

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
Fen Bilimleri Enstitüsü

**RADYOİŞARETLİ FLORESAN SİLİKA  
NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK  
T- HÜCRE GÖRÜNTÜLEMESİ**

**Hazal TOSUN**

**Danışman: Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE**

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Nükleer Uygulamalar Yüksek Lisans Programı

İzmir

2019

**Hazal TOSUN** tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “Radyoışaretli Floresan Silika Nanoparçacıklar Kullanılarak T-Hücre Görüntülemesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 17.07.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

**Jüri Üyeleri:**

**İmza:**

**Jüri Başkanı: Prof. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER**



**Raportör Üye: Doç. Dr. E. İlker MEDİNE**



**Üye: Doç. Dr. Yasemin PARLAK**



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Radyoişaretli Floresan Silika Nanoparçacıklar Kullanılarak T-Hücre Görüntülemesi” 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.

17 / 07 / 2019

Hazal TOSUN

**ÖZET****RADYOİŞARETLİ FLORESAN SİLİKA  
NANOPARÇACIKLAR KULLANILARAK T-HÜCRE  
GÖRÜNTÜLEMESİ**

TOSUN, Hazal

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Emin İlker Medine

Temmuz 2019

T hücreli immünoterapi son zamanların kanser tedavi çalışmalarında öne çıkan yöntemlerden birisidir. Bunun sebebi; T hücrelerinin bağışıklık sistemimizin en önemli bileşenlerinden birisi olması ve spesifik T hücrelerinin kanserli hücrelerle aktif olarak mücadele etmesidir.

Görüntüleme yöntemi ile birlikte hastalığın doğru tanımlanması ve hangi evrede olduğunun tespiti klinik sonuçlar açısından önemlidir. Dual modalite; daha hassas ve yüksek çözünürlüğe sahip portatif optik görüntüleme cihazlarıyla birlikte görüntüyü yönlendirerek gerçek zamanlı tedavinin yapılmasına olanak sağlar. Görüntüleme ajanlarının en üst düzeyde görüntü sağlama yeteneği olması ve hasta üzerinde toksisite tehlikesi olmadan güvenle kullanılması istenir. Bu çalışmada biyolojik olarak uyumlu multifonksiyonel prob olarak Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN) kullanılmıştır. Nanoparçacıkların karakterizasyonu taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve dinamik ışık saçılımı (DLS) analizleri ile yapılmıştır. DLS analizi sonucunda nanoparçacıkların boyut dağılımının homojen olduğu, SEM analizi sonucunda ise nanoparçacıkların ortalama 58 nm boyutunda olduğu tespit edilmiştir.

Floresan boyalar sentezlenen nanoparçacıklara enkapsüle edilerek optik görüntüleme sağlanır. Bu çalışmada floresan boya olarak kullanılan indosiyanın yeşili (ICG) enkapsülasyon işlemiyle nanoparçacıklara floresan özelliği kazandırmıştır.

Radyonüklid olarak kullanılan teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) ile işaretlenen MSN'in işaretlenme verimi  $\%98,46\pm 0,29$  bulunmuştur.

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

Bu çalışmada sentezlenen multifonksiyonel prob ile antijen spesifik T hücrelerinin *in vivo* olarak Dual Modalite ile SPECT/Optik görüntülemesinin sağlanacağı ve bunun sonucunda kanserin teşhisi amacıyla T hücre transfer edilmiş sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN), silika, T-hücresi, nanoparçacıklar, teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ), immünoterapi, dual modalite



**ABSTRACT****T-CELL IMAGING USING RADIOLABELED  
FLUORESCENT SILICA NANOPARTICLES**

TOSUN, Hazal

MSc Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Emin İlker MEDİNE

July 2019

T-cell immunotherapy is one of the most prominent methods of cancer treatment studies. Because T cells are such important elements of our immune system that specialized in actively fighting with cancerous cells.

Accurate identification of imaging and disease staging is vital in terms of clinical outcomes. The dual modality that combines two different imaging techniques; enables image-oriented real-time therapy and instant adjustment due to the combination that leads increasingly more sensitive and high resolution portable optical imaging devices due to the combination.

In this study, mesoporous silica nanoparticles (MSN) as a multifunctional biocompatible probe were used. Solution-based synthesis method was used that followed by structure directing agent removal. Characterization of MSN performed by Scanning Electron Microscope (SEM) and Dynamic Light Scattering (DLS) analyzes. As a result of DLS and SEM analyzes, it was found that MSN were synthesized homogeneous size and dispersity, the average size of 58 nm by SEM.

Fluorescent dyes are encapsulated into MSN in order to provide optical imaging. Indocyanine green (ICG) which is used as the fluorescent dye was encapsulated to MSN and endowed relatively durable fluorescence characteristic.

Radiolabelling efficiency of MSN with technetium-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) as a radionuclide was found to be  $\%98,46\pm 0,29$ .

Finally, radiolabelled MSN in vitro cell culture studies were performed on SKOV3 and SKOV-CEA cells.

With this novel multifunctional probe, It is thought that antigen-specific T cells will be imaged using in vivo SPECT/Optical imaging with Dual modality and contribute to the concept of T cells transferring system for the diagnosis of cancer.

Keywords: Meseporous silica nanoparticles (MSN), silica, T-cell, nanoparticles, technetium ( $^{99m}\text{Tc}$ ), immunotherapy, dual modality



## ÖNSÖZ

Bu çalışmada N-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB)'den yola çıkılarak Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN) sentezlenmiştir. Sentezlenen mezoporlu silika nanoparçacıklar DTPA ile şelatlandıktan sonra İndosiyenin Yeşili (ICG) MSN içerisine yüklenmiştir. Daha sonraki aşamada ise ICG yüklü MSN ler  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoişaretlenmiş ve sonrasında T hücreleri ile birleştirilerek SKOV3-CEA hücreleri için hedef ajan olarak kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG) ajanının SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki görüntüleme potansiyeli incelenmiştir.

İZMİR

17 / 07 / 2019

Hazal TOSUN





**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	ix
ÖNSÖZ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xviii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xxii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1 Kanser .....	3
2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri .....	5
2.3 İmmünoterapi .....	6
2.4 Nanoteknoloji .....	7
2.4.1 Mezoporlu silika nanoparçacıklar .....	9
2.5 Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları .....	10
2.5.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	10

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
2.5.3 Dinamik ışık saçılımı (DLS).....	11
2.5.4 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR).....	12
2.6 Floresan Boyalar .....	12
2.6.1 İndosiyanın yeşili (ICG).....	14
2.7 Radyofarmasötikler.....	15
2.7.1 Teknesyum-99m ( <sup>99m</sup> Tc) Kimyası .....	16
2.8 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler .....	17
2.8.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	17
2.8.2 Lipofilite .....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	20
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar .....	20
3.1.1 Kullanılan kimyasallar .....	20
3.1.2 Kullanılan cihazlar .....	21
3.2 Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN) .....	22

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.2.1 Mezoporlu silika nanoparçacıkların sentezi.....	22
3.2.2 Mezoporlu silika nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu .....	23
3.2.3 Ninhidrin testi .....	23
3.2.4 Mezoporlu silika nanoparçacıklara DTPA konjugasyonu .....	25
3.2.5 Mezoporlu silika nanoparçacıklara ICG yüklenmesi.....	24
3.2.6 Yükleme kapasitesi tayini .....	25
3.2.7 Mezoporlu silika nanoparçacıklardan ICG salımının belirlenmesi .....	25
3.2.8 Mezoporlu silika nanoparçacıkların özelliklerinin incelenmesi.....	25
3.3 Yapısal analiz çalışmaları .....	25
3.4 <sup>99m</sup> Tc ile radyoişaretleme çalışmaları .....	26
3.4.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC) .....	26
3.4.2 Stabilite çalışması .....	27
3.4.3 Lipofilite çalışması .....	27
3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları .....	27
3.5.1 Sitotoksisite çalışması .....	28

**İÇİNDEKİLER (devam)**

	<u>Sayfa</u>
3.5.2 T hücreleri ile MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin enkapsülasyonu .....	29
3.5.3 Floresan görüntüleme çalışması.....	29
3.5.4 Apoptozis çalışmaları .....	29
3.6 İstatistik Analizler.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	31
4.1 Mezoporlu Silika Nanoparçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi .....	31
4.1.1 DLS analiz sonuçları .....	31
4.1.2 SEM analiz sonuçları .....	32
4.2 Yapısal Analiz Çalışmaları.....	32
4.2.1 FTIR sonuçları .....	32
4.2.2 Ninhidrin testi sonuçları .....	34
4.2.3 Mezoporlu silika nanoparçacıklara ICG yükleme kapasitesi tayini.....	36
4.2.4 Mezoporlu silika nanoparçacıklardan ICG salımının belirlenmesi.....	36
4.3 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları.....	36
4.3.1 TLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar .....	36
4.3.2 Stabilite sonuçları.....	38

4.3.3 Lipofilite sonuçları.....	40
4.4 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları.....	40
4.4.1 Sitotoksosite sonuçları .....	40
4.4.2 Floresan görüntüleme sonuçları.....	42
4.4.3 Apoptozis sonuçları .....	44
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	49
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	52
TEŞEKKÜR.....	59
ÖZGEÇMİŞ .....	60

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Kanserin oluşumu ve çoğalması .....	3
2.2 Tüm kanserler yaş standart insidans hızlarının cinsiyete göre 2010-2014 yılları arasındaki dağılımı.....	4
2.3 MSN'nin morfolojisi .....	9
2.4 Mezoporlu silika ve ilaç iletimi konusunda araştırma artışı.....	9
2.5 SEM'in şematik yapısı .....	10
2.6 Jabłoński Diyagramı.....	13
2.7 ICG yapısı ve NIR bölgesindeki dalga boyları .....	14
2.8 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü .....	17
2.9 TLC şeridinin uygulanma mekanizması .....	18
3.1 Mezoporlu silika nanoparçacıkların sentez düzeneği .....	23
3.2 SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin inkübasyonu .....	28
3.3 SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin 24. ve 48. saat sitotoksosite çalışması.....	28

## ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 MSN'nin boyut dağılım grafiği .....	31
4.2 MSN'nin SEM görüntüsü .....	32
4.3 MSN'nin FTIR spektrumu .....	33
4.4 CTAB-MSN kimyasal yapısı .....	34
4.5 Ninhidrin reaktifinin amin gruplarıyla etkileşimi .....	35
4.6 (a) <sup>99m</sup> Tc, (b) indirgenmiş <sup>99m</sup> Tc, (c) DTPA-ICG-MSN-NH <sub>2</sub> ait kromatogramlar .....	37
4.7 <sup>99m</sup> Tc-(MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG)'ye ait (a) 30.dakika, (b) 60.dakika, (c) 120.dakika, (d) 180. dakika, (e) 240.dakika, (f) 6.saate ait kromatogramlar.....	39
4.8 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı 24.saatteki % canlılık değerleri .....	41
4.9 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı 48.saatteki % canlılık değerleri .....	42
4.10 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin SKOV3 hücreleri üzerindeki floresan görüntüsü floresan görüntüsü.....	43
4.11 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG yüklü Thücrelerinin SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki floresan görüntüsü.....	43
4.12 Hücrelerin toplam apoptoz oranları .....	45



4.13 Kontrol grubu olarak SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin apoptozis sonuçları .....	46
4.14 T hücrelerinin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları .....	47
4.15 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları .....	47
4.16 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları.....	47
4.17 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin apoptozis sonuçları.....	48

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 Ninhidrin testi reaktif miktarları.....	24
4.1 MSN'nin FTIR incelemesi .....	33
4.2 Farklı Glisin konsantrasyonlarında ölçülen absorbands değerleri.....	35
4.3 TLC yöntemi ile elde edilen R <sub>f</sub> değerleri.....	36
4.4 <sup>99m</sup> Tc ile işaretli MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin işaretlenme verimi.....	36
4.5 <sup>99m</sup> Tc-( MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG)'nin stabilite zaman-verimi .....	38
4.6 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri.....	41
4.7 MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG'nin IC <sub>50</sub> değerleri .....	42
4.8 Apoptozis değerleri.....	44

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

MSN	Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
TLC	İnce Tabaka Radyokromatografi Yöntemi
ICG	İndosiyanin Yeşili
R <sub>f</sub>	Alıkonma değeri
SEM	Scanning Electron Microscopy
SPECT	Tek Foton Emisyon Tomografisi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
DLS	Dynamic Light Scattering
CTAB	N-cetyltrimethylammonium bromide
TEA	Trietanolamin
TEOS	Tetraetil ortosilikat
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilane
MSN-NH <sub>2</sub>	Silanlanmış mezoporlu silika nanoparçacıklar
FBS	Fetal Bovine Serum
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu





## 1. GİRİŞ

Kanserin teşhis ve tedavisinde karşılaşılan en önemli zorluklardan birisi kullanılan radyofarmasötiklerin hedef bölgeye olan spesifite sorunlarıdır. Bu durum araştırmacıları, teşhis veya tedavinin uygulanacağı hedef bölge için yüksek spesifiteye sahip tanı yöntemlerini araştırmaya yöneltmiştir. Bu nedenle, tümör spesifik T hücreleriyle adoptif immünoterapinin tedavi potansiyeli çeşitli kanser türlerine karşı araştırılmaktadır. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar, T hücrelerinin tümörle birleşmiş antijenleri spesifik olarak tanıyabileceğini ve immün mekanizmaları ile kanseri inhibe edebileceğini öne sürmektedir. Bu amaç doğrultusunda, tümör ve lenfoid organlardaki T hücrelerinin dağılımını izlemek için invazif olmayan görüntüleme yöntemleri geliştirmek oldukça önemlidir.

Multi işaretli görüntüleme problemlerinin gelişmesiyle hedef bölge, iki veya daha fazla farklı görüntüleme yöntemleri dual modalite olarak değerlendirilebilmektedir. Bu şekilde her yöntemin güçlü ve avantajlı yönleri birleştirilmiş olur. Bu sebeple aynı anda birden fazla görüntüleme yöntemi ile tespit edilebilecek multifonksiyonel görüntüleme problemlerini geliştirmek avantaj sağlayacaktır.

Görüntüleme teknikleri erken tümör algılama ve zamanında tedavi için çok önemlidir. Floresan görüntüleme teknolojisi biyolojik ve tıbbi uygulamalarda net sonuçlar ortaya koymaktadır. Yeni jenerasyon problemler NIR bölgesinde (650-900 nm) hedef dışı artıkları azaltarak doku zayıflamasını ve hedeflenmeyen dokudan kaynaklanan otofloresansı gösterir. Böylece hedefte arka plan olan oranları en üst düzeye çıkartır ve görülebilirliğe göre gelişmiş uygulamalar ortaya koyar. Boya sızıntısını önlemek için parçacık probunun silika matrisine katılmasıyla dikkate değer fotofiziksel iyileştirmeler gözlenmiştir. Bu özelliklerle birlikte kanserin evrelendirilmesi ve gelecekteki tedavisinde heyecan verici olanaklar sağlar.

Bu amaç doğrultusunda, bu çalışmada T hücrelerinin spesifik bir antijeni eksprese eden tümörlere hedeflenebilmesini dual modalite olarak SPECT/Optik sistemlerde gösterebilmek için multifonksiyonel prob yapılması amaçlanmıştır. Multifonksiyonel prob olarak T hücrelerine konjuge  $^{99m}\text{Tc}$  radyoışaretili floresan özellikli silika nanoparçacıklar sentezlendi.

Bu çalışmada floresan boya maddesi olarak 800 nm lik dalga boyuna sahip olan ICG kullanılmıştır ve mezoporlu silika nanoparçacıklar ile enkapsüle edilmiştir. Bu tip boyaların silika nanoparçacıklar ile enkapsülasyonu onların *in vivo* olarak uzun süreli izlenmesine katkı sağlamakta, kimyasal stabilitesini ve biyouyumluluk derecesini arttırmakta, sönümlenmelerini ve bozunmalarını önemli ölçüde azaltmaktadır. Sentezlenen floresan özellikli silika nanoparçacıkların karakterizasyon çalışmaları dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı elektron

mikroskobu (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizleri ile yapılmıştır.

Sentezlenen floresan özellikli mezoporlu silika nanoparçacıklar Dietilenetriaminepentaasetik asit (DTPA) şelatlayıcı ajanı kullanılarak  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyo işaretlenmiştir. Radyoişaretleme verimi ve radyokimyasal saflık TLC yöntemiyle tespit edildikten sonra son aşama olarak  $^{99m}\text{Tc}$  işaretili floresan silika nanoparçacıklar T hücrelerine protamin sülfat ve heparin varlığında konjuge edilmiştir.

Bu yeni multifonksiyonel prob ile antijen spesifik T hücrelerinin *in vivo* olarak dual modalite ile SPECT/Optik görüntülemesinin sağlanacağı ve bunun sonucunda kanserin teşhisi amacıyla T hücre transfer edilen sistemlerin geliştirilmesine katkıda bulunacağı düşünölmektedir.

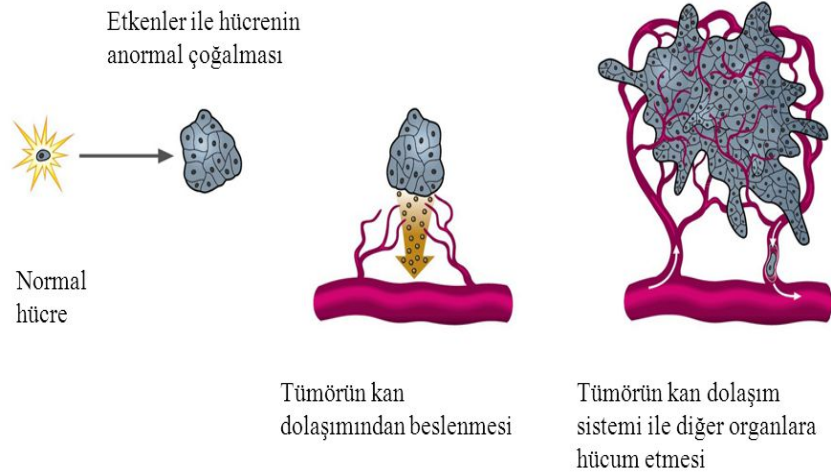


## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Kanser

Kanser anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalması sonucu başlangıç noktasından mikroçevresine, yakın dokulara ve diğer dokulara yayılması olarak basitçe anlatılabilir. Kontrolsüz bölünen hücreler, bulunduğu doku ve organı işgal ederek dokunun veya organın işlevini yerine getirmesini engeller (Challapalli et al., 2017).

Kanser, insan vücudunda bulunan trilyonlarca hücrenin herhangi birisinde başlayabilir. Normal insan hücreleri vücudun ihtiyacına göre yeni hücreler oluşturabilmek için büyür ve çoğalırlar. Sağlıklı dokularda hücre ölümü ve çoğalması moleküler düzeyde sinyallerle dengede tutulur. Sağlıklı hücrelerin metabolizmasını dikte eden hücre içi ve hücre dışı sinyallerin kanser hücrelerindeki etkisi zayıflar ve bunun sonucu olarak hücrelerin moleküler sinyallerden bağımsız olarak aşırı çoğalması ve doku işgali görülür. Çoğalan hücreler bulunduğu dokuyu aşarak kan ve lenf dolaşımı vasıtasıyla vücudun farklı bölgelerine gidebilirler (Şekil 2.1). Ulaştıkları dokularda tümör kolonileri oluşturarak büyümeye devam ederler. Kanserli hücrelerin oluştuğu dokudan vücudun diğer bölgelerine yayılmasına metastaz adı verilir.



Şekil 2.1 Kanser oluşumu ve çoğalması

Kaynak alınan vücut kısmına ve mikroskopik görünümüne göre kanser isimlendirilir. Örneğin; kaynak aldıkları dokuya göre meme kanseri, deri kanseri, akciğer kanseri, mide kanseri gibi isim alırlar. Değişik tipteki kanserlerin büyüme ve çoğalma hızları, yayılma şekilleri ve tedavilere verdikleri cevaplarda farklı olur. Bu farklılıklar neticesinde kanser hastalarında tedavi yöntemi hastalığın tipine göre düzenlenir (Bertram, 2000).

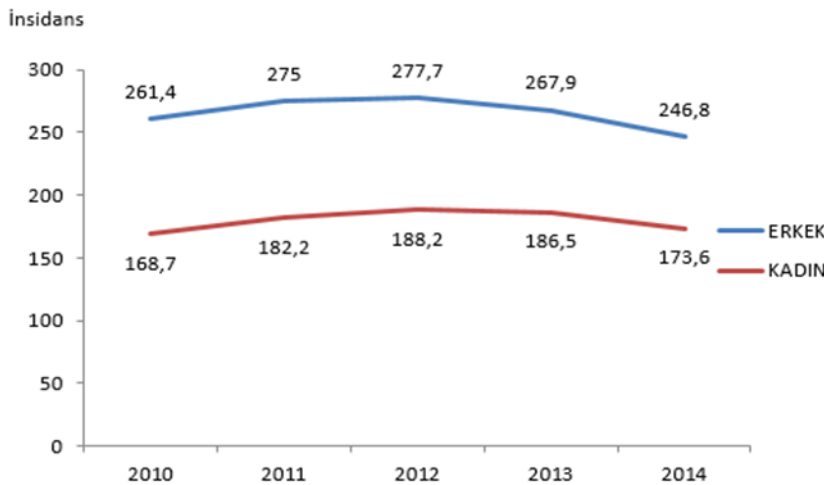


Günümüzde kanserden korunma yöntemlerinin bilinmesi, bireylerin bilinçlenmesi, erken tanı ve tedavi yöntemleri ile sağlanan başarının artması insanların kansere karşı duyduğu korkuyu içinden atmasını sağlamıştır. Bazı kanser türlerinin tedavisi veya kanserle uzun yıllar beraber yaşamak mümkün olsa da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

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

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

Amerikan Kanser Derneği'nin 2015 yılında yayınladığı Kanser Atlası'nda, Türkiye'de her yıl 148 bin civarında yeni kanser vakasının ortaya çıktığı bilgisi bulunmaktadır. Yaklaşık 91 bin 800 insan kanserden yaşamını yitirdiği için önemli bir sağlık sorunu olarak ele alınmaktadır. Türkiye'deki resmi olan son rakamlar değerlendirildiğinde bir yılda yaklaşık olarak 96.000 erkeğe ve 67.000 kadına kanser teşhisi konulduğu tahmin edilmektedir. Son 5 yıl verileri değerlendirildiğinde; kanserin görülme sıklığında herhangi bir artma veya azalma görülmemektedir. (Steering Committee, 2015). Şekil 2.2'de tüm kanserler yaş standart insidans hızlarının cinsiyete göre dağılımı görülmektedir.



Şekil 2.2 Tüm kanserler yaş standart insidans hızlarının cinsiyete göre 2010-2014 yılları arasındaki dağılımı (Her 100 bin kişide yıllık teşhis edilen kanser sayısı) (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2017)

Dünya genelinde yaşlı nüfus oranının yükselmesi ve dolayısıyla toplam nüfusu etkilemesine bağlı olarak artan çevresel karsinojenlerle temas sonucu, kanser sayısının progresif olarak artmaya devam edeceği öngörülmektedir (Haydaroğlu vd., 2007). Kanserden korunma ve erken teşhisi için hastalığın nedenlerinin tespit edilmesinin ve bu anlamda kansere karşı alınabilecek tedbirlerin belirlenmesinin insanlık için büyük önemi bulunmaktadır.

## 2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri

Günümüzde kanserin moleküler özellikleri, genetik mutasyonlar, tümör hücreleri ve immün sistemde görev alan hücrelerden salgılanan moleküller tedavi yönteminde belirleyici olmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan yöntemler şunlardır:

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

Tedavi seçimi; tümörün konumuna, derecesine, hastalığın aşamasına ve hastanın genel durumuna bağlıdır. Günümüzde multimodal yaklaşım olarak adlandırılan cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi uygulamaların kombinasyonu pek çok kanserin tedavisinde başarıyı arttırmaktadır.

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

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

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

Kanserli hücrelerin büyüme ve yayılmasını durduran tedavi yöntemlerinden birisi ise immünoterapidir. İmmünoterapide amaç, hastanın bağışıklık sistemini güçlendirerek vücudunun kanseri kendi kendine yenmesini sağlamaktır. İmmünoterapi kanser tedavisinin yeni bir boyutu olarak adlandırılabilir. Normalde insanın kendi bağışıklık sisteminde kanser hücrelerini tanıyıp yok eden hücreler bulunur. Bağışıklık sistemi kanserli hücreleri tanıyınca harekete geçerek hücreyi yok eder. Bunlarla bağışıklık sistemindeki T hücreleri savaşır. T hücreleri kanser hücrelerine karşı savaşarak, onu yok etmeye çalışır.

### 2.3 İmmünoterapi

Kanser immünoterapi tedavisinde bağışıklık sistemini harekete geçiren yöntemler kullanılmaktadır. İmmün sistem hücreleri, kanser hücrelerini yok etmek için hedeflenmektedir. Bu yaklaşım üç yöntemle sağlanabilir.

1. İlk yöntem, kanser tedavisi için spesifik antikorlara dayanmaktadır.
2. İkinci yöntem, kanser hastalarında protein kullanılarak üretilen aşlamaya dayanmaktadır.
3. Üçüncü yöntem, hastaya sitotoksik T lenfositler veya dendritik hücreler gibi bağışıklık sistemi hücrelerinin aktarılmasıyla gerçekleştirilmektedir (Şakalar, 2013).

Biyolojik terapi olarak da adlandırılan immünoterapi, vücudun doğal savunma mekanizmalarını kanserle savaşmaya teşvik eden umut verici bir tür kanser tedavisidir. Kanser aşılı, monoklonal antikorlar ve hücresel terapilerden oluşmaktadır. Bu aşılı, bağışıklık sistemi yoluyla kanser hücrelerini yok etmeyi amaçlamaktadır. Böylece kanser önleme rollerinin yanı sıra bir kanser hücresi varlığında, bulunduğu bölgeye saldırabilme özellikleri de bulunmaktadır. Lenfositler ve dendritik hücreler genellikle hücresel tedavide kullanılmaktadır. Monoklonal antikorlar, kanser hücrelerinde bulunan spesifik antijenleri hedeflemek için tasarlanmıştır. Şu anda klinik olarak onaylanmış en az 12 monoklonal antikor kanser tedavisi için kullanılmaktadır ve devam eden faz çalışmaları ile birçok kanser aşısı geliştirilmektedir.

Kanser immünoterapisi son birkaç yüzyılda onkoloji ve immünoloji alanlarındaki gelişmelerle ortaya çıkmıştır. 1796'da immünoterapi, çiçek hastalığını önlemek için yapılan ilk aşı olan Cowpox ile gerçekleştiren Edward Jenner'in başarısıyla başlamıştır. Emil Von Behring ve Kitasato Shibasabo, on dokuzuncu yüzyılın sonlarına doğru hayvanları aşılıyarak antitoksik kan serumu difteri toksininin ortaya çıkışını keşfetmişlerdir. Ardından Paul Ehrlich Bmagic mermi konseptini yaratarak hastalıkları spesifik bir şekilde hedefleyen antikorlar

kullanılmasını sağlamıştır. 1997'de Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), foliküler lenfomanın tedavisi için rituximab ile ilk antikor tedavisini onayladı. Daha sonrasında trastuzumab, alemtuzumab, cetuximab, bevacizumab, brentuximab vedotin gibi farklı monoklonal antikorlar da onaylanmıştır. Kanser aşularının üretimi, monoklonal antikorların kullanılmasından sonra başlamıştır. Kanser aşısı sipuleucel-T'nin ilk hücre bazlı immün tedavisi, prostat kanseri tedavisi için 2010 yılında onaylanmıştır (Strebhardt et al., 2008).

İmmünoterapi yaklaşımında lenfositler ve dendritik hücrelerinden de bahsedilmektedir. Adoptif T hücresi tedavisi, T hücresi ile transplantasyonun pasif immünizasyonudur. T hücrelerinin yüzeyindeki reseptörler, antijenler olarak adlandırılan proteinlerle aktive olurlar. İnflamatuar hücreler veya antijen sunan hücreler (APC) olarak bilinen spesifik immün hücreler, normal dokularda ve tümör dokular olarak bilinen tümör-infiltrate edici lenfositlerde (TIL) bulunmaktadır. Dendritik hücreler gibi antijen kaynağı hücrelerin varlığıyla T hücreleri tümör antijenleri olarak harekete geçirilirler. Bu hücreler tümör hücrelerine karşı saldırı kapasitesine sahip olsa da, tümör ortamı yüksek derecede immünosupresiftir.

Tümör blokları elde etmek için çeşitli yollar mevcut olması nedeniyle tümör antijene özgü T hücreleri, tümör numunelerinden elde edilebilir veya genetik olarak modifiye edilebilir. Bu hücrelerin aktivasyonu, *ex vivo* transfer ile gerçekleştirilmektedir. Bu tür tedaviye yönelik çalışmalar ümit verici bir gelişme gösterse de adoptif bir T hücresi tedavisi henüz mevcut değildir. Tümör spesifik T hücreleri, spesifik antijenlere, tümör stroma veya vaskülatüre bağlı olarak tümörün tedavisi için özel olarak kullanılmalıdır. Tümör spesifik antijenlerin örnekleri; doku farklılaşma antijenleri, mutant protein antijenleri, onkojenik viral antijenler, kanser testi antijenleri ve stromal vasküler veya spesifik antijenlerden oluşur. Doku farklılaşma antijenleri, her doku tipi için benzersizdir. Bu antijene özgü T hücresi, kanser hücreleri ve normal hücre antijenleri (karsinoembriyonik antijen; CEA) dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini hedefler. Antijen olarak kullanılan mutant proteinler, normal hücrelerin bu proteinleri içermemesi nedeniyle kanser hücreleri için spesifik bir özellik oluşturur. Normal hücre MHC molekülleri üzerindeki normal protein antijenlerini gösterirken, kanser hücresi mutant versiyonunu gösterir. T hücreleri bu iki hücreyi birbirinden ayırabilir; böylece bunlar kanser hücrelerini hedefleyebilir (June, 2007).

## 2.4 Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin atomik-moleküler boyutta mühendisliğinin yapılarak yeni özelliklerinin ortaya çıkartılmasıdır. Nanometre ölçeğindeki fiziksel, kimyasal ve biyolojik olayların anlaşılması ile fonksiyonel materyallerin kontrolü ve üretiminin sağlanması, bu sayede yeni cihazların ve sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Nanoteknoloji, metrenin milyarda biri olan nano kavramından

ismini almıştır. Kanser nanoteknolojisi ise moleküler görüntüleme, moleküler tanı ve hedefe yönelik tedavi için geniş uygulamaları içeren disiplinlerarası bir araştırma alanıdır (Berk ve Akkurt, 2012).

Nanotıp, nanoteknoloji ve ilacı bir araya getirerek yeni tedaviler geliştirebilir ve mevcut tedavileri ise daha iyi bir noktaya taşıyabilir. Nanotıp, mevcut konvansiyonel terapiye ek olarak hastalık bölgesine terapötik veya diagnostik ajanların taşınmasını sağlayan sistemler geliştirmiştir (Gary Bobo et al., 2013).

Yeni tekniklerin ve sentetik stratejilerin geliştirilmesi, yeni biyoaktif moleküllerin keşfine yol açmıştır. Araştırmacılar yeni ilaç dağıtım yöntemlerinin geliştirilmesi konusundaki bilgilerini genişletmeye çalışmışlardır. Bu yöntemler arasında “nano inorganik” sistemler ile hem terapötik hem de teşhis amaçlı olarak çalışılmıştır.

Nanoteknoloji; tıbbi görüntüleme alanında, farmakoloji, mikrobiyoloji, yaraların iyileşmesi, dokuların yenilenmesi, kronik bazı hastalıkların tedavisi, aşı ve genetik alanlarında uygulanmaktadır. Nanoteknolojik ürünler; test ve tanı işlemlerinin hızla gerçekleştirilmesi, kanserin erken dönemde teşhisinde ve patojenlerin belirlenmesinde yarar sağlamaktadır.

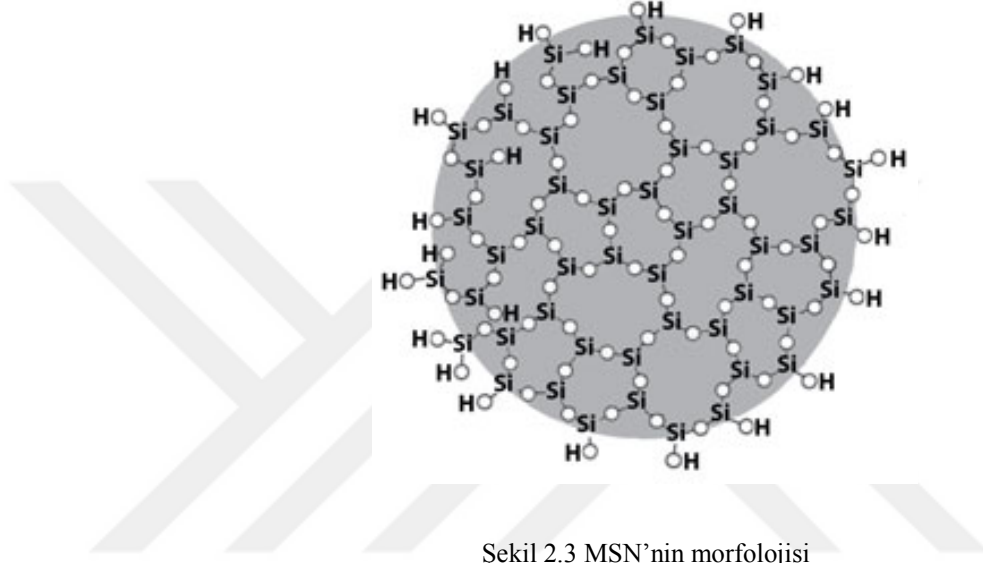
Kanser tedavisinin başarılı olabilmesi için erken teşhis çok önemlidir. Kanseri erken dönemde teşhis etmek geleneksel yöntemlerle yetersiz kalmaktadır. Nanoteknolojik gelişmeler sayesinde nano boyutta olan maddeler manyetik, optik özellikler kazanarak kanserli dokuların tespit edilmesinde kullanılabilir (Gordon et al., 2007).

Son araştırmalar peptidler, proteinler, nükleik asitler veya küçük molekülü ligandlar gibi biyolojik moleküllerle kovalent olarak bağlı olan fonksiyonel nanopartiküller geliştirmiştir (Alivisatos, 2004). Lenf nodu prostat kanseri tespiti için bir kontrast madde olarak süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkların kullanımı (Harisinghani et al., 2003) ve tümör vaskülatürlerine hedeflenen gen verilmesi için polimerik nano partiküllerin kullanılması gibi tıbbi uygulamalar da ortaya çıkmıştır (Hood et al., 2002).

Farklı bir tür olan silika nanoparçacıklarla yapılan çalışmada ise silikanın etkili dozajlarda biyolojik olarak uyumlu olduğu, antikanser ilaçların toksisitesini azaltabilen yapıya sahip ve tümör hedefleme oranı yüksek olduğu gösterilmiştir (Lu et al., 2010). Bu avantajlı özellikler, kanser tedavisi için ümit verici yeni araçlar olarak mezoporlu silika nanopartikülleri daha fazla keşfedilmesinin yolunu açmıştır.

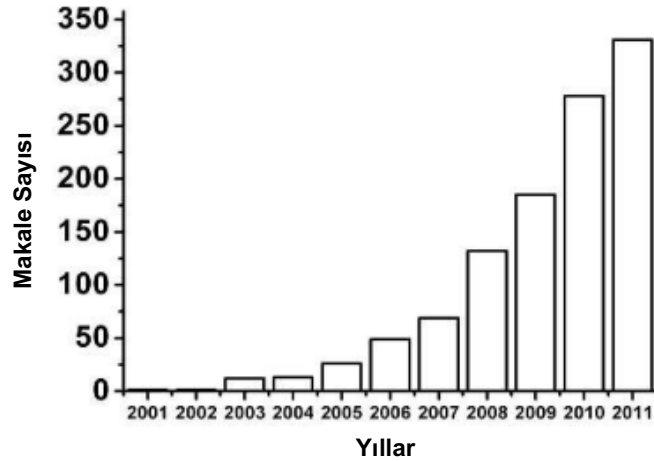
### 2.4.1 Mezoporlu silika nanoparçacıklar

Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN) yoğun araştırma konusu olmuştur (Xu et al., 2006). MSN, suda çözünmez ve zayıf geçirgen ilaçların ilaç verimini iyileştirmede büyük bir potansiyele sahiptir. MSN'nin anti-kanser ilaçları için hedeflenmiş ilaç taşıyıcı araçlar olarak uygulanmasında büyük bir potansiyel görülmüştür (Mamaeva et al., 2011). Şekil 2.3'te MSN'nin morfolojisi görülmektedir.



Şekil 2.3 MSN'nin morfolojisi

MSN kolay sentezlenmesi, morfolojileri, gözenek boyutu, stabilitesinin iyi olması ve yüzey fonksiyonelliğinin çeşitliliği nedeniyle iyi bir ilaç taşıyıcısı olarak kabul edilmiştir (Tang et al., 2012). Şekil 2.4'te görüldüğü gibi 2001 yılında ilaç taşıyıcı sistemi olarak MSN'lerin kullanıldığı rapor edildiğinden itibaren son on yılda MSN ile ilgili biyomedikal uygulamalarda artış olmuştur (Vallet-Regi, 2011).



Şekil 2.4 Mezoporlu silika ve ilaç iletimi konusunda araştırma artışı (Tang et al., 2012)

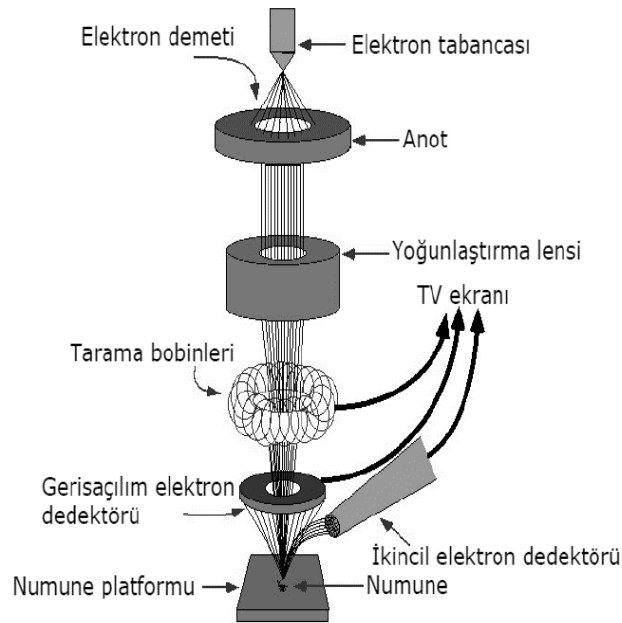
Mezoporlu silika yapı ilaç verme sistemleri için kritik öneme sahiptir. Çünkü daha fazla ilaç molekülü, gözenekli yapıda özgün olmayan bir şekilde adsorbe edilmek yerine, düşük birikimli salım miktarı ayarlanarak gözenekler içine nüfuz edilmesini sağlayabilir (Zhu et al., 2005).

Görüntüleme teknolojileri ile MSN; kontrast sağlayan ajanı korumak için taşıyıcı veya koruyucu olarak görev yaparlar. Yüksek biyouyumluluk; toksik dışı olma, yüksek hidrofilitte, optik şeffaflık, ayarlanabilir boyut gibi özelliklerinden dolayı önemli bir platform olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır.

## 2.5 Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları

### 2.5.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

1935 yılında Max Knoll tarafından tasarlanan taramalı elektron mikroskobu (SEM) mikroyapı alanında büyük gelişmelere yol açmıştır. İlk defa ticari olarak 1965 yılında üretilmiştir. SEM mikrometreden nanometre ölçeğine kadar heterojen organik ve inorganik malzemeleri tayin edebilen, bu yapıların elementel analizini yapabilen çok yönlü bir karakterizasyon aracıdır. SEM, çok geniş bir aralıktaki malzemelerin yüzeylerine ait üç boyutlu görüntü elde etme kapasitesine sahiptir (Misell et al., 1983).



Şekil 2.5 SEM'in şematik yapısı (Kolat, 2007)

Taramalı elektron mikroskobu optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sisteminden oluşur. Şekil 2.5'te verilen şekilde optik kolonda elektron tabancasından çıkan elektron demeti, yüksek gerilimin uygulandığı anot

plakasından geçerek numuneye doğru hızlandırılır. Kondenser mercekleri, elektromanyetik alan ile ince elektron demeti oluşumunu sağlar ve demeti numune üzerine odaklamak için objektif merceğinden faydalanır. Objektif merceğine bağlı çeşitli ışık aralıkları ve elektron demetinin numune yüzeyi taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Tüm optik kolon ve numune hücresi  $10^{-4}$  Pa vakum altında tutulmaktadır. Görüntüleme sisteminde, numune üzerine gelen elektron demeti girişimi sonucu oluşan çeşitli yansımaları ve elektron ışımalarını toplayan dedektörler, sinyal çoğaltıcılar ve numune yüzeyini görüntü ekranı ile senkronizasyonunu sağlayan manyetik bobinler bulunmaktadır.

Numune yüzeyine gelen elektron demetleri dış yörünge elektronları ile girişim yaparak düşük enerjili Auger elektronlarını oluşturur. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır. Yörünge elektronlarından çıkan ve enerjisi azalan elektronlar numune yüzeyine doğru hareket ederek ikincil elektronları oluştururlar. İkincil elektronlar numune hücresinde bulunan sintilatörde toplanarak numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntü elde edilmesinde kullanılır (Selçuk Üniversitesi İleri Teknoloji Araş. Uygulama Mrkz. Müd, 2019).

### 2.5.2 Dinamik ışık saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılımı (DLS), bir süspansiyondaki parçacıkların ortalama büyüklüğünü ve boyut dağılımını ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Teknik, hızlı ve non invaziv olma avantajına sahiptir, ancak düşük partikül konsantrasyonları gerektirir. Makro moleküllerin çözelti içindeki difüzyon davranışını incelemek için çok güçlü bir araçtır. Difüzyon katsayısı ve bundan dolayı hesaplanan hidrodinamik yarıçap, makro moleküllerin boyutuna ve şekline bağlıdır (Hallett, 1994).

Çözelti içerisindeki parçacıklar, etrafını çevreleyen çözücü moleküllerinin bombardımanı nedeniyle rastgele hareket halindedir. Bu harekete Brownian hareketi denilir. Küçük parçacıklar daha hızlı hareket ederken, büyük parçacıklar daha yavaş hareket eder. Bu hareketin hızı çevrimsel difüzyon katsayısı (translational diffusion coefficient) (D) olarak tanımlanır. Dinamik ışık saçılması, saçılan ışık şiddetinin zamana bağlı dalgalanmalarını ölçerek (D) katsayısının belirlenmesinde kullanılır. Dolayısıyla bir süspansiyon içerisindeki maddelerin Stokes-Einstein eşitliği kullanılarak hidrodinamik çapı bulunur.

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D}$$

d(H): Hidrodinamik çap

k: Boltzmann sabit

T: Sıcaklık

$\eta$ : Viskozite



D: Çevrimsel difüzyon katsayısı

Hidrodinamik çap, parçacığın etrafındaki elektriksel çift tabaka ile birlikte oluşturduğu büyüklüktür. Bu yüzden her zaman hidrodinamik çap, parçacık boyutundan daha büyüktür (Kahraman, 2011).

### 2.5.3 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

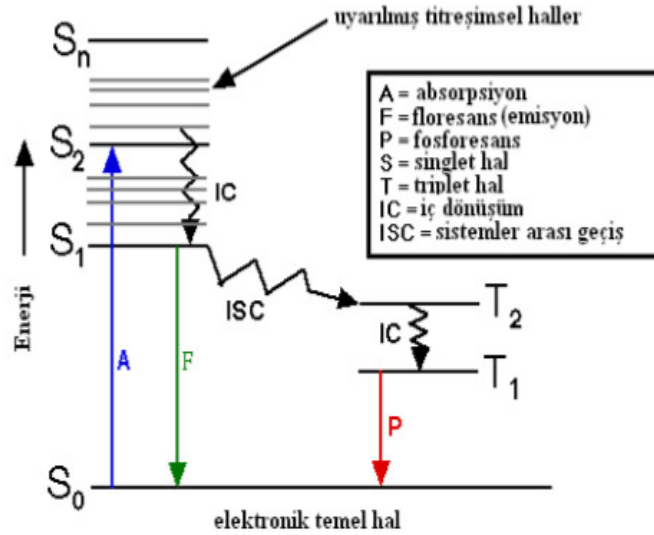
FTIR cihazı, Fransız matematikçi Sean Fourier'in geliştirip, Fourier dönüşümü olarak adlandırılan bir matematiksel işleme göre bir örneğe gönderilen kızılötesi ışınların absorpsiyonunun yorumlanması prensibine dayanır.

FTIR, incelenecek örneğin makromolekülleri fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal, kompozisyonel ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir tekniktir. Bu teknik boyama, işaretleme gibi uzun örnek hazırlama prosedürlerine ihtiyaç duyulmadan, örneğe zarar vermeden hızlı, hassas ve etkin sonuçların elde edilmesini sağlar.

FTIR spektroskopisi, elde edilen spesifik bilgiler sayesinde moleküllerin fonksiyonel gruplarının tespit edilmesini sağlayarak, farklı doku yapılarının ayırt edilmesine olanak tanır. Bu teknik kullanılarak, doku ve hücrelerde lipit, protein, DNA, RNA gibi biyomoleküllerdeki fiziksel, örneğin yapısal değişimlerin izlenmesi mümkün olabilmektedir. Bu bilgiler, öncelikle doğru bant tanımlamalarının yapılması, sonrasında ise ilgilenilen bantların bant pozisyonu, sinyal şiddeti/alanı ve bant genişliği değerlerinin hesaplanması ile elde edilebilir (Griffiths and Haseth, 2007).

## 2.6 Floresan Boyalar

Floresan boyalar araştırmacıların, karmaşık biyomoleküler yapılarda özel bileşenleri mükemmel hassasiyet ve seçicilik ile tespit etmelerini sağlar. Floresan problemler, spesifik bir uyarana cevap vermek veya biyolojik numunenin belirli bir bölgesinde lokalize olmak üzere tasarlanır. Floresan problemlerin mekanizması basit elektronik durum diyagramı (Jablonski diyagramı) ile açıklanmaktadır. Jablonski diyagramı; moleküler spektroskopide enerji transferini gösteren diyagramdır ve Polonyalı fizikçi Aleksander Jablonski'nin adını almıştır.



Şekil 2.6 Jablonski Diyagramı (Lakowicz, 1988)

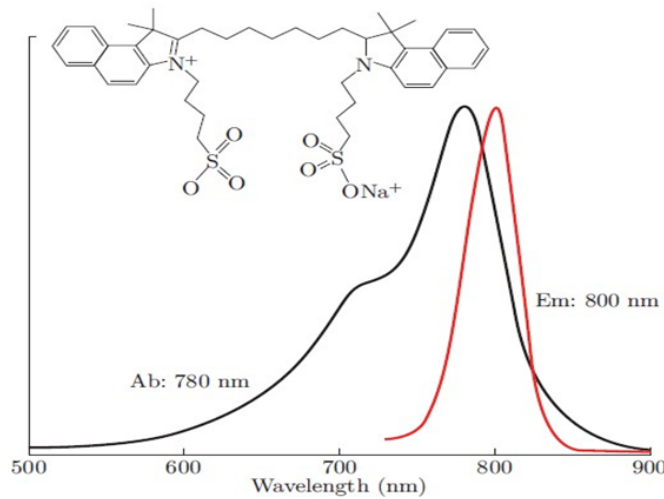
Başlıca enerji düzeyleri temel ( $S_0$ ) ve uyarılmış ( $S_1, S_2 \dots$ ) singlet ve uyarılmış triplet ( $T_1$ ) enerji düzeyleridir. Molekülün uyarılması,  $S_0$  dan  $S_1$ 'e  $\lambda_1$ ;  $S_0$  dan  $S_2$ 'ye  $\lambda_2$  dalga boylu ışınların soğurulmasıyla sağlanır. Moleküllerde elektronik uyarılmaların yanısıra titreşim uyarılmaları da gerçekleşir. Foton soğurularak uyarılma süreci çok kısa sürede gerçekleşir. Uyarılmış molekül birkaç adım üzerinden geçişler yaparak temel hale döner. Bu geçişler başlıca floresan, fosforesans gibi foton yayımı (yeşil ve kırmızı oklarla gösterilen geçişler) ve titreşim geçişleri, iç dönüşüm, dış dönüşüm, sistemler arası geçiş, ön ayrışma gibi ışısız (dalgalı oklarla gösterilen geçişler) ısıl, kinetik geçişlerdir (Jablonski, 1933).

Floresan işaretli hedefli problemlerle moleküler görüntülemeye, yüzey ışıklandırması ile floroforları tekrar tekrar harekete geçirme yeteneğinden ve organik floroforların fotostabilitesi arttıkça artan foton görüntüleme olayları sağlayarak artmış sinyal sayesinde, medikal görüntülemeye *in vivo* olarak tespit etmeyi sağlayabilir.

Günümüzde floresan boyalar hücrelerdeki organizmalardan organlara kadar birçok seviyede görselleştirme için kullanılmaktadır. Moleküler olayların olağanüstü duyarlılık ve seçicilik ile görselleştirilmesini sağlayan floresan görüntüleme teknikleri, canlı hücrelerin çalışılmasında temel bir araç haline gelmiştir. Bu amaçla optik görüntüleme uygulamalarında boyar madde olarak Cy3, Cy5, IRDye 800CW, Rhodamine B, ICG gibi organik floresan boyalar kullanılmaktadır.

### 2.6.1 İndosiyenin yeşili (ICG)

İndosiyenin yeşilinin (ICG) fizyolojik ve fiziksel özellikleri 1960'da Fox and Wood tarafından ilk olarak tanımlanmıştır. 1960'lardan itibaren kardiyak akım çalışmaları için yaygın olarak kardiyologlar tarafından kullanılmıştır. ICG molekülü ikişer tane lipofilik polisiklik yapıdan oluşmaktadır. Bu yapılar birbirine bir karbon zinciriyle bağlıdır. Her polisiklik parçasına bir sülfat grubu bağlı olduğundan molekül şekilde hidrofilik özellik kazanır. Moleküler yapı amfifilik (hem hidrofilik hem de lipofilik) yapıdadır. Molekül ağırlığı 774,96 g/mol olup, yüksek sinyal-arka plan oranına sahip biyo görüntüleme uygulamaları için son derece uygundur. Şekil 2.7'de 800 nm civarında emisyon maksimumu sergilediği görülmektedir (Owens, 1996).



Şekil 2.7 ICG yapısı ve NIR bölgesindeki dalga boyları (Sheng et al., 2013)

1958 yılında ICG, insanlarda gösterge-seyreltme çalışmalarında kullanılmak üzere FDA tarafından onaylanmıştır ve insanlara şimdiye kadar uygulanmış en düşük etkili toksik ajanlardan biridir. Ayrıca, ışık ve toksik kimyasal türleri (tekli oksijen, süperoksit anyonlar ve hidroksil radikalleri gibi) üretmek için absorbe edilmiş ışık enerjisini dönüştürerek, fotoakustik görüntüleme (PA), fototermal (PT) ve fotodinamik (PD) terapilere olanak verir. Bu nedenle ICG iyi bir terapötik ajan olarak kabul edilmiştir (Sheng, 2013).

Bununla birlikte ICG kullanımının bazı dezavantajları vardır. Fotodegradasyon; ICG'nin sulu çözeltide ışığa maruz kaldığında bozunmasının hızlandığı ortaya çıkmıştır. Termal bozunma; daha yüksek sıcaklıklarda, sulu çözeltilerde ICG'nin bozunmasını belirgin bir şekilde hızlandırır. Sulu instabilite; ICG sulu ortamda degradasyona uğrar ve aynı anda emilim ve floresan kaybı olur. ICG molekülü farklı hazırlama stratejileri ile farklı nanoparçacıklarla konjuge edilebilir. Böylece yüksek fotostabilite, termal stabilite, uzun dolaşım zamanı ve tümör hedefleme gibi avantajlara sahip olur (Larush et al., 2011).

## 2.7 Radyofarmasötikler

Radyofarmasötik, spesifik hastalık bölgelerinde (genelde kanserli tümörler) teşhis ve terapötik tedavisi için kullanılan bir radyoaktif bileşiktir. Nükleer tıpta radyofarmasötiklerin yaklaşık %95'i teşhis amaçlı kullanılırken diğerleri ise terapötik tedavi için kullanılır. İnsanlara uygulandıkları için, steril ve apirojen olmalı ve geleneksel bir ilacın gerektirdiği tüm kalite kontrol önlemlerine tabi tutulmalıdırlar. Bir radyofarmasötik,  $^{133}\text{Xe}$  gibi bir radyoaktif element,  $^{131}\text{I}$  ile iyodine edilmiş proteinler ya da  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  işaretli bileşikler gibi olabilir.

Bir radyofarmasötik radyonüklid ve farmasötik olmak üzere iki bileşenden oluşur. Bir radyofarmasötiğin kullanılabilirliği, bu iki bileşenin özelliklerine göre belirlenir. Radyofarmasötik kolayca üretilebilmeli, ucuz ve herhangi bir nükleer tıp tesisinde kolayca bulunabilmelidir. Radyonüklidlerin veya işaretli bileşiklerin karmaşık üretim metotları radyofarmasötiğin maliyetini arttırır. Kullanıcı ile tedarikçi arasındaki coğrafi mesafe, kısa ömürlü radyofarmasötiklerin kullanılabilirliğini de sınırlandırır. Bir radyonüklidin fiziksel yarı ömrü  $T_p$  (veya  $t_{1/2}$ ) olarak gösterilir. Fiziksel yarı ömür, herhangi bir fizikokimyasal koşuldan bağımsızdır ve her bir radyonüklid için karakteristiktir. İnsanlara uygulanan radyofarmasötikler idrar atılımı, terleme veya başka mekanizmalar yoluyla biyolojik sistemden kaybolacak şekilde tasarlanmıştır.

Hastaya uygulanan radyofarmasötiğin istenilen organa gitmesi için özel bir kimyasal yapısı olmalıdır. Genellikle bir radyofarmasötik istenen dokuya yönlendirecek biyoaktif bileşen ve gittiği yerde radyasyon yayarak organın görüntülenmesini sağlayacak radyoaktif bileşenden oluşur. Bioaktif bileşenin kimyasal yapısı görüntülenmek istenen yerin spesifik bir özelliğinden yararlanılarak belirlenir.

Bir radyofarmasötik geliştirildikten ve başarılı bir şekilde formüle edildikten sonra, klinik etkinliği ilk önce hayvanlar daha sonra insanlar üzerinde test edilerek değerlendirilir. Teşhis ve tedavide kullanılmak üzere tasarlanan radyofarmasötikler FDA tarafından çok sıkı biçimde denetlenmektedir (Saha, 2004).

Uygulama noktasında radyofarmasötikler hastaya verildikten sonra bir süre etkisini göstermesi beklenir. Kısa bir süre sonra hastaya verilen radyofarmasötik görüntülenmek istenen organa gider. Yayıdığı ışın ile gama yayıcılar gama kamera ile pozitron yayıcılar pozitron emisyon tomografisi (PET) cihazıyla 'sintigrafi' adı verilen görüntüleri ortaya çıkarır. Bu görüntüler nükleer tıp doktorları tarafından değerlendirilerek hastalığın teşhisi, genel durumu veya uygulanan tedavinin etkinliği konusunda fikir yürütülür.

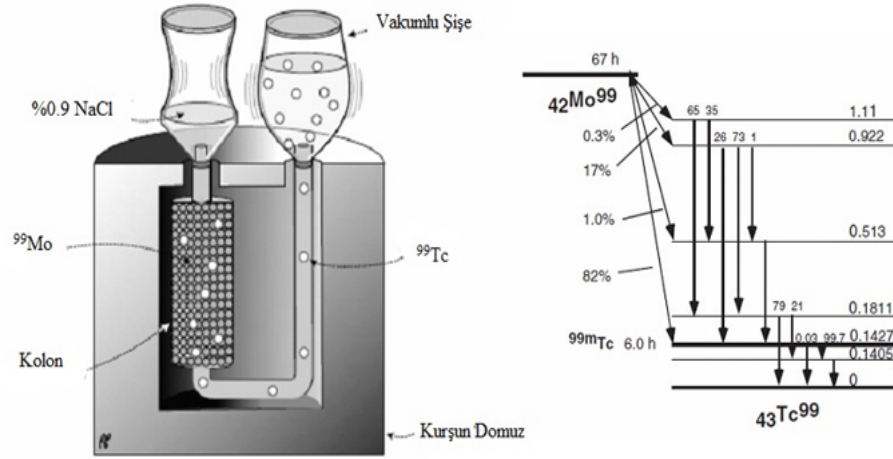
### 2.7.1 Teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) Kimyası

Nükleer tıpta kullanılan radyofarmasötiklerin %80'den fazlasını  $^{99m}\text{Tc}$  işaretli bileşikler oluşturur. Klinik kullanımda sıklıkla kullanılma nedenleri uygun fiziksel ve radyoaktif özelliklere sahip olmasıdır. İdeal fiziksel özelliklerine bakıldığında yarı ömrü ( $t_{1/2}$ ) 6 saattir ve yarı kararlı bir gama yayıcı (140 keV) radyoizotoptur. Yüksek radyokimyasal saflığa sahiptir ve minimum düzeyde işaretleme süresi (oda sıcaklığında 10-30 dakika) vardır. Ayrıca düşük maliyetle elde edilmeleri ve yüksek biyolojik etkinlikleri (hedef organ tarafından maksimum asimilasyon ve uygun farmakokinetik) nükleer uygulamalarda önemini arttırmıştır (Unak et al., 2007).

$^{99m}\text{Tc}$ , dokunun içine girebilen ve kolayca tespit edilebilen ideal foton enerjisine sahiptir. Kısa yarı ömür nedeniyle radyasyon tehlikesini azaltır ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan diğer radyoizotoplarla karşılaştırıldığında yüksek bir alım limiti vardır. Periyodik tabloda 43 numaralı elementtir ve geçiş metal grubu VIIB üyesidir. Teknesyumun elektron konfigürasyonu  $4d^5 5s^2$ 'dir. En dıştaki kabuğunda yedi elektronu vardır ve perteknetatın yedi oksidasyon halini elde etmek için bu elektronları kaybeder. 1 ile 7 arasında bir dizi oksidasyon durumu ile seçkin koordinasyon kimyasına sahiptir. (Akbar et al., 2016).

$^{99m}\text{Tc}$  1938'de Emilio Segrè tarafından keşfedilmiştir. Ernest O. Lawrence'ın Berkeley Radyasyon Laboratuvarı'nı ziyaret eden Segrè, 1937'de laboratuvarın anormal radyoaktivite formlarını yayan bir siklotron deflektöründen bir molibden şerit göndermiştir. Yaptığı kimyasal ve teorik analizlerden sonra Segrè'nin doğada bulunmayan yapay ilk elementi sentezlediği ortaya çıkmıştır. Jeneratör, bir alüminyum oksit kolonu üzerinde  $^{99}\text{Mo}$ 'nun molibdat olarak adsorpsiyonundan ve ayrıca  $0.1\text{mol.L}^{-1}$   $\text{HNO}_3$  içinde  $^{99m}\text{Tc}$ 'nin (perteknetat olarak) ayrıştırılmasından oluşmuştur. (Green, 2012)

$^{99m}\text{Tc}$ , molibdenden siklotron bombardımanının bir ürünü olarak keşfedilmiştir. Şekil 2.8'de yarı ömrü 2,75 gün olan  $^{99}\text{Mo}$ ,  $^{99m}\text{Tc}$ 'ye dönüştüğü görülmektedir. Günümüzde  $^{99}\text{Mo}$ , tıbbi alanda kullanılan  $^{99m}\text{Tc}$ 'nin taşınabilir kaynağı olarak kullanılmaktadır.

Şekil 2.8 <sup>99</sup>Mo/<sup>99m</sup>Tc jeneratörü

## 2.8 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Yöntemler

### 2.8.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

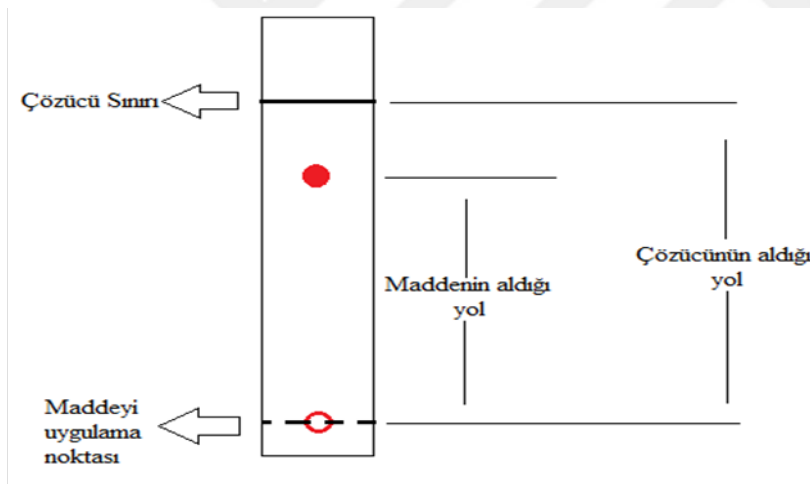
İnce tabaka kromatografisi (TLC), katı-sıvı adsorpsiyonu kromatografisidir. TLC, birçok biyolojik örnek türünde çeşitli sınıflardan bileşiklerin güvenilir şekilde ayrılmasını ve analiz edilmesini sağlar. Analizler biyoloji, biyokimya, hematoloji, immünoloji, tıbbi tanı ve moleküler biyoloji alanlarında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

Hazırlanan radyofarmasötik kağıt TLC tabakaları üzerine damlatılır. Tabakalar alüminyum, cam, plastik gibi maddelerden yapılmış levhalar olup üzerleri selüloz, silikajel, alüminyum oksit gibi maddeler ile ince tabaka halinde kaplanır. Uygun bir sıvı faz olarak seçilen solventin içinde bulunduğu banyoda tabakalar yürütülür. Yaygın olarak kullanılan sıvı fazlar metanol, aseton, metil etil keton (MEK), % 0,9 NaCl çözeltisi ve sudur. Kromatografik işlem sırasında, numunenin farklı bileşenleri, dağılım katsayılarına bağlı olarak adsorban tabaka (kâğıt veya silika jeli) ve çözücü arasında dağılırlar.

Adsorban sabit faz, çözücü ise hareketli fazdır. Sabit fazın elektrostatik kuvvetleri çeşitli bileşenleri geciktirme eğiliminde olurken hareketli faz onları taşır. Bir çözücü içindeki farklı bileşenlerin bu etkisi ve farklı çözünürlükleri, bireysel bileşenlerin farklı hızlarda hareket etmesine ve TLC şeridi boyunca farklı mesafelerde yürütülmesine neden olur. Çözücünün polaritesi numunedeki diğer bileşenlerin kromatografik ayrışmasını da etkiler (Saha, 2004).

Kromatografisi yapılacak numune mikropipet veya enjektör yardımıyla tabakanın alt kenarından belli bir uzaklığa damlatılarak kurumaya beklenir. Sonrasında TLC şeritleri tank içerisine yerleştirilir ve hareketli fazın tabaka üzerinde yükselmesi sağlanır. Hareketli faz, kromatografi kağıdı üzerinde, numune içerisindeki maddelerin birbirinden ayrılması için gereken yüksekliğe kadar yürütülmelidir. TLC şeridi yürütme kabından alınır. Çözücünün ulaştığı seviye kurşun kalemle hafifçe işaretlenerek çözücünün buharlaşması beklenir (Medine, 2008).

TLC’de radyofarmasötiklerin karakterizasyonu  $R_f$  değeri (alınma değeri) ile belirlenir.  $R_f$  değerini tanımlarsak örneğin yürüdüğü mesafenin solventin yürüdüğü mesafeye oranıdır. Bu oranlar bilinen bileşenlerle oluşturulmuştur ve farklı deneysel koşullara göre değişebilir.  $R_f$  değerleri, belirli bir örnekte farklı bileşenlerin tanımlanmasında kullanılır. Çözücü tabakada istenen bir mesafeye hareket ettiğinde, şerit bölmeden çıkarılır, kurutulur. Şeritler oda sıcaklığında kurutulur gazlı dedektörde (Bioscan 2000 TLC Tarayıcı)  $R_f$  değerleri ve işaretlenme yüzdeleri bulunur (Saha, 2004). Şekil 2.9’da TLC şeridinin uygulanma mekanizmasını içermektedir.



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

Şekil 2.9 TLC şeridinin uygulanma mekanizması (Çetin, 2018)

## 2.8.2 Lipofilite

Maddenin yağ içinde çözünme eğiliminin göstergesi lipofilitedir. Lipid su oranı, partiyon katsayısı olarak ifade edilir. Katsayı ne kadar büyük olursa maddenin lipid membranından absorpsiyonu o kadar fazla olmaktadır (Coenen,

2006). Kimyasal bileşiklerde yağ; lipid, petrol ve hekzan, oktanol, toluen gibi apolar çözümlerde çözünme yeteneğini gösterir (Theobald, 1989; Özyüncü, 2009).

Tek bir molekülün iki faz arasındaki dağılım faktörü şeklinde tanımlanabilir.

$$P=A_0/A_{su}$$

Su ve oktanol arasındaki dağılım faktörünün logaritması moleküler hidrofobiteyi ve lipofilite tayin etmek için önemli bir parametredir. Organik moleküller için medikal kimyada önemli olan fizikokimyasal özellikleri saptamada başarılı birkaç teknik olmakla birlikte, peptidler ve aminoasitlere gittikçe artan farmosötik ilgiden dolayı genellikle hızlı, güvenilirdir. Peptidlerin, proteinlerin ve enzimlerin biyolojik aktivitesini, ilaç dağılım bilgisini ve dozaj formülasyonunun saptanması için hidrofobite ve lipofilite önemlidir. Peptidin biyolojik transport özelliklerini anlamada  $P_0/su$  çoğu zaman iyi bir yol göstericidir. Peptidlerin çoğu hidrofilik özelliğe sahiptir (Buchwald, 1988).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

##### 3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- SKOV3 İnsan yumurtalık adenokarsinoma epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- RPMI-1640 (Bio.Ind)
- L-Glutamine (Bio.Ind)
- Sodyum prüvat (Bio.Ind)
- Essential amino acid (Bio.Ind.)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Streptomisin/Penisilin (Bio.Ind)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- Fosfat tampon çözeltisi (PBS) (Bio.Ind)
- Tripsin EDTA (Bio.Ind)
- Şişe üstü 500 ml, 70 mm Diatemer Selüloz asetat filtre (Corning)
- CTAB (N-cetyltrimethylammonium bromide) (Sigma-Aldrich)
- TEA (trietanolamin) (Sigma-Aldrich)
- TEOS (Tetraethy orthosilicate) (Sigma-Aldrich)
- APTES ((3-aminopropyl)triethoxysilane) (Sigma-Aldrich)
- ICG (Indocyanine green) (Sigma-Aldrich)
- DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) (Sigma-Aldrich)
- DMF (dimethylformamide) (Sigma-Aldrich)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH) (Merck)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) (Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- HCl (Hidroklorik asit) (Merck)

- NH<sub>3</sub> (Amonyak) (Merck)
- Asetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N) (Merck)
- SF (Serum Fizyolojik) (%0,9 NaCl)
- Piridin (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N) (Sigma Aldrich)
- ITLC-SG Silika kaplı plastik şeritler (Merck)
- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma-Aldrich)
- Muse Annexin V & Dead Cell Kit (Millipore)
- Sodyum Perteknetant (Na <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı)
- Ninhidrin (Merck)
- Glisin (Merck)
- Prolin (Merck)

### **3.1.2 Kullanılan cihazlar**

- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO<sub>2</sub> inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

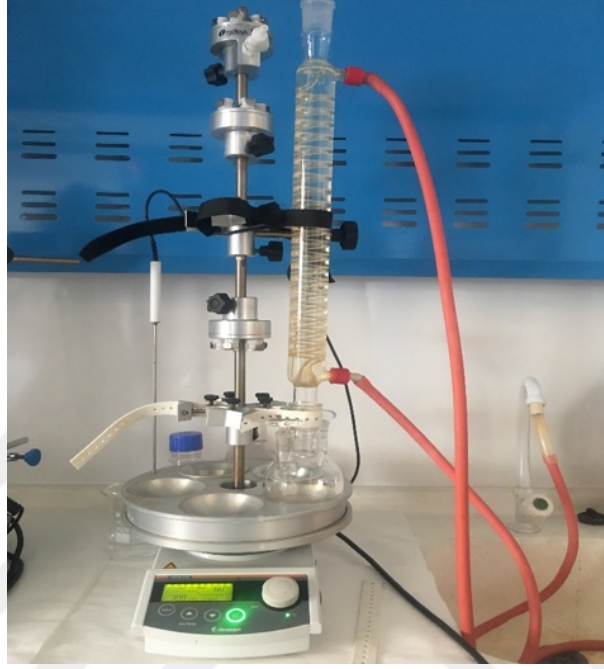
- Işıık mikroskopu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskopu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Mettler) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- SEM (Scanning Electron Microscopy) (Thermo Scientific Apreo S) (Ege Üniversitesi, MATAI-Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi)
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)
- DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Muse Hücre Analiz Cihazı (Millipore) Muse Annexin V / Ölü Hücre Test Kiti (Merck) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

### **3.2 Mezoporlu Silika Nanoparçacıklar (MSN)**

#### **3.2.1 Mezoporlu silika nanoparçacıkların sentezi**

Silika nanoparçacıkların mezoporlu yapı oluşturmaları için N-cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) ve trietanolamin (TEA) kullanılmıştır. Geri soğutuculu karıştırma sisteminde 95°C'de 20 mL ultra saf suda reaksiyon gerçekleştirildi. 1 g CTAB ve 70 µL TEA üç boyunlu balona koyularak 1 saat karıştırıldı. Süre sonunda, damla damla 1,5 mL tetraetil ortosilikat (TEOS) eklenerek 1 saat daha karıştırıldı. Oluşan beyaz renkli karışım bir süre soğumaya bırakıldı. Soğuma sonrasında iki defa 20 mL etanol ile yıkanarak reaksiyona girmeyen maddeler uzaklaştırıldı. 10 dakika 10.000 rpm'de santrifüjlenerek silika nanoparçacıklar çöktürüldü. Sentezlenen silika nanoparçacıklar üzerinde kalan ve reaksiyona girmeyen CTAB'ı uzaklaştırmak için 20 mL metanol ve 1 mL

hidroklorik asit çözeltisi içerisinde geri soğutuculu sistem kullanılarak 60°C'de gece boyunca karıştırıldı. CTAB uzaklaşana kadar metanol-su karışımı ile gece boyunca yıkama işlemi tekrar edildi. CTAB'ın uzaklaşıp uzaklaşmadığı FTIR (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi) analizi ile tespit edildi. İlgili FTIR sonuçları bölüm 4.2'de verilmiştir. Şekil 3.1'de mezoporlu silika nanoparçacıkların sentez düzeneği gösterilmektedir.



Şekil 3.1 Mezoporlu silika nanoparçacıkların sentez düzeneği

Sentez sonrasında nanoparçacık miktarının tayini için MSN'ler 37 °C'de etüvde kurutuldu. Kurutma işlemi sonrasında nanoparçacık miktarı yaklaşık 90 mg olarak bulundu.

### 3.2.2 Mezoporlu silika nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu

MSN'lerin yüzeylerinin amin grupları ile modifikasyonunda APTES (3-Aminopropyltriethoxysilane) kullanıldı. Sentezlenen MSN'ler 50 mL etanol ve 1 mL APTES içerisinde 80 °C'de 12 saat geri soğutucu altında karıştırıldı. 12 saat sonunda çözelti santrifüjlenerek parçacıklar çöktürüldü. Reaksiyona girmeyen APTES'in uzaklaştırılması için çöken nanoparçacıklar saf su ile 3 defa yıkandı. Yıkama sonrasında parçacıklar oda sıcaklığında kurutuldu. Yüzey modifikasyonu yapılan mezoporlu silika nanoparçacıklar MSN-NH<sub>2</sub> olarak adlandırıldı.

### 3.2.3 Ninhidrin testi

Yüzey modifikasyonu yapılarak silika nanoparçacıklar üzerinde oluşturulan amin gruplarının tespiti için ninhidrin testiyle kantitatif tayin yapıldı. Bu yöntemle

2 mg/mL ninhidrin pH 5'te 20 mM asetik asit–sodyum asetat tamponunda çözülerek hazırlandı. Kalibrasyon eğrisi için 0,2 mg/mL glisin ve 0,2 mg/mL prolin çözeltilerinden 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,01; 0,12 mg/mL konsantrasyonlarda standart glisin ve prolin çözeltileri ayrı ayrı hazırlandı.

Ardından aşağıdaki çizelgede belirtilen miktarlar kullanılarak ninhidrin reaksiyonu 10 dakika 100°C'de gerçekleştirildi. Glisin için 570 nm, prolin için 440 nm dalga boyunda absorbanslar ölçüldü ve konsantrasyon değerleri kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı. Çizelge 3.1'de Ninhidrin testi reaktif miktarlarını içermektedir.

Çizelge 3.1 Ninhidrin testi reaktif miktarları

	Kör	Standart	Örnek
<b>Aminoasit Çözeltisi</b>	-	2 mL	2 mL
<b>d-su</b>	2 mL	-	-
<b>Ninhidrin reaktifi</b>	0,4 mL	0,4 mL	0,4 mL
10 dakika 100 °C'de ısıtılır ve soğutulur			
570 ya 440 nm'de absorbans ölçülür.			

### 3.2.4 Mezoporlu silika nanoparçacıklara DTPA konjugasyonu

MSN'lerin <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenebilmesi için nanoparçacıklara DTPA (dietilentriaminpentaasetik dianhidrit) konjugasyonu yapıldı.

De Oliveira Freitas ve arkadaşlarının kullandığı metod modifiye edilerek DTPA konjugasyonu gerçekleştirilmiştir (De Oliveira Freitas et al., 2017). 1 mg MSN ve 1 mg DTPA 5 mL dimetilformamit (DMF) içerisinde gece boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Sonrasında nanoparçacıklar DMF, etanol, su ve aseton ile sırasıyla ayrı ayrı yıkandı. DTPA konjuge edildikten sonra nanoparçacıklarda FTIR analizi yapıldı. DTPA ile konjuge edilen mezoporlu silika nanoparçacıklar MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA olarak adlandırıldı.

### 3.2.5 Mezoporlu silika nanoparçacıklara ICG yüklenmesi

1 mg/mL ICG sulu çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan ICG çözeltisi +4°C'de ve karanlıkta saklandı ve kullanılmadan önce vortekslendi. 5 mg MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA üzerine 100 µg ICG ve 5 mL ultra saf su eklenerek 4 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. İnkübasyon sonunda nanoparçacıklar 2500 rpm'de 5 dakika boyunca santrifüj edilir ardından 3 kez saf suyla yıkanıp ICG'nin fazlası uzaklaştırıldı.

### 3.2.6 Yükleme kapasitesi tayini

Yükleme kapasitesinin tayin edilebilmesi amacıyla ICG'nin yüklenmesi sonrasında reaksiyona girmeyen ICG'nin uzaklaştırılması için santrifüj yapılarak 3 kez saf su ile yıkama yapıldı. Her bir yıkama sonrasında elde edilen süpernatantlar toplandı. Bunun yanında kalibrasyon eğrisinin oluşturulabilmesi amacıyla konsantrasyonu bilinen ICG standart çözeltiler hazırlandı. Standart çözeltiler ile yıkama sonrası elde edilen süpernatantlar 800 nm dalga boyunda Multimode Mikroplaka Okuyucu cihazı kullanılarak absorbanları ölçülerek yükleme kapasitesi hesaplandı.

### 3.2.7 Mezoporlu silika nanoparçacıklardan ICG salımının belirlenmesi

37°C'de kurutulan ICG yüklü nanoparçacıklardan 2,5 mg tartıldı ve 1 mL su içerisinde dağıtıldı. 0, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 720. dakikalarda ve 24. saatte 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak süpernatantlar toplandı. Her santrifüj sonrasında nanoparçacıklar 1 mL'ye tamamlandı. Standart çözeltiler ile belirli zaman aralıklarında yapılan santrifüj sonrası elde edilen süpernatantlar 800 nm dalga boyunda absorbanları Multimode Mikroplaka Okuyucu cihazında ölçülerek nanoparçacıklardan ICG salımı tespit edildi.

### 3.2.8 Mezoporlu silika nanoparçacıkların özelliklerinin incelenmesi

MSN'nin ortalama parçacık boyutu enstitümüz bünyesinde bulunan Malvern Nano-ZS marka DLS cihazı kullanılarak belirlendi. Analiz öncesinde ultra saf su içinde dağıtılan MSN ultrasonik banyoda 15 dakika bekletildi. Sonrasında nanoparçacıklar dekstroz çözeltisi içerisinde dağıtılarak analizi yapıldı.

Silika nanoparçacıkların yüzey morfolojisinin ve boyutlarının tespit edilebilmesi için SEM analizleri Ege Üniversitesi, MATAAL'da Thermo Scientific Apreo S cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. İyi bir görüntü alınabilmesi amacıyla nanoparçacıklar etanol içerisinde dağıtıldıktan sonra alüminyum kağıtların üzerine damlatıldı. Nanoparçacıkların iletkenliğinin sağlanabilmesi için altın ile kaplandıktan sonra görüntüleri alındı.

## 3.3 Yapısal analiz çalışmaları

MSN'nin yapısal analizi Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalında bulunan FTIR (Fourier Transform Infrared Spektrofotometre) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) cihazı ile incelendi.

MSN sentezi sırasında surfaktan olarak kullanılan CTAB'ı reaksiyon sonunda ortamdan uzaklaştırmak için HCl-metanol karışımı ile yıkama yapılmıştır. Yıkama sonrasında ortamdaki CTAB varlığı FTIR analizi ile tespit edilmiştir. Bunun yanında MSN'ye DTPA konjugasyonu yapıldıktan sonra FTIR analizi yapılmıştır.

### 3.4 <sup>99m</sup>Tc ile radyoişaretleme çalışmaları

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin <sup>99m</sup>Tc ile işaretleme çalışmaları kalay klorür indirgeme metodu ile yapılmıştır. Bu amaçla 1 mg MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG üzerine 1 mL su içerisinde hazırlanan 1 mg SnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O çözeltisinden 25 µL eklendi. Daha önce yapılan çalışmalarda optimum işaretleme pH'ı 5 olarak belirlendi. Bu yüzden çözeltinin pH'ı NH<sub>3</sub> kullanılarak pH 5 olarak ayarlandı. Son olarak çözeltiliye 1 mCi sodyum perteknetat (Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub>) ilave edildikten sonra oda sıcaklığında 45 dakika inkübe edildi. Kalite kontrol çalışmalarında referans olarak Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> ve aynı işaretleme koşullarında hazırlanan indirgenmiş teknesyum kullanılmıştır. Radyoişaretili bileşiğin kalite kontrol çalışmaları ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi.

#### 3.4.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Hazırlanan radyoişaretili bileşiklerin TLC ile kalite kontrol yönteminde, sabit faz olarak (10 cm x 1,5 cm) boyutunda silika şeritler kullanıldı. Banyo çözeltisi olarak ise piridin/asetik/asit-su (3:5:1,5), serum fizyolojik (SF) ve asetonitril banyo çözeltileri kullanıldı. <sup>99m</sup>Tc ile işaretili bileşiklerin, Na<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> ve indirgenmiş teknesyum için TLC yöntemi ile kalite kontrolü radyoaktif örneklerden mikropipet yardımıyla 2 µL alınıp hazırlanan tabakaların alttan 0,5 cm mesafedeki noktaya tek seferde damlatılması ve TLC banyo çözeltisini içeren tanklara yerleştirilmesiyle yapılmıştır. TLC şeritlerine damlatılan örneklerin kurumaması beklendikten sonra TLC banyo çözeltilerinin bulunduğu tanklara yerleştirildi. Her örnek TLC şeritler üzerinde yeterince yürüdüktan sonra tanklardan çıkartılarak yürüme mesafeleri hızlıca işaretlendi ve oda sıcaklığında kurutuldu.

Herhangi bir kontaminasyona neden olmaması için kurutulmuş TLC şeritlerin dış yüzeyi yapışkan bir bantla kaplandıktan sonra TLC Scanner (Bioscan AR2000) cihazında ölçümler yapıldı. Tarama işlemine başlamadan önce piklerin Rf değerlerinin cihaz tarafından belirlenebilmesi için örneklerle ilgili bilgiler cihaza ait bilgisayar programına kaydedilir. Bu bilgiler tarama süresi, damlatma noktasının ve yürütme işleminin sonlandırıldığı noktanın kromatografi kağıdına olan uzaklığıdır. Kromatogramın y-ekseninde sayım değeri, x-ekseninde ise kromatografi kağıdının uzunluğu verilmektedir. Elde edilen kromatogramlar sonucunda radyoaktif örneklerin taşındığı Rf değerleri bulunduğundan sonra verimleri hesaplanmıştır.

### 3.4.2 Stabilite çalışması

Fizyolojik ortamda  $^{99m}\text{Tc}$  işaretli MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin stabilitesini tespit etmek amacıyla işaretli örnekler 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübe edilen işaretli örneklerden 0, 30, 60, 120, 180, 240. dakikalarda ve 6. saatte örnekler alındı ve TLC yöntemi ile kalite kontrol çalışmaları yapılarak işaretleme verimleri tespit edildi.

### 3.4.3 Lipofilite çalışması

$^{99m}\text{Tc}$  işaretli MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin lipofilite tayini n-oktanol/su fazlarında gerçekleştirildi. 3 mL su, 3 mL n-oktanol bulunan tüpe 50 µL işaretli örnek eklendi. 5 dakika boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı ve 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüjün ardından alt faz olan su ve üst faz olan n-oktanol'den 50'er µL ayrı ayrı tüplere alınıp radyoaktiviteleri Cd(Te) dedektörlü tek kanallı RAD501 cihazında sayıldı. n-oktanol'ün suya oranıyla log P (log (noktanol/su)) değerleri hesaplandı. Lipofilite çalışması 3 kez tekrar edilerek elde edilen değerlerin ortalaması alındı.

## 3.5 Hücre Kültürü Çalışmaları

*In vitro* deneylerde aşağıdaki hücre hatları kullanılmıştır;

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

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

Hücreler buldukları flaskların %80'lik kısmını kaplayana kadar çoğaldıktan sonra, % 0,25 (W/V) tripsin/EDTA karışımı kullanılarak buldukları flaskın tabanından ayrılmaları sağlandı.

Kullanılmayacak olan hücreler, % 5 DMSO bulunan medyumlar içerisine koyularak -80°C'de dondurulup, -190 °C sıvı azot içinde stoklandı.





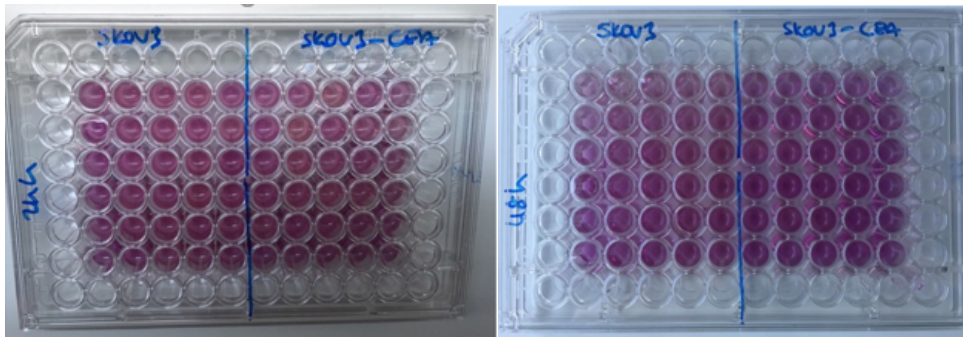
Şekil 3.2 SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin inkübasyonu

### 3.5.1 Sitotoksosite çalışması

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin sitotoksosite çalışmaları SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri kullanılarak gerçekleştirildi.

IC<sub>50</sub> (hücre popülasyonunun %50 sini ölümüne neden olan doz) değerini hesaplayabilmek için MTT testi yapıldı. 96 kuyucuklu mikroplatelere her bir kuyucuğa 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 100 µl hücre süspansiyonları eklendi. Hazırlanan plateler CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> varlığında gece boyunca inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda kuyucuklara MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin 5 farklı konsantrasyonu eklendi. Hücre ve reaktif içermeyen besiyeri negatif kontrol olarak kullanıldı. Yapılan bu çalışmada, her parametre beşer defa tekrar edildi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin 24. ve 48.saat sitotoksosite çalışması

Hücreler CO<sub>2</sub> inkübatöründe 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> varlığında 24. ve 48. saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon işleminin sonunda her bir kuyucuğun üzerine 10 µl MTT solüsyonu eklendi. Dört saatlik inkübasyon süresi sonunda spektrofotometre kullanılarak 570 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her kuyucuğun absorbans değeri (OD) ölçüldü. Negatif kontrol grubu sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıda verilen formülden yararlanılarak % sitotoksosite değerleri hesaplandı.

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

### 3.5.2 T hücreleri ile MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin enkapsülasyonu

Sitotoksosite çalışması sonucu belirlenen IC<sub>50</sub> değerlerinin yarısı değerinde MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği 800 µL serumsuz RPMI 1640 medyum, 4 µL protamine sulfat ve 2 µL heparin içerisinde dağıtıldı. Süspansiyon oda sıcaklığında 2 dakika vortekslendi. Sonrasında süspansiyon içerisine 10<sup>4</sup> T hücresi eklenerek 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> varlığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda hücreler 3 kez PBS ile yıkandı.

### 3.5.3 Floresan görüntüleme çalışması

SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri chamber slide üzerine her bir kuyucuğa 5x10<sup>3</sup> hücre/kuyu olacak şekilde 200 µl hacim içerisinde eklendi. Chamber slide lar 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> varlığında CO<sub>2</sub> inkübatöründe gece boyunca inkübe edildi. Sonrasında her bir kuyuya yukarıda hazırlanan MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG ile enkapsüle edilmiş T hücreleri uygulandı ve 37°C sıcaklıkta, %5 CO<sub>2</sub> varlığında 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında floresan eklentili mikroskopta T hücrelerinin görüntüleri alındı.

### 3.5.4 Apoptozis çalışmaları

Millipore Muse cihazı kullanılarak T hücrelerine enkapsüle edilen MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerinde apoptotik etkileri incelendi.

Canlı, erken / geç apoptotik ve ölü hücrelerin kantitatif analizi için Muse Hücre Analiz Cihazında (Millipore) Muse Annexin V / Ölü Hücre Test Kiti (Millipore, Darmstadt, Almanya) kullanıldı. Kısaca bu analiz apoptotik hücrelerin dış zarı üzerindeki PS(fosfatidilserin)'yi tespit etmek için Annexin V'i; ölü hücreleri tespit etmek için ise 7-AAD'yi (7-amino-aktinomisin') kullanır.

Negatif kontrolleri de içeren SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri, 30 µg/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilen T hücreleri ile 24 saat inkübasyondan sonra tripsinize edildi. Hücre süspansiyonları falkon tüplerine aktararak 1000 rpm 5 dakika santrifüjlemeye tabi tutuldu. Hücre pelletleri, % 1 FBS içeren 100 µl taze besiyer içinde yeniden süspanse edildi. Muse Annexin V / Ölü Hücre Boyası test kiti reaktif maddesi (her falkon tüpüne 100 µl) karıştırılarak eklendi. Oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyondan sonra, hücreler bir Muse Hücre Analiz Cihazına (Merck Millipore) uygulandı.

### 3.6 İstatistik Analizler

Hücre kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Her bir parametre için elde edilen değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken değerler arasında 0,95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0,05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

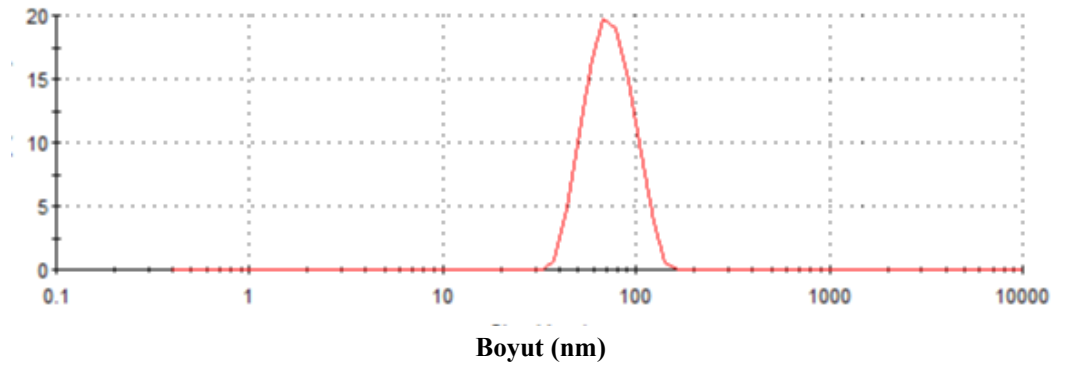
## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

### 4.1 Mezoporlu Silika Nanoparçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi

#### 4.1.1 DLS analiz sonuçları

MSN'in ortalama parçacık boyutu Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) cihazı ile analiz edildi. DLS tekniği ile brown hareketinin hızı ölçülerek parçacık boyutuyla ilişkilendirilir. Doğru ölçümlerin alınabilmesi için akışkanın viskozitesi ve sıcaklığının bilinmesi gerekir. Numune sıcaklığı ile analiz sıcaklığının aynı olması gerekmektedir. Aksi takdirde örnekte oluşacak konveksiyon akımı taneciklerin düzensiz olmayan hareketine yol açarak boyut algısını bozar. Şekil 4.1'de görüleceği üzere uygun koşullar sağladıktan sonra analiz sonucunda hidrodinamik parçacık çapı  $76,38 \pm 28,16$  nm olarak bulunmuştur. Parçacık boyutlarının farklı çözeltiler içerisinde değiştiğinin bir göstergesi olan PDI (Polydispersity Index) değeri analizde 0,152 olarak ölçülmüştür. PDI değerinin 0,2'den düşük olması çözeltinin monodispers olduğunu gösterir ve boyut analizinin doğru sonuç vermesinde önemli bir parametredir.

Sayıya göre boyut dağılımı



Şekil 4.1 MSN'nin boyut dağılım grafiği

DLS analizi ile bulunan ortalama parçacık boyutu MSN çözeltide homojen şekilde dağıldığından, yapılan literatür taramalarına uygun çıkmıştır.

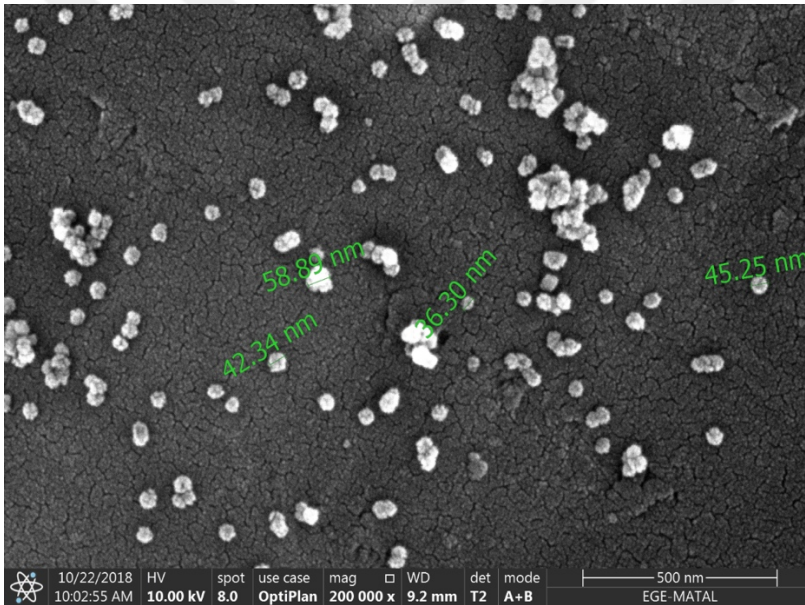
Sentezlenen MSN'nin DLS analiziyle bulunan hidrodinamik çapları farklı araştırma grupları tarafından elde edilen sonuçlarla paralellik göstermiştir (Qiao et al., 2016; Cheng et al., 2017).

### 4.1.2 SEM analiz sonuçları

Nanoboyut aralığında ve homojen kompozisyona sahip silika nanoparçacıklar sentezlemek için farklı teknikler deneysel çalışmalarla geliştirilmiştir (Lieberman et al., 2014)

MSN sentezi için seçilen yöntemle elde edilen nanoparçacıkların boyut ve yüzey morfolojisi analizleri Ege Üniversitesi MATAL’da SEM görüntüleri alınarak incelenmiştir. Analiz sonucunda 36-58 nm çapında nanoparçacıkların varlığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).

MSN’nin sentez metoduna göre SEM görüntülerindeki boyutları 25-100 nm arasında değişmektedir ve merkezde gözenekli mezoporlu yapı görülür (Zhang et al., 2010; Tao et al., 2015). Şekil 4.2 MSN’nin SEM görüntüsü yer almaktadır.



Şekil 4.2 MSN’nin SEM görüntüsü

## 4.2 Yapısal Analiz Çalışmaları

### 4.2.1 FTIR sonuçları

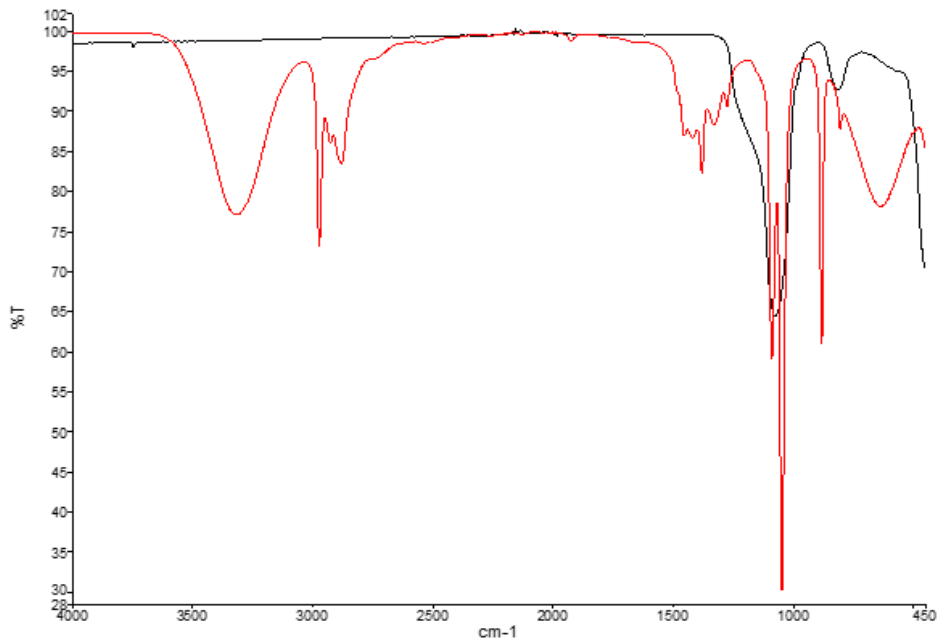
Kızıl ötesi bölgesi  $14000\text{ cm}^{-1}$  ile  $10\text{ cm}^{-1}$  arasında bulunmaktadır. Yakın dalga boylu kızıl ötesi aralığı olan NIR;  $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$ 'dir. Orta dalga boylu kızıl ötesi olan MIR ise  $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$ 'dir. Uzak dalga boylu kızıl ötesi FIR;  $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$  aralıklarında bulunmaktadır (Başyigit ve Karahan, 2010). Spektral bölgeler parmak izi bölgesi olarak ( $600\text{-}1,450\text{ cm}^{-1}$ ) amid I ve amid II bölgesidir ( $1,500\text{-}$

1,700  $\text{cm}^{-1}$ ). S-H, C-H, N-H ve O-H gibi esneme titreşimleri daha yüksek dalga boyu bölgeleri (2,550–3,500  $\text{cm}^{-1}$ ) ile ilişkilidir (Walsh et al., 2007).

MSN'nin yapısal analizleri Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalında FTIR (Fourier Transform Infrared Spektroskopi) (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) cihazı ile incelendi. MSN'nin yapısındaki fonksiyonel gruplar Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 MSN'nin FTIR incelemesi

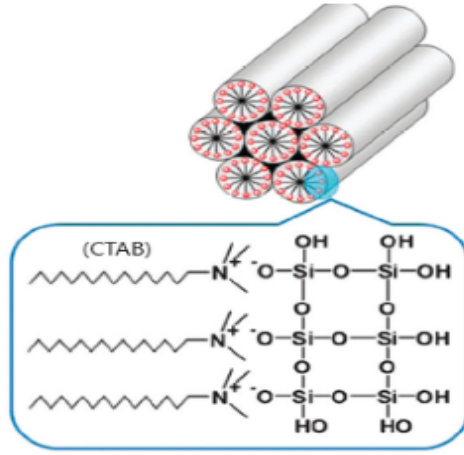
Pik	Gerilim	Açıklama
3400–3600 $\text{cm}^{-1}$	SiO-H	Silanol (germe bandı)
2195 $\text{cm}^{-1}$	-CH-	Metilen (germe bandı)
1180 $\text{cm}^{-1}$	Si-O-Si	Silanol bağlanması (bükülme bandı)
960 $\text{cm}^{-1}$	Si-O-Si	Silanol bağlanması (bükülme bandı)
630 $\text{cm}^{-1}$	Si-O-Si	Silanol bağlanması (bükülme bandı)



Şekil 4.3 MSN'nin FTIR spektrumu

Şekil 4.3'te MSN'ye ait farklı IR spektrumları verilmiştir. Hazırlanan MSN'nin FTIR spektrumları 4000 ile 450  $\text{cm}^{-1}$  aralığında ölçülmüştür. Kırmızı renk ile gösterilen spektrumda, MSN sentezinde kullanılan CTAB'a ait pikler yer almaktadır. Sentez sonucunda ortamda reaksiyona girmeyen CTAB'lar 3400  $\text{cm}^{-1}$  (O-H gerilimi)'de ortaya çıkmıştır.

Hazırlanan örneğin spektrumunda, daha önce yapılan çalışmalardaki gibi (Qasim et al., 2014; Santra et al., 2001) Si-OH gruplarına ve Si-O bağına  $460\text{ cm}^{-1}$  ve  $967\text{ cm}^{-1}$  bantlarında sırasıyla rastlanmıştır.



Şekil 4.4 CTAB-MSN kimyasal yapısı

MSN sentezinde kullanılan CTAB yapıya katılarak Şekil 4.4'teki kimyasal formu oluşturur. Yüzey aktif ajan olarak kullanılan CTAB'ın, MSN sentezi sonrasında ortamdan uzaklaştırılması gerekmektedir. Bunun için farklı yöntemler mevcuttur. Bu tez çalışmasında HCl-metanol ile yıkama işlemi yapılarak CTAB'lar uzaklaştırıldı. Bundan sonraki aşamada FTIR ile analiz edildi ve sonucu Şekil 4.3'te gösterildi. Şekilde kırmızı ile analizi yapılan HCl-metanol yıkama öncesi örneğin sonucunu, siyah ile gösterilen ise HCl-metanol yıkama sonrası sonuçları göstermektedir. CTAB'dan kaynaklanan ilk bölgedeki piklerin yıkama sonrası bertaraf edildiği görülmektedir.

#### 4.2.2 Ninhidrin testi sonuçları

Yüzey modifikasyonu yapılarak mezoporlu silika nanoparçacıklar üzerinde oluşturulan amin gruplarının tespiti için ninhidrin testi yapıldı. Belirtilen konsantrasyon aralıklarında spektrofotometre cihazında ölçülen glisin absorbans değerleri Çizelge 4.2'de verilmiştir. Glisinin farklı konsantrasyonları için  $570\text{ nm}$  dalga boyunda ölçülen absorbans değerleriyle kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.



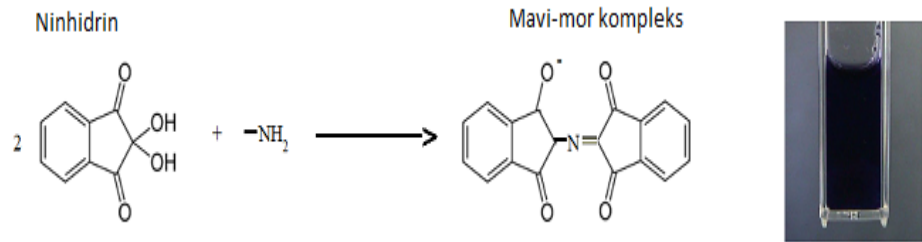
Çizelge 4.2 Farklı Glisin konsantrasyonlarında ölçülen absorbans değerleri

Konsantrasyon(mg/mL) (x)	Absorbans(nm) (y)
0,02	0,0002
0,04	0,0032
0,06	0,0092
0,08	0,2778
0,1	0,4191
0,12	0,5835

Konsantrasyon-absorbans grafiğinden elde edilen denklem aşağıda verilmiştir.

$$y = 7,8525x - 0,3696$$

MSN-NH<sub>2</sub>'nin absorbans değeri denklemde yerine koyularak amin konsantrasyonu 0,0603 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Şekil 4.5'de Ninhidrin reaktifinin amin gruplarıyla etkileşimi görülmektedir.



Şekil 4.5 Ninhidrin reaktifinin amin gruplarıyla etkileşimi



### 4.2.3 Mezoporlu silika nanoparçacıklara ICG yükleme kapasitesi tayini

MSN'ye ICG yüklemesi sonucu yükleme kapasitesi %77,11±1,50 olarak bulunmuştur. Bu durum mezoporlu yapıların ICG'yi yüksek oranda tutumunun gerçekleştiğinin göstergesidir.

MSN'nin ayarlanabilir gözenek büyüklüğü, yüksek gözenek hacmi, yüzey alanı gibi özellikleri boya moleküllerini sert çevresel faktörlerden korurken yüksek yükleme kapasitesi sağlar (Mura et al., 2013).

### 4.2.4 Mezoporlu silika nanoparçacıklardan ICG salımının belirlenmesi

MSN'ye ICG yüklendikten sonra, nanoparçacık içerisinde salınan ICG miktarı hesaplanmıştır. 24 saat içinde hesaplanan ICG salımı %34,01±1,97'dir. 24 saat sonrasında örnek içerisinde yüklü halde duran ICG miktarı %50,88±1,95'dir.

## 4.3 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

### 4.3.1 TLC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Kalite kontrol çalışmaları için yapılan TLC deneylerinde elde edilen  $R_f$  ve % verim değerleri Çizelge 4.3 ve 4.4'de verilmiştir.

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin <sup>99m</sup>Tc ile işaretlenme veriminin belirlenmesi için Serum Fizyolojik Çözeltisi (SF) çözeltisi kullanılmıştır.

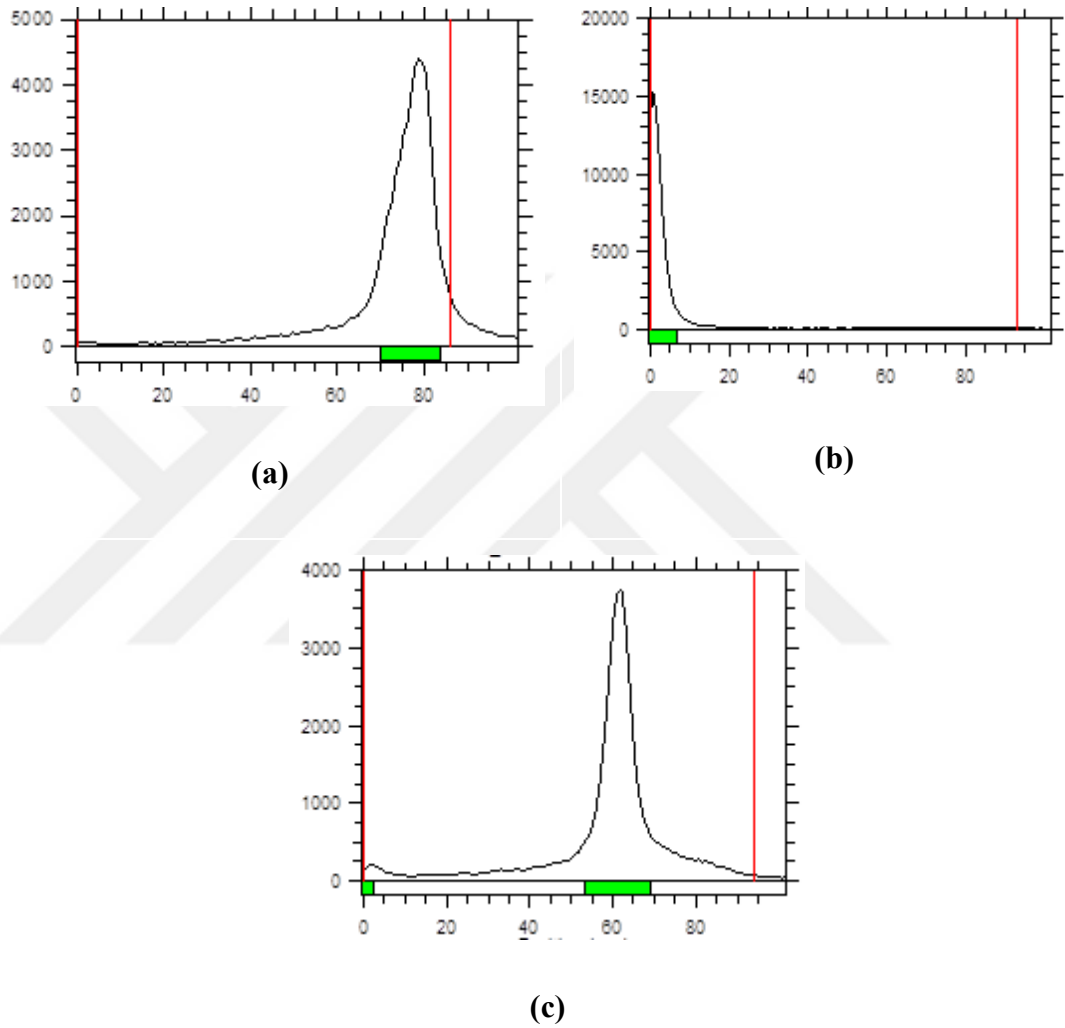
Çizelge 4.3 TLC yöntemi ile elde edilen  $R_f$  değerleri

Banyo Çözeltisi	<sup>99m</sup> Tc	İndirgenmiş <sup>99m</sup> Tc	<sup>99m</sup> Tc-(MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG)
SF	0,93±0,003	0,02±0,003	0,66±0,01

Çizelge 4.4 <sup>99m</sup>Tc ile işaretli MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin işaretlenme verimi

	<sup>99m</sup> Tc-(MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG)
Verim (%)	98,46±0,29

Bölüm 3.3'te verilen koşullara göre nanoparçacıkların radyoışaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen ICG yüklü silika nanoparçacıkların TLC analiziyle radyokimyasal verimi hesaplanmıştır. Çizelge 4.3'de verilen SF banyosundaki radyoışaretli  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG)'nin R<sub>f</sub> değerine bakıldığında örnekte radyokimyasal safsızlığın olmadığı anlaşılmıştır. Kompleksin işaretleme verimi ise  $\%98,46 \pm 0,29$  olarak bulunmuştur (n=5). Elde edilen sonuçlara ait kromatogramlar Şekil 4.6'da görülmektedir.



Şekil 4.6 (a)  $^{99m}\text{Tc}$ , (b) indirgenmiş  $^{99m}\text{Tc}$ , (c)  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG) ait kromatogramlar

TLC kromatogramları şekil 4.6'da gösterildiği gibidir. (a)'da  $^{99m}\text{Tc}$ , (b)'de indirgenmiş  $^{99m}\text{Tc}$ , (c)'de ise  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG). Kromatogramlardan görüldüğü üzere  $^{99m}\text{Tc}$ 'un tamamı indirgenmiştir. Radyoışaretli bileşiğin radyoışaretleme verimi  $\% 98,46 \pm 0,29$ 'dur.

Gerçekleştirilen bu analiz için mobil faz olarak SF banyosu kullanılırken sabit faz için silika kaplı TLC şeritleri kullanılmıştır. TLC yöntemi ile  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-

DTPA-ICG) kompleksine ait birçok kalite kontrol çalışması bulunmaktadır. Bunlardan birisi olan De Barros ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, TLC analizinde silika film kaplı TLC şeritleri sabit faz, SF çözeltisi ise mobil faz olarak kullanılmıştır. İşaretleme verimi %99,78 olarak hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmalar sonucunda SF banyosunun MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin kalite kontrolü için uygun olduğu anlaşılmıştır. TLC, işaretlenmiş bileşiklerin radyokimyasal verimini değerlendirmek için önemli bir yöntemdir, çünkü gerçekleştirilmesi hızlı, güvenilir ve oldukça pratik bir testtir. Radyokimyasal safsızlıkların nükleer tıpta teşhis için görüntü kalitesinde sorunlar oluşturduğu kanıtlanmıştır. Bu nedenle, radyofarmasötiklerin bağlanma veriminin %90'ın üzerinde olması gerektiği sonucuna varılabilir. Bu nedenle, <sup>99m</sup>Tc-(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG), yüksek bir radyokimyasal verim sunmuştur.

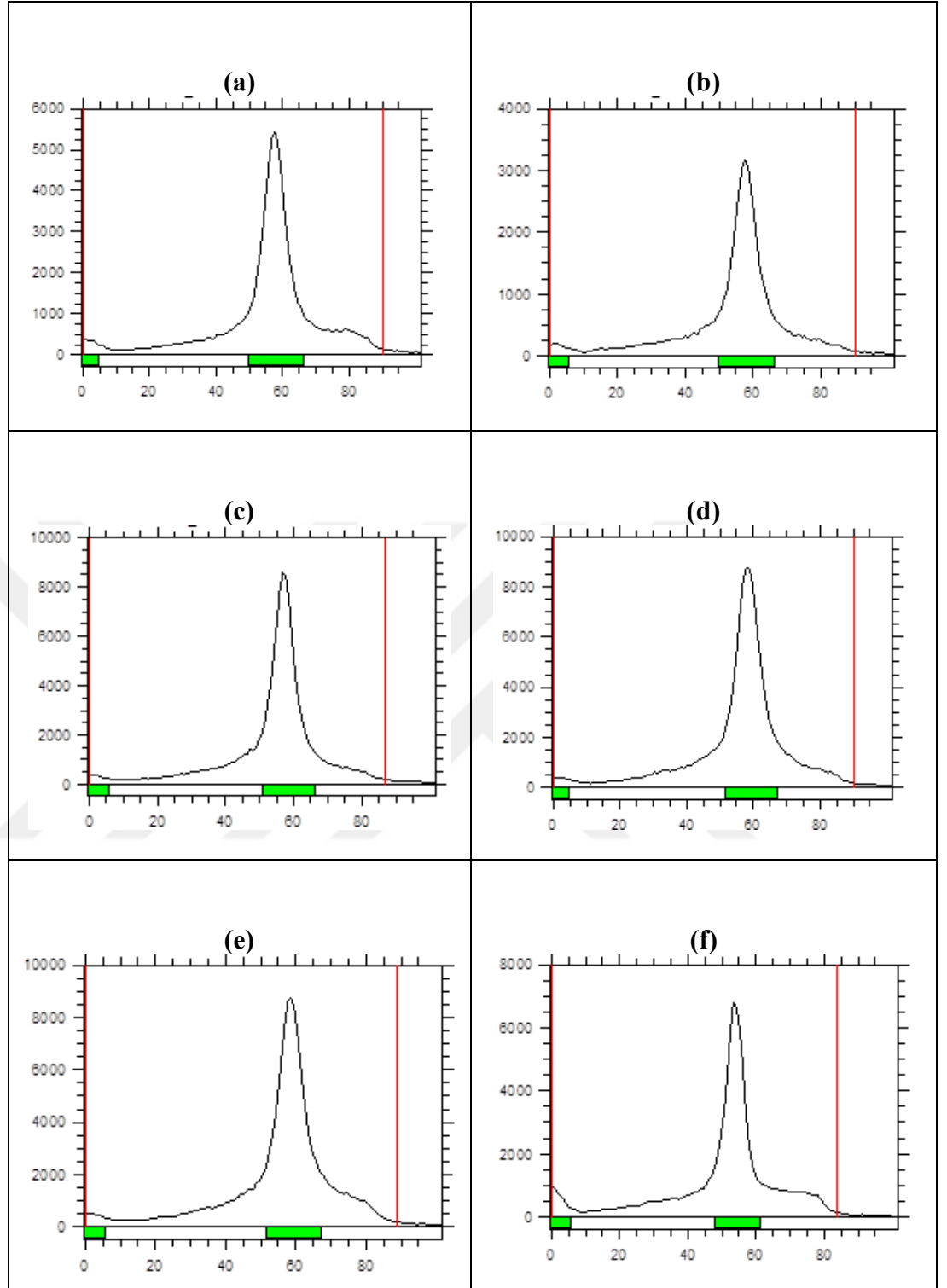
### 4.3.2 Stabilite sonuçları

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG <sup>99m</sup>Tc ile işaretlendikten sonra 37°C'de SF banyosundaki 6.saate kadar olan stabiliteyi TLC Scanner ( Bioscan 2000) cihazı kullanılarak tespit edilmiştir.

Çizelge 4.5 ve Şekil 4.7'de <sup>99m</sup>Tc-(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG)'nin 6. saate kadar olan işaretleme verimleri yer almaktadır. Şekil 4.7'de 30. dakikadan 6. saate kadar olan kromatogramlar gösterilmiştir. Elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde örneğin 6. saatte radyoişaretleme veriminin % 90'nın üzerinde olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.5 <sup>99m</sup>Tc-(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG)'nin stabilite zaman-verimi

Zaman (Dakika)	Radyoişaretleme Verimi (%)
0	95,95 ± 0,83
30	96,08 ± 0,79
60	95,11 ± 0,12
120	94,93 ± 1,66
180	93,22 ± 4,13
240	95,00 ± 0,98
360	92,74 ± 0,97



Şekil 4.7  $^{99m}\text{Tc}$ -(MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG)'ye ait (a) 30. dakika, (b) 60. dakika, (c) 120. dakika, (d) 180. dakika, (e) 240. dakika, (f) 6. saate ait kromatogramlar

### 4.3.3 Lipofilite sonuçları

MSN'nin teorik lipofilite hesaplaması ACD/logP Algorithm programı kullanılarak bulunamamıştır bunun nedeni yapısından dolayı deneysel lipofilitesinin hesaplanamamasıdır. MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'ye ait deneysel lipofilite (logP) değeri -3,42±0,46 (n=3) olarak bulundu. Bu değer bize bileşiğin hidrofobik olduğunu gösterdi.

## 4.4 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

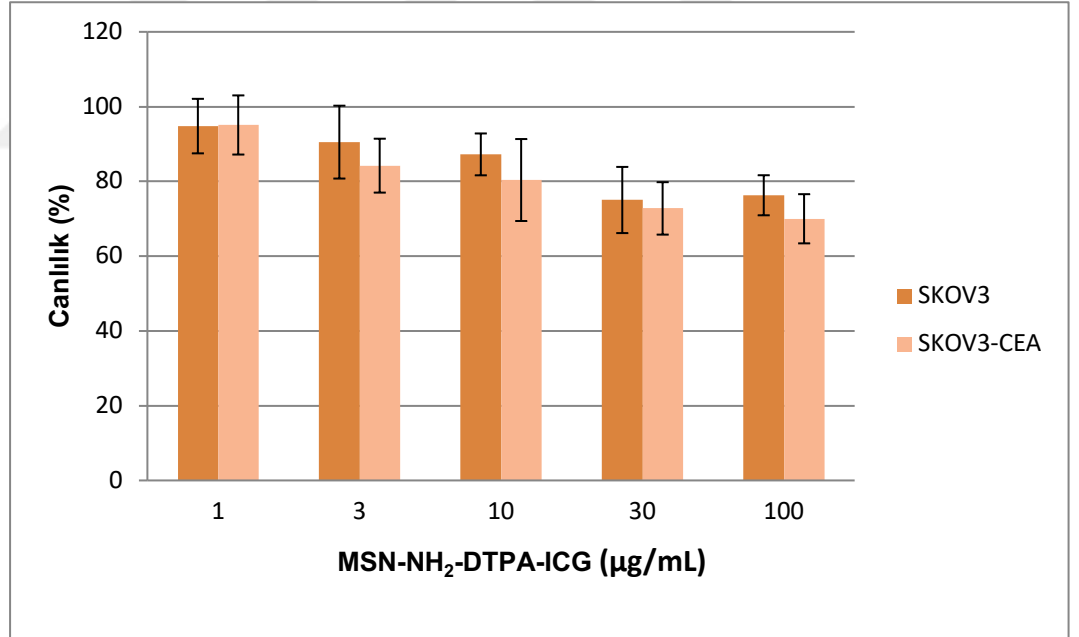
### 4.4.1 Sitotoksosite sonuçları

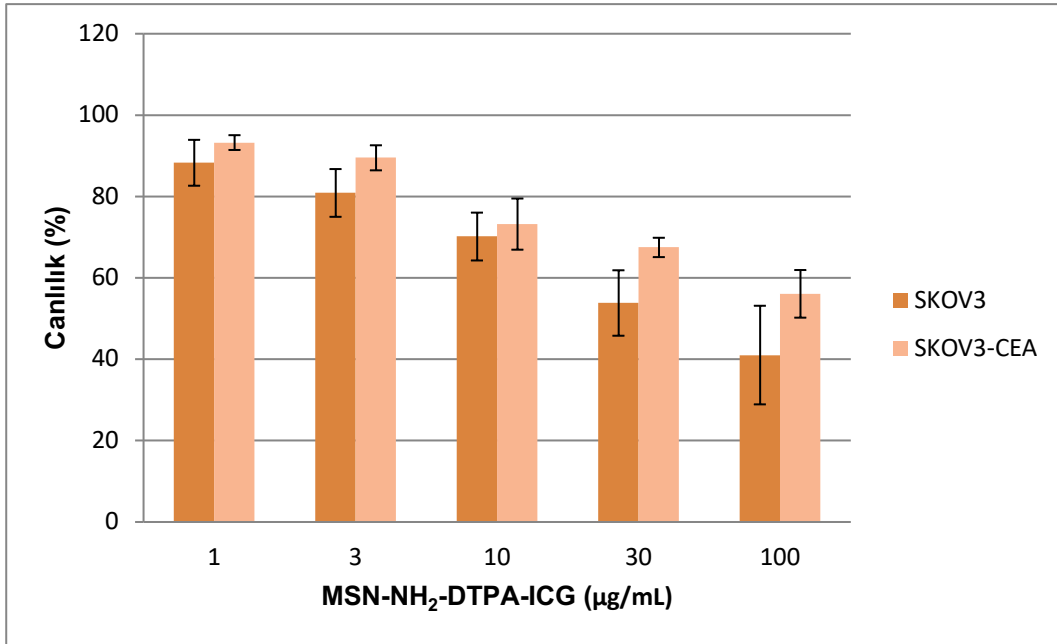
MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin farklı konsantrasyonları kullanılarak SKOV3 ve SKOV3-CEA hatları üzerinde sitotoksosite çalışması yapılmıştır. Şekil 4.8 ve şekil 4.8'de yapılan sitotoksosite çalışması sonucunda SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatlarında 24. ve 48. saatlerdeki hücre canlılık değerleri yüzdelik olarak verilmiştir. Çizelge 4.6'da MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri yer almaktadır. MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG 1 µg/mL'sinin 24 saat içerisinde her iki hücre hattı için belirgin sitotoksik etkisi bulunmazken, 100 µg/mL konsantrasyonda SKOV3 hücresinde canlılık değerinin %76,29 ve SKOV3-CEA için % 70'e düştüğü gözlenmiştir.

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG 1 µg/mL'sinin 48. saatte her iki hücre hattı için bakıldığında 24. saatte gözlenen sitotoksik etkiye yakın bir değer bulunmuştur. SKOV3 için % 88,28 ve SKOV3-CEA için % 93,25 canlılık gözlenmiştir. 100 µg/mL konsantrasyon uygulandığında SKOV3 için %41,03 ve SKOV3-CEA için % 56,07 canlılık değerleri kaydedilmiştir. Önceden belirlenen artan konsantrasyon değerlerinde her iki hücre hattı için % hücre canlılığı kayda değer biçimde azalma göstermiştir.

Çizelge 4.6 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı % canlılık değerleri

Konsantrasyon	MSN-NH <sub>2</sub> -DTPA-ICG			
	SKOV3		SKOV3-CEA	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
100 µg/mL	76,29±7,29	41,01±5,64	70,00±7,91	56,07±1,87
30 µg/mL	75,02±9,75	53,82±5,87	72,77±7,20	67,48±3,08
10 µg/mL	87,22±5,60	70,15±5,88	80,37±10,96	73,21±6,29
3 µg/mL	90,50±8,85	80,87±8,04	84,21±7,01	89,50±2,37
1 µg/mL	94,79±5,36	88,28±12,11	95,09±6,58	93,25±5,86

Şekil 4.8 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı 24. saatteki % canlılık değerleri



Şekil 4.9 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin konsantrasyona bağlı 48. saatteki % canlılık değerleri

Hücrelerdeki canlılık oranlarını kıyaslayacak olursak, 24. saatte SKOV3 hücre hattının SKOV3-CEA'ya göre daha yüksek canlılıkta olduğu görülmektedir. 48. saatte ise SKOV3-CEA hücrelerinin daha yüksek canlılıkta olduğu Şekil 4.9'da görülmektedir.

İstatiksel hesaplamalara göre IC<sub>50</sub> değerleri 24. saat için SKOV3'de 1991 µg/mL, SKOV3-CEA'de 977,3 µg/mL olarak bulunmuştur. 48. saat IC<sub>50</sub> değerleri ise; SKOV3'de 46,43 µg/mL, SKOV3-CEA'de 146,3 µg/mL olarak bulunmuştur (Çizelge 4.7).

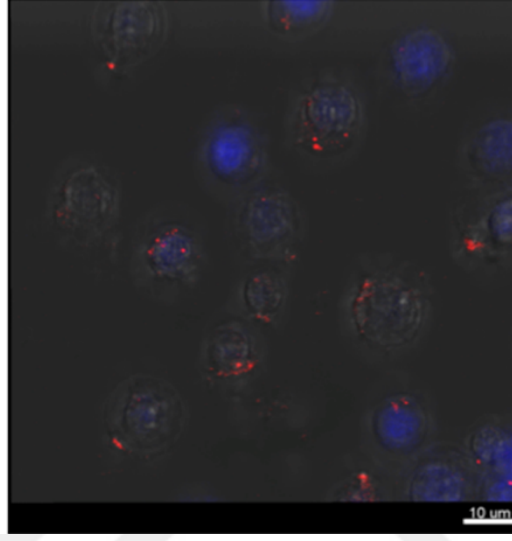
Çizelge 4.7 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin IC<sub>50</sub> değerleri

Zaman	SKOV3	SKOV3-CEA
24. saat	1991 µg/mL	977,3 µg/mL
48. saat	46,43 µg/mL	146,3 µg/mL

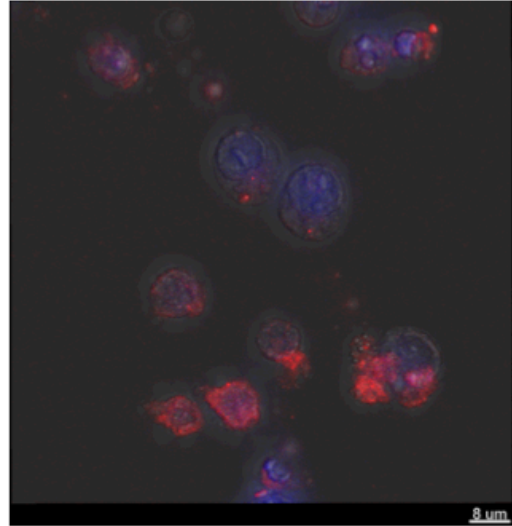
#### 4.4.2 Floresan görüntüleme sonuçları

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG yüklü T hücreleri, SKOV3 ve SKOV3-CEA hücre hatlarına uygulandı. Görüntülemesi floresan eklentili mikroskopta yapıldı.

Şekil 4.10 ve 4.11’de kırmızı renkli olanlar red fluorescence protein (RFP) transfekte edilmiş olan T hücreleridir. Şekil 4.10’da çekirdekleri dapi boyasıyla maviye boyanmış SKOV3 hücrelerine Şekil 4.11 çekirdekleri dapi boyasıyla boyanmış SKOV3-CEA hücrelerine MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edildiği T hücreleri uygulandığında alınan floresan görüntülerdir. Bu görüntülere bakıldığında kırmızı renkte görülen T hücrelerinin SKOV3-CEA hücrelerine daha fazla tutulum gösterdiği görülmektedir. Bunun nedeni de literatür taramalarından elde ettiğimiz verilere göre, T hücrelerinin karsinoembriyonik antijen olarak adlandırılan CEA antijenini tanınmasıdır (Liu, Z. et al., 2014).



Şekil 4.10 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin SKOV3 hücreleri üzerindeki floresan görüntüsü



Şekil 4.11 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki floresan görüntüsü

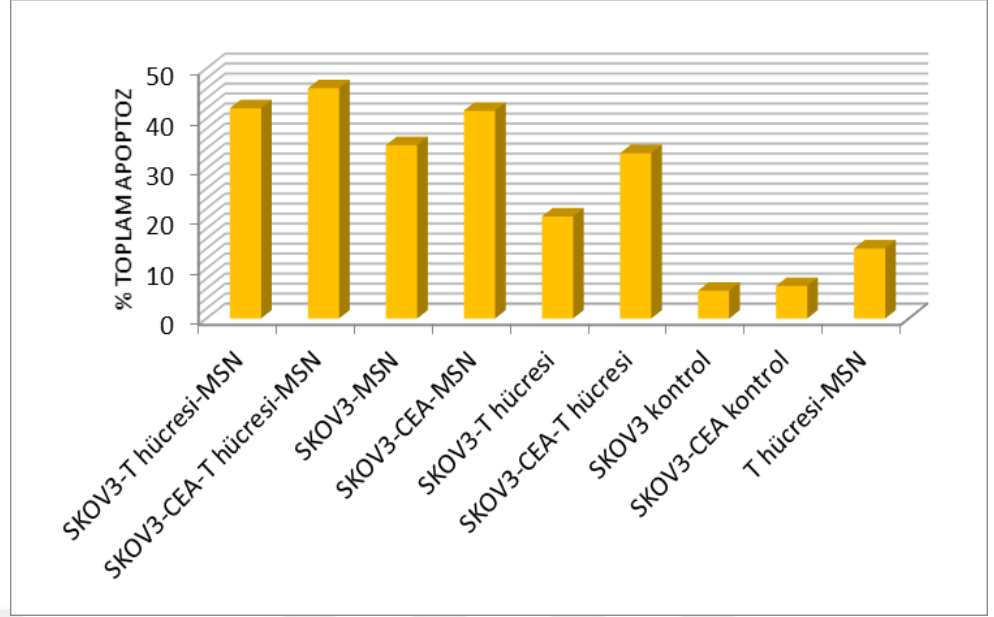


#### 4.4.3 Apoptozis sonuçları

SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerinde yapılan apoptosis çalışmasında hücrelere 30 µg/ml örnekler verilip 24 saat inkübasyon sağlanmıştır. Muse Hücre Analiz Cihazında (Millipore) Muse Annexin V/Ölü Hücre Test Kiti (Millipore) kullanılarak yapılan analizler sonucunda elde edilen bulgular aşağıdaki Şekil 4.12’de verilmiştir.

Çizelge 4.8 Apoptozis değerleri

	Canlı (%)	Erken Apoptoz (%)	Geç Apoptoz (%)	Ölü (%)	Toplam Apoptoz (%)
SKOV3 T hücresi / MSN	57,3	26,4	15,65	0,65	42,05
SKOV3-CEA T hücresi / MSN	51,25	18,15	27,89	2,68	46,04
SKOV3 MSN	63,54	4,39	30,26	1,81	34,65
SKOV3-CEA MSN	56,4	1,97	39,57	2,05	41,54
SKOV3 T hücresi	75,9	1,15	19,25	3,7	20,4
SKOV3-CEA T hücresi	64,79	1,95	31,11	2,16	33,05
SKOV3 kontrol	93,2	1,65	3,9	1,25	5,55
SKOV3-CEA kontrol	92,55	2,2	4,3	0,95	6,5
T hücresi / MSN	84,75	0,85	13,25	1,25	14



Şekil 4.12 Hücrelerin toplam apoptoz oranları

SKOV3 hücrelerinin ( $10^5$  hücre/ml) 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 93,2, erken apoptozdaki hücre oranı % 1,65, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 3,9, ölü hücre oranı % 1,25 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 5,55 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13 a).

SKOV3-CEA hücrelerinin ( $10^5$  hücre/ml) 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 92,55, erken apoptozdaki hücre oranı % 2,2, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 4,3, ölü hücre oranı % 0,95 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 6,5 olarak bulunmuştur (Şekil 4.13 b).

SKOV3 hücrelerine T hücreleri ( $10^4$  hücre/ml) örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 75,90, erken apoptozdaki hücre oranı % 1,15, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 19,25, ölü hücre oranı % 3,70 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 20,40 olarak bulunmuştur (Şekil 4.14 a)

SKOV3-CEA hücrelerine T hücreleri ( $10^4$  hücre/ml) örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 64,79, erken apoptozdaki hücre oranı % 1,95, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 31,11, ölü hücre oranı % 2,16 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 33,05 olarak bulunmuştur (Şekil 4.14 b).

SKOV3 hücrelerine 30  $\mu$ g/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 63,54, erken apoptozdaki hücre oranı % 4,39, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 30,26, ölü hücre oranı % 1,81

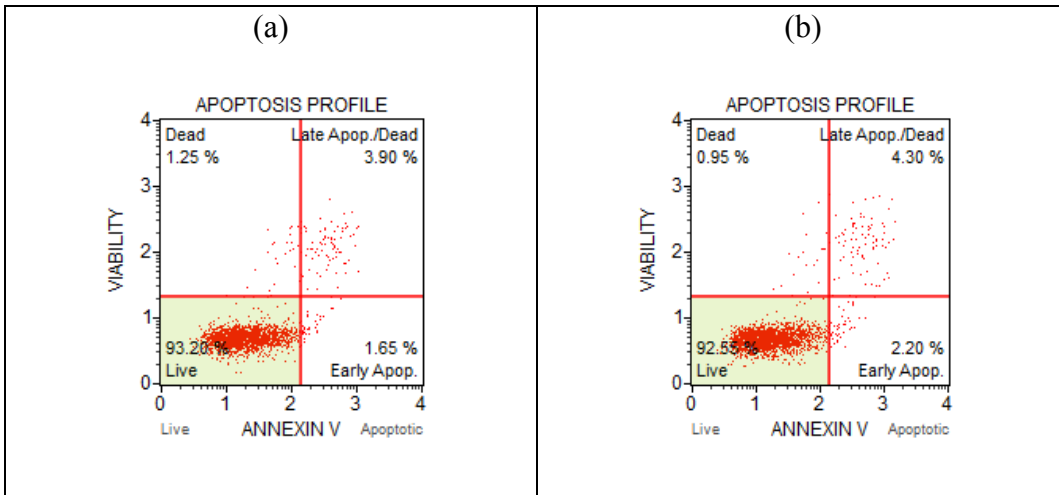
olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 34,65 olarak bulunmuştur (Şekil 4.15 a).

SKOV3-CEA hücrelerine 30 µg/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 56,40, erken apoptozdaki hücre oranı % 1,97, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 39,57, ölü hücre oranı % 2,05 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 41,54 olarak bulunmuştur (Şekil 4.15 b).

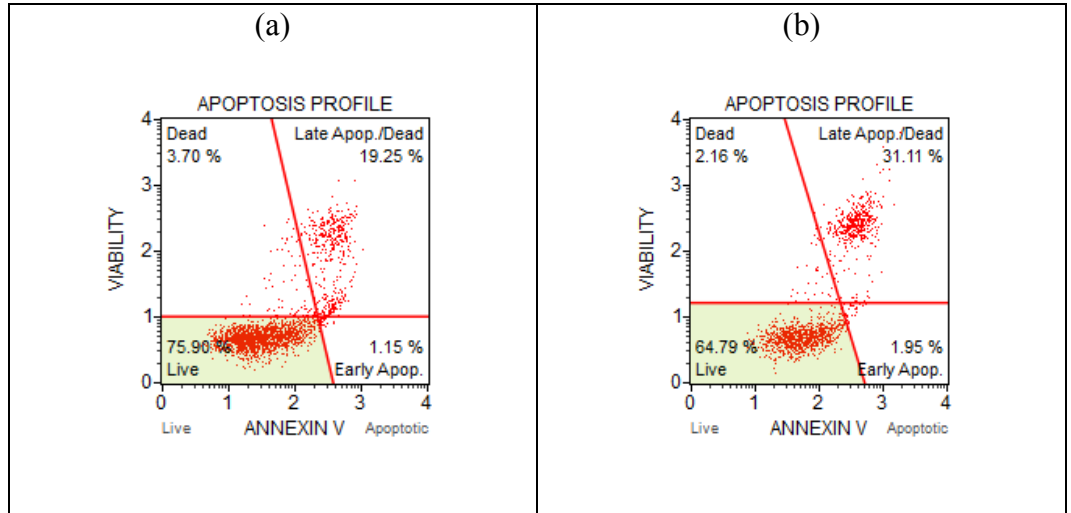
SKOV3 hücrelerine 30 µg/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 57,30, erken apoptozdaki hücre oranı % 26,40, geç apoptozdaki / ölü hücre oranı % 15,65, ölü hücre oranı % 0,65 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 42,05 olarak bulunmuştur (Şekil 4.16 a).

SKOV3-CEA hücrelerine 30 µg/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 51,28, erken apoptozdaki hücre oranı % 18,15, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 27,89, ölü hücre oranı % 2,68 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 46,04 olarak bulunmuştur (Şekil 4.16 b).

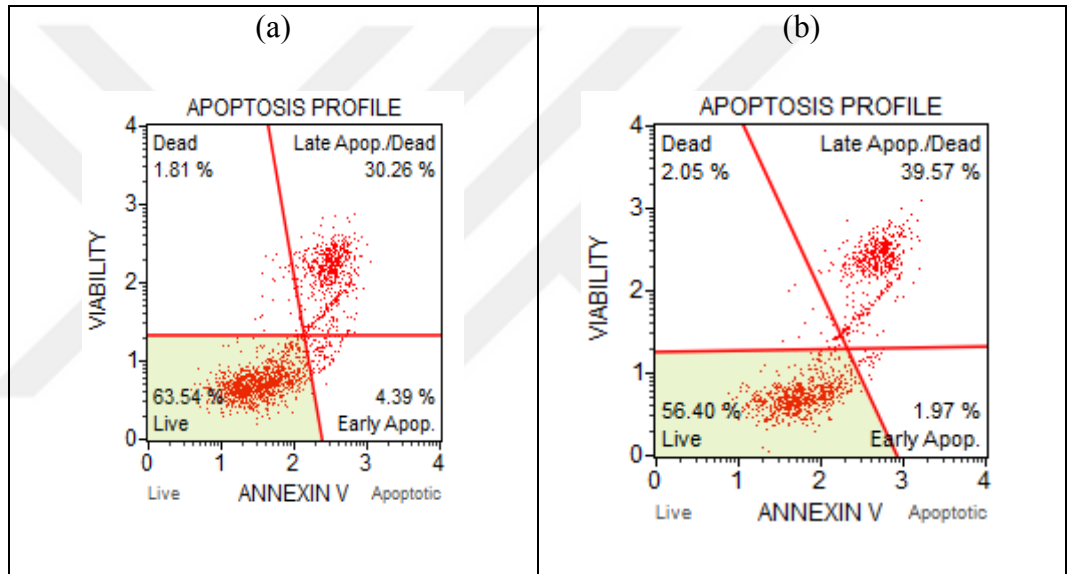
T hücrelerine 30 µg/ml MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği uygulandığında 24 saat inkübasyon sonrası canlı hücre oranı % 84,75, erken apoptozdaki hücre oranı % 0,85, geç apoptozdaki /ölü hücre oranı % 13,25, ölü hücre oranı % 1,25 olmak üzere toplam apoptozdaki hücre oranı % 14 olarak bulunmuştur (Şekil 4.17).



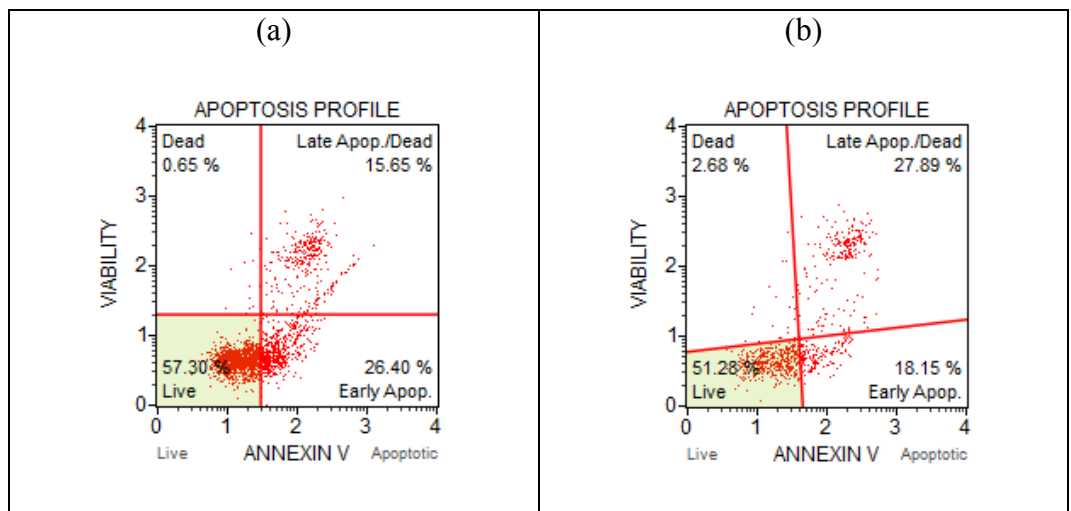
Şekil 4.13 Kontrol grubu olarak SKOV3 ve SKOV3-CEA hücrelerinin apoptozis sonuçları



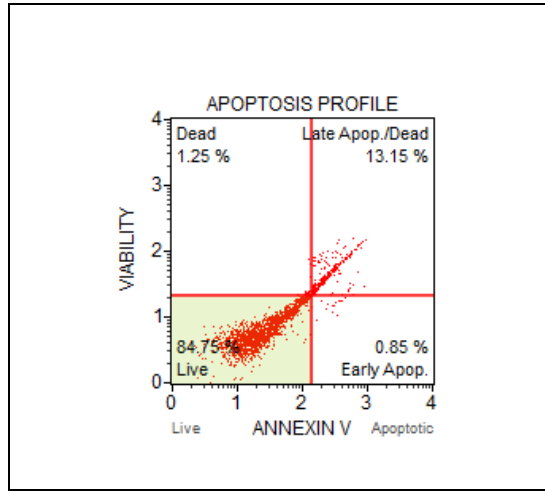
Şekil 4.14 T hücrelerinin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları



Şekil 4.15 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG'nin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları



Şekil 4.16 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin SKOV3 ve SKOV3-CEA hücreleri üzerindeki apoptozis sonuçları



Şekil 4.17 MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG yüklü T hücrelerinin apoptozis sonuçları

SKOV3 hücrelerine baktığımızda toplam apoptoz oranının % 5,55 olduğu görülmekte iken bu hücelere T hücreleri uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 20,4, MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 34,65 ve MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığındaki toplam apoptoz oranının % 42,05 olduğu Şekil 4.12'de görülmektedir. Buna göre MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneğinin, SKOV3 hücreleri üzerinde, ayrı ayrı MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG ve T hücresi örneklerinden daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

SKOV3-CEA hücrelerine baktığımızda toplam apoptoz oranının %6,5 olduğu görülmekte iken bu hücelere T hücreleri uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 33,05, MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG örneği uygulandığındaki toplam apoptoz oranı % 41,54 ve MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneği uygulandığındaki toplam apoptoz oranının % 46,04 olduğu Şekil 4.12'de görülmektedir. Buna göre MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneğinin, SKOV3-CEA hücreleri üzerinde, ayrı ayrı MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG ve T hücresi örneklerinden daha fazla apoptotik etkiye sahip olduğu görülmüştür.

MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneğinin, yukarıdaki değerleri kıyasladığımızda, SKOV3-CEA üzerinde SKOV3'ten daha fazla apoptik etkiye yol açtığı sonucuna varılmıştır. Bunun nedeni T hücrelerinin CEA antijenini tanınmasıdır.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında MSN, DTPA ile şelatlanarak MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG sentezlenmiştir. Parçacıkların karakterizasyonu SEM, FTIR ve DLS analizleri ile yapılmıştır.

Nanoparçacıklara floresan özellik kazandırmak için tıp uygulamalarında sıklıkla kullanılan ICG yüklenmiştir. MSN'nin ortalama boyutu DLS ölçümlerinde 76,38±28,16 nm olarak bulunmuştur. Belirlenen nanoparçacık boyutu nano boyuttaki uygulamalar için uygundur. Elde edilen bu sonuçlar yüksek fiziksel stabiliteye sahip, ideal boyutlarda nanoparçacıklar sentezlendiğini göstermektedir. DLS analizinde 0,152 olarak belirlenen Pdl değeri ise parçacıkların istenilen şekilde monodispers olduğunu belirtmektedir.

Yapılan bu çalışmada floresan özellik gösteren ICG, MSN'ye yüklenerek <sup>99m</sup>Tc ile radyoişaretlenmesi sağlanmış ve biyolojik davranışları *in vitro* olarak incelenmiştir. Radyoişaretli nanoparçacıkların kalite kontrol çalışması TLC yöntemi ile yapılarak bağlanma verimi % 98,46±0,29 olarak hesaplanmıştır. Radyoişaretleme sonrasında 37 °C'de inkübasyon altında 6 saat içerisinde bağlanma etkinliğinde bir değişim görülmemiştir.

Hücre kültürü çalışmaları için SKOV3, SKOV3-CEA yumurtalık ve modifiye edilmiş T hücreleri kullanılmıştır. Bu kapsamda sitotoksikite, floresan hücre görüntülemesi ve apoptosiz çalışmaları yapılmıştır.

Radyoişaretli floresan özellikli MSN sentezlenerek hedefe yönelik ve hazırlanması kolay olan biyoyumlu bir sistem tasarlanmak istenmiştir. Bu amaçla, ideal görüntüleme radyonüklidlerden olan teknesyumun +4 yükseltgenme basamağında oluşturulan kalay (II) klorür indirgenme yöntemi tercih edilerek nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir.

Multifonksiyonel özelliğe sahip MSN'ler, hastalık teşhis ve tedavisi için klinik uygulamalara izin verebilecek avantajlara sahiptir. İlk olarak, MSN kullanım amaçlarına göre farklı yapılarda ve yöntemlerde tasarlanabilir. MSN'nin *in vitro* ve *in vivo* biyoyumlulukları yüksektir ve vücuttan kolaylıkla atılabilirler. Manyetik, floresan ve fototermal özelliklere sahip çok işlevli kullanım kolaylığı, nanoterapötikler için eşzamanlı biyolojik görüntüleme ve ilaç dağıtımına izin verir. MSN'nin esnek, ölçeklenebilir ve düşük maliyetli üretimi, gelecekteki endüstriyel üretim ve klinik çalışmalar için farklı fırsatlar sunar.

Yapılan hücre kültürü çalışmalarına göre canlılık oranlarını kıyaslayacak olursak, 24. saatte SKOV3 hücre hattının SKOV3-CEA'ya göre daha yüksek canlılık oranında olduğu görülmektedir. 48. saatte ise SKOV3-CEA hücrelerinin

daha yüksek canlılıkta olduğu bulunmuştur. Apoptosis etkisi için yapılan çalışmalarda MSN-NH<sub>2</sub>-DTPA-ICG enkapsüle edilmiş T hücresi örneğinin, SKOV3-CEA üzerinde SKOV3'ten daha fazla apoptik etkisi olduğu anlaşılmıştır.

Sonuç olarak bu tez çalışmasıyla, MSN'ler DTPA ile şelatlanıp içerisine ICG yüklenerek floresan özelliğe sahip bir molekül haline getirilmiş ve hedef bölgeye yönlendirilerek etkinliği artırılmıştır. Elde edilen tüm bu sonuçların yapılacak olan yeni teşhis ve görüntüleme sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.



**KAYNAKLAR DİZİNİ**

- A Osso, J., F Catanoso, M., Barrio, G., P Brambilla, T., Teodoro, R., RBR Dias, C., & N Suzuki, K.** (2012). Technetium-99m–New production and processing strategies to provide adequate levels for SPECT imaging. *Current radiopharmaceuticals*, 5(3), 178-186.
- Abdel-Wahab, N., Shah, M., & Suarez-Almazor, M. E.** (2016). Adverse events associated with immune checkpoint blockade in patients with cancer: a systematic review of case reports. *PloS one*, 11(7), e0160221.
- Akbar, M. U., Ahmad, M. R., Shaheen, A., & Mushtaq, S.** (2016). A review on evaluation of technetium-99m labeled radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 310(2), 477-493.
- Alivisatos, P.** (2004). The use of nanocrystals in biological detection. *Nature biotechnology*, 22(1), 47.
- Aslan, R.** (2018). AKILLI (HEDEFLENDİRİLMİŞ) İLAÇLAR. *Ayrıntı Dergisi*, 6(69).
- Baeza, A., Manzano, M., Colilla, M., & Vallet-Regí, M.** (2016). Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for antitumor therapy: our contribution. *Biomaterials science*, 4(5), 803-813.
- Berk, S., & Akkurt, İ.** (2012). Nanopartikül: Geleceğin korkulu rüyası. *Tuberk Toraks*, 60(2), 180-4.
- Bertram, J. S.** (2000). The molecular biology of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 21(6), 167-223.
- Carty, S. E., Cooper, D. S., Doherty, G. M., Duh, Q. Y., Kloos, R. T., Mandel, S. J., & Thompson, G. B.** (2009). Consensus statement on the terminology and classification of central neck dissection for thyroid cancer: the American thyroid association surgery working group with participation from the American association of endocrine surgeons, American academy of



otolaryngology—head and neck surgery, and American head and neck society. *Thyroid*, 19(11), 1153-1158.

**Challapalli, A., Carroll, L., & Aboagye, E. O.** (2017). Molecular mechanisms of hypoxia in cancer. *Clinical and translational imaging*, 5(3), 225-253.

**Cheng, W., Liang, C., Xu, L., Liu, G., Gao, N., Tao, W., & Zeng, X.** (2017). TPGS-functionalized polydopamine-modified mesoporous silica as drug nanocarriers for enhanced lung cancer chemotherapy against multidrug resistance. *Small*, 13(29), 1700623.

**De Barros, A. L. B., das Graças Mota, L., de Aguiar Ferreira, C., & Cardoso, V. N.** (2012). Kit formulation for <sup>99m</sup>Tc-labeling of HYNIC-βAla-Bombesin (7–14). *Applied Radiation and Isotopes*, 70(10), 2440-2445.

**De Barros, A. L. B., de Oliveira Ferraz, K. S., Dantas, T. C. S., Andrade, G. F., Cardoso, V. N., & De Sousa, E. M. B.** (2015). Synthesis, characterization, and biodistribution studies of <sup>99m</sup>Tc-labeled SBA-16 mesoporous silica nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C*, 56, 181-188.

**de Oliveira Freitas, L. B., de Melo Corgosinho, L., Faria, J. A. Q. A., dos Santos, V. M., Resende, J. M., Leal, A. S., ... & de Sousa, E. M. B.** (2017). Multifunctional mesoporous silica nanoparticles for cancer-targeted, controlled drug delivery and imaging. *Microporous and Mesoporous Materials*, 242, 271-283.

**Ettre, L. S.** (2003). MS Tswett and the invention of chromatography. *LC GC North America*, 21(5), 458-467.

**Ferrone, C. R., Brennan, M. F., Gonen, M., Coit, D. G., Fong, Y., Chung, S., & Allen, P. J.** (2008). Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12(4), 701-706.

**Fox, I. J.** (1960). Indocyanine green: physical and physiologic properties. In *Mayo Clin Proc* (Vol. 35, pp. 732-744).

- Gary-Bobo, M., Vaillant, O., Maynadier, M., Basile, I., Gallud, A., El Cheikh, K., & Nirde, P.** (2013). Targeting multiplicity: the key factor for anti-cancer nanoparticles. *Current medicinal chemistry*, 20(15), 1946-1955.
- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., & Tsien, R. Y.** (2006). The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *science*, 312(5771), 217-224.
- Gordon, A. T., Lutz, G. E., Boninger, M. L., & Cooper, R. A.** (2007). Introduction to nanotechnology: potential applications in physical medicine and rehabilitation. *American journal of physical medicine & rehabilitation*, 86(3), 225-241.
- Green, C. H.** (2012). Technetium-99m production issues in the United Kingdom. *Journal of Medical Physics/Association of Medical Physicists of India*, 37(2), 66.
- Hallett, F. R.** (1994). Particle size analysis by dynamic light scattering. *Food research international*, 27(2), 195-198.
- Harisinghani, M. G., Barentsz, J., Hahn, P. F., Deserno, W. M., Tabatabaei, S., van de Kaa, C. H., & Weissleder, R.** (2003). Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *New England Journal of Medicine*, 348(25), 2491-2499.
- Haydaroğlu, A., BÖLÜKBAŞI, Y., & Özşaran, Z.** (2007). Ege Üniversitesi'nde kanser kayıt analizleri: 34134 Olgunun değerlendirmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, 22(1), 22-28.
- Hood, J. D., Bednarski, M., Frausto, R., Guccione, S., Reisfeld, R. A., Xiang, R., & Cheres, D. A.** (2002). Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science*, 296(5577), 2404-2407.
- Hostettmann, K., Marston, A., & Hostettmann, M.** (1986). Preparative chromatography techniques. Berlin: Springer.

- Jablonski, A.** (1933). Efficiency of anti-Stokes fluorescence in dyes. *Nature*, 131(3319), 839.
- June, C. H.** (2016). Adoptive Cellular Therapy With Synthetic T Cells as an “Instant Vaccine” for Cancer and Immunity. In *The Vaccine Book* (pp. 581-596). Academic Press.
- Kahraman, M.** (2011). Proteinlerin Yüzeyle Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasıyla Tayini İçin Yeni Yöntemlerin Geliştirilmesi (Doctoral dissertation, Fen Bilimleri Enstitüsü).
- Lakowicz, J. R.** (1988). Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and applications to cell membranes. In *Fluorescence studies on biological membranes* (pp. 89-126). Springer, Boston, MA.
- Larush, L., & Magdassi, S.** (2011). Formation of near-infrared fluorescent nanoparticles for medical imaging. *Nanomedicine*, 6(2), 233-240.
- Liu, Z., & Li, Z.** (2014). Molecular imaging in tracking tumor-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Theranostics*, 4(10), 990.
- Malvern Instruments, L.** (2008). Zetasizer Nano User's Manual. England, Malvern.
- Mamaeva, V., Rosenholm, J. M., Bate-Eya, L. T., Bergman, L., Peuhu, E., Duchanoy, A., & Sahlgren, C.** (2011). Mesoporous silica nanoparticles as drug delivery systems for targeted inhibition of Notch signaling in cancer. *Molecular Therapy*, 19(8), 1538-1546.
- Medine, İ.** (2008). 125/131I işaretli urasil'in glukuronid sentezi ve manyetik özellik kazandırılarak yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulması. Dr. Perihan ÜNAK, İkinci Danışman: Doç. Dr. Serhan SAKARYA, 26.
- Misell, D., & Stolinski, C.** (1983). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. A text for biologists, material scientists and geologists| JI Goldstein, DE Newbury, P. Echlin, DC Joy, C. Fiori and E. Lifshin. Plenum Press, New York and London, 1981. XIII+ 673 pp.£ 29.50.

- Mura, S., Nicolas, J., & Couvreur, P.** (2013). Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery. *Nature materials*, 12(11), 991.
- Owens, S. L.** (1996). Indocyanine green angiography. *The British journal of ophthalmology*, 80(3), 263.
- Porath, J.** (1997). From gel filtration to adsorptive size exclusion. *Journal of protein chemistry*, 16(5), 463-468.
- Qasim, M., Ananthaiah, J., Dhara, S., Paik, P., & Das, D.** (2014). Synthesis and characterization of ultra-fine colloidal silica nanoparticles. *Advanced Science, Engineering and Medicine*, 6(9), 965-973.
- Qiao, L., Wang, X., Gao, Y., Wei, Q., Hu, W., Wu, L., .& Wang, Q.** (2016). Laccase-mediated formation of mesoporous silica nanoparticle based redox stimuli-responsive hybrid nanogels as a multifunctional nanotheranostic agent. *Nanoscale*, 8(39), 17241-17249.
- Saha, G. B., & Saha, G. B.** (2004). *Fundamentals of nuclear pharmacy* (Vol. 6, pp. 96-100). New York: Springer.
- Santra, S., Zhang, P., Wang, K., Tapeç, R., & Tan, W.** (2001). Conjugation of biomolecules with luminophore-doped silica nanoparticles for photostable biomarkers. *Analytical chemistry*, 73(20), 4988-4993.
- Scott, N. D.** (2018). Magic Bullets II, Genetic Engineering and Technological Pragmatism. In *Food, Genetic Engineering and Philosophy of Technology* (pp. 59-78). Springer, Cham.
- Shen, L., Yu, L., Wu, H. B., Yu, X. Y., Zhang, X., & Lou, X. W. D.** (2015). Formation of nickel cobalt sulfide ball-in-ball hollow spheres with enhanced electrochemical pseudocapacitive properties. *Nature communications*, 6, 6694.
- Sheng, Z., Hu, D., Xue, M., He, M., Gong, P., & Cai, L.** (2013). Indocyanine green nanoparticles for theranostic applications. *Nano-Micro Letters*, 5(3), 145-150.

- Snyder, M. A., Lee, J. A., Davis, T. M., Scriven, L. E., & Tsapatsis, M.** (2007). Silica nanoparticle crystals and ordered coatings using lys-sil and a novel coating device. *Langmuir*, 23(20), 9924-9928.
- Tang, F., Li, L., & Chen, D.** (2012). Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery. *Advanced materials*, 24(12), 1504-1534.
- Tao, C., Zhu, Y., Li, X., & Hanagata, N.** (2015). Binding of CpG oligodeoxynucleotides to mesoporous silica nanoparticles for enhancing delivery efficiency. *Microporous and Mesoporous Materials*, 204, 91-98.
- Unak, P., Teksoz, S., Biber Muftuler, F., Medine, E., Acar, C., & Yurekli, Y.** (2007). <sup>99m</sup>Tc-glucoheptonate-guanine: Synthesis, biodistribution and imaging in animals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 275(2), 379-385.
- Xu, Z. P., Zeng, Q. H., Lu, G. Q., & Yu, A. B.** (2006). Inorganic nanoparticles as carriers for efficient cellular delivery. *Chemical Engineering Science*, 61(3), 1027-1040.
- Zhang, Y., Zhi, Z., Jiang, T., Zhang, J., Wang, Z., & Wang, S.** (2010). Spherical mesoporous silica nanoparticles for loading and release of the poorly water-soluble drug telmisartan. *Journal of Controlled Release*, 145(3), 257-263.

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca enstitü laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Prof. Dr. Fatma Yurt Onaran'a, çalıőmalarım sırasında bana yardımcı olan Ar. Gör. Özge Kozguő Güldü'ye, sentez basamaklarında emeği geçen Doç.Dr. Çiğdem İhedef'e, gerek laboratuvar çalışmaları boyunca gerekse tez yazım süresince bana en büyük desteği ve yardımı sağlayan sevgili ekip arkadaşlarıma, çalıőmalarım boyunca yanımda olan, hayatımın her kısmında verdikleri destek ile beni yalnız bırakmayıp cesaretlendiren aileme sonsuz teşekkür ederim.

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

17/07/2019

Hazal Tosun

## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Hazal TOSUN

**Doğum Yeri:** İSTANBUL-Beyoğlu

**Doğum Yılı:** 10.03.1992

**Öğrenim Durumu:**

Lise: 15 Temmuz Şehitler Anadolu Lisesi (2006-2010)

Lisans: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü (2010-2015)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2016-2019)