

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ İLE RADYOİŞARETLİ D-PENİSİLAMİN
BAĞLI MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN
HAZIRLANMASI**

Seniha (YOLCULAR) ÖZYÜNCÜ

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi :22.01.2009

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Serap TEKSÖZ

Bornova, İZMİR

Sayın Seniha (YOLCULAR) ÖZYÜNCÜ tarafından Yüksek Lisans tezi olarak sunulan “ $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ ile Radyoişaretli D-Penisilamin Bağlı Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması” 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 22.01.2009 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. Suna Timur

.....

ÖZET **$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ İLE RADYOİŞARETLİ D-PENİSİLAMİN BAĞLI
MANYETİK NANOPARÇACIKLARIN HAZIRLANMASI**

(YOLCULAR) ÖZYÜNCÜ, Seniha

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. Serap TEKSÖZ

Ocak 2009, 88 sayfa

Bu çalışmanın amacı D-Penisilamin (D-PA) manyetik nanoparçacıklarının sentezlenerek $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile radyoişaretlenmesi ve bu yapının biyolojik aktivitesinin hücreler üzerinde incelenmesidir. Bu amaçla öncelikle kısmi indirgeme yöntemiyle elde edilen manyetik nanoparçacıklar silika tabakası ile kaplanmıştır. Daha sonra amino silan ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmiş olan bu parçacıkların yapısal özellikleri Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM), X-Işını Kırınımı (XRD) ve Titreşimli Örnek Manyetometresi (VSM) cihazları ile belirlenmiştir. Ardından D-PA molekülü manyetik nanoparçacıklara bağlanmış ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile radyoişaretlenmesi sağlanmıştır. Elde edilen $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile işaretli D-PA manyetik nanoparçacıklarının, $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$, Cd(Te) dedektöründen alınan

aktivite sayımlarıyla radyoişaretleme verimi hesaplanmıştır. Sonuçlar manyetik parçacıkların radyoişaretleme veriminin oldukça yüksek olduğunu (% 97.05) ve parçacıklarla [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ koru arasında kimyasal bir bağlanma gerçekleştiğini göstermiştir.

Bu çalışmada aynı zamanda D-PA molekülünün [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ koru ile radyoişaretleme gerçekleştirilerek oluşan [$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] bileşiğinin kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyokromatografisi (HPLRC) ile gerçekleştirilmiştir. Bununla birlikte [$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -M-D-PA] ve [$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] bileşikleri için yapılan serum stabilite çalışmalarında her iki bileşiğinde kararlılıklarını 24 saat süresince korudukları gözlenmiştir. Sonuç olarak elde edilen bu bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ise kanserli bir meme hücresi olan MCF-7 hücreleri üzerinde incelenmiştir. İşaretli bileşiklerden MCF-7 hücreleri üzerindeki en yüksek bağlanma verimi manyetik alan uygulanmış kuyulardaki [$\text{Tc}(\text{CO})_3$ -M-D-PA] ile işaretleme yapılmış hücrelerde hesaplanmıştır.

Böylelikle bu çalışmadan edilen bilgilerin [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ koru ile radyoişaretleme manyetik özellik taşıyan nano boyutlu yeni tanı ajanlarını oluşturmaya katkısı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Penisilamin, manyetik nanoparçacıklar, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$] $^+$ kor, radyoişaretleme

ABSTRACT**PREPARATION OF D-AMINO ACID MAGNETIC
NANOPARTICLES WITH $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$**

(YOLCULAR) OZYUNCU, Seniha

Master Thesis, Institute of Nuclear Sciences

Supervisor : Doç. Dr. Serap TEKSOZ

January 2009, 88 pages

The aim of this study is to synthesize D-Penicillamine (D-PA) magnetic nanoparticles radiolabeled with $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ core and investigate the biological activity of this complex on the cells. For this purpose, first of all, the nanoparticles were prepared by partial reduction method and magnetite nanoparticles coated with silica layer. Furthermore, surface modified with an amino silane coupling agent's structural properties of the particles were characterized by Scanning Electron Microscope (SEM), X-ray Diffraction (XRD) and Vibrating Sample Magnetometer (VSM). After that D-PA was linked with the magnetic nanoparticles and has been radiolabeled with $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ core. Radiolabeling efficiency of $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ were established by Cd(Te) detector. The results showed that the radiolabeling yield was quite high (% 97.05) so D-PA occurred chemically binding to the magnetic nanoparticles.

VIII

At the same time, in this study, quality control study of radiolabeled D-PA molecule with $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ core was performed by Thin Layer Radio Chromatography (TLRC) and High Performance Liquid Radio Chromatography (HPLRC). Beside that $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ complexes have showed good in vitro stability during the 24 hour period. At the end, biologic activities of binding complexes were investigated on MCF-7 human breast cancer cells. Among this radiolabeled complexes, $[\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ showed the highest uptake on MCF-7 cells which were applied magnetic field in wells.

In that case, result of this study emphasizes that radiolabelled magnetic nanoparticles with core $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ would support new occurrences of new agents.

Key Words: Penicillamine, magnetic nanoparticles, $[\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ core, radiolabeling

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince yardımlarını ve değerli zamanını esirgemeyen tez danışmanım Sayın **Doç. Dr. Serap TEKSÖZ'** e, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü ve Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Perihan ÜNAK'** a, her konuda dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen **Araş. Gör. Çiğdem İÇHEDEF'** e ve her zaman destekleriyle yanımda olan sevgili eşime ve aileme en içten teşekkürlerimi sunarım.

Seniha (YOLCULAR) ÖZYÜNCÜ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XVII
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XIX
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXI
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	7
2.1 Nanoteknoloji.....	7
2.1.1 Manyetik Nanoparçacıklar ve Yüzey kaplamaları.....	8
2.2 Nanoteknoloji ve Sağlık Uygulamaları.....	11
2.2.1 Radyofarmasötik.....	11
2.2.2 Radyoaktif Mikroküreler.....	12
2.2.3 Hedefe Yönelik Uygulamalar.....	14
2.3 Teknesyum.....	15
2.3.1 Teknesyum-99m.....	16

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
2.3.2 Teknesyum-99m' in Koordinasyon Kimyası.....	17
2.4 Aminoasitler.....	20
2.4.1 Penisilamin.....	22
2.4.2 Penisilaminin Kimyasal Özellikleri.....	23
2.5 Çalışmada Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri.....	25
2.5.1 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC).....	25
2.5.2 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	26
2.6 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	27
2.6.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM).....	27
2.6.2 X-Işınları Kırınım Ölçümleri (X-Ray Diffraction, XRD).....	31
2.6.3 Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM).....	32
2.7 Lipofilite.....	33
2.8 Hücre Kültürü.....	33
3. MATERYAL VE METOD.....	36
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	36

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	36
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	37
3.2 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Yüzey Kaplama.....	38
3.2.1 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi.....	38
3.2.2 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Amino Silan ile Yüzey Modifikasyonu (AEAPS).....	39
3.2.3 D-Penisilaminin Manyetik Nanoparçacıklarla Bağlanması.....	40
3.3 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi.....	40
3.4 [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ Korunun Hazırlanması ve Radyoişaretleme.	41
3.4.1 [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ Korunun Hazırlanması.....	41
3.4.2 D-Penisilamin Bağlanmış Manyetik Nanoparçacıkların [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ Kuru ile İşaretlenmesi.....	42
3.4.3 D-Penisilaminin [^{99m} Tc(CO) ₃ (H ₂ O) ₃] ⁺ Kuru ile İşaretlenmesi....	42
3.5 Radyoişaretleli Bileşiklerin Kalite Kontrolleri.....	43
3.5.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC).....	43
3.5.2 Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC).....	44
3.5.3 Lipofilite Analizi.....	44
3.5.4 Serumda Stabilite.....	45

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
3.6 Radyoişaretli Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi...	45
3.6.1 Kontrol Çözeltisi Olarak [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması.....	46
3.6.2 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Kuru ile İşaretli D-Penisilamin Bağlı Manyetik Nanoparçacıklar.....	46
3.6.3 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Kuru ile İşaretli D-Penisilamin.....	47
3.6.4 MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi.....	47
3.6.5 İstatistik Çalışması.....	49
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	49
4.1 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Yüzey Kaplama....	49
4.1.1 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi.....	54
4.1.2 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Amino Silan ile Yüzey Modifikasyonu (AEAPS).....	57
4.2 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması ve Radyoişaretleme.	61
4.2.1 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması.....	61
4.2.2 D-Penisilamin Bağlanmış Manyetik Nanoparçacıkların [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Kuru ile İşaretlenmesi.....	65
4.2.3 D-Penisilaminin [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Kuru ile İşaretlenmesi...	66
4.3 Lipofilitte.....	70

İÇİNDEKİLER (Devam)

	Sayfa
4.4 Serumda Stabilite.....	71
4.5 Radyoişaretli Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi..	72
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
ÖZGEÇMİŞ.....	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
2.1 Manyetik ilaç hedefleme ile sistemik ilaç dağılımının karşılaştırılması.....	15
2.2 [^{99m} Tc(OH ₂)(CO) ₃] ⁺ korunun hazırlanması.....	19
2.3 Amino asit molekülünün genel yapısı.....	20
2.4 Penisilamin ve stereoizomerleri; (a) D-Pensilamin, (b) L-Penisilamin.....	23
2.5 Taramalı elektron mikroskopunun şematik görünüşü.....	30
3.1 24' lük flaskın genel yapısı ve hücrelerin radyoaktif bileşiklerle işaretlenme sırası.....	48
4.1 Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait 1 µm ölçekte SEM görüntüsü.....	55
4.2 Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait 500 nm ölçekte SEM görüntüsü.....	55
4.3 Silika kaplı manyetik nanaoparçacıklara ait XRD görüntüsü.....	56
4.4 Silika kaplı manyetik nanoparçacıkların VSM analizi.....	57
4.5 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların 1µm ölçekteki SEM görüntüsü.....	58
4.6 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların 500 nm ölçekte SEM görüntüsü.....	59
4.7 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların XRD görüntüsü.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

	Sayfa
4.8 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu...	60
4.9 (a) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ve (b) $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları.....	63
4.10 $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerine ilişkin HPLRC diyagramı.....	64
4.11 (a) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, (b) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları.....	68
4.12 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc-D-PA}]$ komplekslerine ilişkin HPLRC kromatogramı (Cd(Te) dedektörü).....	69
4.13 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ komplekslerine ilişkin HPLRC kromatogramı (Cd(Te) dedektörü).....	70
4.14 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ bileşiğinin zamana bağlı olarak değişen % bağlanma verimleri.....	72
4.15 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ (manyetik alan uygulanmış) bileşiklerinin zamana bağlı olarak MCF-7 hücrelerine bağlanma verimleri.....	73
4.16 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ (manyetik alan uygulanmış) bileşiklerine ait bağlanma verimleri.....	74

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
2.1 Standart amino asitler.....	22
2.2 Penisilaminin kullanım alanları.....	24
2.3 Mikroskopların farklı özellikleri.....	28
4.1 D-Penisilamin bağlı magnetik nanoparçacık oluşumu akım şeması.....	50
4.2 [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$] komplekslerine ilişkin Rf değerleri.....	61
4.3 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$] kompleksinin % verim değerleri.....	62
4.4 Radyoişaretleli D-PA bağlı manyetik nanoparçacıklara ait % verim	65
4.5 Komplekslere ilişkin Rf değerleri.....	66
4.6 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] kompleksine ait % verim değerleri.....	66
4.7 ^{99m}Tc -D-PA ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] için lipofilite sonuçları.....	71
4.8 İşaretleli bileşiklerin MCF-7 hücreleri üzerindeki % bağlanma verimleri.....	73

KISALTMALAR

D-PA	D-Penisilamin
AEAPS	N-2-aminoethyl-3-aminopropyl-trimethoxysilane
SG-Si900	N-[3-(trimethoxyysiyl)propyl]-ethylenediamine
TEOS	Tetraetil ortosilikat
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi
SF	Serum Fizyolojik
MeOH	Metanol
HCl	Hidroklorik Asit
Rf	İlerleme Mesafesi (Relative Front)
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
XRD	X-Işınları Kırınım Ölçümleri (X-Ray Diffraction)
VSM	Titerşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer)
$[^{99m}\text{TcO}_4]^-$	Teknesyum Perteknatat
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]$	Teknesyum(I) Trikarbonil Kuru
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$	Teknesyum(I) Trikarbonil Kuru ile İşaretli D-PA

KISALTMALAR (Devam)

[^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] Teknesyum(I) Trikarbonil Kuru ile İşaretli D-PA
Bağlı Manyetik Nanoparçacıklar

1. GİRİŞ

Bugün yeni nesil yüksek teknoloji malzemeleri olarak adlandırılan nano malzemeler elektronik, biyoteknoloji gibi çeşitli araştırma gruplarını da içine alarak yetmişli yıllardan günümüze kadar gelişimini sürdürmektedir. Bu malzemelere manyetik özellik kazandırılarak özellikle biyomedikal alanlarda kullanımı giderek önem kazanmaktadır (Pileni, 1977; Prigogine et al., 1977; Cao et al., 2004).

Sağlık uygulamalarında özellikle kanser tedavisinde manyetik ilaç hedefleme oldukça etkin bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Manyetik ilaç hedeflemede tedavi sınırlandırılmış hastalıklı bir bölgeye bir ilacın serbest bırakılması ile gerçekleşmektedir (Widder et al., 1979; Gupta and Hung, 1989; Häfeli et al., 1997).

Demir oksit nanoparçacıkların ilaç hedefli sistemler için uygun bir taşıyıcı malzeme olduğu gözlenmektedir. Bu sınıftaki parçacıklar süperparamanyetik özellikler gösterirler ve dış bir manyetik alan tarafından yönlendirilebilirler. Parçacıkların boyutları vücut dışından uygulanan manyetik alan tarafından çekilebilmelerine izin verecek büyüklükte olmalıdır. Ancak parçacıkların örneğin vasküler sistemde emilmelerini önlemek için ise gerekli parçacık boyutu 5 µm den küçük olmalıdır (Müler et al, 2001; Sachdeva, 1998).

Manyetik nanoparçacık boyutunun öneminin yanı sıra sentezlenen bu parçacıkların aglomerasyon (topaklanma) veya çökelme olmadan kararlılıklarını uzun bir süre korunması oldukça önemlidir. Bu nedenle demir oksit nanoparçacıklarının yüzeylerinin iyileştirilmesi yani kaplanması gerekmektedir. Biyolojik uygulamalar için manyetik nanoparçacıkların yüksek manyetik doyumluk ile birlikte biyoyum ve yüzey etkileşim gibi özelliklerinin de bir arada olması gerekir. Bu nedenle manyetik parçacıkların yüzeyleri organik polimer veya inorganik moleküllerle kaplanarak yüzey iyileştirmesi (modifikasyon) gerçekleştirilir. Böylelikle manyetik parçacıklara çeşitli biyoaktif moleküller bağlanarak daha fazla amaca hizmet etmesi sağlanabilmektedir (Berry and Curtis, 2003). Parçacıkların silika ile manyetik kaplanmasının bir yöntemi 1990' ların başında Philipse tarafından geliştirilmiştir. Manyetik nanoparçacıkların yüzeyi bir silika tabakası ile kaplandığında parçacıkların dağıtılmasıyla etkili bir yüzey yaratılabilir veya parçacıklar arasında kontrol elektron tüneli oluşturularak yalıtıcı bir tabaka oluşturabilir. Bu durum yük geçişinde önemli olabilir. Aynı zamanda silika ile parçacıkların kaplanması toksisiteye karşı daha iyi koruma sağlayabildiği gibi manyetik yapının oksitlenmesini de önleyebilir (Philipse, 1994; Cao et al., 2004).

Manyetik taşıyıcılar ilk kez doxorubicin gibi sitotoksik ilaçların sıçan kuyruklarına aşılmasına ile sarkoma tümörlerini hedeflemek için kullanılmıştır (Widder et al., 1983). Bu çalışmadan sonra, sitotoksik ilaç dağılımı ve tümör gerilemesinde elde edilen başarı domuz, tavşanlar ve sıçanlar kullanılarak çeşitli gruplar tarafından rapor edilmiştir (Goodwin

et al., 1999, 2001; Alexiou et al., 2000; Puller ve Gallo, 1999). Manyetik taşıyıcılar aynı zamanda beyin tümörlerine karşı sitotoksik ilaç hedeflemede kullanılmıştır (Puller et al., 1999).

Manyetik nanoparçacıkların radyoaktif maddeler ile işaretlenmesi sonucu manyetik radyoaktif nanoparçacıklar elde edilebilmektedir. Manyetik radyoaktif nanoparçacıklar hedef alana radyoaktivitenin yüksek bir miktarını bırakabilme özelliğine sahiptir. Bugüne kadar ^{188}Re , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I ve ^{90}Y gibi çeşitli radyonüklidler kullanılarak radyoişaretli manyetik hedefli taşıyıcılar elde edilmiştir (Yu et al, 2003, Hafeli et al., 1995). Chunfua ve arkadaşları; 200 nm boyutunda HSA (Human Serum Albumin) kaplı manyetik nanoparçacıklar sentezlemişler ve bölgesel hedefli terapi için bu parçacıkları ^{188}Re ile işaretlemişlerdir. Optimum şartları belirleyerek % 90 işaretleme verimi ile 72 saat kararlı işaretli manyetik nanoparçacıklar elde etmişlerdir (Chunfua et al., 2004).

Liang ve arkadaşları; süperparamanyetik demir oksit parçacıkları sentezlemişler, yüzeylerini amino silan ile kaplanmışlardır. Bu silan kaplı parçacıklara Hepama-1 (monoklonal antikor) bağlanmış, ^{188}Re ile radyoişaretleme çalışması gerçekleştirilmiş ve SMMC-7721 karaciğer kanser hücreleri üzerinde yapılan deneyler sonucunda sentezlenen bileşiğin kanserli hücrelerde ölüme neden olduğu ortaya konulmuştur (Liang et al., 2007).

Fu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmaya göre; manyetik nanoparçacıklar Fe(II) ve Fe(III) çözelti karışımı kullanılarak elde edilmiş (Fe_3O_4) ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ çözeltiye eklenerek radyoişaretleme

sağlamışlardır. İşaretleme verimini % 90' in üzerinde bulmuşlar ve biyodağılım sonuçlarında ise radyoişaretleli manyetik nanoparçacıkların sıçana enjekte edilmesiyle karaciğerde yüksek tutulum gözlemişlerdir. Daha sonra kalçaya uygulanan manyetik alan ile işaretleli manyetik nanoparçacıklar hızla bu alana hareket etmişlerdir. Fu ve arkadaşları bu çalışma ile hedeflenen teşhis için ^{99m}Tc işaretleli manyetik nanoparçacıkların uygulanabilir olduğunu göstermişlerdir (Fu et al., 2004).

Häfeli ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada, manyetik poli(laktik asit) molekülünün bir β salıcı olan ^{90}Y ile radyoişaretlelenmesi sağlanmıştır. Tümörlü fareler üzerinde yapılan biyodağılım sonuçlarında manyetik alan uygulanan tümörlü dokudaki radyoaktivite tutulumunu %73 \pm 32; manyetik alan uygulanmayan tümörlü dokuda ki radyoaktivite tutulumunu ise %6 \pm 4 olarak tespit etmişlerdir (Häfeli et al., 1999).

Enstitümüzde son yıllarda radyonüklitlerle işaretleli manyetik nanoparçacıklar oluşturularak bu yapıların biyolojik uygulamaları ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Dağdeviren ve arkadaşları ilaç taşıyıcısı olarak I-131 işaretleli manyetik nanoparçacıkları çok iyi bir şelatlayıcı molekül olan 8-hidroksikinolin ile hazırlamışlardır. İşaretleme verimi ve kararlılığı ile bağlanma verimi yüksek olan bu radyoişaretleli kompleksin ilaç taşıyıcısı olarak kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Dağdeviren et al., 2007; Bekiş vd., 2008). Bir başka ilaç taşıyıcı amaçlı yapılan çalışmada ise Tc-99m ile işaretleli manyetik nanoparçacıklar hazırlanmıştır (Unak and Medine, 2007). Bu konudaki bir diğere çalışmada ise aynı

şekilde manyetik özellik kazandırılarak urasil ve urasil glukuronid türevlerinin İyot-125 ve İyot-131 radyoizotopu ile işaretlenerek tümör hücrelerinin tanı ve tedavisinde hedefe yönelik kullanılması araştırılmıştır (Medine, 2008).

Manyetik nanoparçacıklar tedavi amaçlı kullanıldıkları gibi, iyi bir görüntüleme radyonüklidi olarak bilinen ^{99m}Tc ile oluşturulan manyetik nanoparçacıklar da tanı amacıyla kullanılabilir. Tc zengin bir koordinasyon kimyasına sahiptir. Radyofarmasötik uygulamalar için altı koordinatlı Tc(I) ve Re(I) trikarbonil komplekslerinin temel kimyası (*fac*- $\text{M}(\text{CO})_3$) Alberto ve arkadaşları tarafından geliştirilerek ^{99m}Tc ve ^{188}Re 'un sulu kompleksleri, $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, ile çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar son yıllarda Tc(I) koru ile daha üstün özelliklere sahip radyofarmasötiklerin elde edilmesine olanak sağlamaktadır (Alberto et al., 1999; Alberto et al., 1998).

Bir çok kompleks oluşumunda olduğu gibi, $[\text{M}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru da aromatik azot ve tiyoeter gibi elektron çifti içeren ligandları tercih eder. Bu nedenle aminoasitler $[\text{M}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru ile kompleks oluşturabilirler (He et al., 2005).

Aynı zamanda amino asitlerin tutulumunun tümör dokusunda protein sentezi için oldukça hızlı olduğu bilinen bir gerçektir. Böylece radyoşaretli amino asitler tümör işaretleme veya radyoterapide kullanılabilir. Bu amaçlarla yapılan çalışmalarda amino asitlerin $[\text{M}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru ile işaretlemeyle oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Cao et al., 2004).

Amino asitlerin sahip olduğu bu üstünlüklere bağlı olarak bu çalışmada bir D-amino asit olan D-Penisilamin tercih edilmiştir. D-Penisilamin ile hazırlanacak olan manyetik nanoparçacıkların $[Tc(CO)_3]^+$ koru ile işaretlenmesi amaçlanmaktadır. Böylelikle bu çalışmada alınacak sonuçların gelecekte yeni tanı ajanlarının oluşumuna katkısı olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Nanoteknoloji

Nanoboyut insan hücrelerinden daha küçük bir aralığı tanımlamaktadır. Nanomateryaller enzimler ve reseptörler gibi büyük biyolojik moleküllerle (biyomoleküller) benzer boyutlardadır. Örneğin, kırmızı kan hücrelerindeki oksijeni taşıyan hemoglobin molekülü yaklaşık 5 nm çapındadır. Nanoboyutu 50 nm' den daha küçük olanlar kolaylıkla birçok hücreden geçebilirler. 20 nm' den küçük olanlar ise kan damarlarının dışına taşınabilirler.

Nanomateryaller küçük boyutlara sahip oldukları için kolaylıkla hücrelerin yüzeyindeki ve içindeki biyomoleküllerle etkileşebilirler. Vücudun oldukça geniş alanına ulaşarak tedavi dağılımı ve hastalık tanısında daha önceki yöntemlere göre beklenmedik bir potansiyele sahiptirler. Biyolojik yöntemlerin sonuçlarına göre, kansere ulaştırmak, hücrelerin içinde bulunmak, nanoteknoloji araçlarının bir zenginliğini göstermektedir. Yani kanser tedavisi ve tanısında yeni ve yenilikçi yollarla kanser araştırmalarını sağlamaktadır.

Bugün, kanser ilişkili nanoteknoloji iki ana alan üzerinde ilerlemektedir: (i) laboratuvar bazlı tanılayıcılar. (ii) in vivo tanılayıcılar ve terapötikler.

Nanoboyut içinde yer alan daha iyi ve son derece etkili terapötik ajanların sayısındaki çarpıcı artış kanser tedavisinde radikal bir değişim yaratma potansiyeline sahiptir. Bu örnek içinde yer alan nanoparçacıklar, kötü bir lezyonun moleküler görüntülenmesinde kullanılmak üzere

kanser hücrelerini hedeflemektedir. Nanoparçacıkların büyük miktarları vücuda güvenli bir şekilde enjekte edilir ve tercih edilen kanser hücrelerine bağlanır. Lezyonun anatomik çevresi tanımlanır ve lezyon bu şekilde görünür hale getirilir.

Nanoparçacıklar bize hücreleri ve molekülleri görebilme yeteneğini sağlar. Aksi takdirde biz geleneksel görüntüleme yoluyla hücreleri ve molekülleri dedekte edemeyiz. Hücre içinde olanları öğrenebilme yeteneği hastalıkların tanısı ve tedavisindeki başarıda oldukça önemlidir.

Nanoparçacık teknolojisinin kanser tedavisinde oldukça faydalı olduğu ispat edilebilir. Birçok biyolojik, biyofizik ve medikal engelleri yenmekte etkili ve hedefli ilaç dağılımına izin vermektedir (<http://nano.cancer.gov/index.asp>).

2.1.1 Manyetik Nanoparçacıklar ve Yüzey Kaplamaları

Manyetik nanoparçacıkların hazırlanmasında iki metod kullanılmaktadır: Boyut indirgeme (Papel, 1965) ve kimyasal çökeltme (U.S. Patent 3,843,540 (1974)). Boyut indirgemedeki mikron boyutdaki manyetik toz bir kaç haftalık bir periyotla öğütmek amacıyla bir top değirmende bir solvent ve bir seyrelticiyle karıştırılır. Kimyasal çökeltme ise son zamanlarda manyetik parçacıkların hazırlanmasında en çok kullanılan yöntemdir. Bu amaçla farklı prosedürler geliştirilmiştir. Genel olarak bu yöntemler $FeCl_2$, $FeCl_3$ ve suyun bir karışımı ile başlar. Birlikte çökeltme amonyum hidroksit eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Daha sonra sistem peptit oluşumu, manyetik ayırma, filtrasyon ve en sonunda da seyreltmede farklı uygulamalara tabi tutulur (Scherer and Figueiredo Neto, 2005).

Manyetik akışkanlar veya demir akışkanlar çoğunlukla nano boyutlu demir oksit parçacıklarına (Fe_3O_4 veya $\gamma-Fe_2O_3$) dayanmaktadır. Bir manyetik koloid akışkan demir olarak bilinmektedir ve manyetik parçacıkların koloidal süspansiyonudur. Son yıllardaki önemli ilerlemeler manyetik mikrosiferler, manyetik nanosiferler ve demir akışkanlar alanındaki teknolojilerin gelişmesine neden olmaktadır. Manyetik parçacıklar çoğu kez süperparamanyetik olarak adlandırılırlar. Bu parçacıklar yüzeysel bir manyetik alanla kolaylıkla manyetize edilebilirler. Tipik boyutları 10 nm civarındadır ve likid bir taşıyıcı içinde dağılmışlardır (Papel, 1965; Rosensweig and Kaiser, 1967; Rosensweig, 1997; Saiyed et al., 2003). Likid taşıyıcı polar veya polar olmayan yapıda olabilir. 1960' lardan beri bu materyallerin teknolojik uygulamaları durmaksızın artmaktadır.

Aglomerasyon (topaklanma) veya çökme olmaksızın manyetik nanoparçacıkların sentezlenmesi ve kararlılığının uzun süre korunabilmesi oldukça önemli bir konudur. Manyetik nanoparçacıkların kararlılığı hemen hemen bütün uygulamaları için çok önemli bir zorunluluktur. Özellikle Fe, Co ve Ni gibi saf metaller ve onların metal alaşımları havaya oldukça hassastırlar. Bu nedenle, saf metaller veya onların alaşımlarının kullanılmasındaki temel zorluk havada oksitlenmeleridir. Bu nedenle, manyetik nanoparçacıkların gelişmiş kimyasal kararlılığını arttırıcı etkili stratejilerin geliştirilmesi zorunludur (Schüth et al., 2007). Bunun için en doğru metod parçacıkların geçilemez bir tabaka ile kaplanmasıdır. Böylelikle oksijen manyetik parçacıkların yüzeyine ulaşamaz.

Nanoparçacıkların yüzey kaplaması iki tür malzeme ile gerçekleştirilir:

- (i) yüzey aktif veya polimer içeren organik tabakalarla kaplama;
- (ii) silika, karbon, değerli metaller (Ag, Au) veya oksitleri içeren inorganik bileşenlerle kaplama.

Polimerik kaplayıcı materyaller sentetik ve doğal olarak sınıflandırılabilir. Poli(ethylene-co-vinyl acetate), poly(vinylpyrrolidone) (PVP), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly(ethyleneglycol) (PEG), poly(vinyl alcohol) (PVA) sentetik polimer sistemlerdeki tipik örneklerdir. Doğal polimer sistemler ise jelatin, dextran, chitosan, pullulan gibi polimerleri içeren sistemlerdir. Sodyum oleat, dodesilamin ve sodyum karboksimetilselüloz gibi çeşitli yüzey aktif maddeler aynı zamanda genellikle sulu bir ortam içinde dağıtılarak kullanılabilir (Gupta and Gupta, 2005; Schüth et al., 2007).

Silika ile kaplanmış manyetik nanoparçacıklar manyetik nanoparçacıkların geliştirilmesinde ümit verici ve önemli bir yaklaşım olmaktadır. İlk olarak, manyetik nanoparçacıkların yüzeyindeki silika formu manyetik nanoparçacıklar arasındaki manyetik dipolar çekimi perdeleyebilir. Bu asidik bir ortamda filtrelemeyi sağlayarak onları korur ve sıvı ortamda manyetik nanoparçacıkların dağılmasına yardım eder. İkinci olarak, silika tabakasında bulunan yoğun silanol gruplarının varlığından dolayı, silika kaplı manyetik nanoparçacıklar çeşitli fonksiyonel gruplarla manyetik nanoparçacıkların yüzeyinin kolaylıkla aktif hale getirilebilmesini sağlar. Son olarak, en önemlisi silika tabakası biyolojik sistemlerde manyetik nanoparçacıklar için kimyasal olarak inert bir yüzey sağlar (Deng et al., 2005).

Demir oksit nanoparçacıkları silika, altın veya gadolonyum ile kaplanmaktadır. Bu tabakalar çözeltideki nanoparçacıkların stabilitesini korumakla kalmaz aynı zamanda çeşitli biyomedikal uygulamalar için nanoparçacık yüzeyine çeşitli biyolojik ligandlar bağlanmasına da yardım eder (Gupta and Gupta, 2005).

2.2 Nanoteknoloji ve Sağlık Uygulamaları

2.2.1 Radyofarmasötik

Radyofarmasi, radyofarmasötiklerin hazırlanması, kalite kontrolü ve uygulanması ile uğraşan bilim dalıdır. Radyofarmasötikler ise; insanlarda tanı ve tedavi amacı ile kullanılan, bileşiminde radyonüklid içeren ilaçlardır.

Günümüz Nükleer tıbbında hemen hemen radyofarmasötiklerin % 95' i tanı % 5' i ise tedavi amacıyla kullanılır. Radyofarmasötikler pek çok durumda izleyici miktarlarda kullanıldıkları için farmakolojik etkiye sahip değildir.

Radyofarmasötik terimi yaygın olarak kullanılmasına rağmen radyoizleyici, radyodiagnostik ajan, işaretli izleyici gibi terimler de çeşitli gruplar tarafından kullanılmıştır. Sonradan kullanılan bu isimlendirmeler, bu bileşiklerin gerçek anlamda ilaç olarak değil tanı amaçlı ajanlar olarak kullanıldıklarını savunur. Bu görüşlerin aksine, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu) radyofarmasötikleri, tanı veya tedavi ajanları olmalarına bakmaksızın sınıflandırır.

Dikkat edilmesi gereken bir diğerk nokta da radyokimyasallar ile radyofarmasötikler arasındaki farklılıktır. Radyokimyasalların sterilite ve nonpirojenite eksikliğinden dolayı insanlara verilmesi uygun değildir. Diğer taraftan radyofarmasötikler steril ve nonpirojendirler ve insanlara güvenle verilebilirler. Radyokimyasallar steril ve nonpirojen hale getirilseler bile ilaç ruhsatlama ile ilgili ulusal ve uluslararası mevzuatlar tamamlanmadan radyofarmasötik olarak kullanılamazlar.

Bir radyofarmasötik: radyonüklid ve ligand olmak üzere iki kısımdan oluşur. Radyofarmasötiklerin kullanışlılığı bu 2 kısmın özellikleri ile belirlenir. Bir radyofarmasötiğın tasarımında; öncelikle bir organ içinde birikip (lokalize olacak) veya organın fizyolojik fonksiyonuna katılacak ligand seçilir. Daha sonra uygun bir radyonüklid, seçilen liganda takılır, bu işleme işaretleme denir. Radyofarmasötiğın verilmesinden sonra, ondan yayılan radyasyonlar bir radyasyon dedektörü ile algılanır. Böylece morfolojik yapı veya organın fizyolojik fonksiyonu belirlenebilir. Bir radyofarmasötiğın insana verilmesi için güvenli ve nontoksik olması gereklidir. Vücuda verilen radyofarmasötiklerden yayılan radyasyonlar gama kamera ile kolayca saptanabilir (Ünak, 2003).

2.2.2 Radyoaktif Mikroküreler

Manyetik mikroküreler kanserli hücrelerde, tümörlerde ve organlarda farmasötik ajanların seçici olarak dağıtılması ve geliştirilmiş hedef etkinliğiyle önerilmekte ve geliştirilmektedir (Arshadt, 2001). Bununla beraber radyoaktif manyetik mikrokürelerin birincil uygulaması manyetik ilaçların vücuttaki dağılımını incelemeye tanıya dayalı bir

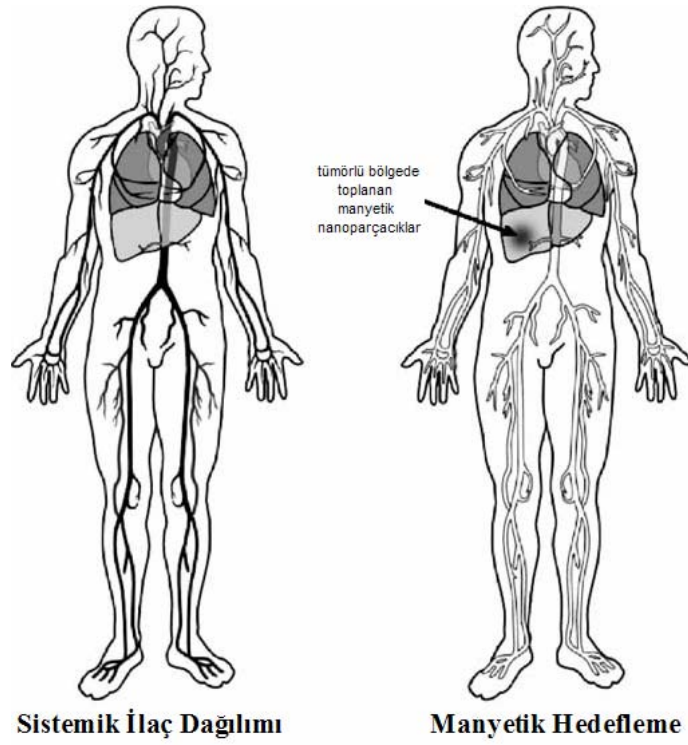
araçtır. Uygulamalar özellikle kanserin tedavisi için halen geliştirilmektedir (Häfeli, 2001).

Manyetik taşıyıcılar manyetit, demir, nikel, kobalt, neodimyum-demir-bor veya samaryum-kobalt gibi birleşik materyallerin bir manyetik alandaki manyetik uyumluluğu olarak kabul edilir. Manyetik taşıyıcılar normal olarak boyuta göre gruplandırılırlar. 10-500 nm aralığındaki kapsüllü nanoparçacıklar genel olarak manyetik nanoküreler, 1-100µm aralığındakiler ise manyetik mikroküreler olarak adlandırılırlar (Häfeli, 2004).

Büyük parçacıklar (300 nm-3,5 µm) gastrointestinal görüntüleme için kullanılır. 60-150 nm boyutlarındaki nanoparçacıklar hızlı bir şekilde karaciğer ve dalakta ortaya çıkar ve enjeksiyona bağlı olarak vücudun reticuloendothelial sistemi tarafından ayrılabilir. Hatta klinik saptamaların altında olan daha küçük parçacıklar (10-40 nm) büyük parçacıklardan daha fazla kan dolaşımında bulunarak kapiler duvarları aşabilir ve sıklıkla lenf başlarında ve kemik iliğinde etkili bir şekilde tutulur. Hatta bu boyutta parçacık yüzeyinde spesifik hedef ligand olmaksızın farklı organ sistemleri görüntülenebilir. Ayrıca kanserli ve normal dokular arasındaki farktan dolayı kanserli dokularda farklı oranda tutulurlar ve bu klinik olarak kanser teşhisi için kullanılabilir. Manyetik ilaç taşıyıcılar yüksek manyetik hassaslığı sebebiyle manyetik alanın fiziksel etkisiyle hedeflenen alana gönderilebilir. Manyetik ilaç taşıyıcıların damar duvarlarına herhangi bir zararı da gözlenmemiştir (Häfeli, 2001, 2003, 2004).

2.2.3 Hedefe Yönelik Uygulamalar

Kemoterapi kanser tedavisinde uygulanan yöntemlerden biridir. Kemoterapi ilaçları çok etkili olmasına rağmen, istenilmeyen ve hatta toksik olan birçok yan etkilere yol açmaktadır. Bölgesel kanser tedavi yaklaşımları kemoterapi ilaçlarının sistemik dağılımı yerine geçen yan etkilerin üstesinden gelmesi açısından önemlidir (Stephens, 1988). Kanser tedavisi için bölgesel bir ilaç dağılım yöntemi araştırmasında manyetik kontrollü hedefle yönelik kemoterapi uygulaması düşünülmektedir (Häfeli et al., 2001). Böylece kemoterapik veya radyolojik ajanların çok yüksek konsantrasyonları çevredeki normal dokulara veya bütün vücuda herhangi bir toksik etki olmaksızın hedef bölgeye yakın elde edilebilir. Şekil 2.1' de sistemik ilaç dağılımı ile manyetik hedefleme karşılaştırılarak manyetik hedeflemede genel kavramın önemi vurgulanmaktadır. Manyetik hedeflemede bir ilaç veya tedavi radyoizotopu bir manyetik bileşiğe bağlıdır. Bu bileşik hastanın kan akımına enjekte edilir ve sonra hedef bölgedeki güçlü bir manyetik alanla durdurulur. İlacın tipine bağlı olarak daha sonra yavaşça manyetik taşıyıcıdan serbest bırakılır (örneğin manyetik mikrokürelerden kemoterapik ilaçların serbest bırakılması) veya bölgesel bir etki verilir (Widder et al., 1979; Gupta and Hung, 1989; Häfeli et al., 1997).



Şekil 2.1 Manyetik ilaç hedefleme ile sistemik ilaç dağılımının karşılaştırılması.

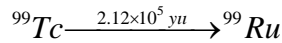
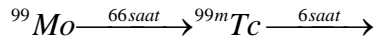
2.3 Teknesyum

Teknesyum 25 izotopu ve 10 izomeri olan; 88-113 arasında atomik kütle değerlerine sahip yapay bir elementtir. Bu çekirdeklerden en çok bilineni Uranyum-235' in fisyon ürünü olan Teknesyum-99 ve nükleer tıp uygulamalarında en çok kullanılan izotopu Teknesyum-99m' dir (Welch and Redvanly, 2003). Teknesyum periyotlar cetvelinde ilk keşfedilen sentetik elementtir. İsmi Yunancada sentetik anlamına gelen technetos' tan gelir. İtalyan bilim adamları Carlo Perrier ve Emilio Segre tarafından 1937 yılında siklotronda molibdenin döteryum ile ışınlanması

sonucunda elde edilmiştir. Bugün ise teknesyum molibdenin nötronlarla ışınlanması ile elde edilmektedir. Teknesyum doğada bulunmaz ancak S-, M- ve N- tipi yıldızların spektral çizgilerinde gözlenebilmektedir (Ünak, 2003).

2.3.1 Teknesyum-99m

Teknesyumun kimyası 1970' den beri dikkat çekici bir gelişime sahiptir. Çünkü onun izotoplarından biri olan ^{99m}Tc tanıya dayalı nükleer tıbbın başlıca dayanağıdır. Teknesyum-99m bazı kimyasal formlar içinde hastanelerde her yıl yapılan teşhis taramalarının % 85' inden fazlasını oluşturmaktadır. ^{99m}Tc ' in nükleer özellikleri teşhisle ilgili işaretlemeler için hemen hemen ideal özelliklerdedir. Tc-99m % 85 olasılıkla 140 keV' lik bir γ -ışını yayınlamaktadır. ^{99m}Tc ' un bu özelliği birçok hastanede bulunan gama kameraları ile görüntüleme için en uygun koşulları sağlamaktadır. Tc-99m 6 saatlik yarı ömrüyle Tc-99m işaretli radyofarmasötiklerin sentezine, onların saflığı analizine, onların hastalara enjeksiyonuna uygundur ve uygulanan işaretleme çalışmalarında hastanın minimum radyasyon dozu alması yeteri kadar kısadır. Kısa yarı ömürlü bir radyonüklidin satın alınmasındaki zorluk ^{99}Mo - ^{99m}Tc jeneratörünün geliştirilmesiyle halledilmiştir. Burada ara radyonüklid ^{99}Mo ($t_{1/2}=66$ saat) ve kız (daughter) radyonüklid ^{99m}Tc ($t_{1/2}=6$ saat) arasındaki geçici dengeyi avantajından faydalanılır.



^{99}Mo ' dan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' in ayrılması, $^{99}\text{MoO}_4^{2-}$ içeren bir alüminyum oksit kolondan steril tuzlu $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ' in seçici ayrılmasıyla gerçekleştirilir. Geçici denge her 23-24 saatte minimum ^{99}Tc ile maksimum $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aktivitesinin en uygun izolasyonu sağlanır.

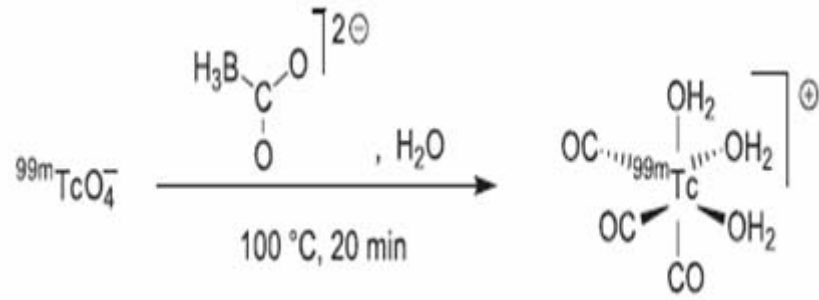
$^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyofarmasötikleri teknesyum esaslı ve teknesyum işaretli olmak üzere iki gruba ayrılabilir. Teknesyum esaslı radyofarmasötiklerde Tc ayrılmaz bir bütünü parçasıdır ve molekül Tc' un yokluğunda hedefe bırakılmaz. Teknesyum işaretli radyofarmasötiklerde hedeflenen parça (antikor, peptit, hormon v.s.) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretlenir. Doğrudan yani aracısız veya bir bifonksiyonel şelatlayıcı bir ajan tarafından işaretleme yapılır ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hedef bölüme ulaşır. Bir bifonksiyonel şelat, metal koordinasyonu için uygun çok dişli yani hedeflenen kısma kovalent bağlanmak için -S, -N, -O gibi fonksiyonel grupları içeren bir ligand grubudur. (Jurrison and Lydon, 1999).

2.3.2 Teknesyum- $^{99\text{m}}$ ' in Koordinasyon Kimyası

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ sekiz yükseltgenme basamağıyla zengin bir koordinasyon kimyasına sahiptir. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ nükleer tıpta tanıya dayalı görüntüleme yaygın olarak kullanılmaktadır. Nükleer tıp uygulamalarında daha önceleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' in (V) yükseltgenme basamağındaki $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}]^{3+}$ kuru yaygın olarak kullanılmaktaydı. Reseptör spesifik radyofarmasötiklerin geliştirilmesinde kullanılan $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}]^{3+}$ komplekslerinde karşılaşılan başlıca engel $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' in (V) yükseltgenme basamağının kararlılığı için ligandın yüksek konsantrasyonu ile işaretleme sonucunda düşük spesifik aktivite elde edilmesidir. Son yıllarda, (I) yükseltgenme basamağındaki organometalik trikarbonil korunun elde edilmesiyle,

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, ^{99m}Tc ' in yüksek spesifik aktiviteli kompleksleri hazırlanmıştır. Bu korunun kullanımı ^{99m}Tc bazlı CNS (merkezi sinir sistemi) reseptör ligandlarının geliştirilmesine uygundur. Sulu ortamda $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ koru ilk olarak 1998' de sentezlenmiştir (Alberto et al., 1998, 1999). $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ içindeki su molekülleri kararsızdır ve karboksilik asitler, fosfinler, tioller, tiyoeterler, tekdişli, ikidişli veya üçdişli aminler veya amidler içeren çeşitli elektron vericilerle yer değiştirebilirler (Alberto et al., 2001). Radyoişaretli biyomoleküllerin in vivo davranışı ^{99m}Tc kompleksi tarafından çok güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Schibbili ve arkadaşları ikidişli ve üçdişli N-,O- içeren ligandlarla elde edilen $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ ile işaretli komplekslerin ilk in vitro ve in vivo çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir Bu çalışmalarda ikidişli liganda sahip komplekslerin böbrek ve karaciğerde yüksek tutulum gösterdiği rapor edilmiştir (Schibbili et al., 2000).

Karbonmonoksit (CO) küçük boyutu ve metal merkezleriyle güçlü bağ yapması nedeniyle çok yönlü bir ligandır. Aynı zamanda suda düşük çözünürlük özelliğine sahip bir gazdır. Alberto ve arkadaşları $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$ nun kantitatif olarak hazırlanmasında $\text{Na}[\text{BH}_4]$ ve CO gazını kullanarak bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu bileşik biyoorganometalik radyofarmasötik kimya için çok faydalı bir başlangıç materyal olarak ortaya çıkmıştır (Alberto et al., 1998). $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$ korunun hazırlanmasına ilişkin yaklaşım Şekil 2.2' de özetlenmiştir.



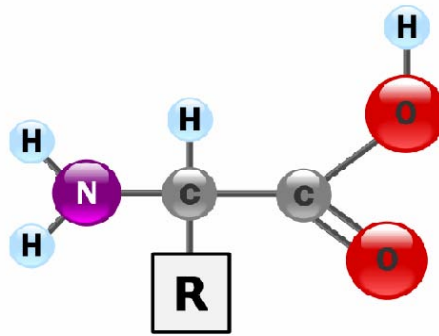
Şekil 2.2 $[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$ korunun hazırlanması (Alberto et al., 1998).

$[^{99m}\text{Tc}(\text{OH}_2)(\text{CO})_3]^+$ nin sulu çözeltileri geniş kullanım alanı sağlamaktadır ve kolaylıkla hazırlanabilmektedir. $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru sp^2 aromatik azot ve tioeter elektron vericileri bulunan ligandları tercih eder. Bir bifonksiyonel yaklaşım olarak aminoasitler veya peptitler içinde yer alan piridil grupları gibi bağlayıcı grupları içeren yapıların $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru ile işaretlenmesinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Piridin halkaları işaretleme verimini arttırmakla kalmaz aynı zamanda lipofilitayı de artırır. Geçmişteki çalışmalarda *in vivo* üçdişli ligandlar ile oluşturulan $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kompleksleri tek- veya ikidişli ligandlar ile oluşturulan komplekslerden daha iyi atılım göstermişlerdir. $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ koru için bir tioeter fonksiyonlu sistein türevleri ve N-, S- ve O- şelatlayıcı halkalarını sağlayan bir grup ideal adaylardır. S-metil-L-sistein (MECYSH) ve methionin gibi bir tioeter gruplu aminoasitler (AAH) bu yaklaşım için uygun bileşiklerdir (Pietsch et al., 2000; Banerjee et al., 2002; He et al., 2005).

2.4 Aminoasitler

Tümör dokusunda protein sentezi için amino asitlerin tutulumu oldukça hızlıdır. Bu nedenle radyoışaretli aminoasitler tümör işaretleme veya radyoterapide kullanılabilirler. Örneğin L-Histidin sahip olduğu imidazol grubu aracılığıyla $[M(CO)_3(OH_2)_3]^+$ (M=Tc, Re) kuru ile kararlı organometalik kompleksler oluşturabilen temel bir aminoasittir (Cao et al., 2004).

Bütün peptitler ve proteinler α -aminoasitlerin polimerleridirler. Şekil 2.3' de görüldüğü gibi bir amino asit amino (-NH₂) ve karboksil (-COOH) fonksiyonel gruplarının her ikisinde içeren bir moleküldür. α -aminoasitlerin genel formülü H₂NCHR⁺COO⁻ dır. Buradaki R bir organik gruptur ve amino asitin türünü belirler. Amino asitlerin kovalent bağlarla uç uca eklenmesiyle oluşturdukları kısa polimer zincirler "peptid", uzun polimer zincirler ise "polipeptid" veya "protein" olarak adlandırılırlar. Hücre içerisinde ribozomlar, mRNA moleküllerini kalıp olarak kullanarak amino asitleri uç uca ekleyerek proteinleri sentezlerler. Bu işleme translasyon (çeviri) denir.



Şekil 2.3 Amino asit molekülünün genel yapısı.

Amino asitler D (dextro) veya L (levo) formlarından (stereoizomerler) birinde bulunabilirler. D ve L optik olarak aktif bileşiklerde mutlak doğrulamayı gösterir. Glisin hariç, diğer bütün amino asitler ayna görüntüsündedirler yani üst üste getirilemezler. Amino asitlerin birçoğu doğal olarak L-tipinde bulunurlar. Bu nedenle ökaryotik proteinlerin daima L-amino asitlerden oluşmasına rağmen D-amino asitler bakteriyel hücre duvarlarında ve bazı peptit antibiyotiklerde bulunurlar.

Yirmi standart aminoasit peptit biyosentezinde hücreler tarafından kullanılmaktadır ve bunlar genetik kod yoluyla belirlenmektedir. Amino asitler esansiyel amino asitler ve esansiyel olmayan amino asitler olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır.

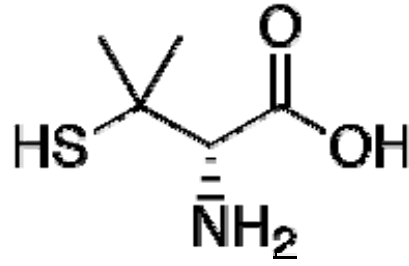
Bir esansiyel amino asit veya zorunlu amino asit vücutta üretilemez ve sadece besinler yoluyla sağlanır. Esansiyel olmayan amino asitler ise vücutta esansiyel amino asitlerin kullanılmasıyla veya proteinlerin bozulmasıyla üretilir. Esansiyel amino asitler ve esansiyel olmayan amino asitler Çizelge 2.1’de verilmiştir. Bu amino asitlerden farklı olarak Histidin yarı-esansiyel olarak dikkate alınmaktadır. Bu 20 amino asitin hepsi yaşam için gerekli amino asitlerdir.

Çizelge 2.1 Standart amino asitler (www.peptideguide.com/amino-acids/index.html).

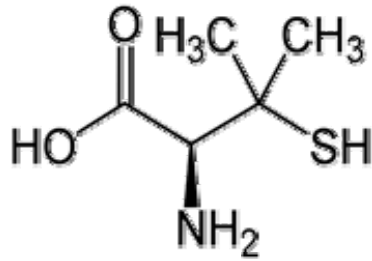
Esansiyel Amino Asitler	Esansiyel Olmayan Amino Asitler
İzolösin	Arginin
Lösin	Alanin
Lizin	Asparajin
Metiyonin	Aspartik asit
Fenilalanin	Sistein
Treonin	Glutamin
Triptofan	Glutamik asit
Valin	Glisin
	Prolin
	Serin
	Tirozin

2.4.1 Penisilamin

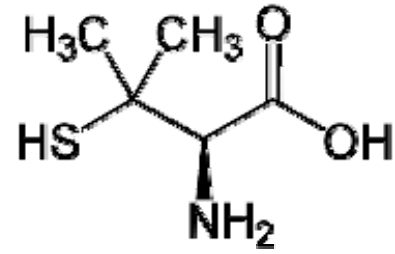
Sistemik (IUPAC) adı (2*S*)-2-amino-3-methyl-3-sulfanyl-butanoic acid' dir. Tüm amino asitlerde olduğu gibi Penisilaminin de D- ve L- stereoizomerleri vardır (Şekil 2.4). L-Penisilamin doğal bir amino asittir ve toksisitesi yüksektir. Bunun yanı sıra D-Penisilamin güçlü bir şelatlama ajanıdır ve tıpta Wilson hastalığında bakırı uzaklaştırmak ve romatoid artrit tedavisinde kullanılır.



Penisilamin



(a) D-Penisilamin



(b) L-Penisilamin

Şekil 2.4 Penisilamin ve stereoizomerleri: (a) D-Penisilamin (b) L-Penisilamin.

2.4.2 Penisilaminin Kimyasal Özellikleri

Penisilamin trifonksiyonel bir amino asittir. Bir karbonil grubu ve bir amino grubu bir karbon atomuna bağlıdır ve bir sülfidril ile iki metil grubu diğer karbon atomuna bağlıdır (Şekil 2.4). Valinden farklı olarak bir sülfidril grubuna sahiptir. Onu sisteinden ayıran ise sistenin ikinci

karbon atomuna iki hidrojen atomunun bağlı olmasıdır. Bu nedenle penisilamin içindeki -SH grubu sistemin aynı konumdaki grubundan sterik olarak çok daha fazla engelleyici durumdadır. D-Penisilamin farmakolojik açıdan bakıldığında doğal olarak bulunan L-izomerine karşı oldukça etkindir. Penisilamindeki üç fonksiyonel grup karakteristik kimyasal reaksiyonlara uğramaktadır. Bunlar asit-baz dengesi, nükleofilik katılma ve yer değiştirme reaksiyonu, farklı metallere bağ oluşturma, yükseltgenme gibi reaksiyonlardır. Ayrıca serbest radikaller oluşturabilirler.

Penisilaminin farmakolojik ve terapötik etkileri Çizelge 2.2' de de görüldüğü gibi çok geniş alanda açıklanabilir. Penisilaminin belirli enzimler üzerine etkileri onun kimyasal özellikleri ile açıklanmaktadır. Metal iyonları ile şelat oluşturma ve indirgenme-yükseltgenme reaksiyonları, sülfidril(-HS)-disülfid değişimi ve nükleofilik katılma yeteneği ise penisilaminin biyokimyasal davranışlarını açıklamaktadır (Mendel, 1977).

Çizelge 2.2 Penisilaminin kullanım alanları.

Penisilamin		
<i>İlişkili Hastalıklar</i>	<i>İlişkili İlaçlar ve Biyolojikler</i>	<i>İlişkili Terapiler ve Prosedürler</i>
Romatoid Artrit	Çinko (Biyo-Ajan)	Şelatlama Terapisi
Wilson Hastalığı	Altın (Biyo-Ajan)	İlaç Terapisi (Kemoterapi)
Sistinüri	Bakır (Biyo-Ajan)	Plazmaferez
Artiritler (Poliartiritler)	Metotreksat	Plazma Değişimi
Sistemik Skleroderma	Hydroxychloroquine Tuzlar (Biyo-Ajan)	Karaciğer Nakli
	Azathioprine (Antimetabolit)	
	Sulfasalazine	
	Prednisolone	

2.5 Çalışmada Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri

^{99m}Tc ile hazırlan radyofarmasötiğin etkili olabilmesi için ^{99m}Tc ' in çoğunun ligandla bağlanması ($\geq \% 95$) ve ürün içinde serbest ^{99m}Tc ' in çok düşük miktarda kalmış olması gerekir. İşaretleme işleminin bir diğer yan ürünü olan indirgenmiş ^{99m}Tc ' de düşük düzeyde bulunmalıdır. Hem serbest hem indirgenmiş ^{99m}Tc , görüntülerde yanlış tanıya neden olabilecek ya da değerlendirmeyi güçleştirecek safsızlıklar oluşturabilir. Hazırlanan radyofarmasötiklerin her biri hastalarda kullanılmadan önce radyokimyasal saflık yönünden test edilmelidir. Teknesyum radyofarmasötiklerinin kalite kontrolü için çeşitli kontrol prosedürleri geliştirilmiştir. En sık kullanılan kalite kontrol yöntemleri; ince tabaka kromatografisi (TLC), kağıt elektroforezi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleridir (Yurt, 2007; Theobald, 1989; Ünak P., 2003).

2.5.1 İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka kromatografisi (TLC), en çok kullanılan kromatografik teknik olup bir katı - sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Destek madde üzerine homojen olarak kaplanmış bir adsorban tabakası üzerine, mikrolitre (μL) düzeyinde uygulanan madde karışımlarının uygun çözücü veya çözücü karışımları yardımıyla ayrılmasıdır. TLC plakaları, destek maddesi (alüminyum, plastik, cam gibi) üzerine bir adsorbanın (selüloz, silikajel ve alüminyum oksit gibi maddeler) kaplanmasıyla oluşturulmuş plakalardır. Sabit faz, çeşitli boyutlardaki destek materyal üstüne, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü

kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan TLC plakası üzerinde yürür ve plakanın alt kesimlerine bir kapiler ile önceden damlatılmış olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. Polar maddeler, çözücü / adsorban madde ikilisinden daha polar olan ile daha sıkı etkileşim gösterirler. Çözücünün ilerleme seviyesi plaka boyunun yaklaşık % 90' ına ulaştığında, kromatogram çözücünden çıkarılır. Başlangıç çizgisi ile çözücünün son seviyesi arasındaki mesafe ölçülür (Skoog, 1998; Gündüz, 2002; Grillini, 2006).

Her bir bileşenin taşınım mesafesi R_f (relative front) değeriyle ifade edilir. Bu değer; her madde için adsorban, destek madde ve çözücüye bağlı olarak ayırt edici bir özelliktir. Bu mesafeler orijinden çözücünün gittiği nokta ve bileşenlerin konsantr olduğu mesafe orijinden ölçülerek gerekli şekilde tespit edilir. Radyofarmasötiklerin kalite kontrolünde R_f değerleri radyofarmasötüğün radyokimyasal saflığının hesaplanmasında önemli bir değerdir (Theobald, 1989).

2.5.2 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvıdır. Maddelerin herhangi bir çözücüde çözünmesi yeterlidir. Kolon uygun bir adsorbanla doldurulmuş ise temel olarak adsorpsiyon mekanizması gözlenir. Dağılım mekanizması için apolar bir hareketsiz faz gaz-sıvı kromatografisindeki (GSK) gibi porlu bir inert madde üzerine adsorpsiyon yoluyla veya kimyasal bağlarla film şeklinde kaplanır. Kalın cam veya paslanmaz çelik kolonların iç çapı 3 - 5 mm, boyu 10 - 25 cm'dir. Bu kolonların tabaka sayıları ise 40000 - 100000 tabaka / m kadardır. Kolonlara, uygun akış hızları elde edebilmek için bir pompa

yardımıyla hareketli sıvı faza 6000 psi (1 b/in²) kadar basınç uygulanabilmektedir. İçine hareketsiz faz yerleştirildikten sonra hareketsiz faz ile kısmen doyurulmuş hareketli faz kolon içine pompalanır. Birkaç saat bu halde bırakılıp hareketsiz fazın kolon içindeki konsantrasyonu sabit hale getirildikten sonra ayrılması istenen karışım, kullanılan hareketli fazda çözünmüş halde kolonun başından enjekte edilir. Sonuç olarak dağılıma uğrayarak ilerleyen ve birbirinden ayrılan maddeler kolonu terkedip dedektörden geçtikten sonra bir kap içinde toplanır. Sonuçlar kayıt cihazındaki kağıda pikler şeklinde kaydedilir. HPLC metodu radyofarmasötiklerin kalite kontrolünde yaygın olarak kullanılmaktadır. Belirli koşullarda verilen maddelerin kolonda alıkonma süreleri (R_t) kimyasal özellikleri nedeni ile birbirlerinden farklılık göstermesi ile ayırım gerçekleştirilmektedir (Yurt, 2008; Theobald, 1989; Gündüz, 2002; Ahuja, 2006).

2.6 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.6.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM)

Manyetik parçacıkların parçacık büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan yöntem Taramalı Elektron Mikroskobudur (Scanning Electron Microscope-SEM).

SEM elektrooptik prensipler çerçevesinde tasarlanmıştır. Taramalı Elektron Mikroskobu, birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımı yanında, mikro elektronikte yonga üretiminde, sanayinin

değişik kollarında hata analizlerinde, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. İlk ticari taramalı elektron mikroskobu 1965' de kullanılmaya başlanmış, bundan sonra teknik gelişmeler birbirini izlemiştir.

SEM görüntü, yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronların numune üzerine odaklanması, bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir.

Gerek ayırım gücü (resolution), gerek odak derinliği (depth of focus) gerekse görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobunun kullanım alanını genişletmektedir. Örneğin 1000X büyütmede optik mikroskobun odak derinliği yalnızca 0.1 μm iken taramalı elektron mikroskobunun odak derinliği 30 μm 'dir. Çizelge 2.3 mikroskopların farklı özelliklerini göstermektedir.

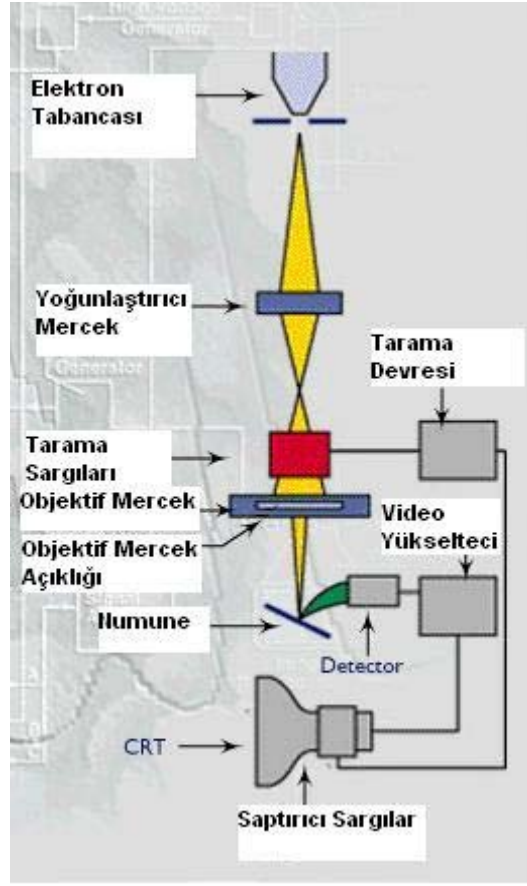
Çizelge 2.3 Mikroskopların farklı özellikleri.

	Işık Mikroskobu	Elektron Mikroskobu
Aydınlatma Kaynağı	Görünür ışınlar ($\lambda=550\text{nm}$)	Elektron demeti ($\lambda=0.005\text{nm}$)
Çözünürlük	0.25 μm	0.05nm
Mak. Büyütme	1400X	300000X

Taramalı Elektron Mikroskobu optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.5).

Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için kondenser mercekleri, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apatürler ve elektron demetinin numune yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune 10^{-4} Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır.

Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.



Şekil 2.5 Taramalı elektron mikroskobunun şematik görünüşü.

Yüksek enerjili demet elektronları numune atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları oluşur. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır ve Auger Spektroskopisinin çalışma prensibini oluşturur. Yine yörünge elektronları ile olan girişimler sonucunda yörüngelerinden atılan veya enerjisi azalan demet elektronları numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanırlar. Bu elektronlar ikincil elektron olarak tanımlanır. İkincil elektronlar numune odasında bulunan sintilatörde toplanarak

ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir. İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesinde kullanılır (Medine, 2008; www.istanbul.edu.tr).

2.6.2 X-Işınları Kırınım Ölçümleri (X-Ray Diffraction, XRD)

Kristal malzemelerdeki farklı kristal yapılar (fazlar) ve kristal yapının parametrelerinin tespiti için X-ışını kırınımı yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem temelde Bragg yansımasına dayanmaktadır. Sistemde üretilip örnek üzerine gönderilen X-ışınları, örnekte kırınıma uğrayarak saçılır. Bu saçılan veya yansıyan ışınlar bir dedektör tarafından algılanarak bilgisayara aktarılır ve bir yazılım (software) yardımıyla yansıyan ışının şiddetinin 2θ değerine karşı grafiği oluşturulur (Medine, 2008; Kolat, 2007).

X-ışını kısa dalga boylu yüksek elektrik enerjili elektromagnetik radyasyondur. Daha uzun dalga boylu olanları (görünür ışık) özellikle analiz çalışmalarında kullanılmaktadır. X-ışını absorpsiyonu atomik seviyelerde gerçekleşmektedir. X-ışını absorpsiyonu öncelikle düşük atomik ağırlıklı maddelerden oluşan örneklerdeki ağır elementlerin analizlerinin yapılması amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle uranyumun belirlenmesi için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

X-ışını sistemleri özellikle metal analizlerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Numune yüksek enerjiye sahip X-ışını ile bombardımana maruz bırakılır. Numunedeki belli elementler X-ışını' nı absorbe eder ve tekrar daha düşük enerji ile X-ışını' nı geri verir. X-ışını atomda bir boşluk oluşturarak bir elektronu dışarı çıkarır ve atom

etrafında bir elektron halkası oluşturur ve diğer halkalardaki elektronlarla bu atomdaki boşluklar doldurularak atom tekrar eski kararlılığına kavuşur. Her seferinde bir elektron alınır ve atom daha az enerjili bir ortama doğru hareket eder ve ortaya çıkan radyasyon, ilk ve son enerji durumlarına göre belli bir dalga boyu ile yayılır. Yayılan radyasyonun enerjisi, açığa çıkan her elementin analiz edilmesini sağlamaktadır (Medine, 2008; Avşar, 2006).

2.6.3 Titreşimli Örnek Manyetometresi (Vibrating Sample Magnetometer, VSM)

VSM, Foner S. tarafından geliştirilmiştir. Düşük sıcaklıkta, yüksek manyetik alan çalışmalarında ölçüm kolaylığı ve kabul edilebilir duyarlılığı nedeniyle çok kullanılan bir cihazdır.

Elde edilen manyetik parçacık numunelerinin manyetik özellikleri titreşimli örnek manyometresi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan sistem 2-300 K sıcaklık aralığında ve ± 7 Tesla'lık manyetik alan değişimi altında ölçüm yapabilme kapasitesindedir. Sistemin sıcaklık kontrolü kapalı çevrime sahip sıvı helyum ile sağlanmakta ve manyetik alan bipolar (çift kutuplu) güç kaynağı ile beslenen süperiletken selenoid tarafından üretilmektedir. Bir VSM sistemi temel olarak süperiletken selenoid titreşen numune ve toplayıcı bobinler ile sinyali analiz eden kısımdan oluşmaktadır. VSM sistemi, manyetik alan altında numunenin titreştirilmesi ve böylelikle numunenin manyetik özelliklerine bağlı olarak referans bobinlerine göre toplayıcı bobinlerde oluşan sinyalin analizi prensibine göre çalışmaktadır (Medine, 2008; Kolat, 2007).

VSM' de incelenen örnek, uygulanan bir manyetik alanda sabit frekans ve genlikte algılama kanalının içinde titreştirilmektedir. Örneğin oluşturduğu değişken manyetik alan nedeni ile algılama kanalında indüklenen gerilim kilitlemeli yükselteç ile ölçülmektedir. Kilitlemeli yükseltecin faz ayarı, örneği titreştiren AC kaynaktan gelen frekans işaretine göre yapılarak sistemden gelen gürültü süzölmektedir. Ölçülen bu gerilim kalibrasyon sabiti ile çarpılarak manyetik moment birimi emu' ya çevrilir (Medine, 2008; Kervan, 2001).

2.7 Lipofilite

Lipofilite maddenin yağda çözünme eğiliminin ölçüsüdür ve lipid / su oranı şeklinde partiyon katsayısı olarak ifade edilir. Bu katsayı ne kadar büyükse; maddenin lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur (Özyazgan, 2002). Kimyasal bileşikler için yağ, petrol, lipid ve hekzan, toluen, oktanol gibi apolar çözümlerde çözünme yeteneğini gösterir (Theobald, 1989).

2.8 Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir dokudan spontan migrasyonla yada mekanik veya enzimatik yöntemlerle ayrılmış in vitro yaşatılan ve üretilen hücreler topluluğudur. Hücre kültürü izole hücre populasyonlarının pek çok fizikokimyasal ve fizyolojik değişkenlerden uzak olarak incelenebildiği araştırmalarda önemli bir yere sahiptir. Hücre kültürü çalışmalarının geçmişi yüz yılı aşkın bir süreyi kapsamaktadır.

Tek bir hücre tipi hakkında en iyi bilgiyi edinebilmek için o hücrenin dokudaki diğer hücre tiplerinden ayrılarak izole edilmesi gerekir. Bunun sonucunda oluşan homojen hücre popülasyonu ya doğrudan ya da kültür ortamında (besiyeri, *medium*) çoğaltıldıktan sonra analiz edilebilir. Farklı hücre türlerini ayırmak için değişik yöntemler uygulanabilir. Hücrelerin fiziksel özelliklerine göre, örneğin büyük olanlar küçük olanlardan, ağır olanlar hafif olanlardan santrifüj edilerek ayrılabilir. Bir başka yaklaşımın temeli, bazı hücre türlerinin cam ya da plastikten yapılmış yüzeye daha sıkı yapışması özelliğine dayanır. Bu yöntem antikorlar kullanılarak özellikle istenen hücre türünün yüzeye yapışması ve daha sonra da uygun işlemlerle o hücrelerin elde edilmesini sağlayabilir.

En gelişmiş hücre ayırıştırma yöntemlerinden birinde özel hücreleri işaretlemek için antikor bağlanmış bir floresan boya kullanılır. Böylece işaretlenmiş hücreler işaretlenmemiş olanlardan elektronik bir floresanla aktive edilmiş hücre ayırıcı cihazlar kullanılarak ayrılabilir. Bu cihazlar saniyede binlerce hücre ayırabilir ve 1000 tane işaretlenmemiş hücrenin içinden bir tane floresanla işaretlenmiş hücreyi ayırabilecek kadar seçicidirler.

Kızılötesi (infrared) lazer kullanarak da mikroskop altında belli bir hücre topluluğu mikrodiseksiyon yöntemiyle elde edilebilir. Bu yöntem özellikle bir tümör dokusunun çeşitli yerlerinden alınan hücrelerin özelliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

Hangi yöntem kullanılmış olursa olsun belli bir tipteki (*uniform*) hücreler elde edildikten sonra, bunlar hücre kültürü için başlangıç materyalini oluştururlar ve koşulları belirlenmiş bir kültür ortamında (besiyeri) sayıları hızla artarak birçok analiz yapılması için

kullanılabilirler. Biyokimya dilinde hücre kültüründe yapılan çalışmalar canlı hücre ortamında gerçekleştiği için *in vivo* olarak tanımlanır.

Bir organizmanın dokularından doğrudan hazırlanan, yani *in vitro* hücre çoğalması olmaksızın hazırlanan, kültüre primer kültür denir. Bu hücrelerin kültür kabından alınıp çoğaltılmasıyla elde edilen kültürlere de sekonder kültür denir. Böylece elde edilen hücreler asıl kökenlerinin özelliklerini yansıtmayı sürdürürler. Örneğin, fibroblastlar kollajen salgılamaya, embriyonik kas hücrelerinden türetilen hücreler kültür ortamında kas lifleri oluşturarak kendiliğinden kasılmaya, sinir hücreleri aksonlarını uzatarak diğer sinir hücreleriyle sinapslar yapmaya, epitel hücreleri de sağlam bir epitelin özelliklerini taşıyan tabakalar oluşturmaya devam ederler.

Memeli hücrelerinin kültürü için gerekli besiyerinin bileşenleri amino asitler, vitaminler, tuzlar, glukoz, antibiyotikler ve serumu (serum kullanılmıyorsa da gerekli proteinleri) kapsar.

Hücre serileri kanser hücrelerinden de elde edilebilirler. Ancak bunlar normal hücrelerden farklı özellikler taşırlar. Örneğin, kanser hücre serileri bir yüzeye tutunmadan çoğalabilirler ve kültür kabında çok yüksek bir yoğunluğa ulaşabilirler. Bu özellikler tümör indükleyici bir virüs ya da kimyasal madde kullanarak normal hücrelerin transformasyonu (değişime uğratılması) da sağlanabilir. Transform edilmiş ya da ölümsüz hücre serileri sıvı azotta (-196°C) saklanabildiği ve çözüldükleri zaman da canlılıklarını korudukları için hücre kültürü çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Bir hücre serisindeki tüm hücreler birbirine çok benzemekle birlikte genellikle birebir eş (*identical*) değildirler. Genetik olarak tek tür bir hücre serisi hücre klonlamasıyla sağlanabilir. Bu işlemde tek bir hücre izole edilerek büyük

bir koloni (klon) oluşturacak kadar çoğalmasına izin verilmektedir. Böyle bir klonda tüm yeni hücreler tek bir öncül (*ancestor*) hücreden gelmektedir (Kirschstei and Skirboll, 2001).

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- D-Penisilamin (Aldrich Chem. Co.)
- Na [^{99m}TcO₄] (E.Ü. Tıp Fak. Nükleer Tıp Anabilim Dalı)
- Susuz Demir (III) klorür (Fe₃O₄) (Fluka)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Sodyum Sülfid (Na₂SO₃) (Merck)
- Azot Gazı
- Amonyak (NH₃) (Merck)
- Etanol (Merck)
- Tetraethyl orthosilicate (TEOS)
- Metanol (Merck)
- N-2-aminoethyl-3-aminopropyl-trimethoxysilane (AEAPS) (Merck)
- PBS (pH=7) (Merck)
- Glutaraldehit (Merck)
- NaCl (Merck)
- EDTA (Merck)
- Borat tamponu (pH=9.184) (Merck)
- 4-Morpholineethanesulfonic acid (MES) (Sigma)

- Sodyum Karbonat (Na_2CO_3)
- Sodyum bor hidrür (NaBH_4)
- $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Riedel Heiden)
- Argon gazı
- Karbonmonoksit (CO) gazı
- Milipore filtre (0.22 μm)
- Serum fizyolojik (% 0.9 NaCl)
- Trifloro asetik asit (TFA) (Merck)
- Metanol (Merck)
- HCl (Merck)
- Trietilamonyumfosfat
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)
- ITLC-SG Silika kaplı plastik şeritler (Merck-5554)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

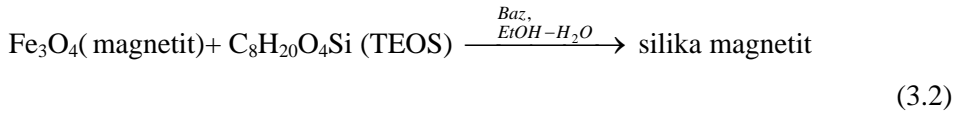
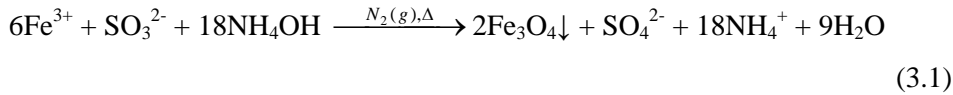
- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gammasayım sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- RadyoTLC (Bioscan 2000)
- TLC küvetleri (Sigma) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC Shimadzu (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Metrohm 686 Titroprocessor (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- SEM (Scanning electron microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)

- XRD (Phillips X'Pert Pro) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü)

3.2 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Yüzey Kaplama

3.2.1 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi

Silika kaplı manyetik nanoparçacıkların hazırlanmasına ilişkin reaksiyon mekanizması aşağıda gösterildiği gibi gerçekleşmektedir. 3.1' de manyetik demir nanoparçacıkları oluşmakta, reaksiyon 3.2' de ise bu parçacıklar bir silika tabakası tetraetil ortasilikat (TEOS) ile kaplanmaktadır.



2 M' lık HCl çözeltisi kullanılarak 2 M' lık 25 mL FeCl₃ çözeltisi hazırlandı ve 500 mL' lik üç boyunlu balonjojeye konularak bidistile su ile 100mL' ye seyreltildi. Taze hazırlanmış 50 mL 0.08 M Na₂CO₃ çözeltisi argon gazı altında yavaşça ilave edildi. Daha sonra hızlı karıştırma ve argon gazı altında bidistile su ile 40 mL' ye seyreltilmiş 8 mL % 25' lik amonyak çözeltisi yavaşça damlatılarak eklendi. Yağ banyosu kullanılarak çözelti sıcaklığını 70 °C olması sağlanarak çözelti bu sıcaklıkta 30 dakika karıştırıldı. Reaksiyon tamamlandıktan sonra

çözelti sıcaklığı 40 °C' nin altına düşene kadar bekletildi. Sonuçta oluşan siyah renkli manyetik parçacıklar yüzeysel bir manyetik alan altında birkaç kez bidistile su ile yıkandı. Ardından birkaç kez de su-etanol (2:1) karışımı ile yıkanarak çökeleğin toplam hacmi 100 mL olacak şekilde 4:1 (v/v) oranında hazırlanan etanol-su çözeltisi içersinde dağılması sağlandı. Oluşan süspansiyona sırasıyla 5 mL tetraetil ortosilikat (TEOS) ve % 10' luk 5 mL NH₃ eklendi. 40 °C' de 12 saat karıştırıldıktan sonra ortamdaki parçacıklar miktans yardımıyla çöktürülerek üst faz dekante edildi. Bu işlem birkaç kez metanol ile tekrarlandı. Böylelikle bu yıkamalar sonucunda reaksiyona katılmayan TEOS ve bağlanmamış silika ortamdan uzaklaştırılmış oldu. Son olarak çökelek 100 mL metanol içine konuldu. Çökeleğin az bir miktarı etüvde kurutuldu ve parçacık özelliklerinin belirlenmesi için kullanıldı.

3.2.2 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Amino Silan ile Yüzey Modifikasyonu (AEAPS)

Metanol ile bir süspansiyon oluşturan manyetik parçacıkların ağırlıkça % 20' si kadar bir silan bağlayıcı ajan olan N-2-aminoethyl-3-aminopropyl-trimethoxysilane (AEAPS) silika kaplı manyetik parçacıkların üzerine eklendi. Karışım yaklaşık 5 dakika ultrasonik banyoda tutuldu ve 60 °C sıcaklıkta 12 saat süreyle su banyosunda bekletildi. Son olarak reaksiyona girmeyen silan bağlayıcı ajanı uzaklaştırmak için karışım metanol ile birkaç kez yıkandı. Elde edilen çökeleğin küçük bir kısmı etüvde kurutularak temel analizler için kullanıldı.

3.2.3 D-Penisilaminin Manyetik Nanoparçacıklara Bağlanması

Metanol içindeki bağlayıcı ajan AEAPS ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların (konsantrasyon >20 mg katı/mL) 1 mL' si santrifüjlenerek sıvı faz ortamdan uzaklaştırılıp katı kısım 4 kez 1 mL fosfat tamponu (PBS, pH=7.00) ile yıkandı. Yıkanan parçacıklar 1 mL PBS içinde 1 mL % 2.5' lik glutardialdehit ile 15 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra 4 °C' de 4 saat süresince bekletildi. Bekleme sonunda süspansiyon dönme sayısı dakikada 1500 (rpm) olacak şekilde 15 dakika santrifüj edilerek sıvı kısım uzaklaştırıldı ve katı kısım yukarıdaki gibi tekrar fosfat tamponu ile yıkandı.

1 mg D-Penisilamin 0.15 M NaCl, 0.005 M EDTA (pH=7.2) içeren 1 mL fosfat tamponunda çözüldü. Hazırlanan bu çözelti manyetik parçacıkların üzerine eklenerek 12 saat oda sıcaklığında beklemeye bırakıldı. Bekleme sonunda parçacıklar borat tamponu (pH=9.2) ile 3 kez yıkandı. 0.5 mg/mL NaBH₄ 1 M borat tamponu içinde çözüldü ve bu çözelti parçacıklara eklenerek 4 °C' de 30 dakika bekletildi. Böylelikle aldehit grupları ve çift bağlar uzaklaştırılmış oldu. Son olarak parçacıklar fosfat tamponu (pH=7.00) ile 3 kez yıkanarak 4 °C' de 1 mL 0.5 M 4-morfonlinetansülfonik asit (MES, pH=6.6) içinde saklandı.

3.3 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Yapısal Özelliklerinin Belirlenmesi

Silika kaplı manyetik nanoparçacıkların yapısal özelliklerinin belirlenmesi için parçacıkların SEM (Scanning Electron Microscope), XRD (X-Ray Diffractometer) ve VSM (Vibrating Sample

Magnetometer) analizleri yapılmıştır. Manyetik parçacıklar etanol-su çözeltisiyle 3 kez yıkandıktan sonra kolay uçabilen bir çözelti (metanol) içerisinde dağıtıldı. Mikropipet yardımıyla alınan örnekler ölçümün yapılacağı SEM cihazına ait çelik plakalar üzerine kondu. Yaklaşık 5 dakika sonra metanolün uçması ile plaka üzerinde kuruyan örneklerin görüntüleri alındı.

Manyetik nanoparçacıkların XRD ile analizinde X-ışını kırınımı ile parçacıkları kristal yapısı belirlendi. Örnekler kolime edilmiş monokromatik X-ışını kaynağı ile ışınlandı. Kırınım açısı ve kırılan X-ışınlarının şiddeti örneğin bilinen çeşitli fazların desenleri ile karşılaştırılabilir desenini verdi.

Manyetik nanoparçacıkların manyetik doygunluk testi VSM (titreşimli örnek manyetometresi) ile gerçekleştirildi.

Bu çalışmada gerçekleştirilen magnetik nanoparçacıklar ile ilgili akım şeması Çizelge 4.1' de verilmiştir.

3.4 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması ve Radyoişaretleme

3.4.1 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması

[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ koru literatürdeki yöntem kullanılarak hazırlandı (Alberto et al., 1998). Bütün reaksiyonlar argon gazı altında gerçekleştirildi. 5.5 mg NaBH_4 , 4.2 mg Na_2CO_3 ve 20 mg tartarat 10 mL' lik deney tüpüne konularak tüpün ağzı hava almayacak şekilde kapatıldı. Daha sonra tüpten 15 dakika CO gazı geçirildi. Üzerine aktivitesi 30 mCi

olan 1 mL TcO_4^- eklendi ve 30 dakika $90\text{ }^\circ\text{C}$ ' de su banyosunda bekletildi. Daha sonra buz banyosunda soğutulduktan sonra $220\text{ }\mu\text{L}$ $0.1\text{ M HCl:PBS (3:1)}$ çözeltisi ile pH 7' ye ayarlandı. Reaksiyon sonrası radyokimyasal saflık TLRC ve HPLRC kalite kontrol yöntemleri kullanılarak belirlendi.

3.4.2 D-Penisilamin Bağlanmış Manyetik Nanoparçacıkların $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Kuru ile İşaretlenmesi

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru bölüm 3.4.1' de verilen koşullarda hazırlandı. 1 mg D-PA ile bağlanmış manyetik nanoparçacıklardan $50\text{ }\mu\text{L}$ ($50\text{ }\mu\text{g}$) çekildi ve fosfat tamponu ile 1 mL ' ye seyreltildi. Bu çözelti deney tüpüne konuldu ve üzerinden 5 dakika süresince Ar gazından geçirilerek 0.3 mCi $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru ile işaretlendi. Çözelti $70\text{ }^\circ\text{C}$ sıcaklıkta 30 dakika bekletildi. Ardından manyetik nanoparçacıklar mıknatıs yardımıyla sıvı fazdan ayrılarak manyetik nanoparçacıkların ve sıvı fazın ayrı ayrı radyoaktiviteleri Cd(Te) yarı iletken dedektörü ile ölçüldü. Daha sonra parçacıklar birkaç kez fosfat tamponu ile yıkanarak manyetik nanoparçacıklar ile sıvı fazın aktivite sayımları tekrar alındı.

3.4.3 D-Penisilaminin $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Kuru ile İşaretlenmesi

1 mg D-PA 1 mL bidistile su kullanılarak 10 mL ' lik tüpte çözüldü. Bu çözeltiden 5 dakika süreyle Ar gazı geçirilerek tüpün ağzı kapatıldı. Üzerine bölüm 3.4.1' de hazırlanmış olan korun yaklaşık $700\text{ }\mu\text{L}$ ' si eklendi ve tüpün ağzı parafilm ile kapatılarak 30 dakika $70\text{ }^\circ\text{C}$ ' deki su banyosunda bekletildi. Radyokimyasal saflık analizi için aynı koşullarda TLRC ve HPLRC kalite kontrol yöntemleri kullanıldı.

3.5 Radyoşaretli Bileşiklerin Kalite Kontrolleri

3.5.1 İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC)

TLRC ile kalite kontrol çalışmalarında sabit faz olarak (10 cm x 1.5 cm) boyutlarında silikajel kaplı alüminyum şeritler kullanıldı. Asetonitril, serum fizyolojik (SF) ve MeOH:HCl (95:5) olarak üç farklı çözüden yararlanıldı. Uygun boyutlarda hazırlanan bu şeritlere her birine tabandan 0.5 cm ileriye olacak şekilde kılcal borular yardımıyla örneklerden bir miktar damlatılır. Bu çalışmada hazırlanan üç takım (3x3) TLC şeridinden birinciye [$^{99m}\text{TcO}_4$]⁻, ikinciye [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ ve üçüncüye [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] örneklerinden bir miktar damlatıldı. TLC şeritlerine damlatılan örnekler kuruduktan sonra her birinde farklı çözümler bulunan (asetonitril, serum fizyolojik ve MeOH:HCl) TLC tanklarına dikkatlice yerleştirildi. Tanktaki çözümler şeritler üzerinde yürüdüktan sonra şeritler tanklardan çıkarılarak oda sıcaklığında kurutuldu. Şeritlerin kuruması tamamlandıktan sonra birer birer şeffaf bantla kaplandı. Bioscan 2000 TLC tarayıcı kullanılarak her birinin radyo kromatogramları alındı. Elde edilen kromatogramlardan radyoaktif maddelerin taşındığı Rf değerleri ve verimler elde edildi. Elde ettiğimiz sonuçların güvenilirliğini sağlamak amacıyla deneyler en az üç kez tekrarlanmıştır. TLRC kromatogramları Bölüm 4.2.1 ve 4.2.3' de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Bioscan 2000 TLC tarayıcı TLC şeritlerinin analizinde radyokromatogram cihazı olarak kullanıldı. Radyokromatogram tarayıcı cihazı doz kalibratörüne benzer olarak başlık kısmı iyon odası şeklinde tasarlanmıştır. İyon odasının orta kısmında bir anot ve bunu çevreleyen bir katot bulunmaktadır. İyon odası % 90 argon ve % 10 metan karışımı

olan P10 gazı içermektedir. Radyoaktif çekirdekten yayınlanan beta veya gama ışınlarının etkisiyle iyonlaşan P10 gazı anot ile katot arasında bir potansiyel fark (voltaj) oluşturur. Sayaca bağlı olan elektronik bir sistemle oluşan bu fark sayılır ve sonuç olarak bilgisayar ortamında kromatogram olarak görüntülenir (Şensoy, 2007).

3.5.2 Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC)

HPLC 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 marka tek kanallı analizör ve (SPD-10AV)UV-VIS dedektörü bulunan Shimadzu LC-10Atvp sisteminde gerçekleştirildi. Mobil faz olarak % 0.1 trifloroasetik asit (TFA) (solvent A) ve MeOH (solvent B) kullanıldı. Mobil faz akış sistemi, ilk 3 dakika % 100 A; 3.1-9 dakika % 75 A, % 25 B; 9.1-20 dakika arasında % 66 A (% 34 B)' dan % 0 A (% 100 B) ulaşıncaya kadar lineer gradient uygulanmıştır; 20-28 dakika % 100 B; 28.1-30 dakika % 100 A olacak şekilde programlanmıştır. Akış hızı 1mL/dk olup, 240 ve 250 nm dalga boyları kullanılarak UV dedektöründe $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ örnekleri için kromatogramlar alınmıştır.

3.5.3 Lipofilite Analizi

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ bileşiğine ilişkin lipofilite tayini n-oktanol / PBS kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bir santrifüj tüpüne eşit oranlarda n-oktanol ve PBS (pH=7) koyulduktan sonra $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ örneğinden 50µg / 0.15 mL alınarak bu karışıma ilave edilip 1500 rpm' de 30 dakika süreyle santrifüjlenmiştir (Zhang and Wang, 2001). Santrifüj sonrasında tüpte fazlara ayrılan bu karışımın üst ve alt

fazlarından 100' er μL alınarak aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile sayılmıştır. Aynı işlemler üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen deneysel ve teorik sonuçlar Bölüm 4.3' de verilmiştir.

3.5.4 Serumda Stabilite

$[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ bileşiklerinin serumdaki kararlılığı 0, 30, 60, 120, 180, 240, 300. dakikalar ve 24 saat sonunda alınan TLC örnekleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 100 μL $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve 100 μL $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ kompleksi ayrı ayrı 200 μL serumla eklenerek belirlenen sürelerde bileşiklerin kararlılığı araştırılmıştır. Bu çalışma üç kez tekrarlanmıştır ve elde edilen sonuçlar bölüm 4.4' de incelenmiştir.

3.6 Radyoşaretli Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi

Elde edilen $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$, $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ komplekslerinin biyolojik aktivitesinin in vivo olarak belirlenmesinde Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Ana Bilim Dalı' ndan temin edilen MCF-7 hücreleri kullanılmıştır. Sayısı 10^8 olan bu hücreler 24' lük flasklara ekilmiş olarak temin edildi.

Bu çalışma için Bölüm 3.4.1' deki yöntem kullanılarak $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kuru, Bölüm 3.4.2' deki yöntem ile $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve Bölüm 3.4.3' deki yöntem ile $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ kompleksi oluşturulmuştur. MCF-7 ekilmiş flasklardaki kuyulara hazırlanan bu komplekslerden sırasıyla belirli spesifik radyoaktivitedeki

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ koru, 2 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve 2 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ yerleştirildi.

3.6.1 Kontrol Çözeltisi Olarak $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Korunun Hazırlanması

5.5 mg NaBH_4 , 4 mg Na_2CO_3 , 20 mg tartarat 10 ml' lik deney tüpüne konuldu. Tüpün ağızı hava almayacak şekilde kapatıldı. Daha sonra tüpten 15 dakika CO gazı geçirildi. Üzerine 1 ml hacimde 7 mCi' lik TcO_4^- eklendi ve 30 dakika 90 °C' deki su banyosunda bekletildi. Daha sonra buz banyosunda soğutulduktan sonra 220 μl 0,1 M HCl:PBS (3:1) çözeltisi ile pH' ı 7' ye ayarlandı.

Kontrol grubu olarak 6 kuyucuk kullanıldı. Kontrol çözeltisi için hazırlanmış olan bu kor çözeltisinden 60 μCi (11.4 μL) alındı ve hücre besiyeri ile 4 mL' ye seyreltildi. Seçilen 6 kuyucuğun her birinin üzerine bu kor çözeltisinden 500' er μL ilave edildi.

3.6.2 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Koru ile İşaretli D-Penisilamin Bağlı Manyetik Nanoparçacıklar

Bölüm 3.2.3' de hazırlanan 1 mg D-PA ile bağlı manyetik nanoparçacıklardan, 60 μL (50 μg) alınarak fosfat tamponu ile 1mL' ye seyreltildi. Deney tüpüne konulan bu çözeltiden 5 dakika boyunca argon gazı geçirildikten sonra tüpe 3.6.1' de hazırlanmış olan korun 200 μCi (38 μL)' si ile radyo işaretleme sağlandı. Bu karışım 70 °C' de 30 dakika süreyle bekletildikten sonra radyokimyasal saflık için parçacıklar birkaç kez fosfat taponu ile yıkandı. 0.6 mL radyo işaretli $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-}$

M-D-PA] karışımından çekildi ve hücre besiyeri ile 7.5 mL' ye tamamlanarak kuyucuklara 500' er μL ilave edildi.

Bu şekilde [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}$] için toplam 12 kuyucuk kullanıldı. Çalışma boyunca Şekil 3.1' deki 1. ve 3.sıradaki 12 kuyucuktan 6 tanesine manyetik alan uygulanırken, diğer 6 kuyucuğa ise manyetik alan uygulanmadı.

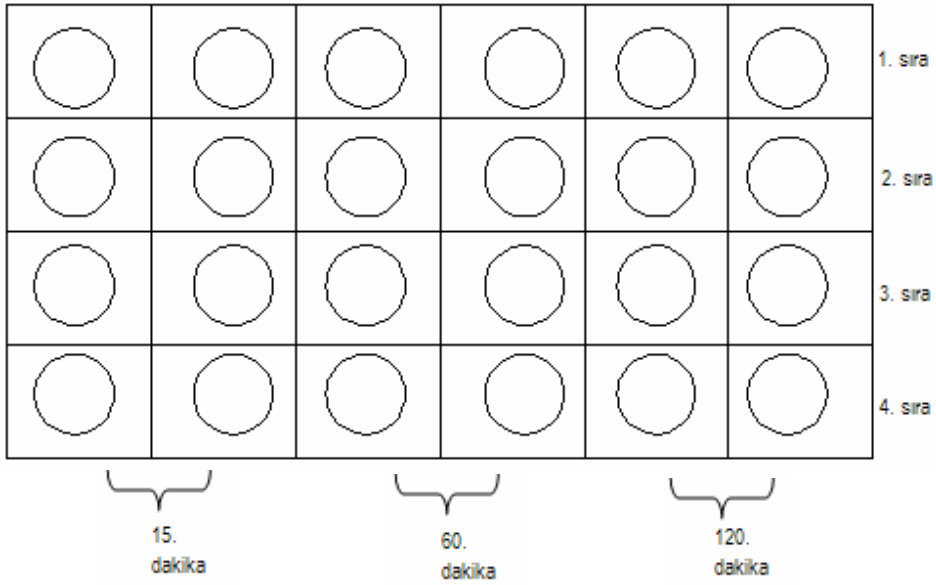
3.6.3 [$^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$]⁺ Kuru ile İşaretli D-Penisilamin

1 mg DPA 1 mL bidistile su kullanılarak çözüldü. Bu çözeltiden 20 μL alındı ve 10 mL' lik deney tüpüne konularak bidistile su ile 1 mL' ye tamamlandı. 5 dakika argon gazından geçirildi ve tüpün ağzı kapatıldı. Üzerine 3.6.1' de hazırlanmış olan kordan 10 μCi (15 μL) eklendi ve tüpün ağzı parafilm ile kapatıldı. Hazırlanan radyo işaretli bileşik 30 dakika süresince 70 °C' deki su banyosunda bekletildi. Radyokimyasal saflık analizi için aynı koşullarda TLRC kalite kontrol yöntemi kullanıldı. İşaretli çözeltinin 0.7 μL ' si alınarak hücre besiyeri ile 7.5 mL' ye tamamlandı. Bu çözeltiden Şekil 3.1' deki 2.sırada seçilen 6 kuyucukta yer alan hücrelerin her birinin üzerine 500 μL ilave edildi.

3.6.4 MCF-7 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamana Bağlı Olarak İncelenmesi

İşaretli bileşikler hücrelerin üzerine eklenmeden önce hücrelerin üzerindeki besi ortamları atıldı. Hücreler fosfat tamponu ile üç kez yıkandıktan sonra hücrelerin üzerine Bölüm 3.6.2, 3.6.3 ve 3.6.4' de hazırlanan hücre besiyeri içinde bulunan işaretli yapılar eklendi. Hücre

bağlanma veriminin belirlenmesi için 0 dk. 15 dk. 60 dk. 120 dk olacak şekilde üç belirli zaman seçildi. 0. dakika 15. dakika, 60. dakika ve 120. dakika sonunda belirlenen hücreler üzerindeki besiyerleri atılarak hücreler 3 kez fosfat tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuktaki hücelere ait aktivite sayımları Cd(Te) yarı iletken katı hal dedektörü ile alındı.



1. Sıra: [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ - M-D-PA] (manyetik alan uygulandı)
2. Sıra: [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA]
3. Sıra: [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ - M-D-PA] (manyetik alan uygulanmadı)
4. Sıra: [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] kontrol çözeltisi

Şekil 3.1 24' lük flaskın genel yapısı ve hücrelerin radyoaktif bileşiklerle işaretlenme sırası.

3.6.5 İstatistik Çalışması

Radyoişaretli bileşiklerin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi amacıyla yapılan çalışmaların sonuçları GraphPad istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiştir. Zamana bağlı olarak hücre bağlanma verimleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Ayrıca işaretli bileşikler kendi aralarında istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi 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.

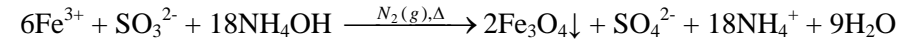
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması ve Yüzey Kaplama

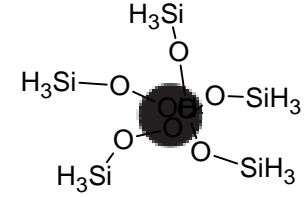
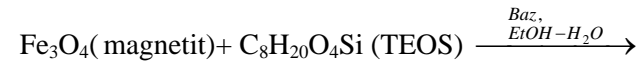
Bu çalışmada amino silan kaplı AEAPS ile modifiye edilerek D-Penisilamin bağlı magnetik nanoparçacık oluşumu ile ilgili akım şeması Çizelge 4.1' de verilmiştir.

Çizelge 4.1 D-Penisilamin bağlı magnetik nanoparçacık oluşumu akım şeması.

➤ **Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması**

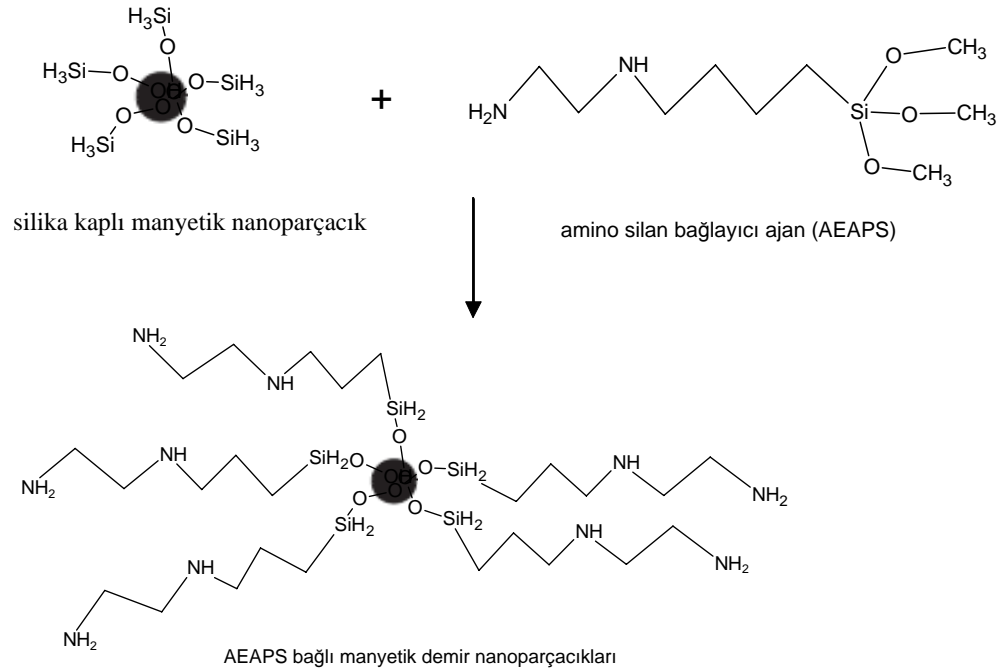


➤ **Silika ile Yüzey Kaplama**

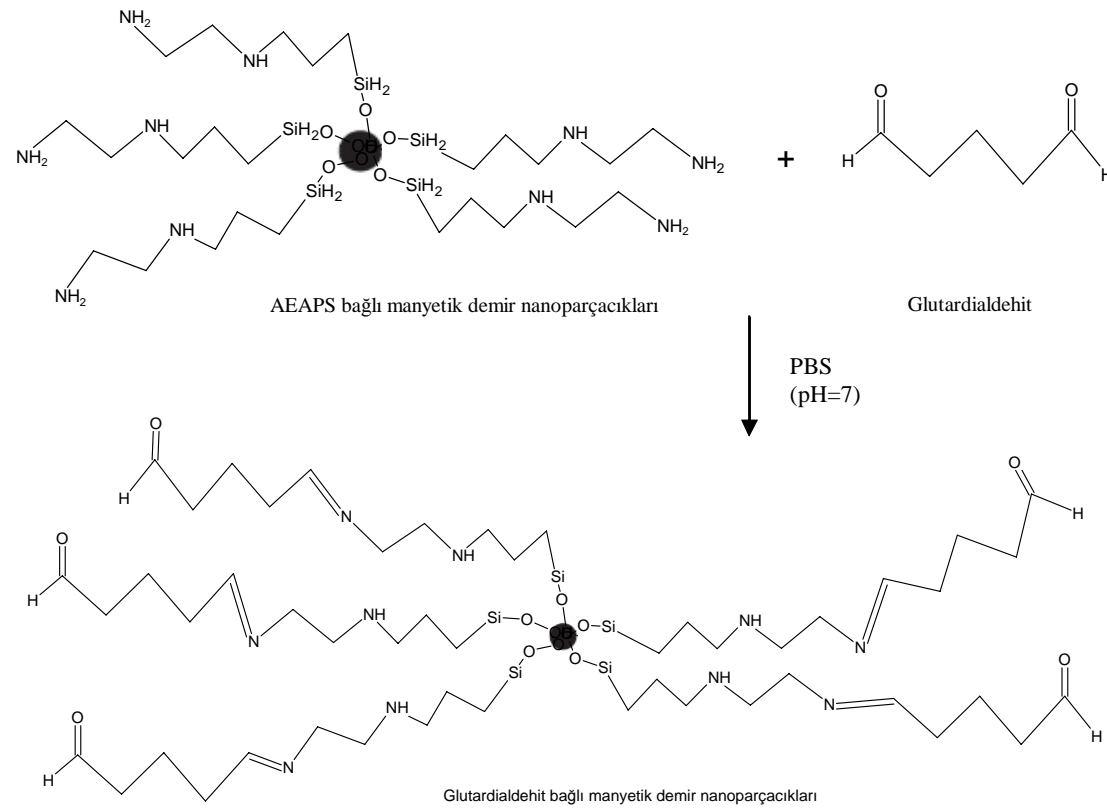


Silika kaplı manyetik nanoparçacık

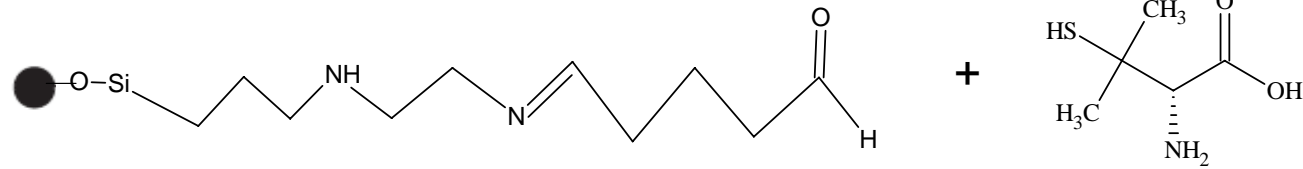
➤ **Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Amino Silan ile Yüzey Modifikasyonu**



➤ **Manyetik nanoparçacıklara glutardialdehit bağlanması**

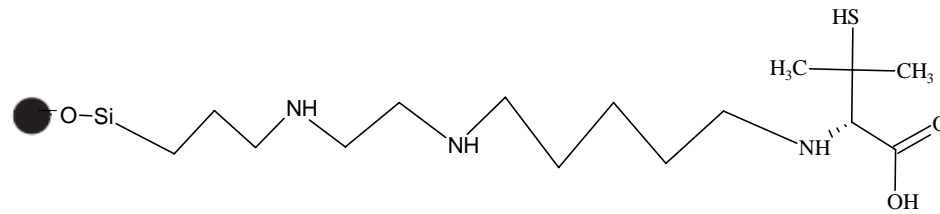
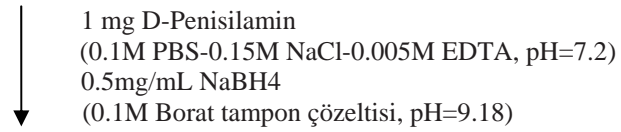


➤ **D-Penisilaminin Manyetik Nanoparçacıklarla Bağlanması**



Glutardialdehit bağlı manyetik demir nanoparçacıkları

D-Penisilamin

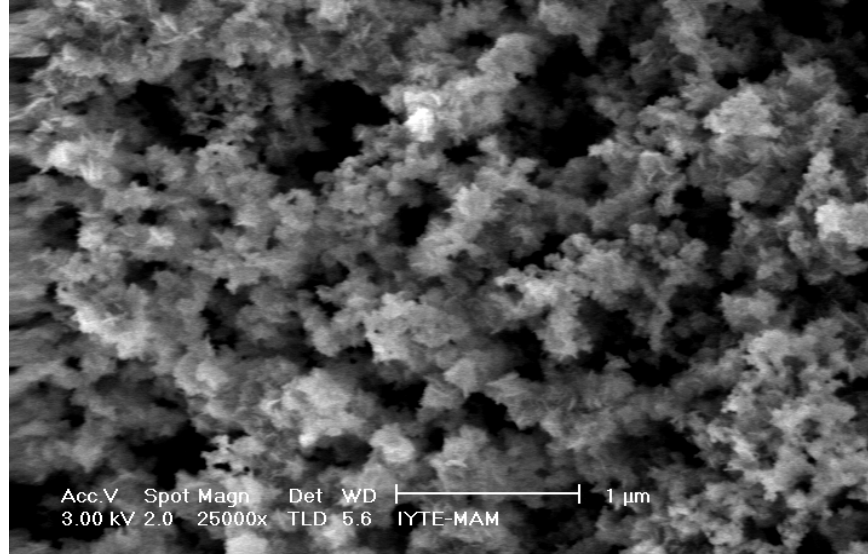


D-Penisilamin bağlı manyetik nanoparçacıklar

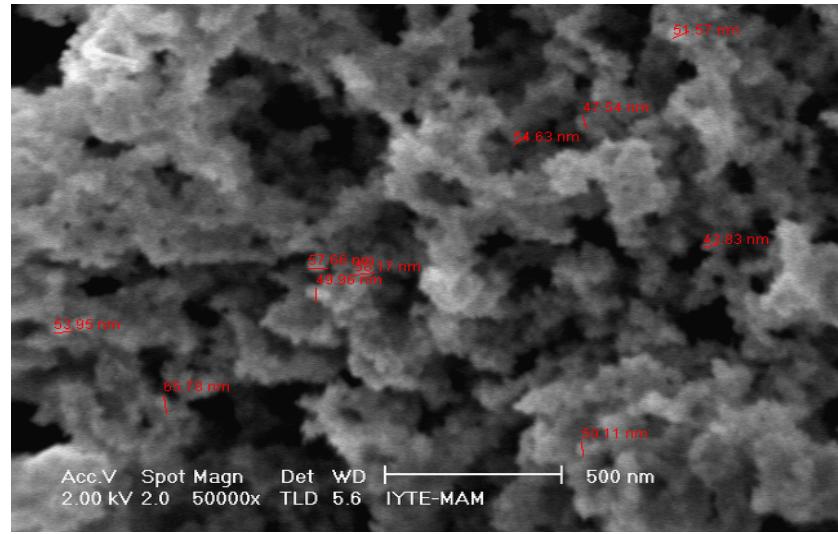
4.1.1 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Sentezlenmesi

Cao ve arkadaşları manyetik nanoparçacık sentezinde Qu ve arkadaşlarının önerdiği koşulları geliştirmişlerdir. Qu ve arkadaşları manyetik nanoparçacık sentezinde koruyucu gaz azot kullanmaksızın başlangıçtaki Fe^{2+}/SO_3^{2-} molar oranını 3' e eşit almışlardır. Cao ve arkadaşları ise sentez koşulları olarak başlangıçtaki Fe^{2+}/SO_3^{2-} molar oranı 6' ya çıkarmışlar ve manyetik nanoparçacıkların oluşumu sırasında oluşan Fe^{2+} ' nin Fe^{3+} ' e geri yükseltmesini önlemek için azot koruyucu gazı kullanarak 70 °C' de 15-30 dakika inkübasyon sonrasında oldukça saf ve manyetik özellikleri gelişmiş 20 nm boyutlarında manyetik nanoparçacıklar elde etmişlerdir (Cao et al., 2004; Qu et al., 1999).

Bu nedenle biz bu aşamada Cao ve arkadaşlarının geliştirdiği bu yöntemi kullandık. Bölüm 3.2.1' de anlatılan bu yöntemle elde edilen taneciklerin boyut analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde alınan SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleriyle incelenmiştir.



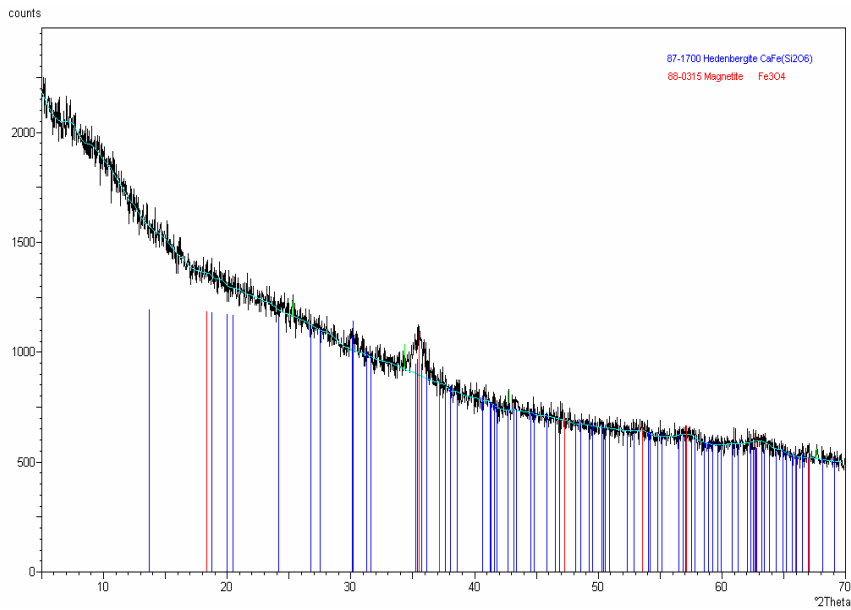
Şekil 4.1 Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait 1 μm ölçekte SEM görüntüsü.



Şekil 4.2 Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait 500 nm ölçekte SEM görüntüsü.

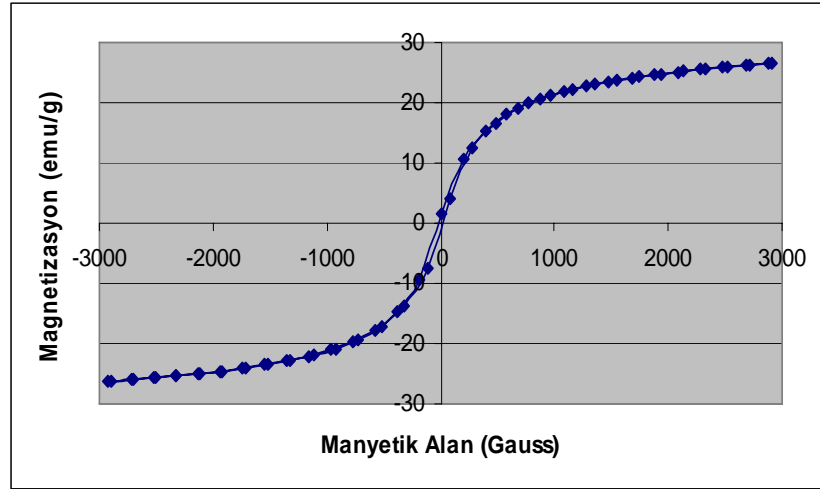
SEM görüntüleri silika kaplı manyetik parçacıkların boyutlarının ortalama olarak 40-60 nm aralığında olduğunu göstermiştir. 1 μm ve 500 nm ölçekte alınan SEM görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2’ de verilmiştir.

Elde ettiğimiz silika kaplı manyetik nanoparçacıkların XRD görüntüleri Şekil 4.3’ te gösterilmiştir. Bu görüntü incelendiğinde X-ışını kırılım deseni Fe_3O_4 kırılım piki ile eşleştiği gözlenmiştir.



Şekil 4.3 Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait XRD görüntüsü.

Silika kaplı manyetik nanoparçacıklara ait manyetik özellikler parçacıkların VSM analizi alınarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.4 silika kaplı manyetik nanoparçacıkların uygulanan manyetik alana karşı emu/g cinsinden manyetizasyon değerlerini göstermektedir. Elde edilen değerlere göre süperparamanyetiklik için kritik değer olan 25 nm’ den büyük manyetik nanoparçacıklar elde edilmiştir.



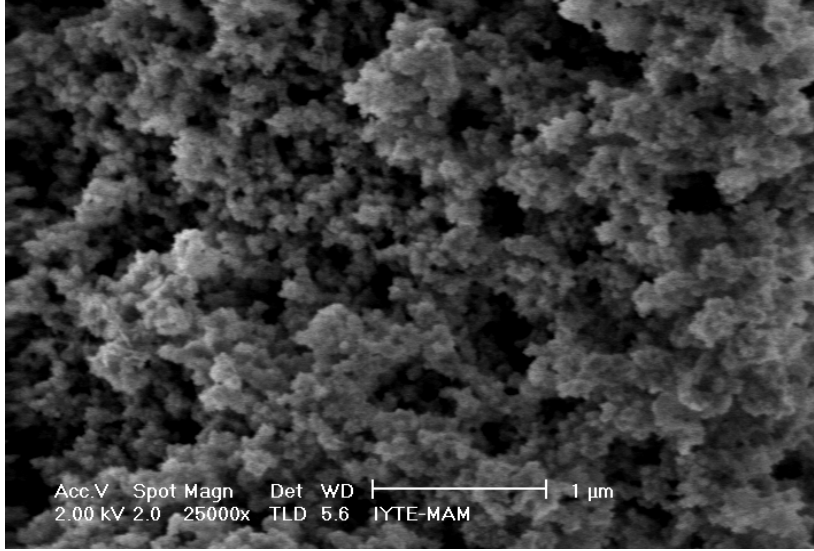
Şekil 4.4 Silika kaplı manyetik nanoparçacıkların VSM analizi.

4.1.2 Silika Kaplı Manyetik Nanoparçacıkların Amino Silan ile Yüzey Modifikasyonu (AEAPS)

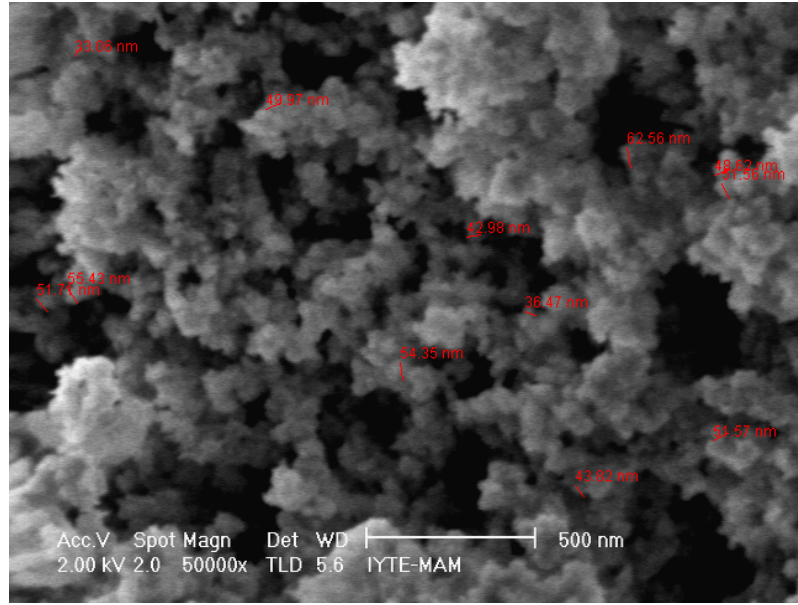
Manyetik parçacıklar arasındaki aglomerasyonu önlemek ve yüzeyin aktif hale gelmesi için silika kaplı manyetik nanoparçacıklar amino silan ile kaplanmıştır. Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıklarının tanecik özelliklerinin belirlenmesi amacıyla parçacıkların SEM, XRD ve VSM görüntüleri alınmıştır.

Cao ve grubunun yaptıkları çalışmada silanlayıcı ajan olarak 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) ile N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]-ethylenediamine (SG-Si900) karşılaştırılmıştır. Çalışmalarında SG-Si900'nün daha hidrofilik ve fonksiyonel gruplarının etkin olması nedeniyle daha üstün özelliklere sahip olduğunu rapor edilmiştir (Cao et al., 2004). Bu nedenle çalışmamızın bu aşamasında silanlayıcı ajan olarak SG-Si900

eşdeğeri olan N-2-aminoethyl-3-aminopropyl-trimethoxysilane (AEAPS) tercih edilmiştir.

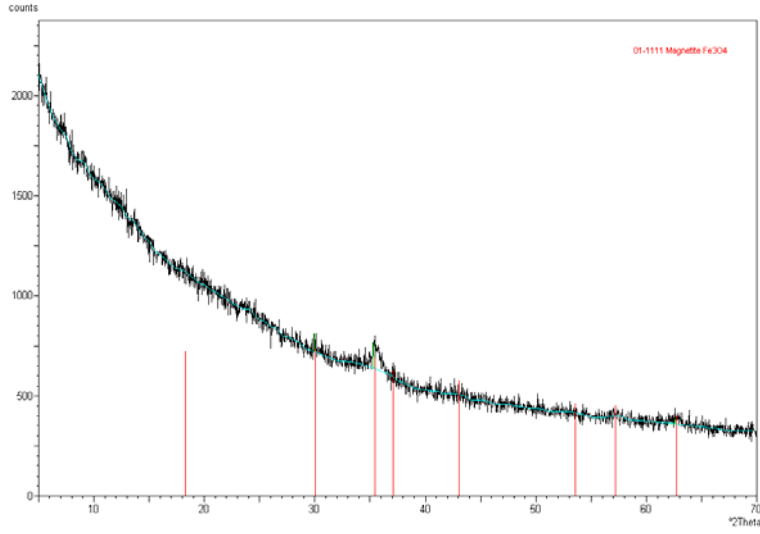


Şekil 4.5 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların 1µm ölçekteki SEM görüntüsü.

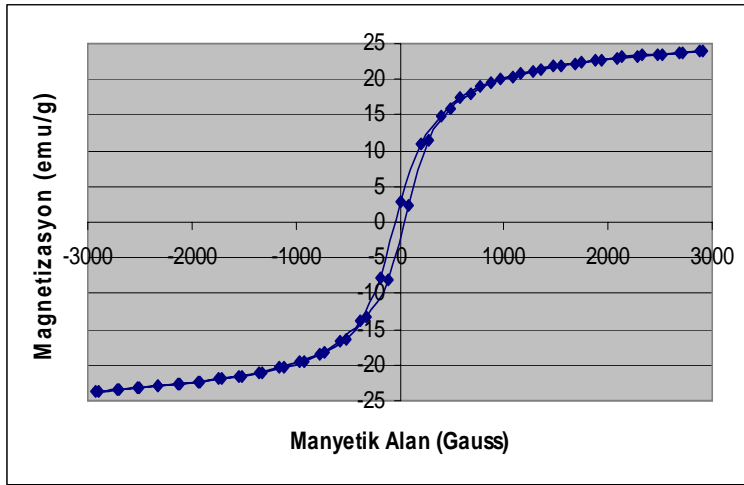


Şekil 4.6 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların 500 nm ölçekteki SEM görüntüsü.

Amino silan ile modifiye edilmiş 500 nm ve 1 μ m ölçekte alınan parçacıklara ait SEM görüntüleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6’ da verilmiştir. Bu görüntülerden amino silan ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıkların boyutlarının 40-60 nm aralığında olduğunu anlaşılmaktadır. Sonuç olarak silika kaplı manyetik nanoparçacıkların amino silan ile modifiye edilmesinin parçacık boyutunda herhangi bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. Aynı şekilde parçacıkların XRD görüntüsünde de belirli bir fark gözlenmemektedir (Şekil 4.7). VSM analizine göre silika kaplı manyetik demir parçacıklarının manyetik doygunluğu 26.45 emu/g olurken amino silan ile kaplandığında manyetik demir parçacıklarının manyetik doygunluğu 23.73 emu/g’ e düştüğü gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.7 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların XRD görüntüsü.



Şekil 4.8 Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu.

4.2 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması ve Radyoışaretleme

4.2.1 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Korunun Hazırlanması

[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ kompleksi Alberto ve arkadaşlarının tanımladığı gibi sulu çözelti içindeki [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ kullanılarak Bölüm 3.4.1’ de verilen yöntem ile hazırlanmıştır (Alberto et al., 1998). [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ korunun radyokimyasal kalite kontrolleri için TLRC ve HPLRC yöntemlerinden yararlanılmıştır.

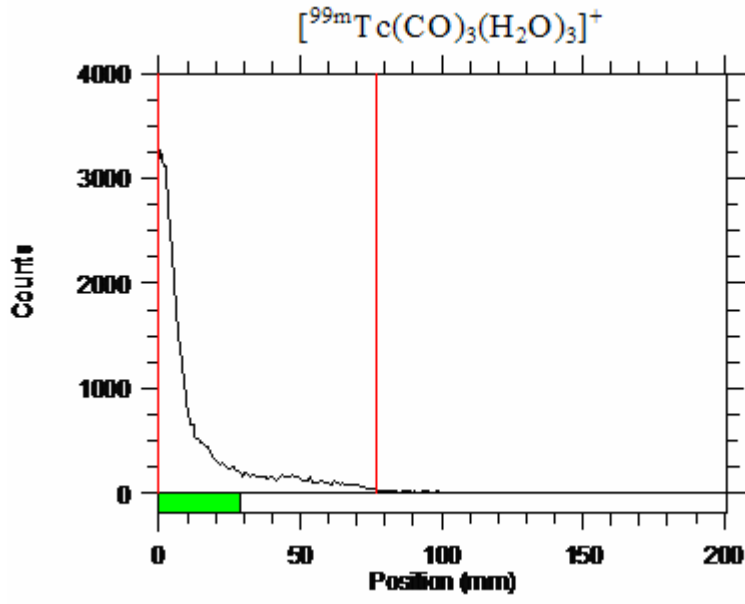
İnce Tabaka Sıvı Radyo Kromatografisinde serum fizyolojik (SF), asetonitril ve MeOH:HCl (95:5) banyo çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ ve [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ komplekslerine ilişkin Rf değerleri ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ koruna ilişkin % verimler Çizelge 4.2 ve 4.3’ de verilmiştir. Bu komplekslerin TLRC kromatogramları da Şekil 4.9’ da verilmektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde % 99’ un üzerinde oldukça yüksek saflıkta [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ koru elde edilmiştir.

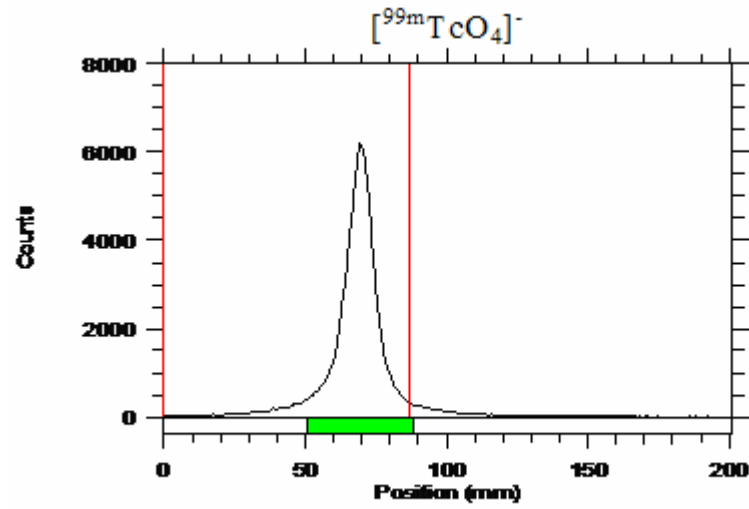
Çizelge 4.2 [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ komplekslerine ilişkin Rf değerleri.

Banyo Çözeltisi	Rf	
	[$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$	[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$
SF	0.75-0.90	0.00-0.10
Asetonitril	0.85-1.00	0.00-0.10
MeOH:HCl	0.74-0.81	0.30-0.80

Çizelge 4.3 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kompleksinin % verim değerleri.

Banyo Çözeltilisi	% Verim
	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$
SF	99.21±07
Asetonitril	99.72±11
MeOH:HCl	-

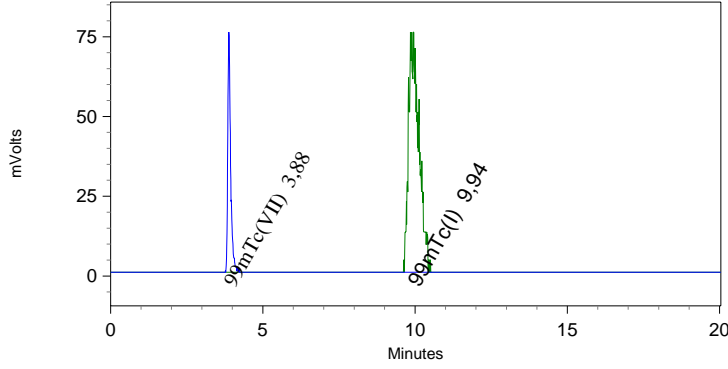




(b)

Şekil 4.9 (a) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ve (b) $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları.

HPLRC ile tanımlanan sonuçlara göre $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kompleksinin radyokimyasal saflığı % 99' dan yüksek olarak belirlenmiştir. HPLC sistemi Cd(Te) radyoaktivite dedektörü ile alınan kromatogramlardan sürüklenme zamanı (Retention Time) Rt değerinin $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ için 3.88, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ için ise 9.94 olarak kaydedilmiştir. Bu sonuçlarla ilgili HPLRC kromatogramı Şekil 4.10' da gösterilmiştir. Bu sonucun Alberto ve grubu ile İçhedefin bulunduğu kromatogramlarla da uyum içerisinde olduğu anlaşılmaktadır (Alberto, 1998; İçhedef, yürüyen tez ve proje).



Şekil 4.10 $[^{99m}\text{TcO}_4]$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerine ilişkin HPLRC diyagramı.

Literatür bilgilerine göre değerlendirdiğimizde $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kor eldesine ilişkin çalışmalarda TLRC yöntemine ilişkin detaylı bilgilere rastlanmamaktadır. Ancak HPLRC ile yapılan kalite kontrol çalışmaları bulunmaktadır (Alberto, 1998; İçhedef yürüyen tez ve proje). Bu aşamada gerçekleştiren HPLRC çalışmalarında daha kararlı ve oldukça yüksek verimli kromatogramlar elde edilmiştir.

Elde edilen $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ kompleksi D-Penisilaminin bağlanmış manyetik nanoparçacıklar ve D-Penisilaminin işaretlenmesinde kullanılmıştır.

4.2.2 D-Penisilaminin Bağlanmış Manyetik Nanoparçacıkların $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ Kori ile İşaretlenmesi

Bölüm 3.2.3' de verilen yöntemle göre D-Penisilaminin manyetik nanoparçacıklar ile birleşebilmesi için glutardialdehit bağlayıcı olarak

kullanılmaktadır. Glutardialdehit sahip olduğu amino grubu ile bir uçtan manyetik nanoparçacıklara bağlanırken ve diğer uçtan da D-Penisilaminin amino grubuyla bağlanır. İlgili reaksiyon basamakları Çizelge 4.1' de verilen akım şemasında görülmektedir. Cao ve arkadaşları Re-188 ile işaretli manyetik nanoparçacıkların hazırlanması konulu çalışmalarında glutaraldehiti aynı amaçla kullanmışlardır (Cao et al., 2004).

D-Penisilamin bağlanmış manyetik nanoparçacıklar 3.4.2' deki yöntemle $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ile işaretlenmiştir. Elde edilen parçacıklar mıknatıs yardımıyla çöktürülerek katı ve sıvı faz ayrılmıştır. Katı ve sıvı fazın radyoaktiviteleri Cd(Te) yarı iletken dedektörü kullanılarak ölçülmüş ve daha sonra manyetik parçacıklar çeşitli kereler yıkanarak saflaştırılmıştır. Bu sayımlara ilişkin değerler ve % verim Çizelge 4.4' de verilmektedir.

Çizelge 4.4 Radyoişaretli D-PA bağlı manyetik nanoparçacıklara ait % verim.

	$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$
Manyetik nanoparçacıkların radyoaktivitesi	10144
Sıvı kısmın radyoaktivitesi	299
Yıkama sonrası manyetik nanoparçacıkların radyoaktivitesi	11011
Yıkama sonrası sıvı kısmın radyoaktivitesi	51
% verim	% 97,05

4.2.3 D-Penisilaminin [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ Kuru ile İşaretlenmesi

İnce Tabaka Sıvı Radyo Kromatografisinde serum fizyolojik (SF), asetonitril ve metanol:HCl (95:5) banyo çözeltileri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre en iyi ayırma SF banyosunda gözlenirken en yüksek işaretleme verimi ise asetonitril banyosunda elde edilmiştir. Kompleksler için elde edilen Rf değerleri ve % verimler Çizelge 4.5 ve Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.5 Komplekslere ilişkin Rf değerleri.

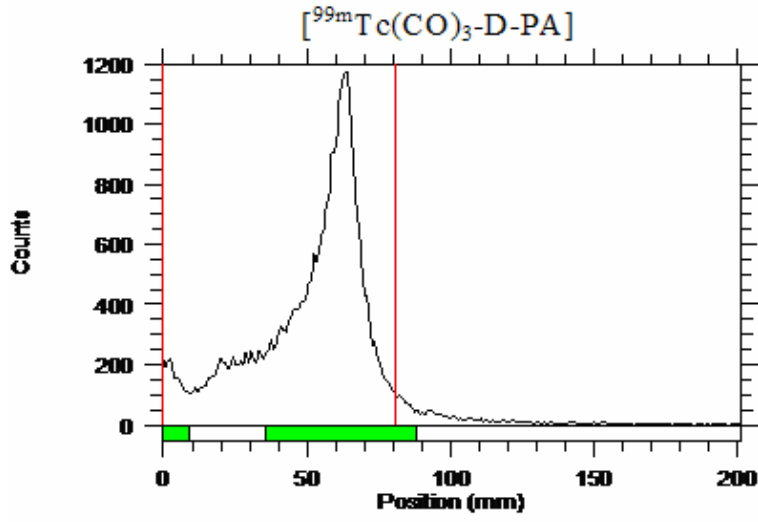
Banyo Çözeltisi	Rf	
	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3^+$	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$
SF	0.00-0.10	0.70-0.80
Asetonitril	0.00-0.10	0.10-0.40
Metanol:HCl	0.30-0.80	0.40-0.80

Çizelge 4.6 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] kompleksine ait % verim değerleri.

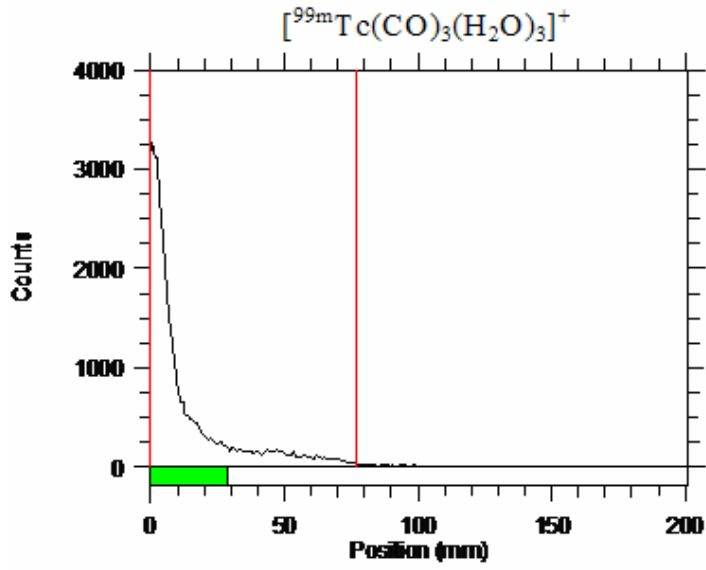
Banyo Çözeltisi	% Verim
	$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$
SF	95.25±1.70
Asetonitril	97.93±3.40
Metanol:HCl	78.90±5.04

Şekil 4.11' de SF banyosunun kromatogramları verilmiştir. Şekil 4.11 (a)' da [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] kompleksi, Şekil 4.11 (b)' de ise [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ yapılarına ait kromatogramlar verilmektedir. Acar ve grubunun bir çalışmasında D-PA' in kalay klorür indirgenme yöntemiyle [$^{99m}\text{TcO}_4$] $^-$ ile işaretlenme koşullarının incelenmesinde en iyi ayırmanın SF banyosunda olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada

indirgenme sonucunda Tc(IV) olarak işaretlenme gerçekleşmektedir. Aynı çalışmada SF banyosunda işaretleme verimi $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ için % 98, Rf değeri ise 0.73-0.93 olarak bulunmuştur (Acar et al., 2007). Tc(I) koru ile yapılan bu çalışmada ise SF banyosunda % 95 verim bulunurken Rf değeri ise 0.70-0.80 dir. Sonuç olarak bu çalışmada sayısal olarak yaklaşık değerler bulunmuştur ancak yapılan literatür araştırmaları sonucunda Tc(I) koru ile oluşan komplekslerin kimyasal ve biyolojik olarak daha kararlı olduklarına dair sonuçlar bulunmaktadır (Alberto et. al.1998; Alberto et. al.1999; Satpati et. al., 2004; Wei et al., 2005; İç hedef yürüten tez ve proje). +1 den +7' ye kadar geniş bir yükseltgenme basamağına sahip olan teknesyumun radyo işaretleme için düşük yükseltgenme basamakları uygun koşullardan birisidir. ^{99m}Tc ile radyo işaretlemeler genellikle kalay klorür indirgeme yöntemiyle ve bu çalışmalarda $[\text{}^{99m}\text{TcO}_4]^-$ deki Tc (VII) yükseltgenme basamağından Tc(IV)' e indirgenmesi ile gerçekleştirilmektedir. Ancak Tc(IV) ile yapılan radyo işaretlemeler havaya karşı duyarlı olduğu için tekrar yükseltgenebilmektedir. Ancak Tc(I) koru ile yapılan çalışmalarda geri dönüşün yani yükseltgenmenin daha zor olduğu sonucuna varılmıştır (Alberto et. al.1998; Alberto et. al.1999; Satpati et. al., 2004; Wei et al., 2005).



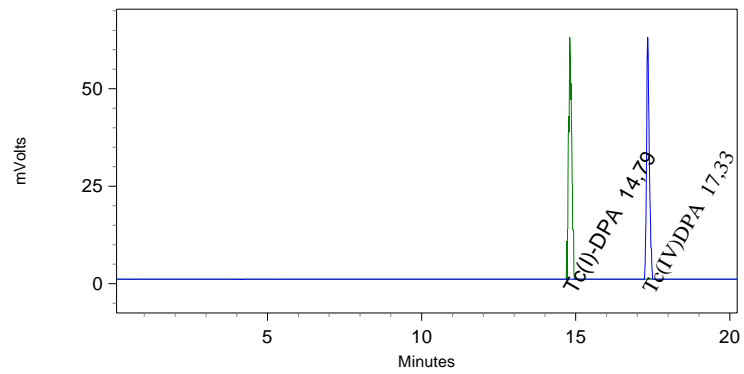
(a)



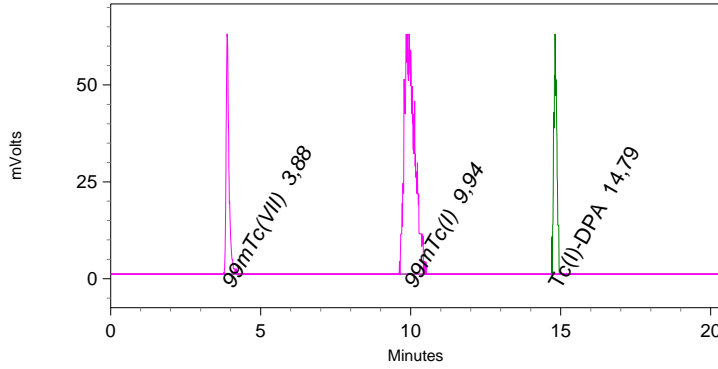
(b)

Şekil 4.11 (a) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, (b) $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ komplekslerinin SF banyosundaki TLRC kromatogramları.

$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DPA}]$ için aynı koşullarda % 99 radyokimyasal saflık belirlenmiştir. HPLC sistemi Cd(Te) radyoaktivite dedektörü ile alınan kromatogramlardan sürüklenme zamanı (Retention Time) Rt değerinin $[^{99m}\text{TcO}_4]^-$ için 3.88, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ için 9.94, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ için 14.79 ve $[^{99m}\text{Tc-D-PA}]$ için ise 17.33 olduğu Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’ de görülmektedir. Bu sonuçlardan D-PA’ in Tc(I) koru ile yüksek verimde bir kompleks oluşturduğu anlaşılmaktadır.



Şekil.4.12 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc-D-PA}]$ komplekslerine ilişkin HPLRC kromatogramı (Cd(Te) dedektörü).



Şekil 4.13 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$], [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$], [$^{99m}\text{TcO}_4^-$] komplekslerine ilişkin HPLRC kromatogramı (Cd(Te) dedektörü).

4.3 Lipofilite

[$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] bileşiğine ait deneysel lipofilite (logP) değeri -0.89±0.16 (n=3) olarak bulunmuştur. Çizelge 4.7' de $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] bileşiklerinin teorik ve deneysel lipofilite değerleri verilmiştir. $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ bileşiğinin teorik lipofilite değeri ACD / logP Algorithm programı kullanılarak bulunmuştur (ACD / LogP ver.6).

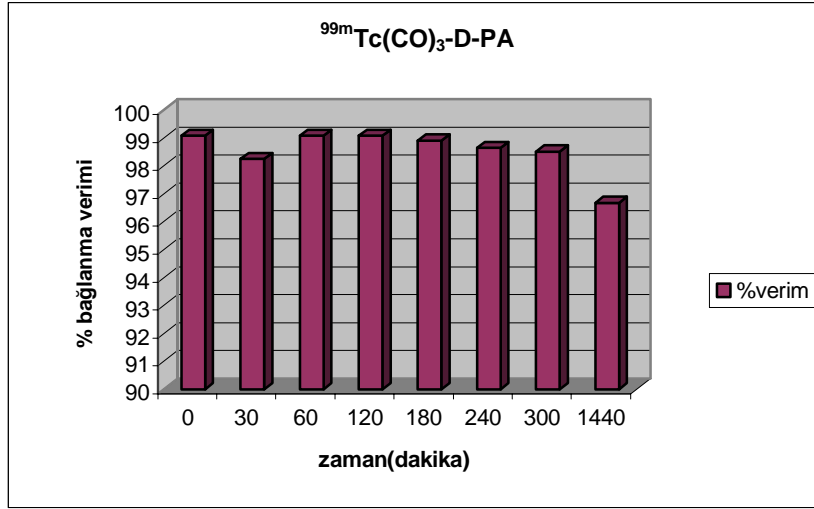
Bu sonuç Acar ve arkadaşlarının elde ettiği $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ bileşiğine ait lipofilite değeri ile karşılaştırıldığında [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] bileşiğinin daha lipofilik olduğu belirlenmiştir (Acar et al., 2007). Yani bu durumda D-PA' in Tc(I) koru ile işaretlenmesi bileşiğin lipofilitesinin artmasına neden olmuştur. Bu sonuç Şekil 4.12' de verilen HPLRC kromatogramı ile de desteklenmektedir. Bu kromatogramda lipofilitesi düşük olan $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ molekülünün sürüklenme zamanınının 17.33, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}$] molekülünün sürüklenme zamanınının ise 14.79 olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7 ^{99m}Tc -D-PA ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ için lipofilite sonuçları.

Kompleks	Teorik lipofilite	Deneysel lipofilite
D-PA	0.93	-
^{99m}Tc -D-PA	-	-2.301
$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$	-	-0.89±0.16

4.4 Serumda Stabilite

$[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ ve $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ bileşiklerinin 37 °C' de serumdaki kararlılığı 24 saat boyunca gözlenmiştir. $[\text{}^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ bileşiğinin serumdaki davranışını gösteren grafik Şekil 4.14' de yer almaktadır. 24 saat sonunda alınan sonuçlara göre bileşiklerin kararlılıklarını koruduğu gözlenmiştir.



Şekil 4.14 [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] bileşiğinin zamana bağlı olarak değişen % bağlanma verimleri.

4.5 Radyoışaretili Bileşiklerinin Biyolojik Aktivitesinin İncelenmesi

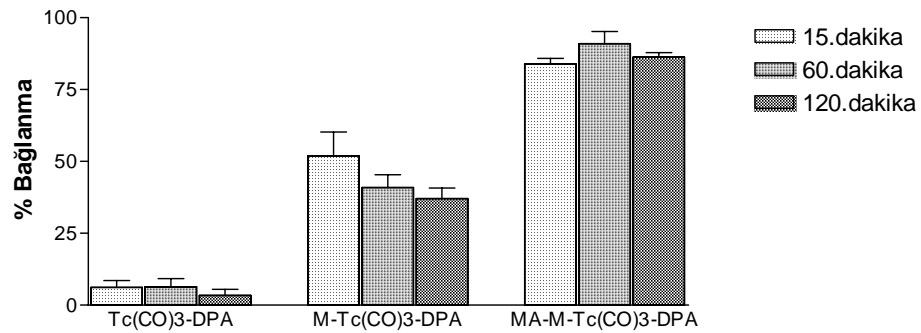
Bölüm 3.6 da belirtildiği gibi bu çalışmada elde edilen [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$, [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] ve [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -M-D-PA] komplekslerinin biyolojik aktivitesinin in vivo olarak belirlenmesinde MCF-7 hücreleri sayısı 10^8 olacak şekilde 24' lük flasklara ekilmiş olarak temin edildi.

MCF-7 ekilmiş flasklardaki kuyulara hazırlanan bu komplekslerden sırasıyla belirli spesifik radyoaktivitedeki [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3$] $^+$ koru, 2 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -D-PA] ve 2 $\mu\text{g}/500 \mu\text{L}$ [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ -M-D-PA] yerleştirildi.

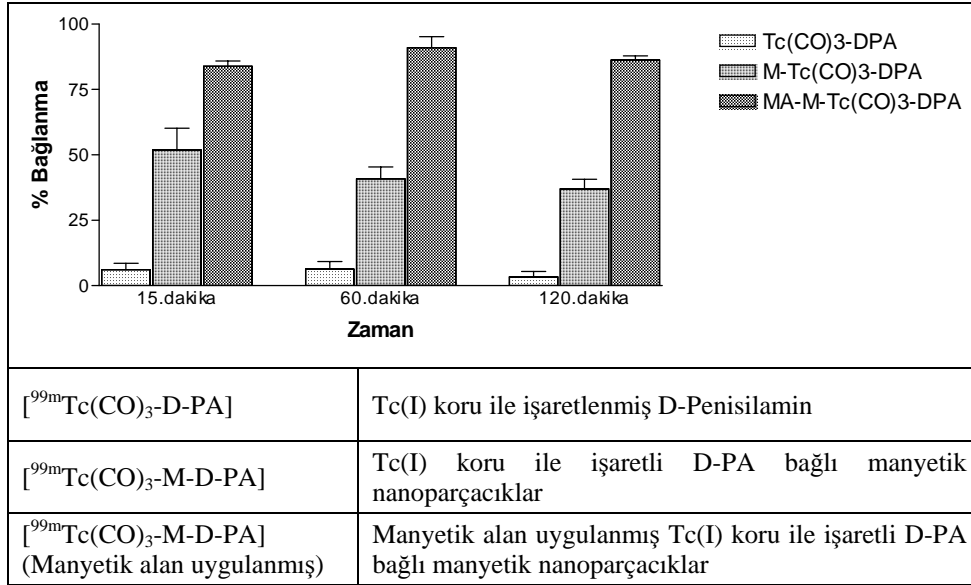
Bölüm 3.6.4' deki işlemler uygulandıktan sonra hücre bağlanma veriminin belirlenmesi için seçilen 0 dk., 15 dk., 60 dk., 120 dk zamanlarında her bir kuyucuktaki hücelere ait aktivite sayımları Cd(Te) yarı iletken katı hal dedektörü ile alındı. Zamana bağlı olarak hücre bağlanma verimleri Çizelge 4.8' de verilmiştir. Alınan sonuçlar zamana bağlı olarak değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamsız ($P>0.05$) bulunmuştur (Şekil 4.15).

Çizelge 4.8 İşaretli bileşiklerin MCF-7 hücreleri üzerindeki % bağlanma verimleri.

Radyoişaretli Bileşik	Zaman		
	15. dakika	60. dakika	120. dakika
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$	6.16±2.40	6.37±2.84	3.39±2.03
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$	51.89±8.29	40.83±4.54	36.99±3.69
$[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ (Manyetik alan uygulanmış)	83.87±1.99	90.94±4.25	86.27±1.63



Şekil 4.15 $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$, $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ (manyetik alan uygulanmış) bileşiklerinin zamana bağlı olarak MCF-7 hücrelerine bağlanma verimleri.



Şekil 4.16 [^{99m}Tc(CO)₃-D-PA], [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] ve manyetik alan uygulanmış [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] bileşiklerine ait bağlanma verimleri.

İşaretli bileşikler kendi aralarında da istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır (Şekil 4.16). [^{99m}Tc(CO)₃-D-PA] ile [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA], [^{99m}Tc(CO)₃-D-PA] ile [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] ve son olarak [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] ile manyetik alan uygulanmış [^{99m}Tc(CO)₃-M-D-PA] bileşikleri arasında istatistiksel olarak anlamlı (P<0.001) sonuçlar elde edilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde D-PA'nın manyetik nanoparçacıklarla oluşturduğu kompleksler hücreler üzerinde daha yüksek bağlanma verimi göstermişlerdir. Bununla birlikte D-PA'nın manyetik nanoparçacıklı komplekslerine manyetik alan uygulanması ile de manyetik parçacıkların hücrelere bağlanma oranı yaklaşık iki kat arttırılmıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada D-Penisilamin (D-PA) manyetik nanoparçacıkları sentezlenerek $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile radyoışaretlenmesi sağlanmış ve hücreler üzerinde bu yapının biyolojik aktivitesi incelenmiştir. Sentezlenen manyetik nanoparçacıklar silika tabakası ile kaplanmış ve yüzeyi amino silan ile modifiye edilmiştir. Elde edilen parçacıkların SEM görüntüleri incelendiğinde parçacık boyutlarının 40-60 nm arasında olduğu belirlenmiştir. Amino silan ile modifiye edilmiş silika kaplı manyetik parçacıklara D-Penisilamin bağlanarak $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ile işaretlenmiştir. Oluşan D-PA bağlı manyetik radyoaktif nanoparçacıkların kalite kontrolleri sonrasında bağlanma verimi % 97.05 olarak hesaplanmıştır. Bu yüksek verim parçacıklarla $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru arasında kimyasal bir bağlanma gerçekleştiğini göstermektedir.

D-PA molekülünün $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ kuru ile işaretlenmesiyle elde edilen $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ bileşiğinin ince tabaka kromatografisi kullanılarak işaretleme verimi 97.93 ± 3.40 olarak bulunmuştur. Bileşiğe ait lipofilité analizi yapılmış ve elde edilen -0.89 ± 0.16 değeriyle $^{99m}\text{Tc-D-PA}$ bileşiğinden daha lipofilik olduğu kanıtlanmıştır. Aynı zamanda $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ ve $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ bileşiklerinin serumda kararlılığı gözlenmiş ve her iki bileşiğinde 24 saat sonunda oldukça kararlı olduğu belirlenmiştir.

Elde edilen bu bileşiklerinin biyolojik aktiviteleri ise kanserli bir meme hücresi olan MCF-7 hücreleri üzerinde incelenmiştir. $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$ bileşiğinin hücrelere bağlanma verimi $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-D-PA}]$ 'den daha yüksek bulunmuştur. Bununla birlikte $[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}]$

bileşigi ile işaretlenmiş hücrelere manyetik alan uygulandığında ise [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-M-D-PA}$]’ in hücrelere daha yüksek verimle bağlandığı gözlenmiştir. Sonuç olarak radyoişaretli manyetik nanoparçacıklarla işaretlenen hücrelere manyetik alan uygulandığında bileşiğin hücrelere bağlanma verimi iki kat artmıştır.

Sonuç olarak bu çalışmada hazırlanması kolay ve hedefe yönelik yeni bir tanı ajanı oluşturulmak istenmiştir. Elde edilen bulgular bize nano-boyutlu manyetik özellik kazandırılmış [$^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$]⁺ koro ile işaretli D-Penisilamin kompleksinin bu amaçla kullanılabileceğini işaret etmektedir. Bu çalışma kimyasal özelliklerinin teknesyuma benzemesi nedeniyle $^{186/188}\text{Re(I)}$ koro ile de gerçekleştirilebilir. Renyumun teknesyumdan farklı olarak beta ışını yayımlamaktadır. Bu sayede renyum ile oluşturulacak bu yapının sadece tanı amaçlı değil aynı zamanda tedavi amaçlı kullanımı da söz konusu olabilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acar, C., Teksöz, S., Ünak, P., Biber, F.Z.**, 2007, Investigation of new bifunctional agents: D-Penicillamine, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 273, 641–647p.
- ACD / LogP ver. 6.0** (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada)
- Ahuja, S.**, 2006, High-pressure liquid chromatography, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47(15): 485 – 559 p.
- Alberto, R., Schibli, R., Egli, A., Schubiger, P.A.**, 1998, A novel organometallic aqua complex of technetium for the labeling of biomolecules: Synthesis of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ from $[\text{}^{99\text{m}}\text{TcO}_4]^-$ in aqueous solution and its reaction with a bifunctional ligand, *J. Am. Chem. Soc.*, 120 (31), 7987–7988p.
- Alberto, R., Schibli, R., Schubiger, A.P.**, 1999, First application of *fac*- $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ in bioorganometallic chemistry: Design, structure and invitro affinity of a 5-HT_{1A} receptor ligand labeled with $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 6076-6077p.
- Alberto, R., Schibli, R., Waibel, R., Abram, U., Schubiger, A.P.**, 1999, Basic aqueous chemistry of $[\text{M}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$ (M=Re, Tc) directed towards radiopharmaceutical application, *Coordination Chemistry Reviews*, 190-192, 901-919p.
- Alberto, R., Ortner, K., Wheatley, N., Schibli, R., Schubiger, A.P.**, 2001, Synthesis and Properties of Boranocarbonate: A Convenient in situ CO Source for the Aqueous Preparation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{OH}_2)_3(\text{CO})_3]^+$, *J. Am. Chem. Soc.*, , 123, 3135–3136p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.** (Eds.), 2002, Isolating cells and growing them in culture, In: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition.
- Alexiou, C., Arnold, W., Klein, R.J., Parak, F.G., Hulin, P., Bergemann, C., Erhardt, W., Wagenpfeil, S., Lubbe, A.S.**, 2000, Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting, *Cancer Res.*, 60, 6641–6648p.
- Banerjee, S. R., Levadala, M. K., Lazarova, N., Wei, L., Valliant, J.F., Stephenson, K. A., Babich, J. W., Maresca, K. P., Zubieta, J.**, 2002, Bifunctional Single Amino Acid Chelates for Labeling of Biomolecules with the $\{\text{Tc}(\text{CO})_3\}^+$ and $\{\text{Re}(\text{CO})_3\}^+$ Cores. Crystal and Molecular Structures of $[\text{ReBr}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{NCH}_2\text{C}_5\text{H}_4\text{N})]$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NH}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)_2\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{H}\}]\text{Br}$, $[\text{Re}(\text{CO})_3\{\text{X}(\text{Y})\text{NCH}_2\text{CO}_2\text{CH}_2\text{CH}_3\}]\text{Br}$ (X = Y = 2-pyridylmethyl; X = 2-pyridylmethyl, Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl; X = Y = 2-(1-methylimidazolyl)methyl), $[\text{ReBr}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})\}]$, and $[\text{Re}(\text{CO})_3\{(\text{C}_5\text{H}_4\text{NCH}_2)\text{N}(\text{CH}_2\text{C}_4\text{H}_3\text{S})(\text{CH}_2\text{CO}_2)\}]$, *Inorganic Chemistry*, 41, 6417-6425p.
- Bekis, R., Medine, I., Dağdeviren, K. And Unak, P.**, 2008, Sentinel Lenf Düğümü Saptanmasında Yeni Bir Yöntem, *Turkish Journal of Nuclear Medicine*, 17, 1, No22, 49s.
- Berry, C.C. and Curtis, A.S.G.**, 2007, Functionalisation Of Magnetic Nanoparticles For Applications in Biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 198, 206p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Cao. J., Wang, Y., Yu, J., Xia, J., Zhang, C., Yin, D. and Hafeli, 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, 165-174p.
- Chunfua, Z., Jinquana, C., Duanzhia, Y., Yongxiana, W., Yanlinb, F. and Jiaju, T.,** 2004, Preparation And Radiolabeling Of Human Serum Albumin (HSA)-Coated Magnetite Nanoparticles for Magnetically Targeted Therapy, *Applied Radiation and Isotopes*, 61, 1255–1259p.
- Friedman M.,** 1977, Chemical Basis for Pharmacological and Therapeutic Actions of Penicillamine, *Proc. roy. Soc. Med.*, 70.
- Fu C., Wang Y., Chao Y., Hung S., Yang M.,** 2004, Directly Labeling Ferrite Nanoparticles With Tc-99m Radioisotope for Diagnostic Applications, *IEEE Transactions on Magnetics*, 40 (4), 3003-3005p.
- Grillini, P. M.,** 2006, Thin-layer chromatography, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47(13): 413 – 442 p.
- Goodwin, S., Peterson, C., Hob, C., Bittner, C.,** 1999, Targeting and retention of magnetic targeted carriers (MTCS) enhancing intra-arterial chemotherapy, *J. Magn. Magn. Mater.*, 194, 132–139p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Goodwin, S.C., Bittner, .C.A., Peterson, C.L., Wong, G.,** 2001, Single dose toxicity study of hepatic intra-arterial infusion of doxorubicin coupled to a novel magnetically targeted drug carrier, *Toxicol. Sci.*, 60, 177–183p.
- Gupta, P.K., Hung, C.T.,** 1989, Magnetically controlled targeted micro-carrier systems, *Life Sciences*, 44, 175–186p.
- Gupta, A.K., Gupta, M.,** 2005, Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications, *Biomaterials*, 26, 3995-4021p.
- Gündüz, T.,** 1999, Instrümental Analiz, Gazi Kitapevi, 5. Baskı, 1115 – 1273 s.
- Dağdeviren, K., Unak, P., Bekis, R., Muftuler, F.Z.B., Ertay, T., Ulker, O. and Durak, H.,** 2007, Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC), *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 273, 3, 635-639p.
- Deng, Y., Whang, J., Hu, J., Yang, W., Fu, S.,** 2005, Investigation of formation of silica-coated magnetite nanoparticles via sol–gel approach, *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 262, 87–93p.
- Häfel, U.O., Sweeney, S.M., Beresford, B.A., Humm, J.L. and Macklis, R.M.,** 1995, Effective Targeting of Magnetic Radioactive 90-Y-Microspheres to Tumor Cells by an Externally Applied Magnetic Field. Preliminary In Vitro and In Vivo Results, *Nucl. Med. Biol.* Vol. 22, No. 2, 147-155p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Häfeli, U., Schütt, W., Teller, J., Zborowski, M.,** 1997. Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers, *first ed. Plenum Press*, New York.
- Häfeli, U.O.,** 2001, Radioactive magnetic microspheres. In: Arshady, R. (Ed.), *Microspheres, Microcapsules & Liposomes: Magneto- and Radio-Pharmaceuticals*, *Citus Books*, London, 3, 559–584p.
- Häfeli, U.O., Yub, J., Farudic, F., Lid, Y. and Tapolskyd, G.,** 2003, Radiolabeling Of Magnetic Targeted Carriers (MTC) With Indium-111, *Nuclear Medicine and Biology* 30, 761–769p.
- Häfeli, U.O.,** 2004, Magnetically Modulated Therapeutic Systems, *International Journal of Pharmaceutics* 277, 19–24p.
- Häfliger, P., Mundwiler, S., Ortner, K., Spingler, B., Alberto, R., Andócs, G., Balogh, L., and Bodo, K.,** 2005, Structure, Stability, and Biodistribution of Cationic $[M(CO)_3]^+$ ($M = \text{Re}, {}^{99}\text{Tc}, {}^{99m}\text{Tc}$) Complexes with Tridentate Amine Ligands, *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 35, 27–34p.
- He, H., Lipowska, M., Xu, X., Taylor, A.T., Carlone, M., Marzilli, L.G.,** 2005, $\text{Re}(\text{CO})_3$ Complexes Synthesized via an Improved Preparation of Aqueous $\text{fac-}[\text{Re}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ as an Aid in Assessing ${}^{99m}\text{Tc}$ Imaging Agents. Structural Characterization and Solution Behavior of Complexes with Thioether-Bearing Amino Acids as Tridentate Ligands, *Inorganic Chemistry*, 44, 5437-5446p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- İçhedef, Ç.**, 2006, Guanin ve türevlerinin $M(CO)_3+$ ($M=Tc$ ve Re) korları ile işaretli manyetik özellikli nanoparçacıklarının oluşturulması ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, devam etmekte.
- Jurgons, R., Seliger, C., Hilpert, A., Trahms, L., Odenbach, S., Alexiou, C.**, 2006, Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy, *Journal of Physics: Condensed Matter*, 18, 2893-2902p.
- Jurisson S.S., Lydon J.D.**, 1999, Potential Technetium Small Molecule Radiopharmaceuticals, *Chemical Reviews*, 99, 2205-2218p.
- Kervan, S.**, 2001, $R_{1-x}R_xMn_2Ge_2$ İntermetalik Bileşiklerin Kristal Yapı ve Magnetik Özelliklerinin İncelenmesi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 57s.
- Kirschstein, R., Skirboll, L.R.**, 2001. Stem cells: scientific progress and future research directions. Report prepared by the National Institutes of Health.
- Kolat, V.S.**, 2007, Lacamno Ve Fecrcunbsib Numunelerinin Manyetik Ve Manyetokalorik Özellikleri, *İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2007, 76-77s.
- Liang S., Wang Y., Yu J., Zhang C., Xia J., Yin D.**, 2007, Surface modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles: as a new carrier for bio-magnetically targeted therapy, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 18, 2297–2302p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Medine E.İ.**, 2008, ^{125/131}I İşaretli Urasil'in Glukuronid Sentezi ve Manyetik Özellik Kazandırılarak Yeni Bir Manyetik İlaç Taşıyıcı Oluşturulması, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 7-8s.
- Müler, R.H., Jakobs, C. and Kayser, O.**, 2001 Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy—Rational for development and what we can expect for the future *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47, 3–19p.
- Özyazgan, S.**, 2002, Toksikokinetik, *Zehirlenmeler Sempozyum Dizisi*, 32: 9 – 19 s.
- Papell, S.S.**, 1965, U.S. Patent no 3, 215, 572.
- Philipse, A.P., Bruggen, M.P.B.v., Pathmamanoharan, C.**, 1994 *Langmuir*, 10, 92p.
- Pietsch H.J., Gupta A., Reisgys M., Drews A, Seifert S., Syhre R., Spess H., Alberto R., Abram, U., Schubiger P.A., Johannsen B.**, 2000, Chemical and biological characterization of technetium (I) and rhenium (I) tricarbonyl complexes with dithioether ligands serving as sinkers for coupling the Tc(CO)₃ and Re(CO)₃ moieties to biologically active molcules, *Bioconjuate Chem.*, 11, 414-424p.
- Pileni, M.P.**, 1977, *Langmuir*, 13, 3266p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Prigogine, I., Stuart, A., Darmann, J.L., Fiorani, D., Ronc E. (Eds.),** 1977, *Advance in Chemical Physics*, Wiley, New York.
- Pulfer, S.K., Gallo, J.M.,** 1998, Enhanced brain tumor selectivity of cationic magnetic polysaccharide microspheres, *Journal of Drug Targeting*, 6, 215–228p.
- Puller, S.K., Ciccotto, S.L., Gallo, J.M.,** 1999, Distribution of small magnetic particles in brain tumor-bearing rats, *Journal of Neuro-Oncology*, 41, 99–105p.
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D. and Li, M.,** 1999, Magnetite Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* 215, 190–192p.
- Rosensweig, R.E. and Kaiser, R.,** 1967, NTIS Rep. No. NASW-1219.
- Rosensweig, R.E.,** 1997, *Ferrohydrodynamics*, Cambridge Univ. Press, Cambridge, London (1985); *republished by Dover.Publ.Inc.*, New York.
- Sachdeva, M.S.,** 1998, Drug targeting systems for cancer therapy, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 7, 1849-1864p.
- Saiyed, Z.M., Telang, S.D. and Ramchang, C.N.,** 2003, Application Of Magnetic Technigues İn The Field Of Drug Discovery And Bionedicine, *BioMagnetic Research and Technology*, 1-2, 1-8p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Satpati, D., Mallia, M., Kothari, K., Pillai, M.R.A.,** 2004, Comparative evaluation of $[\text{}^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{CO})_3]^+$ precursor synthesized by conventional method and by using carbonyl kit, *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 47, 657-668p.
- Satpati, D., Bapat, K., Mukherjee, A., Banerjee, S., Kothari, K., Venkatesh, M.,** 2006, Preparation and bioevaluation of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -carbonyl complex of 5-hydroxy tryptamine derivative, *Applied Radiation and Isotopes*, 64, 888–892p.
- Scherer, C., Figueiredo Neto, A.M.,** 2005, Ferrofluids: Properties and Applications, *Brazilian Journal of Physics*, 35, 718-727p.
- Schibli, R., Labella, R., Alberto, R., Garcia-Garayoa, E., Ortner, K., Abram, U., Schubiger, P.A.,** 2000, Influence of the denticity of ligand systems on the in vitro and in vivo behavior of $^{99\text{m}}\text{Tc}(\text{I})$ tricarbonyl complexes: a hint for the future functionalization of biomolecules, *Bioconj. Chem.*, 11 (3), 345–351p.
- Schüth, F., Lu, A., Salabas E.L.,** 2007, Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application, *Angewandte Chemie Int. Ed.*, 46, 1222-1244p.
- Skoog, D. A. and West, D. M.,** 1998, Fundamentals of Analytical Chemistry, 2. Baskı Türkçe çeviri.
- Stephens, F. O.,** 1988, Why use regional chemotherapy? principles and pharmacokinetics, *Reg. Cancer Treat.*, 1, 4–10p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Theobald, A. E.**, 1989, Radipharmaçuticals using radioactive compounds in pharmaceutics and Medicine, *Ellis Horwood Edition*.
- U.S. Patent**, 1974, 3,843,540.
- Unak, P. and Medine E.I.**, 2007, Tc-99m Labeled Magnetite Nanoparticles As Drug Carriers, EANM'07 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, in Copenhagen/Denmark October, 13-17, 34, Suppl 2, 133p.
- Ünak P.**, 2003, Ulusal Radyofarmasi Kursu Ders Notları Bölüm I Radyonüklidlerin Üretimi.
- Yu, J.F., Hafeli, U.O., Sands, M. and Dong, Y.H.**, 2003, Y-90-Oxine-Ethiodol, A Potential Radiopharmaceutical For The Treatment Of Liver Cancer, *Applied Radiation And Isotopes*, 58, 5, 567-573p.
- Welch, M.J. and Redvanly, C.S.**, 2003, Handbook of radiopharmaceuticals, John Wiley & Sons, Ltd., 645-655 p.
- Widder, K.J., Senyei, A.E., Ranney, D.F.**, 1979, Magnetically responsive microspheres and other carriers for the biophysical targeting of antitumor agents, *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 16, 213-271p.
- Widder, K.J., Morris, R.M., Poore, G.A., Howard, D.P., Senyei, A.E.**, 1983, Selective targeting of magnetic albumin microspheres containing low-dose doxorubicin: Total remission in Yoshida sarcoma-bearing rats, *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 19, 135-139p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Yurt, F., 1998, Benzodiazepin (Diazepam) ve Cycloprrolone (Zopiklone) Grubu Farmasötiklerin I-131 İle İşaretlenmesi, Doktora Tezi, E. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir, 176s.

Zhang, Junbo and Wang, X., 2000, Synthesis of $^{99m}\text{TcN}(\text{IPDTC})_2$ and its biodistribution in mice, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 249(3): 573 – 576 p.

<http://nano.cancer.gov/index.asp>.

www.peptideguide.com/amino-acids/index.html

www.istanbul.edu.tr

www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cell_Culture/Key_Resources/ECACC_Handbook.html

www.research.umbc.edu/~jwolf/method5.htm

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Seniha (Yolcular) Özyüncü

Doğum Yeri : Palu / Elazığ

Doğum Yılı : 21-12-1979

Öğrenim Durumu:

Lisans : 1998 – 2006 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : 2007 - Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü