

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KEMOTERAPÖTİK İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER:
RADYOİŞARETLİ SİKLOFOSFAMİD YÜKLÜ
MEZOPOR SİLİKA NANOPARÇACIKLAR**

Yüksek Lisans Tezi

Selin İrdel HAMURİŞÇİ

Danışman: Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Nükleer Uygulamalar Yüksek Lisans Programı

İzmir

2020

Selin İrdel HAMURİŞÇİ tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “**Kemoterapötik İlaç Taşıyıcı Sistemler: Radyoişaretli Siklofosfamid Yüklü Mezopor Silika Nanoparçacıklar**” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17/08/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday **oybirliği** ile **başarılı** bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof.Dr. Serap TEKSÖZ

Raportör Üye: Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF

Üye : Doç. Dr. Yasemin PARLAK

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Kemoterapötik İlaç Taşıyıcı Sistemler: Radyoişaretli Siklofosfamid Yüklü Mezopor Silika Nanoparçacıklar**” 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.

Selin İrdel HAMURİŞÇİ



ÖZET

KEMOTERAPÖTİK İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER: RADYOİŞARETLİ SİKLOFOSFAMİD YÜKLÜ MEZOPOR SİLİKA NANOPARÇACIKLAR

HAMURİŞÇİ, Selin İrdel

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF

Ağustos 2020, 50 sayfa

Son yıllarda terapötik ve hedefe spesifik ilaçların taşınmasında nanoparçacıkların (NP) sağladığı imkanlar bilim insanları ve ilaç endüstrisi tarafından giderek artan ilgiyle karşılanmaktadır. Bu taşıyıcı sistemler arasında mezoporlu silika nanoparçacıklar (MSN) biyoyumluluk, düşük toksite gibi özellikleri sayesinde sağlık alanında çeşitli uygulamalarda kullanılmaktadır. Mezopor silika nanoparçacıkların gözenekli yapıları ilacın sisteme yüklenmesini ve hedef bölgeye kontrollü bir şekilde verilmesini kolaylaştırır. Bu çalışmada bir antikanser ilaç olan siklofosfamid (CPH) yüklü mezopor silika nanoparçacıklar sentezlenerek teknesyum-99m ile radyoışaretlenmesi ve bu yapının biyolojik davranışının in vitro olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Sentezlenen nanoparçacıkların parçacık boyutu, morfolojisi, ilaç hapsedme kapasitesi gibi parametreler incelenerek en uygun sentez koşulları belirlenmiştir. Nanoparçacıkların karakterizasyonu Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), Dinamik Işık Saçılım (DLS), Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile yapılmıştır. DLS analizine göre sentezlenen MSN' ler $125 \pm 3,4$ nm hidrodinamik yarıçapa sahiptirler. SEM görüntülerine göre de MSN' lerin küresel morfolojik yapıda ve 55 ile 70 nm boyutları arasında oldukları gözlenmiştir. Radyoışaretili Siklofosfamid yüklü mezopor silika nanoparçacıkların ($^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$) kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. MSN-CPH nanoparçacıklar % $99,82 \pm 0,25$ verimle teknesyum-99m ile başarılı bir şekilde radyoışaretlenmiştir. Kalite kontrol

çalışmaları yapıldıktan sonra siklofosfamid yüklü mezopor silika nanoparçacıkların sitotoksisite ve tutulum çalışmaları in vitro olarak MCF-7 ve MDA-MB-231 meme kanser hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ^{99m}Tc -MSN-CPH parçacıklarının MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinde benzer tutulum gösterdiği bulunmuştur. Bu tez çalışmasında sentezlenen nano yapının, gelecekte kanser teşhis ve tedavisinde kullanılabilecek ^{99m}Tc ile radyoişaretli yeni nesil nanoteranostik sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezopor Silika Nanoparçacıklar, İlaç Taşıyıcı Sistemler, Siklofosfamid, Teknesyum-99m, *İn Vitro*



ABSTRACT**DRUG CARRIER SYSTEMS OF CHEMOTHERAPEUTIC DRUGS: RADIOLABELED CYCLOPHOSPHAMIDE LOADED MESOPOROUS SILICA NANOPARTICLES**

HAMURİŞÇİ, Selin İrdel

Master in Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Çiğdem İÇHEDEF

August 2020, 50 page

Recently, the possibilities of nanoparticles (NP) in the transportation of therapeutic and target-specific drugs have been increasingly received by scientists and the pharmaceutical industry. Among these carrier systems, mesoporous silica nanoparticles have remarkable properties. Silica nanoparticles are used in various applications in the field of health thanks to their properties such as biocompatibility and low toxicity. Thanks to their porous structure, mesopore silica nanoparticles (MSN) make it easier to load the drug into the system and deliver it to the target area in a controlled manner. In this study, it was aimed to synthesize cyclophosphamide (CPH) loaded mesoporous silica nanoparticles, radiolabeled with technetium-99m and analyze the biological behavior of this structure *in vitro*. Optimum conditions were determined by examining parameters such as particle size, morphology, drug entrapment capacity of synthesized nanoparticles. The characterization of nanoparticles was carried out by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Dynamic Light Scattering (DLS), Scanning electron microscopy (SEM). The synthesized MSNs have a hydrodynamic radius of 125 ± 3.4 nm according to DLS analysis. SEM images showed that nanoparticles have a spherical morphological structure and distributed between 55 and 70 nm in size. Quality control studies of radiolabeled Cyclophosphamide loaded mesopore silica nanoparticles ($^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$) were carried out using Thin Layer Radiochromatography (TLRC) method. MSN-CPH

nanoparticles were successfully radiolabeled with technetium-99m in $99.82 \pm 0.25\%$ efficiency. After quality control studies, cytotoxicity and uptake studies of cyclophosphamide-loaded mesopore silica nanoparticles were performed in vitro using MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. It was found that ^{99m}Tc -MSN-CPH particles showed similar uptake in MCF7 and MDA-MB-231 cells. It is thought that the nanostructure synthesized in this thesis will contribute to the development of new generation radiolabeled nanotheranostic systems with ^{99m}Tc that can be used in the diagnosis and treatment of cancer in the future.

Keywords: Mesoporous Silica Nanoparticles, Drug Delivery Systems, Cyclophosphamide, Technetium-99m, *In Vitro*



ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca çalışmalarımı gerçekleştirirken kanser hastalığına karşı farkındalık kazanma fırsatım oldu. Çağımızın en önemli problemlerinden biri olarak gösterilen ve dünyadaki ölümlerin büyük bir çoğunluğuna sebebiyet veren kanser hastalığının teşhis ve tedavisi üzerine yürüttüğüm bu tez çalışması sayesinde birçok bilgi ve birikim sahibi olmam beni çok mutlu etti.

Öğrendiğim bu bilgiler sayesinde gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmasıyla bilim dünyasına en ufak bir katkıda bulunabiliyor olmak beni çok mutlu etti.

Bu fırsatı bana sunan başta aileme, bilgi ve birikimlerini benden esirgemeyerek her anlamda bana desteğini hissettiğim kıymetli hocam Doç. Dr. Çiğdem İçhedef'e saygılarımı ve sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

İZMİR

17/08/2020

Selin İrdel HAMURİŞÇİ



İÇİNDEKİLERSayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1 Nanoteknoloji	3
2.2 Kanser	4
2.3 Silika Nanoparçacıklar.....	5
2.4 Mezopor Silika Nanoparçacıklar	6
2.5 İlaç Taşıyıcı Nano Sistemler.....	8
2.6 İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Aktif Ve Pasif Hedefleme.....	9
2.6.1 Pasif hedefleme.....	9
2.6.2 Aktif hedefleme	10
2.7 Radyoışaretili İlaç Taşıyıcı sistemler	11
2.8 Teknesyum.....	13
2.9 Siklofosfamid.....	13
2.10 Fourier-Transform İnfared Spektroskopisi (FTIR)	15
2.11 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi	15
2.12 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) Analizi.....	16
2.13 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)	16
2.14 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	17
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	19
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	19

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.1.2 Kullanılan cihazlar	19
3.2 Mezopor Silika Nanoparçacıkların (MSN) Sentezi	20
3.3 Silika Nanoparçacıkların APTES ile Modifikasyonu	21
3.4 Aminosilan Kaplı Silika Nanoparçacıklara DTPA Konjugasyonu.....	21
3.5 İlaç Yükleme	22
3.6 Sentezlenen Silika Nanoparçacıkların Karakterizasyonu	22
3.6.1 FTIR Analizi	22
3.6.2 DLS ve Zeta Potansiyeli	23
3.6.3 SEM analizi.....	23
3.7 İlaç Hapsetme Kapasitesi	23
3.8 Radyoişaretleme.....	24
3.9 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi ile Radyoişaretleli Bileşiklerin Kalite Kontrolü	24
3.10 Stabilite Çalışması.....	25
3.11 Lipofilite.....	25
3.12 Hücre Kültürü Çalışmaları	25
3.12.1 Sitotoksikite Çalışmaları	26
3.12.2 İnkorporasyon Çalışması.....	26
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	28
4.1 Mezopor Silika Nanoparçacıkların Karakterizasyon Sonuçları.....	28
4.1.1 FTIR Analizi Sonuçları	28
4.1.2 DLS Analizi Sonuçları	29
4.1.3 SEM Analizi Sonuçları	31
4.1.4 Mezoporlu Silika Nanoparçacıklarının Siklofosfamid Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	33
4.2.İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) Çalışmalarının Sonuçları	34
4.3 Stabilite Sonuçları	37
4.4 Lipofilite Sonuçları	38
4.5 Hücre Kültürü Sonuçları	38

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.5.1 Sitotoksisite çalışması sonuçları	38
4.5.2 İnkorporasyon çalışması sonuçları	40
5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	44
6.KAYNAKLAR	45
TEŞEKKÜR	53
ÖZGEÇMİŞ	54

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1 Mezoporlu silika nanoparçacık morfolojisi	6
Şekil 2.2 Mezopor silika nanoparçacık	7
Şekil 2.3 İlaç taşımada akıllı uygulama için en çok kullanılan organik ve inorganik nanotaşıyıcı örnekleri	8
Şekil 2.4 Anti kanser ilaç taşıyıcı sistemlerde pasif hedefleme	10
Şekil 2.5 Anti kanser ilaç taşıyıcı sistemlerde aktif hedefleme ..	11
Şekil 2.6 Teknesyum-99m' in Kalay(II) klorür ile indirgenme reaksiyonu	13
Şekil 2.7 Siklofosfamidin moleküler yapısı	14
Şekil 2.8 TLRC şeridinin uygulanma mekanizması	17
Şekil 2.9 HPLC'nin şematik gösterimi	18
Şekil 3.1 Mezoporlu Silika Nanoparçacık'ların sentez mekanizması.....	21
Şekil 3.2 Mezopor silika nanoparçacıklarının yüzeyinin sırası ile APTES ve DTPA ile modifikasyonu	22
Şekil 3.3 Siklofosfamid yüklü mezopor nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi.....	24
Şekil 3.4 MCF-7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde zamana karşı bağlanma veriminin incelenmesi deneyinde kullanılan 24' lük flaskların genel yapısı.....	27
Şekil 4.1 Siyah spektrum yıkama yapılmamış MSN, turuncu spektrum yıkama yapılan MSN nano parçacıklarına ait FTIR spektrumları	28
Şekil 4.2 MSN-DTPA nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumu	29
Şekil 4.3 MSN nanoparçacıklarının boyut dağılım grafiği.	30
Şekil 4.4 Sentezlenen MSN nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği	31
Şekil 4.5 Sentezlenen MSN-DTPA nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği	31
Şekil 4.6 MSN parçacıklarına ait (a) 250000x ve (b) 80000x büyütmelelerinde ki SEM görüntüleri.....	32
Şekil 4.7 Siklofosfamid'e ait HPLC Kromatogramı	33
Şekil 4.8 Siklofosfamid'e ait Kalibrasyon Eğrisi.....	33
Şekil 4.9 (a) ^{99m} Tc, (b) indirgenmiş ^{99m} Tc, (c) ^{99m} Tc-MSN-CPH'ye ait SF banyosunda ki TLRC kromatogramları.....	36

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
Şekil 4.10 MCF7 hücre epiteli için 72. saatte % canlılık değerleri.....	39
Şekil 4.11 MDA-MB-231 hücre epiteli için 72. saatte % canlılık değerleri.....	40
Şekil 4.12 ^{99m} Tc-MSN-CPH, ^{99m} Tc- MSN ve ^{99m} Tc' un MCF7 hücreleri zerindeki zamana karşı % bağlanma verimi.....	41
Şekil 4.13 ^{99m} Tc-MSN-CPH, ^{99m} Tc- MSN ve ^{99m} Tc' un MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi.....	41

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
Tablo 4.1 ^{99m} Tc ile işaretli MSN-CPH'nin SF banyosunda ki Rf değeri ve radyoişaretleme verimi.....	34
Tablo 4.2 ^{99m} Tc-MSN-CPH 'nin 24 saat süresince stabilitesi.....	37
Tablo 4.3 MCF7 ve MDA-MB-231 hücre epitelleri için 72. saatte % canlılık değerleri.....	39
Tablo 4.4 ^{99m} Tc ile radyoişaretleli MSN-CPH' nin MCF7, MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi.....	40
Tablo 4.5 ^{99m} Tc-MSN'nin MCF7, MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi.....	41
Tablo 4.6 ^{99m} Tc'un MCF7, MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi.....	41

1. GİRİŞ

Nanoteknolojinin, son yıllarda ilaç taşıyıcı sistemler yoluyla hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılması nispeten yeni fakat hızla gelişen bir bilim dalı olmasını sağlamıştır. Nanoteknoloji, kronik insan hastalıklarının bölgeye özgü ve hedefe yönelik hassas ilaçların verilmesiyle tedavi edilmesinde birçok fayda sağlamaktadır. İlaç taşıyıcı sistemlerinin temel amacı, kemoterapötik ajanların biyoyararlanımını iyileştirerek yan etkilerini azaltmak ve sonuç olarak ilaçların etkinliğini arttırmaktır (Bhatnagar et al. 2016). Sağlık alanındaki en büyük zorluklardan biri, düşük toksisite ve en az yan etki ile kanserli hücelere kemoterapi ilaçlarının etkin bir şekilde yönlendirilmesidir. İlaç molekülünün sahip olduğu düşük çözünürlük nedeni ile hastanın, hastalık tedavisinde istenen terapötik etkiyi elde etmek için ilacı yüksek dozda alması gerekir. Bu nedenle ilaç uygulama yollarını çeşitlendirmek, zararlı ilaç yan etkilerini azaltmak ve spesifik bölgeleri hedeflemek için ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi yönünde artan bir talep vardır ve araştırmacılar bu talepler doğrultusunda yoğun çalışmalar gerçekleştirmektedirler. Bu hedeflere ulaşmak için blok kopolimerler, lipozomlar, dendrimer ve hidrojel gibi organik ve inorganik nanoparçacıklar materyal geniş bir şekilde araştırılmaktadır. Bu nanoparçacıklar arasından mezopor silika nanoparçacıkların (MSN) biyolojik olarak uyumlu olduğu, kimyasal ve termal olarak kararlı nanoparçacıklar olduğu bilinmektedir. Bu nanoparçacıkların sahip olduğu eşsiz yapısal özellikleri, ilacın yüklenmesini ve ilacın hedef bölgeye kontrollü bir şekilde verilmesini kolaylaştırır (Mehmood et al., 2017). Seçilen nanoparçacığa yüklenen ilaç istediğimiz doku ve hücreye ilaç hedefleme ile gönderilir. İlaç iletimi sırasında sağlıklı hücreleri yan etkilerden korumak için uygun dozda ilaç istenilen bölgelere iletilebilir (Tran et al., 2017).

Radyofarmasötikler nükleer tıpta tanı veya tedavi amacıyla kullanılan yapısında radyonüklid içeren aktif moleküllerdir. Bir radyofarmasötik radyonüklid ve farmasötik kısım olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Radyonüklid partikül veya ışın yayarak vücut dışından izlenebilen veya vücut içinde bulunduğu dokuyu tedavi edebilen bileşendir. Farmasötik ise fiziksel kimyasal veya biyolojik özelliklerine göre etkili olduğu organa veya dokuya tutunarak radyonüklid sayesinde ışına yaparak o dokunun bozukluklarını gösteren etken maddedir (Ünak et al., 2013).

Son yıllarda ilaç hedefleme amacı ile biyolojik olarak bozunabilir nanoparçacıkların geliştirilmesine büyük ilgi duyulmaktadır. Bu

nanoparçacıkların radyoişaretlenmesiyle yapılan görüntüleme ve tedavi çalışmaları da büyük ilgi görmektedir. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler hastalıkların tanısı, tedavisi ve önlenmesine büyük katkılar sağlamaktadır.

Lu ve arkadaşları, floresanla işaretlenmiş MSN'lerin (çap olarak 100-130 nm) intravenöz enjeksiyondan 4 saat sonra farelerin tümörlerinde seçimli bir birikim göstermişlerdir. Floresan sinyali 48 saat sonra kademeli olarak tüm vücutla aynı seviyeye inmiştir (Lu et al., 2010). Benzer sonuçlar Kim ve arkadaşları tarafından bulunmuş olup, 200 nm'den küçük MSN'lerin uygulamadan 24 saat sonra tümörde birikim gösterdiklerini bildirmişlerdir (Kim et al., 2008).

Cheng ve arkadaşları, metastatik kanserlerde aşırı eksprese edilen $\alpha\beta 3$ integrin reseptörü ile etkileşime giren arginin-glisin-aspartik asit kısaltması olan RGD peptidi yüklü MSN'leri in vitro olarak incelemişler ve siklik RGD (cRGD) yüklü MSN'lerin U87-MG hücreleri tarafından tutulum gösterdiklerini doğrulamışlardır (Cheng et al., 2010).

Bir başka çalışmada ise Luis ve arkadaşları tarafından SBA-16 mezoporus silika nanoparçacıkları sentezlenmiş ve Tc-99m ile radyoişaretlemesi yüksek verimle gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretli MSN lerin sağlıklı farelerde biyodağılım ve sintigrafi çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Luís et al., 2015).

Önerilen bu tez çalışmasında, gözenekli yapısı ve geniş yüzey alanları sayesinde yüksek ilaç hapsedme kapasitesine sahip uygun boyutta mezopor silika nanoparçacıkları (MSN) sentezlenmiştir. Bir antikanser ajanı olan siklofosfamid (CPH) sentezlenen MSN' lere yüklenmiş ve Tc-99m ile radyoişaretlenerek biyoetkinliği in vitro olarak incelenmiştir.

Bu sayede, sistemin gelecekte yapılacak olan çalışmalarda teşhis ve tedavi amaçlı kullanılabilir radyoişaretli nanoparçacıkların değerlendirilmesine ışık tutacağı düşünülebilir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, dünyada nüfus artışıyla birlikte zamanla kendini hissettiren çevre sorunları, besin ve enerjinin yetersizliği ile aynı zamanda sağlık alanındaki sorunlara da birçok bilim dalı ile birlikte çözüm aramakta olan ve 1980'lerden beri daha ciddi çalışmaların yapıldığı bir bilim dalıdır. Çok disiplinli bir bilim dalı olan nanoteknoloji, tıp ve biyomedikal uygulamalarda, nanoparçacıkların çevre dostu üretiminde ve böylelikle çevre kirliliğini önlemede, kozmetik, tekstil, optik, elektronik vb. gibi birden çok alanda kullanılmaktadır.

İnsan vücudundaki hücreler nanometre boyutunda olduğundan, nanoboyutlu parçacıklar doğal engelleri aşabildikleri için vücut içindeki hayati moleküllere ve hücre içindeki biyomoleküllere, dokulara ve organlara ulaşırlar (Sağlam ve Emul, 2016).

Nanoparçacıklar aynı zamanda kanserin erken teşhisinde ve sebeplerinin belirlenmesinde de önemli rol oynarlar. Kanser tedavisinde başarı sağlanabilmesi için erken teşhis çok önemlidir. Geleneksel yöntemlerin kanser teşhisinde yetersiz kaldığı yerde nanoteknolojik gelişmeler ön plana çıkmaktadır. Nanoteknoloji sayesinde nano boyutlu maddelere optik ve manyetik özellikler kazandırılabilir ve böylece bu malzemeler kanserli dokuların teşhisinde kullanılabilirler (Gordon et al., 2007).

Nanoparçacıklar, nanometre büyüklüğünde genellikle 100 nm'den küçük farklı şekil, bileşim ve yüzey modifikasyonlarına sahip organik nanoparçacıklar ve inorganik nanoparçacıklar olarak iki alt başlık altında incelenmektedir (Landfester, 2009). Organik nanoparçacıklar polimerler, lipidler, lipozomlar ve karbonlar ile örneklendirilirken, inorganik nanoparçacıklara ise altın nanoparçacık, gümüş nanoparçacık, demir nanoparçacık ve silika nanoparçacıklar örnek verilebilir.

Nanoparçacıklar çeşitli kimyasal yapıdaki malzemelerden elde edilebilir. En yaygın olarak kullanılanlar metaller, metal oksitler, silikatlar, karbon, lipidler ve biyomoleküllerdir. Aynı zamanda küreler, silindirler, trombositler ve tüpler gibi çeşitli morfolojilerde bulunabilirler (de Barros et al., 2012).

Nanoparçacık çeşitlerinden lipozomlar; boyutlarına, yüklerine ve lipit kompozisyonlarına göre sınıflandırılabilir. Boyut açısından lipozomlar üç kategoriye ayrılabilir: tek lamelli veziküller (25-100 nm), büyük tek lamelli veziküller (> 100 nm) ve çok lamelli veziküller (100-1000 nm) (Sahoo and Labhasetwar, 2003). Yüzeysel yük göz önüne alındığında, lipozomlar nötr veya yüklü olabilir. Negatif veya pozitif yüklü lipozomlar daha kısa yarılanma ömrüne, toksisiteye ve hızlı kandan temizlenme değerine sahiptirler (Soenen et al 2009).

Altın nanoparçacıklar ise biyouyumlulukları, biyomoleküllere kolay konjüasyonu ve lokalize yüzey plazmon rezonanslarının sağladığı benzersiz optik özellikleri sayesinde biyomedikal alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Hutter and Mysinger 2011). Altın nanoparçacıklar, altın nanoküreler, nanorodlar ve nanoyıldızlar gibi farklı şekillerde üretilebilir. Suda yeterli çözünürlüğe ve yüksek morfolojiye sahip boyut dağılımı ve yüzey işlevleri dahil olmak üzere istenen özelliklere sahip altın nanoparçacıklar biyolojik deneylerde kullanılırlar. Görüntüleme alanında ise altın nanoparçacıklar bilgisayarlı tomografi, raman spektroskopisi ve fotoakustik görüntüleme kullanılırlar (Xie et al.,2010).

Silika nanoparçacıklar, büyük miktarlarda biyoaktif molekülü absorplayabilen veya kapsülleyebilen yüzlerce boş kanal (mezopor) içeren petek benzeri gözenekli yapılardan oluşan katı malzemelerdir. Yüksek yüzey alanı, geniş gözenek hacmi, dar dağılımlı ayarlanabilir gözenek boyutu (2-10 nm) ve iyi kimyasal ve termal kararlılık gibi benzersiz özelliklere sahip bu nanoparçacıklar çeşitli kontrollü salım uygulamaları için uygun özelliklere sahiptirler (Kresge et al, 1992).

2.2 Kanser

Kanser kendiliğinden ve düzensiz olarak çoğalarak başlangıç noktasından kendi bölgesinin dışına ve yakındaki dokulara yayılabilen kontrolsüz hücre bölünmesi olarak tanımlanabilir. Kontrolsüz olarak bölünen bu hücreler buldukları doku ve organların görevlerini yerine getirmesini engellerler (Challapalli et al., 2017).

Geniş anlamda kanser 277'den fazla kanser hastalığı tipini ifade eder. Bilim adamları kanserin farklı evrelerini tanımlamışlardır. Bu da birkaç gen mutasyonunun kanser patogenezinde rol oynadığını göstermektedir. Bu gen mutasyonları anormal hücre çoğalmasına yol açmaktadır. Kalıtım veya kalıtım

faktörlerinin neden olduğu genetik bozukluklar, hücre büyümesinin artmasında çok önemli bir role sahiptir (Hassanpour and Denghani, 2013).

Kanser insan vücudunda sürekli olarak kontrol edilemeyen ve bölünen hücrelerden meydana gelmektedir. Hayati tehlike arz eden bu hastalığı tedavi etmek ve önlemek için yeni teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirilmeye çalışılmaktadır.

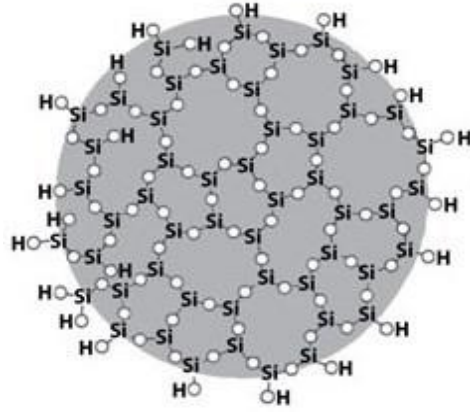
Sürekli artan kanser hücreleri ve tedavi yaklaşımlarının sınırlı kalmasından dolayı birçok kanser türünde hızlı ve sinsi bir şekilde ölüme yol açan evreler oluşmaya başlamaktadır. Kemoterapi gibi mevcut tedaviler yan etkileri ve seçiciliklerinin yetersiz kalması nedenleriyle hastaların sağlığına daha fazla zarar verebilmektedir.

Bu nedenle son yıllarda kanser gibi hastalıkların tedavisinde ilaç taşıyıcı sistemlerin önemi artmış ve sağlık alanında kullanılmaya başlanmıştır (Emadi et al., 2009).

2.3 Silika Nanoparçacıklar

Silika genellikle inorganik nanoparçacıkların biyolojik kullanımını sağlamak için tercih edilen bir malzemedir. Örneğin, kadmiyum sülfid ve selenid gibi silis kaplı yarı iletken kuantum dotların, birçok biyomedikal uygulama için çok önemli olan yüksek kararlılık, kimyasal olarak çok yönlülük ve biyouyumluluğa sahip oldukları belirlenmiştir (Zhu et al., 2007).

Ayrıca, kompozitlerin osteojenik özellikleri nedeniyle yapay implantların formülasyonunda da silika kullanılmıştır (Areva et al., 2007). Şekil 2.1'de MSN'nin morfolojisi görülmektedir.



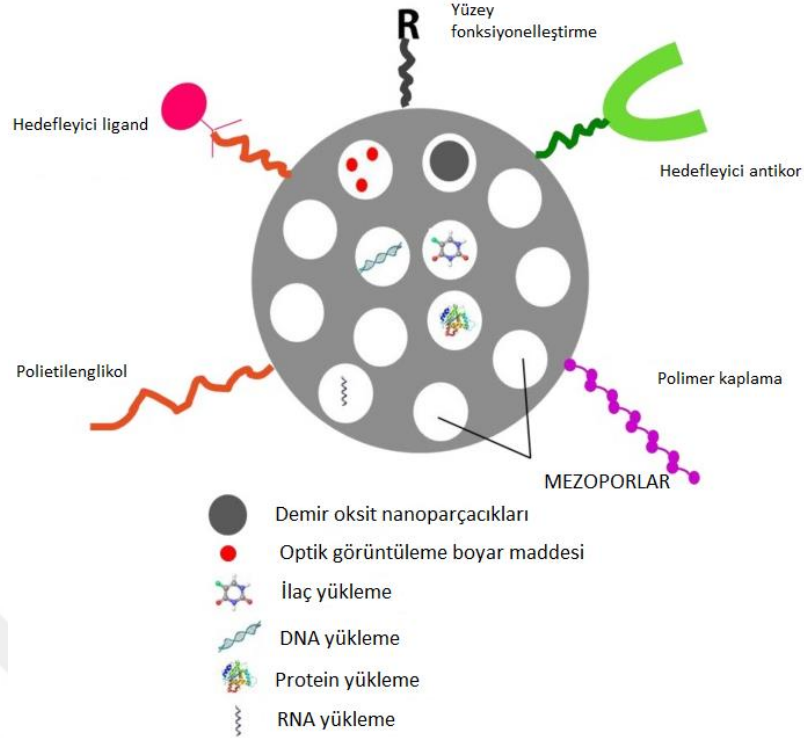
Şekil 2.1 Mezoporlu Silika Nanoparçacık morfolojisi

Silika nanoparçacıklar biyolojik uyumlulukları sayesinde zorlu hastalıkların tedavisinde fayda sağlayabilen özellikle kanser tedavisinde kullanılan faydalı nanoparçacıklar arasındadır. Silika nanoparçacıklar çok yönlülüğü, toksik olmaması ve yüksek yüzey alanına sahip olması sebebiyle sağlık alanında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Mehmood et al., 2017). Bununla birlikte suda çözünmemeleri nedeni ile zayıf geçirgen ilaçların ilaç verimini iyileştirmede büyük bir potansiyele sahiptirler. Silika nanoparçacıklar anti-kanser ilaçlar için hedeflenmiş ilaç taşıyıcı araçlar olarak kullanılmaktadırlar (Mamaeva et al., 2011).

2.4 Mezopor Silika Nanoparçacıklar

Bir silika nanoparçacık çeşidi olan mezopor silika nanoparçacıklar (MSN) ise yüzeyinde ki gözeneklerden homojen dağılım gerçekleştirdiği ve yüzey boyunca serbest dağılım sağlayabildiği için çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Mehmood et al., 2017).

Mezopor silika nanoparçacıkları 1990'ların başında yeni moleküllerin de keşfinden sonra büyük ilgi görmeye başlamıştır. Gözenekli yapısı ve vücut içinde sitotoksositeye neden olmadan hızlıca hücreye alınmaları sayesinde en yaygın kullanılan nanoparçacıklardan biri haline gelmiştir (Şekil 2.2) (Yang et al., 2011).



Şekil 2.2 Mezopor silika nanoparçacık (Narayan et al., 2018)

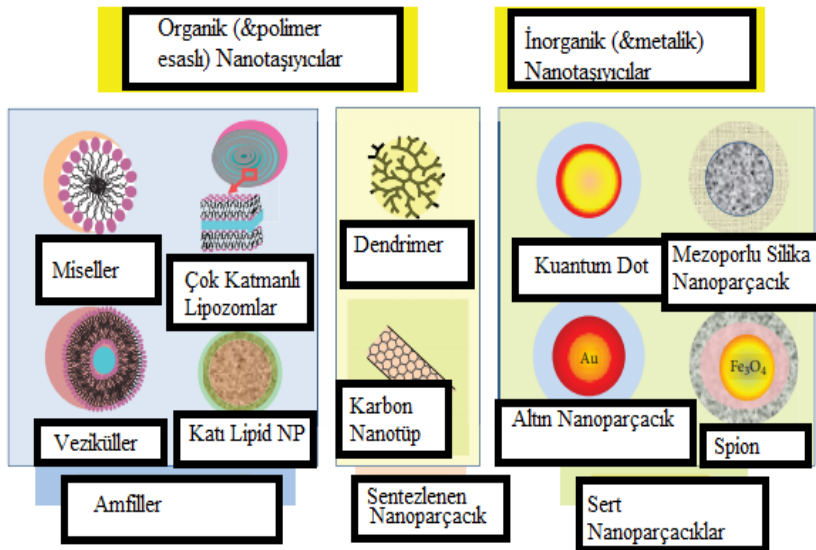
Kolloidal kimya ve buharlaşmaya bağlı olarak kendi kendine birleştirme yöntemi kullanarak düzgün boyutlu, gözenekli ve çözeltide kolaylıkla disperse olabilen nanoparçacıklar sentezleyebilme mezopor silika nanoparçacıklarının birçok uygulama alanına sahip olmasını sağlamıştır. MSN'lerin genellikle yüksek yüzey alanı ve gözenek boyutu, yüzey kimyasını bağımsız olarak değiştirebilme kabiliyeti, lipozomlar veya diğer yaygın ilaç taşıyıcı sistemlerden daha fazla seviyelerde ilaç yüklenmesini sağlamaktadır (tKresge et al., 1992). Mezopor silika nanoparçacıklarının bir diğer önemli özelliği de gözenek kanalları içerisinde ilacın yükleme kapasitesini arttıran dokusal özellikleri sebebiyle vücut içerisinde ilaç dağıtımı için mükemmel taşıyıcılar olduğu düşünülmektedir (Tasciotti et al., 2008).

Tıp alanındaki en önemli zorluklardan biri tümör hücrelerine minimum toksik yan etkisi olacak şekilde ilaç yüklenmesidir. Bu sorunun üstesinden gelmek için, farmasötik alanda terapötik ilacın hedef bölgeye verilmesine yardımcı olan çeşitli ilaç taşıyıcıları mevcuttur. Bu amaçla, mezopor silika nanoparçacıklarının biyouyumlu, kimyasal ve termal olarak kararlı nanoparçacıklar olduğu bulunmuştur. Benzersiz yapısal özellikleri, ilacın yüklenmesini ve daha sonra ilacın hedef bölgeye kontrollü bir şekilde verilmesini kolaylaştırır (Chou, 2011).

2.5 İlaç Taşıyıcı Nano Sistemler

Yeni ilaç molekülünün geliştirilmesi pahalı ve zaman alıcı bir süreçtir. İlaç tedavisi, doz titrasyonu ve terapötik ilaç izleme gibi farklı yöntemler kullanılarak “eski” ilaçların güvenlik etkinlik oranının iyileştirilmesi yönünde çalışmalara yönelmiştir. Kontrollü oranda ilaç verilmesi, ilacın yavaş taşınması, hedeflenmiş ilaç taşıma gibi avantajları sayesinde ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılması araştırmacılar tarafından büyük ilgiyle karşılanmıştır (Tiwari et al., 2012).

Kemoterapötik ilaçlar için kullanılan geleneksel ilaç taşıyıcı sistemlerin hafif toksisite, zayıf özgüllük ve ilaç direnci gibi bir dizi olumsuz özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler birçok ilaç sisteminin terapötik etkinliğini de hassas bir şekilde azaltmaktadır. Nano yapıları taşıyıcı sistemler kemoterapötiklerin taşınmasında kullanılan elverişli sistemlerdir. Mikron altı büyüklükte (tipik olarak <500 nm) kolloidal nanoparçacıklardan oluşan aktif ilaçlar genellikle yüksek yüzey alanı / hacim oranı ile karakterize edilir. Bu nanoyapılı prototipler, aktif (antikanser dahil) ilaçların hastalıklı dokulara etkili bir şekilde verilmesini sağlamıştır. Uygulamalarda ki genel hedef nanotaşıyıcıların kullanımı ile bir hastalığı minimum yan etki ile etkili bir şekilde tedavi edilmesidir. Modern akıllı nano yapıları sistemler genel olarak organik ve inorganik nano-taşıyıcılar olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. İlaç taşımada akıllı uygulama için en çok kullanılan organik ve inorganik nanotaşıyıcı örnekleri (Lombardo et al., 2019).

İlaç taşıyıcı nanosistemlerin fizyokimyasal özelliklerini, bileşimlerini (organik, inorganik veya hibrit), boyutlarını (küçük veya büyük boyutlar) ve şekillerini (küre, çubuk, aşırı dallanmış, çok katmanlı veya çok katmanlı yapılar) değiştirerek ayarlanabilir yüzey özelliklerine sahip olurlar. Böylece istenilen hedefe uygun ilaç taşıyıcı sistem tasarlanması mümkün olmaktadır. Çeşitli hastalıkların (tümörler dahil) tedavisi için bir dizi nano ilaç taşıyıcı sistem yetkililer tarafından onaylanmış olsa da, birçoğu halen daha farklı klinik aşamalarda (Lombardo et al., 2019).

2.6 İlaç taşıyıcı sistemlerde aktif ve pasif hedefleme

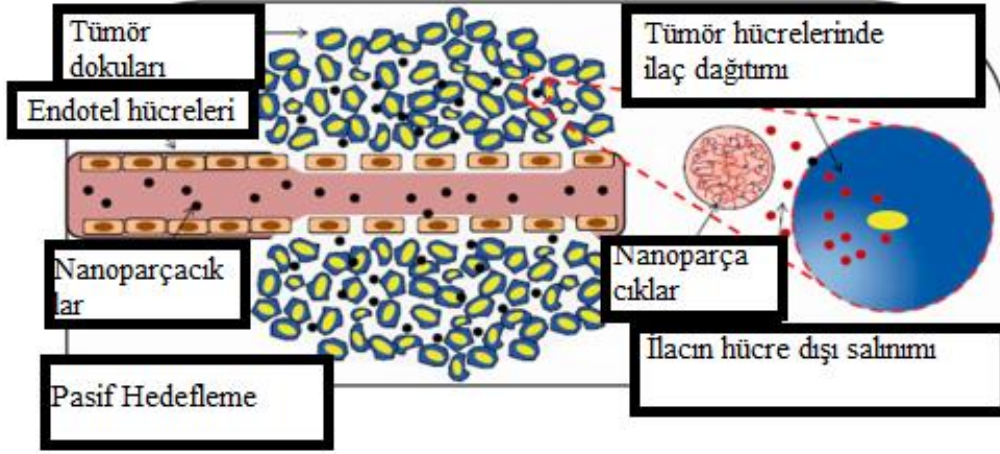
Günümüzde nükleer nanotıp alanındaki çalışmaların büyük çoğunluğu kansere odaklanmıştır. Nanomalzemeler genellikle geçirgenlik ve tutma etkisi (EPR) yoluyla, tümör endotelial hücrelerinde, gelişmiş olarak bilinen bir mekanizma vasıtasıyla tutulum gösterebilir. EPR etkisinin keşfi hedeflenen antitümörün tedavisinin gelişmesine yol açan en büyük atılımlardan biri olarak kabul edilir.

EPR etkisi ilk kez 1986 yılında Matsumura ve Maeda tarafından neokarzinostatin ve poli (stiren-ko-maleik asit) konjugatlarının in vivo davranışı incelerken rapor edilmiştir (Matsumura and Maeda, 1986). Belirli boyutlardaki nanoparçacıklar normal dokularda tümör dokularında olduğundan çok daha fazla birikme eğilimindedir. Ancak ilaç tutulumu vaskülarizasyonu zayıf olan daha büyük tümörler için mümkün olmamaktadır. Modern kanser tanı ve tedavisinde, ilacın hedef hücreler tarafından alınımını kolaylaştırmak için antikorlar, aptamerler, peptitler ve diğer ligandları kullanarak yeni radyoaktif nanoyapı formülasyonlarının yaratılmasına büyük önem verilmektedir. Şimdiye kadar, etkili hedeflenmiş radyofarmasötik terapötikler, birkaç tümör tipi için geliştirilmiş ve valide edilmiştir (Rizzo et al., 2013; Farzin et al., 2018).

2.6.1 Pasif hedefleme

Pasif hedefleme ile tümörlerde yüksek ilaç konsantrasyonu ve normal dokularda ilaç toksisitesinin azalması sağlanmıştır. Pasif hedeflemede ilacın başarısı dolaşım süresi ile doğrudan ilgilidir (Ulbrich et al., 2016). EPR etkisi yoluyla NP' lerin kanda uzun süre kalması ve etkilenen patolojik bölgelerde birikmesi beklenir. Aslında, yeniden tasarlanmış en uygun boyuta sahip NP' ler tümör dokusunda birikmek için EPR etkilerine sahip olabilir. Bunlara ek olarak,

PEG hedefleyici ilaç taşıyıcı sistemlerde suda çözünür ve biyolojik olarak uyumlu bir polimer olarak yaygın olarak kullanılmaktadır.



Şekil 2.4. Anti kanser ilaç taşıyıcı sistemlerde pasif hedefleme (Baas et al., 1994).

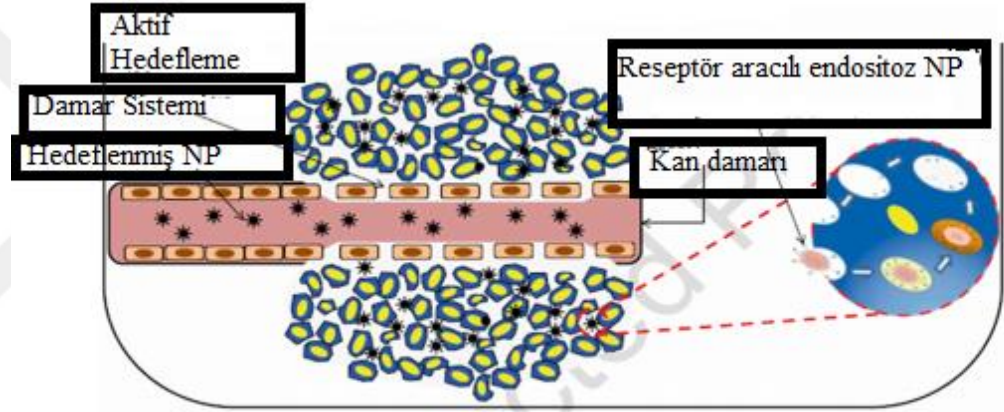
PEGilasyon, nanofarmasötiklerin çözünürlüğünü, boyutunu, moleküler kütlelerini ve serum stabilitesini artırır. PEG bazlı amfilik malzemeler kendi kendine toplanabilir sulu ortamda nanofarmasötiklere dönüştürülür ve retiküloendotelyal sistemin (RES) NP'lerin tanınmasını azaltacak ve dolaşım yarı ömrünü uzatacak gizli yüzeyler oluştururlar (Chen et al., 2016). RES, yabancı fagositozu gerçekleştirebilen monositlerden inen hücrelerden, malzemelerden ve parçacıklardan oluşur. RES' in %90'ı karaciğerde toplanır. PEGillenmiş nanoparçacıklar karaciğer ve dalağın RES' lerinden kaçabilen, kanda uzun bir dolaşıma sahip olan ve sızan tümör dokularındaki EPR etkisi ile pasif hedeflemeye izin verir (Baas et al., 1994; Farzin et al., 2018).

2.6.2 Aktif hedefleme

EPR etkisi ile pasif hedefleme tümör hedeflemede fırsat sağlamasına rağmen, pankreas kanseri gibi düşük vasküler geçirgenlikli kanserlere uygulanamaz. Bir hedefleme stratejisi olmadan bu tümör tipine bağlı alım, tüm tümörlerin EPR'ye bağımlı tutulumlara uygun olmadığını veya hedeflenmemiş NP uygulamasına olumlu yanıt vermediğini gösterir. (Hansen et al., 2015). Buna ek olarak, pasif hedefleme genellikle tümörlerde ilaç birikimi ve PEGilasyon için yeterli değildir.

Göreceli tümör seçiciliği gösteren pasif hedeflemeden farklı olarak, aktif hedefleme nanotaşıyıcı daha yüksek tümör içi birikim göstererek ilacın daha yüksek hücresel konsantrasyonu ulaşmasını sağlar. Bu nedenle, spesifik hücreleri veya dokuları seçici olarak tanıyabilen aktif hedefleme sistemlerinin geliştirilmesi tercih edilmektedir. İlaçların aktif hedeflenmesi kavramı, antikolar, aptamerler, peptitler gibi spesifik ligandların nanotaşıyıcıların veya NP' ların yüzeyine modifiye edilmesi ile hücre yüzeyinde bulunan yapılarla spesifik etkileşimi prensibine dayanmaktadır.

NP'ler yüksek yüzey alanı / hacim oranlarına sahip olduklarından, NP biyodağılımını şekillendirmek, spesifik olmayan alımı azaltmak ve biyolojik bir el sıkışmasını taklit etmek için yüzey yükü, polimerik kaplama ve spesifik hedefleme ligandlarının eklenebileceği ideal platformlar haline gelmiştir (Farzin et al., 2018).



Şekil 2.5 Anti kanser ilaç taşıyıcı sistemlerde aktif hedefleme (Baas et al., 1994).

2.7 Radyoişaretli İlaç Taşıyıcı sistemler

Moleküler görüntüleme karakterizasyonu ve ölçümü biyolojik sürecin moleküler ve hücresel düzeyde in vivo olarak gerçekleşmesi olarak tanımlanabilir (Weissleder et al., 2001). Bugüne kadar kanser teşhisi için çeşitli moleküler görüntüleme yöntemlerinden faydalanılmıştır. Pozitron emisyon tomografisi (PET), tek foton emisyon tomografisi (SPECT), moleküler manyetik rezonans görüntüleme (mMRI) , kontrastlı ultrason (CEU), optik biyoluminesans ve optik flüoresans (Massoud.,et al 2003) bunlardan birkaçı olarak sıralanabilir. Her

görüntüleme yönteminin kendine özgü avantajları ve sınırlamaları vardır. Örneğin, radyonüklid temelli görüntüleme teknikleri olan PET ve SPECT yüksek hassasiyete sahip olmalarına rağmen diğer görüntüleme tekniklerine göre zayıf uzaysal çözünürlüğe sahiptirler. MRI yüksek uzamsal çözünürlüklü görüntüler sağlarken yumuşak doku kontrastı görüntülemeye çok başarılı değildir (Cherry, 2006).

Nanoparçacıklar hedefe özgü kanser tanısı görüntülenmesinde kullanılırlar. Radyoaktif işaretli nanoparçacıklar genellikle çekirdek, radyoizotop ve hedefleyici biyomolekül olmak üzere üç ana bileşene sahiptirler. Hedefleyici biyomolekül, radyoizotopun spesifik olarak verilebilmesi için bir taşıyıcı görevi görmektedir. Radyonüklid doğrudan nanoparçacık yüzeyine çeşitli işaretleme yöntemleri ile konjuge edilebilir. Radyoizotop ayrıca bir bağlayıcı vasıtasıyla nanoparçacık yüzeyine dolaylı olarak da bağlanabilir. Bağlayıcı eleman basit bir hidrokarbon zinciri, peptit veya bir polietilen glikol birimidir. Radyoaktif işaretli nanoparçacıklar aynı zamanda kontrast ajan olarak da kullanılabilir (Wang et al., 2013).

Nanoteknoloji sağlık alanında devrim yaratma konusunda büyük araştırmaların gerçekleşebileceğini vaad etmektedir. Nanoparçacıkların ilaç taşıma, gen terapisi, teşhis ve daha fazlası için bir çok araştırma, geliştirme ve klinik uygulama alanları bulunmaktadır (Hong et al., 2009).

Nanoteknolojide genellikle birkaç yüz nanometreden daha küçük boyutlar söz konusudur. Nanoparçacıklar küçük boyutları sayesinde hem kanser hücresi yüzeyinde hem de kanser hücresi içindeki biyomoleküllerle etkileşime girerler). Ayrıca geniş yüzey alanı/hacim oranına sahip olmaları sayesinde kolayca ilaç yükleyebilme özelliğine sahiptirler. Nanoparçacıkların hedef bölgeye ulaşmak için yüzey modifikasyonlarına elverişli olmaları tümör bölgelerini spesifik hedeflemede yüksek verimliliği sağlayabilmektedir. Bir radyonüklid ile işaretlendikten sonra, fonksiyonelleştirilmiş nanoparçacıklar nükleer görüntüleme için yeni bir moleküle dönüşürler. Bu nedenle son yıllarda klinik öncesinde radyoaktif işaretli nanoparçacıkları kullanan kanser görüntüleme araştırmalarına büyük ilgi vardır.

Radyoaktif işaretli nanoparçacıklar, klinik uygulamalar için büyük potansiyele sahip yeni bir ajan sınıfını temsil etmektedir. Bu potansiyel kısmen uzun kan dolaşım süresi ve plazma stabilitesinden kaynaklanmaktadır. Bunlara ek

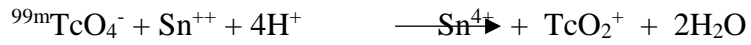
olarak, radyoişaretli bileşiklerle görüntülemenin yüksek duyarlılığı sayesinde hastalıkların doğru ve erken teşhisi gerçekleştirilebilmektedir (De Barros et al., 2012; Mirshojaei et al., 2016).

2.8 Teknesyum

Teknesyum-99m (^{99m}Tc) 6,02 saatlik yarı ömre ve 140,5 keV'lik gama enerjisine sahiptir. Teknesyum-99m ucuz bir maliyete sahiptir ve kolay elde edilebilir. Görüntüleme çalışmaları için uygun foton enerjisine sahip olması nedeniyle biyodağılım, ilaç hedefleme, moleküler görüntüleme uygulamalarıyla birlikte ilaç taşıyıcı sistemlerin de hazırlanmasında sıklıkla kullanılan önemli bir radyonüklidtir (He et al., 2016).

Gama ışını ve pozitron yayan radyonüklidler genellikle teşhis amacıyla kullanılırken, beta ışını yayan radyonüklidler ise tedavi amacıyla kullanılmaktadırlar. ^{99m}Tc ' in $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratöründen kolayca elde edilebilir olması, üretim maliyetinin düşük olması ve 6,02 saatlik yarı ömre sahip olmasından dolayı görüntüleme için ideal bir radyonüklidtir. ^{99m}Tc aynı zamanda farmasötiklerin işaretlenmesinde ve medikal uygulamalarda da sıklıkla tercih edilen bir radyonüklidtir (Miranda et al., 2018; Monteiro et al., 2017; Saied et al., 2017).

Genelde ^{99m}Tc kompleksleri perteknetatın kalay klorür gibi indirgeyici ajanla indirgenmesi ve indirgenmiş ^{99m}Tc ile oda sıcaklığında gerçekleşen basit bir reaksiyon ile hazırlanır. Aşağıdaki denklem bize $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ' nin kalay(II) klorür ile asidik ortamda indirgenmesini göstermektedir (Ünak et al., 2018).

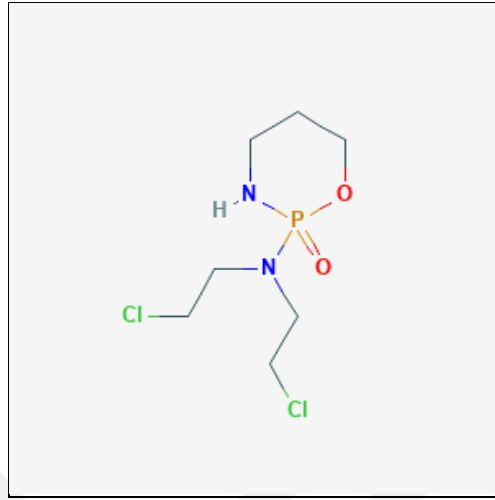


Şekil 2.6 Teknesyum-99m' in kalay(II) klorür ile indirgenme reaksiyonu

2.9 Siklofosfamid

Siklofosfamid (CPH) şimdiye kadar sentezlenen en başarılı anti kanser ajanlarından birisidir. Sentezinden 50 yıl sonra, günümüzde de kemoterapötik bir ajan olarak kan ve kemik iliği transplantasyonu için mobilizasyon ve kondisyonlama amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır . Kanser tedavisi için ilk

linik deneyler 1958'de yapılmış olup 1959 yılında FDA tarafından onaylanan sekizinci sitotoksik ajan siklofosfamid olmuştur.



Şekil 2.7 Siklofosfamid moleküler yapısı

Siklofosfamidin kimyasını ve farmakolojisini gözden geçirmek, geniş terapötik uygulanabilirliğini anlamak için çok önemlidir. 1958'de CPH sentezlenmesi amacıyla kanser hücreleri için daha fazla seçicilik elde edilmeye çalışılarak azot hardallarının kimyasal yapısı değiştirilmeye çalışılmıştır.. Azot hardalının kimyasal yapısını değiştirme çabaları bazı kanser hücrelerinin fosfor-azot (P-N) bağını parçalayabilen, azot hardalını serbest bırakabilen, fosfoamidaz salgıladığı gerekçesine dayanmaktadır. Böylece, siklofosfamid, kanser hücrelerini seçici olarak hedeflemek için tasarlanmış ilk ajanlardan biri olarak kullanılmaya başlanmıştır. Siklofosfamid aslında metabolik aktivasyon gerektiren bir ilaç olmasına rağmen, fosfoamidaz aktivasyonu sayesinde hedeflenen dokuya antikanser tedavisi olarak işlev görebileceği ortaya çıkmıştır (Emadi et al., 2009).

CPH geniş kanser endikasyonu olan birkaç ilaçtan biridir. Malignitelerde tek bir ajan olarak etkili olmasına rağmen, genellikle diğer antineoplastik ajanlarla birlikte kombinasyon halinde kullanılır. Birçok katı tümörün tedavisi için daha yeni ajanlar (platin, taksanlar ve hedefe yönelik tedaviler gibi) ikame edilmiş olsa da, bu endikasyonların çoğu için CPH oldukça aktif ve kullanıma uygundur (Bokhari et al., 2018).

2.10 Fourier-Transform Infrared Spektroskopisi (FTIR)

Orta-kızılötesi (IR) spektroskopisi, kimyasal bileşiklerin yapısal analizinin yapılması ve aynı zamanda kimyasal bileşiklerin tanınması için uygulanan bir tekniktir. Son yirmi yıl içerisinde IR spektroskopisi geliştirilerek Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisine evrilmiş ve bu şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Ismail van de Voort and Sedman 1997). FTIR ışıktaki kızılötesi yoğunluğa karşı dalga sayısını ölçerek, moleküllerin kimyasal yapısını karakterize etmeye yarayan bir yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinde kızıl ötesi bölgesi 10 cm^{-1} ile 14000 cm^{-1} arasına denk gelir (Skoog 1998). Molekül bağları titreşim ve dönme hareketleri gerçekleştirir. Bu hareketlerin sonucunda kızıl ötesi bölgede absorpsiyon pikleri yer değiştirir. Her molekülün farklı karakteristik piklere sahip olması, bu bileşiklerin yapısında bulunan fonksiyonel gruplar, bu gruplarda bulunan bağların durumu ve yerleri ile bileşiğin kimyasal yapı karakterizasyonu FTIR spektroskopisiyle gerçekleştirilir.

2.11 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi

Parçacık büyüklüklerinin belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden biri dinamik ışık saçılımı (DLS) yöntemidir. Çözelti içerisinde bulunan çözünmüş veya dağıtılmış haldeki parçacıkların rastgele hareketleri sonucunda saçılan ışığın şiddetinin ve ışıktaki değişiminin ölçülmesine dayanır. Bu rastgele harekete ‘‘brownian hareketi’’ denir. Parçacığın hareketine, buna bağlı olarak parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine ve sıcaklığa bağlı olarak saçılan ışığın şiddeti değişir .

DLS cihazında aynı zamanda nanoparçacık sisteminin zeta potansiyel değeri de ölçülebilmektedir. Zeta potansiyelinin büyüklüğü, kolloidal sistemin potansiyel kararlılığı hakkında bir fikir verir. Sulu sistemde dağıtılmış kolloidal parçacıkların çoğu belirli bir yüzey yüküne sahiptir. Bu yüzey yükünün, parçacığın ve bunu çevreleyen ortamın içeriğine bağlı olarak birçok kaynağı vardır. Yüklü parçacıkların birbirlerini itme kuvvetleri ne kadar yüksek ise parçacıkların aglomere olarak çökme olasılıkları o oranda düşük olmaktadır yani kararlıdırlar. Eğer parçacıkların düşük zeta potansiyeli değerleri varsa, parçacıkların bir araya gelmesini ve çökme oluşumunu engelleyen bir kuvvet bulunmaz yani kararsız bir yapıdadırlar. Kararlı ve kararsız dağılımlar arasında bir ayırma çizgisi vardır ve bu değer genellikle $+30$ veya -30 mV ta alınır. Bu aralık dışında kalan parçacıklar kararlı olarak kabul edilir (Teksöz vd., 2015).

2.12 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi

Yirminci yüzyılda teknolojinin gelişmesiyle görüntü iletimini sağlayan ışık yollarının merceklerle değiştirilerek çok küçük ayrıntıların görülebilmeye imkân sunan optik sistemler geliştirilmiştir. Ancak bu sistemlerin büyütme oranlarının sınırlı kalması ve görüntü üzerinde işlem yapılmasına olanak tanınamaması araştırmacıları daha ileri sistemler geliştirmeye zorlamıştır. Elektronik ve optik sistemlerin birlikte kullanımı ile yüksek büyütme oranlarında işlem ve analizlerin yapılabildiği görüntülerin elde edildiği yeni sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerin başında elektro optik prensipler çerçevesinde tasarlanan taramalı elektron mikroskobu (SEM) gelmektedir (Zhou and Wang, 2007). Taramalı elektron mikroskobunun prensibi elektronların yüksek voltaj sayesinde yeterince hızlandırılarak örnek ile etkileşime geçmesidir. SEM, katı örneklerin yapısal analizlerinde ve parçacık büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

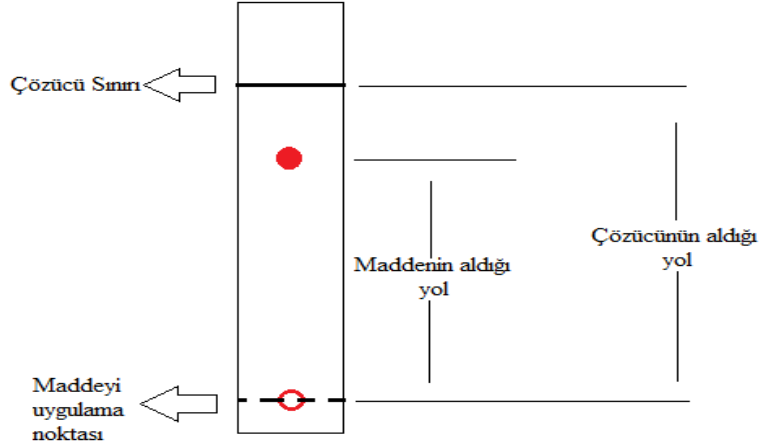
SEM, (3x-1000000x) ile geniş bir büyütme aralığına sahip olduğundan örnekleri ayırt etmek için sıklıkla kullanılır. Odaklanan elektronlar ve elektromanyetik mercekle sistemleri örnek atomları ile etkileşime geçerler. Böylelikle örnek yüzeyi üzerinden x-ışınları açığa çıkar. Açığa çıkan bu x-ışınlarını ve elektronları algılayan dedektörler, görüntüleme ve EDX (Enerji Dağılımlı x-ışınları spektrometresi) element analizi gerçekleştirir. SEM görüntüsündeki hedef bölge üzerinde yoğun olan elementin hangisi olduğu tespit edilebilir (Karaduman et al., 2017).

2.13 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Bir kromatografi çeşidi olan ince tabaka kromatografisi, hızlı sonuç alınması ve kullanımının basit olması dolayısıyla en çok kullanılan kromatografi tekniklerinin başında gelmektedir. İki fazdan oluşur; bunlar durgun ve hareketli fazdır. Durgun faz olarak selüloz ile kaplı kâğıt ve silika jel kullanılır. Çözücü veya çözücü karışımları ise hareketli faz olarak kullanılır (Erdik vd., 2000).

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz olarak kullanılan plakanın tabanına örnek damlatıldıktan sonra hareketli faz olarak kullanılan ve içerisinde çözgenin bulunduğu cam banyo tankına daldırılır ve çözgenin plakanın yukarısına doğru sürüklenmesi sağlanır. Plakaların üzerinde bulunan kapiler etkisi bu sürüklenmenin sebebidir. Böylece radyofarmasötik ve radyokimyasal safsızlıklar sabit faz boyunca ayrılmaktadır (Aydın, 2018).

Damlatılan maddenin TLRC şeridi üzerinde yürümesi, R_f değeri olarak bileşenlerin yürüme mesafesinin, çözücünün yürüme mesafesine bölünerek bilgisayar ortamında hesaplanmaktadır (Şekil 2.4) (Aydın, 2018).

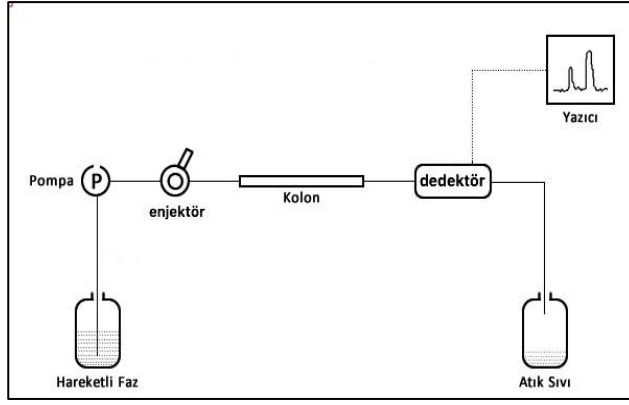


$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$

Şekil 2.8 TLRC şeridinin uygulanma mekanizması (Aydın, 2018).

2.14 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), genellikle karışımların tanımlanması, içerisindeki aktif bileşiklerin ayrılması ve incelenmesi için kullanılır. HPLC spesifik bir kolon kromatografisi biçimidir. HPLC iki ayrı fazdan oluşur bunlar; sabit faz ve hareketli fazdır. HPLC'nin çalışması sabit faz olarak kullanılan kolondan, hareketli fazların sürüklenmesi ve dedektör yardımıyla dedekte edilmesi prensibine dayanır. Sabit faz ile analiz edilen moleküller ve kullanılan çözücüler arasındaki etkileşime bağlı olarak kolondaki tutulma süreleri değişmektedir. Bu etkileşim ile birlikte her maddenin kolondaki tutulum süresi değişmekte ve kromatogramda farklı pikler elde edilmesini sağlanmaktadır. HPLC'nin şematik gösterimi Şekil 2.9 'da verilmiştir (Saito, 2004).



Şekil 2.9 HPLC'nin şematik gösterimi

Uygulama alanı oldukça geniş bir kalite kontrol yöntemi olan HPLC farmasötik uygulamalarda, farmasötik ürünlerin raf ömrü tayininde, dozaj ayarlamalarında aktif bileşenlerin tanımlanmasında, kalite kontrolde; çevresel uygulamalarda ve fenolik bileşiklerin tespitinde kullanılır. Adli tıp alanında ise biyolojik numunelerde ilaçtaki miktarın belirlenmesinde, serum, idrar ve terde steroidlerin tanımlanmasında, tekstil boyalarının adli analizinde ve kandaki kokain ve diğer metabolitlerin belirlenmesinde kullanılır. Klinik alanda da çeşitli uygulamalarda HPLC den yararlanılmaktadır. Bunlar; insan idrarındaki iyon miktarının belirlenmesi, kandaki antibiyotik analizi, beyin hücre dışı sıvılarında endojen nöropeptitlerin tespiti vb. alanlardır (Malviya, 2014).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- Metanol (CH₃OH) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- %0,9 NaCl çözeltisi (SF)
- Tetraetilorosilikat (TEOS)
- N-etiltrimetil amonyum bromür (CTAB)
- Etanol (C₂H₅OH) (Merck)
- Piridin (C₅H₅N) (Merck)
- N-oktanol (C₁₈H₁₈O) (Merck)
- Dimetilformamid (C₃H₇NO) (Merck)
- Toluen (C₇H₈) (Merck)
- Aminopropiltriepoksisilan (C₂H₅O)₃SiC₃H₆NH₂ (APTES)
- Aseton (C₃H₇OH) (Merck)
- Trietanolamin (TEA)
- Pentetik asit (C₁₄H₂₃N₃O₁₀) (DTPA) (Merck)
- Silika kaplı alüminyum şeritler (Merck)
- Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck)

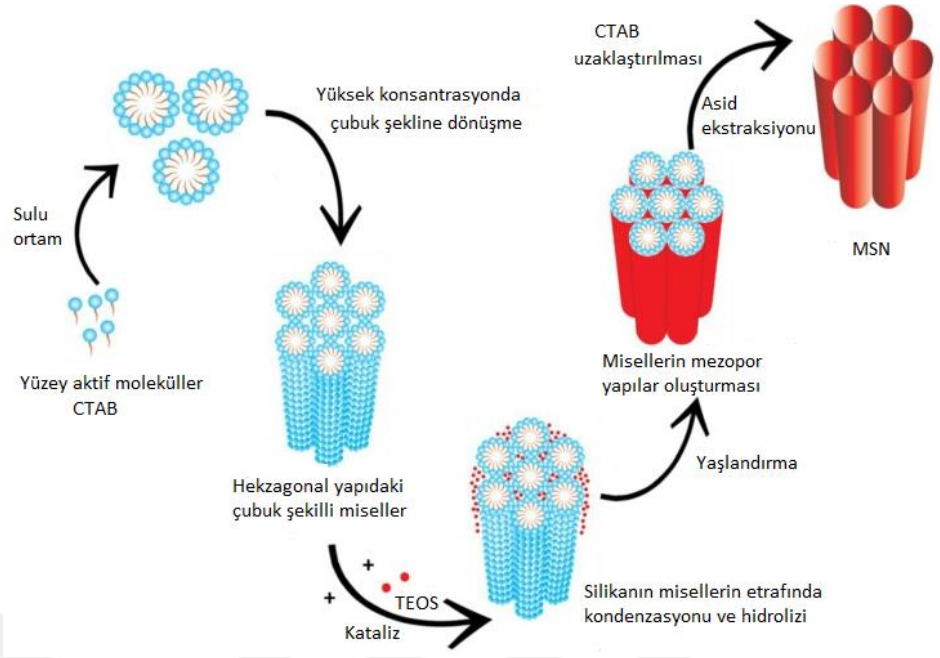
3.1.2 Kullanılan cihazlar

- Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) (Shimadzu) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Boyut analizi ve DLS Zeta potansiyeli (Malvern Zetasizer Nano ZS) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- İnce tabaka kromatografisi (TLC) Tarayıcı (Bioscan AR-2000) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- TLC banyoları (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Liyofilizatör (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)

- Laminar akış steril Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- CO₂ inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Santrifüj cihazı (Hettich) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- SEM (Taramalı elektron mikroskobu) (Ege Üniversitesi-MATAL)

3.2 Mezopor Silika Nanoparçacıkların (MSN) Sentezi

Silika nanoparçacık sentezindeki ilk amacımız silika nanoparçacıkların mezoporlu yapı oluşturmaktır. Bu mezoporlu yapıyı elde edebilmek için 1 gr N-etiltrimetilamonyum bromür (CTAB) , 80 µL trietanolamin (TEA) ve 20 mL ultra saf su 1 saat boyunca 650 rpm ve 95 °C' de karıştırılmıştır. Ardından karışıma 1,5 mL tetraetilorosilikat (TEOS) damla damla eklenerek 1 saat daha karıştırılmıştır. Karıştırma süresi sonunda oluşan süspansiyon soğumaya bırakılıp daha sonra reaksiyona girmeyen kimyasalların uzaklaştırılması için 2 kez etanol ile santrifüjleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra silika nanoparçacıkların içerisinde kalan CTAB'ı uzaklaştırmak amacıyla nanoparçacıklar geri soğutucu düzenekli bir sistem yardımıyla 1 mL hidroklorik asit (HCL) ve 20 mL metanol içerisinde cam balona koyularak 1 gece boyunca 60 °C 500 rpm'de karışmaya bırakılmıştır. Bu işlem 2 kez daha tekrarlanmıştır. Son yıkamadan sonra oluşan saydam renkli süspansiyon santrifüjlenmiş ve MSN etüvde 50 °C' de kurutulmuştur. MSN' nin sentez mekanizması Şekil 3.1' de verilmiştir. CTAB'ın uzaklaşp uzaklaşmadığını kontrol etmek için FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi yapılmıştır. İlgili FTIR sonuçları bölüm 4.1.3' de verilmiştir.



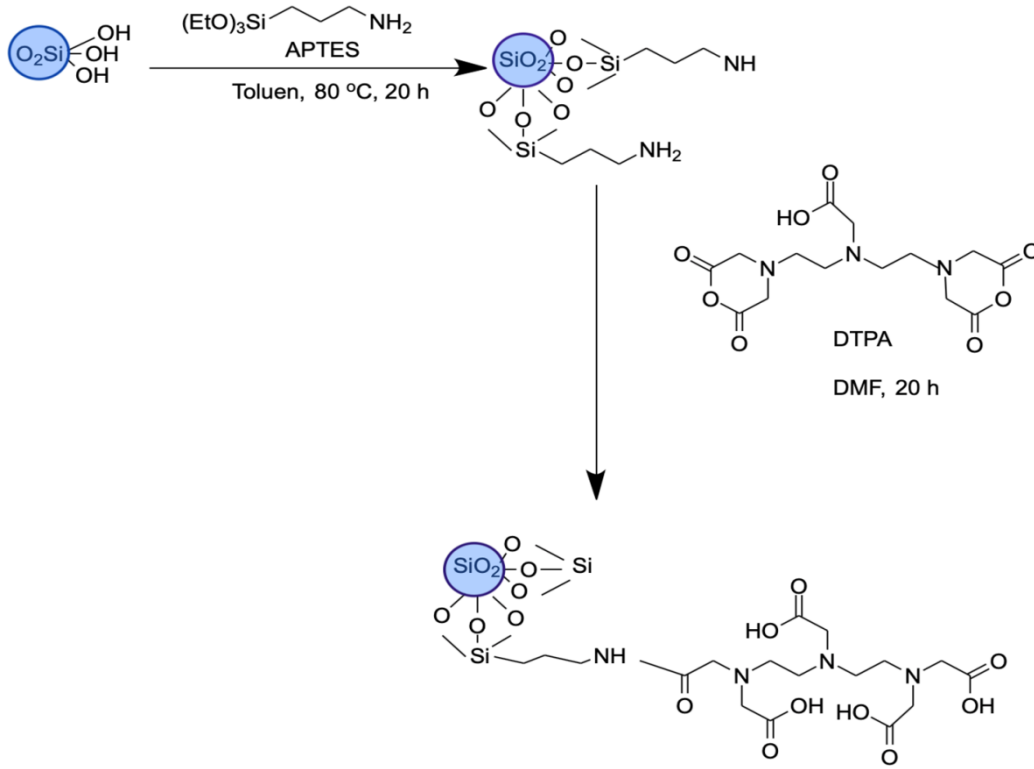
Şekil 3.1 MSN'lerin sentez mekanizması

3.3 Silika Nanoparçacıkların APTES ile Modifikasyonu

Mezopor silika nanoparçacıkları aminosilan ile kaplamak için 400 mg silika ve 10 mL Toluene (C_7H_8), 400 mL 3- Aminopropyltriethoxysilane (APTES) de ilave edildikten sonra geri soğutucu düzenekli bir balon içerisinde $80^\circ C$ ve 500 rpm'de 6 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmaya bırakılmıştır. Karışım sonunda süspansiyon 2 kez etanol ve bir kez aseton ile 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Yıkama işlemi sonunda üst fazlar uzaklaştırılmış ve böylece MSN-NH₂ elde edilmiştir.

3.4 Aminosilan Kaplı Silika Nanoparçacıklara DTPA Konjugasyonu

MSN'lerin ^{99m}Tc ile işaretlenebilmesi için nanoparçacıklara dietilentriaminpentaasetik dianhidrit (DTPA) şelatlayıcı konjugasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 100 mg MSN, 5 mL dimetilformamid ve 100 mg DTPA 1 gece boyunca $80^\circ C$ 'de geri soğutucu düzeneğinde karıştırılmıştır. Daha sonra elde edilen süspansiyon bir kez dimetilformamid (DMF) ve bir kez de aseton ile 10000 rpm ve 10 dk boyunca santrifüjlenmiş ve üst fazlar uzaklaştırılmıştır. Elde edilen MSN-DTPA daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere liyofilize edilmiştir. Mezopor silika nanoparçacıklarının yüzey modifikasyonu Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2 Mezopor silika nanoparçacıklarının yüzeyinin sırası ile APTES ve DTPA ile modifikasyonu

3.5 İlaç Yükleme

Bölüm 3.4' te sentezlenen 25 mg MSN-DTPA ve 5 mg siklofosfamid oda sıcaklığında 5 mL etanol içerisinde 2 gece boyunca karışmaya bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda nanoparçacıklar 2 kez bidistile saf su ve ardından 2 kez etanol ile 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj edilerek yıkanmıştır.

3.6 Sentezlenen Silika Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

3.6.1 FTIR Analizi

MSN, MSN-NH₂ ve MSN-DTPA sentezlerinin fonksiyonel grup analizleri Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü'nün, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalında bulunan 350-6000 cm⁻¹ dalga boyu aralıklarında ve oda sıcaklığında ölçüm yapabilen, FTIR (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar bölüm 4.1.1' de verilerek değerlendirilmiştir.

3.6.2 DLS ve Zeta Potansiyeli

MSN'nin sıvı ortamında ortalama parçacık boyutunu belirlemek amacıyla Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalında bulunan Malvern Nano-ZS marka DLS cihazı kullanılmıştır. Analiz yapılmadan önce ultra saf su içerisinde dağıtılan MSN'ler ultrasonik banyoda 15 dakika boyunca bekletilmiştir. Daha sonra nanoparçacıklar 0,45 µm Millipore filtreden geçirilerek DLS' de parçacık boyutu ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır. Sonuçlar bölüm 4.1.2' de verilmiştir.

3.6.3 SEM analizi

Silika nanoparçacıkların boyut analizini ve morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla Ege Üniversitesi Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarında (MATAL) bulunan Thermo Scientific Apreo S cihazı kullanılarak SEM analizleri gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacıklar metanol içerisinde dağıtıldıktan sonra alüminyum folyo üzerine damlatılmış ve etüvde 40 °C' de etanolün uçması sağlanmıştır. Bu örnekler analize edilmiş ve sonuçlar bölüm 4.1.3' de verilmiştir.

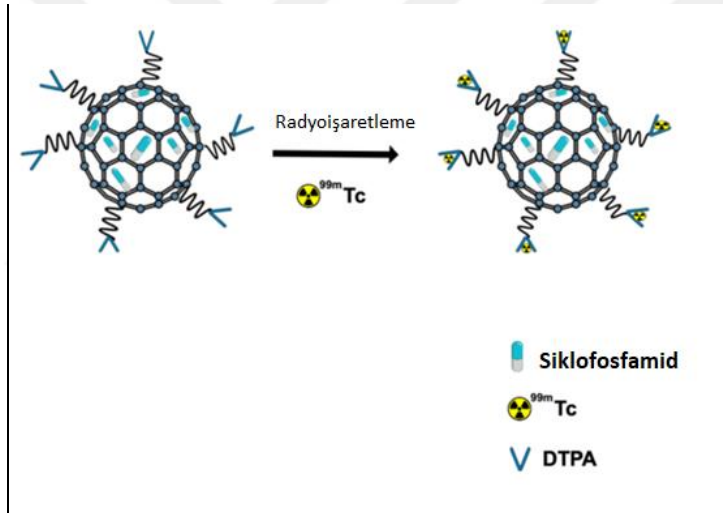
3.7 İlaç Hapsetme Kapasitesi

Bölüm 3.5' de ilaç yüklenen MSN-DTPA nanoparçacıklarının içerisine yüklenen CPH miktarını tayin etmek için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır. HPLC çalışmalarında Thermo ODS-2 HYPERSIL C18 (250 x 4.6) kolonu ve UV-VIS dedektörü kullanılmıştır. İlaç hapsetme kapasitesinin belirlenmesi için 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12.5 µg/mL, 6.25 µg/mL konsantrasyonlarında siklofosfamid çözeltileri hazırlanmıştır. HPLC yöntemiyle elde edilen belirli konstantrasyonlara ait siklofosfamid piklerinin alan hesapları yapılmıştır. Hesaplanan alanlar kullanılarak siklofosfamide ait kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Silika nanoparçacıkların içerisine yüklediğimiz ilaç miktarının belirlenebilmesi için, 1 mg MSN-CPH 1 mL ultra saf su içerisinde çözüldükten sonra 0,45 µm' lik filtreden süzülerek HPLC analizi yapılmıştır. HPLC yönteminde bidistile ultra saf

su ve ACN (30:70) mobil faz olarak kullanılmıştır. Akış hızı 1,25 mL/dk ve 194 - 207 nm dalga boyunda UV dedektöründe analiz yapılmıştır.

3.8 Radyoışaretleme

Siklofosfamid yüklü silika nanoparçacıkların ^{99m}Tc ile işaretleme çalışmalarında kalay klorür indirgeme yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mg MSN-CPH üzerine 1 mg/mL su içerisinde hazırlanan $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinden 25 μL eklenmiştir. Çözeltinin pH'ı 5 olacak şekilde amonyak çözeltisi ile ayarlanmıştır. İşlemler tamamlandıktan sonra oksijen almayacak bir biçimde şırınga yardımıyla ^{99m}Tc çözeltiye dikkatlice ilave edilerek oda sıcaklığında 40 dakika inkübasyona bırakılmıştır (Şekil 3.3). Radyoşaretili bileşiğin kalite kontrol çalışmalarını gerçekleştirmek için ince tabaka radyokromatografisi (TLRC) yönteminden yararlanılmıştır.



Şekil 3.3 Siklofosfamid yüklü mezopor nanoparçacıkların radyoışaretlenmesi

3.9 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi ile Radyoşaretili Bileşiklerin Kalite Kontrolü

^{99m}Tc ile radyoşaretilenmiş nanoparçacığın kalite kontrolü yapılırken kullanılan yöntem olan ince tabaka kromatografisinde sabit faz olarak (10 cm x 1,5 cm) boyutlarında silika ve selüloz şeritler kullanılmıştır. Banyo çözeltisi olarak ise % 0,09' luk NaCl çözeltisi (serum fizyolojik (SF)) ve piridin/asetik/asit-su (PAS) banyoları kullanılmıştır. Örneklerden mikropipet yardımıyla 1,5-2 μL alınarak hazırlanan şeritlerin tabanlarından 0,5 cm yukarıda olacak şekilde damlatılma yapılmıştır. Kuruması beklendikten sonra içerisinde banyo çözeltisi

bulunan tanklara dik bir biçimde şeritler yerleştirilmiştir. Örneklerin TLC şeritler üzerinde yeterince yürüdüğü gözlemlendikten sonra tank içerisinden çıkarılarak yürüme noktaları işaretlenip tekrar kurumaya bırakılmıştır. TLC şeritlerinin analizi Bioscan AR-2000 TLC cihazında yapılmış ve herbir örnek için R_f değeri hesaplanmıştır. R_f değeri bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yolun, çözücünün şerit üzerinde yürüdüğü yola bölünmesiyle bulunur. R_f değeri hesaplandıktan sonra elde edilen kromatogramlar ile birlikte radyoışaretleme verimine ulaşılmıştır.

3.10 Stabilite Çalışması

Radyoışaretleme koşulları bölüm 3.8’de belirlenmiş olan ve yüksek verimle radyoışaretlenen MSN-CPH bileşiğinin stabilite tayininin yapılması için 30., 60., 90., 120., 240., ve 1440. dakikalarda 2’şer μL TLC şeritlere damlatılmıştır. SF banyosunda TLC şeritleri radyoışaretleli bileşik yürüyene kadar bekletilmiştir. Yürüme işlemi tamamlandıktan sonra radyoışaretleme verimlerinin, zamana göre değişimi incelenmiştir. Stabilite çalışmalarının sonuçları Bölüm 4.3’de verilmiştir.

3.11 Lipofilite

^{99m}Tc işaretli MSN-CPH'nin lipofilite tayinini yapabilmek için n-oktanol/su fazları kullanılmıştır. İçerisinde 3 mL su, 3 mL n-oktanol bulunan deney tüpüne 50 μL radyoışaretleli örnek eklenerek oda sıcaklığında 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra 2500 rpm’de 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj bitiminde alt faz olan sudan ve üst faz olan n-oktanolde 500'er μL ayrı ayrı tüplere alınmıştır. Bu tüplerin radyoaktiviteleri Cd(Te) dedektörlü tek kanallı RAD501 cihazında sayılmıştır. N-oktanol fazının radyoaktivite değeri su fazının radyoaktivite değerine oranı hesaplanarak log P (log (noktanol/su)) değerleri hesaplanmıştır ve sonuçlar Bölüm 4.4’de verilmiştir.

3.12 Hücre Kültürü Çalışmaları

İn vitro koşullarda yapılan bu hücre kültürü çalışmalarında ^{99m}Tc ile işaretlenen siklofosamid yüklü silika nanoparçacıkların biyolojik davranışları iki farklı hücre düzeyinde incelenmiştir. Çalışma için MDA-MB-231 östrojen reseptör negatif (ER-) meme (adenikarsinoma) hücresi, MCF7 östrojen reseptör (ER+) pozitif meme (adenokarsinoma) hücresi, kullanılmıştır.

MCF7 ve MDA-MB-231 hücrelerinin üretimi minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)' den oluşan besiyerde gerçekleşmiştir.

Bütün hücre hatları buldukları 75' lik flaskların % 80' ini kaplayacak şekilde üretilmişlerdir. Daha sonra %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu vasıtası ile flasktan ayrılmıştır. Çalışmada kullanılmayacak olan hücreler ise %10 DMSO içeren besiyerlerin içerisine konularak -80 °C' de dondurulup, -190 °C sıvı azot içinde stoklanmıştır.

3.12.1 Sitotoksisite Çalışmaları

MSN ve MSN-CPH örneklerinin farklı konsantrasyonları kullanılarak MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları üzerinde sitotoksisite çalışmaları üç tekrarlı olacak şekilde yapılmıştır.

IC₅₀ (% 50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı) değerleri MTT kiti ile kolorimetrik olarak belirlendi. 96 kuyucuklu mikrolatelerin her bir kuyusuna 10⁵ hücre/ mL olacak şekilde hücre süspansiyonu eklenmiştir.. Her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu eklenirken kontrol dışındaki kuyucuklara üç farklı konsantrasyonda MSN ve MSN-CPH örnekleri eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Hücreler 37 °C sıcaklıkta ve % 5 CO₂ ortamında 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı zaman parametresi için inkübe edildi. İnkübasyonu biten mikrolatelerin her kuyucuğuna 10 µl MTT solüsyonu eklendikten sonra 4 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 450 nm ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre ile okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Çalışmanın her parametresi üç kez tekrar edildi.

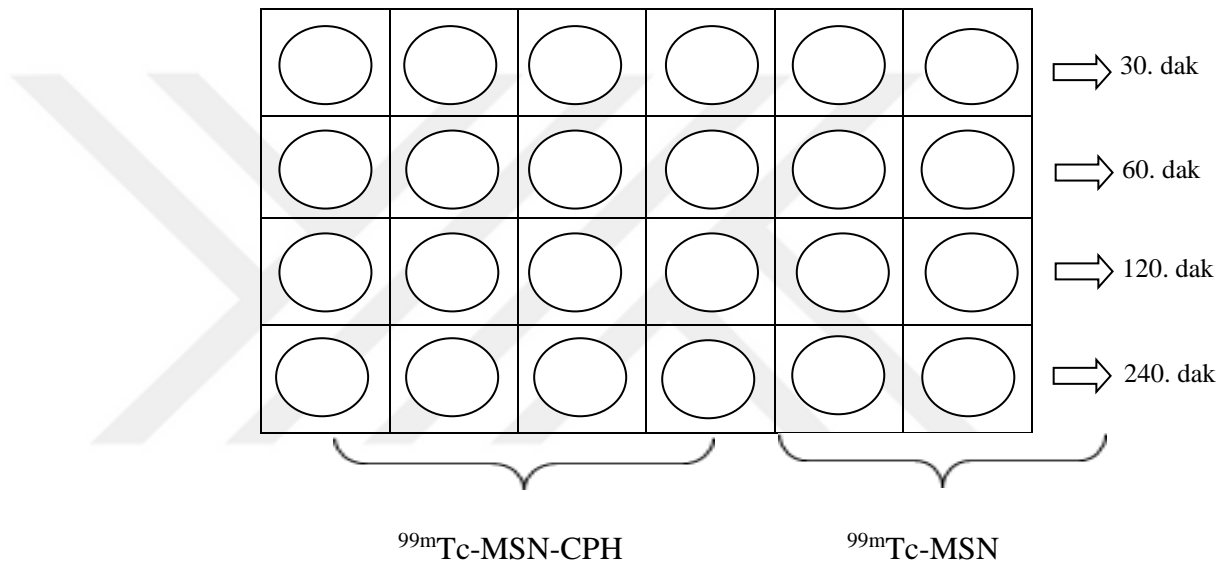
$$\% \text{ sitotoksisite} = 1 - (\text{ölçülen optik densite değeri} / \text{kontrol değeri}) \times 100$$

Yukarıda verilen formül kullanılarak % sitotoksisite değerleri hesaplandı. Bölüm 4.5.1 'de sitotoksisite çalışması sonuçları detaylı olarak incelenmiştir.

3.12.2 İnkorporasyon Çalışması

^{99m}Tc ile radyoşaretli MSN-CPH nanoparçacıklarının inkorporasyon çalışmaları için MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatları uygun koşullarda

çoğaltılarak istenilen popülasyona erişimi tamamlandıktan sonra 24'lük plakalara ekimi yapılmıştır. Hücrelerin besiyerleri mikropipet yardımı ile dikkatlice çekilip, PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra 24' lük plakaların her bir kuyucuğuna 5 μCi aktivite olacak şekilde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli MSN-CPH nanoparçacık çözeltisi eklendi. 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda hücreler üzerindeki besiyer uzaklaştırılarak 2 kez PBS ile yıkandı ve hücrelerde kalan aktivite Cd(Te) dedektör ile sayıldı. İşaretli bileşiğin etkisini inceleyebilmek amacı ile aynı işlemler $^{99\text{m}}\text{Tc}$ kontrol grubu üzerinde de gerçekleştirildi (Şekil 3.4). Bölüm 4.5.2' de inkorporasyon çalışmaları sonuçları ayrıntılı olarak verilmiştir.



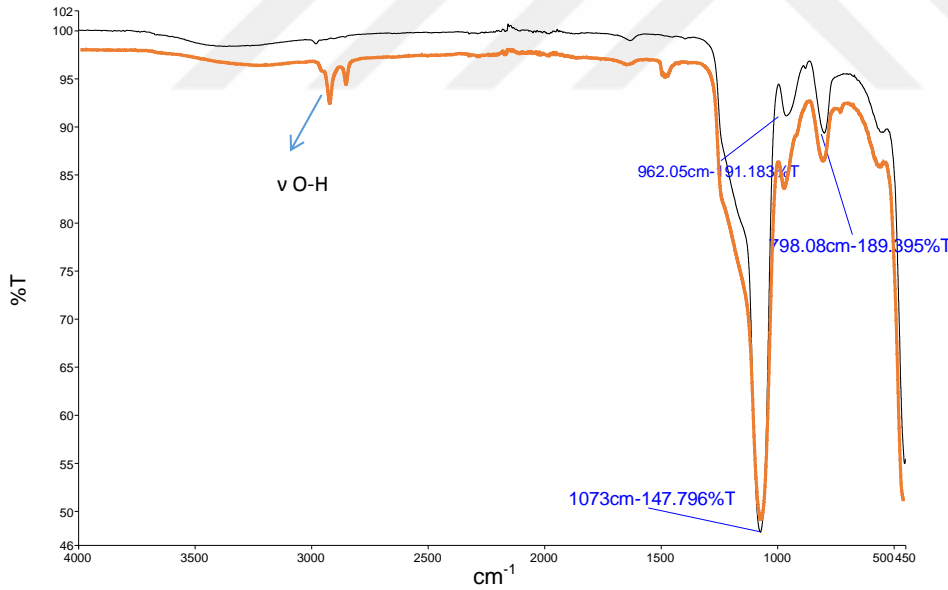
Şekil 3.4 MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde zamana karşı bağlanma veriminin incelenmesi deneyinde kullanılan 24' lük flaskların genel yapısı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Mezopor Silika Nanoparçacıkların Karakterizasyon Sonuçları

4.1.1 FTIR Analizi Sonuçları

MSN'nin yapısal analizlerini gözlemek için Ege Üniversitesi'nde bulunan Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalındaki FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopi) cihazı kullanılmıştır. Şekil 4.1' deki spektrumda görülen 1073 cm^{-1} ve 798 cm^{-1} bandları ν (Si-O-Si) grubunun simetrik ve anti-simetrik titreşimlerine denk gelmektedir. Ayrıca 962 cm^{-1} titreşim bandı da yapıda silanol (Si-OH) gruplarının varlığını göstermektedir. Şekil 4.1' de MSN sentezinde kullandığımız CTAB'a ait pikler görülmektedir. Sentezlediğimiz MSN'lerin sonucunda ortamda reaksiyona girmeyen CTAB'lar bulunmaktadır. CTAB piki $2800\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ arasındaki (O-H gerilimi)'de ortaya çıkmıştır.

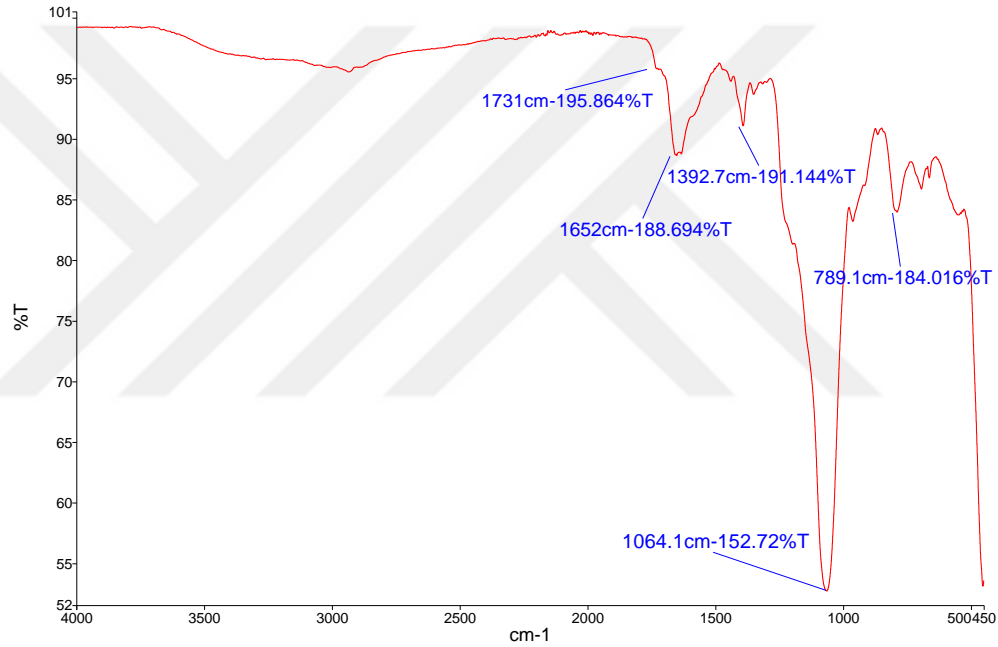


Şekil 4.1 Siyah spektrum yıkama yapılmamış MSN, turuncu spektrum yıkama yapılan MSN nano parçacıklarına ait FTIR spektrumları

CTAB silika nanoparçacık sentezinde yüzey aktif ajan olarak kullanılmıştır. MSN sentezlendikten sonra CTAB ortamdan uzaklaştırılmalıdır. Bunun için kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. HCl-metanol ile yıkama işlemi tez

çalışmamızda kullanılan yöntemdir. Yıkama işlemi yapılarak CTAB'lar ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonraki aşamada tekrar FTIR analizi yapılarak sonuç Şekil 4.1' de gösterilmiştir. Şekil 4.1' de gözlemediğimiz turuncu spektrumda gözlenen O-H gerilimi yıkamalardan sonra alınan siyah spektrumda gözlemlenmediğinden CTAB ortamdan uzaklaşmıştır diyebiliriz.

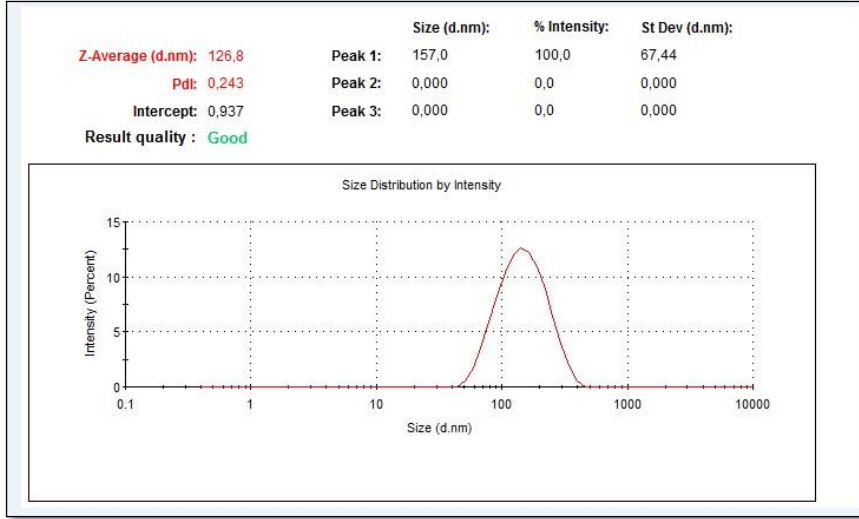
DTPA' nın yapıya katılması ile 1731 cm^{-1} ' de görülen C=O gerilme bandını, DTPA şelatlayıcı ajanının MSN' lere başarılı ile bağlandığını kanıtlamaktadır (Şekil 4.2). FTIR spektrumunda gözlemlenen bu fonksiyonel grupların titreşim ve gerilim bandları literatür ile de uyum içerisindedir (Bouchoucha et al., 2017; Freitas et al., 2017; Luís et al., 2015).



Şekil 4.2 MSN-DTPA nanoparçacıklarına ait FTIR spektrumu

4.1.2 DLS Analizi Sonuçları

DLS yönteminin temel prensibi seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesidir. Saçılan ışığın şiddetindeki bu değişim, parçacığın hareketine ve buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine aynı zamanda sıcaklığa bağlıdır. Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda bulunan Malvern Nano-ZS DLS cihazı kullanılarak analiz gerçekleştirilmiştir. Böylece sentezlenen MSN'in ortalama parçacık boyutu hesaplanmıştır.



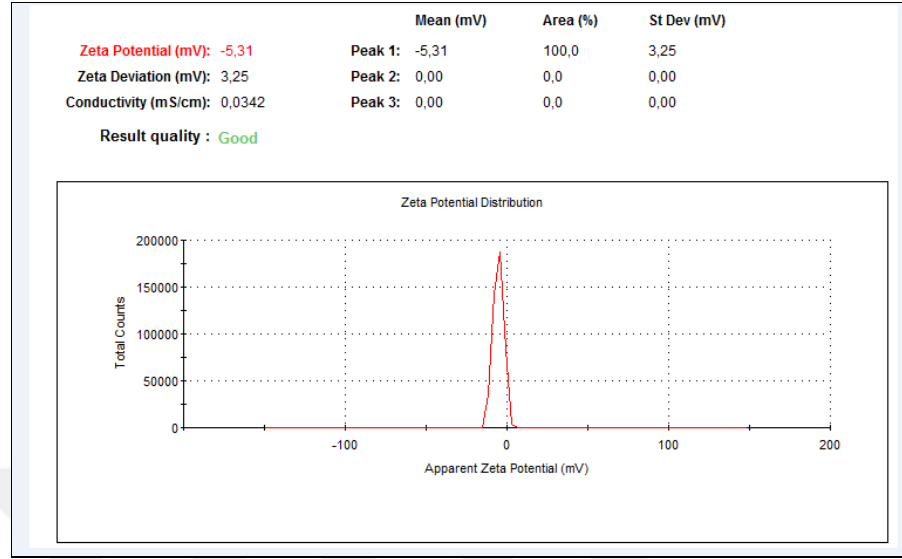
Şekil 4.3 MSN nanoparçacıklarının boyut dağılım grafiği.

Şekil 4.3’de görüldüğü gibi sentezlenen MSN’ nin hidrodinamik parçacık çapı $126 \pm 8,4$ nm olarak bulunmuştur. Parçacık boyutlarının farklı çözeltiler içerisinde değiştiğini gösteren Pdl (Polydispersity Index) değeri ise analiz sonucunda 0,243 olarak ölçülmüştür. Pdl değerinin 0,2 civarında olması çözeltinin monodispers olduğunu göstermektedir. Polidispersite indeksi nanoparçacıkların boyutlarının dağılım kalitesini ifade etmektedir. PI değeri genellikle 0-1 aralığındadır. PI değeri $\leq 0,1$ olan nanoparçacıkların yüksek dağılım kalitesinde olduğu söylenirken, PI değeri $\leq 0,5$ olan nanoparçacıklar ise iyi bir dağılıma sahiptir denilebilir (Kaur et al. 2008; Shah et al. 2014).

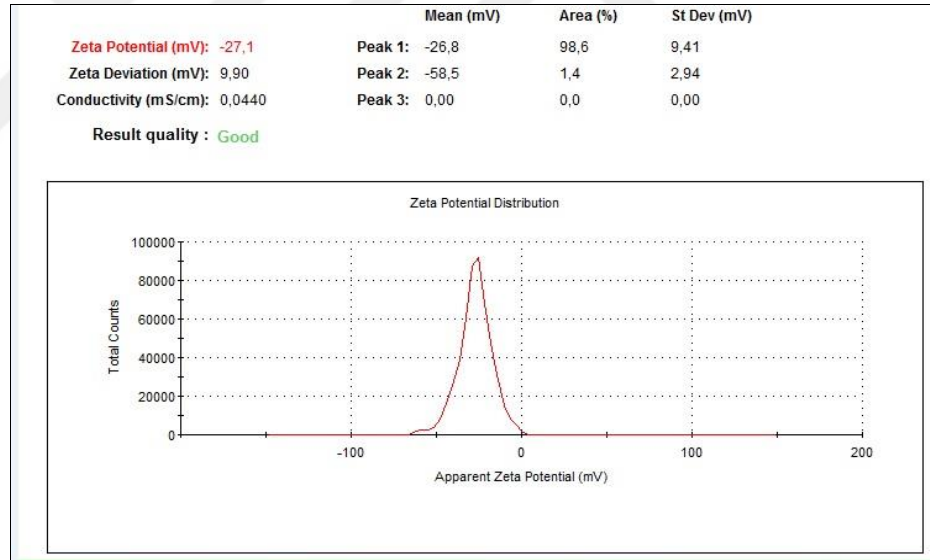
Ortalama parçacık boyutunu analiz ettiğimiz MSN’in dağılımı çözeltide homojen şekilde olduğundan yapılan literatür çalışmalarına göre de uygunluk göstermektedir (Cheng et al., 2017).

Nanoparçacıkların yüzey yüklerinin karakterizasyonu için zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.4 ve Şekil 4.5’ de MSN ve MSN-DTPA için zeta potansiyel grafikleri görülmektedir. MSN parçacıkları silika yüzeyindeki silanol gruplarının miktarı nedeniyle $-5,31$ mV (Si-OH, Si-O-) negatif zeta potansiyeline sahiptir. MSN-DTPA’ nın zeta potansiyel değeri $-27,1$ mV olarak ölçülmüştür. Yapıya DTPA’ nın eklenmesi ile de zeta potansiyelinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu sonucun DTPA’ nın yüzeyinde bulunan negatif yüklü COO- gruplarından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nanoparçacıkların zeta potansiyeli, elektrik yüklerin varlığı sayesinde aglomerasyonu en aza indirerek

nanoparçacıkların in vivo ortamlardaki davranışını değiştirebilir (Luís et al., 2015). Bu nedenle nanoparçacıkların yüzey yüklerinin belirlenmesi önemlidir.



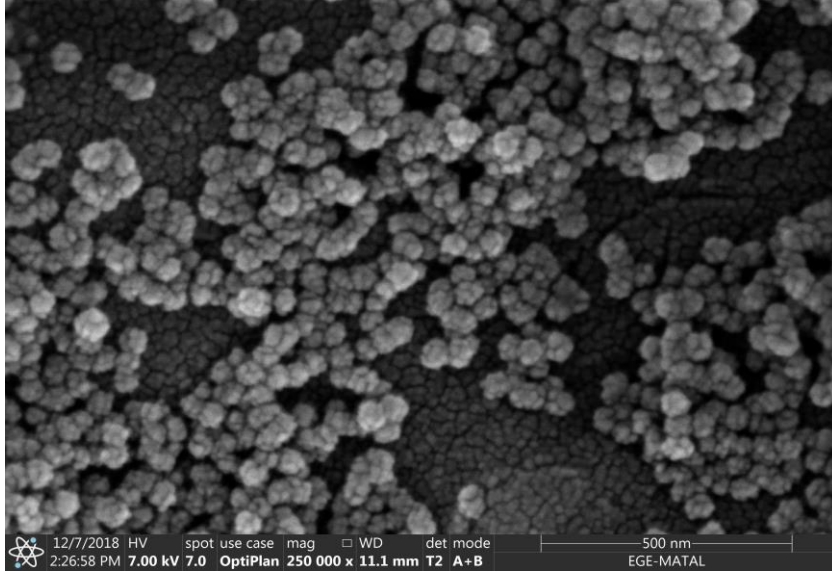
Şekil 4.4. Sentezlenen MSN nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği.



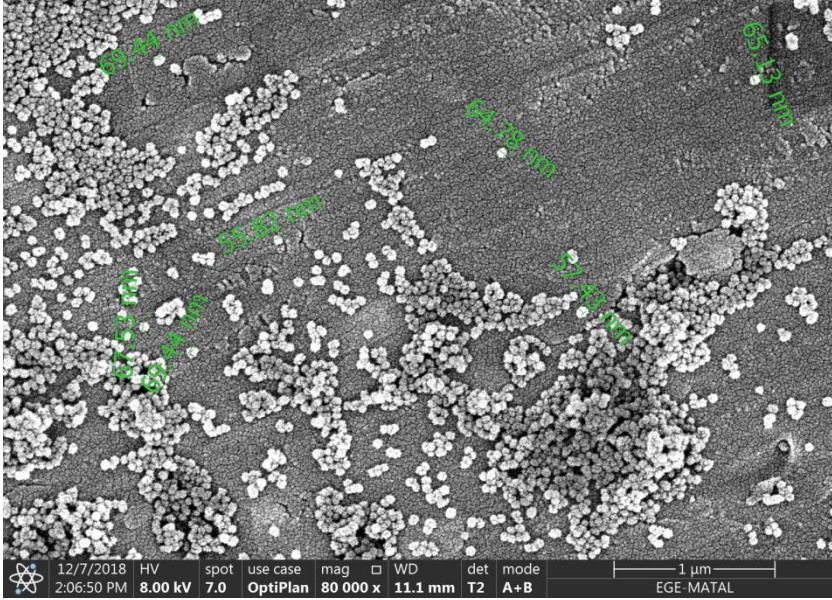
Şekil 4.5 Sentezlenen MSN-DTPA nanoparçacıklarının zeta potansiyel grafiği

4.1.3 SEM Analizi Sonuçları

Sentezlenen mezopor silika nanoparçacıklarının boyut analizi ve morfolojisini belirlemek amacıyla SEM analizi gerçekleştirilmiştir. MSN'lere ait SEM görüntüsünün sonuçları Şekil 4.6'de gösterilmiştir. Elde edilen SEM görüntülerinden sentezlenen nanoparçacıkların boyutlarının 55 nm ile 70 nm arasında değişiklik gösterdiği ve küresel morfolojide oldukları gözlemlenmiştir.



(a)



(b)

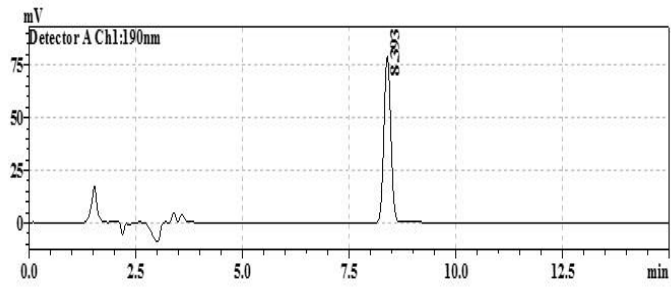
Şekil 4.6 MSN parçacıklarına ait (a) 250000x ve (b) 80000x büyütmelerinde ki SEM görüntüleri

SEM görüntülerinden alınan ölçümlere göre MSN'lerin parçacık boyutlarının DLS' de ölçülen parçacık boyutundan küçük olmasının sebebi DLS' de ölçüm yapılırken nanoparçacıkların su içerisinde dağıtılması ve bu nedenle alınan ölçümün aslında nanoparçacıkları çevreleyen su molekülleri ile birlikte hidrodinamik çapa ait olması olarak açıklanabilir.

4.1.4 Mezoporlu Silika Nanoparçacıklarının Siklofosfamid yükleme kapasitelerinin belirlenmesi

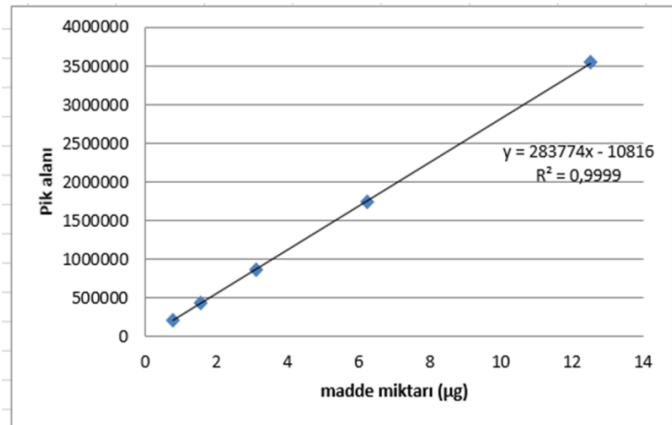
MSN'lerin CPH ile ilaç hapsedme kapasitesinin belirlenmesi amacıyla HPLC analizi yapılmıştır. HPLC analizi için 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL gibi 5 farklı konsantrasyon kullanılmıştır. Mobil faz olarak Asetonitril / Su (30:70) seçilmiştir. Dalga boyu ise 197 nm-204 nm olarak belirlenmiştir.

CP_125mikro_05012019_1



Şekil 4.7. Siklofosfamid'e ait HPLC Kromatogramı

Yapılan literatür çalışmalarında (Malothu et al., 2009) siklofosfamid piki genelde 8 dakika ile 9 dakika arasında çıkmıştır. Şekil 4.7'de görüldüğü üzere 8.3 dakikada CPH piki gözlenmiştir. Bu mikrogram/mL aralığında kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



Şekil 4.8 Siklofosfamid'e ait Kalibrasyon Eğrisi

Şekil 4.8’de görülen kalibrasyon eğrisine göre doğru denklemi ve silika nanoparçacıkların içerisinde bulunan siklofosamid miktarı belirlenmiştir. Silika nanoparçacıkların ilaç hapsetme verimi aşağıda verilen formüle göre belirlenmiştir. MSN’ lere yüklenen siklofosamid $74,95 \pm 1,62$ olarak bulunmuştur.

Enkapsülasyon etkinliği (%EE);

$$\% EE = \frac{\text{Toplam etkin madde miktarı} - \text{Yüklenmemiş etkin madde miktarı}}{\text{Toplam etkin madde miktarı}} \times 100$$

Bollu ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada MSN’lerin yüzeyinde bulunan amin gruplarının ilaç yükleme kapasitesini artırdığı rapor edilmiştir (Bollu et al. 2016). Bu çalışmada elde edilen yüksek yükleme kapasitesinin MSN’lerin yüzeyinde bulunan APTES modifikasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

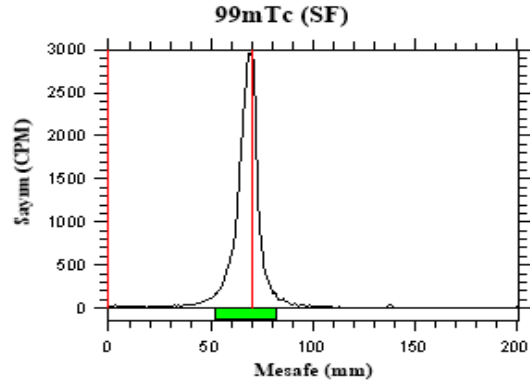
4.2 İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) Çalışmalarının Sonuçları

MSN-CPH nanoparçacıkları ^{99m}Tc ile işaretlenerek işaretlenme verimi ve radyokimyasal saflığı belirlenmiştir. Bunun için mobil faz olarak SF çözeltisi kullanılmıştır. Sabit faz olarak ise silika tabakaları kullanılmıştır. Kalite kontrol çalışmaları ile elde edilen R_f değerleri Tablo 4.1’ de gösterilmiştir.

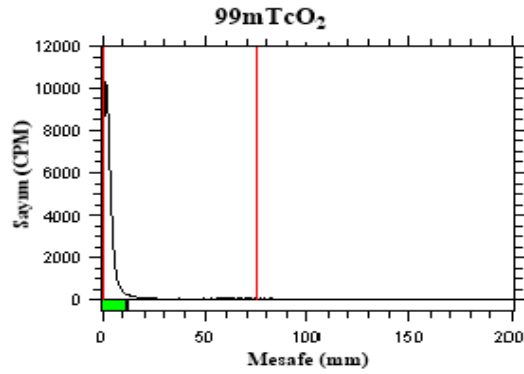
Tablo 4.1 ^{99m}Tc ile işaretli MSN-CPH'nin SF banyosunda ki R_f değeri ve radyoişaretleme verimi

Banyo Çözeltisi (SF)	^{99m}Tc	İndirgenmiş ^{99m}Tc	^{99m}Tc -MSN-CPH
R_f	$0,971 \pm 0,003$	$0,034 \pm 0,003$	$0,537 \pm 0,02$
		^{99m}Tc -MSN-CPH	
	Verim (%)	$99,82 \pm 0,25$	

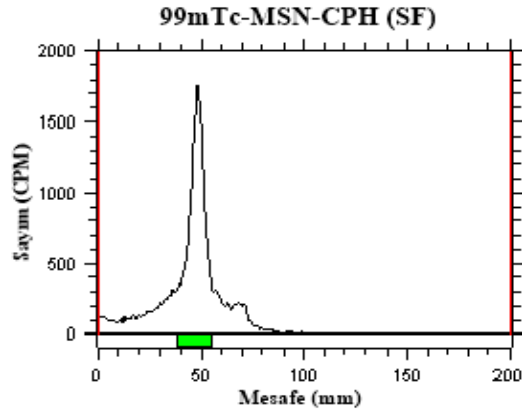
Silika nanoparçacıkların Tc-99m ile kalay klorür indirgeme yöntemi kullanılarak radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen CPH yüklü silika nanoparçacıkların radyokimyasal verimi TLRC yöntemiyle hesaplanmıştır. Tablo 4.1'de verilen $^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$ 'de radyokimyasal safsızlığın olmadığı R_f değerine bakılarak anlaşılmıştır. Kompleksin işaretleme verimi ise $\% 99.82 \pm 0,25$ olarak bulunmuştur. Kromatogramlar ise Şekil 4.9'de görülmektedir.



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.9 (a) ^{99m}Tc , (b) indirgenmiş ^{99m}Tc , (c) $^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$ 'ye ait SF banyosunda ki TLRC kromatogramları

Radyoişaretli nanoparçacıklara ait TLC kromatogramları Şekil 4.9'da gösterilmiştir. Şekil 4.9 (a)'da ^{99m}Tc , (b)'de indirgenmiş ^{99m}Tc , (c)'de ise $^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$ 'ye ait kromatogramlar görülmektedir. TLRC sonuçlarına göre ^{99m}Tc 'in SF çözeltisinde R_f değeri 0,97, TcO_2 'nin R_f değeri 0,05 iken $^{99m}\text{Tc-MSN-CPH}$ parçacıklarının R_f değeri ise 0,53' de serbest Tc-99m ve indirgenmiş Tc-99m' den farklı olarak bulunmuştur. Kromatogramlarda ^{99m}Tc 'un tamamının indirgendiği görülmektedir. Radyoişaretleme verimi ise % $99.82 \pm 0,25$ olarak bulunmuştur.

Bu tez çalışmasında mobil faz olarak SF banyosu kullanılmıştır. Sabit faz olarak ise silika kaplı TLC şeritlerinden yararlanılmıştır. De Barros ve arkadaşları 2015 yılında yayınladıkları çalışmalarında 900 nm boyutlarında sentezledikleri MSN parçacıklarını DTPA ile modifiye etmiş ve Tc-99m ile kalay klorür indirgeme yöntemi kullanarak % 95 üzerinde radyoişaretleme verimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir (Luis et al., 2015). Başka bir çalışmada ise 50 nm boyutunda ki silika nanoparçacıkları teknesyum trikarbonil kuru ile yüksek verimde radyoişaretlenmiş ve *in vitro/ in vivo* deneyleri gerçekleştirilmiştir (Rainone et al., 2017).

Bokhari ve arkadaşları tarafından siklofosfamidin Tc-99m ile radyoişaretlenmesi ve tümörlü farelerde *in vivo* biyodağılımı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada siklofosfamidin 20 μg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ kullanılarak

pH 7' de 10 dakika inkübasyon süresi sonunda % 99 verim ile işaretlendiğini rapor etmişlerdir (Bokhari et al., 2018).

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler sonucunda SF banyosunun MSN-CPH'nin kalite kontrolü için uygun olduğu anlaşılmıştır. TLC yöntemi, işaretlenmiş bileşiklerin radyokimyasal verimini araştırabilmek açısından önemli bir yöntemdir, çünkü hızlı, güvenilir ve oldukça pratik olarak gerçekleştirilebilen bir testtir. Radyokimyasal safsızlıkların varlığı nükleer tıpta gerçekleştirilen teşhisin görüntü kalitesinde sorunlar oluşturmakta olduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, radyofarmasötiklerin bağlanma verimi %90'ın üzerinde ise kullanılması olasıdır sonucuna varılabilir. Bu çalışmada ^{99m}Tc -MSN-CPH, yüksek bir radyokimyasal verim ile elde edilmiştir.

4.3 Stabilite Sonuçları

MSN-CPH ^{99m}Tc ile işaretlendikten sonra oda sıcaklığında SF banyosundaki 24.saate kadar olan stabiliteleri sonuçları TLC cihazı kullanılarak analiz edilmiştir. Tablo 4.2 de ^{99m}Tc -MSN-CPH'nin 24. saate kadar olan işaretleme verimleri yer almaktadır. Elde edilen sonuçların da gösterdiği gibi örneğin 24. saatte radyoişaretleme veriminin % 90'ın üzerinde olduğu görülmüştür. Radyodiagnostik ajanlar için radyoizotopun yapıya bağlı kalması *in vitro* çalışmalarda doğru sonuç elde edilebilmesi açısından son derece önemlidir.

Tablo 4.2 ^{99m}Tc -MSN-CPH 'nin 24 saat süresince stabilitesi

Zaman	Radyoişaretleme Verimi (%)
0 dak.	98,25 ± 0,82
30 dak.	97,05 ± 0,72
60 dak.	96,12 ± 0,11
120 dak.	95,22 ± 1,21
180 dak.	94,28 ± 0,25
240 dak.	94,00 ± 0,65
24 saat	93,22 ± 0,93

4.4 Lipofilite Sonuçları

MSN-CPH'ye ait deneysel lipofilite (logP) değeri $-3,62 \pm 0,37$ (n=3) olarak bulundu. CPH' in teorik log P değerinin 0,8 olduğu bilinmektedir (<http://www.drugbank.ca/drugs/DB00531>). CPH' in mezopor silika nanoparçacıklara yüklenmesi ile lipofilitede düşüş olduğu gözlenmiştir.

4.5 Hücre Kültürü Sonuçları

Bir nanoparçacığın fagositik olmayan hücreler tarafından verimli bir şekilde tutulum gösterebilmesi için materyalin parçacık boyutunun mikron altı ölçekte olması gerekmektedir. Bu nedenle hücre içi ilaç ve gen dağıtım uygulamaları için, parçacık boyutunun hassas kontrolü ile materyallerin tasarlanması konusunda kapsamlı araştırmalar gerçekleştirilmesini sağlamıştır. Ayrıca, ilaç taşıyıcının ilaç molekülleri ile uygun etkileşimlere sahip olabilen uygun yüzey özelliklerine sahip olması önemlidir. Bu sayede ilgili bölgede yüksek konsantrasyonda ilacın hücre içinde salınmasını sağlar. MSN'nin parçacık boyutu ve yüzey özelliği, hücre içi kontrollü salım uygulamaları için hassasiyetle ayarlanabildiği için ilaç taşıyıcı sistemlerde büyük ilgi görmektedir (Slowing et al., 2008).

4.5.1 Sitotoksosite çalışması sonuçları

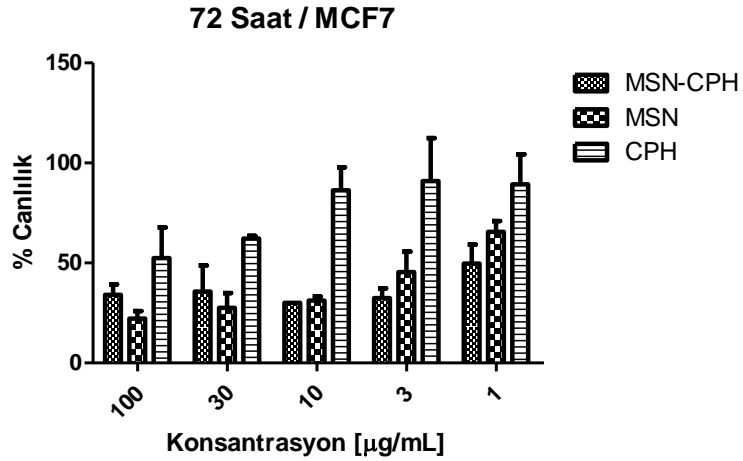
Sitotoksosite çalışmaları sonucunda CPH ve MSN ve MSN-CPH için 72. saat sonrasında aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak bulunan % canlılık değerleri MCF7 ve MDA-MB-231 hücre epitelleri için Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de verilmiştir.

$$\% \text{ sitotoksosite} = 1 - (\text{ölçülen optik densite değeri} / \text{kontrol değeri}) \times 100$$

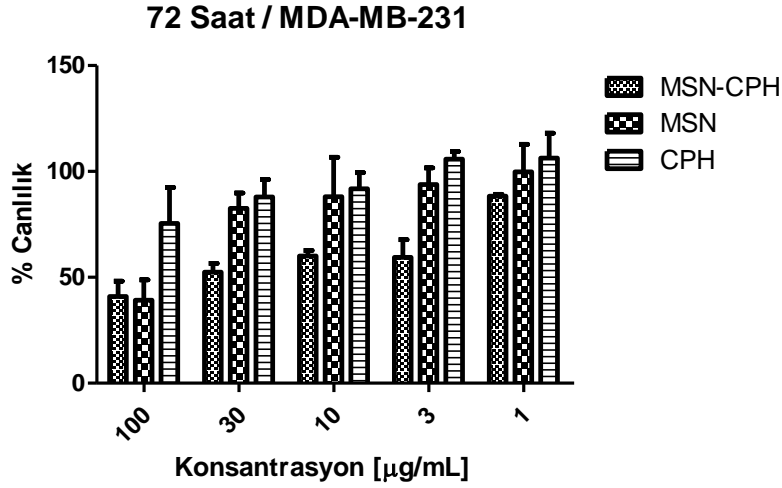
Tablo 4.3 MCF7 ve MDA-MB-231 hücre epitelleri için 72. saatte % canlılık değerleri

	MSN-CPH		CPH		MSN	
	IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)		IC ₅₀ (µg/mL)	
	MCF7	MDA-MB-231	MCF7	MDA-MB-231	MCF7	MDA-MB-231
72. saat	407,5	14,25	19,57	-	12,48	-

Tablo 4.3' de görüldüğü gibi mezopor silika nanoparçacıklar 72. saat sonunda düşük dozlarda bile MDA-MB-231 hücre hattında %50 canlılık değerinin altına düşmemiştir. Bu nedenle IC-50 değeri bu hücre hattı için hesaplanamamıştır. Bir antikanser ilacı olan CPH için 72. saatte MCF7 hücre hattında 19,57 µg/mL IC₅₀ değeri hesaplanmıştır. CPH yüklü MSN parçacıkları ise 72. saatte MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında sırası ile 407,5 ve 14,25 µg/mL IC₅₀ değerine ulaşılmıştır.



Şekil 4.10 MCF7 hücre epiteli için 72. saatte % canlılık değerleri



Şekil 4.11 MDA-MB-231 hücre epiteli için 72. saatte % canlılık değerleri

4.5.2 İnkorporasyon çalışması sonuçları

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MSN-CPH, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MSN ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'a ait MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerinde zamana karşı yüzde bağlanma verimleri Tablo 4.4, Tablo 4.5 ve Tablo 4.6' de verilmiştir.

Tablo 4.4 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile radyoişaretili MSN-CPH' nin MCF7, MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

Zaman	MSN-CPH % İnkorporasyon	
	MCF7	MDA-MB231
30. dakika	3,92±0,70	0,77±0,10
60. dakika	4,36±0,29	5,00±0,31
120. dakika	2,70±0,21	4,25±1,46
240. dakika	1,57±0,61	3,45±0,64

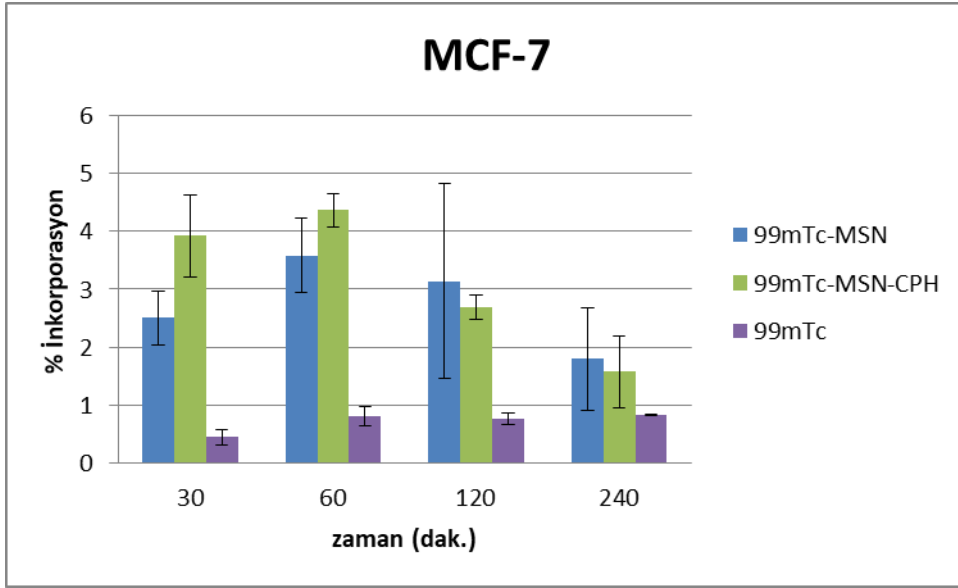
Tablo 4.5 ^{99m}Tc -MSN'in MCF7 ve MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

Zaman	MSN % İnkorporasyon	
	MCF7	MDA-MB231
30. dakika	2,50±0,46	0,90±0,14
60. dakika	3,58±0,64	2,77±0,95
120. dakika	3,14±1,68	3,63±1,42
240. dakika	1,80±0,88	3,33±1,34

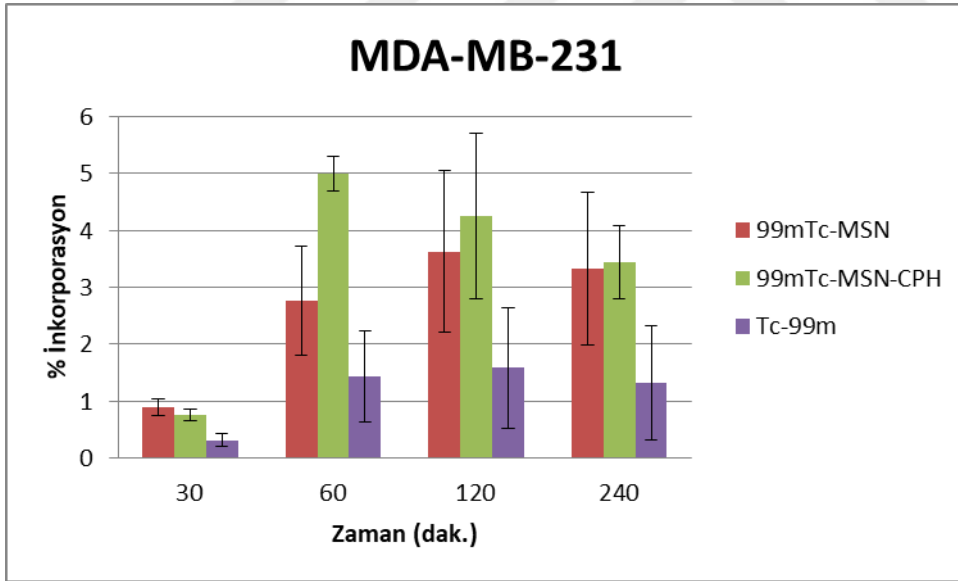
Tablo 4.6 ^{99m}Tc 'un MCF7, MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

Zaman	^{99m}Tc % İnkorporasyon	
	MCF7	MDA-MB231
30. dakika	0,45±0,13	0,31±0,11
60. dakika	0,81±0,17	1,44±0,80
120. dakika	0,75±0,09	1,59±1,06
240. dakika	0,82±0,01	1,32±1,00

Şekil 4.12 ve şekil 4.13 incelendiğinde ^{99m}Tc -MSN-CPH'in yüzde bağlanma veriminin MCF7 ve MDA-MB-231 hücre hatlarında 60. dakikada en yüksek tutulum gösterdiği anlaşılmaktadır. Bağlanma verimleri hücre hatlarına göre karşılaştırıldığında östrojen reseptörü bulunduran MCF7 hücreleri ile östrojen reseptörü negatif olan MDA-MB-231 hücrelerinde ki inkorporasyon yüzdeleri arasında belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen ^{99m}Tc beklenildiği gibi her iki hücre hattında da belirgin bir tutulum göstermemiştir.



Şekil 4.12 ^{99m}Tc -MSN-CPH, ^{99m}Tc -MSN ve ^{99m}Tc ' un MCF7 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi



Şekil 4.13 ^{99m}Tc -MSN-CPH, ^{99m}Tc -MSN ve ^{99m}Tc ' un MDA-MB-231 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

Literatürde yapılan çalışmalarda MSN' nin hücre içerisine alınımın, metabolik inhibitörlerin kullanarak enerjiye bağlı olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte silika için bilinen hücre yüzeyi reseptörleri olmasa bile, MSN alınımının esas olarak klatriin kaplı endositoz yolu ve pinositoz yoluyla gerçekleştiği rapor edilmiştir. MSN' lerin yüzeyi farklı biyoyumlu malzemeler ile modifiye

edildiğinde hücre içine alımlarının verimliliği artmakta ve bunun yanı sıra endozomal bölmelerden kaçma yetenekleri de kontrol edebilir hale gelmektedir. Özellikle MSN'in yüzey yükü (zeta potansiyeli), değiştirildiğinde yüksek yüzey yüklerine sahip iyonik MSN'lerin, endozomal tuzaktan kolayca kaçabileceği bilinmektedir (Slowing et al., 2008). Bu tez çalışmasında MSN'lerin yüzeyi öncelikle pozitif yük yoğunluğuna APTES daha sonra da negatif yük yoğunluğuna sahip DTPA ile modifiye edilmiş ve hücre tutulum çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Slowing ve arkadaşları hücreler tarafından MSN'in alımının hızlı olduğunu genellikle 30 dakika içinde hücrelerin içinde parçacıkların gözlendiğini rapor etmişlerdir (Slowing et al., 2008). Bu çalışmada elde edilen inkorporasyon sonuçlarına göre de MSN'lerin MCF7 hücre hattında ilk 30. dakikada, MDA-MB-231 hücrelerinde ise 60. Dakika gibi hızlı bir sürede tutulum göstermişlerdir.



5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada antikanser bir ilaç olan siklofosfamid yüklü mezopor silika nanoparçacıkları sentezlenmiştir. MSN'lerin karakterizasyonları FTIR, DLS, SEM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Siklofosfamid yüklü silika nanoparçacıkların karakterizasyon çalışmaları için zeta potansiyeli ve boyut analizleri yapılarak nanoparçacıkların 55-70 nm arasında boyuta sahip oldukları ve zeta potansiyelinin -27,1 mV olduğu tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar yüksek fiziksel stabiliteye sahip ve uygun boyutlarda nanoparçacıklar sentezlediğimizi göstermektedir.

Tez çalışmasında radyoişaretli siklofosfamid yüklü silika nanoparçacıklar sentezlenerek hedefe yönelik, hazırlanması kolay ve biyouyumlu bir sistem tasarlanması amaçlanmıştır. İstenmiştir. Bu amaçla, ideal bir görüntüleme radyonüklidi olan teknesyum ile kalay (II) klorür indirgenme yöntemi kullanılarak nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretli nanoparçacıkların kalite kontrol çalışmaları TLRC yöntemi ile yapılmıştır. Bu çalışmaların sonucunda bağlanma verimi % $99,82 \pm 0,25$ olarak hesaplanmıştır.

İlaç yüklü MSN ve MSN'lerin hücre kültürü çalışmaları için MCF7 ve MDA-MB-231 meme hücre hatları kullanılmıştır. Bağlanma verimleri hücre hatlarına göre karşılaştırıldığında östrojen reseptörü bulunduran MCF7 hücreleri ile östrojen reseptörü negatif olan MDA-MB-231 hücrelerinde ki inkorporasyon yüzdeleri arasında belirgin bir fark olmadığı gözlenmiştir. Her iki hücre hattında da radyoişaretli MSN-CPH nanoparçacıkları 60. Dakikada en yüksek tutulum düzeyine ulaşmışlardır.

Sonuç olarak bu çalışmada siklofosfamid yüklü silika nanoparçacıkların radyoişaretlenmesini kapsayan ve biyouyumlu olan bu bileşik sayesinde gelecekte yapılacak olan yeni teşhis ve tedavi sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayabileceğimizi düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Areva, S., Aaritalo, V., Tuusa, S., Jokinen, M., Linden, M. and Peltola, T.,** 2007 Sol-Gel-derived TiO₂-SiO₂ implant coatings for direct tissue attachment. Part II: Evaluation of cell response *Springer*, 18(1): 1633-1642 pp.
- Aydın, B.,** 2018, Metformin için biyoyumlu taşıyıcı sistem tasarımı: karakterizasyonu, radyoışartlemesi ve in vitro çalışmaları, Yüksek Lisans Tezi Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 86s.
- Baas, J., Senninger, N. and Elser, H.,** 1994, The reticuloendothelial system. An overview of function, pathology and recent methods of measurement. *Z Gastroenterol*, 130(32): 117-123pp.
- Bhatnagar, A., Nishad, K., Dhruv, S., Gabrani, T., Sharma, K. and Javed, A.,** 2016, Nose to brain delivery of midazolam loaded PLGA nanoparticles: In Vitro and In Vivo Investigations, *Current drug delivery*, 13(4): 557-564pp.
- Bokhari, T. H., Roohi, S., Hina, S., Akbar, M.U., Sohaib, M. and Iqbal, M.,** 2018, Synthesis, Quality Control, and Bio-Evaluation Of ^{99m}Tc-Cyclophosphamide, *Chemical Biology and Drug Design*, 91 (2): 456-462 pp.
- Bollu, V.S., Barui, A.K., Mondal, S.K., Prashar, S., Fajardo, M., Briones, D., Rodríguez-Diéguez, A., Patra, C.R. and Gómez-Ruiz, S.,** 2016. Curcumin-loaded silica-based mesoporous materials: Synthesis, characterization and cytotoxic properties against cancer cells. *Mater. Sci. Eng. C* 63: 393-410 pp.
- Challapalli, A., Carroll, L. and Aboagye, E. O.** 2017, Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clinical and translational imaging*, 5(3): 225-253 pp.
- Chen, S., Yang, K., Tuguntaev, R.G., Mozhi, A., Zhang, J., Wang, P.C. and Liang, X.J.,** 2016, Targeting tumor microenvironment with PEG-based amphiphilic nanoparticles to overcome chemoresistance. *Nano-medicine*, 12(1): 269-286pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Cheng, S., Lee, C., Chen, M., Souris, J.S., Tseng, F., Yang, C., Mou, C., Chen, C. and Lo, L.,** 2010. Tri-functionalization of mesoporous silica nanoparticles for comprehensive cancer theranostics-the trio of imaging , targeting and therapy. *J. Mater. Chem.* 20: 6149–6157 pp.
- Cherry, S.R.,** 2006, Multimodality in vivo imaging systems: twice the power or double the trouble, *Annu Rev Biomed Eng*, 8(1): 35-62 pp.
- Chou, B.,** 2011, Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system, *International journal of pharmaceutical investigation* 5(3): 124-139pp.
- De Barros, A. L. B., das Graças Mota, L., de Aguiar Ferreira, C. and Cardoso, V. N.** 2012. Kit formulation for ^{99m}Tc-labeling of HYNIC-βAlaBombesin (7–14). *Applied Radiation and Isotopes*, 70(10): 2440-2445pp.
- Emadi, Ashkan, Jones R.J. and Brodsky R.A.,** 2009, Cyclophosphamide and Cancer: Golden Anniversary, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 6 (11): 638–647 pp.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Ökteker, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E.,** 2000, Denel Organik Kimya, Ankara, *Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları*; 3. Baskı, 835s.
- Farzin, L., Sheibani, S., Moassesi, E.M. and Shamsipur, M.,** 2018, An Overview of Nanoscale Radionuclides and Radiolabeled Nanomaterials Commonly used for Nuclear Molecular Imaging and Therapeutic Functions, *National Library of Medicine*;107(1): 251-285pp.
- Gordon, A. T., Lutz, G. E. Boninger, M. L. and Cooper, R. A.,** 2007, Introduction to nanotechnology: potential applications in physical medicine and rehabilitation, *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 86(3): 225-241pp.
- Hassanpour, S. H. and DENGHANI, M.,** 2013 , Review of cancer from perspective of molecular, *Journal of cancer research and practice*, (4): 127-129pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Hansen, A. E., Petersen, A.L., Henriksen, J.R., Boerresen, B., Rasmussen, P., Elema, D. R., Rosenschöld, P. M., Kristensen, A. T., Kjær, A. and Andresen, T. L.,** 2015, Positron emission tomography based elucidation of the enhanced permeability and retention effect in dogs with cancer using copper-64 liposomes. *ACS Nano*, 9(7): 85-95pp.
- He, Z., Zhang, X., Huang, J., Wu, Y., Huang, X., Chen, J. and Wu, J.,** 2016, Immune activity and biodistribution of polypeptide K237 and folic acid conjugated amphiphilic PEG-PLGA copolymer nanoparticles radiolabeled with ^{99m}Tc. *Oncotarget*, 7(47): 76-35pp.
- Hong, H., Zhang, Y., Sun, J. and Cai, W.,** 2009, Molecular imaging and therapy of cancer with radiolabeled nanoparticles, *Nano Today*, 4(1): 399-413pp.
- Hutter, E and Maysinger, D.,** 2011, Gold nanoparticles and quantum dots for bioimaging, *Microscopy research and technique* 74(7): 592-604pp.
- Ismael Van de Voort, F.R. and Sedman, J.,** Stoichiometric determination of hydroperoxides in fats and oils by fourier transform infrared spectroscopy, *Springer* 74(4): 897-906pp.
- Kaur, P., Hegglan, I., Aschner, M., and Syverson, T.,** 2008, Docosahexaenoic acid may act as a neuroprotector for methylmercury-induced neurotoxicity in primary neural cell cultures, *Neurotoxicology* 29(6): 978-987pp.
- Karaduman, I., Er, E., Çelikkan, H., Erk, N. and Acar, S.,** 2017, Room-temperature ammonia gas sensor based on reduced graphene oxide nanocomposites decorated by Ag, Au and Pt nanoparticles. *Journal of Alloys and Compounds*, 72(2): 569-578pp.
- Kim, J., Kim, H.S., Lee, N., Kim, T., Kim, H., Yu, T., Song, I.C., Moon, W.K. and Hyeon, T.,** 2008 , Multifunctional Uniform Nanoparticles Composed of a Magnetite Nanocrystal Core and a Mesoporous Silica Shell for Magnetic Resonance and Fluorescence Imaging and for Drug Delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 47: 8438 –8441 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Kresge, C. T., Leonowicz, M. E., Roth, W. J., Vartuli, J. C. and Beck, J. S.,** 1992, Ordered mesoporous molecular sieves synthesized by a liquid-crystal template mechanism. *Nature*, 35(9): 710–712pp.
- Landfester, K.,**2009, Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. *Angewandte Chemie*, 48(25):4488-4507pp.
- Lombardo, D., Kiselev, M. A. and Caccamo, M.T.,** 2019, Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine. *Journal of Nanomaterials.*: 1-26pp.
- Lu, J., Liong, M., Li, Z., Zink, J.I. and Tamanoi, F.,** 2010. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small* 6: 1794–1805 pp.
- Luís, A., Barros, B. De, Silva, K., Ferraz, D.O., Cristina, T., Dantas, S., Ferreira, G., Nascimento, V., Martins, E. and Sousa, B. De,** 2015, Synthesis , characterization , and biodistribution studies of ^{99m}Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C.* 56(1): 181–188pp.
- Malviya R, Bansal V, Pal OP and Sharma PK.** (2010). High performance liquid chromatography: a short review. *Journal of Global Pharma Technology*, 2(5), 22-26pp
- Mamaeva, V, Rosenholm, J. M., Bate-Eya, L. T., Bergman, L., Peuhu, E. and Duchanoy, A.,** 2011, Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer. *Mol Ther.* 19(15): 38-46pp.
- Miranda, S.E.M., Lemos, J.A., Fernandes, R. S., Ottoni, F. M., Alves, R. J., Cardoso V. and Barros A.L.B.,** 2018, Technetium-99m-labeled lapachol as an imaging probe for breast tumor identification, *Revista Española de Medicina Nuclear e Imagen Molecular*

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Matsumura, Y., and Maeda H.A.,** 1986, New concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumor-tropic accumulation of proteins and the antitumor agent SMANCS. *Cancer Res* 46(1) 6387–6392 pp.
- Malothu, N., Veldandi, U.K. and Devarakonda, R.K.,** 2009, Development of rapid and simple hplc method for the determination of cyclophosphamide in human serum, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinic Research*, 2(3).
- Mehmood, A., Ghafar, H., Yaqoob, S., Gohar, U.F. and Ahmad, B.,** 2017, Mesoporous Silica Nanoparticles: A Review. *Journal of Developing Drugs*, 06 (02): 1-14 pp.
- Miranda, S.E., Lemos J.A., Fernandes, R.S., Ottoni, F.M., Alves, R.J., Ferretti, A., Rubello, D., Cardoso, V.N. and De Barros A.L.B.,** 2018, Technetium-99m-labeled lapachol as an imaging probe for breast tumor identification: *Revista espanola de medicina nuclear e imagen molecular*, 38(3): 167-172pp.
- Mirshojaei, F.S., Ahmadi, A., Avila E.M., Reynoso M.O. and Perez, H.R.,** 2016, Radiolabelled Nanoparticles: Novel Classification of Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging of Cancer. *Journal of Drug Targeting*, 24 (2): 91–101 pp.
- Monteiro, L.O.F., Fernandes, R.S., Castro, L.C., Cardoso, V.N., Oliveira, M.C., Townsend, D.M., Ferretti, A., Rubello, D., Leite, E.A. and De Barros L.B.A.,** 2017, Technetium-99 m radiolabeled paclitaxel as an imaging probe for breast cancer *in vivo*: *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 89: 146-151pp.
- Narayan, R., Nayak, U.Y., Raichur, A.M. and Garg, S.,** 2018, Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances, *Pharmaceutics*, 10, 118 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Radu, D.R., Lai, C.Y., Jeftinicia, K., Rowe, E.W. and Victor, S.Y.**, 2004, A Polyamidoamine Dendrimer-Capped Mesoporous Silica Nanosphere-Based Gene Transfection Reagent *Communications* 126(41)
- Rainone, P., Riva, B., Belloli, S., Sudati, F., Ripamonti, M., Verderio, P., Colombo, M., Colzani, B., Gilardi, M.C., Moresco, R.M. and Prosperi, D.**, 2017. Development of ^{99m}Tc-radiolabeled nanosilica for targeted detection of HER2-positive breast cancer. *Int. J. Nanomedicine* 12: 3447–3461 pp.
- Rizzo, L.Y, Theek, B., Storm, G., Kiessling, F. and Lammers, T.**, 2013, Recent pro-gress in nanomedicine: Therapeutic, diagnostic and theranostic applications. *Curr Opin Biotechnol.* 24(6): 1159–1166pp.
- Ünak P., Teksoz S., Altun G. D. ve Muftuler Z. B.**, 2018, Uygulamalı Temel Radyofarmasi, Nobel Tıp Kitabevleri Yayıncılık, İstanbul, s. 33.
- Ünak P., Müftüler Z. B., Medine E. İ., Kılçar Y. A. and Çekiç B.**, 2013, In vitro evaluation of radiolabeled (¹²⁵I) methanol extracts of yarrow in cell lines of MCF-7, PC-3, A-549 and Caco-2, *J Radioanal Nuclear Chemistry*, 593-599pp.
- Saied, N.M., Mejri, N., Raddaoui, M. and Saidi, M.**, 2017, Initial evaluation of a ^{99m}Tc-cyclopentadienyltricarbonyl technetium complex as a potential 5-HT_{1A} receptor imaging agent, *Applied radiation and isotopes* 129: 196-203pp.
- Saito, Y.**, 2004, Cyclodextrins in Chromatography, *Analytical and bioanalytical chemistry* 6-7pp.
- Sağlam, N. ve Emul E.**, 2016, “Nanotıpta Yeni Gelişmeler” In: TOTEK Ortopedi ve Travmatoloji Temel Bilimler ve Araştırma Kitabı. Ed: Feza Korkusuz, Ankara; 17-25pp.
- Sahoo, S., K. and Labhasetwar, V.**, 2003, Nanotech approaches to drug delivery and imaging, *Drug Discovery Today*, 8(24): 1112–1120pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Slowing, I.I., Vivero-Escoto, J.L., Wu, C.W. and Lin, V.S.Y.,** 2008, Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 : 1278–1288pp.
- Skoog,** 1998, Principles of Instrumental Analysis. *Saunders College* 849p.
- Soenen, J.H.S., Brisson, A.R. and Cuyper, D.M.,** 2009, Addressing the problem of cationic lipid-mediated toxicity: The magnetoliposome model. *Biomaterials*, 30(22): 3691-3701pp.
- Tasciotti, E., Liu, X., Bhavane. R., Plant. K., Ashley. D., Leonard. B., Katherine, P., Cheng, M.M., Decuzzi, P., Tour, J.M., Robertson, F. and Ferrari, M.,** 2008, Mesoporous Silicon Particles as a Multistage Delivery System for Imaging and Therapeutic Applications *Nat Nanotechnology* 3(3):151-7pp
- Teksöz S., İçhedef Ç, Medine Eİ, Kılçar AY, Parlak Y, Bilgin BE ve Ünak P.** Radyoişaretli Paklitaksel Taşıyıcı Katı Lipid Nanoparçacık Formülasyonu ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, 113S369 No' lu Tübitak proje raporu, 2016:78.
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. and Bannerjee S.K.,** 2012, Drug delivery systems: An updated review. *Int J Pharm Investig.* 2(1): 2–11 pp.
- Tran, S., DeGiovanni, P.J., Piel, B. and Rai, P.,** 2017, Cancer nano-medicine: a review of recent success in drug delivery,” *Clinical and Translational Medicine*, 6(1): 44p.
- Ulbrich, K., Holá, K., Šubr, V., Bakandritsos, A., Tucek, J. and Zbořil, R.,** 2016, Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: Covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies. *Chem Rev* 116: 5338–5431pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yang, P., Gai, S. and Lin. J.,** 2011, Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. *The royal society of chemistry* 41: 3679-3698pp.
- Wang, Y., Xu, Cu, and Ow, H.,** 2013, Commercial nanoparticles for stem cell labeling and tracking. *Theranostics*, 3: 544-60pp.
- Weissleder, R. A.,** 2001, Clearer vision for in vivo imaging. *Nature biotechnology* 19(4): 316-317pp.
- Xie J, Chen K, Huang J, Lee S, Wang J. and Gao J.,** 2010 PET/NIRF/MRI triple functional iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*. 31(2): 16-30pp.
- Zhu, Y., Fan, J., Li, Z. and Han, S.,** 2007 Neural basis of cultural influence on self representation. *Neuroimage*. 34(2) : 1310-1316pp.
- Zhou, W. and Wang, Z.L.,** 2007, Scanning microscopy for nanotechnology : techniques and applications. Springer.
- <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00531> (Erişim tarihi: 25.06.2020)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam boyunca ihtiyaç duyduğum her anda bana yol gösteren, güvenen, güler yüzünü, samimiyetini, bilgi birikimini ve desteğini benden esirgemeyen, birlikte çalışmaktan büyük gurur duyduğum saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Öğrenim dönemim boyunca bilgi birikimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Serap TEKSÖZ'e, enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Fatma YURT ONARAN'a, hücre kültürü ile ilgili beni bilgi sahibi yapan ve deneyimlerini benden esirgemeyen Doç. Dr. E. İlker MEDİNE'ye, laboratuvar çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan, tecrübeleriyle bana her türlü desteği sağlayan, sorularıma içtenlikle yanıt veren Doktora Öğrencisi Burcu AYDIN'a teşekkür ederim.

Hayatım boyunca bana her zaman destek ve yardımcı olan aldığım tüm kararlarda yanımda olan canım aileme, yardımlarını benden esirgemeyen enstitüdeki çalışma arkadaşlarıma, tez çalışmamda 12 aylık burs desteğiyle TÜBİTAK 2211 Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na ve tez çalışmamı FYL-2019-20684 numaralı tez çalışmamı desteklediğinden dolayı Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Özgeçmiş

Adı Soyadı : Selin İrdel Hamurişçi

Doğum Yeri : İZMİR

Doğum Yılı : 10.08.1992

Öğrenim Durumu

Lisans : Ege Üniversitesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi / Nükleer Bilimler Enstitüsü / Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

