

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**RADYOİŞARETLİ PAKLİTAKSEL TAŞIYICI KATI LİPİD
NANOPARÇACIK FORMÜLASYONU VE RADYOFARMASÖTİK
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

Eser UÇAR

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 08.09.2016

Bornova, İZMİR

2016

Sayın **Eser UÇAR** tarafından **DOKTORA** tezi olarak sunulan “Radyoişaretli Paklitaksel Taşıyıcı Katı Lipid Nanoparçacık Formülasyonu ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 08.09.2016 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Perihan ÜNAK
Raportör Üye	: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ
Üye	: Prof. Dr. Suna TİMUR
Üye	: Prof. Dr. Sarhan SAKARYA
Üye	: Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “**Radyoışaretli Paklitaksel Taşıyıcı Katı Lipid Nanoparçacık Formülasyonu ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

08 / 09 / 2016

Eser UÇAR

ÖZET**RADYOİŞARETLİ PAKLİTAKSEL TAŞIYICI KATI LİPİD
NANOPARÇACIK FORMÜLASYONU VE RADYOFARMASÖTİK
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

UÇAR, Eser

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

Eylül 2016, 102 sayfa

Bu çalışmada, paklitaksel (PTX) yüklü katı lipid nanoparçacıklar sentezlenerek teknesyum-99m (I) trikarbonil kuru ile radyoışaretlenmesi ve bu yapının biyolojik davranışının *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmesi amaçlanmıştır. Solvent difüzyon yöntemi ile hazırlanan katı lipid nanoparçacıkların (SLN) yapısal özellikleri Zeta Potansiyeli Analizi, Dinamik Işık Saçılımı (DLS) yöntemi, Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) görüntüleri ile tanımlanmıştır. Reseptör hedefleme amacıyla nanoparçacıklar, sentezlenen folat polietilen glikol-kolesterol hemisüksinat (Fol-PEG-CHEMS) molekülü ile modifiye edilmiştir. Hedefleyici molekülün karakterizasyonu proton nükleer manyetik rezonans (¹H-NMR) spektroskopisi ile belirlenmiştir. Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların (SLN-PTX) teknesyum-99m (I) trikarbonil kuru, [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺, ile % 90 verimle radyoışaretlenmesi sağlanmıştır. Paklitaksel yüklü radyoışaretili katı lipid nanoparçacıkların (^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX) kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyokromatografi (HPLRC) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX'in biyolojik davranışının *in vitro* yöntemle belirlenmesi amacıyla folat reseptörü pozitif olan folat reseptörü pozitif MCF7 meme (adenokarsinoma) epiteli ve HeLa serviks (adenokarsinoma) epiteli ile folat reseptörü negatif A549 akciğer (karsinoma) epitellerinden oluşan kanser hücre hatları üzerinde inkorporasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX'in MCF7 ve HeLa hücreleri üzerinde A549 hücrelerine kıyasla daha yüksek

bağlanma verimine sahip olduğu görülmüştür. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ 'in *in vivo* biyolojik davranışının belirlenmesi amacıyla sağlıklı dişi Wistar Albino sıçanlar üzerinde biyodağılım ve görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyodağılım ve görüntüleme çalışmaları sonucunda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ 'in folat reseptörü bulduran böbrek dokusunda diğer bölgelere göre daha fazla tutulumu sahip olduğu gözlenmiştir.

In vitro ve *in vivo* çalışmalar sonucunda elde edilen verilerden geliştirilen sistemin (paklitaksel yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıkların) folat reseptörlerine karşı spesifiteye sahip olduğu görülmektedir.

Geliştirilen paklitaksel yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıkların hazırlanması kolay, hedefe yönelik, biyouyumlu ve terapi potansiyeline sahip bir teşhis ajanı geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Katı lipid nanoparçacık, paklitaksel, Tc-99m, ilaç taşıyıcı sistem.

ABSTRACT**FORMULATION OF RADIOLABELED SOLID LIPID NANOPARTICLES FOR PACLITAXEL DELIVERY AND DETERMINATION OF RADIOPHARMACEUTICAL POTENTIAL**

UÇAR, Eser

PhD Thesis in Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Serap TEKSÖZ

September 2016, 102 pages

In current study, it is aimed to synthesize paclitaxel (PTX) loaded solid lipid nanoparticles, to radiolabel these nanoparticles with technetium-99m tricarbonyl core and to evaluate its biological behaviour utilizing *in vitro* and *in vivo* methods. Solid lipid nanoparticles (SLN) were synthesized by solvent diffusion method. Structural characterization of SLN was performed by Zeta Potential Analysis, Dynamic Light Scattering (DLS) method, Transmission Electron Microscope (TEM) and Scanning Electron Microscope (SEM) imaging. Nanoparticles were modified with folate derivative polyethylene glycol-cholesterol hemisuccinate (Fol-PEG-CHEMS) molecule to target folate receptors. Characterization of targeting molecule was performed by proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy ($^1\text{H-NMR}$). Radiolabeling of PTX loaded solid lipid nanoparticles with technetium (I) tri carbonyl core [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ accomplished with 90 % efficiency. Thin Layer Radiochromatography (TLRC) and High Performance Liquid Radiochromatography (HPLRC) methods were used for quality control of paclitaxel loaded radiolabeled solid lipid nanoparticles ($^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$). *In vitro* biological behavior of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ investigated with incorporation studies on folate receptor positive breast (MCF7), cervix (HeLa) and folate receptor negative lung (A549) carcinoma cell lines. Higher uptake values of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ were determined on MCF7 and HeLa cell lines according to A549 cell line. Biodistribution and imaging studies were conducted to investigate *in vivo* behaviour of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ on female Wistar Albino rats. According to results of *in vivo* studies, it was observed that

$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ have higher uptake in folate receptor positive kidney tissue considering other sites.

According to obtained data from *in vitro* and *in vivo* studies, it is seen that the improved system (paclitaxel loaded radiolabeled solid lipid nanoparticles) is specific to folate receptors.

It is concluded that the system improved in present study will make contribution to improve an easy prepared, target specific and biocompatible diagnostic agent with therapy potential.

Key Words: Solid lipid nanoparticles, paclitaxel, Tc-99m, drug delivery system



TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım süresince beni her zaman destekleyen, güvenen, bilgi ve tecrübesiyle beni yönlendiren danışman hocam Sayın Prof. Dr. Serap TEKSÖZ' e sonsuz saygı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Değerli görüş ve önerileriyle tez çalışmama yaptıkları katkılardan dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK ve Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR' a, enstitümüzün laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Turgay KARALI' ya teşekkür ederim.

Erasmus programım süresince sentez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Centro de Ciências e Tecnologias Nucleares (C2TN)' deki hocalarım Prof. Dr. Isabel Santos, Prof. Dr. António Paulo ve Dr. Célia Fernandes' e bu süreçte bana olan yardımları, yakın ilgileri ve yol gösterici yaklaşımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayvan deneylerini gerçekleştirebilmem için laboratuvarlarından ve görüntüleme cihazlarından yararlanma şansını bana sundukları için Celal Bayar Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Elvan Sayıt BİLGİN' e ve Dr. Yasemin PARLAK' a teşekkür ederim.

Büyük bir özveriyle bana değerli zamanını ayırıp yardımını esirgemeyen, bilgi ve tecrübelerini paylaşan, birlikte çalıştığım ve tanıdığım için kendimi her zaman şanslı hissedeceğim başta Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF olmak üzere, Doç. Dr. İlker MEDİNE' ye, Doç. Dr. Kübra DURKAN' a, Dr. Ayfer YURT KILÇAR' a, Ar. Gör. Özge KOZGUŞ GÜLDÜ' ye ve Kadir ARI' ya çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım, eğitimim ve daha da önemlisi hayatım boyunca beni anlayış ve hoşgörü ile karşılayan, destek olan aileme ve arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca tezimi 113S369 No'lu 1001 araştırma projesi kapsamında destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu' na teşekkür ederim.

Eser UÇAR



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Nanoteknoloji	5
2.2 İlaç Taşıyıcı Nano Sistemler	7
2.2.1 Katı Lipid Nanoparçacıklar	11
2.3 Spesifik İlaç Hedefleme.....	12
2.3.1 Pasif Hedefleme	13
2.3.2 Aktif hedefleme	14
2.4 Paklitaksel.....	16
2.5 Radyofarmasötikler.....	17
2.6 Moleküler Görüntüleme Yöntemleri	19

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.7 Teknesyum-99m (^{99m} Tc) Kimyası.....	23
2.8 ^{99m} Tc İşaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri.....	25
2.9 Nanoparçacıklar İçin Radyoişaretleme Stratejileri.....	27
2.10 Nanoparçacıkların Yapı ve Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi.....	30
3. MATERYAL VE METOD	34
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	34
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar	34
3.1.2 Kullanılan Cihazlar	35
3.2 Folat Türevi Sentezi Basamakları	36
3.2.1 Fol-PEG-Amin Sentezi	37
3.2.2 CHEMS-NHS Sentezi	37
3.2.3 Fol-PEG-CHEMS Sentezi	37
3.3 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyon Basamakları.....	38
3.3.1 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların (SLN-PTX) Sentezi	38
3.3.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları	39
3.3.3 İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi.....	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.4 Radyoışaretleme Çalışmaları	41
3.4.1 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Korunun Sentezi	41
3.4.2 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Korunun Kalite Kontrolü.....	41
3.4.3 Katı Lipid Nanoparçacıkların $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Koru ile Radyoışaretlenmesi ...	43
3.5 Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları.....	44
3.5.1 <i>İn Vitro</i> Çalışmalar	44
3.5.2 <i>İn Vivo</i> Çalışmalar	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	53
4.1 Folat Türevi Sentez Basamakları.....	53
4.1.1 Fol-PEG-Amin Sentezi.....	53
4.1.2 CHEMS-NHS Sentezi	54
4.1.3 Fol-PEG-CHEMS Sentezi	55
4.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyon Basamakları	57
4.2.1 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların (SLN-PT) Sentezi.....	57
4.2.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyon Basamakları	58
4.2.3 Lipid Nanoparçacıkların İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi.....	63

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3 Radyoışaretleme Çalışmaları	65
4.3.1 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Korunun Hazırlanması	65
4.3.2 Katı Lipid Nanoparçacıkların $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Kori ile Radyoışaretleme ..	67
4.4 Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları	69
4.4.1 <i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	69
4.4.2 <i>İn Vivo</i> Çalışmalar.....	78
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	93
ÖZGEÇMİŞ	102

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Nanoparçacık sentezlerinde kullanılan yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımları	7
2.2 İlaç taşıyıcı sistem tasarımı çalışmalarında kullanılan nanoparçacıklar ve boyut aralıkları	8
2.3 Kanser teşhis ve tedavisi için geliştirilen çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler	9
2.4 Pasif ve aktif hedefleme.....	13
2.5 Artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi.....	14
2.6 Folik asit molekül yapısı	16
2.7 Paklitaksel molekül yapısı.....	17
2.8 Biyomedikal uygulamalarda kullanılan görüntüleme yöntemleri	20
2.9 ^{99}Mo ' in $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' a bozunumu	23
2.10 Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı	27
2.11 Nanoparçacıklar için radyoişaretleme yöntemleri.....	28
2.12 Bifonksiyonel şelatlayıcı ajanlar	29
2.13 MALVERN ZETASIZER NANO ZS Model DLS cihazı.....	32
3.1 Katı lipid nanoparçacıkların hazırlanması sırasındaki mekanik karıştırma pH ayarlama ve homojenizasyon aşamaları	39
3.2 MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinin inkübasyonu.....	45

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

3.3	MCF7, HeLa ve A549 hücreleri ile yapılan sitotoksosite çalışması	46
3.4	İnkorporasyon çalışmasında kullanılan 24' lük flasklar	46
3.5	A549, HeLa ve MCF7 hücreleri üzerinde zamana karşı bağlanma veriminin incelenmesi deneyinde kullanılan 24' lük flaskların genel yapısı.....	47
3.6	FITC ile işaretli olan SLN-PTX' in floresan görüntüleme çalışmaları ...	48
4.1	Fol-PEG-Amin sentezi	53
4.2	Fol-PEG-Amin için ¹ H NMR spektrumu.....	54
4.3	CHEMS-NHS sentezi	54
4.4	CHEMS-NHS için ¹ H NMR spektrumu	55
4.5	Fol-PEG-CHEMS sentezi	55
4.6	Fol-PEG-CHEMS için ¹ H NMR spektrumu	56
4.7	Folik asiti için HPLC kromatogramı	57
4.8	Fol-PEG-CHEMS için HPLC kromatogramı.....	57
4.9	Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği	58
4.10	Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların zeta potansiyeli dağılım grafiği.....	59
4.11	Paklitaksel yüklü lipid nanoparçacıklara ilişkin SEM görüntüsü	60
4.12	Paklitaksel yüklü lipid nanoparçacıklara ilişkin TEM görüntüsü (50 nm ölçekte)	61

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 Paklitaksel yüklü lipid nanoparçacıklara ilişkin TEM görüntüsü (100 nm ölçekte).....	61
4.14 Paklitaksel (PTX) için HPLC kromatogramı	63
4.15 Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar (PTX-SLN) için HPLC kromatogramı	63
4.16 Paklitaksel kalibrasyon eğrisi	64
4.17 $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ trikarbonil korunun elde edilmesi.....	65
4.18 (a) $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ve (b) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları	66
4.19 $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerine ilişkin HPLC kromatogramı	67
4.20 (a) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ve (b) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için piridin/asetik asit/su banyosundaki TLRC kromatogramları.....	68
4.21 $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ için HPLRC kromatogramı	69
4.22 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için HPLRC kromatogramı.....	69
4.23 MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinde PTX ve SLN-PTX için konsantrasyon ve 24. Saat % canlılık değerleri.....	71
4.24 MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinde PTX ve SLN-PTX için konsantrasyon ve 48. Saat % canlılık değerleri.....	72
4.25 Radyoişaretleli SLN-PTX' in MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı bağlanma verimerinin karşılaştırılması	74

ŞEKİLLER DİZİNİ (DEVAM)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 FITC ile işaretli SLN-PTX' in MCF7 hücreleri üzerindeki görüntüleri .	75
4.27 FITC ile işaretli SLN-PTX' in HeLa hücreleri üzerindeki görüntüleri...	75
4.28 FITC ile işaretli SLN-PTX' in A549 hücreleri üzerindeki görüntüleri...	76
4.29 SLN-PTX' in MCF7 hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri	77
4.30 SLN-PTX' in HeLa hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri.	77
4.31 SLN-PTX' in A549 hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri	78
4.32 Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 30 dakika dinamik gama kamera görüntüleri.....	79
4.33 Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 30., 60. ve 90. dakika statik gama kamera görüntüleri	81
4.34 Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 120., 180., 240. dakikalara ve 24. saate ilişkin statik gama kamera görüntüleri.....	82
4.35 Normal sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ sistemine ait %ID/g-Bg oranı	86
4.36 Folat reseptörü (FR) doyurulmuş sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ sistemine ait %ID/g-Bg oranı	87
4.37 Folat reseptörlerinin bulunduğu rapor edilen rahim, yumurtalık, meme ve böbrek organları için normal ve folik asit ile doyurulmuş sıçanlardaki tutulumların karşılaştırıldığı grafikler.	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 PET görüntüleme de kullanılan radyonüklitler ve özellikleri.....	21
2.2 SPECT görüntüleme de kullanılan radyonüklitler ve özellikleri.....	22
3.1 Fol-PEG-CHEMS için HPLC çözgen akış sistemi.....	38
3.2 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ için HPLC çözgen akış sistemi	42
4.1 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerine ilişkin R_f değerleri	66
4.2 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için R_f değerleri (n=5)	67
4.3 MCF7 hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri.....	70
4.4 HeLa hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri	70
4.5 A549 hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri	71
4.6 PTX için ng/mL birimi ile IC50 değerleri	72
4.7 Radyoişaretli SLN-PTX' in MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi	73
4.8 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^{+}$ un MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi	74
4.9 Dişi Albino Wistar sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in % ID/g (organ)- Bg oranı verileri (normal).....	85
4.10 Dişi Albino Wistar sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in % ID/g (organ)- Bg oranı verileri (FR doyurulmuş)	86

ÇİZELGELER DİZİNİ (DEVAM)ÇizelgeSayfa

4.11 Varyans analizi sonucuna göre bazı organlara ait reseptör ile ilişkilerine ilişkin P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri 90



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİKısaltmalar

PTX	Paklitaksel
CHEMS-NHS	Kolesteril hemisüksinat – N-hidroksisüksinimid
Fol-PEG-CHEMS	Folat-polietilen glikol-kolesteril hemisüksinat
SLN-PTX	Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskopi
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
ZP	Zeta Potansiyeli
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$	Teknesyum(I) trikarbonil kuru
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$	Teknesyum(I) trikarbonil kuru ile radyoişaretli paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar
FITC	Fluorescein isothiocyanate
% ID/g	Enjekte edilen doz / gram (organ)
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

1. GİRİŞ

Kemoterapinin önemli bir kısmını oluşturan sitotoksik ilaçlar, kullanımlarının uzun geçmişine ve geliştirilen birçok yeni ilaç ve diyetle rağmen diğer ilaç türlerine göre düşük spesifite, yüksek toksisite ve ilaç direncine karşı hassasiyet gibi problemleri beraberinde getirdiklerinden tedavilerde olumsuz sonuçlar doğurmaktadırlar (Wong et al., 2007). Bu durum uygulanan doz miktarını kısıtlamakta ve tedavinin istenilen düzeyde gerçekleşmesini engellemektedir (Cho et al., 2008).

Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler, tedavi amacıyla verilen sitotoksik ilacın tümöre spesifik olması ve yan etkilerinin oluşmaması için geliştirilen çözümlerden biri olarak umut vaat etmektedir. Mikron altı boyut aralığında olmaları nedeniyle vücut içerisinde birçok biyolojik bariyeri aşabilmekte aynı zamanda sitotoksik ilacın hedef bölgede kontrollü salımına olanak sağlamaktadır (Beloqui et al., 2014). Günümüze kadar, biyodağılımı ve hedef bölgedeki birikimi geliştirmek amacıyla lipozomlar, polimerler, miseller, antikorlar gibi birçok farklı ilaç taşıyıcı sistem değerlendirilmiştir ve mikrometrenin altında büyüklüğe sahip bu taşıyıcı materyallerin, terapötik girişimlerdeki etkinlik ve toksisite dengesini geliştirdiği ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir (Goldberg et al., 2012).

Lipofilik ilaçlar için taşıyıcı sistem olarak ilk olarak 1960 yılında Wretling tarafından yağ emülsiyonları geliştirilmiştir. İlk ticari ürünler ise 1970' lerde piyasaya sürülmüştür. Bu sistemlerin avantajı enjeksiyon bölgesindeki yan etkileri azaltmalarıdır. Ancak yine bu sistemler de fiziksel kararlılığın yeterince iyi olmamasından kaynaklanan ilaç sızıntısı, aglomerasyon(topaklaşma) gibi istenmeyen özelliklere sahiptirler (Wissing, 2004).

Bir diğer ilgi çekici taşıyıcı sistem ise lipozomlardır. İlk olarak Bangham ve arkadaşları tarafından yüksek etkiye sahip ilaçların toksisitesini azaltmak ve tedavi etkinliğini arttırmak amacıyla geliştirilip ilaç taşıyıcı sistem olarak sunulmuştur (Bangham and Horne, 1964). Ambisome, DaunoXome ve Doxil doksanlı yıllarda piyasaya çıkan ticari ürünlerdir. Sınırlı fiziksel stabilite, ilacın taşıyıcıdan dışarı sızması, ekonomik olarak kabul edilebilir olmayışı lipozomal formülasyonların geliştirilmesini engellemiştir (Wissing, 2004).

Bir başka inovatif ilaç taşıyıcı sistem ise spesifik hedefleme ve kontrollü ilaç salım özelliklerine sahip polimerik nanoparçacıklardır. Geniş ölçekte

üretimleri ve sitotoksik etkileri gibi tartışılan durumlar nedeniyle farmasötik pazarında yer bulamamıştır.

90' lı yılların başlarında araştırmacılar diğer taşıyıcı sistemlerin avantajlarını bir arada bulunduran ve olumsuzluklarını minimuma indiren katı lipidlerle hazırlanan nanoparçacıklar üzerinde çalışmaya odaklanmışlardır. Vücut içerisinde katı halde kalarak iyi bir stabilite göstermesi ve hazırlama aşamasında organik çözücü kullanılmaması gibi özellikleri temel alınarak katı lipid nanoparçacıklar adı verilen formülasyon üzerinde çalışılmıştır. Katı lipid nanoparçacıkların ilk olarak ortaya çıkış tarihinden günümüze kadar geçen sürede bu konudaki araştırma sayısı giderek artmıştır. Bunun nedenleri; i) lipid nanoparçacıkların yeni formülasyonların geliştirilmesi ile dezavantajlarının giderilmesi, ii) lipid nanoparçacıklarla gerçekleştirilen bir çok uygulamanın ortaya çıkmasıdır (Beloqui et al., 2015). Farklı uygulama yolları için geliştirilen katı lipid nanoparçacıklar (SLN) *in vivo* ve *in vitro* olarak incelenmiştir. İlk ürün, nemlendirici losyon olarak Polonya'da satışa çıkmıştır (Wissing et al., 2004).

Katı lipid nanoparçacıkların stearik asit kullanılarak sulu ortamda çözücü difüzyon yöntemi ile hazırlanması ilk olarak 2002 yılında Hu ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş (Hu F.Q. et al., 2002), 2005 yılında ise stearik asite farklı konantrasyonlarda oleik asit karıştırılarak oluşan katı lipid nanoparçacıkların fizikokimyasal özellikleri ve uygulanabilirliği değerlendirilmiştir (Hu F.Q. et al., 2005).

2004 yılında Wissing ve arkadaşlarının yaptığı değerlendirmede ilaçların parenteral uygulaması için katı lipid nanoparçacıkların kullanımı ele alınmıştır. Çeşitli türdeki katı lipid nanoparçacıkların yapısal farklılıkları belirtilmiştir. Ayrıca biyolojik aktiviteleri ve toksisitenin yanı sıra farmakokinetik profilleri gibi biyofarmasötik açıdan durumları değerlendirilmiştir (Wissing S. A. et al., 2004).

2011' de yapılan çalışmada Andreozzi ve arkadaşları tarafından katı lipid nanoparçacıklar PET görüntülemesinde kullanılmak üzere Lipid-PEG-BAT şelatı kullanarak Cu-64 radyonüklidi ile işaretlenmiştir. İntravenöz uygulama sonrasında 48 saate kadar zaman parametresi kullanılarak gerçekleştirilmiş PET görüntüleme ve biyodağılım çalışmaları sonuçları karşılaştırılmıştır (Andreozzi E. Et al., 2011).

Teknesyum-99m, elverişli görüntüleme özellikleri ve kolay elde edilebilir olması nedeniyle ilaçların olduğu gibi nanoparçacıkların radyoışretlenmesinde de tercih edilen bir radyonüklittir (Banerjee I., 2014). Ballot ve arkadaşları lipid

nanokapsüllerin radyofarmasötik taşıyıcı potansiyelini araştırmak amacıyla sağlıklı sıçanlarda biyodağılımını incelemişlerdir. Lipofilik tiyobenzoat ligandını renyum-188 ve teknesyum-99m ile ayrı ayrı radyoışaretledikten sonra lipid nanokapsüller içerisine hapsederek biyodağılımlarını karşılaştırmışlardır (Ballot S. et al., 2006). Teknesyum-99m ile radyoışaretili katı lipid nanoparçacıkların kullanıldığı bir başka çalışmada ise farklı uygulama yollarının biyodağılıma etkisi incelenmiştir (Reddy L. H. et al., 2005).

Videira ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise katı lipid nanoparçacıklar akciğerlere ve lenfatik sisteme ilaç taşıyıcı olarak geliştirilmiştir. Böylece fagositik sistemdeki alıkonmasını azaltmak ve tümörlü bölgedeki seçicilik ve tutulumu optimize etmek amaçlanmıştır. Bu çalışmada Tc-99m ile işaretli heksametilpropilenamin oksim (HMPAO) içeren katı lipid nanoparçacıklar pulmoner yolla uygulanmıştır (Videira M.A. et al., 2002).

Biyolojik olarak efektif konsantrasyondaki sitoksik ajanların hormon, antikor ve vitamin türevleri, anti kanser ilaçlarla konjuge edilerek tümöre spesifik bir ilaç geliştirilmesi için yapılan çalışmalar hedefe yönelik teşhis ve tedavi açısından oldukça önemlidir. Bunların arasında nükleik ve amino asitlerin biyosentezine katılarak hücrelerin yaşamında önemli bir role sahip olan folik asit ön plana çıkmaktadır. 2008’ de Xiang ve arkadaşları, hazırlanan lipozomları folat reseptörlerine hedefleme amacıyla yeni bir folat türevi ligand sentezlemiş ve geliştirmişlerdir (Xiang G. et al., 2008). Yine aynı yıllarda Xu ve arkadaşları çalışmalarında hepatoselüler karsinoma tedavisinde antitümör etkinliğin artırılmasını amaçlamışlardır. Yapı olarak paklitaksele benzeyen bir taksoid olan docetakseli, hepatoma hücrelerindeki asiyaloglikoprotein (ASGP) reseptörlerine hedeflemek için dioleoil fosfatil etanol amin (DOPE) ile yüzeyi modifiye edilmiş katı lipid nanoparçacıklara hapsederek tedavi performansının olumlu yönde değiştiğini gözlemlemişlerdir (Xu Z. et al., 2009).

Günümüzde SLN'lerin gama sintigrafisinde görüntüleme ajanı olarak kullanımı büyük ilgi uyandırmaktadır. Bu çalışmanın amacı, aktif hedefleme özelliğine sahip ve görüntüleme radyofarmasötiği potansiyeli olan nanoyapılı lipid ilaç taşıyıcı bir sistem geliştirilmesidir.

Nanoparçacıkların yapısında düzensiz kristal matris oluşumunun ilaç hapsedme verimini artırdığı ve ilacın taşıyıcı sistemden dışarı sızmasını engellediği raporlanmıştır (Hu F.Q. et al., 2005). Bu çalışmada çok fonksiyonlu ilaç taşıyıcı

sistem olarak düzensiz kristal matris oluşturulması amacıyla katı ve sıvı olmak üzere iki farklı lipid kullanılarak katı lipid nanoparçacıklar (SLN) hazırlanmıştır. Ardından bu ilaç taşıyıcı sistem içerisine hapsedilecek antikanser ilaç modeli olarak rutinde kullanılan paklitaksel (PTX) seçilmiş ve SLN'lara yüklenmiştir. Ayrıca, bu ilaç taşıyıcı sistemin folat reseptörlü dokulara taşınması amacıyla katı lipid nanoparçacıkların yüzeyi sentezlenen bir folat türevi (Fol-PEG-CHEMS) ile modifiye edilmiştir. Sonuç olarak, PTX yüklü folat reseptörlerine spesifik SLN'lar hazırlanmıştır. Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların boyut ve morfolojileri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM), Dinamik Işık Saçılımı (DLS) ve Zeta Potansiyeli (ZP) analizleri ile belirlenmiştir.

Sentezlenen paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar (SLN-PTX) teknesyum-99m (I) trikarbonil koru, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$, ile radyoişaretlenmiş ve radyoişaretli SLN-PTX için İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyokromatografi (HPLRC) yöntemleri kullanılarak kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen sistemin biyolojik davranışı *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle incelenmiştir.

Bu çalışmada sentezlenen nanoyapılı lipid ilaç taşıyıcı sistemin paklitaksel gibi sitotoksik ajanların spesifik dokularda tutulumu ve tümör görüntüleme özellikli ilaç taşıyıcılarının tasarımı için yararlı olabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

İçerisinde bulunduğumuz yüzyılı önemli ölçüde etkileyeceği öngörülen nanoteknoloji, mikron altı sistemlerin üretim, tasarım, karakterizasyon ve uygulamalarının yanı sıra bu nano yapıların daha büyük sistemleri oluşturması ile ilgilenen multidisipliner bilim dalıdır. ABD Ulusal Nanoteknoloji İnsiyatifi (National Nanotechnology Initiative) belgesinde “Maddenin belirgin özelliklere bağlı yeni uygulamaların gerçekleştirilebileceği yaklaşık 1-100 nm boyutlarında anlaşılması ve kontrolü” şeklinde; British Royal Society ve Royal Academy of Engineering’ in ortak hazırladıkları raporda ise “Nanometre ölçeğinde şekil ve büyüklüklerin kontrolü ile yapıların, donanımların ve sistemlerin tasarımlarının, tanımlamalarının üretim ve uygulamaları” şeklinde tanımlanmaktadır (TÜBİTAK MAM, 2010).

Nanometre terimi ilk olarak kolloid kimyasının temellerini atan ve 1925 yılında kimya Nobel ödülü kazanmış Richard Zsigmondy tarafından parçacıkları karakterize etmek amacıyla ileri sürülmüştür (Hulla et al., 2015). Nanoteknolojinin babası olarak kabul edilen Richard Feynman’ ın 1959’ da Amerikan Fizik Derneği’ nin toplantısında malzemelerin atomik düzeyde işlenmesi hakkında yaptığı “There is Plenty of Room at the Bottom” başlıklı konuşması bilim dünyasına yeni bakış açıları kazandırmıştır. “Nanoteknoloji” kavramı Feynman’ ın konuşmasından 15 yıl sonra Japon bilim adamı Norio Taniguchi tarafından ortaya atılmıştır (Whatmore, 2006). Nanoteknolojinin altın çağı 1980’ lerde Kroto, Smalley ve Curl tarafından yeni bir karbon formu – karbon 60 molekülü – olan fullerenin bulunması ile başlamıştır. Bir başka Japon bilim adamı Iijima’ nın karbon nanotüpleri geliştirmesi ile nanoteknoloji bilimi daha da ileriye gitmiştir.

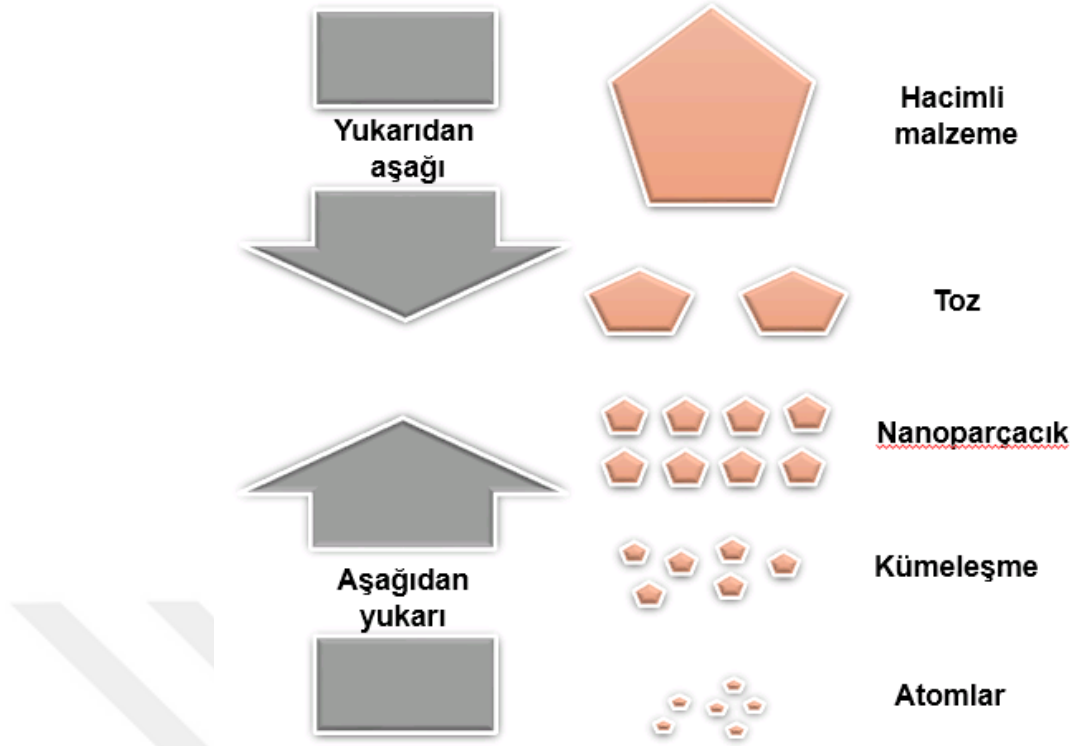
Günümüzde nanoteknoloji alanındaki bilimsel ve teknolojik etkinlikler dünya çapında yaygın bir şekilde sürdürülmektedir. Yaklaşık yarım yüzyıllık süreçte nanoteknoloji, dikkat çekici endüstriyel uygulamaların dayanağı haline gelmiştir. Gıda ve kozmetik sektörlerinde üretim, paketlenme, raf ömrü, biyouyumluluk vb. geliştirilmesi için nanomateryallerin kullanımı çarpıcı biçimde artmıştır (Hulla et al., 2015). Devletler uygulamaların çeşitliliği nedeniyle nanoteknoloji araştırmalarına büyük yatırımlar yapmıştır. 21. Yüzyılda ülkeler için bir güç göstergesi olacağı düşünülen nanoteknoloji araştırmaları için ABD,

Japonya, AB ülkeleri, Kore, İsrail, Güney Afrika Birliği, Kanada gibi ülkelerde ulusal araştırma merkezleri kurulmuştur. Ülkemizde de 5 Ekim 2005'te Bilkent Üniversitesi tarafından sunulan bir proje ile Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) 2006 Haziran ayında hizmete girmiştir. Üniversitelerin yanı sıra birçok özel sektör kuruluşunun da bu alana ilgisi ve yatırımları ile dünyadaki gelişmelere paralel şekilde ülkemizde de projeler ve etkinlikler yürütülmektedir.

Maddeyi nanometre düzeyinde kontrol etmekteki amaç maddenin kimyasal yapısı değişmeden bu düzeyde bazı temel madde sabitlerinde farklılıklar gösterebilmesidir. Bu kuantum etkisi olarak da bilinmektedir. Malzemenin nanoboyutta değişim gözlenebilen özellikleri;

- Özgül yüzey alanı
- Manyetik özellikler
- Optik özellikler
- Elektriksel özellikler
- Termal özellikler
- Kimyasal özellikler
- Mekanik özellikler şeklinde özetlenebilir (Gao et al., 2004; Xie et al., 2005). Örnek verecek olursak normal boyutlarda mat olan bakır, nano boyutlarda saydam görünmekte ve elektriksel iletkenliğini kaybetmektedir. Normalde yalıtkan olan silikon, nano seviyede iletken özellik kazanmaktadır. Gümüş nano boyutlarda anti-bakteriyel, anti-mikrobik özellikler kazanmaktadır.

Nanoparçacıkların üretim yöntemleri **Şekil 2.1**'deki gibi yukarıdan-aşağı ve aşağıdan-yukarı olarak gruplanmaktadır. Yukarıdan aşağıya yaklaşımında hacimsel malzeme mekanik ve kimyasal işlemlerle nano boyuta indirilir. Aşağıdan yukarıya yöntemlerde ise kimyasal yöntemlerle atom veya molekül boyutundaki maddeler büyütülerek nanoparçacıklar oluşturulur (Ateş, 2015).

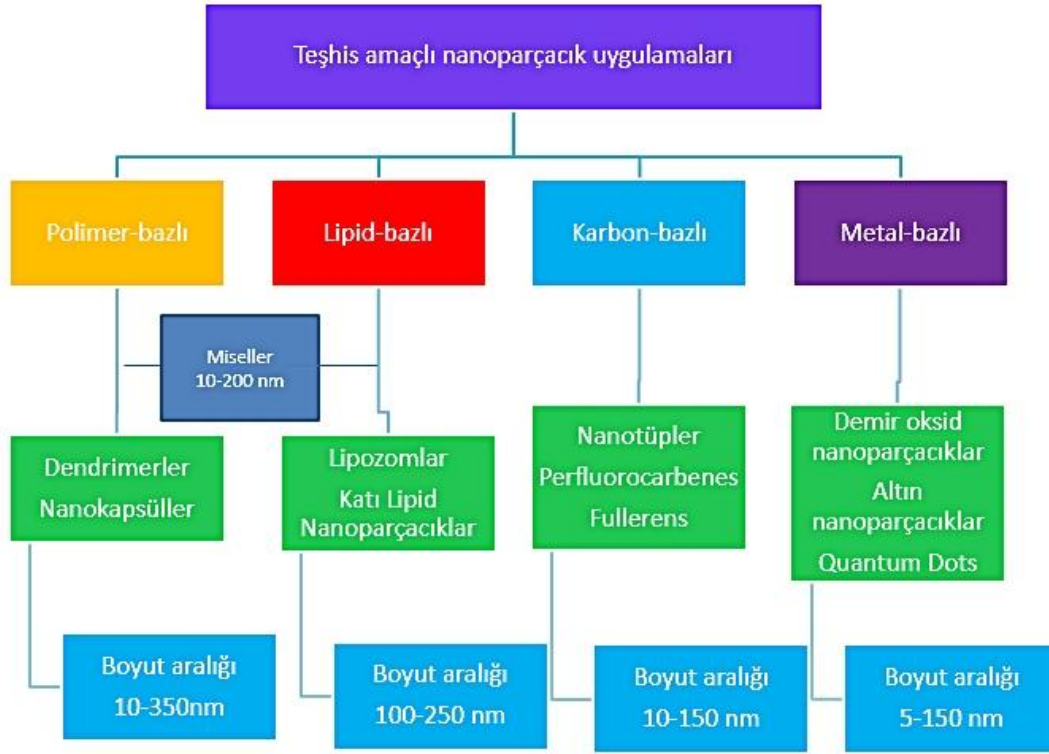


Şekil 2.1. Nanoparçacık sentezlerinde uygulanan yukarıdan aşağı ve aşağıdan yukarı yaklaşımları.

Bu yöntemlerle hazırlanan nanoparçacıkların ilaç alanındaki uygulamaları ilaç taşıyıcı sistemlerin ve diagnostik cihazların geliştirilmesi, gen tedavisi gibi konuları da kapsamaktadır. Nanoteknolojinin farmasötik alana girmesiyle birlikte nano tıpta nanoküreler, polimerik taşıyıcı sistemler, dendrimerler, miseller, lipozomlar, emülsiyonlar, nanoparçacıklar ve nanokapsüller gibi farklı çeşitlilikteki taşıyıcı sistemler araştırılmaya ve kullanılmaya başlanmıştır. Bu nanoparçacıklar anti-viral, anti-tümör veya anti-kanser ajanlar olarak kullanılmaktadır.

2.2 İlaç taşıyıcı nano sistemler

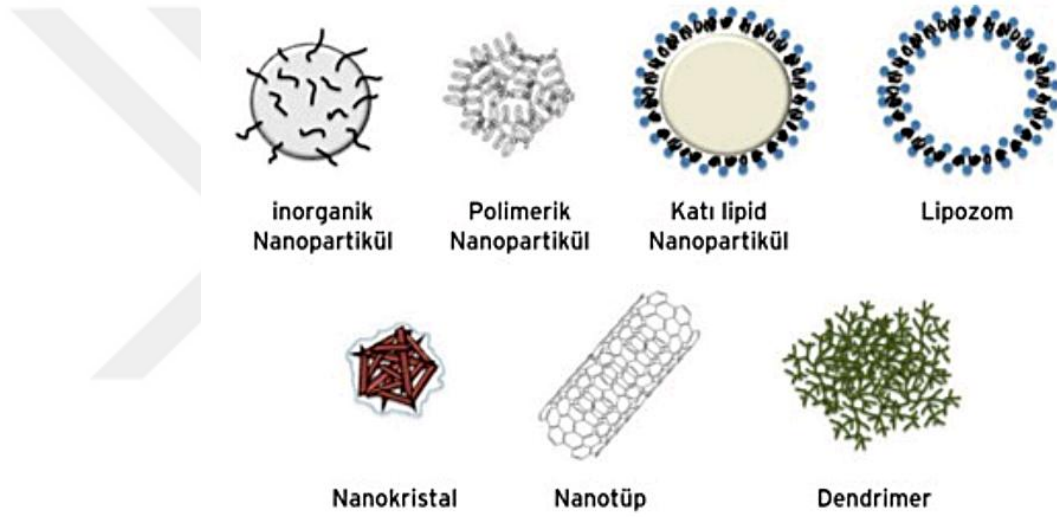
Son dönemde yapılan çalışmalarda çeşitli materyal ve tekniklerle hazırlanan, birden fazla özelliği bir arada bulunduran yeni ilaç taşıyıcı sistem tasarımlarına yönelik ilginin artan bir eğilime sahip olduğu görülmektedir. Bunlar arasında en çok öne çıkan tür nanoparçacıklar olurken bu yöntem kanser teşhis ve tedavisi açısından çok önemli bir etki oluşturmuştur. Bu nedenle nanoparçacık hazırlama ve karakterizasyon tekniklerinin geliştirilmesi önem kazanmıştır. **Şekil 2.2**'de ilaç taşıyıcı sistem tasarımı çalışmalarında kullanılan nanoparçacıklar boyutları ile birlikte verilmiştir.



Şekil 2.2. İlaç taşıyıcı sistem tasarımı çalışmalarında kullanılan nanoparçacıklar ve boyut aralıkları (De Barros et al., 2012).

Bu çalışmalarda kullanılan polimerler (polimerik nanoparçacıkları, miseller, dendrimerler), lipidler (lipozomlar), virüsler (viral nanoparçacıklar), organometalik bileşikler (nanotüpler) gibi materyaller, nanometre düzeyindeki boyutları nedeniyle kanser hücrelerinin yüzeyinde ve içerisindeki biyomoleküller ile olağanüstü etkileşimler göstermektedirler. Örnek olarak, 10-100 nm arasında parçacık çapına sahip nanoparçacıklar artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisine (EPR) bağlı olarak hedef bölgede ideal tutulum sergilemektedir. Buna ek olarak, yüzey alanı/hacim oranının büyük olması, nanoparçacık yüzeyinin, taşıyıcı sisteme birden fazla özellik kazandıracak şekilde, farklı yapılarla modifiye edilmesine olanak sağlar. Bu şekilde hedef bölgede daha yüksek bağlanma verimi elde edilebilir. Nanoparçacıklara bir radyonüklid bağlanması durumunda nükleer görüntüleme için yeni moleküler prob türleri oluşturulabilir. Radyoışaretli nanoparçacıkların fizyolojik ortamda kararlı olduğunu düşünecek olursak, nanoparçacıkların biyodağılımı, radyoizotoptan salınan aktivitenin ölçülmesi ile belirlenerek tümör reseptör seviyeleri, tümör enzim aktiviteleri gibi biyolojik olaylar açığa çıkarılabilir (Xing et al., 2014).

Günümüzde modern bilimin ilgi odaklarından biri olan ilaç taşıyıcı nanoparçacık yaklaşımının arkasındaki mantık, kontrollü salım ve hedefleme gibi fonksiyonlar yardımıyla antitümör etkiyi artırıp sistemik yan etkileri en aza indirmektir. Doxil™, Abraxane™ gibi nanoparçacık formülasyonları, ilaç etkinliğini artırıp istenmeyen yan etkileri azaltarak bu sistemlerin klinik olarak uygunluğunu göstermiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış ve halen geliştirilme aşamasında olan nanoboyuttaki bu ürünler, ilk ilaç hapsedilmiş lipozomlar ve basit polimerik yapılardan daha karmaşık çok fonksiyonlu nanosistemlere kadar geniş bir çeşitliliğe sahiptir (Brigger et al., 2002; Janib et al., 2010; Amiji, 2006; Yerlikaya, 2013). Şekil 2.3' te kanser teşhis ve tedavisi için geliştirilen çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Kanser teşhis ve tedavisi için geliştirilen çeşitli ilaç taşıyıcı sistemler (Nanobülten, Mayıs 2011).

Polimerik Miseller: 100 nm'nin altında boyutlara sahip polimerik miseller hidrofobik kor, hidrofilik kabuk ve amfilik blok kopolimerlerden oluşmaktadır. İlacın lipofilitesine göre polimerik misellerin kabuk veya kor kısmına yüklenebilir. 1984 yılında Bader ve ark. tarafından ilaç taşıyıcı sistem olarak tasarlanmıştır. Küçük boyutları, kolay sterilizasyon sağlanması, hidrofobik ilaçların çözünürlük problemini gidermesi ve kontrollü salım sağlanması bu sistemlerin en önemli avantajlarıdır (Kwon et. al., 1996; Jones et al., 1999).

Dendrimerler: Dendrimerler, bir merkezden başlayarak birden fazla koldan sürekli dallanan ve sonucunda mükemmel üç boyutlu yapılar oluşturan polimerik

makromoleküllerdir. Dışa doğru ve içe doğru olmak üzere iki farklı strateji ile sentezlenebilirler. Üç bileşenden oluşmaktadırlar: reaksiyonu başlatan çekirdek, dallar ve terminal fonksiyonel gruplar. Dendrimerler, suda çözünebilen, ilaç hapsedilebilen ve hedefleme yapılabilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (Bharali et al., 2009).

Lipozomlar: 50-1000 nm aralığında boyutara sahip lipid vezikülleridir. Bileşimlerine ve hücre içerisine alınma mekanizmalarına göre 5 sınıfa ayrılırlar: konvansiyonel lipozomlar, pH duyarlı lipozomlar, katyonik lipozomlar, immüno-lipozomlar ve uzun süre kan dolaşımında kalan lipozomlar. Bu ilaç taşıyıcı sistemlerin en önemli problemleri üretim, sterilizasyon, kararlılık ve ilaç yükleme kapasiteleri ile ilgilidir. İlaç hedefleme yapılabilen toksisitesi düşük sistemlerdir (Bharali et al., 2009; Güney, 2011).

Manyetik Nanoparçacıklar: Bu tür ilaç taşıyıcı sistemlerde manyetik alan etkisiyle hedefleme yapılabilir. Ayrıca hipertermi uygulamalarında ve kontrast ajanı olarak manyetik rezonans görüntüleme de kullanılabilirler. Yüzey modifikasyonu yapılmadığı zaman hidrofobik özelliklerinden dolayı kümeleşirler ve artan parçacık boyutu süperparamanyetik özelliklerinin kaybolmasına sebep olur (İçhedef, 2010).

Karbon Bazlı Nanoparçacıklar: Medikal uygulamalar için geliştirilen en çok ön plana çıkan karbon bazlı nanoparçacıklar; karbon nanotüpler, fullerenler, perflorokarbon nanoemülsiyonlar ve grafen oksit nanoparçacıklardır. İki boyutlu karbon bazlı nanoparçacık sınıfına ait Grafen oksit, elektronik, termal, mekanik ve optik özelliklerinden dolayı büyük ilgi görmektedir.

Katı Lipid Nanoparçacıklar: Boyutları 50-1000 nm arasında değişen oda ve vücut sıcaklığında lipid yapıda ve katı halde bulunan kolloidal parçacıklardır. Belirli dozda antikanser ilacın kanserli dokulara taşınması ve sağlıklı organların bu yüksek toksisiteye sahip ajanlardan etkilenmemesi açısından uygun fizikokimyasal karakteristik, kontrollü ilaç salım kinetiği ve spesifik ilaç taşıma özelliklerine sahip sistemlerdir.

2.2.1 Katı Lipid Nanoparçacıklar

Sunduğu avantajlardan dolayı antikanser ilaç taşımada ön plana çıkan katı lipid nanoparçacıklar (SLN), diğerk taşıyıcı sistemlere alternatif olarak 1991 yılında Müller ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır.

SLN'lerin sahip olduğu avantajlar:

- ✓ Kolloidal büyüklüktedir.
- ✓ Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeler hapsedilebilir.
- ✓ Etkin maddenin kontrollü salımı yapılabilir.
- ✓ Yüzey modifikasyonu sağlanarak hedef dokulara spesifik hale getirilebilir.
- ✓ Endüstriyel ölçekte üretimleri mümkündür.
- ✓ Ekonomik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sistemdir.

SLN'lerin sahip olduğu dezavantajlar:

- Düşük etkin madde yükleme kapasitesi
- Etkin maddenin taşıyıcıdan dışarı sızması
- SLN dispersiyonlarındaki yüksek su içeriği ve ortamda farklı kolloidal yapıların bulunması

Katı lipid nanoparçacıkların üretim yöntemlerini aşağıdaki gibi özetlenebilir:

- Yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemi
- Mikroemülsiyon yöntemi
- Çözücü difüzyon yöntemi
- Yüksek hızda karıştırma – Ultrasonikasyon yöntemi

Uzun süre fiziksel ve kimyasal olarak kararlılığını koruması, ilaç taşıyıcı sistem olarak SLN'nin kullanılması için çok önemli bir faktördür. Optimize edilen sulu SLN dispersiyonlarının parçacık büyüklüklerinin, 12-36 ay boyunca kararlılığını koruduğu gösterilmiştir. Sıvı dispersiyonun daha iyi kimyasal ve fiziksel stabilite sağlanması amacıyla kuru toz formunda bir ürüne dönüştürülmesi faydalı ve sıklıkla da gerekli olmaktadır. Katı forma dönüşüm, parçacık büyümesini ve hidroliz reaksiyonlarını önlemektedir. Liyofilizasyon bu amaçla umut vaat eden bir yöntemdir.

SLN'ler fizyolojik bileşenlerden hazırlandıkları için canlı sistemler tarafından kabul edilirler. Mikron üstü boyutta partiküllerin bulunması, toksik

olaylara sebep olmamakla beraber sistemin performansını azaltabilmektedir. Katı lipid nanoparçacıklar, oral, parenteral, topikal, pulmoner, oküler olarak ayrıca aşılarda adjuvan olarak kullanılabilirler.

Parçacık çapının küçültülmesi intravenöz enjeksiyon yoluyla da uygulamaya olanak sağlar. En küçük kan damarı çapının 4 µm olduğu düşünülecek olursa nanoparçacıkların kılcal damarlardan geçebilmesi için partikül büyüklüğünün bu boyut sınırının altında hazırlanması gerekmektedir (Kreuter, 1994).

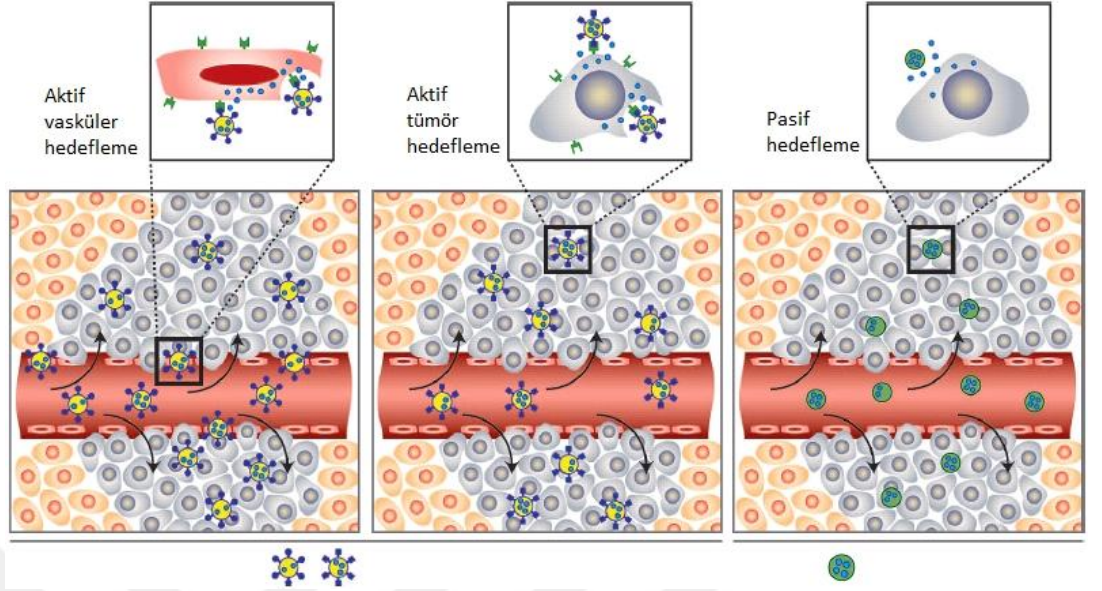
SLN'ler, partikül büyüklüğü, yüzey yükü ve yüzey hidrofobisitesi gibi özellikleri nedeniyle makrofajlar tarafından tanınmaktadır. Bu nedenle, pegilasyon yapılarak retikuloendotelial sistem tarafından yakalanmadan, uzun süre dolaşımda kalan SLN'ler hazırlanmaktadır. Herhangi bir işlem görmemiş SLN'ler intravenöz enjeksiyon sonrasında karaciğerin Kuppffer hücrelerinde birikmektedir. Bu sayede, hepatik neoplazmlar ve hepatit gibi hastalıklarda karaciğere pasif hedefleme sağlanabilmektedir. Ayrıca, partikül yüzeyinin kan-beyin bariyerinin endotelial hücrelerine yapışmaya aracılık eden apolipoproteinler gibi kan proteinleri ile modifikasyonu ile SLN'ler beyine hedefleme için de kullanılabilir (Numanoğlu ve Tarımcı, 2006; Amiji, 2006; Ekambaram, 2011).

2.3 Spesifik İlaç Hedefleme

Kanser tedavisindeki en önemli dezavantajlardan biri terapötik ajanların, hedef olmayan organ ve dokulara giderek bu dokular üzerinde yan etki göstermeleridir. Bu sebeple spesifik ilaç hedefleme sistemlerinde temel amaç hedef olmayan organ ve dokulardaki yan etkilerini önleyecek şekilde ilacın hedef bölgeye taşınmasıdır. Nano boyuttaki ilaç taşıyıcı sistemler aktif ve pasif hedefleme yapılarak sağlıklı hücreler toksik etkiye maruz kalmayacak şekilde ilacın kanser hücrelerindeki konsantrasyonu artırılabilir (Cho et al., 2008).

Aktif molekülün hedef bölgedeki tutulumunu fizikokimyasal özellikleri etkilemektedir. Ayrıca antikanser ajanların sudaki düşük çözünürlüğü, hücrelerdeki geçirgenlik ve dışarı sızma gibi problemleri terapötik etkinliklerini düşürmektedir. Bu sebeple ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey modifikasyonunun, hedefleme verimini geliştirebileceği, hedef olmayan bölgedeki zararı

azaltabileceği ve ilacın kan dolaşımında kalma süresini arttırabileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.4. Pasif ve aktif hedefleme (Farokhzad and Langer, 2009).

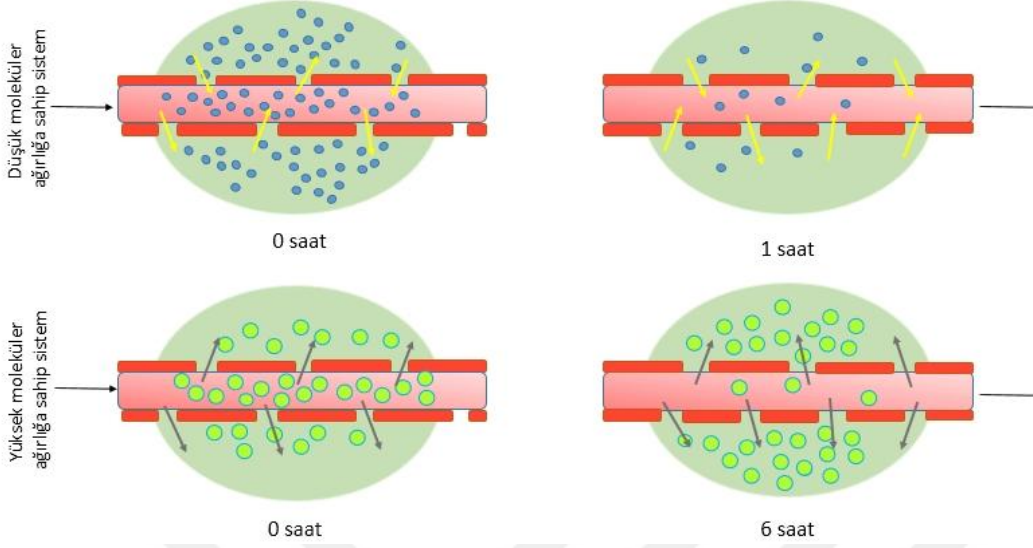
2.3.1 Pasif Hedefleme

İlacın/ilaç taşıyıcı sistemin fizikokimyasal ve farmasötik faktörler nedeniyle belli bir bölgede birikimidir. İstenilen bölgeye ilacın toplanması ve spesifik olmayan dağılımın önlenmesi amacı ile ilaç taşıyıcı sistemin özelliklerine ve hastalığın patolojisine dayanır (Kothari et al., 2012).

Artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi (EPR), Matsumura ve Maeda tarafından tümürlü dokularla normal dokular arasındaki damarlanma yapısının farklılığından kaynaklanan bir olay olarak açıklanmıştır. Belli boyut aralığındaki makromoleküller (>30-45 kDa), katı tümör dokularında efektif olarak tutulurken, küçük moleküller ise dolaşıma geri dönmektedir (Şekil 2.5). Tümürlü dokulardaki *i) artmış damar geçirgenliği ii) artmış damarlanma iii) makromoleküllerin tümör dokusundan kan dolaşımına geri dönüşünün azalması iv) lenfatik sisteme geri dönüşün azalması* gibi karakteristik özellikler bu olayı desteklemektedir (Matsumura et al., 1986).

Bir çok araştırmacı artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisinden yararlanarak pasif hedefleme amacıyla küçük moleküllerin pegilasyon ile modifikasyonunu sağlamıştır (Bayındır et al., 2007). Pegilasyon, çeşitli yöntemlerle hazırlanmış ilaç taşıyıcı nanoparçacık sistemlerin yüzey özelliklerinin polietilen glikol (PEG) ile konjuge edilerek modifiye edilmesidir. Bu şekildeki pasif hedefleme yöntemi

büyük lipozomlar ve polimerlerle konjuge edilmiş dokсорubisin gibi ilaçlar ile çalışılarak gösterilmiştir (Pirollo et al., 2008).



Şekil 2.5. Artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisi

2.3.2 Aktif Hedefleme

Aktif hedefleme, ilacın/ilaç taşıyıcı nanosistemin vücuttaki bir hücre, doku veya organı tanınması ve etkileşime girmesi için seçici afiniteye sahip arjinin-glisin-aspartik asit (RGD), folat, transferrin gibi aktif ajanlarla modifiye edilmesidir.

Reseptör hedefli ilaç taşıyıcı sistemler, ilk olarak toksik ilacın dağılımını sadece patolojik hücrelerle sınırlamak amacıyla geliştirilmişlerdir. Bununla birlikte, hücre membranından geçemeyen ilaçların reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içerisine alınmasına da olanak sağlamaktadırlar (Leamon and Low, 2005). Reseptörler için aktif hedefleme amacıyla kullanılan ajanlar, çeşitli ligandlar ve yüzey proteinleri için antikordlardır. Birçok durumda bu etkileşimler, ilaç taşıyıcı sistemin tümörde etkin şekilde tutulumu ile sonuçlanmaktadır (Pirollo et al., 2008; Kothari et al., 2012; Hilgenbrink et al., 2005; Feng and Mumper, 2013).

Reseptör aracılı endositoz olayı öncelikle nanoparçacıkların dış yüzeyindeki ligandın hücre membranındaki reseptöre bağlanması ile başlar. Anahtar kilit modeline benzeyen bu çok spesifik olay birkaç dakika içerisinde gerçekleşmektedir. Bağlanmanın hemen ardından plazma membranı, ligand-reseptör kompleksini saracak şekilde bir vezikül oluşturur. Daha sonra hücre içerisinde bağımsız bir vezikül oluşur, vezikülün içerisine proton pompalanması

sonucunda ortamın pH'ı yaklaşık 5' e düşer ve ligand reseptörden ayrılır (Leamon and Low, 2005).

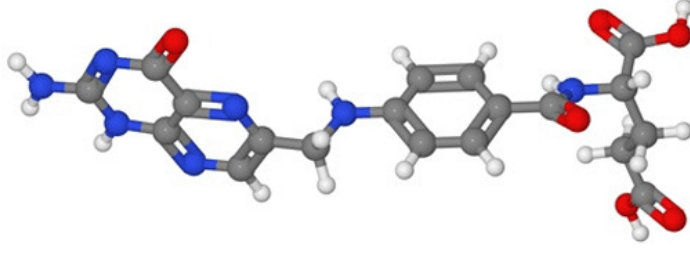
Nanoparçacıklar, çeşitli ligandlar yardımıyla endotelial hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanacak şekilde vasküler hedefleme amacıyla da geliştirilebilirler. Vasküler hedefleme sızıntılı damar yapısı gerektirmese de tümörlü dokulardaki sızıntılı damarlanma ilaç taşıyıcı sistemin veriminin daha da artmasına neden olmaktadır (Farokhzad and Langer, 2009).

Reseptör spesifik sistemlerin radyoışaretleterek kullanımı görüntüleme imkanlarının ve terapötik ilaçların *in vivo* değerlendirilmesi bakımından daha iyi koşullar sağlayan bir metottur. Bunun için reseptör sistemi ve uygun ligandın seçimi önemlidir. Reseptör ligand etkileşim kinetikleri, radyoizotopun yarı ömrü ile uyumlu zaman aralığında gerçekleşmeli, ligandın reseptöre bağlanma afinitesi yüksek olmalıdır (Kilbourn and Zalutsky, 1985).

İlaç taşıyıcı manyetik nanoparçacıkların dışarıdan manyetik alan uygulanarak istenilen bölgeye yönlendirilmesi de bir başka aktif hedefleme yöntemidir (Canefe ve Duman, 1994).

Folat Reseptörleri: Kanser terapötikleri için en çok araştırılan hedeflerden biri folat reseptörleri en çok kullanılan ligandlar ise folik asit türevleridir. **Şekil 2.6'** da molekül yapısı görülen folik asit pürin ve pirimidinlerin sentezinde rol alan ve en temel hücre fonksiyonları için gerekli vitamindir. Bu yüzden folik asit kendisine bağlı etken madde ile birlikte sitoplazmadan içeri alınabilir.

Folat bağlayıcı proteinler (FBP) olarak da bilinen folat reseptörleri yüksek folat afinitesine sahiptir. Farklı dokulara spesifik üç izoformu (α , β , γ/γ') bulunmaktadır. Sağlıklı hücrelerle karşılaştırıldığında folat reseptörleri kanserli hücrelerde çok daha yüksek oranda bulunur. Folat reseptörleri yumurtalık, akciğer, beyin, baş ve boyun, renal hücre ve meme kanserlerinde yüksek oranda bulunur. Folat ligandları ucuz, toksik olmayan, yüksek bağlanma verimine sahip, taşıyıcı sistemlere kolaylıkla konjuge edilebilen, dolaşımında ve saklama sırasında yapısı bozulmayan maddelerdir (Low et al., 2007; Zhao X. et al., 2004; Amiji, 2006; Byrne et al., 2008).



Şekil 2.6. Folik asit molekül yapısı

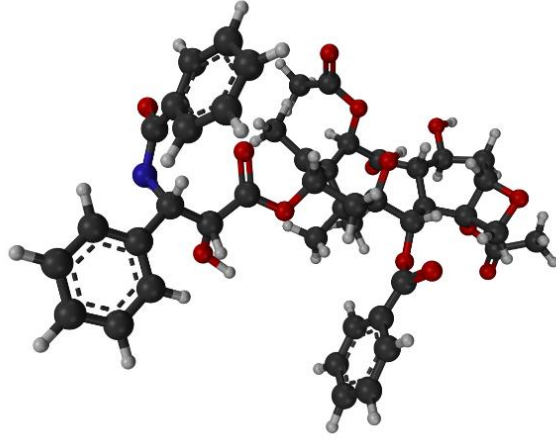
2.4 Paklitaksel

Paklitaksel, Amerikan gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından onaylanmış meme ve yumurtalık kanseri tedavisinde kullanılan en etkili kemoterapi ajanıdır. Paklitakselin elde edildiği porsuk ağacı (*Taxus brevifolia*) kabuğu ekstraktı ilk olarak 1962 yılında incelenmiştir. Wani ve arkadaşları tarafından kimyasal yapısı ve eşsiz özellikleri (Şekil 2.7) tespit edilene kadar paklitakselin antitümör aktivitesi bilinmemektedir. 1979’ da Schiff ve arkadaşları PTX’ in alışlagelmedik etki mekanizmasını ortaya çıkardıklarında bu yeni anti kanser ajana olan ilgi giderek artmıştır. Başlangıçta temin edilmesi ve formülasyonu ile ilgili problemler klinik çalışmaları yavaşlatmıştır. Ancak 1980’ lerin ortalarında Birleşmiş Milletler Ulusal Kanser Enstitüsü’ nün desteği ile çalışmalar hız kazanmıştır. Aynı dönemde Fransızlar tarafından, yaygın porsuk (*Taxus Baccata*) iğnelerinden birkaç yarı sentetik taksoid türevi üretilmiştir (Eisenhauer and Vermorken, 1998). Sistematik (IUPAC) adı “(2 α ,4 α ,5 β ,7 β ,10 β ,13 α)-4,10-Bis(acetyloxy)-13-[[{(2R,3S)-3-(benzoylamino)- 2-hydroxy-3 -phenylpropanoyl] oxy}-1,7 di hydroxy -9-oxo-5,20-epoxytax-11-en-2-yl benzoate” olan ve yüksek molekül ağırlığına sahip (845 Da) paklitakselin sudaki çözünürlüğü sınırlıdır (log *P*, 3.96) (Kollipara et al., 2010).

Paklitaksel tümörlü hücrelerde mitoz için gerekli olan tübüline bağlanır ve mikrotübüller için yüksek kararlılık sağlayarak mitoz sırasında hücre döngüsünü durdurur apoptozun tetiklenmesine neden olur. Antineoplastik etkileri bu mekanizma ile ilgilidir. Taxol® ve Abraxane® olmak üzere Cremophor EL (polietoksillenmiş kastor yağı) ve kuru alkol 50:50 (h/h) karışımı içerisinde enjekte edilebilir iki ticari formu vardır. İçeriğindeki Cremophor EL maddesi paklitakselin farmakokinetiğini değiştirmekle beraber neden olduğu ciddi yan etkiler rapor edilmiştir (Feng and Mumper, 2013). Cremophor EL bulunmayan

formu Abraxane, 2005 yılında FDA tarafından tescil edilmiştir fakat daha iyi klinik profiline rağmen yüksek maliyeti nedeniyle Taxol' ün yerine tercih edilmemektedir (Dong et al., 2009; Fitzpatrick ve Wheeler, 2003). Bunların dışında faz III klinik çalışmaları devam eden Nanoxel™ (Dabur Pharma, Ghaziabad, Hindistan) ve faz I klinik çalışmaları devam eden Nanotax® (CritiTech, Inc., Lawrence, ABD) adlı iki ilaç taşıyıcı sistem tasarlanmıştır (Yerlikaya, 2013).

Paklitaksel günümüzde klinikte sadece parenteral yolla uygulanabilmektedir. Oral yolla uygulanabilmesi için ilaca ve taşıyıcı sisteme ait toksik etkilerin en aza indirilmesi üzerinde çalışmalar yapılması gerekmektedir (Feng and Mumper, 2013).



Şekil 2.7. Paklitaksel molekülü

2.5 Radyofarmasötikler

Radyofarmasi, radyofarmasötiklerin tasarımı, hazırlanması, kalite kontrolü, uygulamalardaki fizyokimyasal ve biyolojik davranışları, saklama koşulları, amaca uygun kullanımı gibi konuları kapsamaktadır.

Radyofarmasötikler, seçilen moleküle bir radyonüklid takılarak, insanlar üzerinde kullanılmak üzere uygun formda hazırlanan sistemlerdir. İşaretleme adı verilen moleküle radyonüklid takılması direk veya bifonksiyonel şelatlayıcı ajan kullanılarak iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Fiziksel, kimyasal, biyolojik özelliklerine göre vücutta belli organ veya dokularda biriken ve fizyolojik fonksiyonuna katılan toksik olmayan etken madde farmasötik kısmı oluşturur.

Radyonüklid kısım ise yayınladığı radyasyonun türüne göre organ fonksiyonlarının görüntülenmesini veya hastalıkların tedavisini sağlar (Saha,1998). Radyofarmasötiklerin yaklaşık % 95' i teşhis, % 5'i tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Teşhis radyofarmasötiklerinin hazırlanmasında yüksek lineer enerji transferleri nedeniyle alfa ve beta tanecikleri yayan radyonüklitler istenmez. Kullanılan radyonüklit saf gama yayıcısı olmalıdır. Görüntü kalitesinin düşmemesi açısından görüntüleme için ideal enerji aralığı 100-250 keV' dir. Bu enerji aralığında foton yayan radyonüklitler ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I tür. İdeal bir teşhis radyofarmasötığının etkin yarı ömrü, görüntüleme için gereken sürenin 1.5 katı olmalıdır. Ayrıca hazırlama ve uygulama sırasında kimyasal olarak kararlılığını korumalıdır. Kullanılan radyofarmasötiklerin hedef / hedef olmayan doku oranının yüksek olması gerekir. Bu şartın sağlanmadığı durumlarda;

- görüntüleme radyofarmasötikleri için hastaya gereksiz radyasyon dozu, teşhiste gecikme ve işlemin tekrarlanması,
- tedavi radyofarmasötikleri içinse kemik iliği ve diğer hassas dokuların yüksek dozdan etkilenmesi gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelir.

Radyofarmasötiklerin hazırlama prosedürlerindeki basamaklar 3'ü geçmemeli, kısa sürede tamamlanmalı ve ilave cihaz gerektirmemelidir. Radyofarmasötikleri hazırlama şekillerine göre şu şekilde sınıflandırabiliriz:

- Kullanıma hazır radyofarmasötikler (I-131 hippuran, Ga-67 sitrat, Tc-99m perteknetat)
- ^{99m}Tc radyofarmasötiklerini hazırlama kitleri (DTPA, MDP, mebrofenin)
- Isıtma isteyen kitler (sestamibi, sülfür kolloid, teboroxime)
- Önemli derecede hazırlık isteyen ürünler (^{99m}Tc RBC, ^{99m}Tc WBC, ^{123}I -mIBG).

Radyofarmasötikler insana enjekte edilmeden önce doz kalibrasyonu yapılmış (reçetede verilen doz % ± 10), steril, apirojen, izotonik (% 0.9 NaCl çözeltisi ile aynı) ve fizyolojik pH' ta (pH: 7.5) olmalıdır (Ünak, 2015).

Radyofarmasötikler klinikte üç farklı şekilde kullanılırlar:

Radyonüklit tedavi: Tümörlü bölgeye tedavi edici dozda iyonize radyasyonu taşımak için tasarlanmış radyoişaretli moleküllerin sınırlı mesafedeki doku ve hücreleri ışınlamasıdır. Tiroid kanseri tedavisinde ^{131}I -sodyum iyodür, iskelet metastazı ile ilgili kemik ağrılarının hafifletilmesinde ise ^{89}Sr -stronsiyum klorür

ve ^{32}P -sodyum fosfat etkin şekilde kullanılmaktadır. Tedavi radyonüklitleri yaydıkları ışınlar göre alfa partikülü yayanlar (^{211}At), beta radyasyonu yayanlar (^{186}Re , ^{67}Cu , ^{90}Y) ve Auger elektronu yayanlar (^{67}Ga , ^{125}I) olmak üzere üç tiptir (Volkert et al., 1991). Tedavilerde amaç hedef bölgede radyasyonun etkisine bağlı DNA hasarı oluşturmak, hedef bölge etrafındaki dokulardaki hasarı en az seviyede tutmak ve vücudun diğer bölgelerini radyasyonun zararlı etkilerinden korumaktır. Radyonüklidin fiziksel yarı ömrü normal organları ışınlayarak hasar vermesine neden olacak kadar uzun olmamalıdır. Bununla birlikte sentez, nakliye ve uygulamaya olanak verecek uzunlukta olmalıdır. Radyofarmasötiklerin vücuttan atılımı yani biyolojik yarı ömrü de farklılıklar gösterir. Bu nedenle hastaların nelere ne kadar süre dikkat etmeleri gerektiği hakkında bilgilendirilmeleri gerekir.

Görüntüsüz teşhis: Bu çalışmalarda, belli doku ya da organa hedeflenmiş radyofarmasötiğin tutulumu vücut dışından sayım ekipmanı kullanılarak ölçülür.

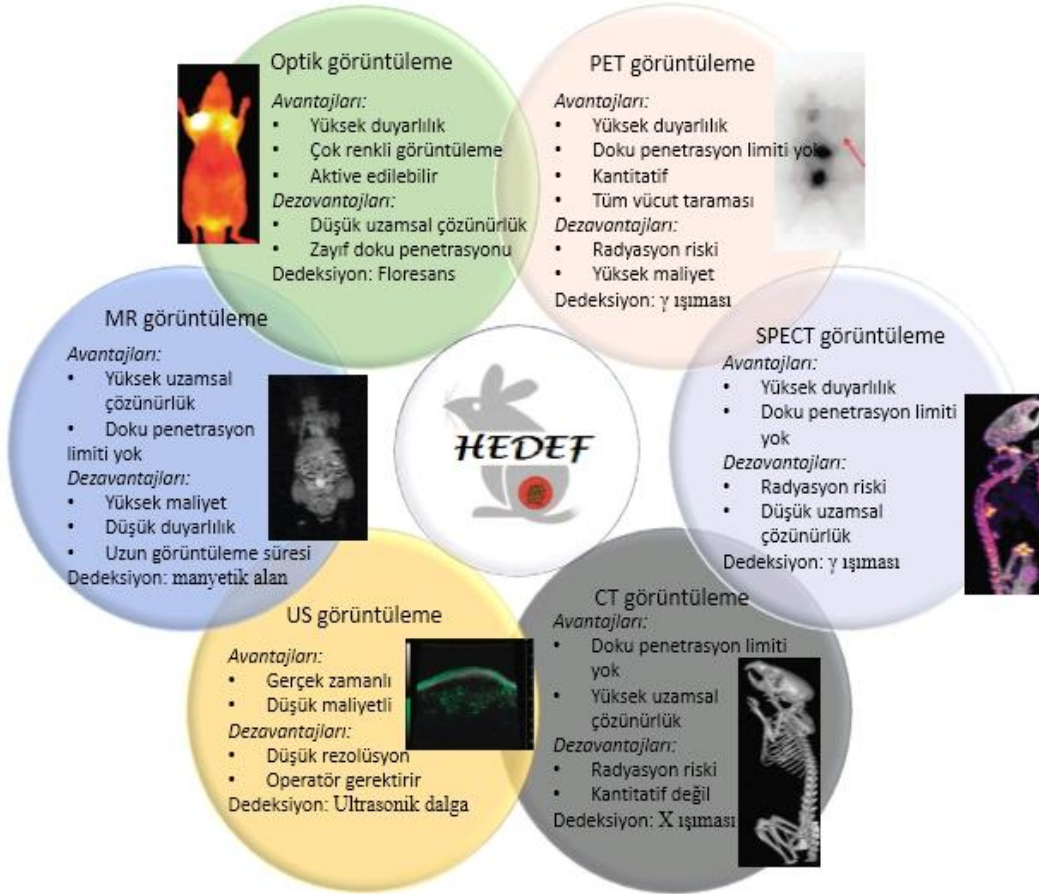
Görüntülü teşhis: Belli doku ya da organa hedeflenmiş radyofarmasötiğin tutulumunun çoğu zaman bilgisayara bağlı gama kameralarla görüntülenmesidir.

2.6 Moleküler görüntüleme yöntemleri

Moleküler görüntüleme, molekül ve hücre düzeyinde biyolojik proseslerin *in vivo* görüntülenmesi, karakterizasyonu ve ölçülmesi olarak tanımlanabilir. Günümüze kadar kanser teşhisinde, tedavi sürecinin izlenmesi ve değerlendirilmesinde çeşitli moleküler görüntüleme yöntemlerinden faydalanılmıştır. Ayrıca, görüntüleme teknolojileri, uygun bir radyonüklit ile radyoşaretli ilaç ve ilaç taşıyıcı sistemlerin *in vivo* biyolojik davranışının belirlenmesi ile ilgili çalışmalarda da yaygın olarak kullanılmaktadır. Farmakosintigrafi, belirli dozda ilacın denek hayvana uygulanmasının ardından organ lokalizasyonu ve konsantrasyonunu değerlendirmek için en uygun tekniktir (Alam et al., 2014; Kakkar et al., 2013).

En sık kullanılan görüntüleme yöntemleri pozitron emisyon tomografisi (PET), tek foton emisyonu bilgisayarlı tomografisi (SPECT), moleküler manyetik rezonans görüntüleme (mMRI), kontrastlı ultrason (CEU), optik biyoluminesans, optik floresans yöntemleridir (**Şekil 2.8**). Her yöntemin kendine özgü avantajları ve kısıtlamaları vardır. Kısıtlamaların önüne geçmek, aynı zamanda avantajlarından yararlanmak amacıyla bu yöntemlerin kombinasyonlarından oluşan görüntüleme teknikleri tasarlanmaktadır. İki veya daha fazla görüntüleme

yöntemini bir arada bulunduran PET/CT, SPECT/CT, PET/MRI gibi hibrit sistemler ticari olarak bulunmakta veya geliştirilme aşamasındadır (Xing et al., 2014).



Şekil 2.8. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan görüntüleme yöntemleri (Lee et al., 2012)

Pozitron emisyon tomografisi (PET) Yöntemi: Emisyon tekniğine dayalı PET yönteminde radyonüklit bozunur ve hemen sonrasında oluşan pozitronlar vücutta çok kısa bir mesafe (yaklaşık 1 mm) ilerleyip yakındaki bir elektronla etkileşime girerek 511 keV enerjili iki gama fotonu meydana getirir. Birbirine zıt yönde hareket eden bu fotonlar dairesel tarzda tasarlanmış PET kamerası tarafından algılanır. Karşılıklı iki dedektör aynı anda foton saptadığında sisteme kaydeder ve bu dataların bilgisayarda işlenmesinin ardından görüntü oluşturulur (Xing et al., 2014).

PET görüntülemede kullanılan radyonüklitler doğada bulunmayıp siklotronda üretilirler. Kullanılan radyonüklitlerden ^{11}C (20.4 dk.), ^{13}N (9.97 dk.) ve ^{15}O (2.04 dk.)'in yarı ömürlerinin çok kısa olması nedeniyle dağıtımı ve

taşınması mümkün değildir. Nispeten daha uzun yarı ömre sahip ^{18}F (110 dk.)'in belirli mesafelere dağıtılması mümkündür. Klinikte sıkça uygulanan tümördeki glikoz metabolizmasının izlenmesinde ^{18}F ile radyoışaretlenmiş fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) radyofarmasötiği kullanılmaktadır.

Çizelge 2.1. PET görüntüleme için kullanılan radyonüklitler ve özellikleri (Mody, 2011).

Radyonüklit	Bozunum türü	Yarı ömür	Enerji maksimum (keV)	Üretim yöntemi
^{18}F	Pozitron	110 dk.	640	Siklotron
^{11}C	Pozitron	20.4 dk.	960	Siklotron
^{13}N	Pozitron	9.96 dk.	1190	Siklotron
^{15}O	Pozitron	2.07 dk.	1720	Siklotron
^{64}Cu	Pozitron	762 dk.	0.655	Siklotron
^{68}Ga	Pozitron	78.6 dk.	93, 184, 300, 393	Siklotron

Klinikte rutin olarak kullanılan [^{18}F]FDG, [^{18}F]FLT, [^{18}F]F-DOPA, [^{11}C]CH₃I, [^{13}N]NH₃ gibi neredeyse her PET radyofarmasötiği için otomatik radyosentez cihazları ticari olarak temin edilebilmektedir (Khalil, 2010). [^{18}F]floromisonidazol (FMISO) hipoksi PET görüntülemesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hipoksi PET görüntülemesi ^{64}Cu ile radyoışaretli ATSM (diasetilbis(N4-metiltiosemikarbazon) ile de gerçekleştirilebilmektedir. Yarı ömrü ve bozunma özelliklerinin yanı sıra iyi bilinen koordinasyon kimyası, proteinlere, peptidlere, antibadilere bağlanmasını sağlayan geniş şelatlayıcı sistem çeşitliliği ^{64}Cu 'ü PET görüntüleme ve radyoterapi için ideal bir radyonüklit haline getirmiştir. ^{82}Rb -klorür (1.3 dk), ^{13}N -amonyak (10 dk), ^{15}O -su (2 dk); ^{68}Ga -Annexin V (68 dk), ^{11}C -asetat nükleer kardiyoloji uygulamalarında kullanılan PET radyofarmasötikleridir. Nörolojik PET uygulamalarında ise ^{11}C -raclopride, ^{11}C -flumazenil (FMZ), ^{18}F -floroetil-L-tirosin (FET) radyofarmasötikleri kullanılmaktadır (Ocak, 2015).

Tek Foton Emisyonu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT) Yöntemi: 1960'larda ilk ortaya çıktığından itibaren SPECT birçok nükleer tıp departmanında rutin bir kullanım alanı bulmuştur. Şu anki teknoloji ile organ yüzeyi ve hacmi üç boyutlu olarak görüntülenerek yorumlanabilmektedir (Groch and Erwin; 2000).

SPECT görüntülemesinde, ^{99m}Tc , ^{67}Ga , ^{111}In , ^{123}I gibi radyonüklitlerden yayılan tek foton emisyonu değerlendirilir. SPECT görüntülemesinde kullanılan bazı radyonüklitler ve özellikleri **Çizelge 2.2**'de verilmiştir. Basit bir SPECT kamera, hastanın etrafında aşamalı şekilde döner, bağlı bulunan bilgisayar elde edilen görüntüleri birleştirip organın kesitsel görüntüsünü oluşturur. Daha gelişmiş sistemlerde hastanın etrafında mekanik olarak hareket eden birden fazla kamera veya halka şeklinde küçük kristallerden oluşmuş sabit dedektörler bulunmaktadır (Powsner R.A. and Powsner, E.R. 2008).

Çizelge 2.2. SPECT görüntülemesinde kullanılan radyonüklitler ve özellikleri (Mody, 2011).

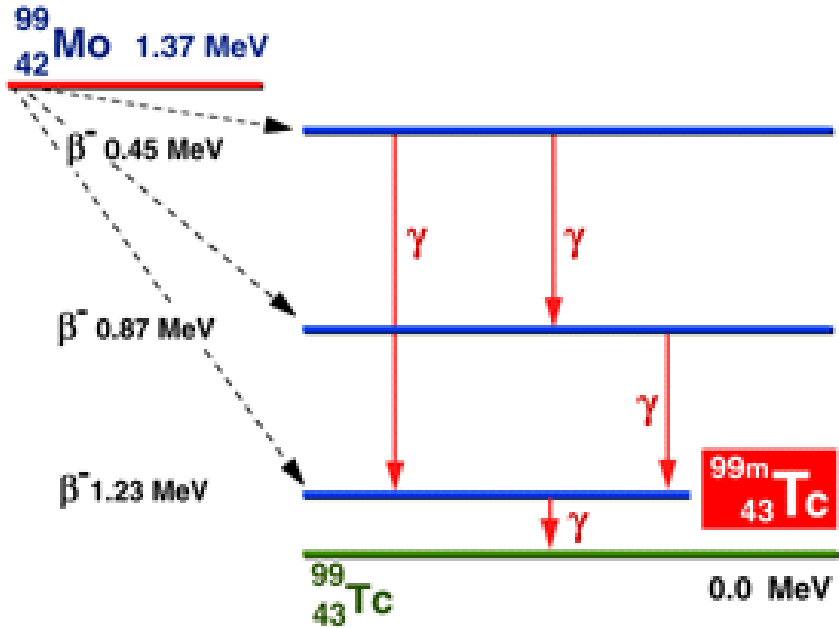
Radyonüklit	Emisyon	Yarı ömür	Enerji _{maksimum} (keV)	Üretim yöntemi
^{99m}Tc	Γ	6.0 saat	140	^{99}Mo jeneratörü
^{201}Tl	Γ	73 saat	70-80; 135; 167	Siklotron
^{67}Ga	Γ	78 saat	93.5;184.5;296;388	Siklotron
^{111}In	Γ	67.2 saat	171,245	Siklotron
^{123}I	Γ	13.2 saat	159	Siklotron
^{131}I	γ (81.2%), β	8.0 gün	284,364,637	Siklotron

SPECT görüntülemesinde kullanılan radyofarmasötiklere örnek olarak; konvansiyonel beyin sintigrafisinde ^{99m}Tc -HMPAO (hekzametilpropilenamin oksim), kronik enfeksiyonların teşhisinde ^{111}In ile işaretli insan immünoglobulin (HIG), miyokard, kas ve paratiroid sintigrafilerinde ve tümör görüntülemesinde $^{201}\text{TlCl}$, kemik sintigrafisinde ^{99m}Tc -metilen difosfanat (MDP) verilebilir (IAEA, 2008).

2.7 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) Kimyası

Kararlı izotopu bulunmayan 43 atom numaralı teknesyum bir geçiş elementi olup periyodik cetvelde VII B grubundadır. 1937 yılında İtalyan bilim adamları Carlo Perrier ve Emilio Segrè tarafından ^{98}Mo 'in nötron ve döteronlarla ışınlanması sonucunda keşfedilmiştir. Gümüş gri renkte ve erime sıcaklığı 2160 °C olan yapay bir elementtir. Teknesyum -1'den +7'ye kadar 8 yükseltgenme basamağına sahiptir. Genel olarak perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) şeklinde bulunan teknesyumun en kararlı yapısı +4 ve +7 değerlikleridir (İçhedef, 2010).

Teknesyum-99m (^{99m}Tc), görüntüleme için uygun gama enerjisine (140 keV) ve yarı ömre (6 saat) sahiptir. Uzun yarı ömürlü (67 saat) ^{99}Mo ' in bozunma ürünü olan ^{99m}Tc 'un (Şekil 2.9) ^{99}Mo - ^{99m}Tc jeneratörü ile kolay elde edilebilir olması, tüm dünyada nükleer tıpta görüntüleme için en çok tercih edilen radyonüklitlerden biri olmasının en önemli nedenidir. Ana radyonüklit ^{99}Mo , ^{235}U 'un nükleer reaktörde fisyonu sonucu 6 % verimle bol miktarda hazırlanır (IAEA, 2008). 67 saatlik yarı ömre sahip ^{99}Mo 'nin, ^{99}Tc 'a bozunması sırasında yüksek oranda (% 86) oluşan metastabil düzeyindeki ^{99m}Tc , $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratöründen sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) çözeltisi halinde elde edilmektedir.



Şekil 2.9. ^{99}Mo ' in ^{99m}Tc ' a bozunumu (Demir, 2009)

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü, cam bir kolon içerisinde bulunan alüminyum oksit (Al_2O_3) üzerine adsorbe edilmiş fisyon ürünü ^{99}Mo içerir. % 0.9 NaCl solüsyonunun kolondan geçirilip vakumlu tüp içerisine sağılmasıyla izotonik, renksiz, berrak, steril, apirojen ve intravenöz enjeksiyona hazır $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ çözeltisi elde edilir. Teknesyum-99m kaynağı olan ilk jeneratör 1957 yılında Brookhaven Ulusal Laboratuvar'ında tanıtılmış ve 1965' te ilk ticari $^{99}\text{Mo}-^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü üretilmiştir (Saleh; 2011; Theobald, 1989).

Direk işaretleme yönteminde +7 yükseltgenme basamağında perteknetat yapısındaki teknesyum kalay klorür gibi indirgeyici ajanlarla indirgenerek kompleks oluşturabilmektedir. Kalay klorür dışında kullanılan diğer organik indirgeyicilerden bazıları, sodyum bisülfid, askorbik asit, sodyum borhidrat, hidrazindir.

Ligand yapısı direk işaretleme için uygun olmadığında teknesyumu biyoaktif moleküle bağlayacak fonksiyonel gruplar (EDTA, DTPA, glukohptonat vb.) gerekmektedir. Bu yöntem direk işaretlemeye göre daha uzun inkübasyon zamanı ve 75-100 °C ısıtma işlemi gerektirmektedir (Ünak, 2015).

Biyolojik ortamdaki kimyasal kararlılığın yanı sıra bir başka gereklilik ise kimyasal saflıktır. Radyofarmasötik olarak uygulanabilir olması için radyoişaretleme reaksiyonunun %98' in üzeri saflıkta gerçekleşmesi ve tekrar edilebilir olması gerekmektedir (Alberto and Abram, 2003).

Radyoişaretleme sonrasında oluşabilecek safsızlıklar:

- Kimyasal safsızlık (Al^{+3} kaçağı < 100 ppm olmalı)
- Radyokimyasal safsızlık (indirgenmiş $^{99\text{m}}\text{Tc}$, serbest $^{99\text{m}}\text{Tc}$)
- Biyolojik safsızlık (sterilite, apirojenite)
- Farmasötik safsızlık (yabancı partikül, pH, partikül boyutu)

Hazır kitler kimyasal reaksiyonun %98' in üzerinde verimle gerçekleşmesi için gerekli maddeleri içeren viallerdir. Perfüzyon ajanları çoğu zaman bu kitlerin sulandırılması ile oda sıcaklığında veya 100 °C su içerisinde tek basamakta hazırlanabilmektedir. Diğer koşullar rutin uygulamalar için elverişli değildir.

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyofarmasötikleri, teknesyumun renyum ile olan kimyasal benzerliği nedeniyle ^{186}Re ve ^{188}Re gibi yüksek enerjili beta yayan radyonüklitlerle tedavi radyofarmasötiklerinin hazırlanmasının önünü açmaktadır (Arano; 2002).

Suda çözünebilir tek dişli izonitril ligandlar ile organometalik Tc(I) kompleksleri geliştirilene kadar teknesyumun düşük oksidasyon basamaklarındaki kompleksleri

ile gerçekleştirilen radyoişaretleme yöntemleri çoğunlukla kimyasal (işaretlenmeden kalan madde) veya radyokimyasal safsızlıklar (ayırışma ürünü olan $^{99m}\text{TcO}_2$) içerdiği için saflaştırma gerektirdiklerinden çok fazla ilgi görmemiştir. Bu nedenle organometalik teknesyum kompleksleri ile ilgili farklı yaklaşımların geliştirilmesine gerek duyulmuştur Davison ve arkadaşlarının bu alandaki öncü çabaları sonucu miyokardiyal görüntüleme için ilk başarılı organometalik radyofarmasötik olan ^{99m}Tc -Sestamibi geliştirilmiştir.

Radyofarmasötik uygulamalar için yeni organometalik bileşikler oluşturma çabasındaki bir başka grup, kolaylıkla hazırlanabilen, suda çözünebilen ve kararlı yapıya sahip, yüksek verimle (>% 98) elde edilebilen teknesyum (I) tri karbonil kuru, $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$, kompleksini ortaya çıkarmışlardır. Bu yöntemle jeneratör ürünü olan $^{99m}\text{TcO}_4^-$ tan çıkılarak sodyum borhidrür (NaBH_4) indirgeyici ajan yardımıyla 1 atm basınç altında CO gazı ile serum fizyolojik ortamında $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ metal kompleksi sentezlenmiştir. Kompleksteki üç su molekülünün kararsız yapısı bu teknesyum kompleksini çeşitli biyomoleküllerle hazırlanabilecek radyofarmasötikler için elverişli hale getirmektedir. Oluşan karbonil kompleksleri, yaşam bilimlerinde ve özellikle nükleer tıpta önemli bir kullanım alanı bulmuştur (Alberto et al., 1998). $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ metal kompleksinin nötral veya asidik pH larda kararlı olmasına karşın bazik pH'ta oksijene karşı duyarlı olduğu bilinmektedir. Teknesyum trikarbonil korunun sentezleme çalışmalarından NaBH_4 'ün iyi bir indirgeyici ajanın olduğu sonucuna varılmıştır (Nguyen A., 2007; Hayes et al., 2014; Alberto R., 1998).

2.8 ^{99m}Tc İşaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Yöntemleri

Radyokimyasal safsızlıklar teşhis sırasında görüntü kalitesini düşürerek görüntülerde yanlış tanıya neden olabilecek ya da değerlendirmeyi güçleştirecek radyoaktif kontaminantlardır. En sık karşılaşılan durum indirgeyici ajan miktarının az olması sonucunda ortamda serbest teknesyumun kalması ve buna bağlı olarak mide, tiroid gibi organlarda istenmeyen aktivite tutulumudur. Radyoişaretlenecek bileşik miktarının az olması durumunda ise indirgenmiş teknesyum, ortamdaki inaktif safsızlıklarla birleşerek farklı yapılar oluşturabilmektedir. Hazırlanan radyoişaretleme bileşiğinin işaretleme veriminin yüksek (>% 95) olması gerekmektedir. ^{99m}Tc ile işaretli bileşiklerin kalite kontrolünde en sık kullanılan yöntemler ince

tabaka radyokromatografisi (TLRC) ve yüksek performanslı sıvı radyokromatografisidir (HPLRC) (Forsyth, 1988; Ünak, 2003).

İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC): İnce tabaka kromatografisi, cam, metal ya da plastik destek madde üzerinde homojen olarak kaplı adsorban kullanılarak mikrolitre düzeyindeki örneğin uygun çözügen yardımıyla ayrılmasıdır. Bu yöntemde sabit faz olarak silika jel kaplı alüminyum ya da selüloz kaplı plastik plakalar kullanılır. Sabit faz üzerinden uygun çözücü geçirilerek ayrışması istenen maddelerin farklı hızlarda ilerlemelerinden yararlanılır.

Radyoışaretili örnek 10x1 cm boyutlarındaki ince tabaka kromatografi kağıdının uygulama noktasına (0,5 cm) damlatılır ve uygun çözügenin bulunduğu küvet içerisine daldırılır. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan TLC plakası üzerinde yürür ve karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Böylece radyokimyasal safsızlıklar ayrılmış olur. Çözügen, plakanın tamamını kaplamadan TLRC plakası küvetten çıkarılır, çözügenin ilerleme mesafesi ölçülür ve kurutulur. Sonrasında gazlı dedektörde sayım işlemi gerçekleştirilerek her bir bileşenin R_f (relative front) değeri belirlenir. R_f değeri, adsorban, destek madde ve çözücüye bağlı olarak her madde için ayırt edici bir özelliktir (İçhedef, 2010; Theobald, 1989).

$$R_f = \frac{\text{Radyokimyasal bileşenin ilerlediği uzaklık}}{\text{Çözügenin ilerlediği uzaklık}}$$

İnce tabaka kromatografisi diğer yöntemlere göre daha düşük maliyet, kısa analiz süresi, aynı anda daha fazla örneği ayırabilme gibi avantajları nedeniyle farmasötik alanında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Yüksek Performanslı Sıvı Radyokromatografisi (HPLRC): Yüksek performanslı sıvı kromatografisi, oldukça hassas saflık, bileşen ayırma, tanımlama ve derişim tayini yapılabilen bir kromatografik yöntemdir. HPLC yöntemi, içleri sabit fazı oluşturan katı reçine dolu kolonlara basınç uygulanması ile örnekteki bileşenlerin kolonda alıkonma sürelerinin (R_t) belirlenmesine dayanır. Alıkonma süresi her madde için özeldir ve bileşenlerin tespitinde esas dikkate alınan parametredir. HPLC cihazları başlıca; hareketli faz kapları, pompa sistemleri, numune enjeksiyon sistemi, yüksek sıvı kromatografi kolonları ve dedektör kısımlarından

oluşur. Radyoışaretili moleküller için radyoaktivite ölçümleri cihaza haricen bağlanan Cd(Te) katı hal dedektörü ile yapılmaktadır. **Şekil 2.10'** da çalışmalar sırasında kullanılan HPLC sistemi görülmektedir.

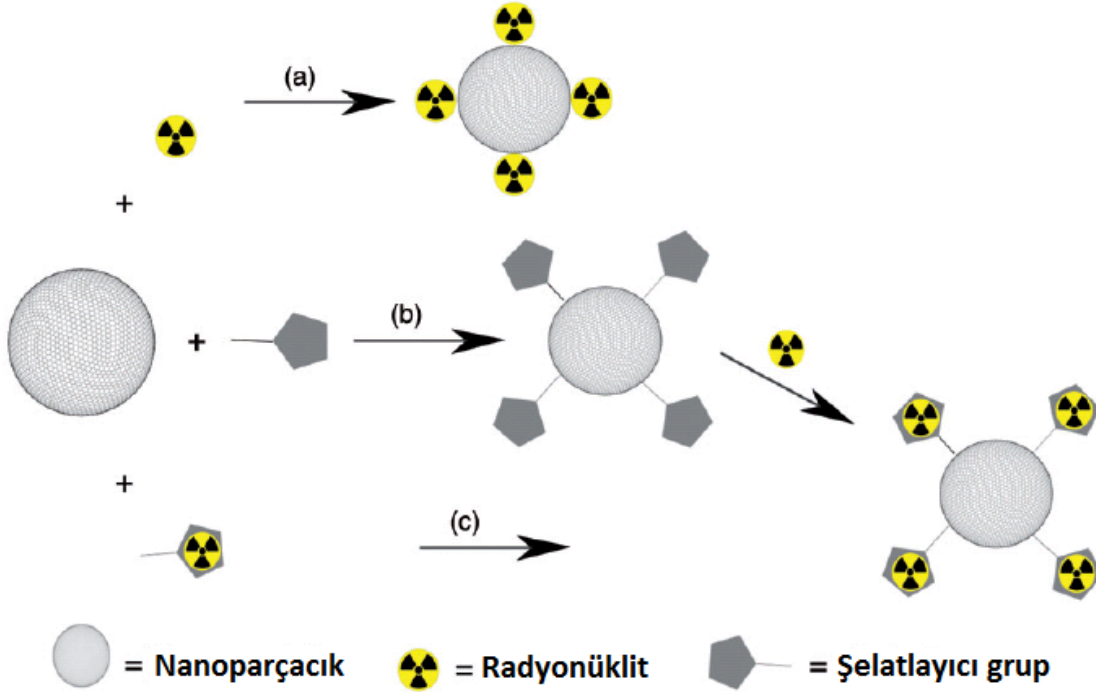


Şekil 2.10. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

2.9 Nanoparçacıklar için radyoışaretleme stratejileri

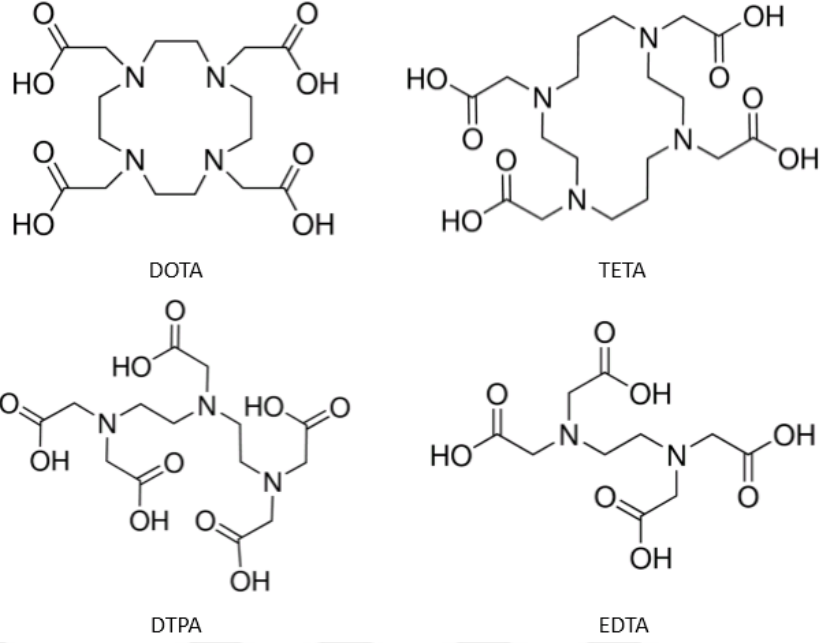
Çok küçük yapılar olarak nanoparçacıklar, endotelial hücre katmanlarından sızarak çeşitli dokulardaki hücresel yapılarla etkileşime giren taşıyıcı araçlardır. Aynı zamanda terapi ve teşhis ajanlarının yüksek kapasite ile taşınmasını sağlayacak büyüklükte dirler.

Radyoışaretili nanoparçacıklar, direkt olarak ^{198}Au gibi radyoaktif atomlarla veya sonradan radyoışaretilenen inert materyallerden oluşturulabilir. Bazı durumlarda radyoışaretleme için nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu gerekebilir. Bilinen iki yöntem vardır (**Şekil 2.11**). Birincisi radyonüklidin nanoparçacık yüzeyine her hangi bir ara parça veya şelatlayıcı olmaksızın konjugasyonudur. İkinci yöntem ise radyonüklidin nanoparçacığa kimyasal olarak bağlanmasını sağlayacak spesifik bir molekül ile işaretlemedir. Son yıllarda kimyasal teknikler oldukça ilerlemiş, metal iyonlarının taşıyıcı sistemden ayrılmasını önleyecek, sistemin kararlılığını sağlayacak ve aynı zamanda farmakokinetik davranışını değiştirecek birçok şelatlayıcı molekül için içine girmiştir.



Şekil 2.11 Nanoparçacıklar için radyoşaretleme yöntemleri (Enrique et al., 2014)

Biyomoleküllerin radyoşaretlenmesinde olduğu gibi nanoparçacıkların radyoşaretlenmesinde de çok dişli bifonksiyonel şelatlayıcı ajanlar (BŞA) kullanılmaktadır. Bifonksiyonel şelatlayıcı ajanın seçimi, radyonüklide, nanoparçacıkların sentez yöntemine ve fiziksel özelliklerine, istenen polarite ve biyodağılım özelliklerine bağlıdır. Yapılarına göre şelatlayıcılar DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid), TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-1,4,8,11-tetraacetic acid), NONA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid), NETA (4-[2-(bis-carboxymethylamino)-ethyl]-7-carboxymethyl-[1,4,7]triazolan-1-yl)-acetic acid) gibi makrosiklik ve DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid), H2dedpa (1,2-[[6-(carboxy)-pyridin-2-yl]-methylamino]ethane), HBED (N,N0-bis(2-hydroxybenzyl)-ethylenediamine-N,N0-diacetic acid), SHBED (N,N0-bis(2-hydroxy-5-sulfobenzyl)-ethylenediamine-N,N0-diacetic acid) gibi asiklik moleküller olarak iki gruba ayrılır.



Şekil 2.12 Bifonksiyonel şelatlayıcı ajanlar.

Nanoparçacıkların yüzeyinin BŞA' lar ile fonksiyonel hale getirilmesi, karboksil, amino, aldehit, tiol yada aktif hidrojen grupları ile kovalent bağlanmayı gerektirir. Reaksiyon basamakları, nanoparçacıkların sentezi sırasındaki yüzey kaplama aşamasına bağlıdır. Bu yöntem, yüksek verim ve kararlılıkta daha kolay sentezleme sağladığından, metalik, inorganik ve yarı iletken nanoparçacıklarla konjugasyon için elverişlidir. Bu avantajlar, bifonksiyonel şelatlamayı nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi için daha çok tercih edilen bir yöntem haline getirmiştir (Enrique et al., 2014).

Kucka ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada protein yapı ile kaplı gümüş nanoparçacıkların yüzeyi polietilen glikol ile modifiye ederek ^{211}At ile radyoişaretlenmiştir. Sistemden beklenen avantajlar, tümörlü bölgede EPR etkisi, immün sistem tarafından yakalanmama ve modifikasyon çeşitliliği olarak rapor edilmiştir (Kucka et al., 2006).

Cao ve arkadaşlarının hazırladığı yüzeyi modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıklar, radyoterapi amacıyla kullanılması hedeflenerek beta salıcı ^{188}Re ile radyoişaretlenmiştir (Cao et al., 2004).

Hedefleyici moleküle bağlı teşhis ve tedavi radyonüklitlerinin aynı platformda bulunduğu sistemlere teranostik sistemler denilmektedir. Uygun

radyoizotop çiftleri ile “SPECT+tedavi” ya da “PET+tedavi” için oluşturulmuş teranostiklere örnek olarak $^{99m}\text{Tc}/^{90}\text{Y}$, $^{68}\text{Ga}/^{177}\text{Lu}$, $^{68}\text{Ga}/^{90}\text{Y}$, $^{99m}\text{Tc}/^{177}\text{Lu}$ vb. verilebilir (Mirshojaei et al., 2016). Jiménez-Mancilla ve arkadaşları, çalışmalarında Tat(49–57)-Lys3-bombesin peptidlerine konjuge edilmiş ^{99m}Tc ve ^{177}Lu ile işaretli altın nanoparçacıkları, plazmonik fototermal terapi ve aktif hedefli radyoterapötik sistem olarak tasarlamış ve PC3 prostat kanserli hücreler üzerinde *in vitro* çalışmışlardır (Jiménez-Mancilla et al., 2013).

2.10 Nanoparçacıkların Yapı ve Yüzey Özelliklerinin Belirlenmesi

Zeta Potansiyeli Analizi: İyonik bir çözeltideki nanoparçacıkların etrafında iyonların kuvvetli şekilde bağlı olduğu bir iç tabaka (Stern tabaka) ve daha gevşek bağlı iyonlardan oluşan bir dış tabaka bulunmaktadır. Bu iki tabaka “Elektriksel çiftli katman” olarak adlandırılır. Bu bölge içinde, her parçacığın tek bir varlık gibi davrandığı kavramsal bir sınır bulunmaktadır. Bu sınırdaki potansiyel zeta potansiyelidir (McNeil, 2011).

Zeta potansiyelinin büyüklüğü, kolloidal sistemin potansiyel kararlılığı hakkında bir fikir verir. Sulu sistemde dağıtılmış kolloidal parçacıkların çoğu belirli bir yüzey yüküne sahiptir. Bu yüzey yükünün, parçacığın ve bunu çevreleyen ortamın içeriğine bağlı olarak birçok kaynağı vardır. Yüklü parçacıkların birbirlerini itme kuvvetleri ne kadar yüksek ise parçacıkların aglomere olarak çökme olasılıkları o oranda düşük olmaktadır yani kararlıdırlar. Eğer parçacıkların düşük zeta potansiyeli değerleri varsa, parçacıkların bir araya gelmesini ve çökme oluşumunu engelleyen bir kuvvet bulunmaz yani kararsız bir yapıdadırlar. Kararlı ve kararsız dağılımlar arasında bir ayırma çizgisi vardır ve bu değer genellikle +30 veya –30 mV’da alınır. Bu aralık dışında kalan parçacıklar kararlı olarak kabul edilir. 113S369 no’ lu TÜBİTAK projesi kapsamında satın alınan MALVERN ZETASIZER NANO ZS Model DLS cihazına ait resim **Şekil 2.13’** te verilmiştir.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS): Nanoparçacıkların boyutları klinik uygulamalardaki davranışlarını (tutulmuş, birikim, atılım) etkileyecek önemli bir faktördür. Örneğin, 5 nm’ den küçük çapa sahip dendrimerler dokuyu çevreleyen kan damarı duvarından kolayca geçebilir. 3 nm ile 6 nm arası parçacık çapına sahip dendrimerler hemen böbrek yolu ile atılır. 6-8 nm aralığında ise aşırı geçirgen tümör damarlarından geçebilirler. Nanoparçacıkların çözelti içerisindeki boyutunu

belirleyebilecek çok az yöntem bulunmaktadır. Bunların birçoğu yaygın olarak kullanılmamakta ve maliyet açısından uygun yöntemler değildir.

Foton korelasyon spektroskopisi olarak da bilinen dinamik ışık saçılım yöntemi, çözelti içerisinde rastgele olan “brownian hareketi” etkisindeki parçacıklardan saçılan ışık şiddetindeki değişimi mikrosaniye mertebesinde ölçerek boyutla ilişkilendirir. Işık şiddetinin zamanla değişiminden korelasyon fonksiyonu hesaplanır. Bu fonksiyondan difüzyon katsayısı bulunur. Parçacıkların küresel morfolojisine ait standart varsayımlar, örneğin vizkositesi ve ölçümün gerçekleştirildiği sıcaklık da göz önünde bulundurularak difüzyon katsayısından (D) Stokes-Einstein eşitliği ile hidrodinamik çap (d_h) hesaplanır.

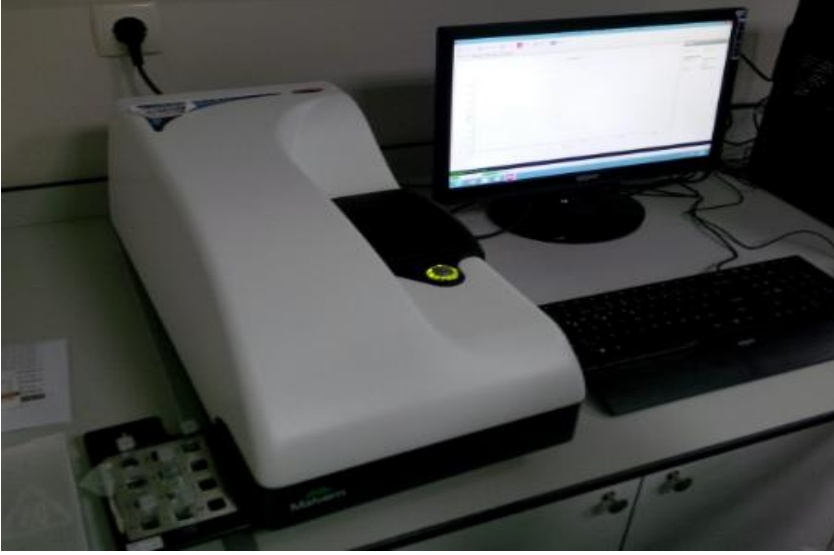
$$d_h = kT / 3\pi\eta D$$

Burada k , Boltzmann sabiti; T , mutlak sıcaklık (K°); η , çözeltinin vizkositesidir. Bu eşitlikten de anlaşılacağı üzere sıcaklık ve vizkositenin sabit olduğu durumda parçacıkların difüzyon katsayısını sadece boyutları etkilemektedir.

DLS ile ölçülen çap değeri bir parçacığın bir sıvı içerisinde nasıl hareket ettiğini gösterir ve bu çap parçacığın hidrodinamik çapı olarak adlandırılır. Yöntemin en önemli avantajları kalibrasyon gerektirmemesi, kısa analiz süresi ve mikron altı partiküllere duyarlı olmasıdır (Kamble et al., 2010).

Genelde nanoparçacıklar sentez sırasındaki deneysel hatalardan ve içerdikleri çok sayıda atomun yapısal varyasyonundan kaynaklanan bir boyut dağılımı gösterirler. Bu nedenle boyut ölçümünde merkezi eğilim ve parçacıktan parçacığa değişen boyut farklılıklarına önem verilir. Polidispersite indeksi (PI), parçacıkların boyut farklılıkları için kümülant analizinden elde edilen ve dağılımın görelî varyansına eşdeğer birimsiz bir niceliktir (McNeil, 2011).

Ölçümü yapılacak olan sistemin kararlı yapıda olması gerekmektedir. Eğer nanoparçacıkların zeta potansiyeli -30 mV ve +30 mV aralığında ise elektrostatik ya da kimyasal düzenleme ile kararlı hale getirilmeye çalışılır. Elektrostatik düzenleme statik yükleme ile, kimyasal düzenleme ise alkol gibi maddelerin uygun miktarda ilavesi ile pH değiştirilerek gerçekleştirilir (TÜBİTAK MAM, 2010).



Şekil 2.13. MALVERN ZETASIZER NANO ZS Model DLS cihazı

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM): Mikroskoplar, canlı organizmaların ve malzemelerin yapılarını ve çeşitli uygulamalar sonrasındaki değişimleri görmek için önemli cihazlardır. Işık mikroskoplarında kaynak olarak görünür ışık kullanılması çözünürlük ve büyütme imkanlarını sınırlamaktadır. Bu nedenle elektron mikroskopları geliştirilmiştir. İlk olarak 1931’de E. Ruska ve M. Knoll tarafından geçirimli elektron mikroskobu geliştirilmiştir.

TEM, SEM’den farklı olarak incelenecek örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülerek floresans ekran, fotoğrafik film katmanı ya da CCD kamera gibi bir sensör üzerine odaklanır. TEM görüntüleme yönteminde en büyük kısıtlama numune hazırlamada ortaya çıkmaktadır (Mukherjee, 2009).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM): 1935 yılında M. Knoll tarafından icad edilen SEM yöntemi, katı örneklerin morfolojik analizlerinde ve parçacık büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. SEM, bir elektron tabancasından maksimum 30 kV voltaj ile hızlandırılmış elektronların incelenecek malzeme üzerinde taratılması sırasında elektron ve malzeme atomları arasındaki girişimlerin uygun dedektör tarafından tespit edilmesi ve sinyal güçlendiricilerden geçtikten sonra monitöre yansıtılması prensibine göre çalışmaktadır (TÜBİTAK MAM, 2010). Bu yansıyan elektronlar kullanılarak malzeme yüzeyinin topografik yapısı hakkında bilgi edinilmesinin yanı sıra yüzey yakınındaki kimyasal bileşim hakkında da bilgi elde edilebilmektedir. SEM, görüntüleme çeşitliliğe sahip

olması, çok yönlü olması, örnek hazırlamanın kolay olması gibi nedenlerle yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biridir. SEM ile hacimce çok yoğun cisimler incelendiğinde yüksek ayırım gücü elde edilmektedir. Bir diğer üstünlüğü de örnek görüntüsünün üç boyutlu olarak belirlenmesidir (İçhedef, 2010).



3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- Stearik asit (Sigma)
- Oleik asit (Sigma)
- Poloxamer 188 (Sigma)
- Folik asit (Sigma)
- N-hidroksisüksinimid (Sigma)
- Disikloheksilkarbodiimid (Sigma)
- Tetrahidrofuran (Sigma)
- Dimetilsülfoksit (Sigma)
- PEG-bisamin (Sigma)
- Trietilamin (Sigma)
- Kolesteril hemisüksinat (Sigma)
- Aseton (Sigma)
- Paklitaksel (Bristol-Myers Squibb)
- P-10 gazı
- Argon (Ar) gazı
- Karbonmonoksit (CO) gazı
- Sodyum karbonat (Na_2CO_3) (Sigma)
- Sodyum borhidrür (NaBH_4) (Sigma)
- Sodyum/Potasyum tatarat ($\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Riedel Heiden)
- Sodyum perteknatat ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Trifloro asetik asit (TFA) (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi)
- ITLC-SG Silika kaplı alüminyum şeritler (Merck-105554)
- ITLC-C Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck-105565)

- MCF7 insan meme (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- HeLa insan serviks (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- A549 insan akciğer (karsinoma) epiteli (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Lonza)
- Dulbecco's MEM (Lonza)
- L-Glutamine (Lonza)
- Essential amino acid (Lonza)
- Sodyum pruvat (Lonza)
- Fetal bovine serum (Biowest)
- Penisilin/streptomisin (Lonza)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- PBS (Amresco)
- Tripsin EDTA (Lonza)
- Cell Counting Kit-8 (WST-8) (Sigma Aldrich)
- BCA (bicinchoninic acid) Protein Assay kit (Thermo Scientific Pierce)
- Albumin human fluoresceinisothiocyanate labeled (Sigma)
- Sephadex G-25 (Sigma)
- Dead END Fluorometric TUNEL System (Promega)
- Alfazyne %2, (Alfasan International B.V.)
- Alfamine %10, (Alfasan International B.V.)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- Parçacık boyutu analizi ile zeta potansiyel ölçümleri (MALVERN ZETASIZER NANO ZS Model DLS) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC Shimadzu (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- TLC Scanner (Bioscan AR-2000) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC küvetleri (Sigma) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Ultrasonik Homojenizatör (Bandelin, Sonoplus HD 2070) (Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- CO2 inkübatörü (Sanyo) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Işık mikroskobu (Olympus) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Inverted mikroskop (Leica) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Otoklav (Hirayama) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Su banyosu (Memmert) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Floresan ataçmanlı araştırma mikroskobu (Olympus) (EÜ., Nük.Bil. Ens., Nük.Uyg. AD.)
- Gama kamera (GE Infania) (Celal Bayar Üni. Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp AD.)

Hizmet alımları:

- SEM (Scanning electron microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- TEM (FEI Tecnai G² Spirit Biotwin) (ODTÜ Merkez Laboratuvarı Ar-Ge Eğitim ve Ölçüm Merkezi) ve (JEOL JEM 2100F HRTEM) (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Malzeme Araştırma Laboratuvarı)
- NMR (MERCURYplus-AS 400) (EÜ-EBİLTEM) ve (Varian Mercury 400 MHz) (Atatürk Üniversitesi Fen Fakültesi Laboratuvarları)

3.2 Folat Türevi Sentezi Basamakları

Bu bölümde lipofilik bir folat türevi olan folat polietilen glikol-kolesterol hemisüksinat (Fol-PEG-CHEMS) sentezi gerçekleştirilmiştir.

3.2.1 Fol-PEG-Amin Sentezi:

Bu basamakta Fol-PEG-Amin sentezi için 53 mg folik asit, 17 mg N-hidroksisüksinimid (NHS) ve 20 mg disikloheksilkarbodiimid (DCC), 3 mL tetrahidrafuran (THF) ve 2 mL dimetilsülfoksit (DMSO) karışımı içerisinde çözülerek üzerine 335 mg PEG-bisamine ve 0.25 mmol trietilamin (TEA) ilave edilmiştir. Reaksiyonun gece boyunca oda sıcaklığında gerçekleşmesi sağlandıktan sonra THF buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra oluşan ürün Sephadex G-25 jel kromatografisi yöntemi ile saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürün liyofilize edilerek 65 mg Fol-PEG-Amin elde edilmiştir.

3.2.2 CHEMS-NHS sentezi:

Bu aşamada öncelikle mol oranlarına göre hesaplanan 109 mg kolesteril hemisüksinat (CHEMS), 52 mg NHS ve 135 mg DCC bir cam balonda kuru THF içerisinde konularak azot ortamında, oda sıcaklığında reaksiyonu sağlanmıştır. Reaksiyon sonunda oluşan disikloheksil üre ortamdan süzülerek uzaklaştırılmış ve süzüntü THF ile yıkanmıştır. Reaksiyon kabından THF buharlaştırılmış kaptaki kalan ürün vakum altında kurutularak tartımı alınmıştır. Elde edilen CHEMS-NHS %100 etil asetat içerisinde rekristalizasyon yöntemiyle saflaştırılmıştır. Saflaştırılan ürün vakum altında kurutulduktan sonra yeniden tartılmıştır. 437 mg olarak tartılan ürünün bir bölümünün yapı analizi ¹H-NMR ile gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Fol-PEG-CHEMS Sentezi:

Mol oranlarına göre hesaplanan 65 mg Fol-PEG-amin ve 14 mg CHEMS-NHS bir cam balona konularak üzerine 15 mL kloroform eklenmiş ve gece boyunca oda sıcaklığında reaksiyon devam etmiştir. Reaksiyon sonunda kloroform buharlaştırılarak ortamdan uzaklaştırılmıştır. Fol-PEG-CHEMS (folat-polietilen glikol-kolesteril hemisüksinat) misellerini oluşturmak için çökeltiye 50 mM sodyum karbonat ilave edilerek diyaliz membran ile saflaştırma yapılmıştır.

Sentezlenen Fol-PEG-CHEMS' in yapı analizi ¹H-NMR ve HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Fol-PEG-CHEMS için HPLC analizi ODS-2 HYPERSİL C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (Thermo) kolonu kullanılarak, (SPD-10AV) UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atvp sisteminde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak su (A) - asetonitril (B) sistemi kullanılmıştır. Çözgen akış sistemi **Çizelge 3.1'** de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Fol-PEG-CHEMS için HPLC Çözgen Akış Sistemi

Zaman	Çözgen A	Çözgen B
0 – 3 dk.	95	5
3 – 15 dk.	50	50
15 – 25 dk.	50	50
25 – 30 dk.	0	100
30 – 35 dk.	0	100

Çözgen oranları UV dedektöründe dalga boyu 227 nm olacak şekilde çalışılmıştır. Sıcaklık 25 °C ve akış hızı ise 1 mL/dk olarak uygulanmıştır.

3.3 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyon Basamakları

3.3.1 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların (SLN-PTX)

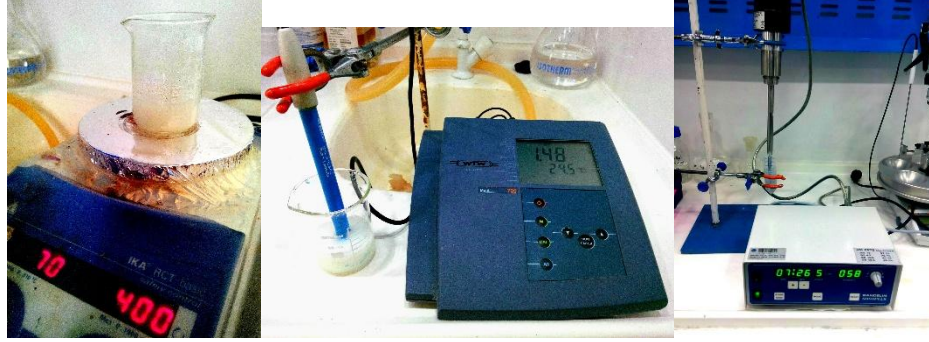
Sentezi:

Folat reseptörü hedefli paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar solvent difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır (Hu et al., 2005). Yüzey modifikasyonu, Wan ve arkadaşlarının çalışmasında olduğu gibi Fol-PEG-CHEMS nanoparçacıkların hazırlanma sırasında lipid-su karışımına ilave edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Wan et al., 2008).

SLN'lerin hazırlanması amacıyla öncelikle 0.003 mmol paklitaksel (3 mg / 0.5 mL), 0.16 mmol stearik asit (47 mg) ve 0.08 mmol oleik asit (22 mg / 25 µL), 2 mL etanol ve 2 mL aseton karışımı içerisinde ultrasonik banyoda 70 °C'de çözülmüştür.

Aktif hedefleme amacıyla yapılan yüzey modifikasyonu, lipid-PEG-ligand konjugatının nanoparçacıklar hazırlandıktan sonra karışıma ilave edilmesinin yanı sıra alternatif olarak hazırlama sırasında diğer bileşenlerle beraber karıştırılarak gerçekleştirilebilir (Feng and Mumper, 2013). Nanoparçacıkların modifiye edilmesi için bölüm 3.2.3'de sentezlenen Fol-PEG-CHEMS (6 mg) nanoparçacıkların hazırlanması sırasında karışıma ilave edilmiştir. Bu karışım içerisinde 150 µL poloxamer188 bulunan 40 mL bidistile su içerisine ilave edilerek 400 rpm'de 70 °C' de 30 dakika süresince karıştırılmıştır. Katı lipid

nanoparçacıkların hazırlanması sırasındaki mekanik karıştırma pH ayarlama ve homojenizasyon aşamaları Şekil 3.1' de görülmektedir.



Şekil 3.1. Katı lipid nanoparçacıkların hazırlanması sırasındaki mekanik karıştırma pH ayarlama ve homojenizasyon aşamaları

Karışım oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve parçacıkların pH'ı 0.1 M HCl çözeltisi ile 1.3'e ayarlanmıştır. Daha sonra nanoparçacıkların 10.000 rpm'de 2 saat süresince santrifüjlenerek çöktürülmesi sağlanmıştır. Elde edilen edilen SLN-PTX sıvı azot içerisinde dondurulup, liyofilize edilerek karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.3.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen SLN-PTX nanoparçacıkları için karakterizasyon çalışmaları farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen SLN-PTX nanoparçacıklarının parçacık boyutu, zeta potansiyeli ve morfolojik özellikleri, belirlenmiştir. Bu amaçla Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Zeta Potansiyeli ölçümü (ZP), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) yöntemleri kullanılmıştır. Bu amaçla sentezlenen SLN-PTX santrifüjlendikten sonra alt faz 400 µL poloxamer 188 içeren 10 mL su içerisinde 500 rpm'de 20 dakika karıştırılmış ve 15 mL'lik falkon tüp içerisine alınmıştır. Daha sonra homojenizatörde (Bandelin marka HD 2070 model) homojenizatörün titanyum ucu (MS73) örneğin ortasında olacak şekilde maksimum gücün % 60'ı kullanılarak 10 dakika süresince homojenize edilmiştir.

DLS ve ZP çalışması

SLN-PTX nanoparçacıklarının su içerisindeki parçacık boyutu analizi MALVERN ZETASIZER NANO ZS Model DLS cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

Hazırlanan 1 mL örnek tek kullanımlık küvet içerisine koyularak parçacık boyutu ölçümü 3 tekrarlı olarak yapılmıştır.

SEM çalışması

SEM analizi için ise sentezlenen SLN-PTX sıvı azot içerisinde dondurulduktan sonra liyofilizatöre konularak 72 saat boyunca liyofilize edilmiş ve -85 °C'de saklanmıştır. Sentezlenen SLN nanoparçacıkların boyutlarını ve morfolojik özelliklerini belirlemek amacıyla İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Phillips XL-30 S FEG cihazı kullanılarak SEM görüntüleri alınmıştır.

TEM çalışması

Katı lipid nanoparçacıkların karakterizasyonu amacıyla TEM dijital görüntüleri; Orta Doğu Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuvarında (FEI Tecnai G² Spirit Bio(TWIN) Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu ile 200 mesh karbon film kaplı bakır grid kullanılarak 120 kV) ve Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Araştırma Laboratuvarları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde (JEOL JEM 2100F HRTEM Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskobu) alınmıştır.

HPLC çalışması

Sentezlenen paklitaksel yüklü SLN nanoparçacıklarının HPLC analizi ODS-2 HYPERSIL C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (Thermo) kolonu kullanılarak, (SPD-10AV) UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atvp sisteminde gerçekleştirilmiştir. **Çizelge 3.1**'de verilen koşullarda asetonitril-su çözgen sistemi olarak kullanılmıştır. Çalışmada dalga boyu 227 nm (UV dedektörü), sıcaklık 25 °C ve akış hızı ise 1 mL/dk olarak uygulanmıştır. Nanoparçacıklar metanol içerisinde çözüldükten sonra 500 µL örnek vial içerisine konup HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

3.3.3 İlaç Yükleme Kapasitesinin Belirlenmesi

Katı lipid nanoparçacıkların içerisinde hapsedilen ilaç miktarını belirlemek için HPLC yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem için öncelikle beş farklı konsantrasyonda (12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL) paklitaksel örneği hazırlanmıştır. Her bir konsantrasyon için HPLC kromatogramındaki paklitaksel piki altında kalan alanlar ölçülmüştür. Bu ölçümler sonucunda konsantrasyona karşı pik altında kalan alan ile çizilen

grafikten bir kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Çalışmalar Thermo ODS-2 HYPERSIL (250 x 4.6) kolonu kullanılarak, (SPD-10AV) UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atpv sisteminde gerçekleştirilmiştir. Mobil faz olarak su (çözgen A) ve asetonitril (çözgen B) (50:50, v/v) kullanılmıştır. UV dedektöründe dalga boyu 210 nm olacak şekilde çalışılmıştır. Sıcaklık 25 °C ve akış hızı ise 1 mL/dk olarak uygulanmıştır.

3.4 Radyoışaretleme Çalışmaları

3.4.1 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Korunun Sentezi:

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$ koru Alberto ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır (Alberto et al., 1998; Waibel et al., 1999). Reaksiyonların tüm aşamaları argon gazı ortamında gerçekleştirilmiştir. $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ trikarbonil korunun hazırlanması için öncelikle 5.5 mg NaBH_4 , 4 mg Na_2CO_3 , 20 mg Na/K tartarat tartılıp bir deney tüpüne konularak tüpün ağzı hava almayacak şekilde kapatılmıştır. Argon gazı ortamında tüpten 15 dakika süresince CO gazı geçirilip 10 mCi aktiviteye sahip 1 mL $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ deney tüpüne eklenmiştir. Ardından tüp 30 dakika 90°C kuru ısıtıcıda bekletilmiştir. Daha sonra tüp buz banyosunda soğutulup, 220 µL 1 M HCl:PBS (3:1; h/h) çözeltisi ile pH 7' ye ayarlanmıştır.

3.4.2 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Korunun Kalite Kontrolü:

Hazırlanan $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ korunun kalite kontrollerinde İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC) kullanılmıştır.

İnce Tabaka Radyokromatografisi Yöntemi (TLRC)

Tc(I) tri karbonil korunun TLRC ile kalite kontrol çalışmalarında sabit faz olarak (10 cm x 1.5 cm) boyutlarında hazırlanan silikajel kaplı alüminyum şeritler çözgen sistemi olarak da serum fizyolojik (SF) ve asetonitril kullanılmıştır. Bu çalışmada hazırlanan üçer adet TLRC şeridinden ilkinde $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve ikinciye $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ örneklerinden damlatılmıştır (örnek TLRC şeridinin uygulama noktasına (0.5 cm) kılcal boru yardımıyla damlatılır). TLRC şeritlerine damlatılan örnekler kuruduktan sonra her birinde farklı çözgenler bulunan (asetonitril ve serum fizyolojik) TLC tanklarına yerleştirilmiştir. Tanktaki çözgenler şeritler üzerinde yürüdüktan sonra şeritler tanklardan çıkarılarak oda sıcaklığında kurutulmuş ve şeffaf bantla kaplanmıştır. Bioscan AR-2000 TLC tarayıcı

kullanılarak şeritlerin her birinin radyokromatogramları alınmıştır. Radyokromatogram tarayıcı cihazının doz kalibratörüne benzer olarak başlık kısmı iyon odası şeklinde tasarlanmıştır. İyon odasının orta kısmında bir anot ve bunu çevreleyen bir katot bulunmaktadır. Oda içerisi % 90 argon ve % 10 metan karışımından oluşan P10 gazı ile doludur. Radyoaktif çekirdekten yayınlanan beta veya gama ışınlarının etkisiyle P10 gazı iyonlaşır ve anot ile katot arasında voltaj farkı oluşturur. Oluşan bu fark sayaca bağlı olan elektronik bir sistemle sayılır ve bilgisayar ortamında kromatogram olarak görüntülenir. Şeritler cihaza yerleştirildikten sonra tarama işlemine başlamadan önce piklerin R_f değerlerinin cihaz tarafından belirlenebilmesi için tarama süresi, damlatma noktasının ve yürütme işleminin sonlandırıldığı noktanın kromatografi kağıdına olan uzaklığı cihaza ait bilgisayar programına kaydedilmektedir. Bu bilgilerle elde edilen kromatogramlardan radyoaktif maddelerin taşındığı R_f değerleri ve verimler elde edilmektedir. TLRC yönteminde bulunan R_f değeri radyokimyasal verimin bir ölçüsüdür.

Bu çalışmada sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla deneyler en az beş kez tekrarlanmıştır.

HPLRC yöntemi

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ korunun HPLRC çalışmaları Nucleodur 100-5 RP-C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (Macharey-Nagel) kolonu kullanılarak, NaI(Tl) radyoaktivite dedektörü ve (SPD-10AV) UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atpv sisteminde gerçekleştirilmiştir. Hareketli faz olarak % 0.1 trifloroasetik asit (TFA) (çözgen A) ve metanol (çözgen B) kullanılmıştır. Çözgen akış sistemi **Çizelge 3.2'** de verildiği şekilde zaman programı ayarlanmıştır. Çalışma süresince sıcaklık 25 °C ve akış hızı ise 1 mL/dk olarak uygulanmıştır.

Çizelge 3.2. $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ için HPLC Çözgen Akış Sistemi.

Zaman	Çözgen A	Çözgen B
0 – 3 dk.	100	0
3 – 9 dk.	75	25
9– 20 dk.	66	34
20 – 28 dk.	0	100
28 – 30 dk.	100	0

3.4.3 Katı Lipid Nanoparçacıkların $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Koruması ile Radyoışaretlenmesi:

SLN dispersiyonundan 500 μL alınarak üzerine 50 μL (3 mCi) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ çözeltisi konulmuştur. 80 $^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 60 dakika bekletilmiştir. Radyoışaretli katı lipid nanoparçacıkların kalite kontrolleri ince tabaka radyokromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi yöntemleriyle belirlenmiştir.

$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için TLRC

Radyoışaretli nanoparçacıkların kalite kontrolü;

- Piridin / asetik asit / su (3:5:1,5),
- Asetonitril (ACN),
- Serum fizyolojik (SF),
- Metanol:HCl (95:5, v/v),
- Metanol-su (3:1, v/v) banyo çözeltileri hareketli faz olarak, selüloz ve silika jel TLC tabakaları sabit faz olarak denenmiştir.

Her bir banyo çözeltisinden alınan şeritler radyokromatogram tarayıcı cihazı (Bioscan 2000) kullanılarak tarandıktan sonra alınan kromatogramlardan R_f değerleri belirlenmiştir.

$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için HPLRC

HPLRC çalışmaları için Nucleodur 100-5 RP-C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (Macharey-Nagel) kolonu kullanılarak, NaI(Tl) radyoaktivite dedektörü ve (SPD-10AV) UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atvp sisteminde gerçekleştirilmiştir. Çözgen sistemi olarak $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kompleksine benzer şekilde % 0.1 trifloroasetik asit (TFA) (A) ve metanol (B) kullanılmıştır. Hareketli faz akış sistemi **Çizelge 3.2'** de verildiği gibi zaman programı ayarlanmıştır. Radyoaktivite dedektörü olarak NaI(Tl) sintilasyon dedektörü kullanılmıştır. Çalışma süresince sıcaklık 25 $^\circ\text{C}$ ve akış hızı ise 1 mL/dk olarak uygulanmıştır.

3.5 Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları

3.5.1 *In Vitro* Çalışmalar

Yapılan bu çalışmada, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ kuru ile işaretli PTX yüklü folat reseptörü hedefli katı lipid nanoparçacıkların (^{99m}Tc -SLN-PTX) hücre düzeyinde etkinliklerinin incelenmesi için folat reseptörü pozitif MCF7 meme (adenokarsinoma) epiteli ve HeLa serviks (adenokarsinoma) epiteli ile folat reseptörü negatif A549 akciğer (karsinoma) epitelileri kullanıldı. MCF7 ile HeLa serviks (adenokarsinoma) epiteli American Type Culture Collection (Rockville, MD, ABD)' dan, A549 akciğer (karsinoma) epiteli Ege Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nden temin edilmiştir.

Çalışmanın bu basamağı hücre ekimi ve pasajlama, sitotoksosite, inkorporasyon, floresan görüntüleme ve apoptoz aşamalarını içermektedir.

Hücre ekimi ve pasajlanması:

MCF7 ve HeLa hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esansiyel amino asitler, 1 mM sodyum pirüvat ve %10 fetal bovine serum (FBS)' den oluşan medyumda; A549 hücreleri ise Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum pirüvat ve % 10 fetal bovine serum (FBS)' den oluşan medyumda üretildi. **Şekil 3.2'** de MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinin üretimi sırasındaki inkübasyonu görülmektedir.

Tüm hücreler buldukları flaskların % 80' ini kaplayacak kadar üretildikten sonra % 0.25 (w/v) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile buldukları flasktan ayrılmaları sağlanarak çalışmada kullanılmayacak olan hücreler % 10 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80 °C' de dondurulduktan sonra, -190 °C' de sıvı azot içinde stoklandı.



Şekil 3.2. MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinin inkübasyonu

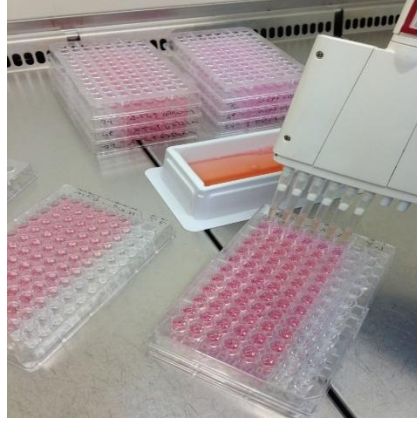
Sitotoksosite çalışmaları:

Bu aşamada PTX ve SLN-PTX farklı konsantrasyonları kullanılarak MCF7, HeLa ve A549 hücre hatları üzerinde sitotoksosite çalışması yapılmıştır.

Çalışmada IC₅₀ (% 50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı) değerleri WST-8 testi (2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-dihydroxy tetrazolium) ile kolorimetrik olarak belirlendi. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikrotelaterde her bir kuyucuğa 10⁵ hücre/mL olacak şekilde hazırlandı (Şekil 3.3). Her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı (0.63 ng/mL, 1.25 ng/mL, 2.50 ng/mL, 5.00 ng/mL ve 10.00ng/mL) konsantrasyonda PTX ve SLN-PTX örnekleri eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen hücre besiyeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre üç kez tekrar edilerek çalışıldı.

Hücreler 37 °C sıcaklıkta % 5 CO₂ ortamında 48 saate kadar inkübe edildi. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa 10 µL WST solüsyonu eklendi ve dört saat inkübe edildikten sonra 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi. Aşağıda verilen formülden yararlanılarak % sitotoksosite değerleri hesaplandı.

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



Şekil 3.3. MCF7, HeLa ve A549 hücreleri ile yapılan sitotosisite çalışması.

İnkorporasyon çalışmaları:

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru ile işaretli SLN örneklerinin inkorporasyon çalışmaları MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerinde yapılmıştır.

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$: Her hücre hattı için 12' şer kuyucuğa, herbir kuyucuğa 500 μL besiyeri içerisinde 50 μCi $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru eklenmiştir.

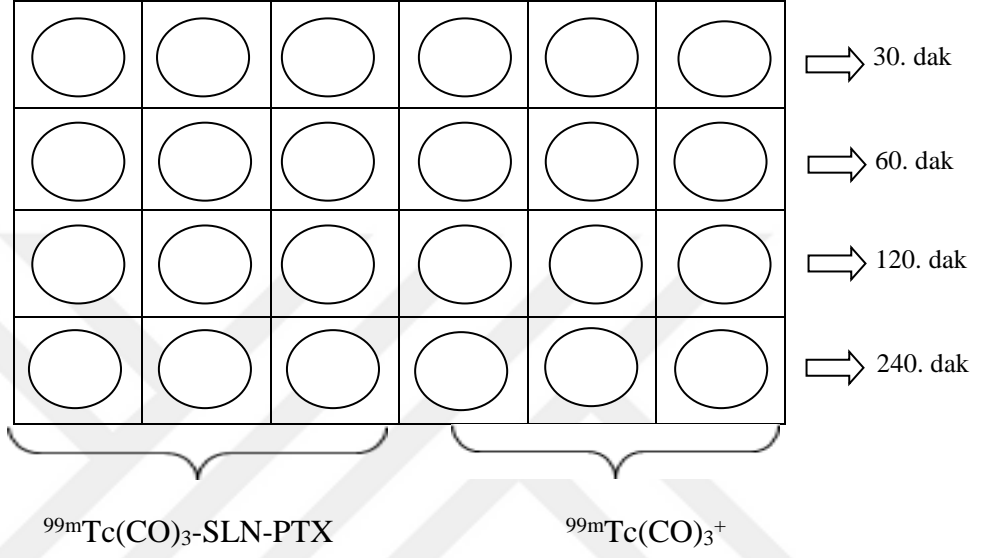
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ile işaretli SLN-PTX: Her hücre hattı için 12' şer kuyucuğa, herbir kuyucuğa 500 μL besiyeri içerisinde 50 μCi $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru ile işaretli 5 μL SLN-PTX eklenmiştir (**Şekil 3.4**).



Şekil 3.4. İnkorporasyon çalışmasında kullanılan 24'lük flasklar.

Hücrelerin üzerindeki besiyerler atılıp hücreler serum fizyolojik çözeltisiyle yıkanarak 24 lük flaskların her bir kuyucuğuna **Şekil 3.5'** te gösterilen şekilde $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru ve işaretli SLN örneklerinin bulunduğu besiyerlerden 50 $\mu\text{Ci}/500 \mu\text{L}$ eklenmiştir. 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda

hücreler üzerindeki besi ortamı atılarak önce % 0.9' luk NaCl ile yıkanmış daha sonra 500 µL Ripa tamponu ilave edilmiştir. Hücrelerde kalan aktivite Cd(Te) dedektör ile sayılmıştır. Sayımlar bittikten sonra protein analizi için pipet ucuyla hücre yüzeyleri kazınmıştır. Ependorf tüplerine alınan bu çözeltilerde (25 µL) protein analizi spektrofotometre ile yapılarak hücre başına düşen bağlanma verimi hesaplanmıştır.



Şekil 3.5. A549, HeLa ve MCF7 hücreleri üzerinde zamana karşı bağlanma veriminin incelenmesi deneyinde kullanılan 24' lük flaskların genel yapısı.

Hücre Kültürü İstatistik Analiz Çalışması

Hücre kültürü çalışmalardan elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad 5.0 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her parametre için iki ayrı denemede toplam altı tekrar yapıp, ortalama bağlanma değerleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Her bir parametre seviyesi için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA ve lineer regresyon analizleri yapılmıştır. Analiz sonuçları değerlendirilirken bağlanma değerleri arasında 0.95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

Floresan görüntüleme çalışması

Öncelikle 1 mg SLN-PTX 1 mL 0.1 M sodyum karbonat çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Daha sonra 1 mg FITC (fluorescein isothiocyanate) çözeltisi 1 mL susuz DMSO içerisinde çözülmüş ve SLN-PTX çözeltisi içerisine 50 uL FITC çözeltisi 5 uL'lik kısımlar halinde yavaşça ve sürekli karıştırma ile ilave edilmiştir. FITC ilave edildikten sonra hazırlanan çözelti karanlıkta 4 °C' de 8 saat süresince inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında FITC işaretli çözeltilere 50 µM NH₄Cl çözeltisi ilave edilip 4 °C' de 2 saat inkübasyona bırakılmıştır. Son olarak nanoparçacıklar, bağlanmamış FITC' nin ayrılması için 1 gün önceden hazırlanan Sephadex G-25 kolondan geçirilmiştir. Oluşan iki banttı hızlı hareket eden FITC bağlı SLN-PTX' dir ve ışığa duyarlı olduğu için tüm bu işlemler karanlık oda koşullarında gerçekleştirilmiştir.

FITC ile işaretli olan SLN-PTX'in floresan görüntüleme çalışmaları MCF7, HeLa ve A549 hücre hatları üzerinde yapılmıştır.



Şekil 3.6. FITC ile işaretli olan SLN-PTX'in floresan görüntüleme çalışmaları

Görüntüleme çalışmalarında **Şekil 3.6'** da görülen 8 kuyucuklu chamber slide malzemeleri kullanılmıştır. MCF7, HeLa ve A549 hücreleri chamber slide'a ekildi. 24 saat sonunda yüzeye tutunan hücrelerin üzerindeki besiyerler değiştirilerek hücreler üzerine FITC ile işaretli olan SLN-PTX içeren besiyer konuldu. FITC'nin ışığa karşı duyarlı olması sebebiyle işlemler karanlık oda koşullarında gerçekleştirildi.

240 dakika olarak tespit edilen optimum inkübasyon zamanı sonrasında FITC işaretli SLN-PTX kuyucuklar üzerinden alınarak kuyucuklar 2 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından chamber slide'ın üzerindeki plastik kısım sökülerek uzaklaştırıldı ve lam üzerindeki hücreler floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) filtre ile incelendi.

Apoptoz çalışması

SLN-PTX' in apoptotik etkisi MCF7, HeLa ve A549 hücre hatlarında Tunnel yöntemi ile çalışılmıştır. Her bir grupta en az 300 hücre değerlendirilmiştir. Hücrelerin ekimi chamber slide' lara yapıldı. 24 saatin sonunda yüzeye tutunan hücrelerin besiyerleri değiştirilerek her bir hücreye 10 ng/mL PTX içeren SLN-PTX çözeltisi içeren besiyerler ilave edildi. 24 saat sonra chamber slide'ın kuyucukları üzerindeki besiyer atıldı ve hücreler 2 kez PBS ile yıkandı. Chamber slide'ın üzerindeki plastik kısım çıkarılarak uzaklaştırıldı ve çalışmaya hücrelerin üzerinde bulunduğu lamlar ile devam edildi. Hücrelerin üzerinde bulunduğu lamlar cam şale içerisinde önceden hazırlanmış olan % 4' lük paraformaldehidin PBS içindeki (pH 7.4) çözeltisine aktarılarak +4 °C' de 25 dakika bekletildi. Ardından, hücrelerin daha geçirgen hale gelmesi için lamlar PBS ile hazırlanmış % 0.2 Triton-X' çözeltisi içerisinde 5 dakika bekletildi. Lamlar PBS ile 5'er dakika süreyle 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra lamlar üzerine 100 µL equilibration tamponu eklendi ve 10 dakika bekletildi. Bu sırada rTdT inkübasyon tamponu hazırlandı: 90 µL equilibration tamponu, 10 µL nükleotit karışımı ve 2 µL rTdT enzimi. 5-10 dakikanın sonunda, lamlarda bulunan fazla sıvı uzaklaştırıldı ve yerine nükleotid karışımı eklendi ve üzerine lamel kapatıldı. 37°C de nemli etüvde 60 dakika bekletildi. Oda sıcaklığında 2XSSC içinde, reaksiyonun durması için 15 dakika bekletildi. Lamlar PBS içerisinde 5 dakika boyunca yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Lamlar 1 µg/ml olacak şekilde hazırlanmış olan propidyumiyodid solüsyonu içerisinde 15 dakika bekletildi ve floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreler kullanılarak görüntüler alındı.

3.5.2 *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmalar Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 07.03.2013 tarih ve 77637435-021 sayılı izin belgesi doğrultusunda Celal Bayar Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim dalında

gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız ağırlıkları 220-280 g arasında değişen 6 haftalık dişi Wistar albino sıçanlar Kobay Deney Hayvanları Laboratuvarı Sanayi ve Ticaret A.Ş' den temin edilmiştir.

In vivo çalışmalar gama kamera görüntüleme ve biyodağılım olarak iki bölümde gerçekleştirilmiştir. Çalışmaların yapıldığı günlerde sıçanların ağırlıklarına göre her bir sıçana verilmesi gereken aktivite hesaplanarak paklitaksel yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıklar, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{.SLN-PTX}$, taze olarak hazırlanmıştır. Biyodağılım için yapılan her radyoişaretleme çalışmasında radyoişaretleme kalite kontrol çalışmaları (TLRC ve HPLRC) gerçekleştirilmiş ve % 90 radyoişaretleme verimi sağlanmıştır. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{.SLN-PTX}$ tutulumun anlamlı olarak belirlenebilmesi düşüncesiyle *in vivo* çalışmalarda folat reseptörü (FR) doyurma işlemine gerek duyulmuştur.

In vivo görüntüleme çalışmaları

Bu basamakta $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile işaretli SLN-PTX' lerin biyolojik davranışını incelemek amacıyla 6 adet dişi Wistar Albino sıçan üzerinde GE İnfina Gama Kamera ile görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Bu basamak için öncelikle paklitaksel yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıklar hazırlanmıştır. 500 μL (500 μg) SLN-PTX alınıp üzerine 3 mCi / 50 μL $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ilave edilip 60 dakika 80 °C'de inkübe edilerek dört (2 yedek olmak üzere) işaretleme reaksiyonu % 90 verimle gerçekleştirilmiştir.

➤ Sıçanların tedirginliklerinin giderilmesi ve acı hissetmemeleri amacıyla her bir sıçana ketamin (50 mg/kg)/ ksilazin (10 mg/kg) kas içine (100 μL) uygulanarak anestezi gerçekleştirilmiştir.

➤ Görüntüleme çalışmasında ikişerli 3 grup halinde deneyler gerçekleştirilmiştir (n=3). Her grupta kullanılan sıçanlardan birine folat reseptörlerini doyurmak amacıyla radyoişaretli bileşiğin enjeksiyonundan 10 dakika önce 0.1 mL (50 μg) folik asit çözeltisi enjekte edilmiştir. 10 dakika sonra her sıçana $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{.SLN-PTX}$ çözeltisinden ~500 μCi aktivite içeren miktar intravenöz olarak uygulanmıştır. Enjeksiyonu yapılan her bir sıçan için ilk 30 dakika dinamik ve 30., 60., 90., 120., 150., 180., 240. dakikalarda ve 24. saatte statik görüntüler alınmıştır.

Biyodağılım çalışmaları

- Görüntüleme aşamasında olduğu gibi sıçanların acı hissetmemeleri ve tedirginliklerinin giderilmesi amacıyla enjeksiyon öncesi her bir sıçana ketamin+ksilazin (75-100 mg/kg + 5-10 g/kg) anestezi intraperitoneal(IP) olarak uygulanmıştır.
- Biyodağılım için 12' şerli iki grup olmak üzere toplam 24 adet dişi Albino Wistar sıçan kullanılmıştır.
- Bu basamak için paklitaksel yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıklar yeniden hazırlanmıştır. Bu amaçla 500 µL (500 µg) SLN-PTX alınıp üzerine 4.2 mCi / 50 µL $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ilave edilip 60 dakika 80 °C'de inkübe edilerek dört (2 yedek olmak üzere) işaretleme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. 550 µL radyoişaretli SLN-PTX örnekleri serum fizyolojik ile 800 µL'ye seyreltilerek 24 sıçan için stok çözelti hazırlandı. Her bir enjektöre eşit hacimde ve aktivitede (500µCi / 0.2mL) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ alınarak 24 tane enjektör hazırlanmıştır.
- Enjeksiyon öncesinde ve sonrasında enjektör aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile sayılmıştır.
- Uygulama iki grup olarak düzenlenmiştir. Birinci grup folat reseptör doyurma, ikinci grup ise doğrudan $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ enjeksiyonu olarak gerçekleştirilmiştir.
- İlk grupta bulunan 12 sıçana öncelikle folat reseptör(FR) doyurma işlemi yapılmıştır. Reseptör doyurma işleminde her bir sıçana 0.1 mL (50 µg) folik asit çözeltisi enjekte edildikten 10 dakika sonra $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile işaretle SLN-PTX enjekte edilmiştir. İkinci grupta bulunan 12 sıçanın herbirine kuyruk veninden olmak üzere doğrudan 0.2 mL $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile işaretle SLN-PTX enjekte edilmiştir.
- Sıçanlar belirlenen zaman aralıkları sonunda (30 dk, 60 dk, 120 dk ve 240 dk) sodyum pentobarbital ile sakrifiye edilmiş ve önceden daraları alınmış olan küçük kaplara belirlenen organlardan bir bölüm alınmıştır. Her organa ait tartım değeri ve aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile ikişer kez ölçülmüştür. Aktivitelerinin ortalamaları alınmış ve her bir organ için gram başına düşen doz değerleri (% ID / g) hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak Excel programında zamana karşı biyodağılım grafikleri elde edilmiştir.

Biyodağılım için İstatistiksel Analiz: Biyodağılım alışmaları sonucunda elde edilen veriler SPSS 20 programı kullanılarak istatistiksel olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla tüm verilerin varyans analizleri (Univariate Variance Analyses) yapılmış ve uygulanan işaretli bileşik ile organlar arasındaki ilişki Pearson Korelasyonu uygulanarak değerlendirilmiştir.

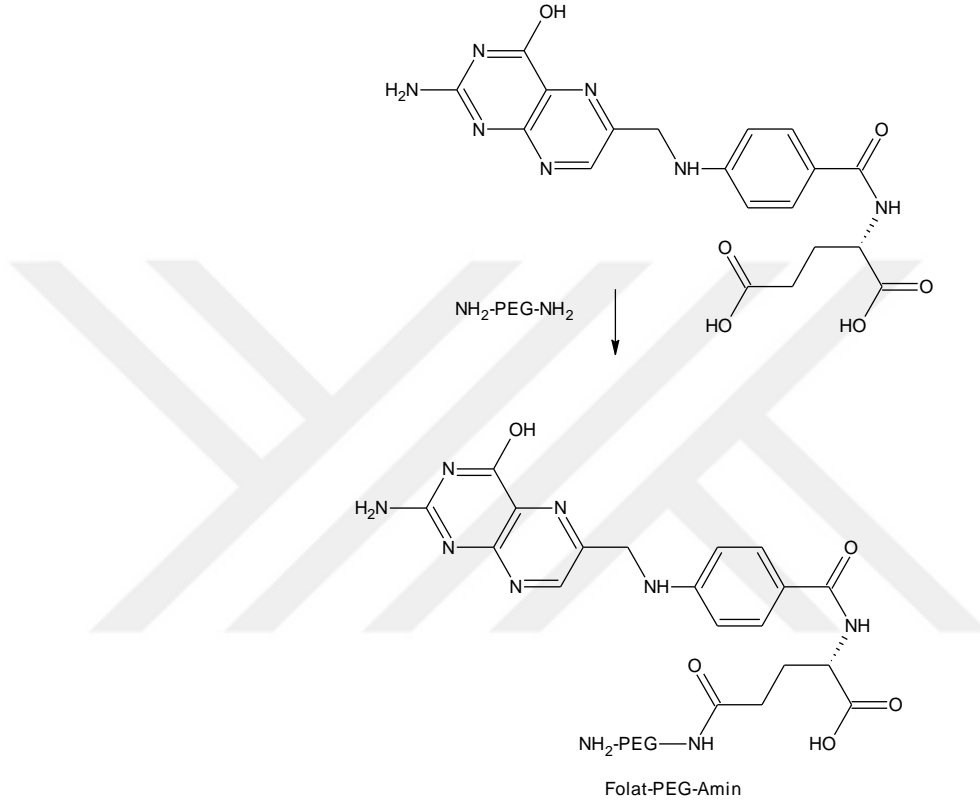


4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Folat Türevi Sentezi Basamakları

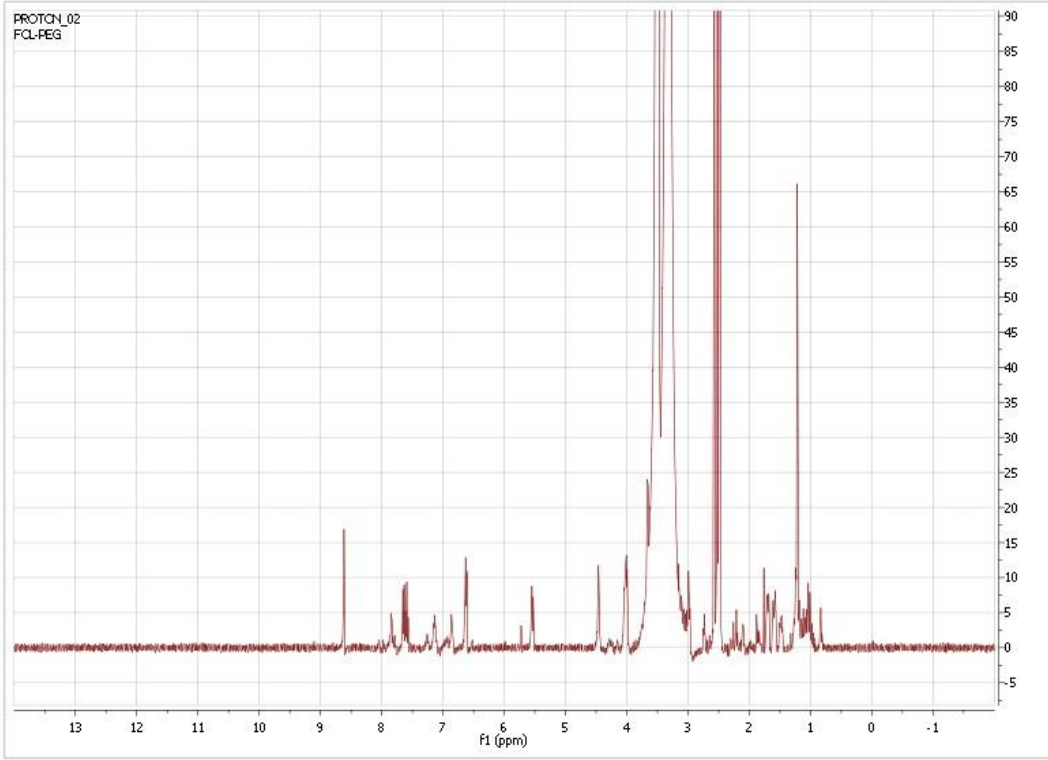
4.1.1 Fol-PEG-Amin Sentezi:

Bölüm 3.2.1’ de Fol-PEG-Amin için sentez basamakları aşağıda **Şekil 4.1’** de verildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



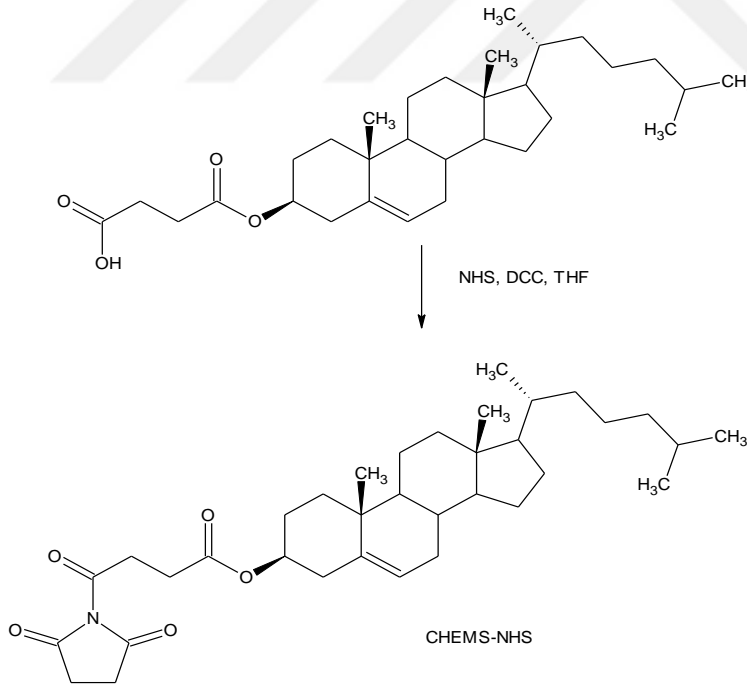
Şekil 4.1. Fol-PEG-Amin Sentezi.

Sentezlenen ürünün yapı analizi 400 MHz işletim frekanslı sıvı MERCURYplus-AS 400 model NMR spektrometresi kullanılarak DMSO [(CD₃)₂SO] çözügeninde ¹H-NMR ile hizmet alımı olarak gerçekleştirilmiştir. **Şekil 4.2’** de sentezi gerçekleştirilen Fol-PEG-Amin için alınan ¹H-NMR spektrumu yer almaktadır. Elde ettiğimiz spektrum, Xiang ve ark. çalışmalarındaki sonuç ile karşılaştırıldığında benzer şekilde Fol-PEG-Amin için folat kısmına ait kimyasal shift değerleri δ ppm olarak 8.61(d), 7.63(d), 6.63(d), 4.46(s), PEG kısmına ait pik değeri 3.65(m) olarak belirlenmiştir (Xiang et al., 2008).



Şekil 4.2. Fol-PEG-Amin için ^1H NMR Spektrumu.

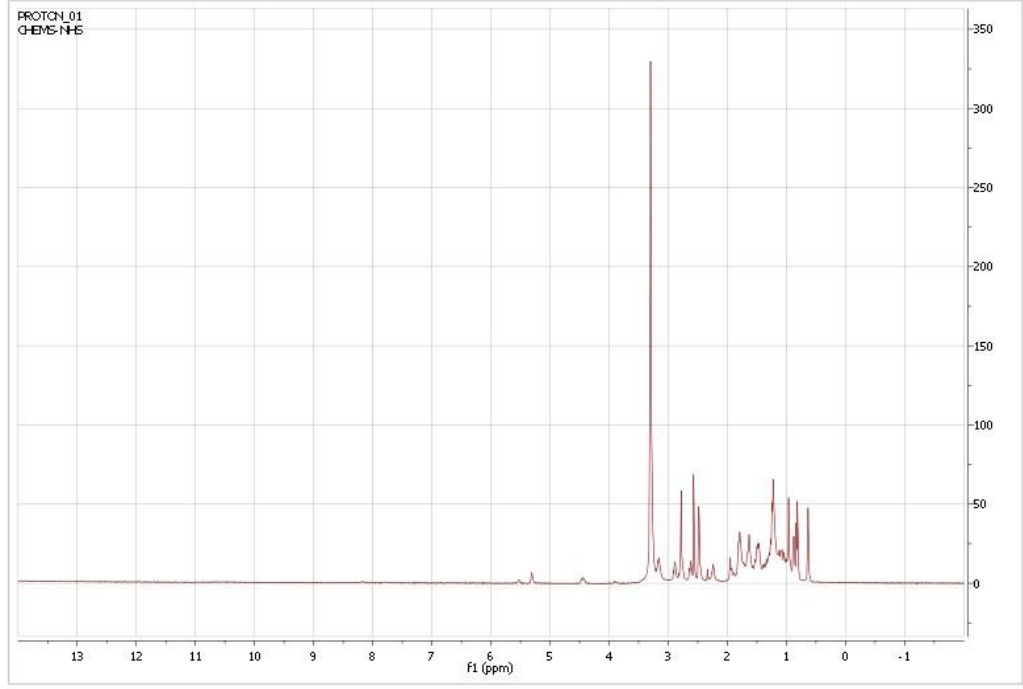
4.1.2 CHEMS-NHS sentezi:



Şekil 4.3. CHEMS-NHS Sentezi.

CHEMS-NHS sentezi bölüm 3.2.2' de belirtildiği gibi sentezlenmiştir. CHEMS-NHS sentezi Şekil 4.3' de verilen reaksiyona göre oluşturulmuştur. Elde edilen ürünün yapı analizi ^1H -NMR ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4' de yer alan ^1H -NMR spektrumunda CHEMS-NHS için belirlenen kimyasal shift değerleri

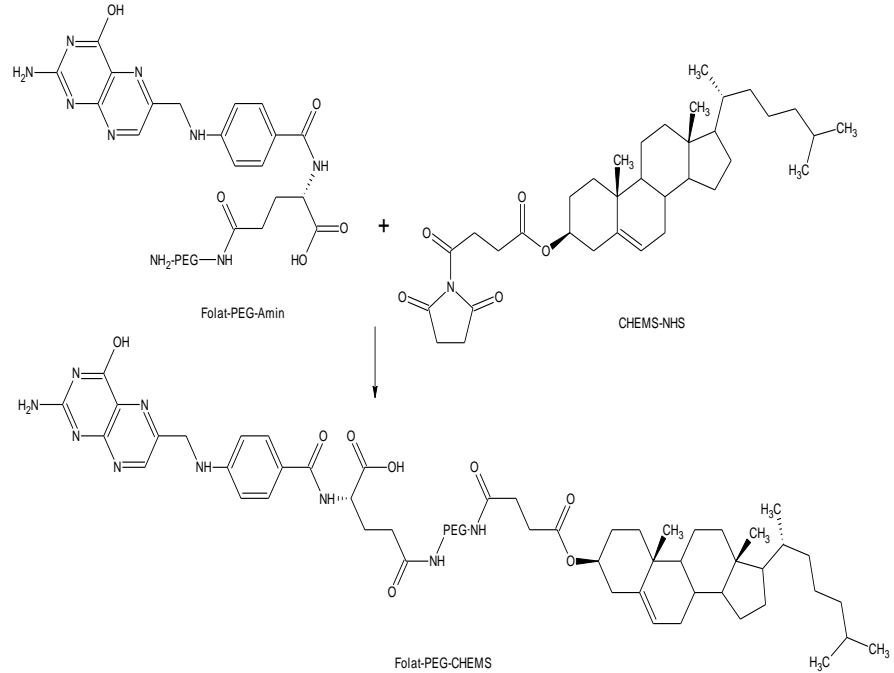
(ppm olarak) Nie ve ark. sonucuna benzer şekilde 0.63(s), 0.90(s), 2.33(d), 2.57(m), 2.74(m), 2.91(m), 5.31(t) olarak bulunmuştur (Nie et al., 2012).



Şekil 4.4. CHEMS-NHS için ¹H-NMR Spektrumu.

4.1.3 Fol-PEG-CHEMS Sentezi

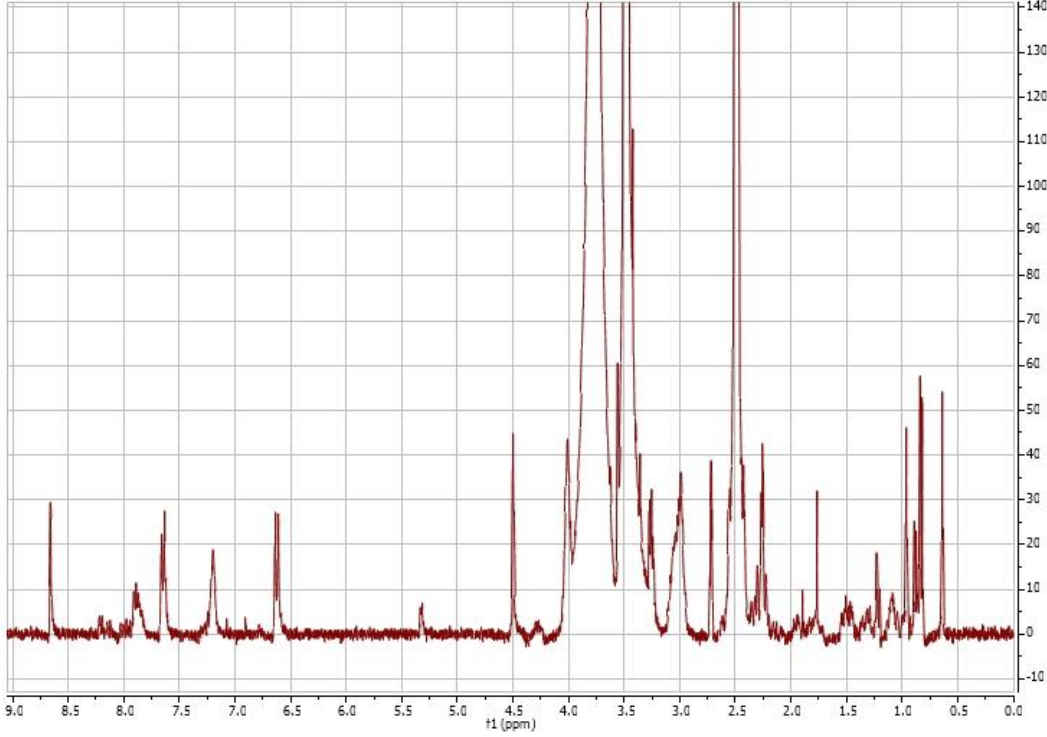
Bölüm 3.2.3' de gerçekleştirilen Fol-PEG-CHEMS sentezi aşamaları Şekil 4.5' de görülmektedir.



Şekil 4.5. Fol-PEG-CHEMS sentezi.

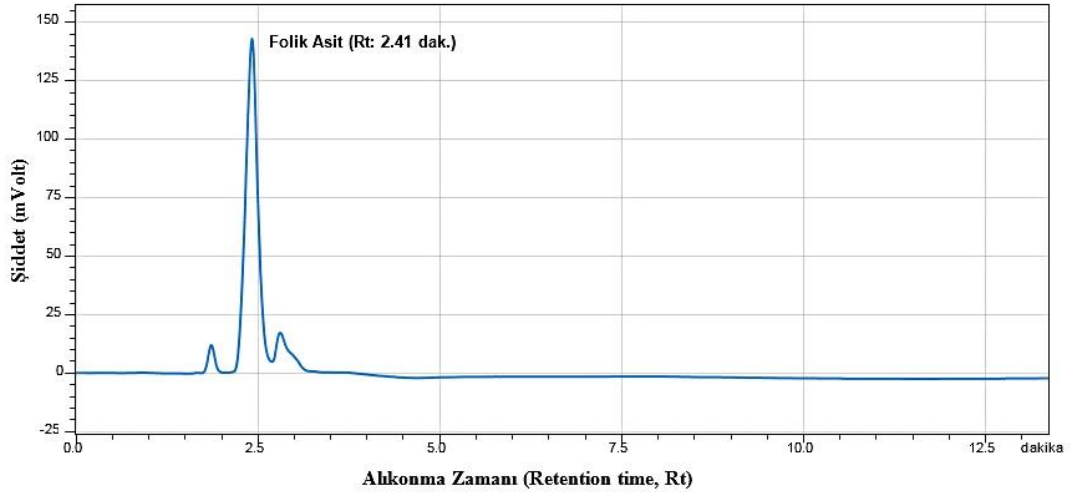
Elde edilen ürünün yapı analizi $^1\text{H-NMR}$ ve HPLC ile gerçekleştirilmiştir.

Şekil 4.6' da görülen $^1\text{H-NMR}$ analiz sonucuna göre Fol-PEG-CHEMS için, folat kısmına ait kimyasal shift değerleri δ ppm olarak 8.65(d), 7.63(d), 6.63(d), 4.49(d), 4.26(m), PEG kısmına ait değer 3.77(m), CHEMS kısmına ait değerler ise 5.31(bd), 2.26(m) şeklinde belirlenmiştir. Yapılan $^1\text{H-NMR}$ analizi sonuçları, Xiang ve ark. çalışmalarında sentezledikleri Fol-PEG-CHEMS için belirledikleri pik değerleri ile uyumluluk göstermektedir (Xiang et al., 2008).

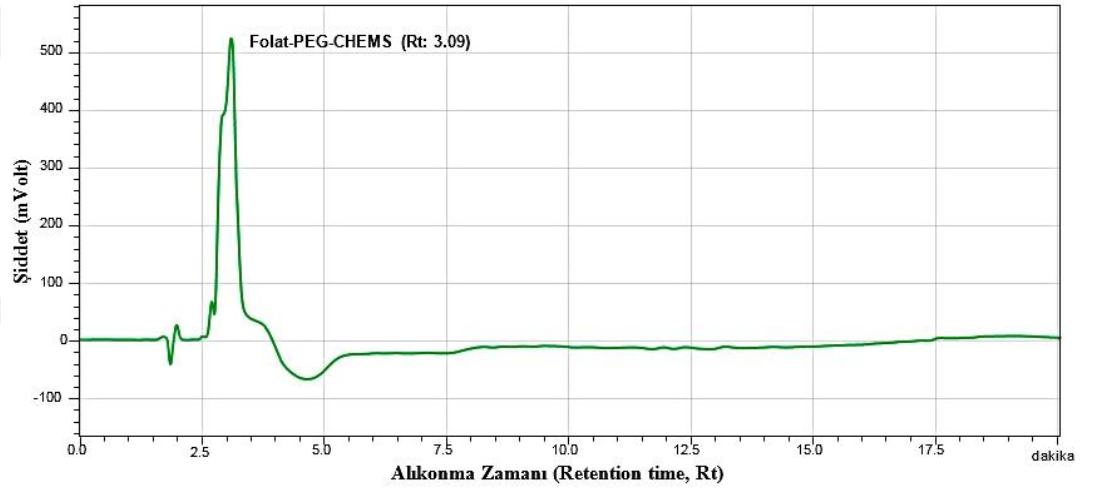


Şekil 4.6. Fol-PEG-CHEMS için $^1\text{H NMR}$ spektrumu.

Sentezlenen Fol-PEG-CHEMS için HPLC analizi **Çizelge 3.1'** de verilen koşullara göre çözgen sistemi asetonitril-su ile gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda folik asit ve sentezlenen Fol-PEG-CHEMS yapılarına ilişkin HPLC kromatogramları sırasıyla **Şekil 4.7** ve **Şekil 4.8'** te verilmiştir.



Şekil 4.7. Folik asit için HPLC kromatogramı (227 nm UV dalga boyunda).



Şekil 4.8. Fol-PEG-CHEMS için HPLC kromatogramı (227 nm UV dalga boyunda).

Elde edilen kromatogramlardan folik asitin alıkonma zamanı (Rt) 2.42 iken sentezlenen Fol-PEG-CHEMS için Rt değeri 3.09 olarak bulunmuştur. Bu değerler sentezin başarılı olduğunu göstermektedir.

4.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentez ve Karakterizasyon Basamakları

4.2.1 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentezi(SLN-PTX):

Bölüm 3.3.1' de belirtildiği gibi folat reseptörü hedefli paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklar solvent difüzyon yöntemi ile hazırlanmıştır (Hu et al.,

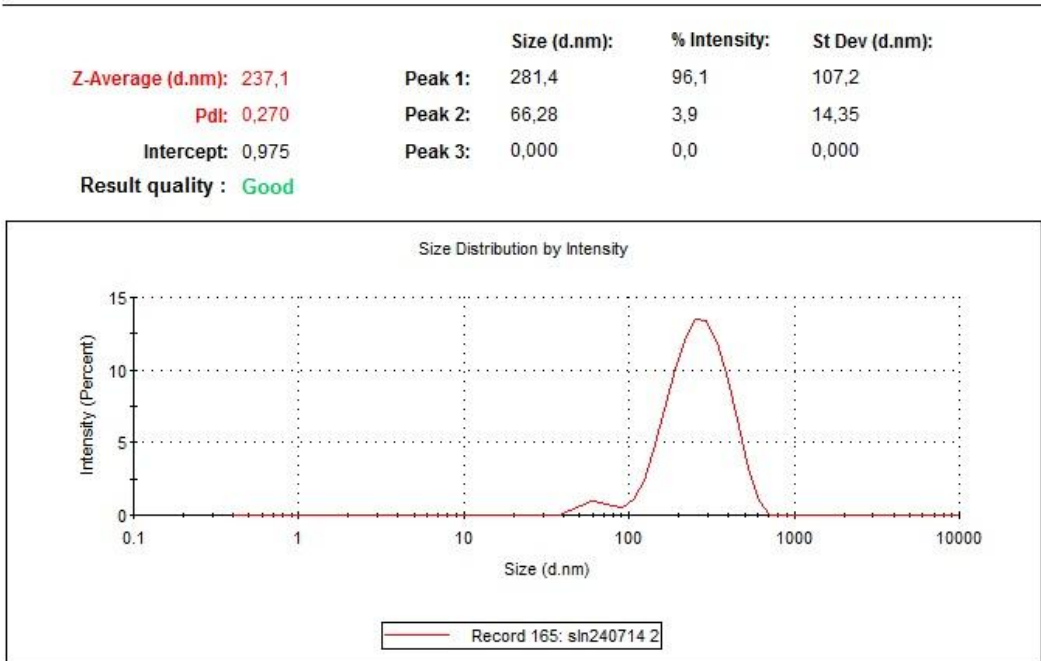
2005). Bu yöntem, uygulama kolaylığının yanı sıra çoğu antikanser ilacın hidrofobik özelliğinden dolayı sadece organik çözücülerde çözünmesi sebebiyle ilaç taşıyıcı nanoparçacık hazırlama yöntemleri arasında en çok tercih edilenidir (Yerlikaya, 2013). Solvent difüzyon yöntemi ile gerçekleştirilen benzer bir çalışmada Wan ve arkadaşları hazırladıkları nanoparçacıkları PEG2000-Stearik asit ile modifiye etmek için iki yöntem kullanmıştır. İlk yöntem PEG' in kimyasal olarak nanoparçacıklara bağlanmasıdır. Bu durum ilaç hapsetme verimini olumsuz olarak etkilemektedir. İkinci yöntem ise ligandı nanoparçacıkların hazırlanması sırasında lipid matris içerisine karıştırmaktır (Wan et al., 2008). Bu nedenle Wan ve ark. larının rapor ettiği şekilde FOL-PEG-CHEMS, nanoparçacıkların hazırlanma sırasında lipid-su karışımına ilave edilmiştir.

4.2.2 Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyon Basamakları

Sentezlenen paklitaksel yüklü nanoparçacıkların karakterizasyonu DLS, SEM, TEM olmak üzere üç farklı yöntem ile gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen nanoparçacıkların morfolojisinin hem SEM hem de TEM den alınan görüntülerden küresel yapıya sahip olduğu bulunmuştur.

DLS ve ZP bulguları

Bölüm 3.3.2'de belirtildiği gibi hazırlanan örneklerden ölçüm sonucunda alınan intensiteye göre boyut dağılım grafiği **Şekil 4.9'** da görülmektedir.



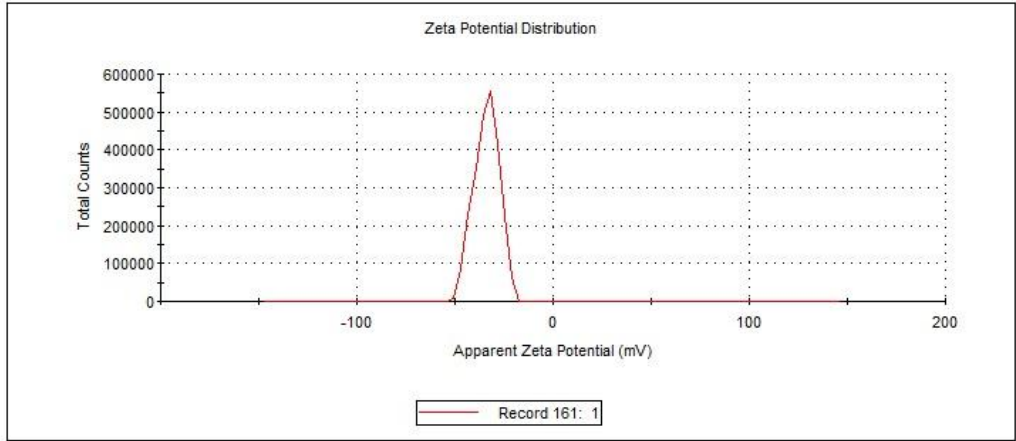
Şekil 4.9. Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların boyut dağılım grafiği.

Grafiğe göre su içerisinde dağılmış SLN-PTX nanoparçacıklarının hidrodinamik boyutu ortalama 237 nm ve polidispersite indeksi ise 0.270 olarak bulunmuştur. Bu değerlerle parçacıkların iyi bir dağılım gösterdiği anlaşılmaktadır.

Nanoparçacıklar termodinamik olarak kararsız yapıda sistemlerdir. Kolloidal ilaç taşıyıcı sistemlerin kararlılığı açısından zeta potansiyeli değerinin -30 mV ile +30 mV aralığı dışında olması istenir (Tiwari and Pathak, 2011). **Şekil 4.10'** da verilen grafikten sentezlenen nanoparçacıkların su içerisindeki zeta potansiyeli -33.9 mV olarak ölçülmüştür. Bu değer, parçacıkların suda iyi bir dağılım gösterdiklerinin ve kararlı olduklarının bir ölçüsüdür.

	Mean (mV)	Area (%)	St Dev (mV)
Zeta Potential (mV): -33,9	Peak 1: -33,9	100,0	6,23
Zeta Deviation (mV): 6,23	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,0351	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality : Good



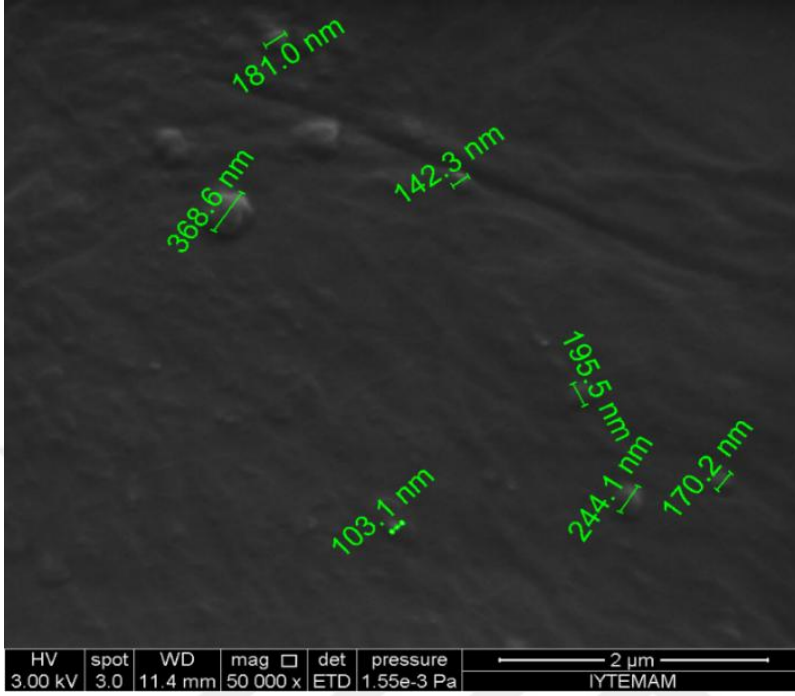
Şekil 4.10. Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların zeta potansiyeli dağılım grafiği.

SEM bulguları

Paklitaksel yüklü nanoparçacıkların morfolojik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla alınan SEM görüntüleri **Şekil 4.11'** de verilmiştir. Bu görüntülerden, oluşan nanoparçacıkların 140-240 nm arasında değişen boyutlarda ve küresel morfolojide oldukları anlaşılmaktadır.

Hazırlama sırasında yüksek oranda oleik asit kullanılmasının küçük boyutlarda, küresel morfolojide ve iyi hapsedme verimine sahip nanoparçacıkların oluşmasını sağladığı düşünülmektedir. Oleik asit, parçacık boyutunu ve

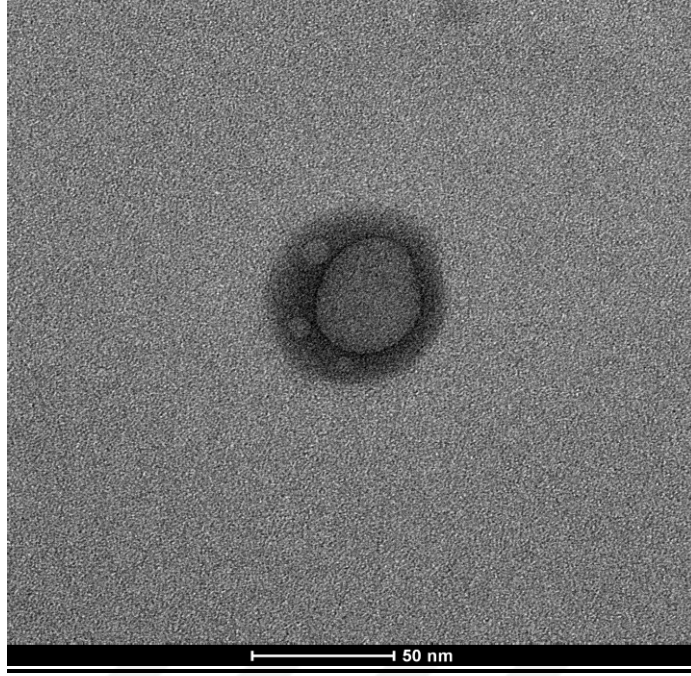
polidispersite indeksini düşüren en önemli faktör olarak değerlendirilmektedir (Tiwari and Pathak, 2011).



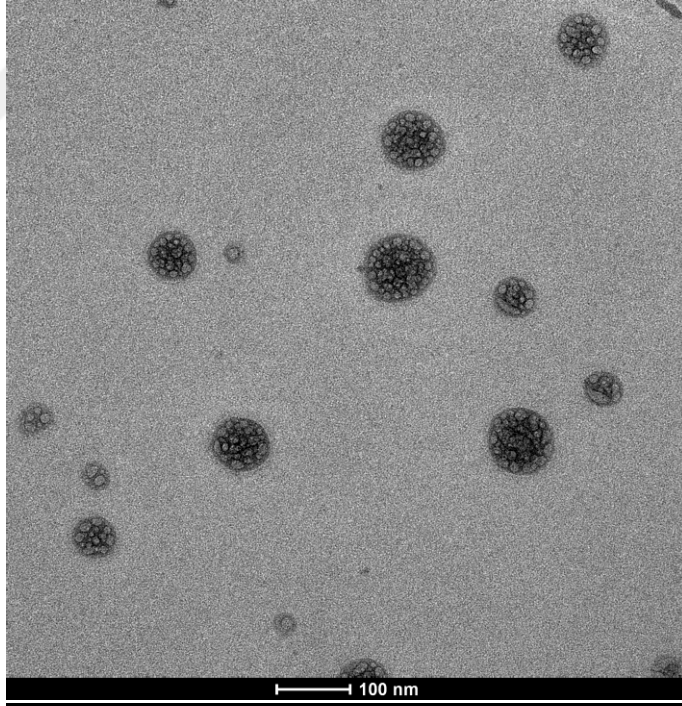
Şekil 4.11. Paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklara ilişkin SEM görüntüsü (2 µm ölçekte).

TEM bulguları

Geçirimli Elektron Mikroskobu kullanılarak alınan görüntülerden, paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıklarının boyutunun 50-100 nm civarında ve küresel yapıda olduğu gözlenmiştir. TEM görüntüleri **Şekil 4.12** ve **Şekil 4.13'** te verilmiştir. Han ve arkadaşları yaptıkları çalışmada lipid nanoparçacıkları hazırlamak amacıyla yüksek basınçlı homojenizasyon yöntemini kullanmışlar ve dört farklı surfaktan kullanarak elde ettikleri formülasyonlar için nanoparçacık boyutlarındaki değişim incelemişlerdir. TEM görüntüleri sonucunda nanoparçacıkların küresel morfolojiye ve 50-100 nm boyuta sahip olduklarını rapor etmişlerdir (Han et al., 2007). Sonuç olarak çalışmamızda hazırladığımız lipid parçacıklar için TEM yöntemiyle belirlenen boyut aralığı Han ve arkadaşlarının bulduğu değerler ile uyum içerisindedir.



Şekil 4.12. Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıklarına ilişkin TEM görüntüsü (50 nm ölçekte).



Şekil 4.13. Paklitaksel Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıklarının TEM görüntüsü(100 nm ölçekte)

Parçacıkların boyutuna ilişkin elde edilen sonuçlar kullanılan üç yöntemle (DLS, SEM, TEM) sayısal olarak farklı görünmesine karşın tekniklerin ölçüm şekilleri göz önüne alındığında birbirleri ile uyum içinde oldukları

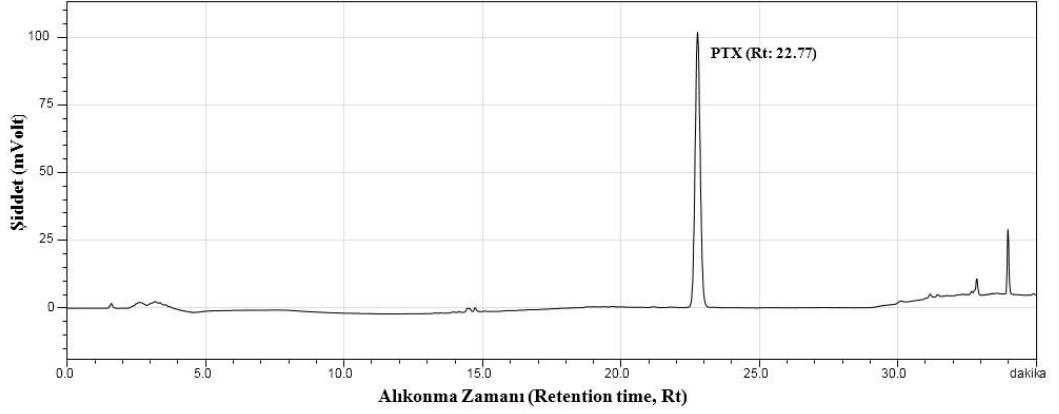
anlaşılmaktadır. DLS' de yapılan ölçümler nanoparçacıkların sıvı içindeki hidrodinamik boyutunu verdiği için SEM ve TEM' e göre parçacıkların boyutu daha büyük gözlenmiştir. Farklı yöntemlerle alınan sonuçlarda belirlenen boyut aralıkları değişebilmektedir. Han ve arkadaşlarının çalışmasında parçacık boyutlarının TEM yöntemiyle 50-100 nm arasında, DLS yöntemiyle yaptıkları ölçümlerde ise ortalama parçacık boyutunun 110-910 nm arasında değiştiğini rapor etmişlerdir (Han et al., 2007).

Çalışmamızda intravenöz enjeksiyon yoluyla uygulanacak nanoparçacıkların büyüklüklerinin mikron altı boyutta olması hedeflenmiştir. Bu açıdan değerlendirildiğinde her üç yöntem ile belirlenen parçacık boyutu analizi sonuçları ilaç taşıyıcı sistemin istenilen boyut aralığında hazırlandığını göstermektedir.

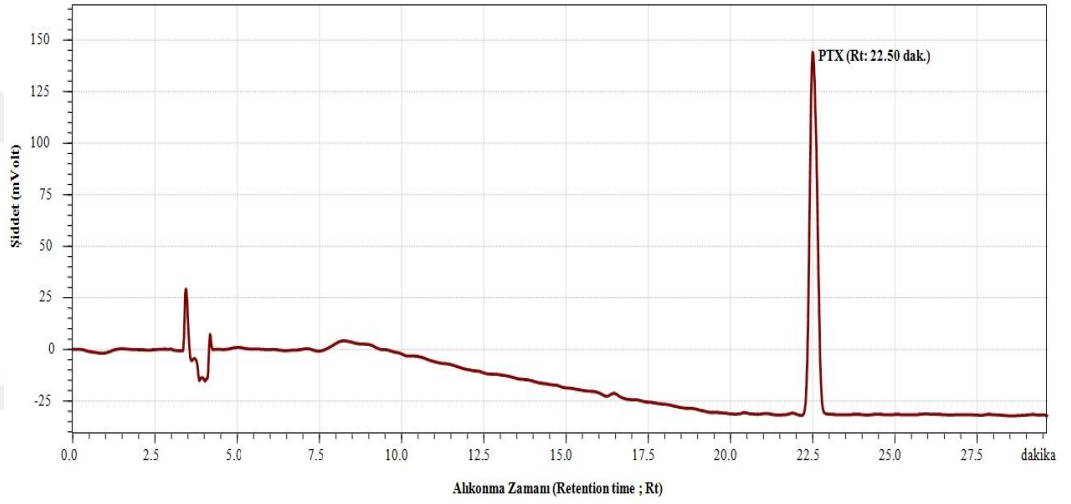
HPLC bulguları

Sentezlenen paklitaksel yüklü SLN nanoparçacıklarının HPLC analizi Bölüm 3.3.2' de verilen koşullarda gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacıklara paklitakselin hapsedildiğini belirlemek amacıyla yapılan bu basamakta, SLN-PTX öncelikle metanolde çözülerek 500 µL örnek HPLC viali içerisine analizi gerçekleştirilmek üzere hazırlanmıştır.

Şekil 4.14' te paklitaksele ilişkin HPLC kromatogramı verilmiştir. Yine aynı koşullarda paklitaksel yüklenerek hazırlanan SLN nanoparçacıklarına ilişkin HPLC kromatogramı ise **Şekil 4.15'** te görülmektedir. Bu kromatogramlarda PTX' e ait alıkonma zamanı, R_t , 22.77. dakikada gözlenirken nanoparçacıklara ilişkin kromatogramda PTX' in alıkonma zamanı 22.50 dakikada belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç SLN' lere paklitakselin başarıyla yüklendiğinin bir göstergesidir.



Şekil 4.14. Paklitaksel (PTX) için HPLC Kromatogramı.



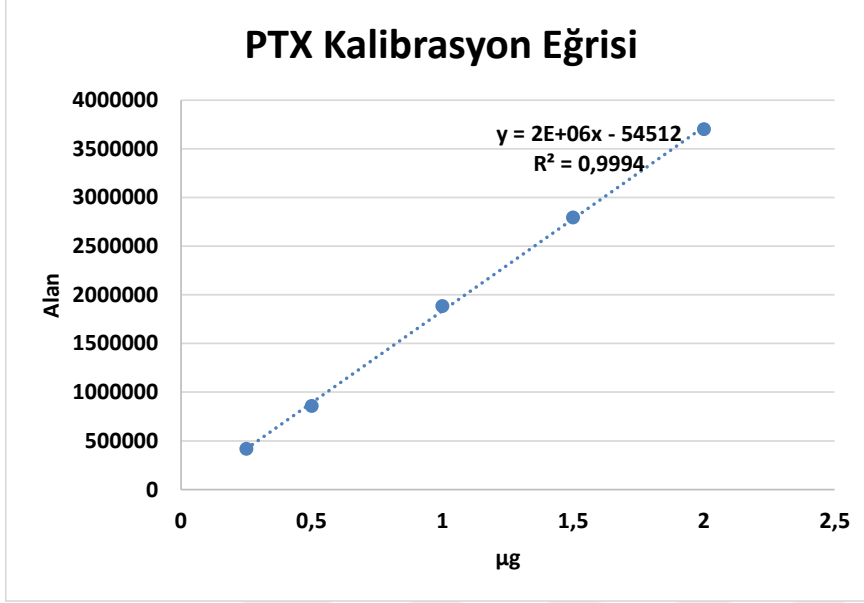
Şekil 4.15. Paklitaksel yüklü Katı Lipid Nanoparçacıklar (SLN-PTX) için HPLC Kromatogramı.

Bu basamakta lipid nanoparçacıkların paklitaksele yüklendiği sonucunun alınmasının yanısıra nanoparçacıklara paklitaksel yükleme kapasitesinin de incelenmesi için kullanılacak uygun HPLC koşulları belirlenmiştir.

4.2.3 Lipid Nanoparçacıkların İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızın bu aşamasında, yukarıdaki basamakta lipid nanoparçacıkların paklitaksele yüklendiğinin anlaşılması sonucunda bu parçacıkların ilaç yükleme kapasitesi belirlenmiştir. Bu amaçla bir önceki bölümde izlenen HPLC koşulları sağlanmış ve bölüm 3.3.3' de farklı konsantrasyonlarda (12.5 µg/mL, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL)

hazırlanan paklitaksel çözeltileri ile çalışılmıştır. Bu koşullar altında her bir konsantrasyon için elde edilen PTX piklerinin altında kalan alanlar ölçülerek **Şekil 4.16'** da verilen kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur.



Şekil 4.16. Paklitaksel Kalibrasyon Eğrisi.

Şekil 4.16' da verilen kalibrasyon eğrisine ilişkin doğru denklemi kullanılarak nanoparçacık içerisindeki paklitaksel miktarı bulunmuştur. Belirlenen miktardan yola çıkılarak nanoparçacıkların ilaç hapsedme verimi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$Ee = ((W_a - W_s) / W_a) \times 100\%$$

Burada; Ee: Enkapsüle edilen etkin madde yüzdesi

W_a: sisteme yüklenen ilaç miktarı

W_s: süpernetanta kalan ilaç miktarı

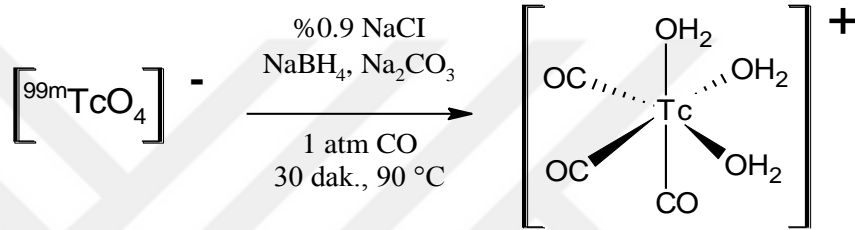
Literatürde bu formül kullanılarak nanoparçacıklar içerisindeki ilaç hapsedme yüzde verimi bulunması çalışmaları bulunmaktadır (Hu et al., 2005; Zhao et al., 2012; Yang et al., 2013). Çalışmamızın bu aşamasında yapılan ilk denemelerde lipid nanoparçacıklar içerisinde paklitakselin hapsedilme yüzdesi % 20 olarak hesaplanmıştır. Hu ve ark. tarafından yapılan benzer bir çalışmada aynı yöntemle hazırlanan nanoparçacıkların oleik asit yüzdesinde değişiklik yapılarak ilaç hapsedme veriminin % 47.67' den % 69.95' e yükseltildiği rapor edilmiştir

(Hu et al., 2005). Bu doğrultuda bizim çalışmamızda nanoparçacıkların sentez basamağındaki lipid oranlarında değişiklik yapılarak ilk denemelerde bulduğumuz ilaç hapsedme verimi % 49'a yükseltilmiştir.

4.3 Radyoışaretleme Çalışmaları

4.3.1 $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ korunun hazırlanması

Bölüm 3.4.1' de $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ trikarbonil koru sodyum perteknetattan ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$) çıkılarak CO gazı ortamında **Şekil 4.17'** de verilen reaksiyona göre elde edilmiştir.



Şekil 4.17. $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ trikarbonil Korunun Elde Edilmesi.

Radyoışaretleme koşulları için pH, sıcaklık, zaman parametreleri üzerine çeşitli denemeler gerçekleştirilmiş ve optimum reaksiyon şartları bu denemeler sonucunda belirlenmiştir. pH 5 ve pH 8 ile yapılan denemelerde çok düşük radyoışaretleme verimi elde edilmiştir. Radyoışaretleme reaksiyonu için optimum koşullar pH 7, sıcaklık 90°C ve inkübasyon süresi 30 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullara göre gerçekleştirilen reaksiyon sonrasında radyokimyasal saflık İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC) kalite kontrol yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

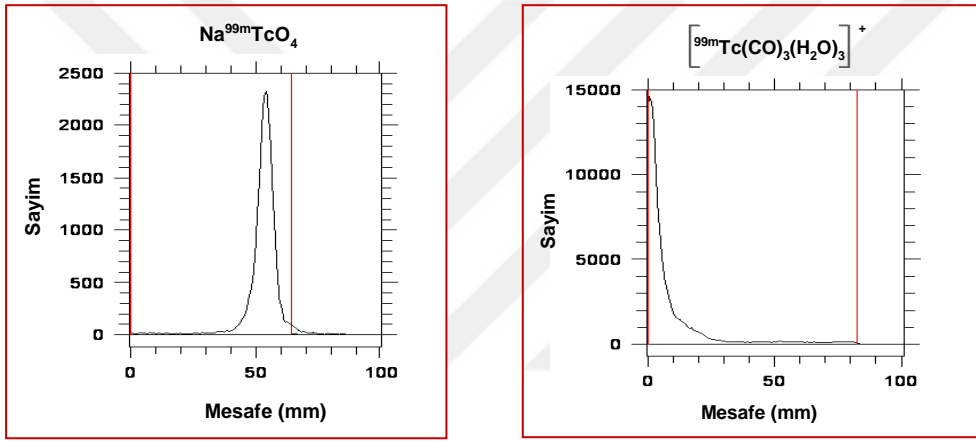
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ koru için TLRC analiz sonuçları

Bölüm 3.4.2' de $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ korunun radyokimyasal saflığının kontrolü için asetonitril ve SF banyoları kullanılmıştır. Yapılan denemelerden her iki banyonun da uygun olduğu anlaşılmıştır. TLRC için R_f değerleri **Çizelge 4.1'** de verilmiştir. SF banyosu için reaksiyonun % 99.72 ± 3.27 verimle gerçekleştiği belirlenmiştir ($n=5$). **Şekil 4.18'** de verilen kromatogramlardan görüldüğü gibi $^{99m}\text{TcO}_4^-$ banyo çözeltisi ile birlikte ilerlerken Tc(I) trikarbonil koru uygulama noktasında kalarak teknesyumdan ayrılmaktadır (Şenocak vd,

2015). Bu sonuçlardan $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ korunun yüksek verimle gerçekleştiği anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.1. $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Komplekslerine İlişkin R_f Değerleri.

Banyo Çözeltilisi	R_f	
	$[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$	$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$
SF	0.75-0.90	0.00-0.10
Asetonitril	0.85-1.00	0.00-0.10



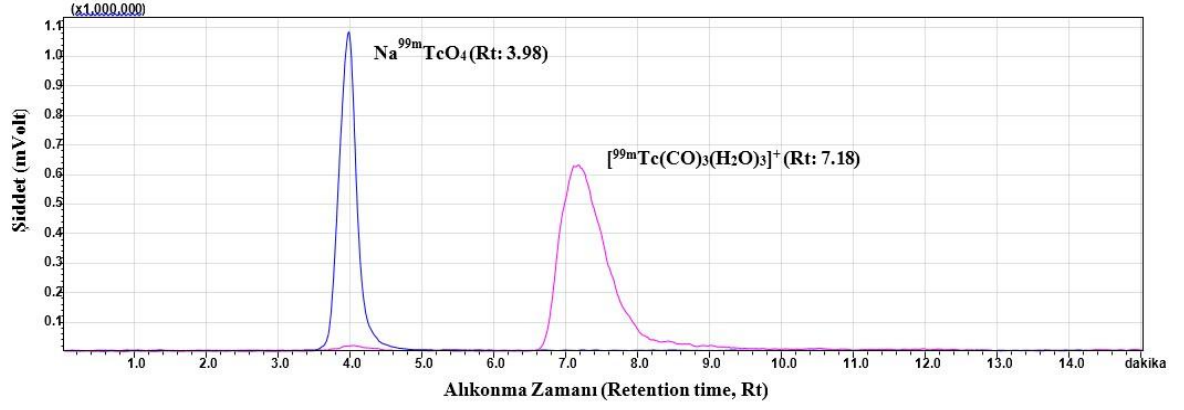
(a)

(b)

Şekil 4.18. (a) $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ve (b) $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları

$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ koru HPLRC analizi sonuçları

$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ koru için gerçekleştirilen HPLRC analizine ait kromatogram **Şekil 4.19'** da verilmiştir. Elde edilen kromatogramda $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerine ait piklerin alıkonma zamanları (R_t) sırasıyla 3.98 ve 7.18 olarak bulunmuştur. R_t değerlerinin farklı olması her örneğin ayırt edilmesinde önemli bir parametredir (Chen et al., 2007). Bulunan R_t değerleri bize $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ korunun yüksek verimle oluştuğunu göstermektedir. Elde edilen yüksek verim ise TLRC sonuçlarını desteklemektedir.



Şekil 4.19. Na^{99m}TcO₄ ve [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺ komplekslerine ilişkin HPLRC kromatogramı.

4.3.2 Katı Lipid Nanoparçacıkların ^{99m}Tc(CO)₃⁺ koru ile radyoişaretlenmesi

Bölüm 3.4.3' de verilen koşullara göre paklitaksel yüklü nanoparçacıkların (SLN-PTX) radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir.

^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX için TLRC sonuçları

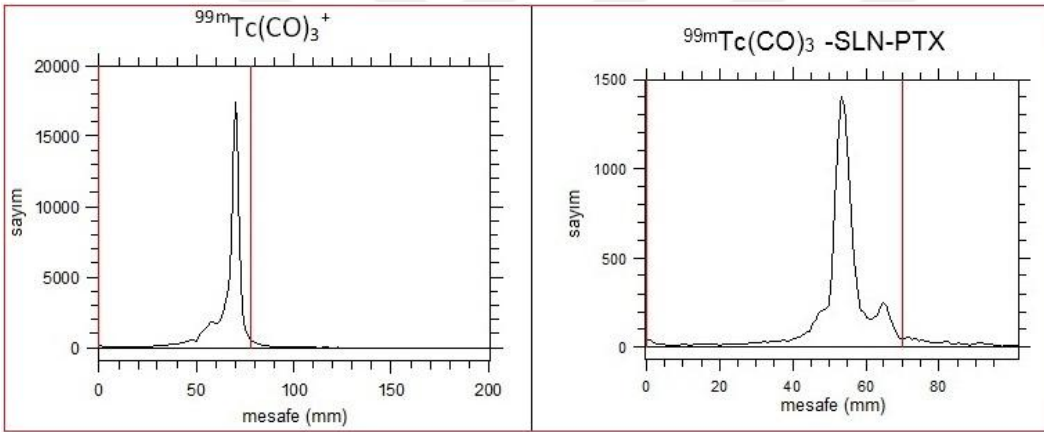
TLRC yönteminde hesaplanan R_f değeri radyokimyasal verimin bir ölçüsüdür. Bu çalışmada kullanılan banyolar için hesaplanan R_f değerleri Çizelge 4.2'de yer almaktadır.

Çizelge 4.2. ^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX için R_f değerleri(n=5)

Banyo Çözeltilisi	R _f	
	[^{99m} Tc(CO) ₃] ⁺	^{99m} Tc(CO) ₃ -SLN-PTX
PAS (Piridin/Asetik asit/su)	0.932	0.769
ACN	0.030	0.028 – 0.806 – 1.000
SF	0.028	0.032
MeOH / HCl	0.757	0.771
MeOH / su	0.024	0.029 – 0.908

R_f değerlerinden $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için en ayırıcı banyonun PAS (3:5:1.5), sabit faz olarak da selüloz kaplı plastik TLRC şeritlerinin olduğu anlaşılmaktadır (Alam et al., 2014). Kullanılan PAS banyo çözeltisinden alınan selüloz şeritler radyokromatogram tarayıcı cihazı Bioscan AR2000 kullanılarak tarandıktan sonra alınan kromatogramlardan R_f değerleri belirlenmiştir. Kromatogramlar **Şekil 4.20**'de görülmektedir.

Radyoişaretleme çalışmaları sonucunda ideal işaretleme koşulları; reaksiyon sıcaklığı $80\text{ }^\circ\text{C}$, ve bekleme süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Bu koşullarda R_f değerleri $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ için 0.932, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için ise 0.769 olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak radyoişaretleme verimi $\% 90 \pm 1.32$ ($n=5$) olarak bulunmuştur. Bu yüksek verim *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar için önemli bir ölçüttür (Psimadas et al., 2013).



(a)

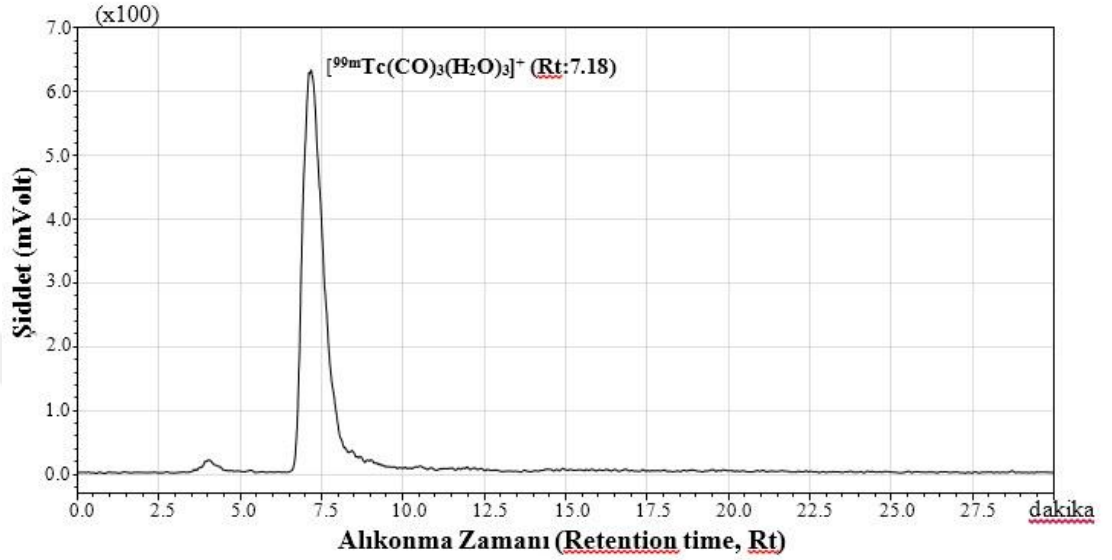
(b)

Şekil 4.20. (a) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ve (b) $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için piridin/asetik asit/su banyosundaki TLRC kromatogramları

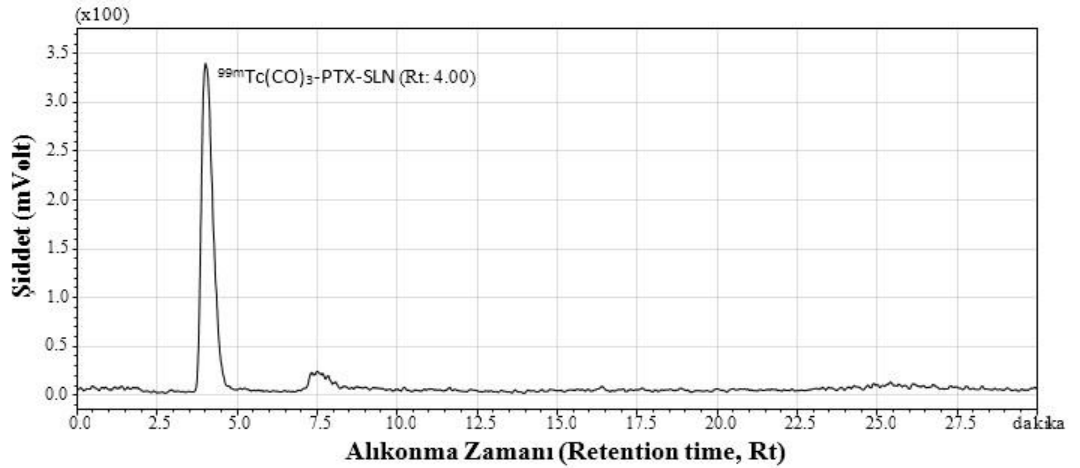
$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için HPLRC sonuçları

Radyoişaretili paklitaksel yüklü katı lipid nanoparçacıkların HPLRC analizi **Çizelge 3.2**'de verilen koşullara göre gerçekleştirilmiştir. **Şekil 4.21**'de verilen kromatogramda radyoaktivite dedektöründe elde edilen $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kompleksine ilişkin pikin alıkonma zamanı (R_t) 7.18 olarak bulunurken **Şekil 4.22**'de verilen kromatogramda ise $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ R_t değeri 4.00 olarak görülmektedir. HPLRC kromatogramlarından bulunan bu farklı alıkonma

zamanları bize paklitaksel yüklü nanoparçacıkların radyoışaretlendiği sonucunu vermektedir. HPLRC yöntemi ile nano boyutlu parçacıkların radyoışaretleme verimlerini belirlenmesi uygun olabilmektedir (Psimadas, 2013). Bu aşamada sonuç olarak paklitaksel yüklü SLN nanoparçacıklarının $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile radyoışaretleme hedefine ulaşılmıştır.



Şekil 4.21. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$ için HPLRC Kromatogramı.



Şekil 4.22. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ için HPLRC Kromatogramı.

4.4 Katı Lipid Nanoparçacıkların Biyolojik Davranışları

4.4.1 *In Vitro* Çalışmalar

Çalışmamızın bu bölümü radyoışaretleli lipid nanoparçacıklara hapsedilen paklitakselin *in vitro* davranışlarının incelendiği sitotoksosite, inkorporasyon,

floresan görüntüleme ve apoptoz çalışmalarından elde edilen bulguları içermektedir.

Sitotoksosite Çalışması

Sitotoksosite çalışmaları sonucunda PTX ve SLN-PTX için 24. ve 48. saat sonrasında aşağıda verilen formüle göre hesaplanarak bulunan % canlılık değerleri; MCF7 hücre epiteli için **Çizelge 4.3**, HeLa hücre epiteli için **Çizelge 4.4** ve A549 hücre epiteli için **Çizelge 4.5**' de verilmiştir.

% sitotoksosite=1- (ölçülen optik densite değeri / kontrol değeri) x 100

Çizelge 4.3. MCF7 hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri

Konsantrasyon	MCF7			
	PTX		SLN-PTX	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
0.63 ng/mL	88.23±3.66	85.32±3.59	98.34±3.69	95.58±3.17
1.25 ng/mL	81.61±2.98	76.89±2.45	96.36±2.56	86.52±2.34
2.50 ng/mL	73.38±3.01	62.34±2.01	95.48±3.51	85.02±3.62
5.00 ng/mL	62.49±2.74	45.37±1.48	90.48±2.10	83.95±4.77
10.00 ng/mL	55.13±1.76	34.67±1.69	89.88±3.67	82.83±2.92

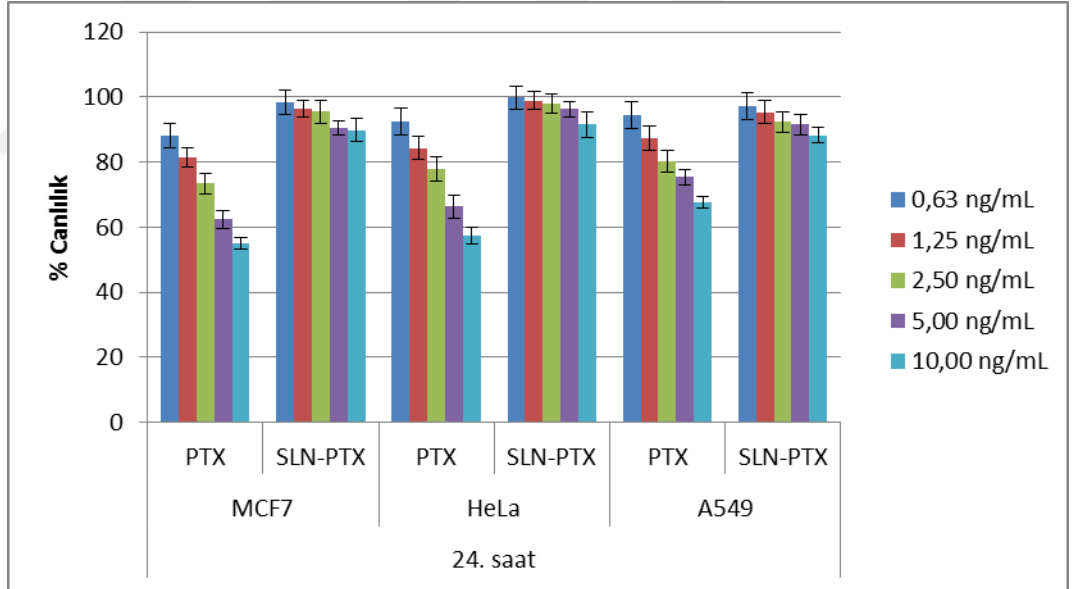
Çizelge 4.4. HeLa hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri

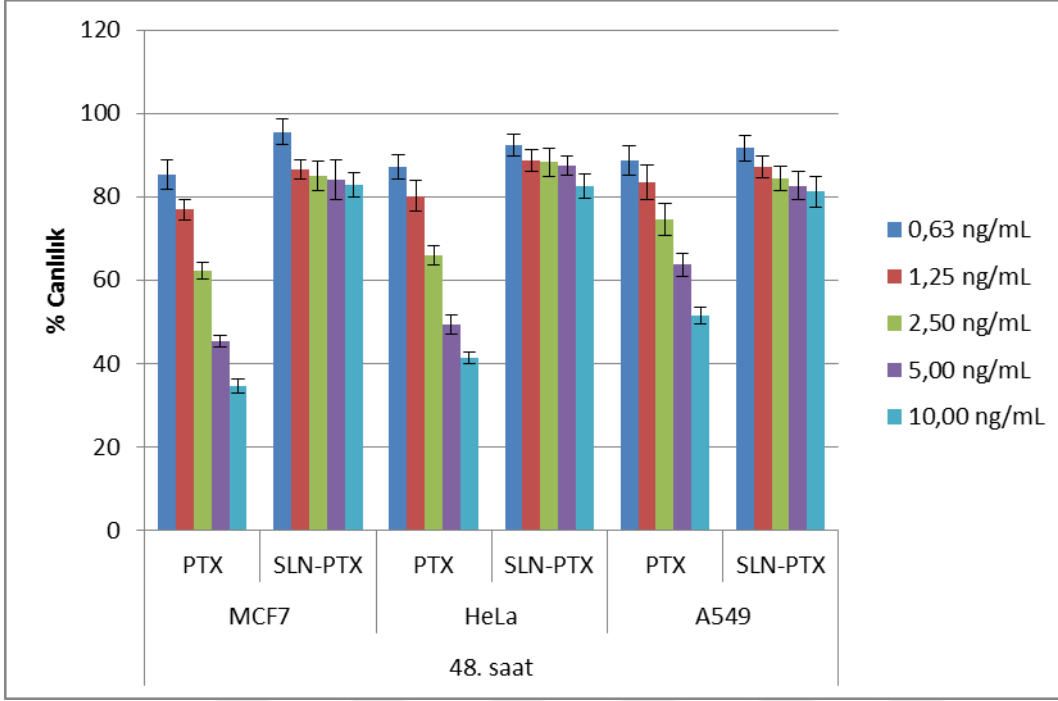
Konsantrasyon	HeLa			
	PTX		SLN-PTX	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
0.63 ng/mL	92.45±4.23	87.12±2.98	99.78±3.39	92.34±2.67
1.25 ng/mL	84.38±3.55	80.23±3.61	98.94±2.84	88.68±2.60
2.50 ng/mL	77.89±3.87	65.89±2.39	98.00±3.13	88.25±3.47
5.00 ng/mL	66.28±3.51	49.46±2.34	96.33±2.36	87.36±2.27
10.00 ng/mL	57.44±2.68	41.38±1.43	91.59±3.89	82.48±2.90

Çizelge 4.5. A549 hücre epitelinin PTX ve SLN-PTX için % canlılık değerleri

Konsantrasyon	A549			
	PTX		SLN-PTX	
	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
0.63 ng/mL	94.39±4.28	88.68±3.55	97.23±4.25	91.67±3.12
1.25 ng/mL	87.38±3.70	83.48±4.28	95.29±3.57	87.20±2.65
2.50 ng/mL	80.27±3.22	74.58±3.82	92.33±3.27	84.43±2.88
5.00 ng/mL	75.49±2.34	63.67±2.80	91.56±3.24	82.68±3.26
10.00 ng/mL	67.56±1.78	51.47±2.11	88.18±2.35	81.19±3.73

Çizelge 4.3, Çizelge 4.4 ve Çizelge 4.5' de hesaplanan % canlılık değerleri ayrıca **Şekil 4.23** ve **Şekil 4.24'** te grafik olarak verilmiştir. MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinde PTX ve SLN-PTX için 24. saat **Şekil 4.23'** te ve **Şekil 4.24'** te ise 48. saatte belirlenen % canlılık değerleri görülmektedir.

**Şekil 4.23.** MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinde PTX ve SLN-PTX için konsantrasyon ve 24. saat % canlılık değerleri



Şekil 4.24. MCF7, HeLa ve A549 hücrelerinde PTX ve SLN-PTX için konsantrasyon ve 48. saat % canlılık değerleri

Şekil 4.24 incelendiğinde, PTX için belirlenen en düşük konsantrasyonun (0,63 ng/mL) 48 saat içerisinde belirgin bir sitotoksik etkisi bulunmazken, en yüksek konsantrasyonun (10 ng/mL) hücrelerin canlılık oranlarını % 50' nin altına düşürdüğü gözlenmektedir. 1993 yılında Liebmann ve arkadaşlarının yaptığı sitotoksikite çalışmasında paklitakselin farklı hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri araştırılmış ve 24 saat sonunda MCF7 ve HeLa hücreleri üzerindeki toksik etkinin A549 hücrelerine göre fazla olduğu rapor edilmiştir (Liebmann et al., 1993). Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlarda da bu literatür sonucu ile uyumlu olarak A549 hücreleri için tespit edilen IC_{50} değeri MCF7 ve HeLa hücrelerine göre yüksek olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.6. PTX için ng/mL birimi ile IC_{50} değerleri

	PTX IC_{50}		
	MCF7	HeLa	A549
24. saat	12.66 ng/mL	14.17 ng/mL	31.08 ng/mL
48. saat	4.48 ng/mL	5.75 ng/mL	10.82 ng/mL

Şekil 4.23 ve **Şekil 4.24'** te görüldüğü gibi yaptığımız sitotoksosite çalışmasında kullandığımız en yüksek SLN-PTX konsantrasyonu, çalışılan hücre hatlarında belirgin bir sitotoksik etki göstermemiştir. SLN-PTX için yüzde canlılık değeri % 50' nin altına düşmediği için IC₅₀ değeri belirlenememiştir. Üç hücre hattı karşılaştırıldığında PTX ve SLN-PTX örneklerinin MCF7 hücre hattı üzerinde A549 ve HeLa hücrelerine kıyasla az da olsa sitotoksitesinin fazla olduğu görülmektedir. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuca uygun olarak Martins ve arkadaşlarının Rhodamine-123 yüklü katı lipid nanoparçacıklarla yaptıkları sitotoksosite çalışmasında su içerisinde dağıtılmış nanoparçacıkların çalışılan beş hücre hattında da sitotoksik etkisinin gözlenmediği belirtilmiştir (Martins et al., 2012). Bu sonuçlardan yola çıkılarak SLN' lerin PTX' in sitotoksik etkisini azalttığı düşünülmektedir.

İnkorporasyon Çalışmaları

^{99m}Tc(CO)₃-SLN-PTX ve ^{99m}Tc(CO)₃⁺ 'a ait MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerinde zamana karşı yüzde bağlanma verimleri **Çizelge 4.7** ve **Çizelge 4.8'** te verilmiştir.

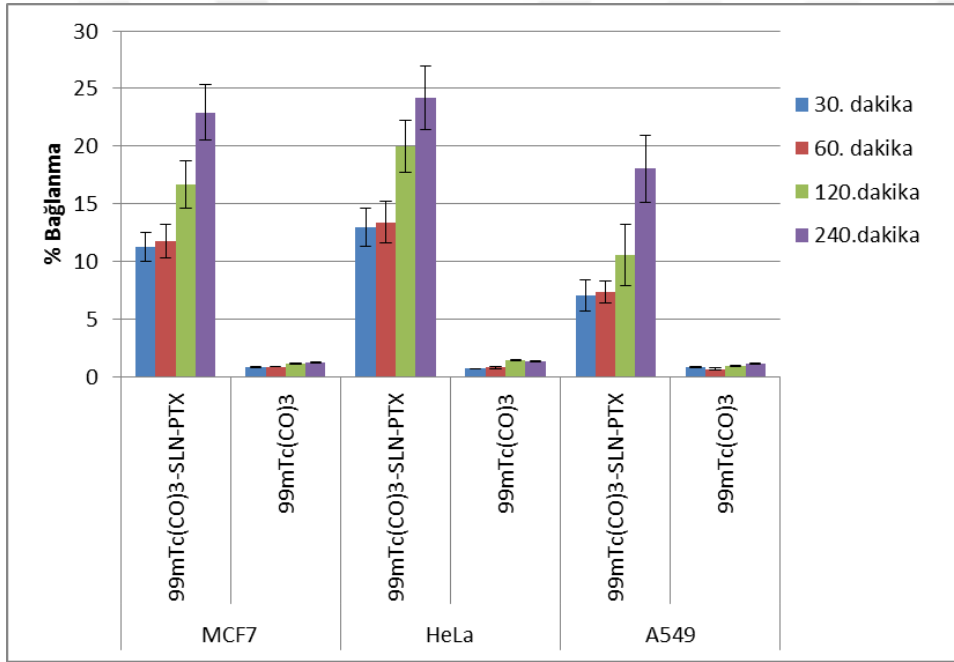
Çizelge 4.7. Radyoişaretli SLN-PTX' in MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

Zaman	^{99m} Tc(CO) ₃ - SLN-PTX		
	MCF7	HeLa	A549
30. dakika	11.24±1.26	12.98±1.65	7.01±1.34
60. dakika	11.73±1.47	13.41±1.79	7.34±0.95
120. dakika	16.65±2.07	19.96±2.24	10.57±2.66
240. dakika	22.91±2.39	24.15±2.76	18.03±2.89

Çizelge 4.8. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ' un MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı % bağlanma verimi

	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$		
	MCF7	HeLa	A549
30. dakika	0.84±0.08	0.69±0.02	0.81±0.07
60. dakika	0.86±0.03	0.78±0.08	0.67±0.09
120. dakika	1.12±0.09	1.42±0.07	0.91±0.06
240. dakika	1.23±0.09	1.31±0.06	1.15±0.05

Benzer şekilde **Şekil 4.25'** te radyoışaretili SLN-PTX' in üç hücre üzerindeki zamana karşı bağlanma verimleri karşılaştırılmıştır.

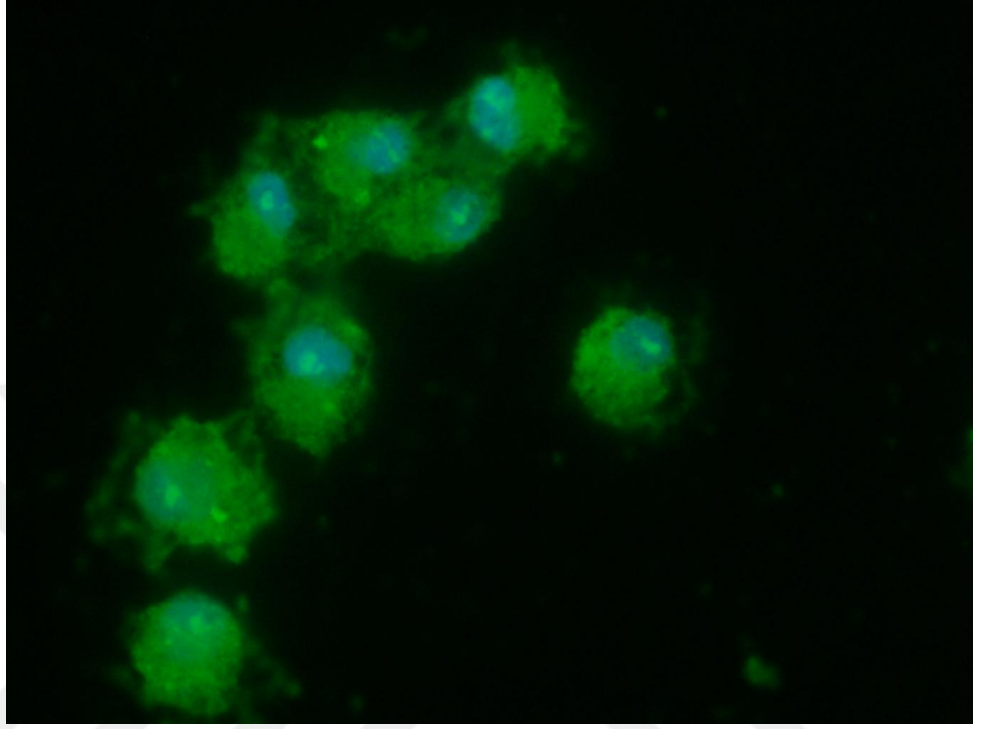


Şekil 4.25. Radyoışaretili SLN-PTX'in MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki zamana karşı bağlanma verimlerinin karşılaştırılması

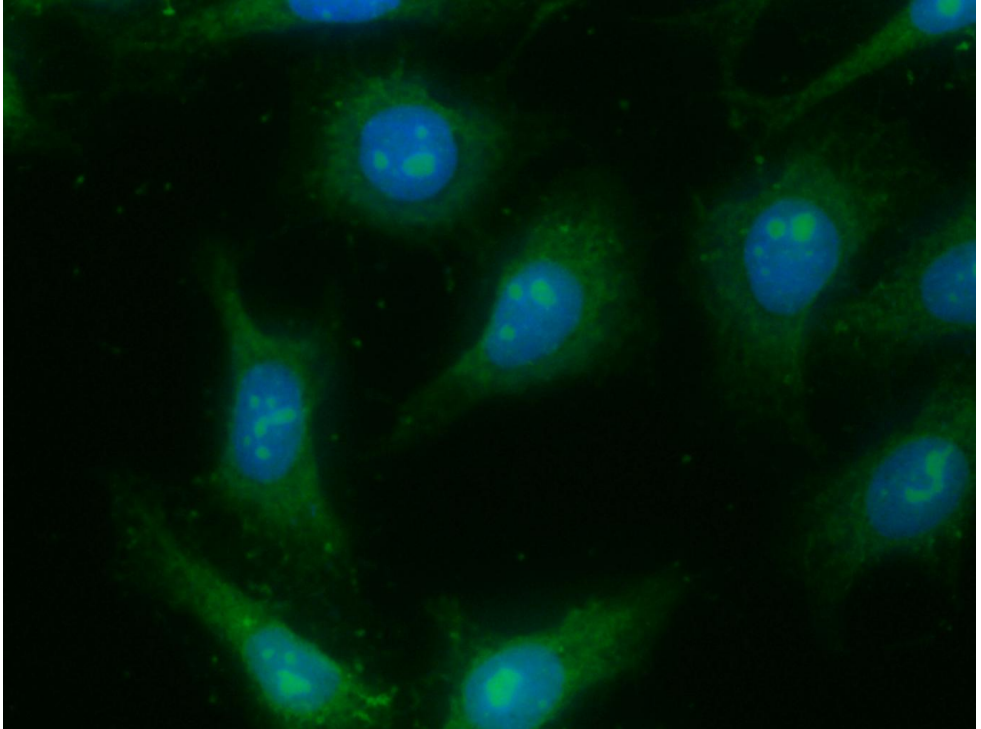
Çizelge 4.7, Çizelge 4.8 ve Şekil 4.25 incelendiğinde MCF7, HeLa ve A549 hücre hatlarında zamana bağlı olarak $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ 'in yüzde bağlanma veriminin arttığı görülmektedir. Bağlanma verimleri hücre hatlarına göre karşılaştırıldığında yüksek düzeyde folat reseptörü bulunduran HeLa hücrelerinde en yüksek, düşük düzeyde folat reseptörü bulunduran MCF7 hücrelerinde daha az olduğu anlaşılmaktadır. Folat-reseptörü negatif olan A549 hücrelerinde ise bağlanma veriminin en düşük seviyede olduğu görülmektedir.

Floresan Görüntüleme Çalışması:

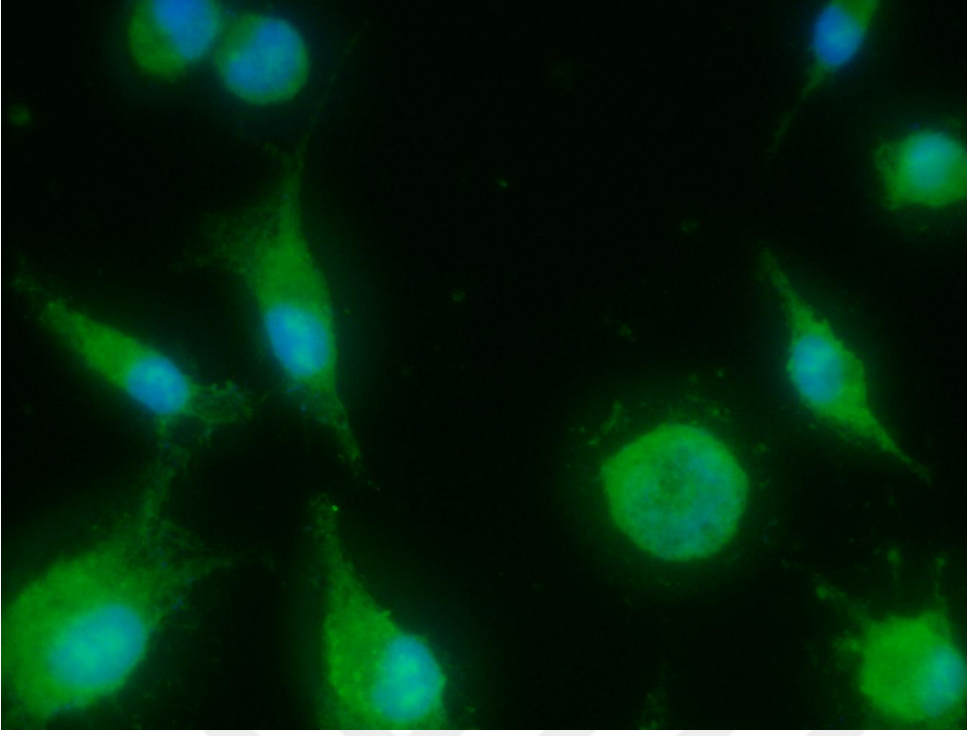
FITC işaretli SLN-PTX'in MCF7, HeLa ve A549 hücreleri üzerindeki görüntüleri floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) filtre ile incelenmiş ve elde edilen görüntüler aşağıda **Şekil 4.26**, **Şekil 4.27** ve **Şekil 4.28'** de verilmiştir.



Şekil 4.26. FITC ile işaretli SLN-PTX'in **MCF7** hücreleri üzerindeki görüntüleri



Şekil 4.27. FITC ile işaretli SLN-PTX'in **HeLa** hücreleri üzerindeki görüntüleri



Şekil 4.28. FITC ile işaretli SLN-PTX' in A549 hücreleri üzerindeki görüntüleri

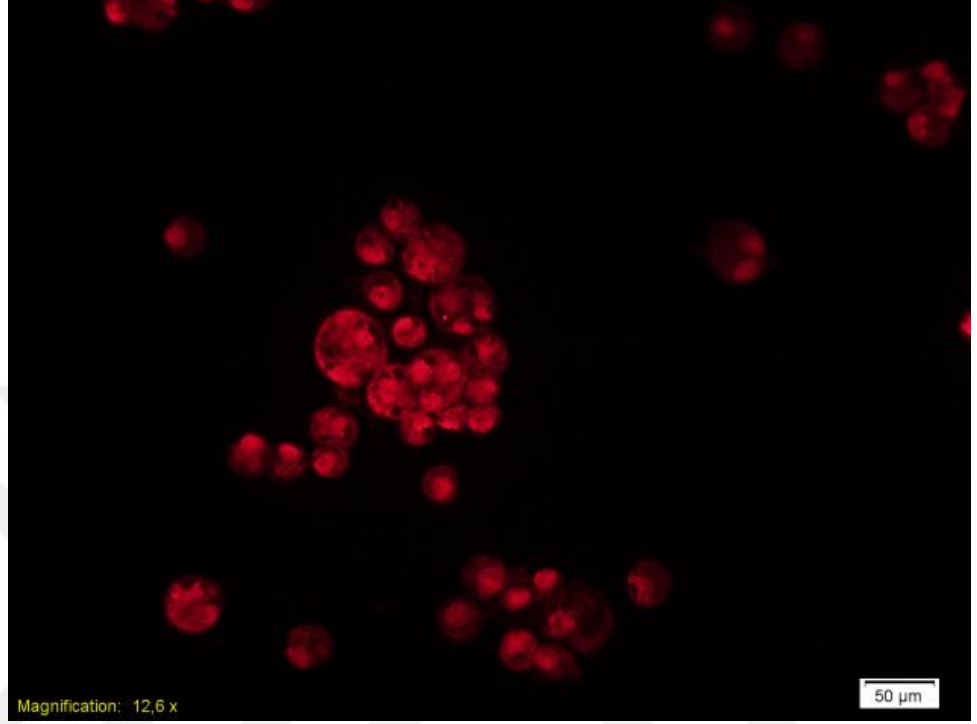
HeLa ve MCF7 hücrelerinde FITC' nin çalışılan dalga boyundaki floresan özelliğinden kaynaklanan parlamalardan 4 saat inkübasyon süresi sonunda her üç hücre hattında da tutulum olduğu anlaşılmaktadır.

Yuan ve arkadaşları tarafından A549 hücre hattı üzerinde yapılan çalışmada floresan görüntüleme ve intensite ölçümleri sonucunda lipid matrisi oluşturan materyallerin hücre tutulumu ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Hücre tutulumlarının kullanılan lipid materyaline göre sıralanışı; Gliserol tristearat SLN > Monostearin SLN > Stearik asit SLN > ATO888 SLN şeklinde rapor edilmiştir (Yuan et al., 2008).

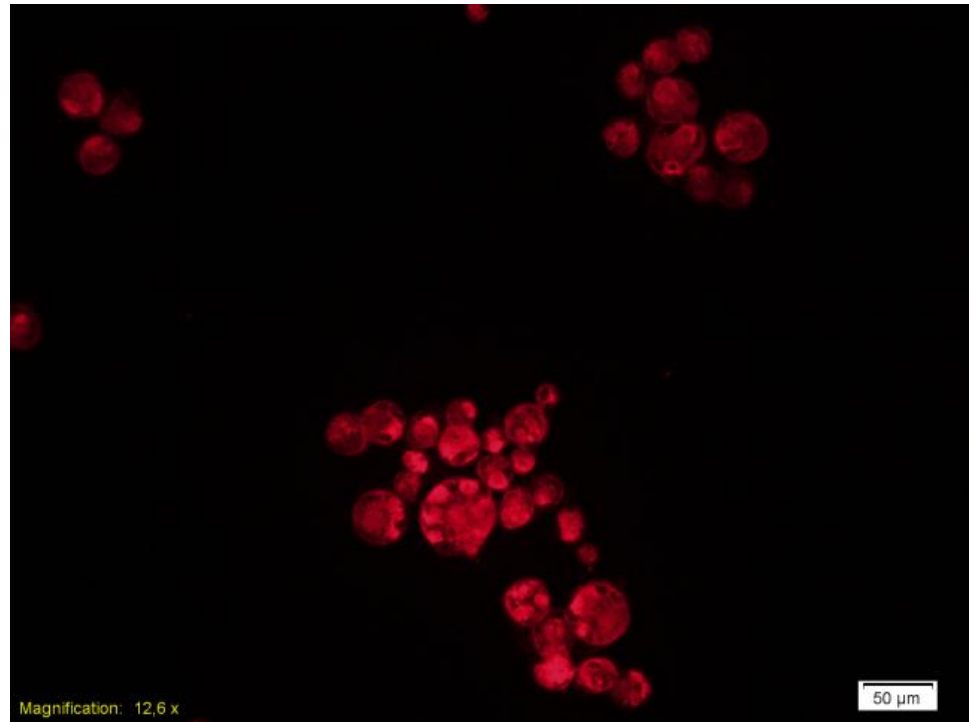
Apoptoz çalışması:

Çok hücreli organizmaların normal gelişimi sırasında hücre bölünmesi ile artan hücre sayısı, hücrelerin programlı şekilde ölüme gitmeleri sonucu dengelenmektedir. Bu önceden programlanmış hücre ölümüne apoptoz adı verilmektedir. Apoptoz yolu ile hücre ölümü bir çok immünolojik proste mevcut antioksidanların serbest radikallerin etkisini tamamen önleyemediği durumlarda (oksidatif stres oluşturan etkenlere bağlı olarak) işin içine giren bir olaydır (Unak vd.,2012). SLN-PTX' in apoptotik etkisi Tunnel yöntemi ile MCF7, HeLa ve A549 hücre hatlarında çalışılmıştır. Floresan eklentili mikroskopta yeşil (520 nm) ve kırmızı (620 nm) filtreler kullanılarak alınan görüntüler **Şekil 4.29**, **Şekil 4.30**

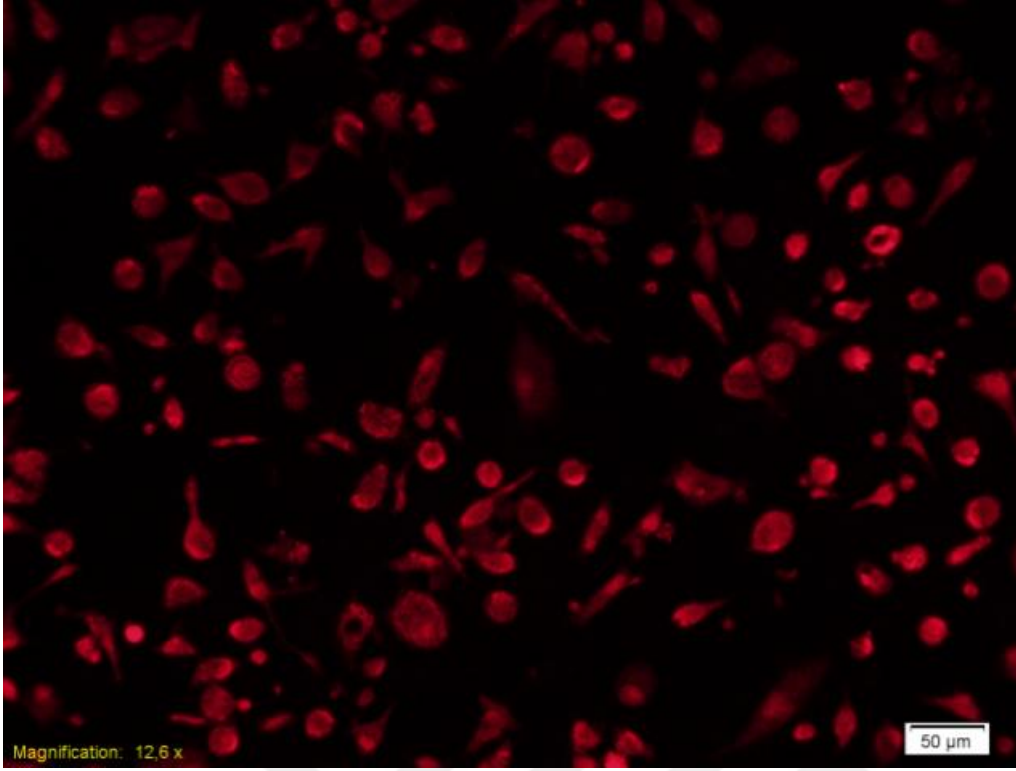
ve **Şekil 4.31'** de verilmiştir. Paklitaksel yüklü lipid nanoparçacıklarla yapılan apoptoz çalışmasına ilişkin görüntüler incelendiğinde SLN-PTX' in çalışılan konsantrasyonda MCF7, HeLa ve A549 hücre hatlarında apoptotik etkiye yol açmadığı belirlenmiştir.



Şekil 4.29. SLN-PTX'in MCF7 hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri



Şekil 4.30. SLN-PTX'in HeLa hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri



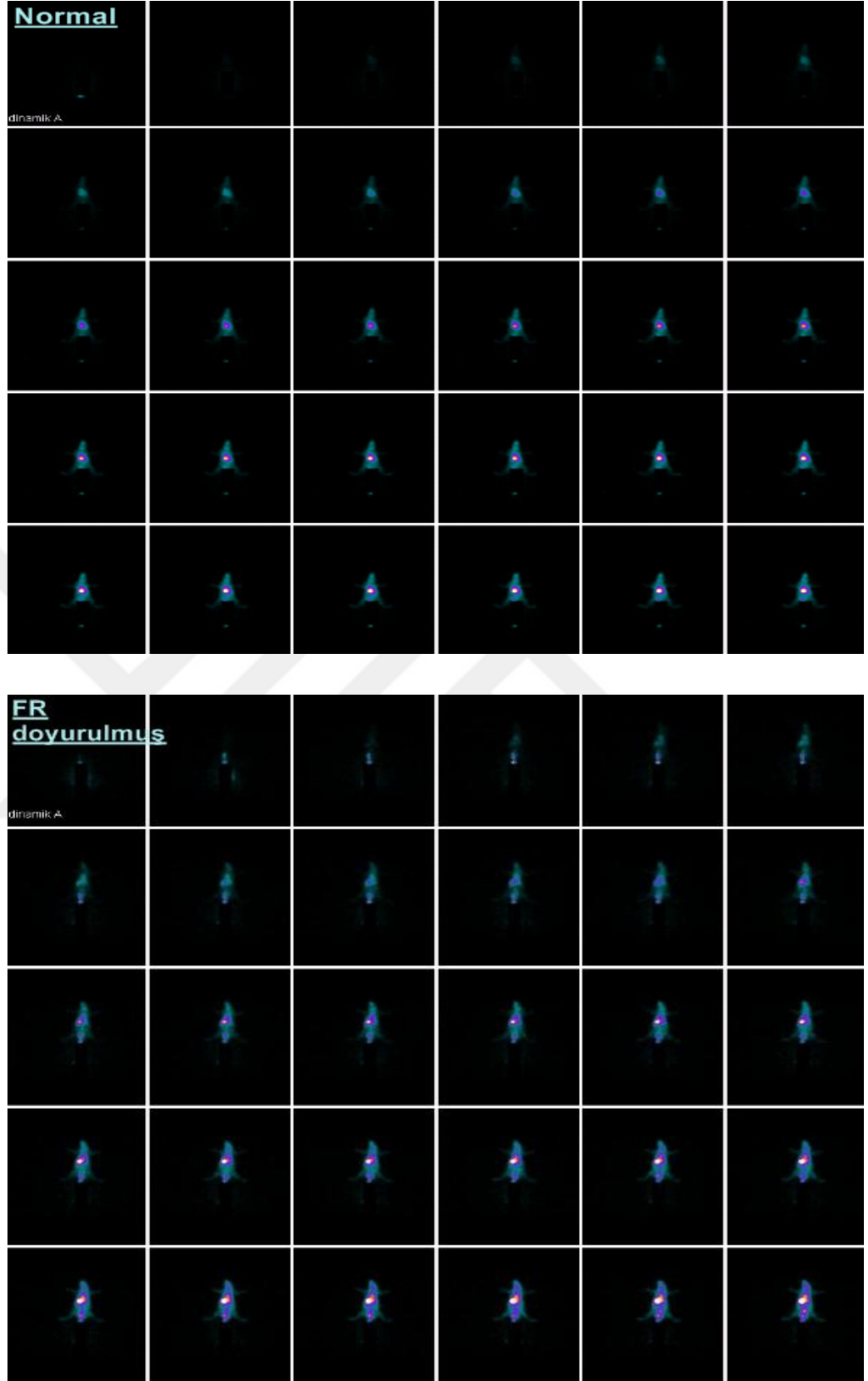
Şekil 4.31. SLN-PTX'in A549 hücreleri üzerindeki apoptoz çalışması görüntüleri.

4.4.2 *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmalar dişi Wistar Albino sıçanlar ile detayları bölüm 3.5.2' de anlatıldığı gibi gama kamera görüntüleme ve biyodağılım olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir.

Görüntüleme çalışmaları sonuçları

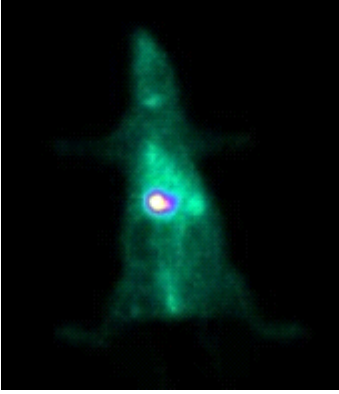
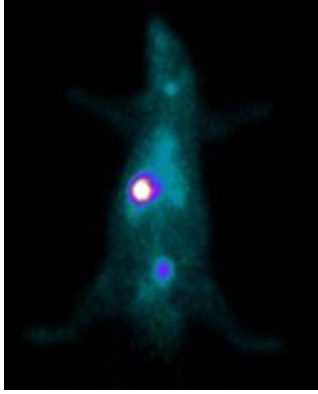
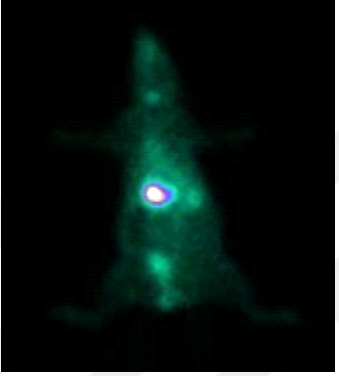
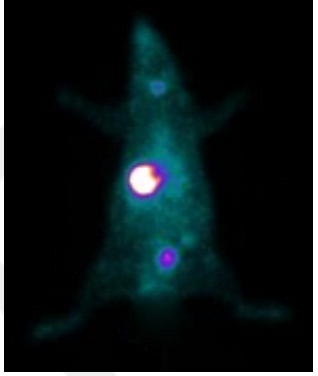
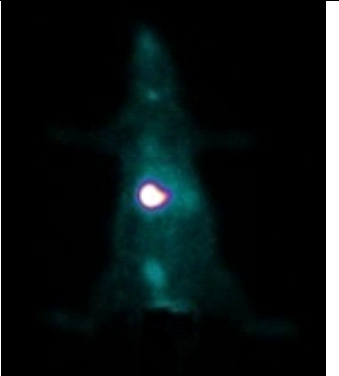
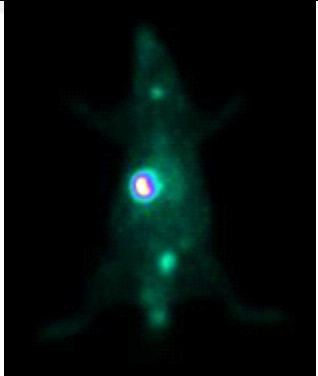
Enjeksiyonu yapılan FR doyurulmuş ve normal sıçanların ilk 30 dakika dinamik gama kamera görüntüleri Şekil 4.32' de verilmiştir.



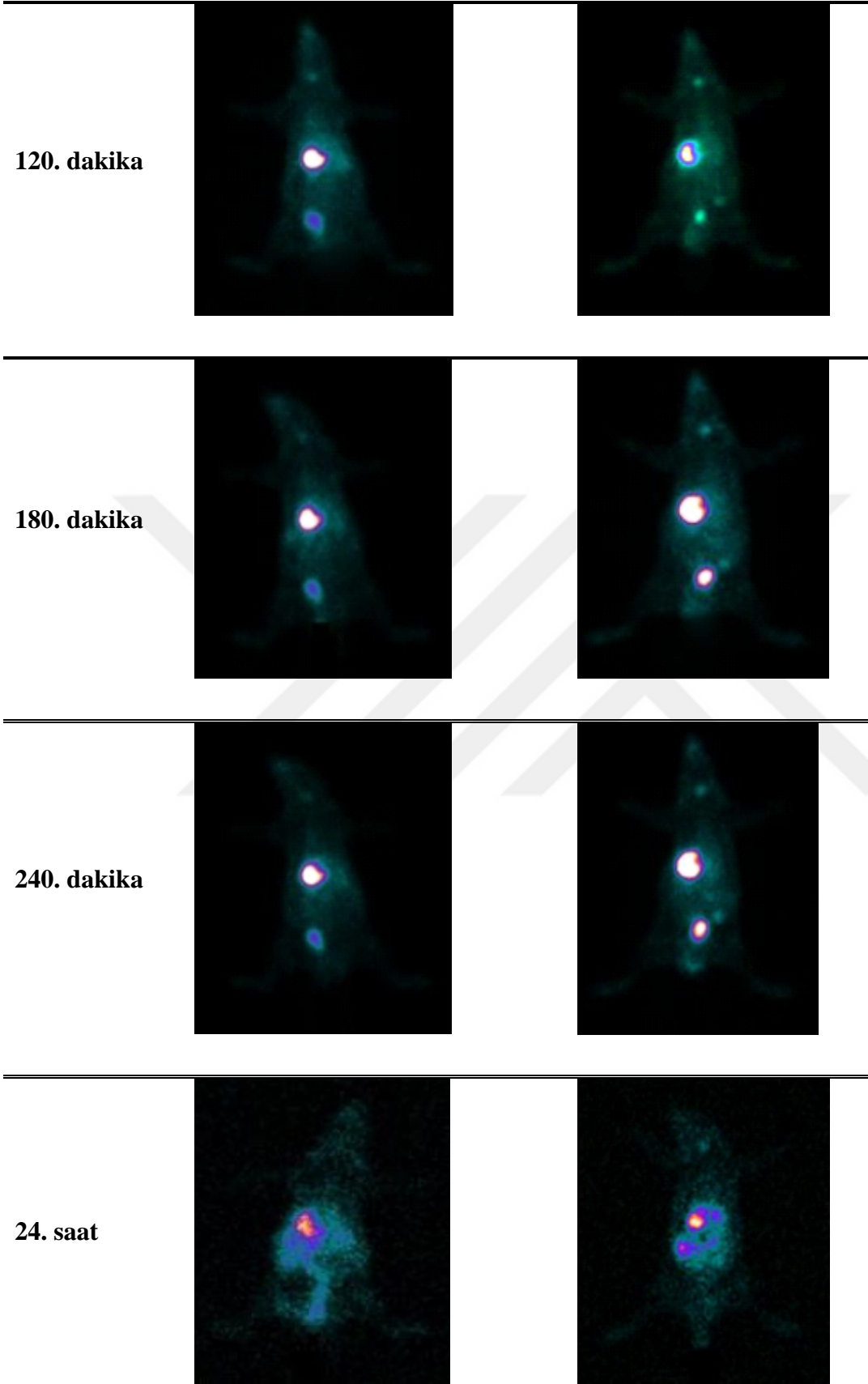
Şekil 4.32. Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 30 dakika dinamik gama kamera görüntüleri

İlk 30 dakikada alınan dinamik görüntülerdeki parlamalardan hayvanlara interavenöz enjeksiyon yoluyla verilen $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ 'in vücut içerisine dağıldığının bir göstergesidir.

Bu basamakta $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile işaretli PTX-SLN' in reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara 30., 60., 90., 120., 180., 240. dakikalarda ve 24. saate ilişkin statik gama kamera görüntüleri **Şekil 4.33** ve **Şekil 4.34'** te görülmektedir. *In vivo* çalışmalarda 200 nm' nin üzerinde boyuta sahip nanoboyutlu parçacıklar intravenöz olarak uygulandığında retiküloendotelial sistem tarafından yakalanması beklenen bir sonuçtur (Zhao et al., 2012). Çalışmamızda elde edilen görüntüler incelendiğinde oluşturduğumuz $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile radyoişaretli ilaç taşıyıcı sistemin karaciğerde yüksek miktarda tutulumu görülmektedir. Tümör hedefli nanoparçacıklarla oluşturulan radyoişaretli sistemlerle ilgili çok sayıda literatüre rastlanmaktadır. Bu çalışmalar incelendiğinde araştırmacılar radyoişaretli ilaç taşıyıcı sistemlerin hedeflenen tümörün yanısıra karaciğerde de yüksek tutulum gösterdiğini rapor etmişlerdir (Esposito et al., 2015; Patel et al., 2011; Polyak et al., 2013).

Zaman	Normal	FR doyurulmuş
30. dakika		
60. dakika		
90. dakika		

Şekil 4.33. Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 30., 60. ve 90. dakika statik gama kamera görüntüleri.



Şekil 4.34. Reseptör doyurulmuş ve normal sıçanlara ait 120., 180., 240. dakikalara ve 24. saate ilişkin statik gama kamera görüntüleri.

Folat reseptörlerinin yumurtalık, testis, kolon, akciğer tümörlerinde olduğu gibi sağlıklı böbrek dokusunda da bulunduğu çeşitli araştırmacılar tarafından rapor edilmiştir (Weitman et al., 1992; Sudimack et al., 2000). Biyodağılım çalışmasında 30. dakikada böbrekteki $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ tutulumu, normal sıçanlarda, FR doyurulmuş denek grubuna oranla yaklaşık on kat fazla olarak belirlenmiştir. Biyodağılım çalışmasından elde edilen bu veriler de göz önünde bulundurulduğunda 30. dakikada normal sıçana ait gama kamera görüntüsündeki böbrek tutulumu anlamlı bir sonuç olarak ortaya çıkmaktadır.

24 saate kadar alınan statik gama kamera görüntülerinde de reseptör doyurma işlemi gerçekleştirilmiş sıçanda karaciğer tutulumunun normal sıçana oranla fazla olduğu gözlenmiştir. 24. saatteki görüntüler karşılaştırıldığında bu sonuç belirgin şekilde görülmektedir. Genel olarak radyoişaretli kompleksin kan dolaşımında kalma süresi ve vücuttan atılımı değerlendirildiğinde reseptör doyurulmuş sıçanda normal sıçana kıyasla daha hızlı gerçekleştiği düşünülmektedir. Bu sonuçlar hedefleme molekülü FOL-PEG-CHEMS' in $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in retiküloendotelyal sistem tarafından yakalanmadan dolaşımında kalmasını sağladığını göstermektedir (Pirollo et al., 2008; Bayındır ve Yüksel, 2007).

Biyodağılım çalışmaları sonuçları

Paklitaksel yüklü radyoişaretli lipid nanoparçacıkların biyolojik davranışı gama kamera görüntüleme çalışmasının yanısıra biyodağılım çalışmasıyla da incelenmiştir. *İn vivo* görüntüleme çalışmasında olduğu gibi sıçanlar folat reseptörü doyurulmuş ve normal olmak üzere iki grupta gerçekleştirilmiştir. **Çizelge 4.9, Çizelge 4.10, Şekil 4.35** ile **Şekil 4.36** incelendiğinde ilk 30 dakikada $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in beklendiği gibi tüm organlara ulaştığı gözlenmiştir. Tutulum 120. dakikada AC, KC ve böbrekte en yüksek değerine ulaşmış ve 240. dakikada bu değerlerin düştüğü gözlenmiştir.

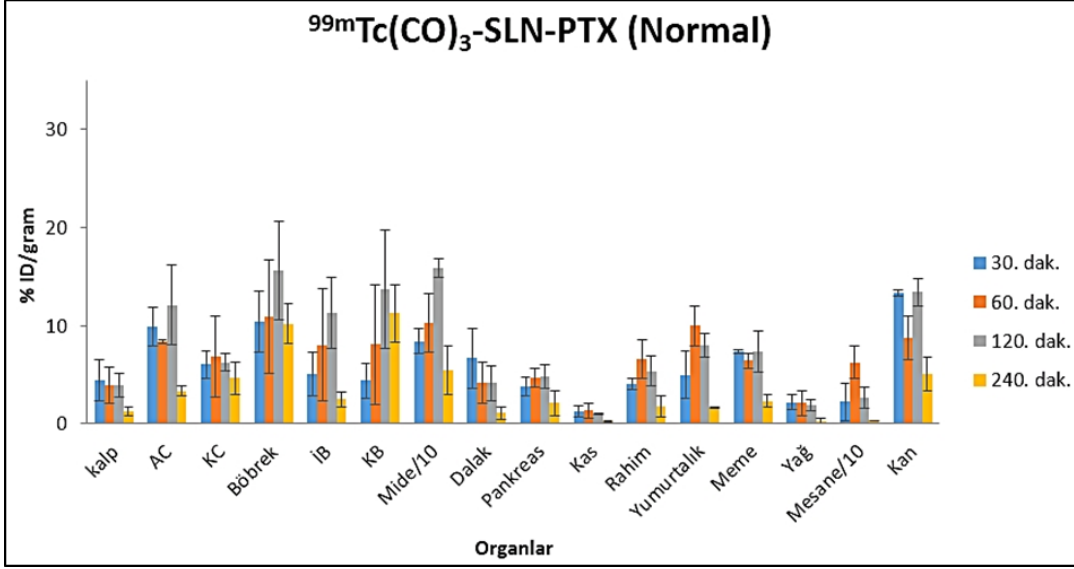
Şekil 4.37' de folat reseptörlerinin bulunduğu rapor edilen rahim, yumurtalık, meme ve böbrek organları için normal ve folik asit ile doyurulmuş sıçanlardaki tutulumlar karşılaştırılmıştır. Wu ve arkadaşları tarafından, yumurtalıkta germinal epitel dokuda, rahimde ise yüzey epitel dokusunda FR- α ekspresyonu rapor edilmiştir (Wu et al., 1999). Bu iki organdaki $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-}$

PTX tutulumları, 30. ve 60. dakikalarda reseptör doyurulmuş ve normal denek gruplarında belirgin farklılık sergilemiştir. Elde edilen veriler literatürdeki bilgiler ışığında yorumlandığında ilgili organlardaki tutulumun reseptör aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir.



Çizelge 4.9 Dişi Albino Wistar sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in % ID / g (organ) - Bg oranı verileri (normal)

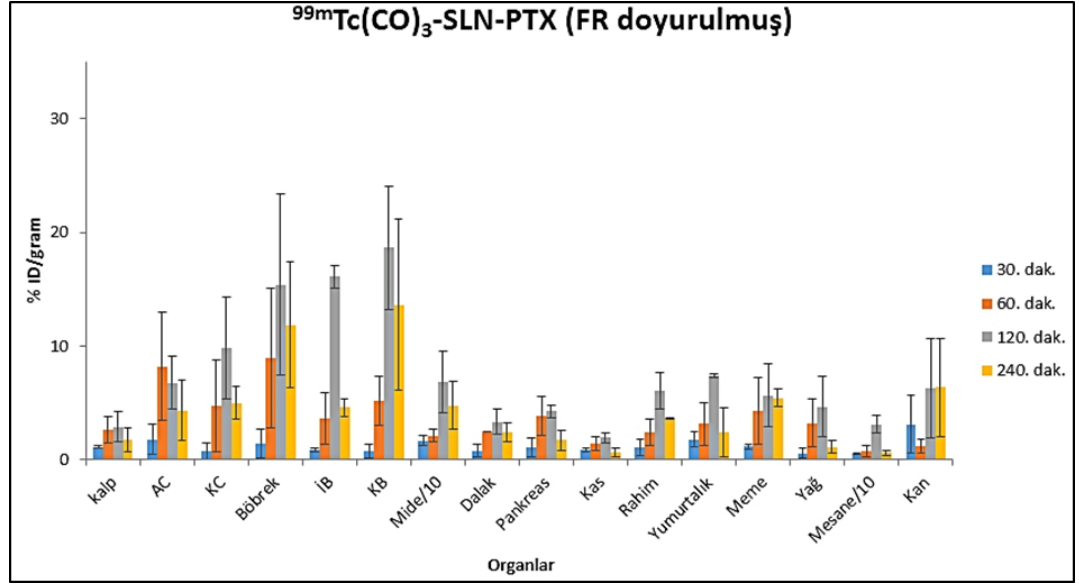
%ID/g (organ)- Bg oranı	30dak	60dak	120dak	240dak
Kalp	4.44 ± 2.15	3.97 ± 1.82	3.93 ± 1.21	1.24 ± 0.46
Akciğer(AC)	9.90 ± 1.93	8.41 ± 0.20	12.11 ± 4.03	3.35 ± 0.52
Karaciğer(KC)	6.02 ± 1.35	6.88 ± 4.15	6.25 ± 0.85	4.64 ± 1.63
Böbrek	10.39 ± 3.11	10.96 ± 5.78	15.64 ± 5.02	10.21 ± 2.05
İnce Barsak(İB)	5.07 ± 2.24	8.03 ± 5.71	11.31 ± 3.65	2.51 ± 0.76
Kalın Barsak	4.38 ± 1.75	8.11 ± 6.10	13.68 ± 6.04	11.23 ± 2.86
Mide/10	8.42 ± 1.30	10.32 ± 2.99	15.92 ± 0.95	5.47 ± 2.47
Dalak	6.66 ± 3.03	4.19 ± 2.04	4.17 ± 1.78	1.08 ± 0.67
Pankreas	3.77 ± 0.94	4.74 ± 0.95	4.82 ± 1.24	2.12 ± 1.29
Kas	1.29 ± 0.59	1.36 ± 0.76	1.04 ± 0.06	0.25 ± 0.11
Rahim	4.06 ± 0.53	6.62 ± 1.93	5.37 ± 1.49	1.81 ± 1.06
Yumurtalık	5.00 ± 2.43	9.96 ± 2.01	7.98 ± 1.18	1.67 ± 0.06
Meme	7.36 ± 0.15	6.41 ± 0.75	7.33 ± 2.07	2.34 ± 0.60
Yağ	2.21 ± 0.79	2.11 ± 1.26	1.92 ± 0.62	0.31 ± 0.22
Mesane/10	2.24 ± 1.89	6.27 ± 1.67	2.65 ± 1.11	0.33 ± 0.02
Baş	1.42 ± 0.53	0.83 ± 0.11	1.20 ± 0.50	0.36 ± 0.17
Kan	13.34 ± 0.31	8.75 ± 2.25	13.40 ± 1.40	5.12 ± 1.70



Şekil 4.35. Normal sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ sistemine ait %ID/g-Bg oranı.

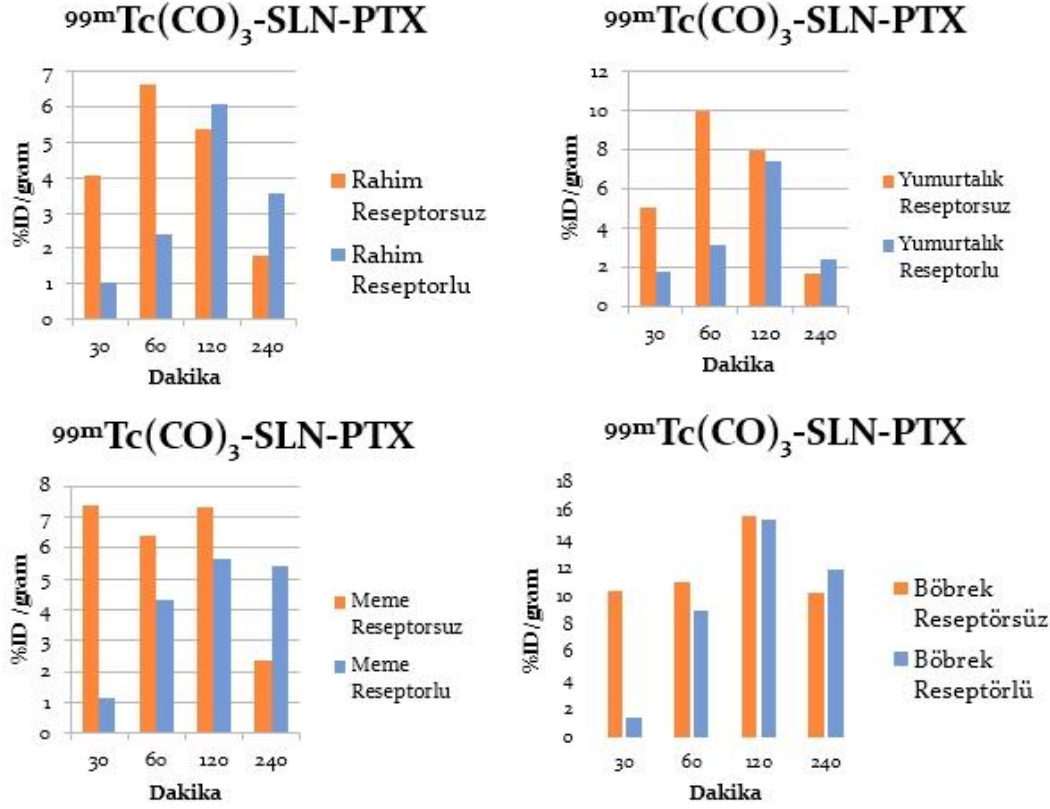
Çizelge 4.10. Dişi Albino Wistar sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in % ID / g (organ) - Bg oranı verileri (FR doyurulmuş)

%ID/g (organ)- Bg oranı	30dak	60dak	120dak	240dak
Kalp	1.10±0.12	2.59±1.18	2.90±1.31	1.72±1.05
Akciğer(AC)	1.75±1.33	8.18±4.76	6.78±2.31	4.35±2.63
Karaciğer(KC)	0.72±0.69	4.76±4.05	9.81±4.49	5.01±1.41
Böbrek	1.43±1.25	8.95±6.14	15.42±7.97	11.85±5.53
İnce Barsak(İB)	0.86±0.19	3.65±2.30	16.13±1.00	4.61±0.76
Kalın Barsak	0.74±0.63	5.21±2.18	18.68±5.41	13.65±7.56
Mide/10	1,67±0,43	2,11±0,53	6,81±2,70	4,78±2,06
Dalak	0.79±0.55	2.43±0.00	3.32±1.10	2.44±0.84
Pankreas	1.08±0.79	3.81±1.71	4.25±0.52	1.72±0.89
Kas	0.87±0.21	1.42±0.63	1.93±0.43	0.61±0.40
Rahim	1.06±0.75	2.42±1.19	6.08±1.62	3.58±0.06
Yumurtalık	1.80±0.68	3.14±1.85	7.38±0.18	2.41±2.20
Meme	1.15±0.22	4.29±2.91	5.67±2.73	5.43±0.80
Yağ	0.57±0.47	3.23±2.13	4.66±2.64	1.12±0.56
Mesane/10	0,56±0,04	0,73±0,54	3,12±0,79	0,58±0,20
Baş	0.13±0.11	0.24±0.17	0.68±0.34	0.33±0.16
Kan	3.11±2.57	1.16±0.61	6.30±4.40	6.34±4.30



Şekil 4.36. Folat reseptörü (FR) doyurulmuş sıçanlarda $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ sistemine ait %ID/g-Bg oranı

Guo ve arkadaşları tarafından 2011 yılında yapılan bir çalışmada ^{99m}Tc ile radyoışaretli folik asit ile modifiye edilmiş kitosan nanoparçacıkların dişi Kunming fareler(n=10) üzerinde biyodağılımı incelenmiş, bu amaçla radyoışaretli nanoparçacıkların enjeksiyonundan 10 dakika önce 5 fareye folik asit ile reseptör doyurma işlemi gerçekleştirilmiştir. 1 saatin sonundaki tutulumlar değerlendirildiğinde folat reseptörlerinin yoğun olarak bulunduğu böbrekteki tutulumun reseptör doyurma işlemi yapılmamış farelerde belirgin düzeyde artış gösterdiği rapor edilmiştir. Karaciğerdeki tutulumda ise azalma olduğu ve bunun nanoparçacıkların folat reseptörlerine spesifik olduğunun bir göstergesi olduğu belirtilmiştir (Guo et al., 2011). Aktif hedefleme yapılmayan koloidal yapıdaki parçacıkların kan dolaşımında uzun süre kalmadan karaciğer ve dalak tarafından tutularak istenen dokulara gitmesinin engellendiği bilinmektedir (Bertrand et al., 2013). İntravenöz enjeksiyon sonrasında katı lipid nanoparçacıkların da tipik biyolojik davranışı retikuloendotelial sistem organlarında (karaciğer, dalak ve akciğerler) tutulum göstermeleridir (Feng and Mumper, 2013). Çalışmamızda Guo ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçla uyumlu şekilde 120. dakikadaki karaciğer tutulumu reseptör bloke edilmiş grupta daha yüksek olarak belirlenmiştir. Reseptörlerin folik asit ile doyurulması nanoparçacıkların folat reseptörlü dokularda tutulmasını engelleyerek karaciğer tutulumunu yükseltmiştir.



Şekil 4.37. Folat reseptörlerinin bulunduğu rapor edilen rahim, yumurtalık, meme ve böbrek organları için normal ve folik asit ile doyurulmuş sıçanlardaki tutulumların karşılaştırıldığı grafikler.

Folat reseptörlerinin yumurtalık kanserinde 90 %, diğer tümörlü dokularda yüksek oranda bulunmasının yanı sıra sağlıklı böbrek ve akciğer dokularında da bulunduğu Sudimack tarafından 1999 yılında yapılan incelemede rapor edilmiştir. (Weitman et al., 1992; Sudimack et al., 2000; Byrne et al., 2008). Biyodağılım çalışmasından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında 30. dakikada akciğer için normal sıçanlardaki % ID/g değeri 9.90 ± 1.93 olarak belirlenirken, FR doyurulmuş sıçan grubunda bu değer 1.75 ± 1.33 ' tür. Benzer şekilde 30. dakikada böbrekteki $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ tutulumu normal sıçanlarda 10.39 ± 3.11 , FR doyurulmuş sıçanlarda ise 1.43 ± 1.25 ' tir. Radyoişaretleli nanoparçacıkların vücuttan atılımının başladığı 120. dakikaya kadar her iki organ için tutulumlardaki fark belirgin şekilde görülmektedir. Bu sonuç nanoparçacıkların bir folat türevi olan Fol-PEG-CHEMS ile modifiye edilmesinin sistemi belirli organlara hedefleme amacımız için başarı sağlandığını desteklemektedir. İntravenöz enjeksiyon sonrasında nanoparçacıkların akciğerdeki lokalizasyonu ile ilgili bir başka olasılık

ise agregasyon sonucu nanoparçacıkların akciğer kılcallarında alıkonmasıdır (Rossin et al., 2005).

Literatürde 20-500 nm arasında bayutlara sahip katı lipid nanoparçacıkların bağırsak mukozasındaki epitel hücreler (enterositler) tarafından lenf dolaşımına geçişi belirtilmiştir (Tiwari and Pathak, 2011; Khan et al., 2013). Gerçekleştirdiğimiz biyodağılım çalışmasına ait veriler bağırsakta 120. dakikaya kadar artan $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ tutulumu olduğunu göstermektedir. Tiwari ve Pathak tarafından simvastatin yüklü radyoişaretleli katı lipid nanoparçacıklarla yapılan çalışmada da benzer şekilde bağırsakta 4. saate kadar süren aktivite tutulumu rapor edilmiştir (Tiwari and Pathak, 2011). SLN'lerin bu yolla absorpsiyonu, lipofilik bileşiklerin lenfatik yolla hedeflenebilir ilaç taşıyıcılar olmasının yanı sıra ilaca karşı direnç, toksik etki gibi sınırlamaları gidermektedir (Khan et al., 2013).

İstatistiksel Analizler: Biyodağılım sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizleri (Univariate Variance Analyses) SPSS 20 programı kullanılarak yapılmıştır. $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ bileşiği için organlar arasında Pearson korelasyonu uygulanmıştır. Pearson korelasyonuna göre işaretli bileşiklerin tutulumları ile organlar arasında bir ilişki tanımlanmaktadır. Anlamlılık düzeyi (P) değeri ile ifade edilecek olursa $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir.

- Kalp ile ince bağırsak, dalak, kas, rahim, yumurtalık, tiroid, baş,
- Akciğer ile mide, pankreas, rahim, yağ, meme, tiroid, baş,
- Karaciğer ile ince bağırsak, kas
- Böbrek ile ince bağırsak, kalın bağırsak, mide
- İnce bağırsak ile kalın bağırsak, mide, rahim, yumurtalık
- Mide ile pankreas
- Dalak ile kas, rahim, yumurtalık, tiroid, baş
- Pankreas ile rahim, yağ, baş
- Kas ile rahim, yumurtalık, tiroid, baş
- Rahim ile yumurtalık, meme, tiroid, baş
- Yumurtalık ile mesane
- Yağ ile tiroid, mesane, baş, kan

- Meme ile tiroid, baş, kan,
- Tiroid ile baş, kan
- Baş ile kan

organları arasında mevcut istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur. Organ - süre ilişkisine bakıldığında ise mide, rahim, yumurtalık, meme, mesane ve kan için istatistiksel bir fark söz konusudur ($P < 0,05$). (**Çizelge 4.11**).

Çizelge 4.11. Varyans analizi sonucuna göre bazı organlara ait reseptör ile ilişkilerine ilişkin P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri.

Organ	P Değeri	r Değeri
Mide	0.031	0.868
Rahim	0.029	0.755
Yumurtalık	0.029	0.873
Meme	0.037	0.792
Mesane	0.031	0.808
Kan	0.006	0.902

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada paklitaksel yüklü folat reseptörü hedefli katı lipid nanoparçacıklar sentezlenerek [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ koru ile radyoişaretlenmesi sağlanmış ve biyolojik davranışı *in-vitro* ve *in-vivo* olarak incelenmiştir.

Sentezlenen katı lipid nanoparçacıklara aktif hedefleme özelliği kazandırmak amacıyla ilk olarak bir folat türevi Fol-PEG-CHEMS sentezlenmiş ve $^1\text{H-NMR}$ analizleri ile yapısı aydınlatılmıştır. Solvent difüzyon yöntemi ile elde edilen parçacıkların sentezlenen folat türevi ile modifiye edilmesinin ardından zeta potansiyeli analizi yapılmış ve yüzey yükü beklendiği gibi -33.9 mV bulunmuştur. Dinamik ışık saçılımı analizi, TEM ve SEM görüntüleme çalışmaları sonuçları doğrultusunda parçacık boyutlarının 50-150 nm arasında olduğu belirlenmiştir.

Çalışmamızda ideal bir görüntüleme radyonüklidi olan teknesyumun +4 yükseltgenme basamağında geleneksel kalay (II) klorür indirgeme yöntemi yerine +1 yükseltgenme basamağındaki Tc(I) trikarbonil koru tercih edilerek folat reseptörü hedefli katı lipid nanoparçacıkların radyoişaretlenmesi sağlanmıştır. Radyoişaretli katı lipid nanoparçacıkların TLRC ve HPLRC yöntemleri ile yapılan kalite kontrolleri sonrasında bağlanma verimi % 90 olarak hesaplanmıştır.

Bu çalışmada elde edilen $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in biyolojik davranışları HeLa, MCF7 ve A549 hücre hatları kullanılarak *in vitro* olarak değerlendirildiğinde;

- Aynı derişimlerde paklitaksel ile karşılaştırıldığında nanogram düzeyinde katı lipid nanoparçacıkların kullanılan hücre hatları üzerinde belirgin bir toksik etkisine rastlanmamıştır.
- Tüm hücre hatlarında $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ sisteminin hücrelere bağlanma veriminin zamanla arttığı,
- Yüksek düzeyde folat reseptörü bulunduran HeLa hücrelerinde en yüksek, düşük düzeyde folat reseptörü bulunduran MCF7 hücrelerinde daha az, folat-reseptörü negatif A549 hücrelerinde en düşük olduğu sonucuna varılmıştır.
- Elde edilen sonuç aynı hücre hatları üzerinde gerçekleştirilen floresan mikroskobu görüntüleri ile desteklenmiştir.

$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-SLN-PTX}$ ' in biyolojik davranışı, **folat reseptörü doyurulmuş** ve **normal** olmak üzere iki grup oluşturularak dişi Wistar Albino

sıçanlar üzerinde biyodağılım ve gama kamera görüntüleme çalışmaları ile *in vivo* olarak belirlenmiştir.

Biyodağılım çalışmaları sonucunda folat reseptörü bulunan organlar için iki denek grubundaki tutulumlar karşılaştırıldığında nanoparçacıklara aktif hedefleme özelliği kazandırma amacına ulaşıldığı görülmüştür. Rahim, yumurtalık ve memede normal denek grubundaki aktivite tutulumunun folat reseptörü doyurma işlemi yapılmış denek grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Aynı zamanda FR doyurulmuş grupta karaciğer tutulumundaki artış katı lipid nanoparçacıkların normal denek grubunda retikuloendotelial sistem tarafından yakalanmadan kan dolaşımında daha uzun süre kaldığını ve spesifik organlara yönlendirildiğini desteklemektedir. Gama kamera ile görüntüleme çalışmasında özellikle 24. saatte elde edilen görüntülerde, iki denek grubunda karaciğer tutulumundaki belirgin farklılık aynı sonucu desteklemektedir.

Bu çalışmada; görüntüleme özelliğine sahip çok fonksiyonlu aynı zamanda biyoyumlu ilaç taşıyıcı sistem hazırlanmış *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarla folat reseptörlü hücre ve dokularda afinitesi saptanmıştır. Bundan sonraki çalışmalarda tümörlü hayvan modeli üzerinde farklı uygulama yolları (deri altı, pulmoner, oral, vb.) denenerek çalışmalar yapılması, radyoişaretli ilaç taşıyıcı sistemin tümörlü dokulardaki tutulumunun ve klinikte kullanım potansiyelinin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alam, M. I., Baboota, S., Ahuja, A., Ali, M., Ali, J., Sahni, J. K. and Bhatnagar, A.,** 2014, Pharmacoscintigraphic evaluation of potential of lipid nanocarriers for nose-to-brain delivery of antidepressant drug, *International journal of pharmaceuticals*, 470(1), 99-106pp.
- Alberto, R. and Abram, U.,** 2003, ^{99m}Tc: Labeling chemistry and labeled compounds. In: *Handbook of Nuclear Chemistry*, Vol. 4, Vertes, A., Nagy, S., Klencsar, Z. (Eds.), Kluwer Academic Publishers, 215p.
- Alberto, R., Schibli, R., Egli, A. and Schubiger, P. A.,** 1998, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of [^{99m}Tc(OH)₂]₃(CO)₃⁺ from [^{99m}TcO₄]⁻ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (31), 7987-7988pp.
- Amiji, M. M.,** 2006, *Nanotechnology for cancer therapy*, CRC Press: Boca Raton, 741-771pp.
- Andreozzi E., Seo J.W., Ferrara K. and Louie A.,** 2011, Novel Method to Label Solid Lipid Nanoparticles with ⁶⁴Cu for Positron Emission Tomography Imaging, *Bioconjugate Chemistry*, 22, 808-818pp.
- Arano Y.,** 2002, Recent Advances in ^{99m}Tc Radiopharmaceuticals, *Annals of Nuclear Medicine*, 16(2), 79-93pp.
- Ateş, H.,** 2015, Nano parçacıklar ve nano teller, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, Part: C, 3(1), 437-442s.
- Ballot, S., Noiret, N., Hindré, F., Denizot, B., Garin, E., Rajerison, H. and Benoit, J. P.** 2006, ^{99m}Tc/¹⁸⁸Re-labelled lipid nanocapsules as promising radiotracers for imaging and therapy: formulation and Biodistribution, *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 33(5), 602-607pp.
- Bangham, A. D. and Horne, R. W.** 1964, Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope, *Journal of molecular biology*, 8(5), 660-IN10.
- Bayındır, Z.S. ve Yüksel, N.,** 2007, Pegilasyon: PEG Konjugatlarının Hazırlanması ve Uygulamaları, *Ankara Ecz. Fak. Der.*, 36(4), 249-266s.
- Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N. and Farokhzad, O. C.,** 2014, Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Advanced drug delivery reviews*, 66, 2-25pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Bharali, D. J., Khalil, M., Gurbuz, M., Simone, T. M. and Mousa, S. A.** 2009, Nanoparticles and cancer therapy: a concise review with emphasis on dendrimers, *International journal of nanomedicine*, 4, 1p.
- Brigger, I., Dubernet, C. and Couvreur, P.** 2002, Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced drug delivery reviews*, 54(5), 631-651pp.
- Byrne, J.D., Betancourt, T. and Brannon-Peppas, L.,** 2008, Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, 1615-1626pp.
- Canefe, K. ve Duman, G.,** 1994, İlaçların Seçici Taşınması ve Hedeflendirilmesi, *Ankara Ecz. Fak. Der.*, 23, 1s.
- Cao, J., Wang, Y., Yu, J., Xia, J., Zhang, C., Yin, D. and Häfeli, U. O.** 2004, Preparation and radiolabeling of surface-modified magnetic nanoparticles with rhenium-188 for magnetic targeted radiotherapy. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 277(1), 165-174pp.
- Chen, X., Guo, Y. and Liu, B.,** 2007, Caution to HPLC analysis of tricarbonyl technetium radiopharmaceuticals: An example of changing constitution of complexes in column, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 43(4), 1576-1579pp.
- De Barros, A. B., Tsourkas, A., Saboury, B., Cardoso, V. N. and Alavi, A.** 2012, Emerging role of radiolabeled nanoparticles as an effective diagnostic technique, *EJNMMI Res*, 2(1), 39p.
- Demir, İ.,** 2009, Radyoişaretli Bevacizumab'ın Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü.
- Dong, X., Mattingly, C. A., Tseng, M., Cho, M., Adams, V. R. and Mumper, R. J.,** 2009, Development of new lipid-based paclitaxel nanoparticles using sequential simplex optimization, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 72, 9-17pp.
- Eisenhauer, E. A. and Vermorken, J. B.,** 1998, The taxoids, *Drugs*, 55(1), 5-30pp.
- Ekambaram, P., Sathali, A. A. H. and Priyanka, K.,** 2011, Solid Lipid Nanoparticles: A review, *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(1), 80-102pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Enrique, M. A., Mariana, O. R., Mirshojaei, S. F. and Ahmadi, A.** 2015, Multifunctional radiolabeled nanoparticles: strategies and novel classification of radiopharmaceuticals for cancer treatment, *Journal of drug targeting*, 23(3), 191-201pp.
- Esposito, E., Boschi, A., Ravani, L., Cortesi, R., Drechsler, M., Mariani, P. and Giganti, M.** 2015, Biodistribution of nanostructured lipid carriers: A tomographic study, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 89, 145-156pp.
- Farokhzad, O. C. and Langer, R.** 2009, Impact of nanotechnology on drug delivery, *ACS nano*, 3(1), 16-20pp.
- Feng, L. and Mumper, R. J.** 2013, A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery, *Cancer letters*, 334(2), 157-175pp.
- Fitzpatrick, F. A. and Wheeler, R.** 2003, The immunopharmacology of paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), and related agents, *International Immunopharmacology*, 3, 1699-1714pp.
- Forsyth, O. E.** 1988, Quality Assurance of Technetium-99m Radiopharmaceuticals. In *The SA Society of Nuclear Medicine Third Congress*, 33p.
- Gao T., Li Q. and Wang T.** 2005, Sonochemical Synthesis, Optical Properties, and Electrical Properties of Core/Shell-Type ZnO Nanorod/CdS Nanoparticle Composites, *Chem. Mater.*, 17(4), 887-892pp.
- Goldberg, M., Langer, R. and Jia, X.** 2007, Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 18(3), 241-268pp.
- Guo, W., Jing, H., Yang, W., Guo, Z., Feng, S. and Zhang, X.** 2011, Radiolabeling of folic acid-modified chitosan with ^{99m}Tc as potential agents for folate-receptor-mediated targeting, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 21, 6446-6450pp.
- Güney, G.** 2011, Askorbik asit yüklü katı lipid nanopartiküllerin kanser hücreleri üzerindeki apoptotik etkileri, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İleri Bilimler Anabilim Dalı, 118s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Han, F., Li, S., Yin, R., Liu, H. and Xu, L.** 2008, Effect of surfactants on the formation and characterization of a new type of colloidal drug delivery system: nanostructured lipid carriers, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 315(1), 210-216pp.
- Hayes, T. R., Kasten, B. B., Barnes, C. L. and Benny, P. D.,** 2014, Rhenium and technetium bi- and tricarbonyl complexes in a new strategy for biomolecule incorporation using click chemistry, *Dalton Transactions*, 43, 6998-7001pp.
- Hilgenbrink, A.R. and Low, P.S.,** 2005, Folate Receptor-Mediated Drug Targeting: From Therapeutics to Diagnostics, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(10), 2135-2146pp.
- Hu F. Q., Yuan H., Zhang H. H. and Fang M.,** 2002, Preparation of solid lipid nanoparticles with clobetasol propionate by a novel solvent diffusion method in aqueous system and physicochemical characterization, *International Journal of Pharmaceutics*, 239, 121 – 128pp.
- Hu F. Q., Jiang S. P., Du Y. Z., Yuan H., Ye Y. Q. and Zeng S.,** 2005, Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 45, 167-173pp.
- Hulla J. E., Sahu S. C. and Hayes A. W.,** 2015, Nanotechnology: History and future, *Human and Experimental Toxicology*, 34(12), 1318-1321pp.
- IAEA,** 2008, Technetium-99m Radiopharmaceuticals: Manufacture of Kits, Technical Reports Series No: 466., Vienna.
- İçhedef, Ç.,** 2010, Guanin'in $M(CO)_3^+$ ($M=^{99m}Tc$ ve Re) korları ile bağlı manyetik nanoparçacıklarının oluşturulması ve radyoışaretleli kompleksin biyoaktivitesinin incelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, 103s.
- İçhedef, Ç., Teksöz, S., Şenocak, K., Uçar, E., and Kılçar, A.,** 2011, Preparation and bioevaluation of ^{99m}Tc -carbonyl complex of guanine, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 289(3), 845-849pp.
- Janib, S. M., Moses, A. S. and MacKay, J. A.** 2010, Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. *Advanced drug delivery reviews*, 62(11), 1052-1063pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Jiménez-Mancilla, N., Ferro-Flores, G., Santos-Cuevas, C., Ocampo-García, B., Luna-Gutiérrez, M., Azorín-Vega, E. and Torres-García, E.,** 2013, Multifunctional targeted therapy system based on ^{99m}Tc/¹⁷⁷Lu-labeled gold nanoparticles-Tat (49–57)-Lys3-bombesin internalized in nuclei of prostate cancer cells. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56(13), 663-671pp.
- Jones, M. C. and Leroux, J. C.,** 1999, Polymeric micelles—a new generation of colloidal drug carriers, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 48(2), 101-111pp.
- Kakkar, V., Mishra, A. K., Chuttani, K. and Kaur, I. P.,** 2013, Proof of concept studies to confirm the delivery of curcumin loaded solid lipid nanoparticles (C-SLNs) to brain, *International journal of pharmaceutics*, 448(2), 354-359pp.
- Kamble, V.A., Jagdale, D.M. and Kadam, V.J.,** 2010, Solid Lipid Nanoparticles as Drug Delivery System, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(3), 1-9pp.
- Khalil, M. M. (Ed.)**. 2010, *Basic sciences of nuclear medicine*. Springer Science & Business Media.
- Khan, A. A., Mudassir, J., Mohtar, N. and Darwis, Y.,** 2013, Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations, *Int. J. Nanomedicine*, 8(1), 2733-2744pp.
- Kilbourn, M. R., and Zalutsky, M. R.,** 1985, Research and clinical potential of receptor based radiopharmaceuticals. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 26(6), 655-662pp.
- Kollipara, S., Bende, G., Movva, S. and Saha, R.** 2010, Application of rotatable central composite design in the preparation and optimization of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for controlled delivery of paclitaxel, *Drug development and industrial pharmacy*, 36(11), 1377-1387pp.
- Kothari, D. D., Aathawale R. B. and Dixit, K. R.,** 2012, Surface Modification Techniques of Nanoparticulate Drug Delivery Systems for Treatment of Cancer, *International Journal of Pharmaceutical Frontier Research*, 2(4), 35-44pp.
- Kreuter, J.,** 1994, *Colloidal drug delivery systems*, New York, USA, Marcel Dekker Inc.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Kwon, G. S. and Okano, T.**, 1996, Polymeric micelles as new drug carriers, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 21(2), 107-116pp.
- Leamon, C. P. and Low, P. S.**, 2005, Receptor-mediated drug delivery, 167-187, *Drug delivery: Principles and applications*, Binghe W., Teruna S. and Richard A. S. (Eds.), New Jersey, Wiley Interscience.
- Lee, D. E., Koo, H., Sun, I. C., Ryu, J. H., Kim, K. and Kwon, I. C.** 2012, Multifunctional nanoparticles for multimodal imaging and theragnosis. *Chemical Society Reviews*, 41(7), 2656-2672pp.
- Liebmann, J. E., Cook, J. A., Lipschultz, C., Teague, D., Fisher, J. and Mitchell, J. B.**, 1993, Cytotoxic studies of paclitaxel (Taxol®) in human tumour cell lines, *Br. J. Cancer*, 68, 1104-1109pp.
- Low, P. S., Henne, W. A. and Doorneweerd, D. D.**, 2007, Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases, *Accounts of chemical research*, 41(1), 120-129pp.
- Martins, S., Costa-Lima, S., Carneiro, T., Cordeiro-da-Silva, A., Souto, E.B. and Ferreira, D.C.**, 2012, Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An investigation of the uptake mechanism and pathway”, *International Journal of Pharmaceutics*, 430:216-227pp.
- Matsumura, Y. and Maeda, H.** 1986, A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs, *Cancer research*, 46(12 Part 1), 6387-6392pp.
- McNeil, S. E.** (Ed.), 2011, *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*, Vol. 697, Humana Press, 269p.
- Mirshojaei, S. F., Ahmadi, A., Morales-Avila, E., Ortiz-Reynoso, M. and Reyes-Perez, H.** 2016. Radiolabelled nanoparticles: novel classification of radiopharmaceuticals for molecular imaging of cancer. *Journal of drug targeting*, 24(2), 91-101pp.
- Mody, V.V.** 2011, *Nanoparticles in Nuclear Imaging*, *Internet Journal of Medical Update-EJOURNAL*, 6(1).
- Mukherjee, S.**, 2009, *Effect of Hydration and Macromolecular Crowding on Peptide Conformation, Aggregation and Folding Kinetics*, PhD Thesis, University of Pennsylvania, 197p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Nguyen, A.**, 2007, Synthesis and biological assessment of organometallic tamoxifen derivatives for the diagnosis and the treatment of breast cancer, PhD Thesis, Piere and Marie Curie University-Paris, 155p.
- Numanoğlu U. ve Tarımcı N.**, 2006, Katı Lipid Nanopartiküllerin (SLNTM) Özellikleri, Farmasötik ve Kozmetik Alandaki Uygulamaları, Ankara Ecz. Fak. Derg., 35(3), 211-235s.
- Ocak, M.**, 2015, PET Radyofarmasötikleri, Bulletin of Thoracic Surgery/Toraks Cerrahisi Bülteni, 6(2).
- Patel, S., Chavhan, S., Soni, H., Babbar, A. K., Mathur, R., Mishra, A. K. and Sawant, K.**, 2011, Brain targeting of risperidone-loaded solid lipid nanoparticles by intranasal route, Journal of drug targeting, 19(6), 468-474pp.
- Polyák, A., Hajdu, I., Bodnár, M., Trencsényi, G., Pöstényi, Z., Haász, V. and Borbély, J.**, 2013, ^{99m}Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities, International journal of pharmaceutics, 449(1), 10-17pp.
- Powsner, R.A. and Powsner, E.R.**, 2006, Essential Nuclear Medicine Physics, Blackwell Publishing, 85-113pp.
- Pirollo, K.F. and Chang, E.H.**, 2008, Does a targeting ligand influence nanoparticle tumor localization or uptake?, Trends in Biotechnology, 26(10), 552-558pp.
- Psimadas, D., Bouziotis, P., Georgoulas, P., Valotassiou, V., Tsoதாக, T. and Loudos, G.**, 2013, Radiolabeling approaches of nanoparticles with ^{99m}Tc, Contrast media & molecular imaging, 8(4), 333-339.
- Quintana, A., Raczka, E., Piehler, L., Lee, I., Myc, A., Majoros, I. and Baker Jr, J. R.**, 2002, Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor, Pharmaceutical research, 19(9), 1310-1316pp.
- Reddy L. H., Sharma R. K., Chuttani K., Mishra A. K. and Murthy R. S. R.**, 2005, Influence of administration route on tumor uptake and biodistribution of etoposide loaded solid lipid nanoparticles in Dalton's lymphoma tumor bearing mice, Journal of Controlled Release, 105, 185-198pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Rossin, R., Pan, D., Qi, K., Turner, J. L., Sun, X., Wooley, K. L. and Welch, M. J.,** 2005, ⁶⁴Cu-labeled folate-conjugated shell cross-linked nanoparticles for tumor imaging and radiotherapy: synthesis, radiolabeling, and biologic evaluation, *Journal of Nuclear Medicine*, 46(7), 1210-1218pp.
- Saha, G.B.,** 1998, *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 4rd ed., Springer Verlag, NewYork; 79-172pp.
- Saleh, T. B.** 2011, Technetium-99m Radiopharmaceuticals, In *Basic Sciences of Nuclear Medicine*, Springer Berlin Heidelberg, 41-53pp.
- Şenocak, K., Teksöz, S., İçhedef, Ç., and Uçar, E.,** 2015, Synthesis and Biological Evaluation of Bisphosphonate Compound Labeled with ^{99m}Tc(CO)₃⁺, *Chemical biology & drug design*, 85(3), 369-376pp.
- Sudimack, J. and Lee, R. J.** 2000, Targeted drug delivery via the folate receptor, *Advanced drug delivery reviews*, 41(2), 147-162pp.
- Theobald, A. E.,** 1989, *Radiopharmaceuticals using radioactive compounds in pharmaceuticals and Medicine*, Ellis Horwood Edition.
- Tiwari, R. and Pathak, K.,** 2011, Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: Comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake, *International Journal of Pharmaceutics*, 415, 232-243pp.
- TÜBİTAK MAM,** 2010, *Nanoteknoloji ve Nano-Malzeme Süreçleri*, Gebze, 217s.
- Videira M.A., Botelho M.F., Santos A.C., Gouveia L.F., de Lima J.J.P. and Almeida A.J.,** 2002, Lymphatic Uptake of Pulmonary Delivered Radiolabelled Solid Lipid Nanoparticles, *Journal of Drug Targeting*, 10(8), 607-613pp.
- Volkert, W. A., Goeckeler, W. F., Ehrhardt, G. J. and Ketring, A. R.,** 1991, Therapeutic radionuclides: production and decay property considerations. *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 32(1), 174-185pp.
- Waibel, R., Alberto, R., Willuda, J., Finnern, R., Schibli, R., Stichelberger, A. and Schubiger, P. A.,** 1999, Stable one-step technetium-99m labeling of His-tagged recombinant proteins with a novel Tc (I)-carbonyl complex, *Nature biotechnology*, 17(9), 897-901pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Wan, F., You, J., Sun, Y., Zhang, X.G., Cui, F.D., Du, Y.Z., Yuan, H. and Hu, F.Q.,** 2008, Studies on PEG-modified SLNs loading vinorelbine bitartrate (I): Preparation and evaluation in vitro, *International Journal of Pharmaceuticals*, 359, 104-110pp.
- Weitman, S. D., Lark, R. H., Coney, L. R., Fort, D. W., Frasca, V., Zurawski, V. R. and Kamen, B. A.** 1992, Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues, *Cancer research*, 52(12), 3396-3401pp.
- Whatmore, R. W.** 2006, Nanotechnology—what is it? Should we be worried?, *Occupational Medicine*, 56(5), 295-299pp.
- Wissing S. A., Kayser O. and Müller R. H.,** 2004, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56, 1257-1272pp.
- Wong, H. L., Bendayan, R., Rauth, A. M., Li, Y. and Wu, X. Y.,** 2007, Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 491-504pp.
- Wu, M., Gunning, W. and Ratnam, M.,** 1999, Expression of folate receptor type α in relation to cell type, malignancy, and differentiation in ovary, uterus, and cervix, *Cancer epidemiology biomarkers & prevention*, 8(9), 775-782pp.
- Xiang G., Wu J., Lu Y., Liu Z., and Lee R. J.,** 2008, Synthesis and evaluation of a novel ligand for folate-mediated targeting liposomes, *International journal of Pharmaceuticals*, 356, 29-36pp.
- Xie X. L., Mai Y. W. and Zhou X. P.,** 2005, Dispersion and alignment of carbon nanotubes in polymer matrix: A review, *Materials Science and Engineering R*, 49, 89-112pp.
- Xing Y., Zhao J., Conti P. S. and Chen K.,** 2014, Radiolabeled Nanoparticles for Multimodality Tumor Imaging, *Theranostics*, 4(3), 290p.
- Xu, X., Chen, L., Gu, W., Gao, Y., Lin, L., Zhang, Z., Xi, Y. and Li, Y.,** 2009, The performance of docetaxel-loaded solid lipid nanoparticles targeted to hepatocellular carcinoma, *Biomaterials*, 30, 226-232pp.
- Unak, G., Ozkaya, F., Medine, E. I., Kozgus, O., Sakarya, S., Bekis, R. ve Timur, S.** 2012, Gold nanoparticle probes: design and in vitro applications in cancer cell culture, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 90, 217-226pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Ünak, P.**, 2015, SPECT radyofarmasötikleri; radyoizotop üretimi, radyoaktif komponent, radyonüklidlerin karakteristikleri ve seçimleri, Ege Üniversitesi Uygulamalı Radyofarmasi Kursu Ders Notları.
- Yang, X. Y., Li, Y. X., Li, M., Zhang, L., Feng, L. X. and Zhang, N.** 2013, Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer, *Cancer letters*, 334(2), 338-345pp.
- Yerlikaya, F.**, 2013, Paklitaksel nanopartiküllerin kalite tasarımı ile geliştirilmesi ve değerlendirilmesi, Farmasötik teknoloji programı doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 92s.
- Yuan, H., Miao, J., Du, Y. Z., You, J., Hu, F. Q. and Zeng, S.**, 2008, Cellular uptake of solid lipid nanoparticles and cytotoxicity of encapsulated paclitaxel in A549 cancer cells, *International journal of pharmaceutics*, 348(1), 137-145pp.
- Zhao, P., Wang, H., Yu, M., Liao, Z., Wang, X., Zhang, F. and Wang, H.**, 2012, Paclitaxel loaded folic acid targeted nanoparticles of mixed lipid-shell and polymer-core: in vitro and in vivo evaluation, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 81(2), 248-256pp.
- Zhao, X. B. and Lee, R. J.**, 2004, Tumor-selective targeted delivery of genes and antisense oligodeoxyribonucleotides via the folate receptor, *Advanced drug delivery reviews*, 56(8), 1193-1204pp.
- EANM** “The Radiopharmacy A Technologist’s Guide”
http://www.eanm.org/publications/tech_guidelines/docs/tech_radiopharmacy.pdf
(Son erişim tarihi: 13.1.2016)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Eser UÇAR

Doğumyeri : ADANA

Doğum Yılı : 20.01.1982

Öğrenim Durumu:

Lisans Gazi Üniversitesi Fen Bilgisi Öğretmenliği

Yüksek Lisans Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Doktora Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı