

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TANI AMACIYLA KULLANILMAK ÜZERE METOTREKSATIN Tc-99m
İLE İŞARETLENMESİ VE KALİTE KONTROLÜ**

RADYOFARMASİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMRE ÖZGENÇ

İZMİR

2015

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TANI AMACIYLA KULLANILMAK ÜZERE METOTREKSATIN Tc-99m
İLE İŞARETLENMESİ VE KALİTE KONTROLÜ**

RADYOFARMASİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

EMRE ÖZGENÇ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu

İZMİR

2015

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan

: Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu

(Danışman)

Üye

: Prof. Dr. Gülten Kantarcı

Üye

: Yard. Doç. Dr. Derya İlem Özdemir

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih: 15.01.2015

ÖNSÖZ

Lisans döneminde ve yüksek lisans eğitimim boyuncaengin bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu'na,

Yüksek lisans eğitimim boyunca desteklerini esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Evren Atlıhan Gündoğdu ve Yard. Doç. Dr. Derya İlem Özdemir'e,

E.Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nda çalışmam süresince sağladığı imkan ve yardımlarından dolayı Prof. Dr. Zeynep Burak'a, desteklerini esirgemeyen Nükleer Tıp Anabilim Dalı'nın tüm personeline,

FTIR çekimlerinin yapılması ve sonuçlarının yorumlanması sırasında yardımlarını esirgemeyen Yard. Doç. Dr. Zeynep Soyer'e,

E.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Bilimler Araştırma Laboratuvarında yaptığım tüm çalışmalar boyunca yardımlarını esirgemeyen Uzm. Kim. Müh. Çiğdem Yengin'e, Kimyager Nihan Atabaş'a, Kimyager Esra Engin'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman desteğini gördüğüm oda arkadaşım Meliha Ekinci'ye,

Çalışmalarım boyunca destek ve yardımlarını esirgemeyen Özlem Bozkurt'a,

Hayatım boyunca verdikleri destek, gösterdikleri ilgi ve sevgileri ile her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İzmir 2015

Emre Özgenç

ÖZET

Tanı Amacıyla Kullanılmak Üzere Metotreksatın Tc-99m ile İşaretlenmesi ve Kalite Kontrolü

Dünyada önemli bir sağlık sorunu olan kanserin erken evrede tanısı amacıyla pek çok araştırmacı, kanser hücrelerine spesifik yeni radyofarmasötikler geliştirmeye çalışmaktadır. Yapılan çalışmalar; folat reseptörlerinin tümör dokusunda, sağlıklı dokulara kıyasla, oldukça yüksek miktarda bulunduğunu göstermektedir. Bu özellik folat reseptörlerini, tümör dokusunu hedefleme amacı ile kullanılabilecek hedefleyici ajan haline getirmektedir.

Bu çalışmada folat reseptörlerine olan yüksek afinitesi sebebi ile kemoterapötik bir ilaç olan Metotreksat (MET) ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenerek yeni bir radyofarmasötik hazırlanması amaçlanmıştır. MET'in ^{99m}Tc işaretlenmesi sırasında varolan yöntem modifiye edilip yeni bir yöntem geliştirilmiştir. İşaretleme verimine kalay tartarat, askorbik asit ve ^{99m}Tc miktarının etkisi araştırılmıştır.

DeneySEL koşulların radyoişaretleli kompleksin işaretleme verimi, radyokimyasal saflığı ve stabilitesi üzerindeki etkisi ince tabaka kromatografisi ve radyo yüksek performanslı sıvı kromatografisi kullanılarak incelenmiştir. Optimum formülasyon olarak 1 mg MET 1 mg kalay tartarat ve 0,1 mg askorbik asit ve 1 mCi ^{99m}Tciçeren formülasyon seçildi. Formülasyonun işaretleme verimliliğinin %90'dan büyük olduğu ve oda sıcaklığında yapılan stabilite testinde 24 saat boyunca stabil olduğu gözlemlendi.

Ayrıca parenteral preparatlar için yapılması gereken sterilite testi ve izotoni testi hazırlanan formülasyon için uygulanmıştır. Formülasyonun steril ve hipertonic olduğu belirlenmiştir.

Sonuç olarak, MET'in terapötik dozdan düşük dozda ^{99m}Tc ile yüksek verimlilik ile işaretlendiği ve tümör dokularının görüntülenmesinde görüntüleme ajanı olarak kullanılabileceği bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Metotreksat; ^{99m}Tc; Radyoişaretleme; Kalite Kontrol

ABSTRACT

Methotrexate Radiolabelling with Tc-99m and Quality Control For Use in

Dagnosis

Diagnosed at an early stage of cancer is an important health problem in the world. Many researchers study on developing new radiopharmaceuticals which are specific to cancer cells. Recent studies showed that folate receptors in tumor tissue compared with healthy tissue indicates that they have been high amount in tumor tissue. This feature aims to the use of folate receptors in tumor tissue makes the potential tumor targeting agent.

In this study, a chemotherapeutic drug that is the cause of high affinity folate receptor (Methotrexate) labeled with ^{99m}Tc radionuclide as a new radiopharmaceuticals. There is a method for labeling Methotrexate with ^{99m}Tc . This method is modifying and a new method has been developed. The effect of tin tartarate, ascorbic acid and the amount of ^{99m}Tc on labeling efficiency was investigated.

The effect of experimental conditions on the radiolabeled complex labeling efficiency, the radiochemical purity and stability was examined by using thin layer chromatography and radio high pressure liquid chromatography. The optimal formulation 1 mg Methotrexate, 1 mg tin tartrate, 0,1 mg ascorbic acid and 1 mCi ^{99m}Tc the formulation was chosen. The formulation is greater than 90% labeling efficiency. Stability tests performed at room temperature for 24 hours and formulation was found to be stable.

In addition, the sterility test and isotonic test were applied to the formulation. The formulation was determined to be sterile and hypertonic.

Consequently, methotrexate is labeled with ^{99m}Tc at high efficiency with low therapeutic doses and ^{99m}Tc labeled methotrexate has been found that can be used as imaging agents for imaging tumor tissue.

Keywords: Metotrexate; ^{99m}Tc ; Radiolabeling; Quality Control

İçindekiler

ÖNSÖZ	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
Tablolar Listesi.....	ix
Şekiller Listesi	xi
KISALTMA LİSTESİ	xiii
GİRİŞ-AMAÇ	1
BÖLÜM I	4
1 GENEL BİLGİLER	4
1.1 Radyofarmasötikler	4
1.1.1 Radyofarmasötiklerin Tasarımında Dikkat Edilecek Hususlar.....	5
1.1.2 Teknesyum	6
1.2 Radyonüklitlerin Üretimi	7
1.2.1 Reaktörde Üretilen Radyonüklitler	7
1.2.2 Siklotronda Üretilen Radyonüklitler	8

1.2.3	Jeneratörde Üretilen Radyonüklitler	8
1.3	Radyofarmasötiklerde Yapılan Kalite Kontrol İşlemleri.....	10
1.3.1	Radyonüklidik Safılık	10
1.3.2	Kimyasal Safılık.....	11
1.3.3	Radyokimyasal Safılık	11
1.4	Radyoişaretleme.....	11
1.4.1	İşaretleme Metotları	11
1.5	Nükleer Tıp Görüntüleme YöntemLeri	12
1.6	Sintigrafik Görüntüleme Teknikleri	13
	Statik Görüntüleme:.....	13
	Dinamik Görüntüleme:.....	13
	Tüm Vücut Görüntüleme:	13
	Tomografik (SPECT ve PET) Görüntüleme:.....	13
	Hibrid Görüntüleme:	14
1.7	Kanser	14
1.7.1	Kanser Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	15
1.8	Metotreksat.....	18

1.8.1	Farmakolojisi ve Farmakokinetiği	19
1.8.2	Etki Mekanizması	20
1.8.3	MET'in Yan Etkileri	21
BÖLÜM II		24
2	GEREÇ VE YÖNTEM	24
2.1	Kullanılan Gereçler	24
2.1.1	Kullanılan Kimyasal Maddeler	24
2.1.2	Kullanılan Alet ve Malzemeler	25
2.2	KULLANILAN YÖNTEMLER	26
2.2.1	MET'e Ait YöntemLer	26
2.2.2	^{99m} Tc-MET'in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilesinin Hesaplanması ...	32
BÖLÜM 3		37
3	BULGULAR	37
3.1	MET'e Ait Bulgular	37
3.1.1	FTIR Analizi ve Tanımlanması	37
3.1.1	UV Analizi ve Tanımlanması	38
3.1.2	MET'in ^{99m} Tc Radyonüklidi ile İşaretlenmesi.....	39

3.1.3	^{99m}Tc -MET Kompleksinin Stabilité Testleri	67
3.1.4	^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilitésinin Hesaplanması ...	71
BÖLÜM IV		77
4	TARTIŞMA-SONUÇ.....	77
4.1	MET'e Ait Bulguların Tartışılması	81
4.1.1	Fourier Transform Infra-Red Spektrumu Analizi.....	81
4.1.2	MET'in ^{99m}Tc Radyonüklidi ile İşaretlenmesi.....	81
4.1.3	İndirgen Ajan Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitésini Üzerine Etkisi	81
4.1.4	Süzme İşleminin ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitésini Üzerine Etkisi	82
4.1.5	Askorbik Asit Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitésini Üzerine Etkisi	83
4.1.6	Radyoaktivite Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitésini Üzerine Etkisi	83
4.1.7	^{99m}Tc -MET Kompleksinin Stabilité Testleri	84
4.1.8	^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilitésinin Hesaplanması ...	84
KAYNAKLAR		86



Tablolar Listesi

Tablo 1: Kalay tartarat miktarının ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar	28
Tablo 2: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine süzme işleminin etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri	29
Tablo 3: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine askorbik asitin etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri	31
Tablo 4: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine radyoaktivite miktarının etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri	32
Tablo 5: Radyo UHPLC çalışmalarında kullanılan akış prosedürü	33
Tablo 6: R-UHPLC çalışmalarında kullanılan formülasyonun içeriği	34
Tablo 7: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri	40
Tablo 8: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları	41
Tablo 9: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları	42
Tablo 10: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdeleri ve standart sapmaları	43
Tablo 11: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları	46
Tablo 12: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları	47
Tablo 13: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmasından önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri ^{99m}Tc -MET yüzdeleri ve standart sapmaları	48

Tablo 14: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları	53
Tablo 15: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları	55
Tablo 16: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği Tc-MET yüzdeleri ve standart sapmaları	57
Tablo 17: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları	63
Tablo 18: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları	64
Tablo 19: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri ve standart sapmaları	65
Tablo 20: Oda sıcaklığında bekletilen $^{99m}\text{Tc-MET}$ formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarları ile $^{99m}\text{Tc-MET}$ radyokimyasal saflık yüzdeleri ve standart sapmaları	68
Tablo 21: Kan serumunda bekletilen $^{99m}\text{Tc-MET}$ formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarları ile $^{99m}\text{Tc-MET}$ radyokimyasal saflık yüzdeleri ve standart sapmaları	70
Tablo 22: $^{99m}\text{Tc-MET}$ formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ safsızlıkları ve $^{99m}\text{Tc-MET}$ 'in farklı solvan sistemlerindeki R_f değerleri	71

Şekiller Listesi

Şekil 1: $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörünün şematik şekli	9
Şekil 2: Met'in Kimyasal Yapısı (33)	19
Şekil 3: Folat-ilaç konjugatının reseptör aracılı endositoz ile hücre içine girişi	20
Şekil 4: MET'in FTIR spektrumu	37
Şekil 5: MET'in kimyasal yapısı	38
Şekil 6: MET'e ait UV spektrumu	38
Şekil 7: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	44
Şekil 8: 500 µg kalay tartarat içeren $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	49
Şekil 9: 750 µg kalay tartarat içeren $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	49
Şekil 10: 1000 µg kalay tartarat içeren $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	50
Şekil 11: 1250 µg kalay tartarat içeren $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	50
Şekil 12: 1500 µg kalay tartarat içeren $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	51
Şekil 13: 500 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	59
Şekil 14: 750 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	59
Şekil 15: 1000 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	60
Şekil 16: 1250 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	60
Şekil 17: 1500 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonlarının $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET yüzdeleri	61

Şekil 18: 1 mCi ve 10 mCi radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdeleri	66
Şekil 19: Farklı solvan sistemleri kullanılarak yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar	73
Şekil 20: Mobil faza ait kromatogram	74
Şekil 21: $^{99m}\text{TcO}_4^-$ safsızlığına ait kromatogram	75
Şekil 22: $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ safsızlığına ait kromatogram.....	75
Şekil 23: ^{99m}Tc -MET kompleksine ait kromatogram.....	76



KISALTMA LİSTESİ

Teknesyum-99m	^{99m}Tc
Molibden-99	^{99}Mo
Metotreksat	MET
Deoksiribonükleik asit	DNA
Alüminyum oksit	Al_2O_3
Molibdat	MoO_4^-
Serbest teknesyum	$^{99m}\text{TcO}_4^-$
Pozitron emisyon tomografisi	PET
Tek foton yayıcı bilgisayarlı tomografi	SPECT
Bilgisayarlı tomografi	BT
Manyetik rezonans	MR
Flor	F
Oksijen	O
Nitrojen	N
Karbon	C
Fourier transform infra-red spectroscopy	FTIR
Ultra viole	UV
İnce tabaka kromatografisi	İTK
Radyo-ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi	R-UHPLC
Instant thin layer chromatography	ITLC-SG
Asetonitril	ASN
Trifloroasetik asit	TFA
İndirgenmiş/hidrolize teknesyum	$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$
Serum fizyolojik	SF
Silica gel	SG
Photodiode array detector	PDA
Triptik soya besi yeri	TSB
Tiyoglikolat besi yeri	TGB



GİRİŞ-AMAÇ

Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan kanserin erken evrede teşhisi ve etkin bir şekilde tedavisi; tedavi masrafını, tedavi süresini, mortalite ve morbidite riskini önemli ölçüde azaltmaktadır. Küresel çapta 2008’de 12,4 milyon yeni kanser vakasından 7,6 milyonu ölümle sonuçlanmıştır. Küresel çapta akciğer kanseri en yaygın kanser türü ve kanserle ilgili ölüm nedeni iken, kadınlarda en yaygın kanser türü ve kanserle ilgili ölüm nedeni meme kanseridir. Kanser, basit bir ifadeyle kontrolsüz hücre çoğalması olarak tanımlanabilir. “Kontrolsüz çoğalma”, esas özellik olmakla birlikte, kanser hücresinin başka biyolojik karakteristikleri de vardır. Bunlar arasında hücre kültürlerinde kontakt inhibisyonundan kaçabilme, bölünebilmek için dış uyaranlara (sinyallere) gereksinim göstermeme, çoğalmayı baskılayıcı sinyallere duyarsızlık, apoptozisten kaçabilme, anjiyogenezi uyarmak ve metastaz yapabilme sayılabilir. Çok çeşitli kanser tipleri olmasına rağmen hepsi anormal hücrelerin kontrol dışı çoğalmasıyla başlar. Tedavi edilmezse ciddi rahatsızlıklara ve hatta ölüme neden olabilir. Kanser tedavisinde; malign tümörleri uzaklaştırmak-öldürmek, sitotoksik ilaçlar, antineoplastik ajanlar, cerrahi, radyasyon, hedefe yönelmiş sitotoksikler, siklinler, tirozinkinaz inhibitörleri gibi pek çok yaklaşım mevcuttur.

Nükleer Tıp yöntemleri (Tek Foton Yayıcı Bilgisayarlı Tomografi (SPECT), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET)) dokularda meydana gelen fizyolojik değişikliklere dayandığı için erken evrede kanser hastalıklarının teşhisine imkan vermektedir. Tümörün erken evrede yani anatomik değişiklikler başlamadan, fizyolojik düzeyde değişiklikler olduğu anda teşhis edilebilmesi kanserin yayılmasına fırsat kalmadan tedaviye başlanabilmesini, dolayısıyla tedavi başarısının önemli ölçüde artmasını sağlayabilmektedir. Ultrasonografi, radyografi, bilgisayarlı tomografi (BT) gibi anatomik görüntüleme teknikleri, morfolojik değişikliklere dayandığından hastalığın ilk aşamasındaki görüntüleme için yeterli değildir. Sintigrafik görüntüleme ise fizyolojik değişikliklerin tespitine dayanan non-invaziv bir görüntüleme tekniği olduğundan erken evrede teşhise imkan vermektedir.

Sintigrafik görüntüleme çalışmalarında, uygun radyonüklit, farmasötik kısım ile bağlanarak, radyonüklidin yaydığı radyasyon, uygulamayı takiben bir gama kamera ile görüntülenir. Verilen radyoaktif bileşikten yayılan gama ışınlarını kaydeden kamera ile elde edilen sintigrafik görüntüler, vücudumuzdaki sistemlerin fonksiyonları ve anatomisi hakkında bilgi verir. Bu tetkikler güvenli ve ağrısızdır. Bu nedenle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla düşük dozda radyoaktif madde içeren ilaçlar çoğunlukla intravenöz (IV) yolla, daha az sıklıkla oral yoldan veya solunum yoluyla vücuda verilmektedir.

Teşhiste kullanılacak ideal radyoizotop saf gama ışını saçmalı, enerjisi 100-250 keV arasında, kolay elde edilebilir, makul fiyatlı, efektif yarı ömrü kullanıma uygun, hedef/hedef olmayan oranı yüksek, steril, ajirojen, izotonik ve izohidrik olmalıdır. Bütün bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda Teknesyum-99m (^{99m}Tc) fiziksel özellikleri bakımından nükleer tıpta teşhis amacıyla kullanılan radyoizotopların en idealidir. ^{99m}Tc Fiziksel yarılanma ömrü 6 saattir. ^{99m}Tc sadece enerjisi 140 KeV olan gama radyasyonu yayar. Beta partikülü yaymadığı ve kısa yarı ömürlü olduğu için hastanın maruz kaldığı radyasyon dozu oldukça düşüktür. Monokromatik 140 keV fotonlar nükleer tıpta kullanılan gama kamera gibi cihazlarla kolaylıkla algılanıp kaydedilir ve rezolüsyonu yüksek, oldukça kaliteli görüntüler elde edilir. 1965 yılında, Richards ve arkadaşlarının Molibden-99/Teknesyum-99m ($^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$) jeneratörünü üretmelerinden sonra nükleer tıp alanında ^{99m}Tc radyofarmasötikleri hızla artmış, kısa sürede %85'lere ulaşmıştır. Ayrıca nükleer tıp alanında ^{99m}Tc ile işaretli radyofarmasötikler tümör, karaciğer-dalak, beyin, böbrek, akciğer, kemik gibi pek çok farklı bölgenin görüntülenmesinde kullanılırlar.

Kanser hücreleri ile etkileşerek tümör odaklarını ayırabilme potansiyeline sahip olan radyofarmasötikler, radyoişaretli reseptör spesifik moleküllerdir. Küçük, biyolojik olarak aktif ve kanser hücreleri ile spesifik olarak etkileşime girebilen moleküller, uygun radyonüklit ile işaretlenerek, işaretlenmiş oldukları radyonüklidi hedef olan tümör dokusuna taşımaktadır. Kanser hücrelerine spesifik olarak hedeflenebilen bu moleküllerin radyoişaretlenerek kullanımı ile uygun farmakokinetik özelliklere sahip yeni radyofarmasötikler tasarlanabilmektedir. Yeni tasarlanan radyofarmasötiklerin; kandan hızlı bir şekilde temizlenmesi, düşük

toksositeye sahip olması, tümörlü dokuda yüksek, hedef dışı dokuda düşük tutulum oranına sahip olması istenmektedir.

Metotreksat (MET), akut lenfoblastik lösemi, malign lenfoma, osteosarkom, göğüs kanseri ve baş ve boyun kanseri gibi hastalıklarda kullanılan başlıca kematerapötik ajandır. Aynı zamanda psöriazis gibi malign olmayan durumlarda ve immunosupresif etki de göstererek romatoid artrit tedavisinde de kullanılır. MET, deoksiribonükleik asit (DNA) sentezi için gerekli olan folik asitin antagonistidir. MET, folik asitten türeyen bir aminopterin analogudur. MET'in molekül yapısı folik asitten pterin halkasında 4-amino grubu yerine bir hidroksil grubunun bulunması ve N-10 pozisyonunda metil grubunun olmaması ile ayrılır.

MET, antimetabolit olarak fonksiyon görerek, folik asidin tetrahidrofolik aside indirgenmesinden sorumlu olan dihidrofolat redüktaz enzimini reversibl olarak inhibe eder. Tetrahidrofolik asit yapımındaki azalma, gereksinim duyulan tek karbonlu fragmentlerin düzeyini düşürür ve buna bağlı olarak pürinlerin, DNA'nın ve selüler proteinlerin sentezi inhibe olur. Folat reseptörleri, normal sağlıklı hücrelerde çok az miktarda bulunurken, tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı miktarda bulunur. Bu da MET'in, tümör hücrelerine neden daha selektif etki gösterdiğini açıklamaktadır. MET'in klinik etkinliği, sıklıkla molekülün hücreye sızması nedeniyle kanser hücrelerinde direncin elde edilmesiyle anlaşılr.

Bu çalışmanın amacı, lenfoblastik lösemi, malign lenfoma, osteosarkom, göğüs kanseri ve baş ve boyun kanseri gibi kanser türlerinin teşhisinde kullanılmak üzere MET'i ^{99m}Tc ile işaretleyerek nükleer tıpta rutin olarak kullanılmasını sağlamaktır.

BÖLÜM I

GENEL BİLGİLER

1.1 Radyofarmasötikler

Radyofarmasötikler, tanı veya tedavi amacıyla kullanılan, yapısında radyonüklit içeren ilaçlardır (1). Günümüzde reaktör, jeneratör veya siklotron kaynaklı radyoizotoplar kullanarak üretilen, kanser dahil olmak üzere bazı hastalıkların tedavisinde ve pek çok hastalığın teşhisinde kullanılan 100'e yakın radyofarmasötik bulunmaktadır (2).

Bir radyofarmasötik, radyonüklit ve farmasötik kısım olmak üzere iki kısımdan oluşur. Radyofarmasötiğin hazırlanması sırasında; görüntülenmesi istenen organ içinde lokalize olan veya organın fizyolojik fonksiyonuna katılan bir ilaç (farmasötik kısım) belirlenir. Seçilen farmasötik kısım uygun bir radyonüklit ile bağlanarak işaretleme işlemi ile radyofarmasötik hazırlanır. Hazırlanan radyofarmasötiğin hastaya verilmesinden sonra radyonüklitten yayılan radyasyon dedektörlerle belirlenerek bilgisayar yardımı ile görüntüye dönüştürülür. Radyonüklidin organizmadaki dağılımının görüntülenmesi ile anatomik, bu dağılımın zamana göre değişikliklerinin saptanması ile de fizyolojik bilgiler elde edilir (3).

Ayrıca geliştirilen yeni ilaç formülasyonlarının in vivo davranışları hakkında bilgi edinebilmek için radyonüklitlerle yapılan işaretleme çalışmalarından faydalanılmaktadır (3).

Radyofarmasötikler kullanılarak yapılan görüntüleme işlemleri; fizyolojik fonksiyonları ve metabolik aktiviteyi belirleme ve böylece organ fonksiyon ve disfonksiyonları hakkında daha ayrıntılı bilgi verme kapasitesine sahip olması sebebi ile BT, manyetik rezonans (MR) ve ultrason gibi yöntemlere karşı üstünlüğü bulunmaktadır. Radyofarmasötikler ile yapılan biyodağılım çalışmaları ile fonksiyonel morfolojiye dair görüntüler elde edilmekte ve non-invaziv diagnoz olanağı sağlanmaktadır (2, 3).

Nükleer tıpta radyofarmasötiklerin %95'i tanı, %5'i tedavi amacıyla kullanılmaktadır (3). Tanı amaçlı kullanılan radyofarmasötikler gama ışını yayarlar, tedavide kullanılan radyofarmasötikler beta ve alfa ışını yayarlar (4).

Tanı amacıyla kullanılan ideal bir radyofarmasötik;

- Saf gama ışını yaymalı
- Gama enerjisi 100-250 keV arasında 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 dokuda tutulum oranı yüksek olmalı
- Hazırlanması ve kalite kontrolü kolay olmalı
- Ucuz olmalı ve kolay bulunabilmeli
- Toksik olmamalı
- Kararlı olmalıdır (3, 5).

Tedavi amacıyla kullanılan ideal bir radyofarmasötik;

- Beta veya alfa ışını yaymalı
- Enerjisi 1 meV'den büyük olmalı
- Hedef/hedef olmayan dokuda tutulum oranı yüksek olmalı
- Efektif yarı ömrü gün düzeyinde olmalı
- Ucuz olmalı ve kolay bulunabilmeli
- Toksik olmamalı
- Kararlı olmalıdır (3, 5).

1.1.1 Radyofarmasötiklerin Tasarımında Dikkat Edilecek Hususlar

• **Uyumluluk:** Yeni bir radyofarmasötik geliştirilirken işaretleme işleminden önce üzerinde düşünülmesi gereken ilk şey radyonüklit ile farmasötik kısmın kimyasal olarak bağlanmaya elverişli olmasıdır (3, 6).

• **Stokiyometri:** Yeni bir radyofarmasötik hazırlanırken, radyofarmasötiğin bütün bileşenlerinin miktarları bilinmelidir. Bileşenlerden birinin az veya fazla miktarda olması radyofarmasötiğin bütünlüğünü ve işlevini bozar (3, 6).

• **Molekül Büyüklüğü:** Radyofarmasötiğin biyolojik sistemdeki absorpsiyonunu belirleyen önemli bir faktördür (3, 6).

• **Molekül Yükü:** Elektriksel yük radyofarmasötiğin değişik solvanlardaki çözünürlüğünü etkiler (3, 6).

• **Çözünürlük:** Enjeksiyonla uygulanan radyofarmasötikler sulu çözeltilerde stabil olmalı ve pH değerleri kan pH değerine eşit olmalıdır. Radyofarmasötiklerin lipid çözünürlüğü, biyodağılımlarını ve lokalizasyonlarını etkileyen bir faktördür (3, 6).

• **Proteinlere Bağlanma:** Radyoaktif olsun veya olmasın neredeyse bütün ilaçlar plazma proteinine bağlanır. Albumin, globülin ve transferin, ilaç moleküllerinin çoğunlukla bağlandığı proteinlerdir. Proteinlere bağlanma oranı radyofarmasötiğin dokulardaki dağılımını, plazma klerensini ve hedef organdaki tutulumunu etkiler (3, 6).

• **Stabilite:** Radyofarmasötiğin 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 verir (3, 6).

1.1.2 Teknesyum

Teknesyum yapay olarak üretilen ilk radyonüklittir. İsmi Yunanca'da "technetos" (yapay) kelimesinden gelmektedir.

İlk olarak 1937 yılında bulunan teknesyum, Emilio Gino Segre' ve Carlo Perrier tarafından Kaliforniya'daki bir radyasyon laboratuvarında molibden çubuklarının bombardımanı sonucu elde edilmiştir.

^{99m}Tc 140 keV'lik saf gama ışını yayar. Bu enerji aralığındaki ışınlar görüntülemede gama kameralar için idealdir. 6 saatlik yarı ömrü de yine görüntülemede avantaj sağlarken, hastanın aldığı radyasyon dozunun az olması yönünden de idealdir. Birçok farmasötik kısım ile geniş işaretleme yelpazesine sahip olan ^{99m}Tc , üretim zorluğu nedeni ile uzun yıllar kullanılamamıştır. 1965 yılında Richards ve arkadaşlarının $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratörünü üretmelerinden sonra nükleer tıp alanında ^{99m}Tc radyofarmasötikleri hızla artmıştır.

Molibden (^{99}Mo), molibdat (MoO_4^-) halinde yüksek afinitesi nedeniyle alümina kolona (Al_2O_3 : alüminyum oksit) immobilize edilir. % 0,9'luk NaCl çözeltisi kolondan geçirilerek ^{99}Mo 'nin bozunma ürünü olan sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-$) kolondaki alüminaya ilgisi olmadığı için elue edilir. Toplanan perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) zırlı, vakumlu, steril ve önceden kalibre edilmiş bir şişeye alınır. Bu işleme "sağım" adı verilir (5, 7).

Günümüzde, nükleer tıptaki görüntüleme işlemlerinin % 80'inde ^{99m}Tc izomeri kullanılmaktadır. 6-7 milyon hasta Avrupa'da, 12-15 milyon hasta kuzey Amerika'da, 6-8 milyon hasta Asya/Pasifik'de (özellikle Japonya) 0,5 milyon hasta dünyanın geri kalan kısmında olmak üzere; dünya çapında yılda 30 milyondan fazla hasta ^{99m}Tc ile etiketlenmiş bileşiklerle taramaya tabi tutulmaktadır (8).

Teknesyum periyodik tabloda renyum ve manganez arasında yer alan 7B grubu elementidir. Teknesyum ve renyum elementlerinin atomik yapıları birbirine benzediğinden kimyasal olarak da benzer özellik göstermektedir. Tüm geçiş elementleri gibi teknesyumda elektron eksikliği olan metaller, atomlar veya fonksiyonel gruplarla bağ yaparak bileşik meydana getirir. Teknesyumla kompleks oluşturan donör gruplara örnek olarak amin, amid, tiyol, fosfat, oksim ve izonitril grupları verilebilir. Geçiş elementlerinin her birinin birden fazla sayıda oksidasyon kademesi vardır. Bu grubun bir üyesi olan teknesyum, $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratöründen en yüksek oksidasyon kademesi olan +7 değerlikli TcO_4^- olarak elde edilir. Ancak +7 değerlikli TcO_4^- bu halde iken ligandlarla bağ yapamaz ve bağ yapabilmesi için teknesyumun daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesi gerekir. Bu nedenle kitlere genellikle indirgen ajan olarak kalay ilave edilmektedir (7).

1.2 Radyonüklitlerin Üretimi

Doğada bulunan radyonüklitler çok uzun yarı ömürleri nedeniyle tıpta kullanılmaya uygun değildir. Bu yüzden nükleer tıpta kullanılan radyonüklitlerin tümü yapay olarak reaktör, siklotron veya jeneratörlerden elde edilirler (3).

1.2.1 Reaktörde Üretilen Radyonüklitler

Nükleer tıpta kullanılan reaktörlerde radyoizotop üretiminin iki yolu vardır:

1.2.1.1 Termal Nötron Reaksiyonları

Reaktörde temel nötron reaksiyonları ile radyonüklit üretilirken iki çeşit reaksiyon görülür. Birincisi reaksiyon türünde, ışınlanan 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 (3, 9).

1.2.1.2 Fisyon Reaksiyonları

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

Fisyon reaksiyonu sonucu oluşan radyonüklitleri ayırmak için ekstraksiyon, iyon değişimi, çöktürme, distilasyon ve kromatografik yöntemler kullanılabilir. Nükleer tıpta sıklıkla kullanılan I-131, Xe-133 ve jeneratörde ^{99m}Tc elde etmek için ana radyonüklit olan ^{99}Mo bu yöntemle elde edilir (3, 4, 10).

1.2.2 Siklotronda Üretilen Radyonüklitler

Siklotronlar alfa, döteron, 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 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 (3, 4, 11).

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. Nükleer tıpta en çok kullanılan radyonüklit jeneratörü $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratörüdür (3, 12). $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratörü dışında nükleer tıpta kullanılan diğer radyonüklit jeneratörlerinden bazıları şunlardır: $^{113}\text{Sn}/^{113}\text{In}$ jeneratörü, $^{81}\text{Rb}/^{81}\text{Kr}$ jeneratörü, $^{82}\text{Sr}/^{82}\text{Rb}$ jeneratörü, $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratörü ve $^{62}\text{Zn}/^{62}\text{Cu}$ jeneratörüdür (10).

İdeal bir jeneratör sisteminin sahip olması istenilen özellikleri;

1. Jeneratör çıkışı steril ve pirojensiz olmalıdır.
2. Ürünün kimyasal özellikleri ana radyonüklitten farklı olmalıdır.

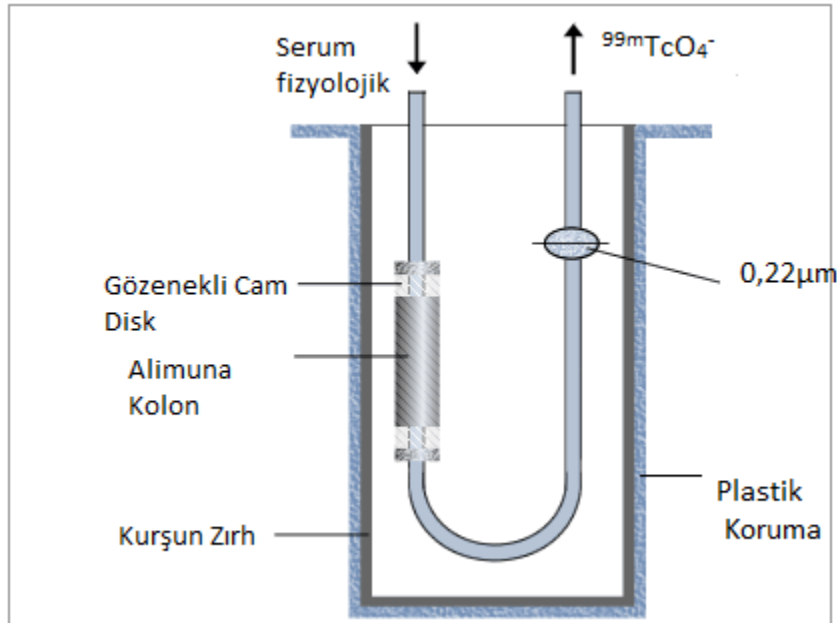
Böylece ikisi birbirinden ayrılabilir.

3. Jeneratör ideal olarak %0,9'luk serum fizyolojik ile elue edilmelidir.

4. Ürün radyonüklit kısa ömürlü gama ışını yaymalıdır.
5. Ürünün kimyası çok çeşitli bileşikleri hazırlamaya uygun olmalıdır.
6. Ucuz olmalı, etkili zırlama kolaylıkla yapılabilmesi ve kullanıcısına minimal radyasyon dozu vermelidir.
7. Kolaylıkla tekrar doldurulabilmelidir (7, 14)

1.2.3.1 $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ Jeneratörü

^{99}Mo , MoO_4^- halinde yüksek afinitesi nedeniyle alümina kolona immobilize edilir. %0,9'luk NaCl çözeltisi kolondan geçirilerek ^{99}Mo 'nin bozunma ürünü olan $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ kolondaki alüminaya ilgisi olmadığı için elue edilir. Toplanan perteknetat zırlı, vakumlu, steril ve önceden kalibre edilmiş şişeye alınır. Bu işleme sağım adı verilir. Perteknetatın kantitatif olarak alınması, alüminaya afinitesinin çok zayıf olmasından kaynaklanır. Fakat MoO_4^- kolona tamamen ve dönüşümsüz olarak bağlanır. Jeneratör elüe edileceği zaman elüsyon hacmi dikkatlice kontrol edilmelidir, böylece her gün relatif olarak sabit konsantrasyon elde edilir.



Şekil 1: $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörünün şematik şekli (2)

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörleri ticari olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir hafta önceden üretilen jeneratör sistemleri başka ülkelere kolaylıkla pazarlanabilmektedir.

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen elde edilen ürünlerde karşılaşılabilecek bazı safsızlıklar vardır. Bu safsızlıkların tespit edilebilmesi ve önlenmesi için radyofarmasötiklerde çeşitli kalite kontrol çalışmaları yapılması gerekir (7).

1.3 Radyofarmasötiklerde Yapılan Kalite Kontrol İşlemleri

Radyofarmasötik kitlerin çoğu $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ kullanılarak hazırlanır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ kit içindeki ligand adı verilen ve özgül bir organ sisteminde lokalize olmak üzere geliştirilmiş bir substrat molekülüne tutunur. Radyofarmasötiğin etkili olabilmesi için $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'nin çoğunun ligandla bağlanması ve ürün içinde serbest $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'in ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) çok düşük miktarda kalmış olması gerekir. İşaretleme işleminin bir diğer yan ürünü olan indirgenmiş-hidrolize $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ($\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$) ise düşük düzeyde tutulmalıdır.

Hem $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ hem $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ görüntülerde yanlış tanıya neden olabilecek ya da değerlendirmeyi güçleştirecek sorunlar oluşturabilir. Radyofarmasötiklerin çoğu için asgari işaretleme etkinliği standartları belirlenmiştir. Hazırlanan radyofarmasötiklerin her biri hastalarda kullanılmadan önce radyokimyasal saflık yönünden test edilmelidir. Radyofarmasötik etkin şekilde işaretlemedikçe görüntü kalitesi bozulur, sintigrafi işleminin doğruluğu da şüphe taşır (7).

1.3.1 Radyonüklidik Saflık

Radyonüklidik saflık radyofarmasötikte bulunan toplam radyoaktivitenin istenilen radyonüklide ait olan miktarını gösterir. $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen elde edilen sağlam ürünü içinde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile birlikte bir miktar ^{99}Mo da bulunabilir. Buna molibden safsızlığı da denir.

Herhangi bir nedenle jeneratörden ^{99}Mo kaçağı olabilir, ancak $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile hazırlanmış radyofarmasötiklerde ^{99}Mo bulunmamalıdır. Radyonüklidik safsızlıklar hastanın alacağı radyasyon dozunu gereksiz yere arttırdığı gibi sintigrafik görüntüyü de biyodağılım farklılığı nedeni ile bozar.

Radyonüklidik saflığı saptamak için istenilen örneğin gama enerji spektrumuna bakmak gereklidir. İki radyonüklidin enerji pikleri birbirinden çok farklı olduğu için miktarları kolaylıkla tayin edilebilir. Amerikan farmakopesine göre hastaya verildiği sırada $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyofarmasötikleri miliküri başına 0,15 miliküriden fazla ^{99}Mo içermemelidir (7, 13).

1.3.2 Kimyasal Saflık

$^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratörü sağıldığında ürün içinde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile birlikte alüminyum iyonunda bulunabilir. Amerikan farmakopesine göre fisyon ile çalışan bir jeneratörden sağılan her mililitre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ başına 10 mikrogramdan fazla alüminyum bulunmamalıdır. Bundan daha fazla alüminyum varlığı jeneratörün kolon yapısının kararlılığını kaybettiğini gösterir. Kimyasal saflığı ölçmede kullanılabilecek en uygun yöntem kolorimetri testidir (7, 13).

1.3.3 Radyokimyasal Saflık

Radyokimyasal saflık radyofarmasötik içinde yer alan radyonüklidin kimyasal bileşik içindeki miktarını gösterir ve radyofarmasötik aktivitesinin toplam radyoaktiviteye oranı ile hesaplanır. Radyofarmasötik kitleri içinde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ bir substrat moleküle bağlanarak özel bir organ sisteminde tutulabilir hale gelir. Radyofarmasötik hazırlama işlemi sırasında oluşan hem serbest $^{99\text{m}}\text{Tc}$ hem de $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyokimyasal safsızlığı oluşturur ve görüntülemeye bazı sorunlara neden olur. Görüntülerin değerlendirilmesinde zorluğa ve klinik tanıda yanılgıya neden olabilir. Dolayısıyla rapor edilen hastalık tanılarının doğruluğundan emin olabilmek için radyofarmasötiklerin etkin bir şekilde bağlanması önemlidir. USP birçok radyofarmasötik için minimum standart bağlanma etkinliklerini belirlemiştir. Her radyofarmasötik hastaya verilmeden önce radyokimyasal saflık açısından test edilmelidir.

Jeneratörden elde edilen sağım ürünü içinde radyokimyasal saflık açısından sadece $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ bulunması beklenir. Sağım solüsyonu içinde $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ bulunması ise safsızlık oluşturacaktır. Bunun tespit edilmesi gerekir (7, 13).

1.4 Radyoişaretleme

1.4.1 İşaretleme Metotları

Kullanılacak olan işaretleme metodu radyonüklidin kimyasal özelliklerine ve işaretlenecek olan maddenin molekül yapısına bağlıdır.

İşaretleme metodları şunlardır:

1. **İzotop Değişimi:** Bir bileşiğin kimyasal ve biyolojik özellikleri korunmak istendiğinde içinde bulunan elementlerden birinin yerine o bileşiğin izotopu konulur. Vücut yapısında doğal olarak bulunan karbon, hidrojen ve azot bu iş için uygundur.

2. **Yabancı İşaretleme:** Hormon, protein, antikor ve organik maddeler uygun yarı ömürlü gama yayıcılar ile işaretlenir. Burada biyolojik rolü bilinen bir moleküle radyonüklidin kovalent bağlarla bağlanması söz konusudur. İyot ve teknesyum radyonüklidleri ile yapılan işaretlemler çoğunlukla bu gruba girer.

3. **Bifonksiyonel Şelatlar ile İşaretleme:** Bu metotla proteinler bifonksiyonel şelatlar ile kompleks oluşturur ve oluşturulan kompleks uygun bir radyonüklit ile işaretlenir.

4. **Biyosentez ve Kimyasal Sentez:** Biyosentez ile işaretlemede yaşayan bir mikroorganizma radyoaktif izleyici bulunan bir kültür ortamında büyütülür. Böylece izleyici organizmanın metabolik işlemleri ile mikroorganizma içine alınır ve daha sonra izleyici ile işaretli metabolitler kimyasal yolla mikroorganizmadan ayrılır (7, 14).

1.5 Nükleer Tıp Görüntüleme Yöntemleri

Nükleer tıpta yapılan sintigrafik görüntülemelerde, vücut içine verilen radyofarmasötiklerden yayılan gama ışınları, dışarıdan özel deteksiyon sistemleri ile tespit edilerek görüntü oluşturulur. Bu tarz görüntülemeye aynı zamanda emisyon görüntüleme adı verilir. Emisyon görüntülemelerde vücut içindeki radyoaktivitenin, yarı ömürle ifade edilen kontrol edilemez bozunması söz konusudur. Bu nedenle emisyon görüntülemelerde hastaya kısıtlı miktarda radyoaktivite verilebilmekte ve bu da elde edilen görüntü çözünürlüğünün sınırlı olmasına neden olmaktadır.

Gerek fiziksel özellikler (bozunma türü, enerji, yarı ömür) gerekse kimyasal özelliklerin uygunluğu açısından nükleer tıpta kullanılabilen radyonüklitlerin sayısı kısıtlıdır. Fiziksel özellikler açısından öncelikle mevcut deteksiyon sistemleri ile tespit edilebilen, uygun enerji aralığında elektromanyetik radyasyon (gama ışını) yayan radyonüklitler görüntüleme amacı ile kullanılabilir. Bu maddelerin yarı ömrünün hastaya ve çevreye verilecek radyasyon dozu açısından çok uzun olmaması; buna karşılık organizmada yeterli dağılabilmesi ve görüntüleme yapmayı sağlayacak kadar uzun yarı ömürlü olması gerekmektedir. Ayrıca radyoaktif bozunmayla devamlı olarak kendiliğinden yok olan bu maddelerin sürekli el altında bulundurulması zorluğu da mevcuttur (14, 15).

1.6 Sintigrafik Görüntüleme Teknikleri

Statik Görüntüleme: Hastaya radyofarmasötik enjeksiyonu yapıldıktan ve radyofarmasötiğin hedef organ veya dokuda lokalize olması için gerekli süre geçtikten sonra vücudun belirli bir bölgesinden yapılan sintigrafik görüntülemedir. Görüntüleme belirli bir süre ya da sayıma ulaşınca sonlandırılabilir. Statik böbrek sintigrafisi, akciğer perfüzyon sintigrafisi veya kemik sintigrafisinde alınan statik görüntüler örnek olarak verilebilir.

Dinamik Görüntüleme: Hastaya radyofarmasötik uygulamasının hemen ardından kamera altında radyofarmasötiğin zaman içerisinde ilgili vücut alanındaki seyrini görüntülemek amacıyla yapılan ardışık görüntüleme biçimidir. Radyofarmasötiğin uygulama şekline göre belirli bir organ veya dokudan transit geçişi ya da organ ve dokunun kanlanması hakkında fonksiyonel bilgiler sağlar. Dinamik böbrek sintigrafisi, özofagus transit zamanı, gastrointestinal kanama yeri tayini, üç fazlı kemik sintigrafisi gibi sintigrafik görüntüleme yöntemleri dinamik teknik ile yapılmaktadır.

Tüm Vücut Görüntüleme: Dedektörlerin vücudun uzun eksenini boyunca hareket ederek tek düzlemde ilgi alanından görüntü toplamasını ifade eder. Sintigrafik görüntülemenin tüm vücut yapılabilmesi konvansiyonel görüntüleme yöntemleri arasında önemli bir avantajdır. Tüm vücut kemik sintigrafisi ve tüm vücut iyot tarama sintigrafisi örnek olarak verilebilir.

Tomografik (SPECT ve PET) Görüntüleme: Modern gama kameralar ile planar yapılabilen görüntülemenin yanısıra tomografik görüntüleme tekniği ile SPECT görüntüleri de elde edilebilir. Bu işlem için dedektörün hasta etrafında dönmesi ve her bir dönüş açısında veri toplaması gereklidir. Toplanan projeksiyon görüntülerinin işleminden geçirilmesi ile transaksiyel, koronal ve sagittal kesitlerde tomografik görüntüler oluşturulur. Myokard ve beyin perfüzyon sintigrafileri gibi rutin olarak SPECT görüntüleme yapılan sintigrafik tetkiklerin yanı sıra günümüzde birçok sintigrafik incelemede duyarlılığı arttırmak amacıyla tamamlayıcı SPECT görüntülemeye başvurulmaktadır.

PET de özel dedektör yapısı ile tomografik görüntüleme için tasarlanmış bir nükleer tıp görüntüleme tekniğidir. PET ile yapılan onkolojik amaçlı standart tüm vücut görüntüleme de kafa tabanından uyluk üst kısmına vücudun tomografik PET

imajları oluşturulur. Beyin ve kardiyak PET gibi özel amaçlı görüntülemelerde ise sadece ilgili organın tomografik görüntüleri oluşturulmaktadır.

Hibrid Görüntüleme: Fonksiyonel ve anatomik bilgileri bir arada değerlendirme imkanı sağlayan hibrid görüntüleme modern nükleer tıp görüntüleme teknolojisidir. İki ayrı görüntüleme cihazının bir araya getirilmesi ile oluşan PET/BT ve SPECT/BT cihazlarında aynı anda PET veya SPECT görüntülemenin yanı sıra BT görüntüleri de oluşturulabilmektedir. Bu hibrid görüntüleme sistemlerinde fonksiyonel görüntüleme ile eş zamanlı elde edilen düşük doz BT görüntüleri sayesinde lezyonların anatomik lokalizasyonu doğru bir şekilde belirlenebilmekte ve her organın yoğunluğuna göre ayrı bir atenuasyon düzeltmesi yapılabilmektedir. PET kameraların MR görüntüleme üniteleri ile kombine edildiği PET/MR cihazları da kullanıma sunulmuş olup fonksiyonel ve anatomik bilgileri bir arada sunan bu hibrid cihazlar sayesinde nükleer tıp da tanısal görüntülemenin duyarlılık ve özgüllüğü giderek artmaktadır (14, 15, 16, 17, 18).

1.7 Kanser

Hücre, insan vücudunda canlılık özellikleri taşıyan en önemli yapı taşıdır. Vücutta bulunan tüm organlar hücrelerden oluşmaktadır. Hücreler yaşam özelliklerini tek başına sürdürme yeteneklerine sahip temel yapı ve işlem birimleridir.

Hücre yapılarında, hücrelerin anormal ve kontrolsüz bir şekilde büyümesi ve çoğalmasına “kanser” denir. Hücre yapılarının bu şekilde davranması DNA yapısının hasara uğraması sonucu oluşmaktadır. Bir günde insan DNA sisteminde 10.000 mutasyon oluşmaktadır. İmmun sistemimiz ise her milisaniyede bir vücut sistemi tarar ve bulduğu kanseri hücrelerini ortadan kaldırır.

Bölünebilme özelliğine sahip olan hücreler sağlıklıdır. Hücrelerin ölmesi durumunda yerine hücrelerin yenilenmesi ve zarar gören dokuların onarılması için bu yetenekleri kullanılmaktadır. Hücrelerin bölünebilme yetenekleri sınırsız değildir. Var olma süresi içerisinde belli bir bölünebilme sayıları vardır. Aynı zamanda sağlıklı bir hücre bölünebilme özelliğini nerede ve ne zaman olacağını bilme yeteneğine de sahiptir.

Hücreler bölünebilme yeteneğini kaybettiklerinde kontrolsüz büyümeye ve çoğalmaya başlar. Kontrolsüz büyüyen ve çoğalan hücrelere kanser hücreleri denir.

Bu hücreler toplanarak tümörleri oluşturur. Tümörler zaman içerisinde normal dokulara zarar verebilir veya dokuları tahrip edebilir. Aynı zamanda bu kanser hücreleri oluştukları tümörlerden ayrıldıklarında, kan veya lenf damarları dolaşımı aracılığıyla vücudun başka bölgelerine de gidebilir. Ulaştıkları diğer bölgelerde yeni tümörler oluşturur ve hızla büyümeye devam ederler.

Günümüzde kanser en sık ölüm nedenleri arasında kalp-damar hastalıklarından sonra ikinci sırada yer almaktadır ve her 10 ölümden birisi kanser nedeniyle olmaktadır. Erken tanı ve tedavi ile kanserli hastalarda önemli oranda iyileşme mümkün olmaktadır. Kanser hastalıklarının büyük bir kısmı çevresel ve davranış faktörlerinden meydana gelmekte olup aynı zamanda kalıtım yoluyla da meydana gelme olasılığı vardır. Kanser belli bir hastalık olmayıp vücudumuzun her tarafında gelişebilen bir hastalık türüdür (19).

Kanser oluşumuna neden olan faktörler; iyonize radyasyon, ultraviyole ışınları, hava kirliliği, kimyasal karsinojenler, beslenme faktörleri, sigara, alkol, virüsler ve genetik faktörlerdir (20).

1.7.1 Kanser Tanısında Kullanılan Yöntemler

Kanser tanısında kullanılan çok sayıda yöntem vardır. Herhangi bir kanser cinsine tanı konulacağı zaman bu yöntemlerin çoğu birlikte kullanılmaktadır. Sadece bir yöntemle tanı koymak çoğu zaman mümkün olmadığı gibi farklı kanser türlerinde de farklı yöntemler öncelik kazanmaktadır. Bu yöntemlerle sadece tanı koymakla kalmayıp hastalığın yaygınlığı da değerlendirilmektedir. Kan sayımı, biyokimyasal analizler, röntgen incelemeleri, endoskopi, ultrasonografi, BT, PET, SPECT gibi yöntemler kanser türünün daha kolay ve güvenli halde teşhis edilmesini sağlamaktadır. Kanser tanısında, yaygınlığının değerlendirilmesinde ve tedavi planlanmasında birden çok yöntem birlikte kullanılır.

1.7.1.1 Kan Sayımı

Tüm hastalarda yapılan temel bir tetkiktir. Hastanın alyuvarlarının ve akyuvarlarının hastalıktan etkilenip etkilenmediğini gösterir.

1.7.1.2 Biyokimyasal Analizler

Kanda ve vücut sıvılarında çeşitli biyomoleküllerin (enzimler, elektrolitler, mineraller, hormonlar, immun kompleksler, antikorlar, eser elementler) düzeyleri ölçülür. Bu maddeler normalde vücutta bulunan maddeler ise miktarlarındaki

azalma veya artma anlamlı olabilir. Normalde vücutta bulunmayan bazı maddelerin de vücutta bulunması tanı da yol gösterici olabilir. Bu analizler sadece tanıda değil hastalarda uygulanan tedavinin izlenmesinde de yararlı olurlar. Ancak biyokimyasal analizler tek başlarına yeterli değildir ve diğer tanı yöntemleri ile desteklenmelidir.

1.7.1.3 Röntgen İncelemeleri

Çok sık kullanılan yöntemlerdir. Düz akciğer, kemik filmleri, ağızdan radyoopak madde verilerek çekilen sindirim sistemi filmleri, damardan radyoopak madde verilerek çekilen böbrek-idrar yolları filmleri sık kullanılanlardır. Sadece röntgen filmleri ile kanser tanısı koymak yanıltıcı olabilir. Çünkü kanser dışındaki bazı hastalıklarda benzer bulguları gösterebilirler. Bu nedenle kanserde kesin tanı için mutlaka biyopsi ve histopatolojik inceleme gereklidir.

1.7.1.4 Endoskopi

İçi boş organların içine özel aletle girilerek hasta bölge doğrudan görülerek incelenebilir. Aynı sırada kanser şüphesi taşıyan bölgeden de biyopsi yapılabilmesi de bir avantaj oluşturmaktadır. Bu yöntemle yemek borusu, mide, on iki parmak bağırsağı, kalın bağırsak, solunum yolları, mesane ve kadın üreme organları incelenebilir (20).

1.7.1.5 Ultrasonografi

Yüksek frekanslı ses dalgalarının organlara gönderilmesi ve bu organlardan yansıyan ışınların kaydedilerek ekrana yansıtılması esasına dayanır. Yaygın kullanılır. Çünkü verdiği güvenilir bilgilere ek olarak en zararsız yöntemlerden biridir. Özellikle karın bölgesi kanserlerinde daha sık kullanılmaktadır (21).

1.7.1.6 Bilgisayarlı Tomografi

Cormak tarafından 1963 yılında teorize edilen ve Hounsfield tarafından 1972 yılında tanı alanına sokulan BT, X ışınının keşfinden bu yana, radyolojideki en büyük ilerleme olarak kabul edilmektedir. Temeli röntgen cihazına dayanmakla birlikte, röntgenden farklı olarak X ışını demetinin inceltilerek, vücuda çizgisel şekilde düşürülmesiyle, iki boyutlu kesitsel görüntüleme sağlayan bir yöntemdir. BT’de kesit görüntünün alınabilmesi, röntgen tüpü ve görüntü alıcıların (dedektör) hastanın etrafında döndürülmesi ile sağlanmaktadır. Hastanın etrafında tüp ve dedektörlerin birbirine bağlı olarak yaptıkları dönme hareketi sırasında, dedektörlerde toplanan ve aslında üç boyutlu bilgi taşıyan verilerin, dönme hareketinin tüm aşamaları göz

önünde bulundurularak yüksek matematiksel çözünümlü ile iki boyutlu kesitsel veriler elde edilebilmektedir (22).

1.7.1.7 Pozitron Emisyon Tomografisi

PET insan vücuduna verilen pozitron yayıcı radyonüklidlerin dağılımını üç boyutlu (tomografik) olarak görüntüleyen tanısal bir nükleer tıp yöntemidir. Bu görüntüleme yöntemi metabolik ve fonksiyonel bilgi sağlayan bir yöntemdir. Bu nedenle PET birçok patofizyolojik durumda yapısal bozuklukların oluşmadığı erken dönemde oluşan biyokimyasal ve metabolik değişiklikleri tespit ederek erken tanıya olanak sağlar. PET anatomik görüntüleme yöntemlerinin bir alternatifi olmayıp genellikle onları tamamlayıcı eşsiz fonksiyonel bilgiler sağlayan bir yöntemdir.

Pozitron yayıcılar adı verilen kendilerine has özellikleri olan radyonüklidlerin yaydığı ışınları alarak, gelişmiş yazılımları olan bilgisayarlar aracılığı ile görüntüler haline dönüştürülür. En sık kullanılan pozitron yayıcı radyonüklidler Flor (F)-18, Oksijen (O)-15, Nitrojen (N)-13 ve Karbon (C)-11'dir. İnsan kullanımına en uygun olan pozitron yayıcıların ortak özellikleri yarı ömürlerinin kısa olmasıdır (2-110 dakika). Yarı ömürlerinin kısa olması nedeniyle siklotron adı verilen cihazlarda yapay olarak oluşturulurlar (23).

Hasta vücudu içine IV olarak verilen radyofarmasötikğin, vücut içindeki dağılımı PET tarayıcı veya PET kamera adı verilen sistemlerle belirlenir. Şekil olarak BT cihazına benzemektedir, yatar pozisyonda iken hastanın içinden geçebileceği bir boşluk ve bunun etrafında hasta vücudundan gelen radyoaktif ışınları tespit eden bir gantri ünitesi ile gelen bilgilerin aktarıldığı bilgisayar kısmından oluşur.

PET görüntülemedeki en büyük sıkıntılardan biriside anatomik enformasyon eksikliğidir. Bu nedenle lezyonlar tam olarak lokalize edilemez ve bazı normal olan yapılar ayırt edilemez. Bu nedenle PET görüntüleri, BT ve MR görüntüleri ile değerlendirilmesi morfolojik yanılmayı en aza indirger. Bazı bilgisayar yazılımları PET görüntüleri ile BT görüntülerini birleştirebilir. Son yıllarda entegre PET/BT tarayıcıları geliştirilmiştir. Bu sistemlerde BT ile PET gantrileri aynı yatakta arka arkaya yerleştirilmiştir. Böylece hasta aynı pozisyonda yatarken hem X ışını ile transmisyon (BT) hem de normal PET emisyon görüntüleme yapılabilmektedir. Bu sistemde X ışınının transmisyon süresi çok kısa olduğu için PET görüntüleme süresi

kısalmaktadır. Aynı pozisyonda elde edilen yüksek çözünürlüklü morfolojik görüntüleri PET görüntülerine tam olarak birleşmektedir (24).

PET klinikte çok çeşitli alanda kullanılmıştır ancak en yaygın olarak onkoloji, kardiyoloji ve nöroloji bilim dallarında kullanılmaktadır. İlk yıllarda klinik uygulamalar kalp ve beyin hastalıkları üzerinde odaklanmışken günümüzde PET'in tüm klinik çalışmalarının %75'ini onkoloji oluşturmaktadır (25).

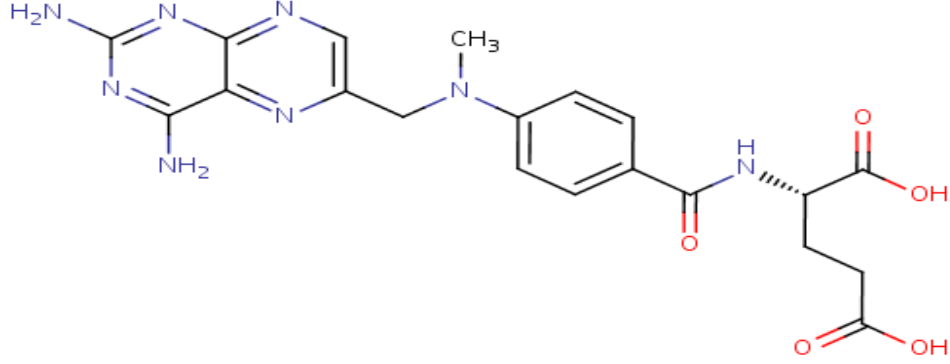
1.7.1.8 SPECT

Nükleer tıp görüntüleme yöntemlerine bilgisayar aracılığıyla derinlik boyutunun katılmasıyla elde edilen görüntüleme yöntemidir. Bu yöntemde düşük enerjili radyonüklidler kullanıldığı için radyasyon korunmasının daha kolay, görüntülerde süreç olanaklarının daha fazla olduğu saptanmıştır. Radyonüklid görüntülerinin çoğunda, elde edilen görüntünün iyileştirilmesi için bir bilgisayar kullanılır. Bu teknikte kamera hasta etrafında dönerek gama ışınları pek çok açıdan görüntü almaktadır. Bilgisayar, bu bilgiyi çok daha detaylı ve kesin görüntü geliştirmek için kullanır (26).

1.8 Metotreksat

MET göğüs kanseri, baş ve boyun kanseri, lösemi, lenfoma, akciğer kanseri, osteosarkom, idrar kesesi kanseri gibi kanser türleri için kullanılan kemotöröpotik bir ajandır. Göğüs kanserinde kemoterapide adjuvan olarak kullanılmaktadır (27).

MET'in açık formülü 4-amino-4deoksi-N10-metil pteroil glutamik asittir.



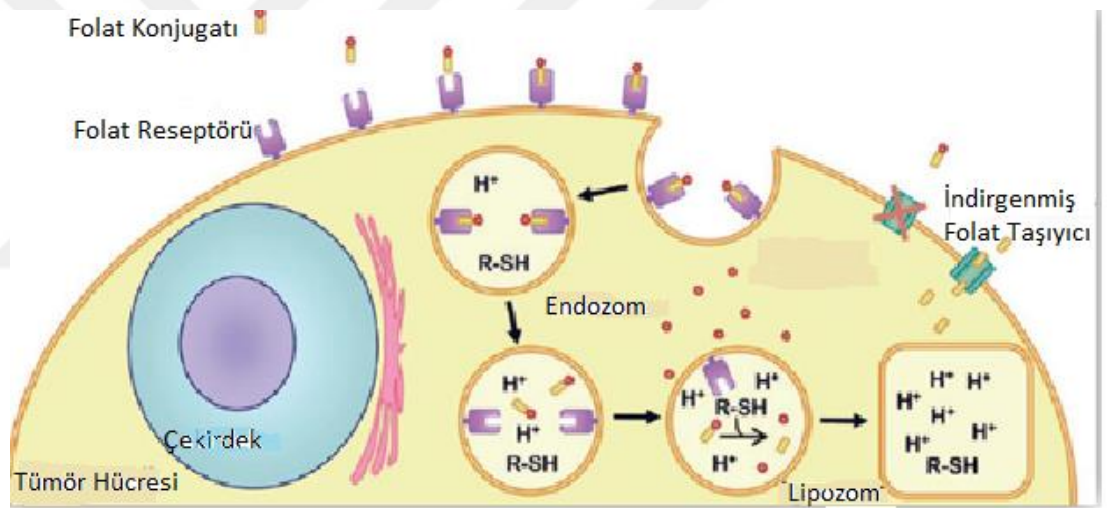
Şekil 2: Met'in Kimyasal Yapısı (37)

1.8.1 Farmakolojisi ve Farmakokinetiği

MET bir folik asit analogudur, hücre içinde folat yerine geçer. Diyetle alınan folinik asit, dihidro folat redüktaz enzimi ile dihidro folat ve tetrahidro folata indirgenir. Bu indirgenmiş folatlar, homosisteinin metionine dönüşümü, histidin metabolizması, pürin sentezi ve DNA sentezi için gerekli olan timidilat sentezinde rol alır. Bir antimetabolit olan MET, dihidro folat redüktaz geriye dönüşümlü bağlanarak onu inaktive eder. Sonuç olarak timidilat ve inosinik asit sentezinin yanı sıra, glisin, serine, homosisteinin de metionine dönüşümü engellenir ve böylece protein sentezi bozulur (28). Sahip olduğu bu etki mekanizması ile antikanser ajan özelliği taşır. MET, seçimli olarak hızlı çoğalan hücreleri etkiler. İlacın hücre içindeki etkinliği ilaç direnç mekanizmaları tarafından azaltılır. Hücre membranlarında bulunan folat reseptörleri, folat ve MET gibi folat analoglarının hücre içine alımından sorumludur. Folat ve antifolat bileşikler folat reseptörüne yüksek afinite ile bağlanır, dolayısıyla folat reseptör pozitif hücrelerde birikebilir (29).

MET, folatların hücre içine aktif transportu ile rekabete girerek hücre içine folatın yerine kendi girer. Karaciğerde diğer folatlarda olduğu gibi poliglutamilasyona uğrar. Poliglutamilasyon sonrası MET intrasellüler olarak uzun süre kalabilir (30).

Folat reseptörleri over, meme bezi, kolon, akciğer, prostat, burun, boğaz ve beyin kanser epitelyum hücrelerinde fazla miktarda sentezlenir. Folat bağlı yapıların reseptör aracılı endositoz ile hücre içine girişi birkaç adımdan oluşmaktadır. Öncelikle konjugat reseptöre bağlanır, membran çöküntüsü oluşur ve endositik vezikül oluşturmak üzere sitoplazmaya girer. Endozomal kompartmanında asidifikasyon gerçekleşir ve reseptörün konformasyon değişmesiyle folat bağlı konjugat reseptörden ayrılır, bilinmeyen bir mekanizma ile konjugat sitoplazmaya geçer. Reseptör membrana doğru yeniden kullanılmak üzere yol alır. Düşük molekül kütlesi (441 g/mol), çeşitli solventlere, pH ve ısıya olan dayanıklılığı, konjugasyonun kolay olması, immunojenitesinin olmaması ve reseptörüne olan ilgisinin yüksek oluşu folik asiti ilaç hedeflemede önemli bir ligand yapar (31).



Şekil 3: Folat-ilâç konjugatının reseptör aracılı endositoz ile hücre içine girişi (31)

1.8.2 Etki Mekanizması

Çok geniş araştırmalara rağmen MET'in etki mekanizması hala tam olarak bilinmemektedir. MET, bir folik asit antagonisti olup pürin metabolizmasının da dahil olduğu folik aside bağımlılık gösteren birçok metabolik yolu birkaç mekanizma ile inhibe edebilmektedir. Bunlar arasında en önemlisi dihidro folat redüktaz enziminin inhibisyonu ile folik asidin dihidro ve tetrahidro folata indirgenmesinin önlenmesidir. MET'in poliglutamil deriveleri sadece MET'ten daha güçlü inhibitör değil, aynı zamanda folik asit metabolizmasında rol oynayan distal enzimlerin de inhibitörüdür.

Pürinler nükleik asitlerin (adenozin monofosfat, guanozin monofosfat) ve sonuç olarak DNA ve ribonükleik asit (RNA) sentezi için gereklidir. Pürin metabolizması de novo ve salvage olmak üzere iki yolla gerçekleşir. 5-nükleotidaz, pürin-nükleozid-fosforilaz, hipoksantin-guanozin fosforibozil transferaz ve adenzin deaminaz salvage yolunda rol alan enzimlerdir (28, 32).

1.8.3 MET'in Yan Etkileri

Uzun dönemdeki etkinliği göz önüne alındığında MET'in ilk ayda etkisinin başladığı, maksimum etkinliğin 6. ayda elde edildiği, buna rağmen bazen etkisizliği için 4-6 aylık bir periyodun geçmesi gerektiği bildirilmiştir. Hastaların %50'sinden fazlası MET alımını 3 yıldan daha fazla sürdürebilmektedir (28).

MET'in ortaya çıkan yan etkilerine bağlı olarak 1/3'ü tarafından bir yıl içinde kullanıma son verildiği ve bu yan etkilerin de ancak %1'inin ciddi yan etkiler olduğu bildirilmiştir (28, 33, 34). Toksik etkilerin ortaya çıkmasında bazı predispozan faktörler rol oynayabilmektedir. Bunlar; folat eksikliği, ilacın gittikçe artan dozlarda kullanımı, böbrek yetmezliği ve beraberinde diğer modifiye edici ilaçların ve non streoidal antienflamatuar ilaçların (NSAİİ) kullanımıdır (28).

1.8.3.1 Gastrointestinal Sistem Yan Etkileri

İştahsızlık, mide bulantısı, kusma, ishal, kilo kaybı gibi yan etkiler sıktır. Hastaların büyük kısmında hafif seyrederek kısa sürer. Ancak hastaların %2,5'inde ilacı kesecek şiddette olabilir. Yine çeşitli şiddetli ağrılı ülser ve eritemden oluşan stomatit görülebilir. Gastrointestinal yan etkiler düzenli verilecek folik asit takviyesi, dozun azaltılması veya parenteral uygulamaya geçilmesiyle azaltılabilir (28, 35, 36).

1.8.3.2 Kutanöz Yan Etkiler

Alopesi, güneş ışığına hassasiyet, eritem, ürtiker ve kutanöz vaskülit olabilir. Ayrıca romatoid nodüllerin sayısında artış olabilir (28, 36).

1.8.3.3 Hematolojik Yan Etkiler

Yeterli folik asit desteği verilmeksizin uzun süre MET kullanımı folat eksikliğine ve eritrositlerde makrositoza neden olabilir. Lökopeni, trombositopeni, megaloblastik anemi ve pansitopeni nadirdir ve %5'ten az görülür. Renal yetmezlik, folik asit eksikliği, akut viral enfeksiyonlar, birlikte probenesisid, trimetoprim-sulfometaksazol gibi ilaçların kullanımı riski artırır. Ortalama eritrosit hacminde artış hematolojik toksisiteye eğilimi yansıtır. Hematolojik toksisite veya MET aşırı

dozundan kuşullanılırsa derhal folik asit tedavisine başlanılmalıdır. MET dozundan 24-48 saat sonra, MET'in dozuna eşit miktarda verilmelidir. Kemik iliği toksisitesi folat tedavisine cevap verir, ancak folik asit profilaktik olarak verilmelidir (28, 35, 36).

1.8.3.4 Renal Yan Etkiler

Düşük doz haftalık MET ile renal toksisite bildirilmemiştir. İlaç böbreklerden atıldığı için renal yetmezlikte kullanılmamalıdır. Renal fonksiyonların düzenli takibi gerekmektedir (36).

1.8.3.5 Üreme Sistemi Üzerine Yan Etkiler

Kanser kemoterapisinde kullanılan yüksek doz MET ile geçici oligospermi olabilir. Overian disfonksiyon ise bildirilmemiştir. MET teratojen bir ajandır. Konsepsiyon düşünüldüğünde kadınlarda en az bir ovaryan siklus erkeklerde de 90 gün önceden ilaç kesilmelidir (28, 30, 36).

1.8.3.6 Akciğerler Üzerine Yan Etkiler

MET ile pulmoner toksisite akut veya kronik olabilir. Pulmoner reaksiyon %3-5 sıklıkta bildirilmiştir. Akut başlayan öksürük, nefes darlığı, hafif ateş, taşipne, akciğer bazallerinde iki taraflı rallerin ortaya çıkması hekimi uyarmalıdır. Akciğer grafilerinde bilateral intersitisyel parankimal infiltrasyon tespit edilmesi ve balgam kültürlerinin negatif olması MET'e bağlı hipersensivite pnömonisini akla getirmelidir. Hastanın 60 yaşın üzerinde olması, akciğer ve plevra hastalıklarının varlığı, daha önce başka modifiye edici ajanların kullanılmış olması, albuminde düşüklük, sigara, diyabetes mellitus MET'in akciğerlere toksisitesini kolaylaştırır. Hafif olgularda ilacın kesilmesiyle sorun çözülürken ileri vakalarda yüksek doz steroid ve solunum desteği gerekebilir (28, 35, 36).

1.8.3.7 Karaciğer Üzerine Yan Etkiler

Haftalık düşük doz MET tedavisi ile hepatotoksisite riski düşüktür, ancak alkol kullanımı diyabetes mellitus, kronik hepatit B ve C taşıyıcılığı, obezite, α -1 antitripsin eksikliği riski arttıran faktörlerdir. MET kullanan olgularda hastalık aktivitesi düzelirken, belirli aralarla yapılan karaciğer fonksiyon testlerinde yükselme ve serum albuminde düşme görülür (34, 35, 36).

1.8.3.8 Diğer Yan Etkiler

Baş ağrısı, kilo kaybı, yorgunluk, ateş, poliartralji, baş dönmesi, grip benzeri semptomlar olabilir. Bu yan etkiler folik asit desteğine cevap verir (35).



BÖLÜM II

2 GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Kullanılan Gereçler

2.1.1 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Aseton	Merck, Almanya
Asetonitril	Merck, Almanya
Askorbik Asit	Sigma Aldrich, Almanya
Azot Gazı	HABAŞ, Türkiye
Butanol	Merck, Almanya
Etanol	Merck, Almanya
Hidroklorik Asit (%37)	Merck, Almanya
Kalay Klorür	Sigma Aldrich, Almanya
Kalay Tartarat	Sigma Aldrich, Almanya
Metil Etil Keton	Merck, Almanya
MET	Koçak Farma, Türkiye
Serum Fizyolojik	İ.E.Ulagay İlaç San. Türk A.Ş.
Sodyum Hidroksit	Merck, Almanya
^{99m}Tc	E. Ü. Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Türkiye
Trifloro Asetik Asit	Merck, Almanya

2.1.2 Kullanılan Alet ve Malzemeler

Analitik Terazı	Precisa 205 ASCS, Almanya
pH Metre	İnolab Level 1, Almanya
Etüv	Nüve FN300, Türkiye
Radyo-Ultra Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	Thermo Acella, Amerika
İne Tabaka Kromatografisi-Tarayıcı	Bioscan AR-2000, Amerika
Fourier Transform Infrared Spectroscopy	Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR, Amerika
Doz Kalibratörü	Biodex AtomLab 400, Amerika
Vorteks	Velp Scientifica, İtalya
Ultra Viole -Spektrofotometre	Thermo Evaluation Array, Amerika
Radyoaktif Enjektör Taşıma Kutusu	Biodex, Amerika
Kurşun Tuğlalar	Biodex, Amerika
Kurşun Atık Kutusu	Biodex, Amerika
Alan Monitörü	Epsilon, Türkiye
Yüzey Monitörü	Biodex, Amerika
Göğüs Zırhı	Biodex Medical Systems, Amerika
Hamilton Enjektör	Hamilton, Amerika
Cam Malzemeler	Teknik Cam, Türkiye
Membran Filtre 0,22µm	Pall Life Sciences, Amerika
Whatman Kromatografi Kağıtları	Whatman International LTD., İngiltere
Instant Thin Layer Chromatography-Silica Gel Plakları	Varian, Amerika
Otomatik Pipet	Brand, Amerika
Laminar Hava Akımlı Kabin	Nuaire NU 440, İngiltere
Buz Dolabı	Beko, Türkiye

2.2 KULLANILAN YÖNTEMLER

2.2.1 MET'e Ait Yöntemler

2.2.1.1 Fourier Transform Infra-Red SpectroscopySpektrumu

MET'in fourier transform infra-red (FTIR) spektrumu 4000-400 cm^{-1} arasında taranıp pik verdiği dalga sayıları tespit edilerek analiz sertifikalarına uygun olup olmadığı araştırıldı.

2.2.1.2 Ultra Viole Spekturumu

2 mg MET'in 1 mL serum fizyolojikteki çözeltisi ile UV spekturumu alındı.

2.2.1.3 MET'in $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Radyonüklidi ile İşaretlenmesi

Met'in $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretlenmesinde en iyi bağlanma veriminin elde edildiği ideal şartları belirleyebilmek için farklı miktarlarda indirgen ve antioksidan ajanlar kullanılarak hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve oda sıcaklığındaki ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) in vitro stabiliteleri ince tabaka kromatografisi (İTK) ve radyo-ultra yüksek performanslı sıvı kromatografisi (R-UHPLC) sistemleri kullanılarak incelendi.

İndirgen ajan olarak kalay tartarat kullanılarak yapılan işaretleme çalışmaları ile en yüksek verimin elde edildiği koşullar belirlendi. Askorbik asitin $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli MET kompleksinin ($^{99\text{m}}\text{Tc-MET}$) stabilitesi üzerindeki etkisi araştırılarak görüntüleme amacı ile kullanılmaya en uygun olan formülasyon belirlendi.

Hazırlanan formülasyonlar 5 dakika bekleme süresinden sonra 0,22 μm por çaplı selüloz asetat filtreden süzüldü. Süzme işleminden sonra formülasyonların işaretleme verimleri yapılan ince tabaka kromatografisi (İTK) çalışmaları ile belirlendi. İTK çalışmalarında sabit faz olarak Whatman 3MM kağıtları ve instant thin layer chromatography- silica gel (ITLC-SG) plakları, hareketli faz olarak ise Aseton ve Asetonitril/Su/Trifloroasetik Asit (ASN/Su/TFA) kullanıldı. 8x1 cm boyutlarında hazırlanan plaklara tatbik edilen örnekler hareketli fazlarda sürüklendi. Sürükleme işlemi sonrasında kurutulan plaklar AR 2000 Radyo-TLC Scanner cihazında tarandı. Radyokimyasal saflık kontrolleri sonucunda $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri hesaplandı. Çalışmalar 3 tekrarlı olarak yapıldı. Ortalama işaretleme verimleri ve standart sapmaları (ss) hesaplandı.

2.2.1.4 İndirgen Ajan Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

İndirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak radyoişaretleme çalışmaları yapıldı. Hazırlanan formülasyonların içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri, ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi işaretlemeden sonra 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. saatlerde alınan örneklerde İTK yapılarak incelendi. MET'in serum fizyolojik (SF) içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisinden her bir şişede 0,5 mL olacak şekilde alındı. Daha sonra bu şişelere üzerinden azot gazı geçirilmiş, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden sırası ile 125 µl, 250 µl, 375 µl, 500 µl, 750 µl, 1000 µl, 1250 µl, 1500 µl ilave edildi. Her bir çözeltinin pH'ı 9'un üzerine ayarlandı. Her bir karışıma 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakılan çözeltilerin radyokimyasal saflığı ve 6 saatlik in vitro stabilitesi İTK yapılarak incelendi. 125 µg, 250 µg ve 375 µg kalay içeren formülasyonlardan elde edilen verimler çok düşük olduğundan bundan sonraki deneylere 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay içeren formülasyonlarla devam edildi. Kalay tartarat miktarının ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisini incelemek için kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların içerikleri Tablo 1'de verildi.

Kalay Tartarat Çözeltisinin Hazırlanması: Kalay tartaratın 0,1N HCl içindeki 1mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Ultrasonik banyoda karıştırılan çözelti üzerinden azot gazı geçirildikten sonra 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzüldü. Her çalışma öncesi çözelti taze olarak hazırlandı.

Tablo 1: Kalay tartarat miktarının ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar

Grup No	MET (mg)	Kalay Tartarat (μg)	^{99m}Tc (mCi)
1	1	125	1
2	1	250	1
3	1	375	1
4	1	500	1
5	1	750	1
6	1	1000	1
7	1	1250	1
8	1	1500	1

2.2.1.5 Süzme İşleminin ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro

Stabilitesi Üzerine Etkisi

Süzme işleminin ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisini araştırırken, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların süzülmeden önce ve süzildikten sonra içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı işaretlemeyen sonra 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. saatlerde alınan örneklerde İTK yapılarak incelendi. MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 1'er mL alınarak şişelere eklendi. Bu şişeler 5 ana gruba ayrıldı ve her bir gruba farklı miktarlarda indirgen ajan ilave edildi. 1. gruptaki şişelere üzerinden azot gazı geçirilmiş, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 μL eklendi ve 2 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,2 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılarak oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda şişelerdeki çözeltilerin yarısını 0,22 μm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülerek, diğer yarısının ise süzülmeden İTK çalışmaları yapıldı. Yapılan İTK çalışmaları ile 500 μg kalay tartarat içeren formülasyonun radyokimyasal saflığı ve 6 saatlik in vitro stabilitesi üzerinde süzme işleminin etkisi araştırıldı. Aynı yöntem 750 μg , 1000 μg , 1250 μg ve 1500 μg kalay

tartarat içeren 2., 3., 4. ve 5. gruplar için de tekrarlandı. Süzme işleminin ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisinin incelenmesi için kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların içerikleri Tablo 2'de verildi.

Tablo 2: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine süzme işleminin etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri (n=3).

Grup No	MET (mg)	Kalay Tartarat (μg)	^{99m}Tc (mCi)	Süzme İşlemi
1	1	500	1	Uygulandı
	1	500	1	Uygulanmadı
2	1	750	1	Uygulandı
	1	750	1	Uygulanmadı
3	1	1000	1	Uygulandı
	1	1000	1	Uygulanmadı
4	1	1250	1	Uygulandı
	1	1250	1	Uygulanmadı
5	1	1500	1	Uygulandı
	1	1500	1	Uygulanmadı

2.2.1.6 Askorbik Asit Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

Askorbik asit miktarının ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisi farklı miktarlarda kalay tartarat içeren formülasyonların içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi işaretlemiden sonra 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. saatlerde alınan örneklerde İTK yapılarak incelendi. MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltisinden 1,5'er mL alınarak şişelere eklendi. 5 ana gruba ayrılan şişelere farklı miktarlarda indirgen ajan ilave edildi. Birinci gruptaki şişelere üzerinden azot gazı geçirilmiş, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 500'er μl ilave edildi. Bu aşamadan sonra şişeler üç alt gruba ayrıldı. Alt gruplardan ilkinde antioksidan madde ilave edilmezken diğerlerine 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit eklendi. 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL)

eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılan çözeltiler oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonrasında 0,22 µm por çaplı membran filtreden süzülen çözeltilerin İTK çalışmaları yapıldı. Yapılan İTK çalışmaları ile 500 µg kalay tartarat içeren formülasyonun radyokimyasal saflığı ve 6 saatlik in vitro stabilitesi üzerine askorbik asit miktarının etkisi araştırıldı. Aynı yöntem 750 µg, 1000 µg, 1250 µg, 1500 µg kalay tartarat içeren 2., 3., 4. ve 5. gruplar için de tekrarlandı. Askorbik asit miktarının ^{99m}Tc-MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisini araştırmak için kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların içerikleri Tablo 3'de verildi.



Tablo 3: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine askorbik asitin etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri (n=3)

Grup No	MET (mg)	Kalay Tartarat (μg)	Askorbik Asit (mg)	^{99m}Tc (mCi)
1	1	500	-	1
	1	500	0,05	1
	1	500	0,1	1
2	1	750	-	1
	1	750	0,05	1
	1	750	0,1	1
3	1	1000	-	1
	1	1000	0,05	1
	1	1000	0,1	1
4	1	1250	-	1
	1	1250	0,05	1
	1	1250	0,1	1
5	1	1500	-	1
	1	1500	0,05	1
	1	1500	0,1	1

2.2.1.7 Radyoaktivite Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Stok çözeltiden 6 şişeye 0,5'er mL alındı. Üzerinden azot gazı geçirilmiş, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 μL ve 0,1 mg askorbik asit ilave edilen şişeler iki gruba ayrıldı. Birinci gruba 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL), ikinci gruba 10 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılan çözeltiler oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonrasında 0,22 μm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen çözeltilerin radyokimyasal saflığı ve 6 saatlik in vitro

stabilitesi İTK yapılarak incelendi.

Tablo 4: ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine radyoaktivite miktarının etkisini araştırmak için hazırlanan formülasyonların içerikleri (n=3)

Grup No	Met (mg)	Kalay Tartarat (μg)	Askorbik Asit (mg)	^{99m}Tc (mCi)
1	1	1000	0.1	1
2	1	1000	0.1	10

2.2.2 ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilesinin Hesaplanması

2.2.2.1 ^{99m}Tc -MET'in Kromatografi Çalışmalarında Kullanılacak Solvan Sisteminin Geliştirilmesi

MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Her bir şişede 0,5 mL stok çözeltisi olacak şekilde üç şişeye ayrıldı. Bu çözeltiler üzerine taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat çözeltisinden 500 μL , 750 μL ve 1000 μL ilave edildi. Her bir karışıma 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda işaretli çözeltiler ile İTK yapıldı. ^{99m}Tc -MET, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ 'nin elde edilen Rf değerleri bulundu. Hareketli faz olarak; Aseton, SF, ASN/Su/TFA (50/25/1,5), sabit faz olarak; Whatman 3MM kağıtları, Silica Gel (SG) ve ITLC-SG plakları kullanıldı.

2.2.2.2 İTK ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

Radyoişaretleme sonrası yapılan İTK çalışmaları ile ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı incelendi. Bu çalışmalarda 1×8 cm boyutlarında kesilmiş Whatman 3MM kağıtları, SG ve ITLC-SG plaklarının başlangıç noktalarına işaretli çözelti tatbik edildi. Whatman 3MM ve SG plaklar asetonda, ITLC-SG plaklar SF ve ASN/Su/TFA (50/25/1,5) solvan sistemlerinde yürütüldü. Sürüklemeye işlemi bittikten sonra tanklardan çıkarılan plaklar Radyo-TLC Scanner'da taranarak, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri Rf değerlerine göre belirlendi. Radyokimyasal saflığı aşağıdaki denklem ile hesaplandı.

$$\% \text{ Radyokimyasal saflığı} = [100 - (\% \text{ IH-}^{99m}\text{Tc} + \% ^{99m}\text{TcO}_4^-)]$$

2.2.2.3 R-UHPLC ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

UHPLC eluatlarındaki radyoaktivitenin ölçümüne dayanan bir araç olan R-UHPLC ile kromatografi çalışmaları yapıldı.

Kromatografik Şartlar

Dedektör: Photodiode Array Detector (PDA) ve NaI Gama Dedektör

Hareketli Faz: Solvan 1: Su/TFA (100 /0,1), Solvan 2: Asetonitril/TFA (100 /0,1)

Kolon: 50×2,1 mm, C₁₈

Akış Hızı: 200 µL/dk

Kolon Sıcaklığı: 25°C

Enjeksiyon Hacmi: 20 µL

Akış Prosedürü: Akış prosedürü Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 5: Radyo UHPLC çalışmaları için kullanılan akış prosedürü

Zaman (Dakika)	Solvan 1 (%)	Solvan 2 (%)
0-3	95	5
3-5	80	20
5-10	40	60
10-13	5	95

R-UHPLC cihazına uygulanacak radyofarmasötik içindeki olası safsızlıkların pik zamanlarını belirlemek için; yukarıda belirtilen koşullarda çalışmakta olan cihaza ^{99m}TcO₄⁻ ve İH-^{99m}Tc örnekleri enjekte edildi. Örneklerin hazırlanması;

^{99m}TcO₄⁻: R-UHPLC cihazına ⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratörden elde edilen 1 mCi aktiviteye sahip Na^{99m}TcO₄ sağım ürünü enjekte edildi. Uygulama öncesinde, Na^{99m}TcO₄ radyonüklidin kalite kontrolü İTK ile yapıldı. İTK çalışmalarında hareketli faz olarak Aseton, sabit faz olarak Whatman 3MM kağıtları kullanıldı.

İH-^{99m}Tc: Azot gazı akımında taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL alınarak 1 mCi aktiviteye sahip Na^{99m}TcO₄ üzerine ilave edildi. Vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılıp oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakılan çözelti bekleme süresi sonunda 0,22 µm por çaplı membran filtreden süzüldü. İH-^{99m}Tc safsızlığının kalite kontrolü İTK ile yapıldı. İTK çalışmalarında hareketli faz olarak Aseton ve ASN/Su/TFA, sabit faz olarak Whatman 3MMkağıtları ve ITLC-SG plakları kullanıldı.

^{99m}Tc-MET: MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. Şişeye 0,5 mL alınan stok çözeltisinin üzerine azot gazı akımında taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL ilave edildi. Daha sonra bu çözeltiye 0,1 mg askorbik asit ilave edildi ve 1 mCi aktiviteye sahip Na^{99m}TcO₄ (0,1 mL) eklendi. Şişe vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırıldı. 5 dakika oda sıcaklığında beklemeye bırakılan çözelti bekleme süresi sonunda 0,22 µm por çaplı membran filtreden süzüldü ve R-UHPLC çalışmaları yapıldı. R-UHPLC çalışmalarında kullanılan formülasyonun içerikleri Tablo 6'da verildi.

Tablo 6: R-UHPLC çalışmalarında kullanılan formülasyonun içeriği

MET (mg)	Kalay Tartarat (µg)	Askorbik Asit (mg)	^{99m} Tc (mCi)
1	1000	0,1	1

2.2.2.4 Radyoışaretili Kompleksin Stabilite Testleri

2.2.2.4.1 Oda Sıcaklığındaki Stabilite Testi

Yöntem 2.2.1.4- 2.2.1.6 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun indirgen ve antioksidan ajan miktarları kullanılarak ^{99m}Tc-MET'in oda sıcaklığındaki (25°C±2°C) in vitro stabilitesi araştırıldı.

MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen 0,5 mL çözelti üzerine, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL ve 0,1 mg askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 9'un üzerine ayarlandı. Daha sonra 1 mCi aktiviteye sahip Na^{99m}TcO₄ (0,1 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılan çözelti oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen çözeltiden radyoışaretlemeden sonra 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 24. saatlerde örnekler alınarak İTK çalışmaları yapıldı.

2.2.2.4.2 Serum Stabilite Testi

Yöntem 2.2.1.4- 2.2.1.6 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun indirgen ve antioksidan ajan miktarları kullanılarak ^{99m}Tc -MET'in serum stabilitesi araştırıldı.

MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen 0,5 mL çözelti üzerine, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL ve 0,1 mg askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 9'un üzerine ayarlandı. Daha sonra 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ (0,1 mL) eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılan çözelti oda sıcaklığında 5 dakika beklemeye bırakıldı. Bekleme süresi sonunda 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen çözeltiden 100 µL alındı. Üzerine ilave edilen taze kan serumu ile toplam hacmi 1 mL'ye tamamlanan karışımdan radyoişaretlemeden sonra 0., 1., 2., 3., 4., 5., 6. ve 24. saatlerde alınan örnekler ile İTK yapılarak çözeltilerin radyokimyasal saflığı ve stabilitesi hesaplandı.

2.2.2.4.3 Sterilite

Yöntem 2.2.1.4- 2.2.1.6 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun indirgen ve antioksidan ajan miktarları kullanılarak hazırlanan radyoişaretleli olmayan formülasyonun sterilite testi yapıldı. MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok çözeltisi hazırlandı. 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen 0,5 mL çözelti üzerine, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL ve 0,1 mg askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 9'un üzerine ayarlandı daha sonra bu çözeltiden steril tüpler içerisinde hazırlanmış olan triptik soya besiyeri (TSB) ve tiyoglikolat besi yerlerine (TGB) 1'er mL ilave edildi. Tüpler 7 gün süreyle $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de inkübe edildi. Bu süre boyunca herhangi bir mikroorganizma üremesi olup olmadığı incelendi.

2.2.2.4.4 İzotoni Testi

Yöntem 2.2.1.4- 2.2.1.6 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun indirgen ve antioksidan ajan miktarları kullanılarak hazırlanan radyoişaretleli olmayan formülasyonun izotoni testi osmometre kullanılarak yapıldı. MET'in SF içindeki 2mg/1mL konsantrasyonda stok

özeltisi hazırlandı. 0,22 µm por çaplı selüloz asetat filtreden süzülen 0,5 mL çözelti üzerine, taze hazırlanmış 1mg/1mL konsantrasyondaki kalay tartarat stok çözeltisinden 1000 µL ve 0,1 mg askorbik asit ilave edildi. Hazırlanan çözeltinin pH'ı 9'un üzerine ayarlandı. Kalibrasyon özeltisi ile kalibre edilen cihazda ependorf tüpler içindeki örneklerin ozmotik basıncı analiz edildi.



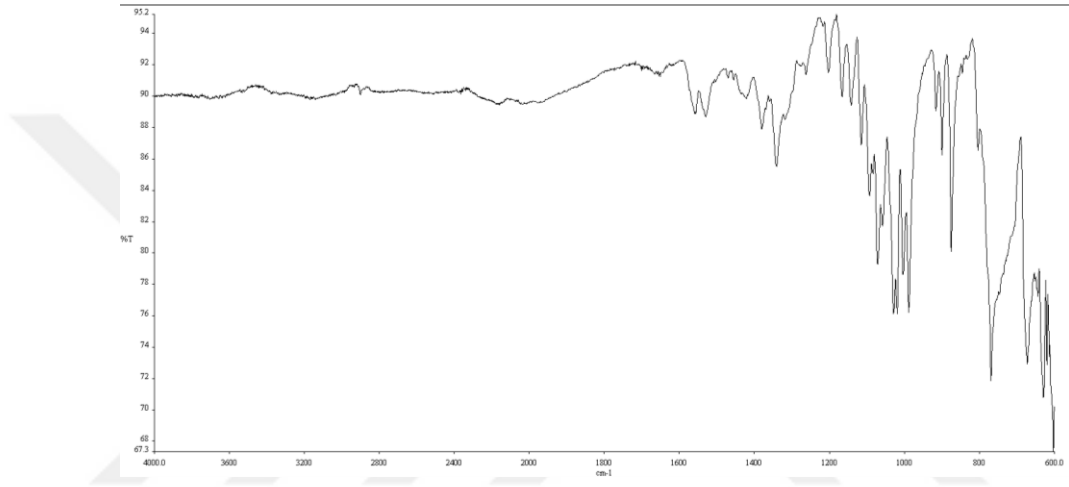
BÖLÜM 3

3 BULGULAR

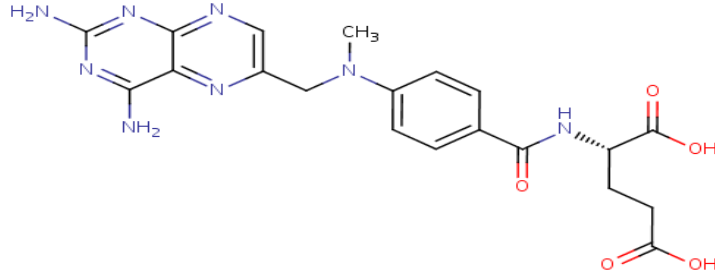
3.1 MET'e Ait Bulgular

3.1.1 FTIR Analizi ve Tanımlanması

Bölüm 2.2.1.1'de anlatıldığı şekilde FTIR spektrumu çekilen MET'in spektrumu Şekil 4'de, karşılaştırılabilmesi için etkin maddenin kimyasal yapısı Şekil 5'te verilmiştir. MET'in yapısında bulunan amit I bandı 1600, amit II bandı ise 1500 cm^{-1} bölgesinde tespit edilmiştir.



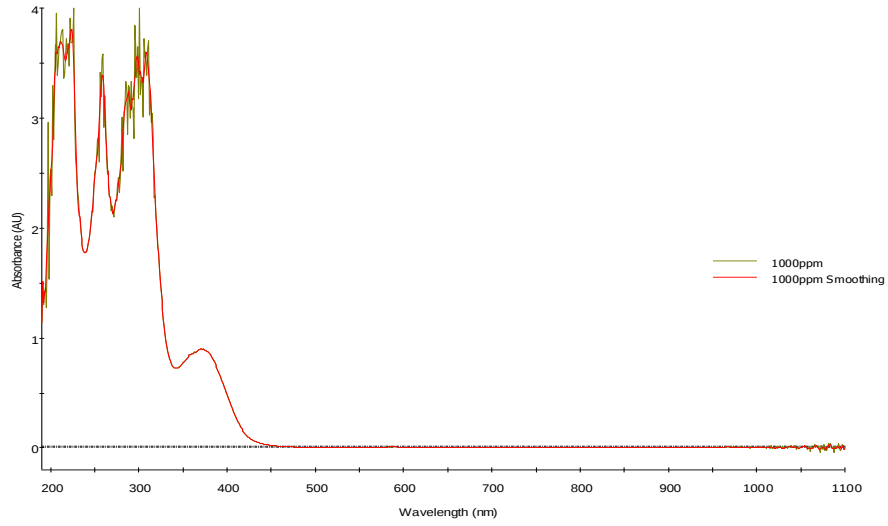
Şekil 4: MET'in FTIR spektrumu



Şekil 5: MET'in kimyasal yapısı (37)

3.1.1 UV Analizi ve Tanımlanması

Bölüm 2.2.1.2'de anlatıldığı şekilde UV spektrumu çekilen MET'in spektrumu Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6: MET'e ait UV spektrumu

3.1.2 MET'in ^{99m}Tc Radyonüklidi ile İşaretlenmesi

MET'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesinde ideal şartları belirleyebilmek için hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve in vitro stabiliteleri incelendi.

3.1.2.1 İndirgen Ajan Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

Bölüm 2.2.1.4'de anlatıldığı şekilde farklı kalay tartarat miktarları ile yapılan radyoişaretleme çalışmalarından sonra 125 µg, 250 µg ve 375 µg içeren ^{99m}Tc -MET'in içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri Tablo 7'de verildi. 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay içeren ^{99m}Tc -MET'in içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi Tablo 8 'de, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi Tablo 9'da ve ^{99m}Tc -MET radyokimyasal saflığı ve stabilitesine ait sonuçlar Tablo 10'da ve Şekil 7'de verildi.

Tablo 7:Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri

Zaman (Saat)								
Kalay Tartarat (μg)		0	1	2	3	4	5	6
125	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi	98,13	97,95	97,27	96,91	98,65	97,46	98,58
	$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi	0,24	0,26	0,30	0,48	0,27	0,29	0,10
250	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi	92,97	98,00	97,99	97,04	98,73	98,31	98,54
	$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi	0,12	0,21	0,18	0,23	0,28	0,32	0,17
375	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi	60,61	80,95	85,07	87,37	96,99	96,90	96,26
	$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi	0,77	0,82	0,41	0,12	0,37	0,34	0,33

Tablo 8: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları($\pm$ ss)
(n=3)

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ Miktarı (%)							
Zaman (Saat)							
Kalay Tartarat (μg)	0	1	2	3	4	5	6
500	10,21 $\pm$ 9,39	21,06 $\pm$ 18,47	38,39 $\pm$ 29,63	45,75 $\pm$ 37,75	45,96 $\pm$ 38,55	47,15 $\pm$ 36,93	51,96 $\pm$ 39,40
750	3,00 $\pm$ 3,49	6,91 $\pm$ 4,44	10,75 $\pm$ 9,52	21,77 $\pm$ 28,90	27,94 $\pm$ 32,32	37,76 $\pm$ 35,50	45,14 $\pm$ 33,90
1000	1,64 $\pm$ 0,53	3,54 $\pm$ 2,25	3,10 $\pm$ 1,65	5,56 $\pm$ 4,10	8,00 $\pm$ 2,70	9,13 $\pm$ 2,27	11,23 $\pm$ 3,54
1250	7,25 $\pm$ 8,09	8,22 $\pm$ 5,76	8,45 $\pm$ 2,38	13,86 $\pm$ 3,05	19,60 $\pm$ 17,86	31,93 $\pm$ 28,15	36,75 $\pm$ 18,71
1500	5,64 $\pm$ 2,70	6,26 $\pm$ 4,47	5,82 $\pm$ 1,33	7,58 $\pm$ 2,14	8,06 $\pm$ 2,43	10,28 $\pm$ 4,42	11,66 $\pm$ 4,42

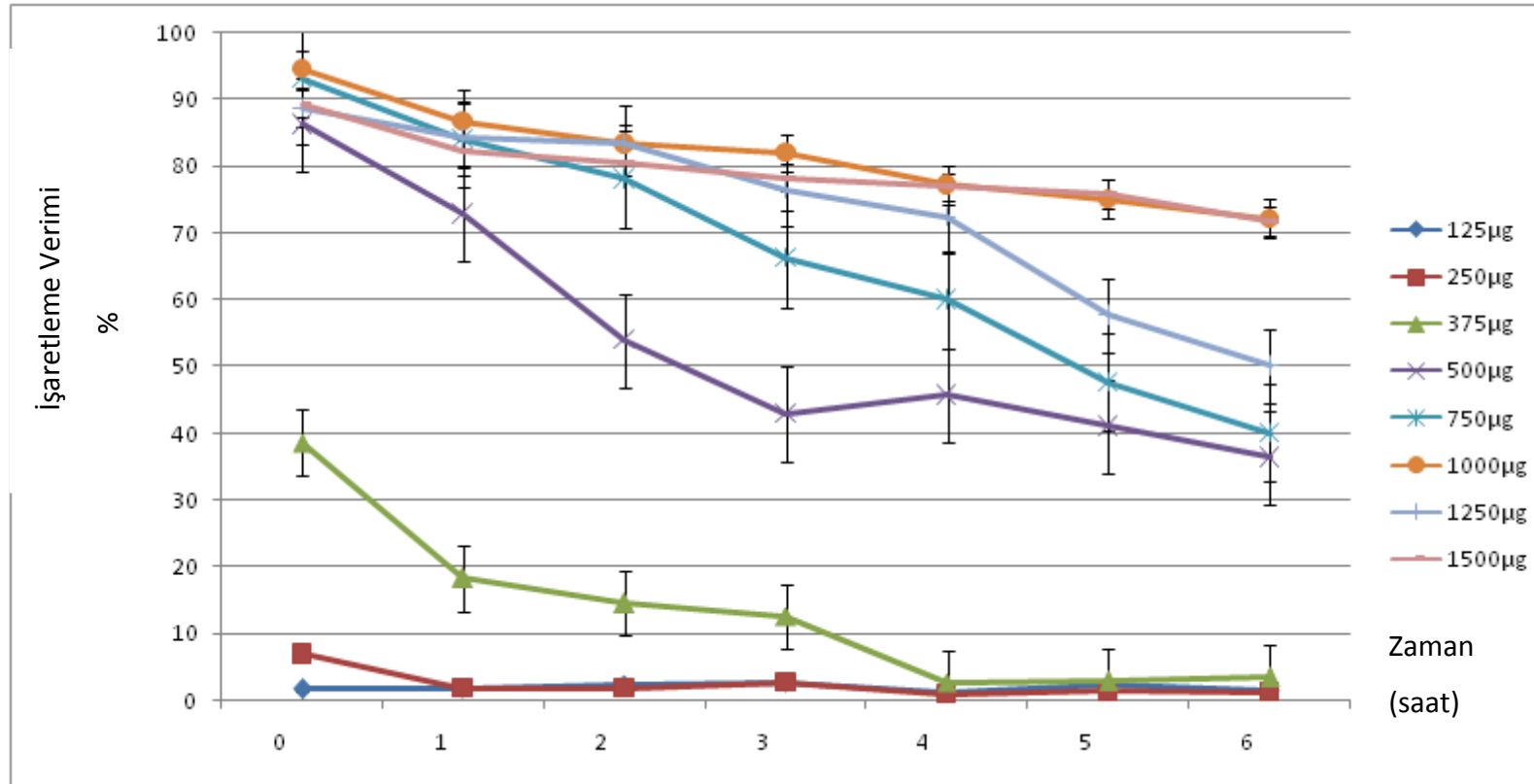
Tablo 9: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm\text{ss}$)(n=3)

$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ Miktarı (%)

Kalay Tartarat (μg)	Zaman (Saat)						
	0	1	2	3	4	5	6
500	3,48 $\pm$ 0,59	6,06 $\pm$ 2,22	7,66 $\pm$ 1,01	11,37 $\pm$ 4,94	8,32 $\pm$ 2,21	11,83 $\pm$ 4,56	11,71 $\pm$ 1,37
750	3,88 $\pm$ 1,77	9,04 $\pm$ 6,81	11,19 $\pm$ 9,64	12,04 $\pm$ 7,28	12,04 $\pm$ 12,40	14,59 $\pm$ 11,08	14,76 $\pm$ 12,79
1000	3,80 $\pm$ 1,35	9,83 $\pm$ 7,84	13,50 $\pm$ 10,88	12,45 $\pm$ 8,34	14,80 $\pm$ 11,81	15,74 $\pm$ 9,33	16,59 $\pm$ 11,83
1250	4,02 $\pm$ 1,58	7,56 $\pm$ 3,31	7,95 $\pm$ 3,89	9,57 $\pm$ 4,93	8,07 $\pm$ 4,21	10,39 $\pm$ 4,00	13,19 $\pm$ 8,44
1500	4,96 $\pm$ 1,46	11,44 $\pm$ 7,39	13,52 $\pm$ 5,25	14,13 $\pm$ 9,59	15,00 $\pm$ 12,19	13,86 $\pm$ 6,15	16,58 $\pm$ 9,31

Tablo 10: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)

Kalay Tartarat (μg)	^{99m}Tc -MET Miktarı (%)						
	Zaman (Saat)						
	0	1	2	3	4	5	6
500	86,31 $\pm$ 9,76	72,88 $\pm$ 18,17	53,95 $\pm$ 28,85	42,88 $\pm$ 40,97	45,72 $\pm$ 36,56	41,02 $\pm$ 40,95	36,33 $\pm$ 38,23
750	93,12 $\pm$ 2,58	84,05 $\pm$ 2,53	78,06 $\pm$ 10,44	66,19 $\pm$ 30	60,02 $\pm$ 26,4	47,65 $\pm$ 28,84	40,1 $\pm$ 23,94
1000	94,56 $\pm$ 0,82	86,63 $\pm$ 6,17	83,4 $\pm$ 9,7	81,99 $\pm$ 7,07	77,19 $\pm$ 9,43	75,13 $\pm$ 7,06	72,18 $\pm$ 8,41
1250	88,73 $\pm$ 7,05	84,22 $\pm$ 2,48	83,59 $\pm$ 3,32	76,57 $\pm$ 2,61	72,32 $\pm$ 16,61	57,68 $\pm$ 24,16	50,06 $\pm$ 17,46
1500	89,4 $\pm$ 1,35	82,3 $\pm$ 5,68	80,66 $\pm$ 4,23	78,29 $\pm$ 8,27	76,94 $\pm$ 10,67	75,86 $\pm$ 8,17	71,76 $\pm$ 13,01



Şekil 7: Farklı kalay tartarat miktarları ile hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdeleri

3.1.2.1 Süzme İşleminin $^{99m}\text{Tc-MET}$ 'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

Bölüm 2.2.1.5'de anlatıldığı şekilde süzme işleminin farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisi incelendi. Süzme işlemi uygulanmış ve uygulanmamış formülasyonların içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi Tablo 11'de, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi Tablo 12'de ve $^{99m}\text{Tc-MET}$ radyokimyasal saflığı ve stabilitesine ait sonuçlar Tablo 13'de, Şekil 8, Şekil 9, Şekil 10, Şekil 11 ve Şekil 12'de verildi.



Tablo 11: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)



Kalay Tartarat (μg)

Zaman (Saat)	500		750		1000		1250		1500	
	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş
0	10,21 $\pm$ 9,39	7,71 $\pm$ 9,18	3,00 $\pm$ 3,49	5,49 $\pm$ 4,04	1,64 $\pm$ 0,53	5,55 $\pm$ 5,52	7,25 $\pm$ 8,09	4,95 $\pm$ 4,61	5,64 $\pm$ 2,70	8,19 $\pm$ 4,4
1	21,06 $\pm$ 18,47	12,11 $\pm$ 13,57	6,91 $\pm$ 4,44	4,97 $\pm$ 2,89	3,54 $\pm$ 2,25	3,48 $\pm$ 1,32	8,22 $\pm$ 5,76	3,71 $\pm$ 1,28	6,26 $\pm$ 4,47	9,99 $\pm$ 4,38
2	38,39 $\pm$ 29,63	17,07 $\pm$ 16,12	10,75 $\pm$ 9,52	14,32 $\pm$ 9,85	3,10 $\pm$ 1,65	8,27 $\pm$ 7,07	8,45 $\pm$ 2,38	10,58 $\pm$ 11,87	5,82 $\pm$ 1,33	8,96 $\pm$ 3,39
3	45,75 $\pm$ 37,75	24,35 $\pm$ 21,19	21,77 $\pm$ 28,90	27,19 $\pm$ 21,4	5,56 $\pm$ 4,10	23,51 $\pm$ 31,04	13,86 $\pm$ 3,05	15,97 $\pm$ 22,00	7,58 $\pm$ 2,14	14,38 $\pm$ 11,38
4	45,96 $\pm$ 38,55	29,21 $\pm$ 27,85	27,94 $\pm$ 32,32	26,41 $\pm$ 21,21	8,00 $\pm$ 2,70	23,58 $\pm$ 32,99	19,60 $\pm$ 17,86	21,58 $\pm$ 30,8	8,06 $\pm$ 2,43	18,65 $\pm$ 21,4
5	47,15 $\pm$ 36,93	36,24 $\pm$ 30,61	37,76 $\pm$ 35,50	30,38 $\pm$ 24,43	9,13 $\pm$ 2,27	33,48 $\pm$ 32,71	31,93 $\pm$ 28,15	28,26 $\pm$ 41,4	10,28 $\pm$ 4,42	22,57 $\pm$ 27,62
6	51,96 $\pm$ 39,40	32,61 $\pm$ 31,79	45,14 $\pm$ 33,90	47,69 $\pm$ 35,14	11,23 $\pm$ 3,54	35,93 $\pm$ 36	36,75 $\pm$ 18,71	30,87 $\pm$ 45,59	11,66 $\pm$ 4,42	28,27 $\pm$ 36,61

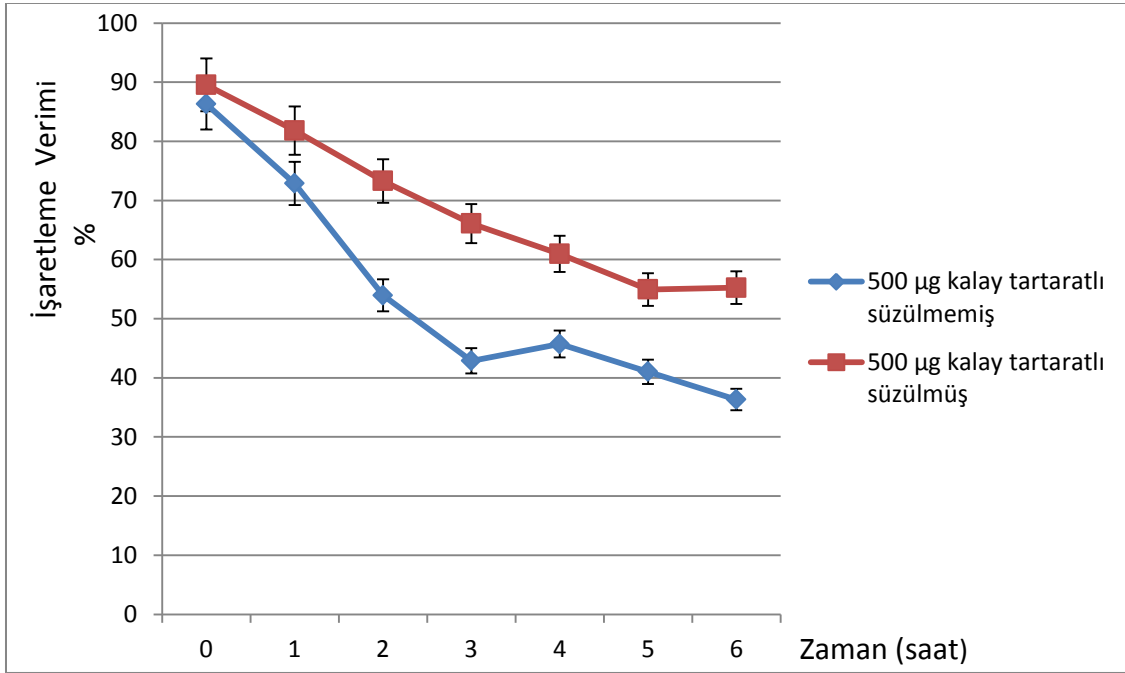
Tablo 12: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)

$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ Miktarı (%)

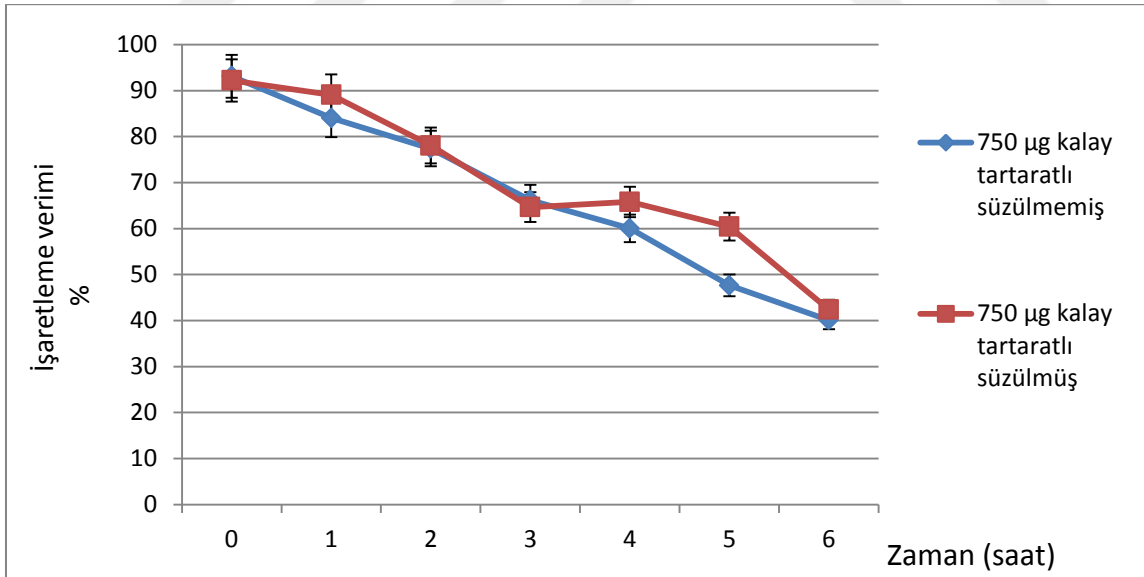
Zaman (Saat)	Kalay Tartarat (μg)									
	500		750		1000		1250		1500	
	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş
0	3,48 $\pm$ 0,59	2,74 $\pm$ 1,07	3,88 $\pm$ 1,77	2,31 $\pm$ 0,43	3,8 $\pm$ 1,35	3,25 $\pm$ 0,79	4,02 $\pm$ 1,58	3,77 $\pm$ 2,22	4,96 $\pm$ 1,46	5,14 $\pm$ 3,04
1	6,06 $\pm$ 2,22	6,07 $\pm$ 3,49	9,04 $\pm$ 6,81	5,94 $\pm$ 2,37	9,83 $\pm$ 7,84	6,66 $\pm$ 3,06	7,56 $\pm$ 3,31	8,99 $\pm$ 3,22	11,44 $\pm$ 7,39	13,35 $\pm$ 7,57
2	7,66 $\pm$ 1,01	9,64 $\pm$ 7,94	11,19 $\pm$ 9,64	8,3 $\pm$ 7,19	13,5 $\pm$ 10,88	7,11 $\pm$ 4,41	7,95 $\pm$ 3,89	8,93 $\pm$ 3,14	13,52 $\pm$ 5,25	11,21 $\pm$ 5,98
3	11,37 $\pm$ 4,94	9,54 $\pm$ 7,35	12,04 $\pm$ 7,28	8,17 $\pm$ 6,89	12,45 $\pm$ 8,34	9,85 $\pm$ 5,99	9,57 $\pm$ 4,93	9,45 $\pm$ 6,19	14,13 $\pm$ 9,59	16,38 $\pm$ 5,24
4	8,32 $\pm$ 2,21	9,82 $\pm$ 9,04	12,04 $\pm$ 12,4	7,8 $\pm$ 6,37	14,8 $\pm$ 11,81	9,09 $\pm$ 5,74	8,07 $\pm$ 4,21	11,63 $\pm$ 5,93	15 $\pm$ 12,19	14,82 $\pm$ 12,12
5	11,83 $\pm$ 4,56	8,82 $\pm$ 7,44	14,59 $\pm$ 11,08	9,19 $\pm$ 8,87	15,74 $\pm$ 9,33	6,55 $\pm$ 4,1	10,39 $\pm$ 40	9,58 $\pm$ 3,36	13,86 $\pm$ 6,15	16,12 $\pm$ 6,74
6	11,71 $\pm$ 1,37	12,14 $\pm$ 6,67	14,76 $\pm$ 12,79	9,92 $\pm$ 7,85	16,59 $\pm$ 11,83	10,43 $\pm$ 8,97	13,19 $\pm$ 8,44	13,08 $\pm$ 5,66	16,58 $\pm$ 9,31	14,02 $\pm$ 7,30

Tablo 13: Farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işlemi uygulanmasından önce ve uygulandıktan sonra içerdikleri ^{99m}Tc -MET yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss). (n=3)

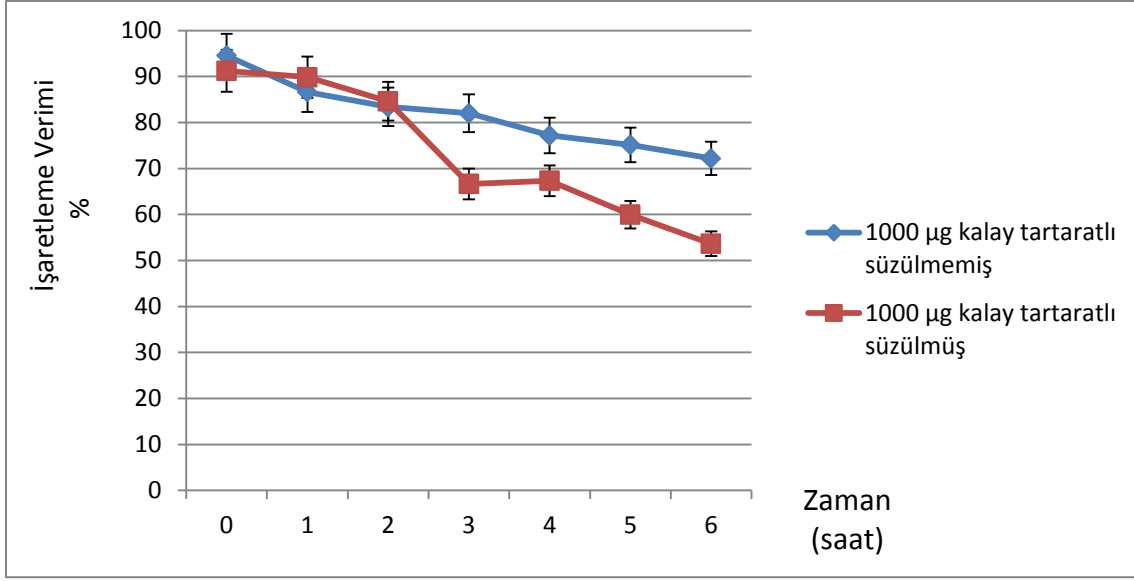
^{99m}Tc -MET Miktarı (%)										
Kalay Tartarat(μg)										
Zaman (Saat)	500		750		1000		1250		1500	
	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş	Süzülmemiş	Süzülmüş
0	86,31 $\pm$ 9,76	89,55 $\pm$ 8,72	93,12 $\pm$ 2,58	92,2 $\pm$ 4,07	94,56 $\pm$ 0,82	91,20 $\pm$ 6,21	88,73 $\pm$ 7,05	91,27 $\pm$ 4,47	89,4 $\pm$ 1,35	86,67 $\pm$ 6,08
1	72,88 $\pm$ 18,17	81,82 $\pm$ 10,34	84,05 $\pm$ 2,53	89,09 $\pm$ 0,52	86,63 $\pm$ 6,17	89,86 $\pm$ 1,96	84,22 $\pm$ 2,48	87,3 $\pm$ 3,16	82,3 $\pm$ 5,68	76,65 $\pm$ 6,76
2	53,95 $\pm$ 28,85	73,29 $\pm$ 8,19	78,06 $\pm$ 10,44	77,38 $\pm$ 3,71	83,4 $\pm$ 9,7	84,62 $\pm$ 5,66	83,59 $\pm$ 3,32	80,49 $\pm$ 9,84	80,66 $\pm$ 4,23	79,83 $\pm$ 2,65
3	42,88 $\pm$ 40,97	66,11 $\pm$ 13,87	66,19 $\pm$ 30	64,64 $\pm$ 14,6	81,99 $\pm$ 7,07	66,64 $\pm$ 29,26	76,57 $\pm$ 2,61	74,59 $\pm$ 16,57	78,29 $\pm$ 8,27	69,24 $\pm$ 6,14
4	45,72 $\pm$ 36,56	60,96 $\pm$ 20,64	60,02 $\pm$ 26,4	65,79 $\pm$ 15,85	77,19 $\pm$ 9,43	67,33 $\pm$ 31,37	72,32 $\pm$ 16,61	66,79 $\pm$ 24,87	76,94 $\pm$ 10,67	50,94 $\pm$ 18,35
5	41,02 $\pm$ 40,95	54,94 $\pm$ 24,02	47,65 $\pm$ 28,84	60,42 $\pm$ 15,92	75,13 $\pm$ 7,06	59,97 $\pm$ 31,79	57,68 $\pm$ 24,16	62,17 $\pm$ 38,77	75,86 $\pm$ 8,17	61,31 $\pm$ 21,84
6	36,33 $\pm$ 38,23	55,25 $\pm$ 25,29	40,1 $\pm$ 23,94	42,39 $\pm$ 27,3	72,18 $\pm$ 8,41	53,64 $\pm$ 29,43	50,06 $\pm$ 17,46	56,05 $\pm$ 40,38	71,76 $\pm$ 13,01	57,71 $\pm$ 31,43



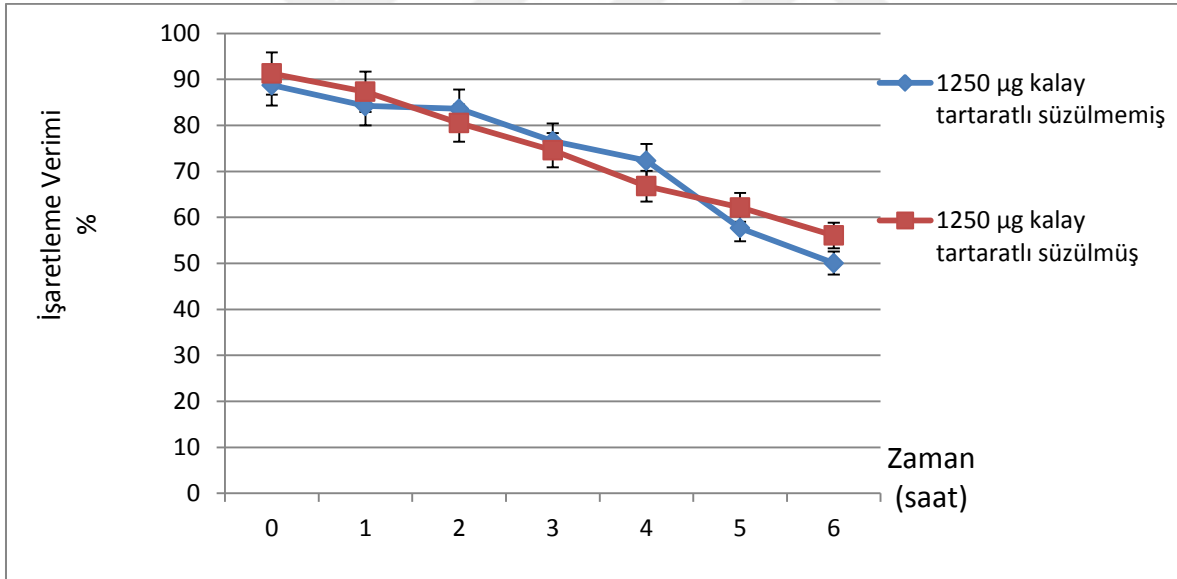
Şekil 8: 500 µg kalay tartarat içeren $^{99m}\text{Tc-MET}$ süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99m}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri



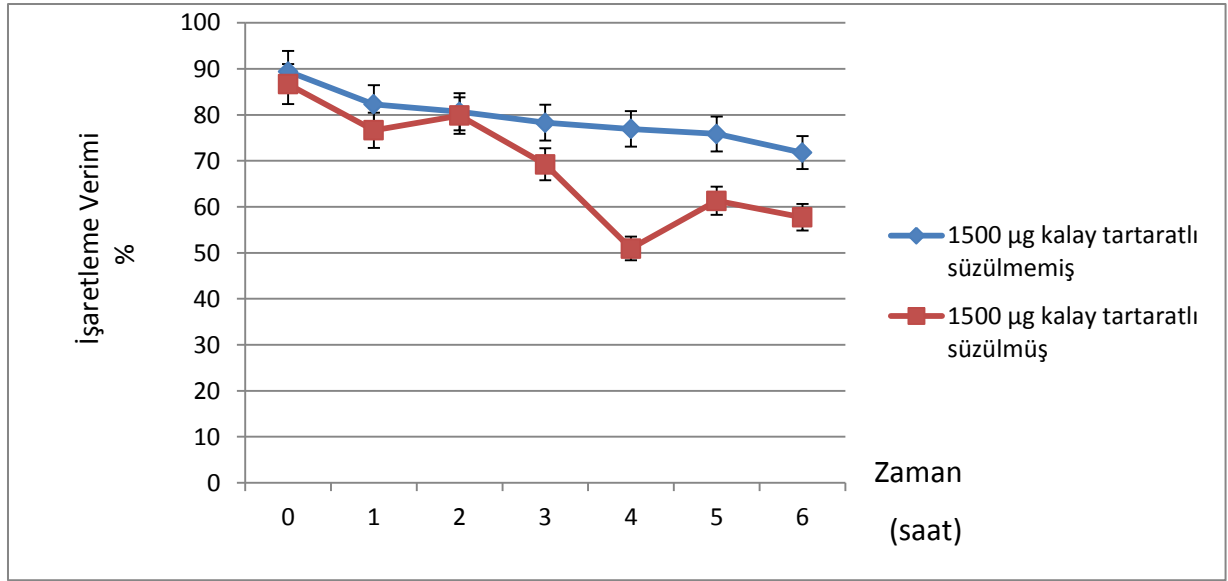
Şekil 9: 750 µg kalay tartarat içeren $^{99m}\text{Tc-MET}$ süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri $^{99m}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri



Şekil 10: 1000 µg kalay tartarat içeren ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



Şekil 11: 1250 µg kalay tartarat içeren ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



Şekil 12: 1500 µg kalay tartarat içeren ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının süzme işleminden önce ve sonra içerdikleri ^{99m}Tc -MET yüzdeleri

3.1.2.2 Askorbik Asit Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

Bölüm 2.2.1.6'da anlatıldığı şekilde askorbik asit miktarının farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisi incelendi. Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren formülasyonların içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi Tablo 14, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi Tablo 15'de ve ^{99m}Tc -MET radyokimyasal saflığı ve stabilitesine ait sonuçları Tablo 16'da ve Şekil 13, Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16 ve Şekil 17'de verildi.



Tablo 14: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ Miktarı (%)

Kalay Tartarat (μg)									
	500			750			1000		
Askorbik Asit Miktarı (μg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)									
0	7,71 $\pm$ 9,18	2,53 $\pm$ 1,57	3,17 $\pm$ 2,72	5,49 $\pm$ 4,04	4,24 $\pm$ 3,70	2,35 $\pm$ 1,44	5,55 $\pm$ 5,52	2,05 $\pm$ 1,55	1,2 $\pm$ 0,78
1	12,11 $\pm$ 13,57	4,11 $\pm$ 3,64	7,57 $\pm$ 6,17	4,97 $\pm$ 2,89	4,21 $\pm$ 0,95	4,96 $\pm$ 3,98	3,48 $\pm$ 1,32	2,02 $\pm$ 0,73	2,08 $\pm$ 1,17
2	17,07 $\pm$ 16,12	7,11 $\pm$ 7,40	19,86 $\pm$ 19,59	14,32 $\pm$ 9,85	4,48 $\pm$ 1,41	9,54 $\pm$ 5,23	8,27 $\pm$ 7,07	2,22 $\pm$ 0,63	2,86 $\pm$ 2,84
3	24,35 $\pm$ 21,19	18,31 $\pm$ 25,52	38,29 $\pm$ 32,81	27,19 $\pm$ 21,40	9,16 $\pm$ 4,85	16,35 $\pm$ 11,10	23,51 $\pm$ 31,04	3,74 $\pm$ 2,31	2,85 $\pm$ 2,34
4	29,21 $\pm$ 27,85	33,01 $\pm$ 24,98	56,75 $\pm$ 25,52	26,41 $\pm$ 21,21	40,29 $\pm$ 22,66	27,04 $\pm$ 12,22	23,58 $\pm$ 32,99	5,80 $\pm$ 1,71	6,87 $\pm$ 3,52
5	36,24 $\pm$ 30,61	31,44 $\pm$ 32,43	57,50 $\pm$ 23,76	30,38 $\pm$ 24,43	45,9 $\pm$ 36,74	47,37 $\pm$ 38,68	33,48 $\pm$ 32,71	12,43 $\pm$ 13,39	9,79 $\pm$ 4,04
6	32,61 $\pm$ 31,79	41,00 $\pm$ 36,49	58,23 $\pm$ 31,79	47,69 $\pm$ 35,14	71,02 $\pm$ 11,37	52,24 $\pm$ 32,19	35,93 $\pm$ 36	24,45 $\pm$ 32,10	4,39 $\pm$ 2,22

^{99m}TcO₄⁻ Miktarı (%)

Kalay Tartarat

(mg)

	1250			1500		
Askorbik Asit Miktarı (µg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)						
0	4,95±4,61	2,04±0,36	9,44±9,07	8,19±4,4	3,16±1,14	3,44±1,75
1	3,71±1,28	2,19±0,97	2,43±1,09	9,99±4,38	4,89±3,41	3,29±1,86
2	10,58±11,87	3,46±2,12	9,99±6,13	8,96±3,39	3,37±0,68	5,55±4,27
3	15,97±22,00	4,03±2,98	7,92±2,55	14,38±11,38	3,64±3,06	12,71±8,20
4	21,58±30,8	6,37±6,72	16,74±7,48	18,65±21,4	4,89±2,87	11,53±6,24
5	28,26±41,4	6,22±5,27	21,36±20,70	22,57±27,62	3,17±2,12	20,83±16,08
6	30,87±45,59	12,22±12,71	33,04±23,85	28,27±36,62	4,86±1,46	14,11±17,65

Tablo 15: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm\text{ss}$) (n=3)

$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ Miktarı (%)

Kalay Tartarat (μg)									
	500			750			1000		
Askorbik Asit Miktarı (μg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)									
0	2,74 $\pm$ 1,07	2,2 $\pm$ 0,75	1,36 $\pm$ 0,38	2,31 $\pm$ 0,43	2,00 $\pm$ 0,48	1,45 $\pm$ 0,55	3,25 $\pm$ 0,79	2,11 $\pm$ 0,58	1,43 $\pm$ 0,23
1	6,07 $\pm$ 3,49	6,51 $\pm$ 1,59	2,57 $\pm$ 1,29	5,94 $\pm$ 2,37	6,4 $\pm$ 3,92	5,26 $\pm$ 2,99	6,66 $\pm$ 3,06	4,02 $\pm$ 1,57	3,31 $\pm$ 1,67
2	9,64 $\pm$ 7,94	5,93 $\pm$ 1,32	3,58 $\pm$ 2,90	8,30 $\pm$ 7,20	5,44 $\pm$ 4,10	4,47 $\pm$ 3,10	7,11 $\pm$ 4,41	4,13 $\pm$ 1,45	3,15 $\pm$ 1,06
3	9,54 $\pm$ 7,35	6,17 $\pm$ 1,01	1,92 $\pm$ 0,97	8,17 $\pm$ 6,89	5,32 $\pm$ 3,47	4,46 $\pm$ 4,05	9,85 $\pm$ 5,99	4,33 $\pm$ 2,08	2,88 $\pm$ 1,48
4	9,82 $\pm$ 9,04	4,65 $\pm$ 0,62	1,57 $\pm$ 0,50	7,80 $\pm$ 6,37	5,72 $\pm$ 4,42	4,09 $\pm$ 3,40	9,09 $\pm$ 5,74	4,42 $\pm$ 2,61	2,57 $\pm$ 0,64
5	8,82 $\pm$ 7,44	7,75 $\pm$ 1,34	1,14 $\pm$ 0,24	9,19 $\pm$ 8,87	5,41 $\pm$ 5,05	4,90 $\pm$ 6,29	6,55 $\pm$ 4,10	4,89 $\pm$ 3,34	2,35 $\pm$ 0,79
6	12,14 $\pm$ 6,67	9,23 $\pm$ 5,64	1,23 $\pm$ 0,26	9,92 $\pm$ 7,85	8,69 $\pm$ 8,42	4,96 $\pm$ 6,67	10,43 $\pm$ 8,97	5,19 $\pm$ 2,97	3,18 $\pm$ 1,65

İH-^{99m}Tc Miktarı (%)

Kalay Tartarat (µg)

	1250			1500		
Askorbik Asit Miktarı(mg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)						
0	3,77±2,22	1,69±0,07	2,89±2,54	2,22±3,04	2,28±0,42	1,91±0,79
1	8,99±3,22	5,99±5,02	6,29±4,66	3,22±7,57	4,66±5,04	3,41±1,97
2	8,93±3,14	6,1±3,98	8,02±4,70	3,14±5,98	7,35±4,75	4,29±1,84
3	9,45±6,19	7,2±4,04	8,25±8,62	6,19±5,24	7,82±4,15	4,22±1,27
4	11,63±5,93	7,16±5,18	4,13±2,43	5,93±12,12	8,58±7,99	3,53±0,92
5	9,58±3,36	9,43±5,60	6,83±7,76	3,36±6,74	13,84±3,94	3,04±0,68
6	13,08±5,66	8,02±7,71	6,28±6,63	5,66±7,30	15,44±7,81	2,56±0,76

Tablo 16: Askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren, indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılarak hazırlanan ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının içerdiği Tc-MET yüzdeleri ve standart sapmaları (±ss) (n=3)

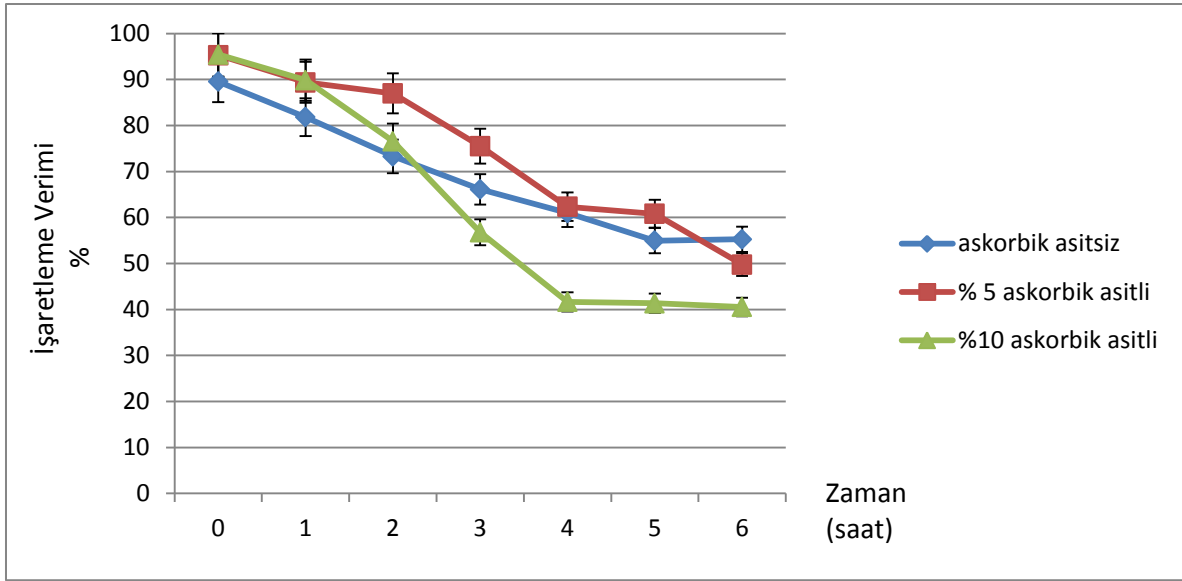
Tc-MET Miktarı (%)

Kalay Tartarat (µg)									
	500			750			1000		
Askorbik Asit Miktarı (mg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)									
0	89,55±8,72	95,27±2,32	95,44±2,90	92,2±4,07	93,77±4,16	96,20±1,76	91,20±6,21	95,84±2,03	97,37±1,01
1	81,82±10,34	89,38±5,05	89,86±7,29	89,09±0,52	89,39±4,85	89,78±6,96	89,86±1,96	93,95±2,23	94,62±2,76
2	73,29±8,19	86,96±8,54	76,56±19,76	77,38±3,71	90,07±4,75	85,99±6,04	84,62±5,66	93,65±1,04	93,99±3,87
3	66,11±13,87	75,52±25,57	56,79±33,17	64,64±14,60	85,52±7,89	79,19±14,95	66,64±29,25	91,93±0,35	94,27±3,41
4	60,96±20,64	62,34±25,07	41,67±25,98	65,79±15,85	53,99±20,24	68,86±13,64	67,33±31,37	89,79±0,97	90,56±4,16
5	54,94±24,01	60,80±33,56	41,36±23,85	60,42±15,92	48,69±36,46	47,73±37,60	59,97±31,79	82,68±10,07	87,86±3,38
6	55,25±25,29	49,76±42,03	40,54±31,83	42,39±27,30	20,29±4,74	42,80±35,04	53,64±29,43	70,37±29,38	92,43±3,72

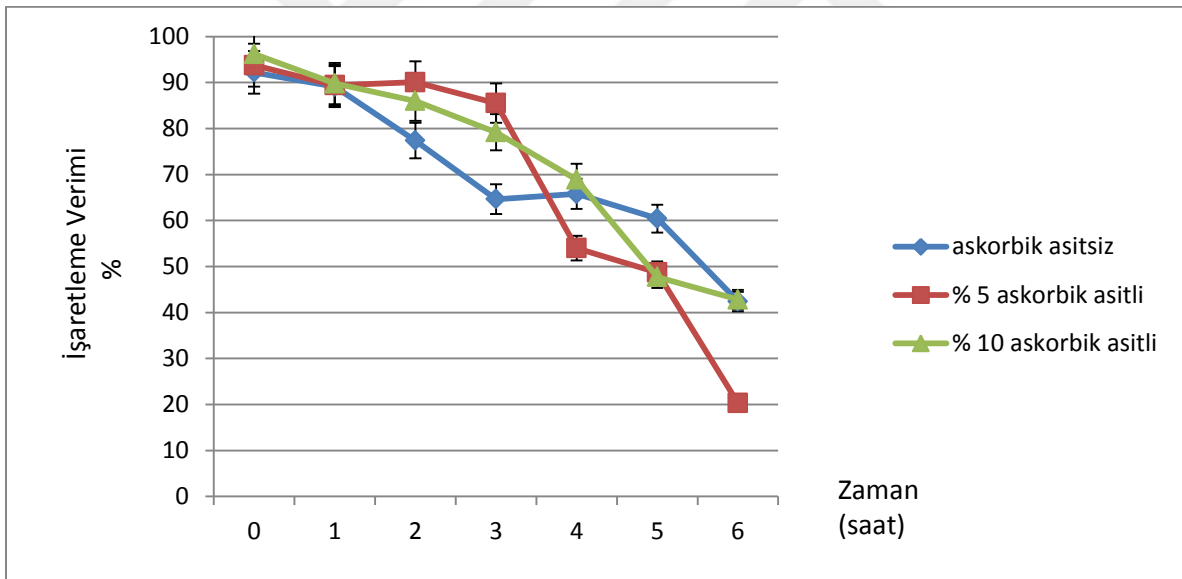
Tc-MET Miktarı (%)

Kalay Tartarat (mg)

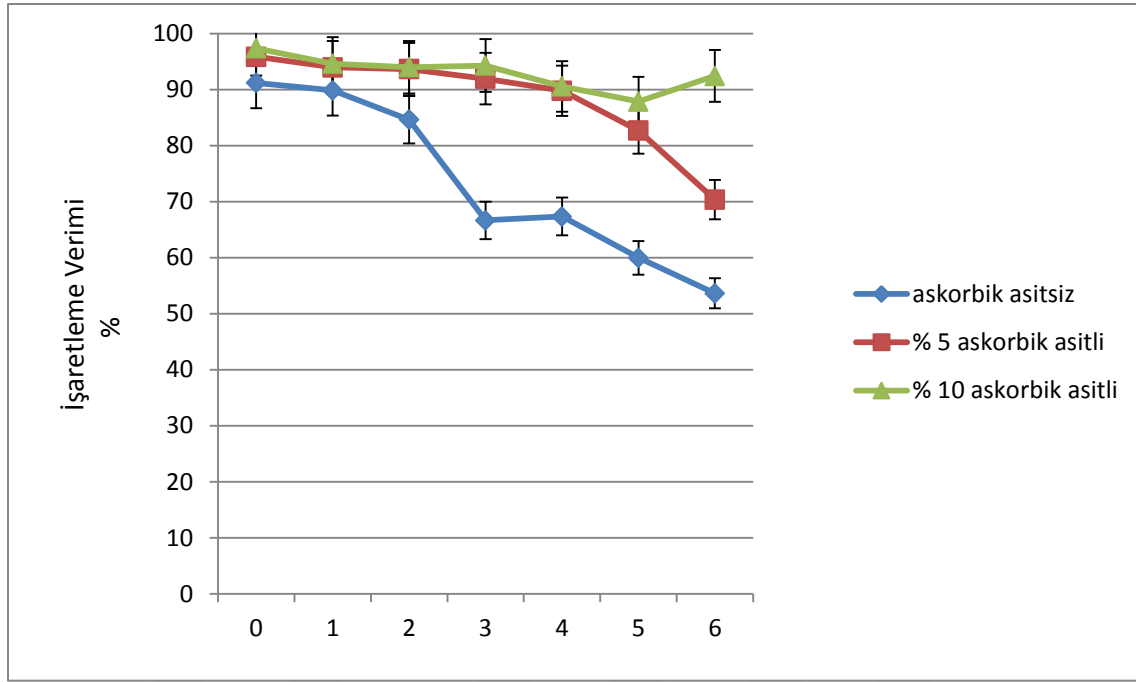
	1250			1500		
Askorbik Asit Miktarı(mg)	-	0,05	0,1	-	0,05	0,1
Zaman (Saat)						
0	91,27±4,47	96,27±0,42	87,67±8,37	86,67±6,08	94,51±0,79	94,65±2,06
1	87,30±3,16	91,83±4,84	91,28±5,23	76,65±6,76	87,55±4,89	93,30±3,81
2	80,49±9,84	90,44±3,94	81,98±4,63	79,83±2,65	86,65±4,29	90,17±6,05
3	74,59±16,57	88,77±3,99	83,83±9,16	69,24±6,14	86,16±5,50	83,07±9,24
4	66,79±24,87	86,46±5,63	79,13±7,38	50,94±18,35	81,95±8,84	84,94±6,09
5	62,17±38,77	84,36±7,75	71,81±17,99	61,31±21,84	80,71±5,41	76,12±15,43
6	56,05±40,38	79,76±10,72	60,68±18,94	57,71±31,43	76,17±9,00	83,32±17,63



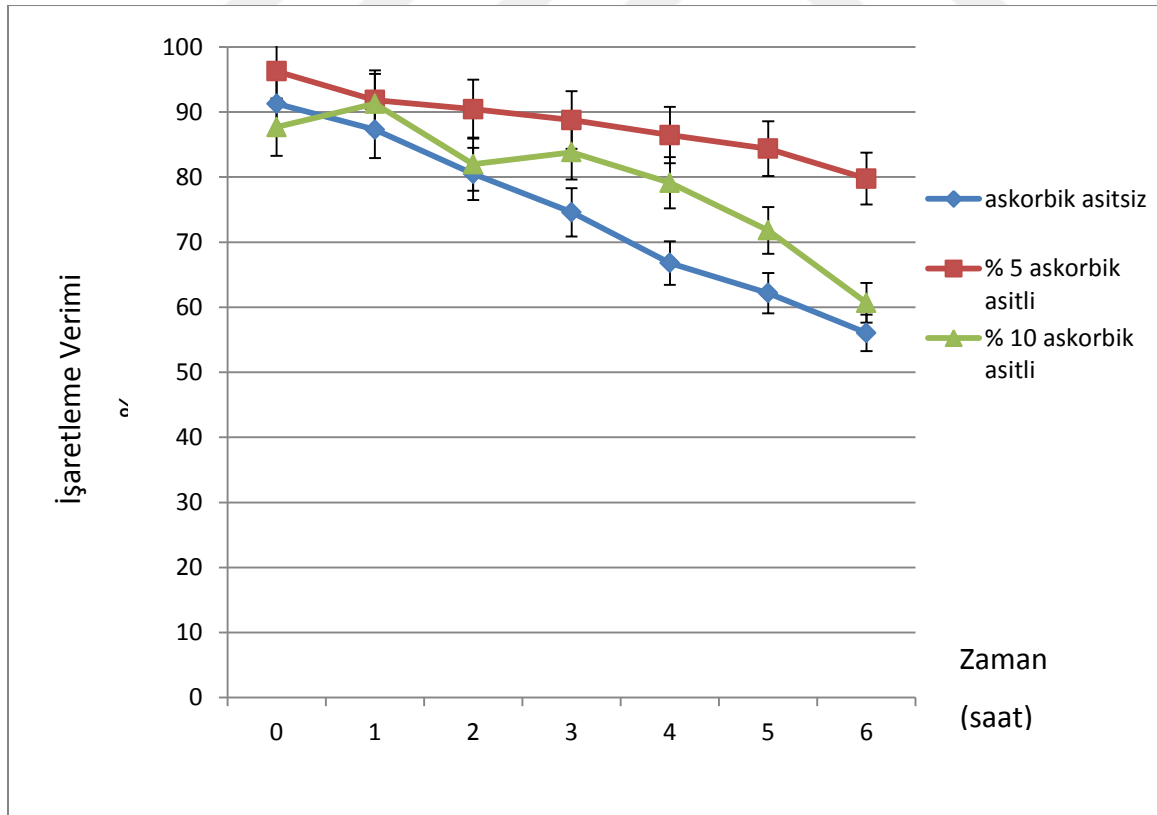
Şekil 13: 500 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



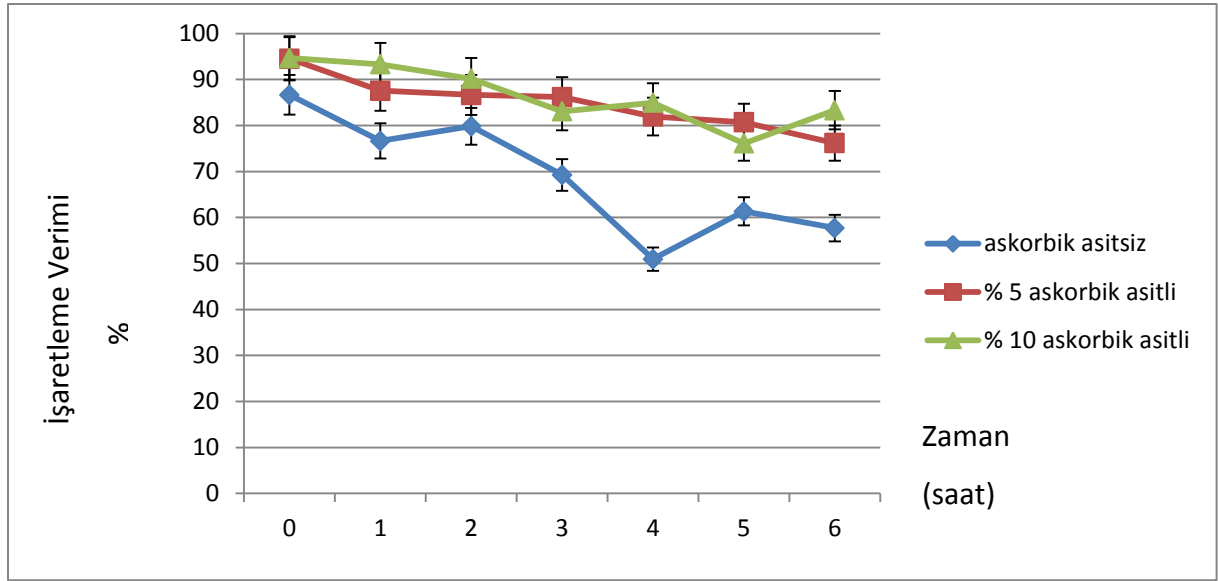
Şekil 14: 750 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



Şekil 15: 1000 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



Şekil 16: 1250 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının ^{99m}Tc-MET yüzdeleri



Şekil 17: 1500 µg kalay tartarat içeren, askorbik asitsiz, % 5 ve % 10 askorbik asitli ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının ^{99m}Tc -MET yüzdeleri

3.1.2.3 Radyoaktivite Miktarının ^{99m}Tc -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro

Stabilitesi Üzerine Etkisini İncelemek İçin Yapılan Çalışmalar

Bölüm 2.2.1.7'de anlatıldığı şekilde yapılan radyoişaretleme çalışmaları ile radyoaktivite miktarının ^{99m}Tc -MET'in radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine etkisi incelendi. 1 mCi ve 10 mCi aktiviteyle işaretleme yapılan formülasyonların içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi Tablo 17, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdesi Tablo 18'de ve ^{99m}Tc -MET yüzdesi Tablo 19'da ve Şekil 18'de verildi.



Tablo 17: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm ss$) (n=3)

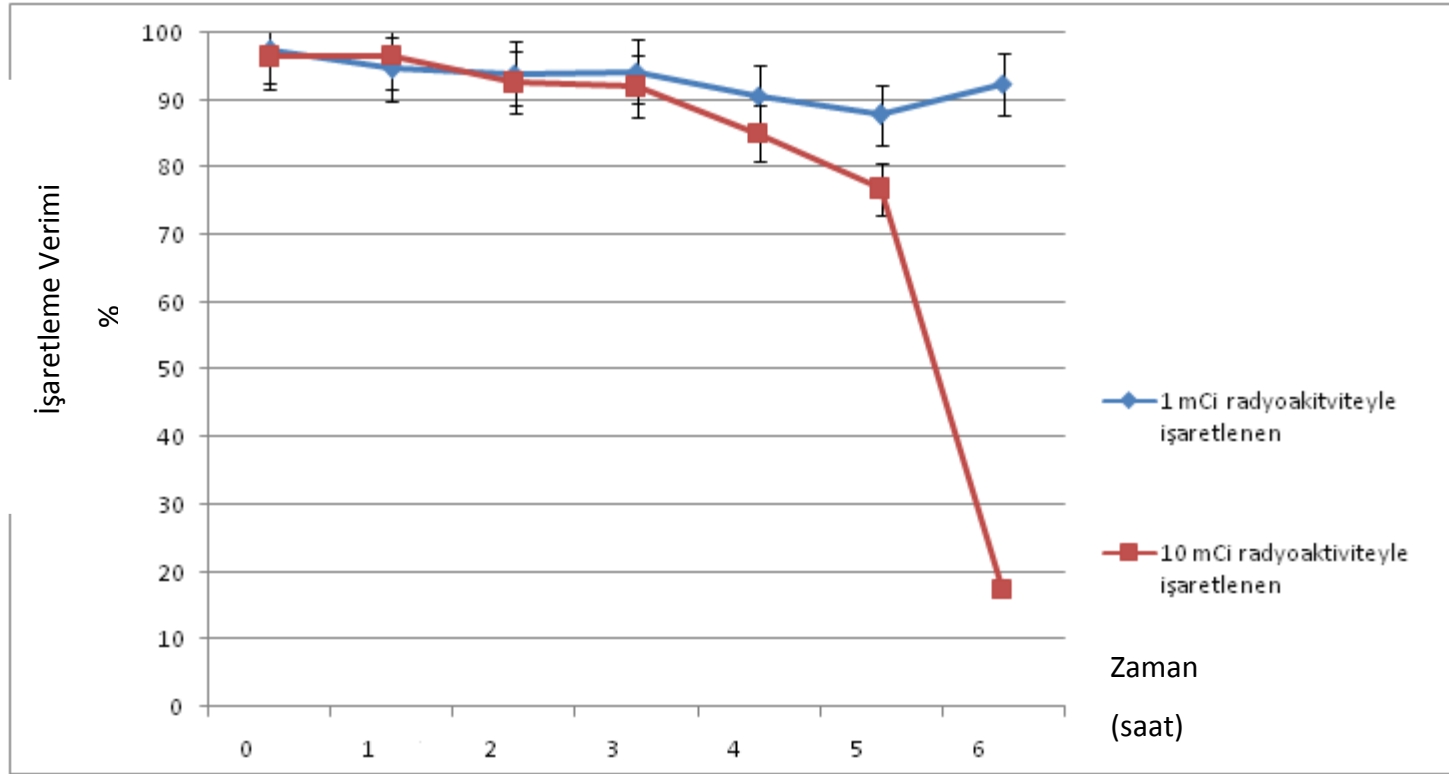
Radyoaktivite Miktarı (mCi)		
	1	10
Zaman (Saat)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ yüzdesi	
0	1,2 $\pm$ 0,78	1,75 $\pm$ 1,53
1	2,08 $\pm$ 1,17	1,58 $\pm$ 0,27
2	2,86 $\pm$ 2,84	5,59 $\pm$ 0,88
3	2,85 $\pm$ 2,34	6,50 $\pm$ 2,70
4	6,87 $\pm$ 3,52	13,41 $\pm$ 1,31
5	9,79 $\pm$ 4,04	21,98 $\pm$ 2,46
6	4,39 $\pm$ 2,22	81,95 $\pm$ 2,63

Tablo 18: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm ss$) (n=3)

Radyoaktivite Miktarı (mCi)		
	1	10
Zaman (Saat)	^{99m}Tc yüzdesi	
0	1,43 $\pm$ 0,23	1,82 $\pm$ 0,09
1	3,31 $\pm$ 1,67	1,87 $\pm$ 0,52
2	3,15 $\pm$ 1,06	1,81 $\pm$ 0,13
3	2,88 $\pm$ 1,48	1,56 $\pm$ 0,20
4	2,57 $\pm$ 0,64	1,52 $\pm$ 0,04
5	2,35 $\pm$ 0,79	1,14 $\pm$ 0,03
6	3,18 $\pm$ 1,65	0,62 $\pm$ 0,03

Tablo 19: Farklı miktarlarda radyoaktiviteyle işaretlenen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdelerine standart sapmaları ($\pm ss$) (n=3)

Radyoaktivite Miktarı (mCi)		
	1	10
Zaman (Saat)	^{99m}Tc -MET yüzdesi	
0	97,37 $\pm$ 1,01	96,43 $\pm$ 1,46
1	94,62 $\pm$ 2,76	96,54 $\pm$ 0,47
2	93,99 $\pm$ 3,87	92,60 $\pm$ 0,99
3	94,27 $\pm$ 3,41	91,94 $\pm$ 2,69
4	90,56 $\pm$ 4,16	85,07 $\pm$ 1,29
5	87,86 $\pm$ 3,38	76,88 $\pm$ 2,48
6	92,43 $\pm$ 3,72	17,43 $\pm$ 2,66



Şekil 18: 1 mCi ve 10 mCi radyoaktiviteyle işaretleme ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}Tc -MET yüzdeleri

3.1.3 ^{99m}Tc-MET Kompleksinin Stabilit  Testleri

3.1.3.1 İdeal Koşullarda Hazırlanan Formülasyonlar ile Yapılan Oda Sıcaklığındaki Stabilit  Testi

Bölüm 2.2.2.4.1’de anlatıldığı şekilde yapılan radyoişaretleme çalışmalarıyla hazırlanan oda sıcaklığındaki (25 C 2 C) formülasyonların içerdiği ^{99m}TcO₄⁻ ve İH-^{99m}Tc yüzdeleriyle ^{99m}Tc-MET radyokimyasal saflık yüzdeleri ve stabilitesine ait sonuçlar Tablo 20’de gösterildi.



Tablo 20: Oda sıcaklığında bekletilen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarları ile ^{99m}Tc -MET radyokimyasal saflık yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)

Zaman (Saat)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ Miktarı (%)	$\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ Miktarı (%)	^{99m}Tc -MET miktarı (%)
0	1,58 $\pm$ 1,05	3,12 $\pm$ 0,33	95,30 $\pm$ 1,10
1	1,53 $\pm$ 0,87	4,47 $\pm$ 0,18	94,00 $\pm$ 1,05
2	1,48 $\pm$ 0,65	3,96 $\pm$ 0,36	94,56 $\pm$ 0,33
3	1,29 $\pm$ 0,86	5,16 $\pm$ 0,60	93,54 $\pm$ 1,47
4	1,53 $\pm$ 0,85	5,78 $\pm$ 0,53	92,69 $\pm$ 0,66
5	0,83 $\pm$ 0,28	6,34 $\pm$ 0,03	92,83 $\pm$ 0,30
6	1,18 $\pm$ 0,34	6,14 $\pm$ 0,27	92,68 $\pm$ 0,45
24	27,6 $\pm$ 3,07	12,79 $\pm$ 1,48	59,61 $\pm$ 3,86

3.1.3.2 İdeal Koşullarda Hazırlanan ^{99m}Tc -MET formülasyonları ile Yapılan Serum

Stabilite Testi

Bölüm 2.2.2.4.2’de anlatıldığı şekilde yapılan radyoişaretleme çalışmaları ile hazırlanan kan serumundaki ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ yüzdeleriyle ^{99m}Tc -MET radyokimyasal saflık yüzdeleri ve stabilitesine ait sonuçlar Tablo 21’de gösterildi.



Tablo 21: Kan serumunda bekletilen ^{99m}Tc -MET formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve $\text{iH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarları ile ^{99m}Tc -MET radyokimyasal saflık yüzdeleri ve standart sapmaları ($\pm$ ss) (n=3)

Zaman (Saat)	$^{99m}\text{TcO}_4^-$ Miktarı (%)	$\text{iH-}^{99m}\text{Tc}$ Miktarı (%)	^{99m}Tc -MET miktarı (%)
0	2,34 $\pm$ 0,21	21,89 $\pm$ 3,19	75,78 $\pm$ 3,39
1	2,55 $\pm$ 1,22	21,52 $\pm$ 4,17	75,93 $\pm$ 5,31
2	1,82 $\pm$ 0,73	23,07 $\pm$ 5,35	75,10 $\pm$ 5,83
3	2,16 $\pm$ 0,61	26,02 $\pm$ 7,39	71,81 $\pm$ 7,49
4	3,01 $\pm$ 1,00	34,65 $\pm$ 6,31	62,34 $\pm$ 5,99
5	3,87 $\pm$ 2,85	34,73 $\pm$ 6,83	61,40 $\pm$ 9,66
6	3,54 $\pm$ 0,79	34,59 $\pm$ 5,90	61,87 $\pm$ 5,67
24	34,95 $\pm$ 4,43	59,12 $\pm$ 5,33	5,93 $\pm$ 1,43

3.1.3.3 Sterilite Testi

Bölüm 2.2.2.4.3’de anlatıldığı şekilde yapılan sterilite testlerinde, bekleme süresi sonunda besi yerlerinde herhangi bir mikroorganizma üremesinin olmadığı görüldü ve hazırlanan formülasyonun steril olduğuna karar verildi.

3.1.3.4 İzotoni Testi

Bölüm 2.2.2.4.4’de anlatıldığı gibi yapılan izotoni testi sonucunda çözeltinin osmatik basıncının ortalama $321,33 \pm 3,21$ olduğu bulunmuştur.

3.1.4 ^{99m}Tc-MET’in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilitésinin Hesaplanması

3.1.4.1 ^{99m}Tc-MET’in Kromatografi Çalışmalarında Kullanılacak Solvan Sisteminin Geliştirilmesi

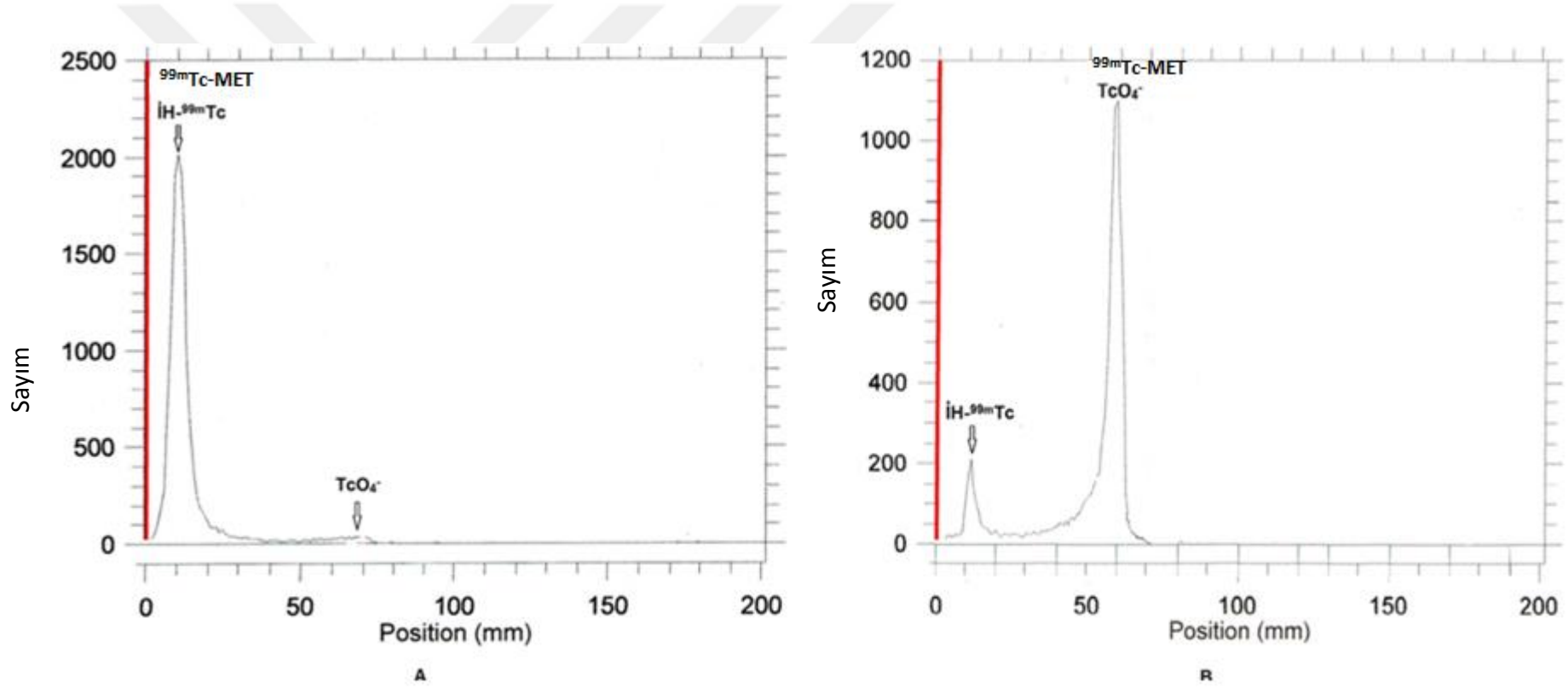
Bölüm 2.2.2.1’de anlatıldığı şekilde radyokimyasal safsızlıkların ayırabileceğimiz uygun kromatografi şartlarını belirlemek için yapılan çalışmalara ait sonuçlar Tablo 22’de gösterildi. Tablo 22: ^{99m}Tc-MET formülasyonlarının içerdiği ^{99m}TcO₄⁻, İH-^{99m}Tc safsızlıkları ve ^{99m}Tc-MET’in farklı solvan sistemlerindeki Rf değerleri

Rf Değerleri			
	Aseton	SF	ASN/S/TFA
^{99m} TcO ₄ ⁻	0,8-1,0	0,8-1,0	0,8-1,0
İH- ^{99m} Tc	0,0	0,0	0,0
^{99m} Tc-MET	0,0	0,0	0,8-1,0

3.1.4.2 İTK Çalışmaları ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

Bölüm 2.2.2.2’de anlatıldığı şekilde farklı solvan sistemleri kullanılarak yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar Şekil 19’da gösterildi.

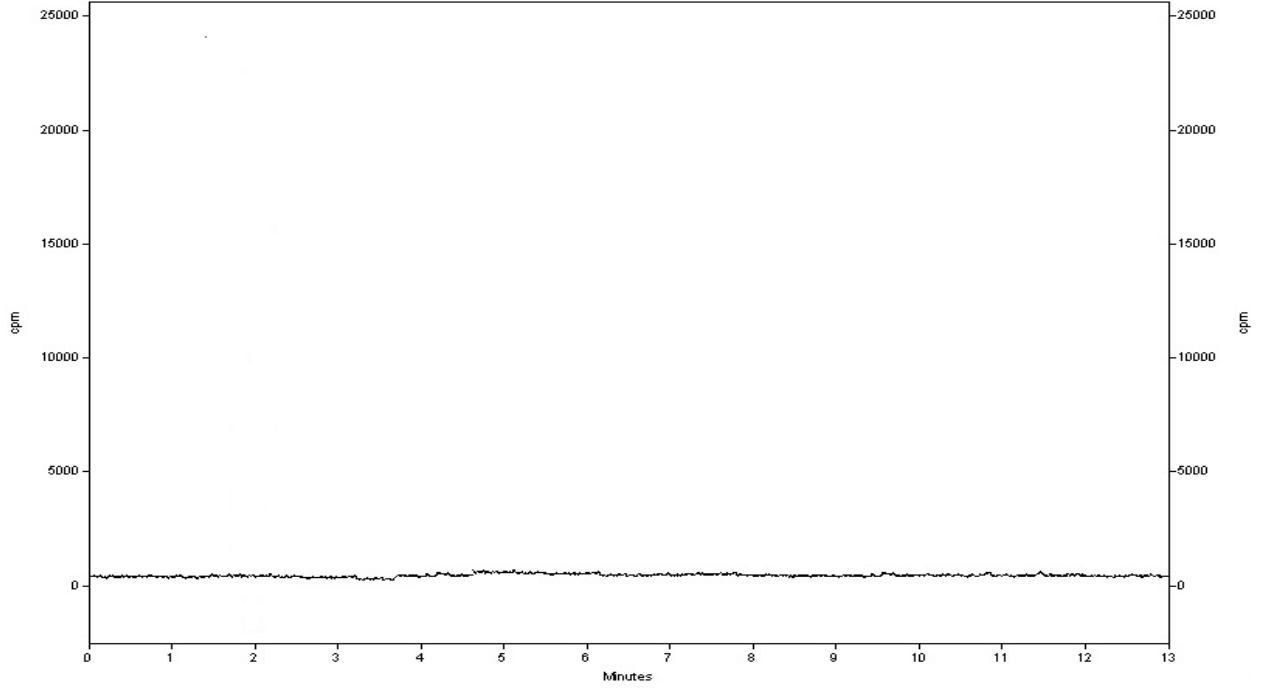




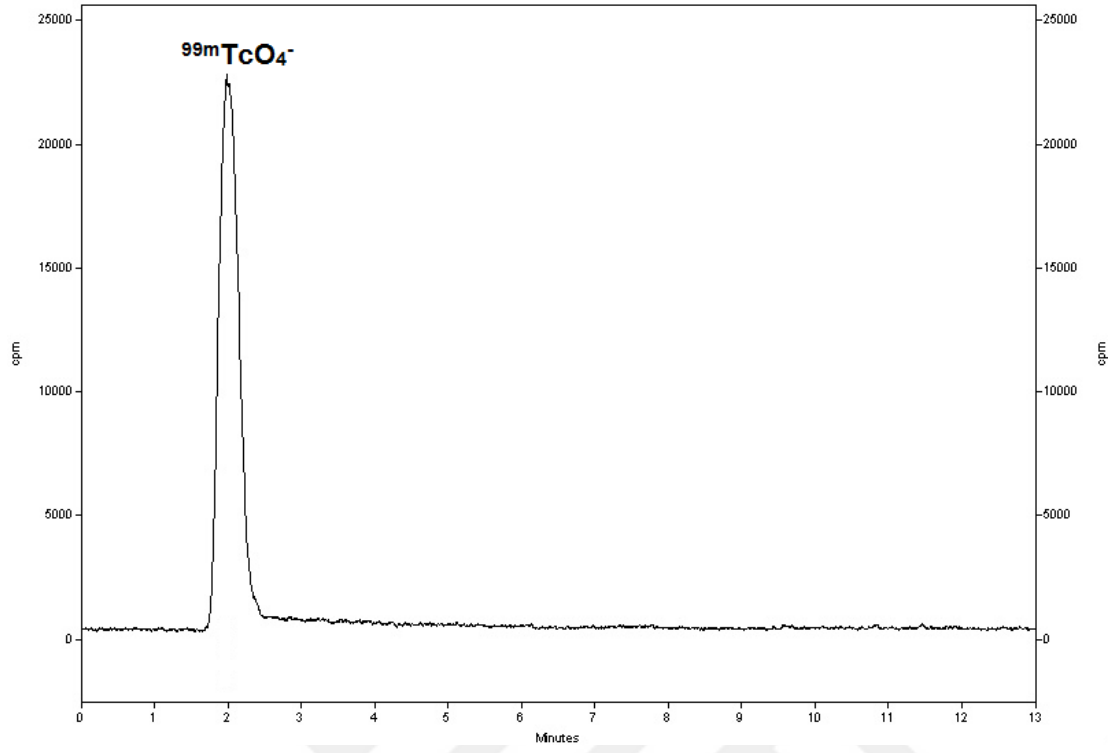
Şekil 19: Farklı solvan sistemleri kullanılarak yapılan İTK çalışmalarına ait kromatogramlar A: Sabit faz Whatman 3MM - Hareketli faz Aseton, B: Sabit faz ITLC-SG - Hareketli faz ASN/S/TFA.

3.1.4.3 R-UHPLC Çalışmaları ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

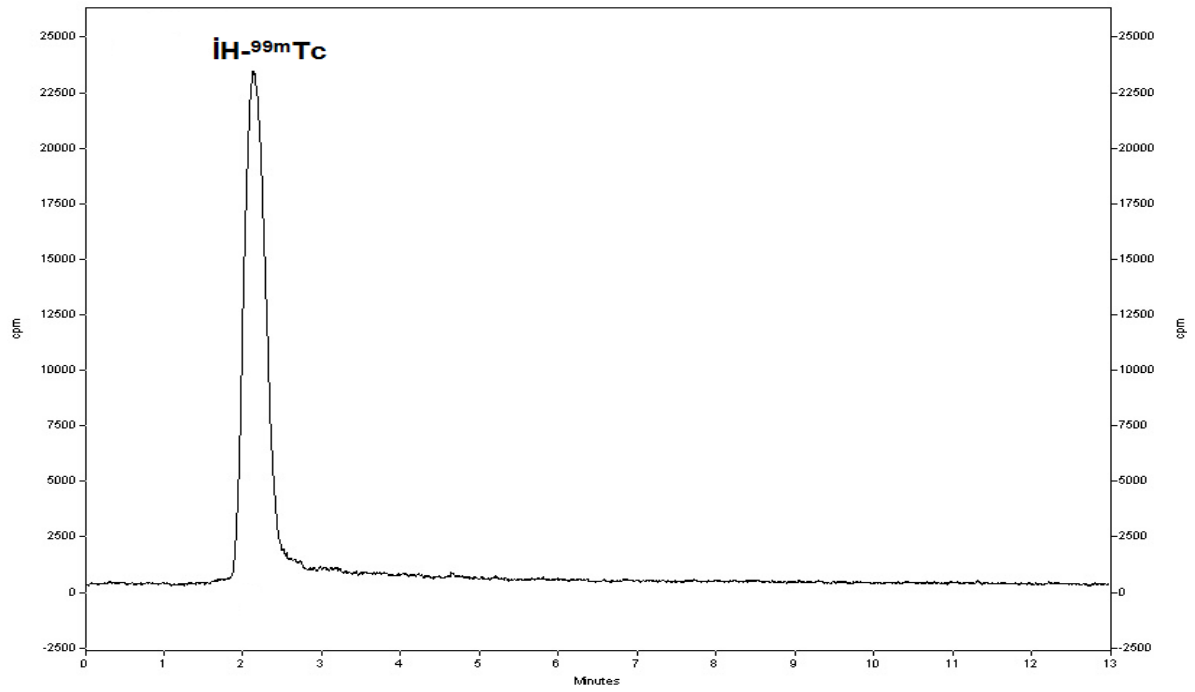
Bölüm 2.2.2.3’de anlatıldığı şekilde hazırlanan kromatografik şartlarda yapılan çalışmalarda mobil faz, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ ve $^{99m}\text{Tc-MET}$ için elde edilen kromatogramlar sırası ile Şekil 20, Şekil 21, Şekil 22 ve Şekil 23’de gösterildi.



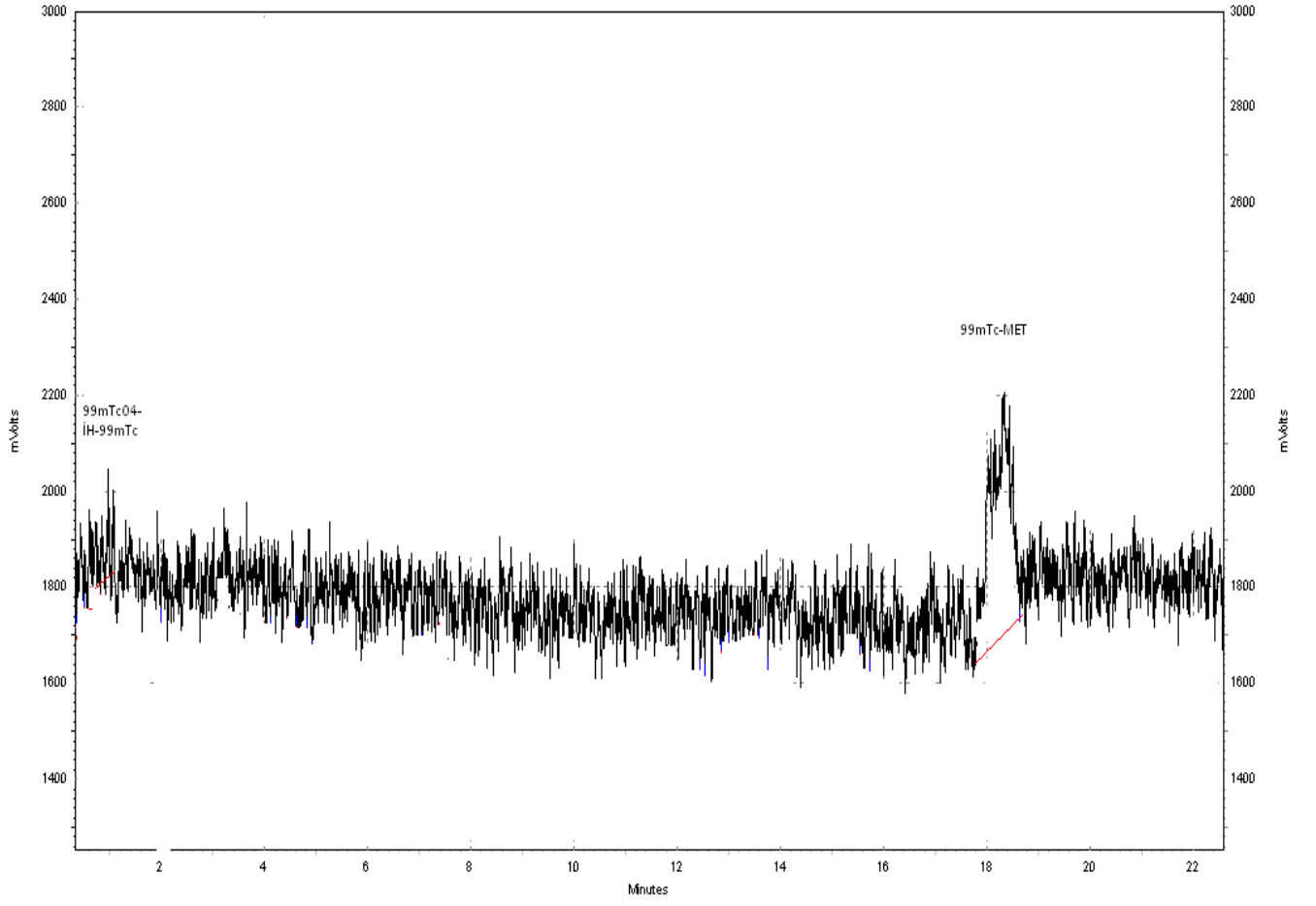
Şekil 20: Mobil faza ait kromatogram



Şekil 21: $^{99m}\text{TcO}_4^-$ safsızlığına ait kromatogram



Şekil 22: $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ safsızlığına ait kromatogram



Şekil 23: ^{99m}Tc -MET kompleksine ait kromatogram

BÖLÜM IV

4 TARTIŞMA-SONUÇ

Dünya genelinde kardiyovasküler hastalıklardan sonra en çok ölüme neden olan hastalık kanserdir. Kanser hücresinin erken evrede, henüz anatomik değişiklikler başlamadan, fizyolojik düzeyde değişiklikler olduğu anda teşhis edilebilmesi kanserin yayılmasına fırsat kalmadan tedaviye başlanabilmesini, dolayısıyla tedavi başarısının önemli ölçüde artmasını sağlayabilmektedir. Kanserin erken evrede, hızlı ve doğru teşhisi; hastalığın tedavi masrafını, tedavi süresini, mortalite ve morbidite riskini de önemli ölçüde azaltmaktadır (38). Ultrasonografi, radyografi, BT gibi anatomik görüntüleme teknikleri, morfolojik değişikliklere dayandığı için hastalığın ilk aşamasındaki görüntüleme için yeterli değildir. Sintigrafik görüntüleme ise fizyolojik değişikliklerin tespitine dayanan bir görüntüleme tekniği olduğundan kanser hücresi oluşumunda erken evrede teşhise imkan vermektedir (38, 39). Sintigrafik görüntüleme çalışmalarında, uygun radyonüklit, farmasötik kısım ile bağlanarak, radyonüklidin yaydığı radyasyon, uygulamayı takiben bir gama kamera ile görüntülenir. Verilen radyoaktif bileşikten yayılan gama ışınlarını kaydeden kamera ile elde edilen sintigrafik görüntüler, vücudumuzdaki sistemlerin fonksiyonları ve anatomisi hakkında bilgi verir. Bu tetkikler güvenli ve ağrısızdır. Bu nedenle tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla düşük dozda radyoaktif madde içeren ilaçlar çoğunlukla IV yolla, daha az sıklıkla oral yoldan veya solunum yoluyla vücuda verilmektedir (38, 40, 41).

Tanı amacı ile kullanılacak ideal radyofarmasötik saf gama ışını yaymalı, enerjisi 100-250 keV arasında, kolay elde edilebilir, ucuz, efektif yarı ömrü kullanıma uygun, hedef/hedef dışı oranı yüksek, steril, apirojen, izotonik ve izohidrik olmalıdır (38, 42). Bütün bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda ^{99m}Tc fiziksel özellikleri bakımından nükleer tıpta tanı amacıyla en fazla kullanılan radyoizotoptur. Fiziksel yarı ömrü 6 saattir. ^{99m}Tc sadece γ radyasyonu yayar. Enerjisi 140 KeV olan tek bir γ fotonuna sahiptir. β -ışını içermediği ve kısa yarı ömürlü olduğu için hastanın maruz kaldığı radyasyon dozu oldukça düşüktür. 140 keV enerjiye sahip radyonüklidler ile yapılan sintigrafi çalışmalarında rezolüsyonu yüksek, oldukça kaliteli görüntüler elde edilir. 1965 yılında, Richards ve arkadaşlarının $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratörünü üretmelerinden sonra ^{99m}Tc radyofarmasötiklerinin sayısı hızla artmış, nükleer tıp alanındaki kullanımları kısa sürede %85'lere ulaşmıştır. Tüm geçiş elementleri gibi Teknesyum da elektron eksikliği olan metaller, atomlar veya fonksiyonel gruplarla bağ yaparak bileşik meydana getirir. Teknesyumla kompleks oluşturan donör gruplara örnek olarak amin,

amid, tiyol, fosfat, oksim ve izonitril grupları verilebilir. Teknesyum, $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ jeneratöründen en yüksek oksidasyon kademesi olan +7 değerlikle elde edilir. Ancak +7 değerlikli teknesyum bu halde iken ligandla bağ yapamaz, bağ yapabilmesi için daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesine gereksinim duyulur. Bu nedenle radyofarmasötiklere indirgen ajan ilave edilmektedir. $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ oksijen atmosferinde veya oksidan bir maddenin varlığında kolaylıkla oksitlenebilir. Oksidasyona engel olmak için, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretlenecek radyofarmasötikler azot gazı akımında ve/veya bir miktar askorbik asit ilavesiyle hazırlanırlar (39, 43, 44, 45, 46).

Günümüzde nükleer tıp alanında $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli radyofarmasötikler tümör, kemik, karaciğer, dalak, beyin, böbrek, akciğer gibi pek çok farklı bölgenin görüntülenmesinde kullanılırlar. Tümör odaklarının sintigrafik görüntülenmesi, hastaların tedavisinin doğru yapılabilmesi için güçlü bir diyagnostik araçtır. Eğer klinik öyküsü ve bulgular kesin değilse, doktor hastalığın lokalizasyonu ve şiddetini tayin etmek için birçok diyagnostik metot seçilebilir. Nükleer tıp dışındaki radyografi, ultrasonografi ve bilgisayarlı tomografi gibi anatomik görüntüleme teknikleri, anatomik değişikliklerin çok belirgin olduğu enfeksiyonun kronik safhasında hassastırlar. Radyolojik metotlar morfolojik değişikliklere dayandığı için tümör oluşumunun ilk aşamalarında kanser tanısı için uygun değildir. Buna karşın tümör odaklarının nükleer tıp teknikleriyle saptanması, anatomik değişikliklerin ortaya çıkmasından önce görülen dokulardaki fizyolojik ve biyokimyasal değişikliklere dayanmaktadır. Bu nedenle tümör gelişiminin erken evrede teşhise imkan vermektedir (38, 42, 46, 47, 48).

Nükleer onkolojik tanı; PET görüntüleme cihazı kullanılarak Flor-18 veya SPECT görüntüleme cihazı kullanılarak $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidi ile işaretli radyofarmasötikler ile yapılmaktadır. PET sistemleri daha yüksek çözünürlük ve daha kesin atenüasyon düzeltilmesine sahip olmasına rağmen, PET görüntüleme oldukça pahalı bir yöntemdir ve radyonüklidi ülkemizde her departman tarafından kolaylıkla temin edilememektedir. Buna karşın SPECT görüntüleme cihazları oldukça yaygın bir kullanım alanına sahiptir. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidi nükleer tıp departmanlarındaki jeneratörlerden günlük olarak yapılan sağımlar ile elde edilir. Bu nedenle SPECT görüntüleme PET görüntülemeye kıyasla oldukça ekonomik ve ulaşılabilir bir yöntemdir (49).

Kanser hücreleri ile etkileşerek tümör odaklarını ayırabilme potansiyeline sahip olan başka bir grup radyofarmasötik ise radyoişaretli reseptör spesifik moleküllerdir. Küçük, biyolojik olarak aktif ve kanser hücreleri ile spesifik olarak etkileşime girebilen moleküller,

uygun radyonüklit ile işaretlenerek, işaretlenmiş oldukları radyonüklidi hedef olan tümör dokusuna taşımaktadır. Kanser hücresine spesifik olarak hedeflenebilen bu moleküllerin radyoişaretlenerek kullanımı ile uygun farmakokinetik özelliklere sahip yeni radyofarmasötikler tasarlanabilmektedir. Yeni tasarlanan radyofarmasötiklerin; kandan hızlı bir şekilde temizlenmesi, düşük toksisiteye sahip olması, tümörlü dokuda yüksek, hedef dışı dokuda düşük tutulum oranına sahip olması istenmektedir (29).

Yapılan çalışmalar; folat reseptörlerinin yumurtalık, meme, rektum ve böbrek tümör dokusunda sağlıklı dokulara kıyasla oldukça yüksek miktarda bulunduğunu göstermektedir. Bu özellik folat reseptörlerini tümör dokusunu hedefleme amacı ile kullanılabilecek bir muhtemel hedef haline getirmektedir (29).

Okarvi ve arkadaşları $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ radyofarmasötiği ile MET ve folik asit molekülünü işaretlemişler, hücre kültürü ve in vivo çalışmalar ile geliştirdikleri radyofarmasötiklerin meme tümörü görüntüleme potansiyelini değerlendirmişlerdir. Yapılan çalışmalar sonucunda tümör/kan tutulum oranını; $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ -Folikasit kompleksi için 1,55 ve $^{99m}\text{Tc-MAG}_3$ -Metotreksat için 0,76 olarak tespit etmişlerdir. Okarvi ve arkadaşları, geliştirdikleri radyofarmasötiklerin meme tümörü tutulum oranının düşük olduğunu ve ileri çalışmalarla geliştirilmesi gerektiğinin sonucuna varmışlardır (29).

Dar ve arkadaşları, MET'i, indirgen ajan olarak kalay tartarat kullanarak, ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlemişlerdir. Geliştirdikleri radyofarmasötiğin kan proteinlerine bağlanmasını incelemişler, tümör modeli oluşturdukları farelerde biyodağılım çalışmaları yapmışlar ve sonucunda uyguladıkları ilacın dokuların bir gramında toplanan yüzdesini (%ID/g) hesaplamışlardır. Yaptıkları in vivo çalışmalar sonucunda radyofarmasötik tutulumunun karın boşluğunda oluşturdukları tümörde $5,87 \pm 0,12$ (%ID/g), göğüs bölgesinde oluşturdukları tümör dokusunda ise $2,84 \pm 0,23$ (%ID/g) olduğunu tespit etmişler; ancak gama kamera görüntülerini teknik aksaklık sebebi ile kullanamadıklarını belirtmişlerdir. Dar ve arkadaşları hazırladıkları radyofarmasötiğin kan proteinlerine bağlanma oranını % $79,3 \pm 5$ bulduklarını belirtmişlerdir (50).

MET, akut lenfoblastik lösemi, malign lenfoma, osteosarkom, göğüs kanseri ve baş ve boyun kanseri gibi hastalıklarda kullanılan başlıca kemoterapötik ajandır (16). Aynı zamanda psöriazis gibi malign olmayan durumlarda ve immunosupresif etki de göstererek romatoid artrit tedavisinde de kullanılır (51). MET, DNA sentezi için gerekli olan folik asitin antagonistidir (52). MET, folik asitten türeyen bir aminopterin analogudur. MET'nin molekül

yapısı folik asitten pterin halkasında 4-amino grubu yerine bir hidroksil grubunun bulunması ve N-10 pozisyonunda metil grubunun olmaması ile ayrılır.

MET, antimetabolit olarak fonksiyon görerek, folik asidin tetrahidro folik aside indirgenmesinden sorumlu olan dihidro folat redüktaz enzimini reversible olarak inhibe eder. Tetrahidro folik asit yapımındaki azalma, gereksinim duyulan tek karbonlu fragmentlerin düzeyini düşürür ve buna bağlı olarak pürinlerin, DNA'nın ve selüler proteinlerin sentezi inhibe olur (53). Folat reseptörleri, normal sağlıklı hücrelerde çok az miktarda bulunurken, tümör hücrelerinin yüzeyinde aşırı miktarda bulunur. Bu da MET'nin, tümör hücrelerine neden daha selektif etki gösterdiğini açıklamaktadır (54). MET'in klinik etkinliği, sıklıkla, molekülün hücreye sızması nedeniyle kanser hücrelerinde direncin elde edilmesiyle anlaşılır (52).

MET oral ve IV yoldan verilir. Tüm vücuda yaygın bir şekilde dağılır. Özellikle böbrek, karaciğer, dalak, safra kesesi ve ciltte yoğunlaşır. MET kan-beyin engelini aşmasına rağmen, serebrospinal sıvıdaki konsantrasyonları IV yoldan birkaç kez g/m^2 dozunda verilmedikçe terapötik konsantrasyon düzeylerine ulaşamaz. MET'nin verilen dozunun küçük bir bölümü karaciğerde metabolize olur; kalan büyük bölümü dolaşımda değişmemiş ilaç halindedir ve böbreklerden elimine edilir (55).

Onkoloji hastalarında tümörün erken safhada, henüz hücresel değişiklikler başlamadan, moleküler düzeyde değişiklikler olduğu anda teşhis edilebilmesi; kanserin yayılmasına fırsat kalmadan tedaviye başlanabilmesini ve dolayısıyla tedavi başarısının önemli ölçüde artmasını sağlayabilmektedir.

Bu çalışmamızda ^{99m}Tc ile işaretli MET'nin geliştirilmesi kanser hücrelerini görüntülemesinde erken teşhisin elde edilebilmesi amaçlanmıştır. Radyonüklit olarak, gama kameralar için ideal enerji aralığına sahip olması, saf gama ışını yayması, 6 saatlik uygun yarılanma süresi, ucuz ve kolay temin edilebilir olması sebebiyle ^{99m}Tc seçilmiştir. MET ise akut lenfoblastik lösemi, malign lenfoma, osteosarkom, göğüs kanseri ve baş ve boyun kanseri tümörlerine tutulum göstermesi ve kimyasal yapı olarak ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenmeye uygunlukları göz önünde bulundurularak seçilmiştir.

MET'in ^{99m}Tc ile işaretlenme çalışmaları amacıyla farklı indirgen, antioksidan ajan ve radyoaktivite miktarının, süzme işleminin radyokimyasal saflık üzerindeki etkisi incelenerek ideal işaretleme koşulları araştırılmıştır.

4.1 MET'e Ait Bulguların Tartışılması

4.1.1 Fourier Transform Infra-Red Spektrumu Analizi

MET'in kalite kontrolü için IR spekturumu alınmıştır. Sonuç olarak elde edilen bulguların literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür (56).

4.1.2 MET'in ^{99m}Tc Radyonüklidi ile İşaretlenmesi

^{99m}Tc ile işaretlenme çalışmalarında en iyi bağlanma veriminin elde edileceği ideal şartları belirleyebilmek için, farklı miktarlarda indirgen ve antioksidan ajanlar kullanılarak hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve oda sıcaklığındaki (25±2°C) in vitro stabiliteyi incelenmiştir. Yöntem 2.2.1.4- 2.2.1.6 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanarak belirlenen en uygun indirgen ve antioksidan ajan miktarları kullanılarak hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığı ve stabilitesi incelenmiştir.

pH değişimi radyofarmasötiklerin stabiliteyi etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle hazırlanan radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi asit veya alkali ilavesi ile farklı pH aralıklarında incelenmelidir. Bir radyofarmasötik için ideal pH değeri 7,4'tür. Ancak radyofarmasötikler küçük hacimlerde uygulanan preparatlar olduğundan kanın yüksek tampon kapasitesi nedeniyle stabil oldukları pH değerlerinde hazırlanabilirler. Yapılan denemelerde MET'in pH < 3 ve pH > 9 olduğu koşullarda stabil olduğu ve SF içinde tamamen çözündüğü görülmüştür. pH 3-9 arasında bulanık bir çözelti halinde olduğu gözlenmiştir. İncelenen literatürlerde işaretleme veriminin pH > 9 olduğu koşullarda pH'nın daha düşük olduğu değerlere göre bariz yüksek olduğu belirtilmiştir (27, 29, 50). MET'in stabilite koşulları nedeniyle işaretleme yapılmadan önce hazırlanan formülasyonun pH'ı 8'in üzerine ayarlanmıştır.

4.1.3 İndirgen Ajan Miktarının ^{99m}Tc-MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

⁹⁹Mo/^{99m}Tc jeneratöründen en yüksek oksidasyon kademesi olan +7 değerlikle elde edilen Na^{99m}TcO₄'ün bağ yapabilmesi için daha düşük oksidasyon kademelerine indirgenmesine gereksinim duyulur. MET'in ^{99m}Tc ile işaretlenme çalışmalarında çeşitli literatürlerle desteklenerek indirgen ajan olarak farklı miktarlarda kalay tartarat kullanılmıştır (27, 29, 50).

125 µg, 250 µg, 375 µg, 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonlarının içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ ve $^{99m}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri hesaplandığında:

En yüksek $^{99m}\text{TcO}_4^-$ miktarı 125 µg kalay tartarat indirgen ajan olarak kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda tespit edilmiştir. 125 µg, 250 µg, 375 µg, 500 µg ve 750 µg kalay tartarat miktarının $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ radyonüklidini indirmek için yetersiz olduğu görülmüştür (Tablo 7, Tablo 8).

En yüksek $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarı 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonlarda tespit edilmiştir (Tablo 9).

4.1.4 Süzme İşleminin $^{99m}\text{Tc-MET}$ 'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro Stabilitesi Üzerine Etkisi

Radyofarmasötiklerin sterilizasyonunda en sık kullanılan metot 0,22 µm por çaplı membran filtreden süzme işlemidir. Bu işlem sırasında çapı 0,22 µm'den büyük olan partiküller çözeltiden uzaklaştırılacağı için, hazırlanan formülasyonlarda süzme işleminden önce ve sonra kalite kontrol çalışmaları yapılarak süzme işleminin radyokimyasal saflık üzerindeki etkisi araştırılmıştır (57, 58, 59, 60, 61, 62).

İndirgen ajan olarak 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan $^{99m}\text{Tc-MET}$ formülasyonlarının süzülmeden önce ve süzildikten sonra içerdiği $^{99m}\text{TcO}_4^-$, $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ ve $^{99m}\text{Tc-MET}$ yüzdeleri hesaplandığında:

Süzme işlemi sonunda formülasyonların içerdiği $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarında azalma olduğu tespit edilmiştir (Tablo 12).

Çalışmamızda $^{99m}\text{Tc-MET}$ formülasyonlarının süzülmeden önce ve süzildikten sonraki kimyasal saflığı değişmemekle birlikte, beklenildiği gibi 0,22 µm'den büyük çaptaki partiküllerin süzülerek formülasyondan uzaklaştırılması nedeni ile $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarında azalma olmuştur. Bu nedenle formülasyon geliştirme çalışmalarında radyofarmasötüğün içindeki radyokimyasal safsızlıkların, steril filtrasyon işleminden önce ve sonra hesaplanmasının önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Aksi takdirde kullanılacak indirgen ajan miktarına bağlı olarak oluşan gerçek $\text{IH-}^{99m}\text{Tc}$ miktarı gözden kaçabilir.

4.1.5 Askorbik Asit Miktarının ^{99m}Tc-MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro

Stabilitesi Üzerine Etkisi

Güçlü indirgen ajan olan kalay iyonları, hava ve ortamdaki çözünmüş oksijen ile kolaylıkla okside olurlar. Bu nedenle radyoişaretleme çalışmalarında kullanılan bütün çözeltilerden azot gazı geçirilmesi gerekmektedir. Su içinden azot geçirilmesi ile yapılan çalışmalarda su içindeki oksijen miktarının önemli ölçüde azaldığı tespit edilmiştir. Kalay iyonlarının oksidasyonunu önlemek amacı ile tercih edilen bir başka yöntem formülasyona askorbik asit, gentisik asit, p-aminobenzoik asit gibi antioksidan ajanlar ilave etmektir. Askorbik asit antioksidan ajan olarak sıklıkla tercih edilmektedir (14, 58, 61, 62, 63).

^{99m}Tc-MET formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi üzerine askorbik asit miktarının etkisini araştırmak için indirgen ajan olarak 500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan, askorbik asit içermeyen, 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit içeren formülasyonların içerdiği ^{99m}TcO₄⁻, İH-^{99m}Tc ve ^{99m}Tc-MET yüzdeleri İTK çalışmaları yapılarak hesaplandığında:

500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların içerdiği ^{99m}TcO₄⁻ miktarının 0,05 mg ve 0,1 mg askorbik asit ilavesi ile azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 14).

500 µg, 750 µg, 1000 µg, 1250 µg ve 1500 µg kalay tartarat kullanılarak hazırlanan formülasyonların içerdiği İH-^{99m}Tc miktarının 0,1 mg askorbik asit ilavesi ile azaldığı tespit edilmiştir (Tablo 15).

Radyokimyasal saflığı en yüksek formülasyonun 1000 µg kalay tartarat, 0,1 mg askorbik asit ilavesi ile hazırlanan formülasyon olduğu gözlenmiştir.

İndirgen ajan olarak, farklı miktarlarda kalay tartarat ve antioksidan ajan olarak farklı miktarlarda askorbik asit içeren formülasyonlar ile bu aşamaya kadar yapılan işaretleme çalışmaları sonucunda optimum formülasyonların en yüksek radyokimyasal saflığa sahip olmaları nedeniyle 1000 µg kalay tartarat ve 0,1 mg askorbik asit içeren formülasyonlar olduğu sonucuna varılmıştır. Bu aşamadan sonra yapılan çalışmalar, bu formülasyon üzerinden devam edilmiştir.

4.1.6 Radyoaktivite Miktarının ^{99m}Tc-MET'in Radyokimyasal Saflığı ve İn Vitro

Stabilitesi Üzerine Etkisi

İn vitro işaretleme çalışmaları, yüksek dozda radyasyonun olumsuz etkilerinden personel ve çevreyi korumak amacıyla düşük doz (1 mCi) ile yapılmıştır. Ancak Nükleer Tıp

Departmanlarında radyofarmasötikler daha yüksek doz radyoaktiviteyle işaretlendiğinden (64), radyoişaretleme çalışmaları yüksek doz radyoaktiviteyle yapılarak formülasyonun radyokimyasal saflığı ve in vitro stabilitesi incelenmiştir. Bu amaçla ideal koşullarda hazırlanan formülasyonlar 10 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ile işaretlenip radyokimyasal saflığı İTK yapılarak incelendiğinde:

10 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ile işaretlenen formülasyonlar ile 1 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ile işaretlenen formülasyonların radyokimyasal saflıklarında 4. saat, 5. saat ve 6. saatlerde anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir. Bu durumun nedeni; ideal koşullarda hazırlanan formülasyonlardaki kalay tartarat miktarının 10 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ 'u indirgemeye yetersiz kalması olabilir. Yine de 10 mCi aktiviteye sahip $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$ ile işaretlenen formülasyonların tamamının radyokimyasal saflığı 5. saate kadar > % 85 olduğu tespit edilmiştir (Tablo 19).

4.1.7 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET Kompleksinin Stabilite Testleri

Nükleer Tıp Departmanlarının sıcak odalarında erken saatlerde hazırlanan radyofarmasötiklerin gün boyunca hastalara uygulanabilmeleri için stabilite çalışmalarının yapılması gereklidir (64).

4.1.7.1 Oda Sıcaklığındaki Stabilite Testleri

İdeal koşullarda hazırlanan formülasyonlar ile $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET'in oda sıcaklığındaki ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) stabilite testi çalışmalarının sonuçları incelendiğinde; hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığının zamanla değiştiği ancak 6 saat boyunca % 92'in altına düşmediği, 24. saatte ise % 60 civarına olduğu tespit edilmiştir (Tablo 20).

4.1.7.2 Serum Stabilite Testi

İdeal koşullarda hazırlanan formülasyonlar ile $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET'in insan serumundaki stabilite testi çalışmalarının sonuçları incelendiğinde; hazırlanan formülasyonların radyokimyasal saflığının zamanla değiştiği ve 6 saat boyunca % 60'ın altına düşmediği, 24. saatte ise % 5 civarında olduğu tespit edilmiştir (Tablo 21).

4.1.8 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET'in Radyokimyasal Saflığı ve Stabilitesinin Hesaplanması

4.1.8.1 İTK Çalışmaları ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

TLC yöntemi ile radyokimyasal saflık analizinde kullanılacak solvanların geliştirme çalışmaları sonucunda elde edilen Rf değerleri Tablo 22'de gösterilmiştir. Bu Rf değerlerine göre $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MET formülasyonunun içerdiği $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ miktarının Whatman 3MM kağıtları

kullanarak aseton, $\text{IH-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ ve $^{99\text{m}}\text{Tc-MET}$ miktarının ITLC-SG plakları kullanılarak ASN/Su/TFA solvan sistemlerinde sürüklenmesi ile tespit edilmesinin uygun olduğu belirlenmiştir.

4.1.8.2 R- UHPLC Çalışmaları ile Radyokimyasal Saflığın İncelenmesi

Hazırlanan formülasyonların içerdıği $^{99\text{m}}\text{Tc-MET}$ miktarını R-UHPLC cihazı kullanılarak tayin etmek için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Hazırlanan örneklerin kalite kontrol çalışmaları TLC ve R-UHPLC cihazları ile aynı anda yapılmış, elde edilen sonuçların birbiri ile uyumlu olduğu tespit edilmiştir.



KAYNAKLAR

- 1- Gürsoy AZ. Farmasötik Teknoloji Temel Konular ve Dozaj Şekilleri, Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayın 2004;2:29:399-407.
- 2- International Atomic Energy Agency Web site [homepage on the Internet]. 1998 [cited 2014 sept 20]. Available from: <http://www.iaea.org>.
- 3- Saha GB. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 6th ed. New York: Springer; 2010.
- 4- Kowalsky RJ, Falen SW. Radiopharmaceuticals in Nuclear Pharmacy and Nuclear Medicine. Washington DC: American Pharmacists Association Press; 2004.
- 5- Durak FG. Kemik Sintigrafisi için yeni Tc-99m Bifosfonat Radyofarmasötiklerinin Geliştirilmesi. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2005.
- 6- Micheal JW, Carol SR, editors. Handbook of Radiopharmaceuticals. Radiochemistry and Applications. United States: Wiley; 2003.
- 7- İlem D. Alendronat Sodyumun Farklı Formülasyonlardaki Biyoyararlanımı. İzmir: Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü: Radyofarmasi Anabilim Dalı; 2008.
- 8- Aydın A, Kaplan A. 99 Mo ve 225 Ac için Proton Hızlandırıcısına Dayalı Farklı Üretim Yöntemlerinin İncelenmesi. Ulusal Proton Hızlandırıcıları Çalıştayı, Ankara; 2013.
- 9- Poggenburg JK. The nuclear reactor and its products. Semin NuclMed 1974;4:3:229-43.
- 10- Khalil MM, editör. Basic Sciences of Nuclear Medicine. Berlin: Springer; 2007.
- 11- Saha GB, Macintyre WJ, Go RT. Cyclotrons and Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals for clinical imaging. Semin NuclMed 1992;22:3:150-61.
- 12- Lambrecht RM, Tomiyoshi K, Sekine T. Radionuclide generators. Radiochim Acta 1997;77:1-2:103-23.
- 13- Taşcı C, Ülker Ö, Ertay T, Taner M. S, Soylu A, Berk F, Erdoğan S, Yürekli Y, Aday S, Unak P ve ark. Radyofarmasötikler için kalite kontrol yöntemleri. Turkish Journal of Nuclear Medicine 2003;12:137-48.
- 14- Demir M. Nükleer Tıp Fiziği ve Klinik Uygulamaları, İstanbul: Bayrak; 2008;1-108.
- 15- Görpe A, Cantez S. Pratik Nükleer Tıp, İstanbul, Nobel; 1992;1-42.
- 16- Metter AF. Essentials of Nuclear Medicine Imaging. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1998; 1-37.
- 17- Sharp FP, Gemmell HG, Murray AD. Practical Nuclear Medicine. London: Springer; 2005;1-35.

-
- 18- Bor D. Nükleer Tıp Sayısal Görüntüleme Yöntelleri, Ankara: Bilim; 2009;43-49.
 - 19- Mustafa K. Bir Uzman Sistem Yardımıyla Kansere Hücrelerinin Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü; 2014.
 - 20- Tezer K, Ayşe K. Kansere Konusunda Genel Bilgiler. T.C. Sağlık Bakanlığı Kansere ve Savaş Daire Başkanlığı; 2001.
 - 21- Derya D. Akciğer Kitlelerinin Görüntülenmesinde Düşük Doz Bilgisayarlı Tomografinin Rolü. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
 - 22- Tuncel E. Klinik Radyoloji. İstanbul: Nobel&Güneş; 2002;40-6
 - 23- Yüksel M, Kalaycı G, editörler. Göğüs Cerrahisi. İstanbul: Bil Medya Grup; 2001;291-302.
 - 24- Sönmezoğlu K. Tüberküloz ve Toraks Dergisi. Akciğer kanserinde FDG-PET uygulamaları 2005; 53:1:94-112.
 - 25- Gökhan G. Küçük Hücre Dışı Akciğer Kanserinde Klinik Evrelemede Kullanılan Pet-CT'nin Patolojik Evreleme ile Karşılaştırılması. İstanbul: Siyami Ersek Göğüs Kalp ve Damar Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Göğüs Cerrahisi Kliniği 2006.
 - 26- Akın A. Temel Nükleer Tıp. Ankara: Ankara Üniversitesi Basımevi; 1981; 417-519.
 - 27- Rashid R, Muhammad J, Fayyaz A, Asima S, Sohail M, Misbah M, Shahid R, Saqib R et al. Preparation of ^{99m}Tc-labeled methotrexate by a direct labeling technique as a potential diagnostic agent for breast cancer and preliminary clinical results. Hellenic Journal of Nuclear Medicine 2013;16:1:33-37.
 - 28- Ersoy Y, Göksoy T, editör. Metotreksat ve diğer sitotoksik ilaçlar. Romatizmal hastalıkların tanı ve tedavisi. I. Baskı İstanbul: Yüce Yayın; 2002;907-26.
 - 29- Okarvi SM, Jammaz IA. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of Technetium-99m-Labeled Folate and Methotrexate Conjugates as Tumor Imaging Agents, Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals 2006;21:1:49-60.
 - 30- Emine Nida K. Uzun Süreli MET Tedavisi Alan Juvenil İdiyopatik Artritli Çocuklarda Folik Asit Desteğinin Plazma Total Homosistein Düzeyine Etkisi. İstanbul: Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği; 2006.
 - 31- Ak G. Folat-PEG-Doxorubicin türevinin sentezlenerek teknesyumla işaretlenmesi ve kansere görüntüleme ajanı olarak kullanım olanaklarının araştırılması. İzmir: Ege Üniversitesi Yüksek Lisans tezi; 2010.

-
- 32- Van Ede AE, Laan RFJM, De Abreu RA, Stegaman ABJ. Purine enzymes in patients with rheumatoid arthritis treated with methotrexate. *Ann Rheum Dis* 2002;61:1060-64.
- 33- Van Ede AE, Laan RFJM, Rood MJ. Effects of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatism* 2001;44:1515-24.
- 34- American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol*; 2002;46:328-46.
- 35- James RO. Methotrexate use in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin N Amer*; 1997;23:779-96.
- 36- Weintblatt ME, William NK. Textbook of Rheumatology. 4th ed. Philadelphia; 1993;767-778.
- 37- Open Data Drug & Drug Target Database [homepage on the Internet]. Canada: Canadian Institutes of Health Research, [cited 2014 oct 17]. Available from: <http://www.drugbank.ca>
- 38- Elgazzar HA editor. Inflammation. The Pathophysiologic Basis of Nuclear Medicine. Berlin: Springer; 2006.
- 39- Diniz SOF, Siqueira CF, Nelson DL, Martin CJ, Cardoso VN. Technetium-99m Ceftizoxime Kit Preparation. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2005;48:89-96.
- 40- Özen E, Kargı A. Akut ve Kronik İnflamasyon. İçinde: Çevikbas U, editör. Temel Patoloji. İstanbul: Nobel, 1992: 25-41.
- 41- Palestro, JC, Love C, Tomas, MB. Infection and inflammation. In: Treves ST editor. Pediatric Nuclear Medicine/PET. New York: Springer, 2007; 419-445.
- 42- Özgüven MA, Karacaoğlu AÖ, Arslan N, İlhan S, Günalp B, Öztürk E ve ark. Pozitron Emisyon Tomografisi Temel Prensipler ve Klinik Uygulamalar. Ankara: Gata Basımevi; 2004.
- 43- Peters AM. The use of nuclear medicine in infections. *Br J Radiol* 1998;71:843:252-61.
- 44- Prabodh K, Gupta CM. Microbiology, Inflammation, and Viral infections, In: Marluce B, David W, editors. Comprehensive Cytopathology. 3th ed. Edinburg: W B. Saunders; 2008; 91-129.
- 45- Sulavik S, Spencer RP. Specificity and sensitivity of distinctive chest radiographic and/or 67-Ga images in the noninvasive diagnosis of sarcoidosis. *Chest* 1993; 103:403-409.

-
- 46- Van der Wall H, Geoffrey S, Clayton F, Provan M. Importance of positioning and technical factors in anatomic localization of sporting injuries in scintigraphic imaging. *Seminars in Nuclear Medicine*; 2001;31: 17-27
- 47- Rhodes BA. Quality control in nuclear medicine, radiopharmaceuticals, instrumentation and in-vitro assays. St. Louis: Mosby; 1997;28:62-64.
- 48- Silverman DH, Small GW, Chang CY, Lu CS, Kung De Aburto MA, Chen W et. al. Positron emission tomography in evaluation of dementia: Regional brain metabolism and long-term outcome. *JAMA* 2001;286:17:2120-7.
- 49- Moore AEB, Hain SF, Blake GM, Fogelman I. Validation of Ultrafiltration as a Method of Measuring Free ^{99m}Tc -MDP. *Journal of Nuclear Medicine* 2003;44:891-897.
- 50- Dar UK, Khan IU, Javed M, Ahmad F, Ali M, Hyder SW. Preparation and biodistribution in mice of a new radiopharmaceutical- technetium-99m labeled methotrexate, as a tumor diagnostic agent. *Hellenic Journal of Nuclear Medicine* 2012;15:2:120-4.
- 51- Wu CS, Wang CH, Zhang JL, Wang DM, Tong YF, Wu S, Huang HW, Ning BM et. al. Separation, determination of six impurities in methotrexate drug substance using ultra-performance liquid chromatography. *Chinese Chemical Letters* 2013;25:3:447-450.
- 52- Nogueira DR, Tavano L, Mitjans M, Perez L, Infante MR, Vinardell MP. In vitro antitumor activity of methotrexate via pH-sensitive chitosan nanoparticles. *Biomaterials* 2013;34:11:2758-72.
- 53- Rx MediaPharma İnteraktif İlaç Bilgi Kaynağı 2014.
- 54- Polyak A, Hadju I, Bodnar M, Trencsenyi G, Pöstenyi Z, Haasz V, Janoki G, Janoki GA, Balogh L, Borbely J et. al. ^{99m}Tc -labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities. *International Journal of Pharmaceutics* 2013;449:1:10-17.
- 55- Rennen HJJM, Boerman OC, Oyen WJG, Corstens FHM. Imaging infection/inflammation in the new millennium. *European Journal of Nuclear Medicine* 2001;28:241–252.
- 56- Kumari Daisy Chella S, Tharani CB, Narayanan N, Kumar Senthil C. Formulation and characterization of Methotrexate loaded sodium alginate chitosan Nanoparticles. *Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology* 2013;9:15-921.
- 57- Eckelman WC, Richards P. Analytical pitfalls with ^{99m}Tc labeled compounds. *J. Nucl. Med* 1972;13:202-204.
- 58- Rodriguez Puig D, Fuster A, Soriano JM, Sierra S, Rub JS. A new method of [^{99m}Tc]-

ciprofloxacin preparation and quality control. J. Labelled Comp. Radiopharm 2006;49:1171-1176.

59- Saleh BT. Radiopharmacy basics. Basic sciences of nuclear medicine. London: Springer 2011.

60- Seyrek E. Radyoizotopların üretimi ve radyoterapide kullanılması. Ankara: Gazi Üniversitesi 2007.

61- Tofe AJ, Francis M. In vitro stabilization of a low tin bone imaging kit. J. Nucl. Med 1976;26:414-422

62- Tsopelas C, Penglis S, Ruszkiewicz A, Bartholomeusz FDL. ^{99m}Tc-Alafosfalin: an antibiotic peptide infection imaging agent. Nuclear Medicine and Biology 2003;30:169-175

63- Chilton HM, Witcofski RL. The ⁹⁹Mo-^{99m}Tc radionuclide generator nuclear pharmacy: An introduction to the clinical application of radiopharmaceuticals. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986;54-61.

64- Britton KE, Soroa V, Amaral H. ^{99m}Tc "Infecton", preliminary evaluation in over 500 patients through an IAEA coordinate research program. Eur J Nucl Med 1998;25:874.

ÖZGEÇMİŞ

1999 yılında Aydın/SMİTTE Akademi. İlköğretim eğitimimi 100. Yıl Atatürk İ.Ö.O'da 2004 senesinde, lise eğitimimi Hilmi Fırat Anadolu Lisesi'nde 2008 yılında, üniversite lisans eğitimimi Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi'nde 2013 yılında tamamladım. Aynı sene Radyofarmasi yüksek lisans programına başladım.

E-posta: emreozgenc90@gmail.com

Yayın:

Derya Ilem-Ozdemir, Evren Gundogdu, Meliha Ekinci, Emre Ozgenc and Makbule Asikoglu
Comperative permeability studies with radioactive and nonradioactive risedronate sodium
from self-microemulsifying drug delivery system and solution
Drug Development and Industrial Pharmacy

Early Online: 1-6

DOI: 10.3109/03639045.2014.959022

Poster:

D. Ilem-Ozdemir, E. Gundogdu, M. Ekinci, E. Ozgenc, M. Asikoglu
Comperative Permeability Studies with ^{99m}Tc-Risedronate Sodium from Self
Microemulsifying Drug Delivery System and Solution

17th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals April 24-27, 2014
Pamplona, Spain.

The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging Vol. 58- Suppl. 1 No. 2
Apri 2014.

