



EGE ÜNİVERSİTESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**RADYOİŞARETLİ INDOLE-3-CARBINOL VE PLGA
İLE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ INDOLE-3-CARBINOL
BİLEŞİKLERİNİN ANTİKANSEROJENİK
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

Görkem YILDIZ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

**Bilim Dalı Kodu : 622.02.01
Sunuş Tarihi : 05.06.2015**

E. Ü. FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bornova-İZMİR

2014

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RADYOİŞARETLİ INDOLE-3-CARBINOL VE PLGA
İLE ENKAPSÜLE EDİLMİŞ INDOLE-3-CARBINOL
BİLEŞİKLERİNİN ANTİKANSEROJENİK
ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

Görkem YILDIZ

Tez Danışmanı : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi : 05.06.2015

Bornova-İZMİR

2015

Sayın Görkem YILDIZ tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak sunulan **“Radyoişaretli Indole-3-carbinol ve PLGA ile Enkapsüle Edilmiş Indole-3-Carbinol Bileşiklerinin Antikanserojenik Etkilerinin *in vitro* Yöntemlerle İncelenmesi”** başlıklı bu çalışma E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 05.06.2015 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

İmza

Jüri Başkanı	: Prof. Dr. Hüseyin Enginar
Raportör Üye	: Doç. Dr. Fazilet Zümrüt BİBER MÜFTÜLER
Üye	: Doç. Dr. Serap TEKSÖZ

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

E.Ü. Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Radyoişaretli Indole-3-carbinol ve PLGA ile Enkapsüle Edilmiş Indole-3-Carbinol Bileşiklerinin Antikanserojenik Etkilerinin *in vitro* Yöntemlerle İncelenmesi” 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.

05/06/2015

Görkem Yıldız

ÖZET**RADYOİŞARETLİ INDOLE-3-CARBINOL VE PLGA İLE
ENKAPSÜLE EDİLMİŞ INDOLE-3-CARBINOL BİLEŞİKLERİNİN
ANTİKANSEROJENİK ETKİLERİNİN *IN VITRO* YÖNTEMLERLE
İNCELENMESİ**

YILDIZ, Görkem

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Haziran 2015, 58 sayfa

Son yıllarda doğal ürünlerin tüketimi önem kazanmakla birlikte özellikle turpgil sebzelerinin (brokoli, brüksel lahanası, karnabahar, kara lahana ve kıvırcık lahana) tüketim ile kansere yakalanma riskinin daha az olduğu yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır. Turpgil sebzelerinde bulunan indol-3-karbinol (I3C) ve metabolik ürünlerinin meme, prostat, kolon kanseri gibi birçok kanser türüne karşı antitümör etkinliğine ilişkin birçok çalışma literatürde yer almaktadır.

Bu tez çalışmasında I3C'nin Poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) ile enkapsülasyonu ve radyoiyodinasyonu gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretlı I3C ve PLGA ile enkapsüle edilen I3C bileşiğinin (I3C-PLGA) antikanserojenik etkileri *in vitro* olarak incelenmiştir. PLGA gibi biyobozunur ve biyouyumlu polimerlerle üretilen nanopartiküller, ilaç taşıma sistemi için yaygın olarak kullanılan sistemlerdir. Tıpta uygulamaları, ilaç, gen ve antijenler için taşıyıcı olarak ve *in vitro/in vivo* çalışmalarda uygulanmasını kapsamaktadır. Bu çalışmada I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin kalite kontrolü Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile gerçekleştirilmiş ve inaktif iyotla işaretli I3C'nin (¹²⁷I-I3C) yapısı Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) yöntemi ile doğrulanmıştır. I3C ve I3C-PLGA bileşikleri, nükleer tıpta teşhis ve tedavide yaygın olarak kullanılan ¹³¹I radyoizotobu ile işaretlenmiştir [(¹³¹I-I3C), (¹³¹I-I3C-PLGA)]. Bileşiklerin radyoişaretleme verimleri İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) sistemi ile belirlenmiştir. Antikanserojenik etkileri ise meme adenokarsinoma epiteli (MCF-7), kolon adenokarsinoma epiteli (Caco-2), prostat karsinoma epiteli (PC) hücreleri üzerinde gerçekleştirilmiştir.

Tüm deneysel sonuçlar radyoişaretli bileşiklerin nükleer tıpta kullanılmasının umut vaad etmekte olduğu ve yapılan çalışmalara ek katkı sağladığı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İndole-3-Carbinol, Turpgil Sebzeleri, PLGA, ¹³¹I, Hücre kültürü, Sitotoksisite, , Antikanserojenik etki, MCF-7, Caco-2, PC3 hücreleri.

ABSTRACT**INVESTIGATION OF ANTICANCEROGENIC EFFECTS OF
RADIOLABELED INDOLE-3-CARBINOL AND PLGA
ENCAPSULATED INDOLE-3 CARBINOL COMPOUNDS
UTILIZING *IN VITRO* METHODS**

YILDIZ, Gorkem,

MSc in Nuclear Sciences

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. F. ZUMRUT BIBER MUFTULER

June 2015, 58 pages

Recently, the usage of natural products has gained more importance and recent studies emphasized that consuming cruciferous vegetables (broccoli, brussel sprout, cauliflower, collard greens and curly kale) lowers cancer risk. In the literature there are a lot of studies which are showed that indol-3-karbinol (I3C) and metabolic ingredients of cruciferous vegetables provide antitumor activity against many cancer types including breast cancer, prostate cancer and colon cancer.

In present study, radioiodination and encapsulation with poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) of I3C has been performed. Anticancerogenic effects of I3C and PLGA encapsulated I3C (I3C-PLGA) have been investigated utilizing *in vitro* methods. Nanoparticles containing biodegradable and biocompatible polymers such as PLGA have been widely used and important research subject about pharmaceutical carriers. Their main usages in medical science contain being a carrier for drug, genes and antigens as well as *in vitro* studies. In this study, quality control of I3C and I3C-PLGA has been performed with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and structural analysis of ^{127}I -I3C has been verified using Nuclear Magnetic Resonance (NMR). I3C and I3C-PLGA compounds have been radiolabeled with ^{131}I [^{131}I -I3C), (^{131}I -I3C-PLGA)] which is widely used for diagnosis and treatment in nuclear medicine. Radiolabelling yields of radioiodinated compounds have been determined using Thin Layer Radio-Chromatography (TLRC) while anticancerogenic effects have been studied

on breast adenocarcinoma epithelial (MCF-7), colon adenocarcinoma epithelial (Caco-2), prostate carcinoma epithelial (PC3) cells.

All experimental results demonstrated that radiolabelled compounds are promising in order to be used in nuclear medicine as well as present study contributed previously reported studies.

Keywords: Indole-3-Carbinol, cruciferous vegetables, PLGA, ¹³¹I, Cell culture, Cytotoxicity, Anticancerogenic effects, MCF-7, Caco-2, PC3 cells

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarımın başlangıcından sonlandırılmasına kadar geçen sürede beni her konuda destekleyen ve katkılarını esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER'e, Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Turgay KARALI ve Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, toplanan verilerin analiz edilmesinde ve tezimde büyük emeği geçen Sayın Öğr. Gör. Dr. Ayfer YURT KILÇAR'a ve Sayın Arş. Gör. Özge KOZGUŐ GÜLDÜ'ye, hücre kültürü çalışmalarında bilgi birikimini ve emeğini esirgemeyen Sayın Doç. Dr. E. İlker MEDİNE'ye, tüm hayatım boyunca hiçbir fedakarlıktan çekinmeyen, maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

Görkem YILDIZ

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1 İndol Bileşikleri	4
2.2 İndol-3-Karbinol (I3C)	5
2.2.1 İndol-3-karbinol (I3C) ve kimyasal bileşikleri	6
2.3 I3C'nin Anti-Tümör Etkinliği	7
2.3.1 I3C ve meme kanserine olan antitümör Etkinliği	7
2.3.2 I3C'nin prostat kanserine olan önleyici etkisi	8

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.3.3 I3C'nin kolon kanserine olan Etkisi	9
2.4 Turpgil Sebzeleri.....	10
2.5 Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)	11
2.6 İyot Elementi, Radyoaktif İyot-131 (¹³¹ I) Bozunumu ve Elde Edilişi	13
2.7 Radyoiodinasyon.....	14
2.8 Kromatografi.....	15
2.8.1 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	16
2.8.2 İnce tabaka radyo kromatografisi (TLRC)	17
2.8.2 İnce tabaka kromatografisi (TLC) ve ince tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemleri	17
2.9 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi	18
2.10 Lipofilite	19
2.11 Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM).....	19
2.12 Zeta Boyut Ölçümü.....	19
3. MATERYAL METOD	21

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	21
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	21
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	21
3.2 I3C'nin PLGA İle Enkapsülasyonu	22
3.3 I3C-PLGA Bileşiminin SEM Analizi.....	22
3.4 I3C-PLGA Bileşiminin Zeta-Sizer İle Boyut Analizi	23
3.5 I3C ve I3C-PLGA Bileşiklerinin HPLC Analizi.....	23
3.6 I3C Bileşiminin İnaktif İyot ile İşaretlenmesi (¹²⁷ I-I3C).....	24
3.7 ¹²⁷ I-I3C Bileşiminin NMR Yöntemi ile Yapı Analizi	24
3.8 I3C ve I3C-PLGA Bileşiklerinin ¹³¹ I ile Radyoışaretleme Çalışmaları (¹³¹ I-I3C).....	24
3.8.1 İodojen tüplerinin hazırlanması	24
3.8.2 I3C bileşiminin ¹³¹ I ile radyoışaretlenmesi (¹³¹ I-I3C)	24
3.8.3 PLGA ile enkapsüle edilmiş I3C bileşiminin ¹³¹ I ile radyoışaretlenmesi (¹³¹ I-I3C-PLGA).....	25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

3.9 Radyoışaretleli I3C (¹³¹ I-I3C), Radyoışaretleli I3C-PLGA (¹³¹ I-I3C-PLGA) Bileşiklerinin, diğer Radyoaktif Bileşenlerin [¹³¹ I ve Yükseltgenmiş ¹³¹ I (Yük. ¹³¹ I)] TLRC Yöntemi Kullanılarak Kalite Kontrolü	25
3.10 Lipofilite Çalışması.....	26
3.11 ¹³¹ I-I3C ve ¹³¹ I-I3C-PLGA Bileşiği için Stabilitate Çalışması	26
3.12 Hücre Kültürü Çalışmaları	26
3.12.1 MCF-7, Caco-2, PC3 hücre dizinlerinin hazırlanması.....	26
3.12.2 ¹³¹ I, ¹³¹ I-I3C ve ¹³¹ I-I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi	27
3.12.3 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin 4-[3-(4-iodophenyl) -2-(4-nitrophenyl) – 2H-5-tetrazolio] - 1,3-benzene disulfonate (WST) kiti kullanılarak MCF-7, Caco- 2 ve PC3 üzerinde sitotoksitesinin belirlenmesi	28
3.13 İstatiksel Analizler.	28
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	30
4.1 I3C-PLGA Bileşiğine Dair SEM Analizi Sonuçları	30
4.2 I3C-PLGA Bileşiğinin Zeta-Sizer İle Boyut Analizi.....	31

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.3 HPLC Analizi Sonuçları	30
4.3.1 I3C bileşiğinin HPLC analizi sonuçları.....	30
4.3.2 I3C-PLGA bileşiğine ait HPLC sonuçları.....	31
4.4 ¹²⁷ I-I3C Bileşiklerinin NMR Yöntemi ile Yapı Analizi Sonuçları.....	32
4.5 Radyoşaretli bileşiklerin (¹³¹ I-I3C, ¹³¹ I-I3C-PLGA) ve Diğer Radyoaktif Bileşenlerin [¹³¹ I ve Yükseltgenmiş ¹³¹ I (Yük. ¹³¹ I)] İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Sonuçları	34
4.5.1 ¹³¹ I-I3C-PLGA ve diğer radyoaktif bileşenlerin [¹³¹ I ve yükseltgenmiş ¹³¹ I (Yük. ¹³¹ I)] ince tabaka radyo kromatografi (TLRC) sonuçları.....	36
4.6 Lipofilite Çalışması Sonuçları	38
4.7 Stabilite Çalışması Sonuçları.....	38
4.8 Hücre Kültürü Çalışması Sonuçları	39
4.8.1 ¹³¹ I, ¹³¹ I-I3C ve ¹³¹ I-I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması sonuçları.....	39

İÇİNDEKİLER (devam)Sayfa

4.8.2 I3C bileşiği ve I3C-PLGA bileşiklerinin WST kiti kullanılarak MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücreleri üzerinde sitotoksitenin belirlenmesi çalışması sonuçları.....	42
4.9 İstatiksel Analiz Sonuçları	46
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	47
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	48
ÖZGEÇMİŞ	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 İndol halkası	4
2.2 İndol türevleri	5
2.3 İndol-3-karbinol moleküler yapısı	6
2.4 I3C'nin kimyasal bileşikleri.....	7
2.5 ¹³¹ I Bozunma Şeması	13
2.6 İdojen'in moleküler yapısı	15
2.7 HPLC sistemi.....	17
3.1 Deney Düzenegi.	22
4.1 I3C-PLGA bileşiğinin görüntü kesitindeki % Frekans-Boyut Grafiği.....	29
4.2 I3C-PLGA'nın 10 000 kat büyütmede SEM Görüntüsü.	29
4.3 I3C-PLGA bileşiğinin zeta-sizer ile boyut analizi sonucu	30
4.4 I3C bileşiğine ait HPLC kromatogramı	31
4.5 I3C-PLGA bileşiğine ait HPLC kromatogramı	31
4.6 I3C bileşiğinin moleküler formülü.	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.7 ^{127}I -I3C bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu	32
4.8 I3C bileşiğine ait ^1H -NMR spektrumu	33
4.9 ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı	35
4.10 Yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı	35
4.11 ^{131}I -I3C Bileşiğine ait TLRC kromatogramı.....	35
4.12 ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı	37
4.13 Yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı.	37
4.14 ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait TLRC kromatogramı.....	37
4.15 ^{131}I -I3C bileşiğine ait stabilite sonuçları	38
4.16 ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait stabilite sonuçları	39
4.17 ^{131}I , ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması % bağlanma grafığı.....	41
4.18 I3C bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerinin, 24. ve saatlerdeki canlılık % grafığı	44

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)ŞekilSayfa

4.19 I3C-PLGA bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerinin, 24. ve saatlerdeki canlılık % grafiği.....	44
--	----

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1 I3C bileşiği için uygulanan HPLC analiz koşulları.	23
4.1 ¹²⁷ I-I3C bileşiğine ait I3C-NMR teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri.....	33
4.2 ¹²⁷ I-I3C bileşiğine ait ¹ H-NMR teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri.....	34
4.3 Banyo çözelti sistemlerinde ¹³¹ I, Yük. ¹³¹ I ve ¹³¹ I-I3C bileşiğine ait Rf değerleri	34
4.4 Banyo çözelti sistemlerinde ¹³¹ I, Yük. ¹³¹ I ve ¹³¹ I-I3C-PLGA bileşiğine ait Rf değerleri.	36
4.5 ¹³¹ I-I3C ve ¹³¹ I-I3C-PLGA bileşiğine ait teorik ve deneysel lipofilité değerleri	38
4.6 ¹³¹ I, ¹³¹ I-I3C ve ¹³¹ I-I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması % bağlanma değerleri.	40
4.7 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerinin, 24. ve 48 saatlerdeki canlılık % değerleri.	43
4.8 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin IC50 değerleri.....	45

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
I3C	: İndol-3-Karbinol
PLGA	: Poli (laktik-ko-glikolik asit)
I3C-PLGA	: PLGA ile enkapsüle edilmiş I3C bileşiği
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
Rt	: Alıkonma Süresi
Rf	: Alıkonma Mesafesi
TLRC	: İnce Tabaka Radyo Kromatografi
SEM	: Scanning Electron Microscopy
UV	: Ultraviyole
Cd(Te)	: Kadmiyum tellür
FBS	: Fetal Bovine Serum
NH ₄ OH	: Amonyum Hidroksit

1. GİRİŞ

Otuz yılı aşkın süredir, sebze­lerin kanser riskini azaltma olasılığı üzerine birçok araştırma yapılmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile başta kolorektal, meme ve prostat kanseri olmak üzere sebze tüketimi ile kanser oluşma riski arasındaki ilişki araştırılmıştır. Sebze tüketimi yüksek olan kişilerin daha az tüketenlere göre, kansere yakalanma riskinin daha düşük olduğu yapılan araştırmalar ile desteklenmektedir. Bu araştırmalar sonucunda sebzelerin kansere yakalanma riskinde azaltıcı etkileri olduğu tespit edilmiş ve yeteri miktarda sebze tüketimi yapılması gerektiği ortaya koyulmuştur (Key, 2011).

Dünya Kanser Araştırma Fonu ve Kanser Araştırma Amerikan Enstitüsü (AlcR) tarafından yayınlanan bir raporda sebze tüketiminin yüksek olduğu durumlarda (400 g/gün) kanser insidansını en az % 20 kadar önlenebileceği ortaya konmuştur (Van Duyn et al., 2000). Son yıllarda insan vücudundaki serbest radikallerin zararlı etkilerini engellemek veya önlemek için sebze tüketimine artan bir ilgi mevcuttur ve sebzelerin vücudun bağışıklık sistemi için etkin olduğu bilinmektedir. (Sikora et al., 2008).

Sebzelerde bulunan izotiyosiyanatlar ve indol-3-karbinol gibi kanser gelişimini inhibe eden aktif bileşenlerin potansiyel koruyucu rolünü araştırmak üzere *in vitro* ve *in vivo* deney modelleri çalışılmıştır (Murillo and Mehta, 2001). Turpgillerden özellikle, Brassica cinsinden (brokoli, lahana, karnabahar, turp, hardal, şalgam, vb) tüketiminin çeşitli kanser türlerinin riskini azalttığı ileri sürülmüştür (Gingras et al., 2004).

Son yıllarda turpgil sebzelerinin tüketiminin artırılması kanser ve kardiyovasküler hastalık gibi kronik hastalıkların riskini azaltmakta ve sağlıklı bir beslenme için tavsiye edilmektedir. Benzer birçok bitki kökenli gıdalar, antioksidan vitaminler ve fitokimyasallar açısından zengin olup, özellikle izotiyosiyanatlar ve indol birincil beslenme kaynağı olarak yer almaktadır (Jiang et al., 2014).

Çok sayıda çalışmada indol-3-karbinol (I3C) ve metabolik ürünlerinin anti-tümör etkinliği vurgulanmaktadır. İndol türevlerinin kolon prostat ve meme ve endometrium dahil olmak üzere çeşitli kanser hücre hatlarının çoğalmasını baskıladığı görülmüştür (Weng et al., 2008). I3C turpgil familyasındaki

sebzelerde; brokoli, lahana, kıvırcık ve kara lahana gibi sebzelerde bulunur (Choia et al., 2014). Turpgillerden sebzelerde glukobrassisinin doğal bir hidroliz ürünü olan I3C, estrojene bağlı insan meme hücrelerinin çoğalmasını durdurarak estrogen Reseptör-alfa proteininin (ER α) bozunmasını uyardığı tespit edilmiştir (Marconett et al., 2012).

Yukarıda verilen bilgiler doğrultusunda bu tez çalışmasında antikanserojenik etkileri olduğu bilinen indol-3-karbinol'ün (I3C) Poli (laktik-koglikolik asit (PLGA) ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. PLGA bileşiminde laktik asit ve glikolik asit içeren bir polimer olup (Danhier et al., 2012), PLGA biyobozunurluk ve biyoyumluluk gibi son derece arzu edilen niteliklere sahiptir (Shah, 2014). Nanobilim yaklaşık olarak 1 ile 100 nm arasında, nano ölçekli düzeyde materyallerin çalışmasını kapsar (Ju-Nam and Lead, 2008). Bir biyoyumlu ve biyolojik olarak bozunabilen polimerler kullanılarak biçimlendirilen nanopartikül ilaç taşıyıcı sistemleri, ilaç iletimi için gelişen bir yaklaşım oluşturmaktadır. Nanopartiküller pasif gelişmiş geçirgenlik özellikleri ve tutma etkisi elektron paramanyetik rezonans (EPR) olarak bilinen bir mekanizma aracılığıyla tümörlerde birikebilir. Sirkülasyon halindeki nanopartiküller gibi taşıyıcılara ilaç-polimer konjugatının kapsüllenmesi, geçirgenlik ve tutma etkisi ile tümör bölgesi içinde daha büyük bir birikim ile konjugatın plazma yarı ömrünü uzatabilir. PLGA mükemmel biyolojik uyumluluk ve biyolojik olarak bozunabilme özellikleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistemlerde yoğun olarak kullanılmaktadır. Güncel literatürler PLGA nanopartiküllerinin içine tek ajanın katılımını incelemektedir (Merlin et al., 2012). PLGA nanopartikülleri (NP) çeşitli hastalıkların tedavisinde aşı ve proteinler gibi büyük biyomoleküllerin verimli taşınmasında kullanılmaktadır. (Cherreddy et al., 2014).

Bu tez çalışmasında, PLGA ile enkapsüle edilen I3C bileşiği (I3C-PLGA) nükleer tıpta hem teşhis hem tedavide tedavide 364 keV'lik foton enerjisi ve γ salınımından kaynaklı sıklıkla kullanılan ^{131}I radyoizotobu ile işaretlenmiştir. Radyoişaretleme sonrası kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) sistemi ile gerçekleştirilmiştir. I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin kalite kontrolü Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) sisteminde gerçekleştirilmiştir. ^{127}I ile işaretli I3C'nin kalite kontrolü HPLC ile yapı analizleri ise Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) ile gerçekleştirilmiştir. ^{131}I ile radyoişaretleme bileşiklere dair antikanserojenik etkiler kolon adenokarsinoma epiteli (Caco-2) , meme adenokarsinoma epiteli (MCF-7), prostat karsinoma

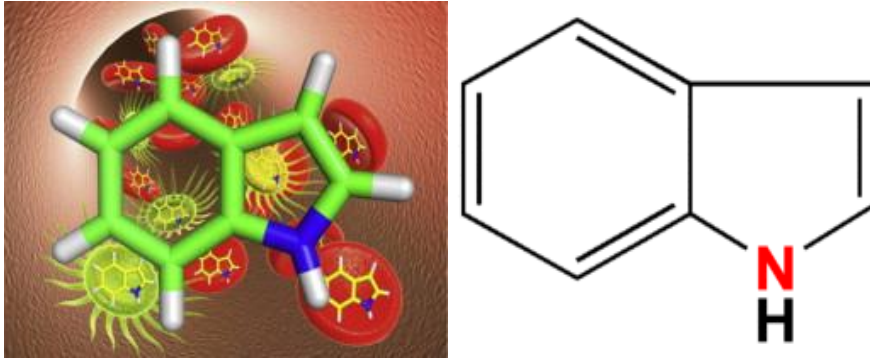
epiteli (PC-3) hücreleri üzerinde *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada tüm deneysel sonuçların ışığı altında, I3C'nin ve PLGA kaplı I3C'nin kanser görüntüleme ve tedavide enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılması önerilmiş olup, daha ileri çalışmaların *in vivo* deney hayvan modelleri üzerinde yapılması planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 İndol Bileşikleri

İndol bileşikleri brokoli ve lahana gibi turpgil sebzelerinde bulunan tamamen doğal oluşumlu bileşiklerdir. İndol halkası içeren bütün bileşikler indoller olarak adlandırılır. Kimyasal olarak indol, aromatik heterosiklik organik bir bileşik olup, beş elemanlı azot içeren pirol halkasına bağlı, altı üyeli bir halkadan oluşan bisiklik bir yapıya sahiptir (Ahmad et al., 2011). İndol halkası, şekil 2.1’de gösterilmiştir.

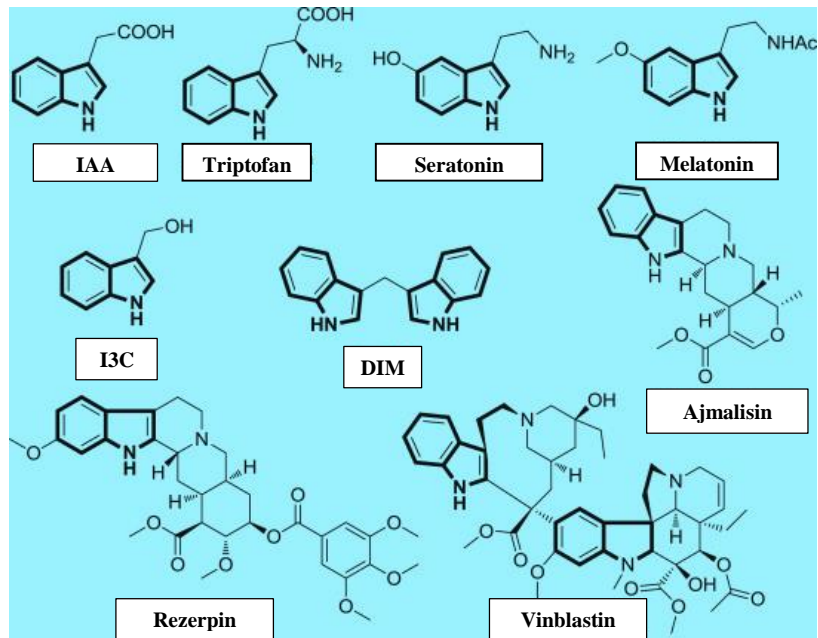


Şekil 2.1 İndol halkası (Zhang et al.,2014).

İki yüz altı epidemiyolojik çalışma ve 22 hayvan çalışması gözden geçirildiğinde, indole-3-karbinol’ün (I3C) tümör oluşumunu engelleyici etkisi rapor edilmiştir ve diğer çalışmalar turpgil sebzelerinin tüketiminin, düşük mesane kanseri riski ile ilişkilendirildiğini güçlü bir şekilde göstermiştir. Turpgil sebzeleri indol türevleri ve izosiyanatlar gibi birçok fitokimyasalın iyi bir kaynağıdır. I3C ve dimeri 3,3’-diindolilmetan (DIM), antikanser özellikleri ile temsilci indollerdir (Ahmad et al., 2011).

İndol, ilaç keşfinde en önemli motiflerden birini temsil etmektedir. İndol türevleri peptidlerin yapısını taklit eden ve enzimlere geri dönüşümlü olarak bağlanmak için eşsiz bir özelliğe sahiptir. İndol biyolojik açıdan aktif doğal ürünlerin her yerinde bulunan bir bileşendir. Şekil 2.2’de indol türevleri görülmektedir. Örneğin; en yaygın şekilde doğal olarak oluşan indol-3-asetik asit (IAA), oksin sınıfının bitki hormonudur. Esansiyel bir amino asit olan triptofan birçok temel biyolojik süreçlere katılır. Biyokimyasal olarak triptofandan

türetilen, serotonin veya 5-hidroksitriptamin (5-HT), bir nörotransmitterdir ve bütün hayvanlarda bulunur. Melatonin hayvan, bitki ve mikroplarda bulunan bir hormondur. Hayvanlar melatonin üretimi sürecinde mevsimsel saat gibi her gün bu varyasyonu kullanır. İndol-3-karbinol (I3C) ve 3,3-diindollmetan'ın (DIM), biyolojik çalışmaları, ilginç antikanserojen ve antioksidan etkileri nedeniyle devam eden araştırmaların konusu olmuştur. Çeşitli bitkilerde doğal olarak bulunan bir indol alkaloidi olan Ajmalisin yüksek tansiyon tedavisinde kullanılan bir anti hipertansiyon ilaçtır. Bir indol alkaloidi olan Rezerpin ruhsal bozukluğu olan hastalarda yüksek kan basıncı ve şiddetli ajitasyon tedavisinde kullanılır. Vinblastin Hodgkin hastalığı, Kaposi sarkomu, Hodgkin olmayan lenfoma ve meme veya testis kanseri dahil olmak üzere çeşitli kanser türlerinin tedavisi için kullanılır (Zhang et al., 2014).



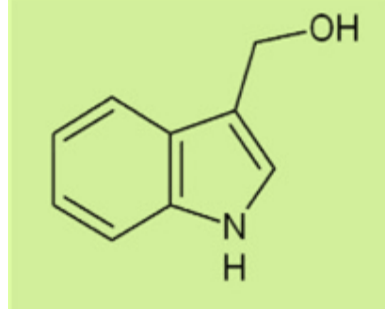
Şekil 2.2 İndol türevleri (Zhang et al., 2014).

2.2 İndol-3-karbinol (I3C)

İndol-3-karbinol (I3C) turpgil sebzelerinde bulunur (Ahmad et al., 2011). I3C özellikle brokoli lahanada karnabahar gibi, turpgil familyasından bitkilerde bulunan bir glukobrassisin türevidir (Chacon et al., 2014). Kansere karşı koruyucu etkisi olduğu görünen sebze ve meyve çeşitleri çiğ sebzeler olup, bunları takiben havuç, yeşil sebzeler, domates ve turpgil sebzeleridir. I3C içeren sebze ve meyveler kansere karşı korumaya yardımcı olabileceği görülmüştür (Aggarwal and Ichikawa, 2005).

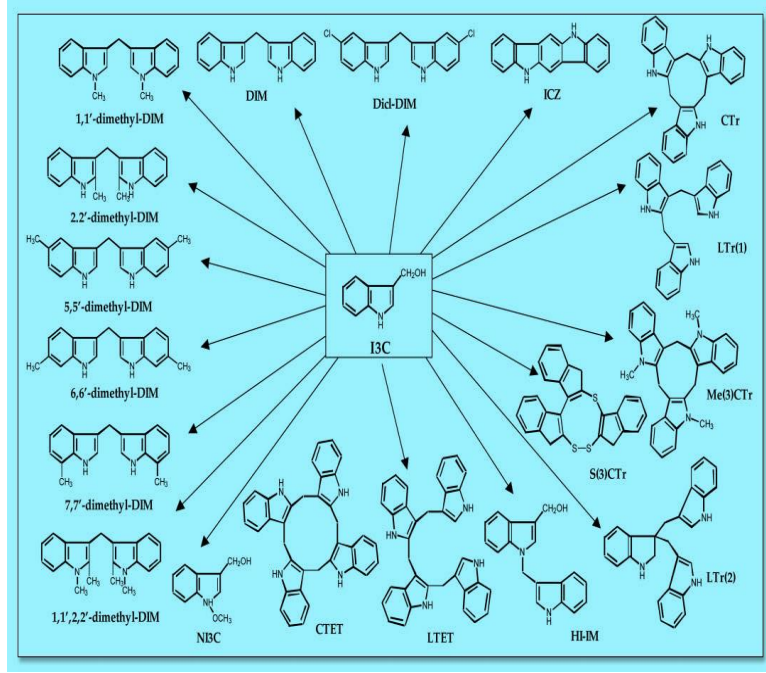
2.2.1 İndol-3-karbinol (I3C) ve kimyasal bileşikleri

İndol-3-karbinol içeren sebzeler yenildikten sonra bu sebzeler, bağırsağın asit ortamında, fizyolojik etkilerin çoğu için sorumlu görünen poli-aromatik indolik bileşikler dizinine kolayca dönüştürülür (Aggarwal and Ichikawa, 2005). I3C, indol-3-metanol olarak da adlandırılır (Broadbent and Broadbent, 1998). Moleküler ağırlığı 147.17 g/mol erime noktası 90 °C, sudaki çözünürlüğü 3.75 g/L'dir. Moleküler formülü C₉H₉NO olan indol-3-karbinol'ün moleküler yapısı şekil 2.3'te gösterilmiştir.



Şekil 2.3 İndol-3-karbinol moleküler yapısı (www.mpbio.com).

DİM, I3C'nin önemli bir *in vivo* asit katalizli yoğunlaşma ürünüdür. Bazı turpgiller sebzelerinde indol, N-metoksiindol-3-karbinol (NI3C) şeklinde bulunur. Alımını takiben I3C, tahminen I3C'nin *in vivo* etkilerinin sorumlusu olan oligomerik ürünlerin serisi haline dönüştürülür. Bunlar ana trimer ürünler olan 5,6,11,12,17,18-hekzahidrosiklonon [1,2-b: 4,5-b': 7,8-b''] triindol (CTr) içerir. Metil sübtitüe edilmiş DİM, 1,1-dimetil-, 2,2', dimetil-5,5'-dimetil-6,6' dimetil-, ve 7,7'-dimetil DİM ve 1,1', 2,2 tetrametil DİM içerir. I3C'nin diğer kimyasal bileşikleri, indol-3-asetonitril, [3,2-b] karbazol (ICZ) ve indol-3-karboksaldehiti kapsar. Chang ve arkadaşları ana anti-proliferatif (hücre çoğalmasını önleyici) bileşen olan 2-(indol-3-ilmetil)-3,3'-diindollmetanın (LTR-1), pozitif estrogen reseptör hücreleri ve negatif estrogen hücreleri olmak üzere her iki estrogen reseptörünün (ER) proliferasyonunu bastırılabilceğini göstermiştir (Chang et al, 1999). Şekil 2.4'te I3C kimyasal bileşiklerinden bazıları gösterilmiştir (Aggarwal and Ichikawa, 2005).



Şekil 2.4 I3C'nin kimyasal bileşikleri (Aggarwal and Ichikawa, 2005).

2.3 I3C'nin Anti-Tümör Etkinliği

I3C'nin meme, kolon, prostat kanseri hücrelerinin çoğalmasını baskıladığı görülmüştür (Aggarwal and Ichikawa, 2005). Klinik öncesi ve klinik kayıtlara bağlı kanıtlar sebzelerde biyolojik olarak önemli bir biyoaktif molekül olan I3C'nin anti-tümörijenik özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. (Kim and Milner, 2005).

2.3.1 I3C ve meme kanserine olan antitümör etkinliği

Meme kanseri, kadınlar arasında yaygın görülmekte ve kanser nedeni ölümlerin başında yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından, kadınlarda görülen kanser türleri içinde en yaygın olanının meme kanseri olduğu rapor edilmiştir. Hastalığın yaygın olarak görülmesi ve ölümlerle sonuçlanması nedeniyle bu hastalığın tedavisine yönelik araştırmalar halen güncelliğini korumakta ve giderek artmaktadır. Meme kanserlerinin ortaya çıkması ve gelişmesinde başta estrogen olmak üzere bazı hormonların rol oynadığı ve hormonların etkisi olmadan, meme kanseri olmayacağı bildirilmektedir. Bundan dolayı kadınlarda meme kanseri erkeklere oranla 100 kat daha sık görülmektedir (Koyunoğlu vd., 2013). Estrogen meme kanseri gelişimini teşvik eder ve meme kanseri hücreleri üzerinde proliferatif etki gösterir. Estrojenler hücre mebranlarından hücre içine

pasif bir şekilde yayılır. Estrojen reseptörleri içeren dokularda estrojen bu reseptörlere bağlanır, hücre içine geçerek hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenler. Estrojen reseptörü seviyesi kadından kadına değişir ve meme kanseri riskinin artması ile doğrudan ilişkilidir ve meme kanseri hücrelerinde proliferatif etki yaratır (Clemons and Goss, 2001).

ER hücre sitozolünde bulunur (Welshons et al., 1984). ER en kötü huylu meme tümörlerinde ortaya çıkan estrojenlerde mitojenik yanıt için çok önemlidir. ER, ER α ve ER β olarak iki alt türü içerir. Meme kanseri hücrelerindeki ER β üzerinde I3C etkileri tam olarak bilinmemektedir. Ancak, I3C ve ER α arasında etkileşim hakkında çok fazla bilgi mevcuttur.(Kim and Milner, 2005). Turpgil sebzelerinde glukobrassinin doğal bir hidroliz ürünü olan I3C, ER α protein bozulmasını uyarmakla birlikte estrojenin reseptörlere ulaşmasını engeller ve yarattığı anti-estojenik etkiyle estrojene bağlı meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını durdurur (Marconett et al., 2012). Chen ve arkadaşlarının meme kanseri hücreleri üzerine yaptıkları çalışmada ise 125 μ M kadar I3C'nin meme kanseri hücrelerinin çoğalmasını durdurarak anti-proliferatif etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Chen et al., 1996).

2.3.2 I3C'nin prostat kanserine olan önleyici etkisi

Prostat kanseri dünyada en sık görülen ve ölümlü sonuçlanan kanserlerin başında yer almaktadır (Vivar et al., 2009). Dünya Sağlık Örgütü'nün 2008 yılı yayınladığı kanser raporuna göre prostat kanseri görülme sıklığı diğer kanser türlerine göre ilk sırada yer almaktadır (Boyle and Levin, 2008). Yaş, ırk, genetik faktörler, beslenme ve hormonal faktörler prostat kanserinin risk faktörleri arasında yer almaktadır. Tüm dünyada erkeklerde prostat kanseri oranının artması ile birlikte bu kanser türüne karşı baskılayıcı etkiye sahip bileşikler arama yoluna gidilmiştir ve *in vivo*, *in vitro* çalışmalar ile prostat kanseri hücrelerinde bu bileşiklerin özellikleri incelenmiştir (Nachshon-Kedmi et al., 2003).

Prostat kanseri, 50 yaşın altındaki erkeklerde nadir görülmekle birlikte, bu yaştan sonra prostat kanserine yakalanma olasılığı artmaktadır. 40-59 yaş arası erkeklerde her 45 kişiden birinde prostat kanseri görülmekte iken, 60-79 yaş arası ise her 7 kişiden birinde prostat kanseri görülmektedir. Prostatın büyümesi ve kontrolü androjenin kontrolü altındadır (Crawford, 2003). Prostat kanserinin ilerlemesi androjenin bağlandığı androjen reseptörüne bağlıdır ve prostat kanseri androjenlere duyarlıdır (Lee et al., 2014). Çok sayıda deneysel verilerde prostat

kanserinin başlangıcı ve ilerlemesini kontrol eden temel faktörlerden birinin androjen olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle androjen baskılayıcı tedavi, prostat kanseri için ilk basamak tedavi stratejisi haline gelmiştir. Androjen reseptörleri (AR) sinyalizasyonunun androjen sentezi de dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalara katkıda bulunduğu kabul edilmektedir (Gauthier-Landry, et al., 2015). Androjen reseptörleri, androjenin hücrede bağlanmasıyla aktif hale geçer ve prostat kanseri hücrelerinin gelişiminde ve proliferasyonunda etkili olur (Singh-Gupta et al., 2012).

I3C prostat tümörü büyümesini inhibe eder ve apoptozu uyararak kanserli hücrede proliferasyonu azaltır (Souli et al., 2008). I3C ve kimyasal bileşikleri, androjene bağlı prostat kanseri hücrelerinde androjen reseptörlerini hedefler ve androjen ile uyarılan kanserli hücreler üzerinde anti-proliferatif ve anti-androjenik etkiler gösterir (Aggarwal and Ichikawa, 2005). Bu konuda Nachson-Kedmi ve arkadaşlarının PC-3 hücreleri üzerinde yaptıkları *in vitro* çalışmada 400 μ M I3C'nin antiproliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Nachshon-Kedmi, 2003), Klein ve arkadaşlarının PC3 hücre hatları üzerinde yaptıkları çalışmada ise 250 μ M kadar I3C'nin proliferasyonu azalttığını tespit edilirken (Klein et al., 2008).

2.3.3 I3C'nin kolon kanserine olan etkisi

Kolon kanseri, dünya çapında erkeklerde en sık görülen dördüncü kanser olmak birlikte kadınlarda ise en sık görülen üçüncü kanserdir. Hastalığın görülme oranı beslenme, yaşam tarzı, fiziksel olarak hareketsizlik, ve kalıtsal faktörlerle ilişki olabilir. Hastalık riski ülkeden ülkeye hatta bireyden bireye değişir (Toloudi et al., 2015). Kolon kanseri için güncel tedavi yöntemleri sitotoksik ilaçlar ve kemoterapidir (Hajiaghaalipour et al., 2015). Bu alandaki gelişmeler kolon kanserinin kontrolüne yönelik yenilikçi yaklaşımlar meydana getirmektedir (Kim et al., 2003).

Kimyasal yoldan önleyici maddeler ya da doğal kaynaklardan elde edilen maddelerin kullanımı kolon kanseri tedavisi için uygun görünen bir yaklaşımdır. Yapılan araştırmalar ile I3C'nin kolon kanseri için potansiyel bir ajan olduğu gösterilmiştir. Çeşitli indoller arasından özellikle I3C olası bir kansere karşı önleyici ajan olarak ilgi görmüş ve bu konuda tıp literatüründe çalışma sayısı gün geçtikçe artmaktadır (Kim et al., 2003). Howells ve arkadaşlarının 2008 yılında kolon kanseri üzerine yaptıkları çalışmada 110 μ M I3C'nin kanserli hücrelerin

çoğalmasını durdurarak anti-proliferatif etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Howells et al., 2008).

2.4 Turpgil Sebzeleri

Turpgil sebzeleri, haç şeklinde dört eşit büyüklükte yapraklara sahiptir ve brokoli, brüksel lahanası, karnabahar, kara lahana, hardal, yer lahanası, kıvırcık lahana gibi birçok bitkiyi içerir (Higdon et al., 2007). Karnabahar ve brokolinin Akdeniz bölgesinin doğu kıyısında evrimleştiğine inanılmaktadır. Roma döneminde bu sebzelerinin ticaretinin gerçekleşmesiyle turpgil sebzelerinin diğer bölgelere adaptasyonu sağlanmıştır. Karnabahar bitkisi 15. yüzyılda geliştirilmiştir ve yüz yıl sonra brokoli cinsi sebze İtalya'da bu isimle adlandırılmıştır. Brüksel lahanası, 18. yüzyılda Brüksel şehri çevresinde Belçikada geliştirildiği düşünülmüş ve daha sonrada Kuzey doğu Avrupanın önemli bir sebzesi haline gelmiştir. Ayrıca Çin brokolisi olarak ta bilinen Çin lahanası yaygın bir şekilde Çin'de kullanılmakla birlikte buraya Akdeniz bölgesinden taşındığı düşünülmektedir. Şalgamın kökeninin neresi olduğu henüz tam olarak bilinmemektedir. Turp, şalgam ve kara lahana Çin'in yerli, Mısır Roma ve Yunan uygarlıklarının tarihsel kayıtlarında bulunmaktadır (Manchali et al., 2012).

Yapılan bazı çalışmalarda, kolorektal kanseri tanısı konulan insanların sebze tüketiminin, olmayanlara oranla muhtemelen daha düşük olduğu bulunmuştur. Özellikle turpgil sebzelerinde bulunan antikanserojen maddelerin meme kanserine olan önleyici etkileri tespit edilmiştir (Higdon et al., 2007). Liu ve Lv'nin 13 meme kanseri vakası üzerine yaptıkları çalışmada yüksek miktarda turpgil sebzelerin alımı ile meme kanserine yakalanma riskinin azaltılabileceğini vurgulamışlardır (Liu and Lv, 2013).

Brassika familyasındaki sebzelerin özellikle gastrointestinal sistem kanserlerinin riskini azaltılabileceği yapılan biyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Brassika familyasından brokoli, glukosinolatlar, mineraller ve antioksidanlar gibi birçok biyoaktif bileşen içeren bir besin kaynağıdır (Cekic vd., 2011). Kansere karşı önleyici etkileri olduğu bilinen I3C bileşiği brokolide bulunan glukobrassisin maddesinin parçalanma ürünüdür (Higdon et al., 2007). Brokoli gibi diğer birçok turpgil sebzelerinde de kansere karşı önleyici etkileri bulunan besin maddeleri mevcuttur. 1996 yılı öncesinde yayınlanmış 87 vaka çalışmasında

turpgil sebze tüketiminin artması ile kanser riskinin azaldığı tespit edilmiştir (Higdon et al., 2007).

2.5 Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA)

Nanopartiküller, doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği sistemlerdir. Polilaktik asit (PLA), Poliglikolik asit (PGA) yada bunların kopolimeri olan Poli(d,l-laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi biyobozunur ve biyoyumlu polimerlerden üretilen nanopartiküller, ilaç taşıma sistemleri için en yaygın olarak araştırılan sistemlerdir. Son yıllarda, nanoteknoloji tıp ve biyoteknoloji alanında nanopartikül sistemlerle ilgili araştırmalara ve uygulamalara ilişkin çalışmaların sayısında önemli ölçüde artış olmuştur. Tıptaki uygulamaları özellikle; ilaç, gen ve antijenler için taşıyıcı olarak kullanılması, *in vitro/in vivo* çalışmalarda uygulanması, geliştirilmiş biyoyumlu materyallerin üretimi gibi konuları kapsamaktadır. Hazırlama yöntemine bağlı olarak, enkapsüle edilmiş terapötik ajanın farklı özellikler ve farklı taşıma karakteristikleri sergilediği nanokapsüller elde edilmektedir. Nanopartiküller ilk defa yaklaşık olarak 40 yıl önce aşıların ve kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanların taşınması için geliştirilmiştir. Nanopartiküller, nanoboyutlu yapılarından dolayı mikropartiküler sistemlere kıyasla hücre içine daha fazla alınmaktadır (Derman vd., 2013). Desai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada 100 nm boyutundaki nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerinden; 1 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla iki buçuk kat daha fazla, 10 µm boyutundaki mikropartiküllere oranla ise altı kat daha fazla hücre içerisine alındığını göstermişlerdir (Desai et al., 1997). Doğal yada sentetik polimerlerin kullanılması ile elde edilen ilaçların yanı sıra, proteinler, peptitler ve genlerin de ilgili dokuya hedeflendirilmeleri için kullanılan nanopartiküllerin sağladığı avantajlar iki temel özelliklerinden dolayı ileri gelmektedir. Bu özelliklerinden birincisi, nanopartiküllerin küçük partikül boyutlarına sahip olmasıdır. İkincisi ise, nanopartiküllerin hazırlanmasında biyobozunur materyallerin kullanılmasıdır. Biyobozunur malzemeler günler hatta haftalar süren periyotlarda hedef dokuda kontrollü etkin madde salımını sağlamaktadır. Tüm bunlara ek olarak nanopartiküller; ilaçların/proteinlerin yada peptidlerin stabilitesinin arttırır ve nanopartiküllerin polimerik yapıları, etkin maddenin hedeflendirilmesini, salınımının kontrolünü ve sürdürülmesini sağlar. Hedeflenen bölgede enjeksiyonu takiben, günler hatta haftalar süren etkin madde salımına

olanak verirler. Ayrıca, nanopartiküllerin yüzeyine hedefleme bölgesindeki özel moleküler yapıları tanıyan özel ligandların tutturulması ile etkin maddenin hedef bölgede tulumu mümkün olmaktadır. Son yıllarda, nanopartiküller sahip oldukları avantajlardan dolayı nanoteknoloji, tıp, biyoteknoloji ve diğer alanlarda yoğun olarak araştırılmaktadırlar. Toksik olmayan metabolitlere dönüşen polimerler, uzun etkili ve kontrollü salım sistemlerinin hazırlanmasında sıklıkla tercih edilmektedir. Sahip olduğu avantajlarından dolayı etkin maddelerin enkapsülasyonu sonucu kontrollü salınımı için nanopartikül üretiminde en yaygın olarak kullanılan biyobozunur polimerlerden biri olan Poli(laktik-ko-glikolik asit), laktik asit ve glikolik asit monomerlerin polimerizasyonu sonucu elde edilmektedir (Derman vd., 2013).

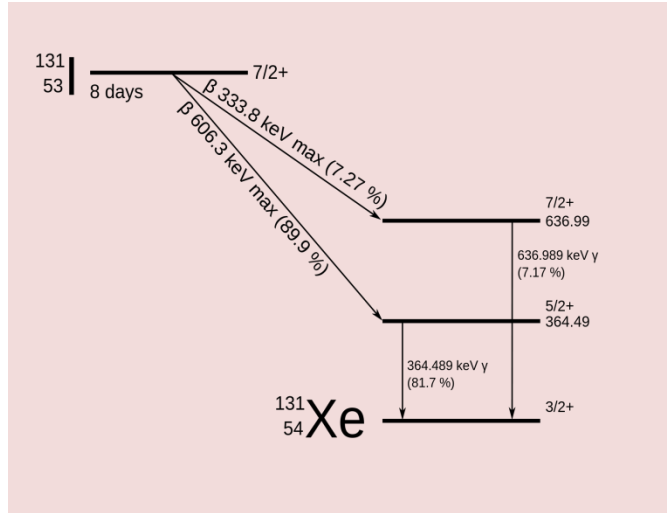
Poli (laktid-ko-glikolik asit) (PLGA), ilaç taşıma sistemlerinde kullanılan Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı biyoyumlu bir polimerdir. Yaygın olarak kemoterapötik antikanser ilaçlarının nano boyutta enkapsülasyonunda kullanılır. Nano boyutta ilaçların taşınımı, kanserli hücrelerin ilaca karşı direncini azaltmak ve ilacın hücre içine alımını kolaylaştırmak için kullanılır (Jaidev et al., 2015).

Polimerik partiküller, ilaç taşıma sistemlerinde antikanser ilaçlar için umut vadeden taşıyıcılar olarak kabul edilmektedir. Bu sistemlerin içerisinde enkapsülasyon işlemi polimerin özellikleri ve hazırlama yöntemleri gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Genel olarak polimerik taşıma sistemleri anti-kanser ilaçların toksisitesini azaltarak etkinliğini artırmakla birlikte proteinler, DNA ve RNA gibi farklı biyoaktif maddelere tutulum için de kullanılabilir (Moreno et al., 2008). Polimerik ilaç taşıma sistemlerinin meme, prostat ve kolorektal kanserlerin antikanser ilaçların terapötik etkisini geliştirdiği yapılan çalışmalar ile desteklenmektedir. Alibolandi ve arkadaşlarının yaptıkları bir *in vitro* çalışmada bir anti-kanser ajanı olan Doksorubisin'in polimerik partiküllerle enkapsülasyonundan sonra MCF-7 hücrelerine nüfus etme yeteneğini artırdığını ve sitotoksitesini azaltıp, tümörlü hücrede tutulumunu artırarak proliferasyonu azalttığını tespit etmişlerdir (Alibolandi et al., 2015).

2.6 İyot Elementi, Radyoaktif İyot-131 (^{131}I) Bozunumu ve Elde Edilişi

İyot siyah, solit ve aktif bir element olup Gay Lussac tarafından 1812 yılında tanımlanmıştır. “İoeides” Yunanca’da “mor renkli” anlamına gelir. Yer kabuğunda oldukça nadir bulunan bir elementtir. Kaya, toprak, mineral, deniz suyu ve yeraltı su kaynaklarında bulunmaktadır. En fazla koyu renkli yosunlarda bulunur. İyodun suda erirliği en azdır, organik eriticilerde çözülür. Atom ağırlığı 126.9 olan iyot, periyodik tablonun VII. grubundadır. 117’den 138’e kadar izotopu vardır. Stabil izotopu ^{127}I ’dir. İyot, başlıca toprakta olmak üzere su ve havada bulunan bir eser elementtir (Delange, 1989).

İyot-131 (^{131}I), Nükleer Tıp’ta tanı ve radyoterapi için en sık kullanılan radyonüklidlerden biridir (Bitar et al., 2013). ^{131}I radyonüklidi, beta bozunumu yapar ve yarı ömrü 8.04 gündür. Maksimum ve ortalama beta parçacık enerjileri sırasıyla 0.61 MeV ve 0.192 MeV’dir. Ayrıca, ^{131}I 364 keV’lik gama fotonu yayar. ^{131}I ’dan gama radyasyonu görüntüleme için kullanılırken, beta radyasyonun ise tedavi edici etkileri mevcuttur (Ahmadzadehfar et al., 2011). Şekil 2.5’te ^{131}I ’in bozunması şeması gösterilmiştir.



Şekil 2.5 ^{131}I ’in Bozunma Şeması.

İyot radyoizotopları bir nükleer reaktörde doğal veya izotopik olarak zenginleştirilmiş tellürün termal nötronlarla ışınlanmasıyla üretilir. ^{131}I , ^{130}Te (n, γ) reaksiyonu ile üretilir. Siklotronlarda bazı iyot izotopları ^{123}Te (p, n) ^{123}I , ^{124}Te ($p,$

$2n)^{123}\text{I}$, ^{124}Te (p, n) ^{124}I gibi çeşitli reaksiyonlarla üretilir. Tellür, tellür-di-oksit (TeO_2) halinde ^{131}I üretimi için kullanılır. ^{131}I aynı zamanda Uranyum-235'in fisyon reaksiyonu $^{235}\text{U}(n, f)^{131}\text{I}$ ile elde edilir (Chattopadhyay and Das, 2009).

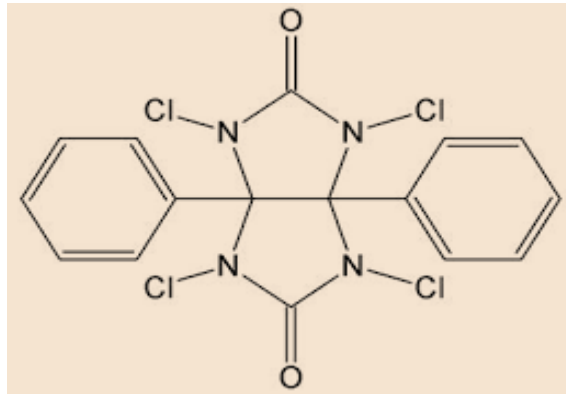
Radyoaktif İyot-131(^{131}I), 1940'ın sonlarında tiroid tedavisinde kullanılmış ve 1950'lerde kullanımı yaygınlaşmıştır. ^{131}I oral olarak alımından sonra hızlı bir şekilde absorbe edilir ve tiroid bezinde toplanır, saçılan beta ışınları sayesinde tümörlü hücrenin çoğalma kapasitesini azaltmakla birlikte yarı ömrü sekiz gün olduğu için uzunca bir süre kanser dokusunda kalarak antitümör etkinliği gösterir (Özen, 2005). Aktif Sodyum iyodür simporteri (NIS) üzerinden iyotun kanserli tiroid hücrelerine taşınma yeteneği 50 yılı aşkın bir süredir nükleer tıpta etkin bir şekilde kullanılmaktadır (Dadachova et al., 2005). NIS taşıyıcı bir protein olup, tiroid, meme dokusu, tükürük bezi ve midede yüksek düzeyde sentezlenmektedir. NIS proteini iyotun hücre içerisine alınmasına aracılık eder (Özdemir ve Özdemir, 2014).

2.7 Radyoiyodinasyon

İyodun radyoaktif izotopları, büyük ve küçük moleküllerin işaretlenmesinde oldukça elverişlidir. Hedef moleküllerin radyoiyodinasyonu için yapılan birçok değişik metod literatürde yer almaktadır. Bu teknikler proteinlerin, nükleik asitlerin ve hücre yüzeyinin radyoiyodinasyonu için kullanılmaktadır. Maddelerin radyoiyodinasyon ile işaretlenmesi onları tanımak için tercih edilen bir yöntemdir. (SeEVERS et al., 1982).

Enerjisi ve yarı ömrü sayesinde hem görüntüleme hem de tedavide kullanılabilme özelliği taşıyan ^{131}I radyonüklidi Nükleer Tıp'ta oldukça uygulama alanı bulmuştur. Moleküler Nükleer Tıp teknikleri kullanımıyla, yeni görüntüleme prosedürleri ile hastalığın karakteristiği hakkında daha kesin bilgi elde edilmekte ve meme, rahim prostat türü kanserlerin tedavisinde etkin karar imkanı sağlanmaktadır. İyod, radyoişaretleme çalışmalarında kullanılan ilk izotop olarak bilinmektedir. Radyoaktif bir atomu büyük bir biyolojik molekülün içine sokmak için kullanılan en yaygın yol 'Radyoiyodinasyon'dur. İyodun bağlanabilmesi için yükseltgenmesi gerektiğinden, işaretleme metodları yükseltgeyici ajanlar gerektirmektedir. Direk radyoiyodinasyon için iodojen ve Kloramin-T bileşikleri yükseltgeyici ajanlardır. Ancak iodojen metodu klinik uygulamalar için daha uygun bir metoddur. Protein ve hücre membranlarının radyoiyodinasyonunda iyodinasyon ajanı olarak en çok iodojen kullanılmaktadır ve % 80 üzerinde bir

işaretleme verimi elde edilir, iodojen ilk olarak Fraker ve Speck tarafından protein ve hücre membranlarını iyodlamak için kullanılan bir ajan olarak tanımlanmıştır. Suda çözünmeyen iodojen, I^- ve proteinlerin sulu çözeltilerinin katı fazda hızlı iyodinasyonuna aracılık eder. Yan reaksiyonların oluş derecesi, bu methodla önemsenmeyecek kadar azdır. Bu ajan oksidatif reaksiyonlarda kapta yapışı kalır çünkü suda çözünmez. Diklorometan içinde steril veya polipropilen tüp içerisine konur ve buharlaştırılır. pH=6-8.5 arası verimli iyodinasyon olur. İodojen ile iyodürün oksidasyonu gerçekleşerek (I^+) üretilir ve aromatik halkaya elektrofilik yer değiştirmeyeyle iyodun bağlanması gerçekleşir. ^{131}I ile işaretli antikor bileşikler kanser tedavisinde yaygın olarak çalışılmaktadır. Genellikle iodojen yöntemiyle *in vivo* basit bir proses ile gerçekleştirilir. Serbest iyod birikimi kolaylıkla ortadan kaldırılabılır. Yüksek spesifik aktivitedeki radyoiodlu antikor bileşikler uzun periyotlarda kararlıdır (Taskar et al., 2004). Şekil 2.6'da iodojenin molekül yapısı verilmiştir.



Şekil 2.6 İodojen molekülü (1,3,4,6-Tetrakloro-3a,6a-difenilglükouril).

2.8 Kromatografi

Kromatografi kelimesi Yunanca 'chroma' renk ve 'Graphein' yazmak kelimelerinden gelmiştir. İlk defa yirminci yüzyılın başlarında görünür renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmış bir tekniktir. Kromatografi farklı bileşiklerin değişken bir şekilde farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Durağan (stasyonel faz) ve hareketli faz (mobil faz) olmak üzere iki faz mevcuttur. Hareketli faz durağan fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri farklı derecede durağan fazla etkileşime girerler. Durağan fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden bileşenler birbirinden ayrılır. Bileşiklerin bileşenlerine ayrılmasında, durağan faz ile

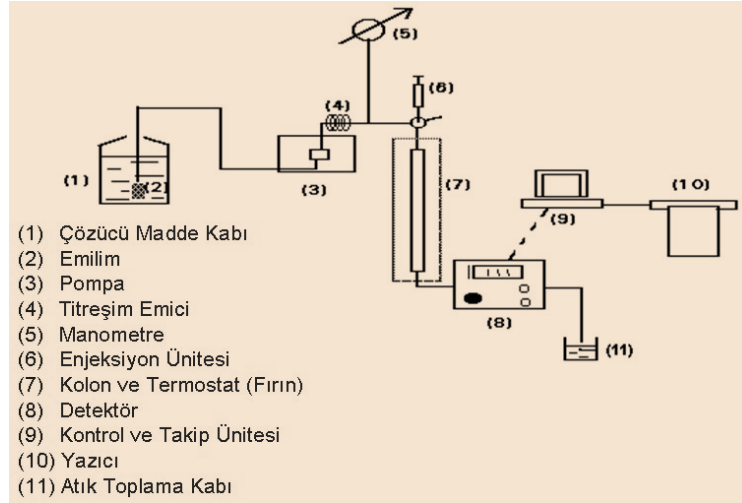
bileşenler arasındaki etkileşim tabiatına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşim molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir (Enginün, 1996).

Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın en ileri kristallendirme ve damıtma metodlarıyla ayırmak çok zordur. Ancak, kromatografik metodlarla bunları kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkündür (Keleş, 1987).

2.8.1 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Örneği taşıyan sıvı mekanik çalışan pompalarla kolondan geçirildiğinde, sıvı fazın kendi halinde kolondan geçişine göre çok daha yüksek hareketli faz hızı sağlanmakta ve ayırma çabuk ve tam olmaktadır. Ayrılan bileşenler kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilerek kaydedilmektedir. Böyle yüksek hızda ve etkin bir şekilde gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı kromatografi sistemlerine yüksek performanslı sıvı kromatografisi denir (Keleş, 1987). HPLC yönteminin temeli, uygun bir çözücü içerisinde çözülmüş maddelerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki durgun faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde ilgi farklılığının sonucu olarak değişik hızlarda ilerlemesine dayanır (Dibek, 2014).

Ayrılabilecek bileşikler ısıya duyarlı ve kolaylıkla uçucu hale getirilemeyecek kadar büyük moleküllü ise sıvı kromatografisi yöntemi ile ayırma daha elverişlidir. Sıvı kromatografisinde asetonitril, su gibi birçok çözücü hareketli sıvı faz olarak kullanılmakta ve pompalarla basınç altında kolondan geçirilmektedir. Pompalar darbesiz ve kesiksiz akış sağlayacak özellikte olmalıdır. Hareketli sıvı faz kolonda tutulan maddelerin kolonda çıkış zamanını hızlandırır yani alıkonma sürelerini azaltır. Ayırmanın başarısı büyük oranda kolon seçimine bağlıdır. Kolonun uzunluğu artarsa ayrılma daha iyi olur, ancak bu durumda yüksek çalışma basıncı ve uzun süre gerektirir. Dedektörün görevi, kolondan çıkan sıvının bileşimini izlemek ve meydana gelen değişikliği kaydediciye iletmektir. En çok kullanılan dedektör tipleri mor ötesi (UV), görünür bölge fotometre detektörleridir (Keleş 1987). Şekil 2.7’de HPLC sisteminin şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 2.7 HPLC sistemi.

2.8.2 İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC)

İnce tabaka kromatografisi 1950 yılından beri kimyasalların ayrılmasında kullanılan geniş uygulama alanı bulunan bir tekniktir (Flow et al., 2000). Bu yöntemde çeşitli adsorban maddelerin cam, alüminyum veya plastik plaklar üzerine kaplanmasıyla elde edilen tabakalar kullanılmaktadır. Bu yöntemde silika jel, alümina, sellüloz, iyon değiştiriciler gibi adsorbanlar kullanılmaktadır. Bu yöntemde numune kromatografi kağıdının bir kenarına yakın bir noktaya damlatılır ve kağıt tankta bulunan solventin içine uygulama noktasına değmeyecek şekilde dikey olarak daldırılır. Solvent kağıtta ilerlerken bileşenleri farklı hızlarda sürükler. Ayrılan bileşenlerin tanınmaları alıkonma zamanı (R_f) değerlerine göre yapılır. R_f değeri maddenin ilerlediği uzaklık ile solventin ilerlediği uzaklığın oranı olup, sabit değildir; kullanılan solvent ve adsorbanın özelliği, hazırlanma şekli, numune cinsi ve numune miktarı, sıcaklık gibi etkenlerle değişebilir. (Şenelt, 1987).

Radyoaktif izotoplar, kimyasal maddelerin ayrılması için İnce Tabaka Kromatografisinde yaygın olarak kullanılan ajanlardır. Düşük miktarlardaki radyo işaretli bileşiklerin saptanması için en uygun sistem İnce Tabaka Radyo kromatografisidir. (TLRC) (Fried and Sherma, 1999).

2.9 Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Aletli analiz yöntemleri arasında çok yaygın olarak kullanılan yöntemlerin başında, spektroskopik yöntemler gelmektedir. Spektroskopik yöntemlerin uygulanması ile, maddenin elektromanyetik radyasyon (ışınım ya da bir başka deyişle ışın) yayması, elektromanyetik radyasyonu absorblaması (soğurması), saçması, saptırması ve dağıtması gibi, maddenin ışınım ile etkileşimi ve bu etkileşimin sonuçları analitik amaçlara yönelik olarak incelenir. NMR elektromanyetik radyasyonun (ışınım) absorplanması esasına göre şekillendirilmiş olup, analiz amacıyla uygulanmaktadır. Elektromanyetik radyasyon uzayda çok büyük hızlarda ilerleyen bir enerji şeklidir. Ancak uzayda dalgalar şeklinde yayılan her enerji elektromanyetik radyasyon değildir. Elektromanyetik radyasyon boşlukta enerjisini kaybetmeden yayılır. Görünür bölgedeki ışınlar, UV ve IR bölgelerinde bulunan ışınlar, X ışınları, γ ışınları, mikro dalgalar ve radyo dalgaları hep elektromanyetik radyasyona örnek gösterilebilecek ışınım tipleridir. Bunları birbirinden farklılaştıran özellikleri ise, frekanslarının (birim zamandaki titreşim sayısı) değişik olmasıdır. Bir madde kendi özelliğine bağlı olarak, üzerine düşürülen çeşitli dalga boylarındaki (ultraviyole ışınlarından, radyo dalgalarına kadar) ışıklardan bazılarını absorblar, bazılarıyla ise hiç ilişkiye girmez. İşte maddenin bu özelliğinden yararlanılarak yapısı ve konsantrasyonu tayin edilebilir. Manyetik Rezonans, dalga boyu 200-750 nm arasındaki ışınlarla çalışan aletlere; UV(ultraviyole)-Görünür Alan ve 2500-25000 nm dalga boylarındaki ışınlarla çalışan aletlere de; Infrared Spektrofotometresi adı verilir. Bu aletlerden yararlanılarak yürütülen analiz yöntemlerine de sırasıyla, NMR, UV-Görünür Alan ve IR-spektroskopileri denir. Nükleer manyetik rezonans spektroskopisi (NMR), moleküllerdeki atomların elektromanyetik ışınımın belli bir bölgesini absorblaması esasına dayanır. NMR Spektroskopisi bazı çekirdeklerin kendi etrafında dönmeleri sonucunda bir mıknatıs gibi hareket etmelerine dayanan ve çekirdeklerin manyetik özelliklerinin önem kazandığı bir absorpsiyon spektrometresi çeşitidir. Organik maddelerin yapı tayininde kullanılan önemli bir tekniktir. Bu metodla bir molekülde hidrojen ihtiva eden grupların sayıları yanında, bu gruba komşu olan gruplar da tespit edilebilmektedir. NMR Spektroskopisinde elektromanyetik radyasyon, radyo frekans alanında absorblanır. Absorpsiyon, molekülde bulunan bazı atom çekirdeklerinin bir fonksiyonudur. Bu absorpsiyonların grafiğe dökülmesi ile NMR spektrumu elde edilir. Absorpsiyon bantları "pik" adını alır. NMR spektrumuna bu pikler kaydedilir (Özden vd., 2004).

2.10 Lipofilite

Lipofilite kimyasal bileşikler için fizikokimyasal bir özelliktir. Kimyasalların sulu ve organik fazlar içeren iki fazlı sistemlerde davranışını belirler ve lipofilik maddeler yağda çözünme eğilimindedirler. Lipofilitenin etkili ilaç emilimi, dağılımı, metabolizması, eliminasyonu ve toksikolojik etkileri hakkında biyolojik sistemlerde etkisi olduğu bilinmektedir. Bileşiklerin lipofilitesi n-oktanol ve su bileşiklerin bölünme katsayısı olan Log P ile ifade edilir ve bu değer lipofilite ile doğru orantılıdır (Mrkvickova et al., 2006).

Güçlü hidrofobik etkileşimler sulu biyolojik ortamda proteinlerle (hedeflenen veya hedef olmayan) spesifik olmayan bir bağlanma ile sonuçlanabilir. Bir hidrofobik ilaç molekülü suya maruz kalan yüzey alanını azaltma eğilimine sahiptir. Hücre dışı veya hücre yüzeyine hedeflenen bileşenler için lipofiliteyi sınırlamak bileşenlerin her hücrenin biyolojik zarları üzerinden hedefi dışına çıkararak kolayca yayılmasını önlemek için uygun görülür. Bu nedenle, ilaç keşfi sırasında yeni moleküllerin tasarımına yardımcı olmak için bileşiğin lipofilitesi hakkı hakkında bilgi sahibi olmak önemlidir (Starek et al., 2013).

2.11 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Elektron mikroskobu görüntü oluşturmak için ışıktan daha çok elektronları kullanan bir mikroskoptur. SEM ile biyolojik botanik, hücre biyolojisi, tıp (Adli Tıp, Anatomi, Mikrobiyoloji, Biyokimya, Fizyoloji, Toksikoloji, Patoloji), madde bilimleri ve yeryüzü bilimlerinden elde edilen örnekleri 100.000 kez büyüterek yüzey yapılarını görüntülenebilir ve yüzeyde meydana gelen farklılıklar değerlendirilebilir. (Kapakin, 2006). Mikrokapsüllerin karakterize edilmesi işleminde elektron mikroskobunun yeri oldukça önemlidir. Elektron mikroskobu polimerik mikrokapsüllerin sadece görünümünün izlenmesi için değil, parçacık büyüklüğünün ve dağılımının da anlaşılmasına imkân kılar. Parçacık büyüklüğünün bilinmesi üretilen mikrokapsüllerin istenilen uygulama için uygun olup olmadığına karar verilmesi açısından gereklidir (Alay vd., 2009).

2.12 Zeta Boyut Ölçümü

Zeta potansiyeli, taneler arası itme veya çekme değerinin bir ölçüsüdür. Nanopartiküllerin zeta potansiyellerine bakılarak kararlılıkları ve topaklaşma

eğilimleri elde edilebilir. Zeta potansiyeli ± 60 mV üzerinde ise partiküller çok iyi seviyede kararlıdır, $\pm 20-30$ mV arasında ise kararlıdır. Sentezlenen nanopartiküller bu değerler aralığında değilse kararsızdır ve çökelme eğilimindedirler (Bueno-Tokunaga et al., 2015).

Işık saçılması, bilim, teknoloji ve nanoteknoloji alanlarında araştırma ve uygulama literatüründe sıklıkla yer almaktadır. (Xu, 2014). Dinamik Işık Saçılımı (DLS), parçacıkların çözelti ortamındaki hareketliliğini belirlediğinden yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir (Kaszuba et al., 2010). DLS, 1960 yılında lazerin icadından sonra kullanılmaya başlanmıştır ve bu metot ile parçacıkların zeta boyutu (parçacıkların çözelti ortamındaki boyutu) tespit edilebilmektedir. DLS metodunda, nanopartiküllere lazer ışığı gönderilir ve elektronlar fotonlara dönüştürülür. Oluşan titreşimlerden faydalanılarak boyuta ait veriler, Zeta-Sizer cihazıyla bilgisayar yazılım desteğinden faydalanılarak yorumlanır (Xu, 2014).

3. MATEYAL METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

İyot-131 (Na^{131}I) (Şifa Üniversitesi Hastanesi, Bornova, İzmir), İnce Tabaka Kromatografi kağıdı ITLC-Selüloz (Merck), Metanol (Merck), I3C (Sigma), PLGA (Sigma), n-oktanol (Merck), n-bütanol (Merck), Metanol (Merck), diklorometan (Ridcl-de-haen), iodojen (Fluka), dekstroz agar (Merck), Müller Hinton Agar (Merck), Müller Hinton Broth Agar (Merck), asetik asit (Merck), izopropil alkol (Merck), MCF-7 (meme adenokarsinoma epiteli) (Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Aydın), Caco-2 (kolon adenokarsinoma epiteli), (Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Aydın), PC3 (prostat karsinoma epiteli) (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi), Essential Medium (Mem Eagle) (Bio.Ind.), Dulbecco's MEM (Bio.Ind.), L-Glutamine (Bio.Ind.), Sodyum bikarbonat (Bio.Ind.), Essential amino acid (Bio.Ind.), Sodyum piruvat (Bio.Ind.), Fetal bovine serum (Bio.Ind.), Penisilin/ streptomisin (Bio.Ind.), Tripan mavisi (Bio.Ind.), PBS (Bio.Ind.), Tripsin EDTA (Bio.Ind.).

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

TLRe scanner (Bioscan AR2000, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), HPLC sistemi (Shimadzu, LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörlü) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Liyofilizatör (Labconco Free Zone 2.5 770, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), doz kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gamma sayım sistemi (RAD-501, E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Vorteks cihazı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C), Sıvı Sintilasyon dedektörü (Packard Tri-carb-1200, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı), CO_2 inkübatörü (Sanyo- MCO-20AIC CO_2 , E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), İnvrt Mikroskop (Leica Dm1l Trinokuler, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Laminar Flow Kabin (Nüve-LN-120, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Soğutmalı santrifüj (Hettich Marka Rotina 38 R Model, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Spektrofotometre (Thermo Varioscan, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü).

3.2 I3C'nin PLGA İle Enkapsülasyonu

I3C bileşimini PLGA ile enkapsüle etmek için Peltonen ve arkadaşlarının (Peltonen et al., 2002) uyguladığı yöntem kullanılmıştır. Bu işlem için, 2.5 mg I3C 0.3 mL suda çözülmüş ve üzerine olarak 0.3 mL etanol eklenmiştir. Ayrı bir behere alınan 25 mg PLGA üzerine 0.145 mL propilen glikol ve 1.2 mL kloroform eklenerek çözülmüştür. Daha sonra bu karışım I3C çözeltisi üzerine eklenmiştir. Oluşan dispersiyon % 70'lik 5 mL etanol üzerine eklenip, 5 dakika boyunca vortekslenmiştir. Bu basamaktan sonra, Heidolph Rotary evaporatörde 35 °C 35 rpm'de organik çözücüler uçurulmuştur. Şekil 3.1'de deney düzeneğine ait bir fotoğraf görülmektedir.



Şekil 3.1 Deney düzeneği.

3.3 I3C-PLGA Bileşiminin SEM Analizi

I3C-PLGA bileşiminin boyut ve yüzey morfolojisinin belirlenmesi için İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Araştırma Merkezinde bulunan SEM cihazına (Phillips XL-30 S FEG) örnek gönderilmiştir. Analiz için örnek katı olarak hazırlanarak üzerine metanol eklendi ve çelik plakalar üzerine damlatılmıştır. Analiz esnasında, parçacıkların kuru olması gerektiği için, metanolün uçması için yaklaşık 5 dakika beklendi ve SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4 I3C-PLGA Bileşiminin Zeta-Sizer İle Boyut Analizi

I3C-PLGA bileşiminin ortalama parçacık boyutları hakkında bilgi sahibi olmak üzere örneğin çözgen ortamında (500µg/ml etanol), Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsünde bulunan Malvern Nano-ZS cihazı ile boyut analizi gerçekleştirilmiştir.

3.5 I3C ve I3C-PLGA Bileşiklerinin HPLC Analizi

Bu basamak Anderson ve arkadaşlarının (Anderson et al., 2002) çalışmasındaki HPLC koşullarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

HPLC analizinde mobil faz olarak %70 lik Asetonitril (A) ve su (B) kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 30 µl, akış hızı 1 mL/ dak ve dalga boyu 254 nm olacak şekilde ayarlanmıştır. Analiz zaman programı, %15 asetronitril % 85 su olarak başlamıştır ve ilk yirmi dakikada % 60 asetronitril, 20-40 dakikada % 65 asetronitril ve 40-60 dakikada % 85 asetronitril ile bitecek şekilde ayarlanmıştır. Çizelge 3.1 de çalışma sırasında uygulanan HPLC koşulları verilmiştir.

Çizelge 3.1 I3C bileşiği için uygulanan HPLC analiz koşulları.

Kolon	GI sciences Inc. C18- ODS kolon		
Akış Hızı	1 mL / dak.		
Mobil Faz	% 70'lik asetronitril (A) – su (B)		
Dalga Boyu	254 nm		
Sıcaklık	25 °C		
Enjeksiyon	30 µL		
Zaman programı	Zaman	% Konsantrasyon (A)	% Konsantrasyon
	0.01	15	85
	20	60	40
	20-40	65	35
	60	85	15

Elde edilen I3C bileşiğine ait HPLC kromatogramı bölüm 4.3.1'de yer almaktadır. PLGA ile enkapsüle edilmiş I3C bileşiminin HPLC analizi için bölüm 3.3'deki prosedürden faydalanılarak aynı koşullarda gerçekleştirilmiş ve elde edilen pik PLGA-I3C olarak kodlanmış ve elde edilen HPLC kromatogramına bölüm 4.3.2'de yer verilmiştir.

3.6 I3C Bileşiminin İnaktif İyot ile İşaretlenmesi (^{127}I -I3C)

I3C bileşiminin inaktif iyot ile işaretlenmesi, I3C/KI/iyodojen miktarları 1:2:1 oranında hazırlanarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada 24 saatlik inkübasyon +4 °C’de ve karanlık ortamda gerçekleştirilmiştir.

3.7 ^{127}I -I3C Bileşiminin NMR Yöntemi ile Yapı Analizi

I3C bileşiği karbon ve proton NMR ile yapı analizi Erzurum Atatürk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünde gerçekleştirilmiştir. NMR sonuçları bölüm 4.3 de gösterilmiştir.

3.8 I3C ve I3C-PLGA Bileşiklerinin ^{131}I ile Radyoışaretleme Çalışmaları (^{131}I -I3C)

3.8.1 İodojen tüplerinin hazırlanması

1 mg iodojen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril) tartılmış ve cam bir tüp içerisinde 1 mL diklorometan ile çözülmüş ve dört farklı deney tüpüne her tüp içerisinde 250 μL olacak şekilde aktarılmıştır. Bu işlemden sonra diklorometan buharlaşana kadar bu tüpler bekletilmiştir. Bekletilme sırasında belli aralıklarla tüpler çalkalanmıştır. Daha sonra diklorometanın tamamen buharlaşması sağlanmıştır. Bunun sonucunda iodojen cam tüplerin çeperini bir film tabakası şeklinde kaplamıştır. 250’şer μg ’lık dört adet tüp, içerisindeki iodojenin kullanılma anına kadar + 4 °C’de saklanmıştır

3.8.2 I3C bileşiminin ^{131}I ile radyoışaretlenmesi (^{131}I -I3C)

1.2 mg I3C 1.2 ml etanolde çözüldüden sonra oluşan stok çözeltiden 40 μg I3C olacak şekilde 40 μL alınıp ve 100 μL su ile seyreltildi. Daha önce hazırlanan içerisinde 250 μg iodojen içeren iodojen tüpüne konuldu. Üzerine aktivitesi daha önce doz kalibraöründe ölçülmüş olan aktivitesi 0.1 mCi olan ^{131}I ilave edilmiştir ve oda sıcaklığında 30 dakikalık inkübasyon süresinden sonra TLRC yöntemi ile işaretli bileşiğin kalite kontrolü yapılmıştır.

3.8.3 PLGA ile Enkapsüle Edilmiş I3C Bileşiminin ¹³¹I ile radyoişaretlenmesi (¹³¹I-I3C-PLGA)

100 µl etanolde 50 µg I3C-PLGA bulunan stok çözelti ¹³¹I ile işaretlenmiştir ve bölüm 3.6.2’de açıklanan prosedür uygulanmıştır.

3.9 Radyoişaretli I3C (¹³¹I-I3C), Radyoişaretli I3C-PLGA (¹³¹I-I3C-PLGA) Bileşiklerinin, diğer Radyoaktif Bileşenlerin [¹³¹I ve Yükseltgenmiş ¹³¹I (Yük. ¹³¹I)] TLRC Yöntemi Kullanılarak Kalite Kontrolü

TLRC yöntemi ile ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerinin kalite kontrol çalışmalarında sabit faz olarak 10 cm × 1.5 cm boyutlarında selüloz TLC şeritler, dört farklı banyo çözeltisi de mobil faz olarak kullanılmıştır. 30 dakikalık inkübasyon süresinden sonra ¹³¹I-I3C çözeltisinden mikro pipet yardımıyla tabandan 0.5 cm yukarıda şekilde uygulama noktası belirlenip damlatma yapılmıştır. Her örnekte kontrol için 2’şer adet TLC şerit kullanılmıştır. Damlatma işleminin öncesinde dengeye gelmesi için TLC tankına konulan banyo çözeltilerinin 20 dakika bekletilmiştir ve bu banyoların içerikleri: n-bütanol / bidistile su / asetik asit (4:2:1) (Banyo1), izopropilalkol / n-bütanol / 0.2 N NH₄OH (4:2:1) (Banyo2) ve izopropilalkol / n-bütanol / 0.2 N NH₄OH (2:1:1) (Banyo3), n-bütanol / etil alkol / 0.2 N NH₄OH (5:2:1) (Banyo4) şeklindedir.

Damlatma yapılan TLC şeritleri içerisinde banyo çözeltisi bulunan tanklara uygulama noktası çözeltiliye değmeyecek şekilde tek seferde yerleştirilmiştir. Ve hareketli fazın yeterince ilerlemesi beklenmiştir. Daha sonra TLC şeritler tanklardan çıkarılarak hareketli fazın son yürüdüğü nokta işaretlenip çeker ocakta kurutulmuştur. Kurutulan TLC şeritlerinde hareketli fazın en son yürüdüğü nokta cetvelle ölçülüp bant ile kaplandıktan sonra Bioscan AR2000 TLRC tarayıcı ile her birine ait radyo kromatogramlar alınmıştır. Kromatogramlardan faydalanılarak R_f değerleri ve % bağlanma verimleri hesaplanmıştır.

3.10 Lipofilite Çalışması

¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerinin lipofilite çalışması için, 0.3 mL n-oktanol ve 0.3 mL pH=7 tamponu bir santrifüj tüpüne konulduktan sonra üzerine 0.1 mL ¹³¹I-I3C eklenmiştir. Daha sonra karışım 1 dakika boyunca vortekslenerek 2500 rpm’de 30 dakika santrifüjlenmiş, üst ve alt fazın oluşması sağlanmıştır. Bu

fazlardan 0.1 mL örnek alınarak, Cd(Te) dedektöründe sayımlar alınmıştır. Bu işlem 3 kez tekrar edilerek teorik değerlerle kıyaslanmıştır. Elde edilen lipofilite çalışmaları bölüm 4.5'te yer almaktadır.

3.11 ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA Bileşiği için Stabilite Çalışması

¹³¹I-I3C bileşiğinden 30., 60., 90., 120., 180., 240. ve 1440. dakikalarda, TLC şeritlere mikro pipet yardımıyla damlatma yapılmıştır. TLC şeritleri banyo 1, banyo 2 ve banyo 3 kodlu banyo çözeltisine daldırılarak hareketli fazın belli bir noktaya ilerlenmesi beklenmiş ve radyoışaretleme kalite kontrolü TLRC yöntemi ile yapılmıştır. Kromatogramlardan yararlanılarak % bağlanma verimlerinin zamana karşı değişimleri incelenmiştir ve elde edilen sonuçlara ait bilgiler bölüm 4.6'da açıklanmıştır.

3.12 Hücre Kültürü Çalışmaları

3.12.1 MCF-7, Caco-2, PC3 hücre dizinlerinin hazırlanması

MCF-7, Caco-2, PC3 hücreleri, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Bilim Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden temin edilmiştir.

Çalışmada kullanılan PC3 hücreleri Dulbecco's MEM 2 mM L-glutamin 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum piruvat ve % 5 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda, Caco-2 hücreleri minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esansiyel amino asitler, 1 mM sodyum piruvat ve % 20 FBS'den oluşan medyumda, MCF-7 hücreleri, minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esansiyel amino asitler, 1 mM sodyum piruvat ve % 10 FBS'den oluşan medyumda üretilmiştir.

Bu işlemde kullanılacak hücreler flaskların % 80'ini kaplayacak şekilde üretildikten sonra % 0.25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu ile enzimatik yöntem yoluyla flask tabanından kaldırılmış, çalışmaların yapılacağı 24 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 37 °C'de % 5 CO₂'de çalışma zamanına kadar bekletilmiştir. Kullanılmayacak olan hücreler ise % 5 DMSO içeren medyumları içine koyularak - 80 °C'de dondurulup, - 190 °C'de sıvı azot içinde saklanmıştır.

3.12.2 ^{131}I , $^{131}\text{I-I3C}$ ve $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiklerinin MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi

Bu basamakta $^{131}\text{I-I3C}$ ve $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiklerinin MCF-7, Caco-2, PC-3 hücrelerinin üzerinde tulumunu incelemek üzere MCF-7, Caco-2, PC-3 hücrelerinin ekimi yapıp, uygun koşullarda çoğaltılmıştır. Yeterli miktarda çoğalan hücreler 24'lük plakalara ekimi yapılmıştır. Çalışmada incelenecek zaman parametreleri 30 dakika, 60 dakika, 120 dakika ve 240 dakika olarak belirlemiştir. Yeterli tekrar sayısına ulaşılması amacıyla; her hücre hattındaki her zaman parametresi için 3'er kuyucuk kullanılmıştır. Her kuyucuk başına I3C ve I3C-PLGA miktarı 1 $\mu\text{g/mL}$ ve radyoaktivite miktarı 1 $\mu\text{Ci/mL}$ olacak şekilde belirlenmiştir. $^{131}\text{I-I3C}$ ve $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiklerine 14 ml besiyer eklenerek vortekslenmiş ve plakalardaki kuyucuklara eklenmeden önce kuyucuklardaki mevcut besiyerler kompresör ile çekilmiştir. Kuyucuklar ölü hücrelerin ortamdaki uzaklaştırılması amacıyla serum fizyolojik (SF) ile 2'şer kez yıkanmıştır. Yıkama işleminin ardından 0.5 ml $^{131}\text{I-I3C}$ içeren besiyer ve 0.5 mL $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ içeren besiyer plakalardaki kuyucuklara ilave edilmiş, zaman parametresi dolana kadar 37 °C etüvde bekletilmiştir.

Herbir zaman parametresi dolduğunda (30, 60, 120, 240. dakika) hücreler üzerindeki radyoişaretli besiyer ortamı atılmış, yüzeyden kalkan hücrelerin atılması amacıyla SF ile 2'şer kez kuyucuklar yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra 200'er μL Ripa tampon çözeltisi ile hücreler kuyucuk yüzeyinden kaldırılmıştır.

Hücreler üzerinde radyoaktivite tulumunun tespiti için, efendorfa herbir kuyucuktan 0.1'er mL hücre içeren çözelti alınarak konmuştur ve üzerine 0.9'ar mL sintilasyon sıvısı ilavesi yapılmıştır. Radyoişaretli örnekler Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı'nda bulunan Packard Tri-carb-1200 sıvı sintilasyon dedektöründe sayılmıştır. Daha önce Ripa Tamponu ile kuyucuk yüzeyinden kaldırılan hücre süspansiyonlarından 25 μL alınarak Bicinchoninic asit ile muamele edilmiştir. Bu işlemle, hücreleri patlatıp mevcut proteinin ortama çıkmasını sağlamıştır. 30 dakika 37 °C inkübe edildikten sonra radyoaktivitenin 562 nm'de spektrofotometrik yöntem ile protein tayini gerçekleştirilmiştir. Protein tayininin amacı sintilasyon dedektöründen alınan sonuçlar protein miktarına oranlanarak kuyucuk başına düşen hücreyi tespit etmek ve buradan yola çıkarak birim hücredeki spesifik radyoaktiviteyi tespit etmektedir. Yapılan her çalışma iki farklı günde tekrarlanmış ve her bir parametre için 6'şar kuyucukta çalışılarak deneylerin tekrarlanabilirliği gözlemlenmiştir.

3.12.3 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin 4-[3-(4-iodophenyl) -2-(4-nitrophenyl) -2H-5-tetrazolio] - 1,3-benzene disulfonate (WST) kiti kullanılarak MCF-7, Caco-2 ve PC3 üzerinde sitotoksitesinin belirlenmesi

MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerini ayrı ayrı içeren süspansiyondan 96 kuyucuklu mikroplate'in her bir kuyucuğuna 5×10^4 hücre / mL olacak şekilde hücreler hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 μ L hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara beş farklı (10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} nM) konsantrasyonda steril SF ile hazırlanan I3C ve I3C-PLGA içeren çözelti eklenmiştir. Negatif kontrol olarak, kuyucuklara hücre ve reaktif içermeyen besiyer eklenmiştir. Hücrelerin bulunduğu plaka 37 °C'de % 5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. Çalışmada deneyin tekrarlanabilirliğini kontrol etmek amacıyla, her bir parametre 3'er kez tekrar edilmiştir. İnkübasyonun 48. saatinde her kuyucuğa 10'ar μ L WST solüsyonu eklenerek 4 saat daha inkübe edilmiştir. 450 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri, spektrofotometre kullanılarak okunmuştur. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edilmiştir ve aşağıdaki formülden yararlanılarak % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

$$[(\text{ölçülen absorbans değeri/kontrol değeri}) \times 100]$$

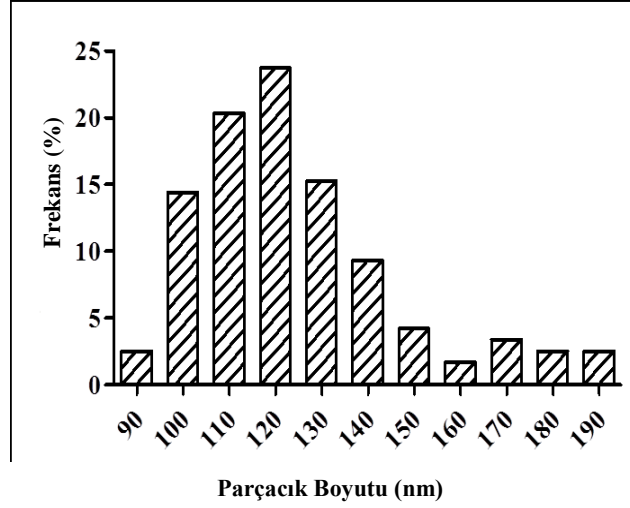
3.13 İstatiksel Analizler

Hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçların istatistik analizleri ise GraphPad istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Her bir parametre seviyesi için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. Hücre kültürü çalışmalarına ait istatistiksel analiz sonuçları değerlendirilirken bağlanma değerleri arasında 0.95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak tespit edilmiştir. P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

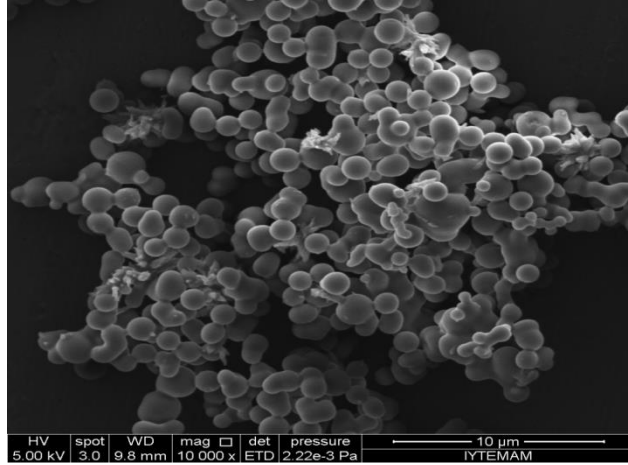
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 I3C-PLGA Bileşiğine Dair SEM Analizi Sonuçları

I3C-PLGA bileşiğinin SEM analizi sonuçları sırasıyla şekil 4.1 ve 4.2’de yer almaktadır.



Şekil 4.1 I3C-PLGA Bileşiğinin görüntü kesitindeki % Frekans-Boyut Grafiği.



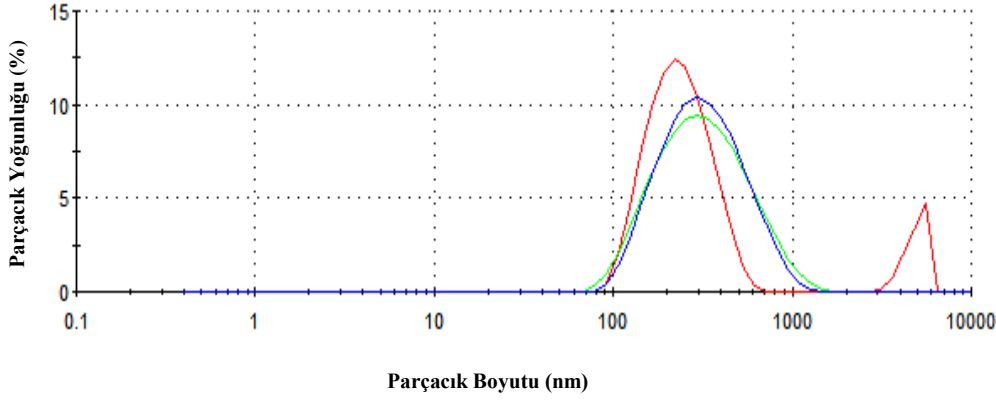
Şekil 4.2 I3C-PLGA'nın 10 000 kat büyütmede SEM Görüntüsü.

Şekil 4.1’de I3C-PLGA bileşiğinin görüntü alınan kesitindeki parçacıkların boyutu yer almaktadır. Bu kesitte parçacık boyutları 90 ile 190 nm arasında

değişmektedir. I3C-PLGA bileşiğinin SEM görüntüsüne ise şekil 4.2’de yer verilmiştir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde parçacık boyutunun yaklaşık olarak ortalama 124.2 nm olduğu görülmüştür.

4.2 I3C-PLGA Bileşiğinin Zeta-Sizer İle Boyut Analizi

I3C-PLGA bileşiğinin zeta-sizer cihazı ile yapılan boyut analizi sonucu şekil 4.3’te yer almaktadır.



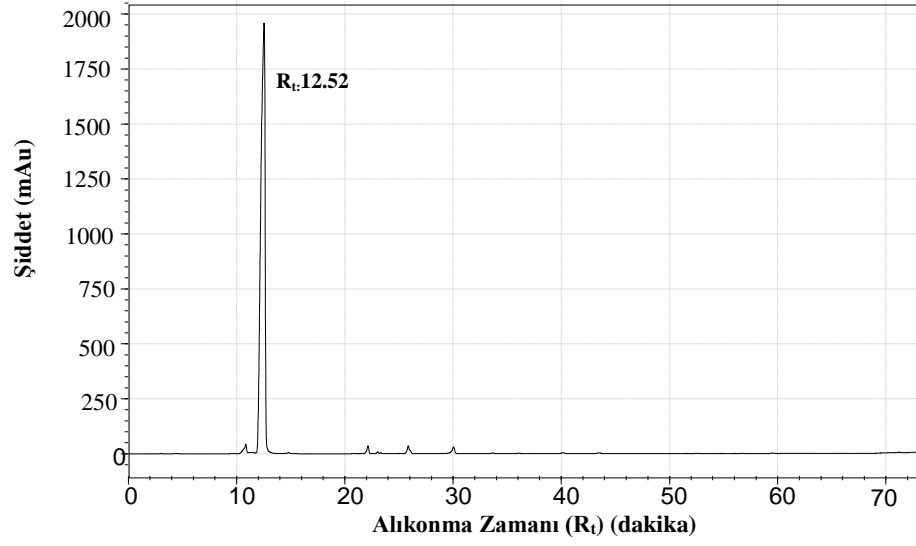
Şekil 4.3 I3C-PLGA bileşiğinin zeta-sizer ile boyut analizi sonucu.

Şekil 4.3 incelendiğinde I3C-PLGA bileşiğinin bulunduğu çözeltide yaklaşık 100 nm’den 1000 nm’ye kadar parçacıkların bulunduğu görülmektedir. En yoğun olarak bulunan parçacıkların boyutu ise 269.6 nm olarak saptanmıştır. Zeta potansiyeli, $\pm 20-30$ mV arasında olan partiküller kararlıdır (Bueno-Tokunaga et al., 2015). I3C-PLGA bileşiğinin zeta potansiyeli incelendiğinde ise; bu değer 24.6 mV olarak görülmüş ve çözelti formunda kararlı olduğu saptanmıştır.

4.3 HPLC Analizi Sonuçları

4.3.1 I3C Bileşiğine Ait HPLC Sonuçları

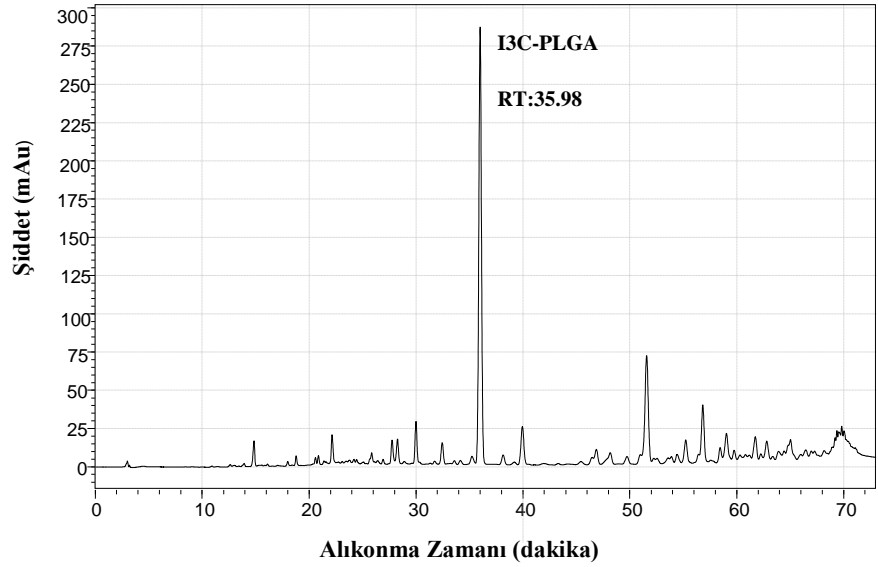
Etanolde çözülmüş I3C bileşiğine ait HPLC kromatogramı şekil 4.4’ de verilmiştir. Elde edilen kromatograma göre I3C bileşiğine ait olduğu tanımlanan pikin alı konma zamanı 12.52 olarak görülmüştür.



Şekil 4.4 I3C bileşiğine ait HPLC kromatogramı.

4.3.2 I3C-PLGA Bileşiğine Ait HPLC Sonuçları

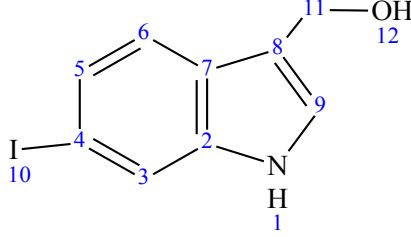
I3C-PLGA bileşiğinin HPLC analizinde aynı prosedür (Anderton et al.,) uygulanmıştır. Alıkonma zamanı 35.98 olarak görülen pik I3C-PLGA pikine ait olduğu belirlenmiştir. Elde edilen kromatograma şekil 4.5’de yer verilmiştir.



Şekil 4.5 I3C-PLGA bileşiğine ait HPLC kromatogramı.

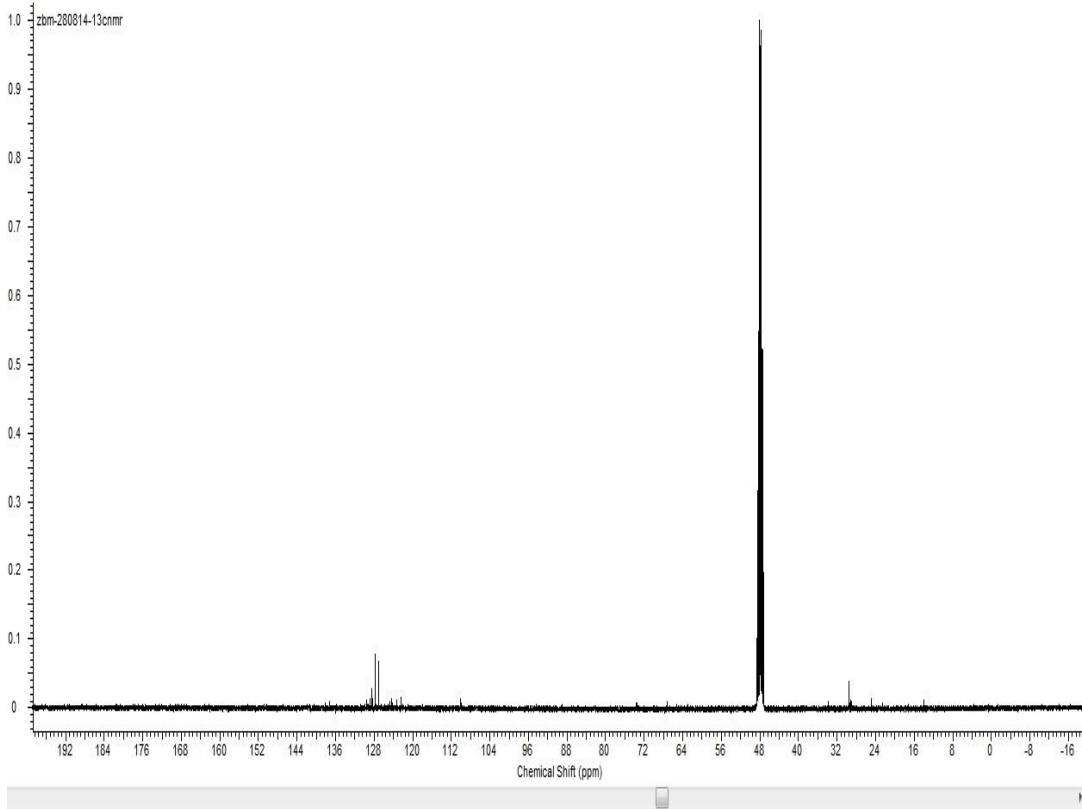
4.4 ^{127}I -I3C Bileşiğinin NMR Yöntemi ile Yapı Analizi Sonuçları

Şekil 4.6'da I3C bileşiğinin ACD/LogP Algorithm (Versiyon 12.01) bilgisayar programında çizilen moleküler formülü yer almaktadır.

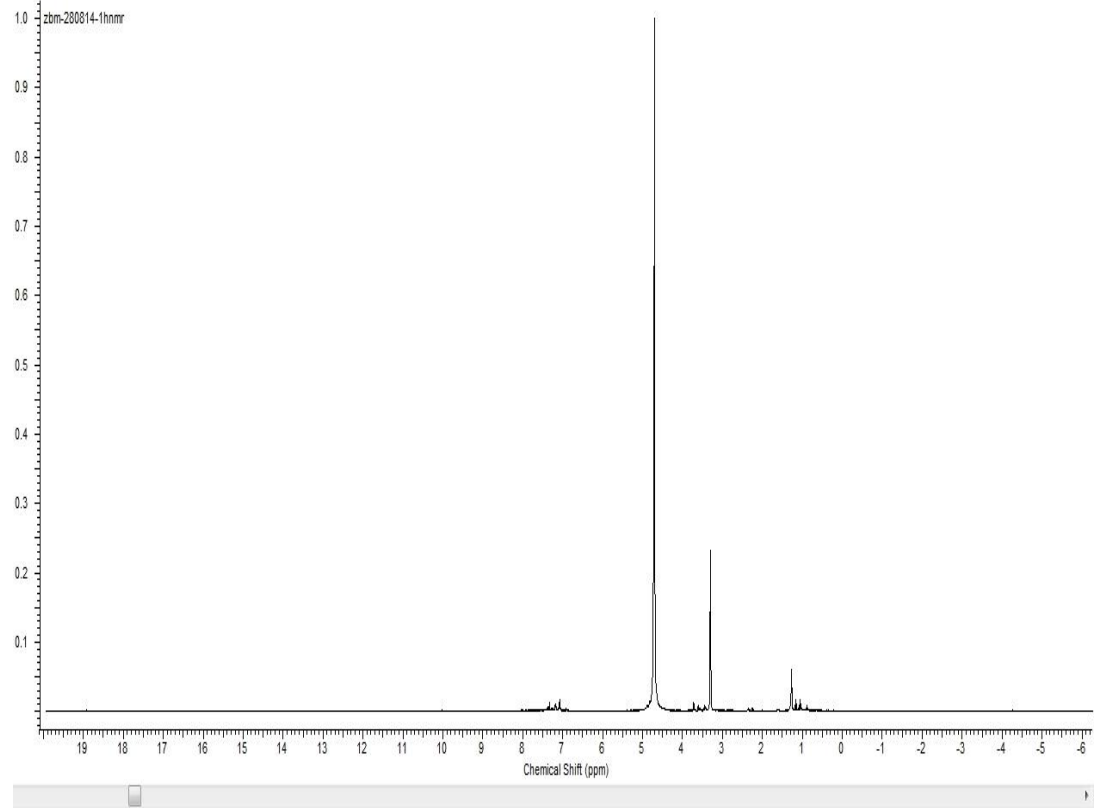


Şekil 4.6 I3C bileşiğinin moleküler formülü.

Şekil 4.7 ve 4.8'de ^{127}I ile işaretli I3C bileşiğinin (^{127}I -I3C) bileşiğinin sırasıyla ^{13}C -NMR ve ^1H -NMR spektrumları görülmektedir



Şekil 4.7 ^{127}I -I3C bileşiğine ait ^{13}C -NMR spektrumu.



Şekil 4.8 $^{127}\text{I-I3C}$ bileşiğine ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

$^{127}\text{I-I3C}$ bileşiğine ait $^{13}\text{C-NMR}$ ve $^1\text{H-NMR}$ teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri sırasıyla çizelge 4.1 ve 4.2’de verilmiştir. Bileşiğin teorik NMR σ (ppm) değerleri ACD/LogP Algorithm bilgisayar programında hesaplanmıştır. Çizelge 4.1 ve 4.2’de I3C bileşiğine ait sırasıyla $^{13}\text{C-NMR}$ ve $^1\text{H-NMR}$ teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri yer almaktadır.

Karbon Numarası	σ (ppm)	
	Teorik	Deneysel
2	138.02	138.10
3	111.29	110.04
4	125.98	127.04
5	130.30	129.00
6	94.36	94.35
7	130.30	129.60
8	121.95	121.10
9	122.80	122.40
11	56.48	58.55

Çizelge 4.1 $^{127}\text{I-I3C}$ bileşiğine ait I3C-NMR teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri.

Karbon Numarası	σ (ppm)	
	Teorik	Deneyisel
3	7.37	7.33
4	6.87	6.89
5	7.27	7.26
9	6.90	6.91
11	4.70	4.71

Çizelge 4.2 ^{127}I -I3C bileşiğine ait ^1H -NMR teorik ve deneysel σ (ppm) değerleri.

Çizelge 4.1 ve 4.2 incelendiğinde teorik ve deneysel verilerin birbirine çok yakın olduğu görülmüş ve deneysel çalışmalarda kullanılan I3C'nin yapısının değişmediği görülmüştür.

4.5 Radyoışaretleli bileşiklerin (^{131}I -I3C, ^{131}I -I3C-PLGA) ve Diğer Radyoaktif Bileşenlerin [^{131}I ve Yükseltgenmiş ^{131}I (Yük. ^{131}I)] İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Sonuçları

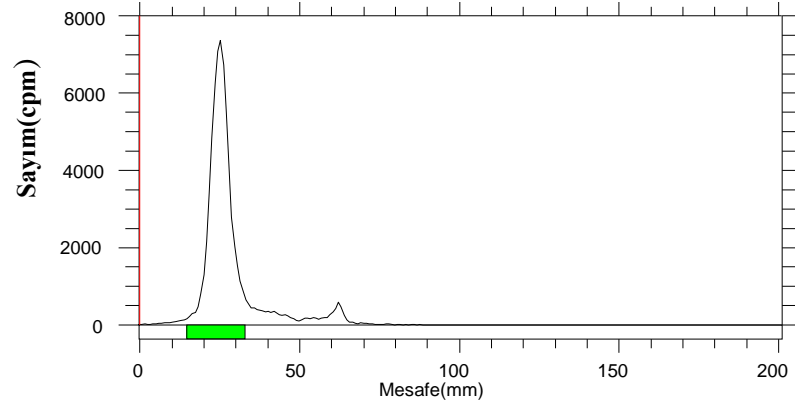
En yüksek radyoışaretleme verimi ortalama 99.59 ± 1.02 (n=6) ile banyo 1 çözelti sistemine aittir. Çizelge 4.3'te ^{131}I , yükseltgenmiş iyot (Yük. ^{131}I) ve ^{131}I -I3C bileşiğine ait R_f değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3 Banyo çözelti sistemlerinde ^{131}I , Yük. ^{131}I ve ^{131}I -I3C bileşiğine ait R_f değerleri

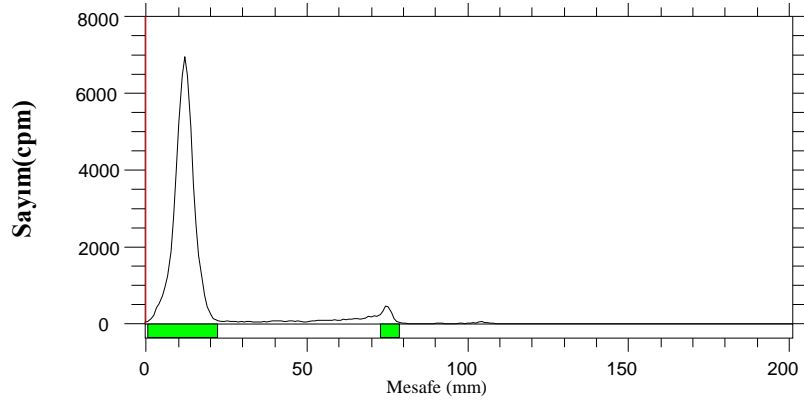
Banyo Çözelti Sistemi	R_f		
	^{131}I	Yük. ^{131}I	^{131}I -I3C
Banyo 1	0.40	0.18	0.99
Banyo 2	0.66	0.122	0.66

Çizelge 4.3 değerlendirildiğinde banyo 2 çözelti sistemindeki ^{131}I ve ^{131}I -I3C bileşiğine ait R_f değerleri çakışmaktadır. Banyo 1 çözeltisinde R_f değerleri, ^{131}I için 0.40, Yük. ^{131}I için 0.18, ^{131}I -I3C için 0.99 olarak hesaplanmıştır.

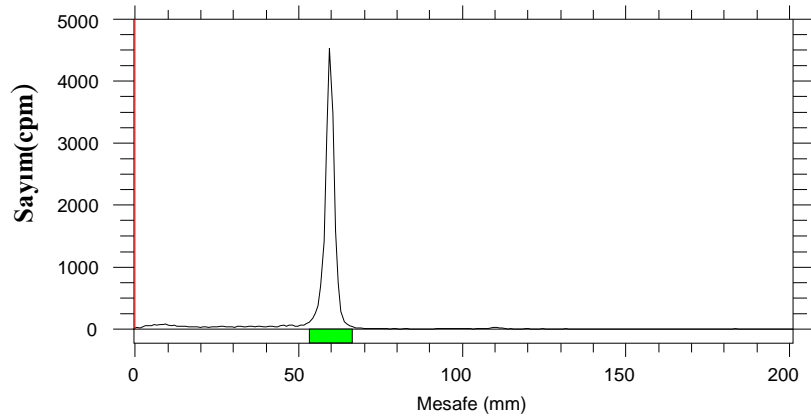
Banyo 1 çözelti sistemi kullanılarak, ^{131}I , Yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -I3C bileşiklerine ait elde edilen TLRC kromatogramları şekil 4.9, 4.10, 4.11'de yer verilmiştir ve I3C bileşiğine ait R_f değerinin ^{131}I ve Yükseltgenmiş ^{131}I 'in R_f değerlerinden farklı olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.9 ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.10 Yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.11 ^{131}I -IBC Bileşiğine ait TLRC kromatogramı.

4.5.1 ^{131}I -I3C-PLGA ve Diğer Radyoaktif Bileşenlerin [^{131}I ve Yükseltgenmiş ^{131}I (Yük. ^{131}I)] İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Sonuçları

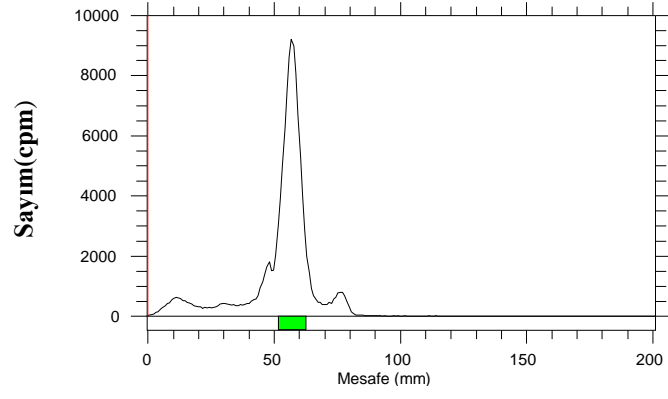
I3C-PLGA bileşiğinin ^{131}I ile radyoişaretlenerek TLRC yöntemi ile kalite kontrol çalışmasında banyo 1 ve banyo 3 banyo çözeltileri kullanılmıştır. İşaretleme sırasında en optimum koşulu sağlayan banyo 3 çözeltisi olarak görülmüş ve radyoişaretleme verimi ortalama $99,35 \pm 1,34$ olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.4 Banyo çözelti sistemlerinde ^{131}I , Yük. ^{131}I ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait R_f değerleri.

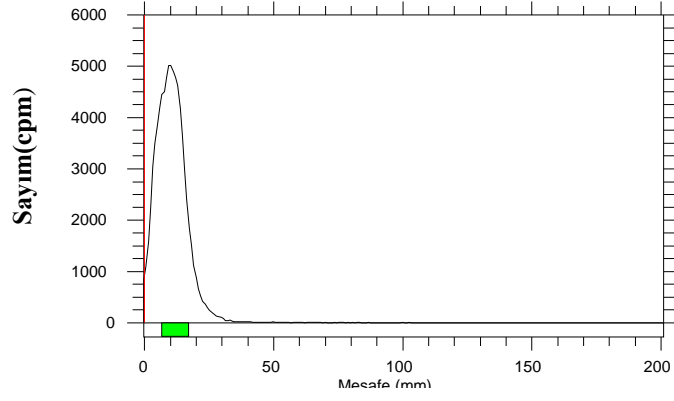
Banyo Çözelti Sistemi	R_f		
	^{131}I	Yük. ^{131}I	^{131}I -I3C-PLGA
Banyo 1	0.54	0.25	0.24
Banyo 3	0.69	0.11	0.27

Çizelge 4.4 incelendiğinde banyo 1'e ait R_f değerleri gözden geçirildiğinde yükseltgenmiş iyoda ait R_f değeri ile ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait R_f değerinin birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Banyo 3 çözeltisinde R_f değerleri ^{131}I için 0.69, yükseltgenmiş ^{131}I için 0,11 ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiği için 0.27 olarak saptanmıştır. Banyo 3 çözeltisinde R_f değerlerinin farklılığı iyodun başarıyla yükseltgenerek I3C-PLGA bileşiğine bağlandığını ve radyoişaretleme işleminin gerçekleştiğini göstermektedir.

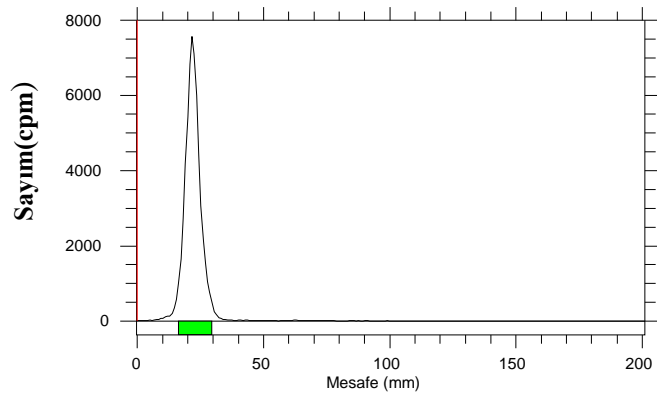
Banyo 3 çözelti sistemine ait TLRC kromatogramları ^{131}I , Yükseltgenmiş ^{131}I ve ^{131}I -I3C bileşiklerine ait elde edilen TLRC kromatogramları sırasıyla şekil 4.12, 4.13 ve 4.14'de gösterilmiştir.



Şekil 4.12 ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.13 Yükseltgenmiş ^{131}I 'e ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.14 ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait TLRC kromatogramı.

4.6 Lipofilite Çalışması Sonuçları

Çizelge 4.5’de I3C ve ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerine ait deneysel ve ACD/Labs logP Algorithm programı (Versiyon 12.01) ile elde edilen teorik lipofilite değerleri verilmiştir.

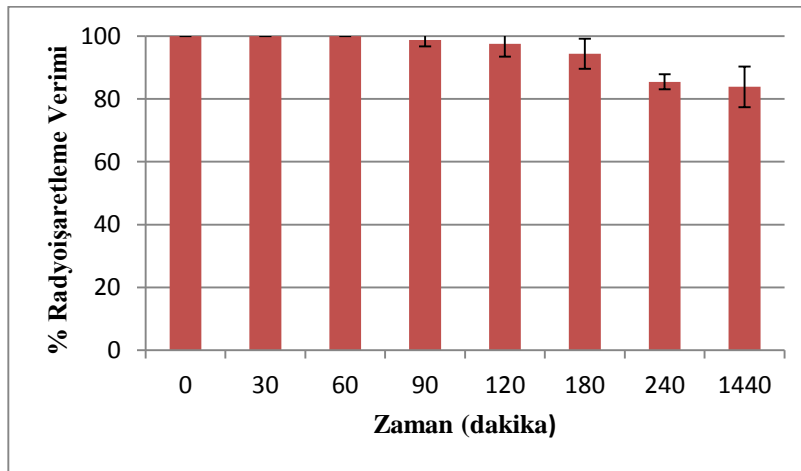
Çizelge 4.5 ¹³¹I-I3C ve¹³¹I-I3C-PLGA bileşiğine ait teorik ve deneysel lipofilite değerleri.

Bileşik	LogP	
	Teorik	Deneysel
I3C	0.96±0.23	-
¹³¹ I-I3C	1.99±0.33	1.03±0.14
¹³¹ I-I3C-PLGA	-	-1.76±0.24

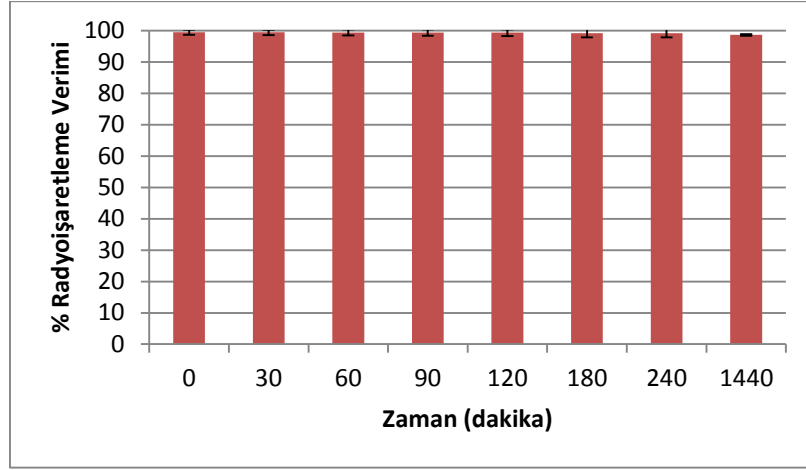
Sonuçlar incelendiğinde I3C ve ¹³¹I-I3C bileşiklerinin teorik logP değerlerinin sırasıyla 0.96±0.23 ve 1.99±0.33 olduğu ve ¹³¹I’in, I3C bileşiğinin lipofilitesini artırdığı görülmüştür. İyodun lipofiliteyi arttırdığına işaret eden birçok veri mevcuttur (Muftuler et al., 2008; Yeşilağaç et al., 2011; Muftuler et al., 2011; Aslan et al., 2012; Ünak et al., 2012). Deneysel olarak incelendiğinde ¹³¹I-I3C bileşiğine ait logP değeri 1.03±0.14 olarak görülmüştür. ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiğinin logP değeri incelendiğinde ise PLGA’nın bileşiğin lipofilik karakteri azalttığı ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiğinin hidrofilik özellik gösterdiği belirlenmiştir.

4.7 Stabilite Çalışması Sonuçları

Şekil 4.15 ve 4.16’da ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerine ait % radyoışartleme veriminin belirli zaman aralıklarındaki değişimini içeren grafik verilmiştir.



Şekil 4.15 ¹³¹I-I3C bileşiğine ait stabilite sonuçları.



Şekil 4.16 ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğine ait stabilite sonuçları.

Grafikler değerlendirildiğinde ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin 1440. dakikaya kadar stabilitesini koruduğu görülmektedir. Sonuçlar incelendiğinde ^{131}I -I3C bileşiğinin radyoışaretleme veriminden 90. dakikaya kadar % 100 iken, 90. dakikada 98.81, 120. dakika 97.63, 180. dakikada 94.47 ve 240 ve 1440. dakikalarda yaklaşık % 85 civarında olduğu görülmüştür. ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğinde ise ilk radyo işaretleme veriminden 1440. dakika kadar radyoışaretleme verimi yaklaşık % 99 civarında iken, 1440. dakikada radyoışaretleme veriminin % 98.66 olduğu saptanmıştır. Sonuçlar karşılaştırıldığında PLGA'nın stabiliteyi artırdığı ve 1440. dakikada bile ^{131}I -I3C-PLGA bileşiğinin kararlılığını koruduğu belirlenmiştir.

4.8 Hücre Kültürü Çalışması Sonuçları

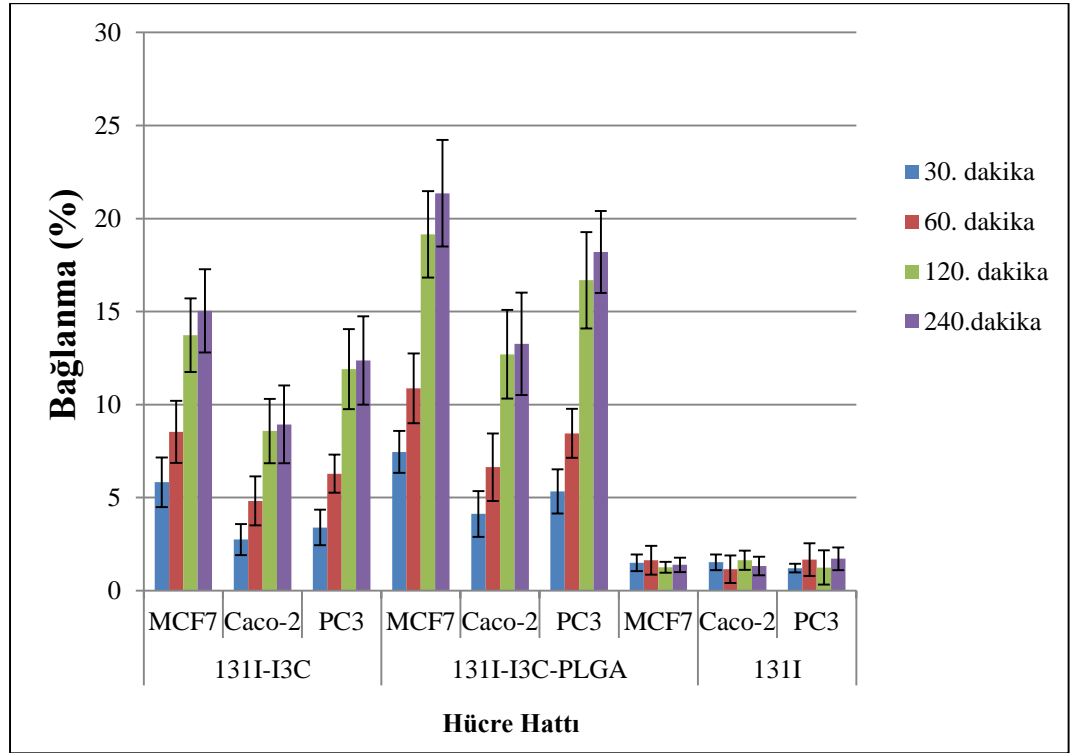
4.8.1 ^{131}I , ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması sonuçları

^{131}I , ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması % bağlanma değerleri çizelge 4.6'da yer almaktadır.

Çizelge 4.6 ^{131}I , ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

^{131}I - % Bağlanma Verimi			
Hücre Hattı			
Zaman (dakika)	MCF-7	Caco-2	PC3
30	1.49±0.45	1.52±0.42	1.20±0.23
60	1.63±0.78	1.14±0.74	1.66±0.88
120	1.25±0.29	1.63±0.51	1.24±0.92
240	1.38±0.39	1.32±0.50	1.71±0.61
^{131}I -I3C - % Bağlanma Verimi			
Hücre Hattı			
Zaman (dakika)	MCF-7	Caco-2	PC3
30	5.82±1.34	2.74±0.83	3.39±0.96
60	8.53±1.67	4.82±1.32	6.28±1.02
120	13.72±1.98	8.58±1.73	11.90±2.15
240	15.04±2.24	8.93±2.09	12.37±2.38
^{131}I -I3C-PLGA- %Bağlanma Verimi			
Hücre Hattı			
Zaman (dakika)	MCF-7	Caco-2	PC3
30	7.45±1.13	4.12±1.23	5.33±1.19
60	10.87±1.88	6.63±1.82	8.45±1.31
120	19.15±2.32	12.70±2.38	16.68±2.59
240	21.36±2.87	13.26±2.75	18.20±2.20

^{131}I , ^{131}I -I3C ve ^{131}I -I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki % bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi grafiği şekil 4.17'de yer almaktadır.



Şekil 4.17 ^{131}I , $^{131}\text{I-I3C}$ ve $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi grafiği.

Çizelge 4.6 ve şekil 4.17 değerlendirildiğinde ^{131}I 'in MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücre hatlarındaki bağlanma etkinliğinin % 2'in altında olduğu ve zamanla değişiminde önemli ölçüde bir farkın olmadığı görülmektedir. $^{131}\text{I-I3C}$ bileşiği incelendiğinde MCF-7 hücre hattında 30. dakika bağlanma verimi yaklaşık % 6 civarındayken bu değer zamanla artarak 240. dakikada % 15 civarına ulaşmıştır. Caco-2 ve PC3 hücre hatlarındaki % bağlanma verimlerine bakıldığında ise 30. dakikada bağlanma verimi yaklaşık %3 civarındayken, bu değer zamanla artarak 240. dakikada Caco-2 hücre hattında %8, PC3 hücre hattında 12 civarında olduğu görülmektedir. $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiğinde % bağlanma veriminin tüm hücre hatlarında $^{131}\text{I-I3C}$ bileşiğine göre daha yüksek olduğunu ve zamanla arttığı görülmekte, 240. dakikada bu değerlerin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücre hatlarında sırasıyla yaklaşık %21, %13 ve %18 civarında olduğu görülmüştür.

Bu sonuçlar incelendiğinde ^{131}I 'in tüm hücre hatlarında bağlanma etkinliğinin çok zayıf olduğu ve anlamlı bir farkın olmadığı, I3C bileşiğinin PLGA ile enkapsülasyonunun bağlanma etkinliğini önemli ölçüde artırdığı görülmektedir. $^{131}\text{I-I3C}$ ve $^{131}\text{I-I3C-PLGA}$ bileşiklerinin tüm hücre hatlarındaki

tutulununun 240. dakikada en yüksek % bağlanma verimine ulaşması ile bu zaman değeri optimum bağlanma etkinliği zamanı olarak belirlenmiştir.

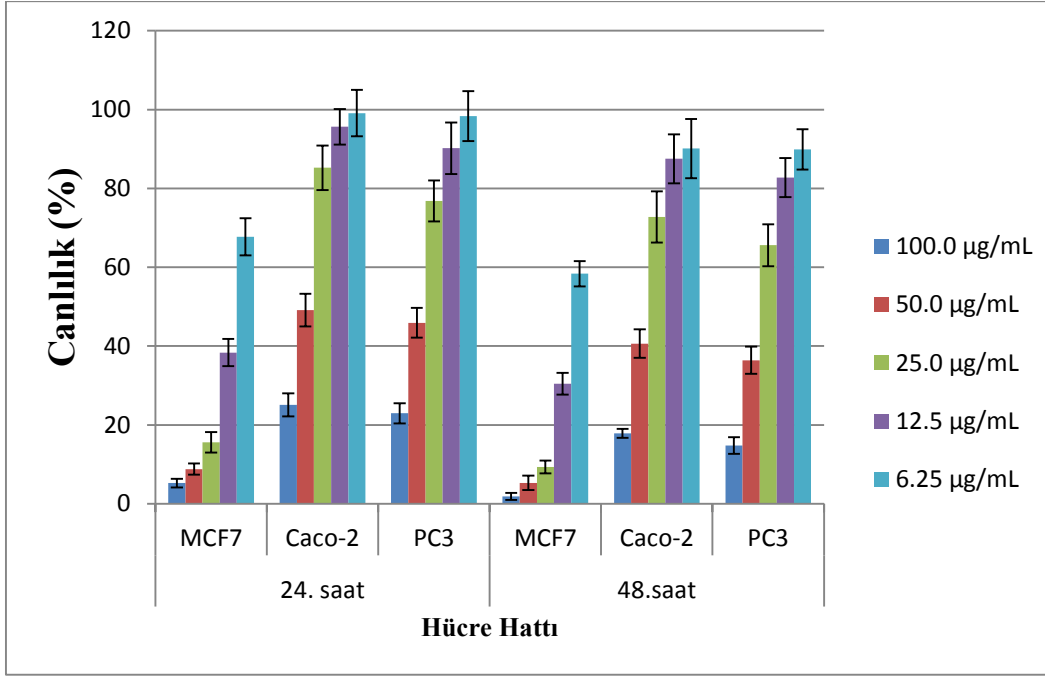
4.8.2 I3C bileşiği ve I3C-PLGA bileşiklerinin WST kiti kullanılarak MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücreleri üzerinde sitotoksisitenin belirlenmesi çalışması sonuçları

MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerinin, I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında 24. ve 48. saatlerde canlılık % değerleri izelge 4.7'de yer almaktadır.

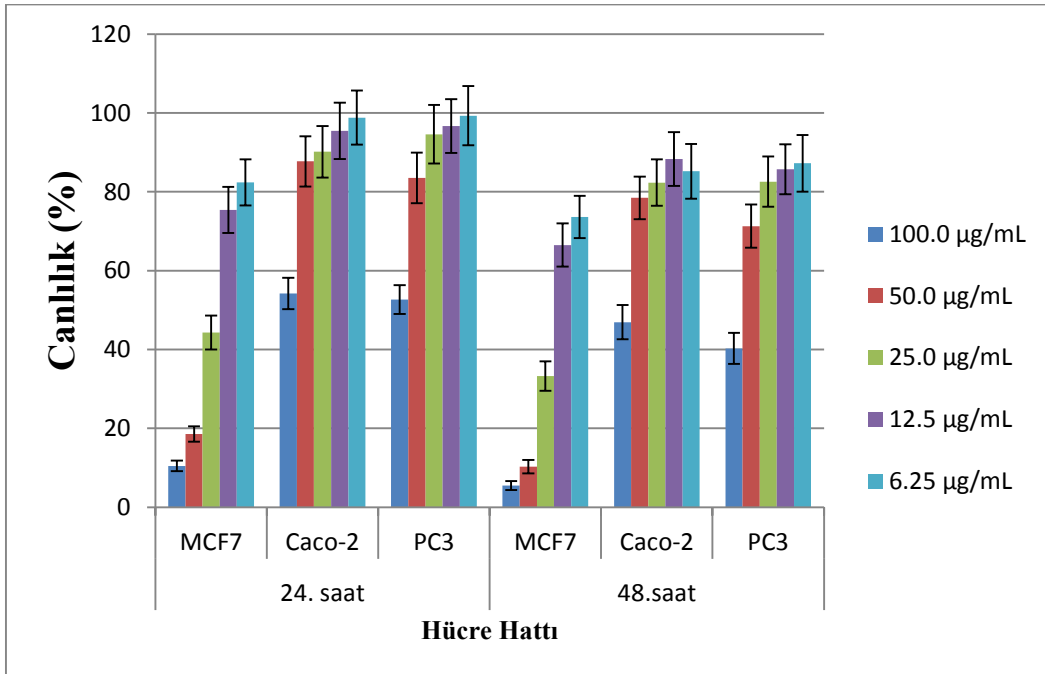
Çizelge 4.7 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerinin, 24. Ve 48 saatlerdeki canlılık % değerleri.

	I3C		I3C-PLGA	
	Canlılık %-MCF-7 Hücre Hattı			
	Zaman (saat)			
Konsantrasyon (µg/mL)	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
100.0	5.24±1.11	1.83±0.91	10.48±1.33	5.49±1.15
50.0	8.79±1.42	5.29±1.82	18.56±1.92	10.30±1.68
25.0	15.58±2.62	9.33±1.62	44.29±4.32	33.27±3.76
12.5	38.35±3.44	30.47±2.77	75.40±5.85	66.49±5.48
6.25	67.71±4.72	58.38±3.21	82.37±5.85	73.62±5.38
	Canlılık %-Caco-2 Hücre Hattı			
	Zaman (saat)			
Konsantrasyon (µg/mL)	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
100.0	25.06±2.92	17.86±1.13	54.25±3.98	46.93±4.35
50.0	49.12±4.15	40.63±3.60	87.72±6.39	78.46±5.37
25.0	85.24±5.88	72.75±6.49	90.15±6.55	82.33±5.90
12.5	95.66±4.51	87.52±6.22	95.47±7.12	85.20±6.83
6.25	99.10±5.63	90.10±7.48	98.83±6.84	88.35±6.92
	Canlılık %-PC3 Hücre Hattı			
	Zaman (saat)			
Konsantrasyon (µg/mL)	24. saat	48. saat	24. saat	48. saat
100.0	22.96±2.56	14.79±2.11	52.68±3.63	40.28±3.92
50.0	45.91±3.78	36.41±3.44	83.52±6.40	71.30±5.47
25.0	76.82±5.17	65.58±5.30	94.60±7.44	82.59±6.36
12.5	90.20±6.32	82.73±4.95	96.72±6.82	85.73±6.31
6.25	98.34±6.54	89.90±5.12	99.29±7.51	87.24±7.19

I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2, ve PC3 hücrelerinin 24. ve 48. saatlerdeki canlılık % grafiği sırasıyla şekil 4.18 ve 4.19'da yer almaktadır.



Şekil 4.18 I3C bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerinin, 24. ve 48. saatlerdeki canlılık % grafiği.



Şekil 4.19 I3C-PLGA bileşiğinin farklı konsantrasyonlarında, MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücrelerinin, 24. ve 48. saatlerdeki canlılık % grafiği.

Çizelge 4.7, şekil 4.18 ve 4.19 değerlendirildiğinde, MCF-7, Caco-2, PC3 hücrelerinin I3C ve I3C-PLGA konsantrasyon miktarı artıkça % canlılık miktarının azaldığı görülmüştür. Özellikle I3C-PLGA bileşiği için, I3C'ye göre çok belirgin olduğu görülmüştür. 48. saatin sonunda hücre hatlarında I3C ve I3C-PLGA'nın % 50 ölüm değerleri (IC_{50}) hesaplanmıştır. I3C ve I3C-PLGA'nın IC_{50} değerlerine çizelge 4.8'de yer almaktadır.

Çizelge 4.8 I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin IC_{50} değerleri.

Zaman	IC_{50} (I3C) $\mu\text{g/mL}$			IC_{50} (I3C-PLGA) $\mu\text{g/mL}$		
	MCF7	PC3	Caco	MCF7	PC3	Caco
24. saat	9.55	47.54	53.31	21.83	106.00	111.70
48. saat	7.62	35.20	41.07	15.98	85.45	114.10

Çizelge 4.8 incelendiğinde 48. saatin sonunda IC_{50} değerleri hesaplanmış ve sitotoksitenin mevcut olduğu görülmüştür. I3C'nin MCF-7, PC3 ve Caco hücre hatlarında sitotoksik etkisinin I3C-PLGA bileşiğine göre daha yüksek olduğu görülmüştür PLGA'nın hücreler üzerinde herhangi bir toksik etkisi mevcut değildir (Yoo et al., 2000). PLGA'nın bu hücre hatlarında sitotoksik etkiyi azaltması bu özelliği ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Brokoli, karnabahar, brüksel lahanası gibi turpgil sebzelerinin yüksek miktarda tüketilmesinin kanseri önleyebileceği ve özellikle bu sebzelerde spesifik olarak bulunan I3C bileşiğinin kolon, prostat ve meme kanserini önleyebilmesinin mümkün olduğu belirtilmektedir (Bell et al., 2000). Ayrıca I3C bileşiğinin hormona bağlı oluşan kolon, prostat, meme kanseri gibi birçok kanser üzerinde antikanserojenik etki gösterdiği gösterdiği bilinmektedir (Chinni et al., 2001). Literatürdeki benzer bazı çalışmalar değerlendirildiğinde Brandi ve arkadaşlarının MCF-7 hücreleri üzerinde yaptığı çalışmada I3C'nin sitotoksik etkisi belirlenmiş ve bu değer 72. saat sonunda IC_{50} değeri $50 \mu\text{M}$ olarak bulunmuştur (Brandi et al., 2003). Li ve arkadaşlarının PC3 hücre hattı üzerinde yaptığı çalışmada $60 \mu\text{M}$ I3C'nin PC3 hücrelerini tedavi edici etki gösterdiğini belirlemişlerdir (Li et al., 2003). Bonnesen ve arkadaşlarının Caco-2 hücre hattında yaptıkları *in vitro* çalışmada ise; 24. saatin sonunda I3C'nin IC_{50} değerini $600 \mu\text{M}$ olarak bulmuşlardır (Bonnesen et al., 2001).

4.9 İstatiksel Analiz Sonuçları

¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerinin hücre hatları üzerinde tutulumunu incelemek amacıyla tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır P değeri 0.05'ten küçük olanlar anlamlı olarak kabul edilmiştir. Bu analiz sonuçlarına göre, ¹³¹I'in % bağlanma düzeyi inkubasyon süreleri boyunca tüm hücre hatlarında %1 civarındadır ve anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerinin tüm hücre hatları üzerinde 120. ve 240. dakikalarda % bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmazken, 30-60, 60-120, 30-120 ve 60-240. dakikalarda elde edilen % bağlanma değerleri arasında anlamlı bir farklılık olduğu tespit edilmiştir (P<0.05). ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiğinin Caco-2 ve PC3 hücre hatları arasında % bağlanma verileri değerlendirildiğinde 30. ve 60. dakikalar karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken, 120. ve 240.dakikalarda anlamlı bir fark tespit edilmiştir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, I3C bileşiğinin PLGA ile enkapsülasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu polimerik kapsüllerin karakterizasyonu için SEM analizi ve Zeta-Sizer ile boyut analizi gerçekleştirilmiştir. SEM analizi ile parçacıkların yüzey morfolojisi belirlenmiş ve ortalama boyutu 124.2 nm olarak bulunmuştur. Zeta-Sizer ile boyut analizinde ise ortalama 269.6 nm olarak bulunmuştur. Boyut farklılıklarının nedeni Zeta-Sizer’da bileşiğin çözelti halinde boyut analizinin gerçekleştirilmesi, SEM analizinde ise organik çözücüler uçurulmuş ve tek bir noktadan görüntü alınmıştır. I3C ve I3C-PLGA bileşiklerinin kalite kontrolü HPLC ile gerçekleştirilmiş ve alıkonma zamanları tespit edilmiştir. I3C bileşiğinin yapı analizi ise NMR ile gerçekleştirilmiş teorik verilerle karşılaştırılarak yapı doğrulanmıştır. I3C ve I3C-PLGA bileşikleri, ¹³¹I ile iodojen metodu ile yüksek verimle radyoışaretlendiği TLRC yöntemi ile kalite kontrol yapılarak belirlenmiştir. ¹³¹I-I3C bileşiğinin görüntüleme ve terapi ajanı olarak kullanılması durumunda, 24. saate kadar yaklaşık % 84, ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiğinin ise 24. saatin sonunda yaklaşık % 99 oranında kararlı olduğu görülmektedir. Bu sonuçlar karşılaştırıldığında PLGA’nın I3C’nin stabilitesini artırdığı görülmüş ve TLRC ile kalite kontrol yapılarak bu sonuçlar desteklenmiştir. I3C bileşiğinin lipofilik karakter gösterdiği, I3C-PLGA bileşiğinin ise hidrofilik karakterde olduğu lipofilité çalışması ile görülmüştür. I3C-PLGA bileşiğinin hidrofilik karaktere geçişi PLGA’nın yapısında bulunan hidroflik karakterdeki glikolik asitten kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları kapsamında, ¹³¹I-I3C ve ¹³¹I-I3C-PLGA bileşiklerinin MCF-7, Caco-2 ve PC3 hücre hatlarında sitotoksik etkisi belirlenmiş ve bu hücre hatları üzerinde tulumu değerlendirilmiştir. Sitotoksisite çalışmasında, 24 ve 48. Saatin sonunda IC₅₀ değerleri belirlenmiş ve bu değerler incelendiğinde PLGA ile enkapsülasyonun I3C’nin sitotoksik etkisini azalttığı görülmüştür.

Tüm deneysel veriler doğrultusunda ¹³¹I ile radyo işaretli I3C ve I3C-PLGA’nın enkapsüle edilmiş ilaç taşıyıcı sistemler olarak çeşitli kanser türleri üzerinde etkin olabileceği düşünülmektedir. Daha ileri çalışmaların *in vivo* deney hayvan modelleri üzerinde yapılması planlanmıştır.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Aggarwal, B. B. and Ichikawa, H.,** 2005, Molecular targets and anticancer potential of indole-3-carbinol and its derivatives, *Cell Cycle*, 4(9), 1201-1215p.
- Ahmad, A., Sakr, W. A. And Rahman, K. W.,** 2011, Role of nuclear factor-kappa B signaling in anticancer properties of indole compounds, *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 3:(2), 55-62p.
- Ahmadzadehfar, H., Sabet, A., Wilhelm, K., Biersack, H. J. and Risse, J.,** 2011, Iodine-131-lipiodol therapy in hepatic tumours, *Methods*, 55(3), 246-252p.
- Alay, S., Göde, F., and Alkan, C.,** 2009, Isıl Enerji Depolama İçin Poli (etil akrilat)/Hekzadekan Mikrokapsüllerinin Üretilmesi ve Karakterizasyonu. *Tekstil Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 3:(3), 33-46p.
- Alibolandi, M., Ramezani, M., Sadeghi, F., Abnous, K. and Hadizadeh, F.,** 2015, Epithelial cell adhesion molecule aptamer conjugated PEG–PLGA nanopolymersomes for targeted delivery of doxorubicin to human breast adenocarcinoma cell line in vitro, *International journal of pharmaceutics*, 479:(1), 241-251p.
- Anderton, M. J., Jukes, R., Lamb, J. H., Manson, M. M., Gescher, A., Steward, W. P. and Williams, M. L.,** 2003, Liquid chromatographic assay for the simultaneous determination of indole-3-carbinol and its acid condensation products in plasma, *Journal of Chromatography B*, 787:(2), 281-291p.
- Bell, M. C., Crowley-Nowick, P., Bradlow, H. L., Sepkovic, D. W., Schmidt-Grimminger, D., Howell, P. and Mathis, J. M.,** 2000, Placebo-controlled trial of indole-3-carbinol in the treatment of CIN, *Gynecologic oncology*, 78:(2), 123-129p.
- Bitar, A., Maghrabi, M. and Doubal, A. W.,** 2013, Assessment of intake and internal dose from iodine-131 for exposed workers handling radiopharmaceutical products. *Applied Radiation and Isotopes*, 370-375p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Bonnesen, C., Eggleston, I. M., & Hayes, J. D.,** 2001, Dietary indoles and isothiocyanates that are generated from cruciferous vegetables can both stimulate apoptosis and confer protection against DNA damage in human colon cell lines, *Cancer Research*, 61:(16), 6120-6130p.
- Brandi, G., Paiardini, M., Cervasi, B., Fiorucci, C., Filippone, P., De Marco, C., and Magnani, M.,** 2003, A new indole-3-carbinol tetrameric derivative inhibits cyclin-dependent kinase 6 expression, and induces G1 cell cycle arrest in both estrogen-dependent and estrogen-independent breast cancer cell lines, *Cancer research*, 63:(14), 4028-4036p.
- Broadbent, T. A. and Broadbent, H. S.,** 1998, The chemistry and pharmacology of indole-3-carbinol (indole-3-methanol) and 3-(methoxymethyl) indole, *Curr. Med. Chem.*, 5, 469-491p.
- Bueno-Tokunaga, A., Pérez-Garibay, R. and Martínez-Carrillo, D.** 2015, Zeta potential of air bubbles conditioned with typical froth flotation reagents. *International Journal of Mineral Processing*, 140, 50-57p.
- Cekic, B., Muftuler, F. Z. B., Kilcar, A. Y. and Ichedef, C.,** 2011, Effects of broccoli extract on biodistribution and labeling blood components with ^{99m}Tc-GH, *Acta Cirurgica Brasileira*, 26:(5), 339-345p.
- Chang, Y. C., Riby, J., Chang, G. H., Peng, B., Firestone, G. and Bjeldanes, L. F.** (1999), Cytostatic and antiestrogenic effects of 2-(indol-3-ylmethyl)-3, 3'-diindolylmethane, a major in vivo product of dietary indole-3-carbinol, *Biochemical pharmacology*, 58:(5), 825-834p.
- Chattopadhyay, S., and Das, S. S.,** 2009, A simple and rapid technique for radiochemical separation of iodine radionuclides from irradiated tellurium using an activated charcoal column, *Applied Radiation and Isotopes*, 67:(10), 1748-1750p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chen, I., Safe, S. and Bjeldanes, L.,** 1996, Indole-3-carbinol and diindolylmethane as aryl hydrocarbon (Ah) receptor agonists and antagonists in T47D human breast cancer cells, *Biochemical pharmacology*, 51:(8), 1069-1076p.
- Cherreddy, K. K., Her, C. H., Comune, M., Moia, C., Lopes, A., Porporato, P. E. And Pr at, V.,** 2014, PLGA nanoparticles loaded with host defense peptide LL37 promote wound healing, *Journal of Controlled Release*, 194p. 138-147p.
- Chinni, S. R., Li, Y., Upadhyay, S., Koppolu, P. K. and Sarkar, F. H.,** 2001, Indole-3-carbinol (I3C) induced cell growth inhibition, G1 cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells, *Oncogene*, 20:(23), 2927-2936p.
- Choi, H. S., Jeon, H. J., Lee, O. H. and Lee, B. Y.,** 2014, Indole-3-carbinol, a vegetable phytochemical, inhibits adipogenesis by regulating cell cycle and AMPK α signaling, *Biochimie*, 104, 127-136p.
- Clemons, M. and Goss, P.,** 2001, Estrogen and the risk of breast cancer, *N engl J med*, 344:(4), 276-285p.
- Crawford, E. D.,** 2003, Epidemiology of prostate cancer, *Urology*, 62:(6), 3-12p.
- Dadachova, E., Nguyen, A., Lin, E. Y., Gnatovskiy, L., Lu, P. and Pollard, J. W.,** 2005, Treatment with rhenium-188-perrhenate and iodine-131 of NIS-expressing mammary cancer in a mouse model remarkably inhibited tumor growth, *Nuclear medicine and biology*, 32:(7), 695-700p.
- Danhier, F., Ansorena, E., Silva, J. M., Coco, R., Le Breton, A. and Pr at, V.,** 2012, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *Journal of controlled release*, 161:(2), 505-522p.
- Delange, F.,** 1989, Iodine nutrition and congenital hypothyroidism, In *Research in congenital hypothyroidis*, 173-185p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Derman, S., Kızılbey, K. and AKDESTE, Z. M.,** 2013, Polymeric nanoparticles, *Sigma*, 31, 109-122p.
- Derman, S., Kızılbey, K. and Akdeste, Z. M.,** 2013, Polymeric nanoparticles, *Sigma*, 31:109-122.
- Desai, M. P., Labhasetwar, V., Walter, E., Levy, R. J. and Amidon, G. L.,** 1997, The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent, *Pharmaceutical research*, 14(11), 1568-1573.
- Dibek, H.,** 2014, Analitik Laboratuvarlarda Hplc Kolonu Seçimi.
- Enginün, M.,** 1996, İyon-değişim kromatografisi ve kromatofokuslama, 109p.
- Flow, F., Geiss, F., Hostettmann, K., Hostettmann, M. and Marston, A.,** 2000, Radioactivity Detection.
- Fried B. and Sherma J.,** 1999, Thin-Layer Chromatography, 8:4, 249,250p.
- Fried, B. and Sherma, J.,** 1999, *Thin-Layer Chromatography, revised and expanded* (Vol. 81), CRC Press.
- Gauthier-Landry, L., Bélanger, A. and Barbier, O.,** 2015, Multiple roles for udp-glucuronosyltransferase (UGT) 2B15 and UGT2B17 enzymes in androgen metabolism and prostate cancer evolution, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 145, 187-192p.
- Gingras, D., Gendron, M., Boivin, D., Moghrabi, A., Théorêt, Y. and Béliveau, R.,** 2004, Induction of medulloblastoma cell apoptosis by sulforaphane, a dietary anticarcinogen from Brassica vegetables. *Cancer letters*, 203:(1), 35-43p.
- Hajiaghaalipour, F., Kanthimathi, M. S., Sanusi, J. and Rajarajeswaran, J.,** 2015, White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. *Food chemistry*, 169, 401-410p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Higdon, J. V., Delage, B., Williams, D. E. and Dashwood, R. H., 2007,** Cruciferous vegetables and human cancer risk: epidemiologic evidence and mechanistic basis, *Pharmacological Research*, 55:(3), 224-236p.
- Howells, L. M., Neal, C. P., Brown, M. C., Berry, D. P. and Manson, M. M., 2008,** Indole-3-carbinol enhances anti-proliferative, but not anti-invasive effects of oxaliplatin in colorectal cancer cell lines, *Biochemical pharmacology*, 75:(9), 1774-1782p.
- Hunter, R. J., 2013,** *Zeta potential in colloid science: principles and applications* (Vol. 2). Academic press.
- Jaidev, L. R., Krishnan, U. M. and Sethuraman, S., 2015,** Gemcitabine loaded biodegradable PLGA nanospheres for in vitro pancreatic cancer therapy, *Materials Science and Engineering: C*, 47, 40-47p.
- Jiang, Y., Wu, S. H., Shu, X. O., Xiang, Y. B., Ji, B. T., Milne, G. L. and Yang, G., 2014,** Cruciferous vegetable intake is inversely correlated with circulating levels of proinflammatory markers in women, *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 114:(5), 700-708p.
- Ju-Nam, Y. and Lead, J. R., 2008,** Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications, *Science of the total environment*, 400:(1), 396-414p.
- KAPAKİN, K. A. T., 2006,** Scanning-Elektron Mikroskobu, *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 17:(1), 55-58p.
- Kaszuba, M., Corbett, J., Watson, F. M. and Jones, A., 2010,** High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 368:(1927), 4439-4451p.
- Keleş, F., 1987,** HPLC ve Gıdalardaki Uygulama Alanları. *Gıda Dergisi*, 12:(5).

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Key, T. J.**, 2011, Fruit and vegetables and cancer risk, *British journal of cancer*, 104(1), 6-11p.
- Kim, D. J., Shin, D. H., Ahn, B., Kang, J. S., Nam, K. T., Park, C. B. and Yang, K. H.**, 2003, Chemoprevention of colon cancer by Korean food plant components, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 523, 99-107p.
- Kim, Y. S. and Milner, J. A.**, 2005, Targets for indole-3-carbinol in cancer prevention, *The Journal of nutritional biochemistry*, 16:(2), 65-73p.
- Klein, A., Shapira, H. and Adler, S.**, 2008, The effect of the synthetic estrogen–diethylstilbestrol (des) and indol-3-carabinol (i3c) on the distribution of telomerase expression cells in lines of prostate cancer, *European Journal of Cancer Supplements*, 6:(9), 140p.
- Koyunoğlu F., Konar, V. Ve Sandal, S.**, 2013, İnsan Meme Kanseri Hücre Serileri (MCF-7) Üzerine Apelin-13’ün Etkilerinin Araştırılması: In Vitro Bir Çalışma, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1:(1), 23-8s.
- Lee, S. Y., Song, C. H., Xie, Y. B., Jung, C., Choi, H. S. and Lee, K.**, 2014, SMILE upregulated by metformin inhibits the function of androgen receptor in prostate cancer cells, *Cancer letters*, 354(2), 390-397p.
- Li, Y., Li, X. and Sarkar, F. H.**, 2003, Gene expression profiles of I3C-and DIM-treated PC3 human prostate cancer cells determined by cDNA microarray analysis, *The Journal of nutrition*, 133:(4), 1011-1019p.
- Liu, X. and Lv, K.**, 2013, Cruciferous vegetables intake is inversely associated with risk of breast cancer: A meta-analysis, *The Breast*, 22:(3), 309-313p.
- Manchali, S., Murthy, K. N. C. and Patil, B. S.**, 2012, Crucial facts about health benefits of popular cruciferous vegetables. *Journal of Functional Foods*, 4:(1), 94-106p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Marconett, C. N., Singhal, A. K., Sundar, S. N. And Firestone, G. L.,** 2012, Indole-3-carbinol disrupts estrogen receptor-alpha dependent expression of insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 and proliferation of human breast cancer cells, *Molecular and cellular endocrinology*, 363:(1), 74-84p.
- Merlin, J. J., Prasad, N. R. and Shibli, S. M. A.,** 2012, Ferulic acid loaded poly-d, l-lactide-co-glycolide nanoparticles: systematic study of particle size, drug encapsulation efficiency and anticancer effect in non-small cell lung carcinoma cell line in vitro, *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2:(1), 69-76p.
- Moreno, D., De Ilarduya, C. T., Bandrés, E., Buñuales, M., Azcona, M., García-Foncillas, J. and Garrido, M. J.,** 2008, Characterization of cisplatin cytotoxicity delivered from PLGA-systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 68:(3), 503-512p.
- Mrkvičková, Z., Kovaříková, P., Klimeš, J. and Doležal, M.,** 2006, Determination of the lipophilicity of potential antituberculous compounds by RP-TLC, *JPC-Journal of Planar Chromatography-Modern TLC*, 19:(112), 422-426p.
- Murillo, G. and Mehta, R. G.,** 2001. Cruciferous vegetables and cancer prevention. *Nutrition and cancer*, 41:(1-2), 17-28p.
- Nachshon-Kedmi, M., Yannai, S., Haj, A., and Fares, F. A.,** 2003, Indole-3-carbinol and 3, 3'-diindolylmethane induce apoptosis in human prostate cancer cells, *Food and chemical toxicology*, 41;(6), 745-752p.
- Özdemir, S. and Özdemir, Ö.,** 2014, Tiroid kanserinde moleküler etyolojik faktörler. *Cumhuriyet Medical Journal*, 36:(1), 128-146p.
- Özden, S., Ertan, R., Akı-Şener, E., Yalçın, İ., Nebioğlu, D., Büyükbilgöl E., Göker, H., Yıldız, İ., Altuntaş-Dinlenç, T., G., Tunçbilek, M., Ayhan-Kılıçgil, T., G., Ölgen, S., Süzen, S., Temiz-Arpacı, Ö., Kuş, C. and Bozdağ-Dündar., O.,** 2004, *Farmasötik Kimya Pratikleri*, 27-67p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Özen, A.**, 2005, Hemodiyalizin Tiroid Sitringrafisi İle İyot-131 Tiroid Updake'i Üzerine Etkileri ve Kronik Böbrek Yetmezliğinde Tiroid Hastalıklarının Tanısında Sintigrafisinin Yeri (Doctoral dissertation).
- Peltonen, L., Koistinen, P., Karjalainen, M., Häkkinen, A. and Hirvonen, J.**, 2002, The effect of cosolvents on the formulation of nanoparticles from low-molecular-weight poly (l) lactide, *AAPS PharmSciTech*, 3:(4), 52-58p.
- Perez-Chacon, G., de los Rios, C. and Zapata, J. M.**, 2014, Indole-3-carbinol induces cMYC and IAP-family downmodulation and promotes apoptosis of Epstein-Barr virus (EBV)-positive but not of EBV-negative Burkitt's lymphoma cell lines, *Pharmacological Research*, 89, 46-56p.
- SeEVERS, R. H. and Counsell, R. E.**, 1982, Radioiodination techniques for small organic molecules, *Chemical Reviews*, 82:(6), 575-590p.
- Sikora, E., Cieřlik, E., Leszczyńska, T., Filipiak-Florkiewicz, A. and Pisulewski, P. M.**, 2008, The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing, *Food Chemistry*, 107:(1), 55-59p.
- Singh-Gupta, V., Banerjee, S., Yunker, C. K., Rakowski, J. T., Joiner, M. C., Kanski, A. A. and Hillman, G. G.**, 2012, B-DIM impairs radiation-induced survival pathways independently of androgen receptor expression and augments radiation efficacy in prostate cancer, *Cancer letters*, 318:(1), 86-92p.
- Souli, E., Machluf, M., Morgenstern, A., Sabo, E. and Yannai, S.**, 2008, Indole-3-carbinol (I3C) exhibits inhibitory and preventive effects on prostate tumors in mice, *Food and chemical toxicology*, 46:(3), 863-870p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Starek, M., Komsta, Ł. and Krzek, J.,** 2013, Reversed-phase thin-layer chromatography technique for the comparison of the lipophilicity of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 85, 132-137p.
- Şenelt, S.,** 1987, Gıda kalite kontrolünde uygulanan başlıca kromatografik yöntemler, *Türkiye hijyen ve deneysel biyoloji dergisi*, 44:2 191-195p.
- Taskar, N.P., Jhaver, K., Divgi, C.,** 2004, Radioimmunotherapy (RIT) of Cancer, *Indian J. Nucl. Med.*, 19:3, 53-67pp.
- Toloudi, M., Apostolou, P., Chatziioannou, M., Eleni, K., Ioanna, V., Georgia, M. and Papatiriou, I.,** 2015, A possible clinical benefit of the identification and characterization of colon cancer stem cells, *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 5:(1), 22-27p.
- Van Duyn, M. A. S. and Pivonka, E.,** 2000, Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature, *Journal of the American Dietetic Association*, 100:(12), 1511-1521p.
- Vivar, O. I., Lin, C. L., Firestone, G. L. and Bjeldanes, L. F.,** 2009, 3, 3'-Diindolylmethane induces a G 1 arrest in human prostate cancer cells irrespective of androgen receptor and p53 status, *Biochemical pharmacology*, 78:(5), 469-476p.
- Weng, J. R., Tsai, C. H., Kulp, S. K. and Chen, C. S.,** 2008, Indole-3-carbinol as a chemopreventive and anti-cancer agent. *Cancer letters*, 262:(2), 153-163p.
- Xu, R.,** 2014, Light scattering: A review of particle characterization applications, *Particuology*.
- Yoo, H. S., Lee, K. H., Oh, J. E. and Park, T. G.,** 2000, In vitro and in vivo anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin-PLGA conjugates. *Journal of Controlled Release*, 68:(3), 419-431p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, M. Z., Chen, Q. And Yang, G. F., 2015, A review on recent developments of indole-containing antiviral agents, European journal of medicinal chemistry, 89, 421-441p.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Görkem YILDIZ

Doğum Yeri : EDİRNE

Doğum Yılı : 25/12/1989

Öğrenim Durumu

Lisans : 2008-2012 Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü

Yüksek Lisans : 2013- 2015 Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

Nükleer Uygulamalar ABD