



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FL ve RADYONÜKLİD İŞARETLİ HPG
(HYPERBRANCHED POLYGLYCEROL)
POLİMERLERİN SENTEZİ VE HÜCRE KÜLTÜR
ORTAMINDA KAN HÜCRELERİNİN
İŞARETLENMELERİNDE KULLANILMALARI**

Sibel AY

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi: 17.01.2019

Bornova-İZMİR

2019

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**FL VE RADYONÜKLİD İŞARETLİ HPG
(HYPERBRANCHED POLYGLYCEROL)
POLİMERLERİN SENTEZİ VE HÜCRE KÜLTÜR
ORTAMINDA KAN HÜCRELERİNİN
İŞARETLEMESİNDE KULLANILMALARI**

Sibel AY

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

**Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı
Sunuş Tarihi:17.01.2019**

Bornova, İZMİR

2019

Sibel AY tarafından **YÜKSEK LİSANS** tezi olarak sunulan “FL ve Radyonüklid İşaretli HPG (Hyperbranched Polyglycerol) Polimerlerin Sentezi ve Hücre Kültür Ortamında Kan Hücrelerinin İşaretlenmesinde Kullanılmaları” 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 17.01.2019 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı

:Prof.Dr. Perihan ÜNAK



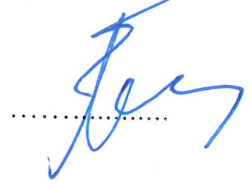
Raportör Üye

:Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF



Üye

:Prof.Dr. Türkan ERTAY



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “FL ve Radyonüklid İşaretli HPG (Hyperbranched Polglycerol) Polimerlerin Sentezi ve Hücre Kültür Ortamında Kan Hücrelerinin İşaretlemesinde Kullanılmaları” 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 / 01 / 2019

Sibel AY

ÖZET**FL VE RADYONÜKLİD İŞARETLİ HPG (HYPERBRANCHED POLYGLYCEROL) POLİMERLERİNİN SENTEZİ VE HÜCRE KÜLTÜR ORTAMINDA KAN HÜCRELERİNİN İŞARETLENMESİNDE KULLANILMALARI**

Ay, Sibel

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Ocak 2019, 94 sayfa

Bu çalışmada, SPECT/Floresan(FL) çok fonksiyonlu diagnostik ajanların geliştirilmesi ve kan hücrelerinin görüntülenmesinde kullanılmaları amaçlanmıştır. Bunun için öncelikle, küresel doğası, işlevselliği açısından çok yönlülük ve mükemmel biyoyumluluk profilleri nedeniyle hiperdallanmış poligliseroller anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Polimerin işlevselleştirilmesi için süksinik anhidrit kullanılmıştır. Floresans görüntülenmesi için indosiyanın yeşili (ICG) HPG' ye bağlanmıştır. Bunun sonucu bağlanma verimi %73,59 olarak bulunmuştur. Şelatlayıcı ajan olarak ise deferoxamin seçilmiş ve süksinat ile fonksiyonlaştırılmış (SS-HPG) HPG' ye bağlanmıştır. HPG, SS-HPG, HPG-ICG-DFO örneklerinin yapısal karakterizasyonları fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FT-IR) ile belirlenmiştir. HPG' nin molekül ağırlığı tayini ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ile belirlenmiş ve 6800 Da olarak bulunmuştur. Yapısal özellikleri dinamik ışık saçılımı (DLS), taramalı uç mikroskobu (SPM) ile belirlenmiştir. Radyoişaretleme $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ile gerçekleştirilen örneklerin kalite kontrolü, HPLRC ve TLRC analizleri ile %100 verim elde edilerek doğrulanmıştır. Stabilitate deneyi sonucu işaretli örnekler 6 saat boyunca kararlılıklarını korumuşlardır. HPG-ICG-DFO örneklerinin biyolojik davranışlarının in vitro incelenmesi K562 kronik myeloid lösemi hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksisite çalışması sonucu artan madde konsantrasyonuyla sitotoksisitenin arttığı gözlemlenmiştir. 5 µg/mL madde konsantrasyonunda en yüksek hücre canlılığı görülmüştür. $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ örneklerinin K562 hücrelerine bağlanma veriminin zamana göre değişimi incelenmiştir. Sonuç olarak zamanla bağlanma yüzdesi artmış ve 6. saatte % 30' u bulmuştur.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında floresans boyalı HPG örneklerinin kan hücrelerinin görüntülenmesine ve kanama odağının bulunmasına yönelik umut verici bir çalışma ortaya konulmuştur.

Anahtar kelimeler: Çok fonksiyonlu görüntüleme probu, RBC, ^{99m}Tc , SPECT, HPG



ABSTRACT**SYNTHESIS OF FL AND RADIONUCLIDE LABELING HPG
(HYPERBRANCHED POLYGLYCEROL) POLYMERS AND USING
BLOOD CELLS AND LABELING IN CELL CULTURE****Ay, Sibel**

MSc. Thesis Department of Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

January 2019, 94 pages

In this study, it was aimed to develop SPECT / Fluorescent(FL) multifunctional diagnostic agents and to investigate their usage for monitoring blood cells. For this reason, hyperbranched polyglycerols have been synthesized by anionic ring opening polymerization due to their global nature, functionality in terms of versatility and excellent biocompatibility profiles. Succinic anhydride was used for the functionalization of the polymer. Indocyanine green (ICG) is bound to HPG for fluorescence imaging. As a result, the binding efficiency was found as 73.59%. Deferoxamine was selected as the chelating agent and linked to succinate functionalized (SS-HPG) HPG. The structural characterizations of HPG, SS-HPG, HPG-ICG-DFO samples were determined by fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). The molecular weight determination of HPG was determined by high pressure liquid chromatography (HPLC) and found to be 6800 Da. The structural properties were determined by dynamic light scattering (DLS), scanning probe microscopy (SPM). Structural properties of dynamic light scattering (DLS) were determined by scanning end microscopy (SPM). The quality control of samples with radiolabeling [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] was verified by obtaining 100% efficiency with HPLRC and TLRC analyzes. Stability test results were stable for 6 hours. In vitro examination of the biological behavior of HPG-ICG-DFO samples were performed using K562 chronic myeloid leukemia cells. Cytotoxicity study showed that cytotoxicity increased with increasing substance concentration. The highest cell viability was observed at a concentration of 5 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Time variation of the binding efficiency of ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) samples to K562 cells was investigated. As a result, the percentage of binding was increased over time and found as 30% at 6 hours.

The results showed that fluorescent stained HPG samples showed a promising study of the visualization of blood cells and the presence of bleeding focus.

Key words: Multifunctional imaging probe, RBC, ^{99m}Tc , SPECT, HPG



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez çalışmam boyunca beni her zaman destekleyen, bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK' a sonsuz saygı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Yardıma ihtiyacım olduğundan benden desteğini esirgemeyen, her konuda danışabildiğim Ar. Gör. Dr. Özge KOZGUŐ GÜLDÜ' ye çalışmalarımın başından itibaren her türlü yardımı ve desteği sağlayıp yanımda olan, bilgilerini benimle paylaşan Sayın Volkan YASAKÇI' ya, tüm deneyimlerini büyük bir sabırla benimle paylaşan ve özellikle in vitro hücre kültürü çalışmalarında hem bana hem çalışmama sağladığı katkılardan dolayı Sayın Volkan TEKİN' e ve çalışmalarında yardımını esirgemeyen Kadriye BüŐra Karatay' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca her an desteklerini hissettiğim, hayatımın her anında yanımda olan, verdikleri destek ile beni cesaretlendiren aileme ve arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasını 2018FBE006 no'lu proje ile maddi yönden destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna da teşekkürlerimi sunarım.

Sibel AY



İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| ÖZET..... | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| TEŞEKKÜR..... | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xviii |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xxi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | xxiii |
| 1.GİRİŞ..... | 1 |
| 2.GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 Kan Hücreleri..... | 3 |
| 2.1.1 Kırmızı Kan Hücrelerinin Radyoışaretlenmesi..... | 4 |
| 2.2. Tıbbi Görüntüleme..... | 5 |
| 2.3 Dual Modalite..... | 6 |
| 2.4 Polimerik Nanoparçacıklar..... | 8 |
| 2.4.1 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol)..... | 8 |
| 2.5 İndosiyanın Yeşili (ICG)..... | 11 |
| 2.6 Teknesyum-99m (^{99m} Tc) Kimyası..... | 12 |
| 2.7 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Analiz Yöntemleri | 13 |
| 2.7.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)..... | 13 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 2.7.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)..... | 15 |
| 2.7.3 Lipofilite..... | 17 |
| 2.7.4 Stabilite..... | 17 |
| 2.8 Polimerin Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler..... | 17 |
| 2.8.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)..... | 17 |
| 2.8.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Cihazı..... | 19 |
| 2.8.3 Taramalı Uç Mikroskobu (SPM)..... | 20 |
| 2.9 Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 21 |
| 3. MATERYAL VE METOT..... | 23 |
| 3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar..... | 23 |
| 3.1.1 Kullanılan Kimyasallar..... | 23 |
| 3.1.2 Kullanılan Cihazlar..... | 25 |
| 3.2 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol) Sentezi..... | 27 |
| 3.3 HPG' nin Süksinidimil Süksinat ile Fonksiyonlaştırılması..... | 29 |
| 3.4 HPG' ye ICG (İndosiyenin Yeşili) Bağlanması..... | 30 |
| 3.5 HPG' nin Deferoxamin ile Şelatlanması..... | 30 |
| 3.6 Sentelenen HPG' nin Karakterizasyon Çalışmaları..... | 31 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 3.6.1 FTIR ile Yapı Analizi..... | 31 |
| 3.6.2 DLS ile Boyut Analizi..... | 31 |
| 3.6.3 AFM ile Yüzey Analiz..... | 31 |
| 3.6.4 HPLC Analizi..... | 32 |
| 3.7 ^{99m} Tc ile Radyoışaretleme..... | 33 |
| 3.8 Radyoışaretleli Örneklerin Kalite Kontrol İşlemleri..... | 33 |
| 3.8.1 İnce Sıvı Radyokromatografisi (TLRC)..... | 33 |
| 3.8.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)..... | 34 |
| 3.8.3 Lipofilite..... | 34 |
| 3.8.4 Stabilite..... | 35 |
| 3.9 Hücre Kültürü Çalışmaları..... | 35 |
| 3.9.1 K562 Kan hücrelerinin Hazırlanması..... | 35 |
| 3.9.2 Sitotoksite Çalışması..... | 35 |
| 3.9.3 İnkorporasyon Çalışması..... | 36 |
| 4. BULGULAR VE TARTIŞMA..... | 38 |
| 4.1 Polimerik Nanoparçacık Sentez Basamakları..... | 38 |
| 4.1.1 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol) Sentezi..... | 38 |
| 4.1.2 HPG' nin Süksinidimil Süksinat ile Fonksiyonlaştırılması..... | 39 |

İÇİNDEKİLER (devam)

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.1.3 HPG' ye ICG Bağlanması..... | 40 |
| 4.1.4 HPG' nin Deferoxamin ile Şelatlanması..... | 41 |
| 4.2 Sentezlenen HPG ve Türevlerinin FTIR Yapı Analiz Sonuçları..... | 42 |
| 4.3 Sentezlenen HPG ve Türevlerinin DLS ile Boyut Analizi Sonuçları..... | 45 |
| 4.4 HPLC Analizi ile HPG' nin Molekül Ağırlığı Tayini..... | 48 |
| 4.5 ICG Bağlanma Veriminin Hesaplanması..... | 50 |
| 4.6 Taramalı UÇ Mikroskop (SPM) Sonuçları..... | 51 |
| 4.7 Radyoşaretli Örneklerin HPLC Analizi Sonuçları..... | 53 |
| 4.8 Radyoşaretli Örneklerin TLRC Analiz Sonuçları..... | 55 |
| 4.7 Stabilite Sonuçları..... | 57 |
| 4.8 Lipofilite Sonuçları..... | 58 |
| 4.9 Hücre Kültürü Sonuçları..... | 58 |
| 4.9.1 Sitotoksosite Sonuçları..... | 58 |
| 4.9.2 İnkorparasyon Sonuçları..... | 60 |
| 5. SONUÇ VE ÖNERİLER..... | 61 |
| KAYNAKLAR DİZİNİ..... | 63 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | 70 |



ŞEKİLLER DİZİNİ

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 2.1 Kanın bileşenleri..... | 4 |
| 2.2 HGP'nin yapısı..... | 9 |
| 2.3 HGP'nin biyomedikal uygulamaları..... | 10 |
| 2.4 ICG'nin kimyasal yapısı..... | 11 |
| 2.5 Mo-99'un Tc-99'a bozunma şeması..... | 13 |
| 2.6 TLRC yönteminde küvetlere yerleştirilmesi..... | 15 |
| 2.7 HPLC cihazının şematik diyagramı..... | 16 |
| 2.8 FTIR Spektroskopisi çalışma prensibi..... | 18 |
| 2.9 DLS cihazı çalışma prensibi..... | 19 |
| 2.10 SPM çalışma prensibi..... | 21 |
| 3.1 HPG sentez düzeneği..... | 27 |
| 3.2 Nötralizasyon işlemi..... | 28 |
| 3.3 Diyaliz işlemi..... | 29 |
| 3.4 Fonksiyonlaştırılmış HPG..... | 30 |
| 3.5 Sitotoksisite çalışması için hazırlanan 96'lık plate..... | 36 |
| 3.6 K562 hücrelerinin inkorparasyon deneyinde 24'lük plate gösterimi..... | 37 |
| 4.1 Halka açma polimerizasyonu ile HPG sentezi..... | 38 |
| 4.2 SS ile fonksiyonlaştırılmış HPG..... | 39 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.3 ICG ile optik işaretlenmiş SS-HPG..... | 40 |
| 4.4HPG-ICG'ye deferoxamin bağlanması..... | 41 |
| 4.5 HPG'nin FTIR yapı analiz sonuçları..... | 42 |
| 4.6 Süksinidimil süksinat ile fonksiyonlaştırılmış HPG FTIR yapı analizi..... | 43 |
| 4.7 Deferoxamin ile şelatlanmış HPG' nin FTIR yapı analizi..... | 44 |
| 4.8 FTIR yapı analizi sonuçları; (A) SS-HPG, (B) DFO-HPG, (C) DFO..... | 45 |
| 4.9 HPG' nin DLS analiz sonuçları..... | 46 |
| 4.10 SS-HPG' nin DLS analiz sonuçları..... | 47 |
| 4.11 DFO ile şelatlanmış HPG' nin DLS analiz sonuçları..... | 47 |
| 4.12 HPG' nin GPC kromotogramı..... | 48 |
| 4.13 Proteinlerin çoklu kromotogramları..... | 49 |
| 4.14 Kalibrasyon eğrisi..... | 49 |
| 4.15 Molekül ağırlığı tayini için proteinlerden elde edilen kromotogramlardan oluşturulan kalibrasyon grafiği..... | 50 |
| 4.16a HPG' nin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3µm-3µm)..... | 51 |
| 4.16b HPG' nin 1µm-1µm boyutunda yakınlaştırılmış görüntüsü..... | 51 |
| 4.16c Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı..... | 51 |

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

| <u>Şekil</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 4.17a HPG-DFO örneğinin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3m-3µm)..... | 52 |
| 4.17b HPG-DFO örneğinin 1µm-1µm boyutunda yakınlaştırılmış görüntüsü..... | 52 |
| 4.17c Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı..... | 52 |
| 4.18a HPG-DFO örneğinin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3µm-3µm)..... | 53 |
| 4.18b HPG-DFO örneğinin 1µm-1µm boyutunda yakınlaştırılmış görüntüsü..... | 53 |
| 4.18c Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı..... | 53 |
| 4.19 ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin RI ve radyoaktivite dedektörde GPC kromotogramı..... | 54 |
| 4.20 [^{99m} TcO ₄] ⁻ 'ın ve ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO)'nun radyoaktivite dedektörüne ait kromotogramı..... | 54 |
| 4.21 ^{99m} Tc(HPG-ICG-DFO) örneğinin SF banyosundaki TLRC kromotogramı.. | 55 |
| 4.22 [^{99m} TcO ₄] ⁻ örneğinin SF banyosundaki TLRC kromotogramı..... | 56 |
| 4.23 İndirgemiş ^{99m} Tc örneğinin SF banyosundaki TLRC kromotogramı..... | 56 |
| 4.24 [^{99m} TcO ₄] ⁻ İle İşaretlenen Örneklerin Zaman-Verim Değerleri..... | 57 |
| 4.25 HPG-ICG-DFO örneğinin farklı konsantrasyonlarında zamana göre % canlılık değerleri..... | 59 |
| 4.26 [^{99m} TcO ₄] ⁻ ve ^{99m} Tc(HPG-ICG-DFO) örneklerinin bağlanma verimlerinin zamana göre değişimi..... | 60 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|---|--------------|
| 3.1 HPLC Çalışma Koşulları..... | 32 |
| 3.2 Protein Kalibrasyonu HPLC Koşulları..... | 32 |
| 3.3 ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO) örneği için HPLC koşulları..... | 34 |
| 4.1 HPG' nin dalga sayısına göre eğilme ve gerilmeleri..... | 42 |
| 4.2 Süksinidimil süksinat ile fonksiyonlaştırılmış HPG' nin eğilme ve gerilmeleri..... | 43 |
| 4.3 Deferoxamine ile şelatlanmış HPG'nin eğilme ve gerilmeleri..... | 44 |
| 4.4 Örneklerin DLS boyut analiz sonuçları..... | 48 |
| 4.5 Protein Kalibrasyon Değerleri..... | 49 |
| 4.6 Spektrofotometri ölçüm sonuçları..... | 50 |
| 4.7 ICG bağlanma verimi hesabı..... | 51 |
| 4.8 ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin RI dedektörde alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri..... | 54 |
| 4.9 ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin radyoaktivite (AD) dedektöründe alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri..... | 54 |
| 4.10 [^{99m} TcO ₄] ⁻ 'in ^{99m} Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin radyoaktivite (AD) dedektöründe alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri..... | 55 |

ÇİZELGELER DİZİNİ (devam)

| <u>Çizelge</u> | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| 4.11 $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$, indirgenmiş ^{99m}Tc ve $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneklerin TLRC yöntemiyle hesaplanan SF banyosundaki işaretleme verimleri ve R_f değerleri..... | 56 |
| 4.12 İşaretleme verilerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları..... | 57 |
| 4.13 Sitotoksosite deneyi sonucu madde konsantrasyonunun zamana göre değerleri..... | 58 |
| 4.14 $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ ve $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneklerinin K562 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi..... | 60 |

SİMGELER VE KISALTMALARAçıklama

| | |
|--------------------------------|---|
| TLRC | İnce Tabaka Radyokromatografi Yöntemi |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi |
| Rt | Alıkonma Süresi |
| Rf | Alıkonma Mesafesi |
| SPM | Scanning Probe Microscopy |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| DLS | Dynamic Light Scattering |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| HPG | Hyperbranched Polyglycerol |
| SS-HPG | Süksinidimil süksinat ile fonksiyonlaştırılmış polimer |
| DFO | Deferoxamine |
| ICG | Indocyanine Green |
| HPG-ICG-DFO | İndosiyenin yeşili ve deferoxamine bağlanmış polimer |
| ^{99m} Tc(HPG-ICG-DFO) | Teknesyum ile radyoişaretli İndosiyenin yeşili ve deferoxamine bağlanmış dallanmış poligliserol |



1. GİRİŞ

Dendrimer alternatiflerinin peşinde, aşırı dallı polimerler, topolojik ve sentetik avantajları nedeniyle geniş bir alan yelpazesinde akademi ve endüstriden artan ilgi görmüştür. Hiper dallanmış poligliserol, adından da anlaşılacağı gibi,% 50-65 oranında dendrimerik yapıya sahip aşırı dallanmış bir polimerdir. Sentez kolaylığı, küresel doğası, işlevselliği açısından çok yönlülük ve mükemmel biyouyumluluk profilleri sayesinde HPG, nanotıp ve biyomedikal teknolojilerinde sayısız uygulama için uygun gelecek vaat eden bir malzeme sınıfı sağlar. HPG, çeşitli biyomedikal uygulamalar için yaygın olarak kullanılan diğer polimerler ile karşılaştırıldığında intravenöz enjeksiyondan sonra hayati organlarda çok az polimer birikimi göstermiştir. HPG farelerde ve sıçanlarda iyi tolere edilir ve bugüne kadar immünojenik olmadığı bulunmuştur. Gösterdiği güvenlik profili ve çok işlevli olması nedeniyle HPG, makromoleküler terapötikler, multivalent inhibitörler / toplayıcılar, kontrollü ilaç verme sistemlerinde, organ korunmasında, diyalizde ve hücre yüzey mühendisliğinde, görüntüleme ajanları ve terapötikler gibi farklı biyomedikal uygulamalar için kapsamlı olarak çalışılmıştır (Abbina et. al., 2017).

Biyolojik olarak uyumlu ve aktif makromoleküllerin hücre yüzeyi zarlarına kovalent bağlanması, ya konjuge makromolekülün ya da hücrenin kendisinin özelliklerinin geliştirilmesi için pratik bir yöntem olarak araştırılmaktadır. Örneğin, hidrofilik makromoleküller daha önce bağışıklık tepkilerini en aza indirmek, enzimatik bozunmayı azaltmak ve genellikle hücrenin in vivo uyumluluğunu geliştirmek için hücre yüzeylerine kovalent olarak bağlanmıştır. Benzer şekilde, bir biyofarmasötik bileşiğin dolaşım, aktivite ve hedeflenebilirliği, bir kırmızı kan hücresinin (RBC) yüzeyine kovalent bağlanma üzerine arttırılabilir (Rossi et. al., 2010).). HPG' nin sahip olduğu dallanmış yapısı kan hücrelerine kolay tutunmasını sağlayacak ve RBC sirkülasyonuna dahil olacaktır. Bu çalışmada kullanılan yöntemin avantajı, HPG'lerin RBC'lerin membranı üzerinden metabolize olmadan hücre yüzeyine bağlanmasıdır.

İç kanamanın etyolojisinin tanınması pek çok kanserde önemlidir. İdrarda kan (hematuria) ilerlemiş böbrek, mesane veya prostat kanserlerinin üst/alt gastrointestinal (GI) kusmuk veya dışkıda kan özafagus, mide, kolon, veya intestinal kanserlerinin belirtisi olabilir. Bu kanserler genel olarak iç kanamanın kaynağında veya yakınında lokalize olmuş olabilirler. İç kanamanın kaynağını belirleyerek kanserin lokalize olduğu yer bulunabilir böylece biyopsi ve cerrahi müdahale mümkün olabilir.

Endoskopi GI kanamada kullanılan genel ve ucuz bir yöntemdir. Malesef insan anatomisi özellikle alt GI da endoskopiye zorlaştırır, ince bağırsak ortalama 6 metre iken, kalın bağırsak 1,5 m uzunluğundadır. Bu kadar uzunlukta oldukça karmaşık bir dokuda araştırma yapmak zor bir iştir. Bu iş buradaki dokunun taze kan renginde olması nedeniyle daha da zorlaşır. İlâveten eğer lezyon bir kan havuzunun altında ise kan opaklaşacağı için görülmeyebilir. Gelişmiş ülkelerde eğer iyi yetişmiş bir gastroenterolojist lezyonu tanıyabilirse, ikinci defada cerrah tarafından lezyon çıkarılır. Radyoaktif işaretli hücreler ile görüntüleme iç kanama lokasyonunu belirlemeye alternatif olabilir. ^{99m}Tc veya ^{111}In işaretli-RBCler GI kanamada hızla lokasyonu görüntüler. Kısa sirkülasyon zamanları için radyoaktif hücrelerin küçük molekülü radyoizleyicilere ile ilişkisi çok uygun olabilir. Radyoaktif RBC'ler 24 saat içinde oluşmuş sürekli olmayan kanamanın görüntülenmesi için çok uygundur, sadece 3cc kan bu iş için yeterlidir. ^{99m}Tc -RBCler ile yılda Dünya'da 2 milyon tarama yapılmaktadır. Bununla beraber SPECT-RBC görüntüleme eksikler vardır. Kanama 0.1 - 0.5 mL/dakika arasında olmalıdır. ^{99m}Tc -RBCler kanamayı hatalı gösterebilir. (false positive), Bu durum da gereksiz cerrahi müdahale riski oluşturur. ^{99m}Tc -RBCler görüntü rehberli cerrahide faydalı değildir. İlâveten, ^{99m}Tc -RBC'ler, ^{99m}Tc ve SPECT tarayıcı gerektirir bu da gelişmekte olan ülkeler için az tercih edilen bir durum yaratabilir. Sonuç olarak, ^{99m}Tc -RBC cerrahi işlemlerde yol gösterici olamaz. Bu sebeplerden dolayı ^{99m}Tc -SPECT/FL işaretli RBC'ler cerrahiden müdahaleden cerrahi işlem gerektirmeyen rehberlik sağlayabilir (Song et al., 2014).

Onkolojik tanıda SPECT ve PET'den SPECT ve PET/BT'ye oradan PET/MR olan sıçramalarda sıra SPECT ve PET radyofarmasötiklerinin multimodal hale getirilerek fonksiyonel ve metabolik karakterizasyon yeteneğinin artırılması mümkün gibi görünmektedir. Metabolik karakterizasyon için yüksek bir tanısal doğruluğa sahip olan PET radyofarmasötiklerinin yarıömürleri oldukça kısadır. Bu nedenle PET radyonüklidlerinin yanısıra ^{131}I gibi teranostik potansiyeli olan daha uzun ömürlü radyonüklidler ve ^{99m}Tc uygun fiziksel özellikleri nedeniyle önemini hala korumaktadır.

SPECT görüntüleme modüllerini FL ile birleştirerek çok modüllü görüntüleme sistemi haline getirmenin pek çok avantajı vardır. Her iki modül de histolojik olarak ve yüzeysel olarak birbirini tamamlar. Floresan proplar hızla bozulan PET proplardan farklı olarak kararlı iken, PET derin dokudaki invazif olmayan kantitatif yapısal çözünürlüğü nedeniyle FL'den üstündür. Bu nedenlerle PET/FL proplar tek başına PET veya FL kontrast ajanlara göre çok daha iyidir. PET/FL prop geliştirme yenilikçi bir konudur. Halen klinikte çok modüllü uygulamalarda kullanılabilecek FDA tarafından onaylanmış bir prop yoktur (Tsien, 2003; Nguyen and Tsien, 2013).

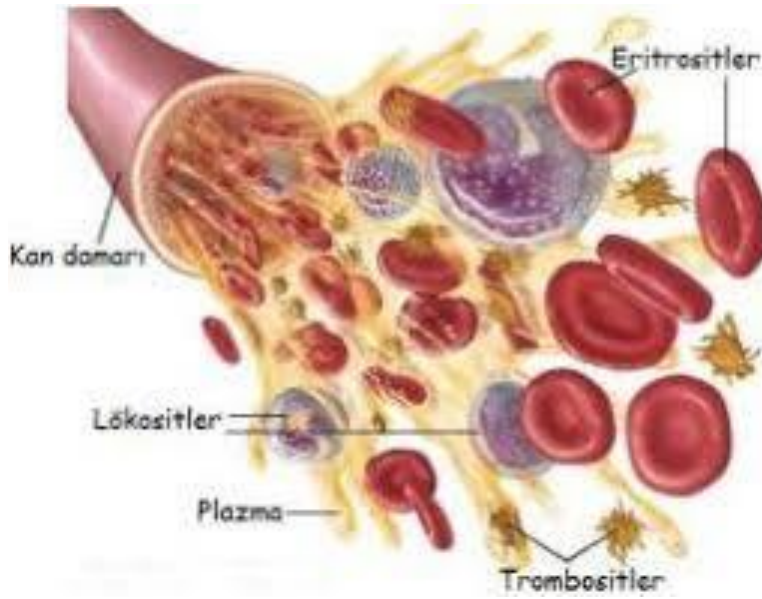
Bu tez çalışmasında; HPG, glisidolün anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Uçlarını işlevselleştirmek için süksinidimil süksinat kullanılmıştır. Elde edilen sentez ürünleri HPG ve SS-HPG' nin yapısal özellikleri için fourier dönüşüm spektroskopisi ve dinamik ışık saçılımı analizleri yapılmıştır. Aynı zamanda HPG' nin molekül ağırlığını belirlemek için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanılmıştır. Floresans özellik için polimere indosiyenin yeşili bağlanmıştır. Bağlanma verimini tespit etmek için multimode mikropilaka okuyucu (Thermo Varioscans Flash) kullanılmış ve % verim hesaplanmıştır. Şelatlayıcı ajan deferoxamin HPG-ICG' ye bağlanıp elde edilen sentez ürününün yapısal özellikleri fourier dönüşüm spektroskopisi, dinamik ışık saçılımı ve taramalı uç mikroskopu analizleri ile belirlenmiştir. Radyoizotop ^{99m}Tc ile gerçekleştirilmiş yüksek sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak kalite kontrolü yapılmıştır. Radyoizotoplu örneklerin kararlılığı, stabilite deneyi ile ince kağıt radyokromatografisi (TLRC) kullanılarak tespit edilmiştir. HPG-ICG-DFO örneklerinin biyolojik davranışlarının *in vitro* incelenmesi K562 kronik myeloid lösemi hücreleri kullanılmıştır. Sentezlenen HPG-ICG-DFO örneğinin K562 hücrelerinde sitotoksik etkisi incelenmiştir. ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) işaretli örneğinin K562 hücreleri üzerindeki tutulumu zamana bağlı olarak incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kan Hücreleri

Ekstrasellüler sıvının (hücre dışı sıvısı) bir parçası olan kan, plazma adı verilen sıvı ortamında kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) süspansiyon halinde dağıldığı, damar sisteminin içini dolduran ve kalbin pompa gücü sayesinde bu sistem içinde tüm vücudu dolaşan bir dokudur. Kan %45 hücresel kısımdan, %55 plazma (sıvı) kısımdan oluşmaktadır. Şekil 2.1'de yer aldığı gibi kanın hücresel elemanlarını eritrositler (%99), lökositler (%< 1) ve trombositler (%< 1) oluşturur. Kanın hücresel bölümünün kan hacmine oranına, kanın hematokrit değeri denilmektedir. Hücresel elemanların % si hematokrit değerini gösterir. Hematokrit değerine birincil olarak etki eden kan hücreleri, eritrositlerdir. Eritrosit sayısında artış, plazmada azalma hematokrit değerini yükseltir.

Eritrositler kemik iliğinde üretilir ve yaklaşık 120 günlük yaşam süreleri sonunda dalakta tahrip olurlar. En önemli bileşeni hemoglobin 141 aminoasitli alfa ve 146 aminoasitli beta olmak üzere iki polipeptit zinciri içerir. Hemoglobin ve diğer hücresel proteinler radyoizotoplamada etkilidir. Lökositler, granulositler ve lenfoid hücrelerinden oluşur. Enfeksiyon ve enflamasyon görüntüleme için granulosit ya da nötrafil hücreleri kullanılır. Trombosit ya da plateletler kemik iliğinde bulunan ve mehakaryosit adı verilen çekirdeksiz dev hücrelerdir. Damar yaralanmalarında kanamanın durması ve kanın pıhtılaşmasında görev yapar (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2018).



Şekil 2.1 Kanın bileşenleri (The Editors of Encyclopaedia Britannica, 2018)

2.1.2 Kırmızı Kan Hücrelerinin Radyoışaretlenmesi

Kan hücrelerinin radyonüklidlerle işaretlenerek kullanılması uzun yıllar öncesine dayanmaktadır. Nobel ödüllü George de Hevesy'nin 1942' de ^{32}P işaretli eritrositlerin hastalarda kan hacminin belirlenmesi için kullanımını başlattığı çalışmalara uzanmaktadır. Radyoışaretli kırmızı kan hücreleri, yıllardır tanı radyofarmasötikleri olarak önemli rol oynamaktadır. Kanın hücresel elemanları ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{51}Cr , ^{32}P , ^{66}Ga , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{55}Co , ^{52}Fe , $^{18}\text{F-FDG}$ gibi çeşitli radyonüklidlerle işaretlenebilmekte ve değişik klinik çalışmalar için kullanılabilir (Ertay ve Ünak, 2017; Srivastava and Chervu, 1984).

Kırmızı hücrelerin radyoaktif etiketlenmesi ve bunların nükleer tıp alanındaki klinik ve araştırma uygulamaları, son yirmi yılda sürekli ilgi ve istikrarlı bir büyüme alanı oluşturmaktadır. Günümüzde, çeşitli uygulamalar için yeterli in vitro ve in vivo stabiliteye sahip radyo-etiketler mevcut olacak şekilde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle $^{99\text{m}}\text{Tc}$ etiketli kırmızı hücreler, çeşitli kalp parametrelerinin hastaya minimum radyasyon dozu veya travmasıyla dış değerlendirmesini mümkün kılarak kardiyovasküler nükleer tıp alanında devrim yaratmıştır (Callahan, 2009).

$^{99\text{m}}\text{Tc-RBC}$ kullanan diğer çalışma alanları arasında kan havuzu görüntüleme, vasküler malformasyonların tespiti, kırmızı hücre kitle tayini, gastrointestinal kanamanın saptanması ve hemanjiyomlar bulunmaktadır. Isı-hasarlı $^{99\text{m}}\text{Tc-RBC}$ dalak görüntüleme, aksesuar dalak lokalizasyonu, GI kanamasının saptanması ve diğer alanlarda uygulamaları bulunmaktadır. Kırmızı hücre etiketleme için şu anda

mevcut olan çeşitli in vitro ve in vivo etiketleme tekniklerinin kritik bir değerlendirmesi sunulmaktadır (Ertay ve Ünak, 2017).

Nükleer kardiyolojide bir kan havuzu görüntüleme ajanı olarak ^{99m}Tc etiketli kırmızı kan hücrelerinin klinik etkinliği, öncelikle vücudun intravasküler havuzuna dağılma ve bu bölmeyi yavaş bir hızda bırakma yeteneğine dayanır. Böyle bir davranış, fizyolojik bir geçit cihazının yardımıyla elde edilebilen yüksek çözünürlüklü görüntülerin birikmesine izin verir. Gama sintilasyon kamerası ile kombine edilen bu prosedür, bölgesel miyokardiyal duvar hareketi ve sol ventrikül ejeksiyon fraksiyonu gibi dinamik süreçler hakkında tanı bilgisi verebilir.

2.2 Tıbbi Görüntüleme

Hastalıkların tanı ve tedavisinde tıbbi görüntüleme çok önemli bir yer oluşturmaktadır. Tıbbi görüntüleme, insan vücudunun iç yapısının çeşitli yöntemler ile görülebilir hale getirilmesi prensibine dayanır (Aydoğdu et al., 2017).

Görüntülemeyi iki ana sınıfa ayırabiliriz. Bu iki ana sınıf; tanı amaçlı görüntüleme ve teşhis amaçlı görüntüleme şeklindedir. Tanı amaçlı görüntülemelerde hastalığın var olup olmadığının tanısı koyulmaya çalışılırken, Teşhis amaçlı görüntülemelerde hastalığın, hangi hastalık olduğunun belirlenmesi için yapılan görüntüleme sekanslarıdır (<http://www.anadoluisagligi.com>).

Günümüzde medikal görüntüleme sistemlerini; X-RAY radyografi, manyetik rezonans (MR), bilgisayarlı tomografi (CT), pozitron emisyon tomografisi (PET), ultrason, optik görüntüleme, tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografisi (SPECT) oluşturmaktadır.

Bilgisayarlı Tomografi (CT): X-ışını kullanılarak vücudun incelenen bölgesinin kesitsel görüntüsünü oluşturan tanı yöntemidir. CT anjiyografi ile damar içi darlıklar gösterilebilir. Orta kulak içi kemikçiklerin ve yumuşak dokuların incelenmesi yapılır. Sinüslerin incelenmesinde ilk olarak tercih edilir. Omurgada hem kemiklerin hem de disk gibi yumuşak dokuların incelenmesini sağladığı için özellikle bel fıtıklarında önemli yeri vardır. Radyoterapi planlanması da CT ile yapılır.

Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRG): Manyetik alan ve radyo dalgaları sayesinde vücut içerisinde bulunan organların detaylı görüntüler oluşmasına dayanır. MRG ile organlar, yumuşak doku ve kemikler görüntülenebilir. MRG'de iyonizan radyasyon kullanılmaz.

Ultrasonografi: Yüksek frekanslı ses dalgaları kullanılarak ses enerjisinin görüntüye dönüştürülmesi işlemidir. Ultrasonografide ses üstü (ultra-son)

dalgaların “yansıması” söz konusudur. Ultrasonografi, genellikle boyun, tiroid bezi, karaciğer, safra kesesi, böbrekler, dalak, pankreas, mesane, rahim, yumurtalıklar, skrotum, testis ve prostat bezi gibi organların görüntülenmesinde kullanılır.

X-Ray Radyografi: İstenilen sürede, istenilen kalite ve miktarda x-ışınının elde edilmesini sağlayan görüntüleme cihazlardır. X-ışınları iyonizan radyasyondur. X-ışınlarının radyolojide kullanılmasının nedeni dokuyu geçebilme yeteneğidir (Aydoğdu et al., 2017).

PET (Positron Emisyon Tomografisi) ve SPECT (Single Photon Emission Tomography): SPECT görüntüleme cihazları, hastanın vücuduna yerleştirilen radyoaktif izleyici moleküllerin dağılımının üç boyutlu (tomografik) görüntülerini sağlar. SPECT görüntüleyiciler, hastaya enjekte edilen izleyicilerin gama ışını emisyonlarını algılayabilen gama kamera dedektörlerine sahiptir. PET taramaları da üç boyutlu görüntüler oluşturmak için radyofarmasötikler kullanır. PET taraması bir kitlenin kanserli olup olmadığını belirlemede rol oynayabilir.

Floresan Görüntüleme: Kontrast madde yardımıyla vücudun moleküler ve hücre fonksiyonlarının tespitinde kullanılmaktadır. FL izleme halen gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde göz korneasında olan ülser lokalizasyonunun gösterilmesinde, belkemiği ve kafatası arasında kan beyin engeli hasarlarını cerrahi olarak giderilmesi gibi konularda yol gösterici olarak kullanılmaktadır.

2.3 Dual Modalite

Birkaç modalitenin birleştirildiği görüntüleme, multimodal görüntüleme olarak bilinir. Bu yaklaşımda karşılıklı olarak birbirini tamamlayan ve her modalitenin zayıf noktalarını telafi eden modaliteler seçilmiştir. Bu yöntem hızlı ve doğru bir teşhis sağlar. X-ışını bilgisayarlı tomografi (CT) ve floresan görüntüleme (FI), yani CT / FI çift modal görüntüleme kombinasyonu, en etkili kombinasyonlardan biridir. CT, boyut, konum gibi anatomik bilgileri sağlar ve dokuların şekli ve evrensel olarak yaygın ve ucuzdur. Bununla birlikte, yumuşak dokuların CT kontrastı doğal olarak düşük olduğu için, CT kontrast ajanlarını kullanmadan, belirli bir yumuşak dokunun çevredeki yumuşak dokulardan ayırt edilmesi zordur. İyot içeren moleküller şu anda klinik uygulamalarda CT kontrast ajanları olarak kullanılmaktadır, çünkü iyot yüksek bir X-ışını absorpsiyon katsayısına sahiptir. Bununla birlikte, bu tür bileşiklerin kullanımı anjiyografinin ve ürografinin görüntülenmesi ile sınırlıdır, çünkü bunlar dokulara spesifik olarak yapışmazlar. Bu nedenle, tümör gibi spesifik bir yumuşak dokunun görselleştirilmesini sağlayan CT kontrast ajanlarına kuvvetle ihtiyaç duyulmaktadır.

FL, görüntüleri çok hızlı bir şekilde sunar ve çalışması kolaydır. Bununla birlikte, algılama derinliği, dokudaki ışığın penetrasyon derinliği ile sınırlıdır. Işık optik pencere olarak bilinen 600-900 nm dalga boyu aralığında vücuda derinden nüfuz eder veya biyolojik dokular için yakın kızıl ötesi (NIR) pencere, çünkü bu dalga boyu aralığında hemoglobun, su ve melanin tarafından emilim azalır (Hayashi et al., 2014). FL ucuz bir teknolojidir. FL görüntü rehberli cerrahide görüntü almada ve tümör çıkarmanın başarılı olup olmadığını test etmede kullanılabilir. Histolojide FL kullanımı SPECT ve cMRI kontrast ajanlardan çok daha fazladır. Çoklu floroforlar sağlanarak görüntü alınabilir (farklı dalgaboylu kromoforlar kullanılarak). FL tümör heterojenitesini ve doku/hücre düzeyinde dağılımı görüntüleme için kullanılabilir. En önemlisi, FL görüntüleme geliştirmekte olan ülkeler için de ucuz ve kolay erişilebilirdir. Bu nedenler ile FL kolay uygulanabilen faydalı bir teknolojidir.

Bu çalışmada geliştirilen SPECT/FL probu SPECT içeren ajanlardan üstündür. FL prob radyonüklid gibi bozunmayacağı için daha uzun zaman görüntü alınabilir. SPECT ve FL propların moleküler birleşmesi gelişmiş ülkeleri de bu modüllerin FDA onayı almayı için teşvik edecektir. Eğer bir Tc-SPECT/FL için FDA onayı alınabilirse, bu ajanların radyoaktif olmayan şekilleri de geliştirmekte olan ülkelerde farmasötik güvenlik ve mevzuat açısından hiçbir problem olmadan kullanılabilir. İki şekilde de geliştirilecek olan SPECT/FL ajanları yenilikçidir ve mevcut gelişmiş ve geliştirmekte olan ülkelerdeki teknolojilerden avantajlıdır. Klinik açıdan bakıldığında SPECT/FL proplarının geliştirmekte olan ülkeler için yararlı olduğunu söyleyebiliriz. Birincisi halen kullanılan klinik uygulamalar açık olarak bu konuya dikkat çeker. Eğer tedavi edilmez ise santral sinir sistemindeki dural yırtıklar nöro inflamasyona yol açar ve duysal fonksiyonlarda kayıplara neden olur (Song et al., 2014). Santral sinir sistemindeki zar yırtıklarına bu şekilde intratekal olarak enjekte edilen bir radyoaktif izleyici (^{111}In , veya $^{99\text{m}}\text{Tc}$) ile SPECT (Ali et al., 1998) veya nasal boşluktaki drenaj aktivitesi izlenerek tanı konabilir. Bu işlem geliştirmekte olan ülkelerde nükleer tıp, otolarinkoloji/nörocerrahi ve radyokimyanın işbirliğini gerektirdiği için kolay olamayabilir. Yakın literatür bilgisi doktorların radyonüklid kullanımından kaçınabildiklerini ve ucuz, kolay uygulanabilir prosedürlere gereksinim duyduklarını göstermiştir. Bu sorun intratekal enjeksiyonun FL özellik gösteren bir molekül kullanılması ile aşılabılır (Javadi et al., 2013; Seth et al., 2010; Placantonakis et al., 2017). Nazal boşluktaki FL dedeksiyonu 7 USD lik bir FL ışık salan diod sistem ile kolaylıkla aşılabılır. Dural iyileşme onkoloji ile ilişkili olmamasına rağmen bu örnek gelişmiş ülkelerde kullanılan teknolojiler (SPECT/CT prop geliştirme) ile paralel olarak geliştirmekte olan ülkelere de FL propların kolay ve ucuz olarak aynı hastalığın teşhisinde kullanılabilirliğini göstermektedir. Mevcut klinik gereksinimler tek moleküllü SPECT/FL görüntüleme proplarının (ve moleküler olarak özdeş, radyoaktif olmayan inaktif FL propların) hem gelişmiş ve hem de geliştirmekte olan ülkelerde diagnostik onkoloji gibi çok önemli uygulamalarda kullanılabilirliğini göstermektedir.

2.4 Polimerik Nanoparçacıklar

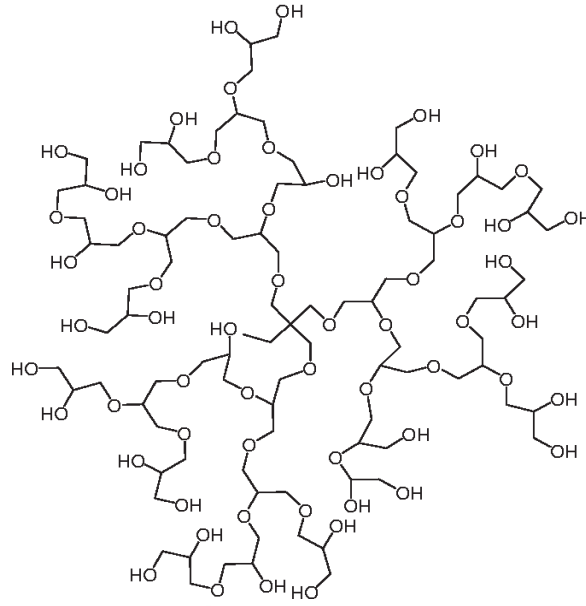
Nanoparçacıklar sıklıkla 10-1000 nm aralığında katı, kolloidal parçacıklar olarak tanımlanmaktadır. Polimerik nanoparçacık terimi, herhangi bir polimer nanoparçacık türü için, fakat özellikle nanoküreler ve nanokapsüller için verilen bir toplu terimdir. Nanokürecekler matris partikülleridir, yani tüm kütlesi katı ve moleküller küre yüzeyinde adsorbe veya partikül içinde kapsüllenmiş parçacıklar olabilir.

Polimer nanoparçacıklar, küçük boyutlarından kaynaklanan eşsiz özellikleri ve davranışları nedeniyle son birkaç yıl içinde büyük ilgi görmüştür. Farklı yazarlar tarafından öne sürüldüğü gibi, bu malzemeler, teşhis ve ilaç dağıtımı gibi geniş bir uygulama yelpazesi için potansiyel göstermektedir. Polimerik nanoparçacıkların taşıyıcılar olarak avantajları arasında kontrollü salım, hem terapi hem de görüntüleme (teranostikler), ilaç moleküllerinin korunması ve spesifik hedeflemesi bulunmaktadır.

Etken maddeyi bir taşıyıcı sistem olarak kullanmakta olan polimerik nanoparçacıkların diğer sistemlere göre belli başlı üstünlükleri bulunmaktadır. Etken maddenin yükleme kapasitesinin yüksek olması ve üretiminin kolay olması, nanoparçacığın polimerik yapısı sebebiyle etken maddenin hedeflenmesi ve kontrollü salımının sağlanması, hedeflenen bölgede uzun süren etken madde salımına olanak sağlanması bu üstünlüklerden birkaçıdır. Ayrıca küçük parçacık boyutları sebebi ile (10-1000 nm) nanoparçacıkların hücre içi penetrasyonuna olanak sağlar, hücre tarafından tutulması ve bu şekilde vücut içerisinde hedeflenen bölgeye etken madde salımını gerçekleştirmekte ve taşıdığı maddenin hedef bölgedeki salımına imkan verdikleri için etken maddenin toksisitesini de azaltmaktadır. (Şengel-Türk ve Hasçıçek, 2009).

2.4.1 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol)

Hiper dallanmış poligliseroller (HPG), unimoleküler nanopartiküller oluşturan yüksek ve rastgele dallanmış polimerlerdir (Şekil 2.2). Anyonik halka açılı çok dilli yoluyla sentezlenen HPG'ler bir başlatıcı olarak trimetilolpropan (TMP) kullanılarak glisidolün polimerizasyonu ile ilk olarak Sunder ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Nispeten basit "tek potlu" sentez, moleküler ağırlık üzerinde iyi kontrol, dar polidispersite ve modifiye edilebilirlik bu sentezin cazip özellikleri arasındadır. Alkil ($C_{8/10}$) gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahip HPG'ler, çekirdeğe ve metoksi polietilen glikol (MePEG) yüzeyine zincirlenirler (Ye, 2011).



Şekil 2.2 HPG'nin yapısı

Polimer terapötikler ve doku mühendisliği, farklı uzunluk ölçeklerinde yapı sergileyen yeni polimerik malzemeler için sürekli bir talebe sahiptir. Bu malzemeler, toksik olmayan, işlevselleştirilmesi kolay ve suda şişirilmelidir. Hiperdallanmış poligliserol (HPG) bu özellikleri birleştirir ve bu nedenle birçok biyomedikal uygulama için yararlıdır. HPG'nin multivalent hidroksil işlevselliği, yüzeyinin biyoaktif maddelerle değiştirilmesine izin verirken, polimer suda çözünür. Dahası, HPG yapısal olarak benzer olandan bile daha az sitotoksiktir. HPG geleneksel olarak yavaş monomer ilavesi altında glisidolün anyonik, halka açılı çok-yollu polimerizasyonu ile hazırlanır. Bu koşullar dar bir polidispersiteye sahip polimerler ve 20 kDa'ya kadar olan bir sayı ortalama moleküler ağırlığı (M_n) verir. (Steinhilber, 2010).

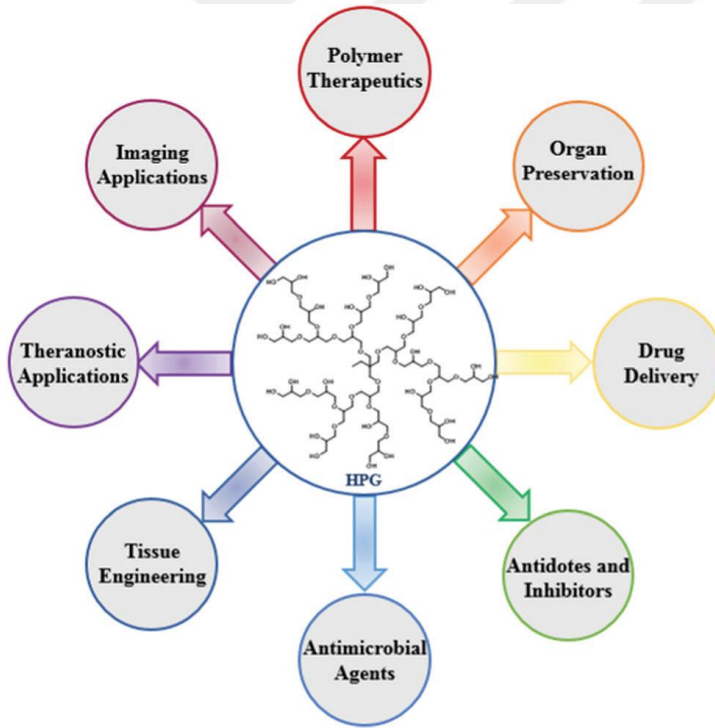
HPG aynı zamanda lineer PEG'den daha termal ve oksidatif olarak daha stabildir. Globüler yapısından dolayı benzer moleküler ağırlıklarda daha az viskoz çözeltiler üretir. HPG'ler bu nedenle daha büyük konsantrasyon aralıklarında yararlıdır ve PEG'den daha fazla protein gibi davranırlar. HPG'lerin şimdiden test edilmiş uygulamaları, insan serumu yerine, mesane kanserinin tedavisi için ilaç taşıyıcı araçlar ve hücre yüzeylerinin bir koruyucu maddesidir (Saatchi et al., 2012).

PEG'den farklı olarak, HPG'ler ve bunların lineer analogları kırmızı kan hücresi (RBC) agregasyonu ve hemoliz üzerinde hiçbir etki göstermemektedir. Bu sonuçla tutarlı, tam kan değişken kesme hızı viskozite çalışmaları, her iki tip poligliserolün, orta viskoziteyi askıya almanın çok küçük bir etkisinin ötesinde kan viskozitesini değiştirmediği de bazı çalışmalarda yer almaktadır.

Başka bir çalışmada, Kainthan ve ark. yüksek moleküler ağırlıklı HPG'lerin in vitro kan uyumluluğunu araştırdığında, yüksek moleküler ağırlıklı HPG'lerin,

aktifleştirilmiş tromboplastin zamanı (APTT), protrombin zamanı (PT), kompleman faktörü C3a jenerasyonu ve trombosit aktivasyonu dahil olmak üzere çeşitli in vitro hemo uyumlu ölçümler üzerinde önemsiz etkileri olduğunu gözlemlemişlerdir. Çalışmalar, biyo-bozunabilir HPG'lerin oldukça kan uyumlu olduklarını ve degradasyon ürünlerinin de istenmeyen toksisiteler oluşturmadığını göstermektedir.

Kısacası, mükemmel biyouyumluluk ve çoklu işlevselleştirme için çok büyük olasılıkla, HPG'nin biyomedikal ve nanotıp alanında büyük potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Kompakt yapı, düşük içsel viskozite, yüksek oksidatif kararlılık, HPG'leri doğrusal eşdeğerlerine veya diğer doğrusal polimerlere üstün kılar. HPG'nin kompakt, dendritik yapısı, polimer üzerinde çok değerlikli bir şekilde ligandlar sergileyen, yüksek erişilebilir sunum sağlar. Bu tür ligandlar, tasarım için önemli avantajlar göstermektedir. HPG'nin sahip olduğu bu özelliklerden dolayı birçok uygulama alanı gelişmektedir (Şekil 2.3). Bu alanlar, polimer terapatikler, kontrollü ilaç dağıtım uygulamaları, nükleik asit taşıyıcı ajan, hücre yüzey mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamaları, görüntüleme uygulamaları, teranostik uygulamalar şeklindedir (Abbina et al., 2017).

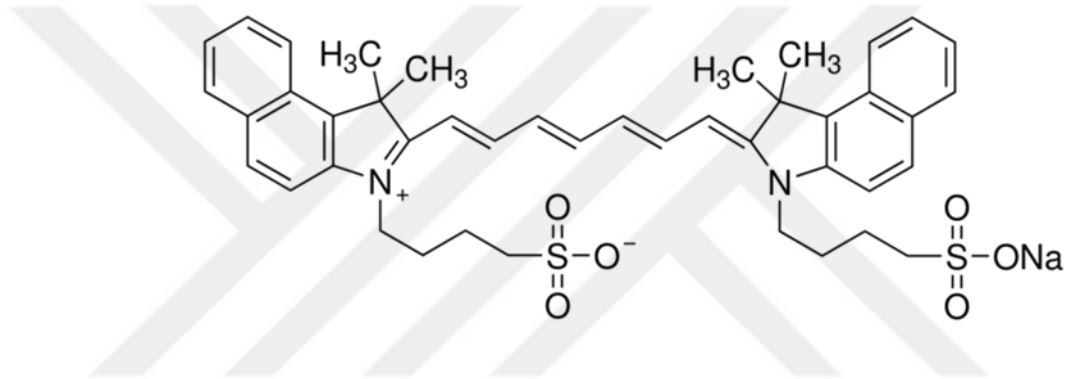


Şekil 2.3 HPG' nin Biyomedikal Uygulamaları

2.5 İndosiyanin Yeşili (ICG)

Suda eriyen bir trikarbosiyanin boyası olan indosiyanin yeşilinin ilk fiziksel ve fizyolojik özellikleri 1960 yılında Fox ve Wood tarafından tanımlanmış ve 1960'lardan beri ICG kardiyologlarca kardiyak akım çalışmalarında kullanılmıştır. Fundus anjiyografi için ilk kullanımını 1970'te baykuş maymunlarının fundus görünümünü elde etmek için olmuştur (Owens, 1996).

ICG molekülü iki lipofilik polisiklik parçadan oluşur ve bu parçalar birbirlerine bir karbon zinciri ile bağlıdır (Şekil 2.4). Her polisiklik parçaya da bir sülfat grubu bağlıdır ve molekül bu sayede hidrofilik özellik kazanır. Bu kompleks moleküler yapı amfifilik (hem hidrofilik hem de lipofilik) bir yapıya yol açar.



Şekil 2.4 ICG 'nin kimyasal yapısı (Fvasconcellos, 2009)

ICG, floresseinin total floresansı ile kıyaslandığında % 4 daha az floresans gösterir. ICG floresansı kapillerler ve küçük ve büyük damarlar arasındaki hematokrit değişikliklerinden etkilenir. Hematokrit düşük olduğunda ICG floresansı artar. ICG kan düzeyi 80 µM/ml oluncaya dek floresans lineer olarak artar. Fakat bu düzeyin üstündeki yoğunlukta floresans düşer. Bu da ICG 'nin agregasyon oluşturması ile açıklanabilir: ICG polimerleri monomerlerden daha zayıf floresans gösterir (Desmettre et al., 2000).

Karaciğerden safra yollarına geçen boya barsaklardan reabsorbe olmaz ve karaciğerin performansına bağlı olarak yaklaşık yarım ömrü olan 3-4 dakika vücuttan atılır.

ICG 'nin kullanım güvenilirliği istatistikleri ilk olarak kardiyoloji ve hepatoloji literatüründe yer almıştır. Kardiyak fonksiyon testi uygulanan 1000 hastalık bir seride hiç yan etki görülmediği bildirilmiştir (Owens, 1996). Toplam 13 yıllık bir süre içinde boyanın üreticisi olan Becton Dickinson Company

firmasına 2 ‘si ölümle sonuçlanan toplam 25 reaksiyon bildirilmiştir. Bu verilerle reaksiyon oranı, yaklaşık 50000 dozda bir reaksiyon görüldüğü şeklindedir.

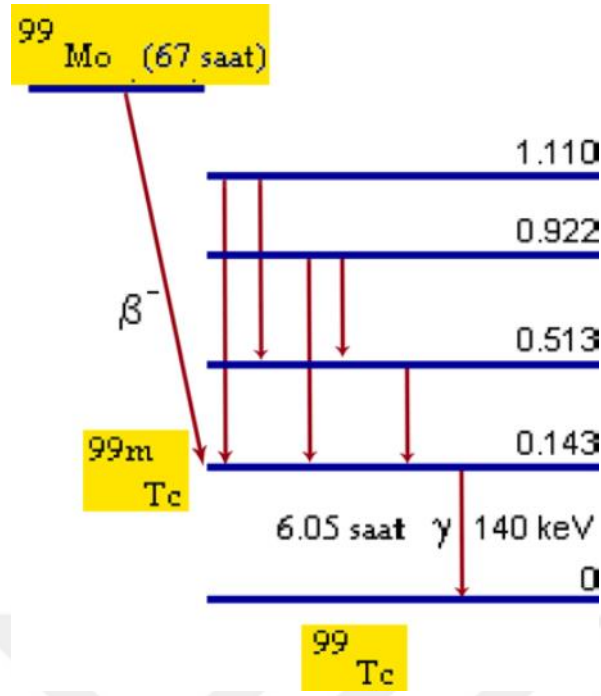
2.6 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) Kimyası

Teknesyum, 1937 yılında İtalyan mineralog Carlo Perrier ve İtalyan asıllı Amerikalı fizikçi Emilio Segre tarafından keşfedilmiştir. Perrier ve Segre, Kaliforniya Üniversitesi’ndeki Lawrence Berkeley Uluslararası Laboratuvar’ında bulunan siklotron adlı hızlandırıcı cihazda bir molibden numunesini döteronlarla (döteryum çekirdeği) bombardımana tutarak teknesyum elde etti.

Teknesyum, keşfedilmeden önce çok aranan ve özellikleri keşfedilmeden belirlenen bir elementtir. Özellikleri, periyodik tabloyu sıralamak için Periyodik Kanun’u keşfeden Dimitri Mendeleev tarafından tahmin edilmiştir. Mendeleev, 1871 yılında periyodik tabloda molibden (42) ve rutenyum (44) arasında bir boşluk buldu ve keşfedilmemiş öğeye geçici olarak “eka-manganez” adını verdi ve manganez ile benzer özellikler sergileyeceğini öngördü. Daha sonraki yıllarda birçok kimyager bu boşluğu doldurarak yeni element keşfeden isim olmak için sayısız deney yaptı. Mendeleev’in öngördüğü elementin boşluğunu diğer elementler dolduramadı. 1937 yılında Perrier ve Segre’nin elde ettiği elemente “panromium” ismi önerildi. 1947 yılında “technetium” olarak kayıtlara geçti.

Kimyasal simgesi “Tc” olan teknesyumun atom numarası 43, atom ağırlığı 98, yoğunluğu 11 g/cm³’tür. Erime noktası 2157 °C, kaynama noktası 4265 °C’dir. Periyodik element tablosunun 7-B grubunda geçiş metalleri arasında yer alır. Parlak, metalik gri renktedir. Çoğunlukla gri toz halinde elde edilir. Kristal yapısı hekzagonaldır. Görünümü bakımından platine, kimyasal özellikleri bakımından renyum ve manganeze benzer. Yarıömrü 6 saat, enerjisi 140 keV olan tek bir gama ışınına sahip, ⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratöründen elde edilebilen, ucuz, birçok farmasötik ile kararlı bileşik oluşturabilen, görüntüleme için ideal bir radyonükliddir.

Teknesyum, nükleer tıpta kullanılan bir elementtir. Nükleer tıp görüntüleme uygulamalarında gama ışını yayan ^{99m}Tc izotopu yaygın olarak kullanılır. Enjeksiyon ile kana karıştırılan ^{99m}Tc, dokularda tutunarak fizyolojik görüntüler elde edilmesini sağlar. Metastabil bir nükleer izomer olan ^{99m}Tc, tıbbi testlerde de kullanılır. Beyin, kalp kası, tiroid, akciğer, karaciğer, safra kesesi, böbrek, kemik ve kandaki tümörlerin görüntülenmesi ve işlevlerinin tespiti için ^{99m}Tc izotopu önemli bir maddedir. Teknesyumun kimyasal özellikleri birçok organik ve biyokimyasal bileşik oluşturmaya izin verir. Bu sebeple onlarca tıbbi teşhis için teknesyumdan faydalanılır. (Eskier, 2017).



Şekil 2.5 ^{99}Mo ' un $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' a bozunma şeması (Zora, 2010)

2.7 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Analiz Yöntemleri

2.7.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC)

1944 de uygulamaya giren ve düzlemsel yüzeyde ayırım sağlayan kağıt kromatografisinin yerini 1950'lerde rutin kromatografik teknik olarak ince tabaka kromatografisi almıştır. TLC tekniği ilk kez 1937 de İzmailov ve öğrencisi Shraiber tarafından bitki ekstraktlarının ayırımında "spot kromatografi" şeklinde kullanılmıştır. Modern anlamda TLC tekniği (cam pleyt üzerinde sabit faz kullanımı ve tanka daldırarak yürütmenin yapılması) ise ilk kez Kitchner tarafından kullanılmış ancak TLC'nin uluslararası kabul edilen analitik teknik haline gelmesi 1950'lerde Egon Stahl'ın çalışmaları ve bunları kitap halinde yayınlaması sonucu olmuştur. Daha sonraki yıllarda TLC ile ilgili cihazlar geliştirilmiş ve teknikler düzeltilmiştir (Fidancı, 2009).

Bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Sabit faz olarak sıklıkla katı adsorban (silika jel-SiO₂ veya alumina-Al₂O₃) kullanılırsa da (normal faz adsorbsiyon TLC) , lipofilik C-18,C-8,C-2 bağlı silika jel kullanılarak revers faz TLC de yapılabilir. Yine magnezyum silikat (Florasil), sellüloz, iyon değıştiriciler, poliamid, kimyasal olarak bağlanmış fenil, amino, siyano, diol tabakaları katı faz olarak kullanılabilir. Normal faz adsorbsiyon TLC'sinde (silika jel kromatografi) hareketli faz sıklıkla organik çözücü karışımıdır (Fidancı, 2009).

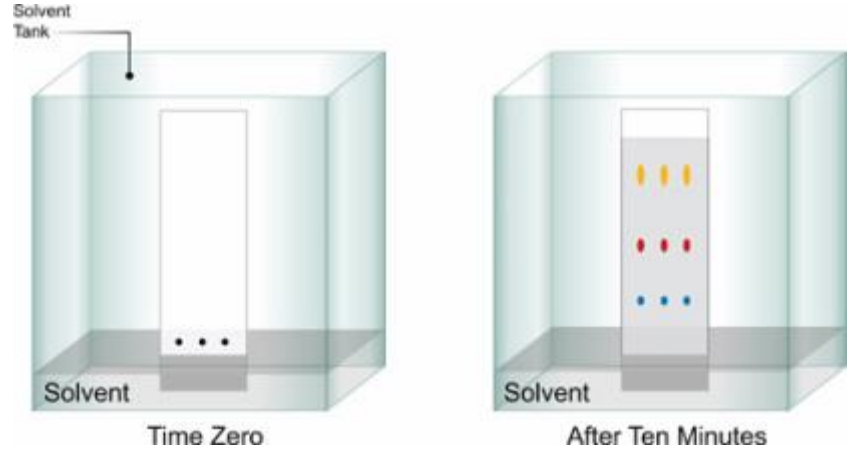
$$R_f = \frac{\text{Analitin ilerleme uzunluđu}}{\text{Çözücünün ilerleme uzunluđu}}$$

Maddelerin değişik çözücü ve katı yüzey üzerinde ilerleme oranı R_f değerleri farklı olmasından ayırma sağlanır.

TLC'nin avantajları arasında hızlı analiz süresi vardır, çünkü birçok örnek eş zamanlı olarak analiz edilebilir, numune başına bazda düşük çözücü kullanımı, enstrümantal TLC için yüksek doğruluk, hassasiyet, nanogram veya pikogram aralığında hassasiyet gibi avantajlara sahiptir. Radyoaktif maddelerin bağlanma verimlerine ve alıkonma faktörlerine yönelik yapılan uygulamalar için kullanılan yöntemine ince tabaka radyo kromatografisi denmektedir.

İnce tabaka kromatografisinde sabit faz (absorban) olarak silika jel ya da selüloz kaplı plakalar kullanılmaktadır. Bu plakalar genelde 0.1-5 mm kalınlığındadır. Hareketli faz olarak ise çeşitli solventler tek başına ya da belli oranlarda karıştırılarak kullanılmaktadır. İşlem sırasıyla şu şekilde gerçekleşir:

- Kromatografi tankına hareketli fazın konulur ve 15 dakika buhar dengesinin sağlanması beklenir.
- Uygun boyutlarda kesilen tabakalara 0,2 µL'lik bir kısmı mikro pipet ya da kapiler yardımıyla damlatılır ve tankın içerisine tabakaların dik bir şekilde bırakılır.
- Hareketli faz, örneği de sürükleyerek yükselmeye başlar. Hareketli faz başlangıç noktasından belli bir seviyeye yükseldikten sonra plaka tankın içerisinden çıkarılır.
- Tank içerisinden dikkatlice çıkarılan tabakalar, hareketli fazın yürümüş olduğu sınırdan işaretlenir ve kurumaya bırakılır. Daha sonra Bioscan 2000 TLRC tarayıcı yardımıyla analizi yapılarak bağlanma verimi ve R_f (Retention Factor) değerleri elde edilir (Yurt Kilcar ve Biber Muftuler, 2014).



Şekil 2.6 TLRC yönteminde küvetlere yerleştirilmesi (Science of chromatography, 2018)

2.7.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi, bir kromatografik ambalaj malzemesi (sabit faz) içeren bir kolondan yüksek basınçta bir çözücü (mobil faz olarak da bilinir) içinde bir çözücü veya analitin pompalandığı bir kolon kromatografisidir. Numune, helyum veya nitrojenin hareketli bir taşıyıcı gaz akımı tarafından taşınır. HPLC, herhangi bir örnekte mevcut olan ve trilyon başına parça kadar düşük eser konsantrasyonlarda bir sıvı içinde çözünebilen bileşikleri ayırma ve tanımlama yeteneğine sahiptir. Bu çok yönlülük nedeniyle, HPLC, farmasötik, çevresel, adli tıp ve kimyasallar gibi çeşitli endüstriyel ve bilimsel uygulamalarda kullanılmaktadır.

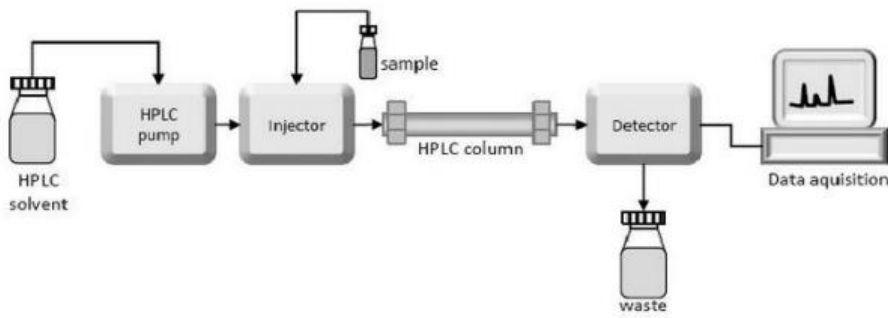
Numune tutma süresi, durağan faz, analiz edilen moleküller ve kullanılan çözücü veya çözücüler arasındaki etkileşime bağlı olarak değişecektir. Numune kolondan geçerken, esas olarak analitlerdeki farklı polariteler nedeniyle iki faz arasında farklı oranda etkileşir. Sabit fazla en az etkileşime sahip olan veya mobil faz ile en fazla etkileşim olan analitler, sütundan daha hızlı çıkacaktır.

Bir HPLC sistemindeki ana bileşenler arasında solvent rezervuarı veya birden fazla rezervuar, yüksek basınçlı pompa, kolon, enjektör sistemi ve detektör bulunur. Rezervuar hareket ettiği için hareketli faz olarak adlandırılan çözücü tutar. Bir sistemde genellikle en az iki rezervuar vardır, bunların her biri 1000 cc solvente tutunur ve genellikle helyumun kabarcıklandırılabilirdiği bir gaz difüzörü ile donatılmıştır. Mobil fazın belirli bir akışını üretmek için bir pompa kullanılır. Örneklerin manuel enjeksiyonu hala mümkün olmasına rağmen, çoğu HPLC, artık tamamen otomatik ve bilgisayar tarafından kontrol edilmektedir. Enjektör veya

otomatik örnekleyici, çözücüyü, numuneyi ayrımı gerçekleştirmek için gereken özel ambalaj malzemesini içeren yüksek basınca (400 bar'a kadar) taşıyan bir faz akımına sokar. Paketleme malzemesi, kolon donanımı tarafından yerinde tutulduğu için sabit faz olarak adlandırılır.

Dedektör, çalışma koşullarına göre seçilmektedir. Bunun için başlıca dedektör çeşitleri şu şekildedir:

- Ultraviyole/görünür bölge dedektörü (UV/VIS)
- Floresans Dedektörü (FLD)
- Refraktif indeks (kırılma indisi) dedektörü (RID)
- Kütle spektrometresi (MS) dedektörü
- Evaporatif ışık saçılması dedektörü
- Radyoakım dedektörü (radyoaktivite için)
- Fotodiyot array dedektörü (photodiode array dedector-DAD) (Huber, 1978).



Şekil 2.7 HPLC cihazının şematik diyagramı (Huber, 1978)

2.7.3 Lipofilite

Maddenin yağda çözünme eğiliminin ölçüsü; lipid /su partiyon katsayısı, yani lipofilitesidir. Maddenin lipid/su partiyon katsayısı ne kadar büyükse; lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur. Küçük, suda çözünür moleküller normal intraselüler su akışını sağlayan su porları (içi su dolu kanallar) aracılığı ile hücre membranını geçerler. Suda çözünür, büyük moleküller membranın lipid kısmından yavaş bir şekilde geçerler. Genellikle fazla iyonize olan maddelerin yağda çözünürlüğü azalır. Bu nedenle membrandan zor geçerler (Özyazgan, 2002).

Radyoışaretili bileşiklerin lipofilitesini belirlemek için, n-oktanol/su sisteminde alt ve üst faz oluşturulduktan sonra bu fazlardan alınan ayrı örneklerin aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile sayılır. Burdan elde edilen değerler ile deneysel lipofilite logP değeri hesaplanır. Teorik lipofiliteler ise ACD (Advanced Chemistry Development) programı ile bulunup, teorik ve deneysel lipofilite değerleri karşılaştırılır.

2.7.4 Stabilite

Stabilite çalışmaları bileşiğin in vivo kararlılığının tahmin edilmesi amacıyla yapılan bir çalışmadır. Çalışma serum kullanarak gerçekleştirilir. Çalışma farklı zaman dilimlerinde örneklemeler yapılarak 24 saatte sonlandırılır. Bu 24 saatlik süre boyunca serum ve kararlılığı araştırılan örnek karışımı 36-37 °C de tutulur (İçhedef, 2010).

2.8 Polimerin Özelliklerinin Belirlenmesinde Kullanılan Kromotografik Yöntemler

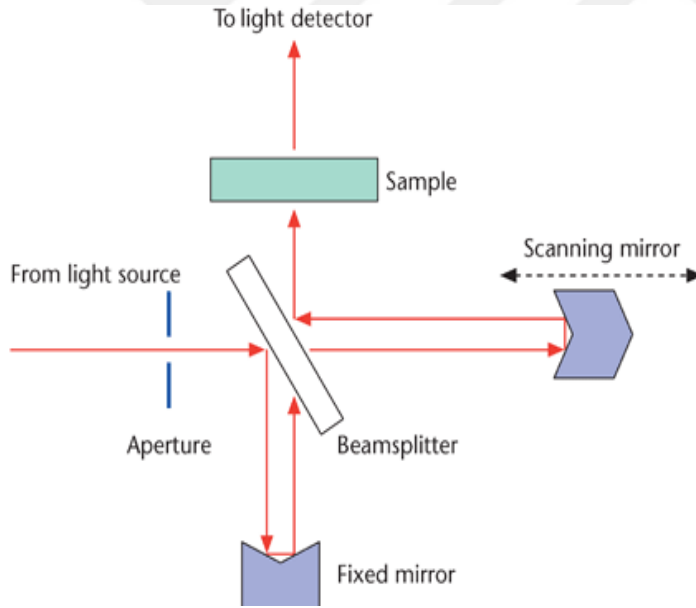
2.8.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Fourier Transform Infrared spektroskopisi bakterilerin incelenmesi amacıyla 1980'li yıllardan beri kullanılan fizikokimyasal bir yöntemdir. Bu yöntem, kızıl ötesi (IR) radyasyonun absorpsiyonu ile kimyasal bağların titreşiminin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Kızıl ötesi radyasyonu kimyasal bağların gerilme, bükülme ve bükülme gibi farklı titreşim hareketleri ile absorbe edilir. Kızıl ötesi bölgesinde kimyasal bağların titreşimlerdeki değişim ve absorpsiyon özellikleri spektral piklerin oluşmasını sağlar. Her fonksiyonel grup kendine özgü titreşim sıklığına sahiptir ve her kızıl ötesi ışık dizisi (spectrum) özgüdür.

FTIR matematiksel Fourier dönüşümü yöntemi ile ışığın infrared yoğunluğuna karşı dalga sayısını ölçen bir kimyasal analitik yöntemdir. Elektromanyetik ışık dizisinin kızıl ötesi bölgesi 14000 cm⁻¹ ile 10 cm⁻¹ arasındadır

ve yakın dalga boylu kızıl ötesi (NIR; $4000\sim 14000\text{ cm}^{-1}$), orta dalga boylu kızıl ötesi (MIR; $400\sim 4000\text{ cm}^{-1}$) ve uzak dalga boylu kızıl ötesi (FIR; $4\sim 400\text{ cm}^{-1}$) olmak üzere üç ana bölgeden oluşmaktadır (Başyigit Kılıç ve Karahan, 2010). Bunlar arasında en önemli spektral bölgeler tipik olarak parmak izi bölgesi ($600\sim 1.450\text{ cm}^{-1}$) ve amid I ve amid II (amid I / II) bölgesidir ($1,500\sim 1,700\text{ cm}^{-1}$). Daha yüksek dalga boylu bölgesi ($2,550\sim 3,500\text{ cm}^{-1}$) S-H, C-H, N-H ve O-H gibi esneme titreşimleri ile ilişkilidir, oysa alt-dalga sayı bölgeleri tipik olarak eğme ve karbon iskelet parmak izi titreşimlerine karşılık gelir (Baker et al., 2014).

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi incelenmek istenen örnek makromolekülleri fonksiyonel gruplarının titreşimlerinden kaynaklanan yapısal ve fonksiyonel bilgilerin elde edilmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu spektroskopik yöntem, boyama, işaretleme gibi ek maddelerin kullanımını içeren uzun örnek hazırlama prosedürlerine gerek duyulmadan, örneğe zarar vermeden hızlı, hassas ve etkin sonuçların göreceli olarak daha ucuz bir biçimde elde edilmesi sağlaması bakımından diğer tekniklerle karşılaştırıldığında daha avantajlıdır (Takan, 2014).



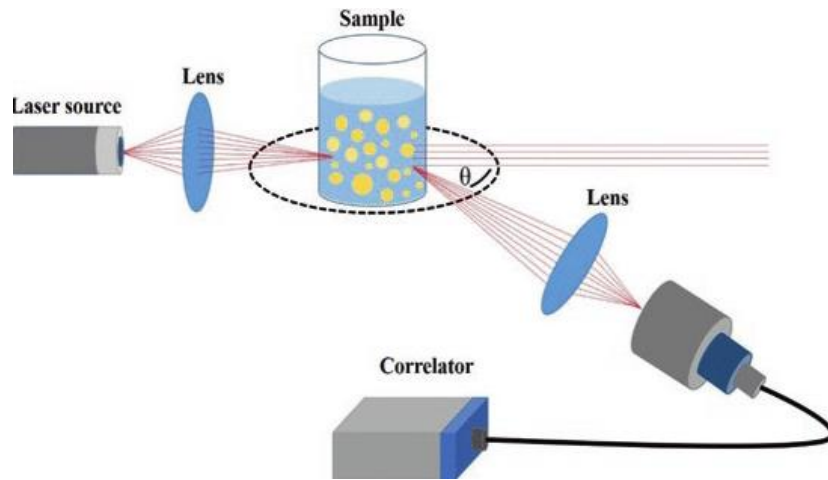
Şekil 2.8 FTIR Spektroskopisi Çalışma Prensibi (Gerwert et al., 2010)

2.8.2 Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Cihazı

Bir araç olarak dinamik ışık saçılımının kullanılması, 1914' te Leon Brillouin'in uyarılmış bir izotropik vücuttan saçılan ışık üzerine teorik bulgular yayınladığı zaman başladı. Bir sıvıdan saçılan ışıktaki frekans kaymalarının deneysel sonuçları, teorik tahminlerden kısa bir süre sonra takip edildi, ancak 1960' lı yıllarda lazerin küçük frekans değişikliklerinin ölçülmesine olanak sağlaması ve böylece katılar, jeller, membran kesecikleri ve kolloidal dispersiyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli sistemler için ışık saçılımının uygulanmasına yönelik bir itici güç sağlandı. (Williams, 1998).

Dinamik ışık saçılımı orijinal olarak seyreltik makromoleküller ve kritik noktaların yakınında saf maddelerin taşınım katsayıları ile translasyon difüzyonunu ölçmek için kullanılmıştır. Şu anda ise, dinamik ışık saçılımı endüstriyel parçacık büyüklüğü ve boyut dağılımı belirlemede kullanılmaktadır (Schmitz and Phillies, 1991).

Çoğu DLS sisteminde, bilinen dalga boyundaki bir lazer (yani HeNe), çözeltideki seyreltik bir numuneden geçmekte ve dağınık ışığın yoğunluğu, bir detektör tarafından toplanmakta ve dekonvol haline getirilmektedir. Şekil 2.8, bir DLS cihazının bir şemasını göstermektedir. Toplanan saçılmış ışığın miktarı, bir partikülün molekül ağırlığı, boyutu ve şeklinin yanı sıra partikül ve çözücünün kırılma indislerine bağlıdır. Dedektöre ulaşmadan önce, tek tek parçacıklardan gelen dağınık ışık, Brownian hareketinden ötürü rastgele hareket eden diğer parçacıklar tarafından yayılanlardan gelen paraziti deneyimliyor. Bu zaman içinde rastgele dalgalanmalara yol açar. Bu değişim, parçacıkların boyutu, dağılımı, şekli ve yapısı hakkında bilgi sağlar (Weber et. al., 1998; Wang et. al., 2010).



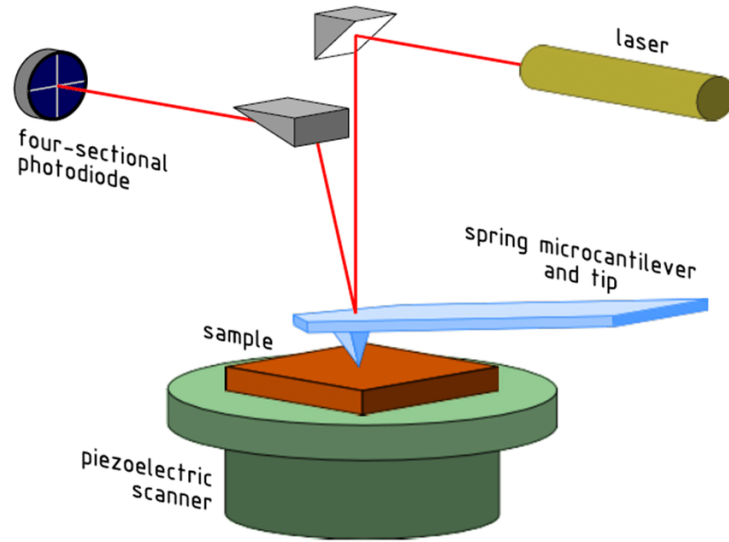
Şekil 2.9 DLS cihazı çalışma prensibi (Kumari, 2017)

2.8.3 Taramalı Uç Mikroskobu (SPM)

Nano ölçekteki atom ve moleküllerin manipülasyonuna yönelik faaliyetler, tarama sondası mikroskoplarının ultra yüksek vakumda kullanılmasıyla belirlenir. Tarama Probu Mikroskopisi (SPM), atomik seviyedeki yüzeylerin özelliklerini incelemek için kullanılan bir tekniktir. Görüntüleme için ışık dalgaları kullanan konvansiyonel mikroskopten farklı olarak, SPM pizoelektrik bir plaka üzerine yerleştirilen bir numunenin yüzeyini çok ince bir proba tarar ve uç ile yüzey arasındaki bazı etkileşimlerin gücünü izler. Bir lazer aracıyla probun sapması fotodiyot yardımıyla toplanır ve veriler bilgisayar programına aktarılır. Keskin prob ve yüzey arasındaki etkileşim, atom ölçeğinde yüzeyin topografik 3D görüntüsünü sağlar. Şekil 2.10'da SPM çalışma prensibi verilmiştir.

Taramalı uç mikroskobu (SPM), tarama tünelleme mikroskobu (STM) ve atomik kuvvet mikroskobu (AFM) fizik, malzeme bilimi ve mühendislik alanlarında oldukça sık kullanılmaktadır. SPM çalışmalarının biyoloji ve biyoteknolojideki bu hızlı genişlemesi, SPM tekniklerinin birçok benzersiz avantaj sağladığı gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Öncelikle çok az ya da hiç numune hazırlama gerektirmemektedir, doğal biyomoleküller genellikle doğrudan görüntülenmektedir. Diğer bir avantajı ise ultra yüksek çözünürlükte gerçek yüzeyde örnek yüzeyinin üç boyutlu bir yeniden yapılandırılmasını sağlayabilmekte ve diğer analitik ve mikroskopi yöntemleri ile elde edilen bilgilere tamamlayıcı bilgiler sunmabilmektedir. Hava, sıvı ve vakum dahil olmak üzere çeşitli ortamlarda çalışabilirler (You and Lowe, 1996).

SPM'nin önemli bir yönü, yüzeyleri değiştirme olanağıdır. Tarama ucu, yüzeyler boyunca atomları, molekülleri veya parçacıkları itmek veya çekmek için kullanılabilir. Bu deneyler, yerel bağlanma hakkında bilgi verir ve sürtünme ve aşınma mekanizmalarını araştırmaktadır. Temasların uygunluğu ile ilgili olan iki farklı rejim gözlemlenmiştir. Çok sayıda partikülün manipülasyonu, partiküllerin boyut ve şekillerine de erişebilme imkanı bulunmaktadır (Meyer, 2010).



Şekil 2.10 SPM Çalışma Prensibi (Riout, 2015)

2.9 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü, çok hücreli organizmalara ait hücrelerin, laboratuvar ortamında özel olarak tasarlanmış kaplarda, ısı, nem, besin gibi ortam şartlarının kontrol edilerek kontaminasyondan arı bir şekilde yaşatılmasıdır. İnsan da dâhil olmak üzere herhangi bir canlıdan alınan hücrelerin suni ortamda yaşatılabilmesi, herhangi bir doku ya da organdan alınan hücrelerin kullanılabilmesi ve birçok etik kaygıyı gidermesi, hücre kültürü çalışmalarının tercih sebepleri arasında yer almaktadır (Zucco et al., 1998). Hücre kültürünün sıkça tercih edildiği alanlar kanser, aşı çalışmaları, ilaç geliştirilmesi ve in vitro sitotoksiste çalışmalarıdır (Gilbert and Boutros, 2016).

Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılır. Ölçüm performansı için, tekrarlanabilirlik başarısı için ya da çalışmalarda karşılaştırma yapmak için hücre popülasyonlarının miktarlarının anlamlı bir şekilde belirlenmesine ihtiyaç vardır. Bu nedenle hücre popülasyonlarında hücre canlılığı ve proliferasyonlarını çalışabilmek için bazı metodlar geliştirilmiştir. Genel olarak direkt hücre sayımında canlı ve cansız hücreleri ayırt etmek için genellikle hemositometre ile birlikte vital bir boya (trypan blue) kullanılır. Bununla birlikte tüm vital boyalar öznel ve kesin değerler alamazlar. Bu metod kolay, çabuk ve ucuzdur ve toplam hücre süspansiyonundan sadece küçük fraksiyonlar gerektirir (Tokur ve Aksoy, 2017).

Sitotoksiste testleri çeşitli hücre kültürlerinde kullanılan kimyasal bileşiklerin toksisitesini belirlemek için kullanılan in vitro metotlardır. In vitro sitotoksiste testlerinin tahmin edilen değeri “bazal” sitotoksiste fikrine

dayanmaktadır. Toksik kimyasallar hücrelerin temel fonksiyonlarını etkilerler ve bu toksisite hücrel hasarın değerlendirilmesiyle ölçülebilir. In vitro sitotoksosite testlerinin gelişimi çok sayıdaki bileşiğin potansiyel toksisitesini hızlı bir şekilde ölçme gerekliliğinden ortaya çıkmıştır. Ölü hücreler, çeşitli tetrazolyum tuzlarını metabolize etme yeteneğine sahip değildirler. Hücrelerin metabolik aktiviteleri azaldığında, hücrel hasar ve ölümün çok geç basamaklarında, MTT, XTT ve WST-1 gibi çeşitli kolorimetrik metotlar kullanılmaktadır. Kolorimetrik metotların, hücre kültürlerinde, herhangi bir faktöre bağlı, indüklenmiş sitotoksosite kantasyonunda 24-96 saatlik döngüde çok etkili oldukları bilinmektedir. Hücre - aracılı sitotoksositeyi ölçmede efektör hücreler, hedef hücrelere bağlanarak aktive olmaktadır. Bu aktivasyon, efektör hücre tarafından oluşturulan, formazan üretiminde artış ile sonuçlanmaktadır. Bu da, hedef hücre ölümünden kaynaklanan, azalmış formazani maskeleyen hedeflemektedir (Numanoğlu, 2008). Hücre proliferasyon reaktifi WST-1, hücre proliferasyonu, büyüme, canlılık ve kemosenitivitenin radyoaktif olmayan, spektrofotometrik ölçümü için kullanılmak üzere tasarlanmıştır. MTT ve XTT'den daha hassastır, hücre tahribatı yapmaz (Kalkan, 2016).

Analiz, tetrazolyum tuzlarının formazana hücrel enzimlerle bölünmesine dayanır. Canlı hücrelerin sayısında bir genişleme mitokondriyal dehidrojenazların genel aktivitesinde bir artışa neden olur ve formazanın oluşumu, metabolik aktif hücrelerin sayısı ile doğru orantılıdır. Tetrazolyum bileşikleri ile yapılan canlılık testleri, üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk aşamada hücreler belirli bir süre toksik maddeye maruz bırakılırlar. İkinci aşamada toksik madde uzaklaştırılıp tetrazolyum bileşiği vasata eklenir ve ortalama 1-4 saat boyunca inkübe edilir. Bu esnada canlı hücreler ilgili bileşikleri indirgeyip formazana dönüştürerek renk değişimini gerçekleştirir. Son aşamada ise renk değişimi spektrofotometrik yöntemle ölçülerek canlı/ölü hücre sayısı belirlenir (Tokur ve Aksoy, 2017).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

3.1.2 Kullanılan Kimyasallar

- Serum Fizyolojik (SF) (%0.9 NaCl)
- Sodyum Perteknetat ($\text{Na } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)
- Piridin ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$) (Sigma-Aldrich)
- Fosfat tamponu (PBS) (Merck)
- N-oktanol ($\text{C}_8\text{H}_{18}\text{O}$) (Merck)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- Asetik asit (CH_3COOH) (Merck)
- Aseton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) (Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Amonyak (NH_3) (Merck)
- Dimetilsülfoksit ($\text{CH}_3)_2\text{SO}$ (Merck)
- Etanolamin ($\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}$)
- Dioksan ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$) (Merck)
- Glisidol (Sigma Aldrich)

- Trimetilpropan ($C_6H_{14}O_3$)
- Potasyum Metilat (Sigma-Aldrich)
- Dowex 50Wx8 katyon reçine (Sigma-Aldrich)
- 2-Merkapto etanol (C_2H_6OS) (Fluka)
- N-hidroksisüksinimid % 98 (NHS) (Sigma-Aldrich)
- N,N'-Diizopropilkarbodiimit ($C_7H_{14}N_2$) (Sigma Aldrich)
- Dimetilaminopiridin ($C_7H_{10}N_2$) (Sigma-Aldrich)
- Indocyanine green (ICG) (Sigma-Aldrich)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- MES tamponu (%99) (Sigma Aldrich)
- Deferoxamin-mesilat ($C_{25}H_{48}N_6O_8$) (Sigma Aldrich)
- ITLC-SG Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck)
- Sintilasyon kokteyli (Sigma Aldrich)
- Cell Counting Kit - 8 (WST-8) (Sigma Aldrich)
- L-Glutamine (Lonza)
- Penisilin/streptomisin (Lonza)
- Essential amino acid (Lonza)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Hücre kültürü medium RPMI 1640 (Bio. Ind.)
- Sodyum prüvat (Lonza)

- Tripan mavisi (Bio. Ind)
- K562 insan myeloid lösemi hücresi (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- RadyoTLC (Bioscan 2000) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetleri (Sigma) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Banyo (CEIA CP104 Standard Ultrasonic Cleaner) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Doz Kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Liyofilizasyon Cihazı (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Bilimler 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)
- CO₂ inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- Işıık mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC (Shimadzu SCL-10AVP) (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- DLS (Dynamic Light Scattering) (Malvern Nano-ZS) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Fourier Transform Infrared Spektrofotometre (FT-IR) Cihazı (Perkin-Elmer Spectrum 100 FT-IR) (E.Ü, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Teknoloji Anabilim Dalı)

3.2 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol) Sentezi

Anyonik halka açılı çok yönlü yöntem kullanılarak, glisidolün polimerizasyonu HPG sentezi gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon, mekanik karıştırıcı ile 3 boyunlu balonda gerçekleştirilmiştir. Bir boyundan reaktif girişi, diğer boyundan azot gazı geçişi ve sıcaklık ölçümü yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 HPG Sentez Düzeneği

0,187g TMP (Trimetilpropan) gaz altında balona eklendi. %20'lik potasyum metilat çözeltisi hazırlanıp balona ilave edilip, karışım 15 dakika manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Ardından 20 mL susuz dioxane ilave edilmiştir. Karışım, sıcaklık 95°C'ye gelene kadar yağ banyosunda tutulmuştur. Şırınga pompası ile 25 mL glisidol 8 saat boyunca damla damla ilave edilmiş ve karışım gece boyu karıştırıcıda karıştırılmıştır. Nötralizasyon işlemi için 3 adet Dowex 50Wx8 katyon değişim reçinesi içeren 5mL'lik enjektör hazırlanıp, örnek metanolde çözüldükten sonra Şekil 3.2' deki gibi reçineden geçirilerek nötralize edilmiştir.



Şekil 3.2 Nötralizasyon İşlemi

Aseton eklenerek çökmesi beklenen karışım yaklaşık 5 saat karıştırılmıştır. Metanol içindeki çözülmüş HPG çökmediği için; ısıtıcı açılıp metanol ve asetonun uçması sağlanmıştır. Metanol ve aseton uçtuktan sonra, beherin çeperlerindeki çökelti metanolde çözdürülüp oda sıcaklığında bekletilmiştir.

Polimerin diyalizi için, selüloz asetat diyaliz tüpü kullanılarak 3 gün boyunca suya karşı işlem gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.3). Diyaliz işlemi tamamlanan örnek donması için -20°C 'de gece boyu bekletilmiştir. Donan örnek vakumla kurutulmak üzere liyofilizatöre koyulmuş ve kuru polimer elde edilene kadar liyofilizatörde 6 gün bekletilmiştir (Kainthan et al., 2006).



Şekil 3.3 Diyaliz İşlemi

3.3 HPG' nin Süksinidimil Süksinat ile Fonksiyonlaştırılması

Polimerler süksinik anhidrit ile COOH asit fonksiyonlaştırılmak üzere; ilk olarak Bölüm 3.2' de sentezlenen liyofilize HPG 45 mL metanolde çözüldürülmüştür. 250 mL yuvarlak dipli balonda 90 °C'de azot gazı altında kurutulmaya bırakılmıştır (6 saat boyunca). Kurutulmuş HPG 3 mL kuru piridinde çözüldükten sonra kataliz için yetecek miktarda dimetilaminopiridin (5 mg/ml piridin çözeltisinde 1 damla) ilave edilmiştir. Bu karışıma 0,5 mL piridinde çözülmüş 0,0067 g süksinik anhidrit 10 dakika içinde damla damla eklenmiş ve karışım oda sıcaklığında, aynı zamanda azot gazı geçirilerek karışıma bırakılmıştır (6 saat boyunca). Polimer çözeltisine 40 mL soğuk aseton ilave edildikten sonra homojen karışım elde etmek için ultrasonik banyoya konulmuştur. 50 mL falconda 15 dakika 10000 rpm'de santrifüjlenerek çöktürülmüştür. Aseton dekante edilip geri kalan aseton azot ile uçurularak uzaklaştırılmıştır. Karboksi gruplarını SS grupları ile aktive etmek için 3 mL susuz DMF (Dimetilformamid) de çözülmüştür. 0,0077 g N-hidroksisüksinimid ve 10 µL diizopropilkarbodiimid çözeltiye eklenmiş ve azot gazı geçirilerek 5 saat boyunca karışıma bırakılmıştır (Chapanian et. al., 2012) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 Fonksiyonlaştırılmış HPG

3.4 HPG' ye ICG (Indosiyenin Yeşili) Bağlanması

Bu işlem için öncelikle 1mg/mL ICG sulu çözeltisi hazırlanmıştır. 4 mg SS-HPG maddesine 40 μ L ICG sulu çözeltisi eklenip manyetik karıştırıcı yardımıyla 6 saat boyunca karıştırılmıştır. Bağlanmamış ICG molekülü 10000 rpm'de 10 dakika boyunca ultrasantrifüjleme ile uzaklaştırılmıştır. Bağlanmayan kısım ayrılıp geri kalan çözelti saf su ile yıkanmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmış ve bağlanan kısım için 3 örnek alınmıştır. Bağlanma verimini tespit etmek amacıyla Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) cihazı ile örneklerin adsorbans değerleri ölçülmüştür.

3.5 HPG' nin Deferoxamin ile Şelatlanması

Şelatasyon işlemi için deferoxamin-mesilat kullanılmıştır. 4 mg HPG-COOH-ICG maddesi için 4 mg DFO (Deferoxamin) kullanılmıştır. Bu karışımın üzerine 0,007 g EDC (1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil)-Karbodiimid) 0,0115 g NHS(N-Hidroksisüknimid) eklenip ve 15 dakika oda sıcaklığında manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır.

Karışım sonunda 1,4 µL merkaptoetanol, 0,40 g MES tamponu ve 0,058 g NaCl karışıma ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti PBS (fosfat tamponu) ile 2 mL'ye tamamlanmış ve 2 saat oda sıcaklığında karışmaya bırakılmıştır.

Çözeltiyeye 10000 rpm' de 10 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Oluşan üst faz dekante edilip PBS ile yıkanmış ve bu işlem 2 kez tekrar edilmiştir.

Sonuçta oluşan çökelti 10 mL metanolde çözülmüştür. Karakterizasyon ve kalite kontrol işlemleri için bu çözelti kullanılmıştır.

3.6 Sentelenen HPG' nin Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1 FTIR ile Yapı Analizi

HPG, SS-HPG ve HPG-ICG-DFO Perkin-Elmer Spectrum Two IR spektrofotometresi (ATR (Attenuated Total Reflection) ile yapı analizleri gerçekleştirilmiştir. Analiz sonuçları yorumlanarak sentezlenen maddeler literatür bilgileriyle karşılaştırılmıştır.

3.6.2 DLS ile Boyut Analizi

HPG, SS-HPG ve HPG-ICG-DFO' nun parçacık boyutu analizi için, katı formda olan 1 mg HPG ve SS-HPG örnekleri 2 mL metanolde çözülmüştür. Ardından hazırlanan çözeltilerden ve metanolde çözünmüş halde olan HPG-ICG-DFO örneğinden 600 µL ölçüm yapılacak küvet içerisine alınmıştır. Analiz, 3 tekrarlı olarak Malvern Nano-ZS DLS (Dynamic Light Scattering) cihazı ile incelenmiştir.

3.6.3 SPM ile Yüzey Analizi

Yüzey modifikasyonun belirlenmesi için; HPG ve HPG-ICG-DFO örneklerinden 1 mg alınarak 2 mL metanolde çözülmüştür. Bu örneklerden analiz için 100 µL mikroskop camına hazırlanmıştır. Analiz, Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Arş Merkezi (MATAL) bünyesinde gerçekleştirilmiştir.

HPG-ICG-DFO maddesinin kan hücrelerindeki görüntüsünü almak için, hücre kültür ortamında çoğaltılan K562 hücre süspansiyonundan 100 µL alınmıştır. 5 µg/mL HPG-ICG-DFO çözeltisi ile karıştırılıp mikroskop camına damlatılmış ve analiz için kurutulmuştur. Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uyg. ve Arş Merkezi bünyesinde SPM (BRUKER Dimension Edge with ScanAsyst) cihazı ile analizi gerçekleştirilmiştir.

3.6.4 HPLC Analizi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Shimadzu SCL-10AVP) kullanılarak sentezlenen HPG'nin molekül ağırlığı tayini yapılmıştır. HPG 1 mg / 2mL metanol olacak şekilde çözelti hazırlanmıştır. Otomatik örnekleyci yardımıyla kolona 10 µL örnek enjekte edilerek analizi yapılmıştır. PSS Proteema analytical 100 A, 8x300 mm, 5 µm kolon ve refraktif index (RI) dedektörü kullanılmıştır. Mobil faz için 0,1M 1L KNO₃ çözeltisi hazırlanmıştır (Ye et. al., 2011). İki enjeksiyon yapılmış ve ikisinde de uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Analiz koşulları Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 HPLC Çalışma Koşulları

| | |
|-------------------|--|
| Kolon | PSS Proteema analytical 100 A, 8x300 mm, 5 µm |
| Mobil Faz | 0.1 M KNO ₃ |
| Akış Hızı | 0.8 mL/dk |
| Dedektör | Refraktif İndex (RI) |
| Sıcaklık | 40°C |
| Enjeksiyon Süresi | 30 dk |
| Enjeksiyon Hacmi | 10 µL |
| Basınç | 53 bar |

Kalibrasyon eğrisinin çizilmesi için gerekli olan protein standartları belirlenmiş ve bunun için 44000, 35000, 17600 ve 12000 molekül ağırlıklarına sahip proteinler seçilmiştir. Enjeksiyon için her bir proteinden, 1 mg / 2 mL ultra saf su çözeltileri hazırlanmıştır. Protein kalibrasyonu HPLC analizi çalışma koşulları Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Protein Kalibrasyonu HPLC Koşulları

| | |
|-------------------|------------------------|
| Mobil faz | 0.1 M KNO ₃ |
| Akış Hızı | 0.8 mL/dk |
| Enjeksiyon Süresi | 30 dk |
| Enjeksiyon Hacmi | 50 µL |
| Sıcaklık | 40°C |
| Dedektör | Refraktif İndex (RI) |
| Basınç | 53 bar |

3.7 ^{99m}Tc ile Radyoişaretleme

10 mg SnCl₂ tartılıp, 1 mL 10⁻³ M HCl ile vortekste çözünmesi sağlanmıştır. Bölüm 3.5' de hazırlanan örnekten 100 µL alınmış ve 50 µL SnCl₂ çözeltisi ile karıştırılmıştır. 0,1 M NH₃ sulu çözeltisi ile pH 7'ye ayarlanmıştır. Aktivitesi 1 mCi olacak şekilde ^{99m}Tc, indirgenmiş [^{99m}TcO₄]⁻ ve HPG'nin bulunduğu ependorflara eklenmiştir. Süspansiyon oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında SF (20 mL) ve piridin-asetik asit-su (3:5:1,5) banyoları hazırlanmıştır. İnkübasyon işleminden sonra radyoaktif örneklerden mikro pipet yardımıyla 2'şer µL alınıp şeritler halinde kesilmiş (0.1-5 mm) selüloz TLC kağıtlarının uygulama noktasına tek seferde damlatılmış ve TLRC banyo çözeltilerini içeren tanklara yerleştirilmiştir. Tanklardan çıkarılan ve kurutulan örneklerin olası kontaminasyonunu önlemek için dış yüzeyi yapışkan bir bantla kaplanmıştır. Reaksiyon sonrası radyokimyasal saflık, ince tabaka radyokromatografisi ve yüksek performanslı sıvı radyokromatografisi kalite kontrol yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir. TLC Scanner (Bioscan AR2000) cihazında ölçümler yapılmıştır.

3.8 Radyoişaretili Örneklerin Kalite Kontrol İşlemleri

3.8.1 İnce Sıvı Radyokromatografisi (TLRC)

Bölüm 3.7' de hazırlanan radyoişaretili örneklerin TLRC ile kalite kontrolünde sabit faz olarak ITLC-SG selüloz kaplı plastik şeritler 1x10 cm' lik şeritler halinde kesilmiştir. Hazırlanan şeritlerin başlangıç noktasından 0.5 cm üzerine mikropipet ile (2 µL) örnekler damlatılıp, kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan TLC kağıtları, içerisinde 20 mL SF çözeltisi bulunan tanklara yerleştirilmiştir. Çözgen yaklaşık 8-9 cm ilerledikten sonra şeritler çıkarılıp yürüme mesafeleri işaretlenip oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Muhtemel kontaminasyonları önlemek amacıyla TLC kâğıtlarının her iki yüzeyi şeffaf bantla kaplanmıştır. Radyokromatogramlar Bioscan-AR2000 cihazı ile alınmıştır. Kromatogramlardan yararlanarak ^{99m}Tc(HPG-ICG-DFO) örneğinin taşıdığı Rf değerleri ve işaretleme verimleri belirlenmiştir.

3.8.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi cihazında GPC (Gel Permeation Chromotography) kolonu kullanılarak [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] ile işaretlenmiş HPG-ICG-DFO örneğinin analizi yapılmıştır. İşaretli örnekler, Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde hazırlanmış ve 30 dakika inkübasyondan sonra otomatik örnekleme yardımıyla kolona 60 μL enjekte edilerek analizi yapılmıştır. Aynı koşullarda [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] ve indirgenmiş ^{99m}Tc ve inaktif HPG-ICG-DFO örneklerinin analizleri yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlar karşılaştırılıp yorumlanmıştır. PSS Proteema analytical 100 A, 8x300 mm, 5 μm kolon, refraktif index (RI), UV ve AD2 dedektörleri kullanılmıştır. Mobil faz için 0,1M 1L KNO_3 çözeltisi hazırlanmıştır. Analiz koşulları Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3 ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneği için HPLC koşulları

| | |
|-------------------|--|
| Kolon | PSS Proteema analytical 100 A, 8x300 mm, 5 μm |
| Mobil Faz | 0.1 M KNO_3 |
| Akış Hızı | 0.8 mL/dk |
| Dedektör | Refraktif İndex (RI), UV, AD2 |
| Sıcaklık | 40°C |
| Enjeksiyon Süresi | 60 dk |
| Enjeksiyon Hacmi | 60 μL |
| Basınç | 53 bar |

3.8.3 Lipofilite

[$^{99m}\text{TcO}_4^-$] ile işaretlenmiş HPG-ICG-DFO örneğinin lipofilite tayini n-oktanol/su sisteminde gerçekleştirilmiştir. Bunun için 3mL n-oktanol, 3 mL su bulunan tüpe 50 μL işaretli örnek eklenmiş ve 5 dakika oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra 2500 rpm'de 30 dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. Santrifüj sonrasında alt faz (su) ve üst fazdan (oktanol) 500 μL ayrı ependorflara alınıp aktiviteleri Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayılmıştır. noktanol'ün su'ya oranı ile log P (log (noktanol/su)) değerleri hesaplanmıştır. Bu işlem her bir örnek için 3 kez tekrar edilmiştir.

3.8.4 Stabilite

Bu çalışma [$^{99m}\text{TcO}_4$] ile işaretlenmiş HPG-ICG-DFO örneğinin stabilitesini tespit etmek amacıyla yapılmıştır. Bölüm 3.7' de anlatıldığı şekilde işaretlenen örneğin 0, 60, 120, 240, 720. dakikalarda işaretli örneklerin işaretleme verimi SF (20 mL) banyo çözeltisi kullanılarak ince tabaka kromatografisi (TLRC) ile tespit edilmiştir.

3.9 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1 K562 Kan hücrelerinin Hazırlanması

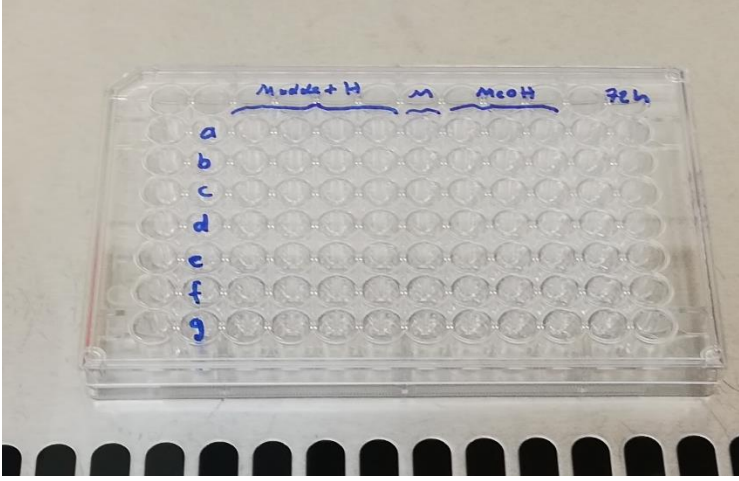
K562 hücreleri için, %10 fetal bovine serumu (%10 FBS), %1 L-glutamin, %1 penisilin streptomisin, %1 sodyum prüvat, %1 nonesansiyel aminoasit içeren RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra çalışma grubu oluşturulmuştur.

3.9.2 Sitotoksisite Çalışması

HPG polimerinin sitotoksisite çalışmaları K526 kan hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Bu çalışma için öncelikle % canlılık değerleri WST testi ile kolorimetrik olarak belirlenmiştir. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrolatelerde her bir kuyucuğa 1×10^4 hücre/mL olarak hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 μl hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara 7 farklı konsantrasyonda (500 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$) HPG - metanol çözeltisi eklenmiştir. Negatif kontrol olarak madde içermeyen metanol çözgeni kullanılmıştır. (Şekil 3.5)



Şekil 3.5 Sitotoksosite çalışması için hazırlanan 96'lık plate

Hücreler 37°C % 5 CO₂ ortamında 24, 48 ve 72. saate kadar inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda hücreler Soğutmalı Santrifüj (Hettich) yardımıyla 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda besiyer içeren üst faz atılmış ve her kuyucuğa 100 µL besiyer, 10 µL WST solüsyonu eklenmiştir. 4 saat inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okunmuştur. Aşağıdaki formülden öncelikli her kuyucuğun net absorbans değeri bulunmuş, bu değerler kullanılarak %canlılık hesaplanmıştır.

Her kuyucuğa ait Nod = od 450nm – od 690nm

%Canlılık = [Örneğin bulunduğu kuyuların Nod × 100] / Kontrol kuyularının Nod

3.9.3 İnkorporasyon Çalışması

^{99m}Tc(HPG-ICG-DFO) örneğinin hücreler üzerindeki bağlanma düzeylerini belirlemek amacıyla K-562 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yeteri kadar çoğalmasından sonra hücreler 24'lük plakalara alınmıştır. Çalışmada incelenecek zaman parametreleri 1. saat, 2. saat, 4. saat ve 6.saat olarak belirlenmiştir.

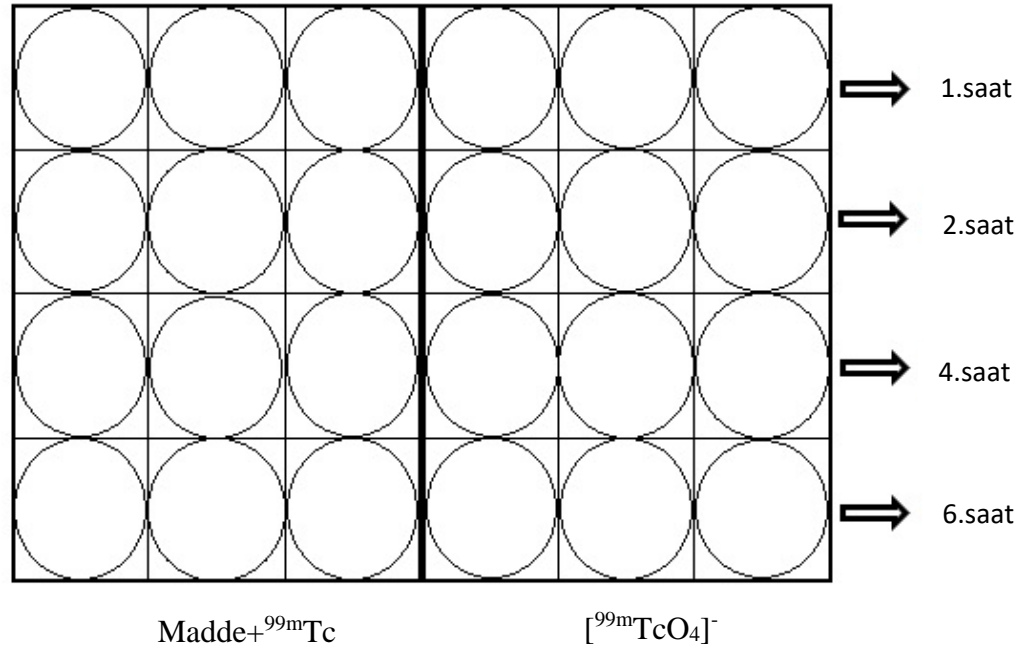
Bölüm 3.5' te hazırlanan HPG çözeltisinden 240 µL iki ayrı ependorfa alınarak inkorporasyon çalışması için iki örnek hazırlanmıştır. Bu örnekler aktivitesi 2,5 mCi olacak şekilde [^{99m}TcO₄]⁻ ile işaretlenmiş ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. İşaretli örnekler 6 mL besiyer ile [^{99m}TcO₄]⁻ ise 4mL besiyer ile karıştırılmıştır.

Kuyucuklardaki ölü hücreleri uzaklaştırmak için öncelikle soğutmalı santrifüjde 5 dakika 2500 rpm' de santrifüj işlemi uygulanmıştır. İşlem sonrasında

her bir kuyucuk fosfat tampon çözeltisi (PBS) ile 2'şer kez yıkanmıştır. Son yıkamanın ardından her bir kuyucuğa 0,5 mL $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ işaretli örnekleri içeren besiyerler ilave edilip, 37°C de inkübe edilmiştir. Bileşiğin etkisini incelemek amacıyla, aynı prosedür sadece $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ kullanılarak da gerçekleştirilmiş ve elde edilen veriler $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ kontrol grubu ile değerlendirilmiştir. Her bir kuyucuğa 0,5 mL $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ içeren besiyerler eklenmiştir (Şekil 3.6).

1. saat, 2. saat, 4. saat ve 6. saatlerde, sırasıyla 10000 rpm' de 3' er dakika santrifüj işlemi uygulanmıştır. İşlem sonucunda hücreler üzerindeki $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ işaretli örnekleri içeren besiyerler atıldı ve hücreler PBS ile 2' şer kez yıkanmıştır. Son yıkama sonrasında her bir kuyucuğa 100'er μL Ripa tampon çözeltisi eklenmiştir.

$[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ işaretli örneklerin hücrelerdeki tutulumunu tespit etmek için, her bir kuyucuktaki hücre süspansiyonundan 100'er μL alınarak endorflara konulmuştur. Eendorflara 900'er μL sintilasyon sıvısı eklendikten sonra radyoşaretli örnekler, Packord Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacında sayılmıştır.

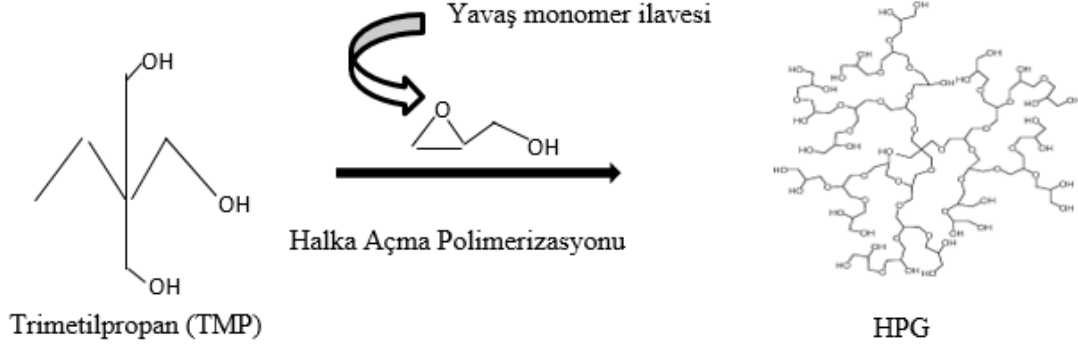


Şekil 3.6 K562 hücrelerinin inkorporasyon deneyinde 24' lük plate gösterimi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Polimerik Nanoparçacık Sentez Basamakları

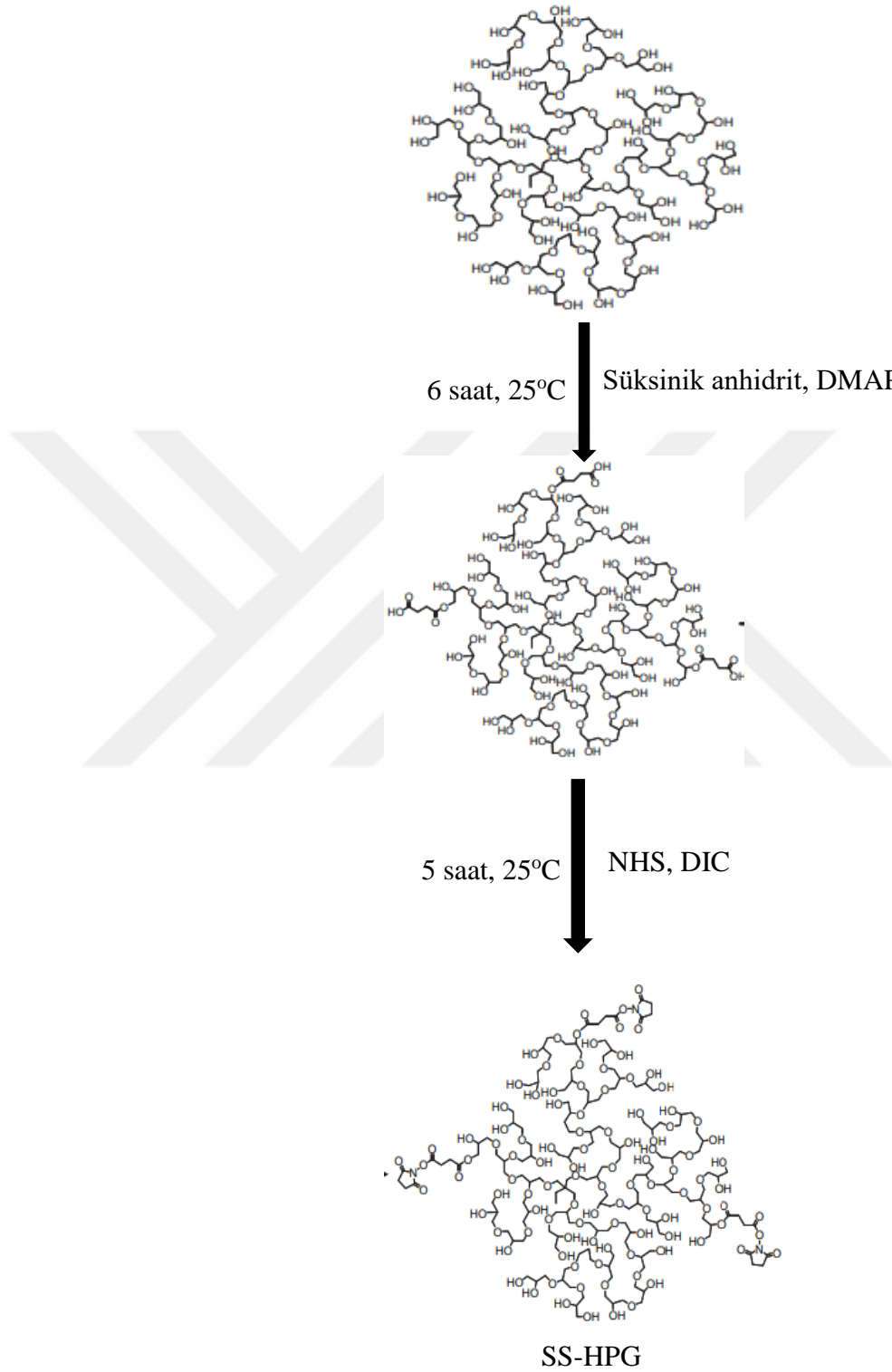
4.1.1 HPG (Hiperdallanmış Poligliserol) Sentezi



Şekil 4.1 Halka Açma Polimerizasyonu ile HPG Sentezi

HPG anyonik halka açma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. HPG, Şekil 4.1 'de verilen mekanizmayla Shen et al., (2017); Kainthan et al., (2006); Wilms et al., (2008) tarafından da farklı amaçlar için sentezlenmiştir. Bu çalışmada HPG' ye floresans görüntüleme için ICG floresan boya bağlanmış, aynı zamanda radyoışaretleme için deferoxamin ile şelatlanmıştır.

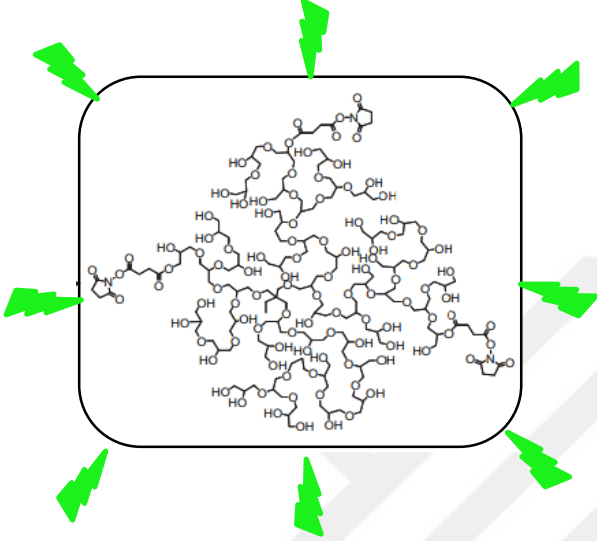
4.1.2 HPG' nin Süksinidimil Süksinat ile Fonksiyonlaştırılması



Şekil 4.2 SS ile fonksiyonlaştırılmış HPG

HPG'nin OH gruplarının NH_2 fonksiyonel grupları olan DFO ile konjugasyonu için süksinik anhidrit ile Şekil 4.2'de verilen reaksiyon mekanizması ile karboksi fonksiyonel hale getirilmiştir. Bu yöntem, Chapanian et al., (2012); Rossi et al., (2010) tarafından da farklı uygulamalarda kullanılmak üzere sentezlenmiştir.

4.1.3 HPG' ye ICG Bağlanması

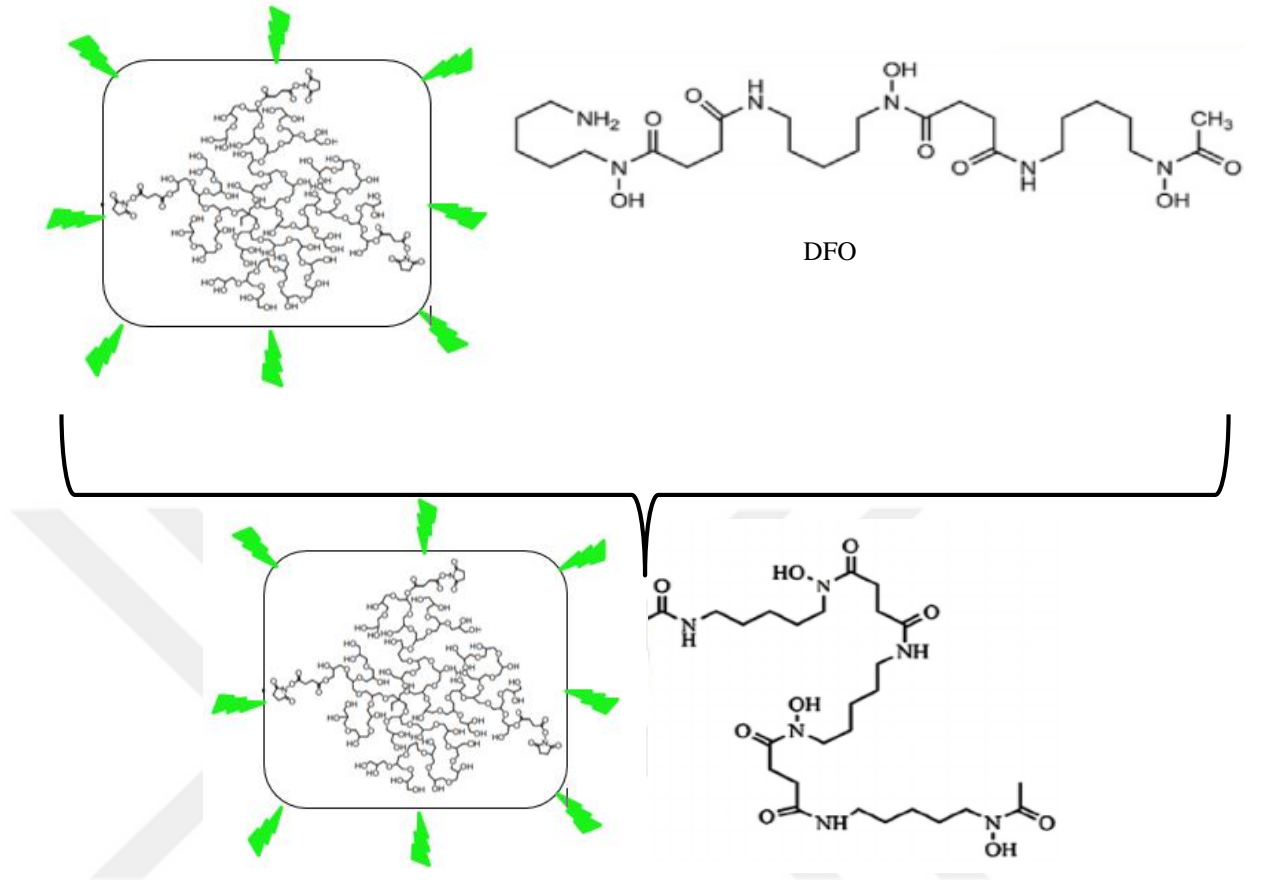


Şekil 4.3 ICG ile optik işaretlemiş SS-HPG

Sentezlenen HPG' ye floresan özellik kazandırmak amacıyla floresan boya olan indosiyanin yeşili (ICG) HPG' ye Şekil 4.3'te görüldüğü gibi bağlanmıştır.

Yapılan bu sentez yöntemi, Ma et al., (2013), Saxena et al., (2005) tarafından da değişik amaçlarda kullanılmıştır.

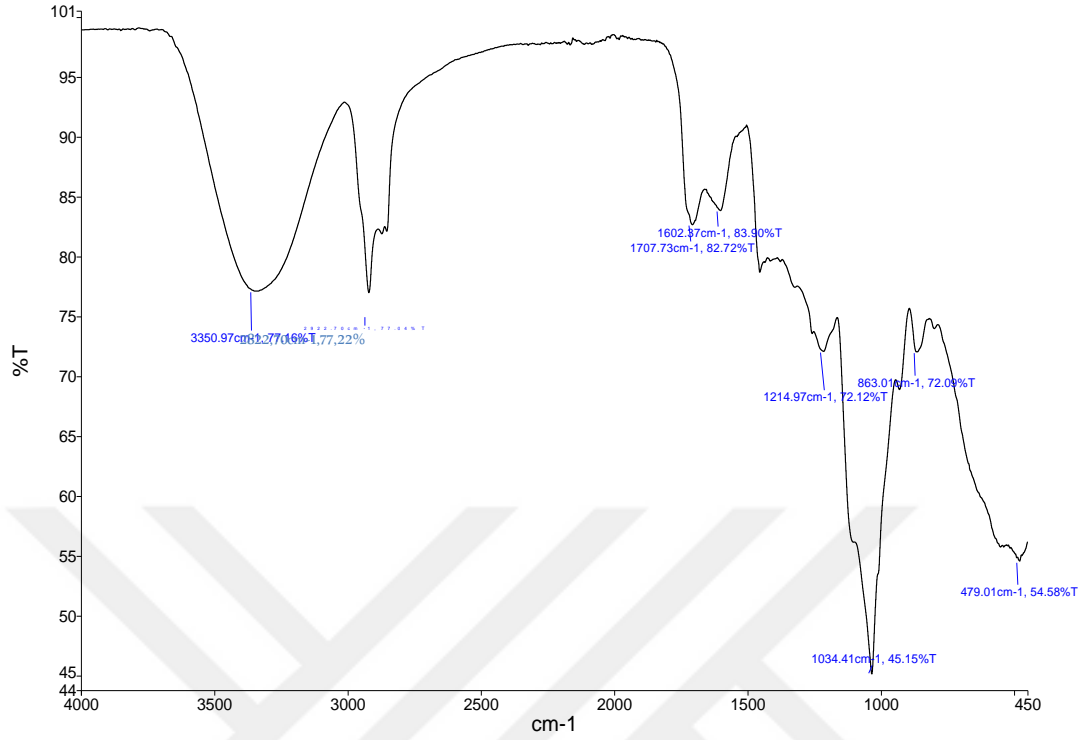
4.1.4 HPG' nin Deferoxamin ile Şelatlanması



Şekil 4.4 Deferoxamin ile şelatlanmış SS-HPG-ICG bileşiği

SS-HPG-ICG örneğinin kompleks yapı kazanması ve bir substrata bağlanması için deferoxamin şelatlayıcı ajanı kullanılmıştır. Deferoxamin Şekil 4.4 te verilen mekanizmayla Tyagi et al., (2016); Silliman et al., (1993) tarafından da çeşitli amaçlar için kullanılmıştır.

4.2 Sentezlenen HPG ve Türevlerinin FTIR Yapı Analiz Sonuçları



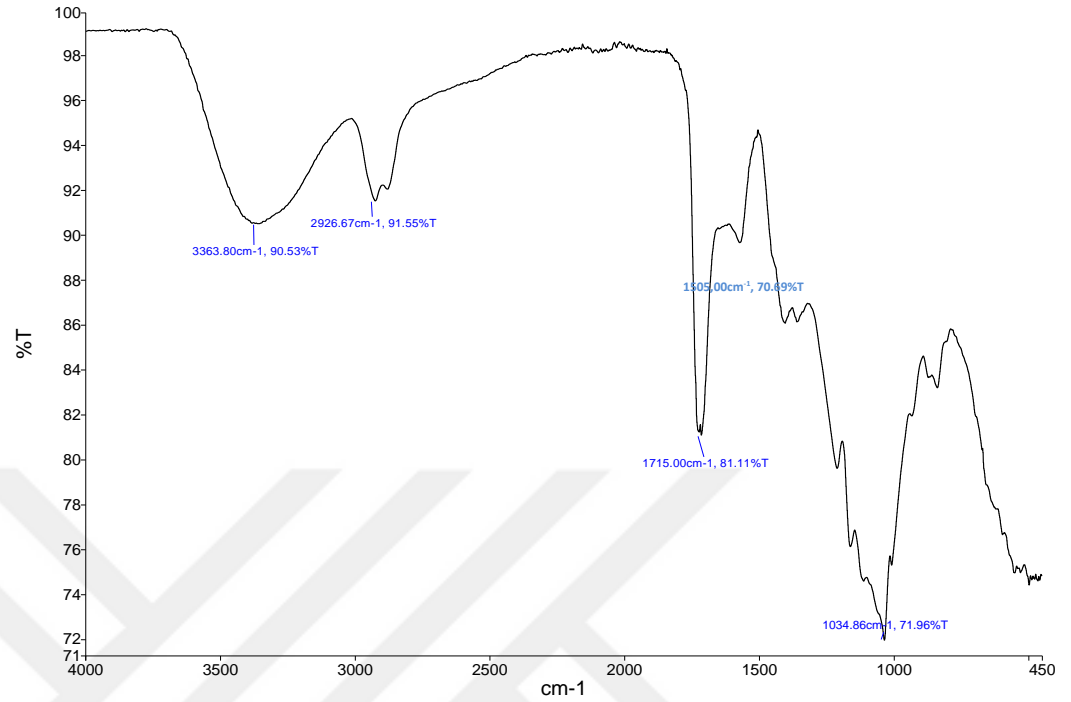
Şekil 4.5 HPG' nin FTIR yapı analiz sonuçları

Çizelge 4.1 HPG' nin dalga sayısına göre eğilme ve gerilmeleri

| Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | Dalga Sayısı Aralığı (cm ⁻¹) | Moleküler Hareket |
|----------------------------------|--|-----------------------------|
| 3350,97 cm ⁻¹ | 3405 cm ⁻¹ | O-H gerilme, hidroksil grup |
| 2822,70 cm ⁻¹ | 2975–2800cm ⁻¹ | C-H gerilme (alkan) |
| 1707,73 cm ⁻¹ | 1730-1700 cm ⁻¹ | C=O gerilme |
| 1602,37 cm ⁻¹ | ~1600 cm ⁻¹ | C=C gerilme (izole) |
| 1214,97 cm ⁻¹ | 1260-1000 cm ⁻¹ | C-O gerilme |
| 863,01 cm ⁻¹ | 890-820 cm ⁻¹ | C-O-O- gerilme, peroksit |
| 1034,41 cm ⁻¹ | 1300–1000 cm ⁻¹ | C-O-C gerilme(dialkil) |

Şekil 4.5 ve Çizelge 4.1'e göre; 1602 cm⁻¹' de C=C çift bağı, 890-820 cm⁻¹' de C-O-O gerilmesini ve HPG'lerin yüzey hidroksil gruplarına karşılık gelen 3350 cm⁻¹' de güçlü bir bandı göstermektedir. 1707,73 cm⁻¹' de güçlü bir ester karbonil bandı ester bağlarının varlığını doğrulamaktadır. 2950–2800 cm⁻¹ bölgesindeki genişleme

tepe noktası ise C-H gerilmelerinin (asimetrik ve simetrik) poligliserol-kuyruğunun kuvvetli örtüşmesinden kaynaklanmaktadır (Ye et.al.,2010).

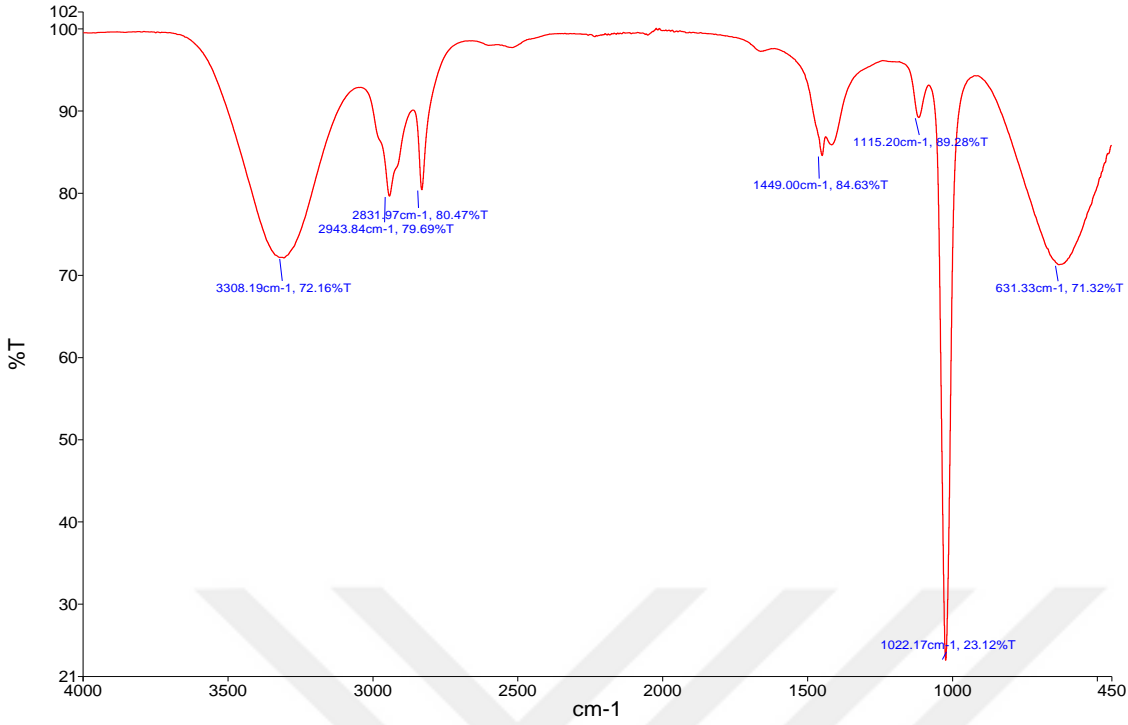


Şekil 4.6 Süksinidimil süksinat ile fonksiyonlaştırılmış HPG FTIR yapı analizi

Çizelge 4.2 Süksinidimil süksinat ile fonksiyonlaştırılmış HPG' nin eğilme ve gerilmeleri

| Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | Dalga Sayısı Aralığı (cm ⁻¹) | Moleküler Hareket |
|----------------------------------|--|-----------------------------|
| 3363,80 cm ⁻¹ | 3405 cm ⁻¹ | O-H gerilme, hidroksil grup |
| 2926,67 cm ⁻¹ | 2975–2800 cm ⁻¹ | C-H gerilme (alkan) |
| 1715,00 cm ⁻¹ | 1730-1700 cm ⁻¹ | C=O gerilme |
| 1505,00 cm ⁻¹ | 1550-1500 cm ⁻¹ | N-O gerilme |
| 1034,86 cm ⁻¹ | 1300–1000 cm ⁻¹ | C-O-C gerilme (dialkil) |

Şekil 4.6 ve Çizelge 4.2' ye göre; 2926,67 cm⁻¹'de C-H gerilmesini, 1300-1000 cm⁻¹'de C-O-C gerilmesini, 1715 cm⁻¹'de C=O gerilmesini ve HPG'lerin yüzey hidroksil gruplarına karşılık gelen 3363,80 cm⁻¹ de güçlü bir bandı göstermektedir. 1680-1780 cm⁻¹'deki tepe noktaları, COOH gruplarının varlığını onaylamıştır. Yapıdaki C=C çift bağları bozulmuş, yerine N-O bağları oluşmuştur (Yang et. al., 2015).

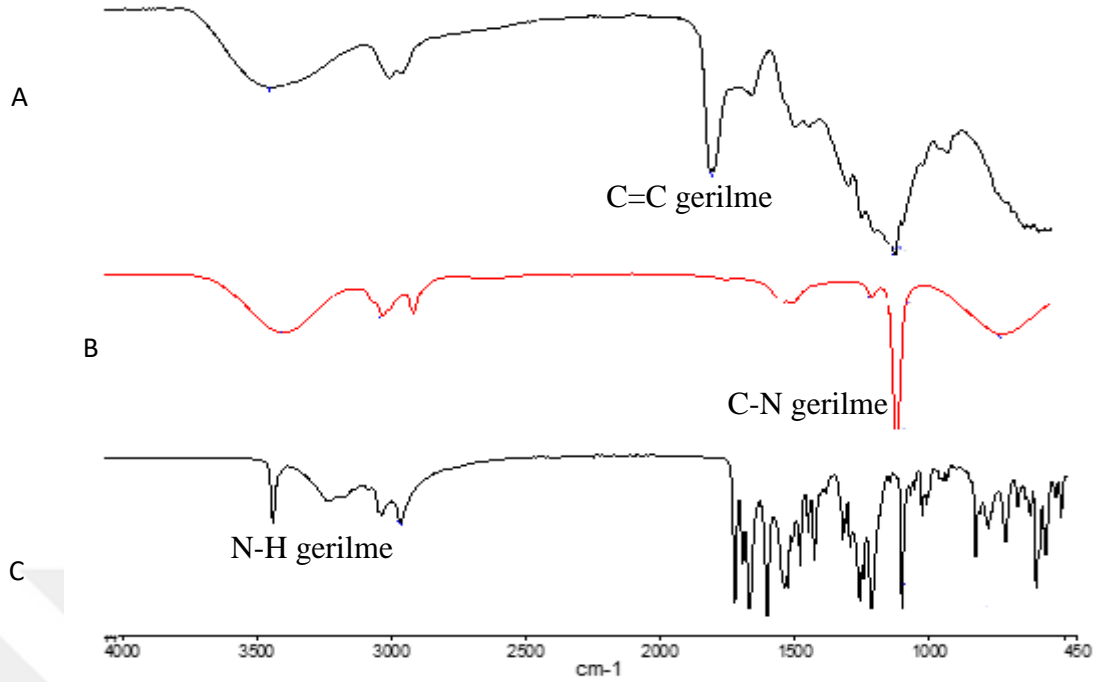


Şekil 4.7 Deferoxamin ile şelatlanmış HPG' nin FTIR yapı analizi

Çizelge 4.3 Deferoxamine ile şelatlanmış HPG'nin eğilme ve gerilmeleri

| Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | Dalga Sayısı Aralığı (cm ⁻¹) | Moleküler Hareket |
|----------------------------------|--|--------------------------------|
| 3308 cm ⁻¹ | 3405 cm ⁻¹ | O-H gerilme, hidroksil grup |
| 2943,84 cm ⁻¹ | 2970–2880 cm ⁻¹ | C-H gerilme (alkan) |
| 1449,00 cm ⁻¹ | 1460 cm ⁻¹ | CH ₂ eğilme (alkan) |
| 1115,20 cm ⁻¹ | 1050-1150 cm ⁻¹ | C-O gerilme |
| 631,20 cm ⁻¹ | 730-665 cm ⁻¹ | C=C eğilme |
| 1022,17 cm ⁻¹ | 1250-1020 cm ⁻¹ | C-N gerilme |

Şekil 4.7 ve Çizelge 4.3' e göre; 2943,84 cm⁻¹'de C-H gerilmesini, 1449,00 cm⁻¹'de C-O-C gerilmesini, 1115,20 cm⁻¹'de C=O gerilmesini 631,20 cm⁻¹'de C=C eğilmesini ve HPG'lerin yüzey hidroksil gruplarına karşılık gelen 3308 cm⁻¹' de güçlü bir bandı göstermektedir. N-O bağları bozulup, yeni yapıda CH₂ eğilmeleri ve C-N gerilmeleri olduğu gözlenmiştir (Umemura et. al., 2017).



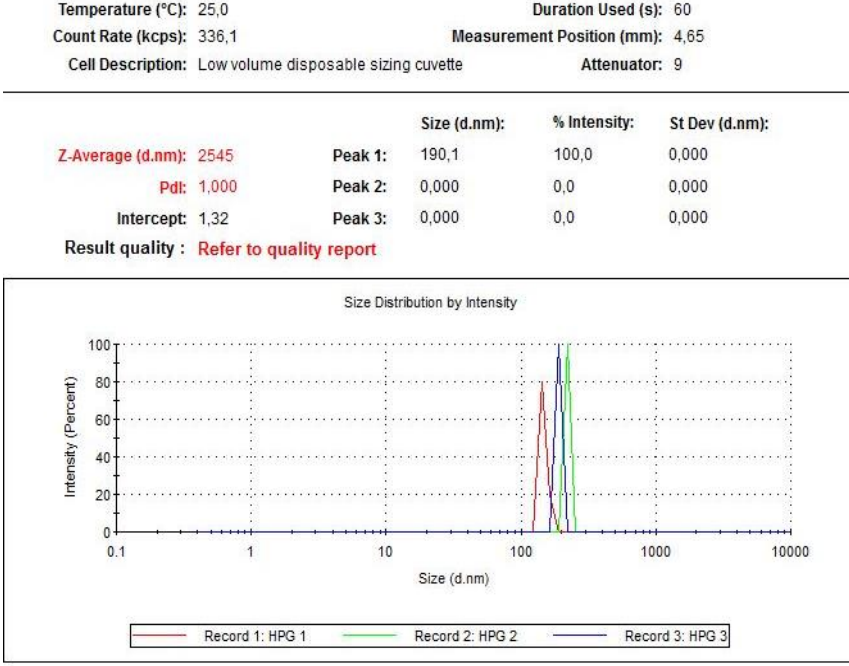
Şekil 4.8 FTIR yapı analizi sonuçları; (A) SS-HPG, (B) DFO-HPG, (C) DFO

Tek başına DFO için $2858\text{--}2931\text{ cm}^{-1}$ ve $2995\text{--}3004\text{ cm}^{-1}$ deki bantlar, buna uygun olarak CH_2 ve N-H gerdirme titreşimlerinin asimetric ve simetric germe titreşimlerine atfedilir. Düşük dalga-sayısı bölgesinde, $1053, 1200, 1460, 1566$ ve 1628 cm^{-1} 'deki bantlar, sırasıyla hidroksamat gruplarının N-O bağlarının gerilme titreşiminden, C-C bağının gerilmeli titreşiminden, CH_2 bağının bükülme titreşiminden, N-H (amin II) 'nin bükme titreşimi ve CO (amin I) 'in gerilme titreşiminden kaynaklanır (Umemura et. al., 2017).

Şekil 4.8' den de görüldüğü üzere SS-HPG' nin yapısındaki N-O bağları bozulup, DFO-HPG' nin yapısında görülen C-N bağları oluşmuştur. HPG' nin yapısındaki OH pikleri bir miktar tüketilmiş ve yerine amin bağları oluşmuştur.

4.3 Sentezlenen HPG ve Türevlerinin DLS ile Boyut Analizi Sonuçları

Sentezlenen HPG ve türevlerinin parçacık boyutu Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda Malvern Nano-ZS DLS (Dynamic Light Scattering) cihazı analizi ile incelenmiştir. Bulunan çaplar parçacığın etrafındaki çözgen molekülleri ile birlikte olduğundan bulunan değerler bize hidrodinamik çapı vermektedir.



Şekil 4.9 HPG' nin DLS analiz sonuçları

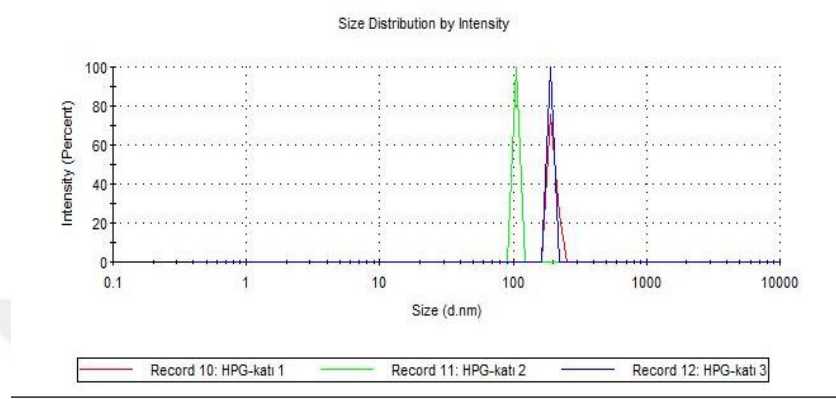
Bölüm 3.2' deki şekilde sentezlenen HPG polimerik nanoparçacıklarının DLS tekniği ile ölçümü sonucunda elde edilen boyut dağılım grafiği Şekil 4.9' da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre suda dağılmış olan HPG nanoparçacıklarının hidrodinamik çapı 190,1 nm ve polidispersite indeksi de 1,000 olarak kaydedilmiştir.

Birçok durumda, aşırı dallanmış polimerlerin MW üzerinde sıkı kontrol elde etmek zor olabilir. Bu kesinlikle hiper dallı poligliseroller için geçerlidir. Bu reaksiyon üzerindeki belli bir kontrol seviyesi, başlatıcı molekülün sınırlı deprotonasyonu ve monomerin yavaşça eklenmesiyle sağlanır. Bununla birlikte, polidispersiteler (PD'ler) büyük ölçüde 1.1 ila 1.7 arasında değişmektedir (Kainthan et. al., 2006). Bu analizde elde ettiğimiz sonuç ise bunu doğrulamaktadır.

Temperature (°C): 25,0 Duration Used (s): 60
 Count Rate (kcps): 325,3 Measurement Position (mm): 1,25
 Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette Attenuator: 8

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 3071 | Peak 1: 197,5 | 100,0 | 12,92 |
| Pdi: 1,000 | Peak 2: 0,000 | 0,0 | 0,000 |
| Intercept: 1,30 | Peak 3: 0,000 | 0,0 | 0,000 |

Result quality : Refer to quality report

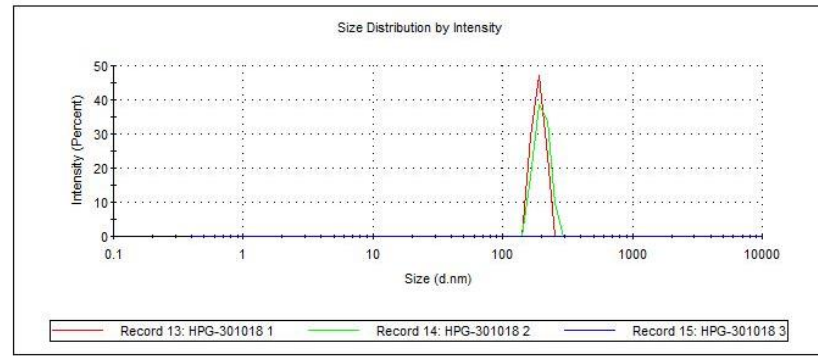


Şekil 4.10 SS-HPG' nin DLS analiz sonuçları

Temperature (°C): 25,0 Duration Used (s): 60
 Count Rate (kcps): 353,0 Measurement Position (mm): 1,25
 Cell Description: Low volume disposable sizing cuvette Attenuator: 11

| | Size (d.nm): | % Intensity: | St Dev (d.nm): |
|-------------------------------|----------------------|--------------|----------------|
| Z-Average (d.nm): 1482 | Peak 1: 202,1 | 100,0 | 26,30 |
| Pdi: 0,946 | Peak 2: 0,000 | 0,0 | 0,000 |
| Intercept: 0,377 | Peak 3: 0,000 | 0,0 | 0,000 |

Result quality : Refer to quality report



Şekil 4.11 DFO ile şelatlanmış HPG' nin DLS analiz sonuçları

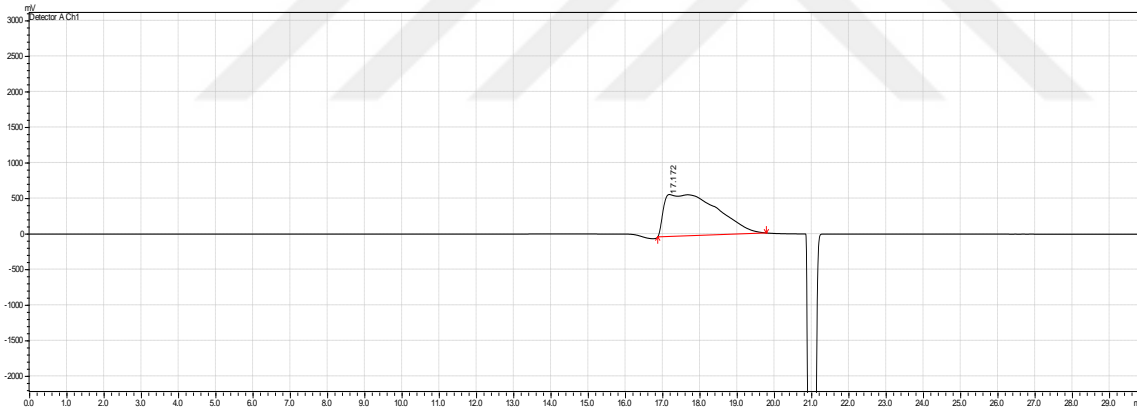
HPG'nin fonksiyonlaştırılması ve sonra DFO ile şelatlanması işlemleri sonucunda da Şekil 4.10 ve Şekil 4.11' de görüldüğü gibi HPG'nin parçacık boyutunda çok fazla değişim gözlenmemiştir.

Çizelge 4.4 Örneklerin DLS boyut analiz sonuçları

| Örnek | Ortalama Boyut (nm) (n=5) | Ortalama Boyut Standart Sapma | Solvent | Polidispersite |
|---------|---------------------------|-------------------------------|---------|----------------|
| HPG | 185,5 | 185,5±37,2 | Metanol | 1,000 |
| SS-HPG | 164,5 | 164,5±51,1 | Metanol | 1,000 |
| DFO-HPG | 195,7 | 195,7±8,93 | Metanol | 0,946 |

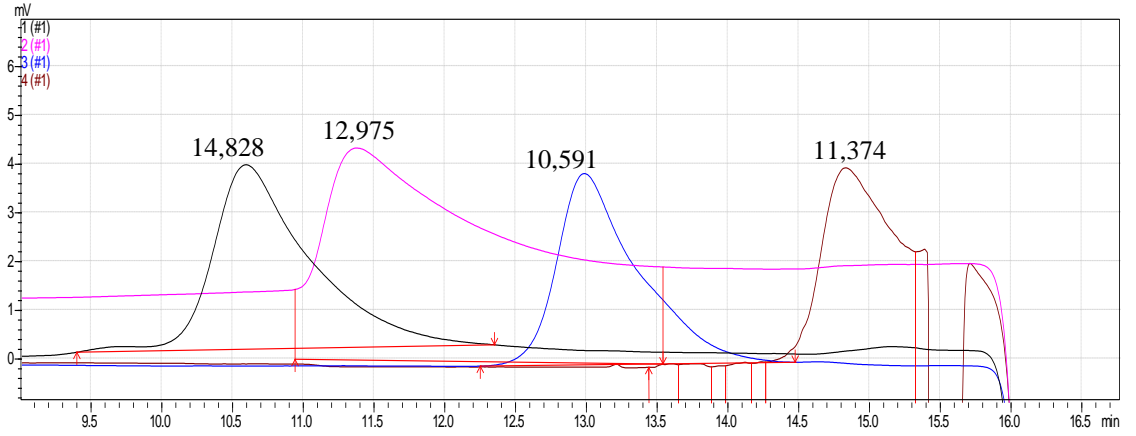
4.4 HPLC Analizi ile HPG' nin Molekül Ağırlığı Tayini

Sentezlenen HPG'nin molekül ağırlığı tayini jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizi ile hesaplanmıştır. Bunun için PSS Proteema analytical 100 A, 8x300 mm, 5 µm kolon ve refraktif index (RI) dedektörü kullanılmıştır. 0,1 M KNO₃ sulu çözeltisi mobil faz olarak 0,8 mL/dk akış hızında kullanılmıştır (Ye et. al., 2011).

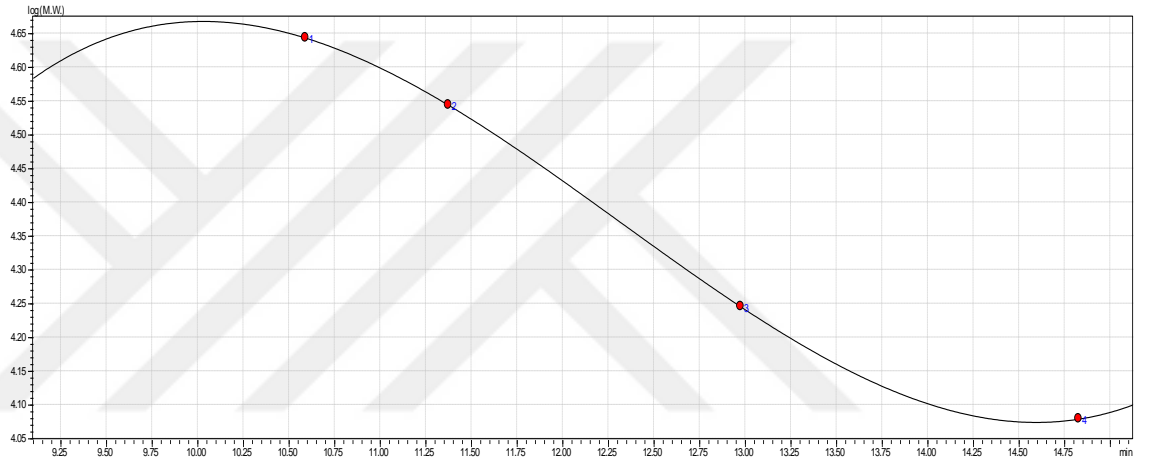


Şekil 4.12 HPG' nin GPC kromatogramı

GPC analizi sonucu HPG' nin alıkonma zamanı Şekil 4.12'den de görüldüğü gibi 17,172 dakika olarak bulunmuştur. HPG' nin molekül ağırlığı hesabı için ise, 44000, 35000, 17600 ve 12000 da molekül ağırlıklarında proteinlerin GPC analizleri yapılmıştır. Analiz sonucu alıkonma zamanları elde edilen proteinlerin kromatogramları Şekil 4.13'te kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.14'te verilmiştir.



Şekil 4.13 Proteinlerin çoklu kromatogramları

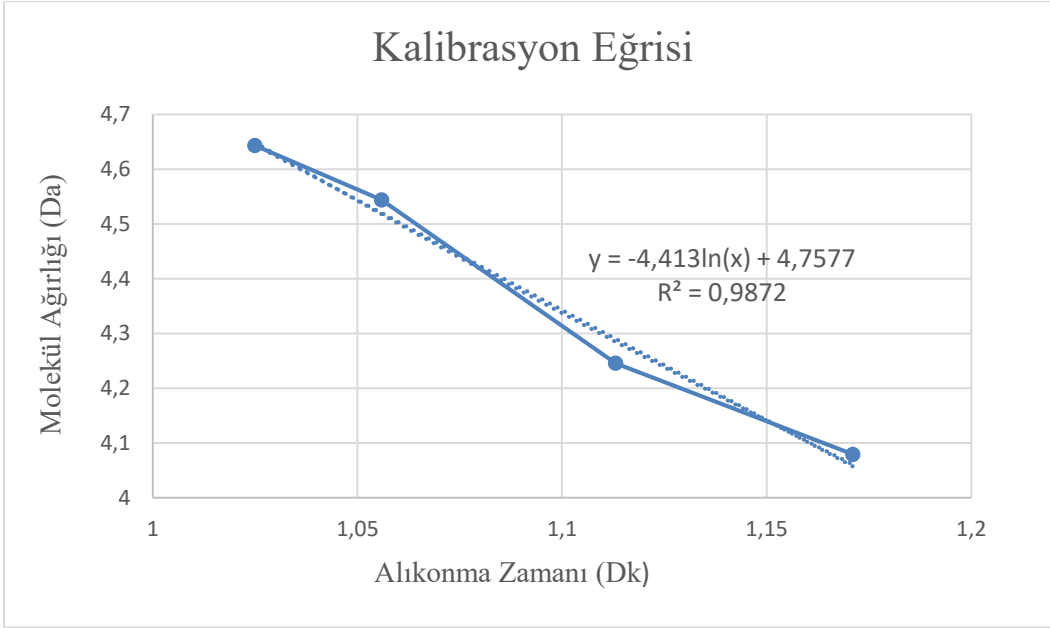


Şekil 4.14 Kalibrasyon eğrisi

Tablo 4.5 Protein Kalibrasyon Değerleri

| Alıkonma Zamanı (Rt) (dk) | Molekül Ağırlığı (Mw) (Da) |
|---------------------------|----------------------------|
| 10,591 | 44000 |
| 11,374 | 35000 |
| 12,975 | 17600 |
| 14,828 | 12000 |

Yapılan protein kalibrasyonu çalışmasında elde edilen değerler sonucu molekül ağırlığı-alıkonma zamanı grafiği Şekil 4.15'teki gibi çizilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak; alıkonma zamanı 17,172 dakika olan HPG'nin molekül ağırlığı 6800 Da olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.15 Molekül Ağırlığı tayini için proteinlerden elde edilen kromotogramlardan oluşturulan kalibrasyon grafiği

4.5 ICG Bağlanma Veriminin Hesaplanması

Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscans Flash) cihazı ile ICG'nin bağlanma verimi hesaplanmıştır. Sentez sonrası elde edilen 3 örnekten, ölçüm için 200' er μ L platelere alınmıştır. Kontrol grubu için ultra saf su kullanılmıştır. Ölçüm sonuçları Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6 Spektrofotometri ölçüm sonuçları

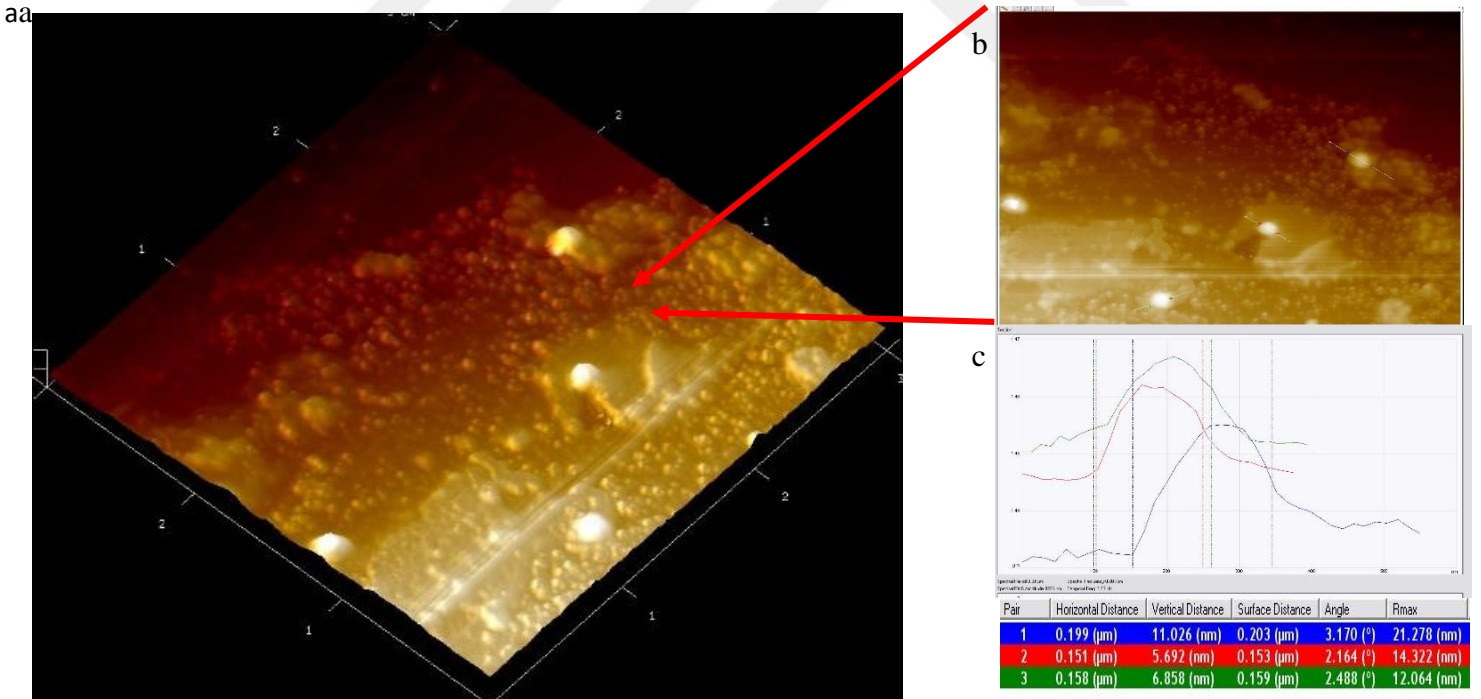
| Örnek | Adsorbans Değeri | Ortalama Değer | Standart Sapma | Çözgen Farkı |
|-------------|------------------|----------------|----------------|--------------|
| ICG | 230,3-218,5 | 224,4 | 8,343 | 221,3085 |
| Süpernatant | 42,89-57,05 | 49,97 | 10,012 | 46,8785 |
| Yıkama-1 | 8,466-8,01 | 8,238 | 0,322 | 5,1465 |
| Yıkama-2 | 8,014-11,03 | 9,522 | 2,132 | 6,4305 |
| Su | 3,429-2,754 | 3,0915 | 0,477 | - |

Çizelge 4.7 ICG bağlanma verimi hesabı

| Örnek | Bağlanmayan ICG (%) | Toplam ICG miktarı (%)=26,41 | Bağlanmayan ICG | ICG Bağlanma Verimi (%)=73,59 |
|-------------|---------------------|------------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Süpernatant | 21,18228 | | | |
| Yıkama-1 | 2,325421 | | | |
| Yıkama-2 | 2,905653 | | | |

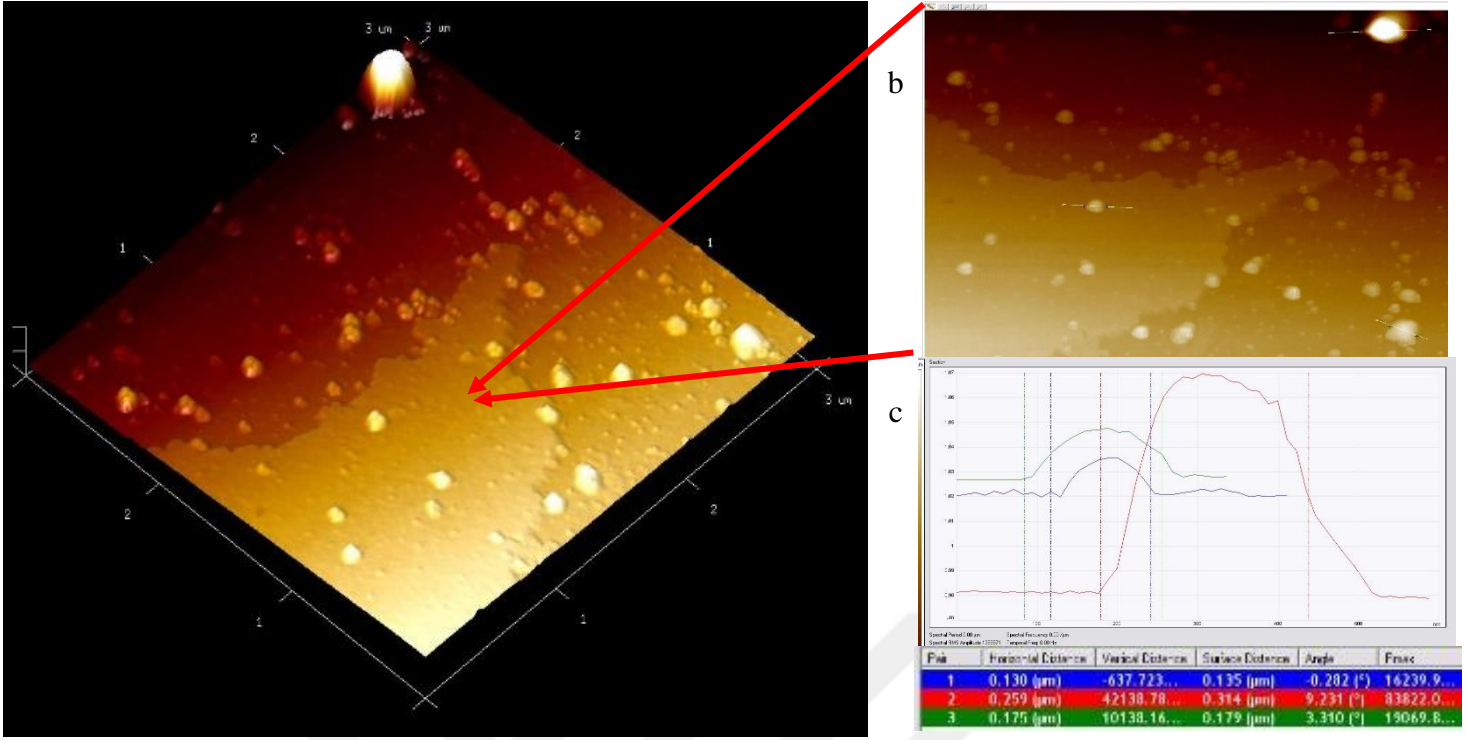
Elde edilen sonuçlara göre 3 örnek için de bağlanmayan ICG (%) değerleri hesaplanmış ve toplam bağlanmayan miktar %26,41 olarak bulunmuştur. Dolayısıyla ICG bağlanma verimi %73,59 olarak elde edilmiştir (Çizelge 4.7). Bu oran da ICG' nin HPG' ye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir (Wang et. al., 2018).

4.6 Taramalı Uç Mikroskop (SPM) Sonuçları



Şekil 4.16 a) HPG' nin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3µm-3µm), b) HPG'nin 1µm-1µm boyutunda yakınlştırılmış görüntüsü, c) Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı

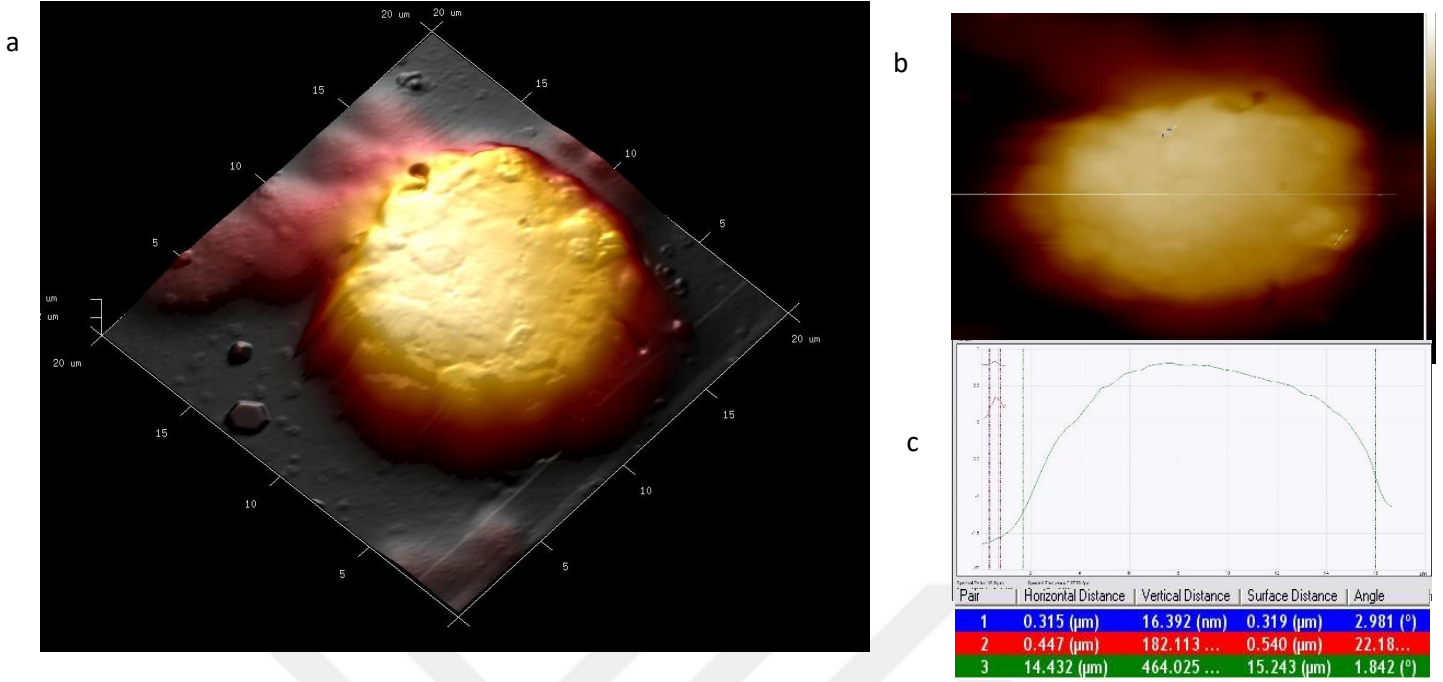
aa



Şekil 4.17 a) HPG-ICG-DFO örneğinin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3µm-3µm), b) HPG-ICG-DFO örneğinin 1µm-1µm boyutunda yakınlaştırılmış görüntüsü, c) Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı

Şekil 4.16’de HPG’ nin mikroskopik görüntüsünü vermektedir ve HPG’ nin küresel yapısı net olarak görülmektedir. Küresel yapılar, tek bir mekanizmanın veya itici gücün bir sonucu olarak oluşturulduğunu ve rastgele bir sürecin ürünü olmadığını belirten bir şekilde küçük bir dağılıma sahiptir. Daha yakından incelendiğinde, bilya benzeri varlıkların polimer yapısı gözlemlenebilmektedir (Power et. al., 1997). Şekil 4.17’de ise HPG-ICG-DFO örneğinin SPM analizi sonuçları verilmiştir.

Her iki örnek için de, DLS analizi sonucunda elde edilen heterojen yapı ve farklı boyut dağılımı SPM analizi ile de onaylanmıştır. SPM analizinde seçilen 3 parçacığın boyutuna bakılmış ve DLS analiziyle çok yakın sonuçlar elde edilmiştir.

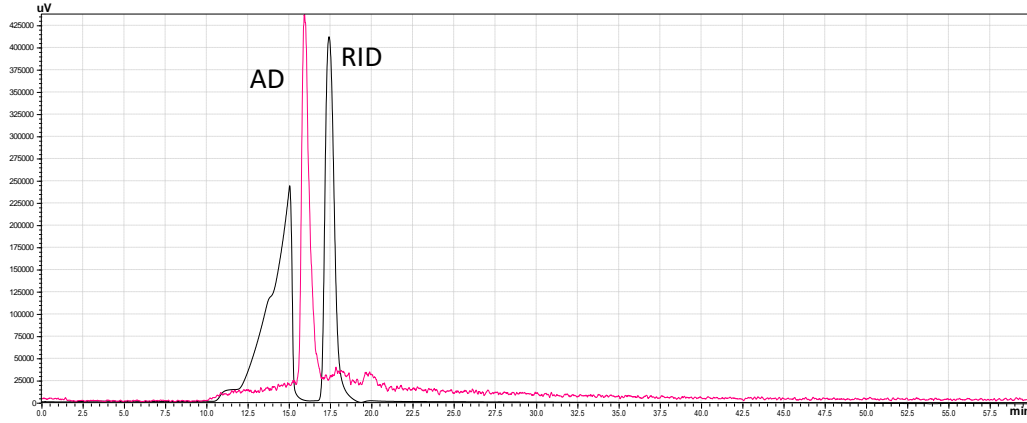


Şekil 4.18 a) HPG-ICG-DFO ekilmiş K562 hücresi örneğinin üç boyutlu taramalı mikroskop görüntüsü (3µm-3µm), b) K562 hücresinin 1µm-1µm boyutunda yakınlaştırılmış görüntüsü, c) Seçilen 3 parçacığın boyut dağılımı

HPG-ICG-DFO örneğinin K562 hücrelerinin yüzeyindeki yapısını görmek amacıyla SPM görüntüsü alınmıştır. Polimerik parçacıkların küresel yapısı kan hücrelerinin yüzeyinde belirgin şekilde görülmektedir (Şekil 4.18). Kan hücresinin yapısı ise olması gerektiği gibi dairesel ve dolgundur. Sağlıklı insan RBC' lerinin normal çapları 7.5-8.5 µm iken K562 hücreleri normal sağlıklı hücrelere göre önemli ölçüde daha büyüktür. Seçilen hücrenin çapı yaklaşık 15 µm olması ise bunu doğrulamaktadır (Mi et al., 2012).

4.7 Radyoşaretli Örneklerin HPLC Analizi Sonuçları

HPLC cihazında jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) yöntemi ile ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO), $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve indirgenmiş ^{99m}Tc aktif örneklerinin analizi yapılmıştır. Şekil 4.19'a bakıldığında, aktif örnek RI dedektörde iki pik vermiştir. Bunun sebebinin yapısında bağlı olan deferoxaminden kaynaklı izomeri olduğu düşünülmüştür. Bu izomerlerden biri işaretlenmiştir. Şekil 4.20'de verilen radyoaktivite dedektörü (AD) sonuçlarına bakıldığında ise $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ 17,295. dakikada inaktif örnek ise 15,924. dakikada %100 verimle elde edilmiştir. İndirgenmiş ^{99m}Tc ise herhangi bir pik vermemiş ve bu şekilde madde ile indirgenmiş ^{99m}Tc ayrılabilmiştir.



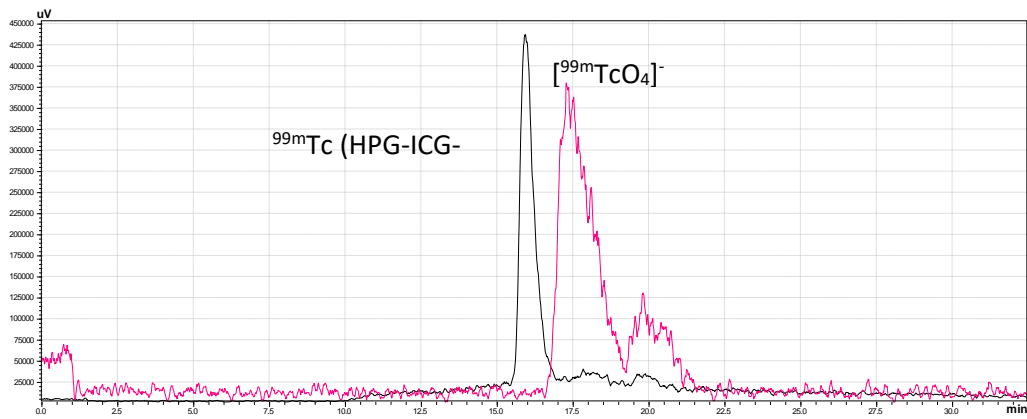
Şekil 4.19 ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin RI ve radyoaktivite dedektörde GPC kromotogramı

Çizelge 4.8 ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin RI dedektörde alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri

| Rf (alıkonma zamanı) | Area (% taradığı alan) |
|----------------------|------------------------|
| 15.021 | 56.7328 |
| 17.406 | 43.2672 |

Çizelge 4.9 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneğinin radyoaktivite dedektöründe (AD) alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri

| Rf (alıkonma zamanı) | Area (% taradığı alan) |
|----------------------|------------------------|
| 15.924 | 100 |



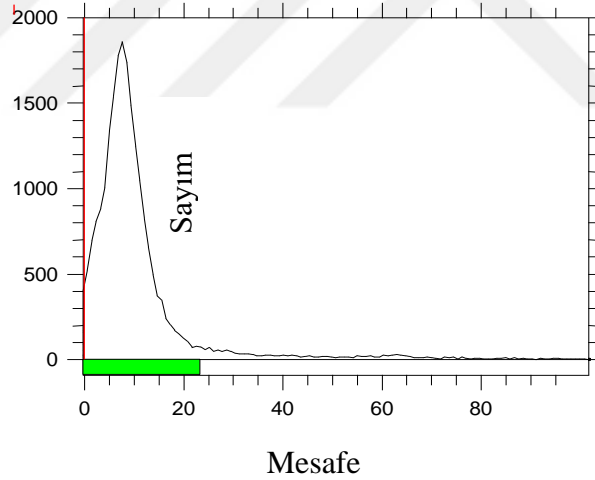
Şekil 4.20 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO)'nun radyoaktivite dedektörüne ait kromotogramı

Çizelge 4.10 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ 'ın ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin radyoaktivite dedektöründe (AD) alıkonma zamanları ve % taradıkları alan değerleri

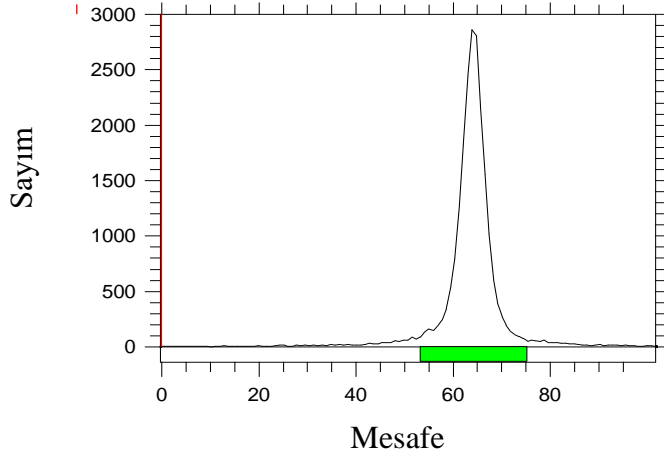
| Örnek | Rf (alıkonma zamanı) | Area (% taradığı alan) |
|---------------------------------|----------------------|------------------------|
| ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) | 15.813 | 100 |
| $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ | 17,295 | 100 |

4.8 Radyoışaretili Örneklerin TLRC Analiz Sonuçları

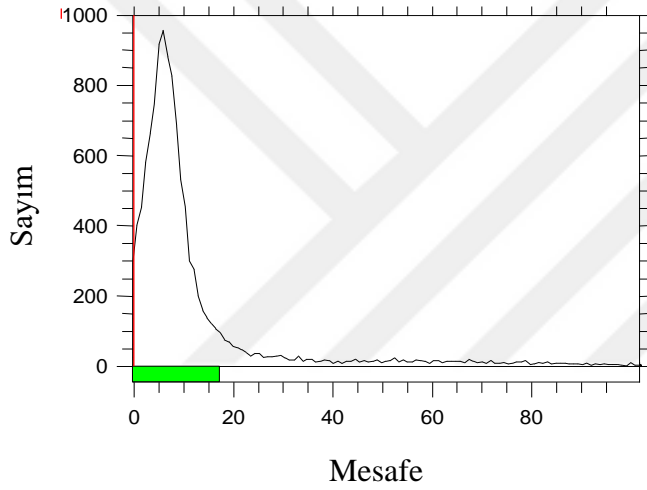
İşaretlenen ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin kalite kontrolü TLRC yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Gerçekleştirilen bu analizde mobil faz olarak Metanol, SF ve PAS (3:5:1.5) banyoları denenmiş olup en iyi ayırım SF banyosunda gözlenmiştir. (n=4). Sabit faz için ise selüloz kaplı TLRC şeriti kullanılmıştır. ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO), indirgenmiş ^{99m}Tc ve $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneklerinin SF banyosunda, Rf değerleri Çizelge 4.14'de verilmiştir.



Şekil 4.21 ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneğinin SF banyosundaki TLRC kromatogramı



Şekil 4.22 [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻ örneğinin SF banyosundaki TLRC kromotogramı



4.23 İndirgenmiş ^{99m}Tc örneğinin SF banyosundaki TLRC kromotogramı

Çizelge 4.11 $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$, indirgenmiş ^{99m}Tc ve [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻ örneklerin TLRC yöntemiyle hesaplanan SF banyosundaki işaretleme verimleri ve Rf değerleri

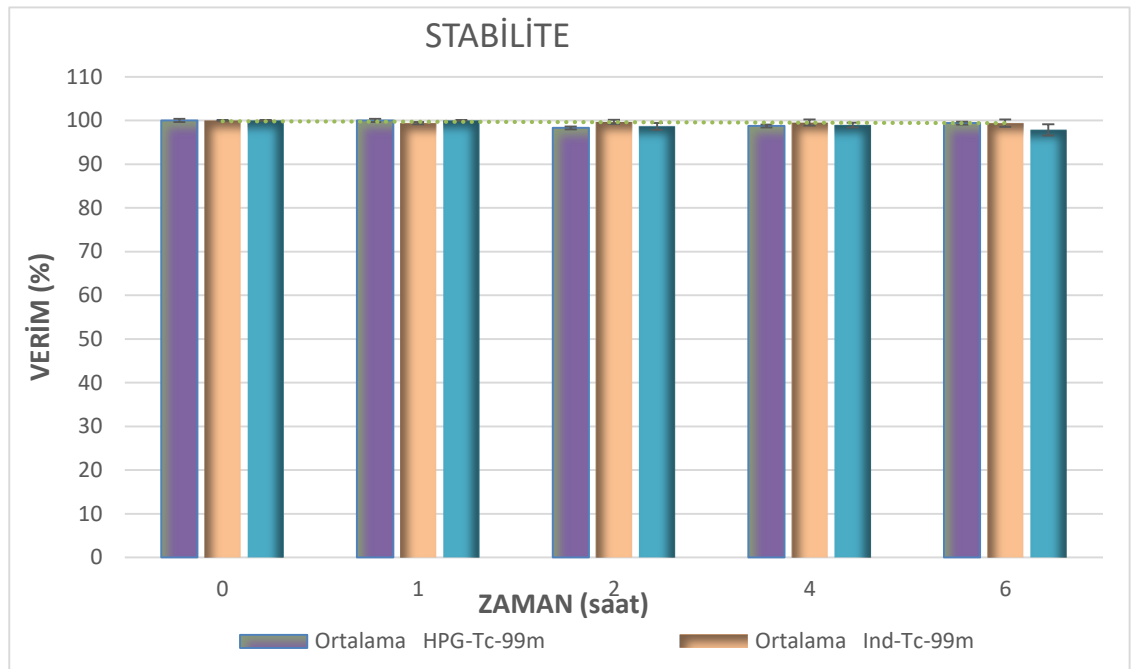
| | SF Banyosu | | |
|-----------|---------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------------|
| | $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ | İndirgenmiş ^{99m}Tc | [$^{99m}\text{TcO}_4$] ⁻ |
| Verim (%) | 100 | 100 | 100 |
| Rf | 0,087±0,01 | 0,052±0,02 | 0,91±0,06 |

4.9 Stabilite Sonuçları

^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO) örneklerinin 6 saat boyunca, oda sıcaklığında ve SF banyosunda kararlılıkları gözlemlenmiştir. Şekil 4.24' de ^{99m}Tc (HPG-ICG-DFO), indirgenmiş ^{99m}Tc ve $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneklerinin zamana göre davranışları verilmiştir. Bu grafikten de görüldüğü üzere işaretli HPG-ICG-DFO örneği 6 saat boyunca kararlılığını korumuştur.

Çizelge 4.12 İşaretleme verilerinin ortalama değerleri ve standart sapmaları

| Zaman (saat) | HPG | İndirgenmiş(^{99m}Tc) | $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ |
|--------------|-------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 0 | 100 | 100 | 100 |
| 1 | 100 | 99,395±0,27 | 100 |
| 2 | 98,31±0,64 | 99,66±0,48 | 98,65±0,78 |
| 4 | 98,75±0,77 | 99,51±0,69 | 98,97±0,55 |
| 6 | 99,405±0,84 | 99,395±0,86 | 97,88±1,27 |



Şekil 4.24 $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ İle İşaretlenen Örneklerin Zaman-Verim Değerleri

4.10 Lipofilite Sonuçları

$^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ bileşiğinin lipofilite deneyi için 3 deneme yapılmıştır. Bunun sonucunda, $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ bileşiğine ait deneysel lipofilite (logP) değeri $-0,796 \pm 0,03$ olarak bulunmuştur. Bu değer HPG-ICG-DFO bileşiğinin hidrofilik yapısını kanıtlamıştır. HPG' nin çok dallanmış yapısı nedeniyle teorik değeri ACD/logP Algorithm programı ile hesaplanamamaktadır. Fakat bulunan deneysel değer beklenen gibi düşük bulunmuştur.

4.11 Hücre Kültürü Sonuçları

4.11.1 Sitotoksosite Sonuçları

Polimerlerin in vitro sitotoksitesisi, WST canlı hücre boyama kiti kullanılarak polimer konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (WST: kırmızı) kullanarak formazan (mor) boya üretir (Terzioğlu et. al., 2013). Bunun sonucu görülen renk değişiminin absorbans olarak spektrofotometre yardımıyla ölçülmesi ile elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13' de yer almaktadır.

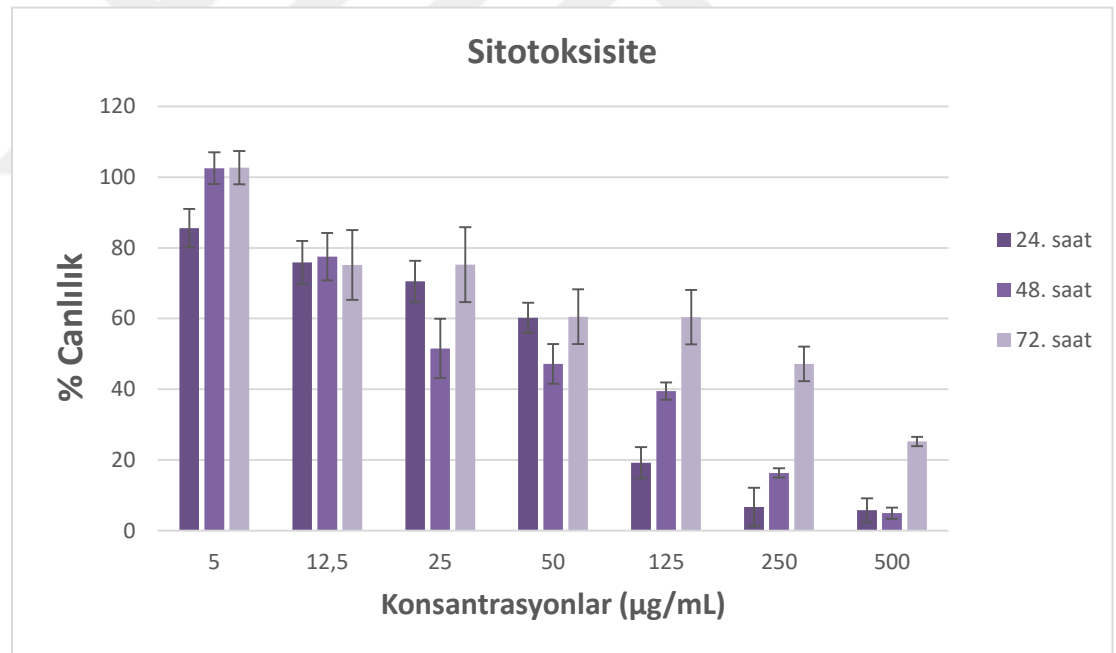
Çizelge 4.13 Sitotoksosite deneyi sonucu madde konsantrasyonunun zamana göre değerleri

| Madde Konsantrasyonu ($\mu\text{g}/\text{mL}$) | Ortalama | | | Standart sapma | | |
|--|----------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| | 24. saat | 48. saat | 72. saat | 24. saat | 48. saat | 72. saat |
| 500 | 5,79 | 4,96 | 25,24 | 3,40 | 1,62 | 1,28 |
| 250 | 6,75 | 16,34 | 47,20 | 5,43 | 1,29 | 4,87 |
| 125 | 19,23 | 39,47 | 60,37 | 4,39 | 2,44 | 7,69 |
| 50 | 60,24 | 47,21 | 60,51 | 4,26 | 5,60 | 7,75 |
| 25 | 70,50 | 51,54 | 75,25 | 5,83 | 8,37 | 10,56 |
| 12,5 | 75,88 | 77,53 | 75,19 | 6,06 | 6,71 | 9,87 |
| 5 | 85,56 | 102,53 | 102,70 | 5,41 | 4,51 | 4,70 |

Madde konsantrasyonunun zamanla değişimini gösteren grafik Şekil 4.25' de verilmiştir. Sonuçlara bakıldığında, kontrol polimeri için artan polimer konsantrasyonu ile sitotoksitenin arttığını gözlemlenmiştir. % 80' den fazla hücre popülasyonu, en yüksek polimer konsantrasyonunda (500 µg / mL) canlılığı kaybetmiştir.

Yüksek konsantrasyonlarda yüksek molekül ağırlıklı HPG-ICG-DFO varlığında hücre ölümü, çözeltinin yüksek viskozitesinden, dehidrasyon ve hücrelerin kümelenmesinden kaynaklanabilir. Hücre canlılığı en fazla 72. Saatte gözlemlenmiştir. Bunun nedeninin ise ikl uygulamada madde hücreyi yüzeyini tamamen kaplamaktadır ve hücre ölümü daha fazla gözükmektedir. Zaman içerisinde hücre yüzeyindeki madde daha dağınık olarak bulunur e bu yüzden hücre ölümünün azaldığı söylenebilir.

Bu polimerlerin biyolojik uygulaması tipik olarak 500 µg / mL'den daha düşüktür. Bu sebepten HPG-ICG-DFO polimeri, mitokondriyal aktivite ve hücre canlılığı üzerinde minimum olumsuz etkilere sahip olacaktır (Son et. al., 2015).



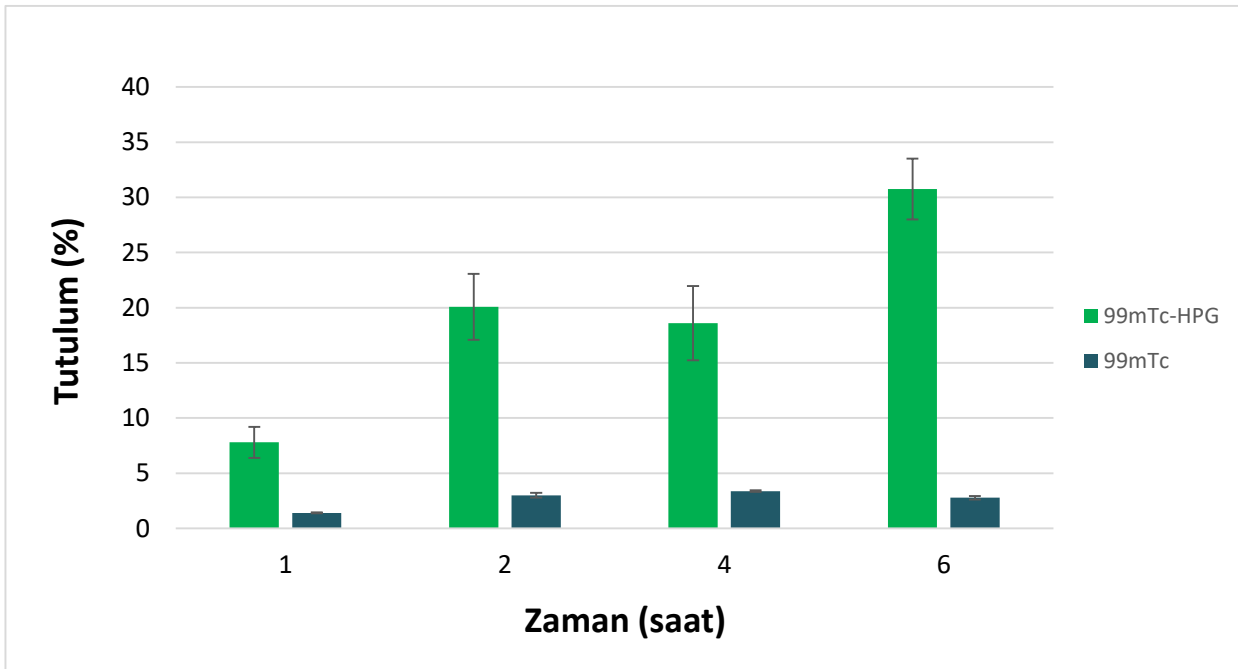
Şekil 4.25 HPG-ICG-DFO örneğinin farklı konsantrasyonlarında zamana göre % canlılık değerleri

4.11.2 İnkorporasyon Sonuçları

$[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ile işaretlenen HPG-ICG-DFO bileşiğinin K562 hücrelerine % bağlanma verimlerinin zamana göre değişimi incelenmiş ve bu değerler Çizelge 4.14’ de verilmiştir. Şekil 4.26’ daki grafik incelendiğinde, zamanla bağlanma verimi arttığı ve 6.saatte % 30 olduğu görülmektedir. Sonuç olarak maddemizin $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ile başarılı bir şekilde işaretlendiğini ve K562 hücreleriyle bağlanma etkinliğinin yüksek olduğunu göstermektedir.

Çizelge 4.14 $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ ve $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ örneklerinin K562 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

| Zaman (saat) | Ortalama | | Standart Sapma | |
|--------------|-------------------------------|--------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG})$ | $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ | $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG})$ | $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ |
| 1 | 7,787 | 2,635 | 1,398 | 0,041 |
| 2 | 20,067 | 3,339 | 2,994 | 0,219 |
| 4 | 18,589 | 3,350 | 3,369 | 0,066 |
| 6 | 30,750 | 0,676 | 2,769 | 0,171 |



Şekil 4.26 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ örneklerinin bağlanma verimlerinin zamana göre değişimi

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, SPECT/Floresan çok fonksiyonlu diagnostik ajanların geliştirilmesi ve kan hücrelerinin görüntülenmesinde kullanılmaları amaçlanmıştır. Amaçlanan problemlerin geliştirilmesi için, mükemmel biyouyumluluk profilleri sergileyen hiperdallanmış poligliseroller anyonik halka açılma polimerizasyonu ile sentezlenmiştir. Polimerin işlevselleştirilmesi için süksinik anhidrit kullanılmıştır. Polimere floresans özellik kazandırmak amacıyla indosiyanın yeşili HPG' ye bağlanmıştır. Bunun sonucu %73,59 gibi yüksek bir bağlanma verimi elde edilmiştir. Şelatlayıcı ajan olarak ise deferoxamin seçilmiş ve süksinat ile fonksiyonlaştırılmış HPG' ye bağlanmıştır. HPG' nin molekül ağırlığı tayini ise yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile belirlenmiş ve 6800 Da olarak bulunmuştur. Düşük molekül ağırlığında olması HPG'nin böbrek yoluyla doğrudan vücuttan atılmasını sağlayacaktır. Molekül ağırlığı büyüdükçe maddenin kinetiği azalmaktadır. Öte yandan büyük molekül ağırlıklı moleküllerin karaciğer gibi organlarda yüksek tutulumu söz konusudur. Düşük molekül ağırlıklı HPG sentezi ile bu sorunun da önüne geçildiği düşünülmektedir. Sentezlenen polimer ve türevlerinin yapısal özellikleri dinamik ışık saçılımı ve taramalı uç mikroskopu ile belirlenmiştir. DLS analizi ile elde edilen heterojen yapı ve hidrodinamik çap değerleri SPM analizi ile de doğrulanmıştır.

SPECT görüntüleme için [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻ ile radyoişaretleme gerçekleştirilen örneklerin kalite kontrolü, HPLRC ve TLRC analizleri ile doğrulanmış ve %100 verimle bir radyoişaretleme gerçekleştirilmiştir. Polimerin lipofilikliğini görmek amacıyla yapılan lipofilité analizi sonucu örneğin lipofilité -0,796±0.03 olarak bulunmuştur. HPG'nin lipofilik yapısı sirkülasyon sırasında organlarda tutulumunu engelleyecektir. Daha yüksek hidrofilité; daha iyi bir etkiye ve daha yüksek stabiliteye ortam sağlamaktadır. İşaretle örneklerin kararlılıkları stabilite deneyi ile test edilmiş ve sonucunda işaretle örnekler 6 saat boyunca kararlılıklarını korumuşlardır.

HPG-ICG-DFO örneklerinin biyolojik davranışlarının in vitro incelenmesi K562 kronik myeloid lösemi hücreleri kullanılmıştır. Sitotoksisite çalışması sonucu artan madde konsantrasyonuyla sitotoksisitenin arttığı gözlemlenmiştir. 5 µg/mL madde konsantrasyonunda en yüksek hücre canlılığı görülmüştür. Bu polimerlerin biyolojik uygulaması tipik olarak 500 µg / mL'den çok daha düşüktür. Bu sebepten HPG-ICG-DFO polimerinin, mitokondriyal aktivite ve hücre canlılığı üzerinde minimum olumsuz etkilere sahip olacağı öngörülmektedir. $^{99m}\text{Tc}(\text{HPG-ICG-DFO})$ örneklerinin K562 hücrelerine bağlanma veriminin zamana göre değişimi incelenmiştir. Sonuç olarak zamanla bağlanma yüzdesi artmış ve 6. saatte % 30' u bulmuştur.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında floresans boyalı HPG örneklerinin kan hücrelerinin görüntülenmesine ve kanama odağının bulunmasına yönelik umut verici bir çalışma ortaya konulmuştur.



KAYNAKLAR DİZİNİ

Abbina, S., Vappala, S., Kumar, P., Siren, E. M. J., La, C. C., Abbasi, U., Brooks, D. E. And Kizhakkedathu, J. N., 2017, Hyperbranched Polyglycerols: Recent Advances In Synthesis, Biocompatibility And Biomedical Applications, *Journal Of Materials Chemistry B*, 5, 9249—9277.

Alander, J. T., Kaartinen, I., Laakso, A., Patil, T., Spillmann, T., Tuchin, V. V., Venermo, M. and Valisuo, P., 2012 A Review of Indocyanine Green Fluorescent Imaging in Surgery, *International Journal of Biomedical Imaging*.

Ali, S. A., Cesani, F., Zuckermann, J. A., Nusynowitz, M. L., Chaljub, G., 1998, Spinal-Cerebrospinal Fluid Leak Demonstrated By Radiopharmaceutical Cisternography, *Clinical Nuclear Medicine*, 23(3):152-5.

Aydoğdu, A., Aydoğdu, Y., Yakıncı, Z. D., 2017, Temel Radyolojik İnceleme Yöntemlerini Tanıma, *İ.Ü. Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dergisi*, Issn:2147-7892, Cilt 5, Sayı 2.

Baker, M. J., Trevisan, J., Bassan, P., Bhargava, R., Butler, H. J., Dorling, K. M., Fielden, P. R., Fogarty, S. W., Fullwood, N. J., Heys, K. A., Hughes, C., Lasch, Martin-Hirsch, P. L., Obinaju, B., Sockalingum, G. D., Sulé-Suso, J., Strong, R. J., Walsh, M. J., B. R., Gardner, P., Martin, F. L., 2014, Using Fourier Transform IR Spectroscopy To Analyze Biological Materials, *National Protocol*, 1771–1791.

Callahan, R. J., 2009, Radiolabeled Red Blood Cells: Method and Mechanisms, The University of New Mexico Health Sciences Center College of Pharmacy, 039-000-06-121-H04.

Chapanian, R., Constantinescu, I., Brooks, D. E., Scott, M. D., And Kizhakkedathu, J. N., 2012, In Vivo Circulation, Clearance, And Biodistribution Of Polyglycerol Grafted Functional Red Blood Cells, *Biomaterials*, 33(10), 3047–3057.

Crucho, C. I. C., Barros, M. T., 2017, Polymeric Nanoparticles: A Study On The Preparation Variables And Characterization Methods, *Materials Science and Engineering*, C 80, 771–784.

Desmettre, T., Devoiselle, J. M., Mordon, S., 2000, Fluorescence Properties And Metabolic Features Of Indocyanine Green As Related To Angiography, *Surv Ophthalmol*, 45: 15-27

Ertay, T., Ünak, P., 2017, Kan ve Kök Hücrelerin Radyonüklid ile işaretlenmesi, (Ed. Perihan Ünak, Gülay Durmuş Altun, Serap Teksöz, F. Zümrüt Biber Müftüler) *Nobel Tıp Kitapevi*, Bölüm 8 p. 131-158.

Eskier, U., 2017, ‘ Teknesyum: En Kullanışlı Yapay Radyoaktif Element’’, <https://www.makaleler.com/teknesyum-nedir> (2017) (Erişim tarihi: 15 Kasım 2018).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Fidancı, U. R., 2009, Kromotografi Ders Notları, Biyoteknoloji, Ankara Üniversitesi, 80.251.40.59

Fvasconcellos, S., 2009, ‘‘Indocyanine Green’’, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Indocyanine_green.svg, (Erişim tarihi: 10 Kasım 2018).

Gerwert, K., Kötting, C., 2010, Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy, *Citable reviews in the life sciences*.

Gilbert, D. F., M. B., 2016, A Protocol For A Highthroughput Multiplex Cell Viability Assay. *Methods Molecular Biology* 1470, 75-84.

Huber, J. F., 2011, Instrumentation for High Performance Liquid Chromatography, *Elsevier*, (Vol. 13), 204p.

Hayashi, K., Wataru, S., and Yogo, T., 2014, Iodinated Silica/Porphyrin Hybrid Nanoparticles For X-Ray Computed Tomography/Fluorescence Dual-Modal Imaging Of Tumors, *Journal Of Asian Ceramic Societies*, 2(4), 429–434.

Hu, M., Chen, M., Li, G., Pang, Y., Wang, D., Wu, J., Qiu, F., Zhu, X. and J Sun, J., 2012, Biodegradable Hyperbranched Polyglycerol with Ester Linkages for Drug Delivery, *Biomacromolecules*, 13, 3552–3561.

İçhedef, Ç., 2010, Guanin Ve Türevlerinin $M(CO)_3^+$ (M=Tc Ve Re) Korları İle İşaretli Manyetik Özellikli Nanoparçacıklarının Oluşturulması Ve Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Doktora Tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 103s.

Javadi, S. A., Samimi, H., Naderi, F., Shirani, M., 2013, The Use Of Low-Dose Intrathecal Fluorescein İn Endoscopic Repair Of Cerebrospinal Fluid Rhinorrhea, *Arch Iran Med.*;16(5):264-6.

Kainthan, R., Muliawan, E. B., Hatzikiriakos, S. G. And Brooks, D. E., 2006, Synthesis, Characterization, and Viscoelastic Properties of High Molecular Weight Hyperbranched Polyglycerols, *Macromolecules*, 39, 7708-7717.

Kalkan, R., 2016, Sitotoksite Analizleri, Yakın Doğu Üniversitesi, Deneysel Sağlık Bilimleri Araştırma Merkezi, Uygulamalı Hücre Kültürü Kursu, 46s.

Kasza, G., Kali, G., Domjan, A., Petho, L., Szarka, G. and Ivan, B., 2017, Synthesis of Well-Defined Phthalimide Monofunctional Hyperbranched Polyglycerols and Its Transformation to Various Conjugation Relevant Functionalities, *Macromolecules*, 50, 3078–3088.

Kaur, I. P., Bhandari, R., Bhandari, S., & Kakkar, V., 2008, Potential Of Solid Lipid Nanoparticles İn Brain Targeting. *Journal Of Controlled Release*, 127(2), 97-109.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kılıç, G. B., Karahan, A. G., 2010, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi Ve Laktik Asit Bakterilerinin Tanısında Kullanılması, Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta.

Kumari, S., Choudhary, R. C., Kumaraswamy, R. V., Saharan, V., 2017, Synthesis, Characterization, and Application of Chitosan Nanomaterials Loaded with Zinc and Copper for Plant Growth and Protection *Scientific Figure on ResearchGate*.

Li, S., Guo, Z., Feng, R., Zhang, Y., Xue W. And Liu, Z., 2017, Hyperbranched Polyglycerol Conjugated Fluorescent Carbon Dots With Improved In Vitro Toxicity And Red Blood Cell Compatibility For Bioimaging, *Royal Society Of Chemistry*, 7, 4975–4982.

Ma, Y., Tong, S., Bao, G., Gao, C. and Dai, Z., 2013, Indocyanine green loaded SPIO nanoparticles with phospholipid-PEG coating for dual-modal imaging and photothermal therapy, *Biomaterials*, 34(31), 7706–7714.

Meyer, E., Editor, G., 2010, Scanning Probe Microscopy And Related Methods, *Beilstein Journal Of Nanotechnology*, 1: 155–157.

Mi, L., LianQing, L., Ning, X., YueChao, W., ZaiLi, D., XiuBin, X. and WeiJing, Z., 2012, Atomic Force Microscopy Imaging And Mechanical Properties Measurement Of Red Blood Cells And Aggressive Cancer Cells, *Science China Life Sciences*, 2012, 55: 968–973.

Nguyen QT, Tsien RY, 2013, Fluorescence-guided surgery with live molecular navigation--a new cutting edge, *Nat Rev Cancer*, 13, 9, :653-962.

Numanoğlu, S., 2008, Östrojen Bağımlı Meme Kanseri Hücrelerinde (Mcf-7) Genistein Ve Hiperteminin Kombine Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, E. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 139s.

Owens, S. L., 1996, Indocyanine green angiography. *Br J Ophthalmol*, 80: 263-266.

Özyazgan, S., 2002, Toksikokinetik, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Zehirlenmeler Sempozyum Dizisi, (32); s. 9-19.

Placantonakis, D. G., Tabaee, A., Anand, V. K., Hiltzik, D., Schwartz, T. H., 2007, Safety Of Low-Dose Intrathecal Fluorescein In Endoscopic Cranial Base Surgery, *Neurosurgery*, 61, 161-5.

Power, D., Larson, I., Hartley, P., Dunstan, D. and Boger, D. V., 1998, Atomic Force Microscopy Studies on Hydroxypropylguar Gels Formed under Shear, *Macromolecules*, 31, 8744-8748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Rossi, N. A. A., Constantinescu, I., Kainthan, R. K., Brooks, D. E., Scott, M. D., Kizhakkedathu, J. N., 2010, Red Blood Cell Membrane Grafting Of Multi-Functional Hyperbranched Polyglycerols, *Biomaterials*, 31:4167e78.

Riout, M., 2015, Hematite-Based Epitaxial Thin Films As Photoanodes For Solar Water Splitting, *Scientific Figure on ResearchGate*.

Saatchi, K., Soema, P., Gelder, N., Misri, R., McPhee, K., Baker, J. H. E., Reinsberg, S. A., Brooks, D. E. and Häfeli, U. O., 2012, Hyperbranched Polyglycerols as Trimodal Imaging Agents: Design, Biocompatibility and Tumor Uptake, *Bioconjugate Chemistry*, 23, 372–381.

Saatchi, K., Gelder, N., Gershkovich, P., Sivak, O., Wasan, K. M., Kainthan, R. K., Brooks, D. E , Häfeli, U. O., 2012, Long-Circulating Nontoxic Blood Pool Imaging Agent Based On Hyperbranched Polyglycerols, *International Journal of Pharmaceutics*, 422 418–427.

Saxena, V., Sadoqi, M. and Shao, J., 2006, Polymeric nanoparticulate delivery system for Indocyanine green: Biodistribution in healthy mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 308(1-2), 200–204.

Seth, R., Rajasekaran, K., Benninger, M. S., Batra, P. S., 2010, The Utility Of Intrathecal Fluorescein In Cerebrospinal Fluid Leak Repair, *Otolaryngol Head Neck Surg.*, 143(5):626-32.

Schmitz, K. S. And Phillis, G. D. J., 1991, An Introduction to Dynamic Light Scattering by Macromolecules, *Physics Today*, 44(5), 66 (1991).

Science of Chromotography, ‘‘ Paper Chromatography Ascending Method’’, <http://chromatographyscience.blogspot.com/2012/08/paper-chromatography-ascending-method.html#.XAGNJGgzbiU> (Erişim tarihi: 1 Kasım 2018).

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I., 2014, Optimisation And Stability Assessment Of Solid Lipid Nanoparticles Using Particle Size And Zeta Potential, *Journal of Physical Science*, 25(1), 59.

Shen, Y., He, G., Guo, Y., Xie, H. and Fang, W., 2017, Modified Hyperbranched Polyglycerol as Dispersant for Size Control and Stabilization of Gold Nanoparticles in Hydrocarbons, *Nanoscale Research Letters*, 12:525.

Silliman, C. C., Peterson, V. M., Mellman, D. L., Dixon, D. J., Hambidge, K. M., Lane, P. A., 1993, Iron Chelation By Deferoxamine In Sickle Cell Patients With Severe Transfusion-Induced Hemosiderosis: A Randomized, Double-Blind Study Of The Dose-Response Relationship, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1993 Jul;122(1):48-54.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Son, S., Shin, E. and Kim, B. S., 2015, Redox-Degradable Biocompatible Hyperbranched Polyglycerols: Synthesis, Copolymerization Kinetics, Degradation, and Biocompatibility. *Macromolecules*, 48, 600–609.

Song, Y., Li, S., Song, B., Zhang, Y., Gao, W., Li, N., Fan, K., Ma, J., 2014, The Pathological Changes In The Spinal Cord After Dural Tear With And Without Autologous Fascia Repair, *Eur Spine J.*:23(7):1531-40.

Srivastava, S. C., and Rao Chervu, L., 1984, Radionuclide-Labeled Red Blood Cells: Current Status And Future Prospects, *Seminars in Nuclear Medicine*, 14(2), 68–82.

Steinhilber D., Seiffert, S., Heyman, J. A., Paulus, F., Weitz, D. A., Haag, R., 2011, Hyperbranched Polyglycerols On The Nanometer And Micrometer Scale, *Biomaterials*, 1311-1316.

Sunder, A., Hanselmann, R., Frey, H., & Mülhaupt, R., 1999, Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization, *Macromolecules*, 32(13), 4240–4246.

Şengel-Türk, C. T., & Hasçıçek, C. 2009, Polimerik Nanopartiküler İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Yüzey Modifikasyonu, *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, 38(2), 137-154.

Takan, G., 2014, Siklin Bağımlı Kinaz (Cdk) İnhibitörü Olomoucine'in ¹³¹I İle İşaretlenmesi Ve Terapötik Etkinliğinin İn Vitro Olarak Adenokarsinoma Hücreler Üzerinde İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 95s.

Terzioğlu, G., Keskin, A. Ü., Demirel, G. Y., 2013, Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması, *Turkish Journal of Immunology*, 1(3):74-89.

The Editors of Encyclopaedia Britannica, ‘‘Red Blood Cell’’, <https://www.britannica.com/science/red-blood-cell> (Erişim tarihi: 10 Kasım 2018).

Tokur, O., Aksoy, A., 2017, İn Vitro Sitotoksikite Testleri, *Harran Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi*, 6 (1): 112-118.

Tsien RY, 2003, Imagining imaging's future, *Nature reviews Molecular cell biology*.;Suppl.:Ss16-21. Epub 2003/11/01.

Tyagi, P., Kumar, A., Gupta, D. and Singh, H., 2016, Decorporation of Iron Metal Using Dialdehyde Cellulose-Deferoxamine Microcarrier, *AAPS PharmSciTech*, 156-165.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Umemura, M., Kim, J.-H., Aoyama, H., Hoshino, Y., Fukumura, H., Nakakaji, R., Ishikawa, Y., 2017, The Iron Chelating Agent, Deferoxamine Detoxifies Fe(Salen)-Induced Cytotoxicity, *Journal of Pharmacological Sciences*, 134(4), 203–210.

Ul-haq, M. I., Lai, B. F. L., Chapanian, R., Jayachandran N. Kizhakkedathu, J. N., 2012, Influence Of Architecture Of High Molecular Weight Linear And Branched Polyglycerols On Their Biocompatibility And Biodistribution, *Biomaterials*, 9135-9147.

Yang, H.M., Choi, H. M., Jang, S.C., Han, M. J., Seo, B.K., Moon, J.K. and Lee, K.W., 2015, Succinate Functionalization of Hyperbranched Polyglycerol-Coated Magnetic Nanoparticles as a Draw Solute During Forward Osmosis, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 15(10), 8279–8284.

Ye, L., Letchford, K., Heller, M., Liggins, R., Guan, D., Kizhakkedathu, Jn., 2011, Synthesis And Characterization Of Carboxylic Acid Conjugated, Hydrophobically Derivatized, Hyperbranched Polyglycerols As Nanoparticulate Drug Carriers For Cisplatin, *Biomacromolecules*, 12:145e55.

You, H. X. and Lower, C. R., 1996, Progress In The Application Of Scanning Probe Microscopy To Biology, *Current Opinion in Biotechnology*, 7:78-84.

Yurt Kilcar A. and Biber Muftuler F. Z., 2014, Crucial Role of Radio-Chromatography in Clinical Chemistry of Nuclear Medicine and Radiopharmaceutical Research, *Austin Chromatography*, 1(2), 2p.

Zora, H., 2010, Passiflora'nın ^{99m}Tc-DTPA'nın Biyodağılımı Ve Kan Hücrelerinin Tutulumu Üzerine Etkisi, Yüksek Lisans Tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü. 57s.

Zucco, F., Angelis, D. I., Stammati, A., 1998, Cellular Models for In Vitro Toxicity Testing. In "Animal Cell Culture Techniques", Ed; Clynes M, Springer Verlag, Germany.

Wang, H., Li, X., Wan-Chi, B., Yang, H., Thorling, C., Liu, Y., Touraud, M., Chouane, J. B., Liu, X., Roberts, M. and Liang, X., 2018, Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics, *Theranostics*, 8(5): 1227–1242.

Wang, H., Shen, J., Wang, B., Yu, B., & Xu, Y., 2010, Laser Diode Feedback Interferometry In Flowing Brownian Motion System: A Novel Theory. *Applied Physics B*, 101(1-2), 173-183.

Wang, S., Zhou, S., Yang, S., Ding, B., 2008, Growing Hyperbranched Polyglycerols On Magnetic Nanoparticles To Resist Nonspecific Adsorption Of Proteins, Colloids And Surfaces B: Biointerfaces, 122–126.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wen, J., 2015, The Chemical Modification Of Hyperbranched Polyglycerols For Improved Bioadhesive And Hemostatic Properties, Master Of Science in The Faculty Of Graduate And Postdoctoral Studies, The University Of British Columbia.

Weber, R., & Schweiger, G., 1998, Photon Correlation Spectroscopy On Flowing Polydisperse Fluid-Particle Systems: Theory. *Applied Optics*, 37(18), 4039-4050.

Williams, C. A., 1998, Application Of Photon Correlation Spectroscopy To A Macromolecular System, Physics Department, The College Of Wooster, Wooster, Ohio.

Wilms, D., Wurm, F., Nieberle, J., Böhm, P., Kemmer-Jonas, U. and Frey, H., 2008, Hyperbranched Polyglycerols with Elevated Molecular Weights: A Facile Two-Step Synthesis Protocol Based on Polyglycerol Macroinitiators, *Macromolecules*, 42, 3230-3236.

Wu, H., Yin, T., Li, K., Wang, R., Chen, Y. And Jing, L., 2018, Encapsulation property of hyperbranched polyglycerols as prospective drug delivery systems, *Polymer Chemistry*, 9, 300–306.

Xu, Z., Zhang, Y., Hu, Q., Tang, Q., Xu, J., Wu, J., Kirk, T. B., Ma, D., Xue, W., 2017, Biocompatible Hyperbranched Polyglycerol Modified B-Cyclodextrin Derivatives For Docetaxel Delivery, *Materials Science and Engineering C*, 965–972.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Sibel AY

Doğum Yeri: Konak / İZMİR

Doğum Yılı: 04.08.1994

Öğrenim Durumu:

Lise: Hatice Güzelcan Anadolu Lisesi (2008 - 20012)

Lisans: Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü (2012 - 2016)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği (2017-)

Deneimler:

-Küçükbay Yağ ve Deterjan Sanayi A.Ş./ Laboratuvar Stajı/Haziran 2015

-Çinkanlar Kimyevi Mad.Tic Ve San A.Ş./ İşletme Stajı (AR-GE)/ Haziran 2016

-Uysal Makine Sanayi/ İşletme Stajı (Kalite Kontrol)/ Temmuz 2016

Sertifikalar:

-İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanlığı Eğitim Sertifikası (C sınıfı)/2017/149611

-Yalın Üretim Eğitim Sertifikası (TSC Kariyer)/2017

-Toplam Kalite Yönetimi (İİEnstitü)/2018

-Kalite Yönetim Sistemi İç Tetkikçi Eğitimi (İİEnstitü)/2018

-Kalite Yönetim Sistemi Dökümantasyon Eğitimi (İİEnstitü)/2018

-Kalite Yönetimi Temel Eğitimi (İİEnstitü)/2018