

**EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**(YÜKSEK LİSANS TEZİ)**

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

**Kadir ARI**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap TEKSÖZ**

**Nükleer Bilimler Anabilim Dalı**

**Bilim Dalı Kodu: 662.02.01**

**Sunuş Tarihi: 06.05.2015**

**Bornova-İZMİR**

**2015**



Kadir ARI tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan “Radyoişaretli Temozolomide 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 06/05/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Perihan ÜNAK  
Raportör Üye : Doç. Dr. Serap TEKSÖZ  
Üye : Doç. Dr. Uğur AVCIBAŐI



# EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

## ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Radyoişaretli Temozolomide 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.

İmzası

Adı-Soyadı

Kadir ARI



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

ARI, Kadir

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serap TEKSÖZ

Mayıs 2015, 48 sayfa

Günümüzde,  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoışaretleme bileşikler hedef organ görüntülenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, bir antikanser ajan olan temozolomide (TMZ) katı lipid nanoparçacıklara (SLN) yüklenerek  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile radyoışaretleme sağlanmıştır.

Dinamik Işık Saçılımı (DLS), Zeta Potansiyeli ölçümü (ZP), Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) yöntemleri ile sentezlenen TMZ-SLN nanoparçacıklarının morfolojik özellikleri, parçacık boyutu ve zeta potansiyeli belirlenmiştir. DLS analizinden parçacık boyutunun  $120\pm 20$  nm, zeta potansiyeli değerinin  $-30,4$  mV olduğu, SEM görüntülerinden ise parçacıkların  $70-200$  nm arasında değişen boyutlarda ve küresel morfolojide oldukları anlaşılmaktadır. Katı lipid nanoparçacıkların ilaç yükleme kapasitesinin  $\% 49,25$  olduğu saptanmıştır.

Yapılan kalite kontrol sonucunda  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli temozolomide ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ) için  $\%99,3\pm 0,35$  radyoışaretleme verimi, temozolomide yüklü katı lipid nanoparçacıklarda ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN) ise  $\% 90,04\pm 0,3$  radyoışaretleme verimi elde edilmiştir.

Bu çalışmada katı lipid nanoparçacıkların hücre düzeyinde etkinlikleri U87 MG (insan glioblastoma-astrocytoma) ve Daoy (insan medulloblastoma) hücre hatları üzerinde incelenmiştir. TMZ-SLN' lerin hücreler üzerinde sitotoksik etki

göstermediği ve TMZ' nin U87 MG ve Daoy hücre hatları üzerinde 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerleri sırasıyla 1241 µM ve 501 µM olarak hesaplanmıştır. Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi incelendiğinde en yüksek bağlanma veriminin [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]-TMZ-SLN için U87 MG hücre hattı üzerinde 240. dakikada % 33,36±3,77 değerinde olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, antikanser bir ilaç yüklü radyoşaretli katı lipid nanoparçacıklar oluşturularak, biyolojik davranışlarının *in vitro* olarak izlenmesi sağlanmıştır.

Anahtar sözcükler: Temozolomide, katı lipid nanoparçacık, [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> koru, radyoşaretleme, *in vitro*



**ABSTRACT****RADIOLABELING FORMULATION OF TEMOZOLOMIDE  
LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES AND  
INVESTIGATION OF RADIOPHARMACEUTICAL  
POTENTIAL**

ARI, Kadir

MSc, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Doc. Dr. Serap TEKSOZ

May 2015, 48 pages

Recently,  $^{99m}\text{Tc}$  labeled compounds are extensively used for imaging of target organ. In this study, an anticancer agent temozolomide loaded solid lipid nanoparticles synthesized and they radiolabeled with  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  core.

TMZ-SLNs morphological characteristics, particle size and zeta potential were determined by Dynamic Light Scattering (DLS), Zeta Potential Measurement (ZP) and Scanning Electron Microscopy (SEM) methods. The particle size by DLS analysis is  $120\pm 20$  nm and the value of the zeta potential is -30,4 mV and the particle size using SEM images is observed in varying sizes between 80-200 nm in spherical morphology. The entrapment efficiency of the solid lipid nanoparticles is determined as 49.25%.

After the quality control studies, the radiolabeling efficiency of  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  core radiolabeled temozolomide ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ) was  $99.3\%\pm 0.35$  and the radiolabeling efficiency of temozolomide loaded solid lipid nanoparticles ( $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN) was  $90.04\%\pm 0.3$ .

In this study, activities of solid lipid nanoparticles on cells is investigated on U87 MG (human glioblastoma-astrocytoma) and Daoy (human medulloblastoma) cell lines.  $\text{IC}_{50}$  values in 48 hours of TMZ is determined on U87 MG and Daoy

cell lines as 1241  $\mu\text{m}$  and 501  $\mu\text{m}$  respectively. The study of the changing of the binding activity by time on cells, the greatest binding efficiency was determined in 240 minutes for  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]\text{-TMZ-SLN}$  as  $33,36 \%\pm 3.77$ .

In conclusion, observing biological behavior of solid lipid nanoparticles of *in vitro* studies is obtained by forming radiolabeled an anticancer drug loaded solid lipid nanoparticles.

Keywords: Temozolomide, Solid Lipid Nanoparticles,  $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  core, radiolabeling, *in vitro*



## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince derin bilgi ve deneyimleri ile olumlu katkılar sağlayan her türlü destek ve yardımlarıyla yanımda olan tez hocam Sayın Doç. Dr. Serap TEKSÖZ' e, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. Perihan Ünak' a ve

enstitümüzün laboratuvarlarında her türlü çalışma imkanını sağlayan Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Turgay KARALI' ya,

çalışmamın başından beri bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan Doç. Dr. Çiğdem İÇHEDEF' e, Öğr. Gör. Dr. Ayfer YURT KILÇAR' a ve Eser UÇAR' a ve hücre kültürü çalışmaları boyunca bana yardımcı olan Doç. Dr. Emin İlker MEDİNE' ye,

çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalındaki araştırma görevlilerine ve öğrenci arkadaşlarıma,

yaşamım ve eğitim hayatım boyunca her an desteklerini hissettiğim ve bana inanan ve güvenen, emeklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili AİLEME,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

**Bu tez 113S369 No'lu TÜBİTAK projesi kapsamında desteklenmiştir.**



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	vii
ABSTRACT .....	xix
TEŞEKKÜR .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xvi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xviii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xix
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1 Radyofarmasötikler .....	4
2.2 Temozolomide .....	5
2.3 Nanoparçacık Teknolojisi .....	6
2.3.1 Katı lipid nanoparçacıklar .....	7
2.4 Teknesyum-99m( <sup>99m</sup> Tc) .....	10
2.5 Teknesyum Radyofarmasötiklerinde Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri ..	11
2.5.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC) .....	11
2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) .....	12
2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu .....	13

2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM) .....	13
--	----

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.6.2 Zeta potansiyeli cihazı .....	14
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	15
3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar .....	15
3.1.1 Kullanılan kimyasallar .....	15
3.1.2 Kullanılan cihazlar .....	16
3.2 Temozolomide Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların Sentezlenmesi .....	17
3.3 TMZ-SLN' lerin ilaç içeriğinin tayin edilmesi .....	18
3.4 Parçacık Karakterizasyonu .....	18
3.4.1 SEM analizi .....	18
3.4.2 Zeta potansiyeli ve boyut analizi .....	19
3.5 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> Korunun Hazırlanması ve Radyoişaretlenmesi .....	19
3.5.1 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> Korunun Hazırlanması .....	19
3.5.2 Temozolomide' in [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> kuru ile işaretlenmesi .....	19
3.5.3 Katı lipid nanoparçacıkların [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> kuru ile işaretlenmesi .....	20
3.6 Kalite Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler .....	20
3.6.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) çalışmaları .....	20
3.6.2 Yüksek performanslı sıvı radyo kromatografi (HPLRC) yöntemi .....	21

3.7 İn Vitro Çalışmaları .....	21
--------------------------------	----

## İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.7.1 Hücre kültürü çalışmaları .....	21
3.7.2 Sitotoksisite çalışması .....	22
3.7.3 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi .....	23
4 BULGULAR VE TARTIŞMA .....	25
4.1 Kalite Kontrol Sonuçları .....	25
4.1.1 HPLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar .....	25
4.1.2 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar .....	26
4.2 Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyonu .....	32
4.2.1 SEM analizi sonuçları .....	32
4.2.2 Zeta potansiyeli ve boyut analizi .....	33
4.3 TMZ-SLN' lere Yüklene İlaç Miktarı Sonuçları .....	35
4.4 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları .....	36
4.4.1 Sitotoksisite sonuçları .....	36
4.4.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi sonuçları.....	38
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	41
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	42

ÖZGEÇMİŞ .....	48
----------------	----

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Temozolomide' in kimyasal gelişimi.....	6
2.2 Lipozom, polimerik nanoparçacık, altın nanoparçacık ve SLN' lerin yapısı ....	8
2.3 SEM cihazının şematik yapısı.....	13
3.1 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> korunun oluşturulması şeması .....	19
3.2 U87-MG ve Daoy hücreleri üzerinde sitotoksisite çalışmaları .....	23
4.1 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ve [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ]-TMZ' ye ait HPLRC kromatogramı.....	25
4.2 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ve [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ]-TMZ-SLN' ye ait HPLRC kromatogramı.....	25
4.3 SF banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> koruna ait kromatogram.....	27
4.4 SF banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ' ye ait kromatogram .....	27
4.5 Metanol: HCl banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> koruna ait kromatogram .....	28
4.6 Metanol: HCl banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ' ye ait kromatogram .....	28
4.7 PAS banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> koruna ait kromatogram .....	30
4.8 PAS banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ-SLN' ye ait kromatogram .....	30
4.9 Metanol: su banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> koruna ait kromatogram .....	31
4.10 Metanol: su banyosundaki [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ-SLN' ye ait kromatogram .	31
4.11 TMZ-SLN' lerin 20.000x' lik büyütmedeki SEM görüntüsü .....	32
4.12 TMZ-SLN' lerin 40.000x' lik büyütmedeki SEM görüntüleri .....	33



**ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)**

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.13 TMZ-SLN için zeta potansiyeli grafiği .....	34
4.14 TMZ-SLN' lerin boyut grafiği .....	35
4.15 TMZ' ye ait kalibrasyon eğrisi .....	36
4.16 U87-MG ve Daoy hücre hatları üzerinde TMZ ve TMZ-SLN' nin farklı konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri .....	37
4.17 U87-MG ve Daoy hücre hattı için [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> koru ile radyoişaretli TMZ ve TMZ-SLN' nin % bağlanma grafiği .....	40

**ÇİZELGELER DİZİNİ**

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.1 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ve [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ için Rf değerleri .....	26
4.2 [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> ve [ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup> -TMZ-SLN için Rf değerleri.....	29
4.3 TMZ' ye ait IC50 değerleri .....	37
4.4 U87-MG hücre hattına ait % bağlanma değerleri .....	39
4.5 Daoy hücre hattına ait % bağlanma değerleri .....	39

**SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

TMZ	Temozolomide
SLN	Katı Lipid Nanoparçacık
TMZ-SLN	Temozolomide yüklü Katı Lipid Nanoparçacık
HCl	Hidroklorik Asit
ACN	Asetonitril
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi
PBS	Fosfat tampon solusyonu (Phosphate Buffer Solution)
R <sub>f</sub>	İlerleme Mesafesi (Relative Front)
R <sub>t</sub>	Alıkonma Zamanı (Retention Time)
SF	Serum Fizyolojik
[ <sup>99m</sup> TcO <sub>4</sub> ] <sup>-</sup>	Teknesyum Perteknatat
[ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>	Teknesyum(I) Trikarbonil Kuru
<sup>99m</sup> Tc	Teknesyum-99m
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
Ci	Curie



## 1.GİRİŞ

Son yıllarda, kanser tanı ve tedavisinde en umut verici gelişme nanoteknoloji alanında olmuştur. Sağlık alanında 1970 yılından bu yana kontrollü ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Katı lipid nanoparçacıklar, manyetik nanoparçacıklar ve altın nanoparçacıklar gibi ilaç hedefleme sistemleri oluşturulmuştur. Bu sistemler ile nanoparçacıklara yüklenen ilaç, istenilen doku veya hücre grubuna gönderilir. Böylelikle uygun dozdaki ilacın istenilen bölgeye iletimi sırasında sağlıklı hücreler yan etkilerden korunmuş olmaktadır.

1990' lı yılların başlarında boyutları 1-1000 nm arası değişen farklı tipteki kolloidal ilaç taşıyıcı sistemler olan katı lipid nanoparçacıklar(SLN) önem kazanmaya başlamıştır. Katı lipid nanoparçacıklar, liposomlar ve polimerik nanoparçacıkların sahip olduğu dezavantajlardan kaçınmak için üretilmiş, etkili, toksik olmayan ve değişken parçacıklardır. SLN' ler, yağ asitleri mono, di ve trigliseridler gibi fizyolojik lipidleri içerdikleri için yüksek seviyede biyouyumluluk gösterirler. Dokulara etkin madde hedeflemesi ve kontrollü ilaç salınımı gibi avantajları sebebiyle SLN' ler istenilen bölgeye ilaç taşınımında sıkça kullanılmaktadır. Bu nedenle sitotoksik ilaç taşınımında ön plana çıkmaktadırlar ve bu ilaçların varolan yan etkilerini en aza indirerek hedefe yönelik çalışma için uygundur (Mehnert et al., 2001; Andrezzi et al., 2011).

Sitotoksik ilaçlar tümörlü hücreler üzerinde sitotoksik etki gösteren ya da çoğalmalarını engelleyen antikanser ajanlardır. Bu ilaçlar bağışıklığı baskı altına alırlar ve kanser tedavisinde sıkça kullanılırlar. Tablet şeklinde veya enjeksiyon yoluyla uygulanabilirler. Sitotoksik ilaçlar, kanser hücreleri kadar sağlıklı hücreleride etkiledikleri için kullanımı sırasında zararlı yan etkileri de bulunmaktadır. Bu yan etkiler sonucu kemik iliği zarar görebilir ve kansızlık görülebilir (Cooper et al., 1986; Hanahan et al., 2000).

Kanser tedavisinde kullanılan sitotoksik ilaçlar sahip oldukları toksik etkiler nedeniyle kolloidal yapıda ilaç taşıyıcı sistemlerin üretilmesinin itici gücü olmuştur. Bu nedenle, teşhis ve tedavi için sürekli olarak yeni yöntemler geliştirilmektedir (Rohit and Pal, 2013).

Teknesyum-99m ( $^{99m}\text{Tc}$ ) uygun gama enerjisi ve kısa yarıömrü sebebiyle kanser teşhisinde yaygın olarak kullanılan bir radyonükliddir.  $^{99m}\text{Tc}$  bu avantajları sebebiyle diğer moleküllere bağlanarak tümörlü hücrelerin görüntülenmesine de olanak sağlamaktadır (Dias et al., 2005).  $^{99m}\text{Tc(I)}$ -trikarbonil koru,  $^{99m}\text{Tc(V)/Re(V)}$  kompleksleri ile karşılaştırıldığında kinetik olarak yüksek kararlılığa sahip olmaları ve biyolojik aktivitenin korunması nedenleriyle tercih edilmektedir (Alberto et al., 1999).

Antikanser ilaç taşımada ön plana çıkan katı lipid nanoparçacıkların farmokokinetiğinin incelenmesi, teşhis ve tedavi amacıyla çeşitli radyonüklidler ile radyoişaretlenmesi son yıllarda önem kazanmaktadır.

Reddy ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir antikanser ajan olan etoposide yüklü SLN' ler sentezlenerek yüksek verimle  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoişaretlenmiştir. Biyodağılım çalışması sonucu etoposide yüklü SLN' lerin beyin ve kemikteki tutulumun serbest haldeki etoposide tutulumundan daha yüksek seviyelerde olduğu görülmüştür (Reddy et al., 2005). Banerjee ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada paklitaksel yüklü SLN' ler oluşturularak % 95 verimle  $^{99m}\text{Tc}$  ile radyoişaretleme çalışması yapılmıştır. *İn vivo* ve *in vitro* çalışmalar sonucu paklitaksel yüklü SLN' lerin beyindeki tutulumunun paklitaksele göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir (Banerjee et al., 2014).

Enstitümüzde radyonüklitlerle işaretli çeşitli nanoparçacıklar oluşturularak bu yapıların biyolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Manyetik nanoparçacıklarla yapılan bir çalışmada urasil ve urasil glukuronid türevlerine İyot-125 ve İyot-131 radyonüklitleriyle işaretlenerek bileşiklerin tümör hücrelerinin teşhis ve tedavisinde hedefe yönelik olarak kullanılabilirliği araştırılmıştır (Medine, 2008).

Bir başka çalışmada MCF-7 hücreleri üzerinde Tc(I) koru ile işaretli D-Penisilamin manyetik nanoparçacıklarının *in vitro* olarak biyolojik davranışları değerlendirilmiştir (Özyüncü, 2009).

İçhedef ve ark. tarafından bir DNA pürin bazı olan guaninin manyetik nanoparçacıkları sentezlenerek  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru ile radyoişaretlenmesi

sağlanmış ve biyolojik davranışları *in vivo* ve *in vitro* olarak değerlendirilmiştir (İçHedef ve ark., 2012).

Bu çalışmada bir antikanser ilaç olan temozolomide yüklenmiş katı lipid nanoparçacıkların sentezlenerek  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru ile radyoişaretlenmesi sağlanmıştır. Temozolomide yüklü radyoişaretli katı lipid nanoparçacıkların biyolojik davranışlarının hücre düzeyinde incelenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1 Radyofarmasötikler

Radyofarmasötikler, nükleer tıpta hastalıkların teşhis ve tedavisinde hedefe yönelik radyoizleyici olarak kullanılan ve farmakolojik etkisi bulunmayan bileşiklerdir. Radyofarmasötikler, radyonüklid ve farmasötik olmak üzere iki farklı bileşenden meydana gelir ve hastanın en düşük radyasyon dozunu alacağı şekilde tasarlanır.

Radyonüklid, yayınladığı radyasyonla vücut dışından görüntülenebilen veya hedeflendiği organı tedavi eden bileşendir. Farmasötik ise radyonüklidi vücut içerisinde hedeflenen organ, doku veya bölgeye yönlendiren etken maddedir. Bir radyofarmasötik üretmek için ilk olarak bir doku veya organa spesifik farmasötik seçilerek, amaca uygun olarak seçilen farmasötiğe yarı ömrü birkaç saniyeden birkaç güne kadar değişen bir radyonüklid bağlanır. Bu işleme radyoışartleme denir. Radyofarmasötiklerin büyük bir çoğunluğu teşhis amacıyla kullanılmaktadır. Radyofarmasötik hastaya verildikten sonra radyasyon cinsine uygun bir dedektör yardımıyla ölçülür (De vos et al., 2005).

Radyofarmasötikler iki ana sınıfa ayrılır: Bunlardan birincisi, kendi kimyasal ve fiziksel özelliğine göre biyodağılım gösteren radyofarmasötiklerdir. İkincisi ise üzerine bağlanan reseptöre göre biyodağılım gösteren radyofarmasötiklerdir. Bu sınıflandırmadan ikincisi hedefe yönelik radyofarmasötikler olarak bilinmektedir (Liu and Edwards, 1999).

Hastanın en düşük radyasyon dozunu alması için teşhis amaçlı radyofarmasötiklerin sahip olması gereken özellikler;

- 1- Kolay bulunabilmeli
- 2- Kısa etkin yarı ömrü olmalı
- 3- Parçacık radyasyonu yaymamalı
- 4-  $\gamma$  enerjisi 100-250 keV arasında olmalı
- 5- Yüksek lokalizasyon oranı
- 6- Metabolik uygunluk
- 7- Hazırlama sırasında ve kullanılırken kimyasal olarak kararlı olmalıdır

(Uçar, 2010).

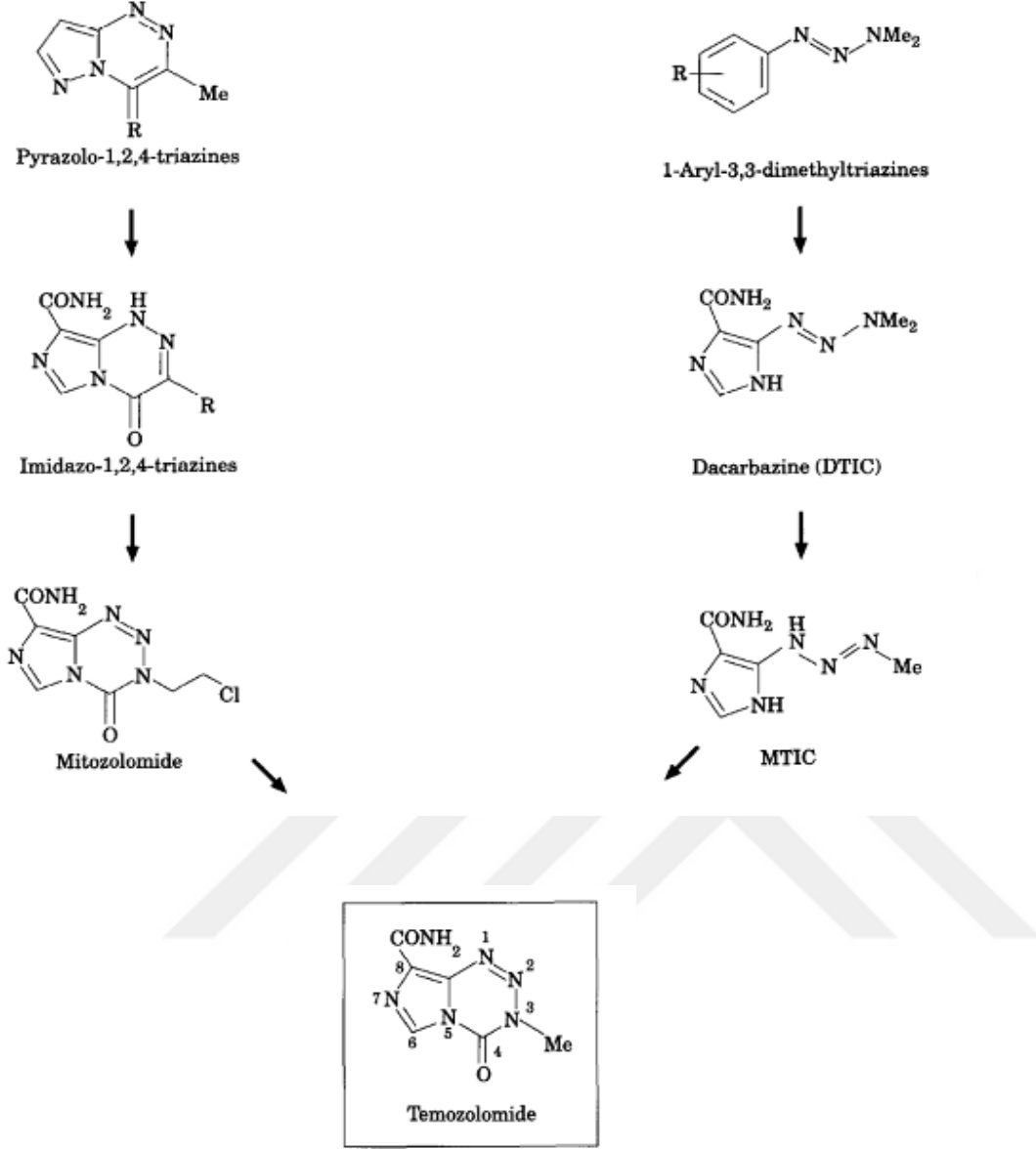


## 2.2 Temozolomide

Bilindiği gibi birçok kanser tipinin tedavisinde sitotoksik ilaçlar kemoterapinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır. Sitotoksik ilaçlar, hızlı bir şekilde büyüyen ve bölünen hücrelere toksik şekilde etki ederek hücre ölümüne neden olan ya da fonksiyonunu durduran maddelerdir (Hanahan et al., 2000).

Temozolomide agresif bir beyin tümör cinsi olan IV. derece astrositom, IV. derece glioblastoma multiform ve cilt kanseri tedavisinde oral yolla alınan sitotoksik bir alkilleyici ajandır. Bu ilaç Cancer Research UK adına Birmingham niversitesi'nde Malcolm Stevens ve arkadaşları tarafından 1978'de geliştirilmiştir. İlk olarak Ağustos 1999'da Amerika'da pazara sunulmuştur. Uygulandığı kanser tipine göre verdiği teröpatik etki umut verici olduğundan 2000 yılından itibaren tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır (Saleem, et al., 2003; Arney, 2013).

Temozolomide, şekil 2.1' de görüldüğü gibi pirazol-1,2,4-triazin ve arildimetiltriazinden başlayarak bugünkü formuna kavuşmuştur (Newlands et al., 1997). Temozolomide terapötik etkisini, DNA' nın yapısında bulunan guanin artıklarındaki N-7 ve O-6 gruplarında oluşturduğu metilleme/alkilleme etkisi ile gösterir. Bu metilleme/alkilleme DNA' da hasar oluşturarak tümörlü hücrenin ölümünü tetikler (Jacinto et al., 2007). Ayrıca, TMZ üzerinde yapılan laboratuvar çalışmaları sonucu bu ilacın farklı tipteki farmakolojik ajanlarla bağlanarak antikanser potansiyelinin artırılması sağlanabilmektedir (Gilbert, 2006).



Şekil 2.1 Temozolomide' in kimyasal gelişimi (Newlands et al., 1997)

### 2.3 Nanoparçacık Teknolojisi

Nanoteknolojinin önemi gün geçtikçe artmakta ve bu teknoloji ile birlikte, atomik boyuttaki materyallerin sahip olduğu farklı özelliklerden yararlanılmaya başlanmıştır. Nanoyapıların tasarımı moleküler seviyedeki materyallerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Tıp, mühendislik, iletişim, kimya, biyoloji ve fizik alanında nanoteknolojiden yararlanılmaktadır.

Nanoteknoloji üzerindeki ilgi 1970 yılında sağlık alanında kontrollü ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesiyle artmıştır (Joeng et al., 1999). Bu amaçla, katı

lipid nanoparçacıklar, manyetik nanoparçacıklar ve altın nanoparçacıklar gibi sistemler oluşturulmuştur. İlaç hedefleme sistemleri ile nanoparçacıklara yüklenen ilaç, istenilen doku veya hücre grubuna gönderilir. İlaç hedefleme için bu sistemlerin kullanılmasındaki amaç, uygun dozdaki ilacın istenilen bölgeye iletimi sırasında sağlıklı hücrelerin yan etkilerden korunmasıdır(Tran et al., 2009).

Kanserin teşhis ve tedavisinde kullanılan yöntemin tümörler üzerindeki öldürücü etkisi yüksek ve uygulama sırasında sağlıklı hücreler üzerindeki zararı en az düzeyde olmalıdır. Hedef hücrelerde absorblanmanın artması ve tedavi sırasında hastaların maruz kaldığı etkilerin en düşük seviyede olması için katı lipid nanoparçacıkların ilaç taşıyıcı sistemler arasında önemli bir yeri vardır (Venkateswarlu et al., 2004).

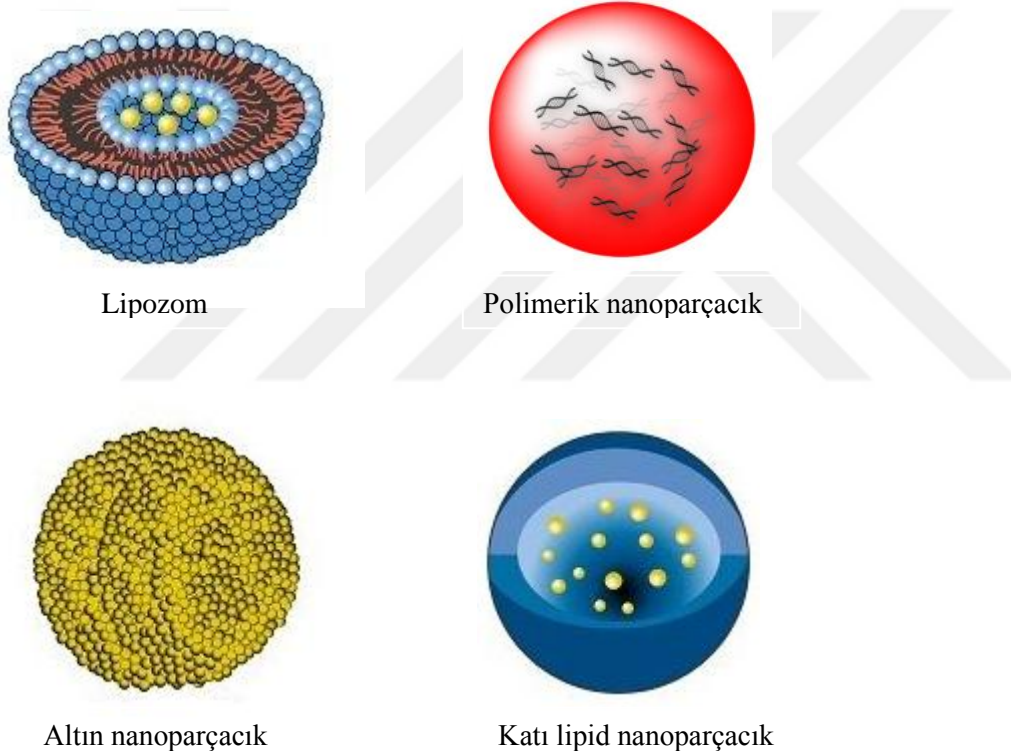
### **2.3.1 Katı lipid nanoparçacıklar**

Katı lipid nanoparçacıklar (SLN), emülsiyonlar, lipozomlar ve polimerik mikropartiküller gibi geleneksel kolloid taşıyıcı sistemlere alternatif olarak 1991 yılında üretilmişlerdir (Shwarz et al., 1994). Katı lipid nanoparçacıklar oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunurlar ve boyutları 50-1000 nm arasında değişir. Düşük toksisite, geliştirilmiş biyoyararlılık ve fiziksel stabilite, kontrollü etkin madde salımı, hazırlama sırasında organik çözücü kullanılmaması ve endüstriyel ölçekte üretim gibi avantajlara sahiptir. Son yapılan çalışmalarda hakim olan genel akım, katı lipid nanoparçacıklara pegilasyon, spesifik hücre hedefleme, pH-duyarlılığı, manyetik nanopartikül veya görüntüleme ajanı yükleme gibi ek özellikler kazandırmak üzerinedir (Shwarz, 1999; Wissing et al., 2004).

SLN' ler en genel tanımıyla emülgatörler, katı lipidler ve sudan oluşmaktadır. Emülgatörler, lipid dispersiyonu stabilize etmek için kullanılırlar. Yüklerine ve molekül ağırlıklarına göre bütün emülgatör tipleri kullanılabilir. Bununla birlikte, emülgatör seçimi uygulama şekline bağlıdır ve parenteral uygulamalar için kullanılan emülgatörler oldukça sınırlıdır. Lesitinler, poloksamerler, etoksillenmiş monogliseridler ve polisorbatar bunlara örnek olarak verilebilir. Lipid yapısı için, yağ asitleri (stearik asit vb.), steroidler

(kolesterol vb.) trigliseridler (tristearin vb.), kısmi gliseridler (Imwitor vb.), ve mumlar (setil palmitat vb.) kullanılmaktadır (Mehnert et al., 2001).

SLN' ler lipozomlar ve diğer katı nanoparçacıkların avantajlarının birleşimini içermektedir. Lipozomlar gibi düşük toksisiteye sahiptirler, organik çözeltileri içermezler ve kolay hazırlanabilirler. Bununla birlikte, diğer tipteki katı nanoparçacıklar gibi kontrollü etkin madde salımı ve kimyasal bozunmaya karşı dayanıklıdırlar (Hu et al., 2002; Bummer, 2004).



Şekil 2.2 Lipozom, polimerik nanoparçacık, altın nanoparçacık ve SLN' lerin yapısı

SLN' lerin avantajları şu şekilde sıralanabilir (Numanoğlu vd., 2006; Cavalli et al., 1997):

- Fizyolojik bileşiklerle hazırlandıklarından sitotoksisiteyi çok düşüktür.
- Koloidal yapıdadırlar.

- Uzun süre stabil kalabilirler ve dondurarak ya da liyofilizasyon yöntemiyle saklanabilirler.
- Otoklav veya gama ışınlarıyla sterilize edilebilirler.
- Üretimleri sırasında organik çözücü kullanılmadığı için son üründe organik kalıntı içermezler.
- Yüzey modifikasyonu sayesinde istenen organ veya dokuya hedefleme yapılabilir.
- Yüklenen ilacın kontrollü ve etkin salınımı sağlanabilir.
- Endüstriyel olarak üretim yapılabilirdiğinden ekonomik açıdan uygundur.

SLN'lerin birçok avantajının yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Bu dezavantajları şu şekilde sıralanabilir:

- Saklama sırasında oluşan polimorfik geçişler sebebiyle yüklenen ilaç salınımı gerçekleşebilir.
- Su içerikleri yüksek seviyededir.
- Düşük ilaç yükleme kapasitesine sahiptirler.
- Ortamda farklı kolloidal yapılar da bulunabilir.

SLN'ler için farklı hazırlanma yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler, 4 ana başlık altında toplanabilir (Wissing et al., 2004; Mehnert et al., 2001; Müller et al., 2000):

1. Yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemi
2. Mikroemülsiyon yöntemi
3. Çözücü emülsifikasyon veya çözücü difüzyon yöntemi
4. Yüksek basınçta homojenizasyon yöntemi

### A. Soğuk homojenizasyon

### B. Sıcak Homojenizasyon

SLN' lerin üretimi sırasında kullanılan yöntemlerden yüksek hızda karıştırma ve ultrasonikasyon yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Hou ve arkadaşları tarafından 2003 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntem için, sentez sırasında sadece yüksek hızda karıştırma ya da sadece ultrasonikasyon kullanılabilir iken bunlardan her ikisi de uygulanabilir. SLN' lerin sentezlenmesi için kullanılacak yağ asitleri ve ilaç uygun bir solventte çözünür. Daha sonra yüksek hızda karıştırma ve/veya ultrasonikasyon uygulanarak SLN' ler oluşturulur. Bu yöntem çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Homojen parçacıkların elde edilmesine olanak sağlaması ve organik çözücüye ihtiyaç olmaması nedeniyle etkin bir yöntemdir (Hou et al., 2003)

## 2.4 Teknesyum-99m(<sup>99m</sup>Tc)

Teknesyum ilk olarak, 1937 yılında Prierre ve Segre tarafından siklotronunda molibdenin döteryumla bombardıman edilmesi sonucu keşfedilmiş gümüş gri renkte yapay bir elementtir. Periyodik cetvelin VIIB grubunda yer alan 43 atom numaralı teknesyumun erime sıcaklığı 2160°C' dir. Teknesyum -1' den +7'ye kadar 8 yükseltgenme basamağına sahiptir ve bu yükseltgenme basamaklarının stabilitesi teknesyuma bağlanan ligandların özelliklerine bağlı olarak değişir. Kimyasal özellikleri aynı grupta bulunan renyum ile benzer özellikler göstermektedir (Şenışık, 2014).

Yükseltgenme basamaklarından +4 ve +7 en kararlı olanlarıdır ve +7 yükseltgenme basamağında donör ligandlarla veya şelatlarla kompleks oluşturamayan sodyum perteknetatın daha düşük oksidasyon basamaklarına indirgenmesi için kalay klorür, kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl, ditionit, demir sülfat gibi ajanlar kullanılır (Maina et al., 1994).

Teknesyumun tüm izotopları radyoaktiftir. Nükleer tıpta en çok kullanılan radyoizotopu  $^{99m}\text{Tc}$ , 140 keV' lik gama enerjisine ve 6,02 saatlik yarıömre sahiptir. Kısa yarıömrü ve uygun gama enerjisi sebebiyle sintigrafik görüntülemeler için ideal bir rezülasyona sahiptir.  $^{99m}\text{Tc}$ , sodyum perteknetat ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) formunda  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  jeneratöründen steril ve apirojen olarak kolaylıkla elde edilmektedir.  $^{99m}\text{Tc}$ ' in bu özellikleri klinik çalışmalarda yaygın olarak kullanılmasına olanak sağlar (Dewanjee, 1990, Alfassi et al., 2005).

Alberto ve arkadaşları tarafından 1998 yılında, jeneratörde elde edilen sodyum perteknetat ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$ ) formundaki bileşiğe, sodyum borhidrür ( $\text{NaBH}_4$ ) indirgeyici ajanı yardımıyla 1 atm basınç altında CO gazı ve sıcaklık uygulayarak  $[\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  kompleksi sentezlenmiştir. Elde edilen kompleksdeki su moleküllerinin bifonksiyonel ligandlarla yer değiştirmesi sonucu kompleksin diğer moleküllere bağlanması sağlanmıştır. Laboratuvar çalışmalarında  $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  korunun kullanılması, yüksek spesifik aktivitede kompleksler oluşturulmasına olanak sağlamıştır (Alberto et al., 1999; Schibli and Schubiger, 2002; İçedef, 2010).

## **2.5 Teknesyum Radyofarmasötiklerinde Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri**

### **2.5.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)**

Kromatografî, bir karışım içerisinde analiz edilecek bileşenlerin birbirinden ayrılması veya saflaştırılması için biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere kullanılan yöntemlere verilen genel bir isimlendirmedir (Dekker and Jonsson, 1987)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), çok sık kullanılan bir yöntem olup, katı-sıvı adsorbsiyonuna dayanan bir kromatografi türüdür. Sabit faz olarak, TLC plakalar kullanılır ve bu plakalar destek maddesi (alüminyum, plastik, cam gibi) üzerine bir adsorbanın (selüloz, silikajel ve alüminyum oksit gibi maddeler) kaplanmasıyla oluşturulmuştur. Hareketli faz olarak, hekzan, kloroform, n-bütanol, aseton, asetonitril, dietil eter, izopropil alkol gibi organik sıvılar

kullanılır. Bu yöntemde, sabit fazın adsorban tabakası üzerine, mikrolitre ( $\mu\text{L}$ ) düzeyinde uygulanan madde, kılcallık etkisi ile hareketli faz yardımıyla aşağıdan yukarı doğru ilerler. Daha önceden TLC tabakalarının alt bölgesine damlatılan karışım hareketli faz olarak kullanılan çözücü yardımıyla farklı hızlarda yukarı taşınır. Bu sayede ayırım gerçekleştirilmiş olur. Çözücünün ilerlediği seviye, TLC plakalar üzerinde istenilen mesafeye ulaştıktan sonra, plakalar çözücünden çıkarılır ve ilerlediği uzaklık ölçülür (Fair and Kormos, 2006; Şenocak, 2010).

TLC tabakalar üzerine uygulanan her bir bileşenin taşınım mesafesi  $R_f$  (relative front) değeriyle ifade edilir.  $R_f$  değeri, radyokimyasal bileşenin ilerlediği uzaklığın çözücünün ilerlediği uzaklığa oranı ile bulunur. Bu değer; her madde için sabit ve hareketli fazlara bağlı olarak ayırt edici bir özelliktir ve radyofarmasötüğün radyokimyasal saflığının hesaplanması açısından önemlidir.

### **2.5.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)**

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi, içleri sabit fazı oluşturan katı parçacıklarla dolu kolonlara basınç uygulanması ile kolona verilen örnek maddenin bileşenlerinin kolonda alıkonma sürelerinin ( $R_t$ ) belirlenmesi ilkesine dayanır. HPLC yöntemi ile saflaştırma, bileşen ayırma ve tanımlama analizleri yapılabilmektedir. HPLC cihazları genel olarak; numune enjeksiyon sistemi, hareketli faz kapları, pompa sistemleri, yüksek sıvı kromatografi kolonları ve dedektör kısımlarından oluşur (Bieri et al., 1979).

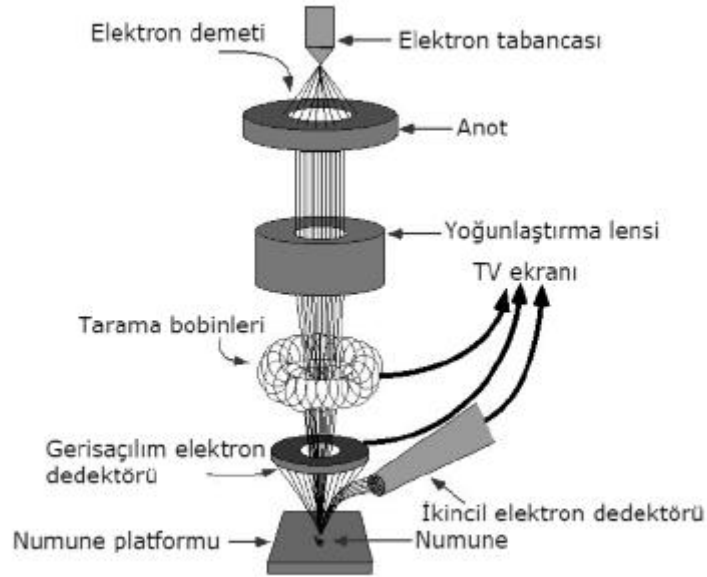
HPLC yönteminde, normal faz (NP), ters faz (RP), ters faz iyon çifti (IP), İyon değişim (IC) gibi ayırma teknikleri vardır. Bunlardan en sık ters faz (RP) tekniği kullanılır ve bu yöntemde kolon apolar mobil faz polardır. Ayrıca, C18, C8, C4, phenyl, TMS, Cyano kolonları kullanılmaktadır. HPLC uygulamalarında kullanılan kolonlar daha çok 30-300 mm uzunluğunda yaklaşık 3-5 mm iç çapında metalik boru şeklindedirler. İç yüzeyleri değişik özelliklerde kaplama materyalleri ile modifiye edilere analizi yapılacak madde grupları için uygun hale getirilebilir. Mobil fazın seçimi sırasında analizi yapılacak örnek madde özellikleri, kullanılacak sabit faz ve HPLC sisteminde kullanılan dedektörlerin özellikleri dikkate alınır (Yurt, 2007).



## 2.6 Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

### 2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM, scanning electron microscope)

Taramalı elektron mikroskobu 1935 yılında Max Knoll tarafından tasarlanmış ve 1965 yılında ilk kez ticari olarak üretilmiştir. SEM cihazı ile, vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromanyetik lenslerle inceltilen elektron demeti ile yüksek çözünürlükte resim oluşturulur. Bu sayede analizi yapılacak olan madde için yüzey resmi oluşturularak incelenmesi sağlanır (Horisberger and Rosset, 1977).



Şekil 2.3 SEM cihazının şematik yapısı ([www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm](http://www.purdue.edu/ehps/rem/rs/sem.htm))

SEM’ de yüksek çözünürlükte görüntünün oluşturulabilmesi için incelenmek istenen madde üzerine elektron demeti gönderilir ve bu maddeyi oluşturan atomlar ile elektron arasında çeşitli etkileşmeler oluşur. Bu etkileşmeler ikincil elektronlar, karakteristik x-ışınları ve geri saçılan elektronlardır. Bunların dedektörler tarafından tespit edilmesi ile elde edilen veriler sonucu görüntü oluşturulur (Nation, 1983).

### 2.6.2 Parçacık boyutu ve zeta potansiyeli ölçüm cihazı

Zeta potansiyel, tanecikler arasındaki itme veya çekme değerinin ölçülmesidir. Zeta potansiyel ölçümü dağılma mekanizmaları ile ilgili bilgi verir ve elektrostatik dağılma kontrolü için önemli rol oynar. Belli bir yükteki tanecik, süspansiyon içerisindeki karşı yükteki iyonları çekerek yüklü taneciğin yüzeyinde güçlü bir bağ yüzeyi oluşturur. Daha sonra da yüklü taneciğin yüzeyinden dışa doğru yayılan bir yüzey oluşur. Yayılan bu yüzey içerisinde "kayma yüzeyi" olarak adlandırılan bir sınır bulunur. Yüklü tanecik ve etrafında bulunan iyonların kayma yüzeyine kadar olan kısmı tek bir parçacık olarak hareket eder. Bu kayma yüzeyinde bulunan potansiyel zeta potansiyeli olarak isimlendirilir. Taneciğin yüzey yapısından ve de içinde bulunduğu sıvının içeriğinden etkilenir. Taneciklerin polar sıvılar içerisindeki davranışlarını yüzeylerindeki elektrik yükü değil, zeta potansiyel değerleri belirler (Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 2014).

Zeta potansiyeli ölçüm cihazı hem boyut hem de potansiyel ölçümünün yapılabildiği ölçüm hücresine ve avalanche tipinde yüksek hassasiyetli bir fotodiyot detektöre sahiptir. Cihaz, partikül boyutu ve zeta potansiyeli ölçümlerini farklı konsantrasyonlarda yapabilmek için lazer ışığının numune içinden geçmeden direkt olarak numune hücresinin kenarından örnekleme yapabilen dinamik ışık saçılımı (dynamic light scattering) (DLS) tekniğini kullanır.

### **3. MATERYAL VE YÖNTEM**

#### **3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar**

##### **3.1.1 Kullanılan kimyasallar**

- Temozolomide (Sigma-Aldrich Co.)
- Stearik asit (Sigma-Aldrich Co.)
- Lesitin (Sigma-Aldrich Co.)
- Sodyum borhidrür (Sigma-Aldrich Co.)
- Sodyum karbonat (Sigma-Aldrich Co.)
- Sodyum/Potasyum Tartarat (Sigma-Aldrich Co.)
- U87-MG (insan glioblastoma-astrocytoma) (American Type Culture Collection (Rockville, MD, ABD))
- Daoy (insan medulloblastoma) (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (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)
- Etanol (Merck Co.)
- Metanol (Merck Co.)
- Asetonitril (Merck Co.)
- Argon Gazı (HABAŞ, Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş.)
- Karbonmonoksit Gazı(HABAŞ, Sınai ve Tıbbi Gazlar İstihsal Endüstrisi A.Ş.)
- Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl)(Eczacıbaşı-Baxter H.Ü.San. ve Tic. A.Ş)
- Aseton (Merck Co.)

### **3.1.2 Kullanılan cihazlar**

- Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- SEM (Scanning Electron Microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmirYüksek Teknoloji Enstitüsü)
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gama sayım sistemi (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RadyoTLC (Bioscan AR2000, 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)
- Milipor (Milli-Q Gradient A-10) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Liyofilizasyon Cihazı (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

- Multimode Mikroplaka Okuyucu (Thermo Varioscan Flash) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Flow Kabin (Thermo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO2 inkübatörü (Sanyo) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Soğutmalı Santrifüj (Hettich) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Işık mikroskobu (Olympus) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted mikroskop (Leica) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Sıvı azot tankı (Thermo Scientific) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu (Memmert) (Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)

### **3.2 Temozolomide Yüklü Katı Lipid Nanoparçacıkların (TMZ-SLN) Sentezlenmesi**

1 mg temozolomide 1 M 1 mL hidroklorik asit içinde çözüldükten sonra bununun 250 µL'si alındı ve 2,5 mL aseton içeren 5 mg lesitin ve 40 mg stearik asit ile karıştırıldı. Karışım 15 dakika boyunca ultrasonik banyoda tutulduktan sonra üzerine 25 mL %0.8' lik Poloxamer-188 eklenerek 60 dakika boyunca 1400 rpm' de karıştırıldı. Karışım buzlu su banyosuna aktarılarak SLN oluşması için 4 saat süresince 1400 rpm' de karıştırılmaya devam edildi. Elde edilen temozolomide yüklü katı lipid nanopartiküller 10.000 rpm'de 1 saat boyunca santrifüjlenmesi

sağlandı. Üst faz uzaklaştırılarak 25 mL % 0.8' lik Poloxamer-188 eklendi. Bu sayede çözelti içerisinde bulunan serbest haldeki temozolomide uzaklaştırılmış oldu. Uzun süreli saklama için +4°C' de tutuldu (Huang et al., 2008).

### **3.3 TMZ-SLN' lerin İlaç İçeriğinin Tayin Edilmesi**

Bölüm 3.2' deki yöntemle hazırlanan TMZ-SLN' lere yüklenen TMZ miktarı yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) kullanılarak hesaplandı. 300 µg/500 µL, 250 µg/500 µL, 50 µg/500 µL, 25 µg/ 500 µL ve 5 µg/ 500 µL konsantrasyonlarına sahip TMZ örnekleri hazırlandı ve HPLC cihazına verildi. Mobil faz olarak % 0,1 asetik asit-asetonitril (90:10, v:v) kullanıldı ve 240 nm' lik dalga boyu seçildi (Kim et al., 2001). Bu yöntem kullanılarak TMZ için kalibrasyon eğrisi oluşturuldu.

Su içerisinde dağılmış olan TMZ-SLN' ler 10.000 rpm'de 30 dakika boyunca santrifüjlenerek elde edilen alt faz 500 µL 1M HCl içerisinde dağıtılarak HPLC' ye verildi. Mobil faz ve dalga boyu için Kim ve arkadaşları tarafından kullanılan yöntem kullanıldı (Kim et al., 2001). Bu sayede, alt fazda bulunan TMZ miktarı hesaplandı.

### **3.4 Parçacık Karakterizasyonu**

#### **3.4.1 SEM analizi**

TMZ-SLN' lerin boyut ve şekillerinin belirlenmesi için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde Phillips XL-30 S FEG cihazı kullanılarak SEM görüntüleri alındı. TMZ-SLN' lerin 500 µL' si 10.000 rpm' de 1 saat santrifüjlenerek üst faz uzaklaştırıldı. Alt faz 500 µL metanol içerisinde dağıtılarak bu süspansiyondan mikropipet ile alınan örnek SEM cihazına ait çelik plaka üzerine damlatıldı. Çelik plaka üzerindeki çözgenin uçması için 5 dakika beklendikten sonra kuruyan örneğin SEM görüntüleri alındı.

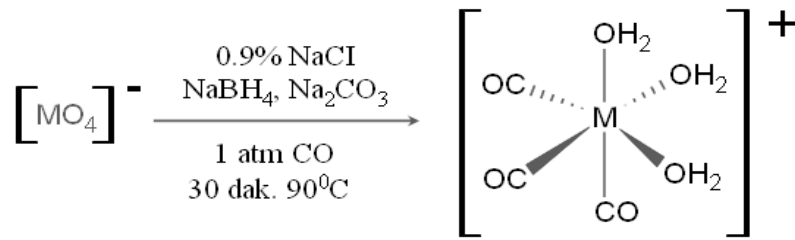
### 3.4.2 Zeta potansiyeli ve boyut analizi

TMZ-SLN' lerin zeta potansiyel ve boyut analizi enstitümüzde bulunan Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı kullanılarak yapıldı. Bölüm 3.2' de anlatılan yöntemle sentezlenen TMZ-SLN' den 200  $\mu$ L alınarak ultra saf su ile 1 mL' ye tamamlandı ve 30 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletildi. Daha sonra, örneğin tamamı zeta potansiyel ve boyut cihazına ait küvete konularak DLS yöntemiyle zeta potansiyel ve boyut analizi yapıldı.

## 3.5 [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$ Korunun Hazırlanması ve Radyoışaretlenmesi

### 3.5.1 [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$ korunun hazırlanması

[ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  koru literatürdeki metot kullanılarak hazırlandı (Alberto et al.,1998). 4mg  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  , 5.5 mg  $\text{NaBH}_4$  ve 20 mg tartarat deney tüpüne konularak 5 dakika boyunca argon gazı geçirildi. Daha sonra, 15 dakika CO gazı geçirilerek yaklaşık 15 mCi aktiviteye sahip 1mL [ $^{99m}\text{TcO}_4$ ] $^-$  eklendi. Katı ısıtıcıda 30 dakika süresince 90°C' de ısıtıldı. İnkübasyon süresi tamamlandıktan sonra buzlu su banyosuna konularak soğumaya bırakıldı. Oda sıcaklığına geldikten sonra yaklaşık 200  $\mu$ L 1 M HCl:PBS (3:1) çözeltisi ile pH 7' ye getirildi. Elde edilen [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  korunun kalite kontrolü için HPLRC ve TLRC analizleri yapıldı.



Şekil 3.1 [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  korunun oluşturulması şeması

### 3.5.2 Temozolomide' in [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$ koru ile işaretlenmesi

1 mg temozolomide 500  $\mu$ L DMSO içerisinde çözülüp 50  $\mu$ L' si alındı ve pH kontrolü yapılarak pH 7 olduğu gözlemlendi. Bu şekilde yaklaşık 1mCi [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  koru ile işaretlendi. Katı ısıtıcı kullanılarak 90°C'de 30 dakika

boyunca ısıtıldı. Daha sonra kısa bir süre soğumaya bırakıldı.  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli TMZ' nin kalite kontrolü için TLRC ve HPLRC analizleri yapıldı.

### **3.5.3 Katı lipid nanoparçacıkların $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile işaretlenmesi**

İşaretleme için, elde edilen temozolomide yüklü katı lipid nanopartiküllerden 500  $\mu\text{L}$  alınarak pH kontrolü yapıldı. Yaklaşık olarak pH 7 olduğu gözlemlendi. Bölüm 3.5.1' de verilen metot kullanılarak  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru hazırlandı. 500  $\mu\text{L}$ ' lik TMZ-SLN yaklaşık 1 mCi aktiviteye sahip  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretlendi. Kuru ısıtıcıda 60 dakika süreyle 80°C' de ısıtıldı. Daha sonra soğumaya bırakıldı.  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli TMZ-SLN' nin kalite kontrolü TLRC ve HPLRC analizleri ile yapıldı.

## **3.6 Kalite Kontrol Çalışmalarında Kullanılan Yöntemler**

### **3.6.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) çalışmaları**

Bu çalışma için 1,2x10 cm' lik parçalara ayrılmış selüloz ve silikajel kaplı şeritler kullanıldı.  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli bileşiklerin 2  $\mu\text{l}$ ' si mikropipet yardımıyla şeritlere damlatıldı. Çalışma için, metanol-su (3:1), asetik asit-piridin-su (PAS) (5:3:1,5), metanol-0,1 M hidroklorik asit (19:1), serum fizyolojik (SF) solventleri kullanıldı. Şeritlerin bir süre kurumaması bekledikten sonra solvent dolu tanklara yerleştirildiler. Solventin şeritler üzerinde yürümesi bekledikten sonra tanklardan çıkartılarak kurumaya bırakıldılar. Kuruduktan sonra oluşabilecek herhangi bir kontaminasyonu engellemek amacıyla şeritlerin yüzeyi bantla kaplandı. Rf (relative front) değerlerinin hesaplanabilmesi için solventin yürüdüğü nokta işaretlendi ve cetvel yardımıyla ölçüldü.

Şeritlerin kalite kontrolü BioScan2000 cihazı yardımıyla yapılarak, Rf değerleri ile  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli bileşiklerin verimleri saptandı.



### 3.6.2 Yüksek performanslı sıvı radyo kromatografi (HPLRC) yöntemi

HPLRC çalışmaları Nucleodur 100-5 C18 RP-C18 (250 x 4,6 mm I.D.) (Macharey - Nagel) kolonu kullanılarak üzerinde Cd(Te) katı hal dedektörlü RAD 501 tek kanallı analizör ve (SPD-10AV)UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atpv cihazında yapılmıştır. Mobil faz %0,1 trifloroasetik asit (TFA)-su (solvent A) %60, asetonitril (solvent B) %40 olacak biçimde ayarlandı. 240nm' lik dalga boyu kullanıldı.

Bölüm 3.3.1, 3.3.2 ve 3.3.3' te verilen metot kullanılarak hazırlanan  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli bileşiklerden 150' şer mCi aktiviteye sahip örnekler alınarak viallere konuldu. 1' er  $\mu\text{L}$ ' lik örnekler HPLRC cihazına verilerek  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile işaretli bileşiklere ait kromatogramlar elde edildi. Bu kromatogramlar ile işaretlenme verimleri hesaplandı.

## 3.7 İn Vitro Çalışmalar

### 3.7.1 Hücre kültürü çalışmaları

Çalışmada kullanılan U87-MG (insan glioblastoma-astrocytoma) ve Daoy (insan medulloblastoma) hücreleri American Type Culture Collection' dan (Rockville, MD, ABD) temin edilmiştir.

U87-MG ve Daoy 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 üretildi.

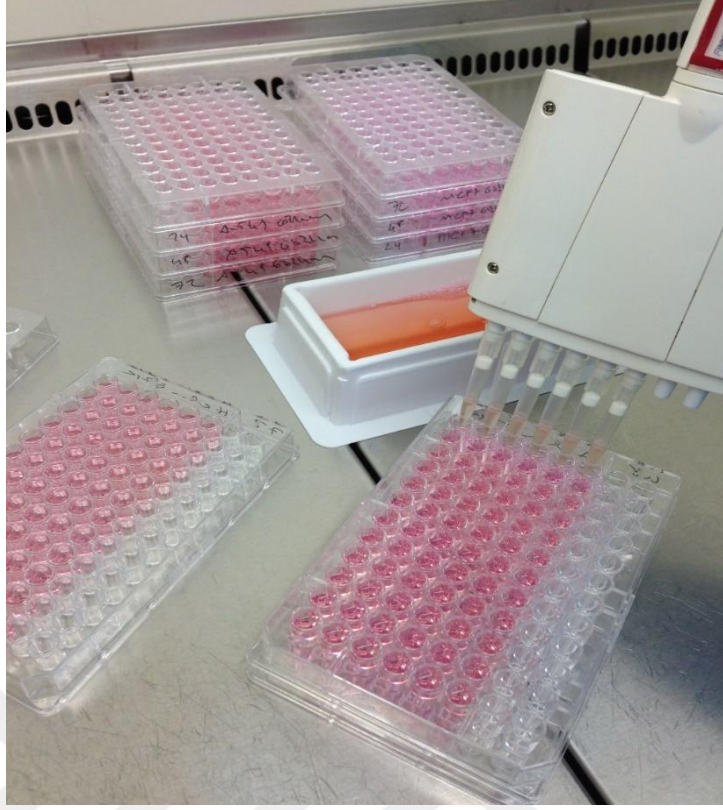
Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrıldılar ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine konuldu. Bu şekilde -80°C de dondurulup, -190°C sıvı azot içinde stoklandı.

### 3.7.2 Sitotoksisite çalışması

TMZ ve TMZ-SLN örneklerinin sitotoksisite çalışmaları U87-MG ve Daoy hücreleri üzerinde yapılmıştır.

Çalışmada IC<sub>50</sub> (%50 ölüm oranına neden olan konsantrasyon aralığı) değerleri WST-8 testi ile kolorimetrik olarak belirlendi. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikropelatelerde her bir kuyucuğa 10<sup>5</sup> hücre/ml olarak hazırlandı. Her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı konsantrasyonda TMZ ve TMZ-SLN örnekleri eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besiyeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37°C %5 CO<sub>2</sub> 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 absorbands değeri (OD), spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbands olarak kabul edildi. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % sitotoksisite değerleri hesaplandı.

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



Şekil 3.2 U87-MG ve Daoy hücreleri üzerinde sitotoksiste çalışmaları

### 3.7.3 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişiminin incelenmesi

İnkorporasyon çalışmasında TMZ ve TMZ-SLN' nin insan beyin hücre hatlarında tutulumlarını gözlemlemek için Daoy ve U87 MG hücreleri ekildi. Hücreler yeterli çoğunluğa ulaştıktan sonra 24'lük plakalara konuldu. 30 µg TMZ ve 30 µL TMZ-SLN 1,5 mCi aktiviteye sahip [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> kuru ile işaretlendi. İşaretli örnekler besiyer üzerine eklenerek 30 saniye boyunca vortekslendi. Plakalarda bulunan hücrelerin üzerindeki besiyer ölü hücrelerin uzaklaştırılması için atıldı. Her bir kuyucuk başına 50 µCi aktiviteye sahip besiyerin 0,5 mL'si hücreler üzerine eklendi. Bu sayede kuyucuk başına 50 µCi [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> kuru ile işaretli 1 µg TMZ ve 1µL TMZ- SLN eklenmiş oldu.

Bağlanma etkinliğinin incelenmesi için, 30. dakika, 60. dakika, 120. dakika ve 240. dakika olmak üzere 4 farklı zaman parametresi denendi. Bu süreler boyunca hücreler 37°C'de inkübe edildi. Her bir kuyucuk uygun zaman parametresine göre Cd(Te) dedektöründe sayılarak üzerlerindeki besiyer atıldı ve

1 kez PBS ile yıkandı. Yıkamanın ardından üzerlerine, kuyucuktaki hücrelerin yüzeyden kalkmasını sağlamak amacıyla 0,5 ml ripa tampon çözeltisi konuldu. Bu şekilde tekrar sayım alınarak tutulum sağlayan hücrelerin üzerindeki aktivite ölçülmüş oldu.

Son olarak kuyulardaki hücreler kazıma yöntemiyle yüzeyden ayrıldı ve Ripa tampon çözeltisi içerisinde dağıldı. Her bir kuyucukta bulunan Ripa tampon çözeltisi mikropipet yardımıyla ependorflara konuldu. Ependorflar vortexlenerek içlerindeki çözeltilerin 25  $\mu\text{L}$ ' si 96' lık plakalara konuldu. Bu şekilde hücre sayısının tespiti için protein tayini yapıldı.

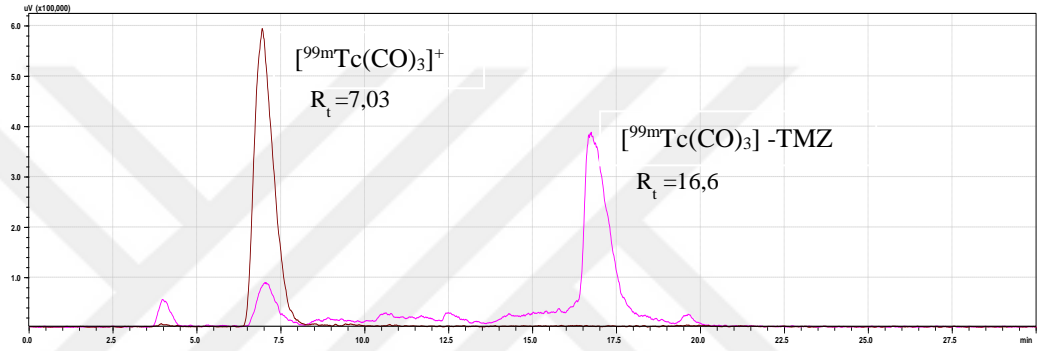


## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

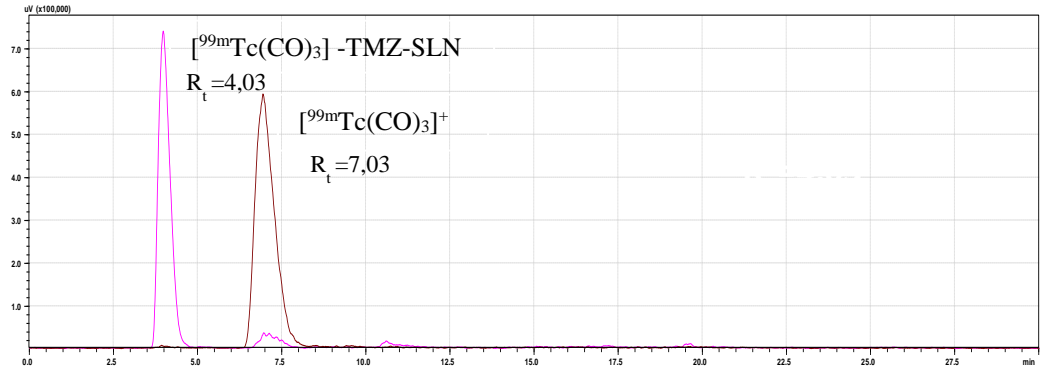
### 4.1 Kalite Kontrol Sonuçları

#### 4.1.1 HPLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Bölüm 3.5.1, 3.5.2 ve 3.5.3'te anlatılan yöntemlerle hazırlanan  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  kuru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  kuru ile işaretli TMZ ve TMZ-SLN' ye ait kromatogramlar aşağıda verilmektedir.



Şekil 4.1  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3] - \text{TMZ}$ ' ye ait HPLRC kromatogramı



Şekil 4.2  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3] - \text{TMZ-SLN}$ ' ye ait HPLRC kromatogramı

Bölüm 3.6.2'de verilen yönteme göre elde edilen kromatogramda  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  korunun  $R_t$  değeri 7,03 olarak elde edilmiş ve hazırlanma verimi %  $99,3 \pm 0,3$  bulunmuştur. Aynı yöntemle elde edilen  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO}_3)_3]^+$  kuru ile işaretli TMZ ve TMZ-SLN' ye ait kromatogramlardan  $R_t$  değeri sırasıyla 16,6 ve 4,03

olarak elde edilmiştir. HPLRC metodu ile radyoişaretli bileşikler ile  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  korunun ayrılması sağlanmıştır.

#### 4.1.2 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

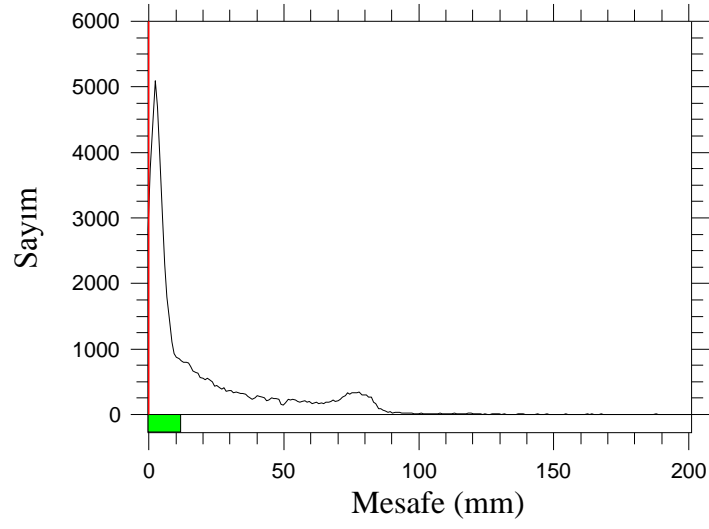
Bölüm 3.5.1’ de anlatılan yöntem kullanılarak  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru hazırlandıktan sonra Bölüm 3.5.2 ve 3.5.3’ teki yöntemlerle radyoişaretlenmesi yapılan TMZ ve TMZ-SLN’ nin kalite kontrolü TLRC yöntemi kullanılarak yapıldı. Bu yöntem için serum fizyolojik (SF), metanol-su (3:1), asetik asit-piridin-su (PAS) (5:3:1,5), metanol-0,1 M hidroklorik asit (19:1) banyoları ile silika jel ve selüloz tabakalar kullanıldı.

Radyoişaretli TMZ için kullanılan banyoların  $R_f$  değerleri Çizelge 4.1’ de ve kromatogramlar Şekil 4.3, 4.4, 4.5 ve 4.6’ da verilmektedir.

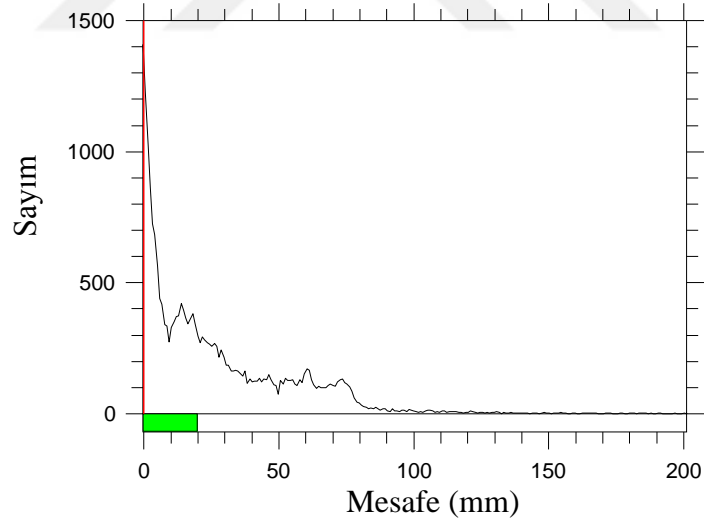
Çizelge 4.1  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  -TMZ için  $R_f$  değerleri (n=4)

Banyo	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ
Serum fizyolojik	0,045	0,05
Metanol: HCl (19:1)	0,81	0,487

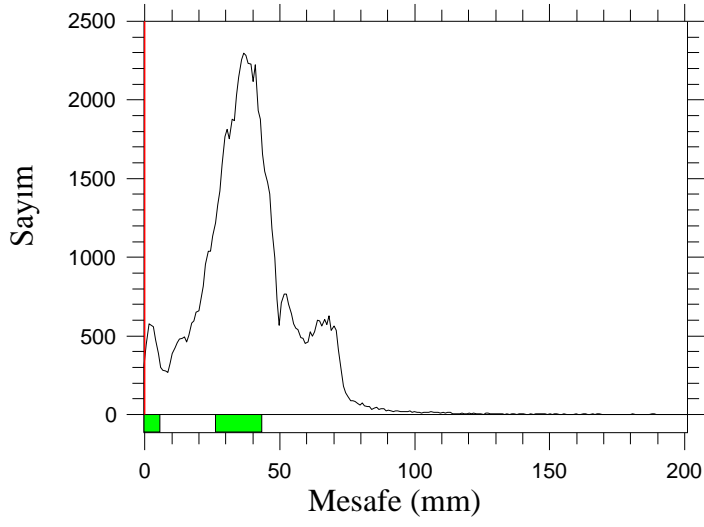
Çizelge 4.1’ de görüldüğü gibi  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru ile  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  - TMZ’ nin  $R_f$  değerleri birbirine çok yakın değerlerde olduğundan SF banyosunda ayırmak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle metanol-HCl (19:1) banyosu kullanılarak TMZ maddesinin işaretlenme verimi hesaplandı.



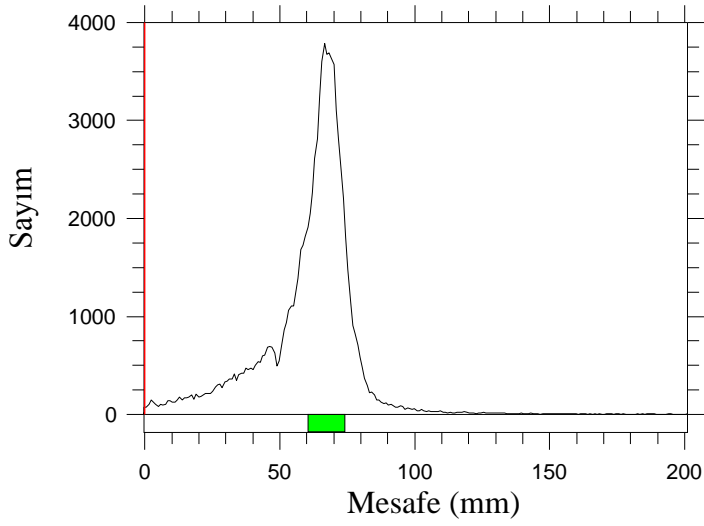
Şekil 4.3 SF banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koruna ait kromatogram



Şekil 4.4 SF banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  -TMZ' ye ait kromatogram



Şekil 4.5 Metanol: HCl banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koruna ait kromatogram



Şekil 4.6 Metanol: HCl banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  -TMZ' ye ait kromatogram



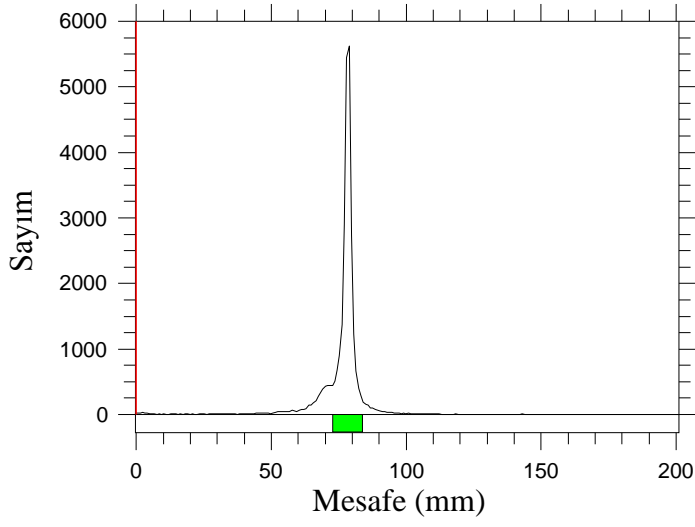
Şekil 4.6 de verilen kromatogramdan  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  - TMZ' nin işaretlenme verimi  $\% 99,3 \pm 0,35$  olarak hesaplandı.

Radyoişaretli TMZ-SLN için kullanılan banyoların  $R_f$  değerleri Çizelge 4.2' de ve kromatogramlar Şekil 4.7, 4.8, 4.9 ve 4.10' da verilmektedir.

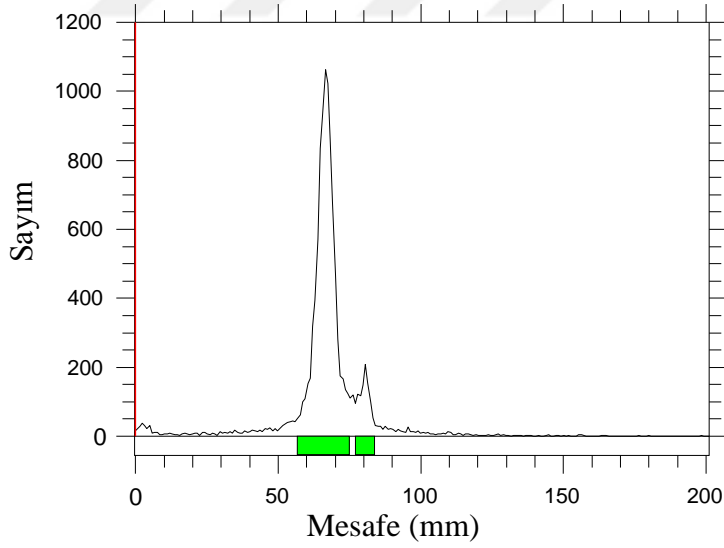
Çizelge 4.2  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  -TMZ-SLN için  $R_f$  değerleri (n=4)

Banyo	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN
PAS (3:5:1,5)	0,977	0,807
Metanol: Su (3:1)	0,047	0,875

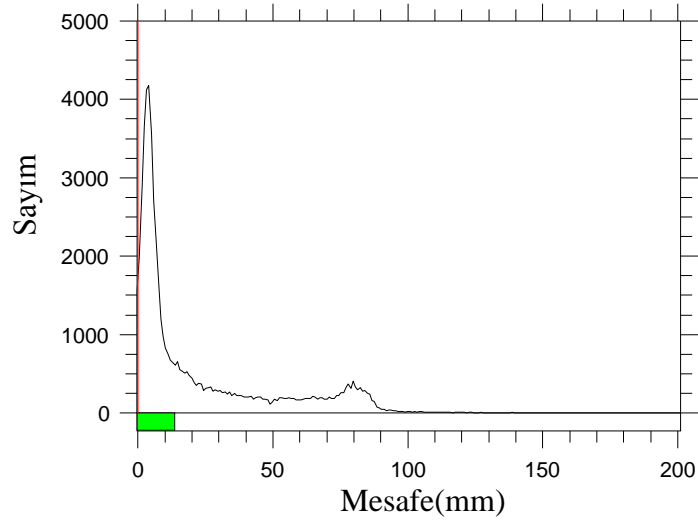
Çizelge 4.2' de görüldüğü gibi iki farklı banyo kullanıldı.  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru ve  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN için PAS banyosu kullanıldığında  $R_f$  değerlerinin birbirine yakın olduğu gözlemlendi. Bu nedenle radyoişaretli bileşiğin kromatogramda daha iyi ayrılabilmesi için metanol: su banyosu kullanıldı.  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru için  $R_f$  değeri 0,047 iken radyoişaretli TMZ-SLN için 0,875 değerindeydi. Bu nedenle metanol: su banyosu daha ayırıcı sonuçlar vermektedir.



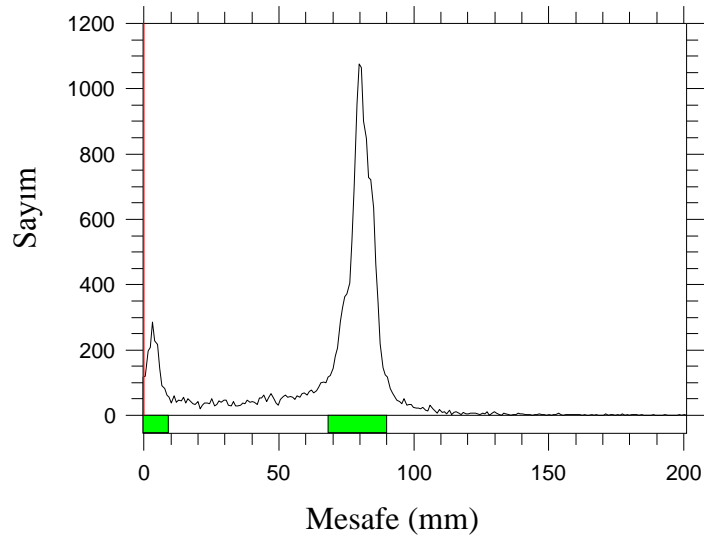
Şekil 4.7 PAS banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koruna ait kromatogram



Şekil 4.8 PAS banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN' ye ait kromatogram



Şekil 4.9 Metanol: su banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koruna ait kromatogram



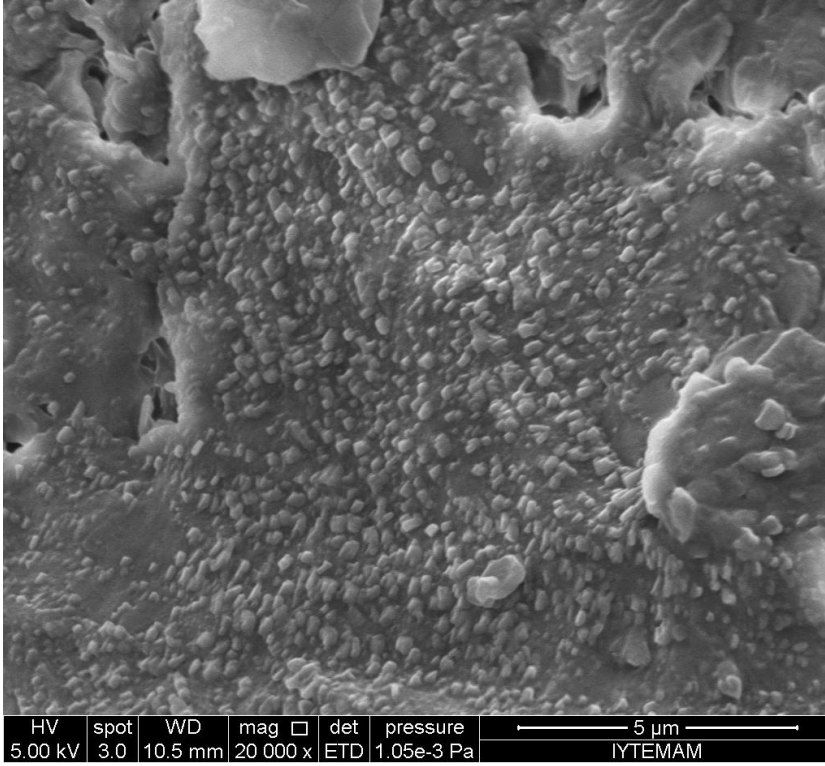
Şekil 4.10 Metanol: su banyosundaki  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$  -TMZ-SLN' ye ait kromatogram

Şekil 4.8 ve 4.10'daki kromatogramlar incelendiğinde [ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ ] $^+$  kuru ile işaretli TMZ-SLN' nin işaretleme verimi  $\%90,4\pm 0,3$  olduğu gözlemlendi. Bu şekilde, yüksek verimle radyoişaretli TMZ-SLN elde edilmiş oldu.

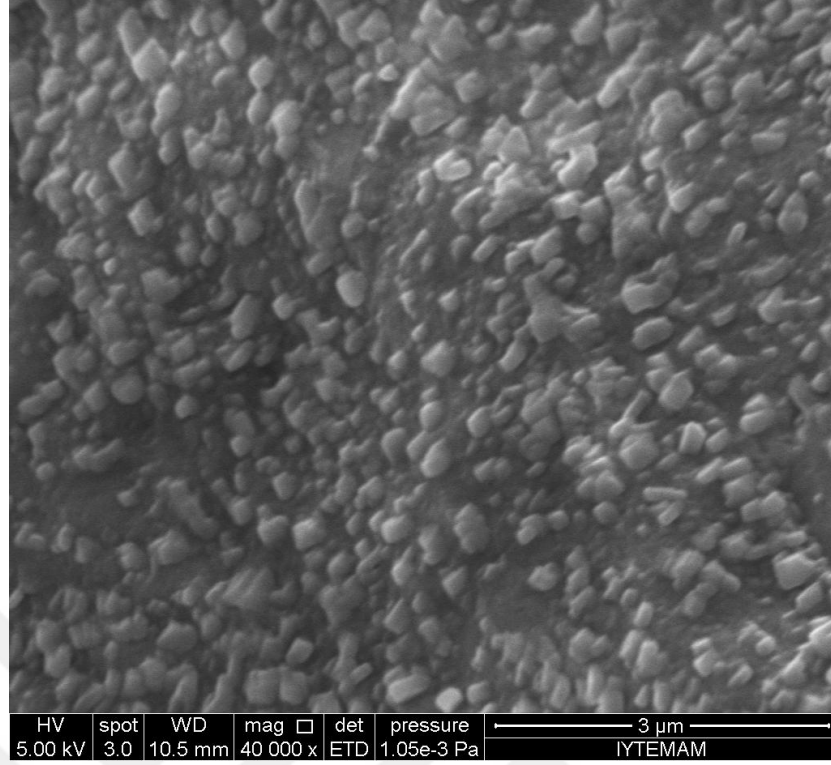
## 4.2 Katı Lipid Nanoparçacıkların Karakterizasyonu

### 4.2.1 SEM analizi sonuçları

TMZ-SLN' lerin boyut tayini ve morfolojisinin belirlenmesi için SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü'nde alındı.



Şekil 4.11 TMZ-SLN' lerin 20.000x' lik büyütmedeki SEM görüntüsü



Şekil 4.12 TMZ-SLN'lerin 40.000x'lik büyütmedeki SEM görüntüleri

Kovacevic ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 200 nm altında SLN'ler elde edilmiştir ve elde edilen SEM görüntülerinden parçacıkların agregatlaşarak farklı boyutlarda görüntülenmesine neden olmuştur. (Kovacevic et al. 2014).

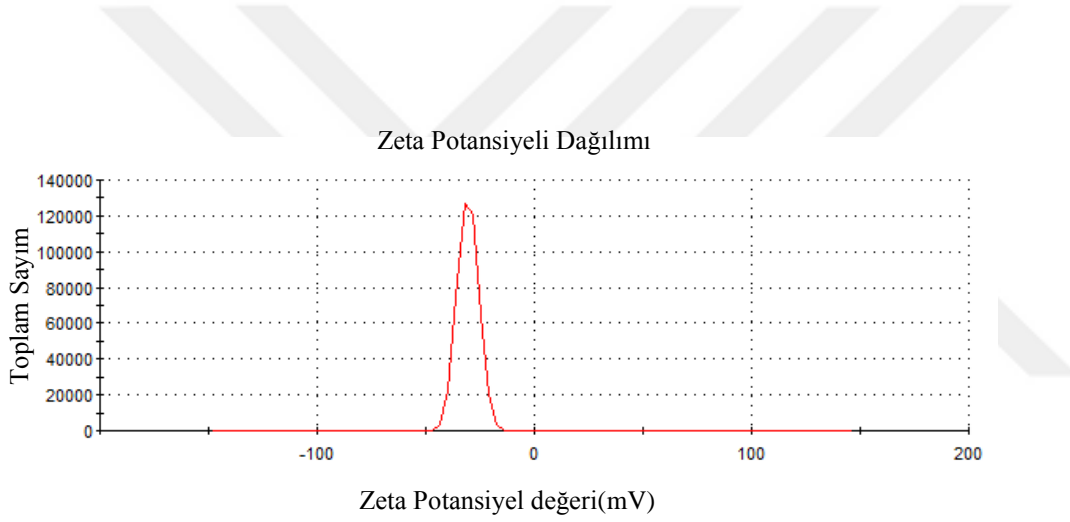
Bu yapılan çalışmada da TMZ-SLN'lerin bir araya toplanarak agregatlaşma eğiliminden ötürü parçacıklar farklı boyutlarda görüntülenmiş ve boyutlarının 70-200 nm arasında değiştiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle hazırlanan nanoparçacıklar için elde edilen parçacık boyutları literatürle uyumludur.

#### 4.2.2 Zeta potansiyeli ve boyut analizi

TMZ-SLN'lerin zeta potansiyel ve boyut analizi Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı'nda Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapıldı.

Şekil 4.13' te zeta potansiyeline ait grafik verilmiştir. Bu grafikten zeta potansiyelinin yaklaşık olarak -30,5 mV olduğu gözlemlenmiştir.

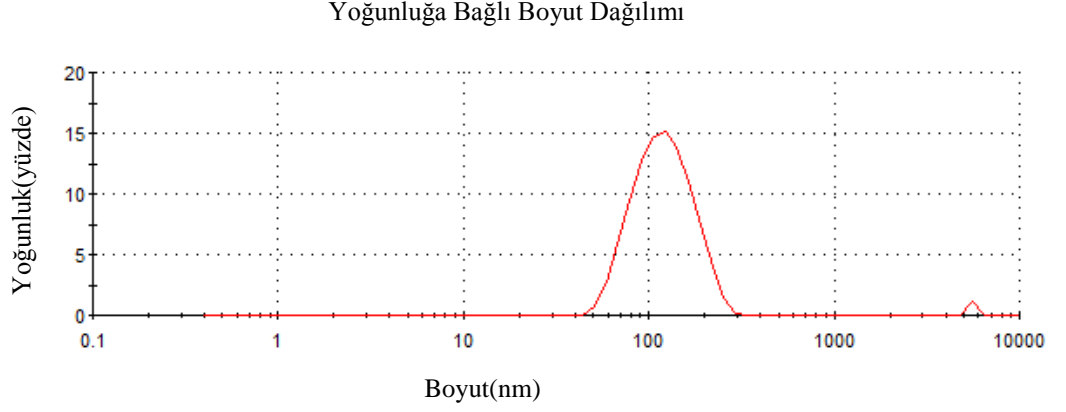
Venkateswarlu ve Manjunath tarafından gerçekleştirilen çalışmada zeta potansiyel değerinin -23 ile 33 mV aralığında olduğu görülmektedir (Venkateswarlu and Manjunath, 2004). Katı lipid nanoparçacıkların kararlılıklarının yüksek olması ve suda homojen olarak dağılımlarının iyi olabilmesi için zeta potansiyeli değerinin -30 ve +30 mV aralığının dışında olması gerekmektedir. Bu çalışmada elde edilen zeta potansiyeli değeri sentezlenen katı lipid nanoparçacıkların uygun kararlılıkta olduğunu göstermektedir (Kovacevic et al., 2014).



Şekil 4.13 TMZ-SLN için zeta potansiyeli grafiği

Hazırlanan ilaç yüklü nanoparçacıkların boyutlarının uygun olup olmadığını anlamak için boyut analizi Malvern Zetasizer Nano ZS cihazı ile yapıldı. Boyut analizi için elde edilen TMZ-SLN' den yaklaşık 200 µL alınarak ultra saf su ile 1 mL' ye tamamlandı ve 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletildi. Bu sayede oluşabilecek agregatlaşmanın engellenmesi sağlandı.

Şekil 4.14' te TMZ-SLN için verilen boyut grafiğinden, elde edilen nanoparçacıkların boyutlarının yaklaşık olarak  $120 \pm 20$  nm olduğu görülmektedir. PDI (çoklu dağılım indisi) değerinin de 0,357 değerinde olduğu için parçacığın boyut tayinine uygun özelliklere sahip olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.14 TMZ-SLN' lerin boyut grafiği

Schubert ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 200 nm altında ve ortalama 0,250 PdI değerine sahip SLN' ler elde etmişlerdir (Schubert et al. 2005). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar ile bizim çalışmamızda elde edilen sonuçlar benzerlik göstermektedir. PdI değerinin farklılık göstermesi karıştırma hızı, sıcaklık ve basınç gibi etkiler nedeniyle oluşmaktadır.

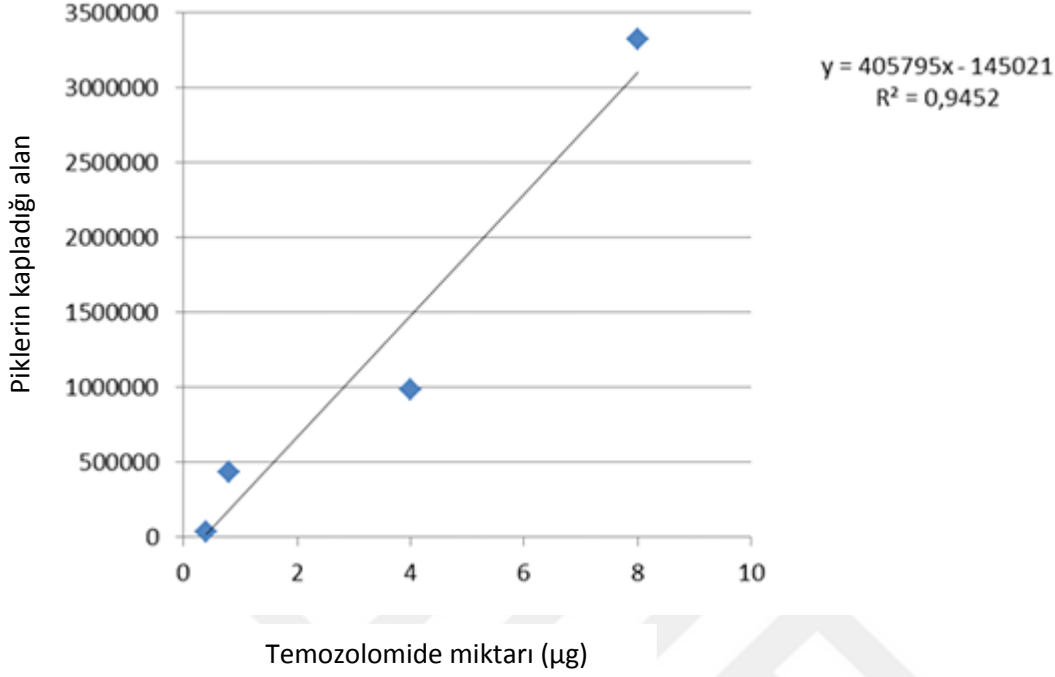
### 4.3 TMZ-SLN' lere Yüklenen İlaç Miktarı Sonuçları

300 µg/500 µL, 250 µg/500 µL, 50 µg/500 µL, 25 µg/ 500 µL ve 5 µg/ 500 µL konsantrasyonlarda hazırlanan TMZ örneklerinden elde edilen HPLC kromatogramları üzerinde TMZ piklerinin kapladığı alanlar hesaplandı. Bunun sonucunda piklerin kapladığı alan başına TMZ miktarının kalibrasyon eğrisi çizildi.

Şekil 4.15' te görüldüğü gibi çizilen kalibrasyon eğrisinden  $R^2$  değerinin 0,9452 olduğu görülmektedir. Elde edilen  $y=405795x-145021$  denkleminde yüklenen ilaç miktarının 1 mg' lık TMZ-SLN başına 26,7 µg TMZ olduğu saptandı.

$$EE = \frac{C_{total} - C_{free}}{C_{total}} \times 100\%$$

Yukarıda belirtilen denklemden yola çıkarak TMZ-SLN' lerin ilaç yükleme oranı % 49,25 olarak elde edildi.



Şekil 4.15 TMZ' ye ait kalibrasyon eğrisi

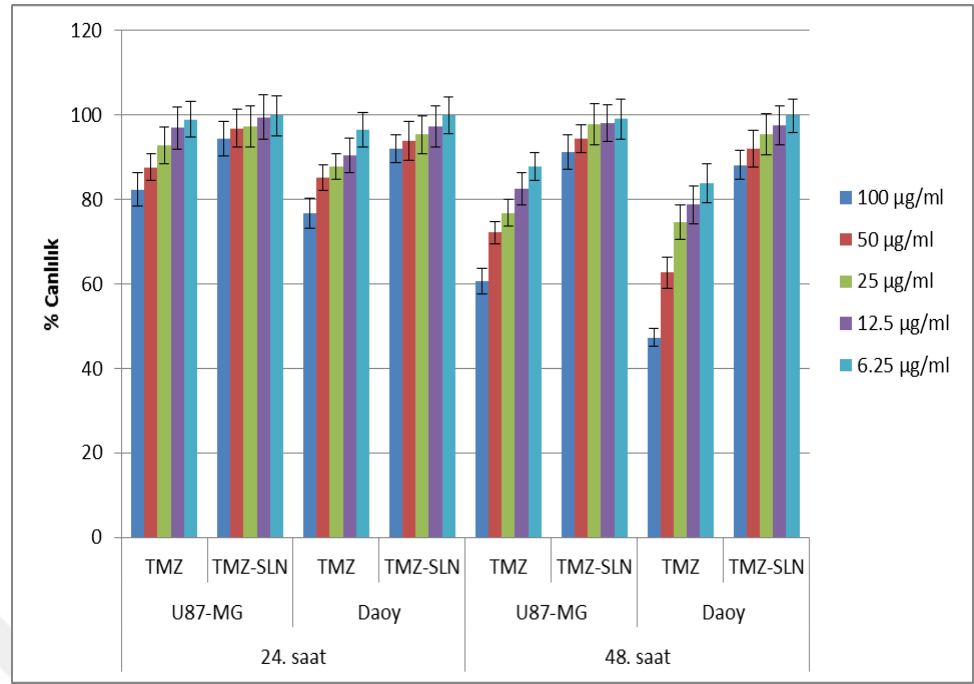
Huang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada TMZ-SLN' ler için ilaç yükleme oranı % 58,9 olarak elde edilmiştir (Huang et al., 2008). Karıştırma hızı, karıştırma zamanı ve kullanılan ilaç miktarı gibi faktörler ilaç hapsetme oranını etkilemektedir.

#### 4.4 Hücre Kültürü Çalışmalarının Sonuçları

##### 4.4.1 Sitotoksosite sonuçları

TMZ ve TMZ-SLN' lerin farklı konsantrasyonları kullanılarak U87 MG ve Daoy hücre hatları üzerinde sitotoksosite çalışması gerçekleştirildi. Şekil 4.16' da 24. ve 48. saatler için % canlılık değerleri verilmektedir. Bu değerlerden TMZ-SLN için belirgin bir sitotoksik etki görülmezken, TMZ' nin 48. saati için % canlılıkta belirgin düşüşler yaşanmaktadır. Elde edilen grafikten TMZ için en yüksek sitotoksik etkinin 100 µg/ml konsantrasyonunda olduğu gözlenmektedir.





Şekil 4.16 U87-MG ve Daoy hücre hatları üzerinde TMZ ve TMZ-SLN' nin farklı konsantrasyon ve zamana bağlı % canlılık değerleri

Çizelge 4.3 bize iki farklı hücre hattında TMZ' ye ait IC<sub>50</sub> değerini vermektedir. İki hücre hattı için de 48. saatte elde edilen IC<sub>50</sub> değerleri düşük seviyelerde olduğundan canlı için belirgin bir toksik etki göstermemektedir

Çizelge 4.3 TMZ' ye ait IC<sub>50</sub> değerleri

48. saat	TMZ IC <sub>50</sub>	
	U87-MG	Daoy
µg/ml	242,00	97,68
µM	1241,00	501,00

Zhou ve arkadaşları tarafından yapılan deneyde Daoy hücre hattının TMZ için IC<sub>50</sub> değeri 452,12 µM olarak bulunmuştur (Zhou et al. 2011). Ferretti ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada U87-MG hücre hattının TMZ için IC<sub>50</sub> değeri 864,1±40,9 µM olarak elde edilmiştir (Ferretti et al. 2013). Martins ve

arkadaşları tarafından yapılan deneyde ise U87-MG dahil farklı hücre hatları üzerinde SLN' ler için sitotoksik etkinin olmadığı gözlemlenmiştir (Martins et al. 2012).

#### 4.4.2 Hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi sonuçları

TMZ ve TMZ-SLN için U87-MG ve Daoy hücre hatları üzerinde bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi incelenmiştir. Çizelge 4.4 ve 4.5 incelendiğinde iki hücre hattı için de TMZ-SLN üzerindeki bağlanmanın TMZ' ye göre daha yüksek seviyede olduğu ve zamana bağlı olarak tutulum değerinin arttığı gözlemlenmiştir.

240. dakika sonunda radyoişaretli TMZ ve TMZ-SLN için U87-MG hücre hattındaki % bağlanma sırasıyla  $16,30 \pm 0,70$  ve  $33,36 \pm 3,77$  iken Daoy hücre hattındaki % bağlanma sırasıyla  $14,06 \pm 3,17$  ve  $27,4 \pm 3,88$  değerlerindedir. Radyoişaretli TMZ ve TMZ-SLN' nin U87-MG hücre hattındaki bağlanma veriminin Daoy hücre hattındaki bağlanma veriminden daha yüksek seviyelerde olduğu görülmektedir. Bunun yanısıra, iki hücre hattı için de  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  korunun bağlanma verimi çok düşük seviyelerdedir ve zamanla değişmemektedir. 240. dakika sonunda U87-MG hücre hattı için % bağlanma  $1,78 \pm 0,32$  değerindeyken, Daoy hücre hattı için  $1,76 \pm 0,96$  değerindedir.

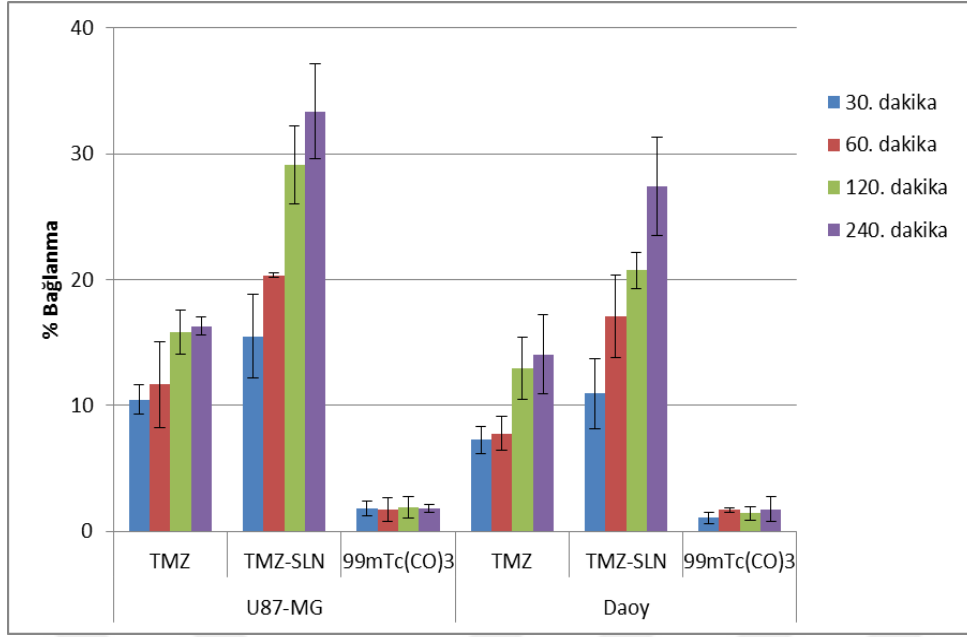
Çizelge 4.4 U87-MG hücre hattına ait % bağlanma değerleri

U87-MG	% Bağlanma		
	TMZ	TMZ-SLN	[ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
30. dakika	10,47±1,18	15,50±3,30	1,81±0,61
60. dakika	11,67±3,43	20,33±0,18	1,69±0,94
120. dakika	15,81±1,74	29,13±3,12	1,94±0,85
240. dakika	16,30±0,70	33,36±3,77	1,78±0,32

Çizelge 4.5 Daoy hücre hattına ait % bağlanma değerleri

Daoy	% Bağlanma		
	TMZ	TMZ-SLN	[ <sup>99m</sup> Tc(CO) <sub>3</sub> ] <sup>+</sup>
30. dakika	7,26±1,09	10,97±2,79	1,08±0,44
60. dakika	7,76±1,36	17,10±3,26	1,69±0,17
120. dakika	12,95±2,45	20,73±1,44	1,42±0,53
240. dakika	14,06±3,17	27,4±3,88	1,76±0,96

Her iki hücre hattı için radyoişaretli bileşikler üzerindeki % bağlanma değerlerinin grafiği şekil 4.17' de verilmektedir. Elde edilen grafikte görüldüğü gibi en yüksek bağlanma verimi radyoişaretli TMZ-SLN için U87-MG hücre hattı üzerinde 240. dakikada elde edilmiştir.



Şekil 4.17 U87-MG ve Daoy hücre hattı için  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  kuru ile radyoişaretili TMZ ve TMZ-SLN' nin % bağlanma grafiği

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada öncelikle antikanser bir ajan olan temozolomide yüklü katı lipid nanoparçacıklar sentezlendi. Daha sonra, TMZ ve sentezlenen TMZ-SLN' ler  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru ile işaretlendi. Kalite kontrol çalışmaları TLRC ve HPLRC metotları kullanılarak belirlendi. İşaretlenme verimleri  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ için % 99,3±0,35,  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN için % 90,4±0,3 olarak hesaplandı. Bu sayede, yüksek verimle işaretli bileşikler elde edilmiştir.

TMZ-SLN' lerin karakterizasyonu için Zeta potansiyel ve boyut ile SEM analizleri yapıldı. Bu analizler sonucu 120±20 nm boyuta ve -30,5 mV' luk zeta potansiyeline sahip nanoparçacıkların olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen bu sonuçlar uygun parçacık boyutuna ve zeta potansiyeline sahip nanoparçacıkların üretildiğini göstermektedir.

Hücre kültürü çalışmaları için U87 MG ve Daoy hücre hatları kullanıldı. Yapılan sitotoksikite çalışmaları sonucu TMZ-SLN için hücreler üzerinde belirgin bir toksik etki gözlenmezken, TMZ için U87 MG ve Daoy hücre hatları üzerinde 48. saatteki IC<sub>50</sub> değerlerinin sırasıyla 1241,00 µM ve 501,00 µM olduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca hücreler üzerindeki bağlanma etkinliği zamanla değişimi incelendiğinde iki hücre hattı için de  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ-SLN için % bağlanmanın  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -TMZ' ye göre daha yüksek seviyede olduğu ve zamana bağlı olarak tutulum değerinin arttığı gözlemlenmiştir. En yüksek bağlanma verimi radyoışaretli TMZ-SLN için U87-MG hücre hattı üzerinde 240. dakikada 33,36±3,77 elde edilmiştir.

Sonuç olarak, antikanser bir ilaç yüklenmiş katı lipid nanoparçacıklar sentezlenerek,  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$  koru radyoışaretli bileşikler elde edilmiş ve bunların biyolojik davranışları in vitro olarak incelenmiştir. Bu sayede, antikanser ilacın sağlıklı hücreler üzerinde oluşturduğu sitotoksik etki azaltılarak gelecekte yapılacak olan çalışmalarla teşhis ve tedavi amaçlı kullanılabilir bir radyofarmasötik oluşturulmasına olanak sağlayabilecektir.

## KAYNAKLAR DİZİNİ

- Alfassi, Z.B., Groppi, F., Bonardi, M.L. and Goeij, J.J.M.,** 2005, On the “artificial” nature of Tc and the “carrier-free” nature of  $^{99m}\text{Tc}$  from  $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$  generators, *Applied Radiation and Isotopes*, 63:37-40pp.
- Androezzi, E., Seo, J.W., Ferrara, K. and Louie, A.,** 2011, A novel method to label solid lipid nanoparticles (SLNs) with  $^{64}\text{Cu}$  for positron emission tomography (PET) imaging, *Bioconjug. Chem.*, 22(4):808-818pp.
- 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  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  from  $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$  in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (31):7987-7988pp.
- Alberto, R., Schibli, R., Egli, A. and Schubiger, A.P.,** 1999, First application of *fac*  $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$  in bioorganometallic chemistry: Design, structure and invitro affinity of a 5-HT<sub>1A</sub> receptor ligand labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ , *J. Am. Chem. Soc.*, 121:6076-6077pp.
- Arney, K. 2013.** “The story of Temozolomide”, Cancer Research UK, <http://scienceblog.cancerresearchuk.org/temozolomide>, (Erişim Tarihi: 5 Ocak 2015)
- Banerjee, I., De, K., Chattopadhyay, S., Bandyopadhyay, A.K. and Misra, M.,** 2014, An easy and effective method for radiolabelling of solid lipid nanoparticles, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 10.1007/s10967-014-3258-z
- Bieri, J.G., Tolliver, T.J. and Catignani, G.L.,** 1979, Simultaneous determination of a-tocopherol and retinol in plasma or red cells by high pressure liquid chromatography, *Am. J. Clin. Nutr.*, 32:2143-2149pp.
- Bummer, P. M.,** 2004, Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery—solid lipid nanoparticles, *Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 21(1).
- Cavalli, R., Caputo, O., Carlotti, M. E., Trotta, M., Scarnecchia, C., Gasco, M.R.,** 1997, Sterilization and freeze drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.*, 148:47-54pp.
- Cooper, J.A., White, D.A. and Matthay, R.A.,** 1986, Drug-induced pulmonary disease. Part 1: Cytotoxic drugs, *Am. Rev. of Respiratory Disease*, 133(2): 321-340pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- De vos, F. J., De Deckerb, Dierck, M. and Diercx, R.A.,** 2005, The good laboratory practice and good clinical practice requirements for the production of radiopharmaceuticals in clinical research , *Nuclear Medicine Communications*, 26(7):575-579pp.
- Dekker, M. and Jonsonn, J.A.,** 1987, Chromatographic Theory and Basic Principles, New York
- Dias, C.R., Marczewski, B., Moraes, V., Barboza, M.F. and Osso, J.A.,** 2005, Tc-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody ior egf/r3: Quality control and image studies in mice, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48:29-35pp.
- Dewanjee, M.K.,** 1990, The chemistry of <sup>99m</sup>Tc-Labeled, *Radiopharmaceuticals, Seminars in Nuclear Medicine*, 20:5-27pp.
- Fair, J.D. and Chad M.K.,** 2008, Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data, *Journal of Chromatography*, 1211:49-54pp.
- Ferretti, M., Fabbiano, C., Bari, M.D., Conta, C., Castigli, E., Sciacaluga, M., Ponti, D., Ruggieri, P., Raco, A., Ricordy, R., Calogero, A. And Tata, A.M.,** 2013, M2 receptor activation inhibits cell cycle progression and survival in human glioblastoma cells, *J. Cell. Mol. Med.*, 17(4):552-566pp.
- Gilbert, M.R.,** 2006, New treatments for malignant gliomas: careful evaluation and cautious optimism required, *Ann. Intern. Med.* 144 (5), 371–373pp.
- Hanahan, D., Bergers, G. and Bergsland, E.,** 2000, Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice, *The Journal of Clinical Investigation*, 105(8):1045-1046pp.
- Herisberger, M. and Rosset, J.,** 1977, Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25(4):295-305pp.
- Hou, D.Z., Xie, C.S., Huang, K.J. and Zhu, C.H.,** 2003, The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs) *Biomaterials*, 24:1781-1785pp.
- 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, *Int. J. Pharm.*, 239:121-128pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Huang, G., Zhang N., Bi X. and Doub M.**, 2008, Solid Lipid Nanoparticle of Temozolomide: Potential reduction of cardial and nephric toxicity, *International Journal of Pharmaceutics* 355:314–320pp.
- İçhedef, Ç.**, 2010, Guanin ve türevlerinin  $M(\text{CO})_3^+$  (M=Tc ve Re) korları ile işaretli manyetik özellikli nanoparçacıklarının oluşturulması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, Doktora Tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 103s.
- İçhedef, Ç., Teksöz, S., Ünak, P., Şenocak, K., Medine, E.İ., Ertay, T. and Bekis, R.**, 2012, Bioevaluation of  $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]$ -Guanine in vivo and in vitro, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 292:739-743pp.
- Jacinto, F.V. and Esteller, M.**, 2007, MGMT hypermethylation: a prognostic foe, a predictive friend, *DNA Repair* 6 (8), 1155–1215pp.
- Joeng, B., Choi, Y. K., Bae, Y. H., Zentner, G. and Kim, S. W.**, 1999, New biodegradable polymers for injectable drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 62(1-2):109-114pp.
- Kim, H., Likhari, P., Parker, D., Statkevich, P., Marco, A., Lin, C. and Nomeir, A.A.**, 2001, High-performance liquid chromatographic analysis and stability of anti-tumor agent temozolomide in human plasma, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24:461-468pp.
- Kovačević, A. B., Müller, R. H., Savić, S. D., Vuleta, G. M. and Keck, C. M.** 2014, Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: preparation, characterization and physical stability investigation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 444:15-25pp.
- Liu, S. and Edwards, D.S.**, 1999,  $^{99m}\text{Tc}$ -Labeled Small Peptides as Diagnostic Radiopharmaceuticals, *Chem. Rev.*, 99:2235-2268pp.
- Maina, T., Stolz, B., Albert, R., Koch, P., Bruns, C. and Macke, H.**, 1994, Synthesis, radiochemistry and biological evaluation of a new somatostatin analogue (SDZ 219-387) labelled with technetium-99m, *Eur. Journal of Nuc. Med.*, 21(5):437-444pp.



## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- 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.
- Medine, E.İ.**, 2008, <sup>125/131</sup>I İşaretli Urasil'in Glukuronid Sentezi Ve Manyetik Özellik Kazandırılarak Yeni Bir Manyetik İlaç Taşıyıcı Oluşturulması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, 222s.
- Mehnert, W. and Mäder, K.**, 2001, Solid lipid nanoparticles production, characterization and applications, *Adv. Drug Del. Rev.*, 47:165-196pp.
- Müller, R.H., Mäder, K. and Gohla, S.**, 2000, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery-a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 50:161-177pp.
- Nation, J.L.**, 1983, A new method using hexamethyldisilazane for preparation of soft insect tissues for scanning electron microscopy, *Biotechnic and Histochemistry*, 58(6):347-351pp.
- Newlands, E.S., Stevens, M.F.G., Wedge, S.R., Wheelhouse, R.T. and Brock, C.**, 1997, Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials, *Cancer Treatment Reviews* 23 (1):35–61pp.
- Numanoğlu U. ve Tarımcı N.**, 2006, Katı lipid nanopatiküllerin (SLN) özellikleri, farmasötik ve kozmetik alandaki uygulamaları, *Ankara Ecz. Fak. Derg.*, 35(3), 211 – 235s.
- Orta Doğu Teknik Üniversitesi**, “Zeta potansiyel ve mobilite ölçüm cihazı”, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, <http://merlab.metu.edu.tr/zeta-potansiyel-ve-mobilite-olcum- cihazi> (Erişim Tarihi: 2 Mart 2015)
- Özyüncü, S.**, 2009, <sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub><sup>+</sup> İle Radyoişaretli D-Penisilamin Bağlı Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 88s.
- Rohit, B. and Pal, K.I.**, 2013, A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment, *Current Nanoscience*, 9(2):1-9pp.

## KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Saleem, A., Brown, G.D., Brady, F., Aboagye, E.O., Osman, S., Sajinder, K.L., Ranicar, A.S.O., Brock, C.S., Stevens M.F.G., Newlands, E., Jones, T. and Price, P.,** 2003, Metabolic activation of temozolomide measured in vivo using positron emission tomography, *Cancer Research*, 63:2409-2415pp.
- Schibli, R. and Schubiger, P.A.,** 2002, Current use and future potential of organometallic radiopharmaceuticals, *European Journal of Nuclear Medicine*, 29(11):1529-1542pp.
- Schubert, M. A. and Müller-Goymann, C. C.,** 2005, Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier, *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 61(1):77-86pp.
- Schwarz, C. and Mehnert, W.,** 1999, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization, *J. Microencapsulation*, 16(2):205-213pp.
- Schwarz, C., Mehnert, W., Lucks, J.S. and Müller, R.H.,** 1994, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, *J. Cont. Rel.*, 30:83-96pp.
- Şenışık, M.,** 2014, Glisilglisin bağılı [<sup>18</sup>F]FDG ile glisilglisin bağılı [<sup>99m</sup>Tc(CO<sub>3</sub>)]<sup>+</sup> sentezi ve biyolojik davranışlarının in vivo karşılaştırılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü
- Şenocak, K.,** 2010, [<sup>99m</sup>Tc(CO)<sub>3</sub>]<sup>+</sup> kuru ile işaretli bisfosfonat bileşiğinin radyofarmasötik potansiyelinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü
- Tran, P. A., Zhang, L. and Webster, T.J.,** 2009, Carbon nanofibers and carbon nanotubes in regenerative medicine, *Advanced drug delivery reviews*, 61(12):1097-114pp.
- Uçar, E.,** 2010, Biberiye (*Rosmarinus Officinalis* L.) bitkisi ekstraktının <sup>99m</sup>Tc ile işaretli kükürt kolloidinin biyodağılımı ve radyoişaretli kan bileşenleri üzerine etkisinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü
- Venkateswarlu, V. and Manjunath, K.,** 2004 Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles *J. Cont. Rel.*, 95:627-638pp.

**KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)**

- Wissing, S.A., Kayser, O. and Müller, R.H.,** 2004, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Del. Rev.*, 56:1257-1272pp.
- Yurt, A.,** 2007, DTPA Bağlı Toremifen' in <sup>99m</sup>Tc ile İşaretlenerek Radyafarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü
- Zhou, H., Rao, J., Lin, J., Yin, B., Sheng, H., Lin, F., Zhang, N. and Yang, L.,** 2011, The insulin-like growth factor-I receptor kinase inhibitor NVP-ADW742 sensitizes medulloblastoma to the effects of chemotherapy, *Oncology reports*, 25(6):1565-1571pp.



## ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı:** Kadir ARI

**Doğum Yeri:** İzmir / TÜRKİYE

**Doğum Tarihi:** 05.07.1988

**Öğrenim Durumu:**

***Lisans:*** Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü (2007 – 2012)

***Yüksek Lisans:*** Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı (2012 - 2015)





