

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

^{99m}Tc -Zoledronik Asidin İşaretleme Verimine DeneySEL Koşulların Etkisi

**Radyofarmasi Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

Ecz. Çağrı Çalışkan

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu**

İZMİR
2012

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Adı Soyadı

İmza

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Makbule AŞIKOĞLU

Üye: Prof. Dr. Hayal ÖZKILIÇ

Üye: Prof. Dr. Yekta ÖZER

Yüksek Lisans Tezinin Kabul Edildiği Tarih:

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında bilgi ve birikimlerini benimle paylaşarak yol gösteren, hocalarım Sayın Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu ve Sayın Prof. Dr. Hayal Özkılıç'a teşekkür ederim.

Araştırma Görevlisi Sayın Derya İlem'e ve E.Ü. Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nın tüm personeline yapmış oldukları yardımlardan dolayı teşekkür ederim.

Bugüne kadar hep olduğu gibi tez çalışmalarım süresince de beni destekleyen anneme ve babama teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri.....	II
ÖNSÖZ.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
TABLO LİSTESİ	XI
KISALTMA LİSTESİ	XIII
BÖLÜM I	2
1 Genel Bilgiler.....	2
1.1 Radyofarmasötikler	2
1.1.1 Tanı amacıyla kullanılacak ideal radyofarmasötiğin özellikleri:	3
1.1.2 Tedavi amacıyla kullanılacak ideal radyofarmasötiğin özellikleri:	3
1.1.3 Radyofarmasötik Dizaynında Dikkat Edilecek Hususlar	3
1.1.4 Radyoişaretleme Yöntemleri	4
1.2 Tıpta Kullanılan Radyonüklitler.....	6
1.2.1 Reaktörde Üretilen Radyonüklitler	7
1.2.2 Siklotronda Üretilen Radyonüklitler	8
1.2.3 Jeneratörde Üretilen Radyonüklitler	8
1.2.4 Nükleer Tıpta Sık Kullanılan Radyofarmasötikler	10
1.3 Teknesyum	16
1.3.1 Teknesyum Kimyası	17
1.3.2 ^{99m} Tc ile Radyoişaretleme	19
1.3.3 ⁹⁹ Mo/ ^{99m} Tc Jeneratörü.....	19
1.4 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü.....	23
1.4.1 Fizikokimyasal Testler	23
1.4.2 Biyolojik Testler	24
1.5 Radyonüklidik Görüntüleme Yöntemleri	25
1.5.1 Gama Kamera (Sintigrafik Yöntemler / 2 boyutlu radyonüklit tarama).....	25
1.5.2 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)	26
1.5.3 PET (Positron Emission Tomography).....	26
1.6 Kemik Sintigrafisi.....	27
1.6.1 Üç Fazlı Kemik Sintigrafisi	28
1.6.2 Normal Kemik Sintigrafisi.....	28
1.6.3 Yumuşak Doku Tutulumları.....	29
1.6.4 Kemik Sintigrafisinin Endikasyonları	31
1.7 Kemik Yapısı	34

1.8	Kemik Radyofarmasötikleri ve Tutulum Mekanizmaları	37
1.8.1	^{99m} Tc ile İşaretli Fosfonat ve Bifosfonatlar Dışında Kemik Görüntülemeye Kullanılan Radyofarmasötikler.....	38
1.8.2	İlaç - ^{99m} Tc-Fosfonat etkileşimleri	39
1.8.3	Kemik Radyofarmasötiklerinin Hazırlanması ve Kalite Kontrolü.....	40
1.9	Bifosfonatlar.....	41
1.9.1	Genel Bakış	41
1.9.2	Biyolojik Etkileri	42
1.9.3	Etki Mekanizması	43
1.9.4	Yapı Etki İlişkisi	45
1.10	Zoledronik Asit	48
1.10.1	Kimyasal Yapı.....	48
1.10.2	Farmakodinamik Özellikleri	49
1.10.3	Farmakokinetik Özellikleri	50
1.10.4	Etki Mekanizmaları	51
1.10.5	Farmakolojik Etkiler	52
1.10.6	Endikasyonları	53
1.10.7	Yan Etkiler ve Toksisite	54
1.10.8	İlaç Etkileşimleri.....	55
BÖLÜM II	56	
2	GEREÇ VE YÖNTEM.....	56
2.1	Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasal Maddeler	56
2.1.1	Kullanılan Araçlar ve Gereçler.....	56
2.1.2	Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	57
2.2	Zoledronik Asit'in Teşhisi	57
2.2.1	FT-IR Spektrumu (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy)	57
2.2.2	Ultra Viole (UV) Spektrumu	57
2.2.3	Erime Derecesi Tayini	58
2.3	Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile İşaretlenmesi	58
2.3.1	Zoledronik Asit Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi	59
2.3.2	Kalay Klorür Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi	59
2.3.3	^{99m} Tc Aktivitesinin İşaretleme Verimine Etkisi	60
2.3.4	Askorbik Asit Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi.....	60
2.3.5	pH'in İşaretleme Verimine Etkisi.....	61
2.3.6	İn Vivo Çalışmalarda Kullanılacak Formülasyonun Belirlenmesi.....	61
2.3.7	İn Vitro Stabilité Çalışmaları.....	62
2.4	Zoledronik Asit'in İşaretleme Veriminin Hesaplanması.....	62
2.5	İn Vivo Çalışmalar	63
2.5.1	Deney Hayvanlarının Hazırlanması	63
2.5.2	İn Vivo Çalışmalarda Kullanılacak ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in Hazırlanması.....	64
2.5.3	^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in Hayvanlara Uygulanması	64

2.6	İstatistiksel Analiz	64
2.7	İzotoni	65
BÖLÜM III.....		66
3	BULGULAR.....	66
3.1	Zoledronik Asit'in Teşhisine Ait Bulgular	66
3.1.1	FT-IR Spektrumu	66
3.1.2	UV Spektrumu.....	67
3.1.3	Erime Derecesi Tayini	68
3.2	Zoledronik Asit'in ^{99m} Tc ile İşaretlenmesine Deneysel Koşulların Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	68
3.2.1	Zoledronik Asit Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	68
3.2.2	Farklı Zoledronik Asit Miktarları ile Hazırlanan Formülasyonların Stabilitesi	69
3.2.3	Kalay Klorür Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	74
3.2.4	Farklı Kalay Klorür Miktarları İle Hazırlanan ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in Stabilitesi	75
3.2.5	^{99m} Tc Aktivitesinin İşaretleme Verimine Etkisi	86
3.2.6	Farklı Aktivitede ^{99m} Tc ile İşaretlenen ^{99m} Tc-Zoledronik Asit Formülasyonlarının Stabilitesi 86	
3.2.7	Askorbik Asit Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi.....	92
3.2.8	Farklı Askorbik Asit Miktarları ile Hazırlanan Formülasyonların Stabilitesi.....	94
3.2.9	pH'in İşaretleme Verimine Etkisi.....	103
3.2.10	pH'in Stabilitate Üzerindeki Etkisi.....	103
3.3	İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Formülasyona Ait Bulgular	107
3.4	İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular.....	112
3.4.1	Gama Kamera İle Alınan Dinamik ve Statik Görüntüler	115
3.5	İzotoni Testine Ait Bulgular.....	123
3.6	İstatistiksel Analiz Testlerine Ait Bulgular	124
EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL İZİNİ		129
TARTIŞMA - SONUÇ		130
ÖZET.....		136
ABSTRACT		138
KAYNAKLAR		140
ÖZGEÇMİŞ.....		145

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 : Siklotron Yapısı	8
Şekil 2 : $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü	9
Şekil 3 : Metilen Difosfonat Molekülü	13
Şekil 4 : Perteknetat İyonu	18
Şekil 5 : Molibden-99'un Bozunma Şeması	21
Şekil 6 : $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründe Aktivite – Zaman ilişkisi	22
Şekil 7 : Kemik Yapısı.....	35
Şekil 8 : Bifosfonik asit ve pirofosfonik asit molekülleri	45
Şekil 9 : Bifosfonatların Biyolojik Etkisinden Sorumlu Substituentler	45
Şekil 10: Bazı Bifosfonatların Kimyasal Yapıları	47
Şekil 11 : Zoledronik Asit Molekülü	49
Şekil 12 : Zoledronik Asit'e ait FT-IR Spektrumu.....	66
Şekil 13: Zoledronik Asit'e ait UV spektrumu.....	67
Şekil 14 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarının stabilitesi.....	70
Şekil 15 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarının stabilitesi.....	71
Şekil 16 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.	72
Şekil 17 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.	73
Şekil 18 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.	73
Şekil 19 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.	74
Şekil 20 : Sulu ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	76
Şekil 21 : Asitli ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	77
Şekil 22 :Sulu ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları.....	78
Şekil 23 : Sulu ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları.....	79
Şekil 24 : Asitli ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları.....	79
Şekil 25 : Asitli ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları.....	80
Şekil 26 : Sulu ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Zoledronik Asit formölasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.....	81

Şekil 27 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.....	81
Şekil 28 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.....	82
Şekil 29 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.....	82
Şekil 30 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,001 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	83
Şekil 31 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	83
Şekil 32 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,005 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	84
Şekil 33 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,01 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	84
Şekil 34 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,02 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	85
Şekil 35 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	85
Şekil 36 : Farklı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi.	87
Şekil 37 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların 6 saatlik in vitro stabilitesi	88
Şekil 38 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları	89
Şekil 39 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları	89
Şekil 40 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları	89
Şekil 41 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları	90
Şekil 42 : 1 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	91
Şekil 43 : 2 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	91
Şekil 44 : 5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	91
Şekil 45 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	95
Şekil 46 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.	96
Şekil 47 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.	96

Şekil 48 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	97
Şekil 49 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.....	98
Şekil 50 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.....	98
Şekil 51 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	99
Şekil 52 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.	100
Şekil 53 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.	100
Şekil 54 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.	101
Şekil 55 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.....	102
Şekil 56 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.	102
Şekil 57 : pH'ın stabiliteye etkisi.	106
Şekil 58 : Optimum ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun oda sıcaklığında 10 saatlik in vitro stabilitesi.....	108
Şekil 58 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan formülasyonun inkübasyondan sonra içerdiği serbest Teknesyum miktarını hesaplamak için asetonda sürüklenmiş plağın radyokromatogramı.	110
Şekil 59 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan formülasyonun inkübasyondan sonra içerdiği İ-H-Teknesyum miktarını hesaplamak için serum fizyolojikte sürüklenmiş plağın radyokromatogramı.	111
Şekil 60 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 60 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.	113
Şekil 61 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 120 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.	113
Şekil 62 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.	114
Şekil 63 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in mesane bölgesine kurşun zırh yerleştirilen tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.	114
Şekil 64: ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in i.v. enjeksiyonundan sonra elde edilen Hedef/BG oranları.	115
Şekil 65 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in 1., 2., 3, ve 4. tavşana i.v. uygulanmasından hemen sonra gama kamera ile alınan bir dakikalık dinamik görüntüler.	116

Şekil 66 : Tavşanlarda ROI çiziminde kullanılan bölgeler.	117
Şekil 67 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun enjeksiyonundan 60 dakika sonra çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).	118
Şekil 68 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun enjeksiyonundan 120 dakika sonra çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).	119
Şekil 69 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun enjeksiyonundan 180 dakika sonra çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).	120
Şekil 70 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun enjeksiyonundan 180 dakika sonra hayvanların mesaneleri üstüne kurşun zırh yerleştirilerek çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).	121
Şekil 71: Gama Kamera Çalışmaları.....	122
Şekil 73 : İzotoni testinde 30 dakika bekledikten sonra 1500 devirde 5 dakika santrifüjlenen tüpler.	123
Şekil 74 : Santrifüjlenen tüplerden alınan ve mikroskopta incelenen eritrosit örnekleri (1 Nolu Tüp : Distile sudaki eritrositler, 2 Nolu Tüp : Serum Fizyolojikteki eritrositler, 3 Nolu Tüp : Optimum ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonundaki eritrositler, 4 Nolu Tüp : Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonundaki eritrositler).	124

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 : Radyoşartleme Yöntemleri	6
Tablo 2 : ^{99m}Tc ile işaretli Radyofarmasötikler ve Kullanım Alanları	15
Tablo 3 : Tıpta Kullanılan Kısa Yarı Ömürlü Radyonüklit Jeneratörleri	20
Tablo 4 : Kemik Sintigrafisinin Uygulama Alanları	33
Tablo 5 : ^{99m}Tc -Fosfonat bileşikleri ile etkileşen ilaç ve prosedürler	39
Tablo 6 : Kemik Radyofarmasötiklerinin işaretleme veriminin Hesaplanmasında Kullanılan Kromatografik Yöntem	41
Tablo 7 : Bazı Bifosfonatların Karşılaştırmalı Yapıları	46
Tablo 8 : Bifosfonatların Relatif Etki Potansiyelleri	48
Tablo 9 : Kreatinin Klerensine Göre Tavsiye Edilen Zoledronik Asit Dozları	51
Tablo 10 : Farklı miktarlarda Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc ve 0,04 mg sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	68
Tablo 11 : Farklı miktarlarda Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc ve 0,04 mg asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	69
Tablo 12 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formölasyonlarının stabilitesi	70
Tablo 13 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formölasyonlarının stabilitesi	71
Tablo 14 : Sulu ortamda çözönmüş farklı miktarlarda Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	74
Tablo 15 : Asitli ortamda çözönmüş farklı miktarlarda Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	75
Tablo 16 : Sulu ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formölasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	76
Tablo 17 : Asitli ortamda çözönmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formölasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.	77
Tablo 18 : Farklı aktivitede $\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$, sulu ortamda çözönmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	86
Tablo 19 : Farklı aktivitede $\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$, asitli ortamda çözönmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	86
Tablo 20 : Farklı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözönmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formölasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi.	87
Tablo 21 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözönmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formölasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi	88
Tablo 22 : 0,5 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözöndürölmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formölasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	93
Tablo 23 : 0,5 mg Zoledronik Asit, sulu ortamda çözöndürölmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formölasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.	93

Tablo 24 : 0,05 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m} Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.....	94
Tablo 25 : 0,05 mg Zoledronik Asit, sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m} Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.....	94
Tablo 26 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	95
Tablo 27 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	97
Tablo 28 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	99
Tablo 29 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m} Tc içeren ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.....	101
Tablo 30 : Farklı pH'lardaki Zoledronik Asit formülasyonlarının radyokimyasal saflık kontrolü çalışmalarına ait sonuçlar.....	103
Tablo 31 : pH'nın işaretleme verimine etkisi.....	103
Tablo 32 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan formülasyonların pH değerleri ve stabilitesi.....	104
Tablo 33 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan formülasyonların pH değerleri ve stabilitesi.....	105
Tablo 34 : pH'nın stabilizeye etkisi.....	106
Tablo 35 : İn vivo çalışmada kullanılmaya uygun görülen formülasyonun 6 saatlik stabilitesi.....	107
Tablo 36 : 0,5 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit ve 3 mCi ^{99m} Tc içeren optimum ^{99m} Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun oda sıcaklığında 10 saatlik in vitro stabilitesi.....	108
Tablo 37 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan ^{99m} Tc-Zoledronik Asit içeren formülasyonun radyokimyasal saflık kontrolüne ait veriler.....	109
Tablo 38 : ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan sonra elde edilen Hedef/BG oranları.....	112
Tablo 39 : Asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş aynı miktarda Kalay Klorür içeren formülasyonların stabilitelerinin karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri.....	125
Tablo 40 : Asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen aynı aktiviteli ^{99m} Tc içeren formülasyonların stabilitelerinin karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri.....	127
Tablo 41 : İn vivo çalışmalarda tavşanlara uygulanan ^{99m} Tc-Zoledronik Asit'in farklı kemiklerdeki tutulumlarından elde edilen Hedef/BG oranlarına ait p değeri.....	128

KISALTMA LİSTESİ

$^{99m}\text{TcO}_4^-$: Teknesyum Perteknetat, Serbest Teknesyum

$^{99m}\text{TcO}_2$, İ-H-Teknesyum : İndirgenmiş/Hidrolize olmuş Teknesyum

^{99}Mo : Molibden

$t_{1/2}$: Yarılanma süresi

UV : Ultraviolet (Morötesi)

FT-IR Spectroscopy : Fourier Transform Infra-Red Spektroskopisi

mg : Miligram

μg : Mikrogram

mL : Mililitre

mCi : Milicurie

keV : Kilo elektron Volt

TLC : Thin Layer Chromatography

PET : Positron Emission Tomography

SPECT : Single Photon Emission Computed Tomography

MDP : Metilen Difosfonat

HMDP : Hidroksi Metilen Difosfonat

EHDP : Etilen Difosfonat

Giriş - Amaç

Günümüzde kemik metastazı ve diğer kemik hastalıklarının araştırılmasında yaygın olarak kemik sintigrafisi kullanılmaktadır. Direkt grafiyle elde edilen verilere ek olarak kemik sintigrafisi; kemiğin kan akımı, kemik metabolizması ve yıkımı gibi fizyolojik bilgileri elde edebilme imkanı tanımaktadır.

Kemik görüntüleme amacıyla en sık kullanılan radyofarmasötik ^{99m}Tc -Metilen Difosfonat (^{99m}Tc -MDP) kompleksidir. Hidroksi Metilen Difosfonat (HMDP) ve Etilen Difosfonat (EHDP) uygulamaya sonradan giren ve kullanılmaya devam eden diğer kemik radyofarmasötikleridir. Kemik radyofarmasötikleri ile yapılan çalışmalar radyofarmasötiğin osteoblast aktivitesine bağlı olarak kemikte tutulumuna dayanır.

Zoledronik Asit osteoklast aktivitesini ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eden, yapısında azot atomu taşıyan bir bifosfonattır. Güçlü bir kemik rezorpsiyonu inhibitörüdür, hidroksiapatit kristallerine yüksek afinite gösterir ve mineralize kemik yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır. Maligniteye bağlı hiperkalsemi tedavisinde, antineoplastik tedaviye ek olarak solid tümörlerin metastatik kemik lezyonlarında ve multipl myelomda endikedir.

Bu çalışmanın amacı, osteoporoz, Paget Hastalığı ve diğer kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılan Zoledronik Asit'in, terapötik dozdan daha düşük miktarlarının nükleer tıp uygulamalarında kullanılabilecek yeni bir kemik görüntüleme ajanı geliştirmek amacıyla ^{99m}Tc ile işaretlenmesi ve farklı deneysel koşulların (etken madde miktarı, indirgen ajan miktarı, antioksidan madde miktarı, radyoaktivite miktarı ve pH değerinin) ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleksinin işaretleme verimi üzerine etkisinin ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlardaki kemik görüntüleme potansiyelinin incelenmesidir.

BÖLÜM I

1 Genel Bilgiler

1.1 *Radyofarmasötikler*

Radyofarmasötik yönetmeliğine göre, radyofarmasötik; kullanıma hazır olduğunda, yapısında radyonüklit içeren ve insanlarda tanı veya tedavi amacıyla kullanılan ürünleri ifade eden terimdir. Nükleer tıpta radyofarmasötiklerin %95'i tanı, % 5'i tedavi amacıyla kullanılmaktadır (82).

Günümüzde reaktör, jeneratör veya siklotron kaynaklı radyoizotopları kullanarak üretilen, kanser dahil olmak üzere bazı hastalıkların tedavisinde ve pek çok hastalığın teşhisinde kullanılan 100'e yakın radyofarmasötik bulunmaktadır (40).

Radyofarmasötiklerle yapılan görüntülemenin üstünlüğü bilgisayarlı tomografi, manyetik rezonans ve ultrason gibi yöntemlerde bulunmayan, fizyolojik fonksiyonları ve metabolik aktiviteyi belirleme ve böylece organ fonksiyon ve disfonksiyonları hakkında daha ayrıntılı bilgi verme kapasitesine sahip olmasıdır. Radyofarmasötikler ile yapılan biyodağılım çalışmaları fonksiyonel morfolojiye dair görüntüler elde edilmesini ve non-invazif diyagnoz olanağını sağlar (40, 82).

Radyofarmasötikler radyokimyasallardan farklı olarak, insana uygulanacakları için steril ve apirojen olarak hazırlanırlar. Radyofarmasötikler küçük moleküller olabileceği gibi, monoklonal antikorlar gibi makromoleküller de olabilirler (55, 82).

Tanı amaçlı kullanılacak radyofarmasötikler gama ışını yayarlarlarken tedavide kullanılacak radyofarmasötikler β ışını yayarlar (48).

1.1.1 Tanı amacıyla kullanılacak ideal radyofarmasötüğün özellikleri:

- Saf gama ışını yayıcı olmalı
- Gama enerjisi 100-250 keV olmalı
- Efektif yarı ömrü görüntüleme süresinden 1,5 kat daha fazla olmalı
- Hastanın ve uygulama yapan personelin alacağı radyasyon dozu minimum olmalı

- Hedef / hedef olmayan doku oranı yüksek olmalı
- Hazırlanması ve kalite kontrolü kolay olmalı
- Ucuz olmalı ve kolay bulunabilmeli
- Toksik olmamalı
- Kararlı olmalı (21, 82).

1.1.2 Tedavi amacıyla kullanılacak ideal radyofarmasötüğün özellikleri:

- Saf beta ışını yayıcı olmalı
- Enerjisi 1 meV'den büyük olmalı
- Hedef / hedef olmayan doku oranı yüksek olmalı
- Efektif yarı ömrü gün düzeyinde olmalı
- Hazırlanması ve kalite kontrolü kolay olmalı
- Ucuz olmalı ve kolay bulunabilmeli
- Toksik olmamalı
- Kararlı olmalı (21, 82).

1.1.3 Radyofarmasötik Dizaynında Dikkat Edilecek Hususlar

Uyumluluk : Yeni bir radyofarmasötik geliştirilirken işaretleme işleminden önce üzerinde düşünülmesi gereken ilk şey; radyonüklit ile farmasötik molekülün birleşip birleşmeyeceği olmalıdır (59, 82).

Stokiyometri : Yeni bir radyofarmasötik hazırlanırken, radyofarmasötiğın bütün bileşenlerinin miktarları bilinmelidir. Bileşenlerden birinin az veya fazla miktarda olması radyofarmasötiğın bütünlüğünü ve işlevini bozar (59, 82).

Molekül Büyüklüğü : Radyofarmasötiğın biyolojik sistemdeki absorpsiyonunu belirleyen önemli bir faktördür (59, 82).

Molekül Yüğü : Elektriksel yük radyofarmasötiğın değışik solvanlardaki çözünürlüğünü etkiler (59, 82).

Çözünürlük : Enjeksiyonla uygulanan radyofarmasötikler sulu çözeltilerde stabil ve pH değıerleri kan pH değıerine eşit olmalıdır. Radyofarmasötiklerin lipid çözünürlüğü, biyodağılımlarını ve lokalizasyonlarını etkileyen bir faktördür (59, 82).

Proteinlere Bağlanma : Radyoaktif olsun veya olmasın neredeyse bütün ilaçlar plazma proteinlerine bağlanır. Albumin, globülin ve transferrin ilaç moleküllerinin çoğunlukla bağlandığı proteinlerdir. Proteinlere bağlanma oranı radyofarmasötiğın dokulardaki dağılımını, plazma klerensini ve hedef organdaki tutulumunu etkiler (59, 82).

Stabilite : Radyofarmasötiğın kararlılığı işaretleme işleminde dikkat edilmesi gereken temel husustur. Radyofarmasötik hem in vivo hem in vitro ortamda stabil olmalıdır. Stabil olmayan radyofarmasötikler biyodağılım çalışmalarında istenmeyen sonuçlar verirler (59, 82).

1.1.4 Radyoişaretleme Yöntemleri

Radyoişaretlemede kullanılan başlıca 6 yöntem vardır (59, 85) :

Moleküle yabancı işaret girişı : Biyolojik davranışı bilinen molekülün kovalent bağlarla radyonüklite bağlanmasıdır.

İzotop değişimi : Moleköldeki atomlardan bir veya birkaçının radyoaktif izotopları ile yer değiştirmesi esasına dayanır

Bifonksiyonel şelatlarla İşaretleme : Bu metodda bifonksiyonel şelat yapıcı ajanlar bir taraftan makromoleküllere bağlanırken diğer taraftan metal iyonu ile bağ yaparlar.

Biyosentez : Radyoaktif maddenin bulunduğu kùltür ortamında yetişen organizmaların metabolik işlemleri sonucunda ortamda bulunan radyoaktif madde organizmanın metabolitleri ile birleşir.

Geri Tepme ile İşaretleme : Nùkleer reaksiyon esnasında, çekirdekten yayılan partiküllerin hedef madde moleküller ile etkileşmesi sonucu ortamda iyonlar oluşmasıdır. Kullanım alanı geniş değildir. Yüksek enerjili atomlar işaretleme veriminin dūřmesine ve spesifik aktivitenin yüksek olmasına sebep olur.

Eksitasyon ile İşaretleme : İşaretlenmek istenen molekülün, anne radyonùklitin nùkleer bozunması sonucu oluşan iyonlarla kompleks oluşturmasıdır. Dūřük verimli bir metottur.

Radyoişaretlemede kullanılan yöntemler Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1 : Radyoşaretleme Yöntemleri (82).

RADYOİŞARETLEME METODU	RADYOFARMASÖTİK
Moleküle Yabancı Radyonüklit Girişi	^{99m}Tc radyofarmasötikleri ^{125}I ile işaretli proteinler ^{125}I ile işaretli hormonlar ^{111}In ile işaretli hücreler ^{111}In ile işaretli Bleomisin
İzotop değişimi	^{125}I ile işaretli T3 ve T4, PET için kullanılan ^{14}C , ^{32}S ile işaretli moleküller
Bifonksiyonel Şelatlar ile İşaretleme	^{111}In – DTPA – Albumin
Biyosentez	^{57}Co ile işaretli B ₁₂ vitamini ^{75}Se -Selenometiyonin
Geri Tepme ile İşaretleme	^3H ile işaretli bileşikler Iyotlanmış bileşikler
Eksitasyon ile İşaretleme	^{123}Xe 'dan bozunan ^{123}I ile işaretli bileşikler ^{77}Kr 'dan bozunan ^{77}Br ile işaretli bileşikler

1.2 Tıpta Kullanılan Radyonüklitler

Doğada bulunan radyonüklitler çok uzun yarı ömürleri sebebiyle nükleer tıpta kullanılmaya uygun değildir. Bir başka deyişle nükleer tıpta kullanılan radyonüklitlerin tümü yapay olarak, reaktör, siklotron veya jeneratörlerden elde edilirler (82).

1.2.1 Reaktörde Üretilen Radyonüklitler

Nükleer tıpta kullanımları açısından bakıldığında reaktörde radyoizotop üretiminin iki yolu vardır :

1.2.1.1 Termal Nötron Reaksiyonları

Reaktörde termal nötron reaksiyonları ile radyonüklit üretilirken iki çeşit reaksiyon görülebilir :

Birinci reaksiyon türünde, ısınlanan element bir nötron tutar ve sonrasında gama ışını yayar.

Bu yolla üretilen radyonüklitlere örnek olarak; Mo-99, Fe-59, Se-75, I-131, Re-186, Y-90, Cr-51, Mn-54, P-33, Ni-63 verilebilir.

İkinci reaksiyon türünde ise reaksiyona giren atom bir nötron tutar ve bir proton saçar. Reaksiyon farklı atom numaralı ve daha yüksek spesifik aktiviteli bir elementin ortaya çıkmasıyla sonuçlanır.

Bu yolla üretilen radyonüklitler ise H-3, C-14, P-32' dir (70, 82).

1.2.1.2 Fizyon Reaksiyonları

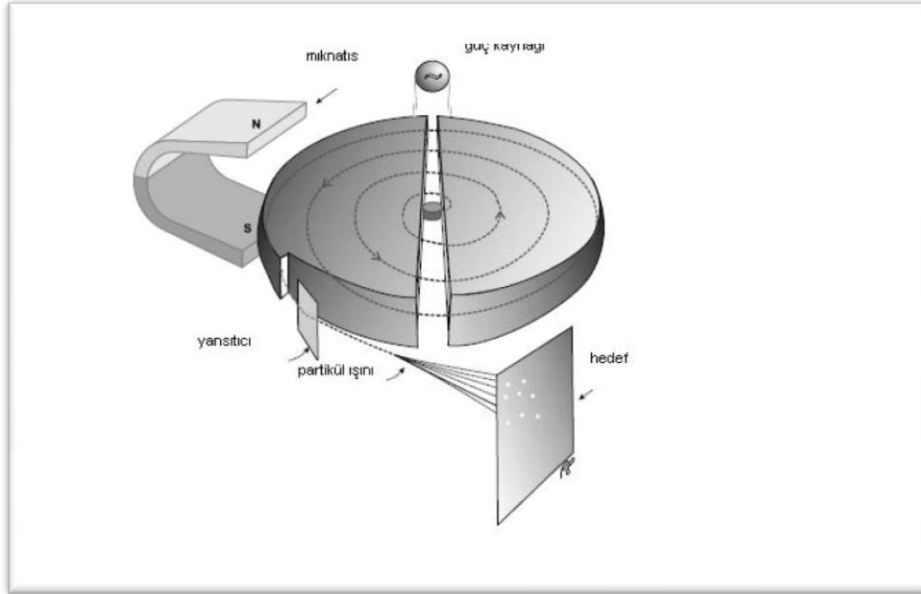
Ağır radyoaktif çekirdekler nötronlarla bombardımana tabi tutulduğunda, nötron absorblayarak, orta ağırlıkta 2 çekirdeğe bölünürler.

Fizyon reaksiyonu sonucu oluşan radyonüklitleri ayırmak için ekstraksiyon, iyon değişimi, çöktürme, distilasyon ve kromatografik yöntemler kullanılabilir. Nükleer tıpta sıklıkla kullanılan I-131, Xe-133 ve jeneratörlerde Tc-99m eldesi için ana radyonüklit olan Mo-99 bu yöntemle elde edilir (46, 48, 82).

1.2.2 Siklotronda Üretilen Radyonüklitler

Siklotronlar alfa, deutron, proton gibi yüklü partiküllerin vakum altında spiral bir rota izlerken hızlandırılması esasına dayanarak çalışır. Hızlandırılmış partiküllerin enerjisi 1 kEv ile 1 mEv arasında değişebilir. Siklotronu meydana getiren yarım dairelere uygulanan alternatif elektrik akımı elektromanyetik bir alan meydana getirir. Bu alanda partiküller giderek hızlanır ve yeterli hıza eriştiklerinde hedefe yollanırlar. Hedefe yollanan partiküller ve hedef atomlar oluşan nükleer reaksiyon sonucu radyonüklitler elde edilir.

Siklotronda üretilen radyonüklitler; Ga-67, I-123, In-111, T-201, C-11, N-13, O-15, F-18'dir (72, 82, 84).



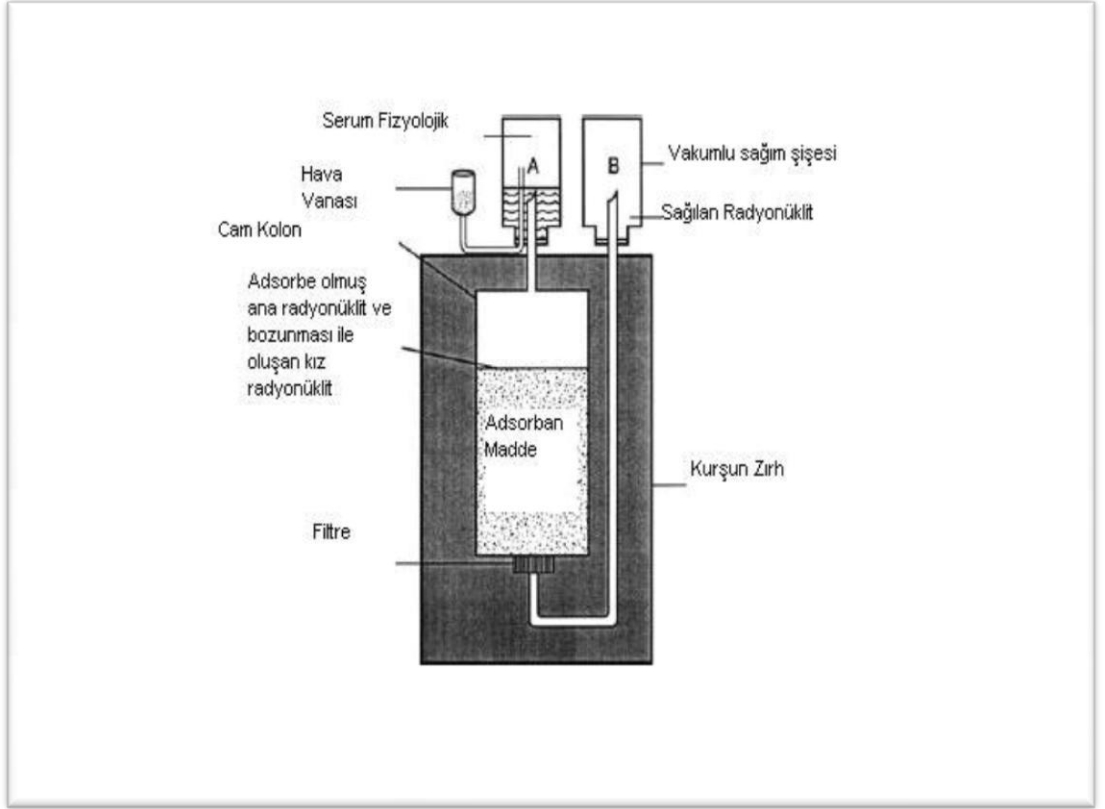
Şekil 1 : Siklotron Yapısı (72).

1.2.3 Jeneratörde Üretilen Radyonüklitler

Radyonüklit jeneratörleri nükleer tıpta kullanılan kısa yarı ömürlü radyonüklitleri elde etmek için kullanılırlar. Relatif olarak daha uzun ömürlü 'ana' radyonüklitlerden kısa yarı ömürlü 'kız' radyonüklitler elde edilir. Ana ve kız

radyonüklitler birbirlerinin izotopu olmadıkları için kolayca ayrıştırılabilirler. Ayrıştırmanın temeli kromatografidir. Ana radyonüklit kolonda kalırken, kız radyonüklit serum fizyolojik içinde sağılır.

En çok kullanılan radyonüklit jeneratörü $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörüdür (50, 83).



Şekil 2 : $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü (48).

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü dışında nükleer tıpta kullanılan diğer radyonüklit jeneratörlerinden bazıları aşağıda verilmiştir :

$^{113}\text{Sn}/^{113}\text{In}$ jeneratörü

$^{81}\text{Rb}/^{81}\text{Kr}$ jeneratörü

$^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ jeneratörü

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratörü

$^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ jeneratörü (46).

1.2.4 Nükleer Tıpta Sık Kullanılan Radyofarmasötikler

Talyum-201 : Klinikte kardiyak görüntüleme amacıyla sık kullanılan bir radyofarmasötiktir. Klorür tuzu ticari olarak bulunabilir. Yarı ömrü 73 saattir (20, 46).

Galyum-67 : Siklotron ürünü bir radyonüklittir. Sitrat tuzu kullanılır. Yumuşak doku ve beyin tümörlerine afinitesi yüksektir. Enfeksiyon odaklarının görüntülenmesinde de kullanılır (4).

İyot radyofarmasötikleri : Nükleer tıpta tanı ve tedavi amacıyla sıklıkla kullanılan radyonüklitlerdir. Kloramin-T ile oksitlenen iyot pek çok aromatik halkaya kolaylıkla bağlanabilir. İyotun değişik izotopları nükleer tıpta kullanılmaktadır (21, 46).

I-131 : Uranyumun fizyonu sonucu oluşur. Yarı ömrü 8,1 gün, enerjisi 364 kEv'dir. β ışını yaydığı için tedavi amacıyla hipertiroidi ve tiroid kanserinde kullanılır (21, 46).

I-125 : Yarı ömrü 60 gün, enerjisi çok düşük (35 KeV) olduğundan görüntülemeye kullanmaya çok uygun değildir. I-125 ile işaretli antikolar

radyoimmunoassay serum albümini ise plazma hacmini hesaplama çalışmalarında kullanılmaktadır (21, 46).

I-123 : Siklotrondan elde edilir. Yarı ömrü 13 saat enerjisi 159 kEv'dir. ¹²³I-MIBG böbrek görüntülemesinde ¹²³I-IMP serebral perfüzyon görüntülemesinde kullanılır (21, 46).

Indiyum-111 : Siklotrondan elde edilir. 67 saatlik yarı ömre sahip, gama ışını yayan bir radyonüklittir. Ga-67 gibi sulu çözeltilerinde +3 değerliklidir ve vücutta demir iyonlarını taklit ederek plazma proteinlerinden transferrine bağlanır. ¹¹¹In-DTPA böbrek ve beyin görüntülemesinde, ¹¹¹In kolloidleri karaciğer ve dalak görüntülemesinde kullanılır (46).

Ksenon-133 : Akciğer görüntülemesinde kullanılan inert bir gazdır. 5,3 günlük yarı ömrü ve 81 kEv lik enerjisi vardır (46).

Renyum-186 : Reaktörden elde edilen β ışını yayan bir radyonüklittir. Hidroksietilen Difosfonat (HEDP) ile oluşturduğu ¹⁸⁶Re-HEDP kompleksi kemik metastazlarında kemik ağrısının palyatif tedavisi ve tüm vücut taramada kullanılır (66).

Fosfor-32 : Yalnızca β ışını yayar ve bu yüzden tedavide kullanılır. i.v. yolla verilir yarı ömrü 14 gündür. Polisitemia vera ve idiyopatik trombositoz tedavisinde dokularda nekroz oluşturuucu etkisi sebebiyle kullanılır (46).

Krom-51 : Dolaşımda bulunan eritrositlerin miktarını ve ömrünü belirlemek amacıyla kullanılır (46).

Teknesyum-99m : Görüntülemesinde en çok kullanılan radyofarmasötiktir. Jeneratörden elde edildiği perteknetat formuyla tiroid, tükürük bezleri, mide ve

testislerde tutulur. Yarı ömrü 6 saattir. Farklı farmasötiklerle oluşturduğu kompleksler bir çok organın görüntülenmesinde kullanılmaktadır (106).

^{99m}Tc-PPI (Teknesyum Pirofosfat) : Eritrosit işaretlemede ve geçirilmiş myokard enfarktüsü sahasını görüntülemeye kullanılır (106).

^{99m}Tc-DTPA (Teknesyum Dietilentriamin Pentaasetik Asit) : Böbrek görüntüleme ve glomerüler filtrasyon ölçümünde, serebral kanlanma ve kan beyin engeli çalışmalarında, Bowel hastalığına bağlı inflamasyon görüntülemeye kullanılır (46, 101).

^{99m}Tc-DMSA (Teknesyum Dimerkaptosüksinik Asit) : Böbrek görüntülemeye kullanılan bir radyofarmasötiktir. Böbrek enfeksiyonlarının tespiti ve böbreğin morfolojik olarak incelenmesinde kullanılır.

^{99m}Tc-MAA (Teknesyum Makroagregat Albumin) : Makroagregat albumin insan serum albuminin ısıda agregasyonu ile elde edilir. Akciğer ventilasyon sintigrafisinde kullanılır (46).

^{99m}Tc-SC (Teknesyum Sülfür Kolloid) : i.v. kullanıma uygundur, ^{99m} Tc ile işaretli sülfürün steril dispersiyonudur. Partikül boyutu 0,1 ile 1 µm arasında değişmektedir. Gastrointestinal sistem kanamalarının belirlenmesinde, mide boşalma zamanının ölçülmesinde, kemik iliği, dalak ve karaciğer sintigrafilerinde kullanılır (106).

^{99m}Tc-IDA (Teknesyum Iminodiasetik Asit türevleri) : IDA türevleri indirgenmiş Teknesyumla kolayca kompleks oluştururlar. Kullanılan değişik N-süstitüe türevleri; DIDA (2,6-dietil veya Etilfenin), PIPIDA (Paraizopropil veya

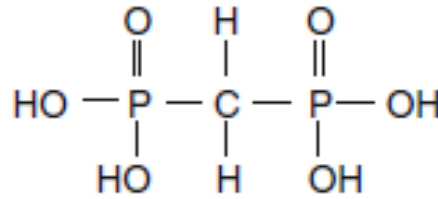
Iprofenin) BIDA (Parabutıl veya Butılfenin) DISIDA (Diizopropil) ve bromotrimetil (Mebrofenin)'dir (46).

Hepatik fonksiyonları değerlendirmede, safra kesesi kanalı tıkanıklığını görüntülemeye kullanılır (106).

^{99m}Tc-HMPAO (Teknesyum Hekzametilen Propilen Aminoksim) : Kan beyin engelini aşabilen ve beyin perfüzyonu görüntülemeye kullanılan bir radyofarmasötiktir. Stabil olmadığı için hazırlanmasından en geç 30 dakika sonra hastaya uygulanmalıdır (56).

^{99m}Tc-MIBI (Teknesyum Metoksiizobutilizonitril) : Myokard perfüzyon sintigrafisinde, paratiroid hiperfonksiyon adenomunun görüntülenmesinde ve tümör görüntülemeye kullanılır (106).

^{99m}Tc-MDP (Teknesyum Metilen Difosfonat) : Kemik sintigrafisinde kullanılır (106).



Şekil 3 : Metilen Difosfonat Molekülü (106).

^{99m}Tc-EHDP (Teknesyum Etan Hidroksi Difosfonat) : ^{99m}Tc ile işaretli Etan Hidroksi Difosfonat, sık kullanılan bir kemik görüntüleme ajanıdır. Hızlı kan klerensine ve düşük yumuşak doku tutulumu oranına sahiptir (43).

^{99m}Tc -HMDP (Teknesyum Hidroksimetilen Difosfonat) : ^{99m}Tc ile işaretli Hidroksimetilen Difosfonat, kemik metastazlarının belirlenmesinde ^{99m}Tc -MDP ile hemen hemen aynı diyagnostik potansiyele sahiptir. i.v. enjeksiyondan sonra %40-50'si dokularda tutulurken kalanı idrarla atılır (106).

Nükleer tıpta kullanım alanlarına göre ^{99m}Tc ile işaretli radyofarmasötikler Tablo 2'de verildi.

Tablo 2 : ^{99m}Tc ile işaretli Radyofarmasötikler ve Kullanım Alanları (106).

Kategori	Radyofarmasötikler
^{99m}Tc ile işaretli Kemik Görüntüleme Ajanları	MDP (Metilen Difosfonat) HDP (Hidroksimetilen Difosfonat) HEDP (1-Hidroksietiliden Difosfonat)
^{99m}Tc ile işaretli Böbrek Görüntüleme Ajanları	DTPA (Dietilentriamin Pentaasetik Asit) DMSA (Dimerkaptosüksinik Asit) EC (Etilen Disistein)
^{99m}Tc ile işaretli Myokardial Perfüzyon Görüntüleme Ajanları	MIBI (Metoksiizobutil Izonitril) Tetrofosmin
^{99m}Tc ile işaretli Beyin Perfüzyonu Görüntüleme Ajanları	HMPAO (Hekzametilen Propilen Amin Oksim) ECD (Etil Sisteinat Dimer)
^{99m}Tc ile işaretli Karaciğer Görüntüleme Ajanları	IDA (İmino Diasetik Asit) türevleri
^{99m}Tc ile işaretli Kolloidler	SC (Sülfür Kolloid) TC (Kalay Kolloid) Albumin nanokolloid
^{99m}Tc ile işaretli Monoklonal Antikorlar	Arcitumomab (Karsinoembriyojenik Antijen) Sulesomab
^{99m}Tc ile işaretli Peptid ve Proteinler	Depreotide Apticide
^{99m}Tc ile işaretli Albumin	HSA (İnsan Serum Albumini) MAA (Makroagregat İnsan Serum Albumini)

1.3 Teknesyum

Atom numarası 43 olan Teknesyum, Molibden'in radyoaktif bozunmasıyla elde edilen yapay bir elementtir. Periyodik tablodaki yeri 1869'da Mendeleyev tarafından öngörülmüş, Perrier ve Segre tarafından 1937'de California'daki Berkeley Radyasyon Laboratuvarı'nda keşfedilmiştir (82, 89). Molibden'in 8 MeV enerjili deutronlarla siklotrona bombardımanı sonucu ortaya çıkan ürünlerin radyoaktif Molibden çekirdekleri ve 6 saat yarı ömürlü gama ışını yayan Teknesyum-99m (^{99m}Tc) olduğu 1938'de Perrier ve Seaborg tarafından yapılan araştırmalarda anlaşılmıştır (59). Teknesyum, ismini 1947'de Yunanca 'yapay' anlamına gelen 'technetos' kelimesinden almıştır.

Çekirdeklerinde aynı sayıda nötron ve proton içerip farklı enerji seviyelerinde bulunan atomlara izomer denir. ^{99m}Tc ile ^{99}Tc izomer atomlardır. İzomerler 'm' harfiyle gösterilir ve bu simge atomun normalden daha yüksek bir enerji seviyesinde olduğunu belirtir. Bu durumdaki atomlara 'metastabil izomerler' denir. Metastabil izomerler çekirdeklerindeki fazla enerjiyi gama ışını olarak yayarak daha düşük enerjili bir hale dönme eğilimindedirler. ^{99m}Tc , düşük enerji seviyesinde olan ^{99}Tc atomuna dönüşmek ister ve bu esnada gama ışını yayar (37, 89).

^{99m}Tc 'in jeneratörlerden elde edilmesi ilk kez Brookhaven Ulusal Laboratuvarı'nda 1957'de, ticari olarak kullanıma sunulması ise 1965'te gerçekleşmiştir. ^{99m}Tc 'in kullanımının yaygınlaşması nükleer tıpta görüntüleme sistemlerinin büyük aşama kaydetmesini sağlamıştır. Bu ilerleme 1970'lerde Kalay Klorür ile indirgenen ^{99m}Tc -DTPA'nın kullanıma hazır liyofilize kitlerinin hazırlanmasıyla daha da fazla hız kazanmıştır (48, 59).

^{99m}Tc bütün nükleer tıp uygulamalarının yaklaşık %85’inde kullanılmaktadır. Bu kadar yaygın kullanımının sebebi ideale oldukça yakın özellikler taşıyor olmasıdır.

Teknesyum’a ait bu özellikler :

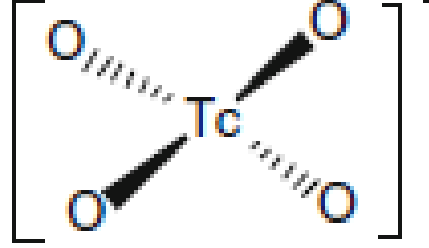
- Sintigrafi için ideal olan 140 keV’lik enerjiye sahip bir gama ışını yayıcı olması.
- Klinik uygulamalar için uygun olan 6 saatlik yarı ömre sahip olması.
- Kimyasal bir substrata bağlandığında oluşan kompleksin yüksek hedef/hedef olmayan bölge dağılımı göstermesi
- $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratörlerinden kolayca elde edilebilmesi
- Kalite kontrol çalışmalarının kolay yapılabilmesidir (89).

1.3.1 Teknesyum Kimyası

Elementel Teknesyum periyodik tablonun VIIB grubunda Mn (Mangan) ve Re (Renyum) arasında bulunur. Teknesyum (+7)’den (-1)’e kadar 8 farklı oksidasyon basamağında bulunabilir. En kararlı olduğu basamaklar (VII), (V), (IV), (I) ve 0’dır. Jeneratörlerden elde edilen Sodyum Perteknetat ($^{99m}\text{Tc}-\text{NaTcO}_4$) formunun oksidasyon basamağı +7’dir (48). TcO_4^- ’in kimyasal reaksiyonlara girebilmesi için Tc^{+7} ’in daha düşük oksidasyon basamaklarında bulunması gerekir. Bunun için gerekli olan indirgenme işlemi çeşitli indirgeyici ajanlar (Kalay Klorür, Kalay Tartarat, Kalay Sitrat) kullanılarak yapılabilir. Rutinde en çok kullanılan indirgeyici ajan Kalay Klorür’dür (95). $10^6:1$ oranında Sn^{+2} iyonu kullanılması ^{99m}Tc radyofarmasötiklerindeki tüm ^{99m}Tc atomlarını indirgemek için yeterlidir (106).

Bazı durumlarda ligandın kendisi de indirgeyici ajan gibi davranır (19).

Perteknetat iyonunun açık kimyasal yapısı Şekil 4’te gösterilmiştir.



Şekil 4 : Perteknetat İyonu (106).

Perteknetat iyonu $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen izotonik NaCl çözeltisi içinde elde edilir. Nükleer tıpta kullanıldığı alanlar şunlardır :

- İşaretli kompleksler oluşturmak için ligandlara bağlanma
- Tiroid sintigrafisi
- Tükürük bezi sintigrafisi
- Gözyaşı bezleri sintigrafisi
- Meckel Divertikulumu sintigrafisi
- Mide sintigrafisi

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ kolloidleri haricinde nükleer tıpta kullanılan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyofarmasötikleri metal kompleksleridirler. Merkezdeki $^{99\text{m}}\text{Tc}$ atomu Lewis asidi, çevresindeki atom veya fonksiyonel gruplar ise Lewis bazı olarak davranır (89).

Teknesyum’un yaptığı şelatların stabilitesi ligand türlerine göre tetradentat>tridentat>bidentat>monodentat olarak sıralanır (19).

Tc^{+4} iyonu PYP, MDP ve DTPA gibi anyonlarla kompleks yapmak için en uygun formdadır.

1.3.2 ^{99m}Tc ile Radyoişaretleme

Hazırlanan formülasyonlar ligand ve ^{99m}Tc haricinde, indirgeyici ajan, antioksidan, tampon çözelti ve sürfaktan içerebilir (46).

Direkt işaretleme metodu : Ligand, indirgeyici ajan ve gerekli diğer maddeleri içeren karışıma ^{99m}Tc eklenmesi yolu izlenir (39, 61).

Değişim metodu : İki basamaklı bir metoddur. Ligandı uygun bir oksidasyon basamağında stabilize eden kararsız bir ligand varlığında TcO₄⁻ indirgenir. Bunu takiben reaksiyon kabına daha kuvvetli donörler olan final ligandları eklenir. Bu işleme transmetalasyon da denir.

^{99m}Tc ile işaretli formülasyonlarda ortamda oluşan kompleks dışında, kalay tarafından indirgenmeyen Serbest Teknesyum ve şelat yapıcı ajanla etkileşmemiş indirgenmiş Teknesyum bulunabilir. Teknesyum radyofarmasötiklerinde safsızlık konsantrasyonunun %5'i geçmemesi istenir. Formülasyonlar hazırlanırken ortam O₂ bulunması Tc⁺⁷ iyonlarının indirgenmesini engeller, bu da serbest perteknetat miktarının artmasına sebep olur (39, 46).

1.3.3 ⁹⁹Mo/^{99m}Tc Jeneratörü

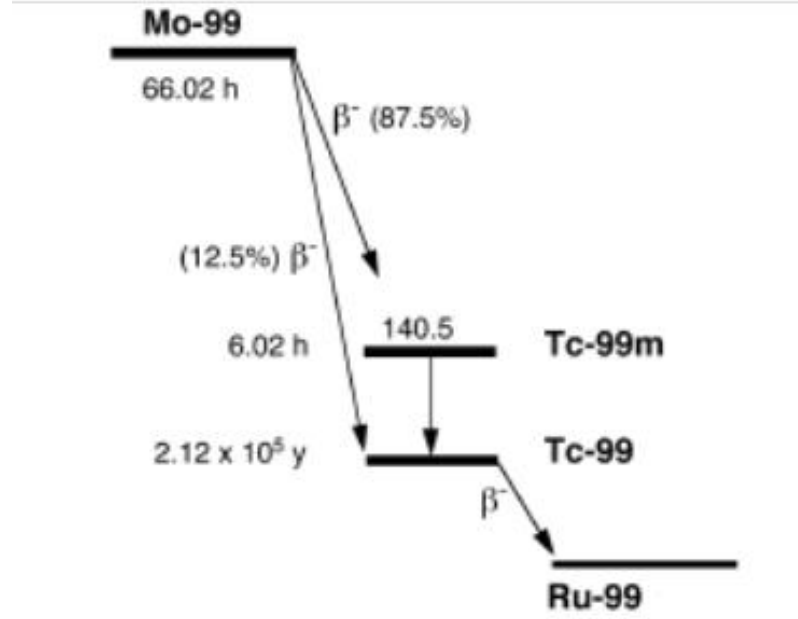
Radyonüklit jeneratörleri uzun ömürlü 'anne' radyonüklitten, kısa ömürlü 'kız' radyonüklit elde edilmesi ilkesine dayanır. Bozunma sonucu oluşan kız radyonüklit kimyasal özellikleri bakımından 'anne' radyonüklitten farklı olmalıdır, böylece kolayca ayrıştırılabilir. Jeneratörün kullanım ömrü anne radyonüklitin yarı ömrüne bağlıdır (106). Jeneratör tabana oturtulmuş cam veya plastik bir sütundan oluşur. Bu sütun anne nüklidin adsorbe edileceği, iyon değiştirici reçine veya alüminyumdan yapılmıştır (2).

Nükleer tıpta kullanılan kısa yarı ömürlü radyonüklitleri üreten jeneratörler Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3 : Tıpta Kullanılan Kısa Yarı Ömürlü Radyonüklit Jeneratörleri (48)

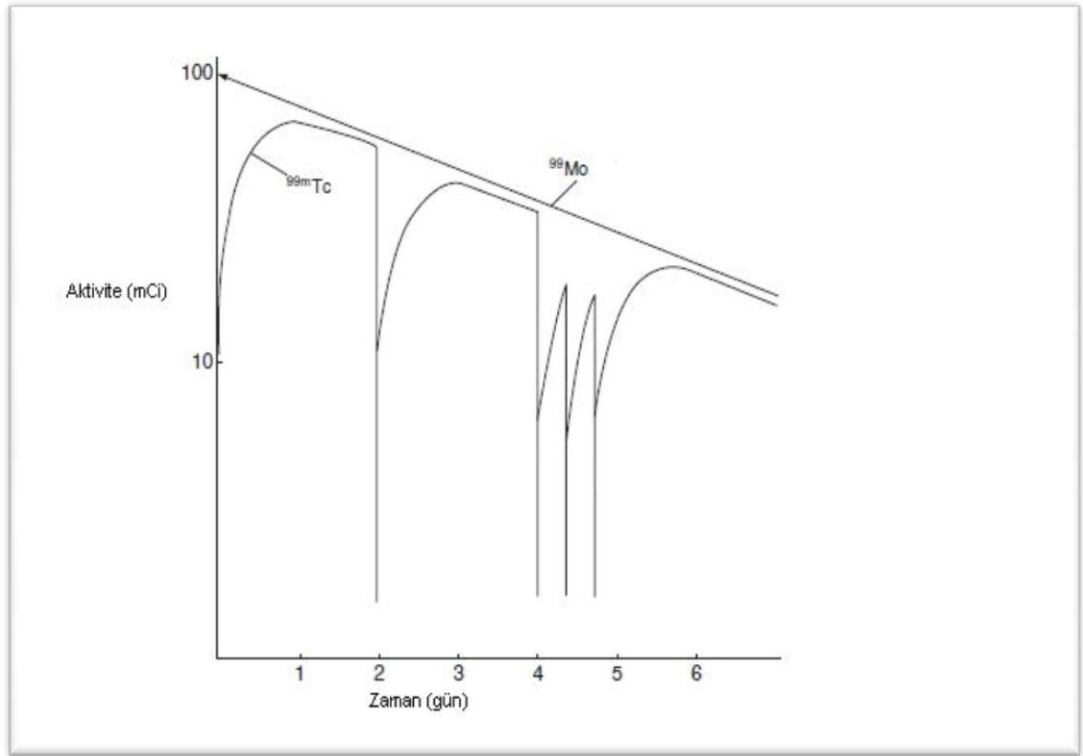
Ana Nüklit	Bozunma Türü	T _{1/2}	Oluşan Radyonüklit	Enerji (keV)	T _{1/2}
⁹⁹ Mo	β-	66,02 saat	^{99m} Tc	141	6,02 saat
¹¹³ Sn	Elektron yakalama	115,1 gün	^{113m} In	392	1,66 saat
⁸¹ Rb	Elektron yakalama, β+	4,58 saat	^{81m} Kr	190	13,3 saniye
⁸² Sn	Elektron yakalama	25 gün	⁸² Rb	-	1,25 dakika
⁶⁸ Ge	Elektron yakalama	288 gün	⁶⁸ Ga	-	68,3 dakika

Radyonüklit jeneratörlerinden en çok kullanılanı ⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratörüdür (60). İlk kez 1957’de Brookhaven National Laboratory’de kullanılmıştır (48). Alüminyum kolona emdirilmiş MoO₄⁻² (Molibdat) formundaki ⁹⁹Mo ana radyonüklittir. Günümüzde kullanılan jeneratörlerin hepsinde fizyon ürünü ⁹⁹Mo bulunmaktadır. Fizyon ürünü Molibden kullanılmasının avantajı yüksek spesifik aktiviteye sahip olmasıdır. Perteknetat iyonunun jeneratörden sağımı kromatografik ilkelere dayanır (8). Kolondan %0,9’luk NaCl solüsyonu geçirilmesi esnasında ⁹⁹Mo ve bozunma ürünü ⁹⁹Tc alüminyum kolonda kalırken, ^{99m}Tc, perteknetat anyonu halinde sağılır. Sağım işlemi vakumlu şişeler kullanılarak yapılır. Sağım sonucu elde edilen perteknetat çözeltisi, renksiz, berrak ve izotoniktir (106).



Şekil 5 : Molibden-99'un Bozunma Şeması (72).

Kolona emdirilen ^{99}Mo bozunmaya başladığında jeneratörde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ artmaya başlar. Yaklaşık 4 yarı ömür (1 gün) sonra $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyoaktivitesi ve ^{99}Mo radyoaktivite arasında bir dengeye ulaşılır (90). $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyoaktivitesi sağım ile birlikte jeneratörde kalan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ konsantrasyonu düşerken o bozunmaya devam eder ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ konsantrasyonu tekrar artar. $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörünün kullanım ömrü yaklaşık bir haftadır ve bu sürenin sonlarına doğru ^{99}Mo aktivitesi azaldığından daha sık sağım yapılır.



Şekil 6 : $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründe Aktivite – Zaman ilişkisi (82).

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörünün sağım verimi aşağıdaki gibi hesaplanır :

Sağım verimi : Sağılan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aktivitesinin, sağım zamanı için hesaplanan teorik $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aktivitesine oranıdır :

$A_1 = A_0 e^{-\lambda_1 t}$: Ana radyonüklidin herhangi bir zamandaki aktivitesi

$A_2 = A_0 e^{-\lambda_2 t}$: Ürün radyonüklidin herhangi bir zamandaki aktivitesi

$$A_{99\text{mTc}}(t) = A_{99\text{Mo}(t=0)} \times 0,96(1 - e^{-0,105t})$$

λ_1 : ^{99}Mo bozunma sabiti

λ_2 : $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bozunma sabiti

A_0 : Kalibrasyon anındaki ^{99}Mo aktivitesi :

A_1 : t anındaki ^{99}Mo aktivitesi

A_2 : t anındaki $^{99\text{m}}\text{Tc}$ aktivitesi (82).

1.4 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü

İnsanlara uygulanan diğer tüm ilaçlar gibi radyofarmasötikler de kalite kontrol testlerinden geçirilmelidir. İlaçlara uygulanan kalite kontrol testlerine ek olarak radyofarmasötikler, radyokimyasal saflık ve radyonüklidik saflık testlerine de tabi tutulurlar. Radyofarmasötiklere uygulanan kalite kontrol testlerini iki ana grupta toplanabilir : Fizikokimyasal testler ve biyolojik testler (82, 85).

1.4.1 Fizikokimyasal Testler

Fiziksel Özellikler : Çözelti halindeki radyofarmasötikler berrak olmalı, zamanla renk değişimi olmamalıdır. Kolloid halindeki radyofarmasötiklerin partikül boyutları istenen uygulamaya uygun olmalıdır (46, 100).

pH ve İyonik Güç : Radyofarmasötik çözeltilerinin pH değeri idealde kanın pH değeri olan 7,4 olmalıdır. Kanın tamponlama yeteneğinin iyi olması sebebiyle uygulamacak radyofarmasötiğin pH değeri 2 ile 9 arasında değişebilir. Radyofarmasötiğin pH değerinin yanı sıra ozmolalite ve izotonisite de insana uygulamaya uygun olmalıdır (85).

Radyonüklidik Saflık : Radyofarmasötiğin toplam radyoaktivitesinin ne kadarının istenen radyonüklitten geldiğini gösteren bir terimdir. Safsızlığın kaynağı izotopik safsızlıklardır. ^{99m}Tc ile işaretli formülasyonlarda bulunan ^{99}Mo en bilinen örneğidir. Her radyonüklidin yarı ömrü ve yaydığı radyasyonun karakteristik özelliklerden yola çıkarak belirlenir (32).

Radyokimyasal saflık : Radyofarmasötiğin toplam radyoaktivitesinin ne kadarının radyonüklitin istenen formundan geldiğini gösteren bir terimdir. Radyokimyasal safsızlıklar ısı veya pH değişimi, ışık, indirgeyici veya yükseltgeyici

ajan varlığı veya radyolize bağlı dekompozisyondan kaynaklanabilir. Teknesyum radyofarmasötiklerinde bulunan radyokimyasal safsızlıklar serbest perteknetat (TcO_4^-) ve indirgenmiş/hidrolize olmuş $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'dur. Radyokimyasal safsızlıklar, görüntüleme çalışmalarında kötü kalitede görüntüler alınmasına ve hastanın fazla doz radyasyon almasına sebep olur (27, 29).

Radyofarmasötiğin stabilitesi radyoliz, ısı ve ışığa maruziyet ve bunlara maruz kaldığı süreye bağlıdır. Radyofarmasötiğin stabil kaldığı süreyi uzatmak için formülasyona antioksidan ajanlar (Askorbik Asit, Sodyum Sülfid) eklenir (67, 100).

Radyokimyasal safsızlığı belirlemek amacıyla kullanılan başlıca yöntemler şunlardır (46) :

- Çöktürme
- Kağıt, ince tabaka ve jel kromatografileri
- Elektroforez
- İyon değişimi
- Solvan ekstraksiyonu
- HPLC
- Distilasyon

1.4.2 Biyolojik Testler

Sterilite : İnsana uygulanacak tüm preparatlar gibi radyofarmasötikler de steril olmalıdırlar. Sterilite, formülasyonda yaşayan hiçbir bakteri veya mikroorganizma bulunmadığı zaman sağlanmış olur.

Isıyla zarar görmeyen ve uzun yarı ömürlü radyonüklit taşıyan radyofarmasötikler otoklavda 121 °C'de 15-20 dakikada sterilize edilebilirken, kısa

yarı ömürlü radyonüklit taşıyan radyofarmasötiklerin sterilizasyonu için membran filtrasyonu daha uygundur. En çok kullanılan membran filtreler porları 0,45µm ve 0,22µm yarıçaplı olanlardır.

Radyofarmasötiklerin sterilite testlerinde, 14 gün boyunca aerobik ve anaerobik bakteriler için sıvı tiyoglikolat besiyerinde, mantar ve küfler için ise soybean-casein besiyerinde üreme olup olmadığı gözlenir (45, 46, 85).

Pirojenite : Pirojenler mikroorganizmalarının metabolik ürünleridir. Isıya dayanıklı ve zor çözünen protein veya polisakkaritlerdir. Pirojenlerin vücuda girmesinin 30 ila 120 dakika sonrasında, ateş, eklemlerde ağrı, terleme başağrısı, gözbebeklerinde dilatasyon görülebilir. Pirojenite kontrolü için rutinde uygulanan testler USP 32 tavşan testi ve *limulus amebocyte lysate* (LAL) testidir (46, 85).

Toksisite : Yeni bir radyofarmasötik insanlara uygulanmaya başlanmadan önce, diğer ilaçlar gibi güvenli dozu belirlenmelidir. Radyofarmasötiklere bağlı toksik etkiler doku ve fizyolojik fonksiyonlarda değişime kadar gidebilir (46, 85).

1.5 Radyonüklidik Görüntüleme Yöntemleri

1.5.1 Gama Kamera (Sintigrafik Yöntemler / 2 boyutlu radyonüklit tarama)

Vücuda verilen radyofarmasötiğin yaydığı gama ışınların, bir gama kamera tarafından saptanması ve bilgisayar ortamında iki boyutlu olarak görüntü haline getirilmesi ilkesine dayanarak çalışır. Gama kameralar 1958’de Anger tarafından geliştirilmiştir. Anger tarafından bulunan sistemin temeli şudur; sintilasyon dedektörü denilen inorganik kristaller (NaI(Tl)) gama ışınlarına duyarlıdır ve gama ışınlarına maruz kaldıklarında florasan etki gösterirler. Bunun sonucu oluşan

ultravioleto veya görünür tayftaki ışınlar fotomultiplier tüpte elektrik akımına çevrilir. Oluşan elektrik akımının büyüklüğü kristal tarafından absorbe edilen gama ışınlarının enerjisi ile orantılıdır.

Elektromanyetik radyasyonun tüm  eşitleri gibi gama ışınları da izotropik olarak yayılır. Sadece bir dedektör kullanarak görüntü elde etmeye çalışmak ışının hastanın vücudundan çıktığı nokta ve dedektöre geldiği nokta arasında bir bağlantı olmayacağından başarısız olacaktır. Bu sebepten gama kameralarda kolimatörler kullanılır. Kolimatör sadece belirli yönlerden gelen ışınların geçmesine izin veren bir filtredir.  zerinde bulunan deliklerin uzunluğu, çapı ve sayısı görüntü kalitesine etki eder (10, 22, 69, 72).

1.5.2 SPECT (Single Photon Emission Computed Tomography)

Radyofarmasötik enjekte edilmiş hastanın etrafında 360 derece dönebilen bir kameranın değişik a ılardan aldığı 2 boyutlu görüntüleri birleştirerek 3 boyutlu görüntüler oluşturma ilkesine dayanarak çalışır. Kamera hastanın etrafında dönerken belirli aralıklarla durarak (6 ) gama ışını yayılımlarını tespit eder. SPECT görüntülemede kullanılan radyonüklitler, ^{99m}Tc, ⁶⁷Ga, ¹¹¹In ve ¹²³I'tür. Düzlemsel gama kameralardan farkı, hastanın etrafında dönerek farklı a ılardan görüntü alabilmesi ve bu görüntüleri bilgisayar ortamında birleştirerek değişik organ kesitlerinin incelenmesine olanak sunuyor olmasıdır (10, 22, 69, 72).

1.5.3 PET (Positron Emission Tomography)

Güçlü bir diyagnostik yöntemdir. Anatomik görüntülerin yanı sıra organların fizyolojisi hakkında bilgi veriyor olması diğer görüntüleme yöntemlerine göre en büyük avantajıdır. PET kameralar 511 keV'luk enerjiye sahip foton çiftlerini 'rastlantı kamerası' ile dedekte edip görüntüye çevirmek için tasarlanmışlardır. Bu

enerjiye sahip pozitron yayıcı radyonüklitlerle (^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{18}F) doğal fizyolojik moleküller işaretlenerek SPECT sistemine göre daha yüksek çözünürlükte görüntüler elde edilebilir. PET çalışmalarının büyük çoğunluğunda kullanılan radyofarmasötik ^{18}F ile işaretli deoksiglukoz molekülüdür. PET'in en büyük avantajlarından biri bu düşük atomik numaralı radyoaktif izotopların fizyolojik sistemlerde kullanılan analoglarını taklit ederek bu sistemlerin ayrıntılı görüntülerinin elde edilmesine imkan sağlamasıdır. PET bilgisayarlı tomografi ile kombine edilerek daha iyi görüntüler elde edilebilir (10, 22, 69, 72).

1.6 Kemik Sintigrafisi

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli difosfonatlarla yapılan kemik sintigrafisi çalışmaları günümüzde nükleer tıpta en çok kullanılan yöntemlerin başında gelir. İşaretli bileşiğin başlangıçta kemiğe tutulumu, kan akımına, kemiğin yeniden oluşum hızı, osteoblastik aktivite ve hormonların etkisine bağlıdır (23). Nükleer tıpta kullanılan görüntüleme yöntemleri fonksiyonel görüntüleme yaparken radyolojik yöntemler anatomik görüntüleme yapar. Radyonüklit kemik görüntüleme yöntemleri spesifik olmamakla beraber çoğu durumda diğer görüntüleme yöntemlerinden üstündür. Kemik sintigrafisi, tüm nükleer uygulamalarının yaklaşık 1/3'ünü oluşturur.

İlk kullanılan kemik radyofarmasötiklerinden olan ^{47}Ca ve ^{85}Sr yüksek gama enerjileri ve uzun yarı ömürleri sebebiyle artık kullanılmamaktadır (18, 65).

Hidroksiapatit kristalindeki hidroksil iyonuyla yer değiştirerek kemikte lokalize olan ^{18}F ise kısa yarı ömrü sebebiyle kısıtlı kullanım olanaklarına sahiptir (23).

Kemik sintigrafisinde en çok $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli difosfonat bileşikleri kullanılmaktadır. Bu bileşikler kemikte hızla akümüle olurlar. Hidroksiapatit

kristalleriyle kompleks yapabilen difosfonat bileşikleri osteoblastik aktivitenin artış gösterdiği bölgelerde daha fazla birikir. Artmış osteoblastik aktivitenin altında yatan neden, birincil ve ikincil kemik tümörleri, travma, kırık, artrit, dejeneratif değişiklikler, nöropatik eklem patolojileri ve osteoporoza bağlı kırıklar olabilir. Rutinde ^{99m}Tc ile işaretlenerek kemik sintigrafisinde en çok kullanılan bifosfonat bileşikleri HEDP, PYP, MDP ve HDP'dir (18, 21, 65).

1.6.1 Üç Fazlı Kemik Sintigrafisi

Lokal lezyonların araştırılmasında kullanılan bir sintigrafi yöntemidir. Enfeksiyon, refleks sempatik distrofi, travma, osteoid osteoma ve diğer benign tümörler, malign primer tümörler, kemik lezyonları üç fazlı kemik sintigrafisinin endike olduğu durumlardır (18).

Birinci fazda 1-2 dakika boyunca 1-3 saniyelik dinamik görüntüler alınır.

İkinci fazda kapiller permeabilite değişikliklerine bağlı kemikteki ekstraselüler sıvı değişiklikleri gösterilir. Bu faz birinci fazın bitiminden onuncu dakikaya kadar olan sürede devam eder. Kan havuzu ve yumuşak dokular görülür.

Üçüncü faz görüntüleri radyofarmasötüğün uygulanmasından 2-4 saat geçip aktivite yumuşak dokulardan tamamen temizlendikten sonra alınır (18, 21).

1.6.2 Normal Kemik Sintigrafisi

Sağlıklı bir yetişkinde iskelet sisteminde aktivitenin simetrik olarak dağılımı görülür. Mesane, hafif renal aktivite ve minimal yumuşak doku aktivitesi normalde görülebilir.

Radyoaktif maddenin kemiklerdeki tutulumu yaş ile birlikte genellikle azalır. Bununla beraber skapulanın akromial ve korakoid çıkıntılarında, klavikulanın medial ucunda, ve sakrumda persistan uptake görülür (18).

Patolojik durumlarda osteoblastik aktivite artışına bağlı olarak o bölgede tutulum artar. Normalde böbrekler hafifçe görüntülenir. Böbreklerin aktivite tutulumundaki değişiklikler bazı böbrek hastalıklarının ve sistemik hastalıkların tanısında kullanılır (18, 21).

Radyoterapi kemikteki aktivite tutulumunu azaltır.

Kemik sintigrafisinde radyoaktivite tutulumu hastaların kemoterapi ya da hormonal tedavi almasına bağlı olarak da değişiklik gösterebilir (65, 97).

1.6.3 Yumuşak Doku Tutulumları

Kemik sintigrafisinde görüntüleme işlemi genelde radyofarmasötiğin hastaya uygulanmasından 2-4 saat sonra yapılır. Bunun nedeni radyofarmasötiğin yumuşak dokudan intravasküler ve ekstraselüler olarak temizlenip osseöz dokuya geçişini beklemektir (18).

Yumuşak doku tutulumları, doku kalsiyumu üzerine bağlanma, denatüre proteinlerle kompleks oluşturma, demir depolarının varlığı, hiperemi-kapiller permeabilite değişikliği ve doku enzimlerine bağlanma gibi birçok mekanizma sonucu oluşur. Hiperkalsemi (hiperparatiroidi veya malignite) aynı zamanda birçok organda yaygın aktivite tutulumu görülür.

Kalsiyum yumuşak dokularda başlıca 4 yolu izleyerek birikir (107).

Metastatik kalsifikasyon : Metastatik kalsifikasyon hiperkalsemiye bağlı olarak normal dokularda artmış kalsiyum depolanmasıdır. Artmış paratiroid hormonu

sekresyonuna, D vitamini fazlalığına, böbrek yetmezliğine bağlı olarak görülebilir (107).

Distrofik kalsifikasyon : Normal kalsiyum ve fosfat seviyeli olan hastalarda, travma, iskemi ve selüler nekroza bağlı histolojik bozulmalar sonucu dokularda Ca^{+2} birikmesidir. Doku hasarı olan bölgede hyalin kollajen dejenerasyonu Ca^{+2} birikmesiyle ilişkilidir. Beyin infarktüsü, derin ven trombozu, flebit, dermatomyosit, enjeksiyon bölgesinde aktivite birikimi distrofik kalsifikasyon örnekleridir (107).

Metabolik Tutulum : Bazı metabolik mekanizmalar kemik radyofarmasötiklerinin tutulumunu etkiler. Osteojenik sarkoma metastazları $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP'ye bağlanan osteoid matriks üretir. Musin üreten tümörler, biyokimyasal olarak osifiye kıkırdığa benzeyen ve Ca^{+2} tuzlarına bağlanan bir glikoprotein salgılar. Akciğer, meme ve sindirim kanalında görülen musinöz tümörlerin $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP tutulumu yaptığı bilinmektedir. Primer tümörlere ek olarak aktivite lenf nodu metastazlarında da tutulabilir (107).

Bölgesel Sekestrasyon : Enjeksiyondan sonra kemik radyofarmasötikleri kemikte tutulum ve renal ekstreksiyona ek olarak ekstraselüler alana yayılır. Venöz veya lenfatik obstruksiyon varlığında artan ödemli ekstremitedeki ekstraselüler boşluk bu bölgede azalan klerense yol açabilir. Bu durumlarda göreceli olarak lokal aktivite artışı görülür (107).

Bu mekanizmaların dışında radyofarmasötikte bulunan safsızlıklar da yumuşak doku tutulumlarına sebep olabilir. Hidrolize olmuş Teknesyum, kolloid formda dalak ve karaciğerde lokalize olur. Serbest Teknesyum, mide, tükürük bezleri ve tiroide tutulur. Düzgün yapılmayan radyofarmasötik enjeksiyonları bozuk tutulumu sebep olabilir (107).

1.6.4 Kemik Sintigrafisinin Endikasyonları

Kemik sintigrafisinin endikasyonlarının başlıcaları (18, 26) :

- Kemik metastazlarının saptanması,
- Birincil malign ve benign kemik tümörleri,
- Osteomyelit,
- Septik artrit,
- Metabolik kemik hastalıkları,
- Kemiğin avasküler nekrozu,
- Eklem hastalıkları,
- Kemik iliği hastalıkları,
- Kemik protezlerinin ve greftlerinin değerlendirilmesi,
- İskelet sistemi travmalarıdır.

Kemik sintigrafisi en çok kanserlerin metastaz yapıp yapmadığını saptamak amacıyla kullanılır. Meme, akciğer, prostat ve mesane kanserleri kemikte metastaz yapma riski en yüksek kanserlerdir. Metastaz soliter olabileceği gibi yaygın olarak da ortaya çıkabilir. Yaygın metastazlarda tüm kemiklerde yaygın aktivite birikimi görülebilir bu duruma '*superscan*' denir (18, 26).

Kemik sintigrafisinde kemikte artmış tutulum sadece osteoblastik aktiviteye değil kan akışına da bağlıdır. Metabolik aktivitesinin daha düşük olması sebebiyle iyi huylu tümörlerde tutulum daha azdır. Ancak osteoid osteoma ve osteoblastoma gibi benign tümörlerde aktivite artışı görülür. Malign tümörler genelde vaskülerdir bu nedenle bu tümörlerde aktivite tutulumu daha yoğundur (15, 18, 23, 26, 65).

Prostat kanser olgularının % 85'inde hastalığın bir döneminde kemik metastazı gelişmekte ve % 35 olguda tanı anında kemik metastazı bulunur. Kemik metastazlarının varlığı için PSA (Prostat Spesifik Antijen) çok önemli bir tümör belirteçidir. PSA 10 ng.mL⁻¹'den düşük ise kemik metastazı olma olasılığı azdır. PSA 10 ng.mL⁻¹'den yüksek ise metastatik hastalığın belirlenmesi için kemik sintigrafisi yapılmalıdır (18).

Kemik sintigrafisinin bilinen malignitelerdeki endikasyonu; evreleme, kemik ağrısının değerlendirilmesi, hastalığın yaygınlığının ve tedaviye yanıtın belirlenmesidir.

Osteomyelitin tanısında kemik sintigrafisi en etkili yöntemdir (12).

Travmalardan sonra yapılan sintigrafilerde kuşkulu olmayan bölgedeki kırıklar da belirlenebilir. Akut ve kronik spor yaralanmalarında, yumuşak doku ve kemik patolojilerinin tanı ve tedavisinin izlenmesinde kemik sintigrafisinin yaygın kullanım alanı mevcuttur. Stres kırıkları bunlardan biridir (18, 36).

Kemik sintigrafisi çok hassas bir tetkik yöntemi ve çoğu durum için ideal görüntüleme yöntemi olsa da özgünlüğü düşüktür. Özgünlüğünü arttırmak ve vücudun daha detaylı görüntülerini elde edebilmek amacıyla SPECT ile kombine edilir (88).

Ağrılı protezlerde aseptik gevşeme ile enfeksiyonun ayırıcı tanısı tedavi açısından önemlidir. Kemik sintigrafisinde genelde enfeksiyonda protez çevresinde artan aktivite, gevşemede ise fokal aktivite görülür. Protez enfeksiyonlarının değerlendirilmesinde en ideal yöntem Tc-99m HMPAO işaretli lökosit sintigrafisidir.

İntervertebral disklerin enfeksiyonu olan diskitisin septik artritisin teşhisinde kemik sintigrafisi kullanılır (72) .

Hiperparatiroidi, renal osteodistrofi ve osteomalazide hızlı kemik yapımı nedeni ile aktivite tutulumu ileri derecede artar ve karakteristik bir tutulum ortaya çıkar (18).

Kemik greftlerinin canlılığının değerlendirilmesinde üç fazlı kemik sintigrafisi çok iyi bir yöntemdir. Greftin komşu kemik ile aynı aktiviteye sahip olması greft inkorporasyonunun göstergesidir (18).

Paget Hastalığı'nda kemik sintigrafisi direkt grafiden daha duyarlıdır. Paget Hastalığı'nda tutulumun takibi, tedavi monitörizasyonu ve komplikasyonların araştırılmasında da kemik sintigrafisi çok etkili bir yöntemdir (105).

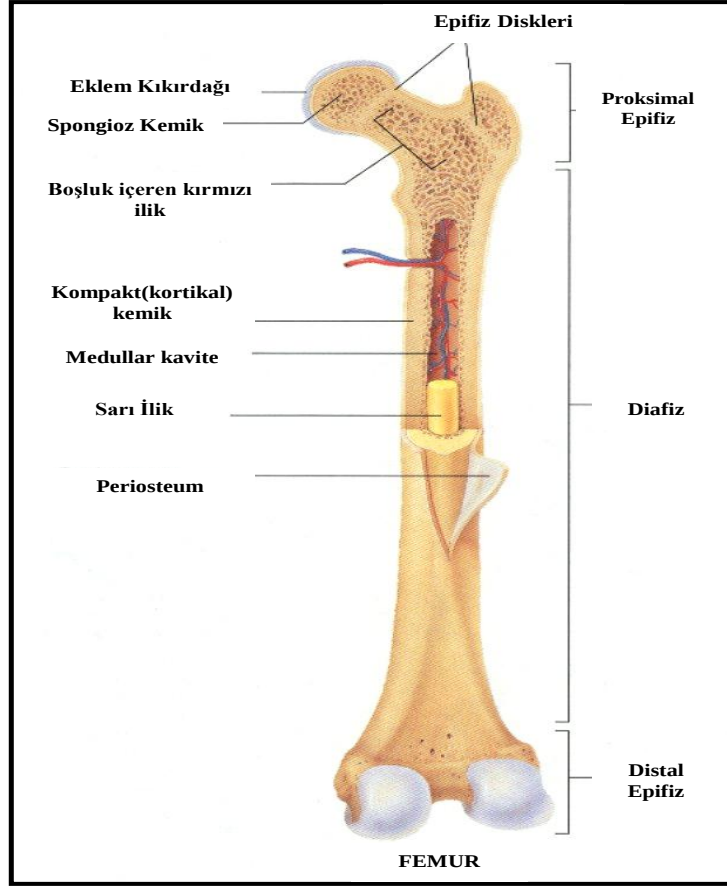
Tablo 4 : Kemik Sintigrafisinin Uygulama Alanları (72).

Kullanım Yüzdesi	Uygulama Alanı
%40	Primer hastalıkların metastaz tedavisi takibi
%20	Metastatik hastalığın tanısı
%20	Ortopedik uygulamalar
%10	Primer kemik tümörleri
%5	Enfeksiyon tanısı
%5	Diğer (Paget hastalığı, Fibröz Displazi, Myositis Ossifikans)

1.7 Kemik Yapısı

Kemikler biraraya gelerek iskeleti oluşturan, diğer organ ve dokuları destekleyen ve koruyan vücut dokularıdır. İskelet sisteminin destek ve koruma dışında kan hücresi yapımı ve mineral depolama, asidozdan koruma, kurşun gibi zehirli maddelere karşı kimyasal tuzak oluşturma görevleri de vardır. Kemik organik (%35) ve inorganik (%65) kısımlardan oluşur. Organik kısmın en büyük bileşeni tip I kolajendir (%90-95). İnorganik kısım başlıca hidroksiapatitten $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ibarettir. Kollajen lifler kemiğin esnekliğinden, hidroksiapatit kemiğin sertliğinden sorumludur. Kemiği oluşturan dokular osseöz doku, ilik, endosteum, periosteum, sinirler, kan damarları ve kıkırdaktır. İskelet sistemimizdeki kemikler şekillerine göre; uzun kemikler, yassı kemikler, kısa kemikler, düzensiz kemikler ve sesamoid kemikler olarak sınıflandırılır (1, 7).

Kemik yapısı Şekil 7’de verilmiştir.



Şekil 7 : Kemik Yapısı (21).

Yapısına göre sınıflandırmada iki çeşit kemik dokusu vardır; kompakt kemik dokusu ve süngerimsi kemik dokusu. Kompakt kemikler matrikslerinde göze görünür bir boşluk barındırmazken süngerimsi kemik dokusu, boşluklu, sünger andıran bir ağ yapısından oluşur.

Kemiğin iç ve dış yüzeyleri bağ dokusundan oluşan tabakalarla örtülüdür. İçteki tabaka endosteum, dıştaki tabaka periosteum adını alır.

Endosteum kemiğin içindeki bütün boşlukları örter. Kemik iliği dokusunun devamı olup retiküler bağ dokudan yapılmıştır. Kemik dokuya dönük kısmında tek sıralı osteoprogenitör hücreler bulunur. Kemik yapım ve yıkımında bu hücreler osteoblastlara dönüşür.

Periosteum 2 katlıdır, dış kat fibroblastlardan, iç kat osteoprogenitör hücrelerden oluşur. Kemikler eklem kıkırdakları bulunan uç kısımları hariç periosteumla kaplıdır. Lenf kanalları, kan damarları ve sinirler burada bulunur. Kan damarları Volkman kanalları aracılığıyla kemik içine girer.

Kemik dokusunun yapısal elemanları hücreler, (osteoprojenitör hücreler, osteoklastlar, osteoblastlar, osteositler) lifler ve amorf ara maddelerdir.

Osteoprojenitör hücreler; kemik hücresi olmaya koşullanmış mezenkimal hücrelerdir. Periosteum ve endosteumda ve bu zarların kanallarında bulunurlar. Kemiğin yeniden düzenlenmesi esnasında mitozla bölünerek çoğalırlar ve çoğalan hücrelerin büyük bölümü osteoblastlara dönüşür.

Osteoblastlar; kemik oluşumundan sorumlu hücrelerdir. Kemik yüzeyinde epitel hücreler gibi yanyana dizili olarak bulunurlar. Yüksek metabolik aktiviteye sahiptirler. Osteoblastlar kemik matriksinin kollajen fibrillerden, proteoglikanlardan, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden oluşan organik kısmını salgılar.

Osteositler; lakuna adı verilen yassı boşluklara yerleşmiş halledir. Her lakunada bir osteosit vardır. Osteositlerin ölümünü takiben matriks rezorpsiyonu görülür. Osteoklastların kemik matriksinin içine girmesiyle oluşmuşlardır.

Osteoklastlar; çok büyük, dallanmış, hareketli hücrelerdir. Kemiğin yeniden biçimlenme sürecinde çözünüp diğer dokular tarafından emilmesinden sorumludurlar. Monositlerin birleşmesi ile meydana gelen elliye yakın çekirdeği olabilen dev hücrelerdir. İşlevleri dikkate alındığında makrofajlara benzemektedirler. Kemik yıkımının olduğu bölgelerde birikmişlerdir. Asit kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgırlar. Kalsifiye olmuş ana maddeyi serbest bırakırlar. Kalsiyumun kemik dokusundan kana salıverilmesinde rol oynarlar (21, 38).

Kemiğin inorganik kısmı, tip I kollajen, glikozaminoglikanlar (kondroitin sülfat, keratin sülfat, hyaluronik asit), proteoglikanlar ve glikoproteinlerden (osteonektin, osteokalsin, osteopontin) oluşur (38, 44).

1.8 Kemik Radyofarmasötikleri ve Tutulum Mekanizmaları

Kemik görüntüleme amacıyla kullanılan ilk radyofarmasötikler β ışını yayan ^{32}P ve ^{45}Ca 'ti. Kalsiyum ve fosfor izotoplarının kemikte tutulmasıyla görüntüleme gerçekleştiriliyordu fakat bu radyofarmasötiklerin β ışını yayıcı olmaları kullanımlarını kısıtlamıştır. Günümüzde kemik radyofarmasötiklerinin en çok kullanılanları gama ışını yayan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretlenmiş bifosfonat bileşikleridir. Bifosfonatlardan MDP ve HDP rutinde en çok kullanılanlardır. Heteroiyonik değişim mekanizması ile kemiğe yerleşen $^{87\text{m}}\text{Sr}$ ve ^{18}F gibi radyofarmasötikler de kullanımdadır. $^{87\text{m}}\text{Sr}$ kemikte Ca yerine, ^{18}F ise hidroksiapatit yerine kemiğe yerleşir (18, 96).

İntravenöz olarak verilen difosfonatlar kemikte kan akımı ve kapiller permeabilite değişikliklerine, kemik yüzeyinin artışına bağlı olarak aktif kemik yapımının mineralize tabakasında bulunan hidroksiapatit kristallerine bağlanır. Radyofarmasötiğin kemikte tutulumu kan akımı ve osteoblastik aktiviteye bağlıdır.

Metabolik aktivitenin arttığı enfeksiyon, primer tümör, avasküler nekroz bölgelerinde, uygulamadan 2-6 saat sonra $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MDP osteoblastik aktivitenin arttığı kısımlarda birikir ve detaylı metabolik görüntüleme yapılmasına imkan sağlar. Primer ve sekonder kemik tümörleri, travma, eklemlerin dejeneratif değişiklikleri, nöropatik eklem tutulumları, osteoporoza bağlı gelişen patolojik fraktürler artan osteoblastik aktivitenin görüldüğü durumlardır. Radyofarmasötiğin enjeksiyonundan sonra geçen bekleme süresini kısaltmak için kemiğe daha yüksek afinite gösteren

radıofarmasötikler kullanılabilir. Kemikte daha çok tutulan radıofarmasötik daha iyi görüntü elde edilmesini sağlar (39).

^{99m}Tc -MDP i.v. enjeksiyondan sonra 2-3 dakikalık yarı ömürle kandan temizlenir. 24 saat sonra kanda kalan miktar %1'den daha azdır. Uygulamadan 24 saat sonra radıofarmasötiğin %50'si uriner ekstraksiyonla atılır, %50'si kemikte tutulur. Hastaya yaklaşık 10-20 mCi ^{99m}Tc -MDP veya ^{99m}Tc -HDP verilir. Uygulamadan 2-3 saat sonra görüntüleme yapılmasının sebebi hastanın ekstraselüler sıvı ve kanda bulunan aktiviteden temizlenmesini beklemek ve yüksek kemik/yumuşak doku tutulum oranı elde etmektir. ^{99m}Tc -MDP, ^{99m}Tc -HDP ve ^{99m}Tc -HEDP hemen hemen aynı diyagnostik etkinliğe sahiptir (82).

1.8.1 ^{99m}Tc ile İşaretli Fosfonat ve Bifosfonatlar Dışında Kemik Görüntülemede Kullanılan Radıofarmasötikler

^{18}F -NaF : ^{18}F -Sodyum Florür (^{18}F -NaF), kemik sintigrafisinde kullanılan Tc-99m ile işaretli difosfonatlar gibi kemik metabolizmasını gösterir. Kemik metabolizmasının arttığı patolojik odaklarda ^{18}F -NaF tutulumunun, Tc-99m işaretli fosfonatlardan en az 2 kat yüksek olması normal kemik ile metastatik odak arasında daha yüksek kontrast sağlar.

^{18}F -FDG : Normal kemikte akümüle olmaz. Metastazlarda ^{99m}Tc -MDP daha yüksek afinite gösterir (9).

^{99m}Tc -Sitrat : İskelet tutulumu difosfonatlardan daha düşük olsa da iyileşmekte olan kırıkları ve osteomyeliti teşhis etmekte daha etkin bir radıofarmasötiktir (6).

201-TI : Malign ve benign tümörlerin ayrımında ve tedavinin değerlendirilmesinde kullanılır. Kaslarda yüksek tutulumu bu amaçla kullanılmasında bir dezavantajdır (98).

^{99m}Tc-MIBI : Malign kemik patolojilerinin görüntülenmesi konusunda çalışmalar yapılmıştır (11).

1.8.2 İlaç - ^{99m}Tc-Fosfonat etkileşimleri

Bazı ilaçlar radyofarmasötiklerin biyodağılımlarını değiştirir. Bazı durumlarda hedef organdaki tutulum artarken, bazı durumlarda azalır. İlaç radyofarmasötik etkileşimleri hedef organa bağlanmada kompetisyon veya direkt fizikokimyasal etkileşme şeklinde olabilir. Tablo 5'te kemik sintigrafisinde kullanılan ^{99m}Tc-Fosfonat bileşikleri ile etkileşen ilaç ve prosedürler ile bu etkileşimler sonucu ortaya çıkan biyodağılım değişiklikleri gösterilmiştir (82, 86).

Tablo 5 : ^{99m}Tc-Fosfonat bileşikleri ile etkileşen ilaç ve prosedürler (82, 86).

İlaç / Prosedür	Biyodağılımda değişme
Kemoterapik ajanlar	Böbrek tutulumunda artış
Melfalan	Kemik tutulumunda artış
Kortikosteroidler	Kemik tutulumunda azalış
Sitotoksik terapi	Karvaryl tutulumunda artış
Demir dekstran	Enjeksiyon bölgesindeki tutulumunda artış
Alüminyum iyonları	Karaciğer tutulumunda artış
Dekstroz	Böbrek tutulumunda artış
Fosfosoda	Kemik tutulumunda azalış

1.8.3 Kemik Radyofarmasötiklerinin Hazırlanması ve Kalite Kontrolü

Diğer radyofarmasötiklerde olduğu gibi difosfonatların ^{99m}Tc ile işaretlenmesi için Teknesyum'un düşük oksidasyon basamaklarında bulunması gerekir. Bunun için indirgen ajan olarak genellikle Kalay Klorür kullanılır. Difosfonatların klinikte kullanılmaları amacıyla ticari kitleri mevcuttur. MDP, HDP, DPD kitleri bulunan bifosfonatlardır (106).

Liyofilize kit içeriğinde difosfonat, Kalay Klorür ve antioksidan ajan bulunur. Liyofilize materyal içeren multidozluk şişeye aseptik şartlarda ^{99m}Tc eklenir. Hastalarda kemik sintigrafisi amacıyla 10-20 mCi, kan havuzu görüntüleme amacıyla 15-20 mCi ^{99m}Tc kullanılır. Hazırlanan radyofarmasötik çözeltisinde oluşması istenen difosfonat kompleksi haricinde indirgenmiş ^{99m}Tc ve serbest ^{99m}Tc bulunabilir.

İndirgenmiş Teknesyum kolloidal yapıdadır ve karaciğerde tutulur. Kromatografi plağında orijinde kalır. Serbest Teknesyum, mide, tiroid, testis ve tükürük bezlerinde tutulur, plakta fronta sürüklenir. Radyokimyasal safsızlık oranları ince tabaka kromatografisi yardımıyla hesaplanır (13, 106).

Tablo 6 : Kemik Radyofarmasötiklerinin işaretleme veriminin Hesaplanmasında Kullanılan Kromatografik Yöntem (21)

	Radyokimyasal Safsızlık	Kromatografide Kullanılan Mobil Faz	Davranışı
A	İndirgenmiş/Hidrolize Olmuş ^{99m} Tc	Serum Fizyolojik	Orijinde Kalır
B	Serbest ^{99m} Tc	Aseton	Fronta sürüklenir

Radyofarmasötiğin işaretleme verimi (%) = 100 – (A (%) + B (%)) olarak hesaplanır.

1.9 Bifosfonatlar

1.9.1 Genel Bakış

Bifosfonatlar kemik hastalıklarının tedavisinde kullanılmak için ideal bileşiklerdir. Aktif kemik metabolizmasının sürdüğü bölgelerde yüksek afinite ile kemiğe bağlanırlar (30). Hidroksiapatit kristallerinin dissolüsyonunu hem in vivo hem de in vitro ortamda inhibe ettikleri gösterilmiştir (63). Osteoklast aktivitesini durdurmaları ve osteoklast apoptozunu indüklemeleri osteoklastlara bağlı kemik rezorpsiyonunun inhibisyonunda kullanılmalarının başlıca nedenidir. Klinikte benign ve malign kemik hastalıklarında, osteoporozda, Paget hastalığında kullanılırlar. Tüm bu hastalıkların patofizyolojisi farklı olsa da temellerinde artmış osteoklast aktivitesi ve anormal kemik metabolizması yatar (30) .

Bifosfonatlar pirofosfat analoglarıdır. Pirofosfatta bulunan oksijen köprüsünün yerini, bifosfonatlarda merkezdeki karbon atomuna bağlı iki fosfor

atomuyla P-C-P yapısı almıştır. İlk bifosfonatlar 1865'te sentezlenmiş, endüstride ve tarımda kullanılmış, 1969'da Fleisch ve arkadaşları tarafından kalsiyum fosfat dissolüsyonu ve kemik rezorpsiyonu üzerindeki etkileri bulununca tıp alanında kullanılmaya başlanmıştır. Bifosfonatlardaki P-C-P bağı ısıya ve hidrolize dayanıklıdır (75).

1.9.2 Biyolojik Etkileri

Bifosfonatlar hem in vivo hem in vitro ortamda kemik rezorpsiyonunun güçlü inhibitörleridir. Kemik yüzeyine selektif olarak adsorbe edilirler ve burda osteoklastların aktivitesini durdururlar. Osteoklastlarla etkileşen bifosfonatların hücre içinde moleküler bazda etkileri iki yolla açıklanabilir. Yapısında azot bulundurmeyen etidronat, klodronat gibi bifosfonatlar ATP'ye bağlı hücre içi yolların çalışmasını durdurur. Yapısında azot içeren alendronat, risedronat, Zoledronik Asit gibi bifosfonatlar ise mevalonat/kolesterol biyosentez yolağının enzimleri üzerinde inhibitör etkiye sahiptirler. Bu yolda bifosfonatların başlıca hedefi olan enzim *farnesil pirofosfat sentaz*'dır. Farnesil pirofosfat sentaz'ın inhibisyonu osteoklastların hücre içi sinyal alışverişlerinde kullandıkları GTPazlara bağlanan proteinlerin prenilenmesinde gerekli olan ve izoprenoid bileşiklerinin sentezini durdurur (29, 79). Prenillenen bu moleküller *Ras*, *Rho*, *Rac* ve *Rab*'dir. Bu küçük moleküller osteoklast fonksiyonları için önemli olan hücre içi haberleşme, hücre morfolojisinin belirlenmesi, sitoskeletal düzenleme, membran trafiği ve apoptoz gibi olaylarda rol alırlar (16, 81).

Bifosfonatların özellikle osteoklast aktivitesinin sürdüğü noktalarda dokuya spesifik hedeflenmesi, bifosfonatların osteoklastlar ve çevresindeki diğer hücreler üzerinde direkt etki sahibi olduğunun göstergesidir (76).

Preklinik alışmalar bifosfonatların anjiyogenez inhibisyonu yaptığını, hayvan modelleri ve in vitro çalışmalarda kanser hücrelerinde apoptozu indüklediğini göstermiştir (54).

Yapılan bazı çalışmalarda azot içeren bifosfonatların antirezorptif özelliklerine bağlı indirekt etkilerinden farklı olarak direkt antitümör etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir (31).

Azot atomu taşıyan bifosfanatların insan meme kanseri ve insan multipl myeloma hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarda pamidronat ve inkadronatın malign hücre apoptozunu indüklediği görölmüştür (91).

Yine in vitro ortamda yapılan bir çalışmada Zoledronik Asit'in prostat kanseri hücrelerinin apoptozunu indüklediği görölmüştür (17).

Bifosfonatların farmakolojisi düşük oral biyoyararlanım ve kemikte yüksek tutulum ile karakterizedir (81).

Pirofosfat gibi bifosfonatlar da in vivo ve in vitro olarak kalsifikasyonunu inhibe edebilir. Pirofosfattan farklı olarak bifosfonatlar oral yoldan uygulandığında da sıçanlarda kalsifikasyonu inhibe etmiştir (76).

Bifosfonatlar hücre içine endositozla girdikten sonra osteoklast metabolizmasını direkt olarak etkiler. Osteoklastların bifosfonatları hücre içine uptake etmesi alendronatın radyoişaretlendiği çalışmalarda gösterilmiştir (87).

1.9.3 Etki Mekanizması

Bifosfonatlar, Kalsiyum Fosfat kristallerin dissolüsyonunu geciktirirler. Bu özellikleri sebebiyle in vivo olarak kemik rezorpsiyonunu önlemekte kullanımları araştırılmıştır.

Bifosfonatların etki mekanizması üç basamakta incelenebilir : Doku düzeyindeki etkileri, hücresel etkileri, moleküler etkileri (24, 42, 75).

Doku düzeyindeki etkileri : Tüm bifosfonatların dokudaki etkileri benzerdir, kemik turnover'ını azaltırlar. Bunun sonucu olarak pozitif kalsiyum dengesi oluşur. Bifosfonatların insanda ve hayvanlarda kemik miktarını arttırdığı bulunmuştur (24, 42, 75)

Hücre düzeyindeki etkileri : Bifosfonatların hücre düzeyindeki hedeflerinin osteoklastlar olduğu bilinmektedir. Hücresel etki mekanizmaları dört başlıkta incelenebilir (24, 42, 75):

Osteoklastların iyileşmesinin inhibisyonu : Bifosfonatların in vitro ortamda kemik iliğinden differensiyon ile osteoklast oluşumunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bununla beraber bifosfonatlar makrofaj proliferasyonunu da inhibe ederler (42).

Osteoklast aktivitesinin inhibisyonu : Kemik yüzeyinde osteoklast aktivitesinin inhibisyonu bifosfonatların osteoklast hücrelerinin morfolojik yapısını değiştirmesi ile görülür. Morfolojide görülen değişiklikler, hücre iskeletinin, aktinin ve dalgalı hücre sınırının değişimini kapsar. Bifosfonat enjeksiyonundan sonra kemik rezorpsiyonu durur ve osteoklastlar inaktif durumdadır (42).

Osteoklastların yaşam süresinin kısalması : Bifosfonatlar yüksek konsantrasyonda osteoklast apoptozunu indükler (42).

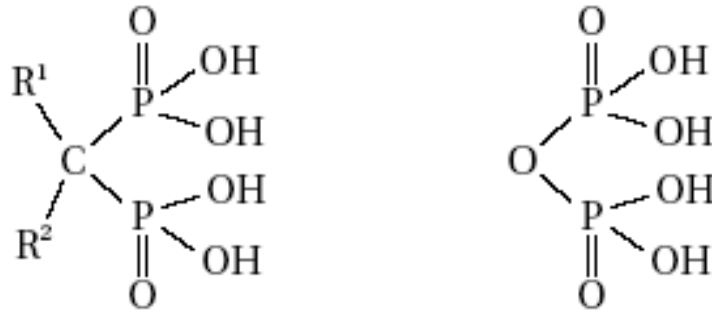
Mineralize matrikste osteoklast adhezyonunun azalması : Bifosfonatlar kemik yüzeyinde osteoklastların adhezyonunu azaltır. Bifosfonatların in vitro ortamda tümör hücrelerinin adhezyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (42).

Moleküler Düzeydeki Etkileri : Moleküler düzeydeki etkileri tam açıklanamamış olmakla beraber, bifosfonatların hücre yüzeyindeki bir reseptöre

bağlandığı veya hücreye uptake edilip bazı enzimleri inhibe ettiği tezleri ortaya atılabilir. Osteoklast vakuollerinin H⁺ATPaz'ın inhibisyonu, lizozomal enzimlerin inhibisyonu, prostaglandin inhibisyonu, protein-tirozin fosfatazların inhibisyonu ve matriks metalloproteinazlarının inhibisyonu moleküler düzeydeki etkilerinden bazılarıdır (24, 42, 75).

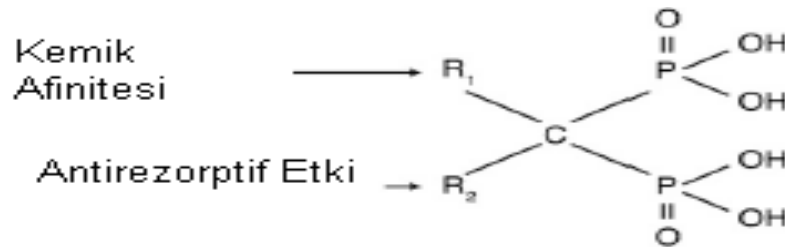
1.9.4 Yapı Etki İlişkisi

Bifosfonatların hidroksiapatit kristallerine gösterdiği yüksek afinitenin sebebi taşıdıkları P-C-P yapısı kalsiyum iyonlarıyla fosfonat gruplarındaki oksijen atomu aracılığıyla bidental yapılı şelatlar oluşturabilmesidir (77).



Şekil 8 : Bifosfonik asit ve pirofosfonik asit molekülleri (77).

Bifosfonatların kemiğe afinitesinden sorumlu olan yapı R1 pozisyonundaki -OH grubudur. Antirezorptif etkiden sorumlu olan grup ise R2 pozisyonundaki substituentlerdir (93).



Şekil 9 : Bifosfonatların Biyolojik Etkisinden Sorumlu Substituentler (93).

Bifosfonatların kemik rezorpsiyonunu inhibe edici etkisi fosfonat gruplarının modifiye edilmesi halinde azalır. Her iki fosfonat grubu yerine $-\text{CH}_3$ grubunun bağlanması halinde kemik afinitesinin ve kemik rezorpsiyonunu inhibe etme kabiliyetinin tamamen kaybolduğu görülmüştür (76).

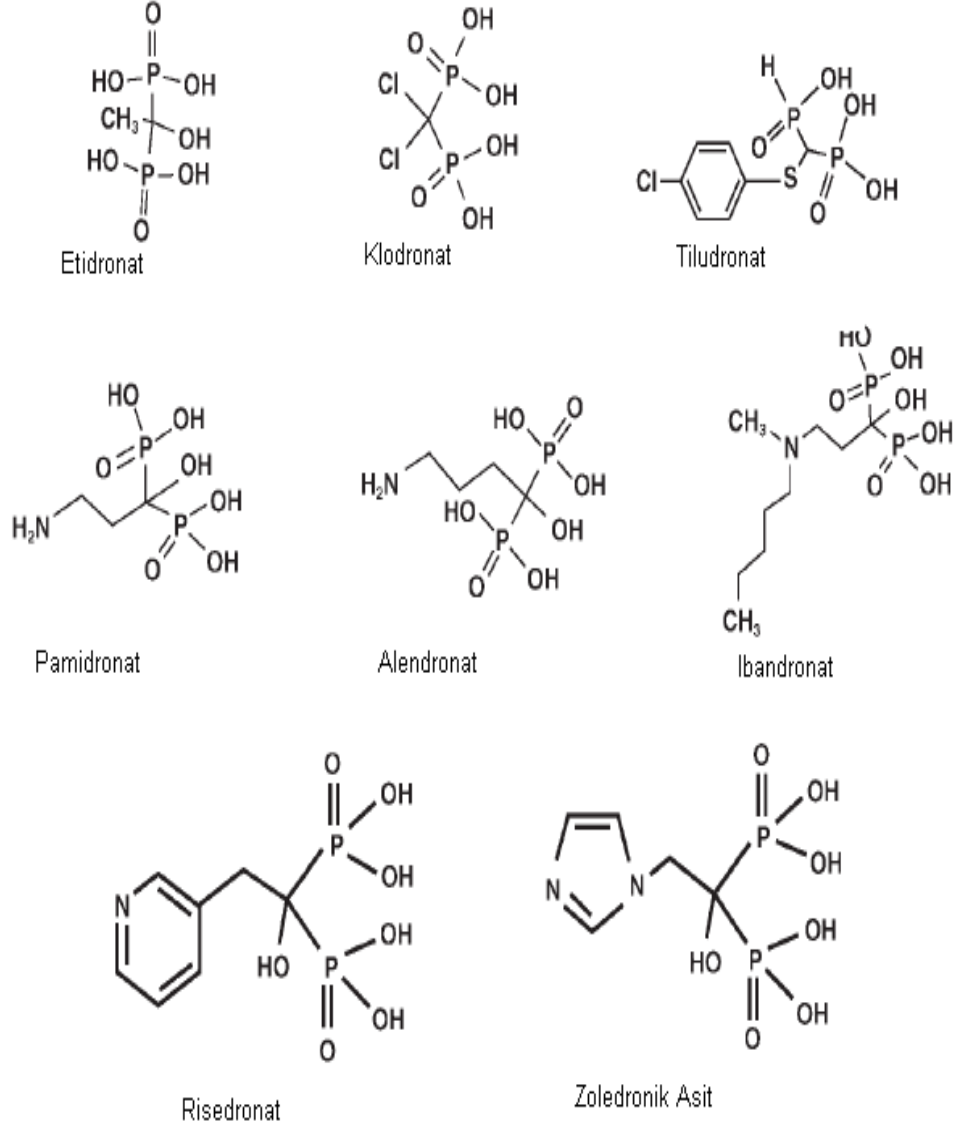
Tablo 7 : Bazı Bifosfonatların Karşılaştırmalı Yapıları (80).

Bifosfonat	R1 grubu	R2 grubu
Alendronat	-OH	$-(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_2$
Etidronat	-OH	$-\text{CH}_3$
İbandronat	-OH	$-(\text{CH}_2)_2\text{-N-CH}_3$
Pamidronat	-OH	$-(\text{CH}_2)_2\text{-NH}_2$
Risedronat	-OH	$-(\text{CH}_2)_2\text{-3-Piridin}$
Zoledronik Asit	-OH	$-\text{CH}_2\text{-imidazol}$

Etidronat ve klodronat sahip oldukları düz R2 yapıları yüzünden göreceli olarak daha zayıf kemik rezorpsiyonu inhibitörleri iken R2 grubunda N atomu taşıyan pamidronat, alendronat ve ibandronat antirezorptif etki bakımından daha güçlü bifosfonatlardır. R2 grubunda azotlu bir heterosiklik halka taşıyan Zoledronik Asit ise antirezorptif etki bakımından bilinen en güçlü bifosfonattır (30).

N taşıyan bifosfonatların farmakolojik etkinliğinin R2 zincirinde taşıdıkları azotlu halkanın 3 boyutlu yapısından ileri geldiği düşünülmektedir. R2 zincirinin stereokimyası antirezorptif etkiden sorumlu ana faktördür. R1 ve R2 gruplarının kombine stereokimyası ise bifosfonat molekülünün farmakolojik hedefe bağlanmasını direkt olarak etkiler (76).

R1 grubu bifosfonatların kemik yüzeyine hızlı ve etkili bir biçimde tutunmalarını sağladıktan sonra R2 grubunun 3 boyutlu yapısı molekülün biyolojik aktivitesini belirler ve spesifik moleküler hedeflerle etkileşime geçer (80).



Şekil 10: Bazı Bifosfonatların Kimyasal Yapıları (30).

Tablo 8 : Bifosfonatların Relatif Etki Potansiyelleri (21).

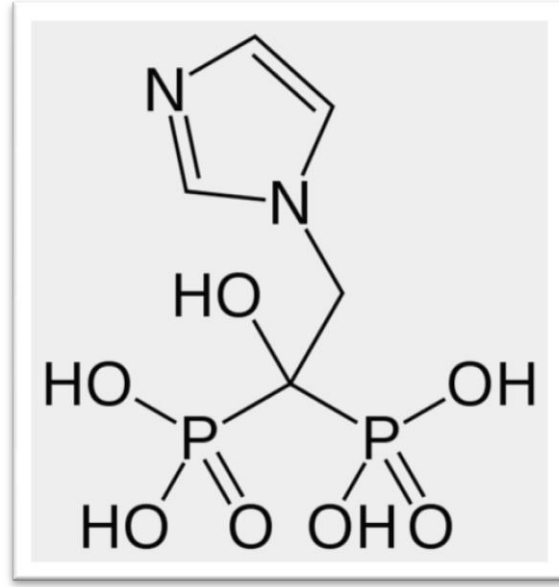
BİFOSFONAT	RELATİF ETKİ POTANSİYELİ
Etidronat	1
Klodronat	10
Pamidronat	100
Risedronat	1000
Alendronat	10000
Ibandronat	50000
Zoledronik Asit	100000

1.10 Zoledronik Asit

Zoledronik Asit, (1-hidroksil-2-imidazol-1-il-fosfonoetil) Fosfonik Asit Monohidrat osteoklast aktivitesini ve kemik rezorpsiyonunu inhibe eden, yapısında N atomu taşıyan bir bifosfonattır. Yapısındaki imidazol halkasında bulunan iki azot atomu diğer bifosfonatlarla karşılaştırıldığında yüksek in vivo ve in vitro etkinliğinin sebebidir. Kanserli hastaların %10–20’sinde görülen malign hiperkalsemi ve multipl myelomada endikedir. Standart antineoplastik terapiye ek olarak solid tümörlerin tedavisinde kullanılır. Tavsiye edilen dozu i.v. olarak her 3-4 haftada bir 4–5 mg’dır (51).

1.10.1 Kimyasal Yapı

Kapalı formülü $C_5H_{10}N_2O_7P_2 \cdot H_2O$ dur. Diğer bifosfonatlar gibi P-C-P yapısı taşır ve R1 grubunda –OH grubu vardır. R2 grubundaki heterosiklik imidazol halkası Zoledronik Asit’i diğer bifosfonatlardan ayırır. Molekül ağırlığı $290,1 \text{ g.mol}^{-1}$ ’dir.



Şekil 11 : Zoledronik Asit Molekülü (37).

1.10.2 Farmakodinamik Özellikleri

Klinik çalışmalar, maligniteye bağlı hiperkalsemi hastalarında Zoledronik Asit'in tek dozluk infüzyonlarının Kalsiyum ve Fosfor seviyelerini serumda azaltırken idrarda arttırdığını göstermiştir.

Metastatik kemik hastalığının ve maligniteye bağlı hiperkalseminin altında yatan neden osteoklastik hiperaktivite ve buna bağlı olarak kemik rezorpsiyonudur.

Zoledronik Asit kemik rezorpsiyonunu inhibe ederken, kemiğin formasyon, mineralizasyon ve mekanik özelliklerini olumsuz yönde etkilemez.

Yapılan çalışmalarda kemik rezorpsiyonunun inhibisyonu etkisine ek olarak in vivo; kemik iliğindeki mikroortamı tümör büyümesine daha az uygun hale getirirken in vitro; osteoblast proliferasyonunun inhibe olmasını sağlar (41).

1.10.3 Farmakokinetik Özellikleri

Faz I çalışmaları Zoledronik Asit'in diğer bifosfonatlara benzer farmakokinetik özellikler taşıdığını göstermiştir (14).

Zoledronik Asit metabolize olmaz ve değişmeden böbreklerden atılır. Uygulanan dozun yüzde 39 ± 16 'sı idrarla atılır kalanı ise büyük oranda kemik dokusuna bağlanır. Kemik dokusundan salımı çok yavaştır, serbestleştikten sonra böbrekler kanalıyla atılır. Vücut klerensi $5,04 \pm 2,5$ L.sa⁻¹tir. İnsan p450 enzimlerini inhibe etmez, biyotransformasyona uğramaz. Hayvanlarla yapılan deneylerde uygulanan Zoledronik Asit miktarının %3'ünden daha azının feçesle atıldığı bulunmuştur. Bu sebeple Zoledronik Asit'in metabolize olurken karaciğere uğramadığı düşünülebilir (14).

64 hastayla yapılan, hastalara 2, 4, 8 ve 16 mg'lık Zoledronik Asit dozlarının 5 ve 15 dakikalık infüzyonlarla verildiği bir çalışmada, infüzyondan sonra plazmada Zoledronik Asit konsantrasyonunun trifazik işlemlerle tutarlı olarak azalma gösterdiği görülmüştür. $t_{1/2\alpha}$ 0,24 saat ve $t_{1/2\beta}$ 1,75 olarak ölçülmüştür. 28 gün arayla tekrarlanan dozlarda akümülayon gözlemlenmemiştir (14).

Farmakokinetik parametrelerde hastalar arası değişkenlik diğer bifosfonatlarda olduğu gibi Zoledronik Asit'te de yüksektir.

Zoledronik Asit'in hücre komponentlerine afinitesi olmadığı ve insan plazma proteinlerine bağlanma oranının düşük (%22) ve dozdan bağımsız olduğu gösterilmiştir (21, 94).

Multipl myelom veya metastatik solid tümörlere bağlı kemik lezyonu bulunan hastalarda Zoledronik Asit ile tedaviye başlanırken serum kreatinin ve kreatinin

klerensi (CLcr) belirlenmelidir. CLcr serum kreatininden Cockcroft-Gault formülü kullanılarak hesaplanır. Bu formülle $CLcr < 30 \text{ mL.dakika}^{-1}$ olarak hesaplanan böbrek yetmezliği bulunan hastalarda Zoledronik Asit tedavisine başlanması tavsiye edilmez. Kreatinin klerensine göre tavsiye edilen Zoledronik Asit dozları Tablo 9’da gösterilmiştir (41, 94).

Tablo 9 : Kreatinin Klerensine Göre Tavsiye Edilen Zoledronik Asit Dozları (38).

KREATİNİN KLERENSİ (mL.dakika ⁻¹)	TAVSİYE EDİLEN ZOLEDRONİK ASİT DOZU (mg)
>60	4.0
50-60	3.5
40-49	3.3
30-39	3.0

1.10.4 Etki Mekanizmaları

Osteoklastlar üzerindeki direkt etkisi Zoledronik Asit’i güçlü bir kemik rezorpsiyonu inhibitörü yapar. Ayrıca osteoklastik aktiviteyi, osteoklast formasyonunu bozarak, apoptotik hücre ölümünü arttırarak da engeller. Hidroksiapatit kristallerine yüksek afinite gösterir ve mineralize kemik yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır (16, 51).

Zoledronik Asit ve yapısında N atomu taşıyan diğer bifosfonatlar, taşımayanlara göre daha güçlü kemik rezorpsiyonu inhibitörüdürler. N atomu taşımayan bifosfonatlar ATP’nin hidrolize olmayan metabolitlerine dönüşüp osteoklast fonksiyonlarını ATP’ye bağımlı enzimler kanalıyla bozarken, N atomu taşıyan bifosfonatlar farnesil difosfat sentez enzimini inhibe ederek mevalonat biyosentez yolağının çalışmasını durdurur. Buna bağlı olarak sentezlenemeyen GTP

bağlayan proteinlerin yokluğu osteoklast aktivitesinde azalma ve sonrasında kemik rezorpsiyonunda inhibisyona neden olur (28, 51).

1.10.5 Farmakolojik Etkiler

Kemik, in vitro ortamda osteoklast matürasyonu ve işlevleri üstünde direkt etkisi olduğu gözlenmiştir (51). Zoledronik Asit olgun osteoklastların fonksiyonel aktivitesini engeller. Yapılan çalışmalar östrojen eksikliği yaratılmış hayvanlarda Zoledronik Asit'in kemik yapısı ve formunu koruduğunu göstermiştir. İskelette görülen patolojik kırıklar, spinal bağ baskısı, hiperkalsemi, radyasyon terapisi veya kemoterapi almaya sebep olacak olan ağrılar insanın yaşam kalitesini önemli ölçüde düşüren etkenlerdir. Prostat kanseri ve meme kanseri hastalarının % 65-75'inde kemik metastazı olduğu gözlenmiştir. Zoledronik Asit'in böyle durumlarda kemik komplikasyonlarını %36 azalttığı bildirilmiştir. Kemik metastazları tüm metastazlar içinde en çok görülen 3. türdür (34).

Antitümör etkinlik; Zoledronik Asit kemik rezorpsiyonunun güçlü bir inhibitörü olmasına ek olarak metastatik kemik hastalıklarındaki etkisine katkıda bulunacak antikanser özelliklere de sahiptir. In vivo ortamda kemik iliği mikroçevresini tümör hücresi büyümesine daha az geçirgen hale getirir. In vitro ortamda, osteoblast proliferasyonunu inhibe eder, tümör hücrelerinde direkt pro-apoptotik etki yapar, diğer kanser ilaçlarıyla kullanıldığında sinerjik etki gösterir ve tümör hücresi yayılması ve adhezyonunu engeller (41).

Zoledronik Asit'in insan prostat kanseri, meme kanseri, renal karsinom ve multipl myelom hücre dizileri üzerinde doza bağlı etkisi olduğu gösterilmiştir. Metastatik süreçte kanser hücrelerinin yayılma yeteneğinin Zoledronik Asit

tarafından azaltıldığı gösterilmiştir. In vitro çalışmalarda Zoledronik Asit'in paklitaksel ve tamoksifenle sinerjik olduğu saptanmıştır (25).

Pamidronata oranla maligniteye bağlı hiperkalsemi tedavisinde daha etkin olduğu saptanmıştır. Yine pamidronatla karşılaştırıldığında meme kanseri kaynaklı kemik malignitelerini %20 daha fazla azalttığı bulunmuştur (68, 104).

Tümöre bağlı hiperkalsemi tedavisinde Zoledronik Asit'in pamidronata göre daha etkin olduğu gözlenmiştir (58).

Antianjiyojenik etkiler; In vivo ve in vitro ortamda yapılan çalışmalar Zoledronik Asit'in antitümör etkisini arttıran antiantjiyojenik etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir (51).

Osteoporozda, erkeklerde ve post menopozal kadınlarda yılda 1 kez 5 mg infüzyonunun kullanılmasının kemik kırıklarının oluşma riskini azalttığı gösterilmiştir. Plaseboya karşı 3 yıllık kullanımda kemik yoğunluğunun arttığı ve vertebral kırıkların azaldığı görülmüştür. Güçlü antirezorptif etkileri sebebiyle osteoporoz ve diğer non-malign kemik hastalıklarındaki etkisi halen araştırılmaktadır (92).

1.10.6 Endikasyonları

Maligniteye bağlı hiperkalsemi tedavisinde, antineoplastik tedaviye ek olarak solid tümörlerin metastatik kemik lezyonlarında ve multipl myelomda endikedir. İlerlemiş maligniteli hastalarda patolojik kırıkların, spinal baskının önlenmesi için kullanılır (41).

1.10.7 Yan Etkiler ve Toksisite

Zoledronik Asit'in yan etkileri yumuşak ve diğer bifosfonatlarınkine benzerdir. i.v. uygulamalardan sonra hastalarda grip benzeri semptomlar görülür, bunların en sık görülenleri ateş, üşüme, kemik ağrısı ve miyaljidir. Gastrointestinal sistemde uygulamadan sonra kusma ve mide bulantısı gibi yan etkiler görülebilir. Zoledronik Asit kullanan hastaların %1,5'unda anoreksiya bildirilmiştir (41, 104).

İnfüzyon uygulama noktasında lokal olarak kızarıklık görülebilir. Çoğu durumda yan etkiler için tedavi gerekmez, 24-48 saat içinde kendiliğinden kaybolurlar (41, 104).

İsilik, kaşıntı ve göğüs ağrısı görüldüğü ve diğer bifosfonatlarda olduğu gibi konjunktivit ve hipermağnezi görüldüğü bildirilmiştir (41, 104).

Zoledronik Asit'e ait akut doz aşımı verisi bulunmamaktadır. İki hastanın 5 dakikalık infüzyonlarla 32 mg Zoledronik Asit aldığı deneyde hastalarda toksik etkiler görülmemiştir. Doz aşımı durumunda hipokalsemi, hipofosfatemi, hipomagnesemi görülebilir (41, 104).

Zoledronik Asit'in tek doz uygulamalarında, doz 4 mg'dan fazla, infüzyon süresi 15 dakikadan az olmamalıdır. Kontrollü klinik deneylerde 4 mg Zoledronik Asit'in 5 dakikalık infüzyon şeklinde hastaya verilmesinin aynı dozun 15 dakikalık infüzyon şeklinde verilmesine göre daha yüksek renal toksisite riski taşıdığı gösterilmiştir. Böbrek yetmezliği bulunan hastalarda Zoledronik Asit kullanımı yakından takip edilmelidir.

Hepatik yetmezlik ve maligniteye bağlı hiperkalsemi bulunan hastalarda Zoledronik Asit'in kullanımına dair yeterli klinik veri yoktur (38).

Diğer bifosfonatların aspirine hassas astımlı hastalarda kullanımı bronkokonstriksiyon ile ilişkilendirilmiştir. Zoledronik Asit bu hastalarda kullanılırken dikkat edilmelidir (38).

Hamile kadınlarda kullanımına dair yeterli veri yoktur. Emziren kadınlarda kullanımı kontrendikedir (38).

Öldürücü olmayan en yüksek tek i.v. dozu farelerde 10 mg.kg^{-1} sıçanlarda $0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ olarak bulunmuştur (41, 104).

Sıçanlarda $0,2 \text{ mg}$ 'dan büyük subkutan dozlarda teratojenik olduğu gözlemlenmiştir (38).

Yapılan testlerde Zoledronik Asit'in mutajenik ve karsinojenik olduğuna dair veri bulunamamıştır (38).

1.10.8 İlaç Etkileşimleri

Aminoglikozidlerle birlikte kullanımda bu ilaçlar serum kalsiyum seviyesini uzun süreli olarak düşürdüğü için tedbirli olunmalıdır. Bazı diüretiklerle birlikte kullanımı da hipokalsemi riskini arttırabileceği için dikkat gösterilmelidir (41).

BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 *Kullanılan Araç, Gereç ve Kimyasal Maddeler*

2.1.1 **Kullanılan Araçlar ve Gereçler**

Alan Monitörü	Epsilon
Analitik Terazı	Precisa 205 ASCS
Cam Malzemeler.....	Teknik Cam
Doz Kalibratörü	Biodex Atomlab 400
Erime Derecesi Tayin Aleti	Barnstead Electrothermal IA 9100
Etüv.....	Nüve FN300
FTIR Spektrofotometre.....	Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR Spectrometer
Gama Kamera	General Electric, Infinia
Göğüs Zırhı.....	Biodex Medical Systems
Hamilton Enjektör	Alltech
Kromatografi Kağıtları	Whatman 3MM
Kurşun Atık Kutusu.....	Biodex
Membran Filtre 0,22µm.....	Pall Life Sciences
pH Metre.....	Inolab Level 1
pH Ölçüm Kağıtları	Merck
Radyoaktif Enjektör Taşıma Kutusu	Biodex
TLC Scanner	Bioscan AR-2000
Vorteks.....	Velp Scientifica
Yüzey Monitörü.....	Biodex

2.1.2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

%10'luk Ketamin HCl.....	Alfasan International BV
%2'lik Ksilazin HCl.....	Alfasan International BV
%37 HCl	Merck
^{99m} Tc.....	E. Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı
Aseton.....	Merck
Askorbik Asit.....	Sigma - Aldrich
Azot Gazı.....	HABAŞ
Distile Su	FABAL
Kalay Klorür Dihidrat (SnCl ₂ .H ₂ O).....	Merck
NaOH.....	Merck
Serum Fizyolojik	İ.E.U.
Zoledronik Asit Monohidrat.....	Novartis

2.2 Zoledronik Asit'in Teşhisi

2.2.1 FT-IR Spektrumu (Fourier Transform Infra-Red Spectroscopy)

1 mg Zoledronik Asit, Potasyum Bromür içinde 10 ton basınç altında sıkıştırıldı. Oluşan diskin FT-IR spektrumu 400–4000 cm⁻¹ dalga boyları arasında ölçüldü.

2.2.2 Ultra Viole (UV) Spektrumu

Zoledronik Asit'in distile suda 0,1 mg.mL⁻¹ konsantrasyondaki çözeltisi hazırlandı. UV spektrumu alındı ve $\lambda_{\max}$ 'u bulundu.

2.2.3 Erime Derecesi Tayini

Zoledronik Asit, bir ucu bek alevinde kapatılan kılcal bir boruya dolduruldu. Erime derecesi tayin aletinde maddenin erime derecesi saptandı.

2.3 Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesi

Zoledronik Asit, ^{99m}Tc ile bir indirgen ajan olan Kalay Klorür Dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) kullanılarak direkt metotla oda sıcaklığında ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) işaretlendi. Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesinde en yüksek verimin elde edildiği koşullar araştırıldı. Bu amaçla farklı miktarlarda Zoledronik Asit, suda veya 0,1N HCl'de çözülmüş Kalay Klorür, Askorbik Asit ve ^{99m}Tc kullanılarak oda sıcaklığında ($25 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$) işaretleme çalışmaları yapıldı. İşaretlenen formülasyonlar içerisinde, görüntüleme amacı ile kullanılmaya en uygun olan miktarlar araştırıldı. Hazırlanan formülasyonların pH değerleri ölçüldü. Çalışmalarda kullanılan tüm çözeltiler taze olarak hazırlandı. Kalay Klorür'ün oksidasyonunu engellemek amacıyla çözeltiden azot gazı geçirildi. Hazırlanan formülasyonlar 0,22 μm por çaplı selüloz asetat filtreden süzüldü. 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İşaretleme verimi hesaplanırken yapılan ince tabaka kromatografisi çalışmalarında sabit faz olarak Whatman 3MM plaklar, mobil faz olarak ise aseton ve serum fizyolojik kullanıldı. 8x1 cm boyutlarındaki Whatman 3MM plaklara tatbik edilen formülasyon örnekleri mobil fazdan çıkarılıp kuruduktan sonra TLC Scanner cihazında tarandı. Radyokimyasal saflık kontrolleri sonucunda serbest Teknesyum ($^{99m}\text{TcO}_4^-$), indirgenmiş/hidrolize olmuş Teknesyum ($^{99m}\text{TcO}_2$ - İ-H-Teknesyum) ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit %'leri hesaplandı. Çalışmalar 3 tekrarlı olarak yapıldı. Ortalama işaretleme verimleri ve standart sapmaları (ss) hesaplandı.

2.3.1 Zoledronik Asit Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi

Zoledronik Asit'in enjeksiyonluk sudaki 1 mg.mL^{-1} konsantrasyondaki, Kalay Klorür'ün distile su ve $0,1 \text{ N HCl}$ 'deki 1 mg.mL^{-1} konsantrasyondaki stok çözeltileri hazırlandı. Bir seri formülasyonda $0,1 \text{ N HCl}$ 'de çözünmüş $0,04 \text{ mg}$ Kalay Klorür kullanılırken diğer seride suda çözünmüş $0,04 \text{ mg}$ Kalay Klorür kullanıldı. Kalay Klorür miktarı ve Teknesyum Perteknetat aktivitesi (1 mCi) aynı kalmak koşuluyla, formülasyonlarda Zoledronik Asit'in farklı miktarları ($0,05 \text{ mg}$, $0,1 \text{ mg}$, $0,2 \text{ mg}$, $0,4 \text{ mg}$ ve $0,5 \text{ mg}$) kullanıldı. Formülasyonlar işaretlemeden sonra süzüldü 15 dakikalık inkübasyon süresinden hemen sonra ve $1.$ saat, $2.$ saat, $3.$ saat, $4.$ saat, $5.$ saat ve $6.$ saatte işaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.3.2 Kalay Klorür Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi

Zoledronik Asit ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ miktarı sabit kalmak koşuluyla Kalay Klorür'ün suda ve $0,1 \text{ N HCl}$ 'de hazırlanmış çözeltileri kullanıldı. Çözeltiler 1 mg.mL^{-1} konsantrasyonda hazırlandı. Kalay Klorür çözeltilerinden azot gazı geçirildi.

Kalay Klorür'ün işaretleme verimine etkisi araştırılırken, Zoledronik Asit'in $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ konsantrasyonundaki enjeksiyonluk sudaki çözeltisinden flakonlara 1 'er mL eklendi. mg.mL^{-1} konsantrasyonunda suda ve $0,1 \text{ N HCl}$ 'de hazırlanan Kalay Klorür çözeltilerinin her birinden flakonlara $0,001 \text{ mg}$, $0,0025 \text{ mg}$, $0,005 \text{ mg}$, $0,01 \text{ mg}$, $0,02 \text{ mg}$ ve $0,04 \text{ mg}$ Kalay Klorür içerecek şekilde Hamilton enjektörler yardımıyla alınan miktarlar formülasyonlara eklendi. Vortekste karıştırıldı. Flakonlara 1 'er $\text{mCi } ^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ çözeltisi eklendi. Preparatlar $0,22 \text{ }\mu\text{m}$ por çaplı milipor filtrelerden süzüldü. 15 dakika inkübasyona bırakıldı. İşaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.3.3 ^{99m}Tc Aktivitesinin İşaretleme Verimine Etkisi

Zoledronik Asit ve Kalay Klorür miktarları sabit tutulup ^{99m}TcO₄⁻ aktivitesi değiştirilerek işaretleme verimi üzerine etkisi incelendi.

1 mL’de 0,5 mg Zoledronik Asit içerecek şekilde hazırlanan stok çözeltiden flakonlara 1’er mL eklendi. 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan çözeltiden 40 µL Kalay Klorür çözeltileri (suda ve 0,1 N HCl’de) ilave edildi. Doz kalibratöründe ölçüldükten sonra 1, 2 ve 5 mCi aktiviteli ^{99m}TcO₄⁻ çözeltileri flakonlara eklendi. 0,22 µm por çaplı milipor filtrelerden süzüldü ve 15 dakika inkübasyona bırakıldı ve işaretleme verimleri Bölüm 2.4’de anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.3.4 Askorbik Asit Miktarının İşaretleme Verimine Etkisi

Zoledronik Asit, Kalay Klorür ve Na-^{99m}TcO₄ aktivitesi miktarı sabit tutularak Askorbik Asit’in 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan çözeltisinden 0,005 mL, 0,025 mL ve 0,05 mL’lik miktarları kullanılarak işaretleme verimine etkisi hesaplandı.

Askorbik Asit’in işaretleme verimine etkisi hesaplanırken hazırlanan stok çözeltilerden 0,5 mg Zoledronik Asit, 0,04 mg Kalay Klorür (suda ve 0,1 N HCl’de) içerecek şekilde flakonlara eklendi. Askorbik Asit’in 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda hazırlanan çözeltisinden 0,005 mL, 0,025 mL ve 0,05 mL’lik miktarları eklendikten sonra 1 mCi aktiviteli ^{99m}Tc çözeltisi ile işaretleme yapıldı. 0,22 µm por çaplı milipor filtrelerden süzülen formülasyonlar 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Formülasyonlara ait 6 saatlik işaretleme verimleri Bölüm 2.4’te anlatıldığı gibi hesaplandı.

Bu serileri takiben yapılan Askorbik Asit'in işaretleme verimine etkisi çalışmalarında ayrıca 0,05 mg Zoledronik Asit, 0,004 mg Kalay Klorür (suda ve 0,1 N HCl'de), 1 mCi aktiviteli $^{99m}\text{TcO}_4^-$ özeltisi ve 1mg.mL^{-1} konsantrasyondaki Askorbik Asit özeltisinin, 0,005 mL, 0,025 mL ve 0,05 mL'lik miktarları kullanıldı. Formülasyonlar 0,22 μm çaplı filtreden süzüldükten sonra 15 dakika inkübasyona bırakıldı. 6 saatlik işaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.3.5 pH'ın İşaretleme Verimine Etkisi

pH değerinin işaretleme verimine etkisi araştırılırken hazırlanan formülasyonlarda 0,05 mg Zoledronik Asit, 0,005 mg Askorbik Asit, 3 mCi ^{99m}Tc ve 0,1 N HCl'de özündürölmüş 1mg.mL^{-1} konsantrasyondaki Kalay Klorür çözeltisinden 0,04 ml kullanıldı. 0,22 μm çaplı filtreden süzülen formülasyonun pH değeri pH metre ile ölçöldü. Aynı stoklardan hazırlanan 2 seri (3'er örnek) formülasyonun pH değeri sırasıyla 0,10 mL 0,1 M NaOH özeltisi ilavesi ile 6,25'e ve 0,18 mL 0,1 M NaOH özeltisi ilavesi ile 7,40'a ayarlandı. İnkübasyondan sonra 6 saatlik işaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

Bu çalışmalara ek olarak diğer deneysel koşulların stabiliteye etkisi araştırılırken hazırlanan formülasyonların pH'ları ölçöldü.

2.3.6 İn Vivo alışmalarda Kullanılacak Formülasyonun Belirlenmesi

İn vivo çalışmalarda kullanmak için, daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkılarak bulunan optimum formülasyonda 0,05 mg Zoledronik Asit, 0,04 mg Kalay Klorür (0,1 N HCl'de), 0,005 mg Askorbik Asit, 3 mCi ^{99m}Tc kullanıldı.

0,05 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda serum fizyolojikte hazırlanan Zoledronik Asit çözeltisinden vial 1 mL eklendi. Üzerine 0,1 N HCl'de hazırlanan 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonundaki Kalay Klorür çözeltisinden 0,04 mL, 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonundaki Askorbik Asit çözeltisinden 0,005 mL eklendi. 3 mCi aktiviteli ^{99m}Tc çözeltisi ile işaretleme yapıldı. Çözeltiler 0,22 µm por çaplı milipor filtrelerden süzüldü. 15 dakika inkübasyondan sonra 6 saatlik işaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.3.7 İn Vitro Stabilite Çalışmaları

Yapılan tüm çalışmalarda ^{99m}Tc–Zoledronik Asit kompleksinin 6 saatlik stabilitesi incelendi. Hazırlanan kompleksten inkübasyon süresinin bitmesinden hemen sonra ve daha sonraki 1. saat, 2. saat, 3. saat, 4. saat, 5. saat ve 6. saatlerde cam kapiller boru yardımıyla alınan örnekler Whatman 3MM kromatografi kağıtlarına tatbik edilerek aseton ve serum fizyolojikte sürüklendi. Mobil faz tanklarından alınan plaklar kuruduktan sonra TLC Scanner'da okunarak değerlendirildi. İşaretleme verimi Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı.

Ayrıca optimum formülasyonun oda sıcaklığındaki (25±3 C°) 10 saatlik stabilitesi yukarıda anlatıldığı şekilde incelendi.

2.4 Zoledronik Asit'in İşaretleme Veriminin Hesaplanması

İnkübasyon süresinin bitiminde işaretli çözeltiler, cam kapiller borular yardımıyla 8x1 cm boyutlarındaki Whatman 3MM plaklara 1,5 cm'den tatbik edildi. İnkübasyon süresinin bitiminde ve onu takip eden 6 saatte her saat başı aseton ve serum fizyolojik mobil fazları kullanılarak yapılan kromatografi çalışmalarında, asetonunda fronta yürüyen serbest Teknesyum ve serum fizyolojikte tatbik yerinde

kalan indirgenmiş Teknesyum oranları hesaplandı. Bu işlem TLC Scanner aleti kullanılarak yapıldı. Formülasyonlara ait işaretleme verimleri :

$$\% \text{ İşaretleme verimi} = [100 - (\% \text{ indirgenmiş Teknesyum} + \% \text{ serbest Teknesyum})]$$

formülü yardımıyla hesaplandı.

2.5 *İn Vivo Çalışmalar*

2.5.1 Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Hayvan çalışmaları için Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 2012-008 sayılı etik kurul izni alındı.

Yapılan çalışmada 2,5–3 kg ağırlığında 4 adet dişi, beyaz Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Hayvanlara deney öncesinde özel bir gıda rejimi uygulanmadı ve deney sırasında hayvanlar aç bırakıldı.

Hayvanlara 0,35 mL Ksilazin (%2'lik Alfazin) ve 0,65 mL Ketamin'den (%10'luk Alfamine) oluşan karışımdan intramusküler yolla anestezi yapıldı. Anestezinin etkisine giren tavşanlar, uygun ebatlarda plakaların üzerine sırt üstü pozisyonda yatırıldı. Tavşanların çekim sırasında anestezi etkisinden çıkarak hareket edebilme riskleri düşünülerek hayvanların ön ve arka ayakları plakaların üzerine bağlanarak sabitlendi.

Kontaminasyonu önleyebilmek için hayvanlara idrar torbası takıldı. Tavşanların karışmaması için kulaklarına keçeli kalem ile numara yazıldı.

2.5.2 İn Vivo Çalışmalarda Kullanılacak ^{99m}Tc–Zoledronik Asit’in

Hazırlanması

0,05 mg.mL⁻¹ konsantrasyonda, serum fizyolojikte hazırlanan Zoledronik Asit stok çözeltisinden flakona 1 mL eklendi. Üzerine 0,1 N HCl’de hazırlanan 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonundaki Kalay Klorür çözeltisinden 0,04 mL, 1 mg.mL⁻¹ konsantrasyonundaki Askorbik Asit çözeltisinden 0,005 mL eklendi. 3 mCi aktiviteli yaklaşık 0,1 mL ^{99m}Tc çözeltisi ile işaretleme yapıldı. Çözeltiler 0,22 µm por çaplı milipor filtrelerden süzüldü. 15 dakika inkübasyondan sonra 6 saatlik işaretleme verimleri Bölüm 2.4’te anlatıldığı gibi hesaplandı.

2.5.3 ^{99m}Tc–Zoledronik Asit’in Hayvanlara Uygulanması

Bölüm 2.5.2’de hazırlanışı anlatılan formülasyondan her bir tavşana 12,5 µg Zoledronik Asit içeren yaklaşık 750 µCi’lik steril ^{99m}Tc-Zoledronik Asit çözeltisi, kulak veninden yapılan i.v. enjeksiyon ile uygulandı. ^{99m}Tc-Zoledronik Asit çözeltisi ile tavşanlarda yapılan görüntüleme çalışmaları gama kamera sistemi ile paralel delikli kolimatör kullanılarak 140 kEv enerji pikiinde gerçekleştirildi. Enjeksiyondan sonra dinamik, 60., 120., 180. dakikalarda, 1’er dakikalık statik görüntüler alındı.

2.6 İstatistiksel Analiz

Ortalamaları ve standardart sapmaları hesaplanan deney sonuçları için, asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş aynı miktarda Kalay Klorür içeren formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel fark olup olmadığını değerlendirilirken bağımsız iki örneklem için t testi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı.

Asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen aynı aktiviteli ^{99m}Tc içeren formülasyonlar arasında istatistiksel fark olup olmadığı değerlendirilirken bağımsız iki örneklem için t testi (SPSS) kullanıldı.

İn vivo çalışmalarda tavşanlara uygulanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in kemik tutulumlarında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığı araştırılırken tek yönlü ANOVA testi kullanıldı.

Testler sonucunda elde edilen p değerlerinin 0,05'ten büyük veya küçük olmasına göre, karşılaştırılan gruplar arasında fark olup olmadığı konusunda yorum yapıldı.

2.7 İzotoni

Optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun izotonik, hipertonic veya hipotonik olduğunu belirlemek için yapılan testte eritrositlerin optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonundaki davranışı, distile sudaki, 0,9 %'luk NaCl çözeltisindeki ve kalay klorürün sulu ortamda çözündüğü ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonundaki davranışlarıyla (0,05 mg Zoledronik Asit, suda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit ve 3 mCi ^{99m}Tc) ile karşılaştırıldı.

Distile su, 0,9 %'luk NaCl çözeltisi, optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonu ve sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunu içeren 4 farklı tüpe mikropipetle 50'şer µl kan damlatıldı. 30 dakika bekletildi. 1500 devirde 5 dakika santrifüjlenen tüplerden alınan örnekler mikroskopta 40x büyütme ile incelendi. Eritrositlerin hemoliz olup olmadığı araştırıldı (27).

BÖLÜM III

3 BULGULAR

3.1 *Zoledronik Asit'in Teşhisine Ait Bulgular*

3.1.1 FT-IR Spektrumu

Yöntem 2.2.1'de anlatıldığı gibi çalışıldı. Zoledronik Asit'in FT-IR spektrumu aşağıda Şekil 12'de verildi.



Şekil 12 : Zoledronik Asit'e ait FT-IR Spektrumu.

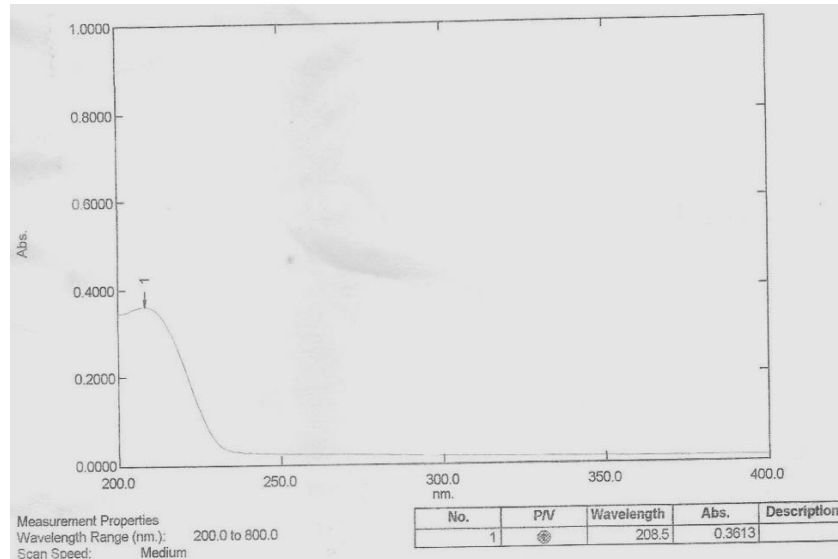
Zoledronik Asit'in kimyasal formülü incelendiğinde molekül üzerinde fosfonik asit ve tersiyer alkol yapıları ile imidazol halkasının bulunduğu görülmektedir. Bu sebeple molekülün IR spektrumunda molekülde mevcut bulunan işlevsel gruplar ve imidazol halkasına ait bantların görülmesi beklenmektedir. Tersiyer alkol yapısına ait O-H gerilme bantlarının intermoleküler hidrojen bağı oluşumu nedeniyle 3300 cm^{-1}

civarında, molekül üzerinde bulunan fosfonik asit yapısına ait P=O gerilme bandının 1300-1100 cm^{-1} arasında ve yine aynı gruba ait O-H gerilmesinin ise 2700-2200 cm^{-1} arasında görülmesi beklenmektedir (47). İmidazol halkasına ait =C-H bandının 3100 cm^{-1} civarında ve C=N gerilmesinin 1600-1400 cm^{-1} arasında olması beklenmektedir.

Zoledronik Asit molekülünün IR spektrumu incelendiğinde 3351 cm^{-1} 'de tersiyer alkol yapısına ait geniş bir O-H gerilmesi, 3131 cm^{-1} 'de imidazol halkasına ait =C-H gerilmesi ve 2441 cm^{-1} 'de fosfonik asit yapısına ait geniş bir O-H gerilmesi tespit edildi. Molekülde bulunan imidazol halkasına ait C=N gerilmesi 1583 cm^{-1} 'de ve fosfonik asit yapısına ait P=O gerilmesi ise 1292 cm^{-1} 'de zayıf 1160'da ise kuvvetli bir bant şeklinde belirlendi. IR spektrumundan elde edilen verilerin literatür ile benzerlik gösterdiği görüldü (47, 73).

3.1.2 UV Spektrumu

Yöntem 2.2.2'de anlatıldığı gibi çalışıldı. $\lambda_{\text{max}} = 208,5 \text{ nm}$ olarak bulundu. Zoledronik Asit'e ait UV spektrumu Şekil 13'te verildi.



Şekil 13: Zoledronik Asit'e ait UV spektrumu.

3.1.3 Erime Derecesi Tayini

Yöntem 2.2.3’de anlatıldığı gibi çalışıldı. Zoledronik Asit’in erime derecesi 240 °C olarak bulundu. Literatüre (49) yakın olduğu gözlemlendi.

3.2 Zoledronik Asit’in ^{99m}Tc ile İşaretlenmesine Deneysel Koşulların Etkisinin İncelenmesine Ait Bulgular

3.2.1 Zoledronik Asit Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Değişik Zoledronik Asit miktarları kullanılarak yapılan çalışmalarda suda çözündürülen Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda elde edilen işaretleme verimleri Tablo 10’da, 0,1 N HCl’de çözündürülen Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda elde edilen işaretleme verimleri Tablo 11’de ortalama değer ± standart sapma olarak gösterildi.

Tablo 10 : Farklı miktarlarda Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc ve 0,04 mg sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit’in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Zoledronik Asit (mg)	^{99m} TcO ₄ ⁻ (%)	^{99m} TcO ₂ (%)	^{99m} Tc-Zoledronik Asit (%)
0,05	2,31±0,25	1,91±2,14	95,78±1,88
0,1	3,51±1,72	0,76±0,15	95,73±1,61
0,2	1,30±0,30	0,79±0,52	98,18±0,15
0,4	4,80±2,32	0,52±0,24	94,68±2,19
0,5	1,14±0,46	2,98±0,29	95,88±0,38

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Tablo 11 : Farklı miktarlarda Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc ve 0,04 mg asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Zoledronik Asit (mg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
0,05	3,81±0,59	1,98±0,73	94,21±0,54
0,1	3,35±0,96	3,10±1,10	93,55±0,69
0,2	4,04±0,66	3,86±2,91	92,11±3,51
0,4	6,94±0,32	0,77±0,14	92,29±0,23
0,5	1,06±0,13	2,77±0,65	96,17±0,60

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Formülasyonda kullanılan farklı Zoledronik Asit miktarlarının işaretleme veriminde büyük bir etki yaratmadığı gözlemlendi.

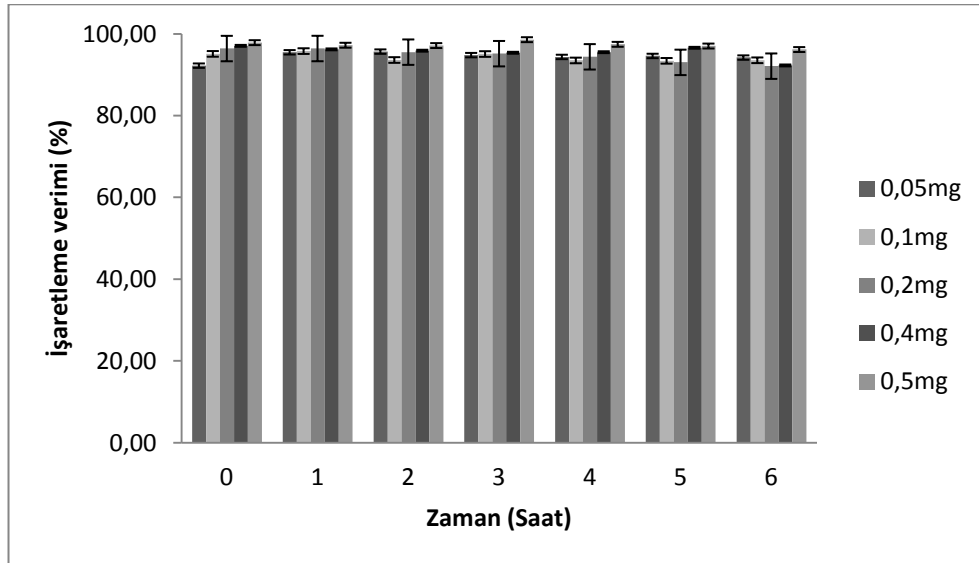
3.2.2 Farklı Zoledronik Asit Miktarları ile Hazırlanan Formülasyonların Stabilitesi

Farklı Zoledronik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların inkübasyon sonrasında ve takip eden her saatte işaretleme verimleri Bölüm 2.4'te anlatıldığı gibi hesaplandı. Yapılan çalışmalarda bulunan veriler Tablo 12, Tablo 13 ve Şekil 14, Şekil 15'te gösterildi.

Tablo 12 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının stabilitesi

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)				
	Zoledronik Asit Miktarı (mg)				
	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5
Başlangıç	92,23±1,48	95,11±0,31	96,42±0,17	97,08±0,38	97,86±0,32
1.	95,50±0,29	95,79±0,59	96,43±0,29	96,22±0,79	97,23±0,72
2.	95,67±0,09	93,61±1,46	95,54±0,90	95,89±1,08	97,14±0,41
3.	94,81±0,75	95,08±0,19	95,16±0,62	95,39±0,13	98,59±0,19
4.	94,36±0,45	93,51±1,56	94,39±0,81	95,53±0,58	97,45±0,41
5.	94,61±0,71	93,42±0,71	93,04±1,10	96,60±0,73	97,03±0,28
6.	94,21±0,54	93,55±0,69	92,11±3,51	92,29±0,23	96,17±0,60

Değerler (ortalama ± standart sapma)(n=3) olarak verildi.



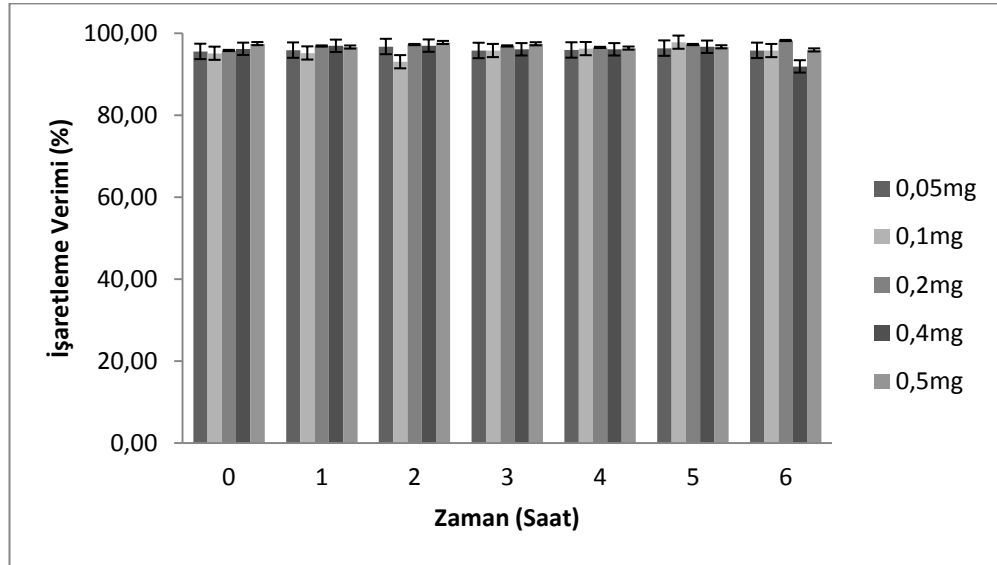
Şekil 14 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının stabilitesi.

Asitli ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda Zoledronik Asit'in değişen miktarlarıyla hazırlanan formülasyonların hepsinin 6 saat boyunca oda sıcaklığında (25±3 C°) stabil olduğu gözlemlendi.

Tablo 13 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının stabilitesi

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)				
	Zoledronik Asit Miktarı (mg)				
	0,05	0,1	0,2	0,4	0,5
Başlangıç	95,52±0,31	95,04±0,68	95,75±0,80	96,15±1,38	97,42±0,27
1.	95,83±1,09	94,95±1,16	96,83±0,31	96,88±0,63	96,59±0,24
2.	96,72±0,24	93,20±1,74	97,19±0,90	96,93±1,28	97,70±0,74
3.	95,75±0,47	95,96±0,23	96,85±0,47	96,04±1,04	97,38±0,42
4.	95,87±0,40	96,10±0,52	96,49±0,49	96,03±0,92	96,33±0,36
5.	96,32±0,76	97,77±0,34	97,20±0,86	96,66±0,29	96,64±0,26
6.	95,78±1,88	96,38±0,78	98,18±0,15	91,86±1,51	95,88±0,38

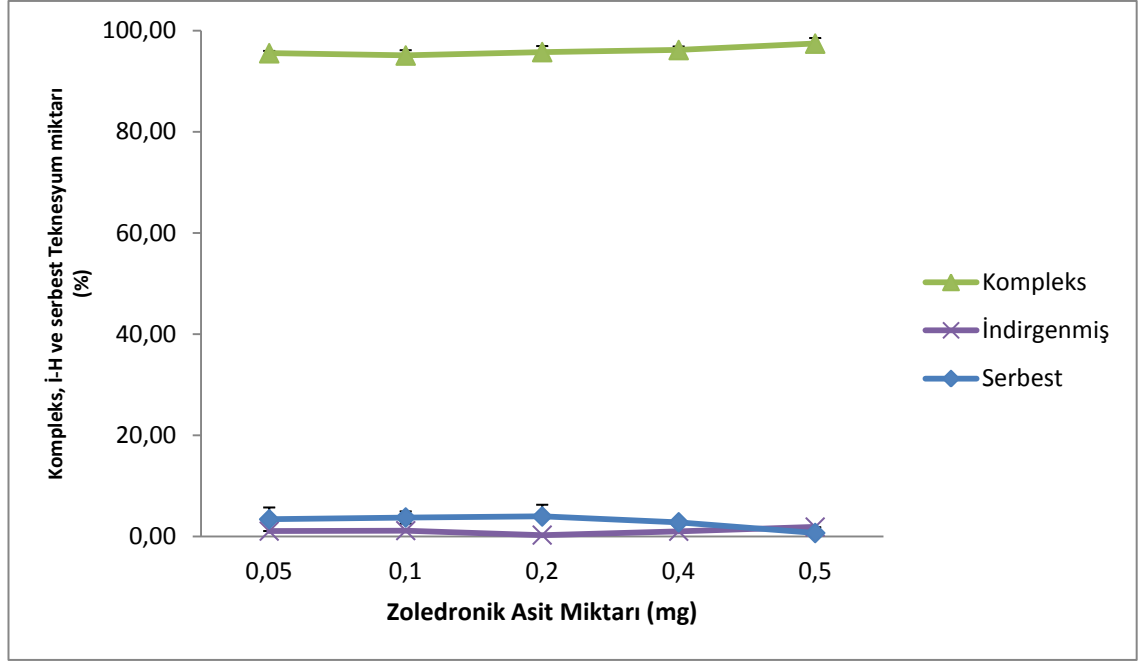
Değerler (ortalama ± standart sapma)(n=3) olarak verildi.



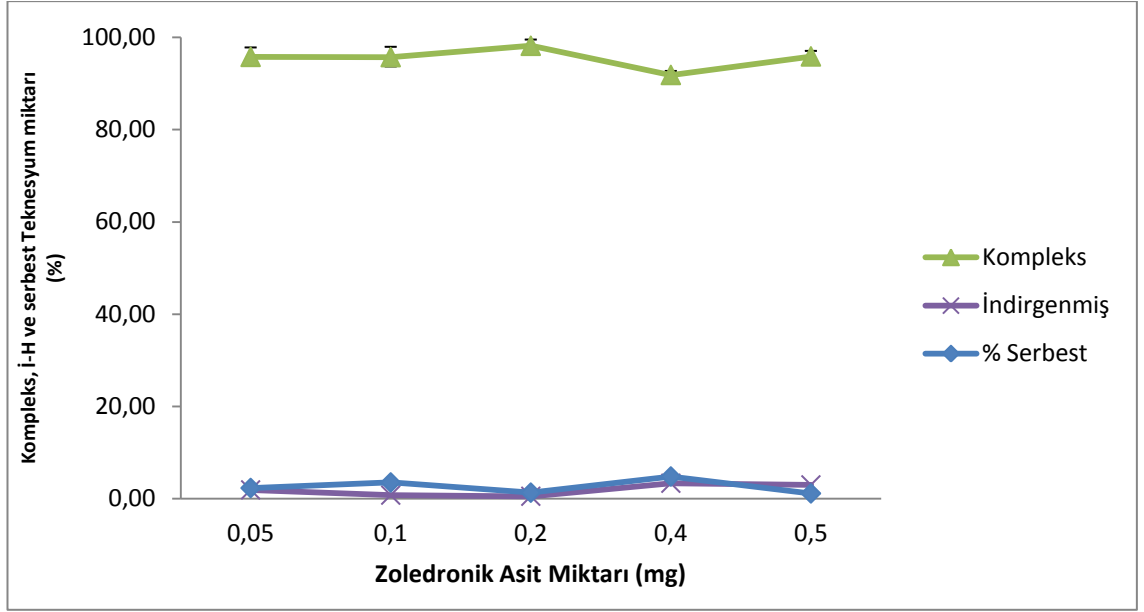
Şekil 15 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının stabilitesi.

Sulu ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların hepsinin işaretleme veriminin %95'ten büyük olduğu ve oda sıcaklığında (25±3 C°) 6 saat boyunca stabil olduğu gözlemlendi.

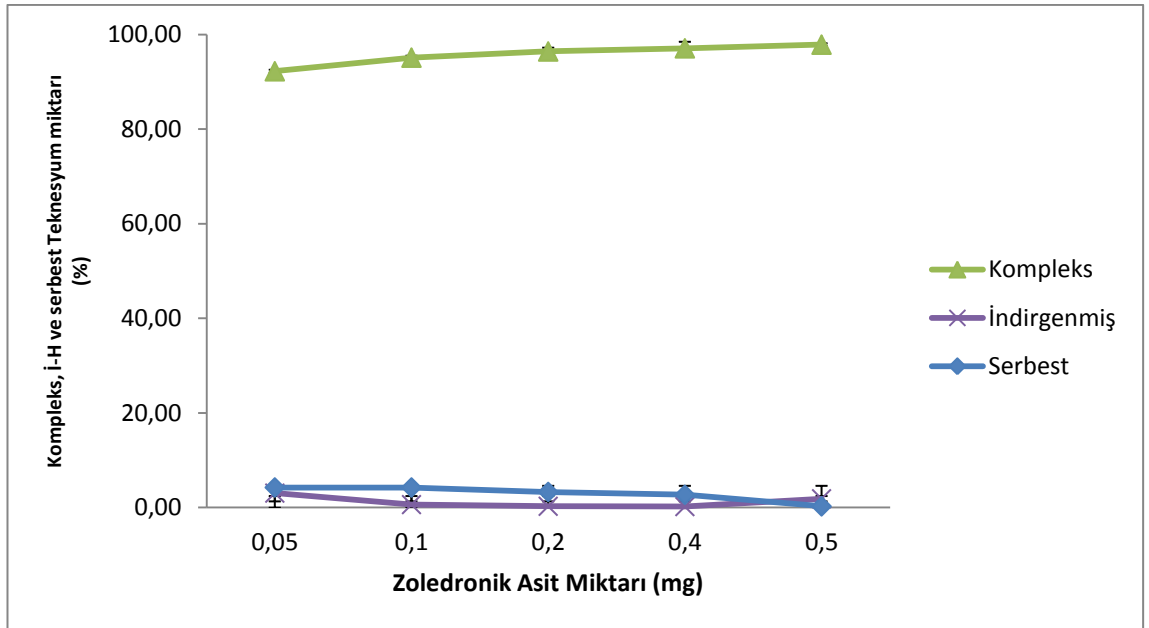
Kullanılan farklı Zoledronik Asit miktarlarının, inkübasyon sonunda ve stabilite testi bitiminde görülen kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarlarına etkisi sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlananlar için Şekil 16 ve Şekil 17’de asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlananlar için Şekil 18 ve Şekil 19’da verildi.



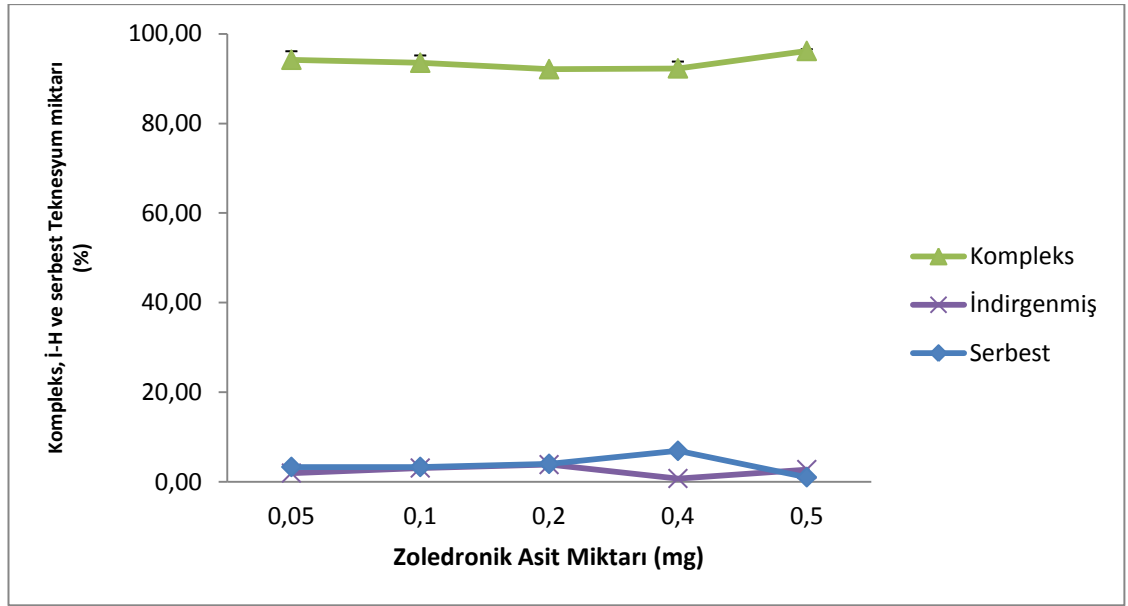
Şekil 16 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.



Şekil 17 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve sulu ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.



Şekil 18 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.



Şekil 19 : Farklı Zoledronik Asit miktarları ve asitli ortamda çözölmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formölasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.

3.2.3 Kalay Klorür Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yapılan radyokimyasal saflık kontrolleri sonunda, ^{99m}Tc-Zoledronik Asit'in işaretlelenmesinde sulu ortamda çözönmüş Kalay Klorür'ün farklı miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 14'te, asitli ortamda çözönmüş Kalay Klorür'ün farklı miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 15'te gösterildi.

Tablo 14 : Sulu ortamda çözönmüş farklı miktarlarda Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit'in işaretlelenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Kalay Klorür (µg)	^{99m} TcO ₄ ⁻ (%)	^{99m} TcO ₂ (%)	^{99m} Tc-Zoledronik Asit (%)
1	70,33 ± 2,35	4,26 ± 0,86	25,41 ± 1,79
2,5	52,11 ± 1,68	4,06 ± 0,51	43,83 ± 1,34
5	5,80 ± 1,71	3,46 ± 0,54	90,70 ± 1,45
10	1,85 ± 0,03	2,39 ± 0,22	95,76 ± 0,20
20	2,17 ± 0,64	3,08 ± 0,64	94,75 ± 1,18
40	1,14 ± 0,46	2,98 ± 0,29	95,88 ± 0,38

Değerler (ortalama ± standart sapma)(n=3) olarak verildi.

Sulu ortamda çözöndürölmüş Kalay Klorür kullanılarak yapılan çalışmalarda 0,001

mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür'ün aktiviteyi indirgemedi yeterli olmadığı ve ortamdaki serbest Teknesyum miktarının fazla olduğu belirlendi. 0,005 mg ve daha fazla Kalay Klorür kullanıldığında ortamdaki serbest Teknesyum miktarının azaldığı ve daha yüksek işaretleme verimi elde edildiği görüldü.

Tablo 15 : Asitli ortamda çözünmüş farklı miktarlarda Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit, 1 mCi ^{99m}Tc kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in işaretlenmesinden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Kalay Klorür (μg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
1	$87,82 \pm 0,16$	$1,41 \pm 0,29$	$10,77 \pm 0,15$
2,5	$75,75 \pm 0,11$	$2,34 \pm 0,76$	$21,91 \pm 0,77$
5	$50,65 \pm 3,59$	$4,42 \pm 2,02$	$44,93 \pm 1,73$
10	$26,58 \pm 1,12$	$2,26 \pm 0,31$	$71,17 \pm 1,43$
20	$5,65 \pm 1,62$	$4,31 \pm 0,29$	$90,04 \pm 1,72$
40	$1,06 \pm 0,13$	$2,77 \pm 0,65$	$96,17 \pm 0,60$

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Kalay Klorür'ün değişik çözgenlerdeki (su veya 0,1N HCl) çözeltilerinden farklı miktarlarda kullanılarak yapılan işaretleme çalışmalarında en uygun Kalay Klorür miktarının 0,04 mg olduğuna karar verildi.

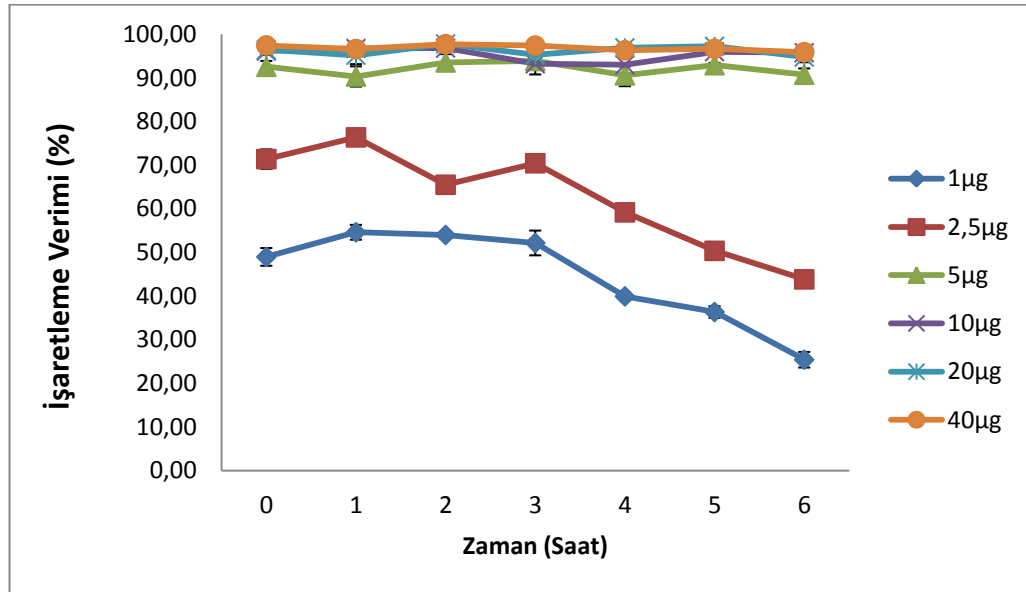
3.2.4 Farklı Kalay Klorür Miktarları İle Hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in Stabilitesi

Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür'ün farklı miktarları ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında (25 ± 3 C°) yapılan 6 saatlik stabilite testlerine ait sonuçlar Tablo 16 ve Şekil 20'de gösterildi.

Tablo 16 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)					
	Kalay Klorür Miktarı (µg)					
	1	2,5	5	10	20	40
Başlangıç	48,97±2,03	71,38±2,23	92,51±1,35	96,13±0,87	96,41±1,19	97,42±0,27
1.	54,61±1,70	76,36±1,63	90,31±2,31	96,73±0,67	95,16±2,02	96,59±0,24
2.	53,99±0,79	65,50±1,63	93,53±1,90	96,81±0,42	97,77±0,61	97,70±0,74
3.	52,17±2,84	70,44±1,35	93,87±1,29	93,22±2,45	95,24±2,88	97,38±0,42
4.	39,93±0,89	59,18±0,37	90,57±2,49	92,99±0,38	92,90±0,84	96,33±0,36
5.	36,34±1,34	50,36±0,75	92,89±0,52	95,96±0,43	97,23±0,48	96,64±0,26
6.	25,41±1,79	43,83±1,34	90,70±1,45	95,76±0,20	94,75±1,18	95,88±0,38

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.



Şekil 20 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarından 0,001 ve 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlananların stabil olmadığı, 0,005 mg, 0,01 mg, 0,02mg ve 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlananlar arasından ise 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan preparatın %95'in

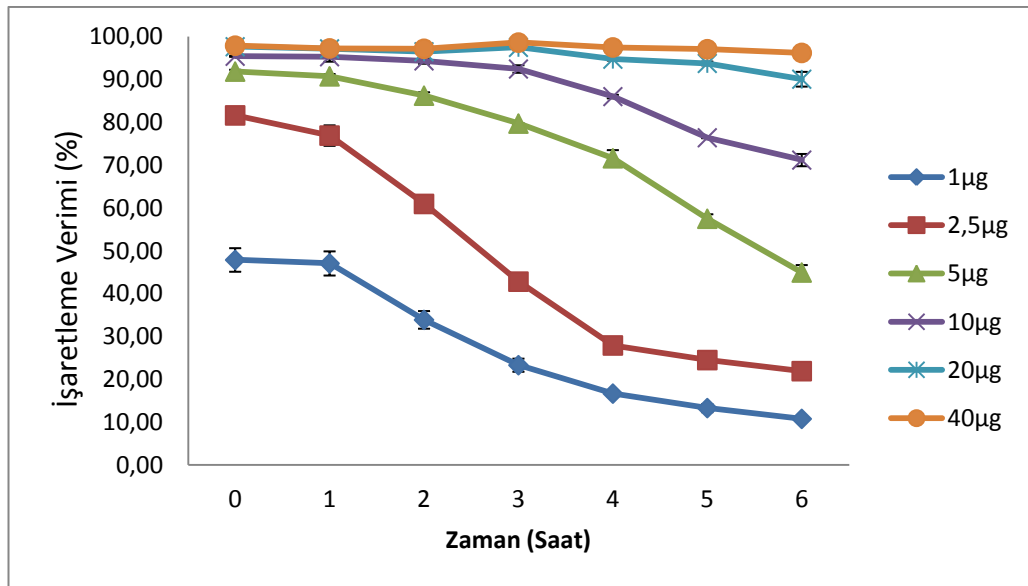
üzerinde verimle işaretlendiği ve en stabil formülasyon olduğu gözlemlendi.

Asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür'ün farklı miktarları ile hazırlanan formülasyonlara ait oda sıcaklığındaki (25±3) 6 saatlik stabilite verileri Tablo 17 ve Şekil 21'de gösterildi.

Tablo 17 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)					
	Kalay Klorür Miktarı (µg)					
	1	2,5	5	10	20	40
Başlangıç	47,86±2,75	81,59±0,87	91,82±0,43	95,39±0,14	97,63±0,32	97,86±0,32
1.	47,05±2,82	76,88±2,39	90,71±0,54	95,28±1,14	97,13±0,17	97,23±0,72
2.	33,88±2,06	60,93±0,37	86,20±0,79	94,31±0,66	96,45±0,29	97,14±0,41
3.	23,30±1,53	42,80±1,42	76,69±0,07	92,08±0,88	97,47±0,68	98,59±0,19
4.	16,66±0,77	27,90±0,53	71,59±1,90	85,98±0,41	94,71±0,31	97,45±0,41
5.	13,28±0,95	24,49±1,64	57,48±1,05	76,38±0,12	93,71±0,45	97,03±0,28
6.	10,77±0,15	21,91±0,77	44,93±1,73	71,17±1,43	90,04±1,72	96,17±0,60

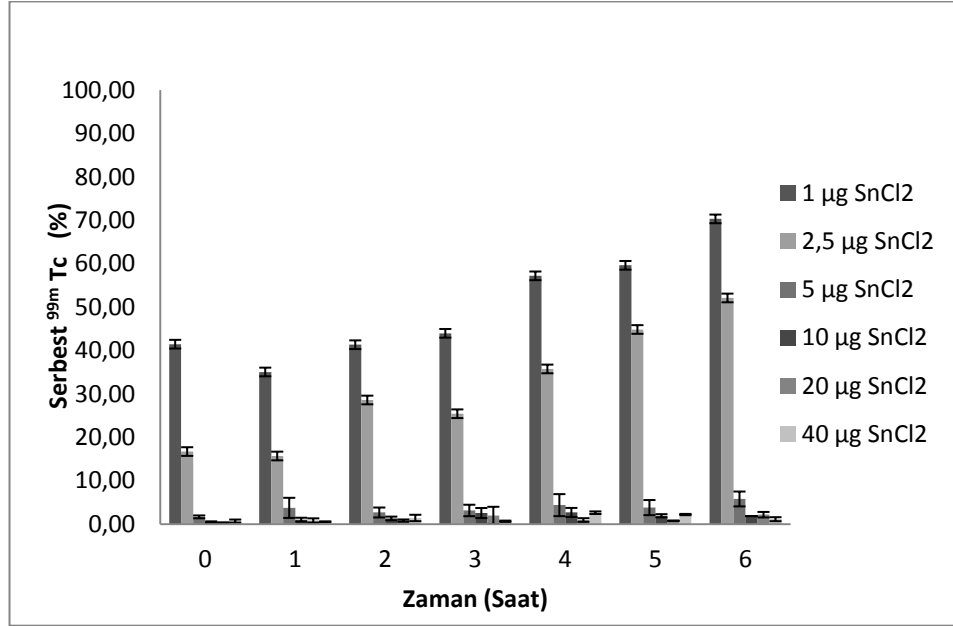
Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.



Şekil 21 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.

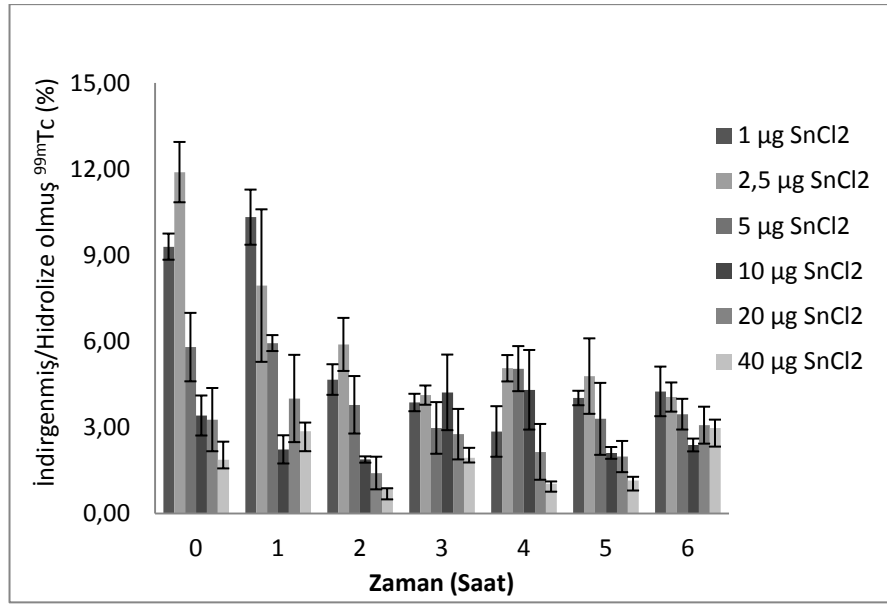
Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından en stabil olanın 0,04 mg Kalay Klorür kullanılan formülasyon olduğu gözlemlendi. 0,001 mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür kullanıldığında işaretleme veriminin düşük olduğu, 0,005 mg ve 0,01 mg Kalay Klorür kullanılan formülasyonların işaretleme verimlerinin ise ilk saatlerden sonra düştüğü gözlemlendi.

Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda görülen serbest Teknesyum (%) miktarları Şekil 22’de, İ-H-Teknesyum (%) miktarları Şekil 23’te verildi.



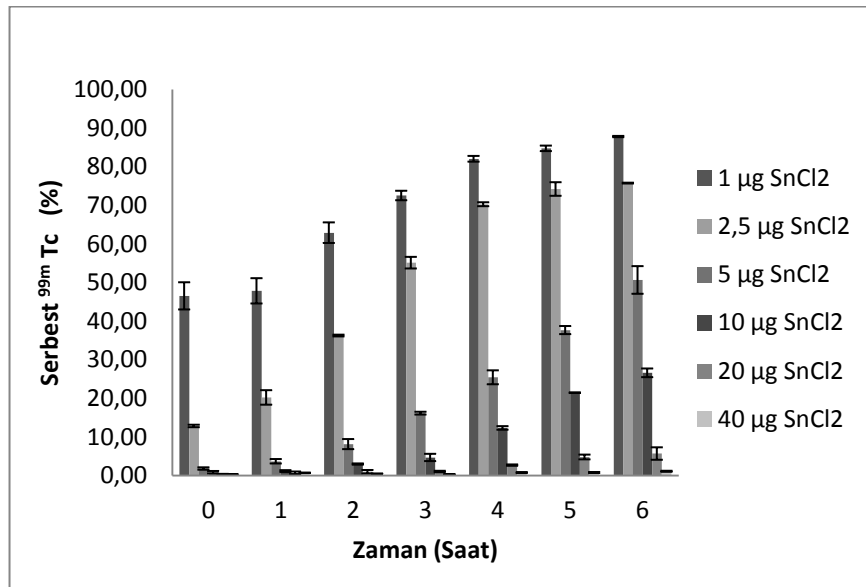
Şekil 22 :Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları.

Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlardan 0,001 mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür içeren formülasyonlarda, kullanılan Kalay Klorür miktarının Teknesyum’u indirgemeye yetmediği, stabilite testinin son saatlerinde serbest Teknesyum (%) miktarının daha da arttığı gözlemlendi.



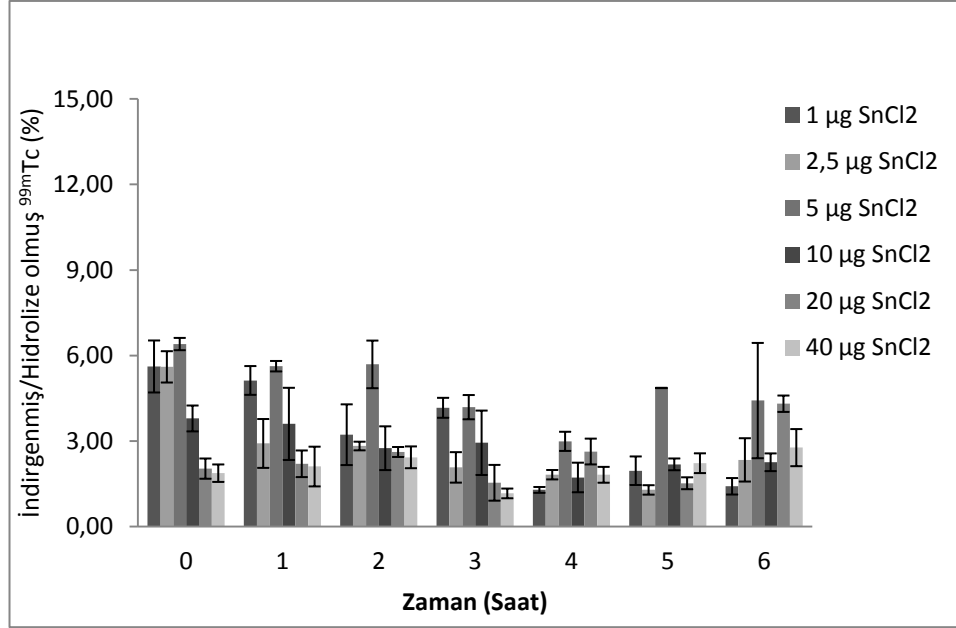
Şekil 23 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları.

Farklı ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından 0,001 mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların en yüksek İ-H-Teknesyum miktarlarını içeren formülasyonlar olduğu görüldü.



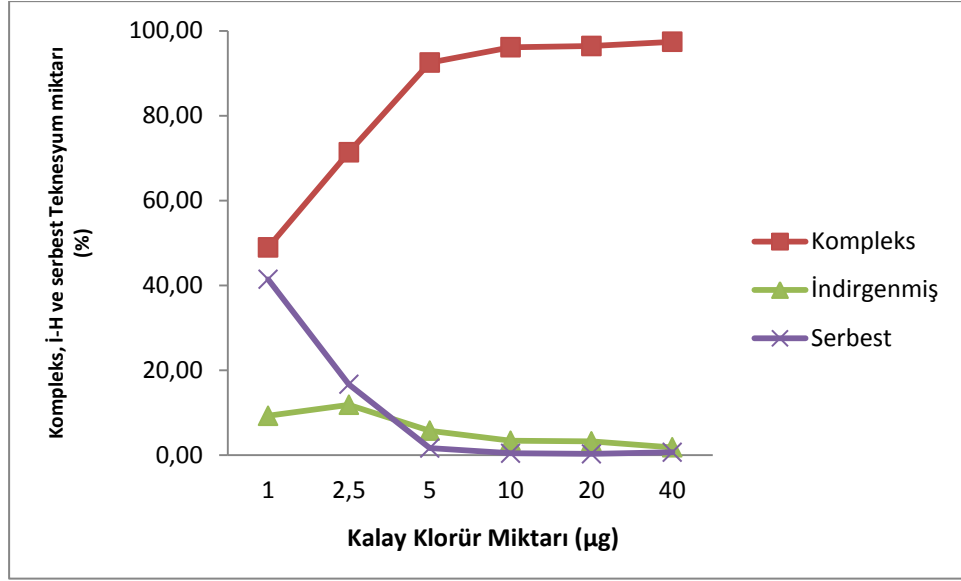
Şekil 24 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları.

Asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan farklı formülasyonlardan 0,001 mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlananlarda stabilite testi boyunca yüksek serbest Teknesyum miktarı (%) gözleendiği, 0,005 mg ve 0,01 mg Kalay Klorür ile hazırlananlarda ise ilk saatlerden sonra serbest Teknesyum miktarının (%) giderek arttığı gözleendi.

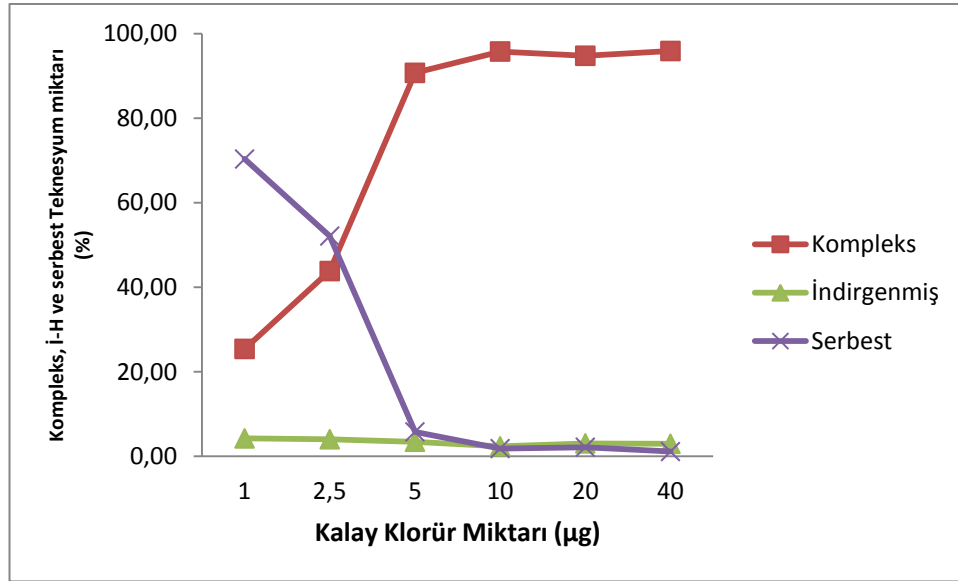


Şekil 25 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarında bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları.

Formülasyonlardaki Kalay Klorür miktarının inkübasyon sonunda ve stabilite testi bitiminde kompleks, serbest Teknesyum ve İ-H-Teknesyum miktarlarına (%) etkisi sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlananlar için Şekil 26 ve Şekil 27’de, asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlananlar için Şekil 28 ve Şekil 29’da verildi.

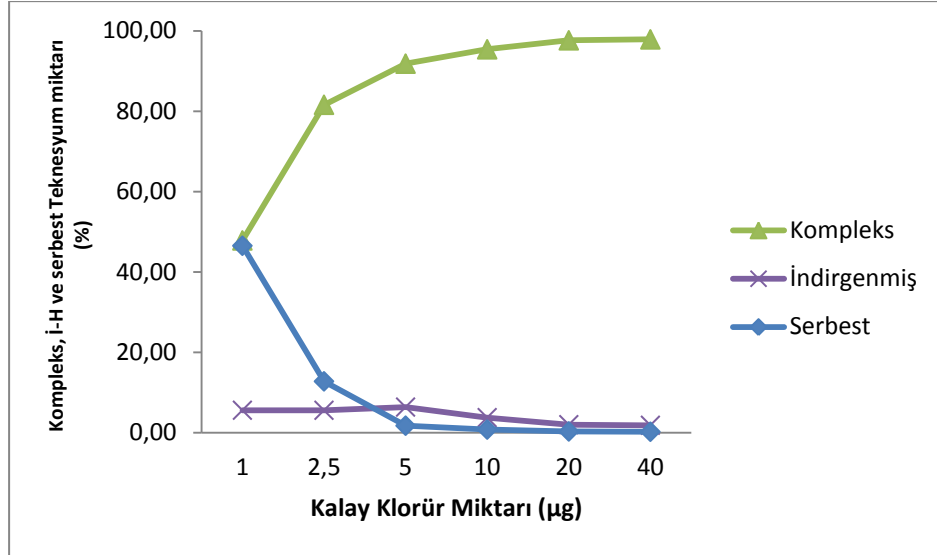


Şekil 26 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.



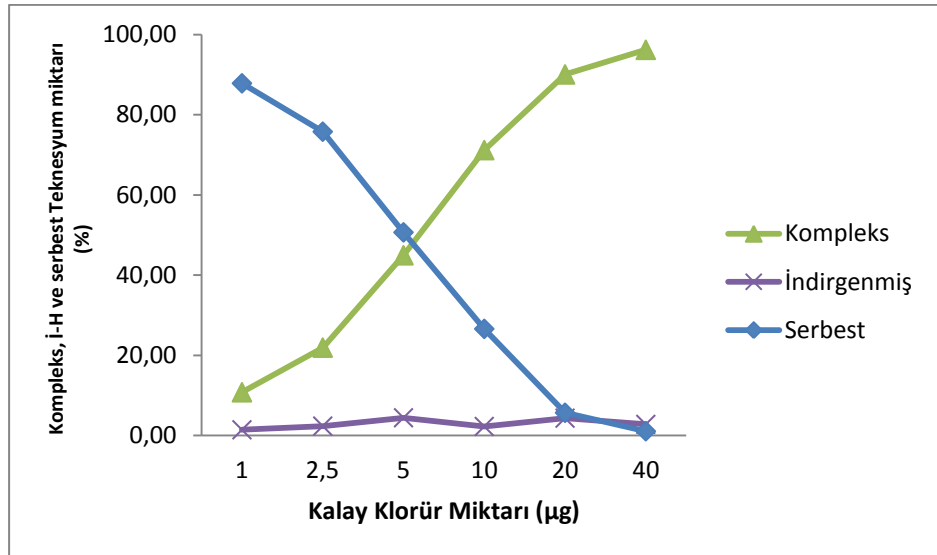
Şekil 27 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.

Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan formülasyonlardan 0,001 mg ve 0,0025 mg Kalay Klorür kullanılanlar haricinde olanların işaretleme verimi % 90'ın üzerinde bulundu.



Şekil 28 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında inkübasyon sonunda (15. dakika) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.

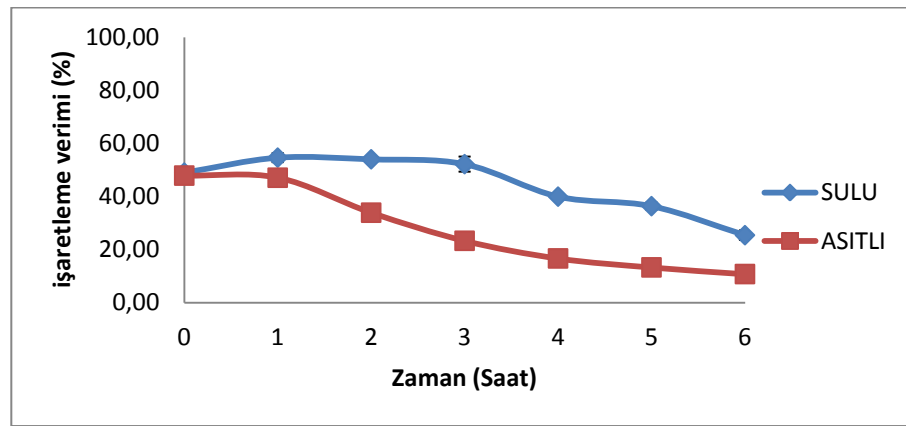
Asitli ortamda çözünen farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında 15 dakikalık inkübasyondan sonra yapılan ölçümlerde formülasyonda kullanılan Kalay Klorür miktarı arttıkça kompleks oranının arttığı, serbest Teknesyum oranının azaldığı gözlemlendi.



Şekil 29 : Asitli ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında stabilite testi sonunda (6. saat) kompleks, İ-H-Teknesyum ve serbest Teknesyum (%) miktarları.

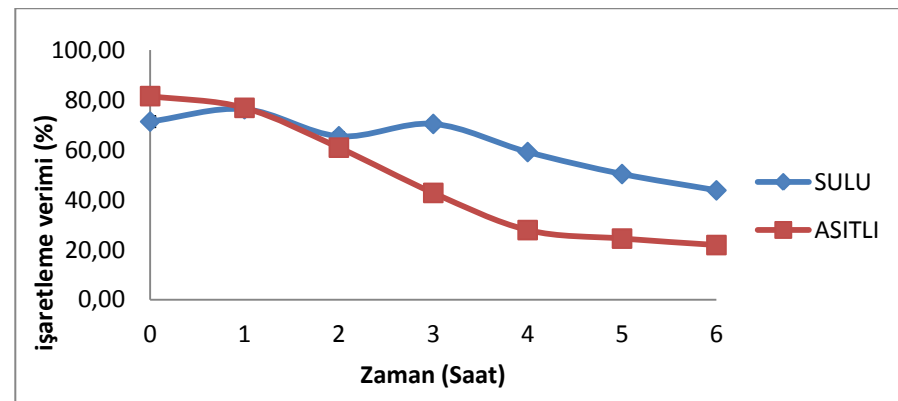
Asitli ortamda çözünen farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarında 6. saat sonunda formülasyonda kullanılan Kalay Klorür miktarı arttıkça kompleks oranının arttığı, serbest Teknesyum oranının azaldığı gözlemlendi.

Aynı miktarda Kalay Klorür'ün farklı çözümlerde çözündürülmesiyle hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığındaki ($25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) stabiliteleri Şekil 30 – Şekil 35'te verildi.



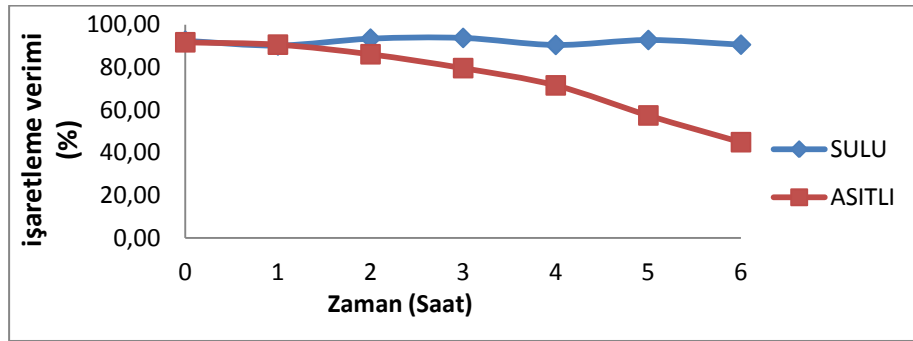
Şekil 30 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,001 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,001 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının her ikisinin de stabil olmadığı gözlemlendi. Aralarında anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).



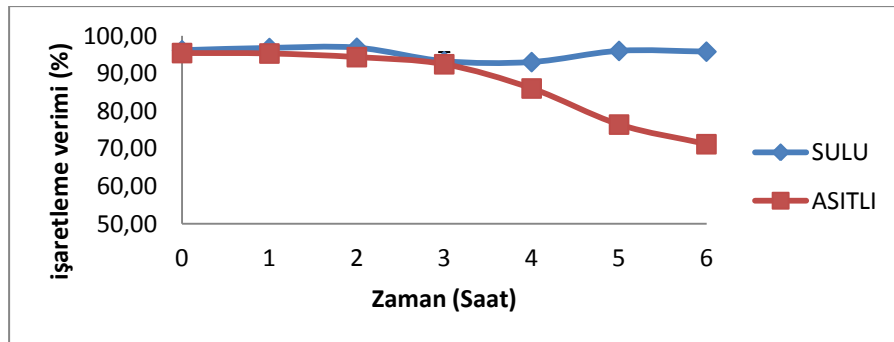
Şekil 31 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun 6. saatteki (%) işaretleme veriminin daha yüksek olduğu fakat her iki formülasyonun da stabil olmadığı gözlemlendi. Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,0025 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).



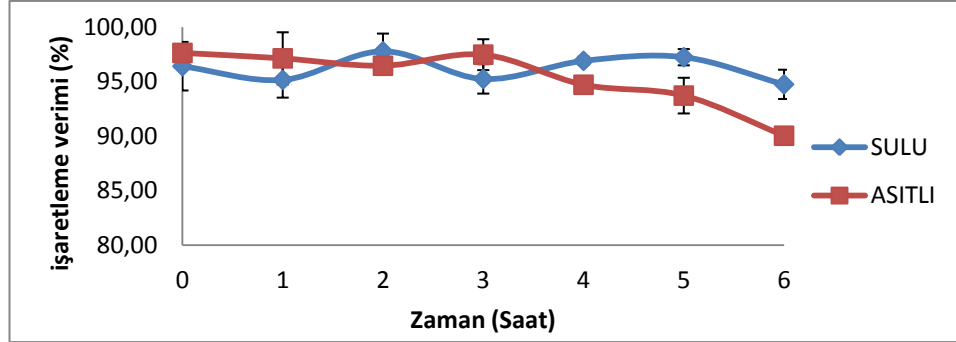
Şekil 32 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,005 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,005 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun stabil olmadığı, sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun ise 6. saat sonunda ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleks (%) oranının 90,70'te kaldığı gözlemlendi. Formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel fark olduğu görüldü ($p<0,05$).



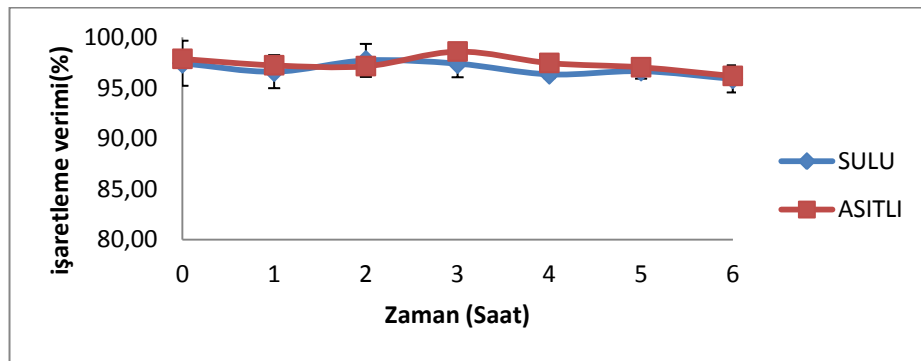
Şekil 33 : Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,01 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözülmüş 0,01 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından sulu ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun 6 saatlik stabilite testi sonunda daha stabil olduğu gözlemlendi. Yapılan analizde formülasyonların stabilitesi arasında istatistiksel fark olduğu görüldü ($p<0,05$).



Şekil 34 : Asitli ve sulu ortamda çözülmüş 0,02 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözülmüş 0,02 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından sulu ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun 6. saat sonunda % 94,75 ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleksi içerdiği, asitli ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonun ise 6. saat sonunda % 90,04 ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleksi içerdiği gözlemlendi. Formülasyonların stabilitesi arasında istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).



Şekil 35 : Asitli ve sulu ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Asitli ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının her ikisinin de stabil olduğu gözlemlendi. Formülasyonların stabilitesi arasında istatistiksel fark olmadığı görüldü ($p>0,05$).

3.2.5 ^{99m}Tc Aktivitesinin İşaretleme Verimine Etkisi

Formülasyonlarda aktivitenin etkisi incelenirken yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmalarına ait sonuçlar Tablo 18 ve Tablo 19’da verildi.

Tablo 18 : Farklı aktivitede $\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$, sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit’in işaretleme veriminden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

$\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$ (mCi)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
1	$1,14 \pm 0,46$	$2,98 \pm 0,29$	$95,88 \pm 0,38$
2	$25,99 \pm 1,32$	$3,32 \pm 1,49$	$70,69 \pm 2,81$
5	$37,08 \pm 0,41$	$1,70 \pm 0,86$	$61,22 \pm 0,75$

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Tablo 19 : Farklı aktivitede $\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$, asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,5 mg Zoledronik Asit kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit’in işaretleme veriminden 6 saat sonra yapılan radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

$\text{Na-}^{99m}\text{TcO}_4$ (mCi)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
1	$1,06 \pm 0,13$	$2,77 \pm 0,65$	$96,17 \pm 0,60$
2	$1,09 \pm 0,19$	$2,93 \pm 0,90$	$95,98 \pm 0,76$
5	$16,78 \pm 1,12$	$3,36 \pm 1,27$	$79,86 \pm 2,39$

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

3.2.6 Farklı Aktivitede ^{99m}Tc ile İşaretlenen ^{99m}Tc -Zoledronik Asit

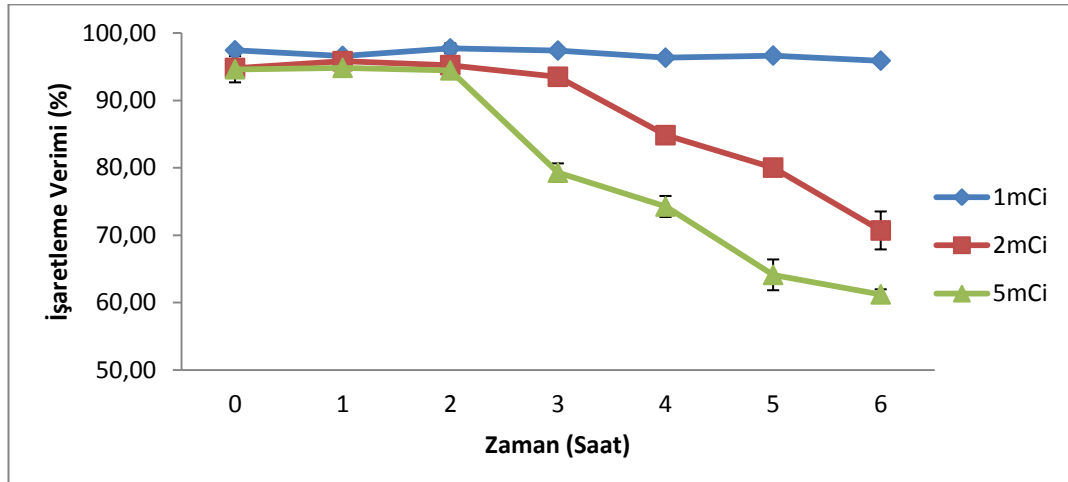
Formülasyonlarının Stabilitesi

Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda ^{99m}Tc aktivitesinin işaretleme verimine etkisi incelenirken elde edilen oda sıcaklığında yapılan 6 saatlik stabilite testi verileri Tablo 20 ve Şekil 36’da verildi.

Tablo 20 : Farklı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)		
	^{99m}Tc aktivitesi (mCi)		
	1	2	5
Başlangıç	97,42±0,27	94,79±0,97	94,61±1,95
1.	96,59±0,24	95,80±0,63	94,82±0,33
2.	97,70±0,74	95,21±0,56	94,45±0,66
3.	97,38±0,42	93,49±0,70	79,27±1,36
4.	96,33±0,36	84,83±1,03	74,25±1,56
5.	96,64±0,26	80,02±0,36	64,11±2,28
6.	95,88±0,38	70,69±2,81	61,22±0,75

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.



Şekil 36 : Farklı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi.

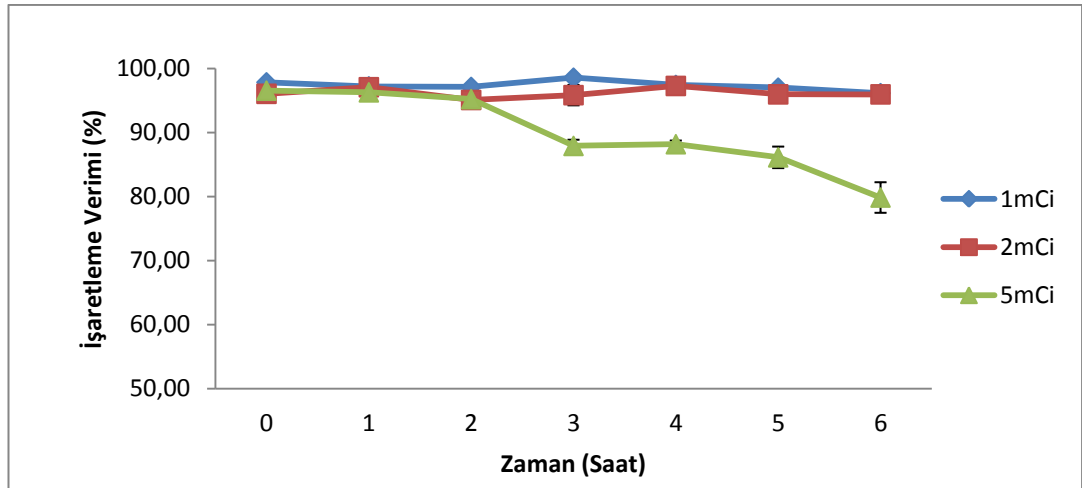
^{99m}Tc aktivitesinin işaretleme verimine etkisi araştırılırken yapılan stabilite testlerinde, sulu ortamda hazırlanan 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen 1 mCi aktiviteli ^{99m}Tc kullanılarak işaretlenen formülasyonun stabil olduğu, 2 mCi ve 5 mCi kullanılarak işaretlenen formülasyonların ise işaretleme veriminin 2. saatten sonraki ölçümlerde giderek azaldığı gözlemlendi.

Asitli ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların 6 saatlik in vitro stabilitesine ait veriler Tablo 21 ve Şekil 37’de verildi

Tablo 21 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların oda sıcaklığında 6 saatlik in vitro stabilitesi

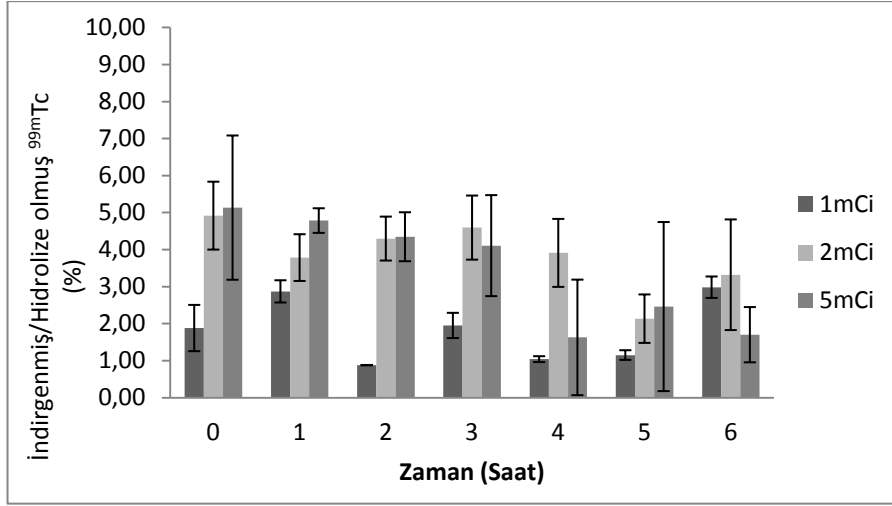
Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)		
	^{99m}Tc aktivitesi (mCi)		
	1	2	5
Başlangıç	97,86±0,32	96,07±0,13	96,57±0,21
1.	97,23±0,72	97,10±0,36	96,30±1,15
2.	97,14±0,41	95,11±0,30	95,23±1,14
3.	98,59±0,19	95,86±1,59	87,93±0,97
4.	97,45±0,41	97,30±0,29	88,19±0,58
5.	97,03±0,28	95,98±0,29	86,14±1,68
6.	96,17±0,60	95,98±0,76	79,86±2,39

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

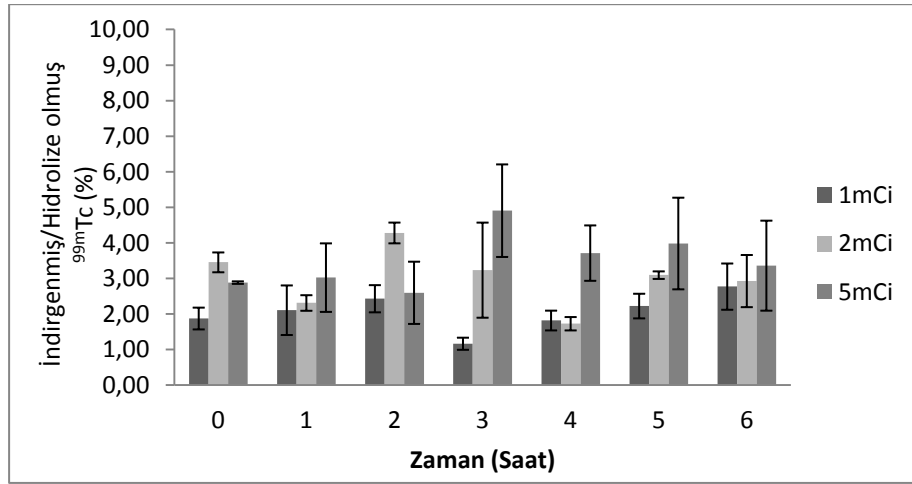


Şekil 37 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonların 6 saatlik in vitro stabilitesi

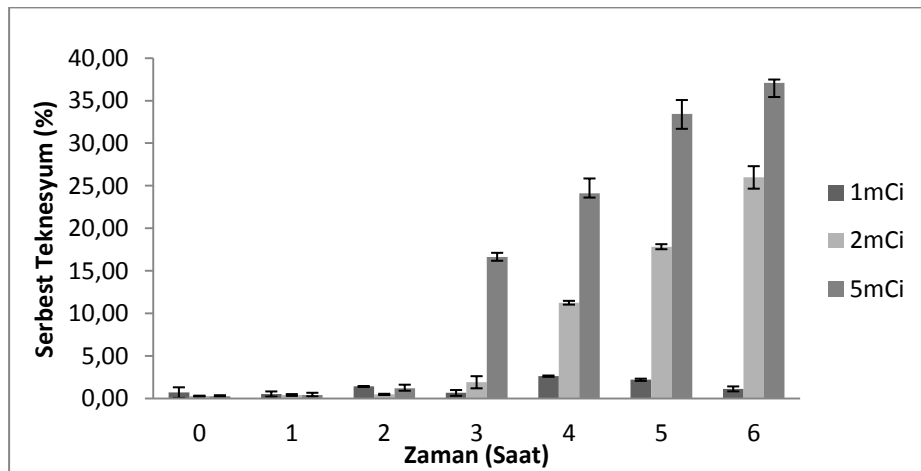
Asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen 1 mCi ve 2 mCi kullanılarak işaretlenen formülasyonun oda sıcaklığında 6 saat boyunca stabil olduğu, 5 mCi aktivite kullanılarak işaretleme yapıldığında ise formülasyonun işaretleme veriminin 2. saatten sonra giderek azaldığı gözlemlendi.



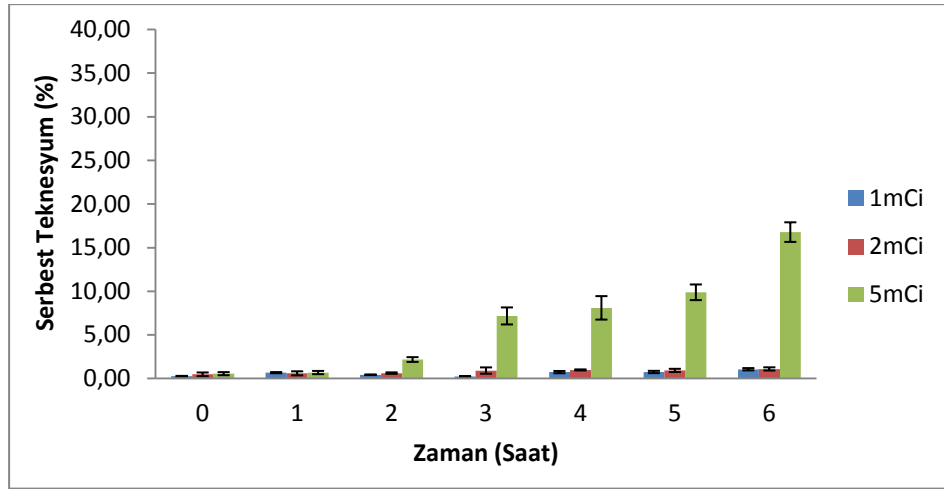
Şekil 38 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları



Şekil 39 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan İ-H-Teknesyum (%) miktarları



Şekil 40 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları

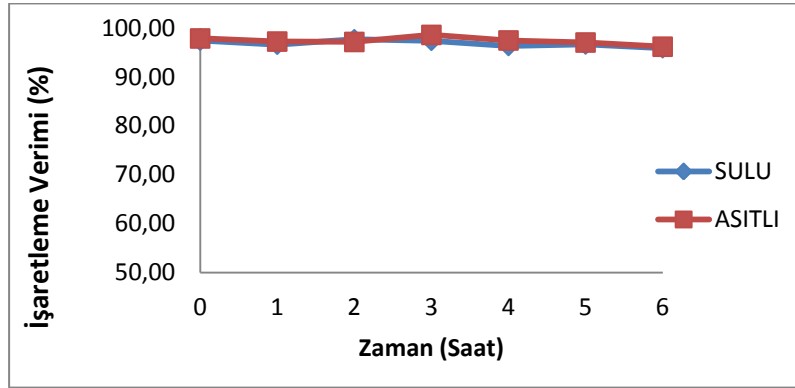


Şekil 41 : Farklı miktarlarda ^{99m}Tc ile işaretlenen asitli ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda bulunan serbest Teknesyum (%) miktarları.

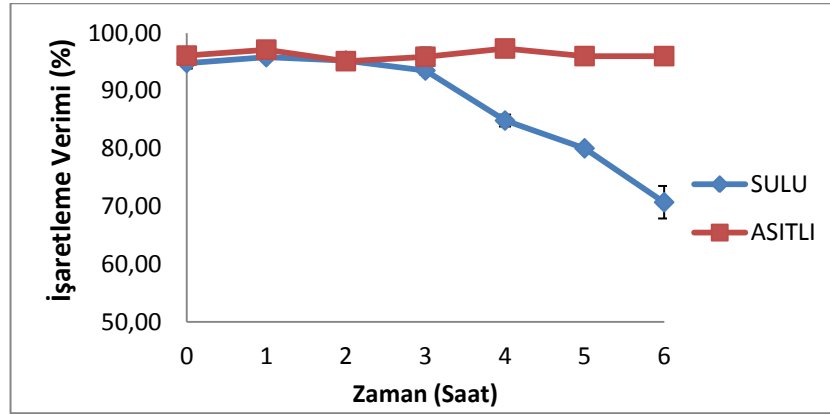
Farklı ortamlarda çözündürülerek hazırlanan Kalay Klorür ile indirgenen Teknesyum'un aktivitesinin formülasyonun stabilitesine etkisi araştırılırken yapılan çalışmalarda, sulu ortamda çözündürülerek hazırlanmış Kalay Klorür kullanılan formülasyonlardan 2 mCi ve 5 mCi aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenenlerde serbest Teknesyum (%) miktarının zamanla arttığı gözlemlendi. Asitli ortamda çözündürülen Kalay Klorür ile hazırlanan formülasyonlarda ise 1 mCi ve 2 mCi aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonlarda serbest Teknesyum oranının zamanla artmadığı, 5 mCi ile işaretlenen formülasyonda ise serbest Teknesyum oranının zamanla arttığı, fakat bu artışın sulu ortamda çözündürülen Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan ve 5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyon kadar fazla olmadığı görüldü. 0,1 N HCl'de çözündürülmüş Kalay Klorür ile indirgenmiş 5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonda serbest Teknesyum miktarı stabilite testi sonunda % 16,78 iken, sulu ortamda çözündürülmüş Kalay Klorür ile indirgenmiş 5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonda serbest Teknesyum miktarının stabilite testi sonunda %37,08 olduğu gözlemlendi.

Aynı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların stabilitelerinin, indirgeyici ajanın asitli ortamda veya sulu ortamda çözünmüş olmasına göre

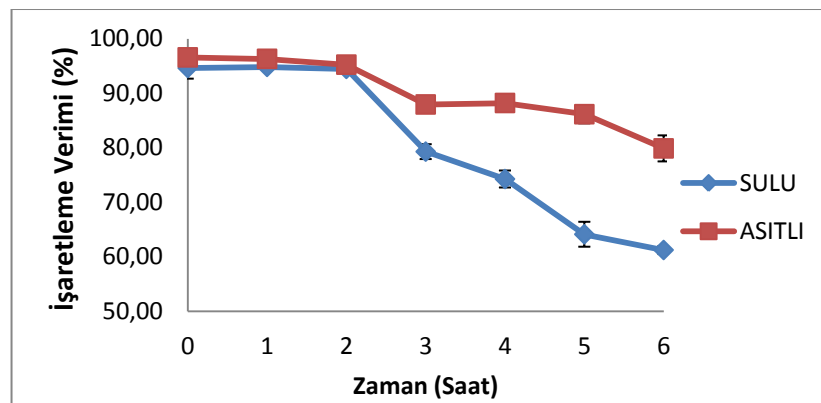
karşılaştırıldığı grafikler aşağıda Şekil 42, Şekil 43 ve Şekil 44'te verildi.



Şekil 42 : 1 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.



Şekil 43 : 2 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.



Şekil 44 : 5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların oda sıcaklığındaki 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Aynı aktiviteli ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonlardan, indirgeyici ajan olarak asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür kullanılanların, sulu ortamda

             0,04 mg Kalay Klorür kull  n  lanlara göre daha yüksek verimle i  aretlendiğ  gözlendi. 1 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonların her ikisinin de stabil olduğ , asitli ortamda              Kalay Klorür ile işaretlenen formülasyonların 6. saatteki işaretleme veriminin ortalama % 96,17, sulu ortamda              Kalay Klorür ile işaretlenen formülasyonların 6. Saatteki işaretleme veriminin ortalama % 95,88 olduğ  gözlendi. 1 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (p>0,05).

2 mCi ve 5 mCi ile işaretlenen formülasyonlardan, indirgeyici ajan olarak kull  n  lan Kalay Klorür'  n asitli ortamda              formülasyonların, sulu ortamda              formülasyonlara göre stabilite testinin son saatlerinde daha yüksek işaretleme verimi g  sterdiğ  gözlendi. 2 mCi ile işaretlenen asitli ve sulu ortamda            Kalay Klorür içeren formülasyonların stabilitesi arasında istatistiksel fark olduğ  bulundu (p<0,05). Yapılan istatistik analizde 5 mCi ile işaretlenen asitli ve sulu ortamda            Kalay Klorür içeren formülasyonların stabiliteleri arasında da istatistiksel fark olduğ  gözlendi (p<0,05).

3.2.7 Askorbik Asit Miktarının    aretleme Verimine Etkisi

Formülasyonlarda kull  n  lan 0,5 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda              0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve Askorbik Asit'in değ i  ik miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 22'de gösterildi.

Tablo 22 : 0,5 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Askorbik Asit (μg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
0	1,06 $\pm$ 0,13	2,77 $\pm$ 0,65	96,17 $\pm$ 0,60
5	0,45 $\pm$ 0,14	3,11 $\pm$ 0,06	96,45 $\pm$ 0,19
25	0,60 $\pm$ 0,08	2,80 $\pm$ 0,25	96,60 $\pm$ 0,17
50	1,43 $\pm$ 0,68	1,95 $\pm$ 0,48	96,62 $\pm$ 0,47

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Formülasyonlarda kullanılan 0,5 mg Zoledronik Asit, sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve Askorbik Asit'in değişik miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 23'te gösterildi.

Tablo 23 : 0,5 mg Zoledronik Asit, sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Askorbik Asit (μg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
0	1,14 $\pm$ 0,46	2,98 $\pm$ 0,29	95,88 $\pm$ 0,38
5	0,65 $\pm$ 0,13	3,30 $\pm$ 1,31	96,05 $\pm$ 1,18
25	0,81 $\pm$ 0,28	2,91 $\pm$ 0,07	96,28 $\pm$ 0,21
50	0,42 $\pm$ 0,15	2,71 $\pm$ 0,30	96,87 $\pm$ 0,27

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Formülasyonlarda kullanılan 0,05 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve Askorbik Asit'in değişik miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 24'te gösterildi.

Tablo 24 : 0,05 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Askorbik Asit (μg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
0	43,84 $\pm$ 1,54	2,62 $\pm$ 0,45	53,54 $\pm$ 1,84
5	1,84 $\pm$ 1,77	2,43 $\pm$ 0,25	95,73 $\pm$ 2,00
25	1,08 $\pm$ 0,28	2,84 $\pm$ 0,41	96,08 $\pm$ 0,51
50	0,68 $\pm$ 0,11	3,15 $\pm$ 0,50	96,17 $\pm$ 0,43

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Formülasyonlarda kullanılan 0,05 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve Askorbik Asit'in değişik miktarları için oluşan işaretleme verimleri Tablo 25'te gösterildi.

Tablo 25 : 0,05 mg Zoledronik Asit, sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür, 1 mCi ^{99m}Tc ve farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflık kontrolü çalışmasına ait sonuçlar.

Askorbik Asit (μg)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
0	25,94 $\pm$ 3,31	4,33 $\pm$ 1,23	69,74 $\pm$ 2,13
5	1,44 $\pm$ 0,24	6,24 $\pm$ 1,18	92,32 $\pm$ 1,41
25	1,04 $\pm$ 0,27	4,19 $\pm$ 0,36	94,78 $\pm$ 0,21
50	0,88 $\pm$ 0,07	3,33 $\pm$ 0,11	95,79 $\pm$ 0,12

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

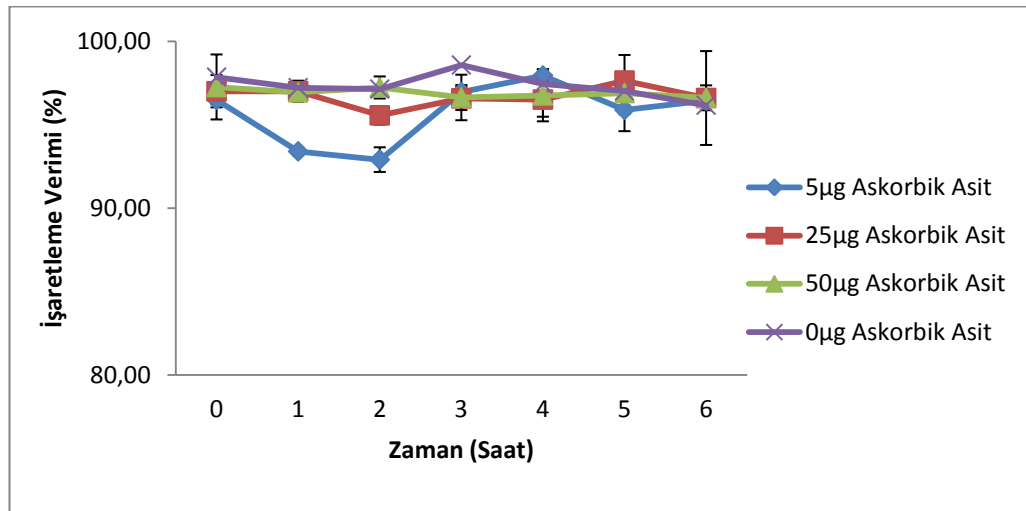
3.2.8 Farklı Askorbik Asit Miktarları ile Hazırlanan Formülasyonların Stabilitesi

0,5 mg Zoledronik Asit içeren formülasyonların stabilitesi üzerine Askorbik Asit'in etkisine ait veriler Tablo 26, Tablo 27 ve Şekil 48'de gösterildi. Hazırlanan formülasyonlardaki İ-H-Teknesyum (%) miktarları Şekil 46 ve Şekil 49'da, serbest Teknesyum (%) miktarları Şekil 47 ve Şekil 50'de verildi.

Tablo 26 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

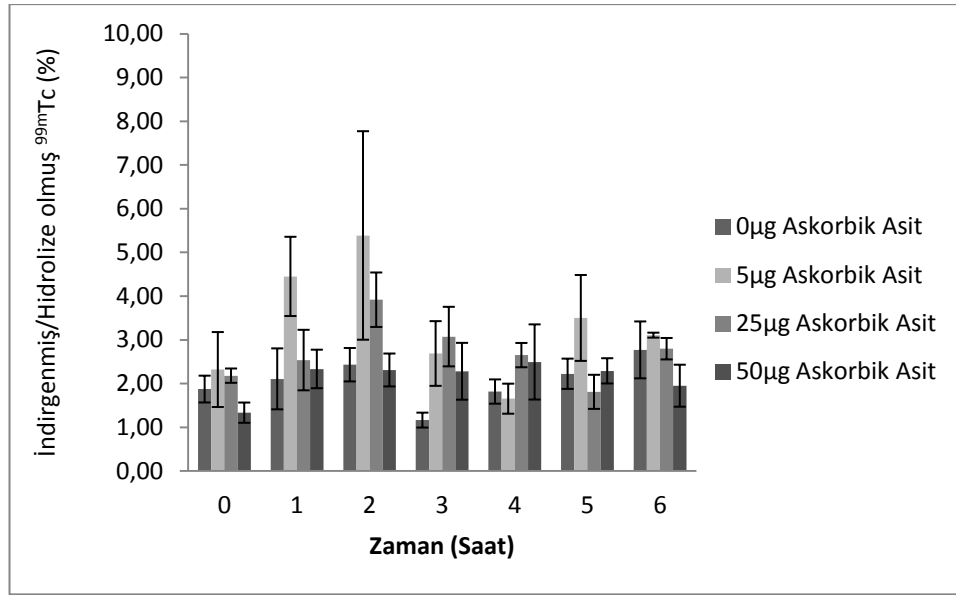
Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)			
	Askorbik Asit Miktarı (μg)			
	Askorbik Asitsiz	5	25	50
Başlangıç	97,86±0,32	96,50±0,86	97,01±0,51	97,27±0,59
1.	97,23±0,72	93,41±0,75	97,01±0,75	96,94±0,29
2.	97,14±0,41	92,91±2,70	95,57±0,65	97,24±0,32
3.	98,59±0,19	96,96±0,74	96,58±0,69	96,64±0,53
4.	97,45±0,41	97,95±0,40	96,51±0,35	96,77±0,85
5.	97,03±0,28	95,89±1,05	97,65±0,51	96,90±0,49
6.	96,17±0,60	96,45±0,19	96,60±0,17	96,62±0,47

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

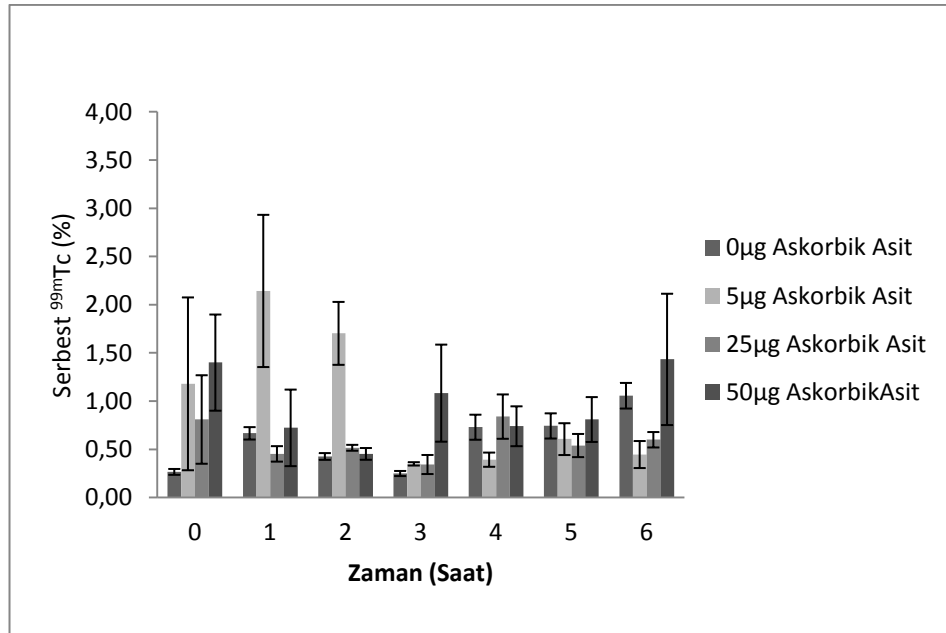


Şekil 45 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Hazırlanan bu formülasyonlarda oda sıcaklığında (25 ± 3 C°) yapılan stabilite testleri sonunda Askorbik Asit kullanılmadan hazırlanan formülasyonun işaretleme veriminin %96,17 olduğu, Askorbik Asit'in artan miktarlarının 6. saat sonundaki işaretleme verimini %0,45'lik artışla %96,62'ye kadar arttırdığı gözlemlendi.



Şekil 46 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.

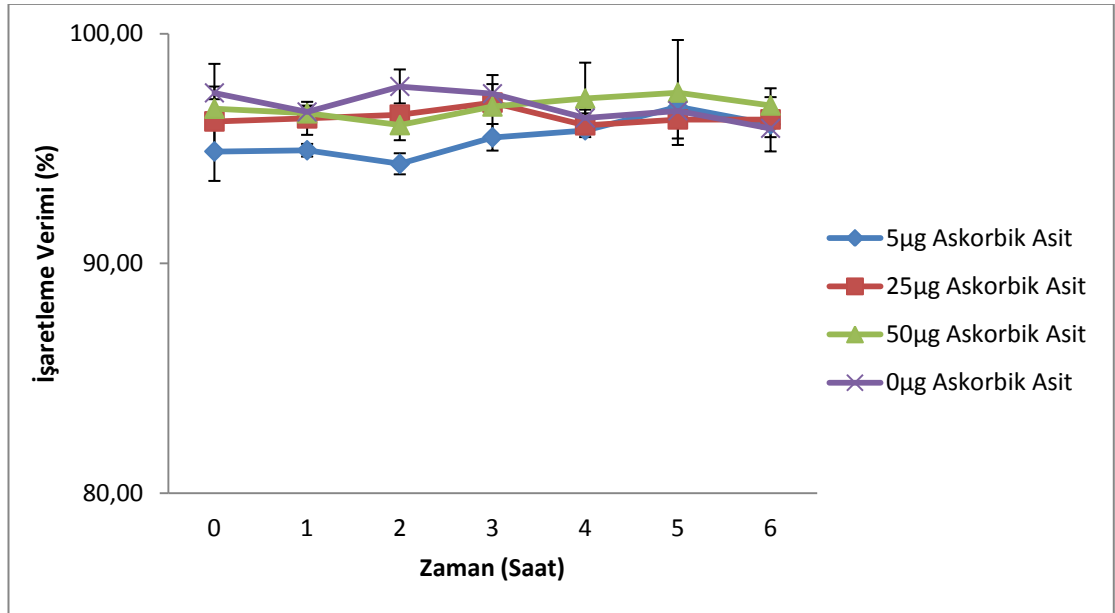


Şekil 47 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.

Tablo 27 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)			
	Askorbik Asit Miktarı (μg)			
	Askorbik Asitsiz	5	25	50
Başlangıç	97,42 $\pm$ 0,27	94,87 $\pm$ 1,29	96,18 $\pm$ 0,36	96,73 $\pm$ 0,84
1.	96,59 $\pm$ 0,24	94,92 $\pm$ 0,28	95,31 $\pm$ 0,72	96,53 $\pm$ 0,34
2.	97,70 $\pm$ 0,74	94,33 $\pm$ 0,46	96,47 $\pm$ 0,32	96,02 $\pm$ 1,97
3.	97,38 $\pm$ 0,42	95,49 $\pm$ 0,58	97,00 $\pm$ 0,29	96,83 $\pm$ 0,51
4.	96,33 $\pm$ 0,36	95,79 $\pm$ 0,04	96,01 $\pm$ 0,52	97,17 $\pm$ 0,54
5.	96,64 $\pm$ 0,26	96,82 $\pm$ 0,08	96,27 $\pm$ 0,83	97,44 $\pm$ 0,42
6.	95,88 $\pm$ 0,38	96,05 $\pm$ 1,18	96,26 $\pm$ 0,34	96,87 $\pm$ 0,27

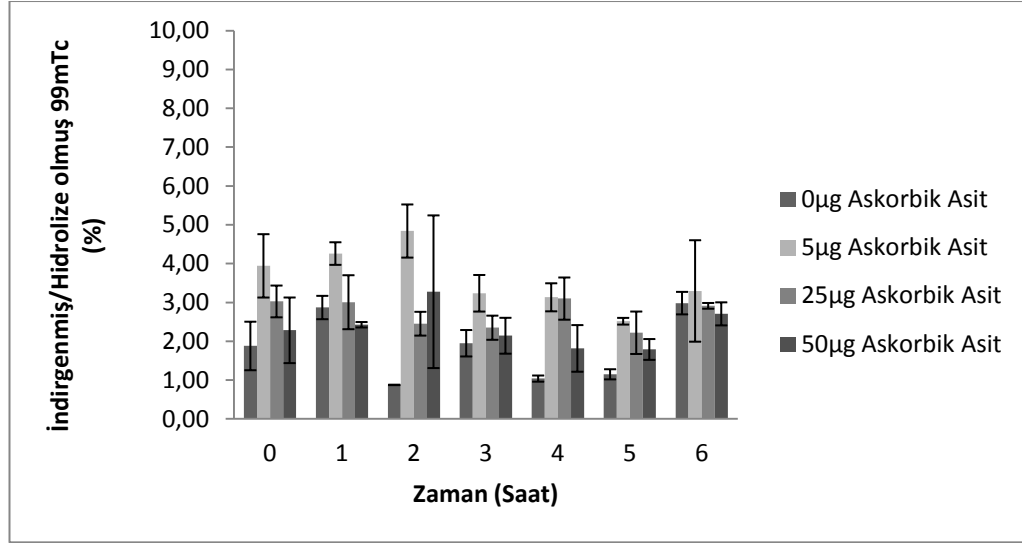
Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.



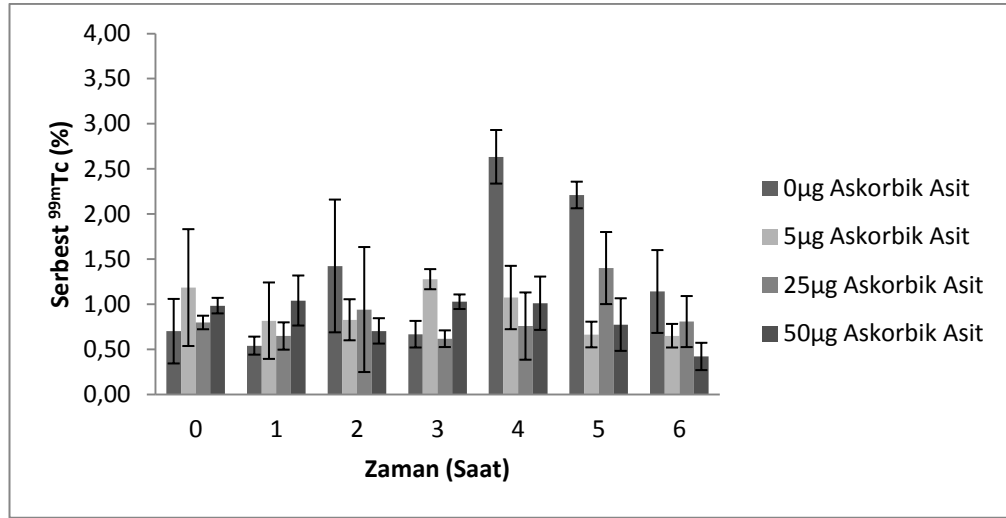
Şekil 48 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Sulu ortamda çözölmüş Kalay Klorür kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda oda sıcaklığında ($25\pm3\text{ }^{\circ}\text{C}$) yapılan stabilite testleri sonunda Askorbik Asit kullanılmayan formülasyonda işaretleme veriminin %95,88 olduğu, Askorbik Asit'in

artan miktarlarının kullanıldığı formülasyonlarda 6. saat sonundaki işaretleme veriminin %96,87'ye kadar çıktığı gözlemlendi.



Şekil 49 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür içeren ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.



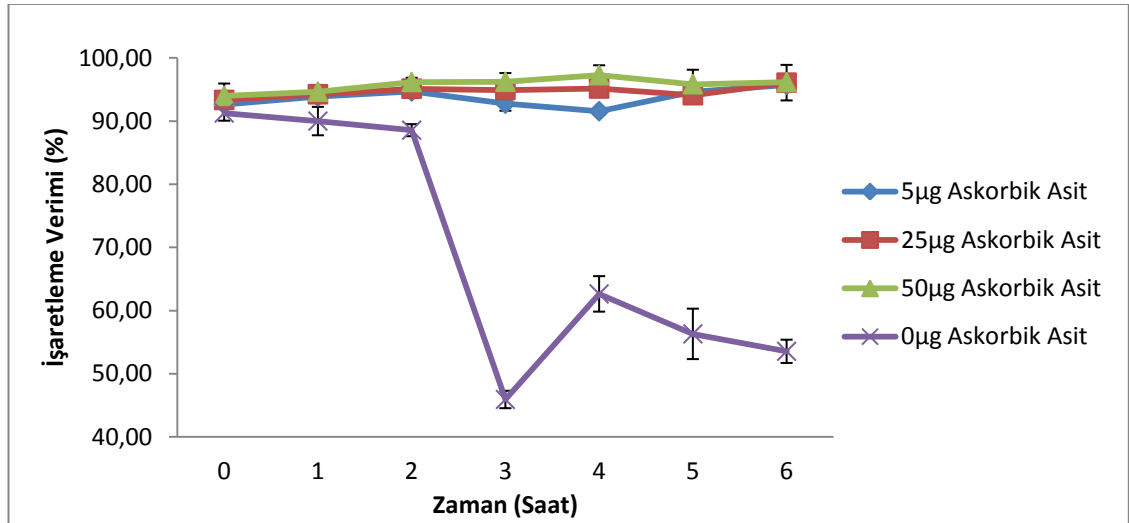
Şekil 50 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,5 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.

Asitli ortamda çözündürülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan ve 0,05 mg Zoledronik Asit içeren formülasyonlarda Askorbik Asit'in etkisi araştırılırken elde edilen veriler Tablo 28, Şekil 51, Şekil 52 ve Şekil 53'te gösterildi.

Tablo 28 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)			
	Askorbik Asit Miktarı (μg)			
	Askorbik Asitsiz	5	25	50
Başlangıç	91,27 $\pm$ 1,22	92,64 $\pm$ 2,08	93,34 $\pm$ 0,42	93,99 $\pm$ 0,96
1.	90,00 $\pm$ 2,25	93,89 $\pm$ 0,06	94,25 $\pm$ 0,44	94,66 $\pm$ 0,41
2.	88,56 $\pm$ 0,95	94,69 $\pm$ 1,25	95,12 $\pm$ 0,57	96,19 $\pm$ 0,30
3.	45,92 $\pm$ 1,38	92,76 $\pm$ 0,13	94,92 $\pm$ 1,12	96,23 $\pm$ 0,46
4.	62,63 $\pm$ 2,81	91,56 $\pm$ 1,89	95,15 $\pm$ 0,60	97,27 $\pm$ 0,35
5.	56,30 $\pm$ 3,99	94,65 $\pm$ 2,26	94,09 $\pm$ 0,57	95,84 $\pm$ 0,54
6.	53,34 $\pm$ 1,84	95,73 $\pm$ 2,00	96,08 $\pm$ 0,51	96,17 $\pm$ 0,43

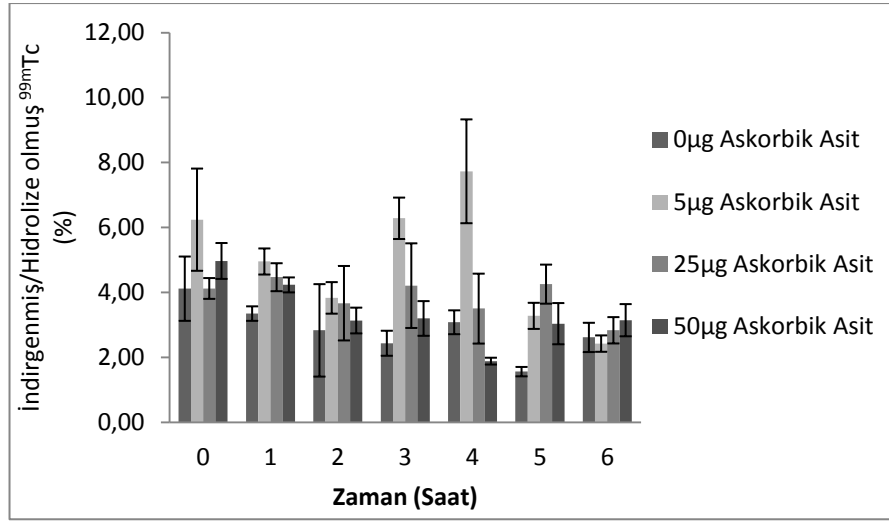
Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.



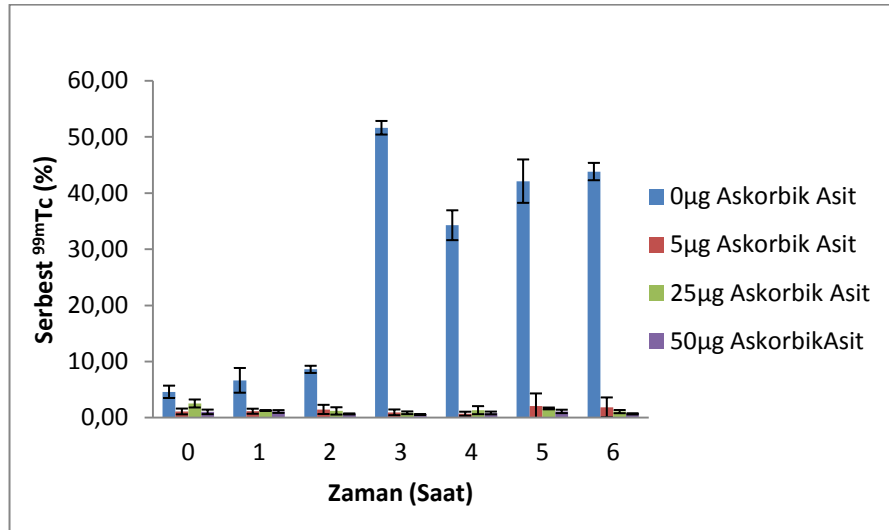
Şekil 51 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarından Askorbik Asit kullanılmadan hazırlanan formülasyonun stabil olmadığı ve işaretleme veriminin stabilite testi sonunda %53,34'e düştüğü, 0,005 mg, 0,025 mg ve 0,05 mg Askorbik

Asit eklenerek hazırlanan formülasyonların ise stabil olduğu ve artan Askorbik Asit miktarıyla 6. saatteki işaretleme veriminin de arttığı gözlemlendi.



Şekil 52 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.



Şekil 53 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve asitli ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.

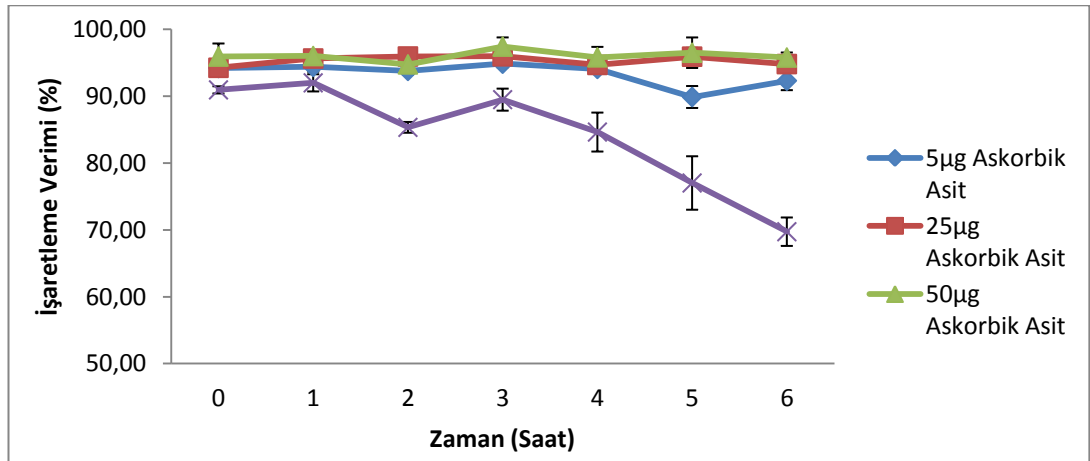
Askorbik Asit kullanılmadan hazırlanan formülasyonda serbest Teknesyum miktarının ilk saatlerden sonra arttığı, Askorbik Asit kullanılan formülasyonlarda ise serbest Teknesyum miktarında bu oranda bir artış olmadığı yapılan stabilite testlerinde gözlemlendi.

Sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit içeren formülasyonlarda Askorbik Asit'in stabiliteye etkisi araştırılırken bulunan veriler Tablo 29, Şekil 54, Şekil 55 ve Şekil 56'da sunuldu.

Tablo 29 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)			
	Askorbik Asit Miktarı (µg)			
	Askorbik Asitsiz	5	25	50
Başlangıç	90,95±0,54	94,22±0,30	94,25±0,87	95,94±0,87
1.	92,00±1,28	94,39±0,72	95,64±1,07	96,02±0,69
2.	85,34±0,81	93,79±0,56	95,94±0,55	94,76±0,26
3.	89,49±1,65	94,87±0,53	95,97±0,45	97,43±0,59
4.	84,64±2,91	94,08±0,65	94,68±1,22	95,82±0,25
5.	77,02±4,00	89,88±1,64	95,92±1,32	96,51±0,12
6.	69,74±2,13	92,32±1,41	94,81±0,47	95,79±0,12

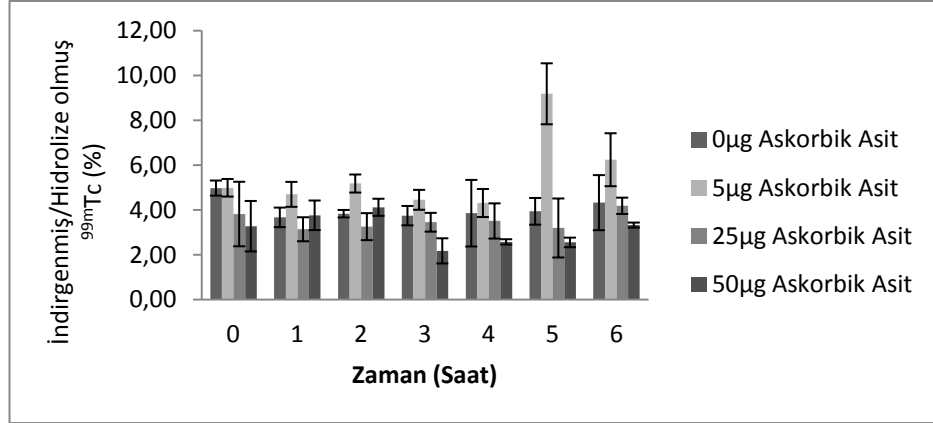
Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.



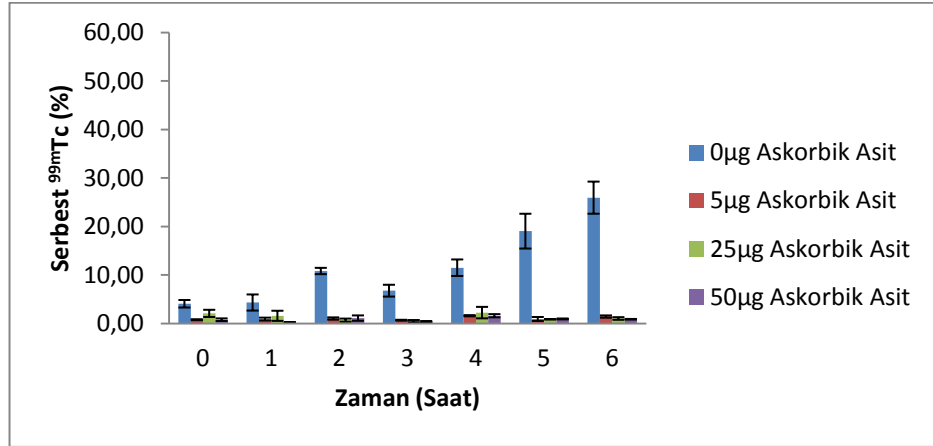
Şekil 54 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının 6 saatlik in vitro stabilitesi.

0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının Askorbik Asit

kullanılmadığı zaman stabil olmadığı gözlemlendi. Bu formülasyona ait işaretleme verimi 15 dakikalık inkübasyon sonrası ortalama % 90,95 iken stabilite testi sonunda % 69,74 olarak bulundu. 0,005 mg, 0,025 mg ve 0,05 mg Askorbik Asit eklenerek hazırlanan formülasyonların ise stabil olduğu ve Askorbik Asit'in artan miktarıyla 6. saatteki işaretleme veriminin de arttığı belirlendi.



Şekil 55 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği İ-H-Teknesyum (%) miktarları.



Şekil 56 : Farklı Askorbik Asit miktarları ile hazırlanan, 0,05 mg Zoledronik Asit ve sulu ortamda çözündürülmüş 0,004 mg Kalay Klorür ve 1 mCi ^{99m}Tc içeren ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonlarının içerdiği serbest Teknesyum (%) miktarları.

Oda sıcaklığında (25 ± 3 C°) yapılan stabilite testlerinde Askorbik Asit kullanılmadan hazırlanan formülasyonda serbest Teknesyum miktarının ilk

saatlerden sonra arttığı, Askorbik Asit kullanılan formülasyonlarda ise serbest Teknesyum miktarında bu oranda bir artış olmadığı gözlemlendi.

3.2.9 pH'ın İşaretleme Verimine Etkisi

Bölüm 2.3.5’de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalarda pH değerinin stabiliteye etkisi incelenirken elde edilen sonuçlar Tablo 30 ve Tablo 31’de ortalama değer $\pm$ standart sapma olarak gösterildi.

Tablo 30 : Farklı pH'lardaki Zoledronik Asit formülasyonlarının radyokimyasal saflık kontrolü çalışmalarına ait sonuçlar.

pH	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
5,85	0,94 $\pm$ 0,43	2,27 $\pm$ 0,98	96,79 $\pm$ 1,26
6,25	1,14 $\pm$ 0,24	3,00 $\pm$ 0,15	95,86 $\pm$ 0,26
7,4	1,25 $\pm$ 0,25	2,92 $\pm$ 0,45	95,84 $\pm$ 0,54

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Tablo 31 : pH'ın işaretleme verimine etkisi.

Zoledronik Asit (mg)	Kalay Klorür (mg)	^{99m}Tc (mCi)	0,1 M NaOH Miktarı (μL)	Askorbik Asit (mg)	pH	Ortalama İşaretleme Verimi (%)
0,05	0,04	3	-	0,005	5,85	96,79 $\pm$ 1,26
0,05	0,04	3	100	0,005	6,25	95,86 $\pm$ 0,26
0,05	0,04	3	180	0,005	7,4	95,84 $\pm$ 0,54

Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

3.2.10 pH'ın Stabilite Üzerindeki Etkisi

Kalay Klorür’ün etkisi araştırılırken hazırlanan formülasyonların pH değerleri ve stabiliteleri Tablo 32 ve Tablo 33’te verildi.

Tablo 32 : Sulu ortamda çözünmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan formülasyonların pH değerleri ve stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)					
	Kalay Klorür Miktarı (µg)					
	1	2,5	5	10	20	40
Başlangıç	48,97±2,03	71,38±2,23	92,51±1,35	96,13±0,87	96,41±1,19	97,42±0,27
1.	54,61±1,70	76,36±1,63	90,31±2,31	96,73±0,67	95,16±2,02	96,59±0,24
2.	53,99±0,79	65,50±1,63	93,53±1,90	96,81±0,42	97,77±0,61	97,70±0,74
3.	52,17±2,84	70,44±1,35	93,87±1,29	93,22±2,45	95,24±2,88	97,38±0,42
4.	39,93±0,89	59,18±0,37	90,57±2,49	92,99±0,38	92,90±0,84	96,33±0,36
5.	36,34±1,34	50,36±0,75	92,89±0,52	95,96±0,43	97,23±0,48	96,64±0,26
6.	25,41±1,79	43,83±1,34	90,70±1,45	95,76±0,20	94,75±1,18	95,88±0,38
pH	7,74	7,70	7,67	7,55	7,47	7,45

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Tablo 33 : Asitli ortamda çözülmüş farklı Kalay Klorür miktarları ile hazırlanan formülasyonların pH değerleri ve stabilitesi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)					
	Kalay Klorür Miktarı (µg)					
	1	2,5	5	10	20	40
Başlangıç	47,86±2,75	81,59±0,87	91,82±0,43	95,39±0,14	97,63±0,32	97,86±0,32
1.	47,05±2,82	76,88±2,39	90,71±0,54	95,28±1,14	97,13±0,17	97,23±0,72
2.	33,88±2,06	60,93±0,37	86,20±0,79	94,31±0,66	96,45±0,29	97,14±0,41
3.	23,30±1,53	42,80±1,42	76,69±0,07	92,08±0,88	97,47±0,68	98,59±0,19
4.	16,66±0,77	27,90±0,53	71,59±1,90	85,98±0,41	94,71±0,31	97,45±0,41
5.	13,28±0,95	24,49±1,64	57,48±1,05	76,38±0,12	93,71±0,45	97,03±0,28
6.	10,77±0,15	21,91±0,77	44,93±1,73	71,17±1,43	90,04±1,72	96,17±0,60
pH	7,7	7,92	7,42	6,82	5,39	4,36

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.

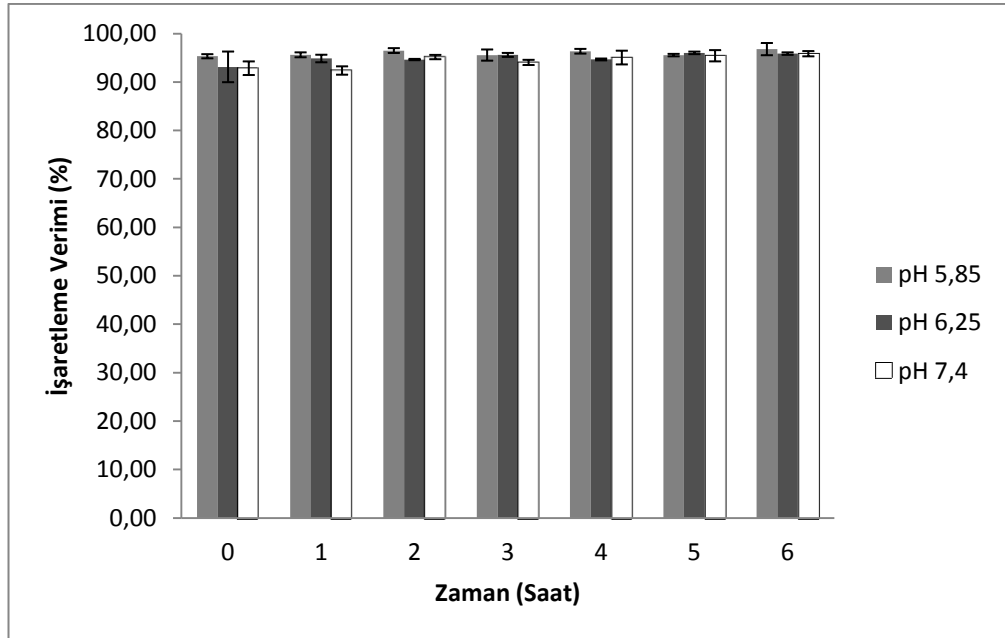
Yapılan çalışmalarda en düşük pH değeri 0,04 mg Kalay Klorür içeren formülasyonda görüldü. pH değerinin Kalay Klorür'ün çözüldüğü çözgenin 0,1 N HCl olması sebebiyle düştüğü ve bu formülasyonda bulunan Kalay Klorür miktarının ^{99m}Tc'i indirgemeye yettiği için formülasyonun stabil olduğu gözlemlendi.

0,1 M NaOH çözeltisi kullanılarak pH'ı ayarlanan çözeltilere ait stabilite verileri Tablo 34 ve Şekil 57'de verildi.

Tablo 34 : pH'ın stabiliteye etkisi.

Zaman (Saat)	Ortalama İşaretleme Verimi (%)		
	pH		
	5,85	6,25	7,4
Başlangıç	95,31±0,42	93,12±3,16	92,84±1,41
1.	95,61±0,51	94,85±0,87	92,37±0,86
2.	96,49±0,50	94,63±0,14	95,15±0,45
3.	95,56±1,15	95,59±0,41	94,04±1,42
4.	96,35±0,48	94,65±0,19	95,04±1,42
5.	95,55±0,25	96,01±0,26	95,41±1,16
6.	96,79±1,26	95,86±0,26	95,84±0,54

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=3) olarak verildi.



Şekil 57 : pH'ın stabiliteye etkisi.

0,1 M NaOH kullanılarak pH ayarı yapılan çalışmalarda formülasyonun pH değerinin stabilite üzerinde belirgin bir fark yaratmadığı gözlemlendi.

3.3 *İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Formülasyona Ait*

Bulgular

Yapılan çalışmalar sonucunda Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesinde optimum olarak belirlenen formülasyona ait madde miktarları; 0,05 mg Zoledronik Asit, 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit ve 3 mCi ^{99m}Tc olarak bulundu. ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleksinin işaretleme veriminin %96'nın üzerinde olduğu ve oda sıcaklığında ($25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) 6 saat boyunca stabil olduğu görüldü. Optimum formülasyonun radyokimyasal saflık kontrolüne ve 6 saatlik in vitro stabilite çalışmasına ait sonuçlar Tablo 35'te verildi .

Tablo 35 : İn vivo çalışmada kullanılmaya uygun görülen formülasyonun 6 saatlik stabilitesi.

Zaman (Saat)	Başlangıç	1.	2.	3.	4.	5.	6.
Ortalama İşaretleme Verimi (%)	95,31 $\pm$ 0,42	95,61 $\pm$ 0,51	96,49 $\pm$ 0,50	95,56 $\pm$ 1,15	96,35 $\pm$ 0,48	95,55 $\pm$ 0,25	96,79 $\pm$ 1,26

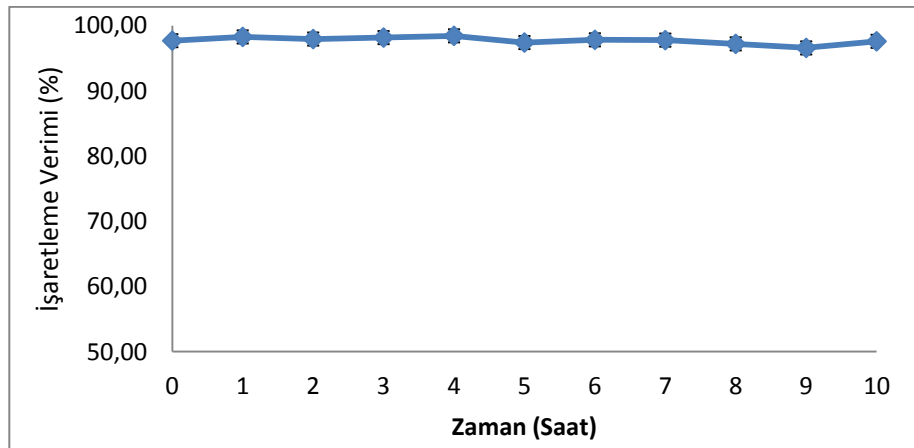
Değerler (ortalama $\pm$ standart sapma) (n=3) olarak verildi.

Optimum formülasyonun oda sıcaklığında ($25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$) 10 saatlik stabilitesi incelendiğinde, formülasyonun stabilitesinin 10 saat boyunca bozulmadığı ve 6 saatlik

stabilite testinin yeterli olacağı görüldü. 10 saatlik stabilite testi sonuçları Tablo 36'da ve Şekil 58'de verildi.

Tablo 36 : 0,5 mg Zoledronik Asit, asitli ortamda çözündürülmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit ve 3 mCi ^{99m}Tc içeren optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun oda sıcaklığında 10 saatlik in vitro stabilitesi.

Zaman (Saat)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ (%)	$^{99m}\text{TcO}_2$ (%)	^{99m}Tc -Zoledronik Asit (%)
Başlangıç	0,79±0,33	1,53±0,26	97,68±0,56
1.	0,48±0,10	1,25±0,21	98,27±0,23
2.	0,72±0,10	1,34±0,58	97,94±0,63
3.	0,65±0,20	1,19±0,11	98,16±0,25
4.	0,43±0,06	1,14±0,16	98,43±0,21
5.	0,44±0,07	2,16±1,41	97,40±1,35
6.	0,45±0,21	1,74±0,14	97,82±0,31
7.	0,60±0,09	1,62±0,50	97,77±0,41
8.	0,52±0,28	2,28±0,33	97,20±0,60
9.	1,03±0,69	2,39±0,76	96,58±0,54
10.	0,65±0,18	1,76±0,45	97,59±0,36



Şekil 58 : Optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun oda sıcaklığında 10 saatlik in vitro stabilitesi.

Optimum formülasyonun oda sıcaklığında en az 10 saat boyunca stabil olarak kaldığı gözlemlendi.

İn vivo çalışmalarda tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in radyokimyasal saflık kontrolüne ait sonuçlar Tablo 37'de tatbikten sonra aseton ve serum fizyolojikte sürüklenen plakların kromatogramları Şekil 59 ve Şekil 60'da verildi.

Tablo 37 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit içeren formülasyonun radyokimyasal saflık kontrolüne ait veriler.

Radyokimyasal Safsızlık Miktarı (%)		Radyokimyasal Saflık Miktarı (%)
$^{99m}\text{TcO}_4^-$	$^{99m}\text{TcO}_2$	^{99m}Tc -Zoledronik Asit
0,34	1,56	98,10

Instrument Parameters

Method:	Cagri Tez 120110	File:	170112A1A0.R001A
Evaluated:	17 Jan 2012 11:48:41	Created:	17 Jan 2012 11:46:06
Evaluation by:	asd		
Collimator Type:	Hi Resolution	Width:	10 mm
Elect. Resol:	Normal	Amp. Range:	50 - 2047
Resolution:	256 chan	Chan Size:	0.902 mm
Hi Voltage:	1500 Volts	Chan of Zero mm:	10.8
Run Time:	0.32 min	Max Count:	0
Relative Pos:	0.0 mm		

Comments

Default Method for use in defining other methods

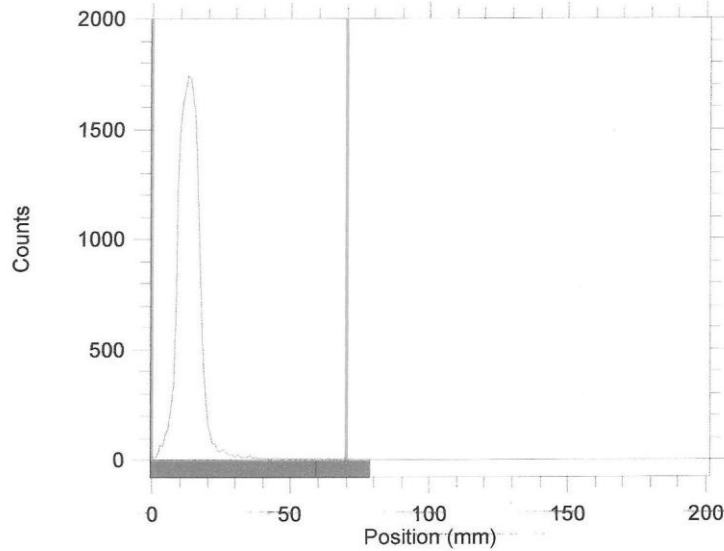
Analysis Parameters

Bkg Subtraction:	none	Origin:	0.0 mm
Normalization:	none	Front:	70.0 mm
Total Counts:	18334.0 (57896.8 CPM)	Region:	0.0 - 80.0 mm
Total File Counts:	18334		

Region Analysis

Definition: Table

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	-4.3	59.8	13.4	0.192	18176.0	57397.9	99.14	99.66
Rgn 2	58.9	78.7	67.1	0.958	62.0	195.8	0.34	0.34
2 Peaks					18238.0	57593.7	99.48	100.00



Şekil 59 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan optimum formülasyonun inkübasyondan sonra içerdiği serbest Teknesyum miktarını hesaplamak için asetonda sürüklenmiş plağın radyokromatogramı.

Instrument Parameters

Method:	Cagri Tez 120110	File:	170112A1S0.R001B
Evaluated:	18 Jan 2012 11:42:36	Created:	17 Jan 2012 11:47:46
Evaluation by:	asd		
Collimator Type:	Hi Resolution	Width:	10 mm
Elect. Resol:	Normal	Amp. Range:	50 - 2047
Resolution:	256 chan	Chan Size:	0.902 mm
Hi Voltage:	1499 Volts	Chan of Zero mm:	10.8
Run Time:	0.32 min	Max Count:	0
Relative Pos:	0.0 mm		

Comments

Default Method for use in defining other methods

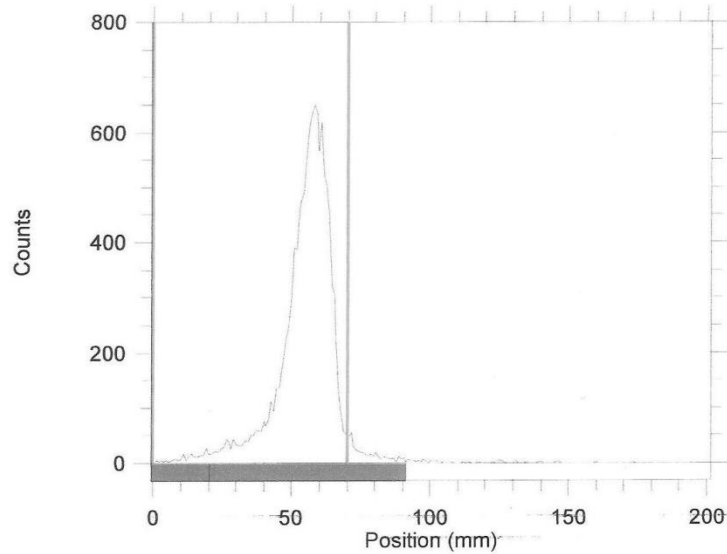
Analysis Parameters

Bkg Subtraction:	none	Origin:	0.0 mm
Normalization:	none	Front:	70.0 mm
Total Counts:	12224.0 (38602.1 CPM)	Region:	0.0 - 80.0 mm
Total File Counts:	12474		

Region Analysis

Definition: Table

Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	-1.6	20.1	13.1	0.187	192.0	606.3	1.57	1.56
Rgn 2	20.1	91.3	55.4	0.792	12148.0	38362.1	99.38	98.44
2 Peaks					12340.0	38968.4	100.95	100.00



Şekil 60 : İn vivo çalışmada tavşanlara uygulanmak üzere hazırlanan optimum formülasyonun inkübasyondan sonra içerdiği İ-H-Teknesyum miktarını hesaplamak için serum fizyolojikte sürüklenmiş plağın radyokromatogramı.

3.4 *İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular*

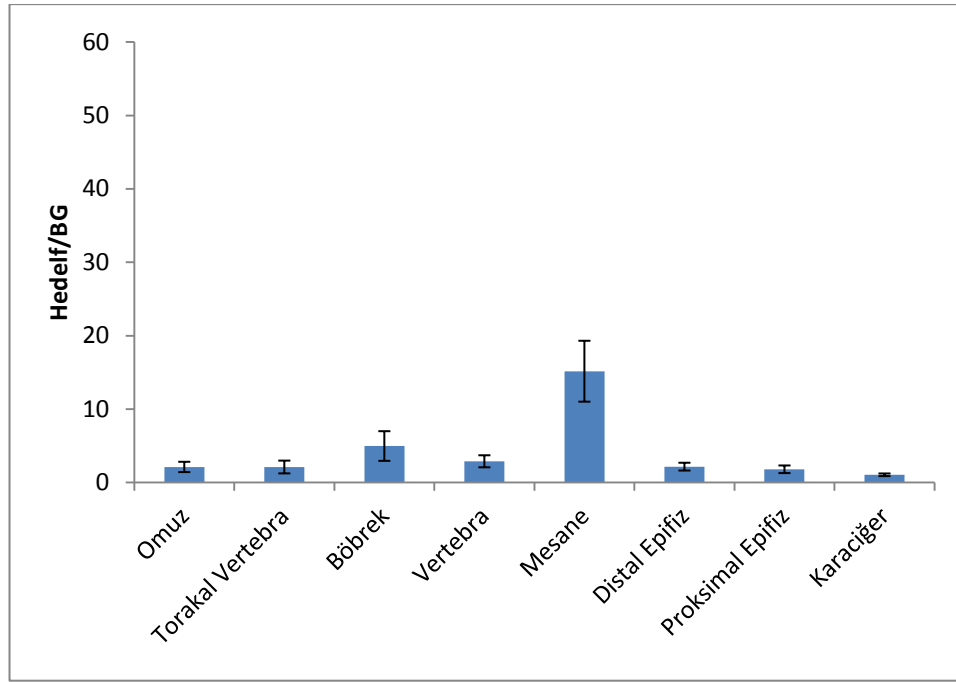
^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in Bölüm 2.3'te anlatıldığı şekilde hazırlanan enjeksiyonluk çözeltisi yöntem 2.5.3.'te anlatıldığı gibi hayvanlara uygulandı. i.v. enjeksiyondan hemen sonra gama kamera ile 1 dakikalık dinamik, 60., 120. ve 180. dakikalarda 1 dakikalık statik görüntüler alındı. Ayrıca 180. dakikadaki ölçümün hemen ardından tavşanların mesanelerinin üstüne kurşun zırh yerleştirilerek bir dakikalık statik görüntüleri alındı. Elde edilen görüntüler üzerinde bilgisayar ortamında çalışılarak radyoaktivitenin toplandığı bölgelerde ilgi alanları (ROI) çizildi. Piksel başına düşen sayımlar hesaplandı ve Hedef/Background (BG) oranları bulundu.

Tablo 38 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan sonra elde edilen Hedef/BG oranları.

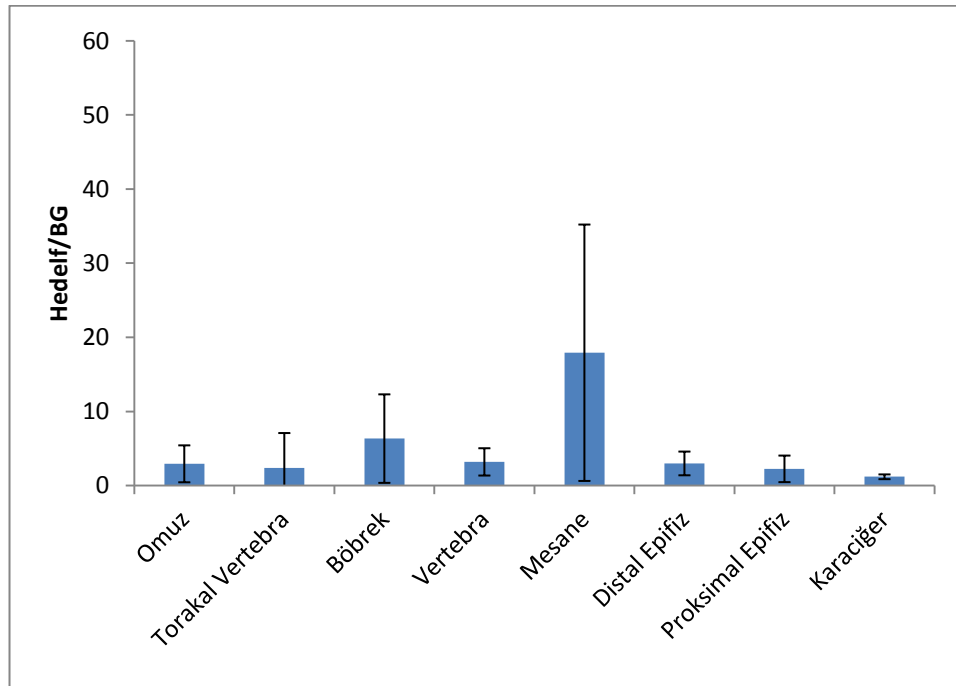
Hedef	Enjeksiyondan sonra geçen zaman (Dakika)			
	60.	120.	180.	180. (Zırhlı)
Omuz	2,11±0,70	2,95±2,49	2,95±1,15	5,43±2,48
Torakal Vertebra	2,10±0,87	2,38±4,72	1,97±1,17	2,69±2,52
Böbrek	4,96±2,02	6,35±5,97	6,63±4,14	10,53±1,15
Vertebra	2,88±0,82	3,21±1,84	3,03±0,40	7,17±4,17
Mesane	15,15±4,15	17,93±17,29	21,15±34,81	-
Distal Epifiz	2,15±0,53	3,00±1,60	3,36±1,14	6,74±2,85
Proksimal Epifiz	1,79±0,52	2,27±1,79	2,26±0,84	4,30±1,41
Karaciğer	1,04±0,18	1,20±0,32	1,10±0,29	1,59±0,40

Değerler (ortalama ± standart sapma) (n=4) olarak verildi.

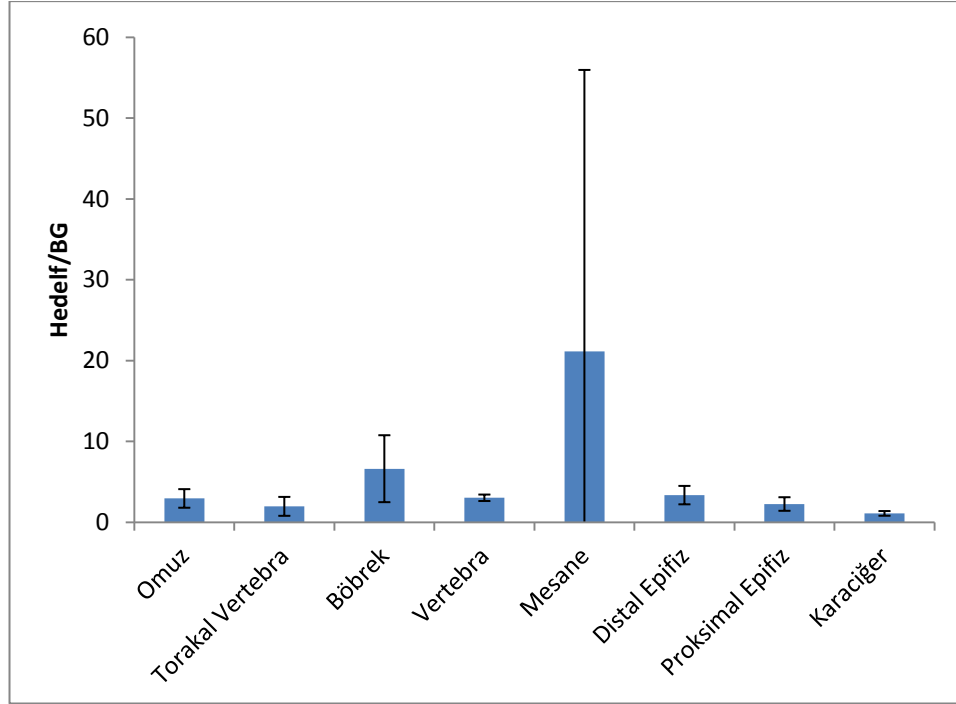
Kemiklerde görülen 3 saatlik Hedef/BG oranları istatistiksel analiz yapılarak karşılaştırıldığında ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in farklı kemiklerdeki dağılımları arasında anlamlı fark görülmedi ($p>0,05$).



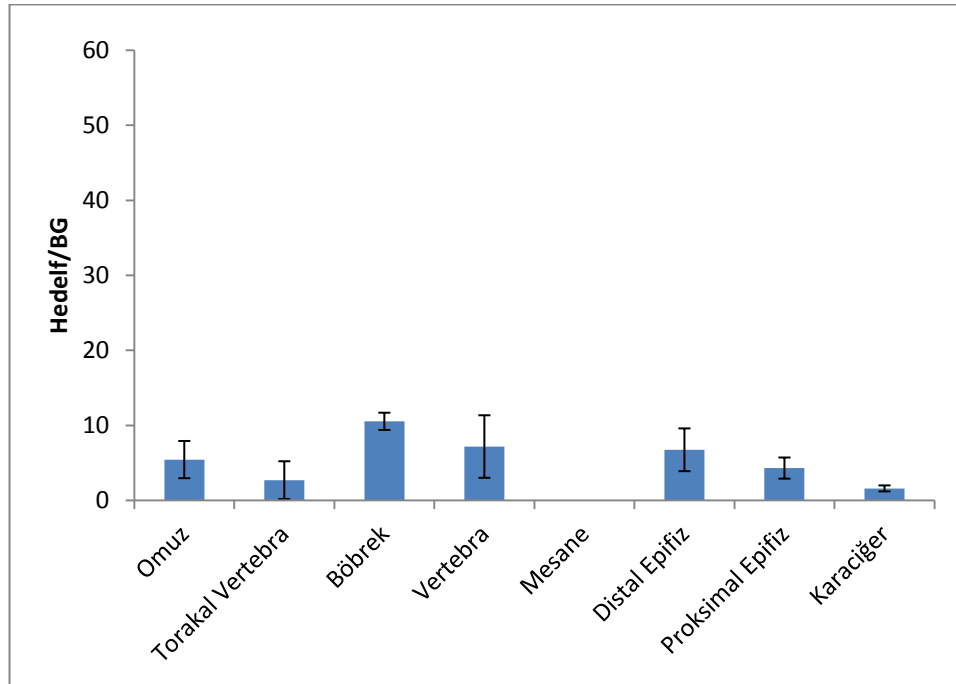
Şekil 61 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 60 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.



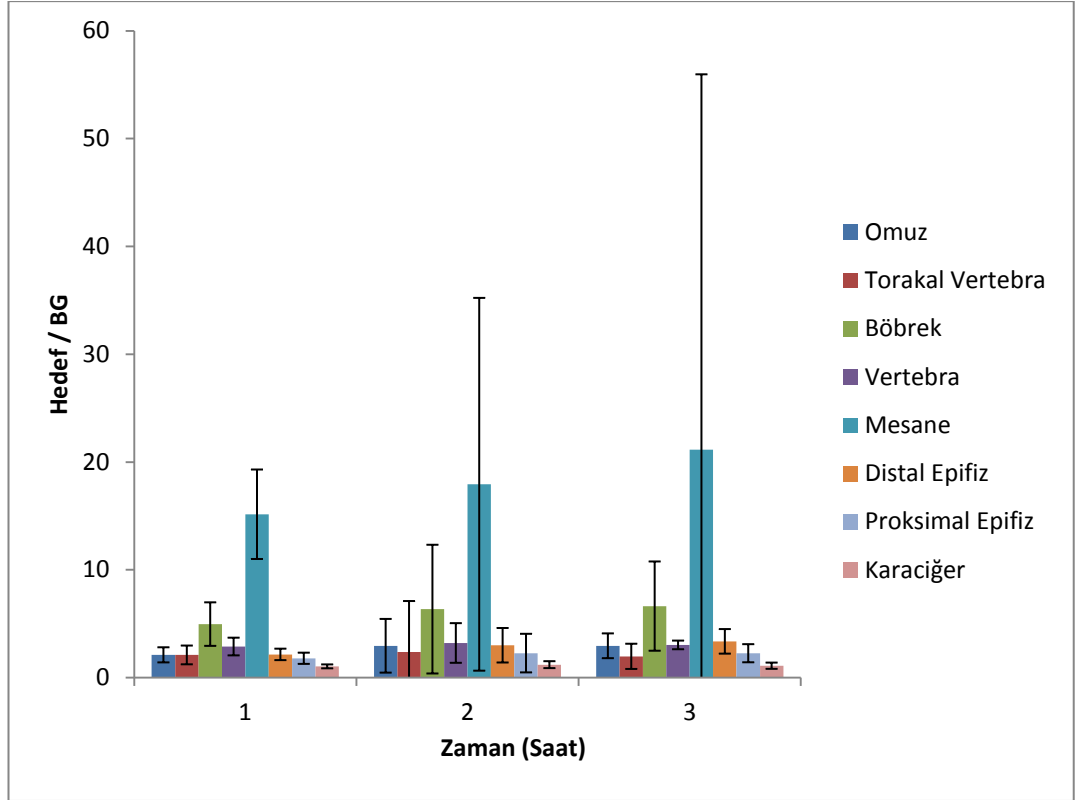
Şekil 62 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 120 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.



Şekil 63 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.



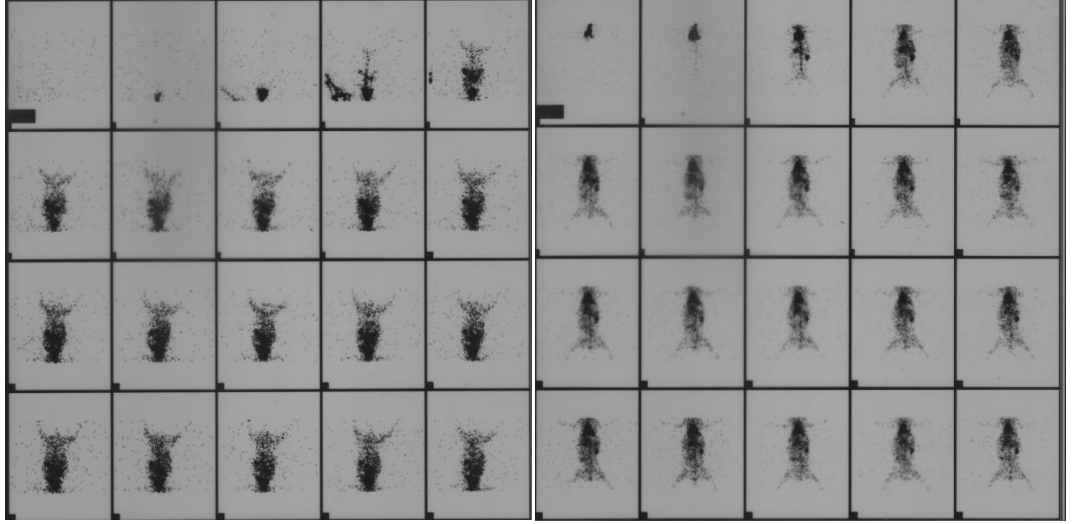
Şekil 64 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in mesane bölgesine kurşun zırh yerleştirilen tavşanlara i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra elde edilen Hedef/BG oranları.



Şekil 65: ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in i.v. enjeksiyonundan sonra elde edilen Hedef/BG oranları.

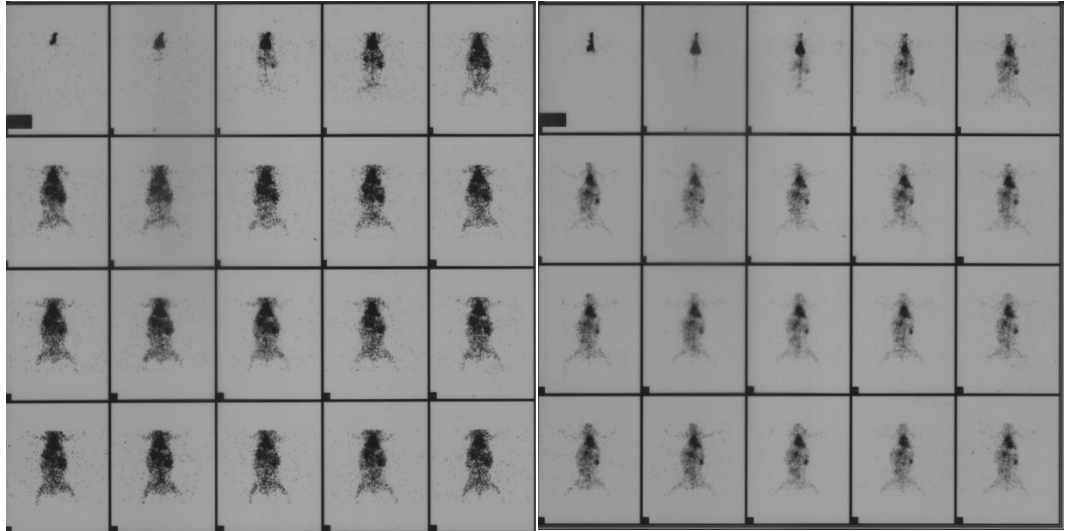
3.4.1 Gama Kamera İle Alınan Dinamik ve Statik Görüntüler

^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. uygulanmasından hemen sonra gama kamera ile alınan dinamik görüntüler Şekil 66'te verildi.



1. tavşan

2. tavşan

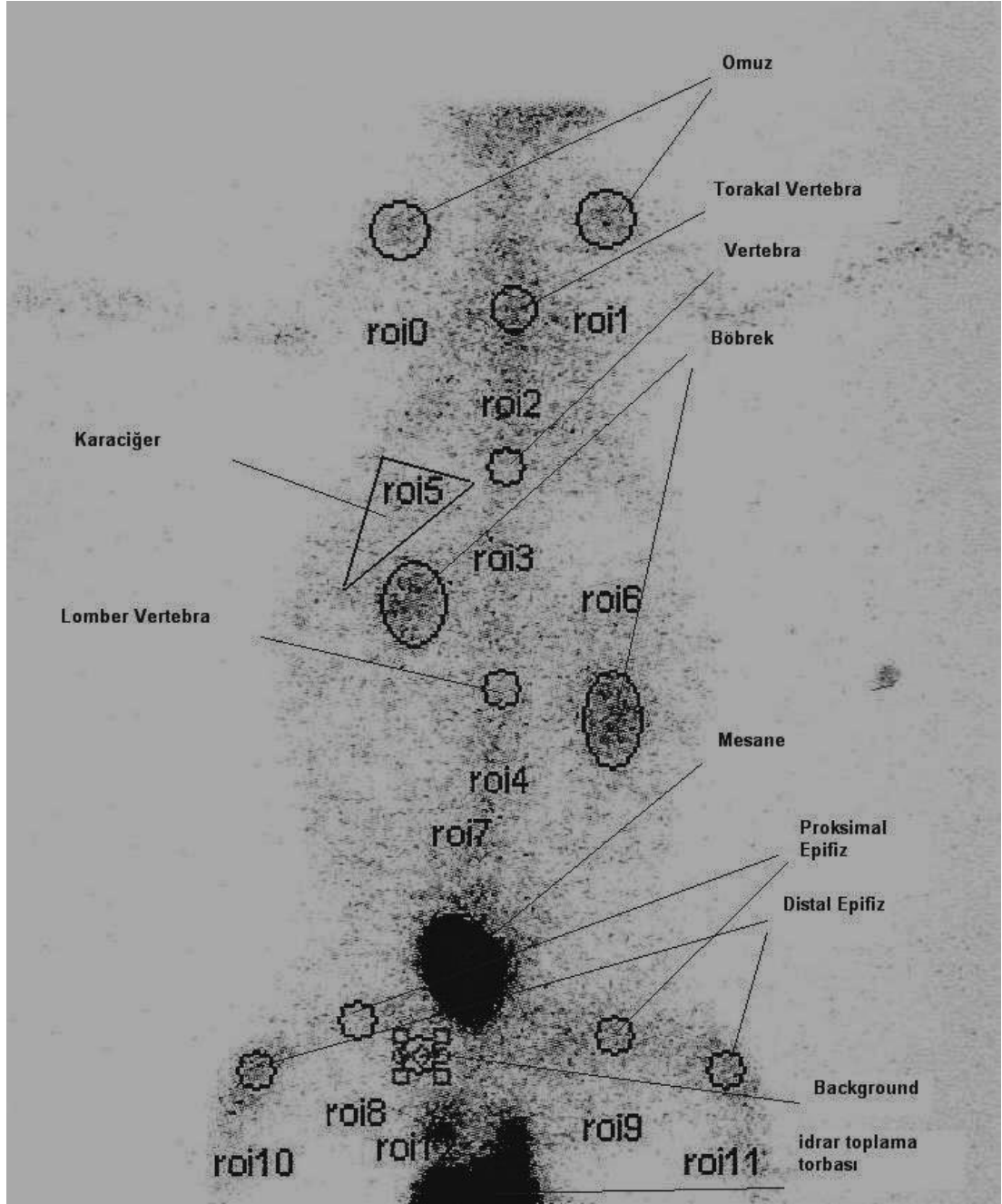


3. tavşan

4. tavşan

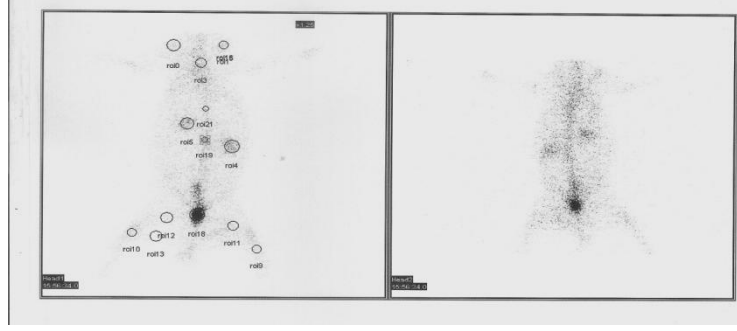
Şekil 66 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in 1., 2., 3. ve 4. tavşana i.v. uygulanmasından hemen sonra gama kamera ile alınan bir dakikalık dinamik görüntüler.

Tavşanlarda ROI çiziminde kullanılan bölgeler Şekil 67'da verildi.

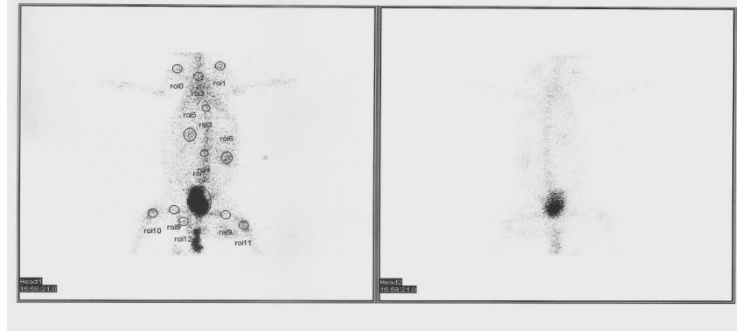


Şekil 67 : Tavşanlarda ROI çiziminde kullanılan bölgeler.

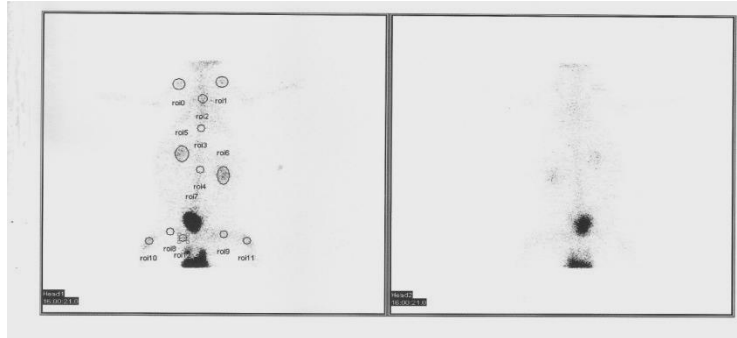
^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. uygulanmasından sonra gama kamera ile 60.dakika, 120.dakika ve 180.dakikalarda alınan birer dakikalık statik görüntüler Şekil 68, Şekil 69, Şekil 70 ve Şekil 71'de verildi.



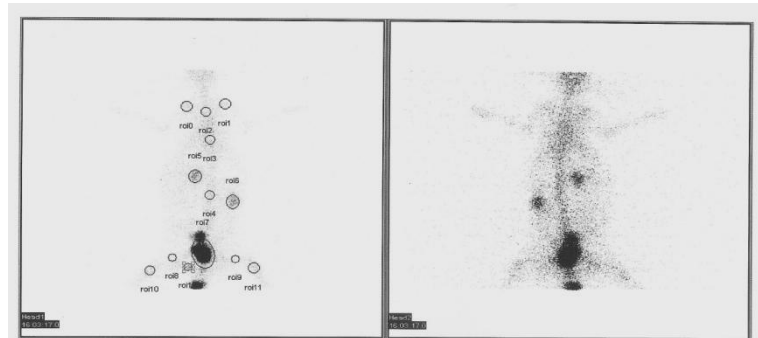
1. tavşan



2. tavşan

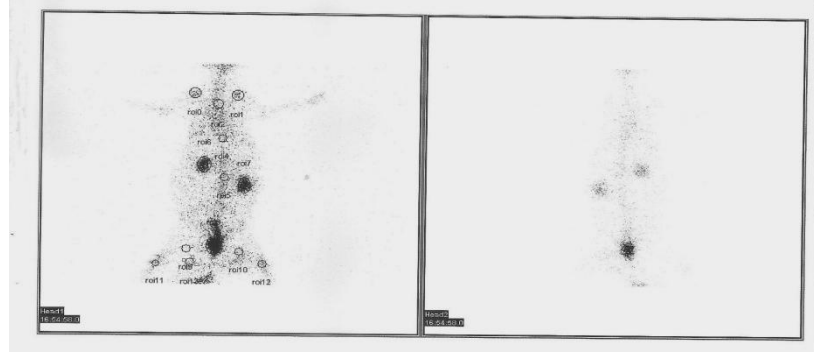


3. tavşan

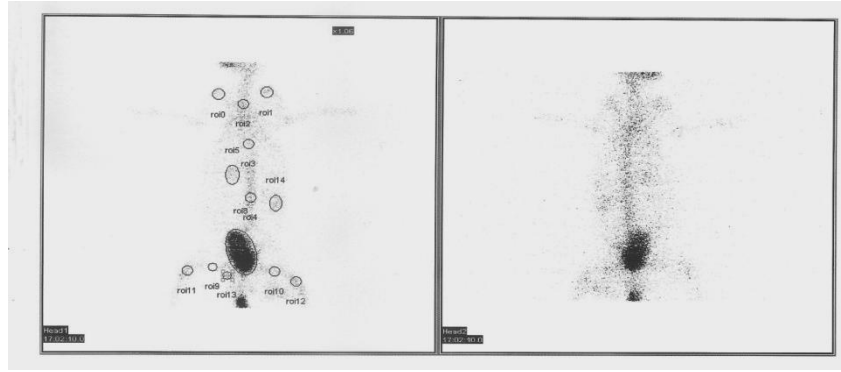


4. tavşan

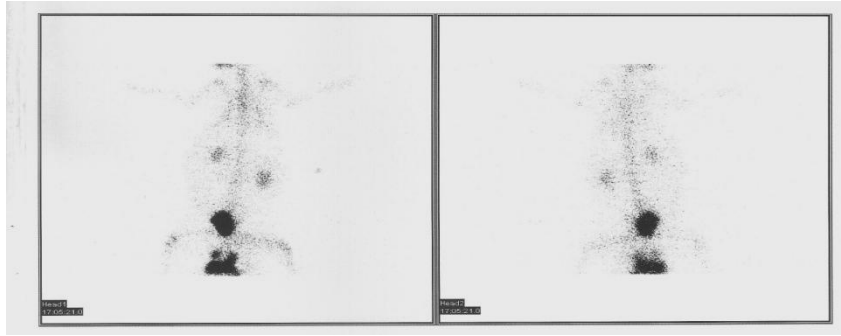
Şekil 69 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun i.v. enjeksiyonundan 120 dakika sonra çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).



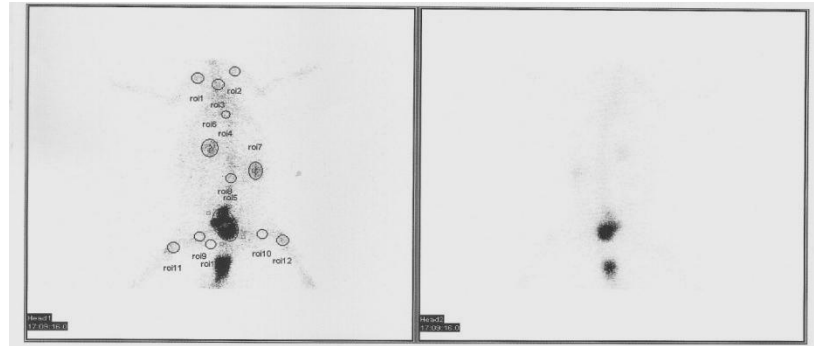
1. tavşan



2. tavşan

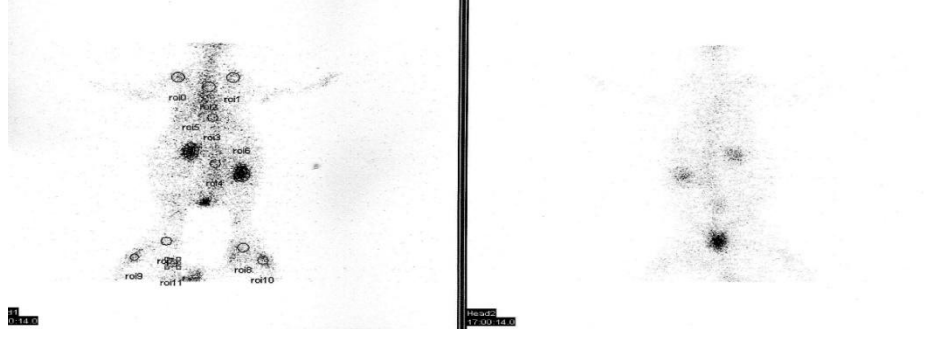


3. tavşan

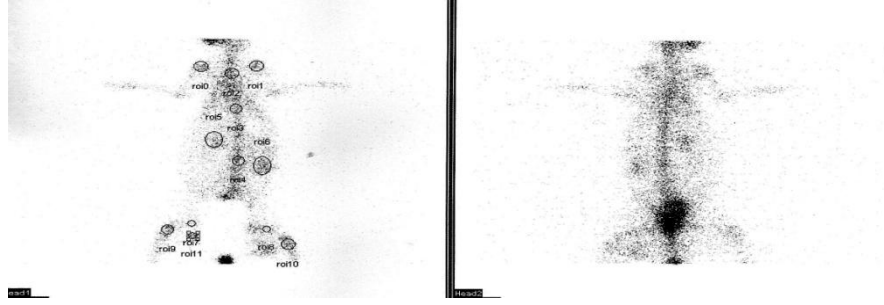


4. tavşan

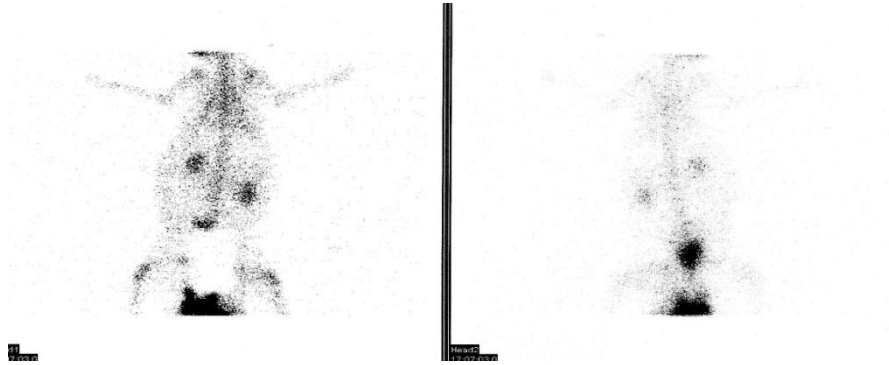
Şekil 70 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra çekilen 1., 2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).



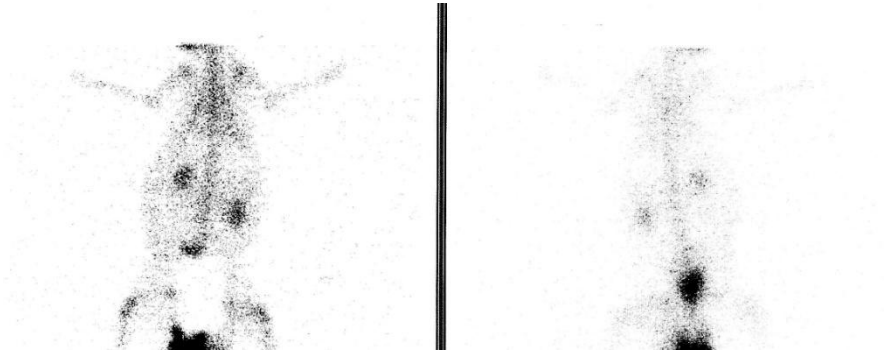
1. tavşan



2. tavşan



3. tavşan



4. tavşan

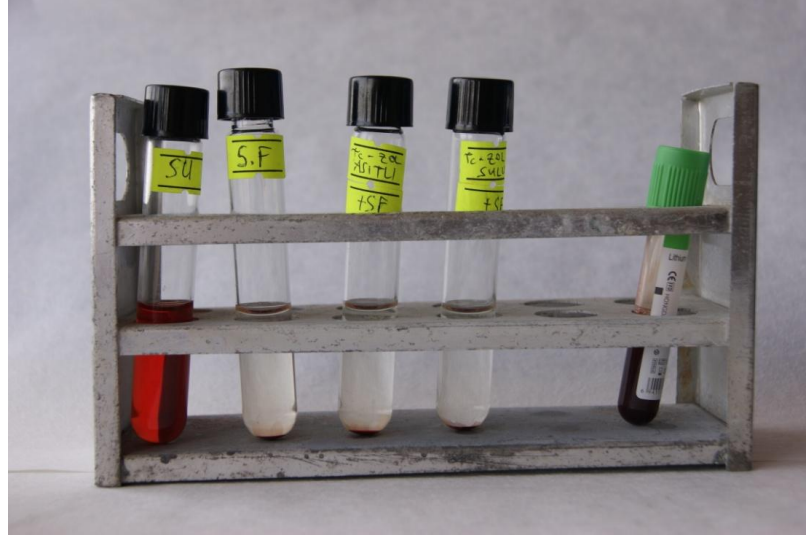
Şekil 71 : ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun i.v. enjeksiyonundan 180 dakika sonra hayvanların mesaneleri üstüne kurşun zırh yerleştirilerek çekilen 1.,2., 3., ve 4. tavşana ait statik görüntüler (anterior ve posterior).



Şekil 72: Gama Kamera Çalışmaları

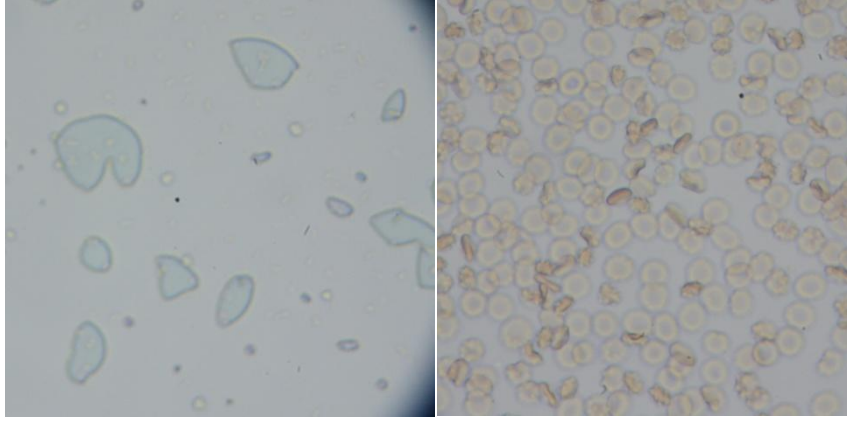
3.5 İzotoni Testine Ait Bulgular

30 dakika bekledikten sonra 1500 devirde 5 dakika santrifüjlenen örneklerde, eritrositlerin distile su içinde hemolize uğradığı, optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunda, sulu ortamda çözünmüş Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunda (0,05 mg Zoledronik Asit, suda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit, 3 mCi ^{99m}Tc) ve % 0,9 NaCl çözeltisi içinde hemolize uğramadan çöktüğü gözlemlendi. Santrifüjlenen tüplere ait görüntü Şekil 73'te verildi.



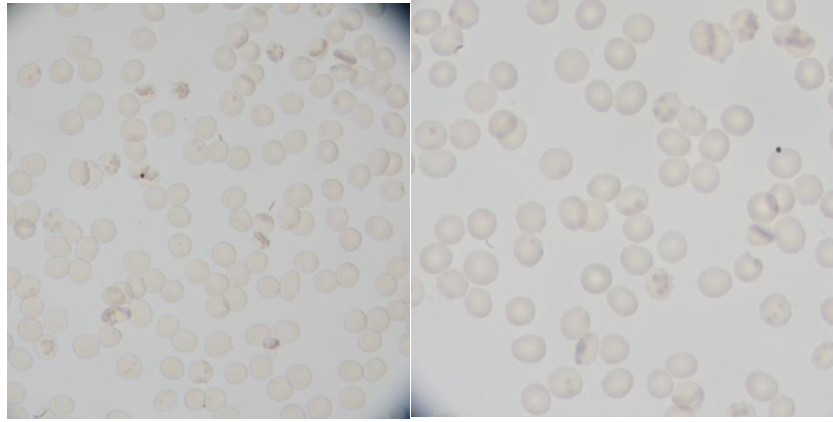
Şekil 73 : İzotoni testinde 30 dakika bekledikten sonra 1500 devirde 5 dakika santrifüjlenen tüpler.

Tüplerin her birinden alınan örnekler mikroskopta incelendiğinde, distile su içindeki eritrositlerin parçalandığı, her iki ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunda ise % 0,9 NaCl çözeltisi içinde olduğu gibi parçalanmadan kaldıkları gözlemlendi. Mikroskoptan alınan görüntüler Şekil 74'te verildi.



1 Nolu Tüp

2 Nolu Tüp



3 Nolu Tüp

4 Nolu Tüp

Şekil 74 : Santrifüjlenen tüplerden alınan ve mikroskopta incelenen eritrosit örnekleri (1 Nolu Tüp : Distile sudaki eritrositler, 2 Nolu Tüp : Serum Fizyolojikteki eritrositler, 3 Nolu Tüp : Optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonundaki eritrositler, 4 Nolu Tüp : Sulu ortamda çözülmüş Kalay Klorür ile hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonundaki eritrositler)

3.6 İstatistiksel Analiz Testlerine Ait Bulgular

Asitli ortamda ve sulu ortamda çözülmüş aynı miktarda Kalay Klorür içeren formülasyonların stabilitelerinin istatistiksel analiz yöntemleriyle karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 39’da verildi.

Tablo 39 : Asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş aynı miktarda Kalay Klorür içeren formülasyonların stabilitelerinin karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri

Zaman (Saat)	Kalay Klorür Miktarı (mg)											
	0,001		0,0025		0,005		0,01		0,02		0,04	
	^{99m} Tc-Zoledronik Asit (%)											
	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu
Başlangıç	47,86 ±2,75	48,97 ±2,03	81,59 ±0,87	71,38 ±2,23	91,82 ±0,43	92,51 ±1,35	95,39 ±0,14	96,13 ±0,87	97,63 ±0,32	96,41 ±1,19	97,86 ±0,32	97,42 ±0,27
1.	47,05 ±2,82	54,61 ±1,70	76,88 ±2,39	76,36 ±1,63	90,71 ±0,54	90,31 ±2,31	95,28 ±1,14	96,73 ±0,67	97,13 ±0,17	95,16 ±2,02	97,23 ±0,72	96,59 ±0,24
2.	33,88 ±2,06	53,99 ±0,79	60,93 ±0,37	65,50 ±1,63	86,20 ±0,79	93,53 ±1,90	94,31 ±0,66	96,81 ±0,42	96,45 ±0,29	97,77 ±0,61	97,14 ±0,41	97,70 ±0,74
3.	23,30 ±1,53	52,17 ±2,84	42,80 ±1,42	70,44 ±1,35	76,69 ±0,07	93,87 ±1,29	92,08 ±0,88	93,22 ±2,45	97,47 ±0,68	95,24 ±2,88	98,59 ±0,19	97,38 ±0,42
4.	16,66 ±0,77	39,93 ±0,89	27,90 ±0,53	59,18 ±0,37	71,59 ±1,90	90,57 ±2,49	85,98 ±0,41	92,99 ±0,38	94,71 ±0,31	92,90 ±0,84	97,45 ±0,41	96,33 ±0,36
5.	13,28 ±0,95	36,34 ±1,34	24,49 ±1,64	50,36 ±0,75	57,48 ±1,05	92,89 ±0,52	76,38 ±0,12	95,96 ±0,43	93,71 ±0,45	97,23 ±0,48	97,03 ±0,28	96,64 ±0,26
6.	10,77 ±0,15	25,41 ±1,79	21,91 ±0,77	43,83 ±1,34	44,93 ±1,73	90,70 ±1,45	71,17 ±1,43	95,76 ±0,20	90,04 ±1,72	94,75 ±1,18	96,17 ±0,60	95,88 ±0,38
	p>0,05		p<0,05		p<0,05		p<0,05		p>0,05		p>0,05	

0,001 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0,05).

0,02 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0,05).

0,04 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0,05).

0,0025 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

0,005 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

0,01 mg Kalay Klorürün asitli ortamda ve sulu ortamda çözündürülmesiyle hazırlanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonların stabiliteleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

Asitli ortamda ve sulu ortamda çözünmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen aynı aktiviteli ^{99m}Tc içeren formülasyonlar arasında yapılan istatistiksel değerlendirmede elde edilen p değerleri Tablo 40'ta verildi.

Tablo 40 : Asitli ortamda ve sulu ortamda çözülmüş 0,04 mg Kalay Klorür ile indirgenen aynı aktiviteli ^{99m}Tc içeren formülasyonların stabilitelerinin karşılaştırılması ile elde edilen p değerleri

Zaman (Saat)	^{99m} Tc Aktivitesi Miktarı (mCi)					
	1		2		5	
	^{99m} Tc-Zoledronik Asit (%)					
	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu	Asitli	Sulu
Başlangıç	97,86±0,32	97,42±0,27	96,07±0,13	94,79±0,97	96,57±0,21	94,61±1,95
1.	97,23±0,72	96,59±0,24	97,10±0,36	95,80±0,63	96,30±1,15	94,82±0,33
2.	97,14±0,41	97,70±0,74	95,11±0,30	95,21±0,56	95,23±1,14	94,45±0,66
3.	98,59±0,19	97,38±0,42	95,86±1,59	93,49±0,70	87,93±0,97	79,27±1,36
4.	97,45±0,41	96,33±0,36	97,30±0,29	84,83±1,03	88,19±0,58	74,25±1,56
5.	97,03±0,28	96,64±0,26	95,98±0,29	80,02±0,36	86,14±1,68	64,11±2,28
6.	96,17±0,60	95,88±0,38	95,98±0,76	70,69±2,81	79,86±2,39	61,22±0,75
	p>0,05		p<0,05		p<0,05	

Aynı aktivitede ^{99m}Tc ile işaretlenen formülasyonlardan 1 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen 0,04 mg Kalay Klorür'ün asitli ortamda çözüldüğü formülasyon ile sulu ortamda çözüldüğü formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı (p>0,05).

2 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen 0,04 mg Kalay Klorür'ün asitli ortamda çözüldüğü formülasyon ile sulu ortamda çözüldüğü formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p<0,05).

5 mCi ^{99m}Tc ile işaretlenen 0,04 mg Kalay Klorür'ün asitli ortamda çözündüğü formülasyon ile sulu ortamda çözündüğü formülasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$).

İn vivo çalışmalarda tavşanlara uygulanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in farklı kemiklerdeki tutulumlarında yapılan istatistiksel analiz çalışmalarında elde edilen p değerleri Tablo 41'de verildi.

Tablo 41 : İn vivo çalışmalarda tavşanlara uygulanan ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in farklı kemiklerdeki tutulumlarından elde edilen Hedef/BG oranlarına ait p değeri

Hedef	Zaman (Saat)		
	1.	2.	3.
Omuz	2,11±0,70	2,95±2,49	2,95±1,15
Torakal Vertebra	2,10±0,87	2,38±4,72	1,97±1,17
Vertebra	2,88±0,82	3,21±1,84	3,03±0,40
Distal Epifiz	2,15±0,53	3,00±1,60	3,36±1,14
Proksimal Epifiz	1,79±0,52	2,27±1,79	2,26±0,84
	$p>0,05$		

^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in omuz, torakal vertebra, vertebra, distal epifiz ve proksimal epifiz tutulumları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$).

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL İZNİ

EGE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2012-008
KONU: Onay

24.02.2012

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda “⁹⁹MTC -ZOLEDRONİK ASİTİN İŞARETLEME VERİMİNE DENEYSEL KOŞULLARIN ETKİSİ ” isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Prof. Dr. Makbule AŞIKOĞLU, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Arş. Gör. Uzm. Eczacı Derya İLEM, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Arş. Gör. Eczacı Çağrı ÇALIŞKAN, Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Rasih YILMAZ
(E.Ü. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanı)

Prof. Dr. Süleyman AKKAN

Prof. Dr. Hüseyin TEZEL

Prof. Dr. İsmet DELİLOĞLU GÜRHAN

Prof. Dr. Lokman ÖZTÜRK

Prof. Dr. Gülcihan Mehtap KÖKSAL

Doç. Dr. T. Tansel TANRIKUL

Doç. Dr. N. Ülkü KARABAY YAVAŞOĞLU

Yrd. Doç. Dr. Gülnur SEVİN

Özcan NALBANTOĞLU

Tingiz ÖZCAN

TARTIŞMA - SONUÇ

Nükleer tıpta sıklıkla görüntüleme amacıyla kullanılan radyofarmasötikler, diğer görüntüleme yöntemlerinden farklı olarak hem anatomik hem de fizyolojik veri elde edilebilmesi olanağı sağlar.

Günümüzde tüm nükleer tıp uygulamalarının yaklaşık üçte birini kemik sintigrafisi çalışmaları oluşturmaktadır (65). Tanısal amaçlı kemik sintigrafisi uygulamalarında en çok kullanılan radyofarmasötikler ise ^{99m}Tc ile işaretli bifosfonatlardır (57). ^{99m}Tc ile işaretli bifosfonatlardan rutinde en sık kullanılan ^{99m}Tc -MDP'dir. EHDP ve HDP kullanımında olan diğer kemik radyofarmasötikleridir. Osteojenik aktivite dışında bifosfonatların kemikte tutulumu, kimyasal yapısı; metilen köprüsüne bağlı substituentlerle ilişkilidir. Yapılan çalışmalarda rutinde kullanılan bifosfonatlar içinde HDP'nin kemikte diğer bifosfonatlara göre daha iyi tutulduğu gözlenmiştir (102).

Zoledronik Asit malign hiperkalsemi ve multipl myelomada endikedir. Standart antineoplastik terapiye ek olarak solid tümörlerin tedavisinde kullanılan bir bifosfonattır. Hidroksiapatit kristallerine yüksek afinite gösterir ve mineralize kemik yüzeyine güçlü bir şekilde bağlanır ve uzun süre tutulumu devam eder. Intravenöz uygulamadan hemen sonra plazma konsantrasyonu üriner atılıma bağlı olarak düşer (16, 51). Zoledronik Asit ve yapısında N atomu taşıyan diğer bifosfonatlar, taşımayanlara göre daha güçlü kemik rezorpsiyonu inhibitörüdürler. Yapılan çalışmalarda Azot içeren bifosfonatların antirezorptif özelliklerine bağlı indirekt etkilerinden ayrı olarak direkt antitümör etkiye sahip olabileceği gösterilmiştir. (31). Bu özelliklerinden dolayı ^{99m}Tc -Zoledronik Asit ideal bir tanısal amaçlı kemik radyofarmasötiği olma potansiyeline sahip olabilir.

Bu çalışmada Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile doğrudan işaretleme yönteminde oluşan işaretleme verimine, etkin madde, Kalay Klorür, Askorbik Asit, ^{99m}Tc aktivitesi ve pH'ın etkisi incelendi ve in vivo çalışmalarda kullanılmak için geliştirilen optimum formülasyonla tavşanlarda gama kamera ile görüntüleme çalışmaları yapıldı.

Zoledronik Asit'in tanısında FT-IR, UV spektrum ve erime derecesi tayini deneyleri yapıldı. Maddenin FT-IR spektrumu literatür (47, 74) verileri doğrultusunda yorumlandığında Zoledronik Asit'e ait işlevsel grupların spektrumda görüldüğü, erime derecesinin de literatür (49) ile uyumlu olduğu gözlemlendi.

^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun geliştirilmesinde, Zoledronik Asit molekülü ^{99m}Tc radyonüklidi ile benzer çalışmalarda (3, 5) olduğu gibi yabancı işaretin moleküle girişi yöntemiyle işaretlendi. Bu yöntemle yapılan işaretlemede ^{99m}Tc radyonüklidi ve Zoledronik Asit ligandı arasında kovalent bağlar (82) oluştuğu yorumu yapıldı.

DeneySEL koşulların etkisinin araştırıldığı çalışmalarda formülasyonların içerdiği radyokimyasal safsızlık oranları TLC Scanner kullanılarak belirlenerek in vivo çalışmalarda kullanılacak formülasyonda kullanılacak madde miktarları için optimum miktarlar saptandı. Radyokimyasal safsızlıklar gama sintigrafi çalışmalarında görüntü kalitesini bozacağı için (82, 100) optimum formülasyonda en düşük miktarda safsızlık olması ve zamanla safsızlık oranının artmaması hedeflendi.

Optimum formülasyonun fiziksel özellikleri değerlendirildiğinde, formülasyonun berrak ve renksiz olduğu ve gözle görünür herhangi bir partikül taşımadığı ve bu açıdan radyofarmasötiklerin kalite kontrol testlerinde aranan özelliklere (46, 82) uyduğu gözlemlendi.

Optimum formülasyonda kullanılacak Zoledronik Asit miktarı 0,05 mg olarak belirlendi. Yapılan deneylerde kullanılan diğer Zoledronik Asit miktarlarında da yüksek işaretleme verimi elde edilmesine rağmen 0,05 mg seçilmesinin nedeni, radyofarmasötiklerin terapötik dozdan düşük dozlarda uygulanmasından kaynaklanmaktadır. Zoledronik Asit'in terapötik dozu 4-5 mg'dır (41). Bundan önce yapılan diğer çalışmalarda Zoledronik Asit terapötik dozlarda işaretlenmiştir (3, 21).

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen elde edilen $^{99\text{m}}\text{Tc}$, +7 değerliklidir. Bileşiklere bağlanabilmesi için oksidasyon kademesinin +7'den daha düşük değerlere indirgenmesi gerekir (89). Bu amaçla benzer çalışmalarda (3, 53) olduğu gibi Kalay Klorür kullanıldı. Optimum Kalay Klorür miktarının 0,04 mg olduğu görüldü.

1 mCi, 2 mCi ve 5 mCi $^{99\text{m}}\text{Tc}$ kullanılarak yapılan aktivitenin işaretleme verimine etkisi incelendiğinde 1 mCi ve 2 mCi aktivite kullanılan ve Kalay Klorür'ün 0,1 N HCl'de çözündüğü formülasyonların işaretleme veriminin yüksek ve stabil olduğu belirlendi. Optimum olarak belirlenen formülasyonda, in vivo çalışmalarda 4 tavşan kullanılacağı ve her tavşana 0,75 mCi dozda radyofarmasötik enjekte edileceği düşünülerek 3 mCi ile işaretleme yapıldı ve 3 mCi ile yapılan çalışmalarda formülasyonun işaretleme verimi %95'ten büyük bulundu.

Antioksidan olarak benzer çalışmalarda olduğu gibi Askorbik Asit kullanıldı (33, 99). Askorbik Asit'in formülasyonun işaretleme verimi üzerine etkisi incelendi. Düşük Kalay Klorür miktarları kullanıldığında Askorbik Asit varlığının stabiliteyi arttırdığı gözlemlendi. 0,04 mg Kalay Klorür kullanıldığında ise Askorbik Asit'in işaretleme verimi üzerine etkisinin %1'den fazla olmadığı görüldü. Optimum formülasyonda 0,005 mg Askorbik Asit kullanılmasına karar verildi.

pH'in formülasyonun işaretleme verimine etkisi araştırılırken yapılan çalışmalarda 0,1 M NaOH kullanılarak ayarlanan pH değerlerinde (5,85-7,40) formülasyonun stabilitesinin değişmediği gözlemlendi. En yüksek işaretleme verimi pH değeri 5,85 olan formülasyonda görüldü.

^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonlarının oda sıcaklığındaki (25±3 C°) stabiliteleri, ^{99m}Tc ile yapılan benzer çalışmalarda (62, 64, 78, 103) olduğu gibi, 6 saatlik stabilite testleri uygulanarak değerlendirildi. Formülasyonların içerdiği radyokimyasal safsızlık oranları, ince tabaka kromatografisi kullanılarak bulundu.

Optimum ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun oda sıcaklığındaki (25±3 C°) stabilitesi 10 saat boyunca incelendi ve formülasyonun işaretleme veriminde 6. saatten sonra da büyük bir değişim olmadığı, ve en az 10 saat boyunca stabil olarak kaldığı gözlemlendi.

Geliştirilen yeni ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun stabilite ve organlardaki Hedef/BG oranları dışında kalan, radyofarmasötiklerin geliştirilmesinde dikkat edilecek diğer özellikleri incelendiğinde, ^{99m}Tc ve Zoledronik Asit moleküllerinin uyumlu oldukları diğer ^{99m}Tc-Bifosfonat radyofarmasötiklerinde (5, 52, 53, 71) olduğu gibi kolayca bağ yapabildikleri yapılan işaretleme verimi kalite kontrolü çalışmaları sonucunda gözlemlendi.

Bifosfonat molekülleri hidrofil yapıda ve suda kolay çözünür özelliktedirler (35). ^{99m}Tc, serum fizyolojik içinde çözülmüş halde jeneratörden sağılarak elde edilmektedir (106). Kalay Klorür'ün asidik ortamdaki çözeltileri berraktır (37). Askorbik asit suda çözünen bir bileşiktir (37). ^{99m}Tc-Zoledronik Asit formülasyonunun geliştirilmesi sırasında hazırlanan tüm çözeltilerin berrak ve bu çözünürlük özelliklerine uymakta olduğu, elde edilen optimum ^{99m}Tc-Zoledronik

Asit formülasyonunun da berrak olduğu ve zamanla herhangi bir çözünürlük problemi oluşmadığı gözlemlendi.

^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonun i.v. enjeksiyonundan hemen sonra alınan 1 dakikalık dinamik görüntüler, ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in hızla tüm vücuda yayıldığını gösterdi.

^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara i.v. enjeksiyonundan sonra oluşan Kemik/BG oranları hesaplandı. ^{99m}Tc -Zoledronik Asit için en yüksek Kemik/BG oranı distal epifizde 180. dakikada $3,36 \pm 1,14$ olarak bulundu.

İn vivo çalışmalarda, statik görüntülerden elde edilen Hedef/BG oranları, ^{99m}Tc -Zoledronik Asit kompleksinin yumuşak doku ve kemiklerde hızla tutulmaya başladığını, böbreklerden elimine olarak mesanede toplandığını gösterdi.

Daha önce ^{99m}Tc -Zoledronik Asit ile yapılan başka çalışmalarda (103) radyofarmasötüğün karaciğerde tutulduğu görülürken, bu çalışmadan elde edilen görüntülerde karaciğerde spesifik bir tutulum gözlenmedi. Radyofarmasötiklerde bulunan safsızlıklar yumuşak doku tutulumlarına sebep olabilir. İ-H Teknesyum, kolloid formda dalak ve karaciğerde lokalize olur (107). Yapılan radyokimyasal saflık kontrollerinde İ-H Teknesyum radyokontaminant oranının düşük olması ve işaretleme veriminin yüksek olması nedeniyle in vivo çalışmalarda karaciğer tutulumu gözlenmedi. Bunun geliştirilen formülasyona ait bir avantaj olduğu düşünüldü.

Optimum ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonu izotoni açısından değerlendirildi. Distile su, %0,9 NaCl ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonu çözeltileri içinde eritrositlerin hemolize uğrayıp uğramadıkları araştırıldı. 1500 devirde 5 dakika santrifüjlenen tüpler içindeki eritrositlerin davranışları

incelediğinde distile su içinde eritrositlerin hemolize uğradıkları, serum fizyolojik ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonları içindeki eritrositlerin aynı davranışı göstererek çöktükleri gözlemlendi. Tüplerden alınan örnekler mikroskopta incelendiğinde distile su içinde hemolize uğrayan eritrositlerin serum fizyolojik ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonu çözeltisi içinde hemolize uğramadıkları gözlemlendi.

^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in tavşanlara verilmesinden sonra gama kamera ile elde edilen görüntülerdeki farklı kemiklere ait Hedef/BG oranları arasında anlamlı fark olup olmadığı incelendi. ^{99m}Tc -Zoledronik Asit'in omuz, torakal vertebra, vertebra, distal epifiz ve proksimal epifiz tutulumları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0,05$). Bifosfonat molekülleri lipofil değildirler ve sulu çözeltilerinde negatif yüklüdürler ve bu sebeple yumuşak doku membranlarındaki permeabiliteleri düşüktür. Kemikte lokalizasyonları hidroksiapatit kristallerine olan kimyasal afinitelerinden kaynaklanmaktadır (35). ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun suda çözünürlüğünün iyi olması, kemik/BG oranlarının yüksek, yumuşak doku tutulumunun düşük olması bu literatür bilgisine paralellik göstermektedir.

Sonuç olarak; osteoporoz, Paget Hastalığı, maligniteye bağlı hiperkalsemi ve multipl myelomda kullanılan bir bifosfonat olan Zoledronik Asit, nükleer tıpta kemik görüntüleme ajanı olarak kullanılmak üzere terapötik dozdan daha düşük dozda, ^{99m}Tc ile başarı ile işaretlendi. Tavşanlarla yapılan gama sintigrafi çalışmalarından olumlu sonuçlar alındı ve ^{99m}Tc -Zoledronik Asit formülasyonunun umut verici bir kemik görüntüleme ajanı olabileceği görüldü.

ÖZET

^{99m}Tc-ZOLEDRONİK ASİDİN İŞARETLEME VERİMİNE DENEYSEL

KOŞULLARIN ETKİSİ

Kemik sintigrafisi, radyoaktif izotopların kemiğe olan afinitesinin bulunmasından bu yana kullanılan, planar ve/veya tomografik görüntüleme yapabilen duyarlı bir yöntemdir. Kemik sintigrafisinde, ^{99m}Tc-Bifosfonat bileşikler tercih edilmektedir. Bu amaçla en çok kullanılan radyofarmasötik, ^{99m}Tc-MDP'dir.

Bu çalışmada, bir kemik rezorpsiyon inhibitörü ve bifosfonat türevi olan Zoledronik Asit'in terapötik dozdan daha düşük dozlarda ^{99m}Tc ile işaretlenmesi amaçlandı. Zoledronik Asit'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesinde, işaretleme verimine etkin madde, Kalay Klorür, Askorbik Asit ve ^{99m}Tc miktarlarının ve pH'ın etkisi incelendi. Ayrıca deney hayvanlarında gama kamera ile görüntüleme çalışmaları gerçekleştirildi.

Zoledronik Asit, ^{99m}Tc ile direkt işaretleme yöntemi ile işaretlendi. Deneysel koşulların radyoişaretli kompleksin işaretleme verimi, radyokimyasal saflığı ve stabilitesi üzerindeki etkisi kağıt kromatografisi kullanılarak incelendi. Optimum formülasyon olarak 0,05 mg Zoledronik Asit, 0,04 mg Kalay Klorür, 0,005 mg Askorbik Asit ve 3 mCi ^{99m}Tc içeren ve pH değeri 5,85 olan formülasyon seçildi. Formülasyonun, işaretleme veriminin %95'ten büyük olduğu ve oda sıcaklığında (25±3 C°) yapılan stabilite testinde en az 10 saat boyunca stabil olduğu gözlemlendi.

İn vivo çalışmalarda kullanılmak üzere geliştirilen optimum formülasyon Gama kamera ile gerçekleştirilen görüntüleme çalışmalarında yaklaşık 2,5 kg ağırlığındaki 4 adet dişi Yeni Zelanda tavşanına sağ kulak venlerinden, 0,75 mCi dozda verildi. 180 dakika boyunca belirlenen zamanlarda statik görüntüler alındı,

görüntüleme çalışmasından sonra ilgi alanları çizildi ve Kemik/BG oranları hesaplandı.

Zoledronik Asit terapötik dozdan düşük dozlarda ^{99m}Tc ile başarıyla işaretlendi ve umut verici bir kemik görüntüleme ajanı olabileceği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler : Zoledronik Asit, Bifosfonatlar, Gama Sintigrafi, ^{99m}Tc Radyofarmasötikleri

ABSTRACT

THE EFFECT OF EXPERIMENTAL CONDITIONS ON LABELING YIELD OF ^{99m}Tc -ZOLEDRONIC ACID

Bone scintigraphy is a very sensitive method that is capable of planar and / or tomographic imaging. It has been being used since the discovery of the affinity of radioactive isotopes to bone . ^{99m}Tc -Biphosphonate complexes are mostly preferred for bone scintigraphy. The most common used radiopharmaceutical for bone scintigraphy is ^{99m}Tc -MDP.

In this study, the aim is labeling Zoledronic Acid, a bone resorption inhibitor and a bisphosphonate derivative, with ^{99m}Tc . The effect of Zoledronic Acid, Stannous Chloride, Ascorbic Acid and ^{99m}Tc activity amount and pH value on labeling yield were investigated. In addition, bone imaging studies on rabbits were performed by gamma scintigraphy.

Zoledronic Acid was labeled with ^{99m}Tc using direct labeling method. The effect of experimental conditions on labeling efficiency, radiochemical purity and stability of the radiolabeled complex were determined by paper chromatography. The formulation which contains 0,05 mg Zoledronic Acid, 0,04 mg Stannous Chloride, 0,005 mg Ascorbic Acid and 3 mCi ^{99m}Tc was chosen as optimum formulation. It was observed that the labeling yield was greater than % 95 and the formulation was stable for at least 10 hours during the stability tests performed at room temperature ($25\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$).

In gamma scintigraphy studies, approximately 2,5 kg weighed, four female, New Zealand white rabbits were used. 0,75 mCi ^{99m}Tc -Zoledronic Acid was administrated intravenously to each rabbits. Static images at the times determined

during 180 minutes were obtained. After the imaging study on rabbits, regions of interest were drawn and Bone/BG ratios were calculated.

Zoledronic acid was successfully labeled with ^{99m}Tc at non-therapeutic, lower doses and proven that it has promising characteristics for bone scintigraphy .

Keywords : Zoledronic Acid, Biphosphonates, Gamma Scintigraphy, ^{99m}Tc
Radiopharmaceuticals

KAYNAKLAR

1. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Biochem.* 1994;55(3):287-99.
2. Arino H, Kramer HH. Fission product ^{99m}Tc generator. *Int J Appl Radiat Isot.* 1975;26(5):301-3.
3. Asikoglu M, Durak FG. The rabbit biodistribution of a therapeutic dose of zoledronic acid labeled with Tc-99m. *Appl Radiat Isotopes.* 2009;67(9):1616-21.
4. Becker W. Guidelines for Gallium-67 citrate scintigraphy in inflammatory diseases. *Nuklearmed.* 1999;38(6A):247-8.
5. Bevan JA, Tofe AJ, Benedict JJ, Francis MD, Barnett BL. Tc-99m HMDP (hydroxymethylene diphosphonate): a radiopharmaceutical for skeletal and acute myocardial infarct imaging. II. Comparison of Tc-99m hydroxymethylene diphosphonate (HMDP) with other technetium-labeled bone-imaging agents in a canine model. *J Nucl Med.* 1980;21(10):967-70.
6. Bhatnagar A, Mishra P, Sharma R, Chuttani K, Chakravarty K, Jain CM, et al. ^{99m}Tc -Citrate: a new bone imaging radiopharmaceutical. *Nucl Med Commun.* 1999;20(11):1067-76.
7. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38.
8. Boyd RE. Tc-99m Generators - Prospects for developing nuclear countries facilities. *Appl Radiat Isotopes.* 1986;37(6):551-.
9. Britton KE. Nuclear medicine imaging in bone metastases. *Cancer Imaging.* 2002;2:84-6.
10. Calleja M, Alam A, Wilson D, Bradley K. Basic science: nuclear medicine in skeletal imaging. *Curr Orthopaed.* 2005;19(1):34-9.
11. Caner B, Kitapcl M, Unlu M, Erben G, Calikoglu T, Gogus T, et al. Technetium-99m-MIBI uptake in benign and malignant bone-lesions - a Comparative-study with Technetium-99m-MDP. *J Nucl Med.* 1992;33(3):319-24.
12. Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician.* 2001;63(12):2413-20.
13. Chan G, Mckay WJ, Miller BR, Shilson AD. Radiopharmaceutical cold kit production - a pharmacists view. *Aust Nz J Med.* 1983;13(6):665-.
14. Chen TL, Berenson J, Vescio R, Swift R, Gilchick A, Goodin S, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with bone metastases. *J Clin Pharmacol.* 2002;42(11):1228-36.
15. Cornud F, Oyen R. Role of imaging in the diagnosis and staging of prostatic adenocarcinomas. *J Radiol.* 2002;83(6 Pt 2):863-80, discussion 81-2.
16. Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sehti S, Ralston SH, Hamilton A, et al. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: Inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res.* 2000;15(8):1467-76.
17. Coxon JP, Oades GM, Kirby RS, Colston KW. Zoledronic acid induces apoptosis and inhibits adhesion to mineralized matrix in prostate cancer cells via inhibition of protein prenylation. *Bju Int.* 2004;94(1):164-70.
18. Çetin Önsel FK, (Ed) Görütüleme Yöntemleri Sempozyumu 1. Basım ed. İstanbul 2010.
19. Dennis L. Nosco JAB-N. Chemistry of technetium radiopharmaceuticals 1: Chemistry behind the development of technetium-99m compounds to determine kidney function. *Coordination Chemistry Reviews.* 1999(184):91-123.
20. Diezjimenez L, Gutierrezgonzalez ME, Guitianiglesias R, Borrellmerlin MP, Llovetverdugo A, Arnaizbuena F. Clinical uses of Thallium-201 myocardial imaging. *Rev Clin Esp.* 1980;157(6):381-5.
21. Durak FG. Kemik Sintigrafisi İçin Yeni ^{99m}Tc Bifosfonat Radyofarmasötiklerinin Geliştirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005.
22. Elliott A. Medical imaging. *Nucl Instrum Meth A.* 2005;546(1-2):1-13.

23. Emir Şilit CÇB, Hakan Mutlu, Zekai Pekkaflı, Eşref Kızılkaya, A. Fevzi Karşlı. Kemik metastazı taramasında Tc-99m-MDP kemik sintigrafisi ile MRG'nin karşılaştırılması. Tanısal ve Girişimsel Radyoloji. 2003;9:357-61.
24. Fleisch H. Bisphosphonates: mechanisms of action. Expert Opin Ther Pat. 2001;11(9):1371-81.
25. Fox A, Patel S, McNair K, Kesingland A, Urban L, Green JR. Zoledronic acid, a potent new bisphosphonate, reverses mechanical hyperalgesia in two rat models of chronic inflammatory and neuropathic pain. Bone. 2001;28(5):S224-S.
26. Füsün Aydoğan RÖ. Kemik sintigrafisinin klinik kullanımı. Tıp Araştırmaları Dergisi. 2010;8(3):210-20.
27. Gennaro A, editor. Remington : The Science and Practice of Pharmacy: Lippincott Williams-Wilkins; 2000.
28. Green JR. Chemical and biological prerequisites for novel bisphosphonate molecules: Results of comparative preclinical studies. Semin Oncol. 2001;28(2):4-10.
29. Green JR. Zoledronic acid: pharmacologic profile of a potent bisphosphonate. J Organomet Chem. 2005;690(10):2439-48.
30. Green JR, Rogers MJ. Pharmacologic profile of zoledronic acid: A highly potent inhibitor of bone resorption. Drug Develop Res. 2002;55(4):210-24.
31. Guise TA. Antitumor effects of bisphosphonates: Promising preclinical evidence. Cancer Treat Rev. 2008;34:S19-S24.
32. Hammermaier A, Reich E, Bogl W. Chemical, radiochemical, and radionuclide purity of eluates from different commercial fission Mo-99 Tc-99m generators. Eur J Nucl Med. 1986;12(1):41-6.
33. Handeland AM, Sundrehagen E. Determination of the oxidation state of 99mTc in complexes with MDP and DTPA. Int J Rad Appl Instrum A. 1987;38(6):479-84.
34. Hillner BE, Ingle JN, Berenson JR, Janjan NA, Albain KS, Lipton A, et al. American Society of Clinical Oncology guideline on the role of bisphosphonates in breast cancer. J Clin Oncol. 2000;18(6):1378-91.
35. Hirabayashi H, Fujisaki J. Bone-specific drug delivery systems - Approaches via chemical modification of bone-seeking agents. Clin Pharmacokinet. 2003;42(15):1319-30.
36. Holder LE. Bone-scintigraphy in skeletal trauma. Radiol Clin N Am. 1993;31(4):739-81.
37. http://en.wikipedia.org/wiki/Zoledronic_acid
38. http://genelbiyoloji.com/wp-content/uploads/2010/05/histoloji_5.pdf.
39. http://www-pub.iaea.org/MTCD/publications/PDF/Pub1405_web.pdf. Technetium-99m Radiopharmaceuticals : Status and Trends. Vienna: International Atomic Energy Agency; 2009.
40. <http://www.iaea.org>.
41. <http://www.zometa.com>.
42. Hughes DE, Wright KR, Uy HL, Sasaki A, Yoneda T, Roodman GD, et al. Bisphosphonates promote apoptosis in murine osteoclasts in-vitro and in-vivo. J Bone Miner Res. 1995;10(10):1478-87.
43. Hughes S. The distribution of ^{99m}Tc-EHDP in the tissues of the dog and its application in the assessment of fracture healing. Ann R Coll Surg Engl. 1977;59(4):322-7.
44. İlem D. Alendronat Sodyumun Farklı Formülasyonlardaki Biyoyararlanımı [Yüksek Lisans Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
45. Imran MB, Khurshid SJ, Karim HMA. Biological and radiochemical quality-control of indigenous Tc(99m)-radiopharmaceutical kits. J Radioan Nucl Ch Le. 1993;176(3):211-23.
46. Khalil MM, (Ed). Basic Sciences of Nuclear Medicine. Berlin: Springer; 2007.
47. Koji Nakanishi PHS,(Ed). Infrared Absorption Spectroscopy. 2nd Edition ed. San Francisco: Holden-Day Inc; 1977.
48. Kowalsky RJ, editor. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. Second Edition ed: Ame rican Pharmacists Association; 2004.

49. Labriola RA, Tombari, Dora G., Vecchioli, Adriana, inventor Gador S. A., assignee. Crystalline form of the Zoledronic Acid, a process to obtain it and the pharmaceutical composition comprising it. A.B.D.2008.
50. Lambrecht RM, Tomiyoshi K, Sekine T. Radionuclide generators. *Radiochim Acta*. 1997;77(1-2):103-23.
51. Li EC, Davis LE. Zoledronic acid: a new parenteral bisphosphonate. *Clin Ther*. 2003;25(11):2669-708.
52. Lin J, Qiu L, Cheng W, Luo S, Ye W. Preparation and in vivo biological investigations on a novel radioligand for bone scanning: technetium-99m-labeled zoledronic acid derivative. *Nucl Med Biol*. 2011;38(5):619-29.
53. Lin JG, Luo SN, Chen CP, Qiu L, Wang Y, Cheng W, et al. Preparation and preclinical pharmacological study on a novel bone imaging agent (99m)Tc-EMIDP. *Appl Radiat Isotopes*. 2010;68(9):1616-22.
54. Lipton A. Emerging role of bisphosphonates in the clinic--antitumor activity and prevention of metastasis to bone. *Cancer Treat Rev*. 2008;34 Suppl 1:S25-30.
55. Liu S, Edwards DS. 99mTc-labeled small peptides as diagnostic radiopharmaceuticals. *Chem Rev*. 1999;99(9):2235-68.
56. Llana B, Nunez R, Roiz C, Raigoso P, Allende T, Sanchez A, et al. Assessment of cerebral perfusion with ^{99m}Tc-HMPAO-single photon emission computer tomography (SPECT) following carotid endarterectomy (CE). *Eur J Nucl Med*. 1999;26(9):1132-.
57. Love C, Din AS, Tomas MB, Kalappambath TP, Palestro C. Radionuclide bone imaging: An illustrative review. *Radiographics*. 2003;23(2):341-58.
58. Major P, Lortholary A, Hon J, Abdi E, Mills G, Menssen HD, et al. Zoledronic acid is superior to pamidronate in the treatment of hypercalcemia of malignancy: A pooled analysis of two randomized, controlled clinical trials. *J Clin Oncol*. 2001;19(2):558-67.
59. Michael J. Welch CSR. Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications 2003.
60. Monroy-Guzman F, Diaz-Archundia LV, Ramirez AC. Effect of Zr : Mo ratio on Tc-99m generator performance based on zirconium molybdate gels. *Appl Radiat Isotopes*. 2003;59(1):27-34.
61. Morales AA, Crespo FZ, Gandolff GN, Iznaga Escobar N, Perez NP, Hernandez JC. Technetium-99m direct radiolabeling of monoclonal antibody for egf/r3. *Nucl Med Biol*. 1998;25(1):25-30.
62. Motaleb MA. Preparation, quality control and stability of ^{99m}Tc-sparafloxacin complex, a novel agent for detecting sites of infection. *J Labelled Compd Rad*. 2009;52(9-10):415-8.
63. Neves M, Gano L, Pereira N, Costa MC, Costa MR, Chandia M, et al. Synthesis, characterization and biodistribution of bisphosphonates Sm-153 complexes: correlation with molecular modeling interaction studies. *Nucl Med Biol*. 2002;29(3):329-38.
64. Oh SJ, Ryu JS, Shin JW, Yoon EJ, Ha HJ, Cheon JH, et al. Synthesis of Tc-99m-ciprofloxacin by different methods and its biodistribution. *Appl Radiat Isotopes*. 2002;57(2):193-200.
65. Özgür Ö CK, Ömer U. Kas iskelet sistemi hastalıklarında nükleer tıp yöntemleri. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Dergisi*. 2007;6(1-2):1-29.
66. Palmedo H, Bender H, Schomburg A, Grunwald F, Schoneich G, Zamorra P, et al. Therapy with rhenium-186 HEDP in painful bone metastases. *Nuklearmed*. 1996;35(2):63-7.
67. Pauwels EK, Feitsma RI. Radiochemical quality control of 99mTc-labeled radiopharmaceuticals. Some daily practice guidelines. *Eur J Nucl Med*. 1977;2(2):97-103.
68. Perry CM, Figgitt DP. Zoledronic acid - A review of its use in patients with advanced cancer. *Drugs*. 2004;64(11):1197-211.
69. Peter F. Sharp HGG, Allison D. Murray, (Ed). Practical Nuclear Medicine. Third Edition ed. London: Springer-Verlag; 2005.
70. Poggenburg JK. The nuclear reactor and its products. *Semin Nucl Med*. 1974;4(3):229-43.

71. Qiu L, Cheng W, Lin J, Luo S, Xue L, Pan J. Synthesis and biological evaluation of novel (99m)Tc-labeled bisphosphonates as superior bone imaging agents. *Molecules*. 2011;16(8):6165-78.
72. Rachel A. Powsner ERP, (Ed). *Essential Nuclear Medicine Physics*. Massachusetts: Blackwell Publishing Ltd.; 2006.
73. Rao DVNS. Novel procedure for the synthesis of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonic acids using phenols as medium (vol 37, pg 4359, 2007). *Synthetic Commun*. 2008;38(3):473-.
74. Rao DVNS, Dandala R, Narayanan GKASS, Lenin R, Sivakumaran M, Naidu A. Novel procedure for the synthesis of 1-hydroxy-1,1-bisphosphonic acids using phenols as medium. *Synthetic Commun*. 2007;37(22-24):4359-65.
75. Rodan GA, Fleisch HA. Bisphosphonates: Mechanisms of action. *J Clin Invest*. 1996;97(12):2692-6.
76. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer-Am Cancer Soc*. 2000;88(12 Suppl):2961-78.
77. Rogers MJ, Watts DJ, Russell RGG. Overview of bisphosphonates. *Cancer-Am Cancer Soc*. 1997;80(8):1652-60.
78. Roohi S, Mushtaq A, Malik SA. Synthesis and biodistribution of Tc-99m-Vancomycin in a model of bacterial infection. *Radiochim Acta*. 2005;93(7):415-8.
79. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40 years. *Bone*. 2011;49(1):2-19.
80. Russell RGG, Croucher PI, Rogers MJ. Bisphosphonates: Pharmacology, mechanisms of action and clinical uses. *Osteoporosis Int*. 1999;9:66-80.
81. Russell RGG, Rogers MJ, Frith JC, Luckman SP, Coxon FP, Benford HL, et al. The pharmacology of bisphosphonates and new insights into their mechanisms of action. *J Bone Miner Res*. 1999;14:53-65.
82. Saha GB. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*. 6th edition ed. Saha GB, editor. London: Springer; 2010.
83. Saha GB. Radionuclide Generators. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, Sixth Edition. 2010:67-82.
84. Saha GB, Macintyre WJ, Go RT. Cyclotrons and Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals for Clinical Imaging. *Semin Nucl Med*. 1992;22(3):150-61.
85. Sampson CB, editor. *Textbook of Radiopharmacy : theory and practice*. Third Edition ed. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers; 1999.
86. Santos-Oliveira R, Smith SW, Carneiro-Leao AMA. Radiopharmaceuticals drug interactions: a critical review. *An Acad Bras Cienc*. 2008;80(4):665-75.
87. Sato M, Grasser W, Endo N, Akins R, Simmons H, Thompson DD, et al. Bisphosphonate action - Alendronate localization in rat bone and effects on osteoclast ultrastructure. *J Clin Invest*. 1991;88(6):2095-105.
88. Savelli G, Maffioli L, Maccauro M, De Deckere E, Bombardieri E. Bone scintigraphy and the added value of SPECT (single photon emission tomography) in detecting skeletal lesions. *Q J Nucl Med*. 2001;45(1):27-37.
89. Schwochau K. *Technetium Chemistry and Radiopharmaceutical Applications*: Wiley; 1997.
90. Shikata E, Iguchi A. Application of Mo-99 to nuclear-medicine and its production. *J Atom Energ Soc Jpn*. 1984;26(8):662-70.
91. Shipman CM, Rogers MJ, Apperley JF, Graham R, Russell G, Croucher PI. Bisphosphonates induce apoptosis in human myeloma cell lines: a novel anti-tumour activity. *Brit J Haematol*. 1997;98(3):665-72.
92. Shmerling RH, Goldring SR. Intravenous zoledronic acid in postmenopausal women with low bone mineral density. *Comment. Clin Exp Rheumatol*. 2003;21(2):151-2.
93. Silverman SL, Maricic M. Recent developments in bisphosphonate therapy. *Semin Arthritis Rheu*. 2007;37(1):1-12.
94. Skerjanec A, Berenson J, Hsu CH, Major P, Miller WH, Ravera C, et al. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of zoledronic acid in cancer patients with varying degrees of renal function. *J Clin Pharmacol*. 2003;43(2):154-62.

95. Skyes AG, (Ed). *Advances in Inorganic Chemistry*: Academic Press; 1994.
96. Souris JS. Seeing the light in bone metabolism imaging. *Trends Biotechnol.* 2002;20(9):364-6.
97. Stokkel MPM, Olmos RAV, Hoefnagel CA, Richel DJ. Tumor and therapy associated abnormal changes on bone-scintigraphy - old and new phenomena. *Clin Nucl Med.* 1993;18(10):821-8.
98. Sugawara Y, Kikuchi T, Kajihara M, Semba T, Ochi T, Fujii T, et al. Thallium-201 scintigraphy in bone and soft-tissue tumors: a comparison of dynamic, early and delayed scans. *Ann Nucl Med.* 2005;19(6):461-8.
99. Sundrehagen E. Formation of reduced Tc-99m by concentrated hydrochloric-acid and vacuum evaporation. *Int J Appl Radiat Is.* 1982;33(2):89-91.
100. Vallabhajosula S, Killeen RP, Osborne JR. Altered biodistribution of radiopharmaceuticals: Role of radiochemical/pharmaceutical purity, physiological, and pharmacologic factors. *Semin Nucl Med.* 2010;40(4):220-41.
101. Vanaardenne YT, Winter WA, Verdegaal WP, Taconis WK. Detection of inflammatory Bowel-disease with Tc-99m DTPA. *Diagn Imaging.* 1980;49(6):334-8.
102. Wang TS, Fawwaz RA, Johnson LJ, Mojdehi GE, Johnson PM. Bone-seeking properties of Tc-99m carbonyl diphosphonic acid, dihydroxy-methylene diphosphonic acid and monohydroxy-methylene phosphonic acid: concise communication. *J Nucl Med.* 1980;21(8):767-70.
103. Wang Y, Luo S, Lin J, Qiu L, Cheng W, Zhai H, et al. Animal studies of 99mTc-i-PIDP: a new bone imaging agent. *Appl Radiat Isot.* 2011;69(9):1169-75.
104. Wellington K, Goa KL. Zoledronic acid - A review of its use in the management of bone metastases and hypercalcaemia of malignancy. *Drugs.* 2003;63(4):417-37.
105. Wellman HN, Schauwecker D, Robb JA, Khairi MR, Johnston CC. Skeletal scintimaging and radiography in the diagnosis and management of Paget's disease. *Clin Orthop Relat Res.* 1977(127):55-62.
106. Zolle I, (Ed). *Technetium - 99m Pharmaceuticals : Preparation and Quality Control in Nuclear Medicine*: Springer; 2007.
107. Zuckier LS, Freeman LM. Nonosseous, nonurologic uptake on bone scintigraphy: atlas and analysis. *Semin Nucl Med.* 2010;40(4):242-56.

ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Çumra / Konya’da doğdum. Ortaöğretimimi Antalya Serik Anadolu Lisesi’nde tamamladıktan sonra 2004 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ni kazandım. 2008 yılında mezun olduktan sonra 2009 yılında Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimime başladım. Aralık 2011’den beri aynı anabilim dalında araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım