

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RADYOİŞARETLİ ANTİKANSER İLACIN TÜMÖR
HÜCRE TUTULUMU VE DNA İLE ETKİLEŞİMİ**

Mustafa TOP

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu :

Sunuş Tarihi : 29.04.2015

Bornova-İZMİR

2015

Mustafa Top tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak sunulan ‘‘Radyoişaretli Antikanser İlacın Tumor Hucre Tutulumu ve DNA ile Etkileşimi’’ başlıklı bu alışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi’nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 29/04/2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT
: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN
: Prof. Dr. şule AYTAş
: Prof. Dr. Sevil İRIşLİ
: Yard. Doç. Dr. Mine İNCE OCAKOğLU

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Radyoişaretleli Antikanser İlacın Tümör Hücre Tutulumu ve DNA ile Etkileşimi” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

29/04/2015

Adı-Soyadı

Mustafa TOP

ÖZET

RADYOİŞARETLİ ANTİKANSER İLACIN TÜMÖR HÜCRE TUTULUMU VE DNA İLE ETKİLEŞİMİ

TOP, Mustafa

Yüksek Lisans Tezi, Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma Yurt LAMBRECHT

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

Nisan 2015, 59 sayfa

Tez çalışmamızın amacı topoizomeraz-1 enziminin inhibitörü olan anti-kanser ilacı Topotekan (TPT)'in ^{131}I radyoizotopu ile işaretlenmesi ve in vitro olarak akciğer kanserine karşı biyopotansiyelinin incelenmesidir.

Topotekan, iodogen metoduna göre ^{131}I ile işaretlenip, kalite kontrolü ince tabaka radyokromatografisi (TLRC) ve kağıt elektroforezi yöntemleri ile belirlendi. Kalite kontrol deneyleri sonucunda TPT'nin yüksek verimle ($94,1 \pm 5,9$) işaretlendiği saptandı.

TPT'nin insan akciğer adeonakarsinoma epitel hücresi (A-549) ve insan fibroblast sağlıklı akciğer hücre (WI-38) hatlarında sitotoksitate deneyleri sonunda IC_{50} değerlerinin sırayla $14,82 \mu\text{M}$ ve $59,3 \mu\text{M}$ olduğu tespit edildi. Bu hücre hatlarında ^{131}I -TPT tutulum deneyleri sonucunda ise ^{131}I -TPT'nin tutulumun A-549 hücresinde WI-38 göre daha yüksek olması, bu radyoışaretili TPT'nin akciğer kanser için spesifik olduğunun göstergesidir.

Çalışmamızda tek kullanımlık elektrokimyasal sensörler kullanılarak ^{131}I -TPT'nin sağlıklı DNA ve kanserli DNA ile etkileşimi, elektrokimyasal yöntemle araştırıldı. Kontrol grubu olarak; ^{131}I ve TPT'nin tek başına davranışı, sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim öncesi ve sonrası ayrıca incelenip, transfer edilen yüke karşı oluşan dirençteki değişim elektrokimyasal empedans

spektroskopi tekniği ile ölçüldü. ^{131}I -TPT'nin kanserli DNA etkileşiminde elde edilen sonuçların diğerlerine kıyasla daha yüksek olduğu görüldü.

Tez çalışmamızda; Topotekan ^{131}I ile yüksek verimde işaretleterek akciğer kanser hücrelerinde tutulum düzeyleri saptandı ve DNA ile etkileşimi tek kullanımlık elektrokimyasal sensörlerle incelendi. Sonuç olarak, ^{131}I -TPT'nin yeni bir akciğer kanseri için nükleer görüntüleme ajanı olarak kazandırılması açısından ümit verici olduğu görüldü.

Anahtar sözcükler: Radyoiyot, antikanser ilaç, sitotoksiste, ilaç-DNA etkileşmesi, elektrokimyasal DNA biyosensörleri.

ABSTRACT**UPTAKE OF RADIOLABELED ANTICANCER DRUG ON
TUMOR CELLS AND DNA INTERACTION**

TOP, Mustafa

MSc, Department of Material Science and Engineering

Supervisor: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Co-Supervisor: Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN

April 2015, 59 pages

The aim of our thesis is to label Topotecan (TPT) which is an anticancer drug, with ^{131}I to investigate biopotential of lung cancer as in vitro.

Topotecan was labeled with ^{131}I with iodogen method and its quality control was determined using thin layer radiochromatography and paper electrophoresis methods. In result of the quality control experiments it is stated that TPT was labeled with high efficiency ($94.1 \pm 5.9\%$).

IC_{50} values of TPT in human lung adenocarcinoma cells (A-549) and human fibroblast healthy lung cells (WI-38) were determined as 14.82 and 59.3 μM respectively at end of cytotoxicity assays. The uptake of ^{131}I -TPT in A-549 cell line is higher than WI-38 cell line. This is show that radiolabeled TPT is spesific for lung cancer.

In our study, the interaction of ^{131}I -TPT with healthy DNA and cancer DNA was investigated using single-use electrochemical sensors. As a control group, the behavior of ^{131}I or TPT by itself, their interactions with healthy/ cancer DNA were also investigated before and after interaction, the changes at the charge transfer resistance was measured by electrochemical impedance spectroscopy technique. It was found that higher results were recorded in the interaction of ^{131}I -

TPT with cancer DNA comparison to the results obtained in the other interaction cases.

In our thesis study, Topotecan was labeled with ^{131}I with high yield. The uptake of ^{131}I -TPT in lung cancer cell was determined and the interactions of ^{131}I -TPT-DNA were also investigated by using electrochemical method. As a conclusion ^{131}I -TPT is promising in terms of a new lung cancer nuclear imaging agent.

Key words: Radioiodine, anticancer drug, cytotoxicity, drug-DNA interaction, electrochemical DNA biosensors.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince radyoaktif işaretli ilacın hazırlanması, radyoaktif işaretli ilacın tümör hücresindeki tutulumu ve radyoaktivite ölçümünde derin bilgi ve deneyimleri ile katkılar sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT'e,

Tez çalışmam süresince radyoişaretli antikanser ilacın tümörlü doku DNA/ sağlıklı doku DNA'sı ile etkileşimi ve etkileşimin perde baskılı elektrot yüzeyinde elektrokimyasal empedans spektroskopisi tekniği ile tayininde derin bilgi ve deneyimleri ile katkılar sağlayan ikinci danışman hocam Sayın Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'a,

2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yüksek Lisans Burs Programı kapsamında maddi ve manevi desteğinden dolayı TÜBİTAK'a

Nükleer Bilimler Enstitüsü ve Eczacılık Fakültesi'ndeki çalışmalarım sırasında Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT ve Prof. Dr. Kadriye Arzum ERDEM GÜRSAN'ın ekibinde yer alan öğrencilerine,

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

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mustafa TOP

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 Radyoaktif İyot İzotopları	4
2.2 Radyoiyotun Çözelti Kimyası	5
2.3 İyot ile İşaretleme	5
2.4 TLRC Yöntemi İle Kalite Kontrol Çalışması	6
2.5 Elektrokimya	6
2.5.1 Voltametri	8
2.5.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi	11
2.6 Biyosensörler	13
2.6.1 İdeal bir biyosensörün özellikleri	14

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
2.6.2 Biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken özellikler.....	15
2.6.3 Biyosensörler uygulamaları	15
2.6.4 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları.....	16
2.6.5 İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal DNA biyosensörler ile algılanması	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21
3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar	21
3.1.1 Kullanılan cihazlar	21
3.1.2 Kullanılan kimyasallar	22
3.2 Kalite Kontrol Çalışmaları	25
3.2.1 Radyoaktif iyot ile işaretleme ve TLRC ile kalite kontrolü.....	25
3.2.2 Elektroforez yöntemi.....	26
3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları	26
3.3.1 IC ₅₀ dozunun belirlenmesi.....	26
3.3.2 ¹³¹ I ile ¹³¹ I-TPT'nin WI-38 ve A-549 hücre hatlarında tutulum çalışması.....	27
3.3.3 Canlılık oranının tespiti.....	28

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
3.3.4 Empedimetrik Ölçüm	28
4. BULGULAR.....	29
4.1 ¹³¹ I-TPT'nin TLRC Yöntemi İle Elde Edilen Kalite Kontrol Sonuçlarına Yönelik Bulgular	29
4.1.1 Elektroforez yöntemi ile elde edilen bulgular	31
4.1.2 TPT'nin TLC sonuçlarına ait bulgular	32
4.2 In Vitro Çalışmalar	33
4.2.1 TPT toksisite çalışmasına ait bulgular.....	33
4.2.2 Hücre tutulum çalışmasına ait bulgular	35
4.2.3 TPT, ¹³¹ I ve ¹³¹ I-TPT'nin % hücre canlılık oranının tespiti çalışmasına ait bulgular.....	35
4.3 TPT/ ¹³¹ I/ ¹³¹ I-TPT Modifiye SPE Yüzeyinde Sağlıklı/ Kanserli DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine İlişkin Bulgular	36
4.3.1 TPT/ ¹³¹ I/ ¹³¹ I-TPT ile etkileşmiş DNA örnekleri modifiye edilmiş SPE'nin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile incelenmesine yönelik bulgular.....	36
4.3.2 ¹³¹ I-TPT'nin sağlıklı/kanserli DNA ile 1 saat süre ile etkileşiminde ölçülen Randless devre elemanlarının incelenmesine yönelik bulgular	39
4.3.3 Sağlıklı/kanserli DNA- ¹³¹ I-TPT/ ¹³¹ I/ TPT'nin 1 saat süreyle etkileşimlerinin sağlıklı/kanserli DNA R _{ct} değerlerine göre % değişim değerlerine ait bulgular	40

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
4.3.4 ^{131}I -TPT-DNA etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışmasına yönelik bulgular	40
5. TARTIŞMA	41
5.1 ^{131}I -TPT'nin TLRC Yöntemi İle Elde Edilen Kalite Kontrol Sonuçları İle İlgili Tartışma	41
5.1.1 Elektroforez yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile ilgili tartışma	41
5.1.2 TPT'nin TLC sonuçları ile ilgili tartışma	41
5.2 In Vitro Çalışmaların Sonuçları İle İlgili Tartışma	41
5.2.1 Toksikite çalışma sonuçları ile ilgili tartışma.....	41
5.2.2 Tutulum çalışması sonuçları ile ilgili tartışma.....	42
5.2.3 TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin % hücre canlılık oranının tespiti çalışması sonuçları ile ilgili tartışma.....	43
5.3 TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT Modifiye SPE Yüzeyinde Sağlıklı/Kanserli DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine Yönelik Bulgular İle İlgili Tartışma	44
5.3.1 TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT ile etkileşmiş DNA örnekleri modifiye edilmiş SPE'nin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma	44
5.3.2 ^{131}I -TPT'nin sağlıklı/kanserli DNA ile 1 saat süre ile etkileşiminde ölçülen Randless devre elemanlarının incelenmesine yönelik bulgularla ilgili tartışma.....	46
5.3.3 ^{131}I -TPT-DNA etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/ kanserli DNA ile etkileşim çalışmasına yönelik bulgularla ilgili tartışma.....	46

İÇİNDEKİLER (devam)

	Sayfa
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Üçlü elektrot sistemi	7
2.2 Voltametricide kullanılan uyarma sinyalleri.	9
2.3 Perde baskılı elektrot (SPE).....	11
2.4 Empedimetrik ölçüm sonrası Nyquist eğrisi.....	13
2.5 Biyosensörün çalışma mekanizması.....	14
2.6 Pürin ve pirimidin bazlarının şeması	17
2.7 DNA'nın yapısı.....	18
2.8 a) Çift sarmallı normal DNA, b) üç bölgede interkalasyon olan (kırmızı alanlar) DNA	19
3.1 TPT'nin açık formülü	23
4.1 ¹³¹ I'in TLRC kromotogramı (A banyosu).....	29
4.2 ¹³¹ I'in TLRC kromotogramı (B banyosu).....	30
4.3 ¹³¹ I-TPT'nin TLRC kromotogramı (A banyosu)	30
4.4 ¹³¹ I-TPT'nin TLRC kromotogramı (B banyosu)	31
4.5 ¹³¹ I-TPT'nin elektroforez deneyi.....	32
4.6 24 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram.....	33
4.7 48 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram.....	34

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil

Sayfa

4.8 72 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram34

4.9 ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarında a) 1 saat, b) 2 saat, c) 4 saat, d) 6 saat, e) 24 saat sonunda hücrelerdeki tutulumu gösteren hologram35

4.10 1 saat sonunda TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki % canlılık oranlarına ait hologramlar.....36

4.11 (A) (a) SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, (d) ^{131}I -TPT (12 μCi 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (e) sağlıklı DNA ve (f) kanserli DNA ile ^{131}I -TPT (12 μCi 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri. (B) (a) ^{131}I (12 μCi) immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA ile ^{131}I 'in (12 μCi) çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri. (C) (a) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPT immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA ile 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPT'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri37

4.12. (A) (a) SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile ^{131}I -TPT (12 μCi 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2). (B) (a) ^{131}I (12 μCi) immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile ^{131}I 'un (12 μCi) çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2). (C) (a) 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPT immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TPT'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2)38

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. İlaç-DNA etkileşimine yönelik yapılan empedimetrik çalışmalar	20
4.1 ¹³¹ I ve ¹³¹ I-TPT'ye ait Rf değerleri	29
4.2 ¹³¹ I, yükseltgenmiş ¹³¹ I ve ¹³¹ I-TPT'in yük dağılımı.	31
4.3 ¹³¹ I-TPT'nin TLRC ve TPT'nin UV ile bulunan Rf değerleri.....	32
4.4 1 saat sonunda TPT, ¹³¹ I ve ¹³¹ I-TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki % canlılık oranları değerleri	36
4.5 1 saat ¹³¹ I-TPT (12 µCi 0,5 µg/mL)'nin sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim sonucunda ölçülen Randless devre elemanları	39
4.6 1 saat sağlıklı/kanserli DNA- ¹³¹ I-TPT (sağlıklı/kanserli DNA; 10µg/mL- ¹³¹ I-TPT; 12 µCi 0,5 µg/mL) / ¹³¹ I (12 µCi) / TPT (0,5 µg/mL) etkileşimlerinin sağlıklı/kanserli DNA R _{ct} değerlerine göre % değişim değerleri.	40
4.7 ¹³¹ I-TPT-DNA (12 µCi 0,5 µg/mL, DNA: 10 µg/mL) etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/kanserli DNA ile ekileşim çalışması sonuçları.....	40

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİSimgelerAçıklama

Ci

Curie

 γ

Gama enerjisi

 μg

Mikrogram

mL

Mililitre

 μL

Mikrolitre

mM

Milimolar

 μM

Mikromolar

 ^{131}I

İyot-131

Kısaltmalar

TPT

Topotekan

 ^{131}I -TPT ^{131}I ile işaretlenmiş Topotekan

MeV

Mega Elektron Volt

KeV

Kilo Elektron Volt

MEM

Minimum gerekli ortam

MTT

3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-

difeniltetrazolyumbromür

A549

İnsan Akciğer Adenokarsinoma Epitel Hücre Hattı

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)Kısaltmalar

WI38	İnsan Fibroblast Sağlıklı Akciğer Hücre Hattı
SPE	Perde baskılı elektrot
SWCNT	Tek duvarlı karbo nanotüp
DNA	Deoksiribonükleik asit
dsDNA	Çift sarmal DNA
EIS	Elektrokimyasal İmpedans Spektroskopisi
DPV	Diferansiyel Puls Voltametri
CV	Çevrimsel Voltametri
PGE	Kalem grafit elektrot
R_{ct}	Yük transfer direnci
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
CH_3Cl	Kloroform
CH_2Cl_2	Diklorometan
SHE	Standart hidrojen elektrot
KCl	Potasyum klorür
H_2SO_4	Sülfürik asit
NaCl	Sodyum klorür

1. GİRİŞ

Kanser son zamanlarda tüm dünyada artış gösteren bir hastalıktır. Deoksiribonükleik asit'in (DNA) hasarından dolayı hücrelerin kontrolsüz veya anormal biçimde büyümesi ve çoğalması kansere neden olur. Kanser başlangıç kısmı, ilerleyişi hastalar arasında farklı olsa da kanserin moleküler ve hücresel bölgeleri heterojenlik ve kararsızlık açısından benzerdir. Kanser türleri vücudun ana yaşam ünitesi olan hücrelerimizden gelişirler. Kanser türleri süreçlerine ve lokalizasyonuna bağlıdır ve cerrahi kanser tedavisi, ışın tedavisi, kimyasal tedavi gibi uygulamalarla tedavi edilmeye çalışılır. Fakat bu tedavi yöntemleri sağlıklı hücrelere de hasar vermekte ve yan etkiler oluşturmaktadır.

Literatürde, Topotekan (TPT)'nin ^{11}C ile işaretlenmesiyle yapılan bir çalışmada, TPT'nin bir topoizomerez-1 enziminin inhibitörü olarak çalışan bir anti-kanser ilaç olup, kan-beyin bariyeri içinden nüfuz edememesinden bahsedilmiştir. Çalışmada PET kamerası kullanılarak küçük hayvanlar üzerinde, ^{11}C ile işaretli Topotekan (^{11}C -TPT)'in beyine nüfuzu aracılığıyla P-glikoprotein (Pgp) ve göğüs kanseri direnç proteini değerlendirmek için ^{11}C -TPT yeni PET ajanı sentezlenmiştir (Yamasaki et al., 2011).

TPT'nin radyoiyot ile işaretlenmesi ile ilgili çalışma olmayıp bizim tarafımızdan gerçekleştirilmiştir. Literatürde bazı kemoterapi ilaçlarının ^{131}I ile işaretlenmesi ve potansiyellerinin incelenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Farklı bir kemoterapi ilacı Protohiperisin kullanılarak gerçekleştirilen çalışmada, ^{131}I -Protohiperisin SPECT-CT, otoradyografi ve histolojik boyama nekroz dokularda yüksek tutulum gösterdiği tespit edilmiştir (Liu et al., 2014).

^{131}I ile işaretli Rituximab, Hodgkin olmayan lenfoma tedavisi için büyük bir potansiyele sahip olduğu ortaya konulmuştur (Kumar et al., 2013).

Iodogen yöntemiyle bakır-klorofil türevi fotosensitizer (Cu-PH-A) ^{131}I ile yüksek verimle işaretlenmiş ve işaretlemeden sonra hücre kültür çalışmaları MCF-7 ve MDAH-2774 hücre hatlarında gerçekleştirilmiştir. Radyoışaretli fotosensitizerin normal sıçan organlarındaki tutulumu belirlenerek bu

photosensitizerin, hem yumurtalık tümör görüntüleme hem de fotodinamik terapi için yararlı olabilirliği ortaya konulmuştur (Ocakoglu vd, 2015).

Biyosensörlerin önemi, birçok kanser türünün teşhisi ve tedavisinde her geçen gün artmaktadır. Biyosensörler; biyokomponentler, fiziksel komponentler ve fizikokimyasal değişimleri çeviren bir dönüştürücünün bir araya gelmesiyle analitik ölçüm olanağı sağlayan sistemlerdir. Biyosensörler hasta başı tanılarda kanser markerlarının tayini için son derece yüksek potansiyele sahiptirler. Literatürde biyosensörlere dayalı ilaç-DNA etkileşimleri hakkında birçok yayın bulunmaktadır (Erdem vd., 2002).

Yapılan bir çalışmada, (Congur vd., 2015), TPT-çift sarmal DNA etkileşiminin araştırılması için elektrokimyasal biyosensör platformları oluşturulmuştur. TPT-çift sarmal DNA (dsDNA) etkileşiminin elektrokimyasal tayini için diferansiyel puls voltametri (DPV) kullanılıp çalışma kalem grafit elektrot (PGE) yüzeyinde ve tek duvarlı karbon nanotüp (SWCNT) modifiyeli PGE yüzeyinde incelenmiştir. TPT ve DNA'ya ait elektroaktif bir baz olan Guanin'in yükseltgenme sinyalindeki değişimler her modifikasyon/immobilizasyondan önce ve sonra ölçülmüştür. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan TPT için, modifiye olmamış PGE ve SWCNT ile modifiyeli PGE kullanılarak tayin sınırları elde edilmiştir. Ayrıca elektrokimyasal empedans spektroskopisi ölçümleri, SWCNT ve SWCNT-PGE yüzeyindeki etkileşim prosesleri kullanılarak yük transfer direncindeki (R_{ct}) değişikliklerin değerlendirilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma literatürde TPT-dsDNA etkileşimlerinin elektrokimyasal yöntemler ile incelenmesi açısından bir ilk olma özelliği taşımaktadır.

Bu çalışmanın temel amacı, topoizomerez 1 enziminin çalışmasını inhibe eden Topotekan'ın, ^{131}I ile işaretlenmesi, DNA etkileşim mekanizmalarının elektrokimyasal yöntem ile incelenmesi ve akciğer kanser için yeni bir görüntüleme ajanı kazandırılmasıdır. Bu kapsamda TPT lakton halkası üzerinden ^{131}I ile iodojen metoduna göre işaretlendi. TPT sitotoksitesite çalışması sağlıklı ve kanserli hücre hatlarında yapılmış ve aynı hücre hatlarında tutulum potansiyelleri belirlendi.

^{131}I -TPT, ^{131}I ve TPT'nin sağlıklı ve kanser hücreler üzerinde % canlılık oranına etkisi incelenmiştir.

Tek kullanımlık perde baskılı elektrot (SPE) kullanılarak, ^{131}I , TPT ve ^{131}I -TPT'nin tek başına davranışı, sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim öncesi ve sonrası incelenmiştir. SPE yüzeyine yapılan modifikasyon öncesinde ve sonrasında transfer edilen yüke karşı oluşan direnç (R_{ct}) değerindeki değişim elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile ölçülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Radyoaktif İyot İzotopları

İyot atom numarası 53 olan VIIA halojen grubunda bulunan metalik bir elementtir. Kimyasal olarak iyot halojenlerin en az reaktif olanı, astatin'den sonra en elektropozitif olanıdır. Kararlı iyotta 74 nötron vardır ve bu sayıdan fazla veya az nötrona sahip olan iyot izotopları ışınım yaparak bozunurlar. Fiziksel özellikleri nedeniyle nükleer tıpta en çok ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I ve ^{131}I izotopları kullanılır.

^{123}I , kararlı izotopundan 4 nötron eksiktir. Bu nedenle elektron yakalaması (EC) ile Te-123m 'e bozunur. ^{125}I ve ^{131}I reaktörde üretilir. ^{123}I üretimi siklotronlarda gerçekleşir bu yüzden maliyetlidir. ^{123}I , 13,3 saat gibi kısa bir yarı ömüre sahiptir. Gama (γ) enerjisi 159 keV olup tıbbi uygulamalar için uygundur (Yurt F., 1998).

^{124}I , kararlı izotopundan 2 nötron eksiktir. Yarı ömrü 4,18 gün olup protonca zengin bir izotopdur. Kararlı izotopundan 2 nötron eksik olması nedeniyle büyük ölçüde (%75) elektron yakalama bozunumuna uğrar. ^{124}I 'ün üretimi siklotronda gerçekleşir ve ^{124}Te 'ün bozunmasıyla üretilir. ^{124}I , iyodür tuzu şeklinde pozitron emisyon tomografisi (PET) kullanılarak tiroit görüntülenir.

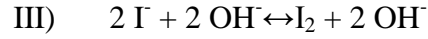
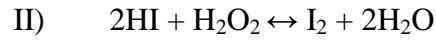
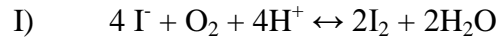
^{125}I , kararlı izotopundan 2 nötron eksiktir. Nötron eksikliği nedeniyle elektron yakalama bozunumuna uğrar. Yarı ömrü 60 gün olup, uzun metabolizma çalışmaları için uygundur. Tıbbi olarak tiroid bezi benzeri organları görüntüleme için kullanılır.

^{131}I , kararlı izotopuna göre 4 nötron fazlalığı vardır. Bundan dolayı negatron bozunumu yapar. Bozunum sırasında birkaç β^- geçişi mümkündür, aynı zamanda 364 keV'lik bir γ enerjisi vardır. Nükleer tıpta tedavi amaçlı olarak en çok kullanılan radyonüklitlerin başında gelir. ^{131}I beta ışınları ve gama ışınlarına sahiptir. β^- ışınları sayesinde tedavi amaçlı kullanılır. 364 keV'lik γ enerjisi nedeniyle çok da az da olsa görüntüleme kullanım potansiyeline sahiptir. Yarı ömrü 8 gündür. Tiroid kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. ^{131}I ilk kez 1946

yılında tiroid kanser tedavisinde kullanılmıştır. Şimdilerde hipertiroidizm ve tiroid kanser tedavilerinde kullanılmaya devam edilmektedir (Phan et al., 2004).

2.2 Radyoiyotun Çözelti Kimyası

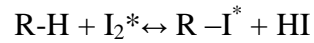
Radyoaktif iyot genellikle sodyum iyodür formundadır. Uygun şartlar altında sulu çözetilerde oksidayson reaksiyonlarına girer. Aşağıda gösterildiği gibi en önemli oksidatif reaksiyonlar oksijen ya da radyoliz ürünleri (peroksitler ve serbest radikaller) ile olmaktadır.



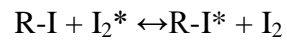
2.3 İyot ile İşaretleme

İyodun, kimyasal ve biyolojik davranışı yükseltgenmiş (iyot) veya indirgenmiş (iyodür) durumda olup olmadığına bağlıdır. Radyoiyot genellikle NaI formundan üretilmektedir. İyot ile işaretlemenin gerçekleşmesi için I^- formundan I^+ formuna yükseltgenmesi gerekir. İşaretlemenin gerçekleşmesi için birkaç yol vardır. Bunlardan biri I^+ 'un elektrofilik yerdeğiştirme reaksiyonları sayesinde radyoiyot ile işaretleme olmasıdır. Diğer bir yöntem ise molekülde bulunan kararlı iyot ile I^+ 'nın izotopik yerdeğiştirme reaksiyonu sonucunda gerçekleşir. Bu reaksiyonlar şöyledir:

Elektrofilik yer değiştirme:



İzotopik yer değiştirme:



Radyoiyodun yükseltgenmesi için çeşitli yöntemler mevcuttur; iodogen, moleküler iyot (I₂), kloramin-T, iyot monoklorür, elektroliz, enzimatik, erime noktasında halojen yer değiştirme yöntemleridir. Bunların arasından en çok kullanılan yöntem iodogen yöntemidir.

İodogen (1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α difenilglukoril) suda çözünmez, kullanımı basit ve kolaydır. Çözücü olarak kloroform (CH₃Cl) veya diklorometan (CH₂Cl₂) kullanılır. Çözücü madde uçurulur ve içinde iodogen bulunduğu cam tüpün yüzeyine bir film tabakası gibi kaplanır. Böylelikle iyodun iodogen ile temas alanı artmış olup işaretleme veriminin de artması sağlanır. İodogen yönteminde reaksiyon katı fazda oluşacağı için bu teknik ile işaretlenen proteinlerin bozunumu çok azdır (Yurt F., 1998; Seyitoğlu vd., 2009).

2.4 TLRC Yöntemi İle Kalite Kontrol Çalışması

Çözünen maddelerin az miktardaki numuneleri ince tabaka radyo kromatografisi (TLRC) şeridinde damlatılır. Şerit çözücünün içinde olduğu kabın üst kısmına bant ile sabitlenerek çözücünün içine daldırılır. Numunelerin damlatıldığı yerin çözücü seviyesinin üzerinde olmasına dikkat edilir. Şerit daldırılan tankın kapağını kapatılır ve çözücü buharı ile doymuş bir buhar atmosferi sağlanır. Çözücü şerit üzerinde yükselerek numunelerin üzerinden geçtikçe de çözünen maddeler şerit üzerinde farklı hızlarda hareket eder. Konsantrasyona bağlı olmayan bu değer aşağıdaki formül ile gösterilir.

$$R_f = \frac{\text{maddenin yürüdüğü uzaklık}}{\text{çözgenin yürüdüğü uzaklık}}$$

2.5 Elektrokimya

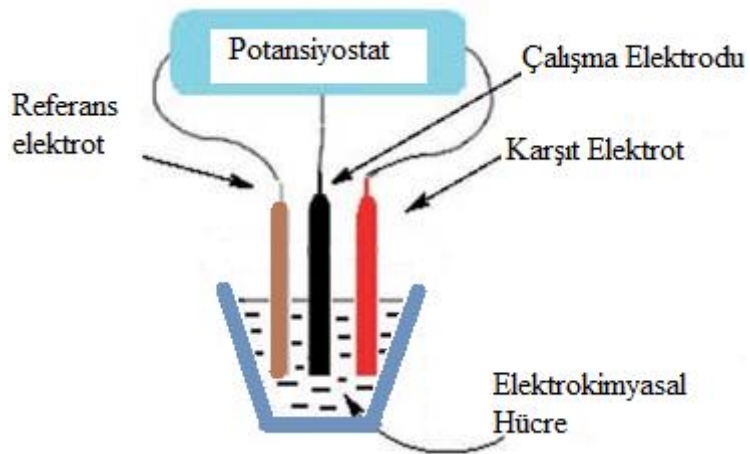
Elektrokimya, elektronik bir iletken (grafit, yarı iletken, veya metal) ile iyonik bir iletken (elektrolit) ara yüzeyinde gerçekleşen reaksiyonları inceleyen maddenin elektrik enerjisi ile etkileşimi sonucu ortaya çıkan kimyasal dönüşümler ile fiziksel değişiklikleri ve kimyasal enerjinin elektrik enerjisine dönüşmesini ele alan bilim dalıdır. Elektroanalitik teknikler birçok maddenin nitel ve nicel

tainine olanak sağlar. Elektroanalitik tekniklerin diğer analitik tekniklere göre bazı üstünlükleri vardır. Bu üstünlükler başlıca şöyledir:

- ✓ Kesin ve hızlı sonuç verir, duyarlıdır, hassastır ve yüksek seçiciliğe sahiptir.
- ✓ Elektroanalitik tekniklerle bir maddenin veya iyonun toplam miktarının yanında istenilen yükseltgenme basamağı da tayin edilebilir.
- ✓ Elektroanalitik kimya alanında kullanılan cihazlar özellikle kromatografik ve spektroskopik cihazlara göre basit ve ekonomiktir.
- ✓ Düşük miktarda numunelerle çalışabilme imkânı sağlamanın yanında numune hazırlama işlemide kolaydır.

Elektroanalitik teknikler sağladığı önemli avantajlar sayesinde, kromatografik ve spektroskopik gibi diğer tekniklere göre son zamanlarda daha hızlı gelişip ve daha geniş uygulama alanı bulmaktadır.

Elektrokimyasal bir tepkimenin sağlanması için, analiz edilecek maddeyi kapsayan bir çözelti, maddenin kimyasal dönüşüm gerçekleştirdiği bir elektrot sistemi (çoğunlukla üçlü elektrot sistemi kullanılır) ve bu elektrotların birbiriyle bağlanmasını sağlayan bir çeviri (transducer) sistemine ihtiyaç vardır.



Şekil 2.1 Üçlü elektrot sistemi.

2.5.1 Voltametri

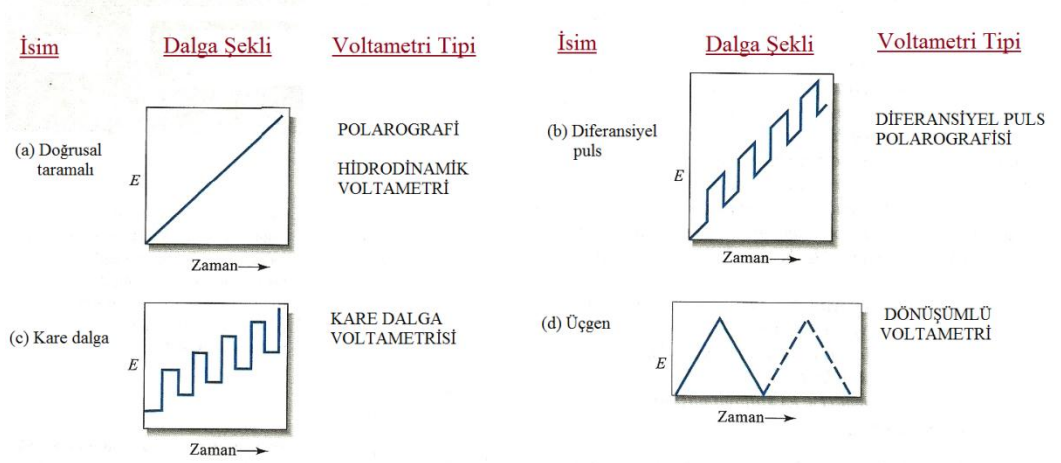
Voltametri, çalışma elektrodunun kutuplandığı (polarizasyon) zamanda akımın uygulanan gerilimin bir fonksiyonu olarak ölçülmesinden faydalanılarak, analit hakkında bilgi edinilen elektroanalitik yöntemlerdir (Skoog et al., 1996). Uygulanan gerilimin ölçülen akıma karşı çizilen grafiğine **voltamogram** denir.

Voltametrimin başlangıcı Nobel ödüllü kimyacı Jaroslav Heyrovský tarafından 1922 yılında Polarografinin keşifi ile başladı. 1942 yılında Hickling ilk kez üçlü elektrot potansiyostat üretti (Hickling et al., 1942). 1960 ve 1970'lerde enstrümantasyon, bilgisayarlı teknolojinin gelişmesi, ve kontrollü sistemler adına birçok gelişme gözlemlenmiştir. Bu gelişmeler hassasiyeti geliştirilmiş ve yeni analitik yöntemler yaratmıştır. Potansiyostat, elektrodlar ve hücrelerin gelişen teknoloji ile birlikte ucuz maliyeti endüstride etkin olarak analitik çalışmaları hızlandırmıştır.

Voltametri, bir indikatör veya çalışma elektrodunun polarize olduğu şartlarda, uygulanan potansiyelin bir fonksiyonu olarak, akımın ölçülmesinden faydalanarak analit hakkında bilgi edinilen bir grup elektroanalitik yöntemi kapsar (Skoog et al., 1996). Civa elektrodu çalışma elektrodu olarak kullanıldığı zaman voltametri, polarografi adını alır.

2.5.1.1 Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri

Voltametri deki çalışma elektrotları, polarizasyonu arttırmak için, yüzey alanları çoğu zaman birkaç milimetre kare ve nadiren ise birkaç mikrometre kare veya daha küçük olan mikroelektrotlardır. Voltametri de, içersinde bir mikroelektrot bulunan elektrokimyasal bir hücreye potansiyel uyarma sinyali uygulandığı zaman, bu uyarma sinyali spesifik bir akım cevabı oluşturulur (Skoog et al., 1996). Voltametri de sıklıkla kullanılan uyarma sinyallerinin dalga şekli, Şekil 2.2' de verilmiştir.



Şekil 2.2 Voltametri de kullanılan uyarma sinyalleri.

2.5.1.2 Voltametrik cihazlar

Voltametrik analizlerde kullanılan cihazlar üç elektrottan oluşur. Bunlardan ilki elektrokimyasal hücre, diğeri, analizlenecek madde ve son olarak destek elektrolit adı verilen elektrolitin aşırısını içeren bir çözeltiye daldırılmış elektrotlardan oluşur. Üç elektrottan biri, zamanla potansiyeli doğrusal olarak değişen mikroelektrot veya çalışma elektrotudur. Bu elektrodun boyutları polarize olması için küçük tutulur. İkinci elektrot, potansiyeli deney boyunca sabit kalan bir referans elektrottur (çoğu zaman doymuş kalomel veya bir gümüş/gümüş klorür elektrot). Üçüncü elektrot ise elektriğin, sinyal kaynağından çözeltinin içinden geçerek mikroelektroda iletilmesine yarayan ve çoğu zaman helezon şeklinde bir platin tel ya da bir civa havuzu olan karşıt elektrottur (Skoog et al., 1994).

2.5.1.3 Voltametri de kullanılan referans elektrotlar

Elektroanalitik uygulamaların çoğunda elektrotlardan birinin yarı-hücre potansiyelinin sabit olması ve ortamdaki çözeltinin bileşiminden bağımsız olması istenir. İstenilen bu tür elektrotlara " referans elektrot" denir.

Elektrokimyada ilk kullanılan referans elektrot Standart Hidrojen Elektrotudur. (SHE) (veya Normal Hidrojen Elektrotu (NHE)) Standart Hidrojen

Elektrot redoks elektrotudur. Bu tür elektrotlar daha önceki dönemlerde yapılan çalışmalarda sadece referans elektrot olarak değil, pH belirlenmesinde indikatör elektrotlar olarak da kullanılmıştır.

İdeal bir referans elektrotta bulunması gereken özellikler vardır (Skoog et al., 1994; Evans, 1991; Pietrzyk and Frank, 1979):

- ✓ Tersinir olup, Nernst eşitliğine uymalıdır.
- ✓ En ufak bir akıma maruz kalsa bile orijinal potansiyeline geri dönmelidir.
- ✓ Zamanla değişmeyen bir potansiyele sahip olmalıdır.
- ✓ Potansiyelinin sıcaklıkla değişim katsayısı küçük olmalıdır.

2.5.1.4 Voltametricde kullanılan çalışma elektrotları

Çalışma elektrodu farklı şekil ve büyüklüklere sahiptir. Çalışma elektrodunun yapımında iletken malzeme olarak platin ya da altın gibi inert bir metal; karbon, pirolitik grafit ya da camsı karbon; indiyum oksit ya da kalay oksit gibi yarı iletken veya bir civa filmi ile kaplanmış bir metal olabilir. Çalışma elektrotlarının kullanıldığı potansiyel aralığı elektrot malzemesine ve bu elektrotların batırıldığı çözeltinin bileşimine bağlı olarak da değişir. Negatif potansiyel sınırları suyun indirgenmesiyle oluşan hidrojen oluşmaktadır. Pozitif potansiyel sınırları moleküler bir biçimde oksijen verecek şekilde, suyun yükseltgenmesiyle oluşan yüksek akımlar sonucu belirlenir.

Çalışma elektrotları için çalışma ortamına göre potansiyel aralıkları seçilir. Civa elektrodu için 1,0 M H₂SO₄ çalışma ortamında, (-0,8 V) ile (+0,4 V) aralığı ve 1,0 M KCl çalışma ortamında, (-1,6 V) ile (+0,2 V) aralığındadır.

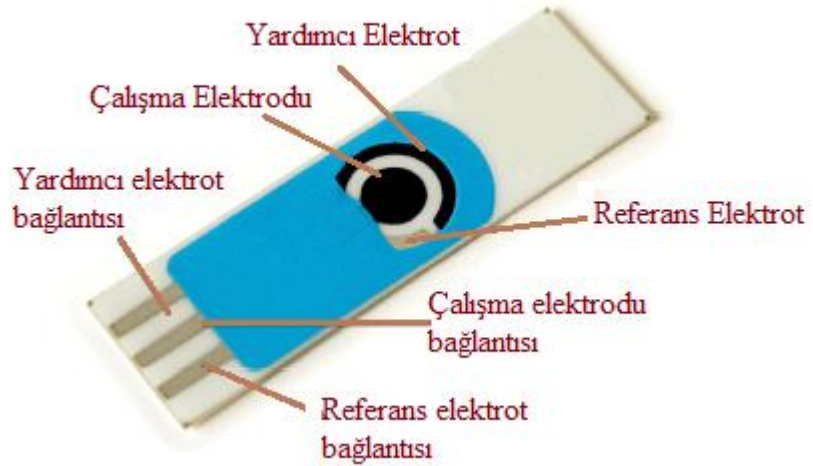
❖ Perde Baskılı Karbon Elektrotlar

Perde baskılı elektrotlara (SPE) dayalı nanomalzemelerin üretimi ve bu alandaki uygulamaları biyosensörlerin gelişmesiyle birlikte artmıştır.

Perde baskılı karbon elektrotlar üçlü elektrot sisteminden oluşur: Çapı 3 mm olan karbon çalışma elektrodu, Ag/AgCl referans elektrot ve karbon karşıt elektrot (Kurbanoglu vd., 2015).

Perde baskılı karbon elektrotların **tekrarlanabilirliğinin iyi olması, kararlı olması, kullanımının kolay olmasından dolayı** biyosensör uygulamalarında önemli konumdadır (Wang et al., 2002a; 2002b; Ye and Ju, 2005; Fanjul-Bolado et al., 2007; Sanchez et al. 2007; Karadeniz vd., 2008; Erdem ve Congur, 2014).

16 farklı çalışma elektodu bulunduran perde baskılı elektrotlar (MUX-SPE16s) ilk olarak Alzheimer hastalığının tanısında belirteç olarak olarak kullanılan miRNA 15-a dizilimi için kullanılmıştır (Erdem vd., 2013)



Şekil 2.3 Perde baskılı elektrot (SPE).

2.5.2 Elektrokimyasal empedans spektroskopisi

Bir devredeki toplam direnç empedans olarak adlandırılır. Empedans spektroskopisi elektrokimyasal sistemleri ve metodları incelemek için ideal bir yöntemdir. Empedans yüksek frekanslara maruz kaldığında kapasitans ve indüktif değişikliklerin sebep olduğu direncin ölçümüne dayanmaktadır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi katı/sıvı ara yüzeyleri karakterize etmede kullanılan bir

yöntemdir. Elektrokimyasal reaksiyonların oluştuğu durumlarda yük aktarımı hakkında da bilgi vermektedir (Monk, 2002). Ohm kanununa göre direnç (R), gerilim (V) ve akım (I) arasındaki oranla ifade edilir.

$$R = V/I$$

Bu eşitliğin kullanımı yalnızca ideal direnç ile sınırlıdır. İdeal direnç sade bir biçimde birkaç önemli özelliğe sahiptir:

- Direncin değeri frekansa bağlı değildir.
- Akım ve gerilim düzeyleri Ohm kanununa uygundur.
- Gerilim sinyalleri ve alternatif akım (AC) sinyalleri eş fazdadır.
- Empedansı tamamen gerçeldir ve rezistif empedans olarak da ifade edilir.

Empedansın elektriksel akıma karşı bir devrenin direnç göstermesi ile ölçülebilen bir değer olması direnç ile olan benzerliğini ortaya koymaktadır. Empedansın, ideal direncin sahip olduğu yukarıdaki basit özellikler ile sınırlandırılmaması da dirençten farkını ortaya koymaktadır. Empedans Z harfi ile gösterilmektedir ve aşağıdaki eşitlik ile ifade edilmektedir.

$$Z = E/I$$

Elektrokimyasal bir hücreye alternatif akım uygulanması sonucu elektrokimyasal empedans ölçülür. Alternatif akım frekansına bağlı olarak iki farklı direnç değeri elde edilir. Bunlardan biri gerçek empedans (Z'), diğeri sanal empedans (Z''). Elektrokimyasal empedans verileri genel olarak Nyquist ve Bode eğrileri yardımıyla bulunur (Macdonald, 1992; Prodromidis, 2007).

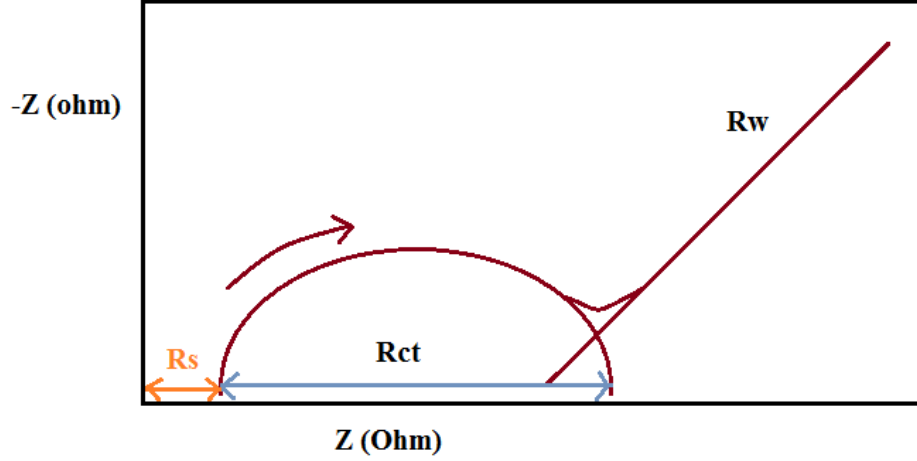
$$Z = Z' - jZ'' \quad (i = \sqrt{-1})$$

Z = empedans

Z' = gerçek empedans

Z'' = sanal empedans

Gerçek empedansın x-ekseninde ve sanal empedansın da y-ekseninde bir arada gösterildiği grafik adını elektronik mühendisi Harry Nyquist'ten alan Şekil 2.4'te gösterilen Nyquist eğrisi olarak adlandırılmaktadır (Monk, 2002).



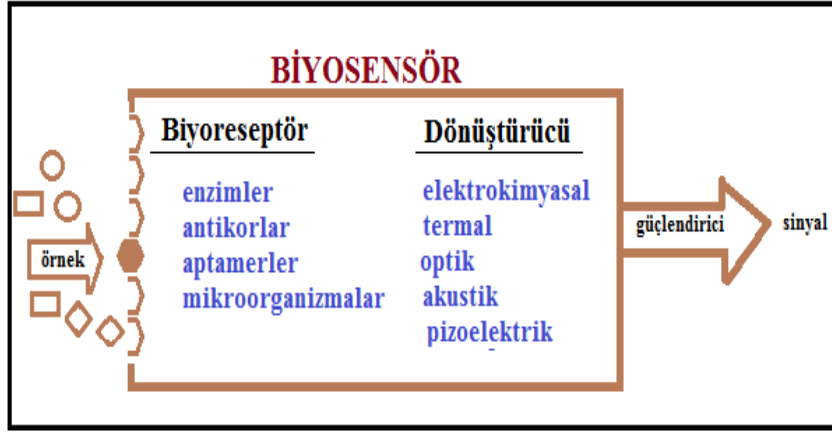
Şekil 2.4 Empedimetrik ölçüm sonrası Nyquist eğrisi.

Şekil 2.4'te gösterilen Nyquist eğrisinde ölçümler yüksek frekansta başlar düşük frekansta biter. Ölçüm başladıktan hemen sonra R_s gösterilen çözelti direnci meydana gelir. Yüksek direnç değerlerinden düşük direnç değerlerine giderken çözelti direncini takip eden yarı çember şeklinde, R_{ct} ile gösterilen eğri elektrota transfer edilen yüke karşı oluşan direnci ifade eder. Düşük frekanslarda oluşan doğrusal çizgi R_w ile gösterilen Warburg empedansını ifade etmektedir. Sistem belirlenen frekans aralığında empedansı gerçekleştirirken yük depolama (kapasitans) özelliğini kullanılır. Nyquist eğrisinde oluşan R_{ct} değerleri bize elektrot yüzeyinde oluşan olaylar hakkında bilgi sunar.

2.6 Biyosensör

Sensör, fiziksel bilgileri elektrik sinyaline çeviren otomatik kontrol sistemlerinin duyu organlarına denir. Biyosensörler; biyolojik analizler için kullanılan bir çeşit özel sensördür ve "**International Union of Pure and Applied Chemistry**" (IUPAC) tarafından, "**kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal ya da elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar**" olarak tanımlanmıştır. Biyosensörlerin büyük bir kısmı basit olarak biyoreseptör (ligand)

ve dönüştürücü (transducer) olmak üzere iki kısımdan oluşmuştur. Biyomoleküler yapıya sahip biyolojik bağlanma bölgesindeki reseptörler biyoreseptör (ligand) olarak ifade edilir. Biyoreseptörün analiti dedekte ettiği zamanda oluşan fiziksel veya kimyasal sinyalleri elektronik sinyale çeviren yapılara dönüştürücüler (transducer) denir (Chambers, 2008). Biyosensörlerin sağladığı en önemli avantajlarından başında çok kısa zamanda sonuç odaklı olması ve uygulama aşamasının kolay olması yer almaktadır (Gooding, 2006).



Şekil 2.5 Biyosensörün çalışma mekanizması.

2.6.1 İdeal bir biyosensörün özellikleri

- ✓ İyi tekrarlanabilirlik
- ✓ Hızlı cevap zamanı
- ✓ Yüksek duyarlılık
- ✓ Seçicilik
- ✓ Geniş ölçüm aralığı
- ✓ Hızlı geriye dönme zamanı
- ✓ Kalibrasyon gereksinimine ihtiyaç duyulmaması
- ✓ Yüksek stabilite
- ✓ Küçültülebilirlik ve sterilize edilebilirlik
- ✓ Yeterli düzeyde tayin sınırı
- ✓ Basitlik ve ucuzluk (Hall, 1990; Shah and Wilkins, 2003; Gooding, 2006).

2.6.2 Biyosensör tasarımında dikkat edilmesi gereken özellikler

Biyosensörde öncelikle analit tanımı yapılır daha sonra tasarlanma aşamasına geçilir. Biyosensörün oluşum sırasında bazı durumlarda dikkatli olunması gerekir. Bu durumlar:

- ❖ Analite uygun biyoreseptörün seçimi,
- ❖ Biyoreseptörü dönüştürücüye sabitlemede kullanılacak uygun ve verimli immobilizasyon metodunun seçimi,
- ❖ Biyoreseptörün analiti algılamasıyla oluşan fiziksel ya da kimyasal sinyali kolay algılanabilir sinyal formatına dönüştürecek olan dönüştürücünün yapısı ve dönüştürücünü seçimi,
- ❖ Ölçüm aralığının, hassasiyetin ve ölçümlerdeki kontaminasyonların karşısında dikkatli olunması,
- ❖ Cihazın kompakt bir hale dönüştürülmesi, olarak sıralanabilir (Gooding, 2006).

2.6.3 Biyosensör uygulamaları

Biyosensörler birçok alanda kullanılmaktadır. Bunların başlıcaları şöyledir.

Tıp: Biyosensörler tıp alanında insülin noksanlığının belirlemek metabolitlerin ölçülmesini sağlamak, yapay pankreasın çalışma ortamlarının kontrolünün sağlanmasında rol oynar. Ayrıca enzim sensörlerinin ölçüm işlemlerindeki yüksek duyarlılığı, ticari uygunluğu açısından tıp dalında çok kullanılan biyosensörlerin başında gelir.

Endüstri: Endüstriyel süreçlerde, biyoreaktöre ilave edilen ya da biyoreaktörden çıkarılan maddelerin ölçülmesinde rol oynar.

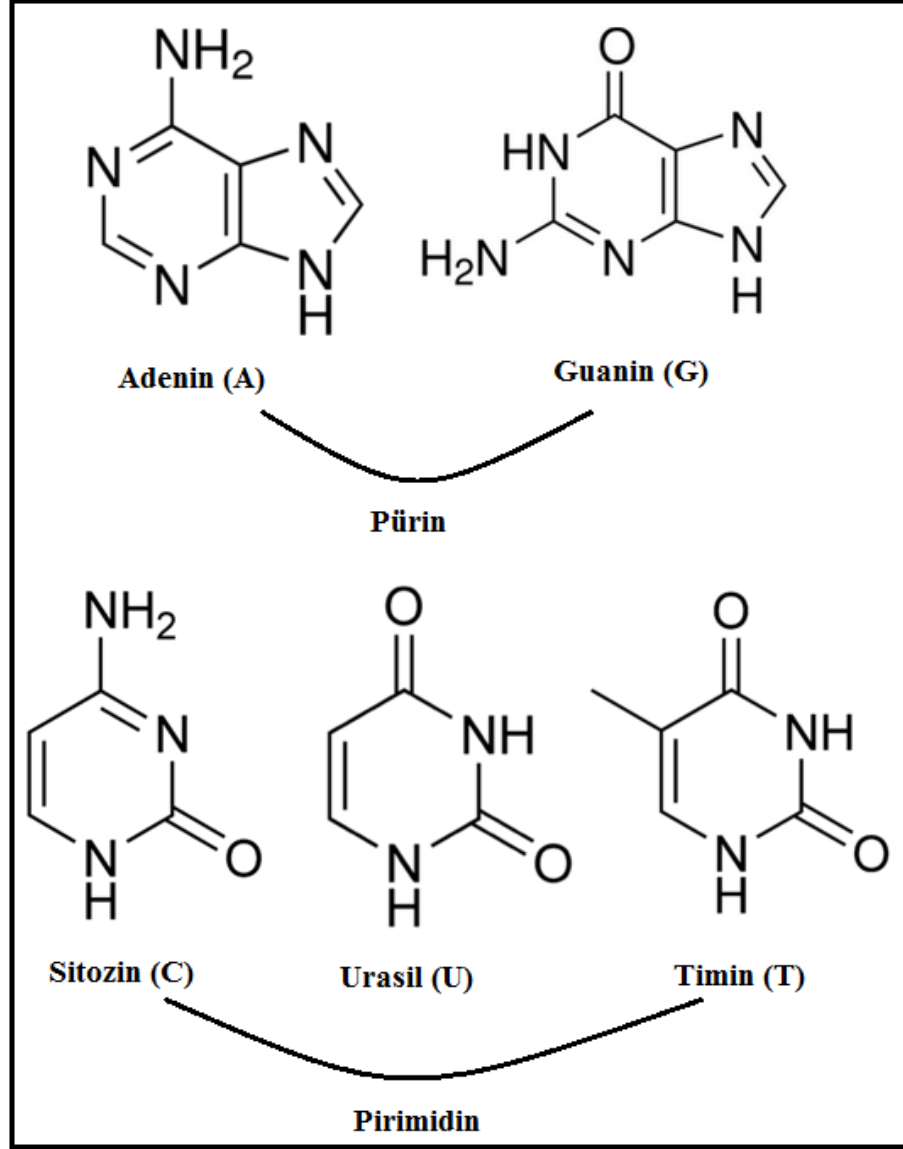
Çevresel Denetim: Çevre Koruma Ajansı (ing:EPA (Environmental Protection Agency) EPA tarafından çevre önemli bir husustur ve sürekli kontrol altında tutmak için izlenim halindedir. Taşınabilir sensörler sayesinde çevre koruma ajansına bağlı birimler düzenli olarak hava ve suyu tahlil etmektedirler.

Savunma (askeri ve sivil): 11 Eylül saldırıları ve körfez krizinden sonra askeri ve savunma alanlarında biyoterör olaylarının önceden tespit edilip önlenmesi için portatif biyosensör imalatına önem verilmiştir. (Gooding, 2006).

2.6.4 Biyosensör tasarımında kullanılan moleküller ve yapıları

2.6.4.1 Nükleik Asitler

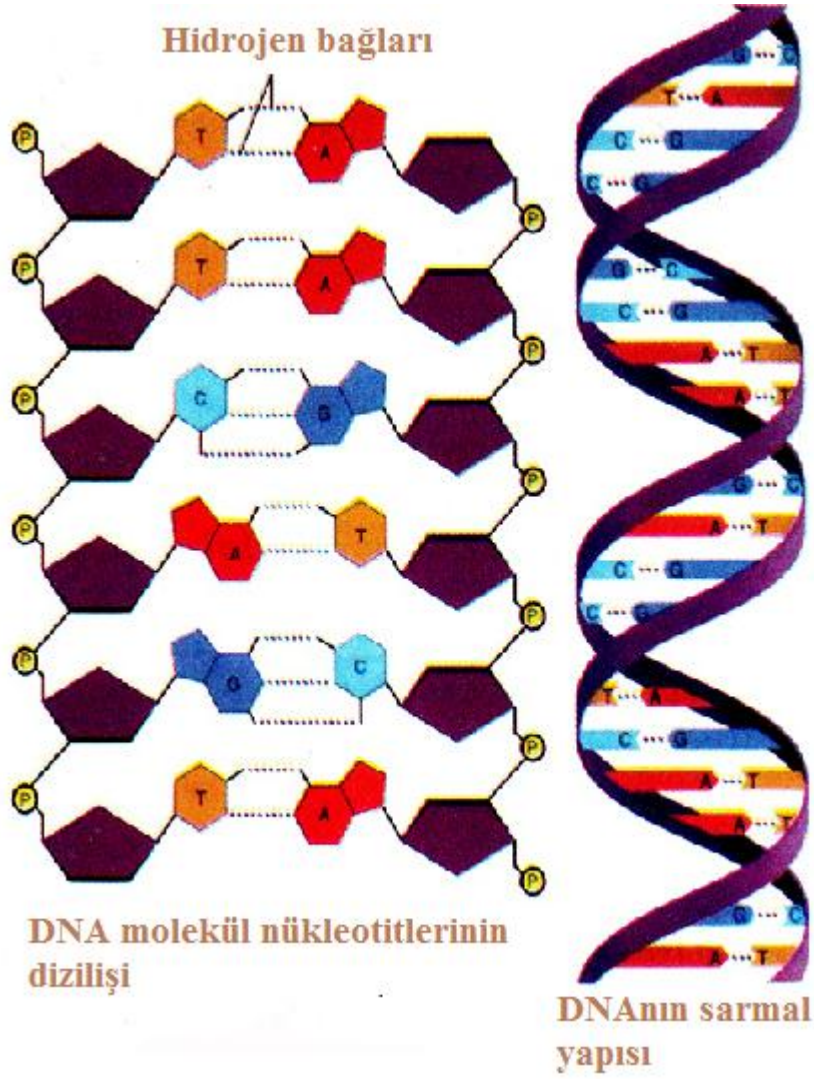
Bir fosfat, beş karbonlu bir şeker ve bir azotlu bazdan oluşan nükleik asit moleküllerinin yapı taşlarına **nükleotit** denir. Nükleotitlerin baz kısmı nükleobaz olarak adlandırılır ve bunlar pürin ve pirimidin olmak üzere iki kısımdan oluşur. Pürinler çift halkalı ve dokuz atomlu aromatik bileşik olan Adenin (A) ve guanin (G)'den, primidinler ise tek halkalı ve altı karbondan oluşan sitozin (S), timin (T) ve urasil (U)'den oluşur. DNA'da, adenin, timin, guanin ve sitozin, RNA'da ise adenin, urasil, guanin ve sitozin bulunur (Dervan, 1986, 1998; Plambeck and Lown, 1984; Brett et al., 1997, Erdem ve Ozsoz, 2011).



Şekil 2.6 Pürin ve pirimidin bazlarının şeması.

Chargaff DNA moleküllerini inceleyerek adenin (A) derişimlerinin timin (T) derişimlerine, guanin (G) derişimlerinin de sitozin (S) derişimlerine eşit olduğunu DNA'nın x ışınları difraksiyon verileri ile ortaya koymuştur.

Pürin ve pirimidin nükleotidleri arasındaki eşleşmeler baza özgü olup adeninin timin ile, guaninin de sitozin ile hidrojen bağı ile bağ oluşturmalarına bağlıdır. Bu nedenle DNA'nın herhangi bir zincirindeki baz dizisi verilirse, diğer zincirdeki baz dizisi de kolayca belirlenebilir.



Şekil 2.7 DNA'nın yapısı.

DNA, hücre bölünmesi esnasında kendini kopyalar, kromozomların ikiye bölünmesi esnasında DNA'nın kendini kopyalamasına duplikasyon denir. DNA kendisini eşlerken hidrojen bağları açılır. Açıkta kalan pürin ve pirimidin nükleotitler hücrede sentezlenmiş nükleotitlerle tamamlanarak birbirine eş iki DNA meydana gelmiş olur.

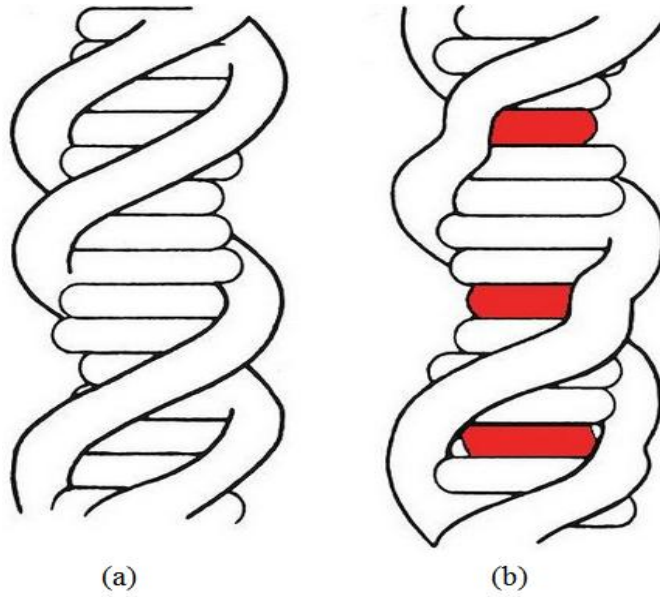
Ayrıca DNA, kendisinde olan bilgiyi RNA'ya (Ribonükleik asit) aktarır. Bu işlem transkripsiyon olarak adlandırılır. RNA'da toplanan bilgi protein sentezinde kullanılır(Watson and Crick, 1953; Mandelkern et al., 1981; Gregory, 2006).

DNA ile ilaç etkileşimi üç farklı şekilde gerçekleşir:

- ✓ Transkripsiyon faktörleri ve polimerazlarının kontrolü ile etkileşimdir. Bu durumda, ilaç DNA'ya bağlanan proteinler ile etkileşime girer.
- ✓ Nükleik asit 3lü heliks yapıları oluşturmak için DNA çift sarmal yapısına RNA aracılığı ile bağlanma veya transkripsiyon aktivitesi ile etkileşebilen DNA-RNA hibritlerini oluşturan DNA tek sarmalını etkilemek için RNA hibridizasyonu ile bağlanma.
- ✓ DNA çift sarmal yapılarına bağlanan küçük aromatik ligand molekülleri ile. DNA'ya bu bağlanmalar şöyle gerçekleşir; genellikle spesifik olmayan bir negatif yüklü nükleik şeker-fosfat yapısı ile elektrostatik etkileşimi, Düzlemsel aromatik halkaların baz çiftleri arasında interkalasyonu ve çapraz bağlanma (Erdem ve Ozsoz, 2002).

2.6.4.2 İnterkalasyon

İnterkalasyon düzlemsel bir molekülün veya grubun çift sarmal nükleik asit yapısının arasına girerek yerleşmesi olayına denir.



Şekil 2.8 a) Çift sarmallı sağlıklı DNA, b) üç bölgede interkalasyon olan (kırmızı alanlar) DNA.

2.6.5 İlaç-DNA etkileşmesinin elektrokimyasal DNA biyosensörleri ile algılanması

DNA hedefli ilaç tasarımında elektrokimyasal biyosensörler kullanılarak ilaç- DNA etkileşiminin analizi gerçekleştirilebilmektedir. İlacın DNA ile etkileşim öncesindeki ve sonrasında mevcut ilaç sinyalindeki ve/veya DNA'daki elektroaktif bazlar, guanin ve adenin sinyalindeki değişim ölçülerek bu değişime göre ilaç-DNA etkileşim türü hakkında bilgi edinilebilmektedir. Çift sarmal DNA varlığında ilacın sinyalinde artış sağlayan ilaçlar olduğu gibi DNA hibridizasyon tayininde kullanılan bazlara DNA'daki çapraz bağ oluşturmak suretiyle bağlanıp elektroaktif bazların sinyalinde etkileşim sonrası azalmaya sebep olan ilaçlarda bulunmaktadır (Özkan vd., 2014; Erdem vd., 2007; Havran et al., 2009; Wang, 2002).

Çizelge 2.1 İlaç- DNA etkileşimine yönelik yapılan empedimetrik çalışmalar.

İlaç	Elektrot	Modifikasyon	Ölçüm Yöntemi	Kaynaklar
Netropsin	GCE		EIS	(Li et al., 2005)
Daunomycin	GCE	TATA box DNA	EIS	Chang and Li, 2009)
Daunorobisin	PGE	SWCNT	EIS,DPV	(Erdem vd., 2009)
Bleomycin(B LM)	PGE		EIS	(Erdem vd., 2013)
6- Thioguanine	PGE		EIS,DPV	(Eksin vd., 2014)
Topotecan	PGE	SWCNT	EIS,DPV	(Congur vd., 2015)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Kullanılan Cihaz ve Kimyasallar

3.1.1 Kullanılan cihazlar

- Doz Kalibratörü (AtomLab™ 100 Plus) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Scanner (Bioscan AR-2000) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Cd (Te) RAD-501 Tek Kanallı Gama Sayım Sistemi (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- TLC Küvetleri (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- CO₂' li İnkübatör (MCO-18 AIC Sanyo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Laminar Air Flow (Thermo MSC Advantage 1.2, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Inverted Mikroskop (Olympus Japan, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Işık Mikroskobu (Olympus Japan, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Multimode Mikroplak Okuyucu (Thermo, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Otoklav (Hirayama HG-50, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Perde Baskılı Karbon Elektrotlar (Dropsens, İspanya) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)
- Potansiyostat (FRA 2 modülü içeren AUTOLAB 302, GPES 4,9 yazılımlı, Eco Chemie, Hollanda)
- Terazî (Mettler Toledo AB204-S) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)

- Ses titreşimli temizleyici (BandelinSonorex) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)
- pH-metre (Orion 420A) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)
- Manyetik karıştırıcı (Biosan MS 3000) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)
- Vorteks (Biosan V1) (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)
- Faraday kafesi (E.Ü. Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)

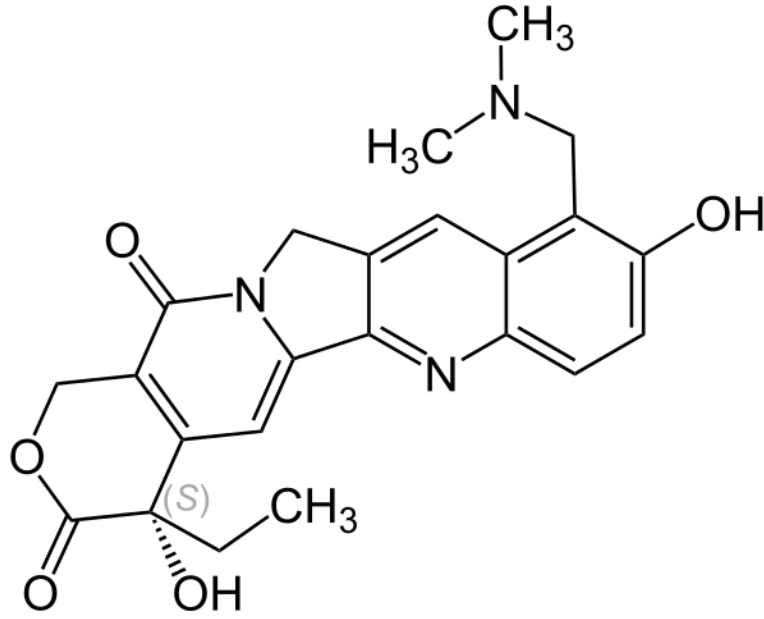
3.1.2 Kullanılan kimyasallar

- Etanol (Merck)
- Etanol (Teknik)
- İodogen (Sigma-Aldrich)
- Diklorometan (Merck)
- n-bütanol (Merck)
- Asetik Asit (Merck)
- İzopropil Alkol (Merck)
- Amonyum Hidroksit (Merck)
- TLC Selüloz F (Merck Plastic Sheets 20x20)
- MTT Kiti (Biological Industries)
- MEM-Eagle (Biological Industries)
- Fosfat Tamponu(PBS) (Amresco)
- Topotekan hidroklorit hidrat (%98) (Sigma)
- A-549 İnsan Akciğer Adenokarsinoma Epitel Hücre Hattı
- WI-38 İnsan Fibroblast Sağlıklı Akciğer Hücre Hattı
- Na ¹³¹I Şifa Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı'ndan temin edilmiştir.
- Tüm çalışmalarda ultra saf su kullanıldı. Deneysel çalışmalar oda sıcaklığında (25,0 ± 0,5) °C' de gerçekleştirildi.

3.1.2.1 TPT hakkında bilgiler

Kapalı Kimyasal Formül: C₂₃H₂₃N₃O₅

Kimyasal adlandırma: (S)-10-[(dimetilamino)metil]-4-etil-4,9-dihidroksi-1H-pirano[3',4':6,7] indolizino [1,2-b] kinolin-3,14-(4H,12H)-dionemonohidroklorür. TPT'nin açık formülü Şekil 3.1'de gösterildiği gibidir.



Şekil 3.1 TPT'nin açık formülü.

Molekül ağırlığı: 421,25 g/mol

Kimyasal Özellikleri: TPT doğal bir bitki olan camptotheca acuminatanın türevi olan ve daha az toksik etkileri olan camptotesinin suda çözülebilir analogudur. Lakton, çoğunlukla, aynı moleküldeki bir karboksil grubu ile bir hidroksil grubunun ya da halojen atomunun molekül içi tepkimesiyle oluşan halkalı yapıdaki organik esterlerin ortak adıdır. TPT'nin yapısındaki bu lakton halkası pH'a bağlı olarak açılır, fizyolojik pH'ta aktif olmayan karboksilat yapısına dönüşür (Herben et al., 1996).

Farmokolojik Özellikleri: TPT yapısında lakton halkası bulunan bir antikanser ilaçtır. Bu lakton halkası TPT'ye farmokolojik yönden aktiflik kazandırır. TPT,

replikasyon sırasında topoizomeraz 1 enzimine bağlanır. TPT topoizomeraz 1 enziminin çalışmasını engellemesinden dolayı çift sarmal yapının açılmasını ve DNA replikasyonunu engeller (Staker et al, 2002, 2005; EMEA, 2005). Ayrıca oluşan ilaç-enzim kompleksinin hücresel döngünün S fazında sitotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Lima et al., 2003; Craig et al., 1997; Staker et al, 2002, 2005). TPT, DNA baz çifti arasına interkale olabilmektedir (Staker et al., 2002, 2005).

3.1.2.2 Kullanılan çözeltilerin hazırlanışı

- **Tampon çözeltilerin hazırlanışı**

0,05 M fosfat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 7,4; PBS):

Ölçümler sırasında kullanılan 0,05 M fosfat tampon çözeltisi litresinde 1,36 g (0,01 mol) KH_2PO_4 , 6,96 g (0,04 mol) K_2HPO_4 içerir. Yukarıdaki değerler neticesinde hazırlanan tampon çözeltisinin pH değeri yaklaşık 7,4'tür.

0,05 M asetat tampon çözeltisinin hazırlanışı (pH 4,8; ABS):

Kullanılan 0,05 M asetat tampon çözeltisinin bir litresinin içinde, 0,2722 g sodyum asetat trihidrat, 0,1154 mL asetik asit ve 1,168 g NaCl (0,02 mol) bulunur. Çözeltinin pH'sının istenilen değerden uzak olması durumunda, çözelti pH'sı 4,8 oluncaya kadar 0,1 N NaOH ve/veya 0,1 N HCl ilave edilir.

- **Redoks probu çözeltisinin hazırlanışı**

$2,5 \times 10^{-3}$ mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ ve 100 mM KCl içerecek şekilde 200 mL ultrapure su içerisinde hazırlandı.

- **Topotekan hidroklorit hidrat çözeltisinin hazırlanışı:**

TPT 100 µg/mL olacak şekilde, pH=7,4 NaCl içermeyen 50 mM fosfat tamponuyla hazırlandı. Cl⁻ iyonlarının girişim yapması sebebiyle NaCl içermeyen fosfat tamponu kullanıldı.

3.2 Kalite Kontrol Çalışmaları

3.2.1 Radyoaktif iyot ile işaretleme ve TLRC ile kalite kontrolü

Yükseltgen ajan olarak kullanılan iodogen (1,3,4,6-tetrakloro-3α,6α difenilglukoluril) suda çözünmeyen bir yapıya sahiptir. Çözgen olarak kloroform (CH₃Cl) veya diklorometan (CH₂Cl₂) kullanılır. İşaretlemenin yapılması için öncelikle 1 mg'lık iodogen tüpleri hazırlandı. Daha sonra çözgen uçurularak yükseltgen ajanın içinde bulunduğu tüpün yüzeyini bir film tabakası şeklinde kaplanması sağlandı. Bu şekilde iyodun iodogenle temas alanı artırılıp ve işaretleme veriminin artmasını sağlandı.

Stok 100 µg/mL TPT çözeltisi fosfat tamponu (tuzsuz, pH=7,4) ile 1 µg/mL ve 1000µL olacak şekilde seyreltildi. Hazırlanan 1 mg'lık iodogen tüpüne 500 µL'lik TPT ve 200 µCi ¹³¹I eklenerek tüp dairesel olarak birkaç kez salladıktan sonra kurşun kaplı çeker ocakta 30 dakika inkübasyon süresince bekletildi.

İnkübasyon süresi sonunda radyoşaretli TPT selüloz TLC şeritlerine damlatıldı ve n bütanol-su-asetik asit (4-2-1) ve izopropil alkol-n bütanol-0,2 N amonyum hidroksit (2-1-1) içeren küvetlere yerleştirildi. Banyolardan çıkarıldıktan sonra TLC şeritleri kurumaya bırakıldı ve sonra bantlanarak Bioscan-AR2000 cihazı ile sayılarak kromatogramları alınıp R_f değerleri tespit edildi. Ayrıca TPT için aynı banyolar kullanılarak TLC deneyi yapıldı ve TLC şeritleri Ultra viyole (UV) ışık altında incelenip ve R_f değerleri tespit edildi.

3.2.2 Elektroforez yöntemi

Poliselüloz asetat olan elektroforez kağıdı 1,5x24 cm boyutlarında kesildi. Kesilen elektroforez kağıtların uçları pozitif, negatif kutuplar ve ortası uygulama noktası olarak belirlendi. Kağıtlar saf su ile ıslatıldıktan sonra uygulama noktalarına 10 µL olarak işaretli topotekan (¹³¹I-TPT) damlatıldı ve elektroforez küveti içerisine kutuplara uygun olarak yerleştirildi. Daha sonra kapalı ortamda 300 V gerilim uygulanarak 2 saat bekletildi. 2 saat sonunda çıkarılan elektroforez kağıtları oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan elektroforez kağıdı TLC scannerda sayıldı.

3.3 Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında sağlıklı insan akciğer hücresi olan WI-38 ve kanserli akciğer hücresi olan A-549 hücre hatları kullanıldı. Hücreler -80°C'de muhafaza edildi. -80 °C'de muhafaza edilen WI-38 ve A-549 hücreler çıkarıldıktan sonra seri bir biçimde çözüldü. Uygun bir besiyer ortamına alınarak çoğalmaları sağlandı.

Çalışmamızda kullanılan 500 mL besiyer ortamı % 10 FBS, % 1 penisilin/steptomisin, % 1 L-Glutamin, % 1 temel olmayan aminoasit, % 1 Na-piruvat içermekte olup kalan kısım da minimum gerekli ortam (MEM) ile tamamlanarak elde edildi. Bu besiyer ortamında çoğaltılan A-549 ve WI-38 hücre hatları 37°C'de % 95 nem ve % 5 CO₂ oranı içeren inkübatörde korundu.

3.3.1 IC₅₀ dozunun belirlenmesi

Sitotoksisite tayini için 96'lık platelerde çalışma grubu oluşturuldu. Plateler bir sütun kontrol grubu olmak üzere her bir kuyucuğa 1x10⁵ sayıda hücreler 200 µL besiyer hücresi içerisinde ekildi. 24 saat inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki besiyer çekildi. 200 µL serumsuz MEM ile hazırladığımız 3,7, 7,41, 14,82, 29,65, 59,3 µM konsantrasyonlarda TPT kuyucuklara eklendi. Plateler 24, 48 ve 72 saat sürelerle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda platte bulunan hücrelerin üzerindeki madde içeren çekildi. Plate üzerine

110 µl 3-(4 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyumbromür (MTT) kiti eklendi. MTT kiti hücrelerin canlılık oranını belirlemek için kullanılır (%11 MTT, %89 MEM). 4 saat inkübasyona bırakıldı. 4 saat sonunda hücrelerin üzerindeki MTT kiti çekildi. MTT kitinin çözünmesi için 110 µl DMSO (dimetil sülfoksit) eklendi ve plateler mikropate okuyucusunda okundu (Özgür A., 2011; Ashrafi et al., 2012).

3.3.2 ¹³¹I ile ¹³¹I-TPT'nin WI-38 ve A-549 hücre hatlarında tutulum çalışması

Tutulum çalışmasında çalışma grubu oluşturmak için, 1 sütun kontrol grubu, 1 sütun işaretli madde ve 1 sütun bloklanmış işaretli madde için 24'lük platler kullanıldı. 4 kuyucuk ¹³¹I, 8 kuyucuk ¹³¹I-TPT için kullanıldı. Kuyucuklara 3 gün öncesinden 1×10^5 sayıda hücre ekildi ve CO₂'li inkübatörde saklandı.

Tutulum çalışması WI-38 ve A-549 hücre hatlarında gerçekleştirildi ve çalışma süreleri 1, 2, 4, 6, 24 saat olarak belirlendi. Hücrelere uygulanacak radyoışaretli TPT miktarı (kuyucuk başına 10 µM/20 µCi) tespit edildi. Hücrelere uygulanacak ¹³¹I miktarı 20 µCi'dir. 3 gün sonunda hücrelerin üstündeki besiyer alınıp ve % 0.9'luk NaCl, (serum fizyolojik (SF)) ile 2 kez yıkandı. A-549 ve WI-38 hücre hatlarına; serumsuz MEM ortamında seyreltilen, 8 kuyucuğa ¹³¹I-TPT (20µCi, 10µM), 4 kuyucuğu da ¹³¹I (20µCi) eklendi. Daha sonra plateler çalışma süreleri boyunca 37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreleri sonunda platelerin üzerlerindeki besiyerlerini almadan kuyucukların başlangıç aktivitesi Cd(Te) dedektöründe ölçüldü. Daha sonra üzerlerindeki aktif besiyerler alınarak kuyucuklar 1 kez SF ile yıkandı ve üstlerine 500 µl SF eklendi. Kuyucuklarda kalan işaretli bileşiklerin son aktivitesi tekrar Cd(Te) dedektöründe bu şekilde sayıldıktan sonra veriler analiz edilerek hücrelerdeki tutulumun yüzdeleri hesaplandı (Özgür A., 2011; Ashrafi et al., 2012).

3.3.3 % Canlılık oranının tespiti

% Canlılık oranının tespitinde çalışma grubu oluşturmak için, 1 sütun kontrol grubu, 1 sütun antikanser ilaç, 1 sütun radyoizotop ve 1 sütun radyoışaretli madde olmak üzere 24'lük plateler kullanıldı. 4 kuyucuk PBS (pH=7,4 NaCl içermeyen), 4 kuyucuk TPT, 4 kuyucuk ^{131}I ve 4 kuyucuk ^{131}I -TPT için kullanıldı. Kuyucuklara 2 gün öncesinden 1×10^5 sayıda hücre ekildi ve CO_2 'li inkübatörde saklandı.

Canlılık oranının tespiti için yapılan çalışmada WI-38 ve A-549 hücre hatları kullanıldı ve 1 saatlik çalışma süresinde çalışıldı. Hücrelere uygulanacak ^{131}I -TPT miktarı (kuyucuk başına 12 μCi) tespit edildi. 1 saatlik inkübasyon sonunda hücrelerin üzerindeki maddeler çekildi, 1 kez PBS (NaCl içermeyen) ile yıkandı ve 250 μL MTT solüsyonu (% 11 MTT, % 89 MEM) eklendi. MTT kitinin çözünmesi için 250 μl DMSO eklendi ve plateler 560 nm'de mikroplate okuyucusunda okundu. Canlılık oranları, oluşturulan kontrol grubuna göre hesaplandı.

3.3.4 Empedimetrik Ölçüm

EIS ölçümleri, 0,1 M KCl içinde hazırlanan 2,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) karışımına sahip redoks probu içinde perde baskılı elektrot yüzeyinde gerçekleştirildi. Empedans, 10 mV sinüsoidal sinyal ile Ag/AgCl'ye karşı 0,23 V potansiyelde 10^{-1} Hz ile 10^6 kHz frekans aralığında ölçüldü. Transfer edilen yüke karşı oluşan direnç (R_{ct}) değeri, AUTOLAB 302 (FRA, version 4,9 Eco Chemie, Hollanda) programıyla hesaplanan yarım dairenin çapına eşdeğerdir.

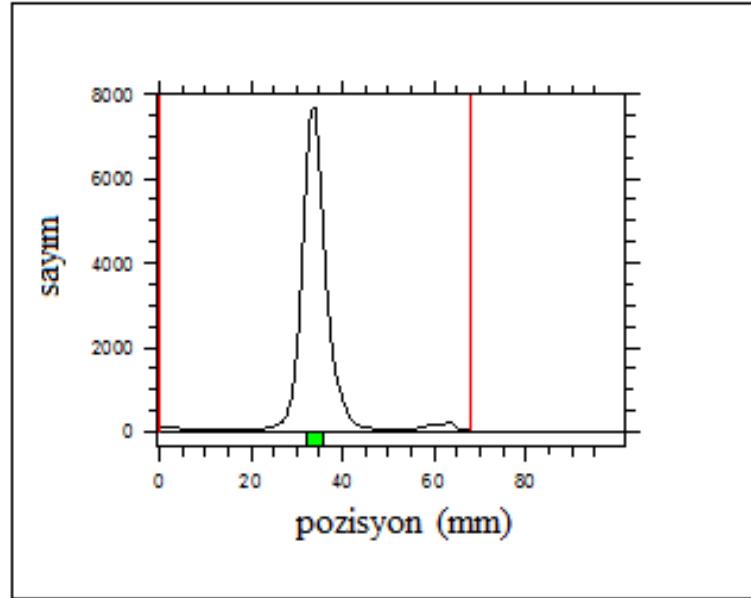
4. BULGULAR

4.1 ^{131}I -TPT'nin TLRC Yöntemi İle Elde Edilen Kalite Kontrol Sonuçlarına Yönelik Bulgular

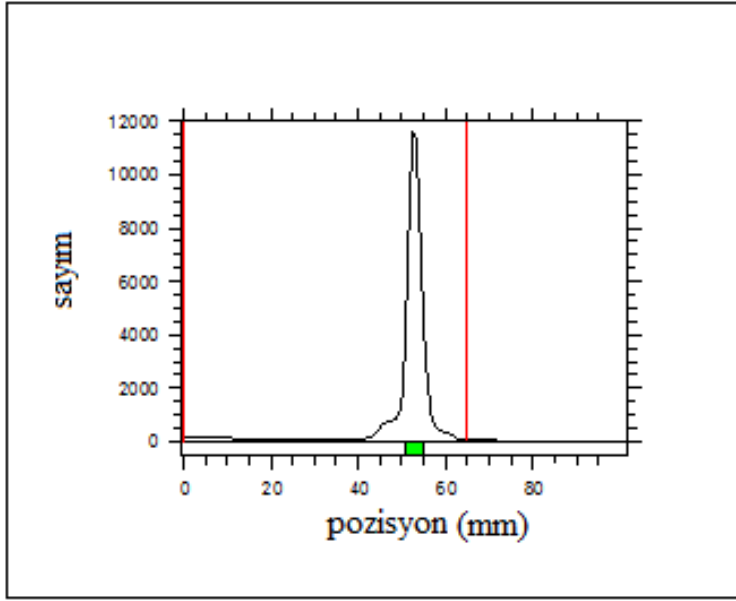
^{131}I -TPT'nin kalite kontrol sonuçlarına göre alıkonma faktörü (R_f) değerleri Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 ^{131}I ve ^{131}I -TPT'ye ait R_f değerleri.

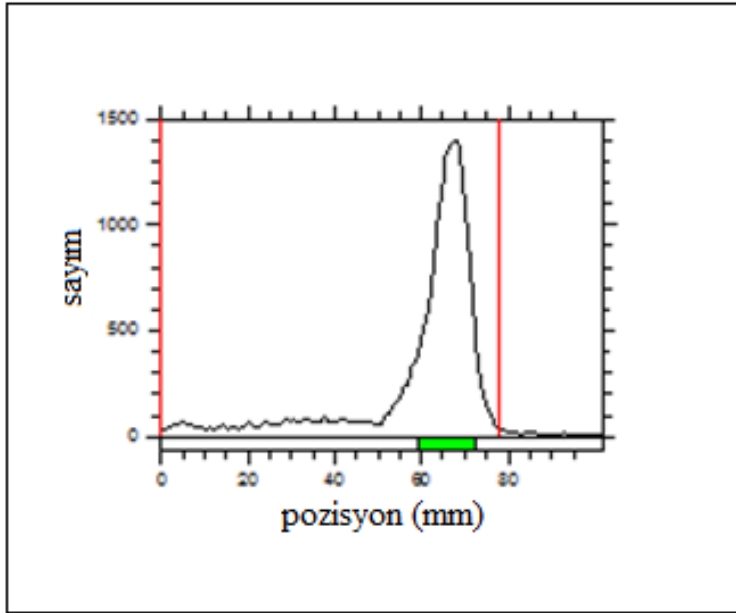
	n bütanol-su-asetik asit (4-2-1)(A banyosu)	izopropil alkol- n bütanol- 0,2N amonyum hidroksit (2-1-1) (B banyosu)
Na^{131}I	0,45	0,68
^{131}I -TPT	0,85	0,84



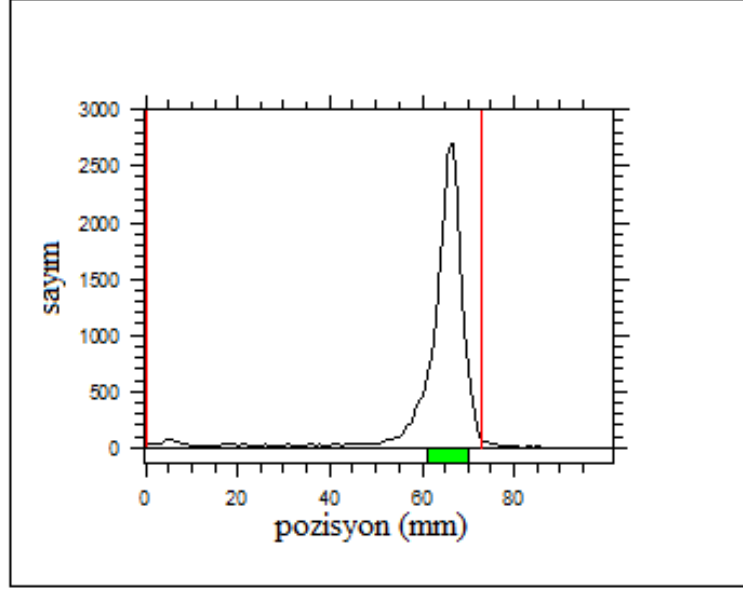
Şekil 4.1 ^{131}I 'in TLRC kromotogramı (A banyosu).



Şekil 4.2 ^{131}I 'in TLRC kromotogramı (B banyosu).



Şekil 4.3 ^{131}I -TPT'nin TLRC kromotogramı (A banyosu).



Şekil 4.4 ^{131}I -TPT'nin TLRC kromotogramı (B banyosu).

4.1.1 Elektroforez yöntemi ile elde edilen bulgular

Kağıt elektroforezi ile yapılan çalışmada ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin yükleri Çizelge 4.2'de görülmektedir.

Çizelge 4.2 ^{131}I , yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin yük dağılımı.

^{131}I	Yükseltgenmiş ^{131}I	^{131}I -TPT
Negatif	Pozitif	Nötr



Şekil 4.5 ^{131}I -TPT'nin elektrofez deneyi.

4.1.2 TPT'nin TLC sonuçlarına ait bulgular

TPT'nin TLC sonuçlarından hesaplanan Rf değerleri, Çizelge 4.3'te görülmektedir.

Çizelge 4.3 ^{131}I -TPT'nin TLRC ve TPT'nin UV ile bulunan Rf değerleri.

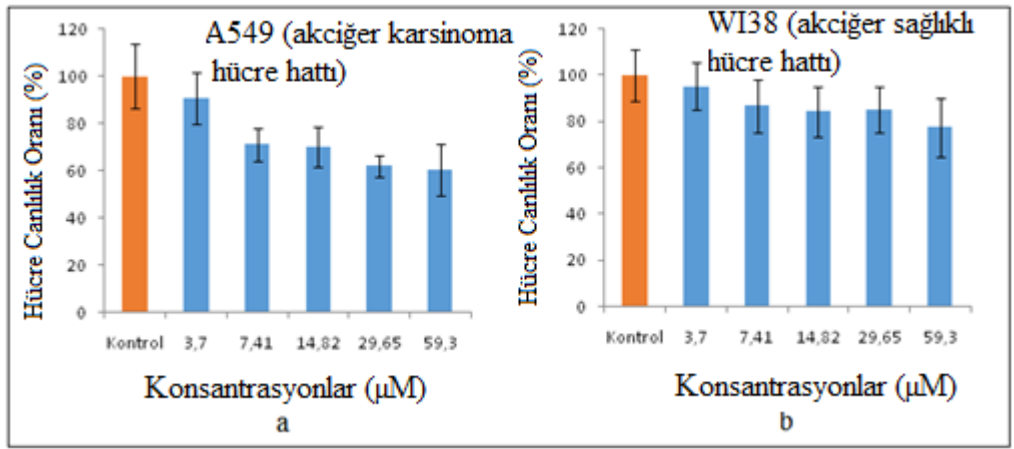
	n bütanol-su-asetik asit (4-2-1)	izopropil alkol- n bütanol- 0,2N amonyum hidroksit (2- 1-1)
^{131}I -TPT	0,85	0,84
TPT	0,86	0,84

4.2 In Vitro Çalışmalar

4.2.1 TPT toksisite çalışmasına ait bulgular

- 24 Saatlik Çalışma Sonucu

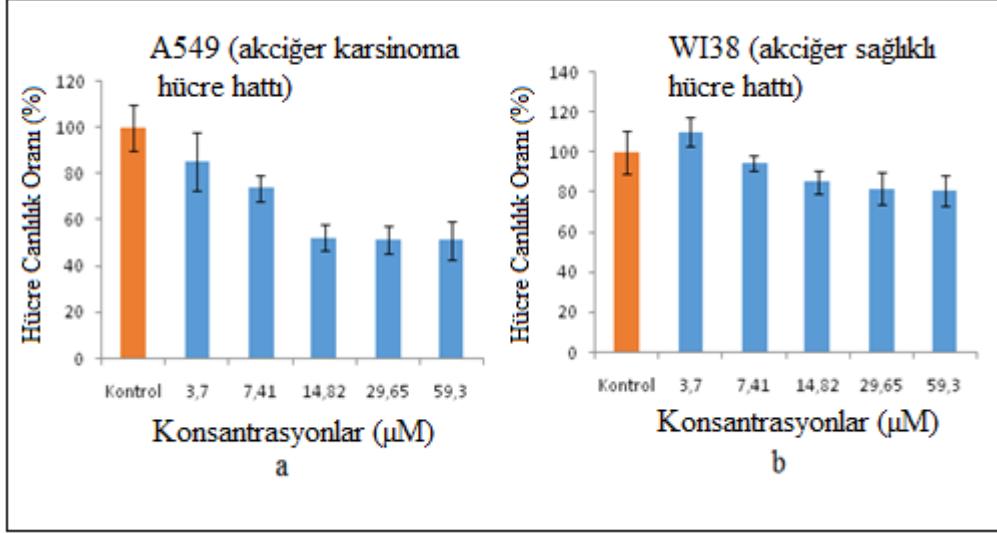
24 saat sonunda farklı konsantrasyonlara ait TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki hücre canlılık oranlarını gösteren hologramlar Şekil 4.6.'da görülmektedir.



Şekil 4.6 24 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram.

• 48 Saatlik Çalışma Sonucu

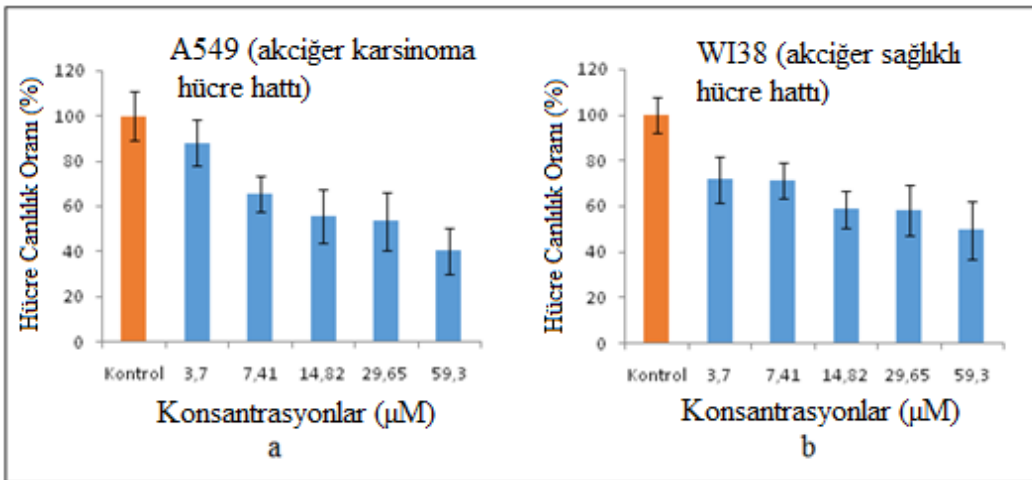
48 saat sonunda farklı konsantrasyonlara ait TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki hücre canlılık oranlarına ait hologram Şekil 4.7'de görülmektedir.



Şekil. 4.7 48 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram.

• 72 Saatlik Çalışma Sonuçları

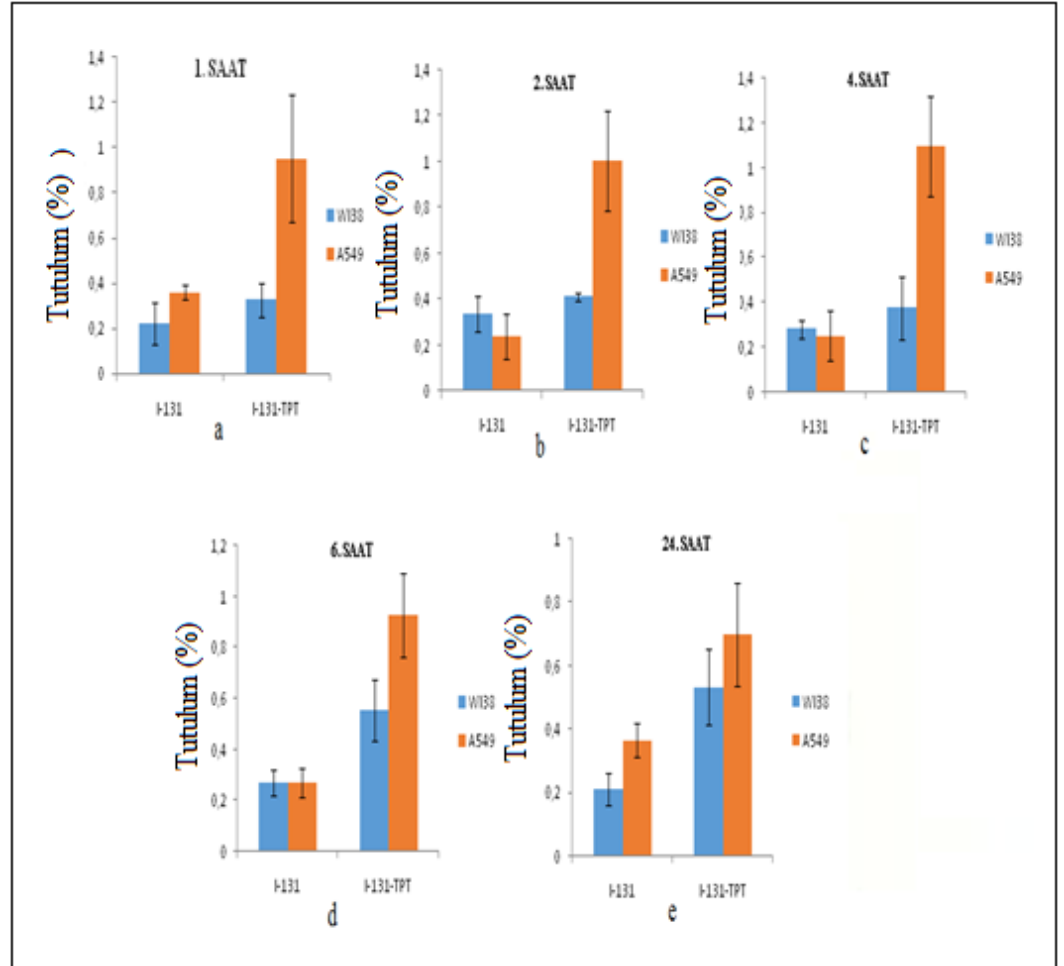
72 saat sonunda farklı konsantrasyonlara ait TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki hücre canlılık oranlarına ait hologram Şekil 4.8'de görülmektedir.



Şekil 4.8 72 saat sonunda TPT'nin a) A-549 akciğer karsinoma hücre hattı b) WI-38 akciğer sağlıklı hücre hattının toksisitesini gösteren hologram.

4.2.2 Hücre tutulum çalışmasına ait bulgular

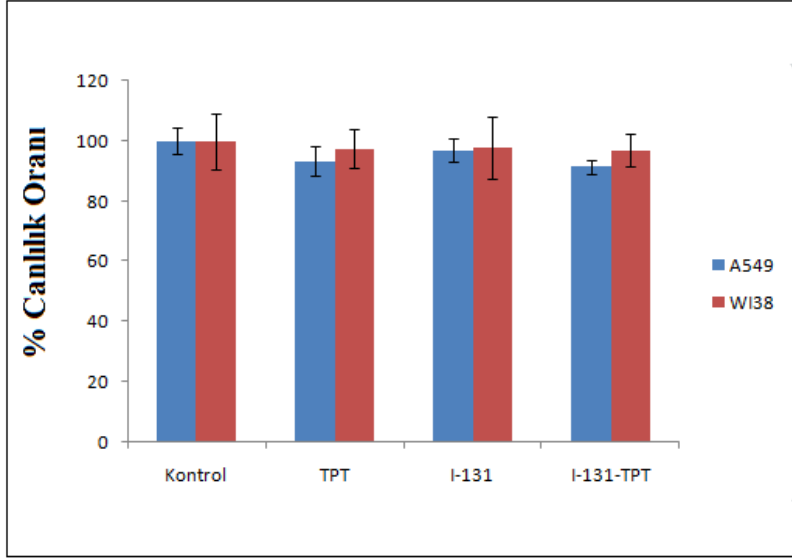
^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin 1, 2, 4, 6 ve 24 saatlik çalışma sürelerinde A-549 ve WI-38 hücre hatlarında gerçekleştirilen tutulum çalışmasının sonuçları Şekil 4.9'da görülmektedir.



Şekil 4.9 ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarında a) 1 saat, b) 2 saat, c) 4 saat, d) 6 saat, e) 24 saat sonunda hücrelerdeki tutulumları gösteren hologram.

4.2.3 TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin % hücre canlılık oranının tespiti çalışmasına ait bulgular

TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin 1 saatlik inkübasyon sonucunda, WI-38 ve A-549 hücre hatlarında % canlılık oranının tespiti Şekil 4.10'da sayısal değer olarak gösterim Çizelge 4.4'te görülmektedir.



Şekil 4.10 1 saat sonunda TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki % canlılık oranlarına ait hologramlar.

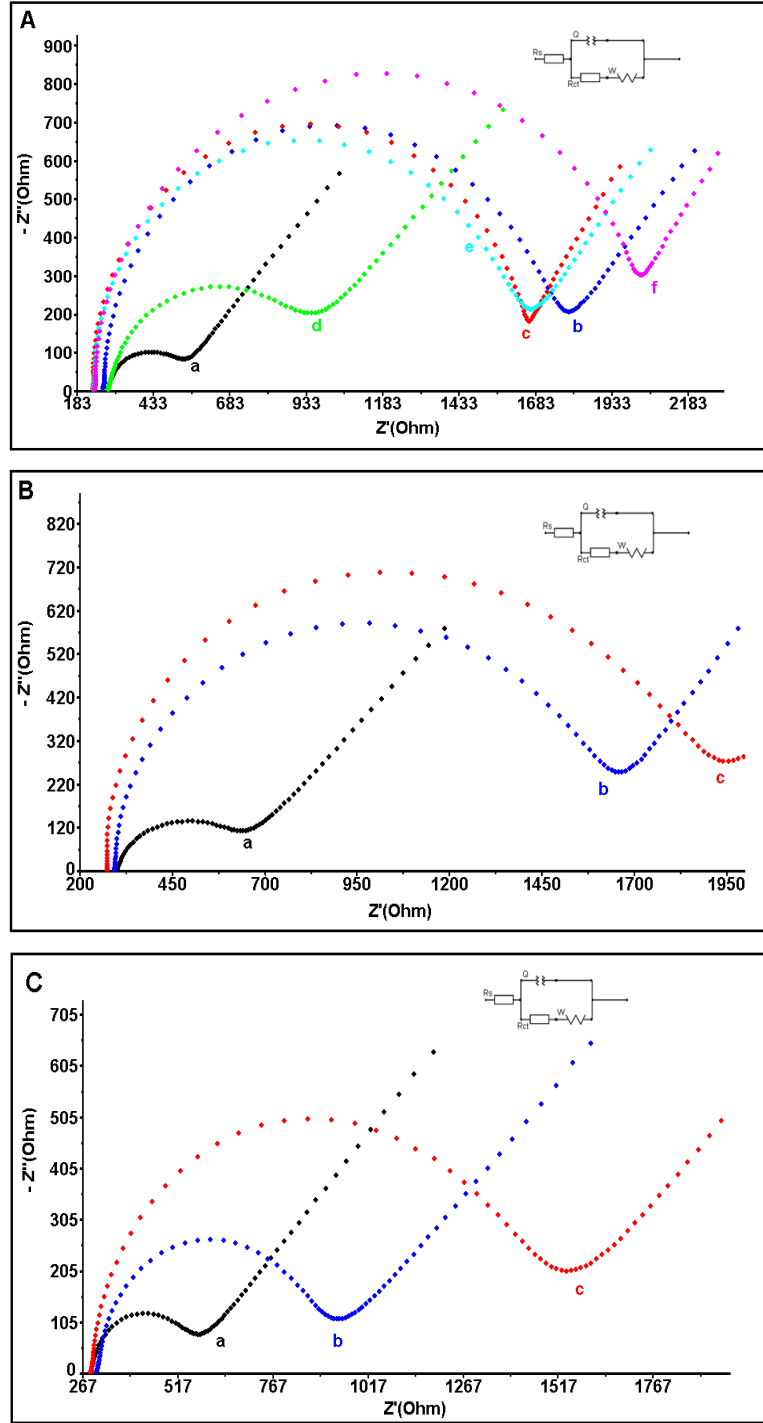
Çizelge 4.4 1 saat sonunda TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatlarındaki % canlılık oranları değerleri.

	A-549	WI-38
TPT	93,26 ± 4,9	97,4 ± 6,3
^{131}I	97,02 ± 3,69	97,88 ± 10,0
^{131}I -TPT	91,42 ± 2,32	97,04 ± 5,5

4.3 TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT Modifiye SPE Yüzeyinde Sağlıklı/Kanserli DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal Olarak İncelenmesine İlişkin Bulgular

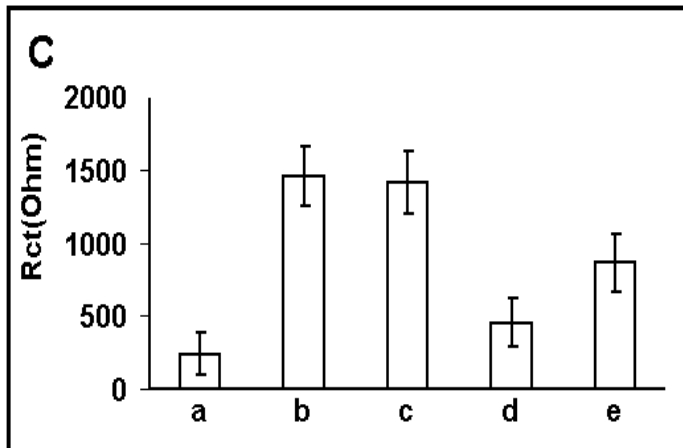
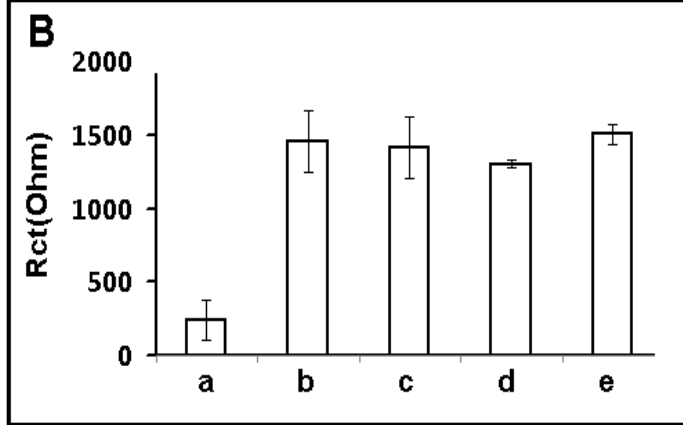
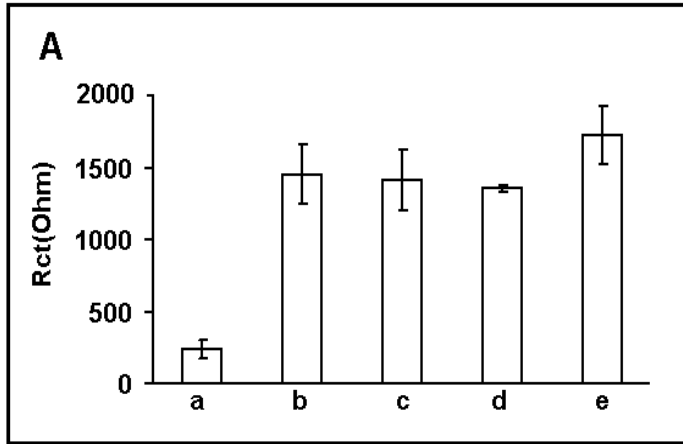
4.3.1 TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT ile etkileşmiş DNA örnekleri modifiye edilmiş SPE'nin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile incelenmesine yönelik bulgular

SPE, TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT modifiye edilmiş ve sağlıklı/kanserli DNA-TPT/ ^{131}I / ^{131}I -TPT etkileşimleri modifiye edilmiş elektrotların elektrokimyasal davranışı, empedans yöntemi kullanılarak karşılaştırıldı.



Şekil 4.11 (A) (a) SPE, 10 $\mu\text{g/mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, (d) ^{131}I -TPT (12 μCi 0,5 $\mu\text{g/mL}$) immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri, 10 $\mu\text{g/mL}$ (e) sağlıklı DNA ve (f) kanserli DNA ile ^{131}I -TPT (12 μCi 0,5 $\mu\text{g/mL}$)'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri. (B) (a) ^{131}I (12 μCi) immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g/mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA ile ^{131}I 'in (12 μCi) çözelti fazında 1 saat süreyle

etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri. (C) (a) 0,5 $\mu\text{g/mL}$ TPT immobilize edilmiş SPE, 10 $\mu\text{g/mL}$ (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA ile 0,5 $\mu\text{g/mL}$ TPT'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş Nyquist eğrileri. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) ölçümleri 2,5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) karışımı içeren 0,1 M KCl içerisinde gerçekleştirilmiştir. Nyquist eğrilerinin üzerinde görülen eşdeğer devre ise empedans verilerinin modellemesinde kullanılır. R_s çözelti direnci, Q kapasitans, R_{ct} elektrot çözelti ara yüzeyindeki elektron transfer direnci ve W elektrot yüzeyine doğru gerçekleşen kütle aktarımına bağlı olarak Warburg empedansını temsil eder.



Şekil 4.12 (A) (a) SPE, 10 µg/mL (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 µg/mL (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile ¹³¹I-TPT (12 µCi 0,5 µg/mL)'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2). (B) (a) ¹³¹I (12 µCi) immobilize edilmiş SPE, 10 µg/mL (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 µg/mL (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile ¹³¹I'un (12 µCi) çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2). (C) (a) 0,5 µg/mL TPT immobilize edilmiş SPE, 10 µg/mL (b) sağlıklı DNA ve (c) kanserli DNA immobilize edilmiş SPE, 10 µg/mL (d) sağlıklı DNA ve (e) kanserli DNA ile 0,5 µg/mL TPT'nin çözelti fazında 1 saat süreyle etkileşimi sonrasında immobilize edilmiş SPE ile elde edilmiş ortalama R_{ct} değerlerini gösteren histogram (n=2).

4.3.2 ¹³¹I-TPT'nin sağlıklı/kanserli DNA ile 1 saat süre ile etkileşiminde ölçülen Randless devre elemanlarının incelenmesine yönelik bulgular

1 saat ¹³¹I-TPT (12 µCi 0,5 µg/mL)'nin sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışmasının sonuçları Çizelge 4.5'de görülmektedir.

Çizelge 4.5 1 saat ¹³¹I-TPT (12 µCi 0,5 µg/mL) 'nin 10 µg/mL sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim sonucunda ölçülen Randless devre elemanları.

	R_{ct} (Ohm)	$W (10^{-3})$	R_s (Ohm)	$Q (\mu F)$	$Y_o n$
a) SPE	225	1,591	283	9,863	0,8602
b) Sağlıklı DNA	1414	1,488	267,7	1,712	0,9714
c) Kanserli DNA	1331	1,732	234,2	1,338	0,1 e ¹
d) ¹³¹I-TPT	618	1,195	284,4	9,624	0,8587
e) ¹³¹I-TPT+ sağlıklı DNA	1311	1,463	236,9	1,837	0,9862
f) ¹³¹I-TPT+ kanserli DNA	1656	1,512	239,2	3,148	0,9619

4.3.3 Sağlıklı/kanserli DNA- ^{131}I -TPT/ ^{131}I / TPT'nin 1 saat süreyle etkileşimlerinin sağlıklı/kanserli DNA R_{ct} değerlerine göre % değişim değerlerine ait bulgular

Sağlıklı/kanserli DNA- ^{131}I -TPT/ ^{131}I / TPT'nin 1 saat süreyle etkileşimlerinin sağlıklı/kanserli DNA R_{ct} değerlerine göre % değişim değerleri Çizelge 4.6'da görülmektedir.

Çizelge 4.6 1 saat sağlıklı/kanserli DNA- ^{131}I -TPT (sağlıklı/kanserli DNA; $10\mu\text{g/mL}$ - ^{131}I -TPT; $12\mu\text{Ci}$ $0,5\mu\text{g/mL}$) / ^{131}I ($12\mu\text{Ci}$) / TPT ($0,5\mu\text{g/mL}$) etkileşimlerinin sağlıklı/kanserli DNA R_{ct} değerlerine göre % değişim değerleri.

	1 saat etkileşim		
	^{131}I -TPT	^{131}I	TPT
Sağlıklı DNA	% 6,8 azalış	% 10,5 artış	% 69 azalış
Kanserli DNA	% 18,5 artış	% 6,4 artış	% 39 azalış

4.3.4 ^{131}I -TPT-DNA etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışmasına yönelik bulgular

^{131}I -TPT-DNA ($12\mu\text{Ci}$ $0,5\mu\text{g/mL}$, DNA: $10\mu\text{g/mL}$) etkileşiminin, 1 saat ve gece boyunca $10\mu\text{g/mL}$ sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışması sonuçları Çizelge 4.7'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.7 ^{131}I -TPT-DNA ($12\mu\text{Ci}$ $0,5\mu\text{g/mL}$, DNA: $10\mu\text{g/mL}$) etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışması sonuçları.

	1 saat	Gece boyunca
Sağlıklı DNA	% 6,8 azalış	% 16,4 azalış
Kanserli DNA	% 18,5 artış	% 16,7 artış

5. TARTIŞMA

5.1 ¹³¹I-TPT'nin TLRC Yöntemi İle Elde Edilen Kalite Kontrol Sonuçları İle İlgili Tartışma

Çizelge 4.1'de görüldüğü üzere, TLRC yönteminde A ve B banyosu kullanıldığında Na¹³¹I ve ¹³¹I-TPT R_f değerlerinin farklı olması her iki banyonun ayırt edici olduğunu göstermektedir. ¹³¹I-TPT'nin radyoışaretleme verimi % 94,1 ± 5,9 olarak bulundu.

5.1.1 Elektroforez yöntemi ile elde edilen sonuçlar ile ilgili tartışma

Çizelge 4.2.'de gösterilen elektroforez sonuçlarına göre, Na¹³¹I formunda olan ¹³¹I'un elektroforez kağıdında pozitif kutuba doğru yürümesi ¹³¹I'in yükünün (-) olduğunu göstermektedir. Yükseltgenmiş ¹³¹I'da elektroforez kağıdında negatif kutuba doğru yürüdüğü yükseltgenmiş ¹³¹I'in (+) yüklü olduğu tespit edildi. ¹³¹I-TPT ise elektroforez kağıdının uygulama noktasında kaldığı ve ¹³¹I-TPT'nin yükünün nötr olduğu tespit edildi.

5.1.2 TPT'nin TLC sonuçları ile ilgili tartışma

Bu çalışmayla bölüm 3.2.1.'deki koşullarda yapılan deney sonucunda ve UV ışık yardımıyla TPT'nin yürüdüğü yer TLC yöntemiyle R_f değerleri saptandı. Çizelge 4.3'de de görüldüğü gibi TPT'nin ve ¹³¹I-TPT'nin R_f değerlerinin paralellik gösterdiği gözlemlendi.

5.2 In Vitro Çalışmaların Sonuçları İle İlgili Tartışma

5.2.1 Toksikite çalışma sonuçları ile ilgili tartışma

Toksikite çalışmasındaki amacımız hücrelerinin canlılık oranının %50'ye düşürdüğü TPT dozunu (IC₅₀) tespit etmektir. 24 ve 48 saatlik çalışma sonucunda IC₅₀ gözlemlenemedi. 72 saatlik çalışma sonuçlarında A-549 hücre

hattı için IC_{50} değeri 14,82 μM ve WI-38 hücre hattı için IC_{50} değeri 59,3 μM olarak belirlendi.

5.2.2 Tutulum çalışması sonuçları ile ilgili tartışma

Tutulum çalışmaları; TPT için belirlenen IC_{50} değerinin altındaki konsantrasyonda (10 μM) gerçekleştirildi. Bu deneyde ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin A-549 ve WI-38 hücrelerindeki tutulumlar incelendi. 1 saat inkübasyon süresi sonunda WI-38 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,32 \pm 0,07$ iken A-549 hücre hattında ise ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,95 \pm 0,27$ dir. 2 saat sonunda ise elde edilen sonuçlar: WI-38 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,40 \pm 0,019$ ve A-549 hücre hattında da ^{131}I -TPT tutulum değeri $1,0 \pm 0,21$ olduğu görüldü. 4. saat sonuçlarına göre de WI-38 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,37 \pm 0,14$ iken A-549 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değerinin $1,09 \pm 0,22$ ve 6. saat sonuçlarında ise WI-38 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değerinin $0,55 \pm 0,10$ ve A-549 hücre hattında ise ^{131}I -TPT tutulum değerinin $0,93 \pm 0,06$ olduğu tespit edildi. 24. saat sonuçlarına göre de WI-38 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,53 \pm 0,11$, A-549 hücre hattında ^{131}I -TPT tutulum değeri $0,70 \pm 0,16$ olarak belirlendi. Her iki hücre hattında da ^{131}I 'in tutulumunun ^{131}I -TPT tutulumlarına göre düşük olduğu görüldü.

1. 2. ve 4. saatlerde WI-38 hücredeki ^{131}I -TPT tutulum değerlerinin birbirine yakın olduğu ve 6. saatteki tutulum değeri arttığı ve 24. saatte de hemen hemen aynı kaldı gözlemlendi.

A-549 hücre hattında ise ^{131}I -TPT tutulum değerlerinin birbirine yakın olmakla birlikte maksimum tutulum 4. Saat sonunda elde edildi. 6. saatten sonra ise tutulumun düştüğü gözlemlendi. Bunun nedeni; hücre ortamında ^{131}I -TPT bozulması ve TPT'nin ^{131}I 'dan ayrılması olabilir.

^{131}I -TPT'nin kanserli hücre hattındaki tutulumun sağlıklı hücreye göre fazla olması radyoışaretli ilacın kanserli hücreler için spesifik olduğunun göstergesidir. Buna göre 1 saat sonucunda elde edilen tutulum sonuçlarının en uygun olduğu belirlendi.

5.2.3 TPT, ^{131}I ve ^{131}I -TPT'nin % hücre canlılık oranının tespiti çalışması sonuçları ile ilgili tartışma

Canlılık oranının tespiti çalışmasında kontrol grup olarak PBS (NaCl içermeyen)'nin değerini % 100 olarak kabul edilip, ^{131}I 'in, TPT'nin ve ^{131}I -TPT'nin hücrelere verdiği hasarı belirlemek üzere % canlılık oranını tespit edildi. Çizelge 4.4'de görüldüğü gibi A-549 hücrelerine TPT, ^{131}I , ^{131}I -TPT etkileşimi sonunda gözlenen % canlılık oranları sırasıyla, % $93,26 \pm 4,9$, $97,02 \pm 3,69$, $91,42 \pm 2,32$ 'dir. Bu canlılık oranları birbirleri ile karşılaştırıldığında belirgin bir fark görülmedi. 1 saatlik süre radyoimmünoterapi için kısa bir süre olması sebebiyle aradaki fark belirgin değildir. Canlılık oranındaki etkinin yüksek olabilmesi için ^{131}I 'un aktivitesini artırılması ve etkileşim süresini uzatılması gerekir (Press et al., 1996). Bu bölümde elde edilen sonuçlar ile tutulum deneyinde elde edilen sonuçlarla uyum içinde olduğu görülmektedir.

WI-38 hücre hattındaki TPT, ^{131}I , ^{131}I -TPT'de gözlenen % canlılık oranları sırasıyla, $97,4 \pm 6,3$, $97,88 \pm 10$, $97,04 \pm 5,5$ olarak bulundu. WI-38 sağlıklı hücre hattında TPT, ^{131}I , ^{131}I -TPT'nin değerleri birbirine benzer olup sağlıklı DNA'ya etkisinin az olduğu gözlemlendi. Bu değerlerin tutulum değerleri ile bir paralellik gösterdiği gözlemlendi.

Literatürde yapılan bir çalışmada, farklı konsantrasyonlardaki bakuchiol bileşiği ve ^{125}I -bakuchiol'un LS-A (lemfosarkoma) ve barcl-95 (radyasyona bağlı timik lenfoma) hücrelerinde % canlılık oranı tespit edilmiştir. ^{125}I 'de bulunan Auger elektronlarının, düşük enerjiye sahip olması ve kısa mesafede etki göstermesi nedeniyle ^{125}I -bakuchiol'un bakuchiol'a göre kanser hücrelerine verdiği zarar daha fazla olup canlılık oranını düşürdüğü gözlemlenmiştir (Bapat et al., 2005).

Sonuçlardan da görüldüğü gibi ^{131}I -TPT'nin A-549 hücredeki tutulumun yüksek olması bu kanser türü için spesifik olduğunun göstergesidir. TPT Auger elektron (^{125}I) ve β salınımı (^{131}I) yapan iyotları ile işaretlendiğinde terapi ve ^{123}I (E.C elektron yakalaması, SPECT görüntüleme), ^{124}I (β salınımı, PET görüntüleme) v.b. radyoiodotlarla işaretlendiğinde görüntüleme için kullanılabilir.

Sonuç olarak TPT amaca uygun olarak radyoizotopu ile işaretlendiği takdirde terapi ve/veya görüntüleme için kullanılabilir.

5.3 TPT/ ¹³¹I / ¹³¹I-TPT Modifiye SPE Yüzeyinde Sağlıklı/Kanserli DNA Etkileşiminin Elektrokimyasal İncelenmesine Yönelik Bulgularla İlgili Tartışma

5.3.1 TPT/ ¹³¹I/ ¹³¹I-TPT ile etkileşmiş DNA örnekleri modifiye edilmiş SPE'nin elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) tekniği ile incelenmesine yönelik bulgular ile ilgili tartışma

¹³¹I-TPT/ ¹³¹I/ TPT ile sağlıklı/kanserli DNA'nın 1 saat etkileşimine ait örneklerin SPE yüzeyinde ölçülmesi sonucunda elde edilen Nyquist eğrisi, Şekil 4.11'de gösterildi. Etkileşim öncesi ve sonrasında SPE yüzeyine modifiye edilen örneğe ait ölçülen R_{ct} değerlerindeki değişime göre değerlendirme Şekil 4.11 ve Çizelge 4.6'ya göre yapıldı.

¹³¹I-TPT'nin sağlıklı DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri, sağlıklı DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre % 6,8 azalışa, ¹³¹I-TPT'nin kanserli DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri, kanserli DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre %18,5 artışa neden olmuştur. Bu artışın sebebi, çift sarmal DNA'nın yapısındaki negatif yüklü fosfat grupları ile anyonik karakterli redoks probunun arasındaki itme kuvvetine bağlı direncin artmasıdır (Erdem ve Congur, 2013).

¹³¹I'un sağlıklı DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri, sağlıklı DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre % 10,5 artışa, ¹³¹I'in kanserli-DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri, kanserli DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre % 6,4 artışa neden olmuştur. Bu artışın sebebi, ¹³¹I-DNA etkileşimi sonrasında, negatif yüklü ¹³¹I'in DNA'nın yapısına verdiği hasarın artması ve

elektrot yüzeyinde negatif yüklü yapının da artmasına bağlı olarak direncin artmasıdır.

TPT'nin sağlıklı DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri, sağlıklı DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre % 69 azalışa, TPT'nin kanserli-DNA ile etkileşimi sonrasında SPE yüzeyinde immobilizasyonu sonrasında elde edilen R_{ct} değeri kanserli DNA ile yapılan kontrol deneyinde elde edilen R_{ct} değerine göre % 39 azalışa neden olmuştur. Bu azalışın sebebi, TPT'nin katyonik yapısı nedeniyle negatif yüklü DNA ile etkileşimi sonrasında yüzeydeki negativitenin azalması ve buna bağlı olarak anyonik karakterli redoks probu ile arasındaki itme kuvvetinin azalarak direncin azalmasıdır. TPT'nin çift sarmal DNA ile etkileşim DNA'da zincir kırılmalarına neden olması sonucunda ilaç-DNA etkileşim sonrasında R_{ct} değerinde azalış tespit edildiği karbon nanotüp modifiye tek kullanımlık kalem grafit elektrot ile gösterilmiştir (Congur vd., 2015a; 2015b).

Elde edilen sonuçlar, biyomoleküler etkileşimin empedimetrik analizine yönelik literatürde mevcut diğer çalışmaların (Erdem vd., 2008,2012; Eksin vd., 2013,2014; Erdem ve Congur,2013) sonuçlarına da paralellik göstermektedir.

$^{131}\text{I-TPT}/^{131}\text{I}$ TPT ile sağlıklı/kanserli DNA'nın 1 saat etkileşimine ait örneklerde SPE yüzeyinde elde edilen sonuçlara ait histogramlar Şekil 4.12'de gösterildi ve etkileşim öncesi ve sonrasında ölçülen R_{ct} değerlerine göre değerlendirme yapıldı.

Şekil 4.12 A'da; SPE, 10 $\mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA immobilize edilmiş SPE ve 10 $\mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA ile $^{131}\text{I-TPT}$ (0,5 $\mu\text{g/mL}$ -12 μCi)'nin çözelti fazında 1 saat etkileşim sonrasında ölçülen ortalama R_{ct} değerleri sırasıyla, $243 \pm 46,2$ Ohm, $1442 \pm 206,7$ Ohm, 1428 ± 183 , 1 Ohm, $1339 \pm 21,9$ Ohm, $1866 \pm 199,4$ Ohm olarak (n=2) saptandı.

Şekil 4.12 B'de; SPE, 10 $\mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA immobilize edilmiş SPE ve 10 $\mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA ile 12 μCi ^{131}I 'in çözelti fazında 1 saat etkileşim sonrasında ölçülen ortalama R_{ct} değerleri sırasıyla, $243 \pm$

46,2 Ohm, $1442 \pm 206,7$ Ohm, $1428 \pm 183,1$ Ohm, 1281 ± 29 Ohm, $1457 \pm 65,8$ Ohm olarak ($n=2$) saptandı.

Şekil 4.12 C'de; SPE, $10 \mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA immobilize edilmiş SPE ve $10 \mu\text{g/mL}$ sağlıklı ve kanserli DNA ile $0,5 \mu\text{g/mL}$ TPT'nin çözelti fazında 1 saat etkileşim sonrasında ölçülen ortalama R_{ct} değerleri sırasıyla, $243 \pm 46,2$ Ohm, $1442 \pm 206,7$ Ohm, $1428 \pm 183,1$ Ohm, $569 \pm 166,9$ Ohm, $1002 \pm 197,3$ Ohm olarak ($n=2$) saptandı.

5.3.2 ^{131}I -TPT'nin sağlıklı/kanserli DNA ile 1 saat süre ile etkileşiminde ölçülen Randless devre elemanlarının incelenmesine yönelik bulgularla ilgili tartışma

Sağlıklı/kanserli DNA, ^{131}I -TPT ve sağlıklı/kanserli DNA- ^{131}I -TPT etkileşimine bağlı olarak SPE yüzeyinde elektron transfer mekanizması hakkında bilgi edinebilmek için, elektrot yüzeyinde transfer edilen elektrona karşı oluşan dirençteki değişim (R_{ct}), çözeltinin direncini (R_1), sabit faz elementini (Q_1), elektrot yüzeyindeki kütle transferinden kaynaklanan Warburg empedansı (W) elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS) yöntemiyle ölçüldü. R_s çözelti direnci, Q kapasitans, R_{ct} elektrot çözelti ara yüzeyindeki elektron transfer direnci ve W elektrot yüzeyine doğru gerçekleşen kütle aktarımına bağlı olarak Warburg empedansını temsil eder.

^{131}I -TPT'nin sağlıklı DNA ile etkileşimi sonucunda R_{ct} değeri 1311 Ohm olarak bulundu. ^{131}I -TPT'nin kanserli DNA ile etkileşimi sonucunda R_{ct} değeri 1656 Ohm bulundu.

5.3.3 ^{131}I -TPT-DNA etkileşiminin 1 saat ve gece boyunca sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışmasına yönelik bulgularla ilgili tartışma

^{131}I -TPT-DNA ($12 \mu\text{Ci}$ $0,5 \mu\text{g/mL}$, DNA: $10 \mu\text{g/mL}$) etkileşiminin $10 \mu\text{g/mL}$ sağlıklı/kanserli DNA ile etkileşim çalışması 1 saat ve gece boyunca yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de gösterildi.

^{131}I -TPT, sağlıklı DNA ile gece boyunca etkileşimi sonrasında, DNA ile daha fazla etkileşirken, 1 saatlik etkileşim sonrasında sonuçlarda daha az bir azalış saptandı.

^{131}I -TPT'nin kanserli DNA 1 saat ve gece boyunca etkileşim sonrasında elde edilen sonuçların birbirine yakın olduğu gözlendi. ^{131}I -TPT'nin kanserli DNA'ya kıyasla, sağlıklı DNA'ya daha az etkileşmesi ve dolayısıyla daha az hasar vermesi kemoterapötik tedavilerde istenen bir durumdur. Dolayısıyla çalışmamızda 1 saatlik etkileşim süresi, ^{131}I -TPT'nin DNA etkileşimi için optimum süre olarak belirlendi.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Çalışmamızın ilk bölümünde bir antikanser ilacı olan Topotekan (TPT) ^{131}I radyoizotopu ile iodogen metoduna göre yüksek verimle ($\%94,1 \pm 5,9$) işaretlendi. TPT'nin A-549 ve WI-38 hücre hatları kullanılarak yapılan toksisite çalışması sonucunda IC_{50} konsantrasyonu A-549 hücre hattı için $14,82\mu\text{M}$ ve WI-38 hücre hattı için $59,3\mu\text{M}$ olarak bulundu.

Kanserli ve sağlıklı hücre hatlarında sitotoksite dozu saptanılmasından sonra ^{131}I -TPT'nin bu hücre hatlarında tutulum potansiyelleri incelendi. ^{131}I -TPT kanserli hücredeki tutulumunun sağlıklı hücre hattındakine göre daha fazla olduğu saptandı. Bu tutulumun yüksek olması bu hücre için radyoışaretli bileşiğin spesifik olduğunu akciğer kanser teşhisinde nükleer görüntüleme ajanı olarak kullanılabilmesinin göstergesidir. Sağlıklı hücrede tutulumun düşük olması görüntüleme sırasında görüntü kalitesinin artmasını sağladığı gibi sağlıklı dokulara radyoışaretli bileşiğin hasar etkisi minimize edilecektir.

Tek kullanımlık perde baskılı elektrot (SPE) kullanılarak yapılan çalışmamızda hızlı, seçimli, hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar elde ederek radyoışaretli ilaç-DNA etkileşiminin tayinine yönelik elektrokimyasal analizlerin yapılabileceği gösterildi.

^{131}I -TPT'nin sağlıklı DNA ile 1 saat süreyle etkileşimi sonucunda R_{ct} değeri 1311 Ohm ve kanserli DNA ile etkileşimi sonucunda R_{ct} değeri 1656 Ohm bulundu. Dolayısıyla ^{131}I -TPT'nin kanserli DNA ile daha etkin bir şekilde etkileştiği görüldü. Geliştirilen radyoışaretli yeni molekülün kanserli DNA'ya kıyasla, sağlıklı DNA'yla daha az etkileşmesi ve dolayısıyla daha az hasar vermesi antikanser özellikli ilaçlarla tedavilerde istenen bir durumdur. ^{131}I -TPT, sağlıklı DNA ve kanserli DNA ile 1 saatlik etkileşim sonrasında elde edilen R_{ct} değerlerine bakıldığı zamanda, sırasıyla, sağlıklı DNA ile $\% 6,8$ oranında bir azalış ve kanserli DNA ile $\% 18,5$ oranında bir artışın olduğu görüldü. Hem iyodun radyoizotopik etkisi, hemde TPT'nin kemoterapötik etkisi nedeniyle ^{131}I -TPT'nin kanserli DNA ile etkileşimi daha etkin bir şekilde gerçekleşmekte ve buna bağlı olarak R_{ct} değerinde bir artışa sebep olmaktadır.

^{131}I -TPT, ^{131}I ve TPT'nin kanser ve sağlıklı hücreler üzerinde yapılan % canlılık çalışmasında ise 1 saatlik sonuçlar karşılaştırıldığında ^{131}I -TPT'nin % canlılık oranının etkisinde belirgin bir fark olmadığı görüldü. ^{131}I -TPT, ^{131}I ve TPT'nin sağlıklı hücre ile yapılan canlılık çalışmasında etkinin hepsi için düşük olduğu gözlenmiş olup bu sonuçlar hücre tutulum deney sonuçlarını destekler durumdadır. Sonuçlardan da görüldüğü gibi ^{131}I -TPT'nin A-549 hücredeki tutulumun yüksek olması bu kanser türü için spesifik olduğunun göstergesidir. TPT Auger elektronu (^{125}I) ve β^- salınımı (^{131}I) yapan iyotlar ile işaretlendiğinde terapi ve ^{123}I (E.C elektron yakalaması, SPECT görüntüleme), ^{124}I (β^+ salınımı, PET görüntüleme) v.b. radyoiyotla işaretlendiğinde görüntüleme için kullanılabilir. Yukarıda bahsedildiği gibi uygun bir radyoiyot ile işaretlendiği takdirde terapi ve/veya görüntüleme için kullanılabilir.

Tez çalışmamızda, Topotekan ^{131}I ile yüksek verimde işaretlenerek akciğer kanser hücresinde tutulum düzeyleri saptandı ve DNA ile etkileşimi tek kullanımlık elektrokimyasal sensörlerle incelendi. Sonuç olarak, ^{131}I -TPT'nin yeni bir akciğer kanseri için nükleer görüntüleme ajanı olarak kazandırılması açısından ümit verici olduğu görüldü.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aprahamian, M., Evrard, S., Keller, P., Tsuji, M., Balboni, G., Damge, C. and Marescaux, J.**, 1993, Distribution of Pheophorbide A in Normal Tissues and in an Experimental Pancreatic Cancer in Rats. *Anti-Cancer Drug Design* 8:101-114pp.
- Ashrafi, S.A., Hosseinimehr, S.J., Varmira, K. and Abedi, S.M.**, 2012, Radioimmunotherapy with ¹³¹I-Bevacizumab as a specific molecule for cells with overexpression of the vascular endothelial growth factor. *Cancer and Radiopharmaceuticals*, 27(7):420-425pp.
- Bapat, K., Chintalwar, G.J., Pandey, U., Thakur, V.S., Sarma, H.D., Samuel, G., Pillai M.R.A., Chattopadhyay, S. and Venkatesh, M.**, 2005, Preparation and in vitro evaluation of radioiodinated bakuchiol as an anti tumor agent. *Applied Radiation and Isotopes* 62:389–393pp.
- Bian, H., Zheng, J.S., Nan, G., Li, R., Chen, C., Hu, C.X., Zhang, Y., Sun, B., Wang, X.L., Cui, S.C., Wu, J., Xu, J., Wei, D., Zhang, X., Liu, H., Yang, W., Ding, Y., Li, J. and Chen, Z.N.**, 2014, Randomized trial of [¹³¹I] metuximab in treatment of hepatocellular carcinoma after percutaneous radiofrequency ablation, *Natl Cancer Inst* 10:106(9)p.
- Brett, A.M.O., Serrano, S.H.P., Gutz, I., La-Scalea, M.A. and Cruz, M.L.**, 1997, Voltammetric behaviour of nitroimidazoles at a DNA biosensor, *Electroanalysis*, 9:1132-1137pp.
- Butler, J.M.**, 2001, Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers, 14-15pp.
- Cai, X., Rivas, G., Farias, P.A.M., Shiraishi, H., Wang, J. and Palecek, E.** 1996, Evulation of Different Carbon Electrodes for Adsorptive Stripping Analysis of Nucleic acids, *Electroanalysis*, (8-9):753-758pp.
- Caliskan, A., Erdem, A. ve Karadeniz, H.**, 2009, Direct DNA Hybridization on the Single-Walled Carbon Nanotubes Modified Sensors Detected by Voltammetry and Electrochemical Impedance Spectroscopy, *Electroanalysis*, 21:2116-2124s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chambers, J.P., Arulanandam, B.P., Matta L.L., Weis. A. and Valdes J.J.,** 2008, Biosensor recognition elements. *Curr Issues Mol Biol*, 10(1-2):1- 12pp.
- Chang, H. and Li, J.,** 2009, Electrochemical impedance probing of transcriptional TATA binding protein based on TATA box site-specific binding, 11:2101-2104pp.
- Congur, G., Erdem A. ve Mese, F.** 2015, Electrochemical investigation of the interaction between topotecan and DNA at disposable graphite electrodes; 102: 21-28s.
- Demir, M.,** Nükleer tıp fiziği ve klinik uygulamaları üçüncü baskı, 276-267s.
- Dervan, P.B.,** 1986, Design of Sequence-Specific DNA-Binding Molecules, *Science*, 232:464-471s.
- Dervan, P.B.,** 1988, Sequence Specific Recognition of Double Helical DNA. A Synthetic Approach, *Nucleic Acids and Molecular Biology*, Vol.2: Ed. Eckstein, F. And Lilley, D.M.J., *Springer-Verlag, Berlin*, 49-64s.
- Eksin, E., Congur, G., Mese, F. ve Erdem, A.,** 2014, Electrochemical monitoring of surface confined interaction between 6-Thioguanine and DNA by using single-use graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 733:33–38s.
- Eksin, E., Muti, M. ve Erdem, A.,** 2013, Chitosan/Ionic Liquid Composite Electrode for Electrochemical Monitoring of the Surface-Confined Interaction Between Mitomycin C and DNA, *Electroanal.*, 25:2321-2329s.
- Enginar, H., Ünak, P., Yurt Lambrecht, F., Biber Müftüler F.Z., Medine E.İ., Yolcular, S., Yurt, A., Seyitoğlu, B. ve Bulduk, İ.,** 2009, Radiolabeling of Codeine with ¹³¹I and Biodistribution in Rats, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 280, 2, 367-374s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A.**, 2007, Chapter 19: Genosensor technology for electrochemical sensing of nucleic acids by using different transducer, *Comprehensive Analytical Chemistry* book “Electrochemical Sensor Analysis”, Ed. S. Alegret and A. Merkoci, Vol. 49, Elsevier, 403-411s.
- Erdem, A.**, 2007, A review: Nanomaterial based electrochemical DNA sensing strategies, *Talanta*, 74:318–325s.
- Erdem, A. ve Congur, G.**, 2013, Impedimetric detection of in situ interaction between anti-cancer drug bleomycin and DNA, *International Journal of Biological Macromolecules* 61:295–301s.
- Erdem, A. ve Congur, G.**, 2014, Dendrimer enriched single-use aptasensor for impedimetric detection of activated protein C, *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 117:338-345s.
- Erdem, A., Congur, G. ve Eksin, E.**, 2013, Multi channel screen printed array of electrodes for enzyme-linked voltammetric detection of MicroRNAs; 188:1089–1095s.
- Erdem, A., Karadeniz, H. ve Caliskan, A.**, 2008, Single-Walled Carbon Nanotubes Modified Graphite Electrodes for Electrochemical Monitoring of Nucleic Acids and Biomolecular Interactions; 464-471s.
- Erdem, A., Karadeniz, H., Canavar, P.E. ve Congur, G.**, 2012, Single-Use Sensor Platforms Based on Carbon Nanotubes for Electrochemical Detection of DNA Hybridization Related to Microcystis, *Electroanalysis*, 24 (3):502-511p.
- Erdem, A., Muti, M., Papakonstantinou, P., Canavar, E., Karadeniz, H., Congur, G. and Sharma, S.**, 2012, Grapheneoxide integrated sensor for electrochemical monitoring of mitomycin C–DNA interaction, *Analyst*, 137:2129-2135p (c).
- Erdem, A. ve Ozsoz, M.**, 2002, A review: Electrochemical DNA biosensors based on DNA-drug interactions, *Electroanal*, 14: 965-974s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Erdem, A. ve Ozsoz, M.**, 2011, in Chapter 2: Nucleic Acids as Biorecognition Element in Biosensor Development, Nucleic Acid Biosensors for Environmental Pollution Monitoring, Ed. By Ilaria Palchetti and Marco Mascini, Royal Society of Chemistry (UK), 17-33s.
- Evans, A.**, 1991, Potentiometry and ISE, ACOL, London, 106-198pp.
- Fanjul-Bolado, P., Quepio, P., Lamas-Ardisana, P.J. and Costa-Garcia, A.**, 2007, Manufacture and Evaluation of Carbon Nanotube Modified Screen-Printed Electrodes as Electrochemical Tools, *Talanta*, 74: 427-433p.
- Gooding, J.J.**, 2006, Biosensor Technology for Detecting Biological Warfare Agents: Recent Progress and Future Trends, *Anal. Chim. Acta*, 559: 137-151p.
- Gregory, S.**, 2006, The DNA Sequence and Biological Annotation of Human Chromosome 1, *Nature*, 441 (7091): 315-321pp.
- Guo, X., Song, Z., Sun, J. and Song, J.**, 2011, Interaction of calf thymus dsDNA with anti-tumor drug tamoxifen studied by zero current potentiometry, *Biosensors and Bioelectronics*, 26: 4001-4005pp.
- Hall, E.A.H.**, 1990, Biosensors, Ch.1: Biosensors in Context, Open University Press, England; p. 30p.
- Havran, L., Vacek J. and Fojta, M.**, 2009, The Reduction of Doxorubicin at a Mercury Electrode and Monitoring Its Interaction with DNA Using Constant Current Chronopotentiometry, *Collection of Czechoslovak Chemical Communications* 74(11-12): 1727-1738pp.
- Herben, V.M., Ten Bokkel Huinink, W.W. and Beijnen, H.J.**, 1996, Clinical pharmacokinetics of Topotecan, 31(2): 85-102pp.
- Hickling, A.**, 1942, "Studies in electrode polarisation. Part IV.-The automatic control of the potential of a working electrode". *Transactions of the Faraday Society* 38: 27-33pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Karadeniz, H., Armagan, G., Erdem, A., Turunc, E., Caliskan, A., Kanit, L. ve Yalcin, A.,** 2009, The Comparison of Electrochemical Assay and Agarose Gel Electrophoresis for the Determination of DNA Damage Induced by Kainic Acid, *Electroanalysis*, 21: 2468-2476s.
- Karadeniz, H., Erdem, A. ve Caliskan, A.,** 2008, Electrochemical Monitoring of DNA Hybridization by Multiwalled Carbon Nanotube Based Screen Printed Electrodes, *Electroanalysis*, 20: 1932-1938s.
- Karadeniz, H., Gulmez, B., Sahinci, F., Erdem, A., Irem Kaya, G., Unver, N., Kivcak, B. ve Ozsoz, M.,** 2003, Disposable Electrochemical Biosensor for the Detection of the Interaction between DNA and Lycorine Based on Guanine and Adenine Signals, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 33: 295-302s.
- Kowalsky, R.J. and Perry, J.R.,** 1987, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice*; 90p.
- Kuralay, F., Demirci, S., Kiristi, M., Oksuz, L. ve Oksuz, A.U.,** 2014, Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) coated chitosan modified disposable electrodes for DNA and DNA–drug interaction sensing; 123: 825-830s.
- Kurbanoglu, S., Mayorga-Martinez, C. C., Sanchez, M. M., Rivas, L., Ozkan, S.A. and Merkoçi, A.,** 2015, Antithyroid drug detection using an enzyme cascade blocking in a nanoparticle-based lab-on-a-chip system; 67: 670-676s.
- Levine, E.G., Cirrincione, C.T. Szatrowski, T.P., Canellos, G., Norton, L. and Henderson, I. C.,** 1999, Phase II trial of topotecan in advanced breast cancer: a cancer and leukemia group B study, *Am J Clin Oncol*, 22(3): 218–222pp.
- Li, C.Z., Liu, Y. and Luong, J.H.,** 2005, Impedance sensing of DNA binding drugs using gold substrates modified with gold nanoparticles, *Anal Chem.* 15;77(2): 478-85pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Liu, X., Feng, Y., Jiang, C., Lou, B., Li, Y., Liu, W., Yao, N., Gao, M., Ji, Y., Wang, Q., Huang, D., Yin, Z., Sun, Z., Ni, Y. and Zhang, J.,** 2015, Radiopharmaceutical evaluation of ¹³¹I-protohypericin as a necrosis avid compound, *Journal of Drug Targeting*, 6: 1-10pp.
- Macdonald, J.R.,** 1992, Impedance Spectroscopy, *Annals of Biomedical Engineering*, 20: 289-305pp.
- Mandelkern, M., Elias, J., Eden, D. and Crothers, D.,** 1981, The Dimensions of DNA in Solution, *J. Mol. Biol.* 152 (1): 153-161pp.
- Monk, P.,** 2002, *Fundamentals of electroanalytical chemistry*, Willey & Sons, England, 14p.
- Ocakoglu, K., Er, Ö., Yurt Lambrecht, F., Yılmaz Süslüer, S., Kayabasi, C., Gündüz, C. ve Yılmaz O.,** 2015, Evaluation of cancer imaging potential and photodynamic therapy efficacy of copper (II) benzyloxypheophorbide-a, *Journal of Drug Targeting*, 23(1): 89-95s.
- Ozgur, A., Yurt Lambrecht, F., Ocakoglu, K., Gunduz, C. ve Yucebas, M.,** 2012, Synthesis and biological evaluation of radiolabeled photosensitizer linked bovine serum albumin nanoparticles as a tumor imaging agent, *International Journal of Pharmaceutics*, 422, 472-478s.
- Ozkan, D., Karadeniz, H., Erdem A., Mascini M. and Ozsoz M.,** 2004, Electrochemical genosensor for Mitomycin C-DNA interaction based on guanine signal, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 35(4): 905-912s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özgür, A.**, 2011, Bovine serum albumin (BSA) nanoparçacıklarına pheophorbide-a'nın bağlanması ve ^{99m}Tc ile işaretlenerek radyofarmasötik potansiyelinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü.
- Phan, T.T., van Tol, K.M., Links, T.P., Piers, D.A., de Vries, E.G., Dullaart, R.P. and Jager, P.L.**, 2004, Diagnostic I- 131 scintigraphy in patients with differentiated thyroid cancer: no additional value of higher scan dose. *Annual Nuclear Medicine*, 18, 641-646pp.
- Pietrzyk, D.J. and Frank, C.W.**, 1979, *Analytical Chemistry*, 2.Baskı, Academic pres, 226-239pp.
- Plambeck, J.A. and Lown, J.W.**, 1984, Electrochemical studies of antitumor antibiotics: V. An electrochemical method of measurement of the binding of Doxorubicin and Daunorubicin derivatives to DNA, *J. Electrochem. Soc.*, 131:2556-2563pp.
- Press, O.W., Shan, D., Howell-Clark, J., Eary, J., Appelbaum, F.R., Matthews, F., King, D.J., Haines, A. M., Hamann, P., Shochat, D. and Bernstein, I.D.**, 1996, Comparative metabolism and retention of iodine-125, yttrium-90, and indium-111 radioimmunoconjugates by cancer cells. *Cancer Research*, 56:2123-2129pp.
- Prodromidis, M.I.**, 2007, Impedimetric Biosensors and Immunosensors, Park. J. *Anal. Environ. Chem*, 8:69-71pp.
- Sanchez, S. Pumera, M. Cabruja, E. and Fabregas, E.**, 2007, Carbon Nanotube/Polysulfone Composite Screen Printed Electrochemical Enzyme Biosensors, *Analyst*, 132:142-147pp.
- Seyitoglu, B., Yurt Lambrecht, F. ve Durkan, K.**, 2009, Labeling of Apigeninwith ^{131}I and bioactivity of ^{131}I -apigenin in maleand femalerats, *J. Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 279,3, 867-873s.
- Shah, J. and Wilkins, E.**, 2003, Electrochemical Biosensors for Detection of Biological Warfare Agents, *Electroanalysis*, 15:157-167pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Skoog, D.A., Holler, F.J. and Nieman, T.A.**, 1994, Çeviri editörleri; Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, Prof. Dr. Hamza Yılmaz. Enstrümantal Analiz İlkeleri, *Bilim Yayıncılık*, 1. Baskı, 564-590pp.
- Skoog, D.A., West, D.A. and Holler, F.J.**, 1996, Analitik Kimyanın Temelleri, Prof. Dr. Esma Kılıç, Prof. Dr. Fitnat Köseoğlu, (Eds.), *Bilim Yayıncılık*, 303p.
- Turunc, E., Karadeniz, H., Armagan, G., Erdem, A. ve Yalcin, A.**, 2013, Electrochemical determination of glutathione in plasma at carbon nanotubes based screen printed electrodes, *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 16(9):695-701s.
- Wang, J.**, 2002, Electrochemical nucleic acid biosensors, *Analytica Chimica Acta* 469: 63–71pp.
- Wang, J., Mo, Jian. and Erdem, A.**, 2002, Single-use thick film electrochemical sensor for insulin, *Electroanalysis*, 14:1365-1368pp.
- Wang, J., Xu, D., Erdem, A., Polsky, R. and Salazar, M.**, 2002, Genomagnetic Electrochemical Assays of DNA Hybridization, *Talanta*, 56:931-938pp.
- Wang, L., Lin, L. and Ye, B.**, 2006, Electrochemical studies of the interaction of the anticancer herbal drug emodin with DNA, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42:625-629pp.
- Wang, T., Wang, A., Zhou, L., Lu, S., Jiang, W., Lin, Y., Zhou, J. and Wei, S.**, 2013, Synthesis of a novel water-soluble zinc phthalocyanine and its CT DNA-damaging studies 115:445-451pp.
- Watson, J. and Crick, F.**, 1953, Molecular Structure of Nucleic Acids; a Structure for Deoxyribose Nucleic Acid, *Nature*, 171 (4356):737-738pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Yamaski, T., Fujinaga, M., Kawamura, K., Hatori, A., Yui, J., Nengaki, N., Ogawa, M., Yoshida, Y., Wakizaka, H., Yanamoto, K., Fukumura, T. and Zhang, M.R.,** 2011, Evaluation of the P-glycoprotein- and breast cancer resistance protein-mediated brain penetration of ¹¹C-labeled topotecan using small-animal positron emission tomography, *Nucl. Med. Biol.*, 38(5):707-714pp.
- Ye, Y. and Ju, H.,** 2005, Rapid Detection of ssDNA and RNA Using Multi-Walled Carbon Nanotubes Modified Screen-Printed Carbon Electrode, *Biosens. and Bioelec.*, 21:735-741pp.
- Yurt Lambrecht, F., Yilmaz, O., Durkan, K., Unak, P. ve Bayrak, E.,** 2009, Preparation and biodistribution of [¹³¹I] linezolid in animal model infection and inflammation, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 281:415-419s.
- Yurt, F.,** 1998, Benzodiazepin (diazepam) ve cyclopyrrolone (Zopiclone) grubu farmasötiklerin ¹³¹I ile işaretlenmesi. Doktora tezi, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 26s.
- Zhou, H., Sun, Z., Hoshi, T., Kashiwagi, Y., Anzai, J. and Li, G.,** 2005, Electrochemical studies of danthron and the DNA–danthron interaction, *Biophys. Chem.* 114:21-26pp.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mustafa TOP

Doğum Yeri: Manisa/ TÜRKİYE

Doğum Tarihi: 05.09.1990

Öğrenim Durumu:

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü (2009 – 2013)

Yüksek Lisans: Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Anabilim Dalı (2014 - 2015)

Aldığı Burslar: 2210-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Yüksek Lisans Bursu

Yayın Listesi:

Poster Sunumlar: Pseudo Spesifik Kriyojellerle Sığır Serum IgG Saflaştırılması: Kinetik ve Termodinamik Parametrelerin İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, 2013.