yüksek afinitesi olduğu tespit edilmiştir. Stabilite testlerinde, farklı zaman dilimlerinde (0-6 gün) PBS ve insan serumu kullanılmış, nanoparçacıkların 42°C'de yüksek stabilite sergilediği görülmüştür. Bu sonuçlar, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının biyolojik sistemlerde dayanıklılığını ve hedefleme potansiyelini desteklemektedir.

In vitro çalışmalar, nanokojugatların SKOV-3 (HER2 pozitif yumurtalık kanseri), BT474 (HER2 pozitif ve hormon reseptör pozitif meme kanseri) ve MDA-MB231 (triple negatif meme kanseri) hücrelerinde test edilmiştir. C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklar, farklı konsantrasyonlarda yapılan sitotoksikite testlerinde, 1-100 µg/mL konsantrasyonlarına kadar belirgin bir toksik etki göstermemiştir. Buna karşın, ¹⁷⁷Lu-DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının her üç hücre hattı üzerinde, 20 MBq/mL dozunda ve 72 saatlik inkübasyon süresi sonunda hücre canlılığında belirgin bir azalma tespit edilmiştir. Ayrıca, bu nanoparçacıkların toksisite etkisinin, ¹⁷⁷Lu-DOTA ile

karşılaştırıldığında anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Hücre bağlanması deneylerinde, HER2 pozitif olan SKOV-3 ve BT474 hücrelerinde nanokonjugatların Trastuzumab aracılığıyla hedeflenmesinin daha etkili olduğu görülmüştür. HER2 negatif olan MDA-MB231 hücre hattında ise spesifik bir bağlanma ve etkinlik gözlenmemiştir.

İnternalizasyon çalışmaları, nanokonjugatın HER2 pozitif SKOV-3 ve triple pozitif BT474 hücrelerinde zamanla artan bir oranda hücre içine alındığını ortaya koymuştur. MDA MB231 hücre hattında, HER2'nin eksikliği nedeniyle nanokonjugatların hücre içine alımı sınırlı olmuş ve tutulum büyük ölçüde reseptör spesifik olmayan yollarla gerçekleşmiştir. Literatüre göre kanser hücrelerinde sağlıklı hücrelere kıyasla aşırı miktarda demir ve glukoz tutulumu olduğu bilinmektedir. HER2 pozitif hücrelerde gözlenen internalizasyon oranlarının yüksekliği, Trastuzumab aracılığıyla hedefleme etkinliğini doğrulamaktadır.

3D hücre kültürü çalışmaları, nanokonjugatın sferoid modeller üzerindeki etkilerini değerlendirmiştir. Triple pozitif ve negatif hücre hatlarında (BT474 ve MDA MB231) nanokonjugat uygulaması sonrası sferoid boyutlarının konsantrasyona ve inkübasyon süresine bağlı olarak önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. MDA-MB231 sferoid boyutlarındaki küçülme, HER2 hedeflemesine bağlı olmaksızın yüksek dozlarda ortaya çıkan genel toksik etkilerle ilişkilendirilmiştir. Bu sonuçlar, nanokonjugatların HER2 pozitif hücre hatlarında spesifik bağlanma ve internalizasyon yoluyla daha etkili olduğunu, HER2 negatif hücre hatlarında ise sınırlı etkinlik gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak, bu çalışma, ^{177}Lu -DOTA-Tras@C-Fe₃O₄-SiO₂-NH₂-FDG nanoparçacıklarının hem terapötik hem de tanısal uygulamalar için yüksek potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Nanokonjugatlar, özellikle Lu-177 ile işaretlendiklerinde teranostik uygulamalarda etkili bir ajan olarak kullanılabilir. Nanokonjugatın hedefe yönelik terapötik etkileri, HER2 pozitif hücre hatlarında belirgin bir şekilde gözlenmiş; 3D sferoid modeller ve internalizasyon çalışmaları, bu sistemin biyolojik etkinliğini ve hücre tipi seçiciliğini desteklemiştir. Bunun yanında, kübik demir oksit nanoparçacıklarının manyetik özellikleri sayesinde MRI görüntüleme için uygun olabileceği ve Lu-177 ile benzer şelatasyon kimyası

sebebiyle Ga-68 ile de işaretlenerek PET görüntülemeye de değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Buna ek olarak, bu nanoparçacıkların *in vivo* hayvan deneylerinde test edilmesi, biyolojik sistemlerdeki etkinlik ve güvenlik değerlendirmesi açısından gelecekte atılacak önemli bir adım olacaktır.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aras, O., Pearce, G., Watkins, A.J., Nurili, F., Medine, E.I., Guldu, O.K., Tekin, V., Wong, J., Ma, X., Ting, R. and Unak, P.,** 2018, An in-vivo pilot study into the effects of FDG-mNP in cancer in mice. Plos one, 13(8), e0202482p.
- Arruebo, M., Valladares, M. and González-Fernández, Á.,** 2009, Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications. Journal of Nanomaterials, 2009(1), 439389p.
- Avdeef, A.,** 2003, Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. John Wiley & Sons.
- Babu, P., Sinha, S. and Surolia, A.,** 2007, Sugar–quantum dot conjugates for a selective and sensitive detection of lectins. Bioconjugate Chemistry, 18(1), 146–151pp.
- Bajwa, R., Soni, S. and Srivastava, A.,** 2014, Stability Studies of Pharmaceutical Dosage Forms. International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 5(3), 1241-1249pp.
- Bakandritsos, A., Mattheolabakis, G., Zboril, R., Bouropoulos, N., Tucek, J., Fatouros, D.G. and Avgoustakis, K.,** 2010, Preparation, stability and cytocompatibility of magnetic/PLA-PEG hybrids. Nanoscale, 2(4), 564-572pp.
- Banerjee, S., Pillai, M.R. and Knapp F.F.,** 2015, Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. Chemical Reviews, 115(8), 2934-74pp.
- Baselga, J. and Swain, S.M.,** 2009, Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. Nature Reviews Cancer, 9(7), 463–475pp.
- Baselga, J., Cortés, J., Kim, S.B., Im, S.A., Hegg, R., Im, Y. H., Roman, L., Pedrini, J.L., Pienkowski, T. and Knott, A.,** 2012, Pertuzumab plus

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

trastuzumab plus, docetaxel for metastatic breast cancer. New England Journal of Medicine, 366(2), 109-119pp.

Berg, J.M., Tymoczko, J.L. and Gatto, G.J., 2015, Biochemistry (8th ed.). W. H. Freeman and Company.

Berne, B. J., and Pecora, R., 2000, Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics. Dover Publications.

Bhusari, P., Vatsa, R., Singh, G., Parmar, M., Bal, A., Dhawan, D.K., Mittal, B.R. and Shukla, J., 2017, Development of Lu-177-trastuzumab for radioimmunotherapy of HER2 expressing breast cancer and its feasibility assessment in breast cancer patients. International Journal of Cancer, 140(4), 938-947pp.

Binnig, G., Quate, C.F. and Gerber, C., 1986, Atomic Force Microscope. Physical Review Letters, 56(9), 930-933pp.

Biotech Reality, “Thin Layer Chromatography (TLC) – Principle, Procedure, Diagram, and Applications” <https://www.biotechreality.com/2024/02/thin-layer-chromatography-tlc-principle-procedure-diagram-and-applications.html> (Erişim Tarihi: 16.02.2025)

Bondarenko, L., Illés, E., Tombácz, E., Dzhardimalieva, G., Golubeva, N., Tushavina, O., Adachi, Y. and Kydralieva, K., 2021, Fabrication, Microstructure and Colloidal Stability of Humic Acids Loaded Fe₃O₄/APTES Nanosorbents for Environmental Applications. Nanomaterials, 11(6), 1418p.

Bozzola, J.J. and Russell, L.D., 1999, Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists. Jones and Bartlett Publishers.

Brechbiel, M.W., 2008 Targeted alpha-therapy: past, present, future? Dalton Transactions, (43), 4918-4928pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Buzea, C., Pacheco, I.I. and Robbie, K.,** 2007, Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. *Biointerphases*, 2(4), MR17-MR71.
- Carter, L.A.,** 2004, Fourier Transform Infrared Spectroscopy in Organic Chemistry. *Journal of Chemical Education*, 81(1), 24-28pp.
- Chaves, N.L., Estrela-Lopis, I., Böttner, J., Lopes, C.A., Guido, B.C., de Sousa, A.R. and Bão, S.N.,** 2017, Exploring cellular uptake of iron oxide nanoparticles associated with rhodium citrate in breast cancer cells. *International journal of nanomedicine*, 12, 5511-5523pp.
- Cheng, G. and Zheng, S.Y.,** 2014, Construction of a high-performance magnetic enzyme nanosystem for rapid tryptic digestion. *Scientific reports*, 4(1), 1-10pp.
- Cheng, Z. and Zhang, L.,** 2014, Design of DOTA-conjugated antibodies for targeted radioimmunotherapy. *Chemical Reviews*, 114(2), 1575-1603pp.
- Ciccone, D.M.,** 2012, *Lipophilicity: Its Impact on Drug Discovery and Development*. Springer.
- Cullity, B.D.,** 1978, *Elements of X-Ray Diffraction*. Addison-Wesley.
- Cullity, B.D., and Stock, S.R.,** 2001, *Elements of X-Ray Diffraction* (3rd Edition). Prentice Hall.
- Cędrowska, E., Pruszyński, M., Gawęda, W., Żuk, M., Krysiński, P., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A., Karageorgou, M.A., Bouziotis, P. and Bilewicz, A.,** 2020, Trastuzumab conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles labeled with ^{225}Ac as a perspective tool for combined α -radioimmunotherapy and magnetic hyperthermia of HER2-positive breast cancer. *Molecules*, 25(5), 1025p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Dash, A., Pillai, M.R.A. and Knapp, F.F.**, 2015, Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49, 85–107pp.
- Direcks, W.G.E., Berndsen, S.C., Proost, N., Peters, G.J., Balzarini, J., Spreeuwenberg, M.D. and Molthoff, C.F.M.** 2008, ^{18}F FDG and ^{18}F FLT uptake in human breast cancer cells in relation to the effects of chemotherapy: an in vitro study. *British journal of cancer*, 99(3), 481-487pp.
- Dutta, B., Shetake, N.G., Barick, B.K., Barick, K.C., Pandey, B.N., Priyadarsini, K.I. and Hassan, P.A.**, 2018, pH sensitive surfactant stabilized Fe_3O_4 magnetic nanocarriers for dual drug delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 162, 163-171pp.
- Egerton, R. F.**, 2011, Electron Energy-Loss Spectroscopy in the TEM. *Micron*, 42(4), 343-352pp.
- Foner, S.**, 1959, Versatile and Sensitive Vibrating-Sample Magnetometer. *Review of Scientific Instruments*, 30(7), 548-557pp.
- Gawęda, W., Pruszyński, M., Cędrowska, E., Rodak, M., Majkowska-Pilip, A., Gawel, D., Bruchertseifer, F., Morgenstern, A. and Bilewicz, A.**, 2020, Trastuzumab modified barium ferrite magnetic nanoparticles labeled with radium-223: A new potential radiobioconjugate for alpha radioimmunotherapy. *Nanomaterials*, 10(10), 2067p.
- Gharibkandi, N.A., Wawrowicz, K., Majkowska-Pilip, A., Żelechowska-Matysiak, K., Wierzbicki, M. and Bilewicz, A.**, 2023, $\text{Au}@^{109}\text{Pd}$ core-shell nanoparticle conjugated to trastuzumab for the therapy of HER2+ cancers: studies on the applicability of $^{109}\text{Pd}/^{109m}\text{Ag}$ in vivo generator in combined β -auger electron therapy. *EJNMMI Radiopharmacy and Chemistry*, 8(1), 26p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Glaser, R.E.** “Vibrational Spectroscopy Tutorial: Sulfur and Phosphorus”
https://faculty.missouri.edu/~glaserr/8160f10/A03_Silver.pdf (Erişim tarihi: 16.02.2025).
- Guleria, M., Sharma, R., Amirdhanayagam, J., Sarma, H. D., Rangarajan, V., Dash, A. and Das, T.,** Formulation, and clinical translation of [177Lu] Lu-trastuzumab for radioimmunotheranostics of metastatic breast cancer, RSC Medicinal Chemistry, 12(2), 263-277pp.
- Gupta, A.K. and Gupta, M.,** 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18), 3995-4021pp.
- Gupta, A.K. and Gupta, M.,** 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. Biomaterials, 26(18), 3995-4021pp.
- Gupta, S., Saxena, N. and Srivastava, S.,** 2019, Importance of Lipophilicity in the Development of Radiopharmaceuticals. Radiology and Oncology, 53(1), 18-26pp.
- Hafid, M., Dalili, W., Yazami, S.I. and Merzouk, N.,** 2010, Growth and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles in silica matrix. Phase Transitions, 83(8), 627-633pp.
- Harris, D.C.,** 2013, Quantitative Chemical Analysis (9th ed.). W. H. Freeman and Company.
- Heister, E., Lutz, T.,** 2009, Functionalized Carbon Nanotubes as Multimodal Drug Delivery Systems for Targeted Cancer Therapy, Nanomedicine Design of Particles, Sensors, Motors, Implants, Robots, And Devices, Book Series: Engineering in Medicine and Biology.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hochgurtel, J., Willmann, J.K. and Jo, B.,** 2017, Lipophilicity of Radiopharmaceuticals: Implications for Clinical Imaging and Therapy. *Journal of Nuclear Medicine*, 58(2), 356-362pp.
- Huang, H.S. and Hainfeld, J.F.,** 2013, Intravenous magnetic nanoparticle cancer hyperthermia. *International Journal of Nanomedicine*, 8, 2521-2532pp.
- Huang, H., Xie, J. and Wang, Y.,** 2005, Scanning Probe Microscopy in Nanomaterials Research. *Nanotechnology*, 16(7), 902-907pp.
- Hynes, N.E. and Lane, H.A.,** 2005, ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*, 5(5), 341–354pp.
- International Atomic Energy Agency,** 2013, Quality Control in the Production of Radiopharmaceuticals. IAEA-TECDOC-1743.
- Jain, K.K.,** 2017, *The Handbook of Radiopharmaceuticals*. Springer.
- Jayaramudu, T., Raghavendra, G.M., Varaprasad, K., Reddy, G.V.S., Reddy, A.B., Sudhakar, K. and Sadiku, E.R.,** 2015, Preparation and characterization of poly(ethylene glycol) stabilized nano silver particles by a mechanochemical assisted ball mill process. *Journal of Applied Polymer Science*, 133(7), 43027p.
- Jordan, A., Scholz, R., Wust, P., Fähling, H. and Felix, R.,** 1999, Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 201(1-3), 413-419pp.
- Karas, M. and Hillenkamp, F.,** 1988, Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10,000 Daltons. *Analytical Chemistry*, 60(20), 2299-2301pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kelkar, S.S. and Reineke, T.M.**, 2011, Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjugate chemistry*, 22(10), 1879-1903pp.
- Kern, D.E., Tice, J.A. and Blanchard, M.H.**, 2017, Toxicity Testing and Safety Evaluation Using In Vitro Methods. *Toxicology in vitro*, 40, 80-88pp.
- Klug, H.P. and Alexander, L.E.**, 1974, X-Ray Diffraction Procedures for Polycrystalline and Amorphous Materials (2nd Edition). John Wiley & Sons.
- Kumari, A., Yadav, S.K. and Yadav, S.C.**, 2010, Biodegradable polymeric nanoparticles-based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 1-18pp.
- Lazaro-Carrillo, A., Calero, M., Aires, A.L., Cortajarena, A., Simões, B.M., Latorre, A., Somoza, Á., Clarke, R.B., Miranda, R. and Villanueva, A.**, 2020, Tailored Functionalized Magnetic Nanoparticles to Target Breast Cancer Cells Including Cancer Stem-Like Cells. *Cancers*, 12(6), 1397p.
- Leavy, O.**, 2010, Therapeutic antibodies: past, present and future. *Nature Reviews Immunology*, 10(5), 297p.
- Li, X., Cai, X., Gassner, E. and Grassl, R.**, 2005, Challenges and Advances in MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77(12), 3666-3674pp.
- Liu, S.**, 2008, Bifunctional coupling agents for radiolabeling of biomolecules and target-specific delivery of metallic radionuclides. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(12), 1347-1370pp.
- Liu, Y., Zhang, Q., and Wang, H.**, 2017, Magnetic Hysteresis of Nanomaterials Using VSM. *Nano Materials Science*, 8(4), 350-358pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Loo, J.A., Bereman, M.S. and Whitelegge, J.P.,** 2002, Tandem Mass Spectrometry of Proteins Using MALDI TOF/TOF. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 13(5), 689-698pp.
- Lu, A.H., Salabas, E.L. and Schüth, F.,** 2007, Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie International Edition*, 46(8), 1222-1244pp.
- Lumpkin, R.J., McKenna, M.A. and Hines, W.,** 2003, Dynamic Light Scattering in the Characterization of Nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 5(1), 51-59pp.
- Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. and Hori, K.,** 2001, Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: A review. *Journal of Controlled Release*, 65(1-2), 271-284pp.
- Majkowska-Pilip, A., Rius, M., Bruchertseifer, F., Apostolidis, C., Weis, M., Bonelli, M., Laurenza, M., Krolicki, L. and Morgenstern, A.,** 2018, In vitro evaluation of ²²⁵Ac-DOTA-Substance P for targeted alpha therapy of glioblastoma multiforme. *Chemical biology and drug design*, 92(1), 1344-1356pp.
- Mamiya, H., Nakatani, I. and Furubayashi, T.,** 2013, Vibrating Sample Magnetometry for Magnetic Nanomaterials. *Advanced Materials*, 25(19), 2661-2672pp.
- Martinez-Boubeta, C., Simeonidis, K., Makridis, A., Angelakeris, M., Iglesias, O., Guardia, P., Cabot, A., Yedra, L., Estradé, S., Peiró, F., Saghi, Z., Midgley, P.A., Conde-Leborán, I., Serantes, D. and Baldomir, D.,** 2013, Learning from nature to improve the heat generation of iron-oxide nanoparticles for magnetic hyperthermia applications, *Scientific reports*, 3(1), 1-8pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- McNeal, C.J., Stock, J.M. and Trefethen, J.M.,** 2016, Limitations of In Vitro Studies in Pharmacology and Toxicology. Environmental Toxicology and Pharmacology, 45, 44-52pp.
- Mitri, Z., Constantine, T. and O'Regan, R.,** 2012, The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. Chemotherapy Research and Practice, 2012(7), 743193p.
- Moasser, M.M.,** 2007, The oncogene HER2: Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. Oncogene, 26(45), 6469-6487pp.
- Morris, M.D.,** 2012, Fourier Transform Infrared Spectroscopy: A Powerful Analytical Tool in Chemistry. Materials Science & Engineering, 32(1), 15-28pp.
- Mozafarinia, M., Karimi, S., Farrokhnia, M. and Esfandiari, J.,** 2021, In vitro breast cancer targeting using Trastuzumab-conjugated mesoporous silica nanoparticles: Towards the new strategy for decreasing size and high drug loading capacity for drug delivery purposes in MSN synthesis. Microporous and mesoporous materials, 316, 110950p.
- Nacev, A., Kim, S.H., Rodriguez-Canales, J., Tangrea, M.A., Shapiro, B. and Emmert-Buck, M.R.,** 2011, A dynamic magnetic shift method to increase nanoparticle concentration in cancer metastases: a feasibility study using simulations on autopsy specimens. International Journal of Nanomedicine, 6, 2907-2923pp.
- National Cancer Institute,** "Tucatinib and Trastuzumab Combination Approved for Advanced Colorectal Cancer" <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2023/fda-tucatinib-her2-colorectal-cancer> (Erişim Tarihi:13.02.2025)

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A. and Hynes, N.E.,** 2000, The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. The EMBO Journal, 19(13), 3159–3167pp.
- Ozkaya, F., Unak, P., Medine, E.I., Sakarya, S., Unak, G.I. and Timur, S.,** 2012, 18FDG conjugated magnetic nanoparticle probes: synthesis and in vitro investigations on MCF-7 breast cancer cells. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 295, 1789–1796pp.
- Pankhurst, Q.A., Connolly, J., Jones, S.K. and Dobson, J.,** 2003, Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. Journal of Physics D: Applied Physics, 36(13), R167-R181pp.
- Pourmiri, S., Tzitzios, V., Hadjipanayis, G.C., Meneses Brassea, B.P. and El-Gendy, A.A.,** 2019, Magnetic properties and hyperthermia behavior of iron oxide nanoparticle clusters. AIP Advances, 9(12), 125033p.
- Radmacher, M., Fritz, M. and Gaub, H.E.,** 1997, The AFM and its applications. Journal of Microscopy, 186(3), 16-25pp.
- Rasaneh, S., Shahhosseini, S., Vadiati Saberi, B. and Salouti, M.,** 2014, Preparation and biological evaluation of ^{177}Lu -trastuzumab as a new radiopharmaceutical for radioimmunotherapy of breast cancer. Nuclear Medicine and Biology, 41(2), 123-128pp.
- Reimer, L.,** 2013, Transmission Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis. Springer.
- Reimer, L. and Kolb, C.,** 2008, Scanning Electron Microscopy: Physics of Image Formation and Microanalysis. Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Ruíz-Baltazar, A., Esparza, R., Rosas, G., & Pérez, R., 2015, Effect of the Surfactant on the Growth and Oxidation of Iron Nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 2015(1), 1–8pp.

Salvanou, E.A., Kanaki, Z., Zachariadis, D. and Bouziotis, P., 2024, Stability and biodistribution studies of novel ¹⁷⁷Lu-labeled magnetic nanoparticles for theranostic applications. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 329(3), 1257-1265pp.

Sauer, M., Kneipp, J., & Rotomskis, R., 2003, Scanning Probe Microscopy: From the Atomic Scale to Nanoscale. *Nature Reviews Materials*, 2(3), 18-27pp.

Schwarz, S.W., Froelich, J. and Decristoforo, C., 2009, Radiochemical purity testing of radiopharmaceuticals: Importance and methods. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 37(2), 131-137pp.

Shagholani, H., Ghoreishi, S.M. and Mousazadeh, M., 2015, Improvement of interaction between PVA and chitosan via magnetite nanoparticles for drug delivery application. *International Journal of Biological Macromolecules*, 78, 130–136pp.

Shana, X.H., Hua, H., Xiong, F., Gub, N., Geng, X.D., Zhuc, W., Lind, J. and Wang, Y.F., 2012, Targeting Glut1 overexpressing MDA-MB-231 cells with 2-deoxy-d-glucose modified SPIOs. *European Journal of Radiology*, 81(1), 95-99pp.

Sigma-Aldrich, “IR Spectrum Table & Chart”
<https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/ir-spectrum-table.html> (Erişim tarihi: 16.02.2025).

Silva, C.J., Lourenço, A.I. and Abrantes, A.M., 2014, Radiochromatography for radiopharmaceuticals: Principles and applications. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 41(2), 102–114pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Silverstein, R.M., Webster, F.X. and Kiemle, D.J.,** 2014, Spectrometric Identification of Organic Compounds (8th ed.). John Wiley & Sons.
- Slamon, D., Eiermann, W., Robert, N., Pienkowski, T., Martin, M., Press, M. and Crown, J.,** 2011, Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *New England journal of medicine*, 365(14), 1273-1283pp.
- Sokoloff, L.,** 1977, Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *Journal of neurochemistry*, 29(1), 13-26pp.
- Stetefeld, J., McKenna, S.A., and Patel, T.R.,** 2016, Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical reviews*, 8(4), 409-427pp.
- Subramanian, M., Pearce, G., Guldu, O.K., Tekin, V., Miaskowski, A., Aras, O. and Unak, P.,** 2016, A pilot study into the use of FDG-mNP as an alternative approach in neuroblastoma cell hyperthermia. *IEEE transactions on nanobioscience*, 15(6), 517-525pp.
- Thakral, P., Singla, S., Yadav, M.P., Vasisht, A., Sharma, A., Gupta, S.K. and Malhotra, A.,** 2014, An approach for conjugation of (177) Lu- DOTA-SCN-Rituximab (BioSim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non-Hodgkins's lymphoma patients. *Indian Journal of Medical Research*, 139(4), 544-54pp.
- Tiwari, G., Tiwari, R. and Kumar, S.,** 2016, Stability of Nanoparticles and Nanostructures in Drug Delivery. *Journal of Controlled Release*, 230, 12-23pp.
- Torchilin, V.P.,** 2006, Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(2), 145-160pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Tutun, E., Tekin, V., Yasakci, V., Aras, Ö. and Ünak, P.,** 2021, Synthesis and morphological studies of Tc-99m-labeled lupulone-conjugated Fe₃O₄@ TiO₂ nanocomposite, and in vitro cytotoxicity activity on prostate cancer cell lines. Applied organometallic chemistry, 35(12), e6435.
- Wang, J., Zheng, S., Shao, Y., Liu, J., Xu, Z. and Zhu, D.,** 2010, Amino-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. Journal of colloid and interface science, 349(1), 293-299pp.
- Wang, S., Mamedova, N., Kotov, N.A., Chen, W. and Studer, J.,** 2002, Antigen/Antibody Immunocomplex from CdTe Nanoparticle Bioconjugates. Nano Letters, 2(8), 817-822pp.
- Warburg, O.,** 1956, On the origin of cancer cells. Science, 123(3191), 309-314pp.
- Warren, B.E.,** 1990, X-Ray Diffraction. Dover Publications. ISBN: 978-0486663173.
- Watkins, A.J., Pearce G., Unak, P., Guldu, O.K., Yasakci, V., Akin, O., Aras, O., Wong, J. and Ma, X.,** 2018, Tissue morphology and gene expression characterisation of transplantable adenocarcinoma bearing mice exposed to fluorodeoxyglucose-conjugated magnetic nanoparticles. Journal of biomedical nanotechnology, 14(11), 1979–1991pp.
- Wawrowicz, K., Majkowska-Pilip, A., Szwed, M., Żelechowska-Matysiak, K., Chajduk, E. and Bilewicz, A.,** 2022, Oxidative status as an attribute for selective antitumor activity of platinum-containing nanoparticles against hepatocellular carcinoma. International journal of molecular sciences, 23(23), 14773p.
- Williams, D.B., and Carter, C.B.,** 2009, Transmission Electron Microscopy: A Textbook for Materials Science. Springer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wu, X., Yang, H., Yu, X., Qin, J.J.,** 2022, Drug-resistant HER2-positive breast cancer: Molecular mechanisms and overcoming strategies. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 1012552p.
- Wu, Y., Wang, L., Guo, B. and Ma, P.X.,** 2014, Injectable biodegradable hydrogels and microgels based on methacrylated poly (ethylene glycol)-co-poly (glycerol sebacate) multi-block copolymers: synthesis, characterization, and cell encapsulation. *Journal of Materials Chemistry B*, 2(23), 3674-3685pp.
- Yasakci, V., Tekin, V., Guldu, O.K., Evren, V., and Unak, P.,** 2018, Hyaluronic acid-modified [19F]FDG-conjugated magnetite nanoparticles: in vitro bioaffinities and HPLC analyses in organs. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*, 318, 1973-1989pp.
- Zahir, M.H., Rahman, M.M., Irshad, K. and Rahman, M.M.,** 2019, Shape-stabilized phase change materials for solar energy storage: MgO and Mg(OH)₂ mixed with polyethylene glycol. *Nanomaterials*, 9(12), 1773p.
- Żelechowska-Matysiak, K., Wawrowicz, K., Wierzbicki, M., Budlewski, T., Bilewicz, A. And Majkowska-Pilip, A.,** 2023, Doxorubicin and trastuzumab-modified gold nanoparticles as potential multimodal agents for targeted therapy of HER2+ cancers. *Molecules*, 28(6), 2451p.
- Zhang, H., Koumna, S., Pouliot, F., Beauregard, J.M. and Kolinsky, M.,** 2021, PSMA Theranostics: Current Landscape and Future Outlook. *Cancers*, 13(16), 4023p.
- Zhu, Y., Rashidi, M. and Tomlinson, I.,** 2003, MALDI-TOF Mass Spectrometry for Proteomic Analysis. *Journal of Chromatography B*, 789(1-2), 77-87pp.

TEŞEKKÜR

Bilgi birikimiyle ufkumu genişleten, rehberliğiyle yolumu aydınlatan ve her zaman ilham kaynağım olan sevgili danışman hocam **Prof. Dr. Perihan ÜNAK**'a sonsuz şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca, tez izleme komitemde yer alarak kıymetli değerlendirme ve önerileriyle çalışmalarına yön veren değerli hocalarım **Prof. Dr. Çiğdem İÇHEDEF** ve **Öğr. Üyesi Coşkun HARMANŞAH**'a gönülden teşekkür ederim.

Doktora öğreniminin ilk üç yılı içerisinde çalışma fırsatı bulduğum **TÜBİTAK 218S749 No'lu Projesi** adına, **TÜBİTAK SBAG** birimine ve bu projeyi başarıyla yürüten değerli hocam **Prof. Dr. Perihan ÜNAK**'a teşekkür ederim. Bu süreçte birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, proje arkadaşlarım **Kadriye Buşra KARATAY** ve **Volkan YASAKÇI**'ya iş birliği ve destekleri için içtenlikle teşekkür ederim.

Doktora çalışmalarım sırasında **2211-C Yurt İçi Öncelikli Alanlar Doktora Burs Programı** ve **TÜBİTAK 2214-A Yurt Dışı Doktora Sırası Araştırma Burs Programı** ile desteklendiğim için **TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı (BİDEB)**'na bir kez daha teşekkürlerimi sunuyorum. Varşova'da bulunan Nükleer Kimya ve Teknoloji Enstitüsü'nde çalışma imkânı sağlayarak bu süreci unutulmaz bir deneyime dönüştüren kıymetli hocam **Prof. Dr. Aleksander BİLEWICZ**'e, değerli katkıları ve yol göstericiliğiyle beni destekleyen **Prof. Dr. Agnieszka MAJKOWSKA-PİLİP** ve **Rafał WALCZAK**'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu akademik yolculukta yalnızca bilimsel gelişimime değil, aynı zamanda kişisel olarak da bana destek olan, laboratuvar çalışmalarında sağladıkları yardımlar ve dostluklarıyla hayatımı zenginleştiren sevgili çalışma arkadaşlarım **Burcu AYDIN**, **Geeva PRASANTH ANNAMALAİSAMY** ve **Nasrin ABBASİ GHARİBKANDİ**'ye en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Ve tabii ki, her zaman en büyük dayanağım olan, beni varlığıyla güçlendiren ve başarımın en büyük destekçisi olan sevgili aileme... Onların desteği olmadan bu yolculuk asla mümkün olamazdı. Akademik hayatıma dokunan, bana ilham veren ve başarı yolculuğuma değer katan herkese minnettarım.