



T.C
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**^{99m}Tc İLE İŞARETLİ MADECASSOSİDE VE
ENKAPSÜLE EDİLMİŞ MADECASSOSİDE
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE PARKİNSON
HASTALIĞININ TEŞHİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN *IN VITRO/IN VIVO*
YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

Doktora Tezi

Emre UYGUR

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

İzmir

2020



T.C

EGE ÜNİVERSİTESİ

Fen Bilimleri Enstitüsü

**^{99m}Tc İLE İŞARETLİ MADECASSOSİDE VE
ENKAPSÜLE EDİLMİŞ MADECASSOSİDE
BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE PARKİNSON
HASTALIĞININ TEŞHİSİNDE
KULLANILABİLİRLİĞİNİN *IN VITRO/IN VIVO*
YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

Emre UYGUR

Danışman: Prof. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Nükleer Uygulamalar Doktora Programı

İzmir
2020



Sayın Emre UYGUR tarafından doktora tezi olarak sunulan “ ^{99m}Tc İle İşaretli Madecassoside ve Enkapsüle Edilmiş Madecassoside Bileşiklerinin Sentezi ve Parkinson Hastalığının Teşhisinde Kullanılabilirliğinin *In Vitro/ In Vivo* Yöntemlerle Tespiti” başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesinin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 03/06/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/~~oyçokluğu~~ ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı

:Prof. Dr. Perihan ÜNAK

.....
P. ÜNAK

Raportör Üye

:Prof. Dr. Fazilet Zümrüt
BİBER MÜFTÜLER

.....
F. Z. BİBER MÜFTÜLER

Üye

:Prof. Dr. Serhan
SAKARYA

.....
S. SAKARYA

Üye

:Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

.....
U. AVCIBAŞI

Üye

:Doç. Dr. Vedat EVREN

.....
V. EVREN



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Doktora Tezi olarak sunduğum “^{99m}Tc İle İşaretli Madecassoside ve Enkapsüle Edilmiş Madecassoside Bileşiklerinin Sentezi ve Parkinson Hastalığının Teşhisinde Kullanılabilirliğinin *In Vitro/ In Vivo* Yöntemlerle Tespiti” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

03/06 /2020



Emre UYGUR



ÖZET

**^{99m}Tc İLE İŞARETLİ MADECASSOSİDE VE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ
MADECASSOSİDE BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE PARKİNSON
HASTALIĞININ TEŞHİSİNDE KULLANILABİLİRLİĞİNİN *IN VITRO/ IN
VIVO* YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

UYGUR, Emre

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Mayıs 2020, 130 sayfa

Dünya üzerinde yaklaşık altı milyon insanı etkileyen, nörodejeneratif bir hastalık olan Parkinson Hastalığı, beynin Substantia Nigra pars compacta (SNc) adı verilen bölgedeki dopamin üreten sinir hücrelerinin ölümüne bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Parkinson hastalığının teşhisinde nörolojik görüntülemeye yönelik biyomarkerlar Bilgisayarlı Tek Foton Emisyon Tomografisi (SPECT), Positron Emisyon Tomografisi (PET), Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve Transkrinal Sonografi (TCS) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Tez çalışması kapsamında da Parkinson Hastalığının teşhisinde kullanılabilecek Teknesyum-99m (^{99m}Tc) ile radyoişaretleli bitkisel kökenli enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda bitkisel kökenli bir bileşik olan Madecassoside (MA) bileşiğinin Levodopa (L-DOPA) konjugasyonu (MA-L-DOPA) yapılmış ve konjugat poli laktik-ko-glikolik asit (PLGA) ile enkapsüle edilerek MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA nanokapsülleri sentezlenmiştir. Gerçekleştirilen sentez ürünlerine ait yapı analizleri ve karakterizasyon çalışmaları sırasıyla erime noktasının tespiti, Fourier Transform Kızılötesi (FTIR), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR), Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS), İnce Tabaka Kağıt Kromatografisi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Dinamik Işık Saçılımı Analizi (DLS) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. ^{99m}Tc ile radyo işaretleli

bileşiklerin (^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA) radyoişaretleme verimleri TLRC ve HPLRC yöntemleri ile tespit edilmiştir. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarında SH-SY5Y ve PC-12 hücre hatları üzerinde ^{99m}Tc ile radyoişaretleli bileşiklerin inkorporasyon ve inaktif (MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA) bileşiklerin sitotoksikite çalışmaları yürütülmüştür. ^{99m}Tc ile radyoişaretleli bileşiklerin biyoetkinliğinin incelenmesi amacıyla sağlıklı erkek Sprague Dawley sıçanlar ve sterotaksik girişimle oluşturulan Parkinson deney modeli üzerinde biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yapılan tüm deneysel sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde; ^{99m}Tc ile radyoişaretleli bitkisel kökenli enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerin Parkinson Hastalığının teşhisinde kullanılabilecek potansiyel bir ajan olduğu ve çalışmanın beyin araştırmalarında yeni ilaç taşıyıcı ajanların geliştirilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: ^{99m}Tc , Madecassoside (MA), L-DOPA, Parkinson Hastalığı, PLGA, Enkapsülasyon, *In vitro*, *In Vivo*.

ABSTRACT

**THE SYNTHESIS OF ENCAPSULATED MADECASSOSIDE AND
RADIOLABELED MADECASSOSIDE WITH ^{99m}Tc AND THE
DETERMINATION THE AVAILABILITY OF UTILIZING IN DIAGNOSIS
OF PARKINSON'S DISEASE WITH *IN VITRO* / *IN VIVO* METHODS**

UYGUR, Emre

PhD. Thesis, Department of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

May 2020, 130 pages

Parkinson's Disease (PD), which is a neurodegenerative disease that affects approximately six million people worldwide, is caused by the death of dopamine-producing nerve cells in the area of the brain called Substantia Nigra pars compacta (SNc). Biomarkers for neurological imaging in the diagnosis of Parkinson's disease are performed using Single Photon Emission Computer Tomography (SPECT), Positron Emission Tomography (PET), Magnetic Resonance Imaging (MRI) and Transcranial Sonography (TCS) methods. Within the scope of the thesis, it is aimed to develop drug delivery systems that encapsulated, herbal origin radiolabeled with Technetium-99m (^{99m}Tc), that can be used in the diagnosis of PD. For this purpose, Madecassoside (MA) compound and Levodopa (L-DOPA) compound was conjugated (MA-L-DOPA) and synthesized MA-PLGA and MA-L-DOPA-PLGA nanocapsules that encapsulated with poly lactic-co-glycolic acid (PLGA). Structural analysis and characterization studies of synthesized products performed, respectively, melting point determination, Fourier Transform Infrared (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy (LC-MS), Thin-layer Chromatography (TLC), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) was performed using Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM) methods. Radiolabeling efficiencies of compounds (^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA) which radiolabeled with ^{99m}Tc were determined by TLRC and

HPLRC methods. *In vitro* cell culture studies, incorporation studies with radiolabeled compounds and cytotoxicity studies with inactive (MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, and MA-L-DOPA-PLGA) compounds were conducted on the SH-SY5Y and PC-12 cell lines.

To investigate the bio-activity of radiolabeled compounds with ^{99m}Tc the biodistribution studies were conducted on healthy male Sprague Dawley rats, and Parkinson's experimental model created by a stereotaxic intervention.

When all experimental results are evaluated together; It is thought that radiolabeled herbal encapsulated drug delivery systems with ^{99m}Tc are a potential agent for the diagnosis of Parkinson's Disease and the study will contribute to the development of new drug-carrying agents in brain research.

Keywords: ^{99m}Tc , Madecassoside (MA), L-DOPA, Parkinson's Disease, PLGA, Encapsulation, *In vitro*, *In Vivo*.

ÖNSÖZ

Nükleer bilimlerle ilgili maalesef toplumda olan önyargı ve radyasyonun büyülü dünyası beni bu alanda doktora çalışması yapmama iten en büyük etkendi. Doktora eğitimim boyunca nükleer bilimlere ilişkin bilgimi derinleştirme imkânı buldum. Değerli hocalarımla yol göstericiliğinde sadece pür bilimsel çalışmalar değil, nükleer bilimler ilgili toplumu aydınlatma yönünde lokal çalışmalar da gerçekleştirdim. Toplumu aydınlatma misyonunu taşıyan öğretmenlik gibi kutsal bir mesleği icra ederken, nükleer konularda var olan ön yargıları kırmak adına pedagoji bilimiyle nükleer bilimleri entegre etme gayreti gösterdim. Doktora tez çalışmasında ise ilgi duyduğum nörodejenaratif hastalıklardan Parkinson hastalığı üzerine çalışmak da benim için çok önemliydi. Çünkü çevremde bu hastalıktan müzdarip insanlar vardı. Yaptığım bu tez çalışmasıyla Parkinson hastalığıyla ilgili birçok bilgi ve deneyim elde etme imkânı buldum. Doktora eğitimim boyunca elde ettiğim bilgi ve birikimi öğrencilerimle, velilerimle ve çevremdeki meslektaşlarımla paylaştım. Ayrıca Parkinson hastalığından müzdarip çevremdeki kişilere bilgi ve deneyimlerimi aktarmak beni ziyadesiyle mutlu etti. Öğrendiğim ve deneyimlediğim bilgiler ışığında gerçekleştirdiğim tez çalışmasıyla bu alanda çalışan bilim dünyasına en ufak bir katkıda bulunabildiysem ne mutlu.

İzmir

03.06.2020

Emre UYGUR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa Numarası
İÇ KAPAK.....	i
KABUL ONAY SAYFASI.....	iii
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	v
ÖZET.....	vii
ABSTRACT.....	ix
ÖNSÖZ.....	xi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xvii
TABLolar DİZİNİ.....	xix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xx
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Parkinson Hastalığı.....	4
2.2. Parkinson Hastalığı Patogenezi	8
2.3. Rotenone Nörotoksitesisi.....	8
2.4. Katekolaminler.....	9
2.5. Levodopa (L-DOPA)	13
2.6. Dopamin.....	14
2.7. Radyofarmasötikler.....	15
2.8. PET ve SPECT Radyofarmasötikleri.....	18
2.9. Teknesyum-99m(^{99m} Tc)	20
2.10. Nükleer Tıpta Beyin Görüntülemeye Kullanılan Ajanlar.....	22
2.11. Parkinson Hastalığının Teşhisine Yönelik PET ve SPECT Ajanları.....	24
2.12. Parkinson Hastalığında Bitkisel Kökenli Bileşiklerin Yeri.....	25
2.13. Madecassoside (MA)	26
2.14. Bitkisel Kökenli Radyoişaretle Bileşikler	28
2.15. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)	29
2.16. Beynin SNc Bölümüne Yönelik İlaç Taşınımı	31
2.17. Lipofilite.....	34
2.18. Stabilitate.....	34

2.19. Erime noktası tayini	35
2.20.Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi (HPLRC)Yöntemi.....	36
2.21.İnce Tabaka Kromatografi (TLC) ve İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Yöntemi.....	37
2.22.Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC/ MS).....	38
2.23.Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)	39
2.24.Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi.....	41
2.25.Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi.....	42
2.26.Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	43
2.27. <i>İn Vitro</i> Çalışmalar	44
2.27.1. Hücre Kültürü için Optimum Koşullar.....	45
2.27.2.Sitotoksikite.....	45
2.28. Parkinson Hastalığına Yönelik Araştırmalarda Kullanılan Deneysel Modeller.....	46
2.28.1. Sterotaksik Girişim.....	46
2.28.2. Rotenone Kullanılarak Oluşturulan Deneysel Modeller.....	47
3. MATERYAL VE METOD.....	49
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	49
3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler.....	49
3.1.2. Kullanılan Cihazlar.....	49
3.2. MA-L-DOPA Sentezi	50
3.3. Yapı Tayini Yöntemleri.....	50
3.3.1. Erime Noktası Tayini.....	51
3.3.2. Fourier Transform Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi	51
3.3.3. Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) Spektroskopisi.....	51
3.3.4. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopi (LC-MS)	52
3.3.5. İnce Tabaka Kâğıt Kromatografisi (TLC)	52
3.3.6. HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) Analizi.....	52
3.4. Enkapsülasyon Çalışmaları.....	53
3.4.1. Zeta Parçacık Boyutu Tespiti.....	53
3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	54
3.5. Radyoizotop Etiketleme Çalışmaları.....	54

3.5.1. MA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi.....	54
3.5.2. L-DOPA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi	55
3.5.3. MA-L-DOPA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi	55
3.5.4. MA-PLGA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi.....	55
3.5.5. L-DOPA-PLGA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi.....	55
3.5.6. MA-L-DOPA-PLGA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi.....	56
3.6. Radyoişaretili Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler.....	56
3.6.1. TLRC Analizi	56
3.6.2. HPLRC Analizi	57
3.7. Stabilite Çalışmaları	57
3.8. Lipofilite Çalışmaları.....	57
3.9. <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları.....	57
3.9.1. Hücre Hatları.....	58
3.9.2. Sitotoksikite Çalışmaları.....	58
3.9.3. Hücreler Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi.....	59
3.10. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	60
3.10.1. Sterotaksik Girişim.....	61
3.10.2. Biyodağılım Çalışmaları.....	62
3.11. İstatistiksel Analizler	63
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	65
4.1. MA-L-DOPA Sentezine İlişkin Yapı Analiz Çalışmaları.....	65
4.1.1. Erime Nokta Tayini Sonuçları	65
4.1.2. FTIR Analizi Sonuçları.....	65
4.1.3. LC-MS Analizi Sonuçları.....	66
4.1.4. NMR Analizi Sonuçları.....	68
4.2. TLC Sonuçları.....	72
4.3. HPLC Sonuçları.....	72
4.4. PLGA İle Enkapsüle Edilmiş Bileşiklerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	73
4.4.1. DLS Sonuçları.....	73
4.4.2. SEM Sonuçları.....	75
4.5. ^{99m}Tc ile Radyoişaretleme Çalışmaları	78
4.5.1 TLRC Sonuçları	78

4.5.2.HPLRC Analiz Sonuçları.....	83
4.6.Stabilite Çalışmaları Sonuçları	85
4.7. Lipofilite Çalışmaları Sonuçları.....	86
4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	88
4.8.1. Sitotoksikite Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	88
4.8.2. Inkorporasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar.....	93
4.9. <i>In Vivo</i> Çalışmalar.....	96
4.9.1. Sterotoksik Girişim.....	96
4.9.2. Biyodağılım Çalışmaları.....	97
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	104
KAYNAKLAR.....	106
TEŞEKKÜR	130
ÖZGEÇMİŞ.....	131

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa Numarası
Şekil 2.1. Bazal ganglionda yer alan substansiya nigra bölgesi.....	6
Şekil 2.2. Beynin Substantia Nigra Bölümü.....	7
Şekil 2.3. Katekolaminlerin kimyasal yapısı.....	10
Şekil 2.4 Katekolaminlerin biyosentezi.	11
Şekil 2.5. a)Normal CA Sinyali, b) CA aktivitesinin artırılması.....	12
Şekil 2.6. L-3,4 dihydroxypheylalanine (Levodopa, L-DOPA) Kimyasal Yapısı.....	13
Şekil 2.7. Temel dopaminerjik yollar.....	14
Şekil 2.8. ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc Bozunum Şeması.	21
Şekil 2.9. Madecassoside Molekülünün Kimyasal Yapısı.	27
Şekil 2.10. PGA, PLA ve PLGA bileşiklerinin kimyasal yapısı.....	30
Şekil 2.11. KBB'nin şematik gösterimi.....	33
Şekil 3.1. MA-L-DOPA Sentezi	50
Şekil 4.1 MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin FTIR analizine ait spektrum.....	66
Şekil 4.2. MA-L-DOPA bileşiğine ait LC-MS analizine ait spektrum..	67
Şekil 4.3.MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ¹ H-NMR spektrumu.....	69
Şekil 4.4. MA-L-DOPA bileşiğine ait deneysel ¹ H-NMR spektrumu...	70
Şekil 4.5. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin 280 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.....	73
Şekil 4.6. L-DOPA-PLGA bileşiğine ait DLS sonuçları.....	74
Şekil 4.7. MA-PLGA bileşiğine ait DLS sonuçları.....	75
Şekil 4.8. MA-PLGA Bileşiğine ait SEM görüntüleri.....	76
Şekil 4.9. MA-L-DOPA-PLGA Bileşiğine ait a) 5µm ve b) 2 µm SEM görüntüleri.	77
Şekil 4.10. Radyoışaretili bileşenlere ait TLRC kromatogramları.....	80
Şekil 4.11. Enkapsüle radyoışaretili bileşenlerin TLRC kromatogramı.	82
Şekil 4.12. HPLRC analizlerine ait kromatogramlar.....	84
Şekil 4.13. Radyoışaretili bileşiklerin radyoışaretleme verimlerinin zamanla değişimi.....	85

Şekil 4.14. Enkapsüle bileşiklerin radyoişaretleme verimlerinin zamanla değişimi.....	86
Şekil 4.15. MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, SH-SY5Y hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.....	89
Şekil 4.16. MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, SH-SY5Y hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.....	89
Şekil 4.17. MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, PC-12 hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.	91
Şekil 4.18. MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, PC-12 hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.....	92
Şekil 4.19. Radyoişaretleli bileşiklerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde % bağlanma değerlerinin zamana göre değişimleri.....	94
Şekil 4.20. Radyoişaretleli bileşiklerin PC-12 hücre hattı üzerinde % bağlanma değerlerinin zamana göre değişimleri.....	95
Şekil 4.21. Sterotaksik girişim uygulamalarına ait bir görsel.	97
Şekil 4.22. Kontrol grubu sıçanlarda radyoişaretleli bileşiklerinin bazı organlardaki zamana bağlı biyodağılımı.....	98
Şekil 4.23. Kontrol grubu sıçanlarda radyoişaretleli bileşiklerinin beyin kısımlarında zamana bağlı biyodağılımı.	99
Şekil 4.24. Parkinson modeli sıçanlarda radyoişaretleli bileşiklerinin bazı organlardaki zamana bağlı biyodağılımı	101
Şekil 4.25. Parkinson modeli sıçanlarda radyoişaretleli bileşiklerinin beyin kısımlarında zamana bağlı biyodağılımı.	102

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa Numarası
Tablo 2.1. Parkinson Hastalığında Görülen Semptomlar.....	5
Tablo 4.1. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA maddelerine ait erime noktaları.....	65
Tablo 4.2. MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ve deneysel çalışma sonucu elde edilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumlarındaki ppm sonuçları	71
Tablo 4.3. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait TLC analizi sonucu elde edilen R_f değerleri.....	72
Tablo 4.4. $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin pH değişimine göre % Bağlanma Verimleri.....	78
Tablo 4.5. Radyoışaretili bileşiklerin % Bağlanma Verimleri.....	79
Tablo 4.6. Radyoışaretili enkapsüle bileşiklerin % Bağlanma Verimleri.....	81
Tablo 4.7. Radyoışaretili bileşiklere ait alıkonma zamanları (R_t).....	83
Tablo 4.8. Radyoışaretili bileşiklere ait deneysel lipofilite değerleri	87
Tablo 4.9. MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) değerleri.....	90
Tablo 4.10. MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin PC-12 hücre hattı üzerindeki IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) değerleri.....	93

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

Kısaltmalar

PH	Parkinson Hastalığı
SNC	Substantia Nigra pars Kompakta
KBB	Kan Beyin Bariyeri
MA	Madecassoside
L-DOPA	Levodopa
^{99m} Tc	Teknesyum-99m
PLGA	Poli laktik-ko-glikolik asit
NP	Nanoparçacık
TLC	İnce Tabaka Kağıt Kromatografisi
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HPLRC	Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
NMR	Nükleer manyetik rezonans
LC-MS	Sıvı Kromatografisi- Kütle Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Parkinson hastalığı, dünya üzerinde yaklaşık 6 milyon insanı etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Genellikle 65 yaş üstü hastalarda görülmekte olan bu hastalık, yaş ile pozitif bir korelasyona sahiptir (Alberio and Fasano, 2010; Alberio et al., 2012; Delenclos et al., 2015). Parkinson genel olarak beynin Substantia Nigra pars compacta (SNc) adı verilen bölgedeki dopamin üreten sinir hücrelerinin ölümüne bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır (Gibb and Lees, 1991). Bu hastalıkta kaslarda sertlik (rigor), kas titremeleri, akineziye (hareketsizlik) kadar ilerleyebilen bradikinezi (hareketlerin yavaşlaması) ve dik duruşta dengesizlik gibi tipik hareket bozuklukları oluşur (Alberio et al., 2012; Jankovic, 2008). Hastalık sürecinde dopaminerjik nöronların kaybı devam etmekte, bu durum hastalığın ilerlemesini hızlandırmaktadır. Bu nedenle hastalığın erken teşhisi büyük bir önem kazanmaktadır (Bohnen et al., 2007). Hastalığın tespiti için genetiksel, biyokimyasal, klinikle ilgili ve nörolojik görüntülemeye yönelik biyomarkerlar kullanılmaktadır. Özellikle nörolojik görüntülemeye yönelik biyomarkerlar Bilgisayarlı Tek Foton Emisyon Tomografisi (SPECT), Positron Emisyon Tomografisi (PET), Manyetik Resonans Görüntüleme (MRI) ve Transkrinal Sonografi (TCS) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Son yıllarda kanser vb. hastalıkların teşhisinde tıbbi bitkilerden elde edilen doğal bileşiklerin Teknesyum-99m (^{99m}Tc), Iyot-125 (^{125}I) ve Iyot-131 (^{131}I) gibi radyoizotoplarla işaretlenmesi, saflaştırılması, görüntüleme ve tedavide kullanım potansiyellerinin *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle araştırılmasına yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. (Biber Muftuler, et al., 2015a). Bu doğal bileşiklerden biri de saponinlerdir. Saponinler genel olarak bazı bitki ve deniz hayvanlarından elde edilen triterpenoid veya steroid yapıda, lipofilik bir çekirdek etrafında bir ya da daha fazla sayıda karbonhidrat yan zincirine sahip glikozit yapıdaki bileşiklerdir (Sun et al., 2015; Ye et al., 2014). Saponinler; antienflamatuar, antimikrobiyal, antioksidan, analjezik etki yanı sıra nöron koruyucu özelliğe sahip olduğunu ortaya koyan çalışmalar mevcuttur (Sun et al., 2015; Ye et al., 2014; Zhou et al., 2016). Madecassoside (MA) bileşiği Centella Asiatica (Gotu Kula) bitkisinden elde edilen bir saponin olup Hindistan, Malezya ve diğer Asya

ülkelerinde geleneksel tıpta hafıza güçlendirici olarak kullanılmaktadır. Merkezi sinir sistemi üzerinde farmakolojik etkiye sahip MA, özellikle beynin SNc ve Striatum bölgelerindeki dopaminerjik hücreler üzerinde nöron koruyucu olduğu belirlenmiştir (Xu et al., 2013). Beynin SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlarda dopamine dönüşerek Parkinson hastalığının semptomlarının azaltılmasında L-3,4-dihydroxypheylalanine, levodopa (L-DOPA) adlı bileşik kullanılmaktadır (Bastide et al., 2015). L-DOPA'nın beynin SNc'deki dopaminerjik nöronlara olan spesifikliğin yüksek olduğu görülmüştür (Falkenburger and Schulz, 2006; Fieblinger et al., 2014).

Son yıllarda nanoparçacıklar (NP) yardımıyla ilaç taşınımı önemli hale gelmiştir (Danhier et al., 2012). Özellikle NP'ler kullanılarak yapılan ilaç taşınım mekanizmalarında polimerik partiküler yapılar katı bir matriks içerisine entegre edilmiş etken maddeyi degradasyondan koruyarak maddenin beyine ulaşma olasılığı artırmaktadır (Danhier et al., 2012; Kwon et al., 2012; Yasin et al., 2013; Kulkarni et al., 2010). Literatür çalışmaları incelendiğinde son otuz yıl içinde poli-laktik- ko-glikolik asit (PLGA) gibi biyolojik olarak parçalanabilir polyester NP'ler, kontrollü biyobozunurluk, mükemmel biyouyumluluk ve yüksek güvenlik ve biyolojik olarak parçalanabilen birkaç sentetik polimerden biri olması nedeniyle yaygın olarak çok çeşitli ilaç ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Makadia and Siegel, 2011; Danhier et al., 2012). Parkinson hastalığının teşhis ve tedavisine yönelik yapılan araştırmalarda üzerinde çalışılan PLGA ile enkapsüle edilmiş bileşiklerden biri de (PLGA-L-DOPA) nano-dopa molekülüdür (Gambaryan et al., 2014; Zhou et al., 2013). Bu tez çalışmasının amacı Parkinson hastalığının görüntülenmesinde kullanılabilecek ^{99m}Tc ile radyoışaretili bitkisel kökenli enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinsentezlenmesi ve *in vitro/in vivo* yöntemlerle biyoetkinliklerinin tespitidir. Bu amaç doğrultusunda MA, beynin SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlara olan yüksek spesifikliğı nedeniyle L-DOPA ile konjuge edilmiştir. Elde edilen konjugatın (MA-L-DOPA) konjugasyon verimi İnce Tabaka Kromatografisi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), yapı analizleri ise Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektroskopisi (LC-MS), Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile tespit edilmiştir. PLGA ile enkapsüle edilmiş MA ve MA-L-DOPA

bileşiklerinin (MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA) karakterizasyonu dinamik ışık saçılımı (DLS) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) yöntemleriyle gerçekleştirilmiştir. ^{99m}Tc ; Nükleer Tıp'ta görüntülemeye sıklıkla kullanılan bir radyoizotoptur (Pimlott and Sutherland, 2011). Literatür taramalarında ^{99m}Tc ile işaretli dopamin transferine yönelik (DAT) çeşitli kitler geliştirildiği belirlenmiştir (Arena and Stoessl, 2015; Choi et al., 1999; Kung, 2001; Weintraub et al., 2005). Tez çalışması kapsamındaki radyoişaretleme çalışmaları ^{99m}Tc ile gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretili bileşiklerin (^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA) kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC), Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC) ile yapılmıştır. Ayrıca radyoişaretili bileşiklerin stabilite ve lipofilite tayinleri yapılmıştır. Çalışmada ^{99m}Tc ile radyoişaretili bileşiklerin *in vitro* ve *in vivo* uygulamaları gerçekleştirilmiştir.

In vitro çalışmalar kapsamında Parkinson hastalığı ile ilgili araştırmalarda sıkça kullanılan SH-SY5Y (insan neuroblastoma) ve PC-12 (sıçan feokromasitoma) hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları, MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA moleküllerinin sitotoksik etkileri ile ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin hücre tutulumları incelenmiştir. Tez çalışmasında *in vivo* çalışmalar kontrol ve Parkinson hayvan modeli kullanılarak radyoişaretili bileşenlerin organ ve beyin tutulumları değerlendirilmiştir. Parkinson hayvan modeli olarak rotenone kullanılan sıçan modelleri kullanılmıştır. Yapılan biyodağılım çalışmalarında özellikle MA bileşiğinin diğer bileşiklere oranla beyin orta beyin ve hipotalamus kısımlarında diğer beyin kısımlarına göre anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) tutulumunun daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Tez çalışması kapsamında sentezlenen ^{99m}Tc ile işaretli bitkisel kökenli nano taşıyıcı sistemlerin, ileride yapılacak Parkinson hastalığının görüntülenmesine yönelik çalışmalara örnek teşkil edeceği yanı sıra radyoişaretili bitki kökenli bileşiklerin sentezine ve ilaç taşıyıcı ajanların geliştirilmesine katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Parkinson Hastalığı

Parkinson hastalığı (PH) adını 1817'de ilk defa *titremeli felç* olarak tarif eden Dr. James Parkinson'dan almıştır. Hastalık dünya üzerinde yaklaşık 6 milyon insanı etkileyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) 2006 yılında yayınlanan verilerine göre Parkinson hastalığının her yıl 100.000 kişideki yaklaşık insidans oranı 4,5-19,0'dur (Alberio and Fasano, 2010; Alberio et al., 2012; Delenclos et al., 2015; WHO, 2006). PH erkek hastalarda daha fazla görülmekte olup, görülme sıklığı 65-90 yaşları arasında yüksektir. Parkinson hastalığı, yaş ile pozitif bir korelasyona sahiptir. Özellikle 65 yaş üstü kişilerde hastalığın görülme sıklığı % 1 civarında iken, 85 yaş üstü insanlarda bu oran % 4-5 civarında seyretmektedir. 40 yaşın altındaki hastalarda da semptomlar görülebilmektedir. Ancak bu oran hastaların %5-10'una tekabül etmektedir. (Jansen et al., 2014; Reyhan, 2005). Alzheimer hastalığından sonra dünya üzerinde ikinci sıklıkla görülen bir nörodejeneratif hastalık olan PH'nın günümüzde tam olarak tedavisi mümkün olmayıp, ilerlemesini yavaşlatmaya yönelik de bilimsel olarak ispatlanmış bir tedavi yöntemi de bulunmamaktadır (Delenclos et al., 2015; Jansen et al., 2014). Parkinson hastalığında tremor, rigor (kaslarda sertlik), kas titremeleri, akineziye (hareketsizlik) kadar ilerleyebilen bradikinezi (hareketlerin yavaşlaması) ve dik duruşta dengesizlik gibi tipik hareket bozuklukları oluşur (Alberio et al., 2012; Jankovic, 2008). Ancak hastalık sürecinde motor semptomlarının yanı sıra motor olmayan semptomlarda görülmektedir. Tablo 2.1'de Parkinson Hastalığında görülen semptomlar motor semptomlar ve motor olmayan semptomlar olmak üzere iki alt kategoride incelenmiştir. Parkinson hastalığında görülen bu semptomlardan motor semptomlar içerisinde özellikle tremor, rijidite, bradikinezi ve postural dengesizlik dört ana klinik semptom olarak görülmektedir (Roth et.al., 1999). Bunlardan tremor (titreme), öncelikle tek elde başlayan daha sonrasında iki ele ve vücudun diğer uzuvlarına da etki eden ve hastaların % 75'inde görülen ilk belirtilerdendir. Tremor bir titreme hareketi olarak sanki hastaların ellerinde bozuk para sayma, ayaktayken pedala basma hareketini andıran bir harekettir.

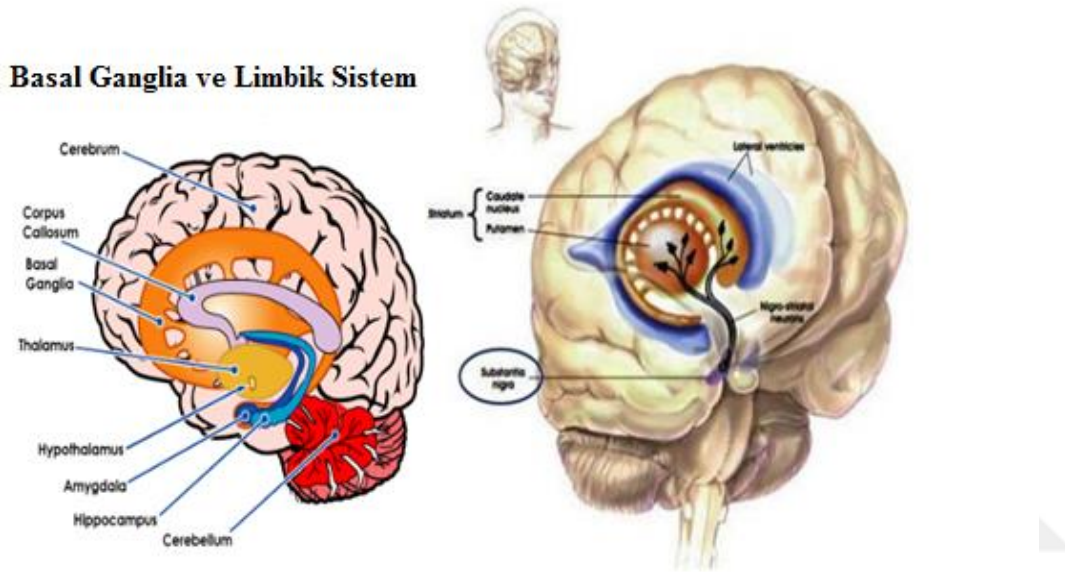
Özellikle dinlenme sırasında görülmekte, istemli hareket sırasında ise ortadan kalkmaktadır. Ancak stres ile artış göstermektedir (Lundbeck Institute, 2019).

Tablo 2.1. Parkinson Hastalığında Görülen Semptomlar (Stacy and Jakel, 2014).

PH'da görülen motor semptomlar	PH'da görülen motor olmayan semptomlar
Resting tremor (kas titremeleri)	Kabızlık
Rijidite (kaslarda sertlik)	Otonomik fonksiyon bozukluğu
Bradykinesia (hareketlerin yavaşlaması)	Koku alma bozukluğu
Postural dengesizlik	Demans
Yürüyüş bozuklukları	Depresyon
Yazı bozukluğu	Uyku bozuklukları
Donuk yüz	İmpulse kontrol bozuklukları
Retropulsion	Psikoz
Hipofonik konuşma	

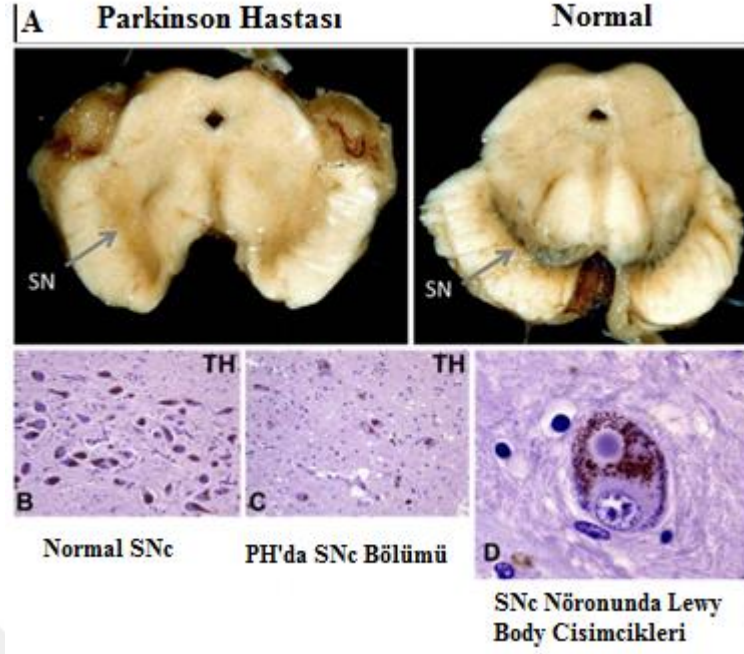
Tremorun yanı sıra hastalarda görülen ikincil belirti hemen hemen bütün hareketlerde kendini gösteren hareketlerde yavaşlama ve yeni bir harekete başlamada güçlük oluşturan bradikinezidir. İlerleyen süreçlerde ise yeterli tedavi almayan hastalarda daha farklı semptomların da ortaya çıktığı görülmektedir. Bunlar ses tonunda ve konuşma akıcılığındaki azalmalar, el ve kol hareketlerindeki yavaşlamalar, konuşma esnasında mimiklerin az kullanımı veya hiç kullanılamaması, yürürken ellerin az sallanması veya hiç sallanılamaması, yemek yeme ve çiğneme esnasında, alçak bir koltuktan ayağa kalkarken, yatakta iken bir taraftan diğer tarafa dönme esnasında zorlanma gibi semptomlardır. Üçüncü ana belirti olan rijidite ise kol ve bacak kaslarında dinlenme durumunda bile azalmayan bir katılık olarak karşımıza çıkmaktadır. Rijidite durumunda kol ve bacakların pasif hareketinde bile sabit ve değişmeyen bir dirençle karşılaşılmaktadır. Bu esnada oluşan katılık, bel ve boyun kaslarında da ortaya çıkabilmektedir. Bu durum süreç ilerledikçe başın gövdeden önde tutulmasına ve belin öne eğilmesine neden olmaktadır. Hastaların özellikle dinlenme halinde de oluşması kuvvetle muhtemel bu katılıktan dolayı çeşitli şikâyetleri literatürde rapor edilmektedir. Bunlar arasında sürekli yorgunluk hissi, ağrı ve kramplar ön plandadır (Nesil, 2011; Lundbeck Institute, 2019). Parkinson hastalığı için beyin anatomik olarak incelendiğinde orta beyinde motor fonksiyonlarının

gerçekleştirilmesinden sorumlu bölge olan bazal ganglionlar ön plana çıkmaktadır. Bazal ganglionlar birbirleriyle bağlantılı dört yapıdan oluşmakta ve buradaki nöronlar dopaminerjik nöronlar olarak adlandırılmakta olup, birbirleriyle dopaminerjik ileti ile etkileşimde bulunmaktadır. (Şekil 2.1). PH'nın patolojik açıdan oluşma sebebi ise, bu dört yapıdan biri olan substansiya nigra pars compacta (SNc) bölgesindeki dopaminerjik nöronlarda çeşitli faktörler (genetik ve çevresel) nedeniyle meydana gelen nörodejenerasyondur (Nesil, 2011).



Şekil 2.1. Bazal ganglionda yer alan substansiya nigra bölgesi (Nada, 2008).

Bu durum orta beyindeki substantia nigra pars kompakta (SNc) (Şekil 2.2) bölümündeki dopamin üreten dopaminerjik nöronların ölümü ve striatum bölgesindeki dopaminin tükenmesiyle ortaya çıkmaktadır. Nörodejenerasyonun tam mekanizması şu anda bilinmemektedir, ancak oksidatif stres, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve hücresel düzeyde protein bozunum mekanizmasının bozulması hastalığın nedenlerinden olduğu düşünülmektedir. Hayatta kalan dopaminerjik nöronlarda ise Lewy cisimciklerinin (sitoplazmik proteinli inklüzyonlar) varlığı PH'nın patolojik işareti olarak kabul edilmektedir (Lokanathan et al., 2016, WHO, 2006). Özellikle dopamin eksikliği motor fonksiyonlarda anormalliğe neden olmakta ve kontrol edilemeyen motor bozukluklar, postural dengesizlik, kaslarda sertlik ve akineziye varan bradikinezi durumlarına neden olmaktadır. (Recchia et.al., 2004; Loonam et.al., 2003; Centonze et.al., 2004; Lotharius and Brundin 2002, Makav, 2018).



Şekil 2.2. Beynin Substantia Nigra Bölümü (Mandel et al., 2010).

Diğer taraftan PH'nda ortaya çıkan patolojik bulgu, beynin SNc ve striatum bölgelerindeki dopaminerjik nöronların kaybı ile henüz fonsiyonel işlevini kaybetmemiş olan hücrelerin sitoplazmalarının içinde biriken protein agregatlarını içeren Lewy body cisimciklerinin mevcudiyetidir (Nesil, 2011; Obeso et al., 2008). Hastalık sürecinde dopaminerjik nöronların ölüm nedenleri arasında yaş, cinsiyet, genetik faktör ve çevresel etmenlerle beraber oksidatif stres, nörotoksin artışları, immünolojik mekanizma değişimleri, nörotrofik faktörlerin azalışı, kalsiyum homeostasis bozuklukları vardır. Özellikle bu mekanizmalardan son yıllarda üzerinde en çok çalışılanlar genetik faktörler, çevresel etmenler, yaş ve oksidatif strese bağlı ön plana çıkmaktadır (Naoi and Maruyama, 2001; Nesil, 2011; Beyoğlu, 2014). Hastalık sürecinde dopaminerjik nöronların kaybı devam etmekte, bu durum hastalığın ilerlemesini hızlandırmaktadır. Bu nedenle hastalığın erken teşhisi büyük bir önem kazanmaktadır (Bohnen et al., 2007).

2.2. Parkinson Hastalığı Patogenezi

PH'nın patogeneziyle ilgili ön plana çıkan iki temel hipotez bulunmaktadır. Birinci hipotezde orta beyinde bulunan SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlarının ölümüne sebep olan etken olarak proteinlerin hatalı katlanması ve agregasyonu ileri sürülmektedir (Dauer and Przedborski, 2003; Beyoğlu, 2014). Hipotezde öne sürülen durum PH'da içine alan yaşa bağlı nörodejenaratif hastalıklarda görülen beyin dokularındaki proteinlerin anormal dağılımıdır. Değişik hastalarda protein agregatlarının dağılımı ve yerleşimi farklılık göstermiş olsa bile bu değişim nöronlar için toksik bir etki oluşturabilmektedir. Hastalık sürecinde agregatlar ya da çözünebilir hatalı katlanmış proteinlerin nörotoksik etkiye sahip olması çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşmektedir (Tanaka et al., 2001).

Özellikle protein agregatları dopaminerjik nöronlarda iki farklı yol ile direkt hasara sebep olabilir. Birincisi hücre yapısının bozulması, ikincisi ise dopaminerjik nöronlardaki sinirsel iletişimin bloke edilmesidir (Saudou et al., 1998; Cummings et al., 1999; Beyoğlu, 2014). Diğer taraftan hastalığın patogenezinde etkili olan yaş ile birlikte dokuların içerisindeki oksitlenmiş protein içeriklerinin artışı da gözlemlenebilmektedir (Beckman and Ames, 1998). İkinci hipotezde ise dopaminin oksitlenmesini kapsayan oksidatif stresin neden olduğu mitokondri fonksiyon bozukluğunun etkisi ön plana çıkmaktadır. (Dauer and Przedborski, 2003; Beyoğlu, 2014). PH üzerine yapılan çalışmalarda insan ve hayvanların kullanıldığı hastalık modelleri bulunmaktadır. Bu modellerde mitokondrial iç membranın elektron transport komplekslerinin inhibitörü olarak etki gösteren nörotoksinler kullanılmaktadır. Bunlar 1-metil-4-fenil-1,2,3,6 tetrahidropiridin (MPTP) (MPP⁺ metabolitleri aracılığıyla), 6 hidroksi dopamin (6-OHDA) ve rotenon gibi nörotoksinlerdir (Beyoğlu, 2014; Kurul ve Gülmez, 2007; Makav, 2018; Nesil, 2011).

2.3. Rotenone Nörotoksitesi

1990'lı yıllarda yapılan çalışmalarda Parkinson hastalığını meydana getirdiği yönünde bulgular gösteren ve herbisit olarak bilinen rotenone,

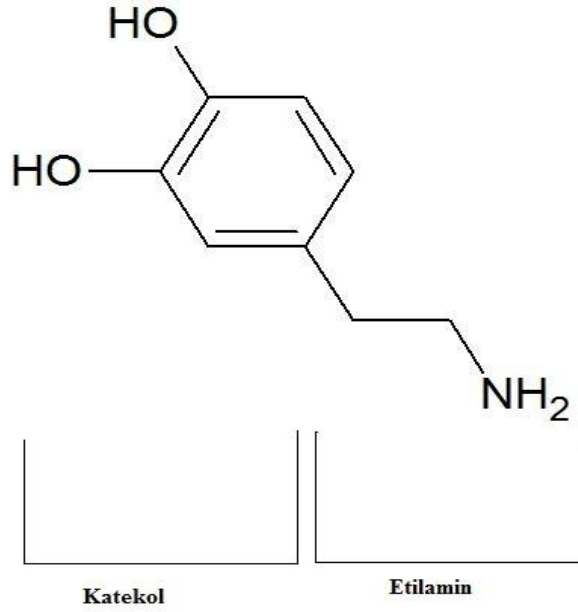
mitokondri içerisinde elektron taşıma zincirinin kompleks-I ünitesini bloklama özelliği gösterir. Lipofilik olan rotenonun kan beyin bariyerini rahatlıkla geçtiği bildirilmiştir (Erbaş et al., 2015; Jansen et al., 2014; Makav, 2018; Wrangel et al., 2015).

Mitokondriyal kompleks I inhibitörleri, nöron hücrelerinde apoptozisinin ana nedenlerinden biri olarak kabul edilmektedir. Bu durum mitokondriyal disfonksiyona yol açan oksidatif stres üreten reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumunu arttırır. Rotenonun indüklediği sinir hücrelerinin apoptozisi, PH'da nörodejeneratif süreci başlatmaktadır (Wu et al., 2014).

Literatürde rotenone kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışmalarda rotenone uygulamalarından sonra Parkinson patolojisinde bulunan özelliklerin birçoğu ortaya çıkabilmektedir. En çok karşılaşılan patolojik bulgulara örnek olarak hücrelerde reaktif oksijen türü üretimi, sistemik mitokondriyal bozulma, mikrogliyal aktivasyon, α -sinüklein fosforilasyon, agregasyon, Lewy patolojisi, seçici nigrostriatal dopaminerjik dejenerasyon, ubikuitin-proteazomal disfonksiyon, Levodopa (L-DOPA) yanıt veren motor defisitleri, tirozin hidroksilaz imünoreaktivitesinin tükenmesi ve oksidatif hasar verilebilir (Drechsel and Patel 2008, Cicchetti et. al. 2009, Norazit et. al. 2010, Bové and Perier 2012). Bu özelliklerin ortaya çıkması rotenone herbisitinin deneysel Parkinson modeli oluşturmada etkin bir nörotoksin olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasında da rotenonun bu özelliklerinden dolayı *in vivo* deneysel Parkinson modeli oluşturmada kullanılması kararlaştırılmıştır.

2.4. Katekolaminler

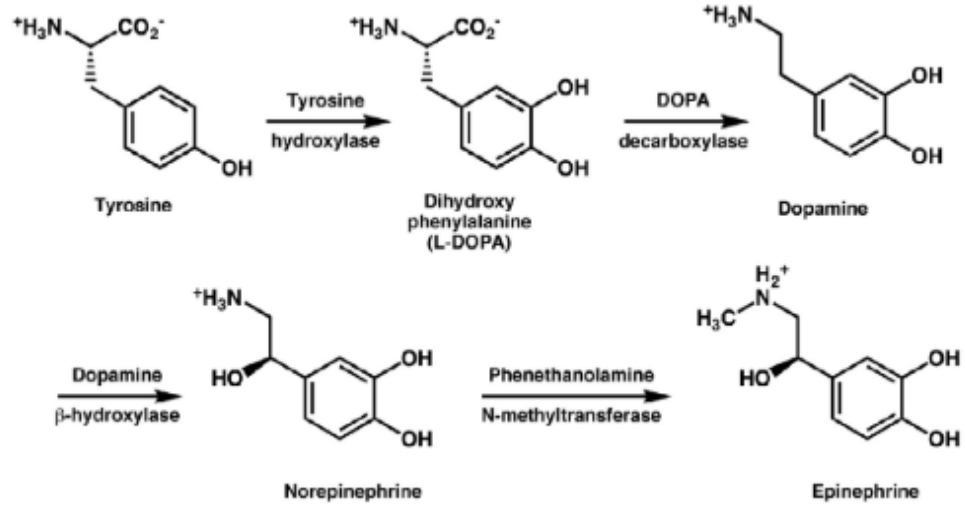
Katekolaminler (CA) genel olarak nörotransmitterler, adrenomedüller, sempato-nöronal sistemler ile beyinde görevli katekolaminerjik sistemler 1900'lü yılların başında keşfedilmiştir (Kvetnansky et al., 2009). CA'ler tek bir amin grubuna sahip bir etilamin yan zinciri ile birlikte 3,4-dihidroksifenil çekirdeğine sahip katekol grubu (Şekil 2.3) içeren nörotransmitterler grubu olarak da tanımlanabilir (Bhattacharjee and Perumal, 2019).



Şekil 2.3. Katekolaminlerin kimyasal yapısı (Çakal, 2010).

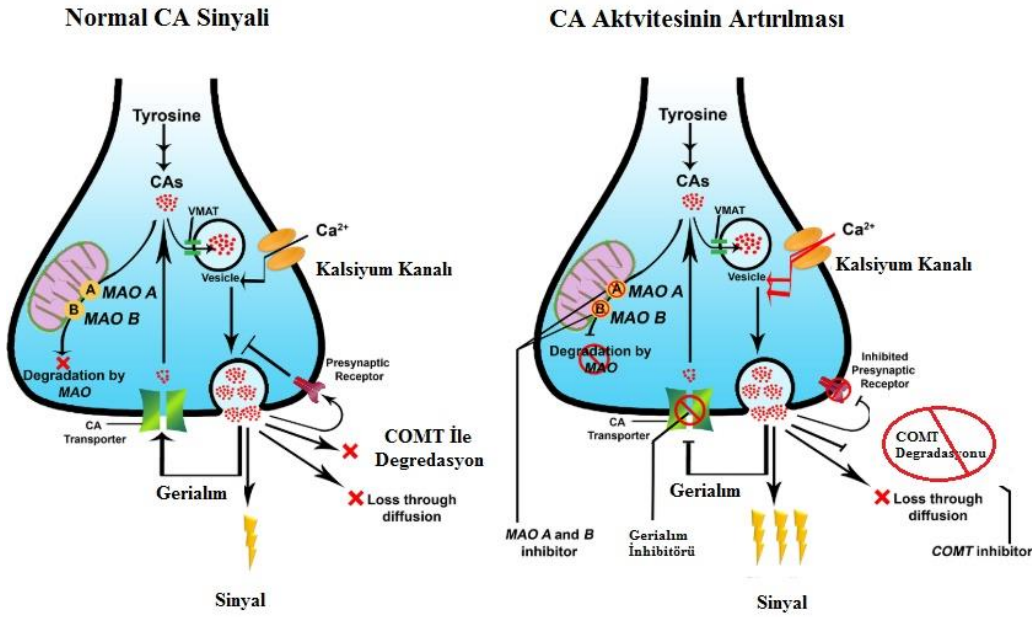
Beyin sistemini etkileyen katekolaminlerden noradrenalin (NA), 1946 yılında Ulf von Euler (1946) tarafından sempatik sinirlerde nörotransmitter ve adrenalinin öncüsü olarak incelenmiş ve yayınlanmıştır. Beyinde sistemsel olarak görev yapan adrenalin ve noradrenalin'den oluşan katekolaminerjik sistem ise ilk defa 1954 yılında Vogt (1954) tarafından keşfedilmiştir. Bu çalışmalara müteakip 1958 yılında Arvid Carlsson, dopaminin (DA) bu sistemde görevli ek bir katekolamin olarak çalıştığını rapor etmiştir (Carlson et al., 1958). Katekolaminler olarak adlandırılan dopamin (DA), epinefrin (E) ve norepinefrinin (NE) üretim yerleri sırasıyla beyin, adrenal medulla ve sinir hücreleridir. Sistemsel olarak bakıldığında beyin katekolaminerjik sistemleri noradrenerjik sistem, adrenerjik sistem, dopaminerjik sistem ve L-DOPA nöronları olarak sınıflandırılabilir (Kvetnansky et al., 2009). Bu CA'lerin sinir sistemi üzerinde motor kontrolü, biliş, duygu, bellek işlemi ve endokrin modülasyonu gibi birçok fonksiyonu bulunmaktadır. Katekolaminlerin hepsi tirozin aminoasidinden türetilmektedir (Şekil 2.4). Sentezdeki ilk adım tirozin aminoasidinin tirozin hidroksilaz enzimi tarafından katalizlenerek dihidroksifenilalanin (L-DOPA)'ya çevrilmesidir. Tirozin hidroksilaz enzimi sentezde aynı zamanda hız sınırlayıcı faktör olarak da görev yapmaktadır (Nagatsu and Nagatsu, 2016). Dihidroksifenilalanin (L-DOPA) ise dopa dekarboksilaz enzimi ile dopamine (DA), dopamin ise dopamine β-hidroksilaz enzimi ile norepinefrine (NE), norepinefrine (NE) fenotanolamine

N-metiltreansferaz enzimi ile epinefrine (E) dönüşmektedir. Katekolaminler hem hayvansal hem de bitkisel yapılarda da bulunur (Khozaei and Emamzadeh, 2014).



Şekil 2.4. Katekolaminlerin biyosentezi (Khozaei and Emamzadeh, 2014).

Katekolaminler Katekol-O-metiltransferaz enzimleri ile (COMT) metilasyon yapması sonucu ya da Monoamin oksidaz enzimlerinin (MAO-A ve MAO-B) deaminasyon yapması sonucu yıkıma uğrarlar (Nagatsu and Nagatsu, 2016). Özellikle Parkinson hastalığının tedavisinde dopamin yıkılmasının önüne geçebilmek için COMT, MAO-A ve MAO-B enzimlerini inhbe eden inhibitörler kullanılabilmektedir (Bhattacharjee and Perumal, 2019). Bu enzimlerden özellikle MAO ön plana çıkmaktadır. MAO enzimi hücre sitoplazmasındaki mitokondri dış zarına bağlı olarak görev yapan ve nörotransmitter moleküllerin (katekolaminler) kimyasal olarak parçalanmasından sorumlu protein yapıdaki bir enzimdir (Pietro et al., 2016). Nöronlar arasında birbirleri ile kimyasal olarak iletişim kurmasını sağlayan sinaptik boşluklar bulunur. Bu boşluklara impuls iletiminden sorumlu nörotransmitter adını veren nörokimyasallar salınır. MAO enzimi sinaps boşluğundaki fazladan salınan nörotransmitterlerin nörosistem üzerinde olumsuz etki yapmalarını engellemektedir. Parkinson hastalığında bir katekolamin olan dopamin sentezinin artırılması istenmektedir. Bunun için L-DOPA takviyesi ile dopamin artırılabilirken, MAO enzim inhibitörü gibi sistemlerde tercih edilmektedir (Bhattacharjee and Perumal, 2019; Delenclos et al., 2015; Mazzio et al, 2013; Nagatsu and Nagatsu, 2016).

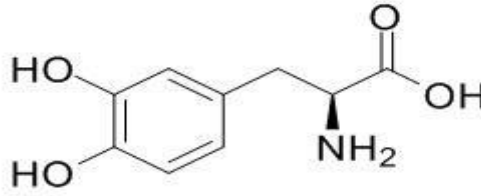


Şekil 2.5. a) Normal CA Sinyali, b) CA aktivitesinin artırılması (Bhattacharjee and Perumal, 2019).

Katekolaminlerin aktivitesinin artırılmasının bir yolu da deaminasyona neden olan COMT ve MAO enzimlerini inhibe etmektir (Bhattacharjee and Perumal, 2019). Sentezden sonra salınan CA'ler veziküler monoamin taşıyıcı (VMAT) yoluyla sinaptik veziküllere taşınırlar. Sinaptik yarıktaki vezikül içeriğini serbest bırakmak için bir veya daha fazla vezikül Ca^{2+} bağımlı sinir impulsu tarafından tetiklenir. Sinaps boşluğuna salınan CA işlevini tamamladıktan sonra ya COMT ile degradasyona uğrar veya CA taşıyıcıları tarafından geri alınır. Geri alınan CA ise MAO tarafından degrade edilir (Şekil 2.5.a). COMT ve MAO inhibitörlerinin devreye alınmasıyla CA degradasyona uğramadan hücre içine geri alınır ve sisteme tekrar sokulur (Şekil 2.5.b). Yapısal olarak bakıldığında MAO enziminin MAO-A ve MAO-B olmak üzere iki farklı izoformu karşımıza çıkmaktadır (Delenclos et al., 2015; Ríos et al., 2016). Bu izoformlar arasındaki temel farklılıklar aminoasit sayılarının ve bulundukları dokuların farklılığıdır. Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde MAO-B izoformu ön plandadır. Bu sebeple Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için geliştirilen ilaçlarda MAO-A'ya karşı MAO-B seçiciliği daha önemli bir parametredir (Nagatsu and Nagatsu, 2016).

2.5. Levodopa (L-DOPA)

Beynin SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlarda dopamine (DA) dönüşerek Parkinson hastalığının semptomlarının azaltılmasında L-3,4-dihidroksifenilalenin (L-DOPA) bileşiği (Şekil 2.7) kullanılmaktadır (Bastide et al., 2015). Parkinson hastalığındaki semptomlar, nöronlarda aromatik L-amino asit dekarboksilaz (AADC) ile DA dönüştürülen ve hayatta kalan nöronlarda DA seviyelerini geri kazandıran L-DOPA uygulanmasıyla rahatlatılır (Cannazza et al., 2005). L-DOPA dopamin öncüsü uygulaması, striatumda dopamin üretimini ve serbest bırakılmasını, bazal striatal tonu, direkt ve dolaylı yollar arasındaki dengeyi ve hareket kontrolü geri kazanımını artırır (Fieblinger et al., 2014). L-DOPA kimyasal yapısı Şekil 2.6'da yer almaktadır.

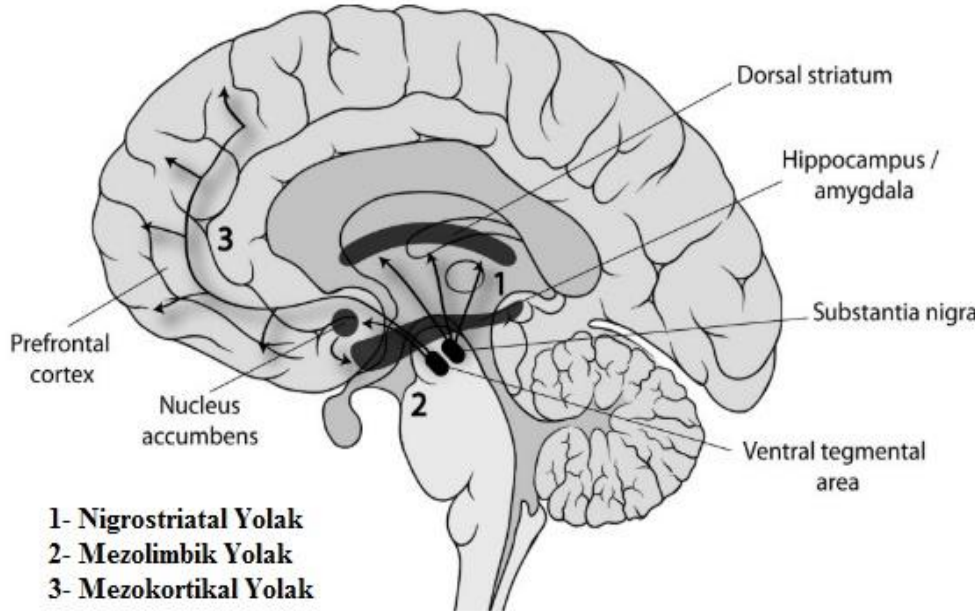


Şekil 2.6. L-3,4 dihidroksifenilalenin (Levodopa, L-DOPA) Kimyasal Yapısı.

L-DOPA'nın temel yapısı da tirosin aminoasitine dayanmaktadır (Şekil 2.4). Tirosin amino asiti tirosin hidroksilaz enzimi yardımıyla L-DOPA'ya, L-DOPA ise dopa dekarboksilaz enzimi ile dopamine (DA) dönüşmektedir (Khozaei and Emamzadeh, 2014). Parkinson hastalığının tedavisinde direk dopamine yerine L-DOPA molekülünün uygulanmasının ana nedeni ise dopaminin kan-beyin bariyerini geçememesidir. L-DOPA'nın kan-beyin bariyerini geçebilmesi ve nöronlarda dopamine dönüşebilmesi büyük bir avantaj olup Parkinson Hastalığının tedavisinde kullanılmasını sağlamaktadır (Bastide et al., 2015; Zhou et al., 2013; Barçın, 2014). Literatürdeki çalışmalar L-DOPA'nın beyin SNc'deki dopaminerjik nöronlara olan spesifikliğinin yüksek olduğunu göstermektedir (Falkenburger and Schulz, 2006; Fieblinger et al., 2014).

2.6. Dopamin

Merkezi sinir sisteminde bulunan katekolaminler sınıfındaki dopamin, DOPA dekarboksilaz enzimi tarafından L-DOPA molekülünden üretilmektedir. Beyinde dopamin içeren ana bölge beyin SNc bölümünden input alan korpus striatumdur. Beyinde SNc bölümünden dorsal striatuma kadar dopaminerjik yollar bulunur. Bu yollar Substantiya Nigra Pars Compacta (SNc), Ventral Tegmental Alan (VTA) ve medial hipotalamusun arkuatında yer almaktadır. Dopaminin beyinde yer aldığı üç temel yolak vardır (Şekil 2.7). Bunlar nigrostriatal, mezolimbik ve mezokortikal yollardır (Horstmann et al., 2015).



Şekil 2.7. Temel dopaminerjik yollar (Horstmann et al., 2015).

Nigrostriatal yolak beyin SNc bölümünden dorsal striatuma dopaminerjik girdi sağlamak ve çoğunlukla motor kontrolü ve alışkanlıklar gibi otomatik uyarıcı-yanıt bağlantılarının oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Mezolimbik yolak ise ventral tegmental alandan (VTA) ventral striatumdaki limbik sisteme, yani amigdala, hipokampus ve prefrontal kortekse (PFK) aktarıldığı çekirdek akümülatlarına (NAcc) gitmektedir. Mezokortikal yolak ise VTA'dan frontal kortekse doğrudan dopaminerjik girdi sağlamaktadır (Ríos et al., 2016;

Horstmann et al., 2015). Dopamin işlevsel olarak motor ve duyuşal koordinasyonda, motor hareketlerin başlatılmasında görev yapar. Parkinson hastalığında ise beynin SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlar dejenere olmaktadır. Bu durum dopamin salgılanması azaltır. Dopamin miktarının azalmasına bağlı olarak motor hareketlerin fonksiyonları azalmaya başlar. Buradan yola çıkıldığında Parkinson hastalığının nörolojik görüntülenmesine dayalı teşhisinde dopamin sisteminin görüntülenmesi esas alınır (Delenclos et al., 2015).

2.7. Radyofarmasötikler

Bir bilim dalı olarak Nükleer tıp, tiroid kanseri özelinde kanser hastalığını teşhis ve tedavi etmek amacıyla ^{131}I kullanılmasıyla 1950'li yıllarda ortaya çıkmıştır. Araştırmacılar tarafından Nükleer tıpın bir bilim dalı olarak tanınmasıyla beraber ^{131}I içeren ve tiroid kanseri için kullanılan sodyum iyodür (Na^{131}I), Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk radyofarmasötik olmuştur (Hyatt, 2009). Genel olarak radyofarmasötikler onkolojik, nörolojik ve kardiyolojik hastalıkların teşhis veya tedavisi amacıyla kullanılan ve bir radyoaktif izotop (radyonüklid) içeren ilaçlardır (Schreuder et al., 2019). Radyofarmasi bilim dalı olarak Güney California Üniversitesinde ilk defa Prof. Walter Wolf tarafından teşkil edilmiştir (Ünak vd., 2018, s1). Radyofarmasi ise teşhis ve tedavi amacıyla kullanılacak radyofarmasötiklerin tasarımı, uygun koşullarda hazırlanması, kalite kontrol çalışmaları, hasta uygulamalarındaki fizyokimyasal ve biyolojik davranışları, saklama koşullarını içeren bir bilim dalıdır (European Association of Nuclear Medicine, 2016). Radyofarmasötikler, hedef organa yönelik seçilen bir moleküle radyoaktif ışımaya yapan bir radyonüklid ile işaretleterek, hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmak amacıyla hazırlanan ilaç sistemleridir. Radyoişaretleme ise seçilen moleküle istenilen radyonüklidin eklenmesidir. Bu işlem direk ya da bifonksiyonel şelatlayıcı ajan kullanılarak iki farklı şekilde gerçekleştirilebilir. Radyofarmasötiklerde farmasötik olarak adlandırılan kısım vücutta belli bir organ veya dokularda birikerek yapının fizyolojik fonksiyonuna katılan ve toksik etki göstermeyen etken bileşiklerden, radyonüklid kısım ise yayınlanması istenen radyasyonun türüne göre seçilmiş bir radyoizotoptan oluşmaktadır. Nükleer tıpta radyofarmasötiklerin yaklaşık % 95'i hastalıkların tanısında (diagnostik

radıofarmasötikler) % 5'i ise tedavi amaçlı (terapötik radıofarmasötikler) kullanılmaktadır (Payolla et al., 2019; Saha, 2004; Schreuder et al., 2019). Teşhis için kullanılan radıofarmasötiklerde tek foton emisyonlu bilgisayarlı tomografi (SPECT) veya pozitron emisyon tomografisi (PET) gibi görüntüleme sistemleri ile algılanabilen radyasyon yayılmaktadır. Terapötik radıofarmasötiklerde ise hastalıklı olan spesifik bölgelere terapötik dozlarda iyonlaştırıcı radyasyon verilmektedir. Günümüzde dünya çapında 10.000'den fazla hastanede nükleer tıp departmanı bulunmakta ve buralarda her yıl teşhis ve tedavi amaçlı on milyonlarca radıofarmasötik kullanan nükleer tıp çalışmaları yapılmaktadır (Hyatt, 2009). Son yıllarda nükleer tıp alanında yapılan çalışmalar anatomik tıptan ziyade moleküler tıba doğru gelişmekte ve özellikle de hücresel ve moleküler yollara ve de hastalık mekanizmalarına odaklanmaktadır (Payolla et al., 2019; Schwarz and Clarke, 2018). Moleküler tabanlı görüntülemenin avantajları dikkate alındığında bir hastalığın saptanması, lokalizasyonu, karakterizasyonu ve nicelleştirilmesinin doğruluğunun arttığı gözlenmektedir. Çünkü bu parametreler hastalıkların gerçekçi teşhisi için büyük önem taşımaktadır. Gerçekçi bir teşhis bir tedavinin başarı oranını önemli ölçüde artırabilir. Diğer taraftan moleküler tabanlı terapötik radıofarmasötikler ise bir hastalık ile ilişkili spesifik bir molekül ile direk hedefe etki eder. Hedefe yönelik yürütülen bu moleküler terapi spesifik olmayan tedavilere göre daha yüksek tedavi etkinliği, hastada daha az yan etki gibi çeşitli avantajlara sahip olunmasına imkan tanır. Bu durumda hastanın yan etkilerden en az şekilde etkilenip yaşam kalitesinin yükselmesine sebep olmaktadır (Schreuder et al., 2019). Radıofarmasötiklerin yaklaşık % 95'i gibi yoğun bir kısmı hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Teşhis amaçlı kullanılan ideal bir radıofarmasötiğin aşağıda yer alan özelliklere sahip olması gerekmektedir.

1- İdeal enerji aralığı: Görüntüleme sistemlerinde kullanılan gama kameraların optimum tarama aralığına uyması için 100 - 250 keV aralığında saf bir gama yayıcı radyonüklid içermesi gerekmektedir. Bu enerji aralığında radyasyon yayan radyonüklitlere ^{99m}Tc , ^{111}In , ^{123}I örnek verilebilir.

2. Teşhis için uygun olan bir yarı ömür (1,5 x test süresi): Bir radyonüklidin yarı ömrü, radyoaktif bozunma hızını belirler. Kullanılan radyonüklidin yarılanma

ömrü çok kısaysa, görüntüleme başlamadan önce aktivite çok düşük bir seviyeye inebilir. Bu durum daha uzun bir tarama süresine, hastanın çekim esnasında hareketlenmesine, kötü sayım istatistiklerine neden olabilir. Diğer taraftan yarılanma ömrü çok uzunsa, çekim süresi boyunca hastaya aşırı radyasyon maruziyeti meydana gelebilir.

3. Yüksek hedef / hedef olmayan doku oranı: Teşhis amaçlı kullanılan radyofarmasötiklerin hedef / hedef olmayan doku oranının yüksek olması gerekmektedir. Aksi takdirde hastaya gereksiz radyasyon dozu, teşhiste gecikme ve işlemin tekrarlanması gibi olumsuzluklar olabilir. Bu olumsuzlukları minimize etmek amacıyla radyonüklid yalnızca hedef organ için spesifik bir moleküle bağlanmakta ve bu bağlanma vücut dokularında az miktarda radyonüklidin serbest bırakılması için yeterli olmalıdır, bu şekilde hedef- hedef olmayan doku oranı artırılabilir.

4. Hem hastaya hem de personele düşük doz oranı: Teşhis çalışmalarında aşırı alınan radyasyon dozunu önlemek için, alfa ve beta partiküllerine sahip radyonüklitlerden kaçınmak gerekir. Çünkü bunların hasta içinde emilmesi, görüntü kalitesinde artış olmadan hastanın gereksiz radyasyon dozu alması anlamına gelir.

5. Radyofarmasötiklerin toksik olmaması: Teşhis amaçlı kullanılan radyofarmasötiklerin kullanım şekilleri çoğunlukla damar yolu enjeksiyonu olmakla beraber az miktarda oral veya solunum yoluyla da gerçekleşmektedir. Bu sebeple kullanılacak radyofarmasötik non-toksik, steril ve pirojeniz olmalıdır.

6. Kullanım sırasında kimyasal stabilite : Teşhis amaçlı kullanılan bir radyofarmasötüğün kimyasal olarak stabil kalması beklenmektedir. Ancak tüm radyoizotoplar izleyici moleküllere bağlanmak için uygun değildir. Teknesyum-99m (^{99m}Tc) ise hastada fizyolojik değişikliklere neden olmadan fizyolojik koşullar altında çok çeşitli bileşiklere kolayca bağlanma yeteneğine sahip olmasıyla ön plana çıkmaktadır.

7. Ucuz ve kolayca elde edilebilir olması: Radyofarmasötiklerin ucuz ve kolay elde edilebilir olması önemlidir. Özellikle bu bakımdan radyonüklid jeneratörleri ön plana çıkmaktadır. Bu jeneratörlerden birçok uygun radyonüklid (^{99m}Tc) elde edilebilir. Bu durumda radyonüklidin ekonomik kullanımı ile sonuçlanır. Diğer radyonüklitler (örneğin ^{18}F) ise özel bir birim olarak siklonlarda üretilir ve kullanıma hazır olarak gönderilir. Ancak bu durum ise günlük ihtiyaçlar için kullanılan radyonüklidlere nazaran pahalı ve ekonomik olmayabilir.

8. Hazırlık kolaylığı ve uygun kalite kontrolü: Hazırlama prosedürlerinin kolay olması beklenmektedir. Bu şekilde karmaşık bir ekipman çeşitliliği de gerekmez. Laboratuvarlarda hazırlanan radyofarmasötiklerin her partisini kontrol etmek için gerekli kalite kontrol prosedürleri mevcut olmalıdır. Bu durum, hasta tarafından alınan radyofarmasötiğin hasta üzerinde zararlı bir etkisi olmadan yüksek kaliteli görüntüler elde edilmesini imkan sağlar (European Association of Nuclear Medicine, 2016; Gijs et al., 2016; Payolla et al., 2019; Schreuder et al., 2019).

2.8. PET ve SPECT Radyofarmasötikleri

Nükleer tıp uygulamalarında teşhis amaçlı iki ana sistem kullanılmaktadır. Bu sistemler Tek Foton Emisyonlu Bilgisayarlı Tomografi (SPECT) veya Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) gibi görüntüleme sistemleridir. Özellikle de Bilgisayarlı Tomografi (CT) sistemlerinin entegre edilmesiyle SPECT/CT ve PET/CT hastalıkların teşhis, evrelerinin tespiti ve tedavi takibinde büyük bir avantaj sağlamaktadır (Taggart et al., 2016). Bu sistemlerden PET sistemleri hastalıkların teşhis, evre tespiti ve tedavi takibinde önemli bir yere sahip olup özellikle onkolojik, kardiyolojik, nörolojik ve enjeksiyon hastalıklarının teşhisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Klinik uygulamalarda yoğunluklu olarak siklotron ürünü olan radyonüklidler kullanılmaktadır. Siklotronlar çalışma prensibi dikkate alındığında pozitif yüklü proton, döteryum gibi hafif çekirdeklerin yüksek hızlarda hızlandırılması ile oluşturulan nükleer reaksiyonlar sonucu radyonüklid üreten sistemlerdir. Siklotronlarda ortaya çıkan radyonüklidler genellikle proton fazlalığı veya nötron eksikliği olan çekirdeklerdir. Bu çekirdekler kararlı hale gelebilmek amacıyla çoğunlukla pozitif beta ışıması (pozitron) veya elektron yakalayarak bozunmaya

uğrarlar. Bunların içerisinde pozitron ışıması yapan radyonüklitler PET sistemlerinde kullanılır ki bunlar PET radyonüklitleri olarak da tanımlanabilir (Ünak vd., 2018, s29). Pozitron ışıması olarak da adlandırılan pozitif beta ışımasında ışıma sonucunda ortaya çıkan pozitif yüklü elektron (pozitron) bir ortam elektronu ile etkileşime girerek çarpışır. Bu çarpışma sonucunda anihilasyon radyasyonu adı verilen ve 0,51 MeV enerjiye sahip iki gama fotonu ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan bu fotonlar arasında 180°'lik bir açı oluşur ve fotonlar birbirinden uzaklaşır. İşte oluşan bu fotonlar PET sistemlerinde kullanılan fotonlardır (Taggart et al., 2016). Siklotronda üretilip pozitron ışıması yapan ve PET sistemlerinde en çok kullanılan radyonüklidler ^{18}F (Flor-18), ^{11}C (Karbon-11), ^{13}N (Azot-13) ve ^{15}O (Oksijen-15)'dir (Pimlott and Sutherland, 2011). Bunun yanında son zamanlarda ortaya çıkan ^{68}Ga (Galyum-68), ^{82}Rb (Rubidyum-82) ve ^{44}Sc (Scandiyum-44) jeneratör sistemlerinden elde edilen PET radyonüklidleri de kullanılmaya başlanmıştır (Conti, 2010; Serdons et al., 2009). Bunların içerisinde ise en çok karşılaşılan PET radyofarmasötüğü ise ^{18}F -FDG (2-[^{18}F]fluoro-2-deoksi-D-glukoz) bileşiğidir. Başta onkoloji olmak üzere kardiyoloji ve nörolojik görüntülemelerde en çok kullanılan PET radyofarmasötüğü olarak karşımıza çıkmaktadır (Payolla et al., 2019; Taggart et al., 2016).

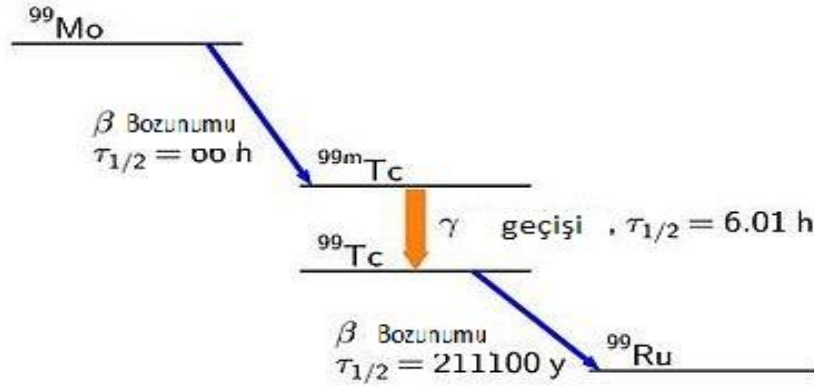
SPECT sistemlerinde ise oluşan görüntünün ana kaynağı hastaya verilen radyofarmasötikten yayılan gama ışımasıdır. SPECT sisteminde hastadan yayınlanan gama ışınları hasta etrafında dönen kolimatörler (algılayıcı dedektörler) tarafından algılanılarak bilgisayar ortamında kesitsel görüntülerin birleştirilmesiyle ortaya çıkmaktadır. Özellikle Bilgisayarlı Tomografi (CT) ile hibrit edilen SPECT/CT sistemleri hastalarda anatomik ve fizyolojik değişimlerin izlenmesine olanak sağlamaktadır (Pimlott and Sutherland, 2011). SPECT sistemlerinde kullanılan radyofarmasötiklerin ideal bir görüntüleme radyofarmasötiklerinin sahip olduğu özelliklere sahip olması beklenmektedir. Özellikle kullanılan radyonüklidin saf gama salıcı olarak 100-250 keV enerjiye sahip gama ışını salması beklenmektedir. Ayrıca etkin yarı ömrün görüntüleme süresinden en az 1,5 kat daha fazla olması, hastanın fazla doz mağduriyetine kalmaması açısından önemlidir. Hedef dokudaki aktivite miktarının hedef olmayan doku oranından yüksek olması da beklenen diğer bir parametredir. Bunu sağlamak amacıyla spesifik aktivitenin yüksek olması dikkate alınır (European

Association of Nuclear Medicine, 2016). Spesifik aktivite birim miktardaki radyoaktivite miktarı olarak tanımlanabilir. Buradaki birim miktar kütle, hacim veya mol birimi cinsinden de olabilir. Spesifik aktivitenin yüksek olması kullanılan radyofarmasötüğün daha küçük bir alanda daha yüksek lokalizasyona sahip olmasına imkan vererek, görüntü kalitesinin artmasını sağlar (Ünak vd., 2018, s 8). Ayrıca kullanılan radyofarmasötüğün hasta ve personele en az radyasyon dozu vermesi, non-toksik özellikte olması, kimyasal stabilite göstermesi, ucuz ve kolay bulunabilir olması, basit hazırlanabilmesi ve kolay kalite kontrol sistemlerine cevap vermesi beklenmektedir (European Association of Nuclear Medicine, 2016). Üretim yöntemlerine göre radyonüklidler jeneratör ürünleri, termal nötron reaktör ürünleri, siklotron ürünleri ve fisyon reaktör ürünleri olarak kategorize edilebilir. Özellikle SPECT radyofarmasötiklerinde jeneratör ürünleri ve siklotron ürünleri ön plana çıkmaktadır. Bunlardan en önemlisi $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen üretilen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklididir. Diğer radyonüklidler ise siklotron da üretilen Talyum-201 (^{201}Tl), Galyum-67 (^{67}Ga), Indiyum-111 (^{111}In), İyot-123 (^{123}I) ve İyot-131 (^{131}I)'dir (Apostolova et al., 2015; Taggart et al., 2016; Zhu et al., 2014). SPECT radyofarmasötikleri hazır ürünler, ısıtma isteyen kitler ve önemli derecede hazırlık isteyen ürünler olmak üzere sınıflandırılabilir. Hazır ürünler içerisinde en çok $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -perteknetat, ^{123}I kapsülleri, ^{131}I hippuran, ^{67}Ga - sitrat ve ^{201}Tl - klorür örneklendirilebilir (Ünak vd, 2018, s 42). Diğer taraftan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile birleştirilmeye hazır kitlerde klinikte yoğunluklu olarak kullanılmaktadır. Bunlara disofenin, dietilenetriaminepentaasetikasit (DTPA), metilendifosfonat (MDP), heksametil-propilenamin oxim (HMPAO) ve mebrofenin verilebilir (Kar, 2019; Payolla et al., 2019; Taggart et al., 2016; Vermeulen et al., 2019). Bu radyofarmasötikler içerisinde özellikle de teşhis amaçlı kullanılan en yaygın radyonüklid, tüm nükleer tıp prosedürlerinin de % 80'ini oluşturan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli radyofarmasötiklerdir (World Nuclear Association, 2020).

2.9. Teknesyum-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)

Teknesyum-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) ($t_{1/2} = 6$ saat, 140 KeV) Nükleer Tıp'ta tanı amaçlı kitlerin geliştirmesinde kullanılan kolay, elverişli, ekonomik bir radyonükliddir. Literatür incelendiğinde siklotronun keşfinden itibaren periyodik

tablodaki 43 numaralı elementin ilk kesin deneysel kanıtı 1937 yılında Perrier ve Segre tarafından ortaya konulmuştur. Yapay olarak elde edilmiş ilk element olan bu elemente 1947 yılında Yunanca'da yapay anlamına gelen 'Tc' simgesi ile Teknesyum ismi verilmiştir. Teknesyum elementi periyodik tablonun 7B grubunda bulunan en düşük atom numaralı radyoelementtir. Teknesyum elementinin bilinen 22 izotopu ve 9 izomeri vardır. Bunların yarı ömürleri 0.3 saniyeden 4.2 milyon yıla kadar değişebilmektedir. Özellikle uzun yarı ömürlü izotoplar arasında tartılabilir miktarlarda elde edilebilen sadece Teknesyum-99 (^{99}Tc)'dur, bu element Uranyum-235 (^{235}U)'in fisyonu ile nükleer reaktörlerde düşük spesifik aktivite ve düşük beta salımı sayesinde yüksek verimle elde edilebilmektedir. Teknesyumun kimyasal reaksiyonlardaki oksidasyon seviyelerinin -1'den +7'ye kadar değişiklik göstermektedir. Ancak en kararlı formları (oksitleri, sülfürleri, halojenürleri ve perteknetatları) +7 ile +4 arasındaki seviyelerde görülmektedir (Schwochau, 2000, Bowen and Orvig, 2008; Saha, 2004). $^{99\text{m}}\text{Tc}$, $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen elde edilmektedir. $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ bozunum şeması Şekil 2.8'de yer almaktadır.



Şekil 2.8. $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Bozunum Şeması.

Jenaratörün çalışma prensibine göre negatif beta (β^-) ışıması yapan ^{99}Mo % 87 oranında metastabil $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ve % 13 oranında temel seviyesine bozunur. Teknesyum; $[\text{MoO}_4]^{2-}$ ile $[\text{TcO}_4]^-$ arasındaki yük farkından yararlanılarak sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) formunda elde edilmektedir (Bowen and Orvig, 2008). Eluant içerisindeki $^{99\text{m}}\text{Tc}$ konsantrasyonu yaklaşık 10^{-9} M seviyelerindedir. Jeneratörden $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ formunda elde edilen $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'nin bu yapısı kararlı olduğundan istenilen bileşiklerle işaretlenebilmesi için indirgenmiş formu veya

ligand yerdeğişimi yöntemleri kullanılmaktadır. Her iki yöntem için de indirgeme tepkimesine ihtiyaç duyulmakta olan reaksiyonlarda indirgeyici olarak kalay klorür ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), kalay sitrat, kalay tartarat, derişik HCl, sodyum borhidrür, ditionitin ve demir sülfat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar kullanılmaktadır. Ancak $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli bileşiklerin hazırlanmasında yoğunlukla kalay klorür ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) tercih edilmektedir (Saha, 2004). Tez çalışması kapsamında yapılan işaretlemelelerde de ($\text{SnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) tercih edilmiştir. Salınan gama ışınlarının enerjisinin ideal görüntü elde etmek açısından gama kameralar için elverişli olması, *in vivo* görüntüleme için yeterli yarı ömre sahip olması gibi özellikler $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidinin Nükleer Tıp'ta kullanılmasının önemli sebepleri arasında görülmektedir (Choi et al., 1999; Wang et al., 2015). Özellikle SPECT görüntülemelerinde, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ işaretli radyofarmasötikler için, basit, kullanışlı, ekonomik ve yaygın rutin klinik tanı prosedürü sağlamaktadır (Wang et al., 2015).

2.10. Nükleer Tıpta Beyin Görüntülemede Kullanılan Ajanlar

Klinik beyin araştırmalarında SPECT veya PET görüntüleme ajanları nörolojik hastalıkların tanısı ve tedavilerinin izlenmesi ile ilgili önemli bilgiler sağlamaktadır. Beyin görüntüleme çalışmaları Parkinson Hastalığı (PH), Alzheimer Hastalığı (AH), inme, epilepsi, depresyon ve beyin tümörünün görüntülenmesine dayanır. İnsan beyninin görüntülenmesi, AH ve PH gibi nörodejeneratif hastalıkların patolojisinin belirlenmesi, hastalığın ilerlemesinin takip edilmesine imkan sağlamakla beraber, görüntüleme yöntemi ayrıca beyindeki ilaç bağlanma yerleri ile ilgili spesifik bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler geliştirilen yeni ilaçların klinik öncesi ve klinik çalışmaları ile ilgili önemli datalar içermektedir (Zhu et al., 2014). Beyin görüntüleme için etkili bir teşhis radyofarmasötiği çeşitli özelliklere sahiptir. Ön plana çıkan ilk özellik kısa yarı ömürlü ve gama salıcı radyonüklidlerin kullanılmasıdır. Yaklaşık 140 keV'lik enerjili gama ışınları yayan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gibi izotoplar SPECT görüntüleme için kullanılırken, pozitron ışıması yapan ^{18}F ise PET görüntülemede sıklıkla kullanılan radyonüklidlerdir. Radyofarmasötiklerin kullanıldığı teşhis çalışmalarında kısa ömürlü radyoizotop kullanılması hastalara verilen iyonlaştırıcı radyasyon dozunu azaltır. Bu durum ayrıca kimyasal toksisite riski minimuma indirmektedir. Diğer bir özellik ise verilen radyofarmasötiğin vücuttaki

dağılımının ve hedefleme mekanizmalarının bilinmesidir. Beyin görüntülemeye bölgesel kan perfüzyonu, glukoz metabolizması veya spesifik nöroreseptörleri, taşıyıcıları veya amiloid plaklar gibi diğer bağlanma bölgelerini hedefleme gibi stratejik adımlar takip edilir. Bu durum özellikle ilgili hedef dokuda ve nörodejeneratif hastalıklarla ilişkili bağlanma bölgelerinde meydana gelen değişikliklerin görüntülenmesi için faydalıdır (Kar, 2019; Pimlott and Sutherland, 2011; Trapani et al., 2017; Zhu et al., 2014). Klinik araştırmalarda beyin görüntülemeye kullanılan radyofarmasötiklerin kan beyin bariyerine nüfus etme yeteneğine sahip olması gerekmektedir. Özellikle yağda çözünen yüksüz moleküller önlerine çıkan bu bariyeri, beynin mikrovasküler yapısı içerisindeki kılcal endotel hücrelerin her iki kısmında da oluşan konsantrasyon farkı sayesinde basit difüzyonla aşabilmektedir (Li and Sabliov, 2013; Pardridge, 2012; Stumpf, 2012). ^{99m}Tc ile işaretli beyin radyofarmasötiklerinin de kan beyin bariyerini basit difüzyonla geçtiği yapılan araştırmalar tarafından desteklenmektedir (Apostolova et al., 2015; Liu et al., 2011; Maksimenko et al., 2019; Neumaier et al., 2010; Yang et al. 2012). Ancak iyi bir beyin görüntüleme için beyne geçen radyofarmasötiklerin sadece kan beyin bariyerini geçmesi değil beyinde kalma süresi de önemli bir parametredir. Bütün bunlardan yola çıkarak görüntüleme için geliştirilecek olan bir beyin radyofarmasötığının kan beyin bariyerini geçmesi ve ilgili bölgede bir süre kalarak atılmaması çalışmaların odak noktasını oluşturmaktadır (Chen et al., 2020; Wang et al., 2015). Beyin görüntülemeye ticari olarak sıkça kullanılan ^{99m}Tc ile radyoişaretli radyofarmasötikler mercaptoacetiltriglisin [^{99m}Tc]-MAG3, [^{99m}Tc]-Tetrofosmin, heksaametilpropilenamin oksim [^{99m}Tc]-HMPAO ve tropandopamintrasporter [^{99m}Tc]-TRODAT-1 molekülleridir. (Choi et al., 1999; Kung, 2001; Zhu et al., 2014). Bunlar SPECT görüntüleme için kullanılırken PET sistemlerinde 2- ^{18}F fluoro-2-deoksi-D-glukoz [^{18}F -FDG,] L-6- ^{18}F fluoro-3,4-dihidroksifenilalenin [^{18}F -DOPA], [^{15}O -H₂O], Pittsburgh Compound-B [^{11}C -PIB], ^{11}C -raclopride sıklıkla kullanılan PET radyofarmasötikleridir (Zhu et al., 2014).

2.11. Parkinson Hastalığının Teşhisine Yönelik PET ve SPECT Ajanları

Dünya üzerinde nörodejeneratif hastalıklar arasında ikinci sırada olan Parkinson Hastalığının tam olarak tedavisi mümkün olmayıp, ileri evrelerde semptomları azaltmaya yönelik ilaç tedavisi ve cerrahi müdahale uygulanmaktadır. Bu bakımdan hastalığın tedavi şansının artırılmasında, erken teşhis büyük bir önem kazanmaktadır (Xu et al.,2013). Hastalığın tespiti için genetiksel, biyokimyasal, klinikle ilgili ve nörolojik görüntülemeye yönelik biyomarkerlar kullanılmaktadır. Özellikle nörolojik görüntülemeye yönelik biyomarkerlar SPECT, PET, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve Transkrinal Sonografi (TCS) yöntemleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Parkinson hastalığının teşhisinde yapılan PET ve SPECT çalışmaları bir taşıyıcı molekülün ^{18}F , ^{11}C , ^{123}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gibi izleyici bir molekül ile işaretlenerek beyindeki dopaminerjik nöronlarda meydana gelen değişimleri izlemeye yöneliktir (Choi et al., 1999; Delenclos et al., 2015; Kung, 2001; Sharma et al., 2013). Parkinson hastalığının görüntülenmesinde izlenen stratejilerden biri dopamin taşıyıcı (DAT) ligandların izlenmesidir. Parkinson hastalığında beyindeki bazal gangliyonlar ve SNc bölümünde önemli bir dopaminerjik nöron kaybı vardır. Dopamin taşıyıcı (DAT) ligandlar dopamini sinaptik yarıktan nörona geri alımını sağlayan presinaptik nöronlarda bulunur. DAT'lar sayesinde nöronun içine tekrar alınan dopamin daha sonra veziküler monoamin taşıyıcı 2 (VMAT2) tarafından veziküller içinde yeniden paketlenir. SPECT sistemlerinde kullanılan radyofarmasötiklerden bir grup nöronlarda dopamin alımına özgü olan DAT'ların izlenmesine yönelik geliştirilmiştir. Eğer nöronlardaki dopamin seviyesi yüksek ise DAT'lara özgü radyoaktif izleyiciler nöronların içersinde yüksek miktarda tutulum gösterecek, bu durumda dopaminerjik nöronların sağlam olduğunu gösterecektir. Az tutulum ise oradaki dopaminerjik nöronlarda azalma olduğunu göstermekte bu durumun ise Parkinson hastalığından kaynaklandığı düşünülmektedir. SPECT radyofarmasötiklerine tropandopamintrasporter [$^{99\text{m}}\text{Tc}$ -TRODAT], 2-Karbometoksi-8-(3-floropropil)-3-(4- ^{123}I iyotfenil)tropan [^{123}I -FP- β -CIT] örnek olarak verilebilir (Kar, 2019; Pimlott and Sutherland, 2011; Zhu et al., 2014). Parkinson hastalığının görüntüleme çalışmaları kapsamında yapılan PET çalışmaları ise mekanizma olarak daha çok glukoz metabolizmasına yönelik

kullanılan ^{18}F -FDG ile birlikte, dopaminin öncü türevi olan L-DOPA'nın ^{18}F ile işaretlenmesiyle elde edilen ^{18}F -DOPA kullanılmasıdır. 1980'lerde keşfedilen 6- ^{18}F fluoro-L-dihidroksifenilalanin (^{18}F -DOPA) adrenerjik bir nörotransmitter olup, PET sistemlerinde dopamin nöronların ve glioma dokusunun görüntülenmesinde kullanılmaktadır. ^{18}F -DOPA dopaminerjik nöronlarda tıpkı L-DOPA gibi sisteme katılmaktadır. Dekarboksilaz enzimi ile dopamine dönüşmekte ve dopaminin izlenmesine imkan sağlamaktadır. Bu durum da Parkinson hastalığının teşhisi ile ilgili önemli veriler alınmasına imkan tanımaktadır.(Denora et al., 2017; Pimlott and Sutherland, 2011; Sharma et al., 2013; Zhu et al., 2014). Diğer bir radyofarmasötik grubu ise monoamine transporter-2 (VMAT-2) sistemine yönelik dizayn edilmektedir. Bunlardan biri de ^{11}C -dihidrotetrabenazine (^{11}C -DTBZ) radyofarmasötikidir. ^{11}C -DTBZ iyi bir görüntü vermesine rağmen kullanma pratiği açısından bazı sakıncalar taşımaktadır. Özellikle ^{11}C yarı ömrü ($t_{1/2} = 20$ dakika) önemli bir sorundur. Bunun yerine dihidrotetrabenazine (DTBZ)'nin ^{18}F ($t_{1/2} = 110$ dakika) ile radyoışaretili hali olan ^{18}F -DTBZ daha büyük bir avantaj sağlamaktadır. VMAT-2 sisteminin görüntülenmesine dayalı olarak kullanılan bu radyofarmasötikler insan beyninde en çok kaudat putamen, nükleus accumbens, substantia nigra, dorsal raphe ve locus coeruleus bölgelerinde tutulum göstermekte ve yüksek konsantrasyonlu görüntü alınabilmesine imkan sağlamaktadır (Arena and Stoessl, 2015; Nagatsu and Nagatsu, 2016; Stoessl et al., 2011; Zhu et al., 2014).

2.12. Parkinson Hastalığında Bitkisel Kökenli Bileşiklerin Yeri

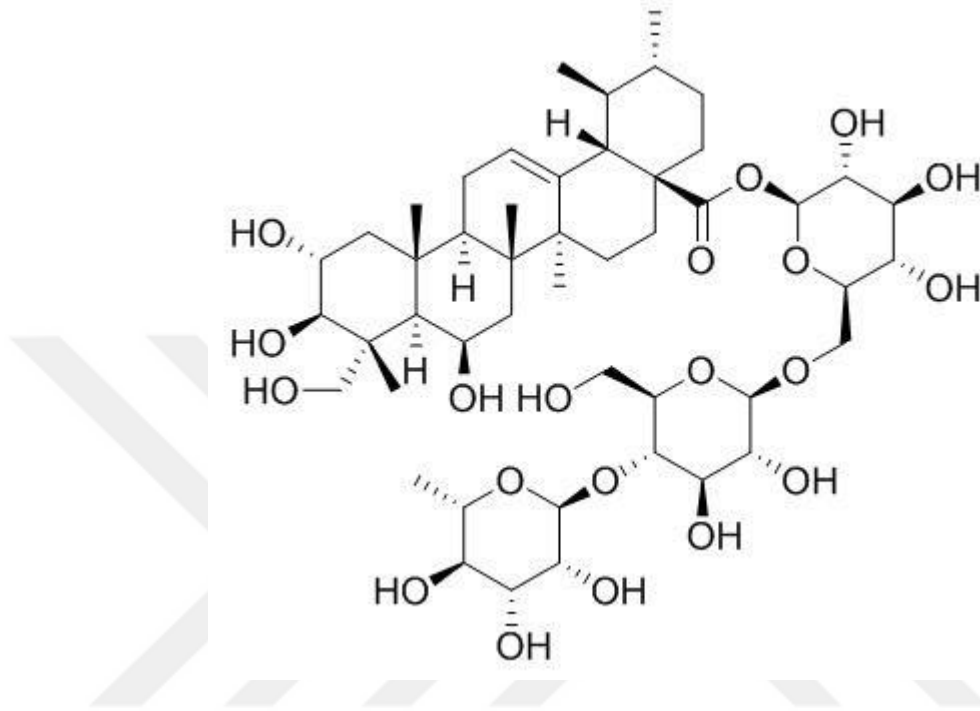
Tıbbi bitkiler yüzyıllardır hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Parkinson hastalığının teşhis ve tedavisinde de bitkisel kökenli bileşiklerin kullanım potansiyeli üzerine yapılan araştırmalarda da artış görülmektedir (Alberio and Fasano, 2010; Bhattacharjee and Perumal, 2019; González-Burgos et al., 2014; Jansen et al., 2014; Jia et al., 2014; Khozaei and Emamzadeh, 2014; Li et al., 2019). Bu araştırmalarda bitkilerin antioksidan özellikleri (Panahi et al., 2019), MAO-B enzim inhibitör özellikleri (Mazzio et al., 2013), antienflamatuar etkileri (González-Burgos et al., 2014), ve nöroprotektif özellikleri (Jia et al., 2014; Mamun et al., 2014) gibi bazı özellikleri ön plana çıkmaktadır. Özellikle Parkinson hastalığının sebebi olarak dopaminerjik nöronların tahribi göz önüne

alındığında bu nöronlara yönelik antioksidan özellik gösteren ve buna bağlı nöroprotektif etki gösteren bileşikler daha da önemli hale gelmektedir (Garlapati et al., 2014). Çünkü süperoksit ve hidroksil radikalleri Parkinson hastalığı (PH) patogeneğinde rol oynamaktadır. Bu durumda oluşan bu serbest radikalleri önleyecek antioksidanların kullanılması hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak için potansiyel taşımaktadır. Bu açıdan bakıldığında antioksidan özellik gösteren bitki özleri Parkinson hastalığı çalışmalarında bir potansiyel taşımaktadır (Kamatou et al., 2012). Bu bitkilerden biri de *Panax ginseng* bitkisidir. *Panax ginseng* bitkisindeki farmakolojik olarak aktif bileşiklerden ginsenosidler merkezi sinir sistemi üzerinde antioksidan ve anti-enflamatuvar aktiviteleri yoluyla çeşitli nörotoksik hasarlardan nöronların kurtarılmasını yardımcı olmaktadır (González-Burgos et al., 2014). Parkinson hastalığında nöroprotektif etki gösteren bileşikler içeren bitkilerden *Centella Asiatica* bitkisi dikkat çekmektedir. *Centella Asiatica* genellikle “Gotu kola, Asya pennywort, Hint pennywort, Hint su göbekli, yabani menekşe ve kaplan otu” olarak da bilinmekte olup, Türkiye de dahil olmak üzere bazı ülkelerdeki tıbbi önemi nedeniyle başarılı bir şekilde yetiştirilen tropik bir bitkidir ve yüzyıllardır Çin geleneksel ilaçlarında uzun bir kullanım geçmişine sahiptir. *Centella Asiatica* nöroprotektif etkisine ek olarak, yara iyileşmesi, antienflamatuvar, antipormal, antiülser, hepatoprotektif, antikonvülsan sedatif, immünostimülan, kardiyoprotektif, antidiyabetik, sitotoksik ve antitümör, antiviral, antibakteriyel, böcek öldürücü, antifungal, antioksidan, lepra ve venöz yetmezlik tedavileri gibi insan sağlığı için istenen çok çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olduğu da literatürdeki birçok çalışmayla bildirilmiştir (Lokanathan, et al., 2016; Al Mamun et al., 2015; Sun et al., 2015; Zorzi et al., 2015; Li et al., 2019; Liu et al., 2019; Lu et al., 2019; Sasmita et al., 2018; Shen et al., 2019; Wang et al., 2019). Özellikle bitki içerisindeki etken maddelerden asiaticoside, madecassoside, madecassic asit ve asiatic asit literatürde en çok çalışılan maddelerdir (Sun et al., 2015; Zorzi et al., 2015; Kai et al., 2008).

2.13. Madecassoside (MA)

Madecassoside (MA) ($C_{48}H_{78}O_{20}$, Moleküler Ağırlığı: 975,13 g/mol, Şekil 2.9) bileşiği Gotu Kola (*Centella Asiatica*) bitkisinden elde edilen triterpenoid yapıda bir saponin olup Hindistan, Malezya ve diğer Asya ülkelerinde geleneksel

tıpta hafıza güçlendirici ilaç olarak kullanılmaktadır. MA'nın, *Centella asiatica* bitkisi içerisinde ana biyoaktif triterpen bileşenleri arasında en yüksek içerik maddesi olduğu bildirilmektedir (Wang et al., 2014a). MA molekülünün kimyasal yapısı Şekil 2.9'da yer almaktadır.



Şekil 2.9. Madecassoside Molekülünün Kimyasal Yapısı.

Merkezi sinir sistemi üzerinde farmakolojik etkiye sahip MA bileşiğinin, özellikle beynin SNc ve Striatum bölgelerindeki dopaminerjik hücreler üzerinde nöron koruyucu özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir (Xu et al., 2013). Literatürde MA bileşiğinin nöron koruyucu etkisiyle ilgili çalışmalar mevcuttur (Lokanathan et al., 2016). Bu çalışmalardan biri de Xu (2013) ve arkadaşlarının yılında yapmış oldukları çalışmadır. 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) kullanarak oluşturdukları Parkinson hayvan modeli üzerinde MA bileşiğinin dopaminerjik hücreler üzerinde koruyucu etkiye sahip olduklarını tespit etmişlerdir (Xu et al., 2013). Aynı şekilde Jia ve arkadaşları Sprague-Dawley sıçanlarında fokal serebral iskemi reperfüzyon hasarına karşı MA bileşiğini nöroprotektif etkisi olduğunu belirlemişlerdir (Jia et al., 2014). MA bileşiği nörodejenaratif hastalıklardan sadece Parkinson Hastalığı için değil Alzheimer hastalığına yönelik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Beyinde amyloid β peptide 1 - 42 ($A\beta$ 1-42) birikmesi Alzheimer hastalığının nedenleri arasında

görülmektedir. MA bileşiğinin amyloid β peptide 1 - 42 ($A\beta$ 1-42) birikmesi sonucu oluşan hafıza bozukluklarının giderilmesinde etkili olduğu ve SH-SY5Y hücrelerindeki nörotoksisiteyi engellediği belirlenmiştir (Al Mamun et al., 2015). L-DOPA molekülünün beynin SNc bölümündeki dopaminerjik nöronlara olan yüksek spesifikliğı nedeniyle tez çalışmasında MA bileşiğı L-DOPA ile konjuge edilmiştir (MA-L-DOPA). Böylelikle MA bileşiğinin SNc bölümüne olan spesifikliğinin artması öngörülmüştür.

2.14. Bitkisel Kökenli Radyoişaretli Bileşikler

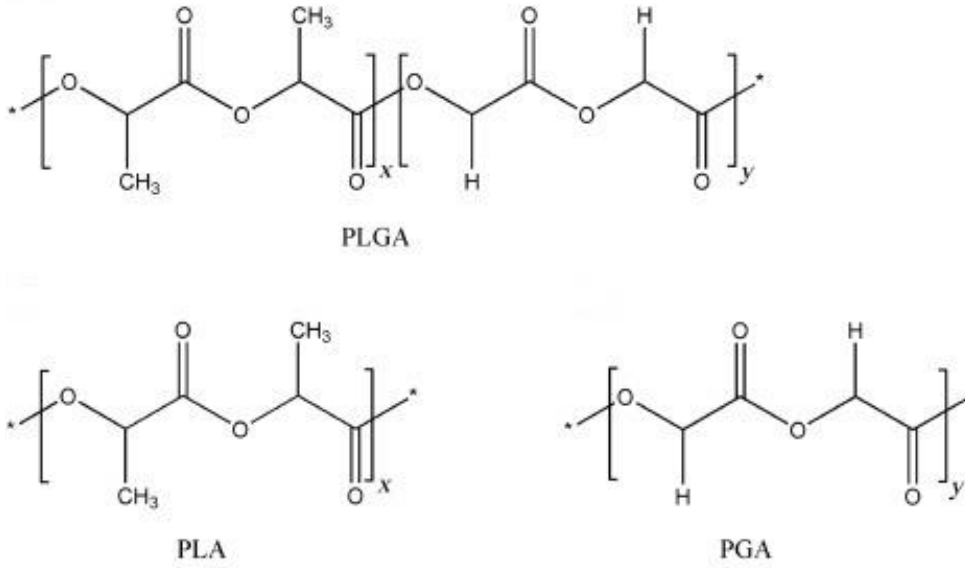
Son yıllarda literatürde kanser vb. hastalıkların teşhis ve tedavisine yönelik bitki kökenli radyo işaretli bileşiklere yönelik birçok çalışma görülmektedir. Bu amaçla yapılan çalışmalar bitkilerin tanımlanması, içeriklerindeki etkili ajanların izolasyonu, saflaştırılması ve ^{99m}Tc veya ^{131}I / ^{125}I gibi uygun radyoizotoplarla işaretlenerek *in vitro* ve *in vivo* yöntemlerle biyoetkinliklerinin değerlendirilmesini içermektedir (Biber Muftuler et al., 2015b). Beyin üzerine yapılan çalışmalarda bitkisel kökenli bileşiklerin çeşitli radyonüklidlerle işaretlenerek incelendiğı araştırmalarda mevcuttur. Bunlardan biri de Enginar ve arkadaşlarının (Enginar et al., 2009a) yapmış olduğu çalışmadır. Papaver somniferum bitkisinden elde edilen kuru haşşas kapsüllerinden ekstrakte edilen kodein (COD) bileşiğı ^{131}I radyoişaretlenmiştir (^{131}I -COD). Radyoişaretli bileşiğın Albino Wistar sıçanlarında biyodağılım çalışmaları sonuçlarına göre beynin serebellum, medulla pons, striatum ve hipotalamus bölgelerinde tutulum gözlenmiştir. Çalışmanın verdiğı olumlu sonuçlar üzerine ek olarak COD bileşiğinin glukuronid türevi sentezlenip (kodain-glukuronid, COD-GLU) ^{131}I ile radyoişaretlenmiştir. (^{131}I -COD-GLU). (Enginar et al., 2009b). Aynı ekip bu çalışmalara ek olarak, Papaver somniferum bitkisinden morfin (MOR) izole ederek ^{131}I ile radyoişaretlenmiş (^{131}I -MOR) bu bileşiğın sıçanlar üzerindeki biyodağılım sonuçlarına göre ^{131}I -MOR'un hipotalamusta daha yüksek tutulum gösterdiğini belirtilmiştir. (Enginar et al., 2010). Bunun yanı sıra morfin glukuronid bileşiğı de sentezlenmiş (morfin glukuronid, MOR-GLU) ^{131}I ile radyoişaretlenmiştir. Radyoişaretli glukuronid türevinin hipotalamus ile beraber orta beyinde de tutulum gösterdiklerini rapor etmişlerdir (Enginar et al., 2012a). Diğer taraftan morfin bileşiğinin etil-morfin (EM) türevi ve EM'nin glukuronid

türevi (EM-GLU) sentezlenerek bu bileşikler yüksek verimle ^{131}I ile radyoışaretlenmiştir. Her iki radyoışaretli bileşiğin medulla pons, hipotalamus ve orta beyinde diğer beyin kısımlarına göre daha fazla tutulum gösterdikleri belirtilmiştir (Enginar et al., 2012b). Araştırma ekibi Papaver somniferum yani haşhaş bitkisinden elde edilen tabein (TAB) bileşiği üzerinde de benzer prosedür ışığında bir çalışma yapmışlar, gerçekleştirdikleri biyodağılım çalışması sonucunda radyoışaretli TAB'ın (^{131}I -TAB) beyinde orta beyin ve hipotalamus kısmında tutulum gösterdiği rapor edilmiştir (Enginar et al., 2013.) Sadece bu araştırma ekibinin yapmış olduğu çalışmalar irdelendiğinde bile, radyoışaretli bitkisel kökenli bileşiklerin Parkinson hastalığının teşhisinde umut verici bir potansiyele sahip olabileceği görülmektedir.

2.15. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)

Nanoparçacıklar, boyutları 10 nm ile 1000 nm arasında değişen katı parçacıklar olup, yaklaşık 50 yıl önce, biyolojik olarak parçalanabilen polimerler vasıtasıyla aşı ve kanser kemoterapi ajanlarına yönelik taşıyıcı sistem oluşturmak amacıyla geliştirilmişlerdir (Danhier et al., 2012; Kulkarni et al., 2010). Son yıllarda nanoparçacıklar gibi polimerik ve vücutla biyouyumlu aktif madde taşıyıcı sistemlerin kullanılabilirliği, üzerinde en fazla araştırma yapılan konulardan biridir (Danhier et al., 2012; Gambaryan et al., 2014; Kwon et al., 2012b, 2012a; Rai et al., 2009; Maksimenko et al., 2019; Paudel et al., 2019; Pereverzeva et al., 2019; Steinman et al., 2019). İlaç taşıma sistemlerinde kullanılan nano boyutlu yapılar aşağıda yer alan özellikleri nedeniyle oldukça elverişli sistemlerin oluşturulmasına imkân sağlamaktadır. Bunlar; sahip oldukları boyutlarından dolayı hücre membranından yüksek derecede geçiş sağlamaları, içerdikleri etkin maddeyi hücre dışında veya hücre içine girerek istenilen konumlarda serbestleştirebilmeleri, nanoparçacıklar içerisine konjuge edilen ya da kompleksleştirilen ilaç moleküllerinin hücre alımlarını artırmaları, hücre membranına yönelik artırılmış penetrasyon ve uzatılmış kalış süreleri gibi özelliklerinin bulunması, yüksek ilaç yükleme kapasitelerine sahip olma, vücut içerisinde istenilen bölgeye programlanabilen ilaç ya da benzeri biyolojik aktif madde salımı sağlamaları, vücut içerisindeki düşük toksisiteleri, artırılmış biyoyararlanım sağlamaları vb. (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011;

Maksimenko et al., 2019; Steinman et al., 2019) olarak sıralanabilir. Araştırmalarda yukarıda da ifade edildiği gibi ilaç taşınımında çeşitli avantajlara sahip olan nanopartiküler sistemlerin hazırlanabilmesi için poli (kaprolakton) (PCL), poli (laktikasit) (PLA), poli (glikolikasit) (PGA) ve bunların ko-polimeri olan poli (ko-gilikolikasit) (PLGA) (Şekil 2.10) gibi polimerler en çok kullanılan sentetik polimerler olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 2.10. PGA, PLA ve PLGA bileşiklerinin kimyasal yapısı

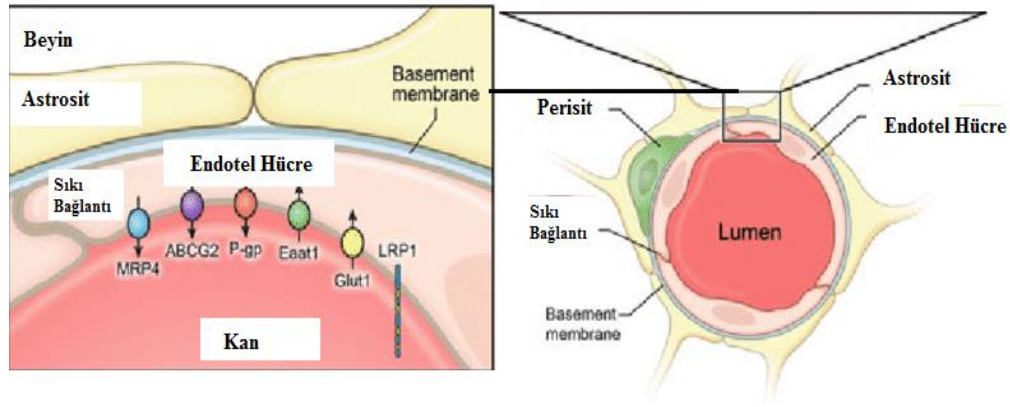
Kullanılan bu sentetik polimerlerin biyouyumlulukları ve doğal yollardan absorbe edilebilirlikleri en önemli özelliklerindendir. PLGA ile PLA molekülleri karşılaştırıldığında ise özellikleri birbirine çok yakın olmasına rağmen PLGA'nın daha fazla yükleme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (Jena, 2011). Özellikle tez çalışmamızda da kullanılan PLGA adı geçen polimerler arasında nano ve mikroküre üretiminde sıkça kullanılan polimerlerden biridir. PLGA molekülünün biyoparçalanma kinetikleri, non-toksik etkileri ve mekanik özellikleri kullanılmasıdaki önemli avantajlarından biridir. Bu özellikleri de dikkate alındığında ilaç taşıma mekanizmasında PLGA'lı nanopartiküllerinin hücre içerisine endositoz ile alındığı ve hedeflenen yerde ilacı saldırdığı düşünülmektedir (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011; Şimşek, 2010, Jena, 2011).

Özellikle PLGA molekülü birçok araştırmada toksik olmayan maddelere dönüşmesi ve insan vücudu tarafından uzaklaştırılmasından dolayı etkin nanoparçacık ilaç taşıma sistemi olarak kullanılmaktadır (Jena, 2011; Vey et al., 2011). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), PLGA molekülünü fiziksel olarak güçlü ve biyolojik olarak son derece uyumlu olması dolayısıyla onaylı biyobozunur polimerler ailesinde sınıflandırmaktadır (Makadia and Siegel, 2011).

2.16. Beynin SNc Bölümüne Yönelik İlaç Taşınımı

Nöronal hasarlanmalara bağlı olarak işlevselliği açısından geri dönüşümü hemen hemen olanaksız bir organ olan beynimizde, nöronlar hasarlanmaya maruz kalan bazı etkenlere bağlı olarak belli bir sürede ya yavaş olarak düzelebilir ya da ölebilmektedir. Nöronal hasarlanmaya eşlik eden etkenlere, nöronların gelişimsel yaşı, hücrenin anatomik lokalizasyonu, hasarın tipi, şiddeti ve süresi örnek olarak verilebilir. Parkinson hastalığında da beynin SNc bölümü ve striatum bölgelerindeki dopaminerjik nöronlarda benzer hasarlar meydana gelmekte ve dopaminerjik nöronların kaybı PH sebebi olarak değerlendirilmektedir. Bu alanda yapılan son zamanlardaki araştırmalar nöroprotektif etkisi olduğu iddia edilen bileşikler ve bunların farklı serebral hasarlanmalardaki koruyucu etkilerine yönelik yoğunlaşmıştır (Harischandra et al., 2020; Lin et al., 2019; Raza et al., 2019). Literatürde nöroprotektif etki, kavram olarak, oluşmuş nöronal hasarın geri döndürülmesi ya da bir sonraki oluşabilecek nöronal hasarlanmayı önleyebilecek bir ajanın uygulanması olarak tanımlanmaktadır. Bu ajanların çalışma prensiplerinde oksidatif stresi azaltma, mitokondriyal hasarı önleme, aggregatedatlaşmayı engelleme gibi özellikler sayılabilir. Nöroprotektif etki gösteren bu ajanlar hedef olarak nöronların içine nüfuz edebilmeleri istenmekte olup protein ya da peptid yapıda küçük moleküllerden oluşmaktadır (Panahi et al., 2019; Raza et al., 2019; Q. Wang et al., 2019). Bu moleküllerin kullanılmasında ve ilaçların endüstriyel üretiminde hedeflenen amaç ise insan vücudunun istenen bölgelerine iletilebilen teşhis ve tedavi ajanları geliştirmektir. İstenen durum üretilen bu ilaçların zaman, yer ve konsantrasyon parametreleri açısından doğru bir şekilde iletiminin sağlanmasıdır. Çünkü beyin alanında yapılan klinik araştırmalarda ilaç olarak geliştirilen yeni bileşiklerden sadece sınırlı bir kısmı beyne ulaşabilmekte ve klinik denemelerden onay alabilmektedir. Oluşan bu duruma ek çözümler

bulmak amacıyla aktif olarak araştırmalara devam edilmektedir (Kulkarni et al., 2010; Panahi et al., 2019). Nörolojik hastalıkların teşhis veya tedavisi alanında yapılan çalışmalar kapsamında geliştirilen metotların beklenenden az sayıda olmasının en önemli nedenlerinden biri ilgili ilaçtaki aktif maddenin beyne iletilmesi sırasında ortaya çıkan Kan-Beyin-Bariyerinin (KBB) varlığıdır (Li and Sabliov, 2013; Maksimenko et al., 2019). Yapılan araştırmalar nörolojik hastalıkların teşhis uygulamaları için geliştirilecek olan beyin radyofarmasötiklerinin de KBB'ye nüfuz etme yeteneğine sahip olması gerektiğini göstermektedir. Çünkü KBB nörodejeneratif hastalıklara karşı geliştirilen yolların santral sinir sistemine iletimini sınırlandıran bir etken olarak değerlendirilmektedir (Chen et al., 2020; Panahi et al., 2019; Sayed et al., 2019). KBB, nörolojik alanda teşhis ve tedavi amaçlı kullanılan ilaçların kandan beyne difüzyonu esas olarak, biyolojik aktif molekülün lipid membranlara geçiş yeteneğine bağlı bir sistemdir (Pardridge, 2012). Buna göre aktif bir maddenin KBB'den geçerek santral sinir sistemine penetre olabilmesi çeşitli koşullara bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Bu koşullar aktif maddenin lipitte çözünebilirliği, fizyolojik pH'da noniyonize olma durumu, düşük molekül ağırlığı ve serum proteinlerine düşük oranda bağlanma şeklinde sıralanabilir. (Pardridge, 2003, 2012; Andrieux and Couvreur, 2009; Kulkarni et al., 2010; Roney et al., 2005; Pereverzeva et al., 2019). KBB beyin dokusunda çok verimli bir koruyucu bariyer olarak işlev görmektedir. Ancak bu mekanizma aynı anda birçok potansiyel tanı ve teşhis amaçlı kullanılan ilaçların da beyne iletiminin kısıtlamasına sebep olmaktadır (Li and Sabliov, 2013; Andrieux and Couvreur, 2009; Kulkarni et al., 2010). İstenilen ilaçların beyine penetre olmasında KBB'nin üstesinden gelebilmek için birçok invaziv ve noninvaziv strateji geliştirilmiş ve halen çalışmalar devam etmektedir. Fakat oluşan bu olumlu süreçte bazı dezavantajların da olduğu gözden kaçırılmamalıdır (Andrieux and Couvreur, 2009; Pardridge, 2012). şekil 2. 11.'de KBB'nin şematik gösterimi verilmiştir.



Şekil 2.11. KBB'nin şematik gösterimi (George, 2015).

Şekil 2.11'de görüldüğü gibi KBB öncelikle beyinde bulunan kılcal damarlardaki beyin endotel hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Endotel hücrelerinin etrafı taban tarafındaki perisitler ve astrositlerle çevrelenmektedir. Endotel hücreleri ayrıca çeşitli proteinlerin (connexin, occludin ve claudin ailesi proteinleri) aracılık ettiği sıkı bağlantılar oluşturur. Geçiş sistemi özetlenecek olursa apikal hücre yüzeyinde, P-glikoprotein (P-gp), ABCG2 ve MRP4 (çoklu ilaç direnç proteini) gibi protein taşıyıcıları küçük molekülleri lümene geri taşır. Kan kaynağından gelen besin maddelerine ise, glutamat (uyarıcı amino asit taşıyıcı, Eaat1) ve D-glikoz (glikoz alım taşıyıcı, Glut1,) gibi kolaylaştırıcı çözünen taşıyıcıları aracılık eder. LRP1 (düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü), beyin endotel hücreleri boyunca reseptör aracılı transsitoza aracılık etmektedir (George, 2015). Şekil 2.10'da verilen mekanizmalar oluşan zorluklara karşı serebral ilaçların iletilmesinde KBB'nin geçiş mekanizmalarında manipülasyonlar sağlanarak strateji geliştirilmesi üzerinedir (Kulkarni et al., 2010). Bu stratejiler arasında beyinde bulunan özel taşıma sistemlerinin kullanılması, aktif madde modifikasyonları-ön ilaç uygulamalarının (prodrug) kullanılması, Nano-Parçacık (NP) ve lipozom gibi polimerik taşıyıcıların kullanılması ve sıkı bağlantıların ozmotik etki ile açılması olarak örneklendirilebilir (Charabati et al., 2020; Li and Sabliov, 2013; Pardridge, 2012). Özellikle bu stratejiler yardımıyla peptit-protein gibi suda çözünen aktif maddeler ile yağda çözünürlüğü zayıf olan ve hidrojen bağı yapan fonksiyonel gruplara sahip küçük moleküllerin KBB'yi geçerek santral sinir sistemine taşınması mümkün olmaktadır (Roney et al., 2005; Andrieux and Couvreur, 2009; Kulkarni et al., 2010). Bu stratejilerin içerisinde son zamanlarda özellikle koloidal taşıyıcıların kullanımı daha ön plana çıkmaktadır. Koloidal ilaç

taşıyıcı sistemleri miseller, emülsiyon, lipozomlar ve nanoparçacıkları (nanosferler ve nanokapsül) içermektedir (Andrieux and Couvreur, 2009; Kulkarni et al., 2010). Özellikle nörolojik hastalıkların teşhisinde NP uygun yüzey modifikasyonları, KBB'yi aşma potansiyelleri ve istenen hedefe ilaç iletimi sağlama kapasiteleri nedeniyle araştırmalarda sıkça kullanılmaya başlanmıştır (Charabati et al., 2020; Li and Sabliov, 2013; Maksimenko et al., 2019; Pereverzeva et al., 2019). Tez çalışmasında etken ana maddelerimiz olan MA ve MA-L-DOPA bileşikler biyobozunur yapıda olan NP'lerden poli laktik-koglikolik asit (PLGA) ile enkapsüle edilerek KBB'yi geçmesi ve hedef organ olan beynin SNc bölümüne taşınması amaçlanmıştır.

2.17. Lipofilite

Lipofilite ve hidrofobisite terimleri bileşiklerin aynı fiziksel parametrelerini tanımlamak amacıyla kullanıma potansiyeline sahip olmalarına rağmen aralarında ince bir ayrım vardır. Lipofilite, bir bileşiğin yağ fazına yönelik benzerliğini aynı zamanda *in vivo* biyolojik sistemlerdeki lipit membranlardan geçebilme yeteneğini gösteren bir olgudur. Lipofilite aynı zamanda tıbbi kimya çalışmalarında hayati önem taşıyan fizikokimyasal bir özelliktir (Rutkowska et al., 2013). Bu özellik, bir bileşiğin, birbiri içinde çözünmeyen biri sulu, diğeri ise organik yapıda olan çözücüye geçiş oranı olarak ölçülmektedir. Araştırmalarda n-oktanol, organik faz olarak çok tercih edilen bir bileşiktir (Şenocak, 2010; Tekin, 2013; Yurt Kilcar, 2013). Lipofilite değeri esas olarak $C_{\text{oktanol}}/C_{\text{su}}$ oranı olup, bu değer P olarak nitelendirilir ve P değerinin logaritması alınarak lipofilite logP değeri üzerinden değerlendirilir (Liu et al., 2011). Beyin araştırmaları açısından incelendiğinde ise bir bileşiğin serbestçe KBB'yi geçebilme durumu birçok faktörden etkilenmesine rağmen bileşiğin lipid çözünürlüğüne, protein bağlama kapasitesine, molekül büyüklüğüne ve yüküne bağlı bir parametredir (Jeong et al., 2014; Pimlott and Sutherland, 2011; Vermeulen et al., 2019; Zhu et al., 2014). Dischino ve arkadaşlarının yaptıkları araştırmada KBB'yi geçebilen maksimum oktanol/su dağılım katsayısı $[\log P(\text{okt})]$ belirlenmeye çalışılmış ve ^{11}C ile radyoışaretli bileşiğin lipofilitesi ile tek bir geçiş esnasında beyine ekstraksiyonu arasındaki ilişki incelenmiş, araştırma sonucunda log P (okt) değerleri 0,9 ile 2,5

arasında değişim gösterdiği ve ^{11}C ile radyoişaretli bileşiklerin tamamının beyine geçişinin mümkün olabildiğini tespit etmişlerdir (Dischino et al., 1983).

2.18. Stabilite

Doğada var olan tüm sistemler en kararlı halde bulunma eğilimindedir. Doğadaki maddeler ışık, hava, zaman, sıcaklık gibi parametrelerin değişimi veya iç reaksiyonlar geçirmesi sonucunda değişerek ya da bozularak kendilerini en kararlı hale getirme eğilimi göstermektedir. Örneğin teorik açıdan bakıldığında kullanılan bir sistem, ortam koşulları değişmediği takdirde enerjisini minimuma indirerek sonsuza kadar stabil olarak kalabilir. Sistemin oluşan bu kararlılığı sürdürme yeteneği ise stabilite olarak tanımlanmaktadır (Wu et al., 2011). Stabilite süresi çeşitli parametrelere bağlı olarak değişkenlik gösterebilir. Bu parametrelere çalışmada kullanılan radyonüklidin yarı ömrü, uygulama yeri ve uygulama zamanı örnek olarak verilebilir (Martins et al., 2011). Stabilite ilaç geliştirme çalışmalarında önemli bir parametredir. Özellikle de görüntüleme ve tedavi amacıyla nükleer tıpta kullanılması için geliştirilen radyoişaretli bir bileşiğin, kararlı olması ve ilacın etkin süresi içinde de stabilitesini koruması büyük bir öneme haizdir (Denora et al., 2017; Martins et al., 2011; Trapani et al., 2017). Çünkü kullanılan radyoişaretli bileşik hazırlanmasından uygulama anına kadar geçen zaman diliminde ve ilacın etkinliği sürecinde kararlılığını sürdürememesi, uygulanan bileşiğin vücut içerisindeki biyodağılımının kontrol altında tutulmasını imkânsız hale getirebilir (Martins et al., 2011). Böyle bir durum ilacın uygulandığı hasta için de hayati bir risk oluşturma potansiyeli barındırır (Jurisson et. al, 1992).

2.19. Erime Noktası Tayini

Saf maddeler belirli bir sıcaklıkta erimekte olup, bu esnada madde katı formdan sıvı forma geçmektedir. Saf maddelerin sıvı forma geçtiği andaki sıcaklık ise o maddenin erime noktası olarak tanımlanmaktadır. Saf maddeler özelinde düşünüldüğünde erimenin gözleendiği sıcaklık ile maddenin tamamen sıvı hale geçmesini içeren bir erime noktasında bir sıcaklık aralığı bulunmaktadır. Bu ölçülebilen sıcaklık aralığı saf maddelerde $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'yi geçmemektedir (Erdik vd.,

2000). Madde içerisinde safsızlıkların varlığı erime noktası aralığını artırmaktadır. Erime noktasının tayini sentez çalışmalarında da önemli bir ön belirteç olarak kullanılmaktadır (Hildebrand and Franke, 2012; Makadia and Siegel, 2011). Bunun için çok az miktarda alınan katı bir madde bir termometreye tutturulmuş kapiler tüp içinde ısıtılmakta ve maddenin erimeye başladığı andaki sıcaklık değeri termometreden okunarak kaydedilmektedir. Erime noktalarının karşılaştırılmasına dayanarak sentezi yapılan ürünün sentezinin gerçekleşip gerçekleşmediği ile ilgili bir fikir elde edilebilir (Kodama, 2009; Saha, 2004).

2.20. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografisi (HPLRC) Yöntemi

HPLC, bir karışım içindeki bileşenleri analiz etmek ve/veya ayırtmak için kullanılan kromatografik yöntemlere dayalı bir sistemdir (Rafamantanana et al., 2009). Sistemin esas çalışma prensibi, katı adsorban madde içeren bir kolon içinden, incelenen örneği muhteva eden sıvı fazın geçirilmesi ve bu şekildeki sıvı örneklerin sütun içerisinde sürüklenmesi şeklinde ifade edilebilir. Kolon içerisinde yüksek basınçla yapılan sürüklenme esnasında, uygulanan örneğin bileşenleri, sütun içerisindeki katı materyalle etkileşime girer. Oluşan bu etkileşim eğer zayıf ise örneğin kolon dışına çıkması kısa sürede, etkileşim güçlü ise de çıkış uzun sürede olmaktadır. Bu oluşan durum kolondan çıkış süreleri dikkate alınarak, kromatogramda farklı pikler elde edilmesine imkân sağlamaktadır. Örnek içerisindeki ayırma tabi tutulan bileşiklerin kolonu terk etme süresi alıkonma zamanı (Retention Time; R_t) olarak tanımlanmaktadır (Jian et al., 2012). Bu sistem, kontrol edilebilir elektronik panel, yüksek basınçlı pompa sistemi, sıvı faz taşıma kapları, dedektörler, saflaştırma kolektörü, kolon taşıma bölümü, fırın ve verilerin kaydedildiği bilgisayardan oluşmaktadır (Erfani et al., 2013; Saran et al., 2012). Bu sistemler HPLC olarak adlandırılmaktadır. Sistem içerisinde kullanılan dedektörler de farklılıklar göstermektedir. HPLC sistemlerinin kullanım maliyetleri diğer yöntemlere göre daha fazladır. Çünkü sistemde tanecik boyutu 2-10 μm arasında olan dolgu maddeleri kullanılmakta ve uygun akış hızları elde edebilmek için yüzlerce atmosferlik pompa basınçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüksek basınçların oluşturulabilmesi ve uygun kullanım koşulları olarak HPLC için diğer kromatogramlara göre daha ince işçilik gerektirdiğinden maliyet

yükselmektedir (Dahimiwal et al., 2013). HPLC sistemi kullanılarak çeşitli kromatografiler üzerinde çalışılabilmektedir. Bunlar arasında normal faz kromatografisi, bölüm kromatografisi, ters faz kromatografisi, deplasman kromatografisi, jel filtrasyon kromatografisi, iyon değişim kromatografisi ve biyoaffinite kromatografisi gibi kromatografiler ön plana çıkmaktadır (Dahimiwal et al., 2013; Gupta et al., 2012). Radyolojik örneklerin dedeksiyonu için ise radyoaktivite dedektörleri NaI(Tl) eklenerek sistem HPLRC sistemi olarak adlandırılmaktadır.

2.21. İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ve İnce Tabaka Radyo Kromatografisi (TLRC) Yöntemi

TLC yöntemi, bir tepkimenin ilerlemesini izlemek, belirli bir karışım içinde bulunan bileşiklerin tespit edilmesini sağlamak ve madde saflığını belirlemek gibi amaçlarla kullanılan hızlı, ucuz ve kolay bir kalite kontrol yöntemidir. Çalışma prensibi katı-sıvı adsorpsiyonuna dayanmaktadır (Fair and Kormos, 2008). Bu yöntemde katı faz olarak, plastik ya da alüminyum materyalin üzerine ince bir tabaka halinde kaplanan, silika jel, alüminyum oksit ya da selüloz gibi adsorban bir madde bulunan TLC şeritleri kullanılmaktadır (Wicha-Komsta and Komsta, 2017). Sıvı faz olarak ise radyoaktif işaretli maddeye uygun olan çözgen ya da çözgen karışımları kullanılmaktadır (Vogel et al., 1996). Çalışılacak olan numune uygulanmadan önce mobil faz tankının kullanılacak çözücü buharıyla doymuş olması önemli bir etkidir (Fuchs et al., 2011). Örnek, kullanılan plakanın çözücüye değecek olan kenarından 1-2 cm mesafede, nokta halinde uygulanır. İşlemden en iyi verimin alınabilmesi için nokta minimum çapa sahip olmalıdır. Uygulamadan sonra örnek damlatılmış ve örneğin kurumuş olduğu plaka, mobil faz tankına, çözücünün ilerleyebileceği şekilde yerleştirilir. TLC işleminde yürütme, uygulanan numunenin durgun fazda, çözücü olarak adlandırılan hareketli bir faz yardımıyla taşınması işlemidir. Hareketli faz olarak kullanılan çözücü, madde örneğinin uygulandığı noktadan geçerken örneği çözerek, plakanın üst kısmına doğru taşır. Hareketli faz olan çözücü, plaka uzunluğunun en az yarısını geçtikten sonra mobil fazın olduğu kaptan çıkartılarak kurumaya bırakılır. Kuruyan plaka üzerindeki analitlerin belirlenmesinde çeşitli yöntemler vardır. Bunlar floresans sayımı, UV, radyoaktivite sayımı gibi

metotlardır. Bu metotların kullanılmasıyla elde edilen değerlerden Relatif Front (R_f) değerinin bulunması TLC yönteminin ana hedefidir. R_f değeri bulunurken çözücü içinde çözülmüş örneğin yürüdüğü mesafenin, sadece çözücünün yürüdüğü mesafeye oranı olarak tespit edilmektedir (Fuchs et al., 2011; Kucharska and Grabka, 2010; Wicha-Komsta and Komsta, 2017). Eğer kullanılan örnek radyoışaretle bileşiklerin kalite kontrolü için yapılan uygulamalardaki örneklerde ise izlenen prosedür TLC yöntemi ile aynı şekilde uygulanmaktadır. Radyoaktif bir bileşen içeren maddelerin kalite kontrolü bu yöntemle uygun radyoaktivite dedektörünün eklenmesi ile yapılmaktaysa, TLRC olarak adlandırılmaktadır. Tez çalışmamızda ise TLC metodu için UV sayımı, TLRC metodu kullanılan çalışmalarda ise radyoaktivite sayım metodu uygulaması Bioscan TLRC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.22. Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC/ MS)

Kimya alanında kullanılan temel ayırma tekniklerinden biri sıvı kromatografisi (LC) tekniğidir. LC ayırma tekniği küçük moleküllü ilaç metabolitlerinden, peptid ve proteinlere kadar geniş bir ölçekte organik bileşiklerin ayrımını yapabilmeye imkân sağlamaktadır (Kruve et al., 2015). Spektroskopi ise kimya alanında sıkça kullanılan ve elektromanyetik ışımının belli bir alanında, farklı dalga boylarında verdiği etkileşimlerle ilgilenen bir alandır. Özellikle de kütle spektrometresi (MS), manyetik veya elektriksel alanda hareket eden iyonik yapıları kütle/yük oranlarına göre ayırarak analiz eder. MS çalışmalarda üç boyutlu veri elde edilmesine imkân tanımaktadır. MS çalışmaları LC analizlerinin spesifite ve güvenilirliğini artırmakla beraber MS'ler de elde edilen sinyal şiddetine ek olarak numunenin molekül ağırlığı, yapısı ve saflığı hakkında bilgi sağlamakta, ayrıca çalışmalarda niceleyici ve niteleyici analize olarak tanımaktadır (Himmelsbach, 2012). Çalışma prensiplerine göre sistemler incelendiğinde LC'de örnekler hareketli bir faz ile bir kolonda bulunan durgun fazın farklı etkileşimlere girerek kolon içerisinde uygulanan örneğin kendine özgü bir hızla ilerlemesi ve kolunu terk etme zamanlarına göre dedekte edilme prensibine göre çalışmaktadır. MS'de ise incelenecek molekül sistem içerisinde öncelikle parçalanmakta, parçalanmış yapılar manyetik ve elektriksel alanlarda ayrılmaktadır. Bu sistemden elde edilen veriler molekül yapısının ortaya

çıkarılmasına imkân sağlamaktadır. Sistem içerisinde incelenen molekülün aynı koşullar altında aynı sonuçları vermesinin sebebi ise analizlenen molekülün daima aynı davranışı göstererek parçalanmasından dolayıdır. Modern kütle spektroskopisi, çalışmalarda yüksek kütle dağılımı ve doğru analize imkân tanıyan sistemlerdendir. Sistemde hareketli ve yüklü parçacıklar kütle/yük (m/z) oranlarına göre hızla ayrılmakta ve iyonların çoğu tek yüklü olduğundan bu oran iyonun kütlesi olarak ifade edilmektedir (Himmelsbach, 2012; Kruve et al., 2015). LC ve MS sistemlerinin birleştirilmesiyle oluşturulan LC-MS sistemleri ise az uçucu ve uçucu olmayan bileşenler içeren numunelerin incelenmesine imkân sağlamaktadır. LC ve MS sistemleri birbirlerine çeşitli arayüzler aracılığıyla bağlanmakta ve bileşik bir sistem oluşturmaktadır. LC-MS sistemlerinde incelenecek örnek öncelikle sıvı kromatografisi ile bileşenlerine ayrılır. Ayrılma işlemine müteakip örnekler kütle spektrometresine verilir. Sistemde verilen her bileşen nicel ve/veya nitel olarak tespit edilmektedir. Oluşan veriler ışığında detaylı analizler yapılabilmektedir (Himmelsbach, 2012; Igarashi et al., 2003; Kruve et al., 2015).

2.23. Fourier Dönüşüm Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Spektroskopik yöntemler organik moleküller tarafından elektromanyetik ışımanın soğurulması, moleküldeki atomların türü, düzeni, moleküllerin şekli, büyüklüğü gibi parametrelere bağlı olduğundan, organik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerine, organik yapıların stereokimyasal özelliklerinin bulunması ve saflık kontrolü vb. çalışmaların yapılmasına imkan tanımaktadır. Moleküler açıdan incelendiğinde ise kovalent bağlarla bağlı atomların çekirdekleri titreşim ve salınım yapmaktadır (Fessenden et al., 1990, Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014). Kovalent bağlı moleküller için geçişler yalnız elektronik değil, bir titreşim ve dönme seviyesinden diğer bir titreşim ve dönme seviyesine de gerçekleşebilmektedir. Özellikle bir seviyeden diğer seviyeye yapılan geçişlerin enerjisi elektronik geçişlerin enerjisinden daha düşüktür. Ortaya çıkan ısıma enerjisi ise bu geçişe yakın kızıl ötesi (IR) bölgelerine karşılık gelmektedir (Erdik vd., 2000). Kovalent bağlı moleküllerdeki bağların titreşim hareketleri sabit veya belirli enerji seviyelerinde meydana gelmektedir. Özellikle belirli bir bağ türünün belli bir dalga boyunu soğurması molekülün temel hal ve uyarılmış hal arasındaki

enerji farkına bağılı bir özelliktir. Bu durumdan kaynaklı olarak farklı bağ türleri, farklı karakteristik dalga boylarında IR ışıını soğurmaktadır. Belirli bir bağ birden fazla dalga boyunda enerji soğurabilir. Çünkü bir moleküldeki bir bağ farklı salınımlar ve titreşimler gösterebilmektedir (Fessenden et al., 1990). Kızılötesi spektrofotometrelerinin (IR) çalışması bağların dalga boyuna veya dalga sayısına (cm^{-1}) karşı absorpsiyonu ya da yüzde geçirgenliğini kaydetmesi prensibine göre gerçekleşmektedir ve organik veya inorganik bileşiklerin karakterize edilmesinde kullanılır. Her molekülün tıpkı bir parmak izi gibi kendine has bir spektrumu bulunmaktadır. IR spektrumunda da örneği oluşturan atomlar arasındaki bağların titreşimiyle oluşan frekanslarına karşılık gelen absorpsiyon pikleri, maddenin sahip olduğu parmak izini gösteren spektruma karşılık gelmektedir. Modern IR düzeneklerinde hızlı bir Fourier analizi uygulanan sistemlere ise FTIR adı verilmektedir (Fessenden et al., 1990). Organik maddelerin katı, sıvı veya gaz hallerindeki örneklerinden FTIR spektrumları alınabilir. Ancak sistem içerisinde genellikle katı örnekler tercih edilmektedir. Örneğin suyun 3700 cm^{-1} seviyesindeki absorpsiyonu ortaya çıkmakta bu nedenle de kullanılan örneklerin kuru olması istenmektedir (Erdik vd., 2000). FTIR analizleri grafiklerle desteklenerek spektral veri analizi yapılmasına imkân tanımaktadır. Yapılan araştırmalarda kızılötesi spektrumları detaylı bir şekilde incelendiğinde moleküllerdeki her bir işlevsel grup için soğurma dalga boylarının tipik aralıklarının belirlendiği görülmektedir. Yapılan diğer araştırmalarda kullanılmak üzere bu bilgilerin özeti halinde korelasyon şemaları oluşturulmuştur. Şemalar elde edilen spektrumların yorumlanmasında kullanılmaktadır. Şemalar incelendiğinde spektrumlardaki 1400 cm^{-1} ile 4000 cm^{-1} 'e kadar olan bölgelerdeki gerilme bandına sahip bölgeler ön plana çıkmaktadır. Diğer bölgeler örneğin 1400 cm^{-1} altında kalan gerilme bandına sahip bölge hem gerilme hem de eğilme modlarının soğurulmasını içerdiğinden karışık bir bölgedir. Bu yüzden bu bölgelerdeki spektrumlar incelendiğinde sağlıklı bir korelasyon yapmak ve analizi doğru değerlendirmek zorlaşmaktadır. 2000 cm^{-1} bandından sonra gelen kısımlar ise organik maddeler baz alındığında daha ayrıntılı olarak ele alınmaktadır. Bu bölge aynı zamanda parmak izi bölgesi olarak da adlandırılmakta ve elde edilen spektrumlar iki kat genişletilerek incelenmektedir. Bu durum madde hakkında daha detaylı bilgi edinilmesine olanak sağlamaktadır. Parmak izi bölgesi diye adlandırılan bu bölgede organik bileşikler kendilerine özgün soğurma bandı

oluşturmakta ve spektrumun 1400 cm^{-1} üzerindeki bölgede benzer olduğu durumlarda ise aynı bileşiğe ait olup olmadığı parmak izi bölgesine bakılarak tespit edilmektedir (Büyüksırt ve Kuleaşan, 2014; Zhou et al., 2013; Fessenden et al., 1990).

2.24. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Organik moleküllerin farklı işlevsel gruplarının tespiti kızılötesi spektrum analizleri ile yapılırken, molekülün hidrokarbon kısmına ilişkin bilgiler Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ile elde edilmektedir. NMR, 1944 yılında yapmış olduğu buluşuyla da Nobel ödülü alan Isidor RABI tarafından 1938 yılında nükleer ışınların ölçümde kullanılmıştır. NMR'ın keşfi aynı zamanda Edward Mills Purcell'in II. Dünya Savaşı sırasında, Massachusetts Enstitüsü, Teknoloji Radyasyon Laboratuvarı'nda radar gelişimi üzerine yapmış olduğu radyo frekansı absorpsiyonu, radyo frekanslarının üretimi ve geliştirilmesi gibi çalışmaların yapılmasına imkan sağlamıştır. NMR çalışmaları bunun yanında analitik kimya ve biyokimyanın gelişiminde, ileri elektronik ve elektromanyetik teknolojinin geliştirilmesinde önemli katkılar sağlamaktadır (Silverstein et al., 1991). NMR spektroskopisinin çalışma prensibi, organik moleküllerdeki belirli çekirdeklerin kuvvetli bir manyetik alanda iken radyo frekans bölgesinde elektromanyetik ışınım soğuran ve paralelden anti-paralel spin durumuna geçen çekirdeklerin radyo dalgalarını soğurmasına dayanmaktadır. Bu süreçte sistemdeki bir protonun dış manyetik alan şiddeti ve radyo frekansı nedeniyle protonun paralelden anti paralele dönmesine sebep olduğu durumda proton rezonans durumudur. Manyetik alandaki rezonans halinde bulunan çekirdekler NMR terimi ile ifade edilmektedir. NMR sistemlerinde sisteme uygulanan dış manyetik alan uygulanan örnek molekülün bağlarında indüklenmeye dayalı küçük manyetik alanların oluşmasına neden olmaktadır (Talebpour et al., 2004). Ancak bu durumun risk taşıyan bir yönü de olabilmektedir. Örneğin indüklenmiş bir moleküler manyetik alan protonları perdeleme riski taşıyabilmektedir. Bu durum soğurma bandında bir kimyasal kaymaya neden olabilmektedir. İşte bu perdeleme ve perdelenme terimlerinin kantitatif ölçümleri için bir referans noktasına ihtiyaç duyulmuştur. İhtiyaç duyulan referans nokta ise tetrametilsilan (TMS) olarak seçilmiştir. Oluşan kimyasal kaymanın tespiti TMS soğurma konumu ile belirli bir

protonun soğurması arasındaki farkın bulunmasına dayalı olarak yapılmaktadır. Sistemde uygulanan radyo frekansın milyonda biri olan kayma değeri δ değerleri şeklinde gösterilmekte ve ppm birimiyle ifade edilmektedir. Organik kimya içerisinde nükleer spine sahip en önemli iki izotop bulunmaktadır. Bunlar ^1H (Hidrojen-1) ve ^{13}C (Karbon-13) izotoplarıdır. Farklı izotopların kullanılmasıyla her izotop için ayrı tiplerde NMR spektrumlarının alınması gerekmektedir (Fessenden et al., 1990). Bunlardan ^1H -NMR spektroskopisi bir organik molekülün içerisindeki hidrojen atomları hakkında yapısal bilgi vermektedir. ^1H -NMR spektroskopisinde hidrojenin % 99.99 bulunma oranındaki ^1H izotopu kullanılmaktadır. Karbon-13 (^{13}C -NMR) spektroskopisinde ise bir organik moleküldeki karbonlar hakkında yapısal bilgi vermektedir. Burada ise ^{13}C izotopu doğal olarak oluşan karbon atomlarının % 1,1'ine tekabül etmektedir. ^1H -NMR ile ^{13}C -NMR arasındaki bir diğer fark ise enerji geçişleri ile ilgilidir. Çünkü C-13 izotopunun çekirdeğinin paralel spinden anti paralel spine geçişi düşük enerjili bir geçiştir. Bu sebeple de ^{13}C -NMR spektrumlarının tespiti için ^1H -NMR spektrumlarına nazaran çok daha duyarlılığı yüksek spektrometrelere ihtiyaç vardır (Talebpour et al., 2004; Trapani et al., 2017).

2.25. Dinamik Işık Saçılımı (DLS) Analizi

Hareketli sıvı veya gaz atomlarının, sıvı veya gaz ortamda asılı bir halde bulunan herhangi bir parçacığa çarpması Brownian hareketi olarak adlandırılan rastgele hareketlerin oluşmasına sebep olur. Bu harekete sahip olan parçacık ile çözücü moleküller arasında bir elektriksel çift tabaka oluşmaktadır. Bunun nedeni parçacığın içinde bulunduğu çözücü moleküller içerisinde hareket ederken iyonik güç etkisiyle etkileşimidir. Bu etkileşim sonucunda oluşan elektriksel çift tabaka ile parçacığın hidrodinamik çapı ortaya çıkmaktadır (Harada and Asakura, 1998). Temel olarak bakıldığında hidrodinamik çap parçacığın bulunduğu çözücü ortamda oluşan elektriksel çift tabakanın kalınlığının $(1/K)$ parçacığının çapına eklenmiş hali olarak tanımlanmaktadır. Çözücü içindeki parçacık etrafında oluşan elektriksel çift tabaka ile hareket etmektedir. DLS tekniği kullanılarak yapılan parçacık boyutu ölçümü sonrasında parçacığın çözücü ortam içerisindeki boyutu ise Zeta boyutunu ifade etmektedir. DLS tekniği ile yapılan ölçümler bir parçacığın bir sıvı içerisindeki hareketini temsil ettiğinden önemli bir analiz

olarak değerlendirilmektedir. Literatürde de sentezlenen parçacıkların uygulanan ortamlardaki davranışlarının incelendiği çalışmalarda mevcuttur. (Nobbman et al., 2007; Pereira et al., 2008; Yang et al., 2011). DLS tekniği ile yapılan ölçümlerde kullanılan sistemlerin çalışma prensibi; parçacıklara lazer ışığı gönderilmesi sonucu oluşan titreşimlerin dedeksiyonuna dayanmaktadır. Sistemde yapılan dedeksiyon sonucunda difüzyon katsayısı olarak da tanımlanan Brownian hareketinin hızı ölçülerek belirli denklemler aracılığıyla parçacığın hidrodinamik çapı tespit edilebilmektedir. Brownian hareketinde iki önemli parametre ön plana çıkmaktadır. Bunlar sıcaklık ve viskozitedir. Burada parçacık boyutu arttıkça Brownian hareketi yavaşlarken, sıcaklık yükseldikçe hareket hızlanmaktadır. Özellikle iyonik şiddeti güçlü olan ortamlarda hidrodinamik çap küçülmekte ve parçacık daha hızlı hareket etmektedir (Arzen et al., 2010; Harada and Asakura, 1998; Andrieux and Couvreur, 2009; Jena, 2011).

2.26. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Çıplak gözle görülemeyecek kadar küçük cisimlerin görüntülenmesi amacıyla optik sistemler geliştirilmiştir. Bu sistemlerde kullanılan öncelikli araçlar merceklerdir. Fakat bu sistemlerin de büyütme oranları sınırlıdır. Bu sebeple araştırmacılar optik ve elektronik sistemlerin birlikte kullanıldığı, yüksek büyütme oranları çerçevesinde yürütülen işlem ve analizlerin yapılabilirdiği, çözünürlüğü iyi görüntülerin elde edildiği yeni sistemler geliştirmişlerdir. Elektronik ve optik sistemlerin bir arada kullanıldığı sistemler elektroskoptik sistem olarak adlandırılmaktadır. Elektroskoptik prensipler çerçevesinde tasarlanan sistemlerin başında da taramalı elektron mikroskobu (SEM) gelmektedir (Santra and Ott, 2015). SEM sisteminde ana prensip yüksek voltaj uygulanarak hızlandırılmış elektronların incelenen örnek üzerine odaklanmasıdır. Elde edilecek görüntü ise elde edilen elektron demetinin örneğin yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve örneğe ait atomlar arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin sistemdeki algılayıcılar tarafından toplanması, sinyal güçlendiricileri yardımıyla güçlendirilmesi ve bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla oluşmaktadır. Günümüzde kullanılan en modern sistemlerde ise algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilerek bilgisayar ortamına aktarılarak kullanılmaktadır (Zhou and Wang, 2006). SEM

sistemi ilk kez 1965 yılında kullanılmaya başlanmıştır. Ayırım gücü, odak derinliği, görüntü ve analiz birleştirme özellikleri SEM'in mikro elektronikte, sanayinin değişik kollarında, biyoloji bilimlerinde, tıp ve kriminal uygulamalarda olmak üzere çok geniş bir kullanım alanına sahip olmasına imkân tanımaktadır. SEM sistemlerinde optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısmı bulunmaktadır (Santra and Ott, 2015; Timmermans and Otto, 2015). SEM sistemleri mikro yapıların morfolojisi ve kimyasal kompozisyon karakterizasyonlarının incelenmesi ve analizi için kullanılmakta ve elde edilen SEM görüntülerinden uygulanan örneğin topografisi, morfolojisi, şekli, boyutu, bileşim ve kristalografik bilgileri gibi önemli bilgilerin elde edilebilmesine imkân tanımaktadır (Mamun et al., 2014; Santra and Ott, 2015; Timmermans and Otto, 2015; Wang et al., 2014b).

2.27. *In Vitro* Çalışmalar

Hücre kültürü çalışmaları son yıllarda ilaç geliştirme araştırmalarında sıkça başvurulmuş, çok hücreli ökaryotlardan elde edilen hücre gruplarıyla, optimum koşullarda gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalar bütünüdür (Al-Sharif et al., 2013; Alberio et al., 2012; Freshney, 2006). Hücreler genellikle hayvanlardan elde edilirken bitkilerden, mantarlardan, virüslerden, bakteri ve protistalardan da elde edilebilmektedir. Hücre kültürü çalışmalarının *in vivo* çalışmalara nazaran daha tercih edilebilir olmasının nedeni kolay ve ucuz bir şekilde çalışılmasına imkan sağlamasıdır. Bu çalışmalarda monoklonal antikor üretimi, aşı üretimi, protein sentezi, enzim ve hormon üretimi, genetik analiz, hücreler arası etkileşim, hücre popülasyon kinetiği, embriyonik çalışmalar, intraselüler aktivite, enerji metabolizması, DNA replikasyonu ve transkripsiyonu gibi çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Canlılardan elde edilen hücreler, tabanları hücrelerin tutunmasını sağlamak amacıyla polimerle kaplanmış, flask adı verilen kaplarda çoğaltılır ve -80 °C'de dondurularak saklanır (Freshney, 2006). *In vitro* olarak kullanılan hücre modelleri toksisite testleri, kanser araştırmaları, viroloji, genetik mühendisliği, gen terapi, ilaç geliştirme/izleme, aşı/hormon v.b. üretimi gibi çeşitli ve önemli alanlarda kullanılmaktadır (Freshney, 2006). Parkinson hastalığı üzerine yapılan incelemelerde de sıklıkla dopaminerjik nöronların özelliklerini gösteren hücre

kültürleri hazırlanmakta ve kullanılmaktadır (Alberio et al., 2012; Mamun et al., 2014; Stahl et al., 2011; Xia et al., 2016; Zhou et al., 2016).

2.27.1. Hücre Kültürü için Optimum Koşullar

Hücre kültürünün sağlıklı bir şekilde yürütülebilmesi için optimum koşullar gereklidir. Bunlar pH aralığı, nem miktarı, sıcaklık, kontaminasyonun engellenmesi şeklinde özetlenebilir (Microspheres et al., 2012). Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan optimum pH aralığı 7.2-7.4 aralığıdır. Çünkü kültür içerisinde pH bazik olduğunda hücreler birkaç saatten fazla yaşayamazken, asidik olması durumunda ise hücreler bölünmeyi bırakabilmektedir. İkinci olarak hücre kültüründeki nem oranı % 90-95 lik atmosfer nemi oranında devamlı olarak sağlanmalıdır. Çünkü hücrelerdeki su kaybı sebebiyle ortaya çıkacak iyon konsantrasyonu değişimleri hücre kültürünün yürütülmesinde büyük bir engeldir. Diğer bir parametre ise çevresel ısıdır. Kültür içerisindeki hücrelerin üremesi ve gelişmesi için, canlı ortam sıcaklığına eşdeğer olan 37-37,5 °C'lik bir çevre sıcaklığına sahip olunması gerekmektedir. Sıcaklık değişimleri ± 0.25 °C'den fazla olmamalıdır. Çünkü sıcaklık artışı hücreler için öldürücü sınıra ulaşması durumunda, hücrenin bölünme hızında artış kaydedilmektedir. Tam tersi sıcaklığın düşmesi durumunda ise hücre metabolizması yavaşlamakta; ancak hasar verici etkisi bulunmamaktadır. İki durumda da kültürün gelişimi olumsuz etkilenmektedir (Arora, 2013). Ele alınacak son risk ise kontaminasyon riskidir. Hücre kültüründe bulunan hücreler *in vivo* koşullardaki bağışıklık sistemine sahip olmadığından enfeksiyon oluşma riskine açıktır. Bu riski minimize etmek amacıyla antibiyotikler kullanılmaktadır (Denora et al., 2017; Trapani et al., 2017). Ancak antibiyotiklerin profilaktik olarak kullanıldığı dozlarda hücreler üzerinde istenmeyen etkiler de oluşabilmektedir. Kontaminasyonu önlemek için, kültürde steril haldeki malzemeler ile steril bir ortamda çalışılmak gerekmektedir (Freshney, 2006).

2.27.2. Sitotoksosite

Toksosite esas olarak herhangi bir maddenin insan, hayvan, bitki ya da bakteri gibi bir organizmaya zarar verebilme derecesini gösteren bir olgudur.

Uygulanan madde söz konusu organizmanın tamamına etki edebilir veya spesifik hücre ya da organlarına toksik etki gösterebilir. Etkilenen yapıya göre bakıldığında maddenin hücreye toksik olma derecesine sitotoksosite, bir organa toksik olma derecesine ise hepatotoksosite denilmektedir. Toksik maddeler yapılarına göre sınıflandırıldığında kimyasal ve biyolojik olarak gruplanabilir. Kimyasal toksik maddelere örnek olarak; civa, asbest, kurşun, hidroflorik asit, klor gazı, metil alkol gibi organik kökenli kimyasallar ile rotenone gibi canlı zehirleri verilebilir. Biyolojik toksik maddelere ise örnek verilecek olduğunda canlı organizmalarda enfeksiyonlara sebep olan bakteri ve virüsler ön plana çıkmaktadır (Skehan et al., 1990). Hücre çalışmalarında sitotoksosite tespiti çalışmalarda kullanılan maddelerin kullanılabilirliği için en önemli parametrelerden biridir (Han et al., 2014; Rudyanto et al., 2015).

2.28. Parkinson Hastalığına Yönelik Araştırmalarda Kullanılan Deneysel Modeller

Literatür incelendiğinde PH için çeşitli deneysel hayvan modeli kullanılan birçok çalışmaya rastlanmaktadır (Huang et al., 2015; Imai et al., 2012; Makav, 2018; Morales et al., 2015; Wrangel et al., 2015). Kullanılan bu modeller genetik ve toksik modeller olarak iki ana kısımda incelenmektedir (Blesa and Przedborski, 2014). Ancak PH için çalışmalarda daha çok toksik modeller ön plana çıkmaktadır. Toksik modeller içerisinde 6-Hidroksidopamin (6-OHDA), 1-Metil-4-Fenil-1,2,3,6-Tetrahidropiridin (MPTP), Rotenon, Parakuat, Manabe, Metamfetamin ve üç-nitrotirosin modelleri sıklıkla çalışmalarda kullanılan modellerdendir (Makav, 2018).

2.28.1. Sterotaksik Girişim

Sterotaksik kelimesi Yunanca'daki üç boyutlu anlamındaki stereo ve Latince'deki dokunmak anlamındaki tactic kelimelerinin bir araya getirilmesiyle ortaya çıkmıştır. Stereotaksik cerrahi girişimin çalışma prensibi intrakranyal yapıların beyin atlasları yardımıyla verilen koordinatlara göre uzaysal yerleşiminin belirlenerek cerrahi aletlere rehberlik edilmesine dayanmaktadır. Bu prensibe dayanılarak sterotaksik cihazı 1906 yılında Robert Henry Clarke ve

Victor Horsley tarafından geliştirilmiştir (Fornari et al., 2012). Zaman içerisinde yapılan görüntüleme çalışmalarından ve stereotaksik cerrahi girişimlerden elde edilen intrakranyal yapılara ait koordinat sistemleri çeşitli parametrelere uyarlanarak deney hayvanlarına (sıçan, fare, maymun vb.) ait beyin atlasları geliştirilmiştir (Paxinos and Watson, 2007). Atlasların kullanılmasıyla uygulama yapılacak hedef yapının koordinatları tespit edilmektedir. Buradan yola çıkılarak sistemde referans kabul edilen bregma gibi yapılar baz alınarak koordinatlara göre uygulama yapılacak nokta tespit edilebilmektedir. Sterotaksik girişimin zaman içerisinde teknoloji ile beraber ilerlediği de gözlenmektedir. Bu tekniğin 1947’de klinik nöroşirürjide kullanılmaya başlamasıyla beraber, ilerleyen süreçte bilgisayar yazılımları ile entegre edildiği böylelikle yapılan cerrahi işlemlerde hassasiyet ve tanısız değer artışının sağlandığı görülmüştür. Sterotaksik girişimin çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bunlar düşük komplikasyon oranı, hasta uyum oranının yüksekliği ve düşük mortalite oranı şeklinde ifade edilebilir (Fornari et al., 2012).

2.28.2. Rotenone Kullanılarak Oluşturulan Deneysel Modeller

Parkinson modeli oluşturmada bir nörotoksin olan rotenone herbisitinin kullanılmasıyla ilgili literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur (Blesa and Przedborski, 2014; Erbaş et al., 2016; Erbaş et al., 2015; Imai et al., 2012; Makav, 2018; Terzi et al., 2004; Wrangel et al., 2015). *In vivo* deneysel çalışmalarda rotenone uygulamalarından sonra Parkinson hastalığı patolojisinde bulunan özelliklerin birçoğu ortaya çıkmaktadır. Örneğin reaktif oksijen türü üretimi, sistemik mitokondriyal bozulma, mikrogial aktivasyon, α -sinüklein fosforilasyonu, agregasyon ve Lewy patolojisi, seçici nigrostriatal dopaminerjik dejenerasyon, ubiquitin-proteazomal disfonksiyon ve Parkinson hastalığında kullanılan Levodopa (L-DOPA) bileşiğine yanıt veren motor defisitleri, tirozin hidroksilaz imünoreaktivitesinin tükenmesi, oksidatif hasar gibi birçok belirti görülebilmektedir (Drechsel and Patel 2008, Cicchetti et. al. 2009, Norazit et. al. 2010, Bové and Perier 2012). Yukarıda örnek olarak verilen bulguların ortaya çıkması rotenonun deneysel Parkinson modeli oluşturmada etkin bir nörotoksin olduğunu göstermektedir. Rotenonun lipofilitesi incelendiğinde lipofilik özellik gösterdiği böylelikle kan beyin bariyerini rahatlıkla geçebildiği bilinmektedir

(Makav, 2018). Rotenone'nun hücre içerisindeki ana etkisi mitokondri içerisinde birikerek elektron taşıma zincirinin kompleks-I ünitesini bloklamasıdır. Bu etki sayesinde nigrostriatal dopaminerjik nöronların dejenere olduğu bildirilmiştir (Dauer and Przedborski 2003, Blandini and Armentero 2012). Yapılan uygulamalarda deneysel modellerde ortaya çıkan davranışsal değişimler Parkinson modeli oluşturmada etkin olduğunu ispatlar niteliktedir. Bu davranışsal değişiklikler hipokinezi (anormal derecede hareketlilik düşüklüğü), fleksiyon, rijidite ve tremor gibi Parkinson Hastalığının temel motor semptomlarına benzerlik göstermektedir (Betarbet et. al.,2000; Sherer et. al, 2003; Makav, 2018). Rotenone kullanılarak elde edilen *in vivo* modellerler, diğer modellerle kıyaslandığında çeşitli avantajlar göstermektedir. Örneğin toksin modellerinin çoğu dopaminerjik nöronlarının akut hasar görmesine neden olurken, rotenon kullanılarak elde edilen modellerde aynen Parkinson hastalarında görülen kronik ilerlemeyi taklit eden semptomlar gösterdiği belirtilmektedir. Ayrıca sistemik mitokondriyal inhibisyon ve nigrostriatal dejenerasyon oluşturmada, PH'nın patolojisinde ve klinik bulgularında bir araya gelen çeşitli moleküler ve biyokimyasal süreçlerin incelenmesine imkan vermesi de çalışmalarda tercih edilme sebeplerinden biridir (Wrangel et al., 2015). Parkinson modeli oluşturmada rotenone uygulama modelleri çalışmaların amacına göre çeşitlilik gösterebilmektedir. Bunlar arasında intravenöz, intraperitoneal veya subkutan olarak günlük enjeksiyonlar yapılması (Fleming et.al., 2004; Cannon et. al., 2009), intranasal uygulamalar (Sasajima et al., 2015), oral uygulamalar (Liu et al., 2017), intragastrik uygulamalar (Pan-Montojo et. al., 2010) veya doğrudan beyne stereotaksik girişimle enjeksiyon veya infüzyonu uygulamaları (Alam et al., 2004; Xiong et al., 2009) sayılabilir. Tez çalışmamızda da stereotaksik girişimle rotenone enjeksiyonu yapılarak deneysel model hazırlanmıştır.

3- MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kullanılan Kimyasallar ve Reaktifler

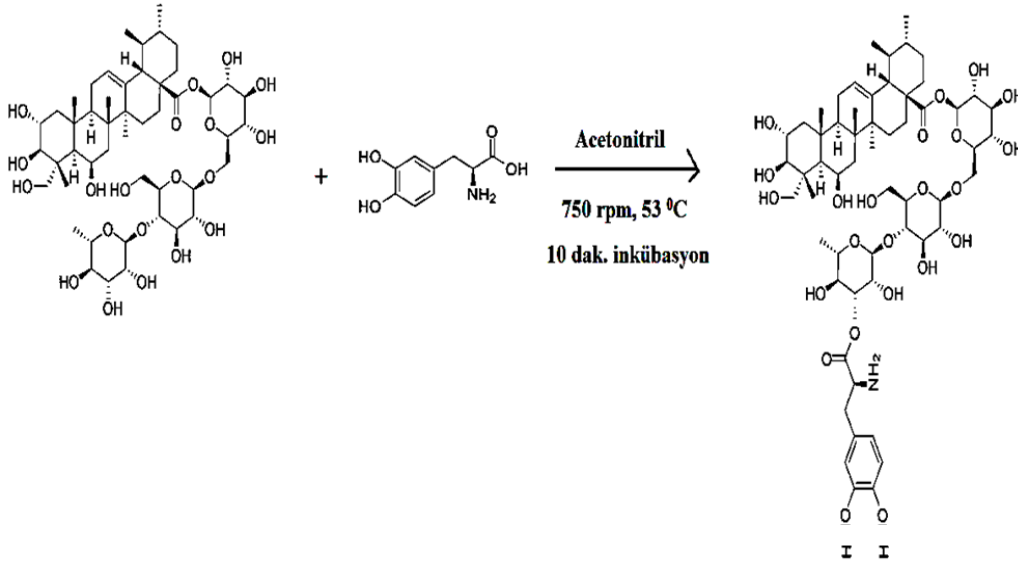
Madecassoside From Centella Asiatica (Sigma), L-3,4-Dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) (Sigma), Na^{99m}TcO₄ (MON. TEK. ⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratörü), (Asetonitril (Merck), İnce Tabaka Kromatografi kağıdı ITLC-Selüloz/Slica, Etanol (Merck), Asetonitril (Merck), n-oktanol (Merck), n-bütanol (Merck), Metanol (Merck), izopropil alkol (Merck), Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Bio.Ind.), Dulbecco's MEM (Bio.Ind.), RPMI 1640 Medium (Bio. Ind), L-Glutamine (Bio.Ind.), Sodyum bikarbonat (Bio.Ind.), Essential amino acid (Bio.Ind.), Sodyum piruvat (Bio.Ind.), Fetal bovine serum (Bio.Ind.), Penisilin/streptomisin (Bio.Ind.), Tripan mavisi (Bio.Ind.), PBS (Bio.Ind.), Tripsin EDTA (Bio.Ind.), Rotenone (Sigma), Dimetil Sülfoksit (DMSO) (Sigma).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar

TLRC scanner (Bioscan AR2000, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), HPLC sistemi (Shimadzu, LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörlü, Vorteks cihazı (Ika), hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C). Vorteks cihazı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C), Sıvı Sintilasyon dedektörü (Packard Tri-carb-1200, Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü), CO₂ inkübatörü (Sanyo-MCO-20AIC CO₂, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), İnvert Mikroskop (Leica Dm1 Trinokuler, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Laminar Flow Kabin (Nüve-LN-120, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Soğutmalı santrifüj (Hettich Marka Rotina 38 R Model, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Spektrofotometre (Thermo Varioscan, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), stereotaksi cihazı (Model 900 Small Animal Stereotaxic Instrument, DavidKopf Instruments).

3.2. MA-L-DOPA Sentezi

MA ve L-DOPA'nın moleköl yapıları incelendiğinde teorik olarak konjugasyonun esterleşme reaksiyonu ile gerçekleşeceği öngörülmüştür. Söz konusu esterleşme reaksiyonu Şenocak'ın (2010) çalışmasından yararlanarak ve koşullar optimize edilerek gerçekleştirilmiştir. Buna göre konjugasyon çalışması kapsamında $2,5 \times 10^{-3}$ mmol (2,5 mg) MA ile $2,5 \times 10^{-3}$ mmol (0,5 mg) L-DOPA bir tüpe alınıp üzerine çözücü olarak 5 mL asetonitril eklenmiştir. Ekleme sonrası karışım vortekslenerek gözlem yapılmış ve çözünmenin gerçekleştiği gözlenmiştir. Elde edilen konjugat (MA-L-DOPA) manyetik karıştırıcıda 750 rpm ve 53 °C'de 10 dakika süresince karıştırılmıştır. 10 dakikalık süreç sonucunda çözelti içerisinde beyaz renkli çökeltiler gözlenmiştir (Şekil 3.1). Oluşan çökeltiliyi ayırmak için 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj yapılmış ve üst faz pipet yardımıyla ayrılmıştır. Üst ve alt fazı içeren her iki tüp etüve konularak asetonitril uçurulmuştur.



Şekil 3.1. MA-L-DOPA Sentezi.

3.3. Yapı Tayini Yöntemleri

Çalışmada elde edilen sentez ürününün (MA-L-DOPA) kimyasal yapısının aydınlatılması için Erime Noktası Tayini, Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR), Sıvı Kromatografi /Kütle Spektrometresi (LC/MS), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) spektrumları alınmıştır. Nükleer Manyetik

Rezonans (^1H -NMR) ve LC-MS/MS analizleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında, Erime Noktası Tayini ve FTIR analizleri ise Afyon Kocatepe Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sentez ürününe yönelik beklenen teorik NMR spektrumları ACD bilgisayar programı kullanılarak oluşturulmuş ve deneysel NMR spektrumları ile kıyaslanmıştır. Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim dalına ait laboratuvarlarda ise TLC ve HPLC analizleri yapılmıştır.

3.3.1. Erime Noktası Tayini

MA-L-DOPA bileşiğinin E.N. tayini Afyon Kocatepe Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Laboratuvarında (Electrothermal 9200) yapılmıştır. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA maddelerinden katı halde hazırlanan örnekleri cihaz için hazırlanan kapiler cam tüp içerisine yerleştirilerek E.N. cihazına konulmuştur. Artan sıcaklıkla beraber örneklerin faz veya rengindeki değişimler incelenerek kaydedilmiş ve örneklerin erime noktalarının tayin gerçekleştirilmiştir.

3.3.2. Fourier Transform Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi

MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait IR soğurma spektrumları da Afyon Kocatepe Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Laboratuvarında bulunan FTIR spektrofotometresi cihazından (Perkin Elmer Spectrum BX II) alınmıştır. Yapılan analiz için minimum parçacık boyutuna sahip potasyum bromür ile örneklerden ayrı ayrı homojen bir karışım oluşturularak örnek-KBr (MA-KBr, L-DOPA-KBr ve MA-L-DOPA-KBr) peletleri hazırlanmıştır. Cihaz içerisine yerleştirilen peletlerin ölçümü ile örneklerin 400 - 4000 cm^{-1} aralığında FTIR spektrumları elde edilmiştir.

3.3.3. Nükleer Manyetik Rezonans (^1H -NMR) Spektroskopisi

Sentezlenen MA-L-DOPA bileşiğinin yapısının aydınlatılması amacıyla MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşikleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarına gönderilerek ^1H -NMR (DMSO) spektrumları

alınmıştır. Ayrıca konjugat bileşiğine ilişkin beklenen teorik $^1\text{H-NMR}$ spektrumları ise ACD/LogP Algorithm bilgisayar programı kullanılarak oluşturulmuştur. Beklenen teorik $^1\text{H-NMR}$ spektrumları ile yapılan analiz sonucunda elde edilen spektrumlar karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve gerçekleştirilen sentez sonucu istenilen yapıya ulaşıp ulaşılmadığı değerlendirilmiştir.

3.3.4. Sıvı Kromatografi-Kütle Spektroskopi (LC-MS)

MA-L-DOPA bileşiğinin LC-MS analizi için örnekler Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarına gönderilmiştir. Analizler (Waters 2695 Alliance Micromass ZQ) marka LC/MS cihazıyla gerçekleştirilmiştir.

3.3.5. İnce Tabaka Kâğıt Kromatografisi (TLC)

TLC analizi Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim dalına ait laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. TLC analizi için MA ve L-DOPA maddeleri 1 mg/mL olacak şekilde metanol içinde çözülmüştür. MA-L-DOPA maddesi ise sentez ürünü az olduğundan 100 μL metanol içinde çözülmüştür. TLC analizi için 1,2 cm-10 cm ebatlarında silika jel TLC kağıtlar hazırlanmış ve TLC analizi için Metanol-Su (9:1) banyosu hazır hale getirilmiştir. Örnekler kâğıt uçlarından 0,5 cm uzağa her bir örnekten 2’şer adet olmak üzere 6 adet örnek damlatılmış, kağıtlar TLC tankına konulmuştur. TLC tankından çıkarılan kâğıtlar kurumaya bırakılmış ve kuruyan kâğıtlar UV lambası altında gözlenmiştir. Her bir örneğin Relative Front (R_f) değerleri hesaplanmıştır.

3.3.6. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizi

HPLC analizi Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim dalına ait kromatografi laboratuvarında bulunan ODS 5- μm C18 RP-C18 (250 x 4.6 mm I.D.) (GL Sciences Inc.) kolonu kullanılarak kolon fırını (Shimadzu CTO-10ASvp) ve düşük basınçlı dörtlü pompa üzerinde UV-VIS (SPD-10A/V) dedektörü, diyod array dedektörü (DAD) (Shimadzu SPD-M20A), fraksiyon kollektörü (FRC-10A) ile otomatik örnekleyici (SIL-20A HT)

içeren Shimadzu LC-10Atp (SPD-10AV) sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. HPLC analizi için koşullar C-18 kolon, 20:80 (v/v) metanol-su mobil faz, akış hızı 1mL/dk, dalga boyları (205 nm-280 nm) ve izleme süresi 45 dakika olacak şekilde koşullandırılmıştır. MA-L-DOPA molekülü 1 µL olacak şekilde enjeksiyon edilmiş, aynı koşullar altında MA ve L-DOPA moleküllerinden 3'er µL enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda örneklerin alıkonma zamanlarına ilişkin (R_t) değerleri belirlenmiştir.

3.4. Enkapsülasyon Çalışmaları

MA-PLGA sentezi için literatür taraması yapılmış olup, Peltonen ve arkadaşlarının (2002) yapmış oldukları çalışma optimize edilerek PLGA enkapsüle MA bileşiği (MA-PLGA) sentezlenmiştir. Buna göre enkapsülasyon için 10 mg PLGA üzerine 500 µL DMSO, 2 mg MA üzerine de 500 µL DMSO eklenmiştir. Elde edilen MA çözeltisi PLGA çözeltisi üzerine eklenmiş ve MA-PLGA çözeltisi bir enjektöre alınmıştır. Bir beher içerisine 10 mL saf su konularak manyetik karıştırıcıda girdap oluşacak şekilde oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Enjektör içindeki MA-PLGA çözeltisi damla damla karıştırıcıda bulunan saf suya eklenmiştir. Son çözelti 30 dakika boyunca manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. 30 dakika sonrasında çözelti 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek üst ve alt faz ayrılmıştır. Üst faz ve alt fazdan alınan örneklerin DLS analizi yapılmış ve SEM görüntüleri için örnekler alınmıştır. Aynı prosedür PLGA enkapsüle L-DOPA (L-DOPA-PLGA) ve PLGA enkapsüle MA-L-DOPA (MA-L-DOPA-PLGA) bileşikleri için de gerçekleştirilmiştir.

3.4.1. Zeta Parçacık Boyutu Tespiti

Zeta parçacık boyutu ölçümü MA-PLGA, L-DOPA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA nanokapsüllerin çözgen ortamındaki (30 µg/mL metanol içerisinde) Zetaparçacık boyut analizleri Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Nükleer Uygulamalar Anabilim dalına ait Malzem Zeta Sizer cihazı ile gerçekleştirilmiştir.

3.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin boyut ve yüzey özelliklerinin belirlenmesi amacıyla Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezinde bulunan Thermo Scientific Apreo S cihazı ile SEM görüntüleri alınmıştır. Bu analiz için PLGA sentezi sonucu üst ve alt fazdan alınan örnekler mikropipet yardımıyla alüminyum folyo plakalar üzerine damlatılmıştır. Plakalar üzerindeki DMSO ve su çözücüsünün uçması için örnekler etüve konmuştur. Ardından analiz için hazır olan örneğin SEM görüntüleri alınmıştır.

3.5. Radyoişaretleme Çalışmaları

^{99m}Tc radyoizotopu ile yapılan radyoişaretleme çalışmaları optimize edilerek gerçekleştirilmiştir. Optimizasyon çalışmaları kapsamında farklı pH (pH 3, 5, 7, 9, 12) değerleri denenmiştir. Ayrıca TLRC analizi için en uygun banyo türü de araştırılarak koşullar optimize edilmiştir. ^{99m}Tc radyoizotopu ile yapılan radyoişaretleme çalışmaları sırasında sodyum perteknetatın ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$; oksidasyon sayısı=7) indirgenmesi amacıyla taze kalay (II) klorür dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) stok çözeltisi (1 mg/ mL) hazırlanmıştır. Ayrıca radyoişaretleme sonrası ortamda indirgenmiş ^{99m}Tc 'nin olup olmadığını belirlemek için ayrı bir deney tüpüne sadece kalay klorür çözeltisi (1 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 1 mL H_2O) ve $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ eklenerek indirgenmiş ^{99m}Tc hazırlanmış ve kalite kontrol çalışmaları yapılmıştır.

3.5.1. MA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

MA bileşiği 1 mg/mL olacak şekilde saf su içinde çözülmüştür. 25 µg MA, 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi bir ependorfa konularak, 0,1 M NaOH ile pH değeri 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi ^{99m}Tc (22.2 MBq) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretleli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.5.2. L-DOPA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

L-DOPA bileşiği 1 mg/mL olacak şekilde saf su içinde çözülmüştür. 25 µg L-DOPA, 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi bir ependorfa konularak, 0,1 M NaOH ile pH değeri 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi ^{99m}Tc (22.2 MBq) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.5.3. MA-L-DOPA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

MA-L-DOPA bileşiği 1 mg/mL olacak şekilde saf su içinde çözülmüştür. 15 µg MA-L-DOPA, 35 µL distile H_2O , 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi bir ependorfa konularak, 0,3 M NaOH ile pH değeri 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi (22.2 MBq) ^{99m}Tc eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.5.4. MA-PLGA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

1 mg/mL MA-PLGA bileşiği DMSO içinde çözülmüştür. 30 µg MA-PLGA, 70 µL DMSO, 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri bir ependorfa konularak, pH değeri 0,3 M NaOH ile 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi ^{99m}Tc (22.2 MBq) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.5.5. L-DOPA-PLGA Bileşiğinin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

1 mg/mL L-DOPA-PLGA bileşiği DMSO içinde çözülmüştür. 30 µg L-DOPA-PLGA, 70 µL DMSO, 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri bir ependorfa konularak, pH değeri 0,3 M NaOH ile 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi ^{99m}Tc (22.2 MBq) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.5.6. MA-L-DOPA-PLGA Bileşiminin ^{99m}Tc İle Radyoişaretlenmesi

1 mg/mL MA-L-DOPA-PLGA bileşiği DMSO içinde çözülmüştür. 30 µg MA-L-DOPA-PLGA, 70 µL DMSO, 25 µg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ çözeltileri bir ependorfa konularak, pH değeri 0,3 M NaOH ile 12'ye getirilmiştir. Ependorfa 600 µCi ^{99m}Tc (22.2 MBq) eklenmiştir. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon sonrasında radyoişaretli bileşiklerin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.6. Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler

^{99m}Tc ile yapılan radyoişaretleme çalışmalarında 30 dakikalık inkübasyon süresi sonunda TLRC ve HPLRC radyokromatografi yöntemleri kullanılarak radyoaktif ürünlerin kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. TLRC Analizi

^{99m}Tc -MA bileşiminin TLRC analizi için Serum Fizyolojik (SF), Asetonitril (ACN), Metanol-Su (9:1) ve Metanol-Su (2:8) olmak üzere 4 farklı banyo sistemi hazırlanmıştır. Silikajelle kaplı, kalınlıkları 0,1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki alimünyum (ITLC-SG) tabakalar kullanılmış ve bu tabakalar 1,50 x 10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Hazırlanan şeritlerin üzerine tabandan 0,50 cm yukarıya kapiler yardımıyla İnd. ^{99m}Tc ve radyoişaretli MA damlatılmıştır. Radyoişaretli bileşiklerin uygulandığı bu şeritler içerisinde çözücü içeren TLC tankına konmuştur. Tanktaki çözücünün yaklaşık 8 cm kadar ilerlemesinden sonra şeritler tank içerisinden çıkartılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan örneklerin dış yüzeyi yapışkan bir bantla kaplanarak herhangi bir kontaminasyona neden olmadan TLRC Scanner (Bioscan AR2000) cihazında ölçümler yapılmıştır. Yapılan deneyler ışığında en iyi bağlanma veriminin pH=12'de ve Metanol- Su (2:8) banyosunda elde edildiği belirlenmiştir. Diğer radyoişaretli bileşiklerin (^{99m}Tc -L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA, ^{99m}Tc -L-DOPA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA) TLRC analizlerinde Metanol- Su (2:8) banyosu kullanılarak aynı prosedür takip edilmiştir.

3.6.2. HPLRC Analizi

HPLRC yöntemi ile $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerinin kalite kontrolleri yapılmıştır. Bölüm 3.3.6.'da inaktif bileşenler için uygulanan yöntem ile aynı koşullarda HPLRC analizleri yapılmıştır. Farklı olarak bileşenlerin radyoaktivitesi HPLC sisteminde bulunan NaI(Tl) dedektörü (Gabi Star, Raytest) kullanılarak dedekte edilmiştir.

3.7. Stabilite Çalışmaları

$^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ radyoişaretle bileşiklerinin stabilite tayini için 0., 30., 60., 90., 120. ve 240. dakikalarda örnekler alınarak TLRC yöntemiyle bu zamanlardaki % bağlanma verimlerine bakılmış ve zamana karşı değişimi incelenmiştir.

3.8. Lipofilite Çalışmaları

0.3 mL n-oktanol ve 0.3 mL pH=7 tamponu bir santrifüj tüpüne konulduktan sonra üzerine 0.1 mL $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$ bileşiği ilave edilerek tüm karışım 1 dakika boyunca vortekslenmiştir. 2500 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek üst ve alt fazın ayrılması sağlanmıştır. Bu fazlardan 100'er μL örnek alınarak, Cd(Te) detektöründe sayımlar alınmıştır. Aynı işlem $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ için de uygulanmıştır. Aynı zamanda elde edilen deneysel lipofilite değerleri, ACD/Labs logP Algorithm programından (Versiyon 6.0) elde edilen teorik lipofilite değerleri ile karşılaştırılmıştır.

3.9. *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

In vitro hücre kültürü çalışmalarında insan nöroblastoma (SY-SH5Y) ve sıçan feokromasitoma (PC-12) hücre hatları kullanılmıştır. Hücre hatlarında $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşikleriyle ilgili inkorporasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca iki hücre

hattı üzerinde de MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin sitotoksosite çalışmaları yapılmıştır.

3.9.1. Hücre Hatları

In vitro çalışmada insan nöroblastoma (SY-SH5Y) ve sıçan feokromasitoma (PC-12) hücre hatları kullanılmıştır. SY-SH5Y Ege Üniversitesi Fizyoloji Anabilimdalından PC-12 hücreleri ise Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsünden temin edilmiştir. SH-SY5Y hücreleri, minimum Essential Medium (Eagle) ve % 10 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda; PC-12 hücreleri ise RPMI 1640 medium, % 10 horse serum ve % 5 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda üretilmiştir. Tüm hücreler % 5 CO₂ ortamında ve 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. 2 günde bir sıklıkla besiyeler değiştirilerek taze besiyer ortamı eklenmiştir. Hücreler flaskların % 80'ini kaplayacak kadar üretildikten sonra % 0.25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrılarak inkorporasyon çalışmaları için 24 ve sitotoksosite çalışmaları için 96 kuyucuklu plakalara ekilerek çalışma grupları oluşturulmuştur. Çalışmada kullanılmayacak olan hücreler % 5 DMSO içeren medyumların içine koyularak önce -20 °C daha sonra -80 °C'de dondurulup, -190 °C'de sıvı azot içinde saklanarak, yapılacak diğer çalışmalar ve karşılaşılabilecek riskler amacıyla stoklanmıştır.

3.9.2. Sitotoksosite Çalışmaları

SY-SH5Y ve PC-12 hücre süspansiyonlarından, 96 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 5 x 10⁴ hücre / mL olacak şekilde hücreler hazırlanmıştır. Oluşturulan her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı (10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ nM) konsantrasyonda steril SF ile hazırlanan MA içeren çözelti eklenmiştir. Negatif kontrol olarak, hücre ve reaktif içermeyen besiyer kullanılmıştır. Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışılmıştır. Hücrelerin bulunduğu plaka 37 °C' de % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. SH-SY5Y hücrelerinin inkübasyonun 24., 48. ve 72. saatlerinde her kuyucuğa 10'ar µl WST solüsyonu eklenerek 4 saat daha inkübe edilmiştir. PC-12 hücrelerine ise MTT solüsyonu eklenerek 4 saat daha inkübe edilmiş ve

inkübasyon sonunda hücreler üzerinde bulunan MTT solüsyonu uzaklaştırılıp hücreler üzerine 200 µL DMSO eklenmiştir. Hücreler 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri, spektrofotometre kullanılarak okunmuştur. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edilerek $[(\text{ölçülen absorbans değeri/kontrol değeri}) \times 100]$ formülü ile % canlılık değerleri hesaplanmış ve aynı işlemler MA-L-DOPA bileşiği içinde tekrarlanmıştır.

3.9.3. Hücreler Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla

Değişimi

$^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiklerinin hücreler üzerindeki en yüksek tutulum düzeyleri için optimum zamanını tespit etmek amacıyla SH-SY5Y ve PC-12 hücrelerinin ekimi yapılmıştır. Hücrelerin yeteri kadar çoğalmasından sonra SH-SY5Y hücreleri 24'lük plakalara, PC-12 hücreleri ise epondarflara 0,5 mL besiyer içerecek şekilde alınmıştır. Çalışmada incelenecek zaman parametreleri 30., 60., 120. ve 240. dakika olarak belirlenmiştir.

SY-SH5Y hücreleri yeteri kadar çoğaltıldıktan sonra 24'lük plakalara ekilmiş ve mevcut besiyerler ortamdan pipet yardımıyla çekilerek uzaklaştırılmıştır. Kontrol grubu olarak 24'lük plakalardaki hücrelerin üzerine ^{99m}Tc içermeyen medyum konulmuştur. Plakalara tutunamayan ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla her bir kuyucuk serum fizyolojik (SF) ile yıkanmış ve plakaların her bir kuyucuğuna 0,5 mL $^{99m}\text{Tc-MA}$ (1 mCi) içeren besiyer ilave edilmiştir. 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda öncelikle her bir kuyucuktaki hücreler üzerindeki işaretli medyumun Cd (Te) dedektöründe sayımı yapılarak başlangıç radyoaktiviteleri (A_0) tespit edilmiştir. Ligandların etkisini incelemek amacıyla, aynı prosedür, serbest ^{99m}Tc için de uygulanmıştır. Kuyucuktaki işaretli medyum, hücreler üzerinden uzaklaştırılmış ve kuyucuklar SF ile yıkanmıştır. Her bir göze 0.5 mL SF eklenerek, kuyucuklarda bulunan hücrelere bağlı kalan ^{99m}Tc ile işaretli örneklerin radyoaktivite sayımı (A_1) tekrar yapılmıştır. Tespit edilen A_1 ve A_0 değerleri oranlanarak ve kontrol grubu sayımları da değerlendirmeye alınarak % bağlanma değerleri tespit

edilmiştir. Her hücre hattındaki, tüm zaman parametreleri, çalışmanın yeterli tekrar sayısına ulaşması amacıyla 3'er kuyucuk çalışılmıştır (n=6).

PC-12 hücre hattında ise hücreler süspanse olduğu için 24'lük plakalar yerine ependorflar içerisinde hücre çalışma grupları oluşturulmuştur. Tüm hücreler 2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası hücrelerin üzerindeki mevcut besiyer çekilmiş ve ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak amacıyla üzerlerine 0,5 mL SF eklenerek yıkama yapılmış tekrar 2500 rpm'de 5 dk. santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrası ölü hücreler ortamdan uzaklaştırılmış ve her bir ependorfa 0,5 mL ^{99m}Tc -MA (1mCi) içeren besiyer ilave edilmiştir. Ligandların etkisini incelemek amacıyla, aynı prosedür, serbest ^{99m}Tc için de uygulanmıştır. 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda öncelikle her bir ependorftaki hücreler üzerindeki işaretli medyumun CdTe dedektöründe sayımı yapılarak başlangıç radyoaktiviteleri (A_0) tespit edilmiştir. Seçilen zaman parametreleri (30, 60, 120 ve 240. dk.) dolana kadar 37 °C etüvde bekletilmiştir. Her hücre hattındaki, tüm zaman parametreleri, çalışmanın yeterli tekrar sayısına ulaşması amacıyla 3'er ependorf çalışılmış ve bu deney farklı bir gün de tekrarlanmıştır (n=6). Her zaman parametresinin sırası geldiğinde, sırasıyla hücreler 2500 rpm'de 5 dk. santrifüj edilmiş, santrifüj sonrası hücrelerin üzerindeki radyoişaretli besiyerler atılmış ve SF ile yıkamaları yapılarak yüzeyden kalkmış hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Her bir ependorfa 0.5 mL SF eklenerek, ependorflarda bulunan hücrelere bağlı kalan ^{99m}Tc ile işaretli örneklerin radyoaktivite sayımı (A_1) tekrar yapılmıştır. Tespit edilen A_1 ve A_0 değerleri oranlanarak ve kontrol grubu sayımları da değerlendirmeye alınarak % bağlanma değerleri tespit edilmiştir.

3.10. *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmalar kapsamında ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin Sprague Dawley sıçanları üzerinde biyodağılımları incelenmiştir. *In vivo* çalışmalar için gerekli etik kurulu izinleri Ege Üniversitesi Yerel Hayvan Deneyleri Etik Kurulunun 21.12.2016 tarih ve 2016-110 sayılı onayı ile alınmıştır. MA bileşiğinin sıçanlarda beyin dokusundaki tutulumunun 1 saat içerisinde gerçekleştiği bilinmektedir

(Anukunwithaya et al., 2017). Zaman parametresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda rotenone kullanılarak sterotaksik girişimle deneysel Parkinson Modeli (n=7) oluşturulmuştur. Herhangi bir girişim uygulanmayan sağlıklı Sprague Dawley sıçanları ise kontrol grubu (n=12) olarak kullanılmıştır.

3.10.1. Sterotaksik Girişim

In vivo hayvan modeli çalışmaları kapsamında Erbaş ve arkadaşlarının (Erbaş et al., 2015) yapmış oldukları çalışmada kullanılan rotenone enjeksiyonu sonucu oluşturulan sıçan modelleri kullanılmıştır. Bu amaçla DMSO içerisinde 12 mg/mL rotenone çözümüştür. Deneysel çalışmalar kapsamında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı Beyin Araştırmaları laboratuvarında 7 adet sağlıklı erkek Sprague Dawley sıçana (250-300 gram) sterotaksik cerral rotenone enjeksiyonu yapılmıştır. Bu amaçla sıçanlara öncelikle 2 mL/kg olmak üzere anestezi maddesi [2 mL ketamine (80mg/kg) + 2 mL SF + 1 mL ksilazin (4mg/kg)] uygulanmıştır. Anestezi kontrolü yapıldıktan sonra sıçanların başı tıraşlanarak tüylerden arındırılmış ve stereotaksi cihazına yerleştirilmiştir. Gerekli cerrahi girişimler doğrultusunda kafa derisi açılmış ve bregma belirlenmiştir. Sıçan sterotaksik atlası yardımı (Paxinos and Watson, 2007) ile SNc bölgesi saptanıp, Bregma orjin (0) noktası kabul edilerek anterior posterior (AP: 5,2 mm), lateral (L: 2,4 mm) ve vertikal (V: 8mm) koordinatlarına karşılık gelen SNc bölgesine 32'lik Hamilton şırıngası ile 100 µL rotenone enjeksiyonu yapılmıştır. Cerrahi girişim sonrası sıçanların kafatasında açılan delikler kemik mumu yardımıyla dikkatlice kapatılmış, kafatasına dikiş atılarak enfeksiyon riskine karşılık batikon ile kafa derisi temizlenmiştir. Uygulama yapılan sıçanlar kendilerine gelene kadar ayrı kafeslerde bekletilmişlerdir. Anestezi sonrası uyanan sıçanlarda unilateral dönüşler gözlenmiş bu durum da motor hareketlerindeki değişimlerle beraber değerlendirildiğinde Parkinson modeli olarak kabul edilmiştir. Uygulamalar sonrası sıçanların sağlık durumları belli zaman aralıklarında 10 gün boyunca gözlenmiştir. Bu süreç zarfında sıçanların sağlık durumlarında motor fonksiyonlarında bozukluk ve tremor gözlenmiştir.

3.10.2. Biyodağılım Çalışmaları

Deneyssel biyodağılım çalışmasında yapılan temel uygulamalar (kuyruk veninden enjeksiyon, doku örneklerinin çıkarılması, tartılması, Cd(Te) dedektöründe aktivite sayılması prosedürü takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Biyodağılım çalışması Sprague dawley sıçanları üzerinde iki aşamalı olarak yapılmıştır. Birinci aşamada naif kontrol grubu olarak belirlenen (n=12) 250-300 gram aralığındaki 4-6 haftalık erkek Sprague Dawley sıçanları kullanılmıştır. Birinci aşamada ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşikleri sıçanların kuyruk venininden sıçan başı yaklaşık 1mCi aktivite değerine sahip 0,20 mL olacak şekilde enjeksiyon yapılmıştır. Sıçanlara enjekte edilen net aktivite miktarını belirlemek için enjektörlerin enjeksiyonun hemen öncesi dolu haldeki aktiviteleri ve enjeksiyon sonrasındaki boş haldeki aktiviteleri Cd(Te) dedektöründe sayılmıştır. Enjeksiyon sonrası madde dağılımı için çalışması dikkate alınarak zaman parametresi olarak 60 dakika belirlenmiştir. 60 dakikalık süreç sonunda sıçanlar ketamin + ksilazin [2 mL ketamine (80mg/kg) + 2 mL SF + 1 mL ksilazin (4mg/kg)] kullanılarak anestezi altında sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen sıçanların kan, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, ince bağırsak (İB), kalın bağırsak (KB), mide, dalak, pankreas, kas, testis, prostat, yağ, mesane, baş ve beyin kısımları çıkarılmıştır. Çıkarılan örnekler daha önceden daraları alınmış kaplara konulmuş, hassas terazi ile tartılmış akabinde Cd(Te) dedektöründe aktivite sayımları alınmıştır. Beyin ölçümlerinin akabinde beynin serebellum, hipokampus, medulla pons, striatum, hipotalamus, temporal korteks, orta beyin, frontal korteks bölümleri de ayrılmıştır. Beyin bölümlerinin de daha önceden daraları alınmış kaplara konulmuş, hassas terazi ile tartılmış akabinde Cd(Te) dedektöründe aktivite sayımları yapılmıştır. Yapılan bu tartım ve sayımlar sonucunda, her bir yapı için gram başına düşen aktivite değerleri (%ID/g) zaman düzeltmeleri de dikkate alınarak Excel programında hesaplanmış ve yapılara ait %ID/g-zaman grafikleri çizilmiştir. İkinci aşamada ise sterotaksik girişimle beynin SNc (AP:5,2 mm, L: 2,4 mm, V:8 mm) bölümüne rotenone enjeksiyonu yapılan ve dopaminerjik lezyon oluşturulan (n=7) 250-300 g aralığındaki Sprague Dawley sıçanı kullanılmıştır. Birinci aşamada elde edilen verilerden yola çıkılarak ikinci aşamada sıçanlara sadece ^{99m}Tc -MA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA bileşikleri verilmiştir. Bu bileşikler de

sıçanların kuyruk venininden (sıçan başı yaklaşık 1 mCi) aktivite değerine sahip 0,20 mL olacak şekilde enjeksiyon yapılarak verilmiştir. Birinci aşamada olduğu gibi sıçanlara enjekte edilen net aktivite miktarını belirlemek için enjektörlerin enjeksiyonun hemen öncesi dolu haldeki aktiviteleri ve enjeksiyon sonrasındaki boş haldeki aktiviteleri Cd(Te) dedektöründe sayılmıştır. Enjeksiyon sonrası madde dağılımı için parametresi olarak 60 dakika belirlenmiştir. 60 dakikalık süreç sonunda sıçanlar ketamin + ksilazin [2 mL ketamine (80mg/kg) + 2 mL SF + 1 mL ksilazin (4mg/kg)] kullanılarak anestezi altında sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilen sıçanların kan, kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, ince bağırsak (İB), kalın bağırsak (KB), mide, dalak, pankreas, kas, testis, prostat, yağ, mesane, baş ve beyin kısımları çıkarılmıştır. Örnekler daraları belirlenmiş kaplara konulmuş, hassas terazi ile tartılmıştır. Ardından Cd(Te) dedektöründe aktivite sayımları alınmıştır. Beyin ölçümlerinin akabinde bu aşamada beynin serebellum, hipokampus, medulla pons, striatum, hipotalamus, temporal korteks, orta beyin, frontal korteks bölümleri sağ ve sol olmak üzere (örneğin sağ serebellum- sol serebellum) ayrılmıştır. Çünkü yapılan sterotaksik girişimle sıçanların sağ tarafında tahribat yapılmış, dolayısıyla sağ ve sol bölümlerin arasında bir fark olup olmadığını tespit etmek amacıyla sağ ve sol beyin bölümleri incelenmiştir. Beyin bölümleri de daraları tespit edilmiş kaplara konularak, hassas terazi ile tartılmıştır. Tartım değerlerinin belirlenmesinden sonra yapıların Cd(Te) dedektöründe aktivite sayımları yapılmıştır. Yapılan bu tartım ve sayımlar sonucunda, her bir yapı için gram başına düşen aktivite değerleri (%ID/g) zaman düzeltmeleri de dikkate alınarak Excel programında hesaplanmış ve yapılara ait %ID/g-zaman grafikleri çizilmiştir.

3.11. İstatistiksel Analizler

In vitro ve *in vivo* çalışmalara ilişkin istatistiksel analiz sonuçları değerlendirilirken inkorporasyon ve tutulum değerleri arasında % 95 ($p < 0,05$) güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı test edilmiştir. Bu aşamada istatistiki sonuçların P değerlerine bakılmış ve P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı fark olarak kabul edilmiştir. *In vitro* hücre kültürü çalışmalarından elde edilen veriler ile ilgili istatistiksel analizler için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) Graph Pad programı ile yapılmıştır. Analizlerde her bir parametre için

3 tekrar olmak üzere iki ayrı denemede toplam altı tekrar dikkate alınmış, ortalama bağlanma değerleri ile standart sapmaları hesaplanmıştır. Her bir parametre seviyesinde elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için ($p < 0,05$) tek yönlü varyans (ANOVA) analizi yapılmıştır. *In vivo* biyodağılım çalışmalarının istatistiksel değerlendirmesinde ise SPSS 15 istatistik programı kullanılmıştır. Bu sonuçlar için Varyans Analizi ve Pearson Korelasyonu istatistikleri gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. MA-L-DOPA Sentezine İlişkin Yapı Analiz Çalışmaları

MA-L-DOPA sentezine ilişkin yapı analizini doğrulamak amacıyla erime noktası tayini, FTIR, LC-MS, $^1\text{H-NMR}$, TLC ve HPLC analizleri gerçekleştirilmiştir.

4.1.1. Erime Nokta Tayini Sonuçları

MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait erime noktaları Tablo 4.1’de verilmiştir.

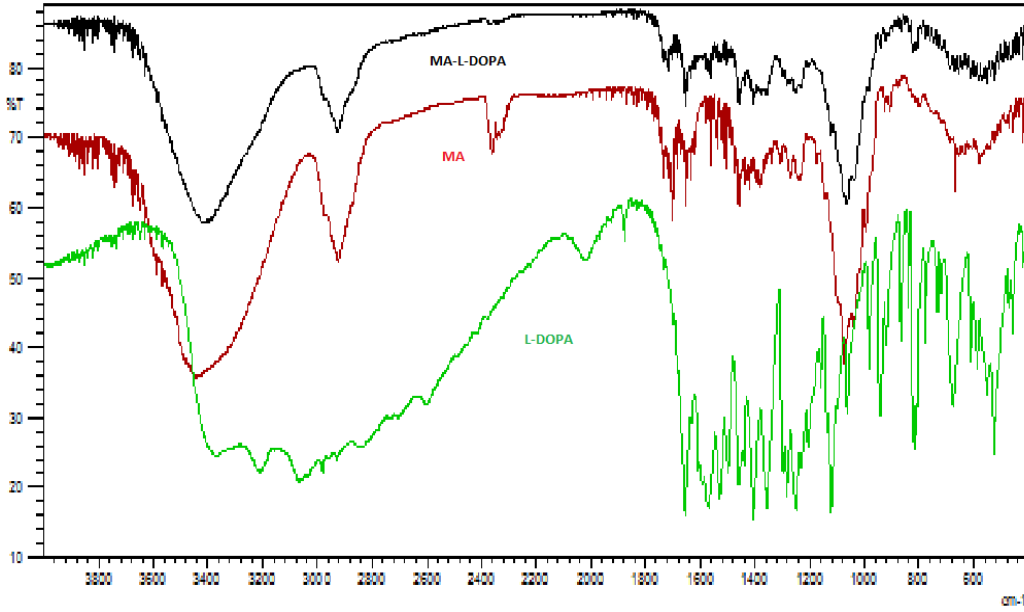
Tablo 4.1. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA maddelerine ait erime noktaları.

Bileşik	Erime Noktası ($^{\circ}\text{C}$)
MA	232-233
L-DOPA	279-280
MA-L-DOPA	239-240

Saf maddeler için erimenin gözlemlendiği sıcaklık ile maddenin tamamen sıvı hale geçmesini içeren bir sıcaklık aralığı bulunmaktadır. Bu ölçülebilen sıcaklık aralığı saf maddelerde $0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ’yi geçmemektedir. Madde içerisinde safsızlıkların varlığı erime noktası aralığını da artırmaktadır (Erdik vd., 2000). MA-L-DOPA bileşiğine ait erime noktası ($239\text{-}240\text{ }^{\circ}\text{C}$) değerinin, MA ($232\text{-}233\text{ }^{\circ}\text{C}$) ve L-DOPA ($279\text{-}280\text{ }^{\circ}\text{C}$) bileşiklerinin erime noktalarından farklı olduğu belirlenmiştir. Elde edilen erime noktası tayini sonuçlarına göre sentezin gerçekleştiği görülmektedir.

4.1.2. FTIR Analizi Sonuçları

MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait FTIR analizine ait kromatogram Şekil 4.1’de verilmiştir.

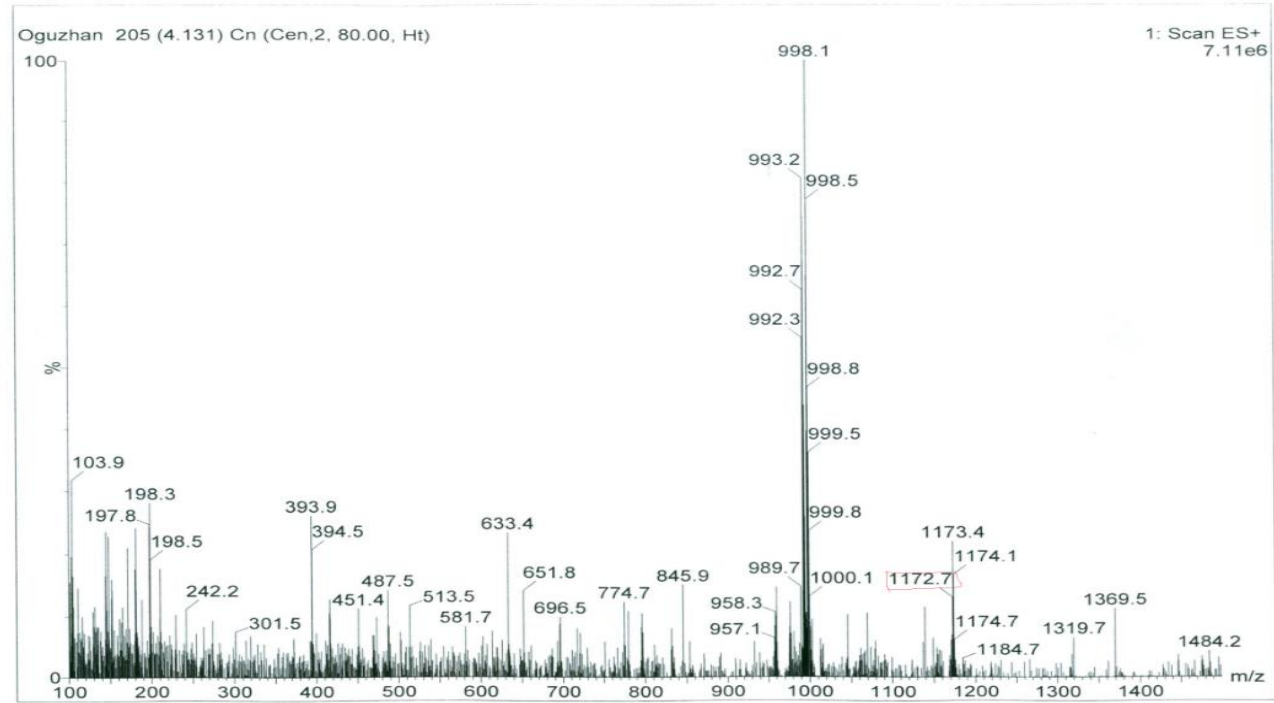


Şekil 4.1 MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin FTIR analizine ait spektrum.

FTIR sonuçları dikkate alındığında; MA-L-DOPA ve MA molekülü için –OH bağının $3000\text{--}3600\text{ cm}^{-1}$ ’de gerilme absorpsiyon bandını oluşturduğu ancak, L-DOPA molekülüne ait –OH bağının gerilme absorpsiyon bandının daha geniş olduğu görülmektedir. 1600 cm^{-1} ve 1200 cm^{-1} deki pikler sırası ile –OH bükülme ve C–O gerilme bağlarına aittir. MA molekülünün FTIR sonuçları Lin ve arkadaşlarının çalışmasında (Lin et al., 2014) yer alan sonuçlarla benzerdir.

4.1.3. LC-MS Analizi Sonuçları

MA-L-DOPA molekülünün LC-MS analizleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. MA-L-DOPA bileşiğine ait LC-MS sonuçları Şekil 4.2’de verilmiştir. MA molekülünün LC/MS sonuçları literatürdeki (Lin et al., 2014) çalışma dikkate alınarak incelenmiştir. Burada MA molekülünün m/z oranı 975 değerini göstermektedir. Ancak buradaki değer $[\text{MA}+\text{Na}]^+$ şeklinde verilmektedir. Bu durum MA molekülüne sodyum bağlı olduğunu göstermektedir. Aynı şekilde L-DOPA molekülü içinde Igarashi ve ekibinin (Igarashi et al. 2003) çalışması dikkate alındığında m/z oranının 198 değerini gösterdiği görülmektedir. Çalışma kapsamında yapılan MA-L-DOPA molekülünün LC-MS analizinde ise 1172 piki görülmektedir.

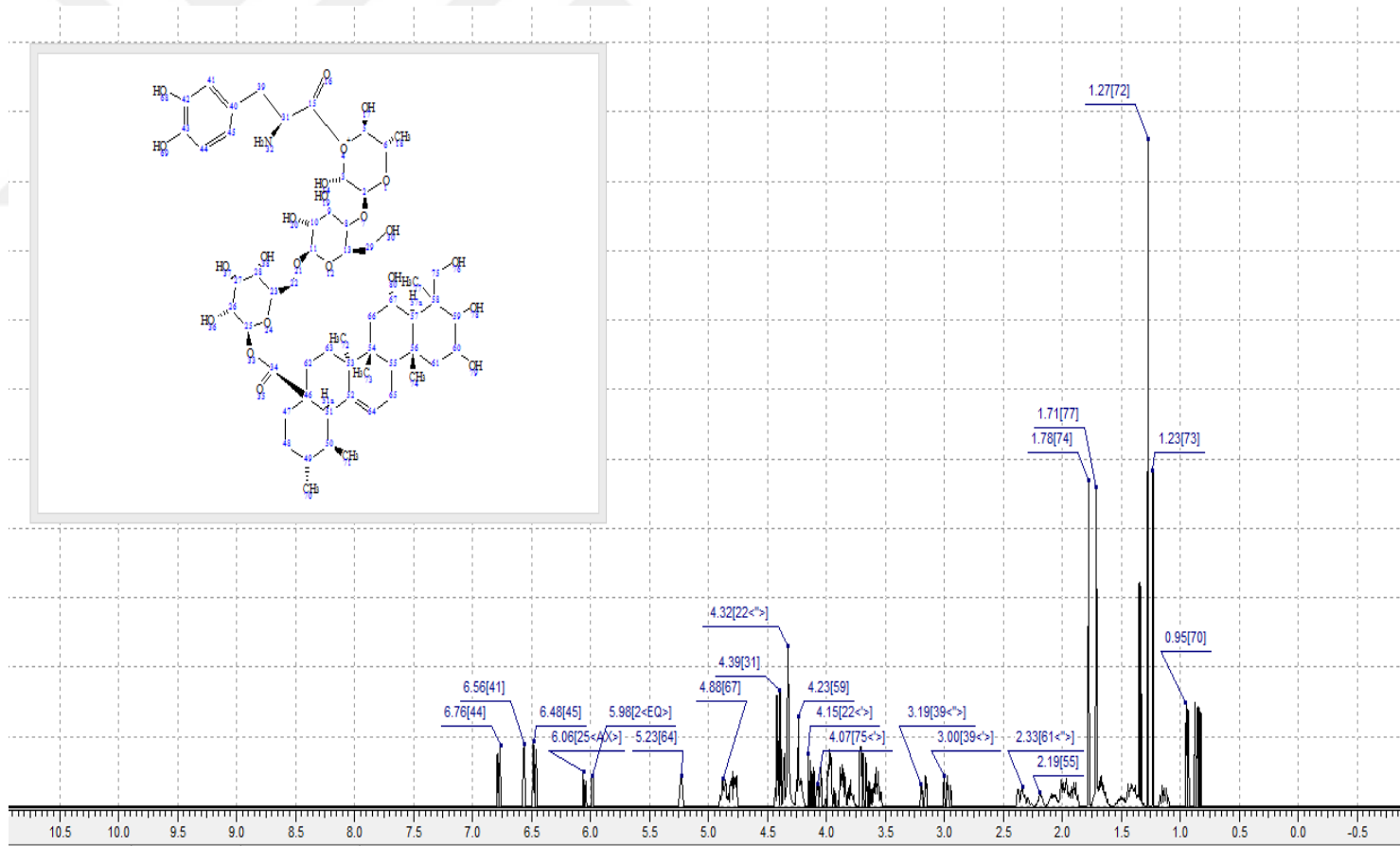


Şekil 4.2. MA-L-DOPA bileşğine ait LC-MS analizine ait spektrum.

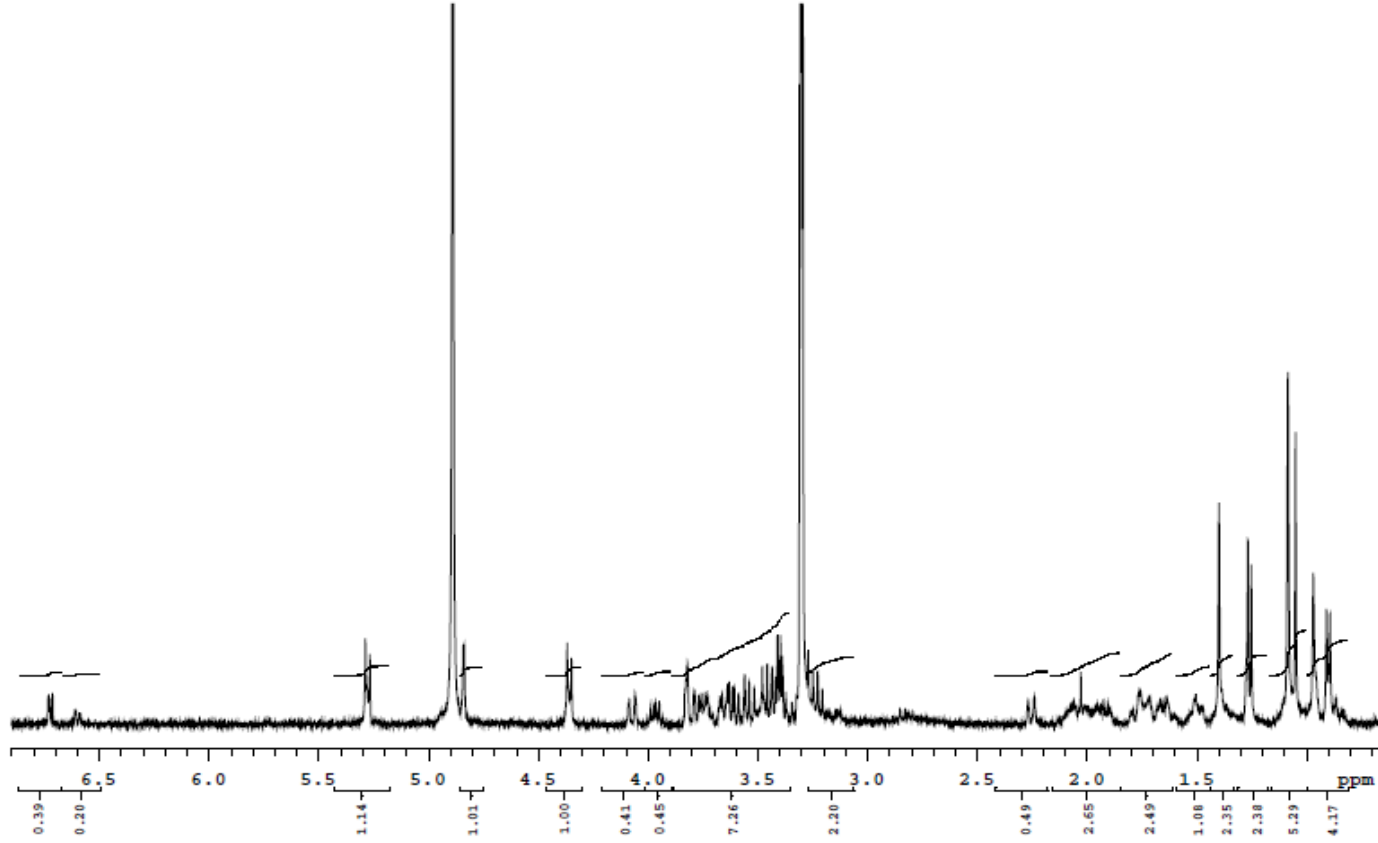
Her iki literatür çalışması (Igarashi et al., 2003; Lin et al., 2014) birlikte değerlendirildiğinde iki yapının (MA ve L-DOPA) birleşmiş ve suyun ayrılmadığı şeklinde değerlendirilmektedir. Ayrıca çok büyük 998 ve 992,3 pikleri de MA molekülüne su ve sodyum bağlı olduğu şeklinde değerlendirilmektedir.

4.1.4. NMR Analizi Sonuçları

MA-L-DOPA molekülünün ^1H -NMR analizi Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Teorik ^1H -NMR spektrumu ise ACD/ChemSketch 2.0 programı ile elde edilmiştir. MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ^1H -NMR spektrumu Şekil 4.3.'de, deneysel ^1H -NMR spektrumu ise Şekil 4.4'de verilmektedir.



Şekil 4.3. MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ^1H -NMR spektrumu.



Şekil 4.4 MA-L-DOPA bileşiğine ait deneysel ^1H -NMR spektrumu.

Şekil 4.3 ve 4.4'deki verilerden yola çıkılarak Tablo 4.2'de MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ve deneysel çalışma sonucu elde edilen ^1H -NMR spektrumlarındaki teorik ve deneysel ppm sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.2. MA-L-DOPA bileşiğine ait teorik ve deneysel çalışma sonucu elde edilen ^1H -NMR spektrumlarındaki ppm sonuçları.

Karbon No	Teorik ppm değeri	Deneysel ppm değeri
31	4,39	4,36
41	6,56	6,61
44	6,76	6,72
45	6,48	6,59
55	2,19	2,24
59	4,23	4,35
64	5,23	5,26
67	4,88	4,89
70	0,95	0,97
72	1,27	1,27
73	1,23	1,25
74	1,78	1,79
77	1,71	1,71

MA molekülünün ^1H -NMR spektrumları (Lin et al., 2014) ve L-DOPA molekülünün ^1H -NMR spektrumları ise (Talebpour et al., 2004) çalışmaları dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında ise MA-L-DOPA konjugasyonunu doğrulamak amacıyla ^1H -NMR analizleri yapılmıştır. Literatürdeki (Lin et al., 2014; Talebpour et al., 2004) çalışmalar ve Tablo 4.2, Şekil 4.3.a ve 4.3.b birlikte değerlendirildiğinde MA-L-DOPA bileşiğinin teorik ve deneysel ^1H -NMR spektrumlarının benzer olduğu görülmektedir. Bu durum MA-L-DOPA sentezinin başarıyla gerçekleştiğini göstermektedir.

4.2. TLC Sonuçları

Literatürde MA molekülüne ait TLC analizlerini içeren çeşitli araştırmalar mevcuttur (Bonfill et al., 2006; Du et al., 2014). Bu araştırmalardan yola çıkılarak elde edilen prosedür (Bölüm 3.3.5) ışığında MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine TLC analizi yapılmıştır. Yapılan TLC analizi sonucu elde edilen R_f (Relative Front) değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur.

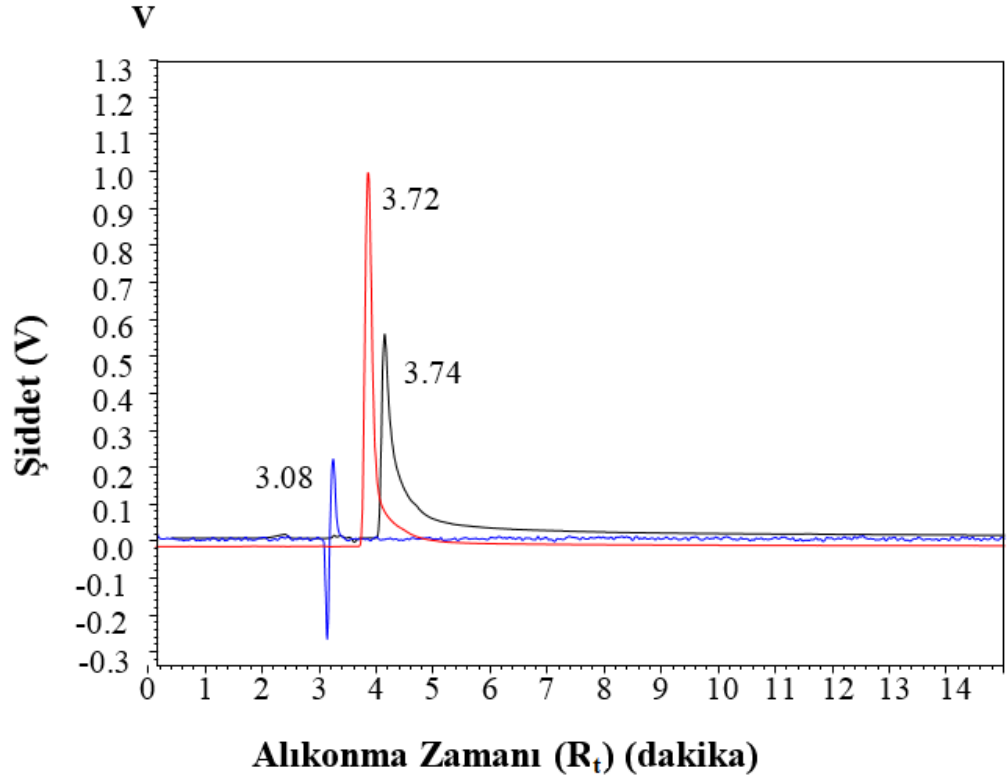
Tablo 4.3. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait TLC analizi sonucu elde edilen R_f değerleri.

Bileşik	R_f Değeri
MA	0,97
L-DOPA	0,94
MA-L-DOPA	0,85

Tablo 4.3 incelendiğinde, MA, L-DOPA ve L-DOPA bileşiklerine ait R_f değerleri sırasıyla 0,97, 0,94 ve 0,85 olarak tespit edilmiştir.

4.3. HPLC Sonuçları

Literatür incelendiğinde MA molekülüne ait çeşitli HPLC çalışmalarının (Aziz et al., 2007; Pan et al., 2007; Rafamantanana et al., 2009) mevcut olduğu görülmektedir. Çeşitli solventler ve metotlar kullanılarak yapılan bu çalışmalardan yola çıkılarak oluşturulan metot (Bölüm 3.3.6) doğrultusunda HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerine ait HPLC kromatogramları şekil 4.5’de verilmiştir. Kromatogramlar incelendiğinde alıkonma süreleri (R_t) MA için 3,08 dakika, L-DOPA için 3,72 dakika ve MA-L-DOPA için 3,74 dakika olarak tespit edilmiştir. Alıkonma zamanlarının farklı olması bileşiklerin farklı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.5. MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin 280 nm dalga boyundaki HPLC kromatogramı.

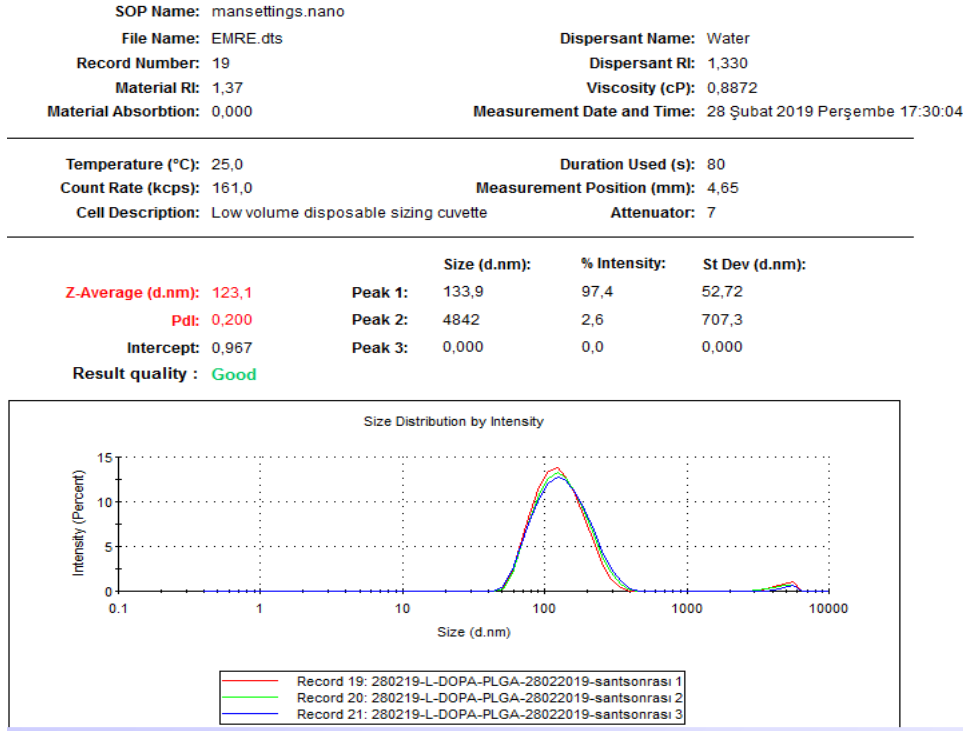
4.4. PLGA İle Enkapsüle Edilmiş Bileşiklerin Karakterizasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Peltonen ve arkadaşlarının (Peltonen et al., 2002) yapmış oldukları çalışmadan yola çıkılarak koşulların optimize edilmesiyle (Bölüm 3.4) MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin PLGA ile enkapsülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

4.4.1. DLS Sonuçları

Enkapsülasyon çalışmaları yapılan DLS analizi ve SEM görüntülerinin birlikte incelenmesiyle değerlendirilmiştir. Madde stoklarımız dikkate alınarak ilk olarak L-DOPA bileşiğinin PLGA ile enkapsülasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve optimizasyon sürecinde bu sistem ele alınmıştır. Süreç iyileştirme çalışmaları kapsamında öncelikli olarak DLS analizleri yapılmıştır. L-DOPA-PLGA enkapsülasyon çalışmalarında yapılan DLS analizlerine ait sonuçlar aşağıda

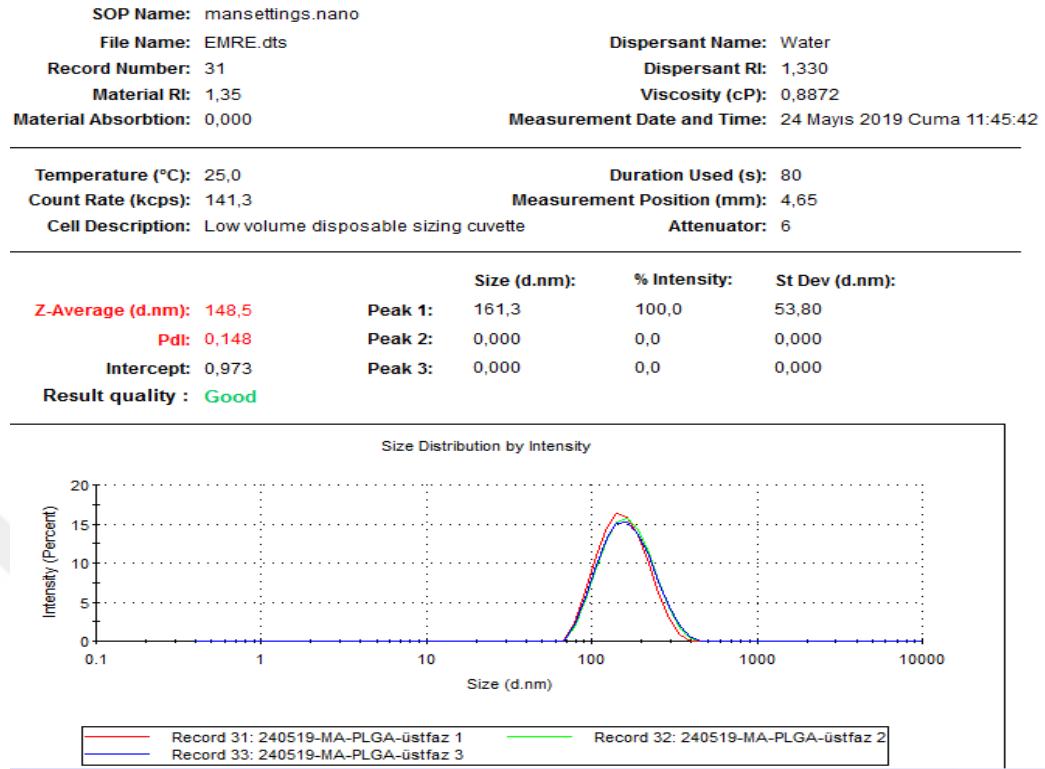
verilmiştir. Çalışmalara ilk başlandığında L-DOPA-PLGA bileşiğine ilişkin DLS sonuçlarında elde edilen nanoparçacık boyutları ortalama 3915 nm iken koşulların çeşitli varyasyonlar aracılığıyla optimize edilmesiyle elde edilen yöntem ile bu boyutlar 123 nm'ye (Şekil 4.6) kadar düşürülmüştür.



Şekil 4.6. L-DOPA-PLGA bileşiğine ait DLS sonuçları.

Literatür incelendiğinde Cu ve Saltzman'a göre modifiye edilmemiş PLA NP'ler ve PLGA ile kaplanmış liganda ilişkin su içerisindeki parçacık boyutları 100-400 nm aralığında verilmektedir. (Cu and Saltzman, 2009). Elde edilen parçacık boyutları buna göre değerlendirildiğinde optimizasyon sürecinin başarıyla gerçekleştiği değerlendirilerek metodun son hali verilmiştir. Elde edilen boyutlara ilişkin DLS analizleri aşağıda gösterilmiştir. Literatürde L-DOPA-PLGA bileşiğinin sentezine yönelik çeşitli yöntemler kullanılarak yapılmış araştırmalar mevcuttur (Gambaryan et al., 2014; Microspheres et al., 2012; Xu, 2014; Zhou et al., 2013). Bu çalışmalarda yoğun olarak su-yağ-su ($W_1 / O / W_2$) emülsiyon çözücüsü içinde buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır (Zhou et al., 2013). Çalışmalar dikkatlice incelendiğinde nano parçacık boyutlarının 170 nm-500 nm aralığında değiştiği görülmektedir. Bu sonuçlar deneysel çalışmamızda elde edilen sonuçlarla birlikte değerlendirildiğinde benzerlik göstermekle beraber, çalışmamızda elde edilen nano parçacık boyutlarının daha düşük olması sebebiyle,

optimizasyon sonrası kullanılan yöntemin söz konusu yöntemden daha verimli olduğu düşünülmektedir.

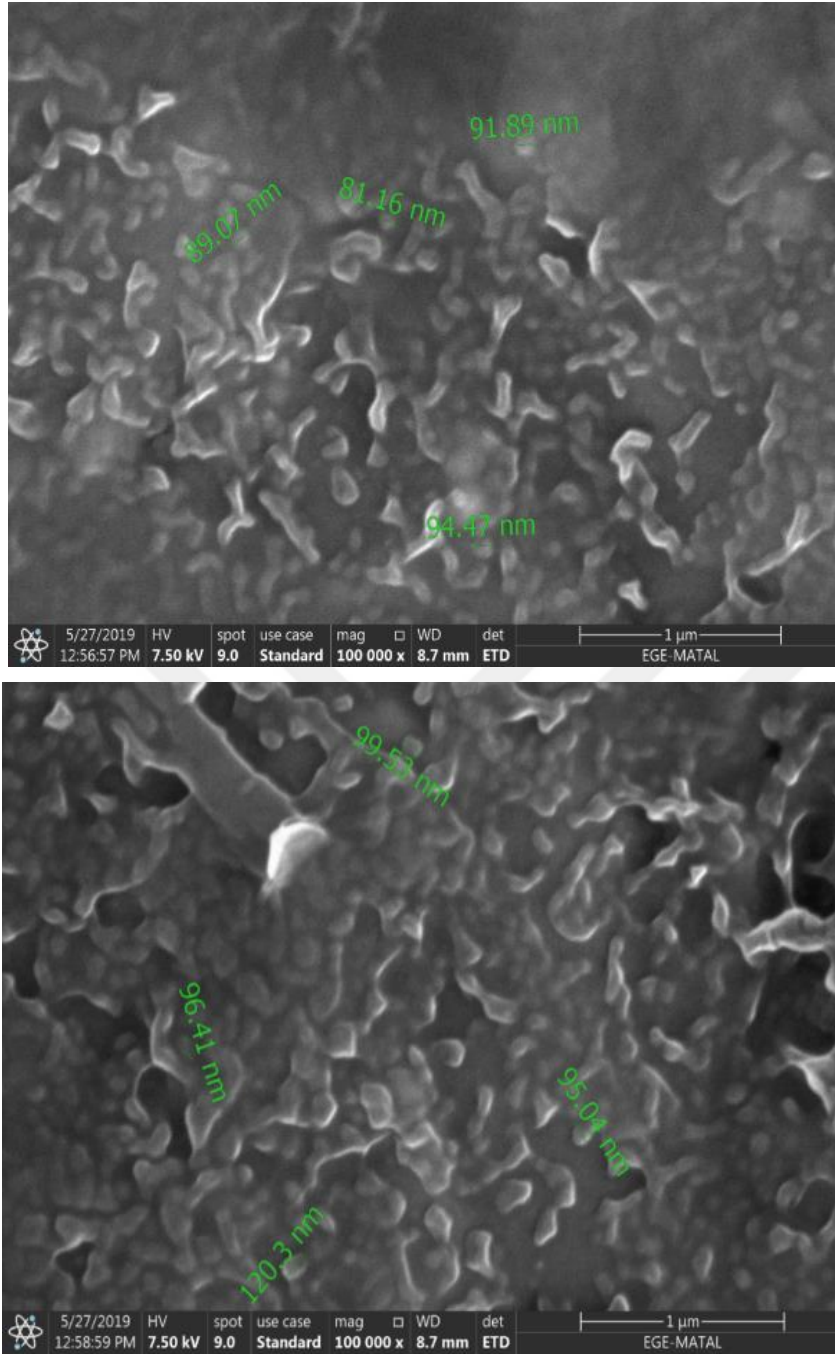


Şekil 4.7. MA-PLGA bileşiğine ait DLS sonuçları.

Şekil 4.7’de yer alan MA-PLGA e bileşiğinin DLS analizlerine ait sonuçları incelendiğinde nano parçacık boyutları ortalama 148,5 nm seviyesine kadar düşürülmüştür.

4.4.2. SEM Sonuçları

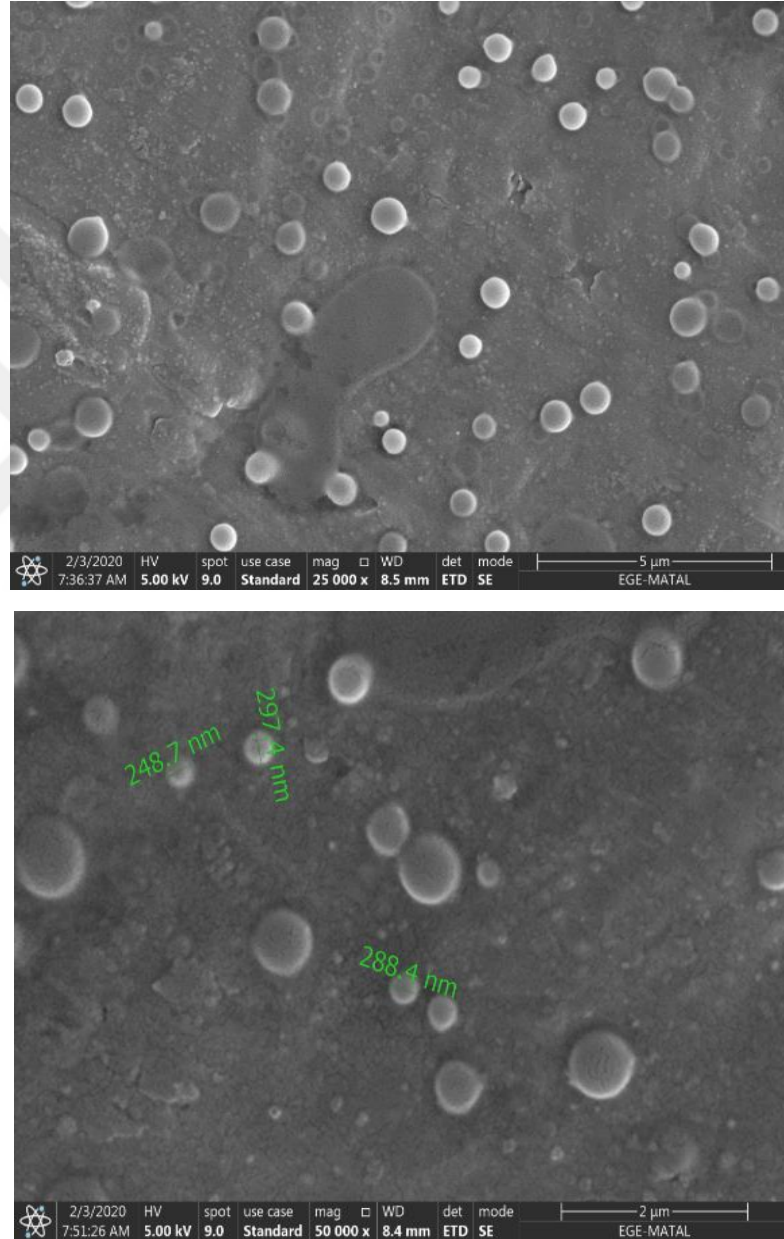
Optimizasyon sonrası elde edilen yöntem ile MA’nın PLGA ile enkapsülasyon çalışması yapılmış, çalışma verimi DLS analizi ve SEM görüntüleri birlikte incelenerek değerlendirilmiştir. MA-PLGA bileşiğine ait SEM görüntüleri Şekil 4.8’de sunulmuştur.



Şekil 4.8. MA-PLGA Bileşiğine ait SEM görüntüleri.

Nanoparçacıkların metanol içerisindeki çözücü molekülleri ile oluşan elektriksel çift tabakayla birlikte davranışının ölçüldüğü Zeta parçacık boyutunun (148,5 nm) SEM analizi ile alınan boyut ölçümlerinden (81-120 nm) yüksek olması beklenebilir (Cu and Saltzman, 2009). Çalışma kapsamında bulunan sonuçlar bu aralıkta olduğu için enkapsülasyon çalışmalarının gerçekleştiği düşünülmektedir.

MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerine ilişkin SEM görüntüleri ise Şekil 4.9'da verilmiştir. MA-L-DOPA-PLGA bileşiğine ilişkin SEM görüntüleri (Şekil 4.9) incelendiğinde nano parçacık boyutunun 248nm-298 nm aralığında değiştiği ve bu sonuçların Cu ve Saltzman'ın (Cu and Saltzman 2009) çalışmasında verilen referans aralığındadır. Dolayısıyla görüntüler ve boyutlar birlikte değerlendirildiğinde MA-L-DOPA-PLGA enkapsülasyon çalışmalarının da yüksek verimle gerçekleştiği görülmektedir.



Şekil 4.9. MA-L-DOPA-PLGA bileşiğine ait a) 5µm ve b) 2 µm SEM Görüntüleri.

4.5. ^{99m}Tc ile Radyoişaretleme Çalışmaları

Radyoişaretleme çalışmaları kapsamında literatür incelenmiş ancak MA bileşiğinin ^{99m}Tc ile radyo işaretlenmesine ilişkin bir çalışmaya rastlanmamıştır. Optimizasyon çalışmaları kapsamında pH (pH 3, 5, 7, 9, 12) değerleri üzerinde çalışılmıştır. Ayrıca TLRC analizi için en uygun banyo türü de [SF, ACN, Metanol-Su (9:1), Metanol-Su (2:8)] araştırılarak koşullar optimize edilmiştir. Buna bağlı olarak en iyi radyoişaretleme verimimin pH 12 ve en iyi banyo sisteminin Metanol-su (2:8) olduğu tespit edilmiştir. Radyoişaretleme prosedürü bölüm 3.5’de detaylı olarak açıklanmıştır. Radyoişaretleme çalışmaları kapsamında yapılan TLRC analizlerinin sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.5.1 TLRC Sonuçları

Solvent sistemleri için yapılan değerlendirmeler sonucu en iyi TLRC banyosunun Metanol- Su (2:8, v/v) olduğu tespit edilmiş olup, tekrar edilen denemelerde Metanol- Su (2:8, v/v) TLRC banyosu kullanılmıştır. Radyoişaretleme prosedürü Bölüm 3.5 deki parametrelere göre pH değiştirilerek gerçekleştirilmiş ve radyo işaretleme verimi TLRC analizi ile tespit edilmiştir.

Tablo 4.4. ^{99m}Tc -MA bileşiğinin pH değişimine göre % Bağlanma Verimleri.

pH değeri	Bağlanma Verimi (%)
3	0
5	0
7	50,14±1,12
12	99,67±0,60

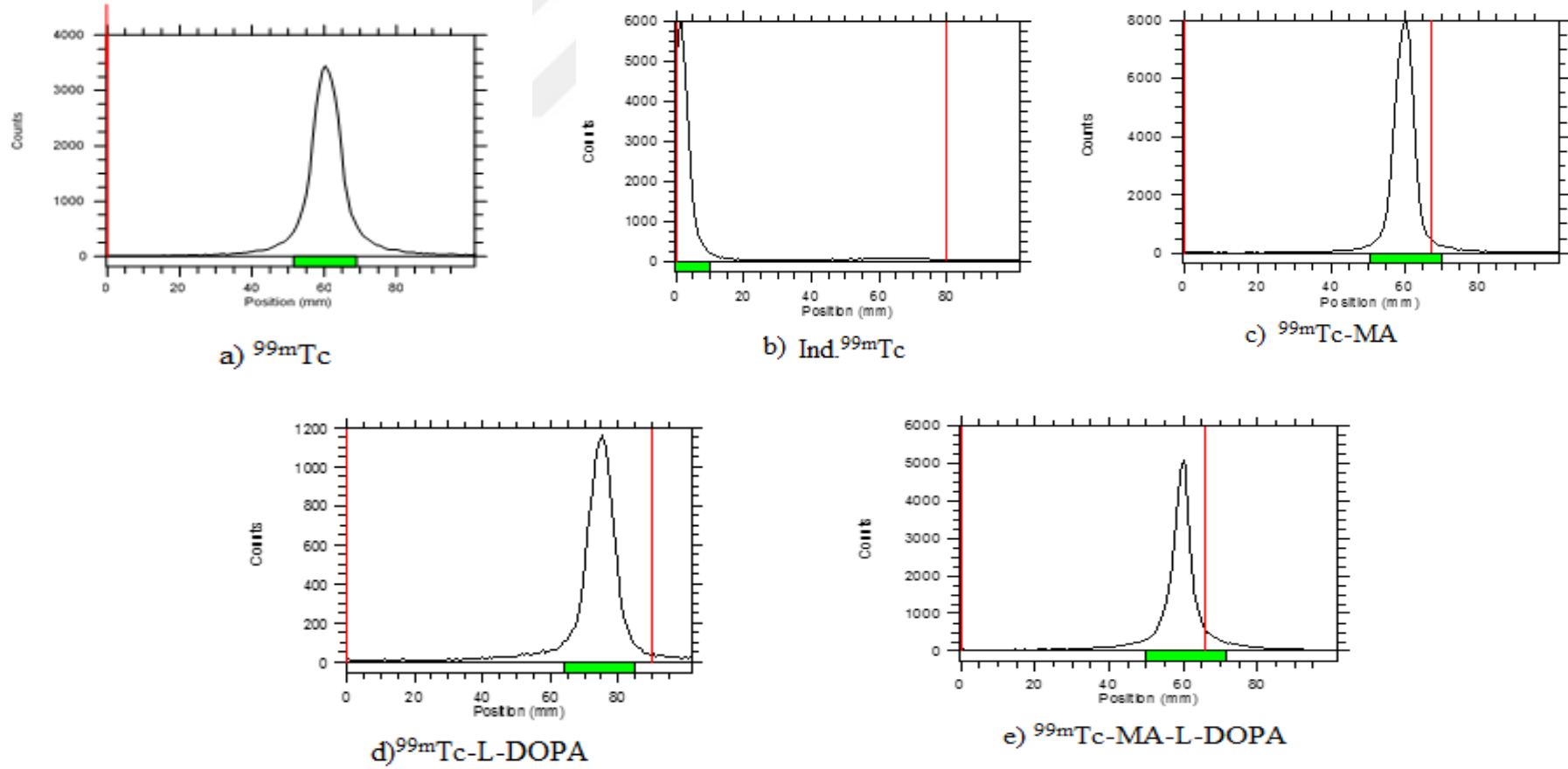
Tablo 4.4’deki radyoişaretleme verimleri incelendiğinde en iyi bağlanmanın pH:12 değerinde elde edildiği tespit edilmiştir. Radyoişaretli bileşenlere ($^{99m}\text{TcO}_4^-$, İnd. ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA) ait TLRC kromatogramları Şekil 4.10 ’da verilmiştir. MA bileşiğinin ^{99m}Tc ile radyoişaretleme verim 99,67±0,60 ve radyoişaretli bileşenler için Rf değerleri ise 0,876, 0,035 ve 0,905 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen radyoişaretleme

veriminin yüksek olması dolayısıyla diğer bileşikler de (L-DOPA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, L-DOPA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA) aynı prosedür izlenerek radyoişaretleme çalışmalarına tabi tutulmuş ve TLRC analizi yapılmıştır. L-DOPA bileşiğinin ^{99m}Tc ile işaretlenmesindeki verim $99,15 \pm 0,37$ olarak tespit edilmiştir. MA-L-DOPA bileşiğinin ^{99m}Tc ile işaretlenmesindeki verim $99,19 \pm 0,93$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan radyo işaretleme çalışmaları bir bütün olarak değerlendirildiğinde işaretleme verimlerinin $^{99m}\text{Tc-MA}$ ($\% 94,04 \pm 1,60$, $n=10$), $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ ($\%99,15 \pm 0,37$, $n=10$) ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ ($\%99,35 \pm 0,37$, $n=10$) olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar aşağıdaki Tablo 4.5’de sunulmuştur.

Tablo 4.5. Radyoişaretleli bileşiklerin % Bağlanma Verimleri.

R_f ve % Bağlanma Verimi					
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	İnd. ^{99m}Tc	$^{99m}\text{Tc-MA}$	$^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$	$^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$
R_f	0,87	0,03	0,91	0,83	0,90
Bağlanma Verimi (%)			$99,67 \pm 0,6$ 0	$99,15 \pm 0,37$	$99,19 \pm 0,93$

Literatürde hastalara uygulanacak ^{99m}Tc ile radyoişaretleli bir radyofarmasötüğün radyoişaretleme veriminin $\% 95$ seviyesinin üzerinde bir radyoişaretleme verimine sahip olması gerektiği belirtilmektedir (Saha, 2004). Dolayısıyla bir bütün olarak bakıldığında elde edilen $\%$ bağlanma verim değerlerinin belirtilen $\% 95$ ’in üzerinde olduğu görülmektedir.



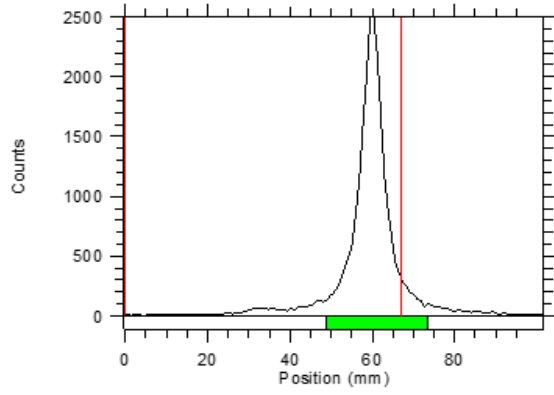
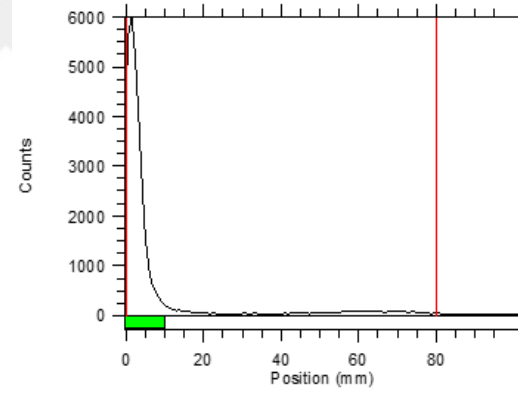
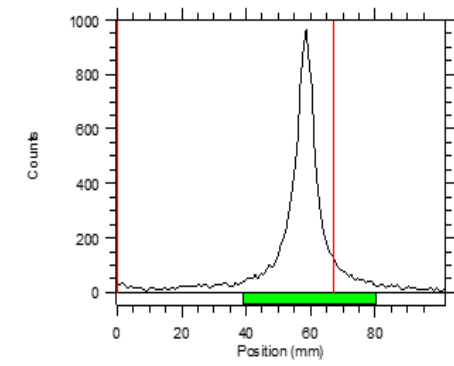
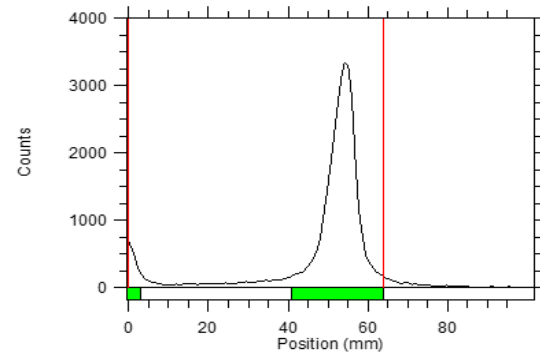
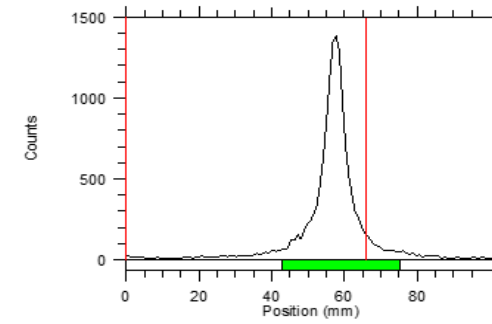
Şekil 4.10. Radyoişaretili bileşenlere ait TLRC kromatogramları.

[a) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, b) Ind. ^{99m}Tc , c) $^{99m}\text{Tc-MA}$, d) $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$, e) $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$]

Enkapsüle radyoişaretli bileşiklerin ($^{99m}\text{TcO}_4^-$, İnd. ^{99m}Tc , $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$) TLRC kromatogramları Şekil 4.11’de sunulmuştur. $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ bileşiğinin radyoişaretleme verimi $99,38 \pm 0,84$ olarak tespit edilmiştir. $^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$ bileşiğinin ^{99m}Tc ile işaretlenmesindeki verim $93,83 \pm 0,61$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan radyo işaretleme çalışmaları bir bütün olarak değerlendirildiğinde işaretleme verimlerinin $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ ($99,38 \pm 0,84$, $n=13$), $^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$ ($93,83 \pm 0,61$, $n=3$) ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ ($98,93 \pm 1,16$, $n=13$) olarak tespit edilmiştir. Sonuçlar Tablo 4.6’da sunulmuştur.

Tablo 4.6. Radyoişaretli enkapsüle bileşiklerin % Bağlanma Verimleri.

R_f ve % Bağlanma Verimi					
	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	İnd. ^{99m}Tc	$^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$	$^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$	$^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$
R_f	0,90	0,03	0,88	0,83	0,87
Bağlanma Verimi (%)			$99,38 \pm 0,84$	$93,83 \pm 0,61$	$98,93 \pm 1,16$

a) ^{99m}Tc b) Ind. ^{99m}Tc c) $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ d) $^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$ e) $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$

Şekil 4.11. Enkapsüle radyoişaretleli bileşenlerin TLRC kromatogramı.

[a) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, b) Ind. ^{99m}Tc , c) $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, d) $^{99m}\text{Tc-L-DOPA-PLGA}$, e) $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$]

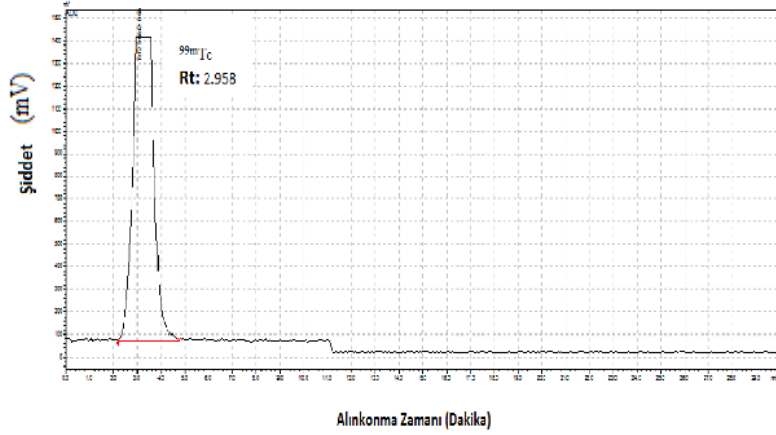
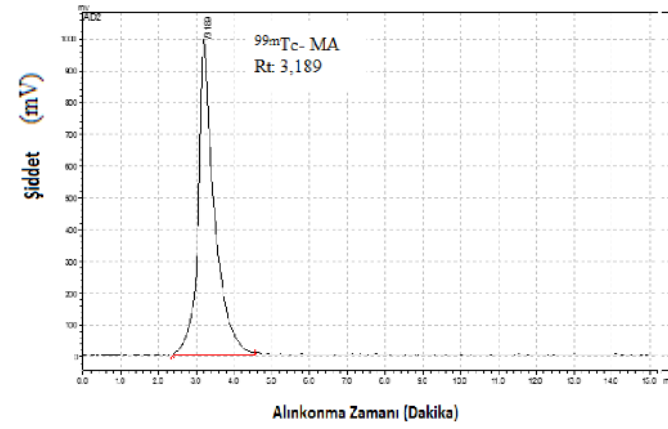
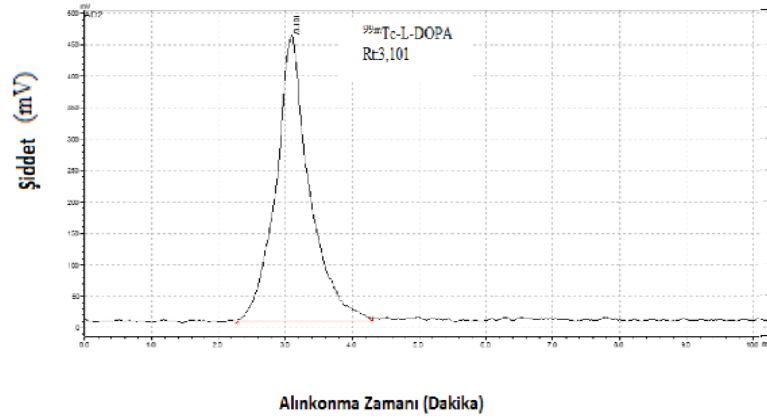
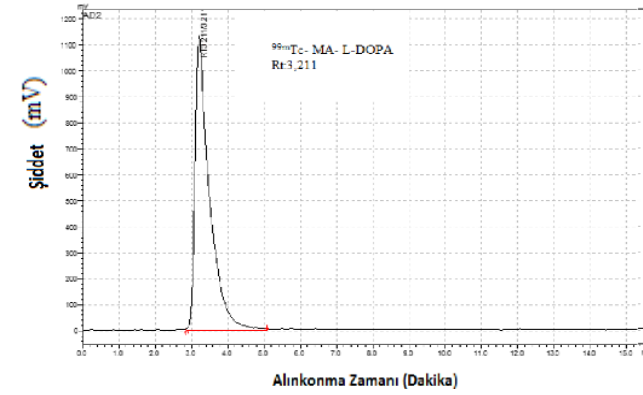
4.5.2. HPLRC Analiz Sonuçları

TLRC analizi sonrası ^{99m}Tc ile radyoişaretli bileşiklerin HPLRC analizleri de gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.6.2’de verilen koşullar kullanılarak HPLRC analizleri yapılmıştır. Radyoişaretli bileşiklere ait HPLRC kromatogramları ise sırasıyla Şekil 4.12’de verilmiştir.

Tablo 4.7. Radyoişaretli bileşiklere ait alıkonma zamanları (R_t).

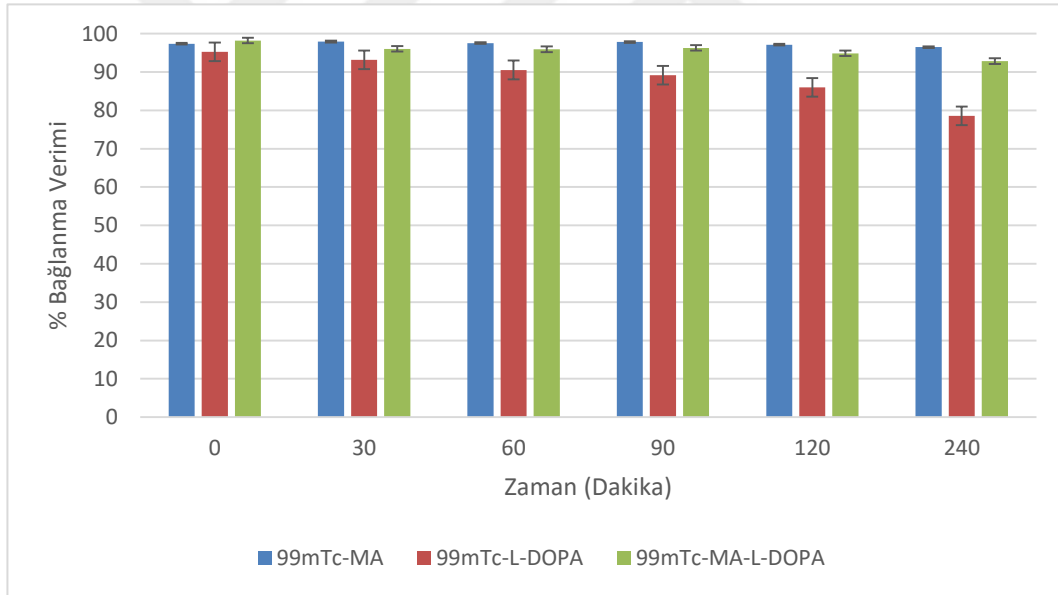
Bileşik	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{Tc-MA}$	$^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$	$^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$
(R_t)	2,96	3,19	3,10	3,21

$^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerine ait alıkonma süreleri Tablo 4.7’de verilmiştir. Radyoişaretli bileşenlere ait HPLRC kromatogramları incelendiğinde alıkonma zamanlarının farklı olması işaretleme için gerçekleştirildiği olarak yorumlanmaktadır.

a) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ b) $^{99m}\text{Tc-MA}$ c) $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ d) Tc-MA-L-DOPA Şekil 4.12. HPLRC analizlerine ait kromatogramlar a) $^{99m}\text{TcO}_4^-$, b) $^{99m}\text{Tc-MA}$, c) $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$, d) $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$

4.6. Stabilité Çalışmaları Sonuçları

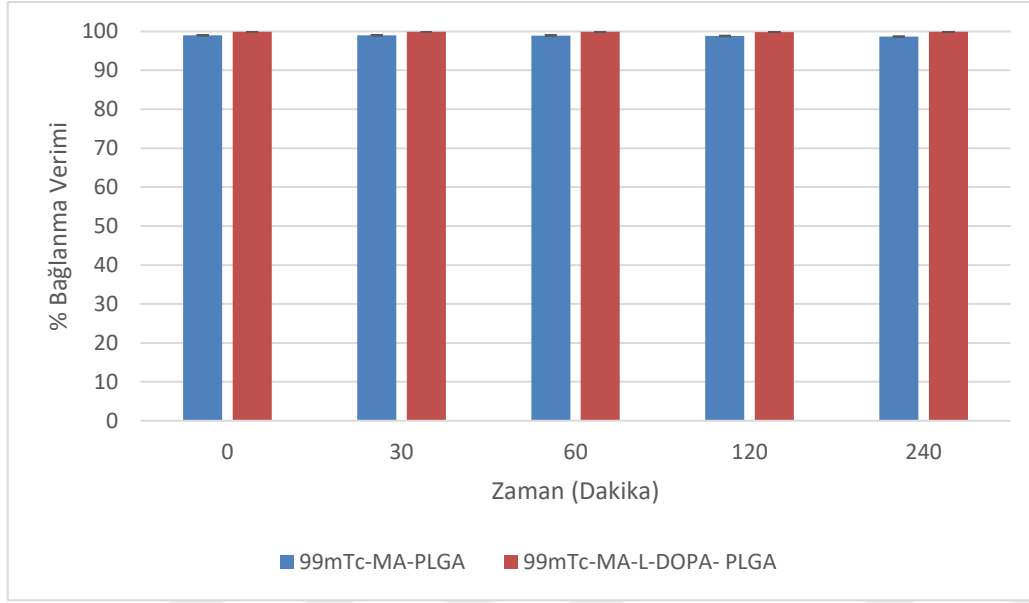
$^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ moleküllerinin kararlılık performansının incelenmesi amacıyla 0., 30., 60., 120. ve 240. dakikalarda Bölüm 3.8.3. de verilen prosedüre göre stabilite tayini çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tüm bileşiklerin herbir zaman parametresi için 3 tekrar (n=3) yapılmıştır. Şekil 4.13' de $^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerinin radyoişaretleme verimlerinin zamana göre değişimlerine ait grafik verilmiştir. Şekil 4.13 incelendiğinde radyoişaretleli bileşiklerin oda sıcaklığında yapılan stabilite çalışmalarında $^{99m}\text{Tc-MA}$ radyoişaretleli bileşiğinin 240 dakika boyunca bağlanma veriminde önemli bir değişiklik izlenmemiştir. 240. dakikadaki radyoişaretleme verimi $\% 96,61 \pm 2,36$ (n=3) olup literatürde görüntüleme ajanı olma şartlarında (Saha, 2004) belirtilen $\% 95$ seviyesinin üstünde olduğundan stabil kabul edilmiştir.



Şekil 4.13. Radyoişaretleli bileşiklerin radyoişaretleme verimlerinin zamanla değişimi.

Aynı şekilde $^{99m}\text{Tc-L-DOPA}$ radyoişaretleli bileşiğinde 30 dakika boyunca önemli bir değişiklik izlenmemesine rağmen 120. dakikada bağlanma verimi $\% 86,03 \pm 7,24$, 240. dakika sonunda ise $\% 78,57 \pm 8,17$ oranında kararlılık gösterdiği gözlenmiştir. $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, bileşiği ise 90 dakika boyunca önemli bir değişiklik izlenmemesine rağmen 120. dakikada bağlanma verimi $\% 94,90 \pm 2,20$ olup, 240. dakika sonunda ise $\% 92,86 \pm 2,36$ olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak

özellikle ^{99m}Tc -MA bileşiğinin zamana göre diğer radyoişaretli bileşiklere nazaran daha stabil olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca PLGA ile enkapsüle bileşiklerden *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda kullanılması planlanan ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA radyoişaretli bileşiklerin de aynı zaman parametrelerinde stabiliteleri incelenmiştir. Stabilitate tayini çalışmalarında elde edilen veriler Şekil 4.14'deki grafikte verilmiştir.



Şekil 4.14. Enkapsüle bileşiklerin radyoişaretleme verimlerinin zamanla değişimi.

Şekil 4.14 incelendiğinde enkapsüle radyoişaretli bileşiklerin oda sıcaklığında yapılan stabilite çalışmalarında ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiğinin 240 dakika boyunca bağlanma veriminde önemli bir değişiklik izlenmemiştir. 240. dakikadaki radyoişaretleme verimi % 99,86 ± 0,15 olup çalışma periyodu boyunca stabil olduğu görülmektedir. Aynı şekilde ^{99m}Tc -MA-PLGA bileşiğinde de 240. dakika sonundaki radyoişaretleme veriminin % 98,65 ± 0,40 olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak her iki enkapsüle radyoişaretli bileşiğin zamana göre % 95'in üzerinde radyoişaretleme verimine sahip oldukları görülmektedir.

4.7.Lipofilite Çalışma Sonuçları

Beyin araştırmalarında bir bileşiğin serbestçe KBB'yi geçebilme durumu birçok faktörden etkilenmesine rağmen bileşiğin lipid çözünürlüğüne, protein bağlama

kapasitesine, molekül büyüklüğüne ve yüküne bağlı bir değişkendir (Dischino et al., 1983; Mathis et al., 2004; Schwochau, 2000). Lipofilite tayininde üzerinde çalışılan bileşiğin, birbiri içinde karışmayan biri sulu, diğeri organik çözücüye geçiş oranı olarak ölçümü yapılır. Bu organik çözücüler içerisinde n-oktanol en çok tercih edilendir. Buna bağlı olarak lipofilite; $C_{\text{oktanol}}/C_{\text{su}}$ oranının logaritması alınarak tayin edilir (Theobald, 1989). Çalışmalarda elde edilen logP değerleri -1 ile +1 arasında ise üzerinde çalışılan bileşiğin bu aralıkta lineer olarak artan ve % 70'ten % 100'e kadar değişen KBB geçirgenliğine sahip olduğu bildirilmiştir (Dischino et al., 1983; Schwochau, 2000). $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiklerine ait deneysel ve teorik lipofilite değerleri Tablo 4.8'de verilmiştir.

Tablo 4.8. Radyoişaretle bileşiklere ait deneysel lipofilite değerleri.

Radyoişaretle Bileşik	Teorik Log P	Deneysel Log P
$^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$	$1,88 \pm 0,95$	$-0,60 \pm 0,01$
$^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$	$-0,22 \pm 0,32$	$-1,59 \pm 0,01$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$	-----	$1,52 \pm 0,01$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$	-----	$-0,69 \pm 0,28$
$^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$	-----	$-0,25 \pm 0,09$

Tablo 4.8'de görüldüğü gibi $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$, ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşikleri için deneysel olarak bulunan logP değerleri sırasıyla $-0,60 \pm 0,01$, $-1,59 \pm 0,01$, $-1,52 \pm 0,01$, $-0,69 \pm 0,28$ ve $-0,25 \pm 0,09$ olarak hesaplanmıştır.

Bu doğrultuda her üç radyoişaretle bileşiğin ($^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$) hidrofilik yapıda olduğu görülmüştür. Değerler literatürde verilen (Dischino et al., 1983; Schwochau, 2000) aralıklarla kıyaslandığında $^{99\text{m}}\text{Tc-MA}$, $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiklerinin -1 ve +1,5 aralığında olduğu görülmektedir. Özellikle PLGA ile enkapsüle bileşiklerin lipofilite değerleri karşılaştırıldığında PLGA yapısının

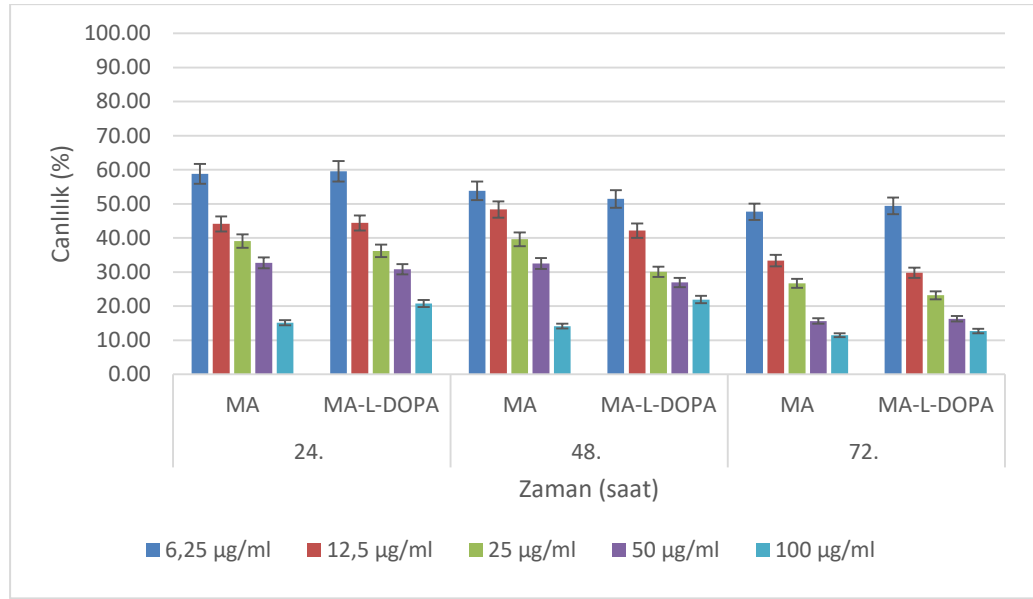
bileşiklerin lipofilitesinin artırılmasına pozitif etki sağladığı düşünülmektedir. PLGA'nın lipofiliteyi arttırdığı literatürden de bilinmektedir (Wang et al., 2016).

4.8. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

Parkinson hastalığının teşhis ve tedavisi için geliştirilen bileşiklerin *in vitro* olarak incelenmesinin çeşitli avantajları bulunmaktadır. Bunlar; (I) genetik ve farmakolojik müdahaleler açısından kültürdeki hücelere kolay erişim sağlanması, (ii) görüntüleme için hücre ve yaşama kabiliyetinin saptanması, çeşitli biyokimyasal tahlillerde, metabolik durum, protein agregatları ve diğer parametrelere kolay ve tekrarlanan erişim sağlanması, (iii) olası ilaçlar için yüksek verimli taramalara uygun olması ve (iv) uygulama yapılması planlanan hayvan sayısının minimum düzeye indirgenmesi gibi avantajlar çalışmalarda büyük yararlılık sağlamaktadır. Özellikle hastalık ile ilgili araştırmalarda mezensefalik dilim kültürleri, primer olgunlaşmamış dopaminerjik nöronlar ve ölümsüzleştirmiş hücre hatları kullanılmaktadır (Alberio et al., 2012; Falkenburger and Schulz, 2006). Parkinson Hastalığı ile ilgili araştırmalarda moleküler ve nörokimyasal parametreleri açısından insan nöroblastoma (SH-SY5Y) veya sıçan feokromasitoma hücre hatları (PC-12) tercih edilmektedir (Falkenburger and Schulz, 2006). Tez çalışması kapsamında yürütülen *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında SH-SY5Y ve PC-12 hücre hatları kullanılmıştır. Bu hücre hatları üzerinde MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin sitotoksosite çalışmaları ile ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin inkorporasyon çalışmaları yürütülmüştür. Söz konusu sitotoksosite ve inkorporasyon çalışmalarına ilişkin sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

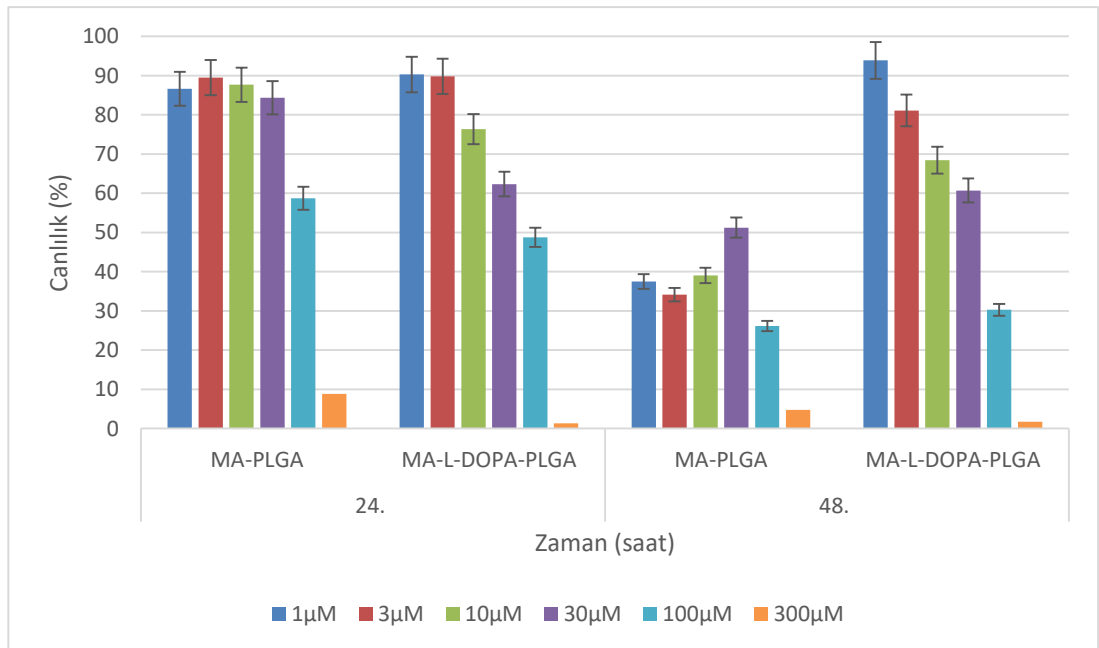
4.8.1. Sitotoksosite Çalışmalarına Ait Sonuçlar

MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmasıyla elde edilmiş olan hücrelerin canlılığındaki yüzde değişim, azalan konsantrasyonlara (μM) karşı ifade edilerek Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, SH-SY5Y hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.

Enkapsüle MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde yapılan sitotoksosite çalışmasıyla elde edilmiş olan hücrelerin canlılığındaki yüzde değişim, azalan konsantrasyonlara (μM) karşı ifade edilerek Şekil 4.16' da verilmiştir.



Şekil 4.16. MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, SH-SY5Y hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.

Şekil 4.15 ve Şekil 4.16 birlikte değerlendirildiğinde 6.25, 12.50, 25, 50, 100 μM konsantrasyonlardaki MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin SH-SY5Y hücresi üzerinde 24, 48 ve 72. saatlerdeki yüzde canlılık değerleri görülmektedir. Şekil 4.15 incelendiğinde tüm maddelerin artan konsantrasyon değerleri ile birlikte SH-SY5Y hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerinin arttığı görülmektedir. Literatür incelendiğinde L-DOPA ve türevlerinin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde sitotoksik etki gösterdiğine dair çalışmalara rastlanmaktadır (Denora et al., 2017; Lai and Yu, 1997; Trapani et al., 2017). Bu çalışmalarda da L-DOPA ve türevlerinin artan konsantrasyonları ile beraber SH-SY5Y hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkilerinin arttığı gözlenmektedir. Ayrıca yapılan analiz çalışmalardan elde edilen verilerden IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler ışığında hesaplanan IC_{50} değerleri de Tablo 4.9’da verilmiştir.

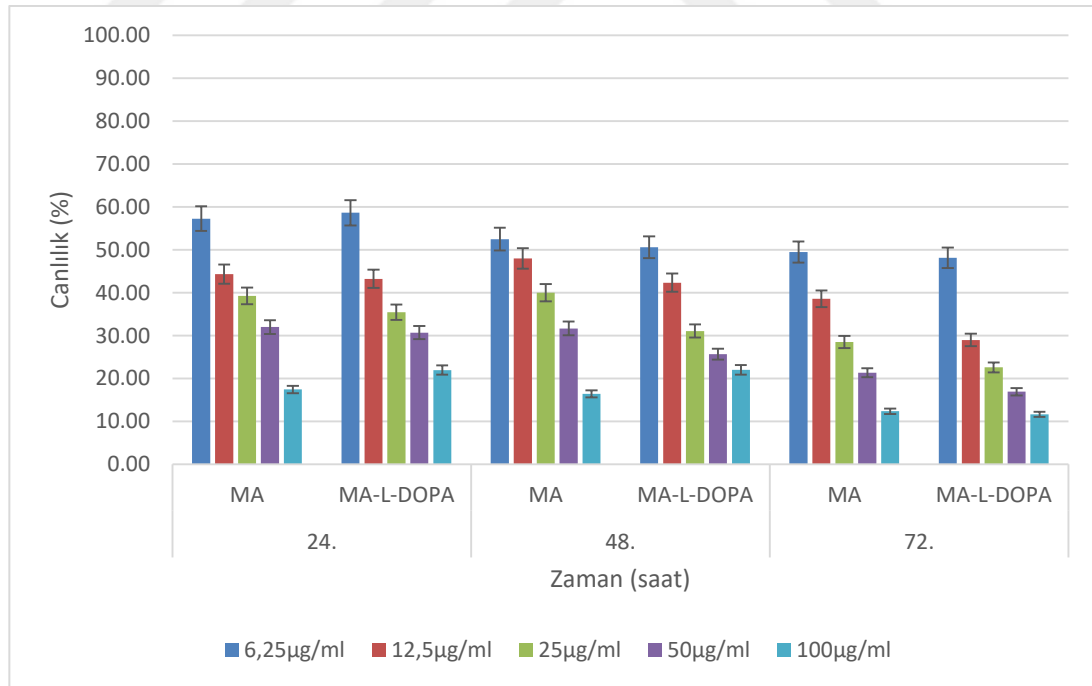
Tablo 4.9. MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin SH-

IC_{50} (μM) Değeri			
Zaman (Saat)			
Bileşik	24.	48.	72.
MA	12,94 $\pm$ 2,14	12,80 $\pm$ 2,24	7,45 $\pm$ 1,14
MA-L-DOPA	12,89 $\pm$ 2,09	10,13 $\pm$ 2,08	7,16 $\pm$ 1,11
MA-PLGA	55,51 $\pm$ 5,63	73,11 $\pm$ 2,34	
MA-L-DOPA-PLGA	86,79 $\pm$ 7,33	-----	

SY5Y hücre hattı üzerindeki IC_{50} (μM) değerleri.

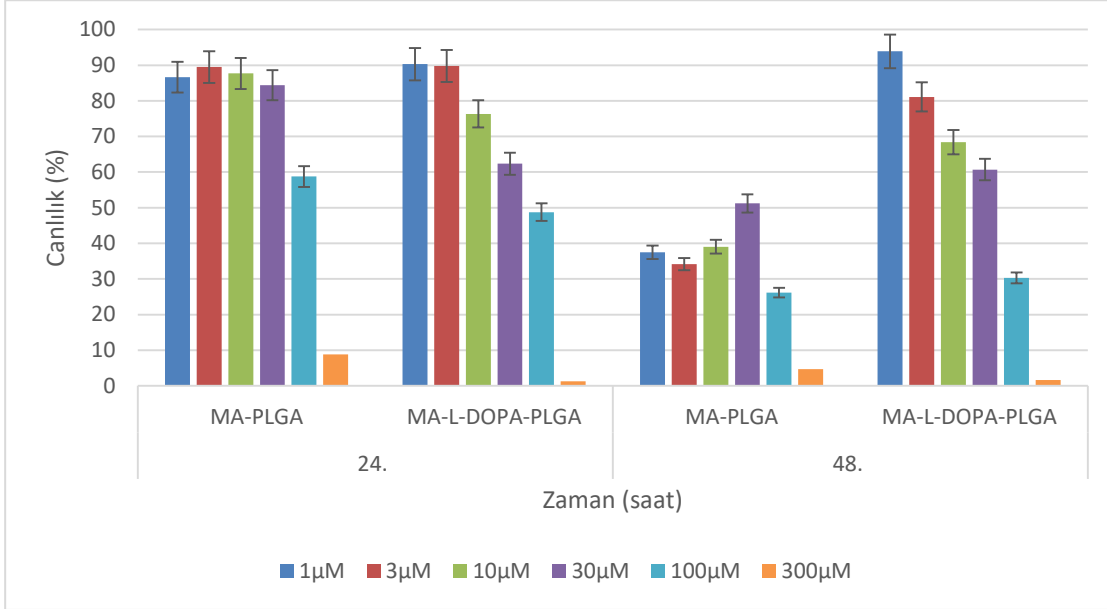
Şekil 4.15, Şekil 4.16 ve Tablo 4.9 birlikte incelendiğinde L-DOPA içeren MA-L-DOPA ve MA-L-DOPA-PLGA molekülleri içinde benzer sonuçlar ortaya çıkmaktadır. SH-SY5Y hücre hatları üzerinde yürütülen araştırmalarda MA bileşiğinin hücre hattı üzerinde serbet oksijen radikallerinin yol açtığı sitotoksik etkiyi azalttığına dair araştırmalarda mevcuttur (Du et al., 2014; Lokanathan et al., 2016; Mamun et al., 2014; Mamun et al., 2015; Rastogi et al., 2015). Şekil 4.15 bu perpektiften incelendiğinde MA bileşiğinin SH-SY5Y hücre hattındaki sitotoksik etkisinin MA-L-DOPA bileşiğine göre daha az olduğu görülmektedir. Bu durum L-DOPA molekülünün SH-SY5Y hücre hattı üzerinde artan konsantrasyonla beraber sitotoksik

etki göstermesi (Denora et al., 2017; Lai and Yu, 1997; Trapani et al., 2017), ancak MA molekülünün serbet oksijen radikallerinin yol açtığı sitotoksik etkiyi azaltması sonucu oluşan sitotoksik etkiyi azaltmasıyla (Du et al., 2014; Lokanathan et al., 2016; Mamun et al., 2014; Mamun et al., 2015; Rastogi et al., 2015) açıklanabilir. Şekil 4.14’de verilen grafiklerden MA bileşiği ile MA-L-DOPA bileşiğinin aynı konsantrasyondaki % canlılık değerleri karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmesi MA molekülünün L-DOPA molekülün sitotoksik etkisini azaltmasıyla açıklanabilir. Yine şekil 4.15 ve şekil 4.16 incelendiğinde MA ve MA-L-DOPA molekülleri MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA kıyaslandığında PLGA ile kaplı bileşiklerin aynı konsantrasyonlarda daha az sitotoksik etki gösterdiği görülmektedir. Bu durum PLGA yapısının biyobozunur olmasıyla (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011) açıklanabilir. PC-12 hücre hattı üzerinde de sitotoksikite çalışmaları yürütülmüştür. Şekil 4.17’de MA, MA-L-DOPA bileşiklerinin 6,25, 12,50, 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyon değerlerinde yüzde canlılık değerlerinin zamana karşı değişimi verilmektedir.



Şekil 4.17. MA ve MA-L-DOPA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, PC-12 hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.

Şekil 4.18’de MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin değişik konsantrasyonlardaki (1, 3, 10, 30, 100, 300 μ M) yüzde canlılık değerlerinin zamana karşı değişimi verilmektedir.



Şekil 4.18. MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, PC-12 hücresi üzerindeki yüzde canlılık değerleri.

Tablo 4.10’da ise PC-12 hücre hattı üzerinde MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin IC_{50} değerleri verilmiştir. Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Tablo 4.10 birlikte incelendiğinde artan konsantrasyonlarla beraber PC-12 hücre hattı üzerinde de sitotoksitenin arttığı gözlenmiştir. PC-12 hücre hattında L-DOPA molekülünün yüksek konsantrasyonlarda sitotoksik etki gösterdiğine dair literatürde çalışmalarda mevcuttur (Cambonie et al., 2000; Migheli et al., 1999; Walkinshaw and Waters, 1995).

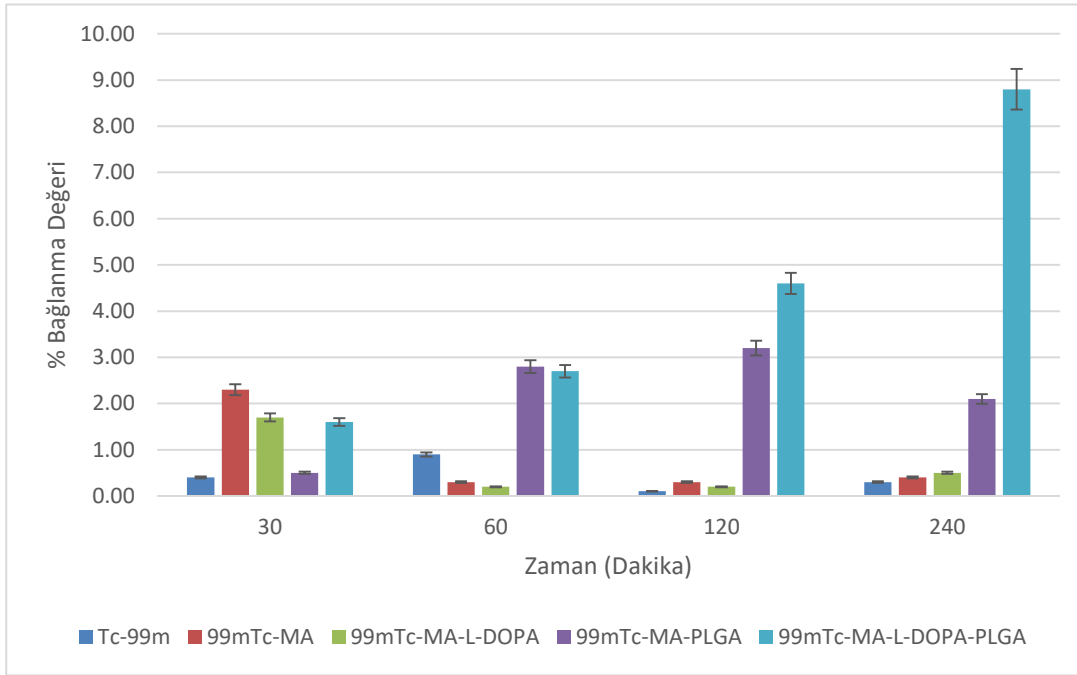
Tablo 4.10. MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin PC-12 hücre hattı üzerindeki IC₅₀ (μM) değerleri.

IC ₅₀ (μM) Değeri			
Madde	Zaman (Saat)		
	24.	48.	72.
MA	12,82±2,21	12,63±2,41	8,54±1,37
MA-L-DOPA	12,49±2,21	10,03±2,06	6,93±1,09
MA-PLGA	105,3 ± 3,23	-----	
MA-L-DOPA-PLGA	50,38 ± 14,96	31,25 ± 10,40	

MA bileşiği ile MA-L-DOPA bileşiklerinin PC-12 hücre hattı üzerinde canlılık düzeyinde benzer etkilere sahip olduğu görülmektedir. Bu durum MA bileşiğinin L-DOPA bileşiğinin oluşturduğu toksik etkiyi azalttığı şeklinde yorumlanmaktadır. Özellikle de MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin toksik etkilerinin MA ve MA-L-DOPA bileşiklerine göre daha az olması da dikkate değer bir bulgu olarak değerlendirilmektedir. Bu durum PLGA yapısının biyobozunur olmasıyla literatürde de yer aldığı üzere (Danhier et al., 2012; Makadia and Siegel, 2011) açıklanabilir.

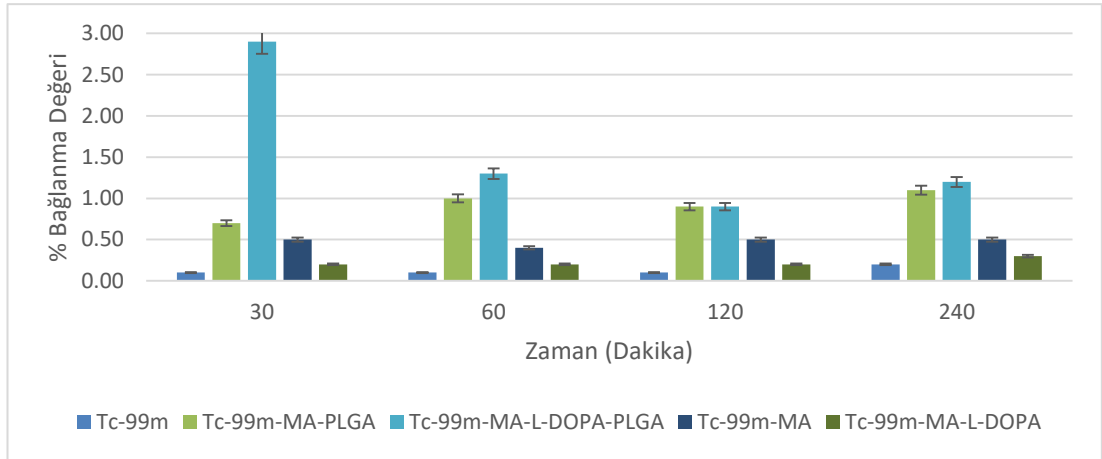
4.8.2. İnkorporasyon Çalışmalarına Ait Sonuçlar

Tez çalışması kapsamında yürütülen inkorporasyon çalışmaları SH-SY5Y ve PC-12 hücre hatları üzerinde ^{99m}Tc, ^{99m}Tc-MA, ^{99m}Tc-MA-L-DOPA, ^{99m}Tc-MA-PLGA, ^{99m}Tc-MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin % bağlanma değerleri incelenerek gerçekleştirilmiştir. İnkorporasyon süreci bölüm 3.9.3’de verilen prosedüre göre yürütülmüştür. Yapılan deneysel işlemlerde elde edilen ^{99m}Tc, ^{99m}Tc-MA, ^{99m}Tc-MA-L-DOPA, ^{99m}Tc-MA-PLGA, ^{99m}Tc-MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin SH-SY5Y hücresindeki bağlanma etkinliğinin zamanla % değişimi Şekil 4.19’da yer almaktadır.



Şekil 4.19. Radyoişaretli bileşiklerin SH-SY5Y hücre hattı üzerinde % bağlanma değerlerinin zamana göre değişimleri.

Şekil 4.19 incelendiğinde $^{99m}\text{Tc-MA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerinin 30. dakika sonrasında % bağlanma değerlerinin $2,3 \pm 0,8$ seviyelerinden $0,5 \pm 0,1$ seviyesine azaldığı görülmektedir. Ancak PLGA ile enkapsüle $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ bileşiğinin 30. dakika sonrasında % bağlanma değerinin $0,5 \pm 0,1$ seviyesinden $3,2 \pm 0,8$ 'ye kadar yükseldiği, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiği ise 30. dakika sonrasında % bağlanma değerlerinin $1,6 \pm 0,3$ seviyesinden $8,8 \pm 0,8$ seviyesine arttığı tespit edilmiştir. Bu iki durum kıyaslandığında PLGA ile enkapsülasyonun hücredeki tutulumu artırdığı söylenebilir. PLGA ile enkapsüle edilmiş bileşiklerin tutulumu artırmalarının, PLGA'nın biyoyumlu olmasından (Makadia and Siegel, 2011) kaynaklandığı düşünülmektedir. ^{99m}Tc ile radyoişaretli bileşikler kıyaslandığında 30. dakikada $^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ radyoişaretli bileşiklerin anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha fazla tutulum gösterdikleri görülmüştür. 30. dakikadan sonra ise enkapsüle $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiklerinde anlamlı bir fark görülmektedir. ^{99m}Tc , $^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiklerinin PC-12 hücresindeki bağlanma etkinliğinin zamanla % değişimi değerleri Şekil 4.20'de yer almaktadır.



Şekil 4.20. Radyoişaretli bileşiklerin PC-12 hücre hattı üzerinde % bağlanma değerlerinin zamana göre değişimleri.

Şekil 4.20 incelendiğinde 30. dakikada en yüksek % bağlanma değeri ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiğinde olduğu ($\%2,90 \pm 0,20$) görülmektedir. Bu bileşikte de 30. dakika sonrasında % bağlanma değerlerinin $\%0,90 \pm 0,10$ seviyesine kadar azaldığı görülmektedir. ^{99m}Tc ile radyoişaretli bileşikler kıyaslandığında 30. dakikada ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA ve ^{99m}Tc -MA-PLGA radyoişaretli bileşiklerin fazla tutulum göstermedikleri görülmüştür ($p > 0,05$). Tutulumun ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiğinde daha yüksek çıkması PLGA ile enkapsülasyonun hücredeki tutulumu artırdığını göstermektedir. Bu durum PLGA ile enkapsüle edilmiş bileşiklerin tutulumu artırmalarının, PLGA'nın biyouyumlu olmasından (Makadia and Siegel, 2011) kaynaklandığı düşündürmektedir.

Her iki hücre hattı birlikte değerlendirildiğinde SH-SY5Y ve PC-12 hücrelerinde, özellikle PLGA ile enkapsüle bileşiklerin tutulum değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı olduğu söylenebilir. Benzer sonuçlar Kılçer'in (2013) yapmış olduğu çalışmada da görülmektedir. Kılçer (2013) yapmış olduğu çalışmada DAOY, U87-MG ve A-549 hücreleri üzerinde ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -H, ^{99m}Tc -BH ve ^{99m}Tc -BH-PLGA bileşiklerinin tutulumlarını incelemiş ve en yüksek tutulumun tüm hücre hatlarında ^{99m}Tc -BH-PLGA bileşiğinde görüldüğünü belirtmiştir. Bu durumun enkapsülasyon materyali olarak kullanılan PLGA'dan kaynaklandığı düşünülmüştür. Buradan yola çıkarak SH-SY5Y ve PC-12 hatları üzerinde PLGA ile enkapsüle bileşiklerin daha fazla tutulum gösterdiği ve bu durumun PLGA'nın literatürde belirtilen biyouyumluluk (Makadia and Siegel, 2011) özelliğinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

4.9. *In Vivo* Çalışmalar

In vivo çalışmalar kapsamında ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin Sprague Dawley sıçanları üzerinde biyodağılımlar çalışmaları yapılmıştır. MA bileşiğinin sıçanlarda beyin dokusundaki tutulumunun 1 saat içerisinde gerçekleştiğinden (Anukunwithaya et al., 2017) zaman parametresi 60 dakika olarak belirlenmiştir. Çalışmada aynı zamanda rotenone kullanılarak sterotaksik girişimle deneysel Parkinson Modeli (n=7) oluşturulmuştur. Herhangi bir girişim uygulanmayan sağlıklı Sprague Dawley sıçanları ise kontrol grubu (n=12) olarak kullanılmıştır.

4.9.1. Sterotaksik Girişim

In vivo çalışmalar ile ilgili literatür incelendiğinde ise Parkinson modeli olarak kullanılan hayvan modelleri, toksin bazlı modeller, genetik mutasyona bağlı modeller ve bunların ikisinin birlikte kullanıldığı modeller olmak üzere üç ana grupta ele alınmaktadır (Blesa and Przedborski, 2014). Özellikle toksin bazlı modeller incelendiğinde belirli toksinlerle oluşturulan modeller ön plana çıkmaktadır. MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6- tetrahydropyridine) kullanıldığı fare ve maymunlar (Blesa and Przedborski, 2014; Huang et al., 2015; Imai et al., 2011; Li et al., 2016), 6-OHDA (6-Hydroxydopamine hydrochloride) kullanılan sıçanlar (Morales et al., 2015) ve rotenone kullanılan fare modelleri (Erbaş et al., 2015; Wrangel et al., 2015) *in vivo* çalışmalarda sıkça kullanılan modellerdendir. Tez çalışmamızda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim dalında rotenone kullanılarak sıçanların beyinlerindeki SNc bölümünde dejenerasyon yapılarak hayvan modeli oluşturulmuştur (Erbaş et al., 2015; Erbaş et al., 2016; Erbaş et al., 2013; Terzi et al., 2004). Sterotaksik girişim deneyleri bölüm 3.10.1’de verilen prosedüre gerçekleştirilmiştir. Stereotaksik rotenon infüzyonlarından 10 gün sonra sıçanlara dönme davranışını indüklemek için apomorfin hidroklorür (2 mg / kg, i.p.) enjekte edilmiştir. Apomorfin çözeltisi, oksidasyon etkisini en aza indirmek için deneme öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. 10 dakikalık bir sürede tam 360° dönüş gözlenen tek taraflı dönüşler tüm hayvanlar için kayıt altına alınmıştır. Tek yönlü olarak dakikada 7 devirden fazla dönen sıçanlar, PH modeli olarak başarılı kabul edilmiştir (Erbaş et al., 2015; Jin et al., 2008). Dakikada 7’den fazla tek yönlü dönüş gösteren hayvanlar, bu durumdaki motor

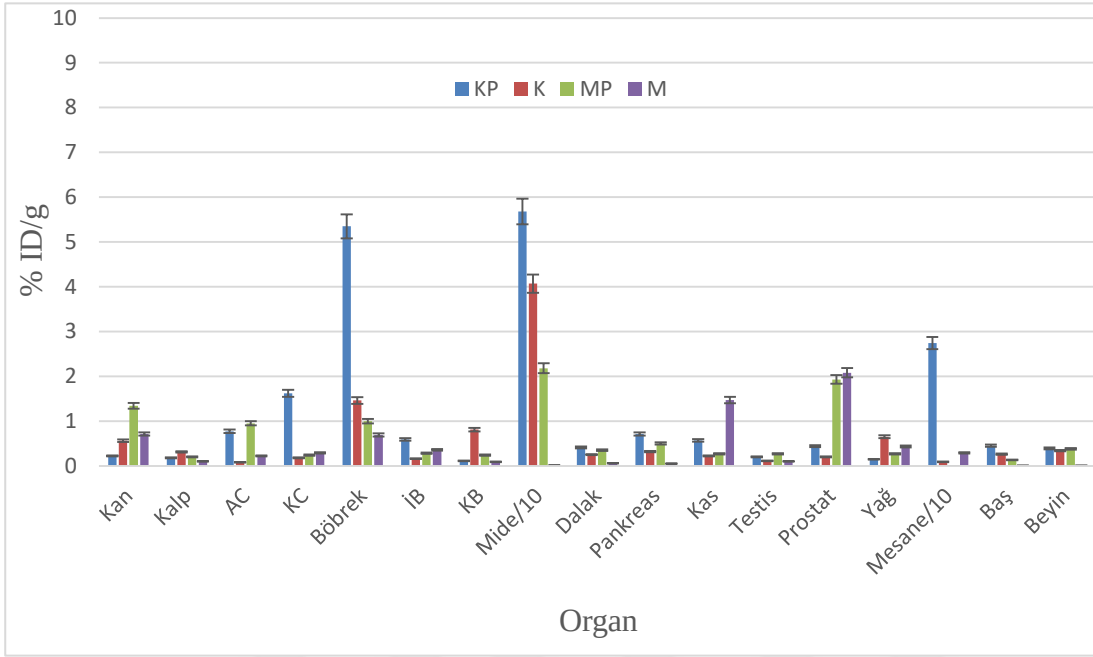
hareketlerindeki değişimlerle beraber değerlendirildiğinde Parkinson modeli olarak kabul edilmiştir. Bu süreç zarfında sıçanların sağlık durumlarında motor fonksiyonlarında bozukluk ve tremor gözlenmiştir. şekil 4.21’de sterotaksik girişime ait bir görsel verilmektedir.



şekil 4.21. Sterotaksik girişim uygulamalarına ait bir görsel.

4.9.2. Biyodağılım alışmaları

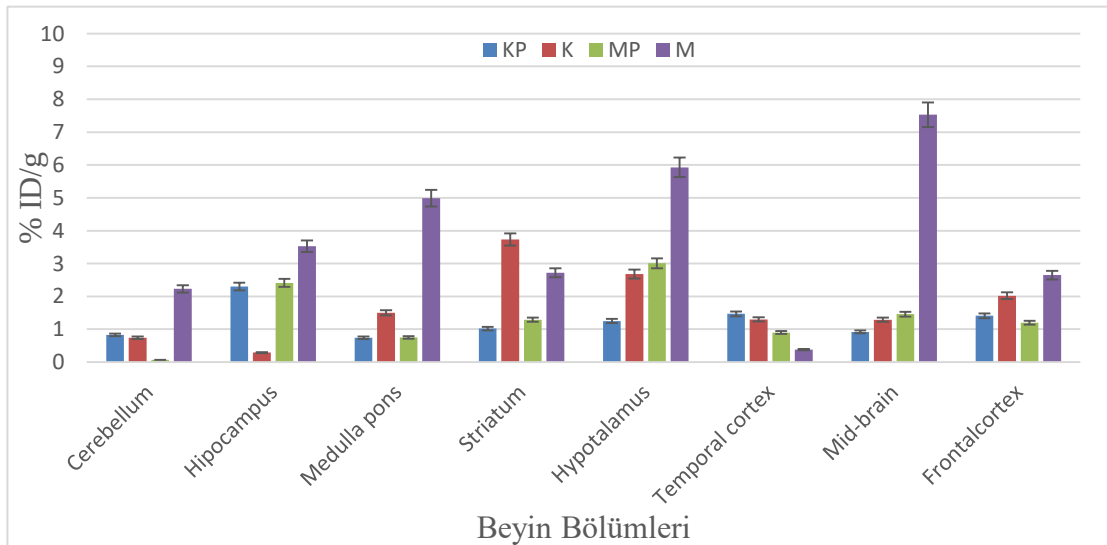
Herhangi bir deneysel işlem yapılmayan (kontrol grubu, n=12) sağlıklı erkek Sprague Dawley sıçanları üzerinde yapılan biyodağılım çalışmasında $^{99m}\text{Tc-MA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ radyoişaretli bileşiklerin organlar üzerindeki tutulumları incelenmiştir. nc bölümde verilen prosedüre göre gerçekleştirilen çalışmada radyoişaretli bileşiklerin organlara ait %ID/g grafikleri şekil 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.22. Kontrol grubu sıçanlarda radyoişaretle bileşiklerinin bazı organlardaki zamana bağlı biyodağılımı. (M- $^{99m}\text{Tc-MA}$, MP- $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, K- $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, KP- $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$).

Şekil 4.22 incelendiğinde $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin organlar içerisinde en çok prostat ve kas dokusunda tutulduğu görülmektedir. Böbrek, kan, yağ, ince bağırsak, kalın bağırsakta da tutulum göstermektedir. Literatürde MA bileşiğinin sıçanlar üzerinde biyodağılımını içeren çalışmalara rastlanmaktadır (Leng et al., 2013; Diniz et al., 2008). Leng ve arkadaşlarının (Leng et al., 2013) Sprague Dawley sıçanları üzerinde yapmış oldukları çalışmada MA bileşiğinin karaciğer, böbrek, kalp, dalak ve akciğerde yaygın olarak dağıldığını, özellikle de karaciğer ve böbrekteki tutulumunun daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bunun nedeni olarak da MA'nın kan ile dağıldığını ve özellikle kan akış hızı ile perfüzyon hızının biyodağılımı etkileye anahtar faktör olduğunu belirtmişlerdir. Diğer bir çalışma ise (Diniz et al., 2008) tarafından yapılan çalışmadır. Wistar sıçanları üzerinde MA bileşiğinin ana component olduğu Centella Asiatica (CA) bitki özütü uygulanmasından 1 saat sonra $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (Sodyum Perteknatat)'ın dağılımı incelenmiştir. CA ekstraktı ile akut tedavinin beyin haricindeki çeşitli organ ve dokularda (dalak, kalp, duodenum, mide, karaciğer, kas, böbrek, testis ve kan) $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (Sodyum Perteknatat) biyodağılımını anlamlı derecede değiştirdiğini ($p < 0.05$) göstermişlerdir. Bu çalışmalar (Leng et al., 2013; Diniz et al., 2008) ve Şekil 4.22 birlikte değerlendirildiğinde sonuçların benzer olduğu

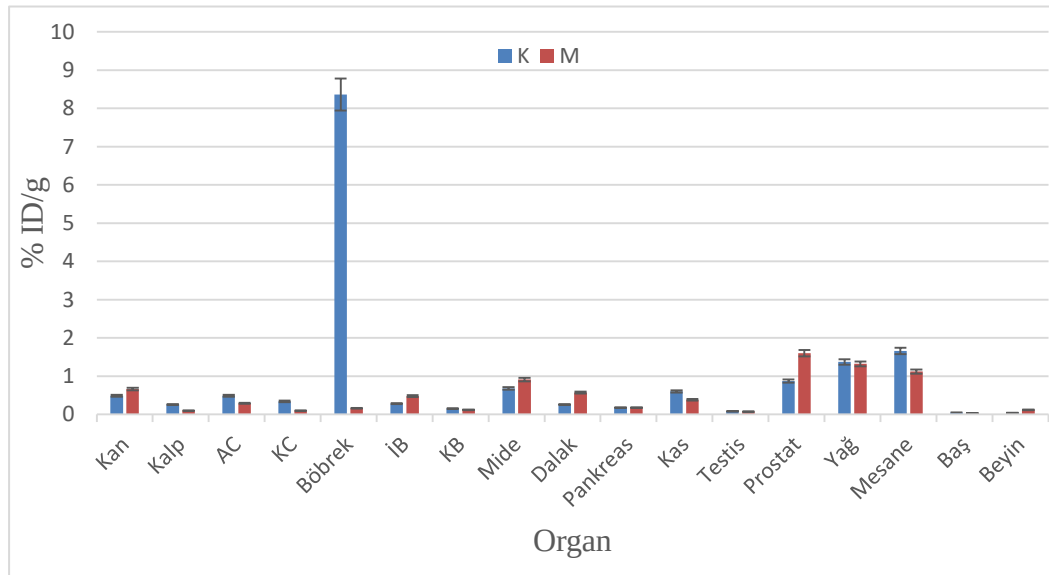
görülmektedir. L-DOPA ile konjuge $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ sonuçları kıyaslandığında ise mide ($\%4,07\pm0,19$) ve böbrekte ($\%1,46\pm0,67$) tutulumun daha fazla olduğu görülmektedir. Araştırmalar L-DOPA'nın gastrointestinal sistem, böbrek ve karaciğerde metabolize edildiğini göstermektedir (Halkias et al., 2007). Bu durum L-DOPA ile konjuge $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ mide ve böbrekteki tutulumun daha fazla olmasının nedeni olarak değerlendirilmektedir. Enkapsüle yapılar incelendiğinde $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$ bileşiğinin en çok mide ($\%5,35\pm0,63$), böbrek ($\%5,68\pm0,72$) ve mesanede ($\%2,78\pm0,65$) tutulum gösterdikleri görülmektedir. Özellikle $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ ile kıyaslandığında bu organlardaki tutulumun anlamlı derecede ($p < 0,05$) daha yüksek olduğu görülmektedir. $^{99m}\text{Tc-MA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ bileşikler kıyaslandığında ise kan ($\%1,34\pm0,15$) ve mide ($\%2,18\pm0,22$) dokusunda $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ bileşiğinin daha yüksek tutulum değerine sahip olduğu, diğer dokularda ise anlamlı bir farkın olmadığı görülmektedir. Genel olarak bakıldığında PLGA ile enkapsüle bileşiklerin kapsüle edilmemiş bileşiklerle kıyaslandığında ise böbrek ($\%5,35\pm0,63$) ve midede ($\%5,68\pm0,72$) daha fazla tutulum gösterdikleri görülmektedir. Bu durumun biyobozunur yapıdaki PLGA ile ilişkisi olduğu söylenebilir. Çünkü PLGA kullanılan ilaç taşıma sistemlerinde PLGA yapısının yoğun olarak karaciğer, böbrek ve beyinde tutulum yaptığı bilinmektedir (Semete et al., 2010). Şekil 4.23'de ise radyoışaretli bileşiklerin Sprague Dawley sıçanların beyin çeşitli bölümlerine ait %ID/g-zaman grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.23. Kontrol grubu sıçanlarda radyoışaretli bileşiklerinin beyin kısımlarında zamana bağlı biyodağılımı. (M- $^{99m}\text{Tc-MA}$, MP- $^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$, K- $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$, KP- $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$).

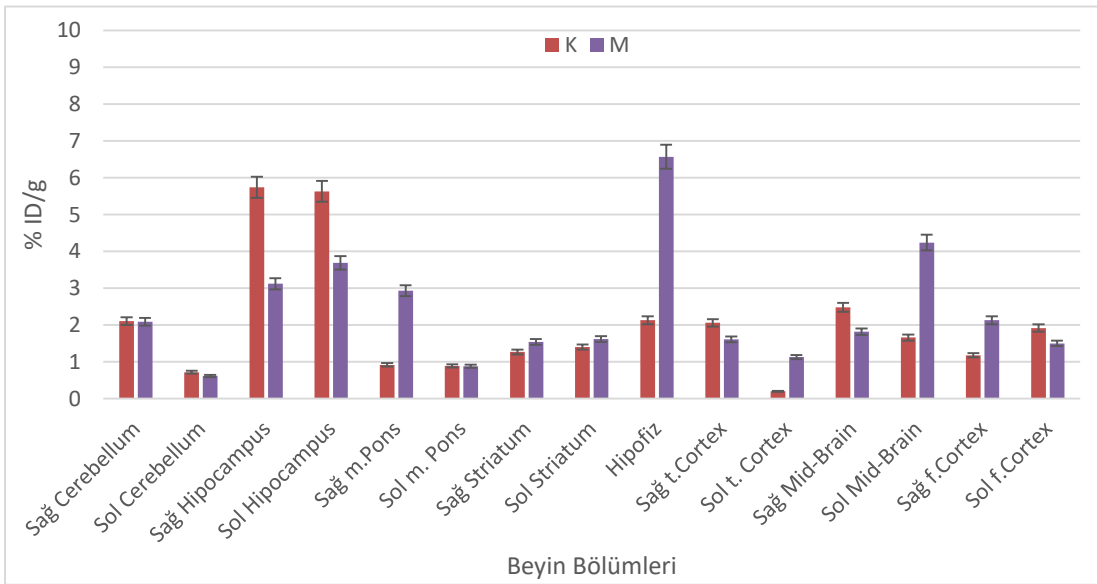
Şekil 4.23 incelendiğinde $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin en yüksek mid-brain (orta-beyin), hipotalamus, medulla pons, hipokampus, striatum, frontal korteks ve cerebellumda tutulduğu görülmektedir. Özellikle bunların içersinde orta-beyin kısmı daha ön plandadır. Bunun nedeni dopaminerjik nöronların yoğunluklu olarak orta-beyindeki SNc bölümünde ve ventral tegmental alanda olmasından (Horstmann et al., 2015) kaynaklandığı düşünülmektedir. $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin dopamin ile ilişkisi gözönüne alındığında sonuçların beyindeki dopamin yollarıyla ilişkisi incelenmelidir. Beyinde dopaminin yer aldığı üç temel yolak vardır. Bunlar nigrostriatal, mezolimbik ve mezokortikal yollarlardır. Nigrostriatal yolak beyin SNc bölümünden dorsal striatuma dopaminerjik girdi sağlamakta ve çoğunlukla motor kontrolü ve alışkanlıklar gibi otomatik uyarıcı-yanıt bağlantılarının oluşumu ile ilişkilendirilmektedir. Mezolimbik yolak ise ventral tegmental alandan (VTA) ventral striatumdaki limbik sisteme, yani amigdala, hipokampus ve prefrontal kortekse (PFK) aktarıldığı çekirdek akümülatlarına (NAcc) gitmektedir. Mezokortikal yolak ise VTA'dan frontal kortekse doğrudan dopaminerjik girdi sağlamaktadır (Ríos et al., 2016; Horstmann et al., 2015). Elde edilen sonuçlarda $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin en yüksek mid-brain (orta-beyin) ($7,53 \pm 0,53$) tutulduğu görülmektedir. Bunun sebebi dopaminerjik nöronların yoğunluğunun beyin SNc ve VTA bölümlerinin orta beyinde bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Diğer taraftan dopamin yollarında yer alan hipokampus, striatum ve frontal kortekste bulunması da anlamlı görülmektedir. Ancak striatum bölgesine bakıldığında $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiğinin daha fazla tutulum ($3,73 \pm 0,49$) gösterdiği görülmektedir. Ancak hipotalamus, medulla pons ve cerebellumda tutulması $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin beyindeki tutulum mekanizmasında dopaminerjik sistemden daha geniş bir yayılım göstermesi dikkat çekicidir. Bunun sebeplerini anlamak amacıyla rotenone enjeksiyonu ile dopaminerjik nöronların yoğun olduğu SNc bölümünde dejenerasyon yapılan ve çalışmamızda Parkinson hayvan modeli olarak adlandırılan sıçanlar üzerinde bir biyodağılım çalışması daha yapılması ihtiyacı doğmuştur. Enkapsüle bileşiklerin beyin araştırmalarındaki ilaç taşınmasına yönelik çalışmalarda daha etkin oldukları raporlanmıştır (Danhier et al., 2012; Gambaryan et al., 2014; Li and Sabliov, 2013; Makadia and Siegel, 2011; Şimşek, 2010; Zhou et al., 2013). Daha etkin olması beklenirken daha az tutulum göstermelerinin nedeni incelendiğinde MA ve MA-L-DOPA bileşiğinin daha fazla yüzey modifikasyonuna ihtiyacı olduğu düşünülmektedir. Çünkü Li ve Sabliov (2013) tarafından yapılan bir araştırmada

PLGA ve PLA ile enkapsüle edilmiş bileşiklerin modifiye edilmedikleri takdirde KBB'yi geçmekte zorlandıklarını rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada PLGA ve PLA ile kaplı nanoparçacıkların sıçanlar veya fareler üzerinde oral, karotid arter ve intravenöz uygulamalarla verildiği ve modifiye edilmemiş PLGA / PLA nanoparçacıklarının çok düşük (<% 1) beyin alımı gösterdiği ifade etmişlerdir. Ayrıca yüzey kaplama ve hedefleme ligandlarının eklenmesi gibi yüzey modifikasyonları uygulanmış olan PLGA nanoparçacıkların, modifiye edilmemiş PLGA nanoparçacıklarına kıyasla ilaçların beyin iletimini geliştirdiğini belirtmişlerdir. Özellikle de parçacıkların yüzeyine kovalent olarak bağlanan ligandlar, nanoparçacıkların beyin alımını en çok geliştiren etki olduğu ifade etmişlerdir. Bu açıdan bakıldığında tez çalışmasında kullanılan enkapsüle bileşiklerin ($^{99m}\text{Tc-MA-PLGA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA-PLGA}$) modifiye edilmesi gerektiği düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda bu bileşiklerin optimize edilmesiyle beyine daha fazla penetre olacağı öngörülmektedir. Ancak enkapsüle bileşikler diğer işaretli bileşiklerle kıyaslandığında ikinci biyodağılım çalışmasına dahil edilmemişlerdir. Biyodağılım çalışmalarının ikinci aşamasında Parkinson modeli üzerinde $^{99m}\text{Tc-MA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerinin biyodağılımı incelenmiştir. Bölüm 3.10.2'de verilen prosedüre göre gerçekleştirilen çalışmada radyoişaretli bileşiklerin Parkinson modeli hayvanlardaki organlara ait %ID/g-zaman grafikleri Şekil 4.24'de verilmiştir.



Şekil 4.24. Parkinson modeli sıçanlarda radyoişaretli bileşiklerinin bazı organlardaki zamana bağlı biyodağılımı. (M: $^{99m}\text{Tc-MA}$, K: $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$).

Şekil 4.24 incelendiğinde $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin organlar içerisinde en çok prostat ($\% 1,60 \pm 0,67$), mesane ($\% 1,12 \pm 0,56$), yağ ($\% 1,32 \pm 0,35$) dokusunda tutulduğu görülmektedir. Mide, dalak, kan, kas, ince bağırsak ve akciğerde de tutulum göstermektedir. Kontrol grubu verileri (Şekil 4.22) ile kıyaslandığında anlamlı bir fark göze ($p > 0,05$) çarpmamaktadır. Literatürde MA bileşiğinin sıçanlar üzerinde biyodağılımını içeren çalışmalarla (Leng et al., 2013; Diniz et al., 2008) paralel sonuçlar çıkmaktadır. $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ incelendiğinde ise en yüksek tutulum değerinin belirgin bir farkla böbrekte ($\% 8,36 \pm 0,85$) olduğu görülmektedir. Diğer taraftan mesane ($\% 1,66 \pm 0,28$), yağ ($\% 1,37 \pm 0,17$) ve prostatta ($\% 0,87 \pm 0,12$) da anlamlı bir tutulum göze çarpmaktadır. Sonuçlar kontrol grubu verileri (Şekil 4.22) ile kıyaslandığında ise büyük oranda benzerlik göstermektedir. Böbrekteki yoğun tutulumun ise L-DOPA'nın gastrointestinal sistem, böbrek ve karaciğerde metabolize edildiğinden (Halkias et al., 2007) kaynaklandığı düşünülmektedir. Beyin kısımlarındaki tutulum incelenirken sterotaksik girişim yapılan beynin SNc bölümü (AP: 5,2 mm, L: 2,4 mm, V: 8mm) beynin sağ kısmında olduğundan ve orada rotenone enjeksiyonu ile dejenerasyon yapıldığından beyin dokuları sağ ve sol olarak iki ayrı kısımda incelenmiştir. Sadece bu yapılardan hipotalamus kısmı yerine hipofiz kısmı ele alınmış bu doku ise ikiye ayrılamadığından bir bütün olarak ele alınmıştır. Şekil 4.25'de radyoişaretli bileşiklerin Parkinson modeli sıçanlardaki beyin kısımlara ait %ID/g-zaman grafikleri verilmiştir.



Şekil 4.25. Parkinson modeli sıçanlarda radyoişaretli bileşiklerinin beyin kısımlarında zamana bağlı biyodağılımı (M- $^{99m}\text{Tc-MA}$, K- $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$).

Şekil 4.23’de verilen kontrol grubu verilerinden $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiğinin en yüksek mid-brain (orta-beyin) ($\% 7,53 \pm 0,52$), hipofiz, medulla pons, hipokampus, striatum, frontal korteks ve cerebellumda tutulduğu görülmektedir. Şekil 4.25’de ise bu bölümler sağ ve sol olarak incelenmiştir.. Orta-beyin kısımları incelendiğinde sol orta-beyin kısmındaki tutulumun ($\% 4,03 \pm 0,32$) daha fazla olduğu görülmektedir. Bunun nedeni sağ kısımda bulunan SNc bölümünün dejenere edilmesiyle birlikte oradaki dopaminerjik nöron yoğunluğunun azalmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.22’de verilen hipotalamus ($\% 5,93 \pm 0,53$) kısmı yerine Şekil 4.25’de hipofiz ($\% 6,21 \pm 0,49$) kısmı ele alınmıştır. Tutulum açısından iki kısımda da benzer sonuçlar göze çarpmaktadır. Striatum ve hipokampus bölgelerinde de sol tarafta daha fazla tutulum görülürken, sağ kısımlarıyla kıyaslandığında anlamlı bir fark göze çarpmamaktadır. Bu durum sterotaksik girişimde bu dokulardaki dopaminerjik nöronlarda fazla tahribat olmaması olarak değerlendirilmektedir. Frontal korteks ve temporal korteks kısımlarda da sağ tarafta daha fazla bir tutulum görülmesine rağmen sol kısımla aralarında anlamlı bir fark tespit edilememiştir. Ancak medulla pons ve cerebellum kısımlarında sağ tarafından anlamlı derecede daha fazla bir tutulum izlenmiştir. Cerebellum açısından Şekil 4.23 ve Şekil 4.25 kıyaslandığında sol cerebellum ($\% 1,02 \pm 0,32$) ve şekil 4.27 ($\% 0,97 \pm 0,21$) de ki cerebellum kısımları benzer değerler göstermektedir. Ancak sağ kısımdaki ($\% 2,12 \pm 0,25$) artma lehine anlamlı fark ($p < 0,05$) göze çarpmaktadır. Cerebellum beyinde birçok motor ve bilişsel işlevde kritik bir rol oynamaktadır. Dopaminin ise belirli cerebellar fonksiyonlarda rol oynayabileceğini düşünülmektedir (Melchitzky and Lewis, 2000). Ancak burada daha fazla ön plana çıkanın katekolamin biyosentezinde hız sınırlayıcı enzim olan tirozin hidroksilaz olduğu belirlenmiştir. Özellikle burada ortaya çıkan dopaminin adrenal in öncüsü olduğu yönünde çalışmalar mevcuttur (Giompres and Delis, 2005). Bu açıdan bakıldığında $^{99m}\text{Tc-MA}$ bileşiği ile ilgili dopamine ve dopaminin yer aldığı diğer katekolaminlerin ilgisi (adrenalin- epinefrin) daha detaylı bir şekilde incelenmesi gerektiği sonucuna götürmektedir. Ancak elde edilen verilerden $^{99m}\text{Tc-MA}$ ve $^{99m}\text{Tc-MA-L-DOPA}$ bileşiklerinin Parkinson hastalığının teşhisinde kullanılabilirlik potansiyeli taşıdığını göstermekle beraber üzerinde daha detaylı çalışmalar yapılması önerilmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında MA molekülü ile L-DOPA molekülünün konjugasyonu ile MA-L-DOPA molekülü sentezlenmiştir. Senteze ait yapı analizlerini doğrulamak amacıyla Erime Noktası Tayini, LC-MS, NMR ve FTIR analizleri yapılmıştır. Reaksiyonun kalite kontrolü TLC ve HPLC analizleri ile de desteklenmiştir. Tüm analizler birlikte değerlendirildiğin sentezin gerçekleştiği tespit edilmiştir.

MA, L-DOPA ve MA-L-DOPA moleküllerinin PLGA ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Enkapsülasyon çalışmaları sonrası elde edilen yapıların DLS analizi yapılarak SEM görüntüleri alınmıştır. Yapılan analizler sonucu enkapsülasyonun gerçekleştiği görülmüştür.

MA, L-DOPA, MA-L-DOPA, MA-PLGA, L-DOPA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA moleküllerinin ^{99m}Tc ile radyoişaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Radyo işaretleme çalışmalarına ilişkin kalite kontrolleri TLRC ve HPLRC yöntemleri ile yürütülmüştür. Radyoişaretleme verimlerinin %95'in üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Radyoişaretleli bileşiklerin stabilite ve lipofilite tayinleri yapılmıştır. Radyoişaretleli bileşiklerin kararlı yapıda oldukları ve KBB'yi geçme potansiyeli taşıdıkları tespit edilmiştir.

In vitro çalışmalar kapsamında inaktif MA, MA-L-DOPA, MA-PLGA ve MA-L-DOPA-PLGA moleküllerinin sitotoksosite çalışmaları yürütülmüştür. Tüm bileşiklerin artan konsantrasyonları ile birlikte sitotoksitelerinin arttığı görülmüş ve canlı dokunda çalışılacak doz miktarı belirlenmiştir. Hücre hatları üzerinde radyoişaretleli ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşiklerinin inkorporasyon çalışmaları da yapılmıştır. Bu bileşiklerin SH-SY5Y ve PC-12 hücre hattında tutulum gösterdikleri tespit edilmiştir.

Ayrıca *in vivo* çalışma kapsamında rotenone kullanılarak oluşturulan Parkinson hayvan modeli ve herhangi bir işlem yapılmayan kontrol grubu üzerinde ^{99m}Tc -MA, ^{99m}Tc -MA-L-DOPA, ^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA bileşikleriyle biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Biyodağılım çalışmaları tüm organlar ve beyin dokuları üzerinden irdelenmiştir. Enkapsüle bileşiklerin (^{99m}Tc -MA-PLGA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA-PLGA) beyinde daha az tutulum gösterdikleri, ^{99m}Tc -MA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA bileşiklerinin her iki grupta da (kontrol ve Parkinson modeli) tutulum gösterdikleri belirlenmiştir. ^{99m}Tc -MA bileşiğinin en yüksek mid-brain (orta-

beyin), hipotalamus, medulla pons, hipokampus, striatum, frontal korteks ve cerebellumda tutulduğu gör÷lmektedir. ^{99m}Tc -MA-L-DOPA bileşiğinin ise hipocampus, cerebellum, frontal korteks ve orta beyinde yoğun olarak tutulduğu ortaya çıkmaktadır. Bu durum iki bileşik (^{99m}Tc -MA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA) ile ilgili dopamine ve dopaminin yer aldığı diğer katekolaminlerin ilgisi (adrenalin- epinefrin) daha detaylı bir şekilde incelenmesi gerektiği sonucuna götürmektedir. Ancak elde edilen verilerden ^{99m}Tc -MA ve ^{99m}Tc -MA-L-DOPA bileşiklerinin Parkinson hastalığının teşhisinde kullanılabilirlik potansiyeli taşıdığını göstermekle beraber üzerinde daha detaylı çalışmalar yapılması önerilmektedir.



KAYNAKLAR DİZİNİ

- Al-Sharif, I., Remmal, A., and Aboussekhra, A., 2013, “Eugenol Triggers Apoptosis in Breast Cancer Cells through E2F1/Survivin down-Regulation.” *BMC cancer* 13: 600.
- Alam, M., Mayerhofer, A., and Schmidt, W. J., 2004, The neurobehavioral changes induced by bilateral rotenone lesion in medial forebrain bundle of rats are reversed by L-DOPA. *Behav. Brain Res.* 151, 117–124. doi: 10.1016/j.bbr.2003.08.014
- Alberio, T. and Fasano M., 2010, Proteomics in Parkinson’s Disease: An Unbiased Approach towards Peripheral Biomarkers and New Therapies. *Journal of Biotechnology* 156(4): 325–37. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.08.004>.
- Alberio, T., Lopiano, L. and Fasano, M., 2012, “Cellular Models to Investigate Biochemical Pathways in Parkinson’s Disease.” *FEBS Journal* 279(7): 1146–55.
- Andrieux, K. and Couvreur, P., 2009, Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*, 1:463–474 pp.
- Anukunwithaya, T., Tantisira, M.H., Tantisira, B. and Khemawoot P., 2017, “Pharmacokinetics of a Standardized Extract of Centella Asiatica ECa 233 in Rats.” *Planta Medica* 83(8): 710–17.
- Apostolova, I., Niedzielska, D., Derlin, T., Koziol, E. J., Amthauer, H., Salmen, B., Buchert, R., 2015, Perfusion single photon emission computed tomography in a mouse model of neurofibromatosis type 1: towards a biomarker of neurologic deficits. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 35, 8, 1304–1312. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2015.43>
- Arena, J. E., and Stoessl A.J., 2015, “Optimizing Diagnosis in Parkinson’s Disease: Radionuclide Imaging.” *Parkinsonism & Related Disorders* 22: S47–51.
- Arora, M., 2013, “Cell Culture Media: A Review.” *Materials and Methods* 3: 1–29.
- Arzen, D., Podgornik, R. and Kuzman Ljubljana, D., 2010, Dynamic light scattering and application to proteins in solutions, seminar, University of Ljubljana Faculty of Mathematics and Physics, Department of Physics, May 19.
- Avcıbaşı, U., Avcıbaşı, N., Ünak, T., Ünak, P., Müftüler, F. Z., Yildirim, Y., Dursun, E. R., 2008, Metabolic comparison of radiolabeled aniline- and phenol-phthalateins

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- with ¹³¹I. *Nuclear Medicine and Biology*, 35,4,, 481–492.
<https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2008.02.003>
- Aziz, Z. A., Davey, M. R., Power, J. B., Anthony, P., Smith, R. M., and Lowe, K. C., 2007, Production of asiaticoside and madecassoside in *Centella asiatica* in vitro and in vivo. *Biologia Plantarum*, 51,1,, 34–42. <https://doi.org/10.1007/s10535-007-0008-x>
- Barçın, Z., 2014, Anti-Parkinsonian Drug Delivery Across The Blood-Brain Barrier. MSc Thesis. Middle East Technical University. (Unpublished)
- Bastide, M. F., Meissner, W. G., Picconi, B., Fasano, S., Fernagut, P.-O., Feyder, M., Bézard, E., 2015, Pathophysiology of L-dopa-induced motor and non-motor complications in Parkinson's disease. *Progress in Neurobiology*, 132, 96–168. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.07.002>.
- Beckman K.B. and Ames B.N., 1998, The free radical theory of aging matures, *Physiol.Rev.* 78: 547–581pp.
- Betarbet R., Sherer T.B., MacKenzie G., Garcia-Osuna M., Panova V., Greenamyre J.T., 2000, Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 3: 1301–1306,
- Beyoğlu, G., 2014, SH-SY5Y Hücreleri Kullanılarak Aracılığıyla Oluşturulan İn Vitro Parkinson Modelinde P90rsk ve P38 Sinyal Yolaklarının Gsk-3b Düzenlemesine Etkilerinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yayınlanmamış).
- Bhattacharjee, M., and Perumal E., 2019, Potential Plant-Derived Catecholaminergic Activity Enhancers for Neuropharmacological Approaches: A Review. *Phytomedicine* 55: 148–64.
- Biber Muftuler, F. Zumrut, Yurt Kilcar,A., and Unak, P., 2015a, A Perspective on Plant Origin Radiolabeled Compounds, Their Biological Affinities and Interaction between Plant Extracts with Radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*.
- Biber Muftuler, F. Z., Yurt Kilcar, A., and Unak, P., 2015b, A perspective on plant origin radiolabeled compounds, their biological affinities and interaction between

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- plant extracts with radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 306,1,, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s10967-015-4082-9>
- Blandini F, and Armentero M., 2012, Animal models of Parkinson's disease. *FEBS J*, 279: 1156–1166,
- Blesa, J., and Przedborski, S., 2014, Parkinson's disease: animal models and dopaminergic cell vulnerability. *Frontiers in Neuroanatomy*, 8, December,, 155. <https://doi.org/10.3389/fnana.2014.00155>
- Bohnen, N. I., Gedela, S., Kuwabara, H., Constantine, G. M., Mathis, C. a., Studenski, S. a., and Moore, R. Y., 2007, Selective hyposmia and nigrostriatal dopaminergic denervation in Parkinson's disease. *Journal of Neurology*, 254,1,, 84–90.
- Bonfill, M., Mangas, S., Cusidó, R. M., Osuna, L., Piñol, M. T., and Palazón, J., 2006, Identification of triterpenoid compounds of *Centella asiatica* by thin-layer chromatography and mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*, 20,2,, 151–153. <https://doi.org/10.1002/bmc.564>.
- Bové J, Perier C., 2012, Neurotoxin-based models of Parkinson's disease. *Neuroscience*, 211: 51–76,
- Bowen, M.L. and Orvig, C., 2008, 99m-Technetium carbohydrate conjugates as potential agents in molecular imaging, *Chemical Communications* ,41,:5077–5091 pp.
- Büyüksırt, T., ve Kuleaşan, H., 2014, Fourier Dönüşümlü Kızılötesi , FTIR, Spektroskopisi ve Gıda Analizlerinde Kullanımı. *Gıda*. 39, 235–241. <https://doi.org/10.5505/gida.43434>
- Cambonie, G., Laplanche, L., Kamenka, J. M., and Barbanel, G., 2000, Effects of Dopamine and L-DOPA on Survival of PC12 Cells. *Journal of Neuroscience Research* 62(1): 112–19.
- Cannazza, G., Di Stefano, A., Mosciatti, B., Braghiroli, D., Baraldi, M., Pinnen, F., and Parenti, C., 2005, Detection of levodopa, dopamine and its metabolites in rat striatum dialysates following peripheral administration of l-DOPA prodrugs by mean of HPLC–EC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36,5,, 1079–1084. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2004.09.029>

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Cannon J.R., Tapias V., Na H.M., Honick A.S., Drolet R.E., and Greenamyre J.T., 2009, A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 34: 279–290.
- Carlsson A, Lindqvist M, Magnusson T, and Waldeck B., 1958, On the presence of 3-hydroxytyramine in brain. *Science* 127: 471.
- Centonze D, Gubellini P, Usiello A, Rossi S, Tschertter A, Bracci E, Erbs E, Tognazzi N, Bernardi G, Pisani A, Calabresi P, and Borrelli E., 2004, Differential contribution of dopamine D2S and D2L receptors in the modulation of glutamate and GABA transmission in the striatum. *Neuroscience*, 129: 157–166.
- Charabati, M., Rabanel, J. M., Ramassamy, C. and Prat, A., 2020, “Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles.” *Trends in Pharmacological Sciences* 41(1): 42–54.
- Chen, W., Barback, C. V., Wang, S., Hoh, C. K., Chang, E. Y., Hall, D. J., Vera, D. R., 2020, A receptor-binding radiopharmaceutical for imaging of traumatic brain injury in a rodent model: [99mTc]Tc-tilmanocept. *Nuclear Medicine and Biology*.
- Choi, S. R., Kung, M. P., Plössl, K., Meegalla, S., and Kung, H. F., 1999, An improved kit formulation of a dopamine transporter imaging agent: [Tc-99m]TRODAT-1. *Nuclear Medicine and Biology*, 26,4., 461–466.
- Cicchetti F, Drouin-Ouellet J, and Gross R.E., 2009, Environmental toxins and Parkinson's disease: what have we learned from pesticide-induced animal models? *Trends Pharmacol Sci*, 30: 475–483.
- Conti, P. S., 2010, Radiopharmaceutical Chemistry for Positron Emission Tomography. *Advanced Drug Delivery Reviews* 62(11): 1031–51.
- Cu, Y. and Saltzman, W.M., 2009, Controlled surface modification with poly(ethylene)glycol enhances diffusion of PLGA nanoparticles in human cervical mucus, *Molecular Pharmaceutics*, 6(1):173–181 pp.
- Cummings CJ, Reinstein E, Sun Y, Antalffy B, Jiang Y, Ciechanover A, Orr HT, Beaudet AL and Zoghbi HY., 1999, Mutation of the E6-AP ubiquitin ligase reduces nuclear inclusion frequency while accelerating polyglutamine-induced pathology in SCA1 mice. *Neuron* 24: 879–892pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Dahimiwal, S. M., Thorat, D. B., Jain, N. P., Jadhav, V. B., and Patil, P. B., 2013, A review on high performance liquid chromatography. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 5,3,, 1–6.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A., and Préat, V., 2012, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications. *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, 161,2,, 505–522.
- Dauer, W. and Przedborski, S., 2003, Parkinson's disease:mechanisms and models, *Neuron*, 39: 889–909pp.
- Delenclos, Marion, Jones,D. R., McLean, P. J., and Uitti, R. J., 2015, Biomarkers in Parkinson's Disease: Advances and Strategies. *Parkinsonism & Related Disorders* 22: S106–10.
- Denora, N., Lopedota, A., de Candia, M., Cellamare, S., Degennaro, L., Luisi, R., and Scilimati, A., 2017, Pharmaceutical development of novel lactate-based 6-fluoro-1-DOPA formulations. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99, 361–368.
- Diniz, C. L., do Carmo, F. S., de Almeida, D. S., Santos-Filho, S. D., Missailidis, S., Fonseca, A. de S. da, and Filho, M. B., 2008, Effect of an extract of centella asiatica on the biodistribution of sodium pertechnetate (Na^{99m}TcO₄) and on the fixation of radioactivity on blood constituents. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(Specialissue), 215–219.
- Dischino, D.D., Welch, J.M., Kilbourn, R.M. and Raichle, E.M., 1983, Relationship Between Lipophilicity and Brain Extraction of C-11- Radiopharmaceuticals, *Journal of Nuclear Medicine*, 24:1030–1038 pp.
- Drechsel, D.A, and Patel M., 2008, Role of reactive oxygen species in the neurotoxicity of environmental agents implicated in Parkinson's disease. *Free Radic Biol Med*, 44: 1873–1886.
- Du, B., Zhang, Z., and Li, N., 2014, Madecassoside prevents A 25-35-induced inflammatory responses and autophagy in neuronal cells through the class III PI3K/Beclin-1/Bcl-2 pathway. *International Immunopharmacology*, 20,1,, 221–

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

228.

Ediz, M., Avcıbaşı, U., Unak, P., Müftüler, F. Z. B., Medine, E. İ., Yurt Kılçar, A., and Sakarya, S., 2013, Investigation of Therapeutic Efficiency of Bleomycin and Bleomycin-Glucuronide Labeled with ^{131}I on the Cancer Cell Lines. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28,4,, 310–319.

Enginar, H., Unak, P., Lambrecht, F. Y., Biber, F. Z., Medine, E. I., and Cetinkaya, B., 2005, Synthesis of ^{131}I labeled estrone derivatives and biodistribution studies on rats. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 264,3,, 535–539.

Enginar, H., Ünak, P., Lambrecht, F. Y., Biber Müftüler, F. Z., Medine, E. I., Yolcular, S., and Bulduk, I., 2009, Radiolabeling of codeine with ^{131}I and its biodistribution in rats. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 280,2,, 363–370.

Enginar, H., Unak, P., Yurt Lambrecht, F., Biber Muftuler, F.Z., Medine, E.I., Yolcular, S., Yurt , A., Seyitoglu, B., and Bulduk, I., 2009a, Radiolabeling of codeine with ^{131}I and its biodistribution in rats. *J Radioanal Nucl Chem* 280:363–370

Enginar, H., Unak, P., Biber Muftuler, F.Z., Yurt Lambrecht, F., Medine, E.I., Yolcular, S., Yurt, A., Seyitoglu, B., Bulduk, I., 2009b, Synthesis, radiolabeling and in vivo tissue distribution of codeine-glucuronide. *INCS News* 6:46–56

Enginar, H., Unak, P., Yurt Lambrecht, F., Biber Muftuler, F.Z., Seyitoglu, B., Yurt, A., Yolcular, S., Medine, I., and Bulduk, I., 2010, Radiolabeling of morphine with ^{131}I and its biodistribution in rats. *Cancer Biother Radiopharm* 25:409–416

Enginar, H., Unak, P., Biber Muftuler, F.Z., Yurt Lambrecht, F., Medine, E.I., Yolcular, S., Yurt Kilcar, A., Seyitoglu, B., and Bulduk, I., 2012a, Synthesis, radiolabeling and biodistribution of morphine glucuronide (mor-glu). *J Radioanal Nucl Chem* 291:849–857

Enginar, H., Unak, P., Biber Muftuler, F.Z., Yurt Lambrecht, F., Yurt Kilcar, A., Yolcular, S., Seyitoglu, B., Medine, E.I., Bulduk, I., 2012b, Synthesis, radiolabeling and biodistribution of a new opioid glucuronide derivative: ethyl-morphine glucuronide (em-glu). *J Radioanal Nucl Chem* 292:667–673

Enginar, H., Unak, P., Yurt Lambrecht, F., Biber Muftuler, F.Z., Seyitoglu, B., Yurt, A., Yolcular, S., Medine, E.I., Bulduk, I., 2013, Extraction, radiolabeling, and

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- biodistribution of thebaine in rats. *Med Chem Res* 22:3459–3465
- Erbaş, O., Yılmaz, M., and Taşkıran, D., 2016, Levetiracetam attenuates rotenone-induced toxicity: A rat model of Parkinson's disease. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 42.
- Erbaş, Oytun, Çiar, B. P., Solmaz, V., Çavuşoğlu, T., and Ateş, U., 2015, The neuroprotective effect of erythropoietin on experimental Parkinson model in rats. *Neuropeptides*, 49, 1–5.
- Erdemoğlu, S., Sayılkan, F., Emre, F. B., Akarsu, M., Şener, Ş., and Sayılkan, H., 2005, Removal of Inorganic–Organic Bound Cu,II, from Different Aqueous Solutions by New Adsorbents Synthesized by Sol–Gel Process. *Separation Science and Technology*, 39,6,, 1385–1405.
- Erdik, E., Obalı, M., Yüksekışık, N., Öktemer, A., Pekel, T. ve İhsanoğlu, E., 2000, Denel Organik Kimya, Ankara, Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Döner Sermaye İşletmesi Yayınları, 3. Baskı, 835s.
- Erfani, M., Doroudi, A., Hadisi, L., Andishmand, A., Mirshojaei, S. F., and Shafiei, M., 2013, ^{99m}Tc-tricarbonyl labeling of ofloxacin and its biological evaluation in *Staphylococcus aureus* as an infection imaging agent. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 56,12,, 627–631.
- European Association of Nuclear Medicine, 2016, *The Radiopharmacy A Technologist's Guide*. https://www.eanm.org/content-eanm/uploads/2016/11/tech_radiopharmacy.pdf. (Erişim Tarihi: 01 Mart 2020)
- Fair J.D. and Kormos C.M., 2008, Flash column chromatograms estimated from thin-layer chromatography data. *Journal Chromatography* , 1211(1-2), 49-54.
- Falkenburger, B. H., and Schulz, J. B., 2006, Limitations of cellular models in Parkinson's disease research. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, ,70,, 261–268.
- Fessenden, R.J., Fessenden, J.S. and Logue, M.W., 1990, Organik Kimya 4. Baskı, (Çev. T. Uyar), Güneş Kitabevi.
- Fieblinger, T., Graves, S. M., Sebel, L. E., Alcacer, C., Plotkin, J. L., Gertler, T. S., and Surmeier, D. J., 2014, Cell type-specific plasticity of striatal projection neurons in

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- parkinsonism and L-DOPA-induced dyskinesia. *Nature Communications*, 5, 5316.
- Fleming S.M., Salcedo J., Fernagut P.O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M.S., and Chesselet M.F., 2004, Early and progressive sensorimotor anomalies in mice overexpressing wild-type human alphasynuclein. *J Neurosci*, 24: 9434–9440.
- Fornari, R. V., Wichmann, R., Atsak, P., Atucha, E., Barsegyan, A., Beldjoud, H., and Roozendaal, B., 2012, Rodent stereotaxic surgery and animal welfare outcome improvements for behavioral neuroscience. *Journal of Visualized Experiments*, 59, 1–4.
- Freshney, R.I., 2006, *Microspheres Culture of Cells for Tissue Engineering: Basic Principles of Cell Culture*, John Wiley & Sons Inc., New York.
- Fuchs, B., Süß, R., Teuber, K., Eibisch, M., and Schiller, J., 2011, Lipid analysis by thin-layer chromatography-A review of the current state. *Journal of Chromatography A*, 1218,19,, 2754–2774.
- Gambaryan, P. Y., Kondrasheva, I. G., Severin, E. S., Guseva, A. A., and Kamensky, A. A., 2014, Increasing the Efficiency of Parkinson’s Disease Treatment Using a poly,lactic-co-glycolic acid, ,PLGA, Based L-DOPA Delivery System. *Experimental Neurobiology*, 23,3,, 246.
- Garlapati, P. K., Raghavan, A. K., and Shivanna, N., 2014, Phytochemicals Having Neuroprotective Properties from Dietary Sources and Medicinal Herbs. *Pharmacognosy Journal* 7(1): 1–17.
- George, A. M., 2015, *ABC transporters - 40 years on. ABC Transporters - 40 Years on*.
- Gibb, W. R., and Lees A. J., 1991, Anatomy, Pigmentation, Ventral and Dorsal Subpopulations of the Substantia Nigra, and Differential Cell Death in Parkinson’s Disease. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 54(5): 388–96.
- Gijs, M., Aerts, A., Impens, N., Baatout, S., and Luxen, A., 2016, Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 43(4), 253–271.
- Giompres, P., and Delis, F., 2005, Dopamine transporters in the cerebellum of mutant mice. *Cerebellum*, 4(2), 105–111.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- González-Burgos, E., Fernandez-Moriano, C., and Gómez-Serranillos, M. P., 2014, Potential Neuroprotective Activity of Ginseng in Parkinson's Disease: A Review. *Journal of Neuroimmune Pharmacology* 10: 14–29.
- Güçlü, K.B., ve Uyanık F., 2004, “8-Saponinler-ve-Biyolojik-Onemi.Pdf.” *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi* 1(2): 125–31.
- Gupta, V., r Jain, A. D. K., Gill, N. S., and Gupta, K., 2012, Development and Validation of HPLC Method - a Review. *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 2(4): 17–25.
- Halkias, I. A. C., Haq, I., Huang, Z., and Fernandez, H. H., 2007, When Should Levodopa Therapy be Initiated in Patients with Parkinson ' s Disease ?, 24(4), 261–273.
- Han, X., Zhu, S., Wang, B., Chen, L., Li, R., Yao, W., and Qu, Z., 2014, Antioxidant action of 7,8-dihydroxyflavone protects PC12 cells against 6-hydroxydopamine-induced cytotoxicity. *Neurochemistry International*, 64,1,, 18–23.
- Harada, Y. and Asakura, T., 1998, Dynamics and dynamic light-scattering properties of Brownian particles under laser radiation pressure, *Pure and Applied Optics: Journal of the European Optical Society Part A*, 7(5):1001– 1012 pp.
- Harischandra, D. S., Rokad, D., Ghaisas, S., Verma, S., Robertson, A., Jin, H., Kanthasamy, A. G. 2020. Enhanced differentiation of human dopaminergic neuronal cell model for preclinical translational research in Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1866,4,, 165533. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2019.165533>
- Hildebrand, H., and Franke, K., 2012, A New Radiolabeling Method for Commercial Ag0 Nanopowder with 110mAg for Sensitive Nanoparticle Detection in Complex Media. *Journal of Nanoparticle Research* 14(10).
- Himmelsbach, M., 2012, 10years of MS Instrumental Developments - Impact on LC-MS/MS in Clinical Chemistry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 883–884: 3–17.
- Horstmann, A., Fenske, W. K., and Hankir, M.K., 2015, And Dopaminergic Tone Obesity Etiology and Pathophysiology Argument for a Non-Linear Relationship

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- between Severity of Human Obesity and Dopaminergic Tone. (June).
- Huang, C., Chang, Y., Amstislavskaya, T. G., Tikhonova, M. A., Lin, C., Hung, C., Ho, Y., 2015, Synergistic effects of ceftriaxone and erythropoietin on neuronal and behavioral deficits in an MPTP-induced animal model of Parkinson ' s disease dementia. *Behavioural Brain Research*, 294,110,, 198–207.
- Igarashi, K., Hotta, K., Kasuya, F., Abe, K., and Sakoda, S., 2003, Determination of cabergoline and l-dopa in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 792,1,, 55–61.
- Imai, Y., Venderova, K. and Lim, K.L., 2012, Animal Models of Parkinson's Disease 2012." *Parkinson's Disease* 2012: 1–2.
- Jankovic, J., 2008, Parkinson's Disease: Clinical Features and Diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 79(4): 368–76.
- Jansen, R. L. M., Brogan, B., Whitworth, A. J., and Okello, E. J., 2014, Effects of Five Ayurvedic Herbs on Locomotor Behaviour in a Drosophila Melanogaster Parkinson's Disease Model. *Phytotherapy Research* 28(12): 1789–95.
- Jena, K.K., 2011, Biodegradable Polymers ,PLA and PLGA, Based Nanoparticles in Protein and Plasmid DNA Delivery, MSc Thesis, Department of Life Science National Institute of Technology, Rourkela, 47 p.
- Jeong, D. C., Kim, and D. H., Sohn, D.R., 2014, Pharmacokinetics and Disposition of Madecassoside and Asiaticoside after the Administration of a Titrated Extract of Centella Asiatica in Rats. : 1–9.
- Jia, D., Deng, Y., Gao, J., Liu, X., Chu, J., and Shu, Y., 2014, Neuroprotective effect of Panax notoginseng polysaccharides against focal cerebral ischemia reperfusion injury in rats. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63, 177–180.
- Jian W., Edom R.W., Lin Z.J. and Weng N., 2012, Chromatographic separation methods, Enabling Technologies in Drug Design and Development, 25.
- Jin, F., Wu, Q., Lu, Y.F., 2008, Neuroprotective effect of resveratrol on 6-OHDA-induced Parkinson's disease in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 14 (600), 78–82
- Jurisson S., Berning D., Jia W. and Ma O., 1992, Coordination Compounds in Nuclear Medicine, *Chem. Rev.* 1883, 93, 1137-1156

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Kamatou, G. P., Vermaak, I., and Viljoen A. M., 2012, Eugenol - From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A Review of a Remarkable and Versatile Molecule.” *Molecules* 17(6): 6953–81.
- Kar, N.R., 2019, Production and Applications of Radiopharmaceuticals: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation* 9(2): 36–42.
- Kenney, P. M., and Luke, K. T., 2010, Sesquiterpenes from clove, ,7,, 999–1003.
- Khozaei, M., and Emamzadeh, R., 2014, Catecholamines are active plant-based drug compounds in *Pisum sativum* , Catecholamines are active plant-based drug compounds in *Pisum sativum* , *Phaseolus vulgaris* and *Vicia faba* Species, ,November 2016,.
- Kodama, R. 2009, 200 *Magnetic Nanoparticles*. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*.
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., and Leito, I. 2015, Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part I. *Analytica Chimica Acta*, 870,1,, 29–44.
- Kucharska, M., and Grabka J., 2010, A Review of Chromatographic Methods for Determination of Synthetic Food Dyes. *Talanta* 80(3): 1045–51.
- Kung, H. F., 2001, Development of Tc-99m Labeled Tropanes: TRODAT-1, as a Dopamine Transporter Imaging Agent. *Nuclear Medicine and Biology* 28(5): 505–8.
- Kurul, S., ve Gülmez, Ö. ,2007, Nöroproteksiyon Ve Nöron Koruyucu Ajanlar, DEÜ Tıp Fakültesi Dergisi. 21,2,, 119–130.
- Kvetnansky, R., Sabban, E. L., and Palkovits, M., 2009, “Catecholaminergic Systems in Stress: Structural and Molecular Genetic Approaches.” *Physiological Reviews* 89(2): 535–606.
- Kwon, M. C., Choi, W. Y., Seo, Y. C., Kim, J. S., Yoon, C. S., Lim, H. W., Lee, H. Y. ,2012, Enhancement of the Skin-Protective Activities of *Centella asiatica* L. Urban by a Nano-encapsulation Process. *Journal of Biotechnology*, 157,1,, 100–106.
- Lai, C.-T., and Yu, P. H., 1997, Dopamine- and l-β-3,4-dihydroxyphenylalanine hydrochloride, l-Dopa,-induced cytotoxicity towards catecholaminergic

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- neuroblastoma SH-SY5Y Cells: Effects of oxidative stress and antioxidative factors. *Biochemical Pharmacology*, 53,3,, 363–372.
- Leng D.D., Han W.J., Rui Y., Dai Y., Xia Y.F., 2013, In vivo disposition and metabolism of madecassoside, a major bioactive constituent in *Centella asiatica* (L.) Urb. *J Ethnopharmacol*, 150: 601-608.
- Li, G., Guan, X., Liu, S., Fang, L., Li, T., Dong, J., and Zhou, Q., 2019, Intravoxel Incoherent Motion Imaging Study of Madecassoside in Improving Lipopolysaccharide-Induced Cognitive Impairment in Rats, 1–8.
- Li, J., and Sabliov, C., 2013, PLA / PLGA nanoparticles for delivery of drugs across the blood-brain barrier, 2,3,, 241–257.
- Lin, Q. S., Chen, P., Wang, W. X., Lin, C. C., Zhou, Y., Yu, L. H., Kang, D. Z., 2019, RIP1/RIP3/MLKL mediates dopaminergic neuron necroptosis in a mouse model of Parkinson disease. *Laboratory Investigation*, 503–511.
- Lin, X., Zhang, S., Huang, R., Wei, L., Tan, S., Liang, C., Huang, Q., 2014, Protective effect of madecassoside against cognitive impairment induced by d-galactose in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 434–442.
- Liu, H. F., Ho, P. W. L., Leung, G. C. T., Lam, C. S. C., Pang, S. Y. Y., Li, L., and Ho, S. L., 2017, Combined LRRK2 mutation, aging and chronic low dose oral rotenone as a model of Parkinson's disease. *Scientific Reports*, 7,January,, 1–15.
- Liu, X., Testa, B., and Fahr, A., 2011, Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharmaceutical Research*, 28,5,, 962–977.
- Loonam TM, Noailles PAH, Yu J, Zhu JPQ, and Angulo J.A., 2003, Substance P and cholecystokinin regulate neurochemical responses to cocaine and methamphetamine in the striatum. *Life Sci*, 73: 727– 739.
- Lokanathan, Y., Omar, N., Ahmad Puz, N. N., Saim, A., and Hj Idrus, R., 2016, Recent updates in neuroprotective and neuroregenerative potential of *Centella asiatica*. *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 23,1,, 4–14.
- Lotharius J. and Brundin P., 2002, Pathogenesis of parkinson's disease: Dopamine, vesicles and alpha-synuclein. *Nat Rev Neurosci*, 3,12,: 932-942.
- Lundbeck Institute, 2019, 'Parkinson's Disease', <http://www.cnsforum.com/>

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- parkinson's+disease. ,Erişim Tarihi: 26 Aralık 2019,.
- Makadia, H. K., and Siegel, S. J., 2011, Poly Lactic-co-Glycolic Acid ,PLGA, as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Annales de La Fondation Louis de Broglie*, 1,3,, 1377–1397.
- Makav, M., 2018, Rotenon İle Deneyisel Olarak Oluşturulmuş Parkinson Modelinde Östrojenin Etkisi, Doktora tezi, Kafkas Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, (Yayınlanmamış).
- Maksimenko, O., Malinovskaya, J., Shipulo, E., Osipova, N., Razzhivina, V., Arantseva, D., and Gelperina, S., 2019, Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastoma: Towards the pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics*, 572, August,, 118733.
- Mamun, A. A., Hashimoto, M., Hossain, S., Katakura, M., and Arai, H., 2014, Neuroprotective Effect of Madecassoside Evaluated Using Amyloid B 1-42-Mediated in Vitro and in Vivo alzheimer ' s Disease Models Neuroprotective Effect of Madecassoside Evaluated Using Amyloid β 1-42 -Mediated in Vitro and in Vivo A lzheimer ' s Disease. *International Journal of Indigenous Medicinal Plants*, 47, September,, 1669–1682.
- Mamun, A. Al, Hashimoto, M., Hossain, S., and Katakura, M., 2015, Confirmation of the Experimentally-Proven Therapeutic Utility of Madecassoside in an A β 1-42 Infusion Rat Model of Alzheimer ' s Disease by in Silico Analyses, ,June,, 37–44.
- Mandel, S. A., Morelli, M., and Halperin, I., 2010, Biomarkers for prediction and targeted prevention of Alzheimer ' s and Biomarkers for prediction and targeted prevention of Alzheimer ' s and Parkinson ' s diseases : evaluation of drug clinical efficacy, June.
- Martins, P. D. A., Silva, J. L., Ramos, M. P. S., Oliveira, I. M. De, Felgueiras, C. F., Herrerias, R., Matsuda, M. M. N., 2011, Radiochemical Stability of Radiopharmaceutical Preparations. *2011 International Nuclear Atlantic Conference - INAC, 2011 Belo Horizonte, MG, Brazil, October 24-28, 2011*.
- Mathis, C.A, Wang, Y. and Klunk, W.E., 2004, Imaging beta-amyloid plaques and neurofibrillary tangles in the aging human brain, *Current Pharmaceutical Design*,

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

10(13):1469–1492 pp.

Mazzio, E., Deiab, S., Park, K., and Soliman, K. F. A., 2013, High throughput Screening

to Identify Natural Human Monoamine Oxidase B Inhibitors, 828, May 2012, 818–828.

Melchitzky, D. S., and Lewis, D. A., 2000, Tyrosine hydroxylase- and dopamine transporter-immunoreactive axons in the primate cerebellum: Evidence for a lobular- and laminar-specific dopamine innervation. *Neuropsychopharmacology*, 22(5), 466–472.

Microspheres, P., Zeini, D., Khoshkenar, P., and Rabiee, M., 2012, The Influence of Formulation and Process Parameters on the Morphology , Size and Release Profile of L-Dopa-Loaded Poly Lactic-Co-Glycolic Acid, 98,21,, 1–7.

Migheli, R., Godani, C., Sciola, L., Delogu, M. R., Serra, P. A., Zangani, D., Desole, M. S., 1999, Enhancing effect of manganese on L-DOPA-induced apoptosis in PC12 cells: Role of oxidative stress. *Journal of Neurochemistry*, 73,3,, 1155–1163.

Morales, I., Sanchez, A., Rodriguez-sabate, C., and Rodriguez, M., 2015, The degeneration of dopaminergic synapses in Parkinson ’ s disease : A selective animal model. *Behavioural Brain Research*, 289, 19–28.

Nada, H. 2008, ‘Parkinson’s disease, Nileherbs, <http://nileherbl.blogspot.com> ,Erişim Tarihi: 5 Ocak 2020,.

Nagatsu, T. and Nagatsu, I., 2016, Tyrosine Hydroxylase (TH), Its Cofactor Tetrahydrobiopterin (BH4), Other Catecholamine-Related Enzymes, and Their Human Genes in Relation to the Drug and Gene Therapies of Parkinson’s Disease (PD): Historical Overview and Future Prospects. *Journal of Neural Transmission* 123(11): 1255–78.

Naoi, M. and Maruyama, W., 2001, Future of neuroprotection in Parkinson’s disease, *Parkinsonism and Related Disorders*, 8, 139-145pp.

Nesil, T., 2011, Sikloastragenol ve Astragalozit IV’ün PC-12 Hücre Hattında 6-Hidroksidopamin ,6-OHDA, İle Oluşturulan Nörotoksositeye Karşı Nöroprotektif Etkisinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yayınlanmamış).

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Neumaier, B., Deisenhofer, S., Sommer, C., Solbach, C., Reske, S.N. and Mottaghy, F., 2010, Synthesis and evaluation of 18F-fluoroethylated benzothiazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in Alzheimer's disease, *Applied Radiation and Isotopes*, 68,6,:1066–1072 pp.
- Nobmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Shen, F., Yi, J. and Harding, S.E., 2007, Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies, *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 24:117–128 pp
- Norazit A, Meedeniya ACB, Nguyen MN, and Mackay-Sim A., 2010, Progressive loss of dopaminergic neurons induced by unilateral rotenone infusion into the medial forebrain bundle. *Brain Res*, 1360: 119– 129.
- Obeso, A.J., Rodriguez-Oroz, M.C., Benitez-Temino, B., Blesa, J.F., Guridi, J., Marin, C. and Rodriguez, M., 2008, Functional organization of the basal ganglia: Therapeutic implication for Parkinson's disease, *Movement Disorders*, 23, 3, 548-559pp.
- Orhan, I. E., 2012, Centella asiatica ,L., Urban: From traditional medicine to modern medicine with neuroprotective potential. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.
- Ozkan, M., Muftuler, F. Z. B., Kilcar, A. Y., Medine, E. I., and Unak, P., 2013, Isolation of hydroxytyrosol from olive leaves extract, radioiodination and investigation of bioaffinity using in vivo/in vitro methods. *Radiochimica Acta*, 101,9,, 585–593.
- Pan, J., Kai, G., Yuan, C., and Jin, R., 2007, Separation and determination of the structural isomers of madecassoside by HPLC using β -cyclodextrin as mobile phase additive. *Chromatographia*, 66,1–2,, 121–123.
- Pan-Montojo, F., Anichtchik, O., Dening, Y., Knels, L., Pursche, S., and Jung, R., 2010, Progression of Parkinson's disease pathology is reproduced by intragastric administration of rotenone in mice. *PLoS ONE* 5:e8762.
- Panahi, Y., Rajaei, S. M., Johnston, T. P., and Sahebkar, A., 2019, Neuroprotective effects of antioxidants in the management of neurodegenerative disorders: A literature review. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120,3,, 2742–2748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Pardridge, W. M., 2012, Drug transport across the blood-brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32,11,, 1959–1972.
- Paudel, S., Cerbu, C., Astete, C. E., Louie, S. M., Sabliov, C., and Rodrigues, D. F., 2019, Enrofloxacin-Impregnated PLGA Nanocarriers for Efficient Therapeutics and Diminished Generation of Reactive Oxygen Species. *ACS Applied Nano Materials*, 2,8,, 5035–5043.
- Paxinos, G. and Watson, C., 2007, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, Academic Press/Elsevier.
- Payolla, F. B., Massabni, A. C., and Orvig, C., 2019, Radiopharmaceuticals for Diagnosis in Nuclear Medicine: A Short Review. *Ecletica Quimica* 44(3): 11–19.
- Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Häkkinen, A. and Hirvonen, J., 2002, The effect of cosolvents on the formulation of nanoparticles from low-molecular-weight poly(l)lactide, *AAPS PharmSciTech*, 3(4):1-5 pp.
- Pereira, M.A., Mosqueira, V.C., Vilela, J.M., Andrade, M.S., Ramaldes, G.A. and Cardoso, V.N., 2008, PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with ^{99m}Techetium-HMPAO: release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(1):42–51 pp.
- Pereverzeva, E., Treschalin, I., Treschalin, M., Arantseva, D., Ermolenko, Y., Kumskova, N., Gelperina, S., 2019, Toxicological study of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the treatment of glioblastoma. *International Journal of Pharmaceutics*, 554,July 2018,, 161–178.
- Pietro, O., Alencar, N., Esteban, G., Viayna, E., Szałaj, N., and Vázquez, J., 2016, Design, synthesis and biological evaluation of N-methyl-N- [1 , 2 , 3-triazol-4-yl , alkyl] propargylamines as novel monoamine oxidase B inhibitors *Bioorganic and Medicinal Chemistry Design* , synthesis and biological evaluation of N -methyl- N - [1 , , *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, ,June,.
- Pimlott, S. L., and Sutherland, A. ,2011, Molecular tracers for the PET and SPECT imaging of disease. *Chem. Soc. Rev.*, 40,1,, 149–162.
- Rafamantanana, M. H., Rozet, E., Raelison, G. E., Cheuk, K., Ratsimamanga, S. U.,

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Hubert, P., and Quetin-Leclercq, J., 2009, An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* ,L., Urb ,APIACEAE,. *Journal of Chromatography B*, 877,23,, 2396–2402.
- Raghunandan, D., Ravishankar, B., Sharanbasava, G., Mahesh, D. B., Harsoor, V., Yalagatti, M. S., and Venkataraman, A., 2011, Anti-cancer studies of noble metal nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Cancer Nanotechnology*, 2,1–6,, 57–65.
- Rai, M., Yadav, A., and Gade, A., 2009, Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnology Advances*, 27,1,, 76–83.
- Rastogi, V., Santiago-Moreno, J., and Dor, S., 2015, Ginseng: a promising neuroprotective strategy in stroke. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8,January,, 1–13.
- Raza, C., Anjum, R., and Shakeel, N. A., 2019, June 1,. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sciences*. Pergamon.
- Recchia, A, Debetto, P, Negro, A, Guidolin, D, Skaper, SD, Giusti, P., 2004, Alpha-synuclein and Parkinson's disease. *FASEB J*, 18: 617–626, 2004.
- Reyhan, R., 2005, İdiopatik Parkinson Hastalığı Etiyopatogenezinde Seruloplazminin Yeri Ve Proton Mr Spektroskopisi İle Verifikasyonudur. Reyhan Gürer ,Uzmanlık Tezi,. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Nöroloji Kliniği İstanbul-2005.
- Ríos, J. L., Onteniente, M., Picazo, D., and Montesinos, M. C., 2016, Medicinal Plants and Natural Products as Potential Sources for Antiparkinson Drugs. *Planta Medica*, 82,11–12,, 942–951.
- Roney, C., Kulkarni, P., Arora, V., Antich, P., Bonte, F., Wu, A., Mallikarjuana, N.N., Manohar, S., Liang, H.F., Kulkarni, A.R., Sung, H.W., Sairam, M. and Aminabhavi, T.M., 2005, Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood-brain barrier for Alzheimer's disease, *Journal of Controlled Release*, 108,2-3,:193–214 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Roth, J., Sekyrova, M., Ruzicka, E., Dvorak, J., Kanovsky, P., Rektorova, I., and Ristovska, H., 1999, Parkinsonovanemoc. [Parkinson's disease]. Praha: Maxdorf,
- Rudyanto, M., Widiandani, T., and Syahrani, A., 2015, Some benzoxazine and aminomethyl derivatives of eugenol: Cytotoxicity on MCF-7 cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7,5,, 229–232.
- Rutkowska, E., Pajak, K., and Józwiak, K., 2013, Lipophilicity--methods of determination and its role in medicinal chemistry. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70,1,, 3—18.
- Saha, G.B., 2004, Fundamentals of Nuclear Pharmacy, New York, Springer, 5. Edition, 383p.
- Santra, B., and Ott, H., 2015, Scanning electron microscopy of cold gases. *Journal of Physics B: Atomic, Molecular and Optical Physics*, 48,12,.
- Saran, S., Menon, S., Shailajan, S., and Pokharna, P., 2012, Validated RP-HPLC method to estimate eugenol from commercial formulations like Caturjata Churna , Lavangadi Vati , Jatiphaladi Churna , Sitopaladi Churna and clove oil. *JOPR: Journal of Pharmacy Research*, 6,1,, 53–60.
- Sasajima, H., Miyazono, S., Noguchi, T., and Kashiwayanagi, M., 2015, Intranasal administration of rotenone in mice attenuated olfactory functions through the lesion of dopaminergic neurons in the olfactory bulb. *NeuroToxicology*, 51, 106–115.
- Saudou, F., Finkbeiner, S., Devys, D., and Greenberg, M.E., 1998, Huntingtin acts in the nucleus to induce apoptosis but death does not correlate with the formation of intranuclear inclusions, *Cell*, 95: 55–66pp.
- Sayed, M. E., Motaleb, M. A., Ibrahim, I. T., Awad, G. A. S., and Ahmed, R. O., 2019, Intranasal drug delivery of iodo-haloperidol as a radiopharmaceutical brain imaging agent. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 319,3,, 927–935.
- Schreuder, N., Koopman, D., Jager, P. L., Kosterink, J. G. W., and van Puijenbroek, E., 2019, Adverse Events of Diagnostic Radiopharmaceuticals: A Systematic Review. *Seminars in Nuclear Medicine*, 49(5), 382–410.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Schwarz, S. W., and Clarke, B., 2018, Perspective on how the FDA should review diagnostic radiopharmaceuticals. *Journal of Nuclear Medicine*, 59(6), 865–867.
- Schwochau, K., ,2000, *Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications*, Wiley-VCH, Winheim.
- Semete, B., Booyesen, L., Lemmer, Y., Kalombo, L., Katata, L., Verschoor, J., and Swai, H. S., 2010, In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 6(5), 662–671.
- Serdons, K., Verbruggen, A., and Bormans, G. M., 2009, Developing new molecular imaging probes for PET. *Methods*, 48(2), 104–111.
- Sharma, S.,2013, “Biomarkers in Parkinson’s Disease (Recent Update).” *Neurochemistry International* 63(3): 201–29.
- Sharma, S., Moon, C. S., Khogali, A., Haidous, A., Chabenne, A., Ojo, C., Ebadi, M.,2013, Biomarkers in Parkinson’s disease ,recent update,. *Neurochemistry International*, 63,3, 201–229.
- Sherer T.B., Kim J.H., Betarbet R., Greenamyre J.T., 2003, Subcutaneous Rotenone Exposure Causes Highly Selective Dopaminergic Degeneration and α -Synuclein Aggregation. *Exp Neurol*, 179: 9–16.
- Silverstein R., Bassler M. and Morrill T.C., 1991, *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5th Ed., Wiley.
- Stacy, M., and Jakel R., 2014, “Parkinson's Disease Psychosis.” *Journal of Parkinsonism and Restless Legs Syndrome* (October): 41.
- Stahl, K., Mylonakou, M. N., Skare, Amiry-Moghaddam, M., and Torp, R., 2011, Cytoprotective effects of growth factors: BDNF more potent than GDNF in an organotypic culture model of Parkinson’s disease. *Brain Research*, 1378, 105–118.
- Steinman, N. Y., Haim-Zada, M., Goldstein, I. A., Goldberg, A. H., Haber, T., Berlin, J. M., and Domb, A. J., 2019, Effect of PLGA block molecular weight on gelling temperature of PLGA-PEG-PLGA thermoresponsive copolymers. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, 57,1,, 35–39.
- Stoessl, A. J., Martin W. R W., McKeown M. J., and Sossi V., 2011, Advances in

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Imaging in Parkinson's Disease." *The Lancet Neurology* 10(11): 987–1001.
- Stumpf, W. E. ,2012, Drugs in the Brain Cellular Imaging with Receptor Microscopic Autoradiography. *Progress in histochemistry and cytochemistry* 47(1): 1–26.
- Sun, A., Xu, X., Lin, J., Cui, X., and Xu, R., 2015, Neuroprotection by saponins. *Phytotherapy Research*.
- Şenocak, K., 2010, $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3^+$ Koru İle İşaretli Bisfosfonat Bileşiğinin Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü (Yayınlanmamış)
- Şimşek, S., 2010, Beyne Hedeflendirilmiş Polisorbat-80 Kaplı / Atorvastatin Yüklü Amfifilik Plga -B-Peg Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi.Nanoteknoloji Ve Nanotıp Anabilim Dalı, (Yayınlanmamış).
- Taggart, M. P., Tarn, M. D., Esfahani, M. M. N., Schofield, D. M., Brown, N. J., Archibald, S. J., Thompson, L. F., 2016, Development of radiodetection systems towards miniaturised quality control of PET and SPECT radiopharmaceuticals. *Lab on a Chip*, 16(9), 1605–1616.
- Talebpour, Z., Haghighi, S., and Shamsipur, M., 2004, ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy analysis for simultaneous determination of levodopa, carbidopa and methylodopa in human serum and pharmaceutical formulations. *Analytica Chimica Acta*, 506,1,, 97–104. h
- Tanaka, K., Engelender, S., Igarashi, S., Rao, R.K., Wanner, T., Tanzi, R.E., Sawa, A., Dawson, V.L., Dawson, T.M. and Ross, C.A., 2001, Inducible expression of mutant α -synuclein decreases proteasome activity and increases sensitivity to mitochondria-dependent apoptosis, *Hum Mol Gen*, 10, 919-926pp.
- Tekin, V., 2013, Kına Yaprğından Ekstrakte Edilen Lawsone Bileşiğinin Radyoişaretlenerek, In Vivo Ve In Vitro Yöntemlerle Biyoetkinliğinin İncelenmesi, Yüksek Lisans tezi, Ege Univesitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, (Yayınlanmamış).
- Tekin, V., Biber Muftuler, F. Z., Kozgus Guldu, O., Yurt Kilcar, A., Medine, E. I., Yavuz, M., and Timur, S., 2014, Biological affinity evaluation of Lawsonia inermis origin Lawsone compound and its radioiodinated form via in vitro methods.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 131, 701–708.
- Terzi, A., Iraz, M., Sahin, S., Ilhan, A., Idiz, N., and Fadillioglu, E., 2004, Protective effects of erdosteine on rotenone-induced oxidant injury in liver tissue. *Toxicology and Industrial Health*, 20,6–10.
- Timmermans, F. J., and Otto, C., 2015, Contributed Review: Review of integrated correlative light and electron microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 86,1,.
- Trapani, A., Tricarico, D., Mele, A., Maqoud, F., Mandracchia, D., Vitale, P., Scilimati, A., 2017, A novel injectable formulation of 6-fluoro-l-DOPA imaging agent for diagnosis of neuroendocrine tumors and Parkinson's disease. *International Journal of Pharmaceutics*, 519,1–2,, 304–313.
- Ünak P., Durmuş Altın, G., Teksöz S., Biber Müftüler, F.Z., 2018, Uygulamalı Temel Radyofarmasi, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Vermeulen, K., Vandamme, M., Bormans, G., and Cleeren, F., 2019, Design and Challenges of Radiopharmaceuticals. *Seminars in Nuclear Medicine*, 49,5,, 339–356.
- Vey, E., Rodger, C., Booth, J., Claybourn, M., Miller, A. F., and Saiani, A., 2011, Degradation kinetics of poly,lactic-co-glycolic, acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies. *Polymer Degradation and Stability*, 96,10,, 1882–1889.
- Walkinshaw, G., and Waters, C. M., 1995, Induction of apoptosis in catecholaminergic PC12 cells by L-DOPA. Implications for the treatment of Parkinson's disease. *Journal of Clinical Investigation*, 95,6,, 2458–2464.
- Wang, H., Liu, M., and Du, S., 2014a, Optimization of madecassoside liposomes using response surface methodology and evaluation of its stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 473,1–2,, 280–285.
- Wang, H., Liu, M., and Du, S., 2014b, Optimization of madecassoside liposomes using response surface methodology and evaluation of its stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 473,1,, 280–285.
- Wang, L., Wang, Y., Wang, X., Sun, L., Zhou, Z., Lu, J., Zhou, Z., 2016, Encapsulation of low lipophilic and slightly water- soluble dihydroartemisinin in PLGA

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- nanoparticles with phospholipid to enhance encapsulation efficiency and in vitro bioactivity, 2048.
- Wang, Q., Yao, L., Xu, K., Jin, H., Chen, K., Wang, Z., and Xu, J., 2019, Madecassoside inhibits estrogen deficiency - induced osteoporosis by suppressing RANKL - induced osteoclastogenesis, ,September 2018,, 380–394.
- Wang, X., Cui, M., Jia, J., and Liu, B. 2015. ^{99m}Tc -labeled-2-arylbenzoxazole derivatives as potential A β imaging probes for single-photon emission computed tomography. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89, 331–339.
- Weintraub, D., Andrew, B., Mark, S., Andrew, D., Moberg, P., Fisman, G. K., 2005, Striatal Dopamine Transporter Imaging Correlates with Anxiety and Depression Symptoms in Parkinson's Disease, 46,2,, 227.
- Wicha-Komsta, K., and Komsta, Ł., 2017, Unconventional TLC systems in lipophilicity determination: A review. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 40,5–6,, 219–225.
- Vogel A.I., Tatchell A.R., Furnis B.S., Hannaford A.J. and Smith P.W.G., 1996, Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry (5th ed.), ISBN 0-582-46236-3.
- World Health Organization (WHO), 2006, *Neurological Disorders public health challenges*.p 140-150, Switzerland.
- Wrangel, C. von, Schwabe, K., John, N., Krauss, J. K., and Alam, M., 2015, The rotenone-induced rat model of Parkinson's disease: Behavioral and electrophysiological findings. *Behavioural Brain Research*, 279, 52–61.
- Wu, L., Zhang, J., and Watanabe, W., 2011, Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63,6,, 456–469.
- Wu, M., Yuan, Y., Chen, J., Li, C., Zhang, D., and Chen, N., 2014, Polygalasaponin F against rotenone-induced apoptosis in PC12 cells via mitochondria protection pathway, 6020,January 2016.
- Xia, Y., Xia, Y. F., Lv, Q., Yue, M. F., Qiao, S. M., Yang, Y., Dai, Y., 2016, Madecassoside ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice through promoting the generation of hepatocyte growth factor via PPAR- γ in colon. *British Journal of Pharmacology*, 173,7,, 1219–1235.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Xiong, N., Huang, J., Zhang, Z., Zhang, Z., Xiong, J., Liu, X., 2009, Stereo- taxical infusion of rotenone: a reliable rodent model for Parkinson's disease. *PLoS ONE* 4:e7878.
- Xu, C. L., Qu, R., Zhang, J., Li, L. F., and Ma, S. P., 2013, Neuroprotective effects of madecassoside in early stage of Parkinson's disease induced by MPTP in rats. *Fitoterapia*, 90, 112–118.
- Yang, X., Huang, J., Wang, Q., Wang, K., Yanga, L. and Huoa, X., 2011, A one-step sensitive dynamic light scattering method for adenosine detection using split aptamer fragments, *Analytical Methods*, 3(1):59-61 pp.
- Yang, L., Rieves, D. and Ganley, C., 2012, Brain Amyloid Imaging — FDA Approval of Florbetapir F18 Injection, *The New England Journal of Medicine*, 367,10,:885–887 pp.
- Yasin, S., Liu, L., and Yao, J., 2013, Biosynthesis of silver nanoparticles by bamboo leaves extract and their antimicrobial activity. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 1, March,, 77–84.
- Ye, Y., Fang, F., and Li, Y., 2014, Isolation of the sapogenin from defatted seeds of camellia oleifera and its neuroprotective effects on dopaminergic neurons. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62,26,, 6175–6182.
- Yurt Kilcar, A., 2013, ^{99m}Tc İle İşaretli Nanopartiküllerle Konjuge Cloquimol Türev, Ler, 'İnin Sentezi ve Alzheimer'da Rol Oynayan Amyloid Protein Birikimlerinin İn Vitro / İn Vivo Görüntülenmesinde Kullanılması, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü (Yayınlanmamış).
- Yurt Kilcar, A., Cekic, B., Biber Muftuler, F. Z., Unak, P., and Medine, E. I., 2013, In vitro evaluation of radiolabeled ,125I, methanol extracts of yarrow in cell lines of MCF-7, PC-3, A-549 and Caco-2. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 295,1,, 593–599.
- Zhou, T., Zu, G., Zhang, X., Wang, X., Li, S., Gong, X., Zhao, J., 2016, Neuropharmacology Neuroprotective effects of ginsenoside Rg1 through the Wnt / b -catenin signaling pathway in both in vivo and in vitro models of Parkinson ' s disease. *Neuropharmacology*, 101, 480–489.

KAYNAKLAR DİZİNİ (DEVAM)

- Zhou, W. and Wang, Z.L., 2006, Scanning Microscopy for Nanotechnology Techniques and Applications, New York, Springer, 533 p.
- Zhou, Y. Z., Alany, R. G., Chuang, V., and Wen, J., 2013, Optimization of PLGA nanoparticles formulation containing L-DOPA by applying the central composite design. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 39,2,, 321–330.
- Zhu, L., Ploessl, K., and Kung, H. F., 2014, PET/SPECT imaging agents for neurodegenerative diseases. *Chemical Society Reviews*, 43,19,, 6683–6691.



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum her anda, bana içtenlikle yol gösteren, güvenen, güler yüzünü, bilgi birikimini ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalışmaktan büyük bir gurur duyduğum, mesleki hayatımda çalışma prensiplerini her zaman örnek alacağım tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER'e en derin teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Doktora öğrenimim boyunca deneyim ve bilgi birikimlerini benimle paylaşan değerli hocam Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, laboratuvar çalışmalarım sırasındaki desteklerinden dolayı Prof. Dr. Hüseyin ENGİNAR, Doç Dr. Vedat EVREN, Doç. Dr. Ayfer YURT KILÇAR, Dr Öğr. Üyesi Oğuzhan ALAGÖZ, Araş. Gör. Dr. Özge KOZGUŞ GÜLDÜ, Dr. Volkan TEKİN'e, özellikle de laboratuvar ekibimden öte kardeşlerim kabul ettiğim Kadriye Büşra KARATAY, Emine DERVİŞ ve Cansu KAYAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenim sürecimle beraber hayatımdaki her aşamada bana destek olan çok kıymetli eşim Mesude UYGUR ve ilgi beklēmelerine rağmen buna katlanıp benimle gurur duyduklarına inandığım çocuklarım Nihal UYGUR ve Metehan UYGUR'a, hayatım boyunca aldığım kararlarda yanımda olan, maddi ve manevi desteklerini her zaman hissettiğim annem ve babama en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Doktora öğrenim boyunca maddi destek aldığım TÜBİTAK BİDEB tarafından yürütölen 2211-A Yurt İçi Genel Doktora burs programına ve tez çalışmasına destek veren Ege Üniversitesi Aliye Üster vakfına sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZGEÇMİŞ

Ad ve Soyad: Emre UYGUR

Doğum Tarihi: 20.06.1985

Doğum Yeri: Üsküdar- İstanbul

1. EĞİTİM

2014 – 2020 Doktora - Nükleer Uygulamalar- **Ege Üniversitesi-** Nükleer Bilimler Enstitüsü

2007-2009 Yüksek Lisans - Fen Bilgisi Öğretmenliği - **Gazi Üniversitesi** - Eğitim Bilimleri Enstitüsü -Ankara

2003-2007 Lisans - Fen Bilgisi Öğretmenliği - **Gazi Üniversitesi** **Kastamonu Eğitim Fakültesi** -[Bölüm Birinciliği]-Kastamonu

1999-2003 Şile İMKB Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi **[Okul İkinciliği] - İstanbul**