

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**^{99m}Tc-SİTRO-FOLAT SENTEZİ VE RADYOFARMASÖTİK
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

Burcu ALTIPARMAK

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu: 622.02.01

Sunuş Tarihi: 14.01.2009

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Bornova-İZMİR

ÖZET**^{99m}Tc-SİTRO-FOLAT SENTEZİ VE RADYOFARMASÖTİK
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

ALTIPARMAK, Burcu

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

Ocak 2009, 73 sayfa

Over kanseri kadınlarda en çok gözlenen kanser türlerinin yedincisidir. Bu kanser türü, kadınlarda kanserden ölüm sebebi olarak dördüncü sıradadır. Over kanserinin erken teşhisi çok büyük bir önem arz etmektedir.

Radyoaktif işaretleme teknikleri, doku patofizyolojilerinin spesifik bağlanma kabiliyetleri nedeniyle non-invaziv tümör görüntülemelerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yeni ve geliştirilmiş tümör seçici radyofarmasötiklerin gelişimi, birincil ve metastatik lezyonların yerinin ve varlığının saptanmasını, tümör evrelerinin ve tedavisinin planlanması hakkında bilgi verilmesi ve tümörün tedaviye cevabının görüntülenmesi için olanak sağlamaktadır.

Folat reseptör pozitif hücreler ve dokularda, folat ve folat bağlı moleküller yüksek affiniteye sahiptir ve teşhis amaçlı kullanıma uygundur. Folat reseptörleri, folik asit ve folat türevlerinin hücrelerde birikimini mümkün kılmaktadır. Bu birikim nedeniyle, folik asit bir tümör işaretleyici olarak kullanılmaktadır. İlaveten, bu konjugatların radyoaktif işaretlileri ise gama kamera ile görüntüleme yapmaya olanak

sağlamaktadır. Düşük molekül ağırlıklı radyofarmasötikler, radyoışaretili antikorlardan çok daha uygun farmakokinetik özellikler gösteren folat türevleridir ve ayrıca bu radyofarmasötikler yüksek tümör seçiciliğine sahiptirler.

Bu çalışmanın amacı, folat türevleri hazırlayarak in-vivo deneyler ile potansiyelini araştırmaktır. İlk aşamada sitro-folat sentezi gerçekleştirilmiş, daha sonra bu bileşik ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenmiştir. Radyoaktif işaretli konjugenin, teşhis radyofarmasötiği olarak potansiyeli incelenmek üzere Albino Wistar sıçanlar üzerinde biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

RTLC kalite kontrol yöntemleri ile işaretleme veriminin sonucunda $\%97\pm 1.0$ olduğu saptanmıştır. Serum stabilite çalışmalarının sonuçları, işaretli bileşiğin serumda 4. saate kadar stabilitesini koruduğunu göstermiştir. İn vivo biyodağılım çalışmaları, Albino Wistar dışı sıçanlarda gerçekleştirilmiştir. Bu radyoışaretili bileşiğin hidrofilik olmasından dolayı böbreklerden hızlı atılım sağladığı gözlemlenmiştir. Biyodağılım çalışmaları sonucunda ^{99m}Tc -Sitra-folat'ın folat reseptörünce zengin pankreas, over ve uterus organlarında yüksek tutulum gösterdiği saptanmıştır.

Bu çalışmanın sonuçları ^{99m}Tc -Sitra-folat, folat reseptör pozitif tümörlerin görüntülenmesinde kullanılabilmesi muhtemel görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: Folik asit, Sitrik asit, ^{99m}Tc , radyoışaretleme, tümör görüntüleme ajanları

ABSTRACT

**THE SYNTHESIS OF ^{99m}Tc -CITRO-FOLATE AND
INVESTIGATION OF RADIOPHARMACEUTICAL POTENTIAL**

ALTIPARMAK, Burcu

MSc, Institute of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRECHT

2009, 73 pages

Over carcinoma is the seventh of the mostly seen cancers in women. As the leading cause of death it is fourth common cancer type. Early diagnosis is the one of the most important parameter that effects the prognosis in over carcinoma.

Radioactive tracer techniques are widely used in the diagnostic imaging of tumor due to their ability to non-invasively probe for tissues pathophysiology. The development of new and improved tumor-selective radiopharmaceuticals is clinically desirable as a means of detecting and confirming the present location of primary and metastatic lesions; informing the tumor staging and subsequent treatment planning and monitoring tumor response to treatment.

Folate and folate conjugates posses high affinity for the folate-receptor positive cells and tissues and were enable to use for diagnostic interest. Folate receptors are known to be responsible for cellular accumulation of

folic acid and folic acid conjugates. Welding from this accumulation; folic acid is used as a tumor marker. In addition, if these conjugates are radiolabelled, we have chance to obtain gamma camera images. Low molecular weight radiopharmaceuticals based on folate conjugates are much more favorable pharmacokinetic properties than radiolabeled antibodies. And they show high tumor selectivity.

The aim of this study was to synthesis folate conjugate compounds and investigate their with in-vivo studies. First step, achieved the citro-folate synthesis, then this conjugate was labeled with Tc-99m radionuclide. Biodistribution of radiolabeled conjugate was achieved in Albino Wistar rats in order to investigate its potential as a diagnostic radiopharmaceutical.

Radiolabeling efficiency was confirmed as 97 ± 1.0 by RTLC quality control methods. The serum stability results shown that radiolabeled folate conjugate remained stable in human serum up to 4 hours. In-vivo biodistribution studies were carried out in female Albino Wistar rats. As the radiolabeled folate conjugate was hydrophilic, it has been observed that it maintains rapid discharge from kidneys. Biodistribution results of ^{99m}Tc -citro-folat showed that high uptake in folate receptor rich tissues such as pancreas, over and uterus. This study shows that ^{99m}Tc -citro-folat is probably used for imaging of folate receptor positive tumors

Key words: Folic acid, Citric acid, Tc-99m, radiolabeling, tumor imaging agents

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım süresince engin bilgisini, her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam **Prof. Dr. Fatma YURT LAMBRRECHT**'e, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı Başkanı ve Enstitü Müdürü Sayın **Prof. Dr. Perihan ÜNAK**'a, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı'ndaki bütün öğretim üyesi ve çalışanlarına, master çalışmalarım boyunca başından sonuna kadar her türlü desteği sağlayan Sayın Hocam **Prof Dr. Eray ALPER**'e, başta dostluğunu ve yardımseverliğini esirgemeyen **Uzm. Dr. Kübra DURKAN** ve **Araş. Gör. Çiğdem ACAR** olmak üzere, her zaman büyük özveriyle yanımda olan arkadaşlarıma, her koşulda bana verdikleri manevi ve maddi destek için **AİLEME** sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burcu ALTIPARMAK

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VI
TEŞEKKÜR.....	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVI
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XVII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. Kanser ve Over Kanseri.....	5
2.2. Vitaminler.....	7
2.2.1. Folik Asit.....	8
2.2.2 Folik Asit ve Over Kanseri	10
2.3. Folat Reseptörleri.....	12
2.4. Radyoışaretli Folik Asit Türevleri.....	14
2.5. Teknesyum-99m (^{99m} Tc) Kimyası.....	16
2.5.1. ^{99m} Tc işaretli bileşiklerin kalite kontrolü.....	18
2.5.1.1. İnce tabaka kromatografisi.....	19
2.5.1.2. Kağıt elektroforezi.....	20

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.1.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	21
2.6. Lipofilite.....	22
3. MATERYAL VE METOD.....	23
3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	23
3.1.1 Kullanılan kimyasallar.....	23
3.1.2 Kullanılan cihazlar.....	24
3.2. Kimyasal Sentez Basamakları.....	25
3.2.1 Folat Hidrazid Sentezi.....	25
3.2.2 Sitro-Folat bileşiğinin elde edilmesi.....	27
3.3. İnaktif Bileşenler için Kullanılan Kromatografik Yöntemler.....	28
3.3.1 TLC yöntemi.....	29
3.3.2 HPLC yöntemi.....	29
3.4 İşaretleme Yöntemi.....	30
3.4.1 ^{99m} Tc-Sitrat'ın hazırlanması	31
3.4.2 ^{99m} Tc-Sitro-Folat'ın hazırlanması.....	31
3.5. Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler.....	32
3.5.1 Kağıt elektroforezi yöntemi.....	32
3.5.2. Radyo ince tabaka kromatografi (RTLC) yöntemi.....	32
3.6. n-Octanol / Su Oranın Bulunması (Lipofilite).....	33
3.7 Serumda Stabilite.....	33
3.8 Dişi Albino Wistar Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyodağılım Çalışmaları.....	34
3.9 İstatistik Analizler.....	35

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.4 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	36
4.1. İnaktif Bileşenler (Folik Asit, NHS-folat, Folat-hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-folat) için Kullanılan Kromatografik Yöntem Sonuçları.....	36
4.1.1 TLC yöntemi ile elde edilen Rf sonuçları.....	36
4.1.2 HPLC ve RHPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar.....	37
4.2. Moleküler Yapının Belirlenmesi.....	40
4.3. Radyoşaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Sonuçları.....	50
4.3.1. Kâğıt elektroforezi ile elde edilen sonuçlar.....	50
4.3.2. RTLC ile elde edilen sonuçlar.....	51
4.4 n-Octanol / Su oranı (Lipofilite) sonuçları.....	58
4.5. Serumda stabilite sonuçları.....	59
4.6. Dişi Albino Wistar sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarının sonuçları.....	59
4.7. İstatistik Analiz Sonuçları.....	65
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	69
7. ÖZGEÇMİŞ.....	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Folik asitin moleküler yapısı.....	9
2.2. 5,6,7,8-Tetrahidrofolik asit.....	10
2.2.1 DNA'nın yapısı ve replikasyonu.....	10
2.3.1. α ve γ karboksil gruplarının bağlı folik asit yapısı.....	12
2.3.2 Folat reseptör hedefli endositozun şematik gösterimi.....	13
2.4. ^{99m}Tc Bozunum Şeması.....	17
3.1. NHS-Folat bileşiğinin sentezi.....	26
3.2 Folat-Hidrazid bileşiğinin sentezi.....	27
3.3 Sitro-Folat Bileşiğinin Sentezi.....	28
4.1 Folik Asit, NHS-Folat ve Folat-Hidrazid bileşiklerinin HPLC kromatogramları.....	37
4.2. Folat-Hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-Folat bileşiklerinin HPLC kromatogramları.....	38
4.3. İşaretli ^{99m}Tc -Sitrat ve ^{99m}Tc -Sitra-Folat bileşiklerinin RHPLC kromatogramları.....	38
4.4. İşaretli ^{99m}Tc -Sitra-Folat $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc bileşiklerinin RHPLC kromatogramları.....	39
4.5. Folik Asit LC-MS/MS Spektrumları.....	44
4.6. NHS-Folat LC-MS/MS Spektrumları.....	45
4.7. Folat-Hidrazid LC-MS/MS Spektrumları.....	46
4.8. Sitrik Asit LC-MS/MS Spektrumu.....	47
4.9. Sitro-Folat'ın LC-MS/MS Spektrumu.....	48

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.10 Hidrazid-Folat'ın H-NMR Spektrumu.....	49
4.11 Hidrazid-Folat'ın molekül yapısı.....	49
4.12. ^{99m} Tc-Sitrat'ın ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	52
4.13. ^{99m} Tc-Sitro-folat'ın ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	52
4.14. ^{99m} TcO ₄ ⁻ 'ın ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	53
4.15. İnd. ^{99m} Tc' in ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	53
4.16. ^{99m} Tc-Sitrat'ın SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları.....	54
4.17. ^{99m} Tc-Sitro-Folat'ın SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları.....	54
4.18. ^{99m} TcO ₄ ⁻ 'ın SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	55
4.19. İnd. ^{99m} Tc' ni SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	55
4.10. ^{99m} Tc-Sitrat'ın aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	56
4.21. ^{99m} Tc-Sitro-Folat'ın aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı	56
4.22. ^{99m} TcO ₄ ⁻ 'ın aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

	<u>Sayfa</u>
4.23. İnd. ^{99m}Tc ' nin aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogram.....	57
4.24. ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin Albino Wistar sıçanlardaki reseptör doyurulmamış biyodağılım sonuçları	61
4.25. ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin Albino Wistar sıçanlardaki reseptör doyurulmuş biyodağılım sonuçları	61
4.26. ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin over reseptör doyurulmamış ve reseptör doyurulmuş biyodağılım çalışmaları	63
4.27. ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin uterus reseptör doyurulmamış ve reseptör doyurulmuş biyodağılım çalışmaları	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar	30
3.2. HPLC solvent sistemi zaman programı.....	30
4.1. Folik Asit, NHS-Folat, Folat-Hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-Folat bileşiklerinin 2-propanol: kloroform (7:3) çözeltisindeki Rf değerleri.....	36
4.2.1. Folik Asit bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri	40
4.2.2. Sitrik Asit bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.....	41
4.2.3. Folat-Hidrazid bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.....	41
4.2.4 NHS-Folat bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri	42
4.2.5. Sitro-Folat bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.....	43
4.3.1. Elektroforez Sonuçları.....	50
4.3.2. Rf değerleri.....	51
4.4. Bileşiklerin LogP değerleri.....	58
4.5 Albino Wistar sıçanlarda ^{99m} Tc-Sitro-Folat bileşiğinin Biyodağılım çalışmaları.....	60

KISALTMALAR

FR	: Folat Reseptör
DF	: Deferoksiamin
DTPA	: Dietilentriaminpentaasetik asit
HYNIC	: Hidrazinonikotinamid
MAG3	: Merkaptoasetiltriglisin
MAG2	: Merkaptoasetildiglisin
PEG	: Polietilenglukol
GPI	: Glikozilfosfatidilinositol
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi (Thin Layer Chromatography)
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)
RTLC	: Radyo İnce Tabaka Kromatografisi (Radio Thin Layer Chromatography)
RHPLC	: Radyo Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (Radio High Performance Liquid Chromatography)
Rf	: Alıkonma Mesafesi

1. GİRİŞ

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görünmesi ve öldürücülüğünün yüksek olması nedeniyle de bir halk sağlığı sorunudur. Tanı olanaklarının gelişmesi ve sağlık kuruluşlarından yararlanma olanaklarının artması ile her yıl daha çok kanser vakası teşhis edilebilmektedir. Ülkemizde 1970'li yıllarda sebebi bilinen ölümler arasında dördüncü sırada yer alan kanser, son yıllarda kardiyovasküler sistem hastalıklarından sonra ikinci sıraya yükselmiştir. Her yıl dünyada 11 milyon, Türkiye'de ise 150 bin kişi kansere yakalanmaktadır. Uluslar arası Kanser Araştırma Merkezi'nin istatistiklerine göre Türkiye' de kadınlarda meme, bağırsak, mide kanser türlerinden sonra yumurtalık (over) kanseri ölüm sebebi olarak dördüncü sıradadır (Kanser Yüğü Raporu, 2006)

Folat reseptörleri (FR) farklı kanser tiplerinde; özellikle over kanserinde sıklıkla görülmektedir. Folik asit ve folat konjugasyonları; tümörlü dokuda sıklıkla bulunan folat reseptörlerine karşı yüksek ilgiye sahiptirler. Bu durum; folik asit ve folat konjugasyonlarının özellikle hedef kanser hücrelerinde tutulumlarına olanak sağlamaktadır. Radyonüklid ile işaretlenmiş konjugatlar; tümör hücrelerinde artmış olan folat reseptörleri tarafından tutulmalarıyla tümör görüntülenmesi yapılabilmektedir. Bu nedenle over kanserinin teşhisinde folat radyofarmasötiklerinin önemi büyüktür.

Folat reseptör hedefli tümör görüntüleme için kullanılacak farklı ajanlar ile ilgili araştırmalar mevcuttur. İn-vitro olarak radyonüklid ile işaretlenen konjugatlarla folat reseptörleri hedeflenmiştir. ⁶⁷Ga, ¹¹¹In

ve ^{99m}Tc radyonüklidleri içeren folat konjugatları ile de çalışmalar yapılmıştır ve tümör/zemin oranı incelenmiştir. $^{67}\text{Ga-DF}$ (deferoksamin)-folat bileşiğinin tümör görüntüleme ajanı olarak potansiyelini incelemiştir. $^{67}\text{Ga-DF-folat}$, $^{67}\text{Ga-DF}$ 'e göre artmış folat reseptör bölgelerinde 100 kat daha fazla tutulum gözlenmiştir. $^{67}\text{Ga-DF-folat}$ 'ın hızlı temizlenme kinetiğinden dolayı çok iyi görüntüler elde edilmiştir. Bu radyofarmasötığın tümörlü farelerde lokalizasyon özellikleri değerlendirilmiştir ve tümör/kan oranı 409/1 olarak kaydedilmiştir (Sudimack et al., 2000).

Wang ve arkadaşları 1997'de yapmış oldukları bir çalışmada $^{111}\text{In-DTPA}$ (dietilentriaminpentaasetikasit)-folat radyoaktif konjugatının radyofarmasötik potansiyelini incelemiştir. Tümör/kan oranı 82/1 olarak bulunmuştur. $^{111}\text{In-DTPA-folat}$ 'ın $^{67}\text{Ga-DF-folat}$ 'a göre hepatobilier sistemden temizlenmesinin az olduğunu ifade etmişlerdir ve görüntüleme ajanı olarak kullanmışlardır (Wang et al., 1997).

Guo ve arkadaşları $^{99m}\text{Tc-HYNIC}$ (hidrazinonikotinamid)-folat'ın bağlanma özelliğini KB hücrelerini (ağız karsinomu) saptamak amacıyla çalışmışlardır. FR'lerin ^{99m}Tc işaretli konjugatı endositoz ile hücre içerisine alınımı, serbest folik asitin alınmasından 300 kat daha iyi bir ajan olduğunu göstermiştir. Bu konjugatların yüksek spesifitesi ve hızlı temizlenme kinetiği nedeni ile FR (+) tümörlerin saptanmasında ideal bir görüntüleme sağlanmıştır (Guo et al., 1999).

Okarvi ve Jammaz $^{99m}\text{Tc-MAG3}$ (merkaptasetiltriglisin)-folat ve $^{99m}\text{Tc-MAG2}$ (merkaptasetildiglisin)-folat bileşiklerinin

radıofarmasötık potansiyellerını ıncelemlşlerdır. Hücree kúltürü çalışmaları sonucunda reseptöre bağlanma gücü ^{99m}Tc -MAG3-folat'ın 338.62 nM, ^{99m}Tc -MAG2-folat'ın 605.10 nM olarak kaydedılmıştır. Biyodağılım çalışmalarında tümör/doku oranı ^{99m}Tc -MAG3-folat'ın 6.63 ve ^{99m}Tc -MAG2-folat'ın 9.05 olarak kaydedılmıştır. Bu konjugatlar arasındaki fark şelatlayıcı ajanın moleköl büyüklüğünden kaynaklanmaktadır (Okarvi et al., 2006).

Kim ve arkadaşları ^{99m}Tc -PEG(polietilenglukol)-folat bileşiğinin in-vivo modelleme yöntemi ile çalışmaları sonucunda 4. satte tümör/normal kas oranını 4.3'e ulaştığını ve 4 saat sonrasında ise 1.2'nin altına düştüğünü gözlemişlerdir (Kim et al., 2007).

Bu çalışmalar arasında Siegel ve arkadaşları tarafından klinik olarak denenmiş; ^{111}In -DTPA-folat radyofarmasötiği kötü huylu ve iyi huylu lezyonların saptanmasında non-invaziv (girişimsiz) olarak görüntüleme sağlanabilmiştir (Siegel et al., 2003).

Hücree kúltüründe daha önce yapılan çalışmalar, hedeflenmiş terapi için antikanser ilaçları nanoparçacıklara eklemenin terapötik cevabı arttıracadı öne sürülmüştür. Michigan Üniversite'sindeki bilim adamları metotreksatı tümör hücrelerine sokabilmek için folik asiti kullanarak nanoteknoloji temelli bu tedavinin etkili olduğunu göstermişlerdir (Baker, 2005).

Bu çalışma ile FR (+) over tümörlerinin görüntülenmesinde kullanılabilecek bir radyoişaretli folat konjugatı elde edilecek ve

günümüzün önemli kanser türlerinden olan over kanserinin erken teşhisine imkan sağlayarak yeni bir konjugat sentezlenecek ve in-vivo deneyler ile potansiyeli araştırılacaktır. Böylelikle bu tür vakalarda hastanın erken tedaviye yönlendirilmesi ölüm oranını düşürücü önemli bir etken olacaktır. Folik asitin radyonüklidle bağlanmasını kolaylaştırmak ve yapıyı hidrofilik hale getirerek folat reseptöre afinitesini arttırmak için hidrofilik bir grup olan sitrik asit bileşiği yapıya takılarak kalay klorür (SnCl_2) indirgeme metoduyla $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidi ile işaretleme gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser ve Over Kanseri

İnsan bedenini oluşturan sayısız hücrenin her birinin çekirdeğinde değerli bir hazine gibi saklanan deoksiribonükleik asit (DNA) molekülü, çeşitli etkenler tarafından hasara uğratıldığında, bazen hücreler kontrol dışı çoğalma ve yayılmaya başlarlar. Giderek, buldukları yerden taşmaya ve vücudun başka bölgelerine taşınmaya başlarlar. Buna metastaz (yavrulama) denir. Bu durum, gövdesinden çıkan bacakları ve kısıkaçlarıyla bir yengeci anımsattığından bu hastalığa, Latince’de yengeç anlamına gelen ‘Kanser’ ismi konmuştur. DNA’yı hasara uğratan bu etkenler; çeşitli tahriş edici veya toksik kimyasallar (sigaradakiler gibi), radyasyon (güneş ışığındakiler dahil) özellikle mukoza denem örtücü tabakalarda sürekli tahriş yapan fiziksel nedenler, bazı virüsler veya bazı kalıtsal faktörlerdir (<http://www.kanseroloji.com/kanser-nedir/>).

Dünya’ya baktığımızda, sadece bizim ülkemizde değil Dünya’da insanın veya canlının yaşadığı her yerde kanser riskine rastlanmaktadır. Bazı ülkelerde bazı kanser türleri daha fazla görülürken, bazı ülkelerde daha az görülmektedir. Ülkeden ülkeye kanser türlerinin farklı oranlarda görülmesinin nedeni insanların beslenme ve yaşam tarzındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır. Dünya sağlık örgütünün 2001 verilerine göre ölüm nedeni olarak kanser kalp hastalıklarından, enfeksiyon hastalıklarından ve solunum sistemi hastalıklarından sonra dördüncü sırada yer almaktadır. Erkeklerde en sık görülen kanser sırası

ile % 29 ile prostat kanseri, % 14 ile akciğer kanseri, % 10 ile kalın bağırsak ve makat kanserleridir. Erkeklerde kansere bağlı en önemli ölüm nedenleri ise sırasıyla % 31 ile akciğer, % 11 ile prostat kanseri, % 10 ile kalın bağırsak/makat kanserleridir. Kadınlarda en sık görülen kanserler sırası ile % 30 ile meme kanseri, % 12 ile akciğer kanseri, % 11 ile kalın bağırsak ve makat kanserleri, % 6 ile rahim kanserleridir. Kadınlarda kansere bağlı en önemli ölüm nedenleri ise sırasıyla % 25 ile akciğer, % 15 ile meme, % 11 ile kalın bağırsak/makat kanseridir (http://www.adnanaydiner.com/hastalar_kanser_nedir_02.htm, 2007).

Over kanseri, jinekolojik kanserleri içinde en geç tanısı konabilen ve bu nedenle en fazla ölüme sebebiyet veren kanser türü olması nedeni ile ayrı bir öneme sahiptir. Kadın kanserlerinin % 4'ünü, genital kanserlerin ise % 23'ünü meydana getirir. Over kanser tanısı konulan kadınlarda 5 yıldan uzun yaşama süresi % 35 civarındadır. Her yaşta görülmesine rağmen en fazla 45 yaşından sonra rastlanır. Menopoz öncesi dönemde over tümörlerinin sadece % 7'si kanserken bu oran menopoz sonrası % 30'a çıkmaktadır. Over dokusu pek çok değişik hücreyi barındırmaktadır. Kanserin köken aldığı hücre türüne göre de görülme yaşları ve oranları değişir. Over kanserinin ve diğer tüm dokuların ana yapısını oluşturan epitelyum hücrelerden köken alan tümörler en sık görülen tümörlerdir. Over kanserinin ve diğer tüm dokuların ana yapısını oluşturan epitelyum hücrelerden köken alan tümörler en sık görülen tümörlerdir. Over kanserinin erken teşhisi çok büyük önem arz etmektedir. Over kaynaklı kitlelere sıklıkla cerrahi yaklaşım önerilmektedir. Bu da, cerrahi tedavi gerektirmeyen iyi huylu

kitlelerde gereksiz cerrahi girişime neden olmaktadır. Günümüzde bu amaçla kullanılan görüntüleme yöntemlerinin başında Ultrasonografi (US) ile Renkli Doppler Ultrasonografi (RDUS) gelmektedir ve klinik uygulamanın devamı şeklinde gelmektedir. Magnetik Rezonans (MR) ve Bilgisayarlı Tomografi (BT) ise US'nin tamamlayıcısı konumundadır (Türk, 2006). Over kanseri tanısını güçlendiren ve bu konuda hekimlere son derece yardımcı olan bir başka tetkikte tümör belirteçleridir. Tümör belirteçleri kabaca normal dokularda fazla miktarda bulunmayan ancak malign dokulardan kana salınan maddeler olarak tanımlanabilir. Kullanılan ya da araştırma safhasında olan pek çok belirteç olmasına rağmen ideal bir tümör marker henüz saptanamamıştır. Over kanserinde en çok işimize yarayan CA 125 adı verilen belirteçtir. Over bölgesinde şüpheli bir kitle bulunan kadınlarda yüksek saptanması tanıyı destekler. Ancak sigara içimi, erken gebelik, endometriozis gibi hastalıklarda da yükselebilmesi bunun güvenilirliğini kısıtlar. Bu da bize dokuların patofizyolojisinin tespiti için radyoaktif iz sürme tekniklerinin kullanılması, non-invaziv görüntülemeye olanak sağlamaktadır.

2.2 VİTAMİNLER

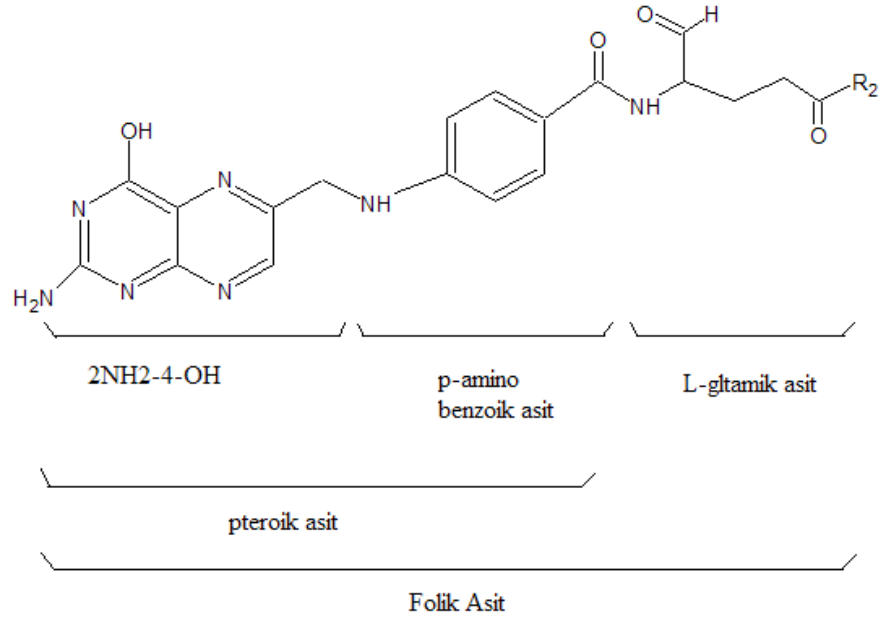
Vitaminler, özel hücresel fonksiyonların yerine getirilmesinde vücudun eser miktarda gereksinim duyduğu organik bileşiklerdir. Çözünürlüklerine ve metabolizmadaki fonksiyonlarına göre sınıflandırılabilirler (Champe and Harvey, 1997). Organik çözenlerde çözünenler (A, D, E ve K) 'yağda çözünen' vitaminler grubunu ve B1 vitamini (tiyamin), B2 vitamini (riboflavin), B6 vitamini, B3 vitamini

(niyasın), B12 vitamini, folik asit, biyotin, pantotenik asit ve C vitamini ise 'suda çözünen' vitaminler grubunu oluşturur.

Çözünürlüklerine göre yapılan bu sınıflandırma, vitaminlerin önemli fiziksel özelliklerinin belirlenmesinin yanı sıra yağda çözünen vitaminlerin genellikle yağlara benzer şekilde emilime uğradıklarını, taşındıklarını ve uzun süre depolandıklarını anımsatmaktadır. Bu sınıflama suda çözünen maddelerle aynı metabolik sonu paylaştıklarını, vücutta daha kısa süre tutulduklarını ve idrarla hızlı şekilde atıldıklarını belirtmektedir. Ayrıca genel fonksiyonel fark olarak suda çözünen vitaminlerin memeli ve mikroorganizmalardaki çeşitli enzimatik tepkimelerde koenzim olarak önemli işlevleri bulunmaktadır. Buna karşılık mikroorganizmalar tarafından nadiren kullanılan yağda çözünen vitaminlerin koenzim işlevi bulunmaz (Burtis and Ashwood, 2005).

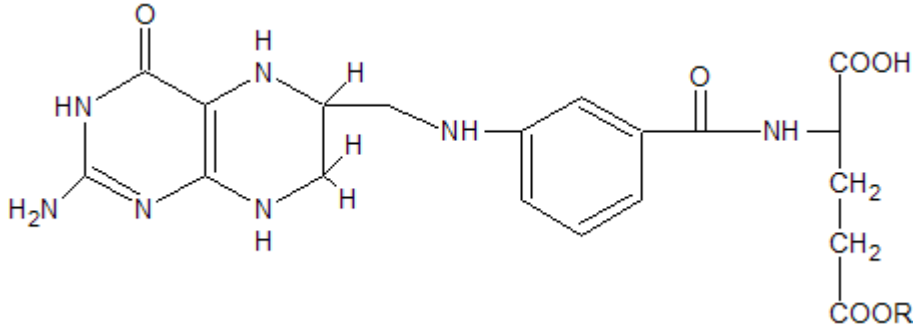
2.2.1 Folik Asit

Folik asit, B grubundan bir vitamindir. Yeşil yapraklarda yaygın olarak bulunduğu için bu ad verilmiştir. Çünkü Latince'de 'folum' yaprak manasındadır. Mitchell ve arkadaşları bu vitamini 1941 yılında ıspanak yapraklarında keşfetmişlerdir (vikipedi, 2008). Bir grup pteroid asit ile ilişkili bileşiğe genellikle folik asit veya folat adı verilir. Pteroid asit, pteridin halkasına bağlı p-aminobenzoik asit katkısında oluşur (Burtis and Ashwood, 2005).



Şekil 2.1 Folik asitin moleküler yapısı (Burtis and Ashwood, 2005).

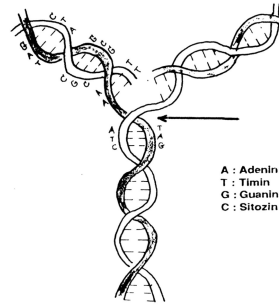
Bu bileşik alkali çözeltilerde floresans verir ve maksimum absorbanları 256, 282 ve 365 nm'dir. Pteroiik asitin bir molekül L-glütamik asit ile konjuge olması sonucu pteroilglütamik asit (PteGlu) elde edilir. Bu bileşik, dihidrofolik asit'e (H₂PteGlu veya FH₂) veya tetrahidrofolik asit'e (H₄PteGlu veya FH₄) indirgenir. Sadece indirgenmiş şekiller biyolojik aktivite göstermektedir. İnsanlarda serum veya diğer vücut sıvılarında çeşitli folik asit şekilleri bulunmasına karşın en önemli folik asit şekli tetrahidrofolattır (Kisliuk, 2006).



Şekil 2.2 5,6,7,8-Tetrahidrofolik asit. (Kisliuk, 2006).

2.2.2 Folik Asit ve Over Kanseri

Bir canlıya ait tüm genetik bilgiyi taşıyan DNA molekülünün birimleri nükleotidlerdir. Bir nükleotidde fosforik asit, deoksiriboz ve organik baz bulunur.

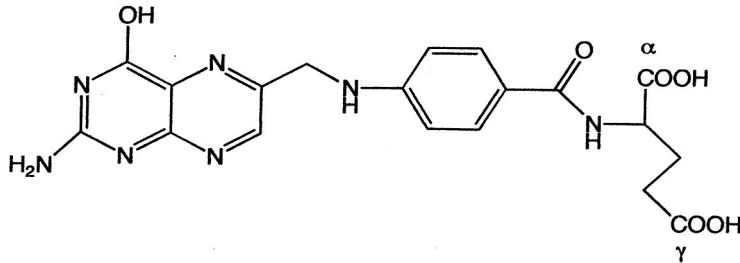


Şekil 2.2.1 DNA'nın yapısı ve replikasyonu. (www.aof.anadolu.edu.tr, 2008)

Organik bazlar, purin ve pirimidin olmak üzere ikiye ayrılır. Purinler adenin ve guanin, pirimidinler timin (urasil) ve sitozinden oluşur (<http://www.aof.anadolu.edu.tr>, 2008). Folik asit (veya folat), tek karbon metabolizmasında anahtar rol oynar, purinler ve pirimidinlerden timin biyosentez için gereklidir. Kansere hücreleri normal hücrelerden çok daha hızlı bölünmektedir. Böylelikle DNA replikasyonu artmaktadır. DNA replikasyonu sırasında nükleotid oluşumunda gerekli olan bazların oluşumu için daha fazla folik aside gereksinim duymaktadırlar. Bu nedenle kanser hücrelerinde folat reseptörü artışı sözkonusudur. Folik asit, reseptörlerde diğer tip tümör hücreleri için de tümör belirleyici olarak kullanılmaktadır (over, endometrial, kolorektal, meme, akciğer, reba ve beyin). Özellikle over kanser hücrelerinde folat reseptör sentezinin sıklığı saptanmıştır (Sudimack et al., 2000). Over kadınlarda görülen kanser türlerinin yedincisidir. Kadınlarda kanserden ölüm sebebi olarak ise bu kanser türü dördüncü sıradadır. Over kanserinin erken teşhisi çok büyük bir önem arz etmektedir. Dokuların patofizyolojisinin tespiti için radyoaktif folat konjugasyonlarının kullanılmasıyla; non-invaziv (girişimsiz) görüntüleme şansı ortaya çıkmaktadır. Bu gelişmeler, yani tümör seçici radyofarmastiklerin gelişmesi, birincil ve metastatik lezyonların yerinin ve varlığının saptanmasını, tümör evrelerinin ve tedavisinin planlanması hakkında bilgi vermek ve tedaviye cevap veren tümörlerin görüntülenmesine olanak sağlamaktadır (Sudimack et al., 2000).

2.3. Folat Reseptörleri

Reseptör, hücre içinde ya da üzerinde hormon, ilaç, virüs v.b.'nin özel olarak bağlandığı ve bazı hallerde özel bir hücre cevabının verilmesine yol açan ve bunların hücreye girmesini sağlayan, protein, glikoprotein ya da oligosakkaritlerden oluşan yapılardır (<http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr>, 2008). Folat reseptör, hücre membranında bulunan folat bağlı proteinlere yüksek afinitesi vardır ve glikozilfosfatidilinositol (GPI) bağlı membran glukoprotein olup, belirgin ağırlığı 38-40 kDa arasındadır. İnsanlarda folat reseptörün iki tane membran bağ tipi vardır. Bunlar α ve γ izomerleridir (Şekil 3.1). Folat reseptörün α izomerinden bağlanan folik asitin ayırma gücü katsayısı 0.1 nM olup, bu değer reseptör ile folat bağlanması için yaklaşık on kat düşük bir K_d değeridir. Bu nedenle folat reseptör, γ izomerinden bağlanan folik asite yüksek spesifik bağlanma olanağı sağlayacaktır (Sudimack et al., 2000).

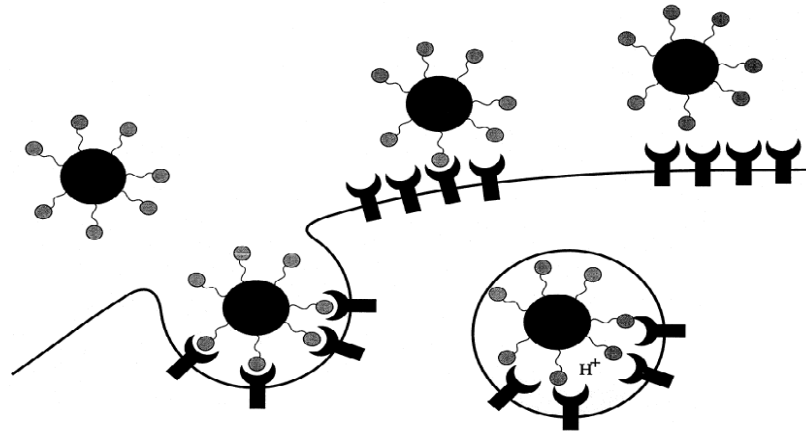


Şekil 2.3.1. α ve γ karboksil gruplarının bağlı folik asit yapısı.

Folat reseptörleri (FR), farklı kanser tiplerinde; özellikle over kanserinde sıklıkla görülmektedir. Folik asit ve folat konjugasyonları;

malign (kötü huylu) dokuda sıklıkla bulunan folat reseptörlerine karşı yüksek ilgiye sahiptir. Bu durum folik asit ve folat konjugatlarının özellikle hedef kanser hücrelerinde tutulumlarını olanak sağlamaktadır. Radyonüklid ile işaretlenmiş konjugatlar; tümör hücrelerinde artmış olan folat reseptörleri tarafından tutulmalarıyla tümörün görüntülenmesi yapılabilmektedir.

Folik asit'in hücre içine alınması 'fagositoz' olayına örnek teşkil eder. Endositoz, hücre içine büyük moleküllerin alınmasında geçerlidir. Bu tip bir durumda, hücre zarının belirli bölgeleri içeriye doğru çöküntüler yaparak bir kesecik şeklini alır. Hücre içine alınacak olan maddeyi içine hapseden bu kesecik, daha sonra zardan koparak hücrenin içine geçer ve ihtiyacın olduğu yere ulaşır. Eğer hücre içine alınması gereken madde sıvı ise olayın adı 'pinositoz (içme)' olarak, katı ise de 'fagositoz (yeme)' olarak bilinir.



Şekil 2.3.2 Folat reseptör hedefli endositozun şematik gösterimi (Sudimack et al., 2000)

Folat reseptör (+) hücrelerine sahip tümör hücrelerine ilaç gönderiminin iki şekilde gerçekleştiği yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Birincisi, reseptöre monoklonal antikor bağlamak, ikincisi ise folat reseptörüne karşı yüksek affiniteye sahip folik asit bağlamaktır. Monoklonal antikor bağlamak, klinik olarak tümör görüntüleme ve immünoterapi için uygun ve over kanserli hastalarda anlamlı hedeflenebilirlik göstermiştir. Folik asit ise folat reseptörlerine yüksek ilgiye sahip bir ligandır. Folik asit, γ karboksil yoluyla elde edildiği zaman folat reseptörlerine bağlanma özelliği göstermektedir. Bu nedenle; folat konjugatları, folat reseptörlerin hedeflenmesinde alternatif bir yöntem olarak önerilmektedir. Yapılan çalışmalara göre folatın FR ile birleşiminde, molekül ağırlığı hafif olan radyofarmasötiklerin radyoşaretli antikorlardan çok daha uygun farmakokinetik gösterdiği ve ayrıca bu radyofarmasötiklerin çok daha fazla tümör seçiciliği gösterdikleri ortaya konulmuştur (Sudimack et al., 2000)

2.4. Radyoşaretli Folik Asit Türevleri

Folat reseptör hedefleme ile yapılan tümör görüntüleme farklı ajanlar kullanılarak da yapılmıştır. Örneğin; PEG-folat, ^{67}Ga -DF-folat, ^{111}In -DTPA-folat, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-folat gibi radyoaktif konjugatlar kullanılmıştır. İn-vitro olarak işaretli konjugatlar ile folat reseptörünü hedeflemişlerdir. Düşük molekül ağırlıklı folat konjugatları, radyoşaretli antikorlarla karşılaştırıldığında folat konjugatlarının vücuttan

temizlenmesi daha hızlıdır. Bunun sebebi yapısının küçük olmasıdır. Tümör/zemin oranları yüksektir. ^{67}Ga , ^{111}In , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ içeren folat konjugeleri değerlendirilmiştir.

^{111}In -DTPA-folat radyoışaretli konjugatın radyofarmasötik potansiyeli incelenmiştir tümör/kan oranı 82/1 olarak kaydedilmiştir (Wang et al., 1997). Bu çalışmanın devamı olarak 2003 yılında, Siegel ve arkadaşlarınca yapılan çalışmada kötü huylu ve iyi huylu lezyonların saptanmasında non-invaziv görüntüleme sağlayabilmişlerdir (Siegel et al., 2003).

Guo ve arkadaşları $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidi ile işaretli HYNIC-folat' ın bağlanma özelliğini hücre kültüründe çalışarak FR'lerin endositoz ile hücre içine alınımı serbest folik asitin alınmasından çok daha iyi olduğunu göstermişlerdir (Guo et al., 1999).

Mathias ve arkadaşlarınca folat bileşiğine DEF ligandının bağlanmasını içeren sentez aşamaları sonucunda ^{67}Ga radyonüklidi ile işaretlenmesi FR' lere gönderilen bileşiğin tutulumunun sadece DF bileşiği ile oluşturulan ^{67}Ga -DF bileşiğine göre 100 kat daha fazla hedeflenme kabiliyeti göstermiştir (Sudimack et al., 2000).

Okarvi ve arkadaşı Jammaz FR'lere radyoışaretli folat konjugatlarının gönderiminde şelatlayıcı ajanın bu hedeflemede nasıl bir rolü olduğunu araştırmışlardır ve bunu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3-folat ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG2-folat radyofarmasötikleri ile gerçekleştirmişlerdir. Hücre kültürü çalışmaları sonucunda elde edilen verilere göre, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG2-folat'ın

^{99m}Tc -MAG3-folat'a göre FR'lere bağlanma gücünün daha fazla olduğunu kanıtlamışlardır (Okarvi et al., 2006).

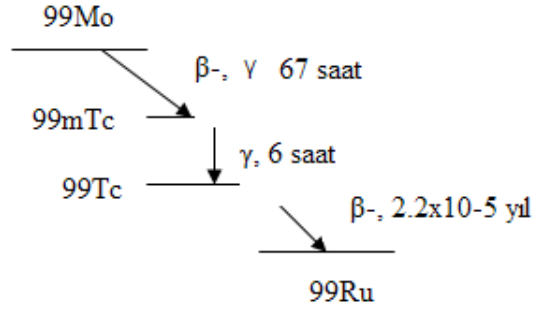
Kim ve arkadaşları 2007'de yapılan çalışmalarında ^{99m}Tc işaretli PEG-folat'ı gönderimi sonucunda 4 saatte tümör/kas oranı 4.3 ve 4. saat sonrasında ise 1.2'nin altında olduğu gözlenmiştir (Kim et al., 2007).

Bu çalışmaların yanı sıra terapötik olarak Baker ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yapılan çalışmada metotreksat isimli antikanser ilacı folat ile birleştirmişler ve bu tedavinin etkili olduğunu göstermişlerdir (Baker et al., 2005).

2.5 Teknesyum-99m (^{99m}Tc) Kimyası

Teknesyum, periyotlar cetvelinde ilk keşfedilen sentetik elementtir. İsmi Yunancada sentetik anlamına gelen technetos'tan gelir. İtalyan bilim adamları Carlo Perrier ve Emilio Segre tarafından 1937 yılında siklotron molibdenin döteryum ile ışınlanması sonucu elde edilmiştir (Vikipedi, 2007). ^{98}Mo bir nötron yakalayarak ^{99}Mo 'a dönüşür. ^{99}Mo , 66 saat yarı ömürle negatif beta (β^-) ve gama (γ) ışınması bozunumu yaparak, Teknesyum-99m (^{99m}Tc)'e dönüşür. Teknesyum'un en uzun yarı ömürlü olan ^{98}Tc 'in yarı ömrü yaklaşık 4.200.000 yıldır. Beta bozunması ile ^{98}Ru 'e dönüşür. Teşhis için kullanılan radyofarmasötiklerin çoğu; jeneratör vasıtası ile elde edilir. Nükleer tıp uygulamaları için kullanılan ^{99m}Tc 'in yarılanma süresi 6 saat ve enerjisi 140 keV'dir. ^{99m}Tc ; jeneratörden en muhtemel oksidasyon düzeyi olan +7 değerlikli perteknetat yapısında sağılır. ^{99m}Tc jeneratörü alüminyum oksit (Al_2O_3)

üzerinde adsorbe edilmiş fisyon ürünü ^{99}Mo içerir. En önemli enerjisi 740 keV'lik γ enerjisidir. Beta (β^-) bozunumu ile % 87.5 oranında ^{99m}Tc 'e dönüşür (Ünak, 2003).

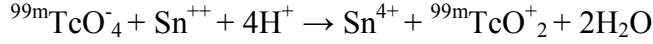


Şekil.2.4. ^{99m}Tc Bozunum Şeması

Jeneratörden elde edilen steril ve izotonik sodyum perteknetat çözeltisi jeneratörden alındığı şekilde nükleer tıp kuruluşlarında sintigrafi çalışmalarında veya genellikle liyofilize kit olarak sağlanan çeşitli kimyasal bileşiklere bağlanarak tanı amacıyla in-vivo olarak kullanılabilir. Ancak ^{99m}Tc perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) yapısında iken ortamda bir indirgen ajan yoksa kendiliğinden elektronegatif gruplarla şelat bileşikler oluşturamaz. Genelde ^{99m}Tc komplekslerinin çoğu kompleks yapacak ajanın varlığında, perteknetatı indirgeyici ajanla (Sn-II iyonu gibi) indirgenmesi ile hazırlanırlar. Bu şekilde indirgenmiş teknesyum, oksoteknesyum ($(\text{O}=\text{}^{99m}\text{Tc}=\text{O})^+$, $(\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{O})^{3+}$) veya nitrodoteknesyum ($(\text{}^{99m}\text{Tc}\equiv\text{N})^{2+}$) yapısındadır. Teknesyum oksoteknesyum veya nitridoteknesyum yapısında iken ortaklanmamış elektron bulunan N, S, O, P gibi elektroşelatlayıcı gruplarla (SH (tiyol), CO_2 (karboksilat), -NH

(amin), PO_4^- (fosfat), CNOH (oksim), OH^- (hidroksil), P (fosfin), NC (izonitril) ile 6 koordinasyonlu şelat bileşikler oluşturabilir.

Aşağıdaki denklem $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ 'nin Sn(II) ile asidik ortamda indirgenmesini göstermektedir.



Perteknetat'ı indirgemek için kalay klorür, kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl, sodyum borhidrit, demir sülfat çeşitli indirgen ajanlar kullanılmaktadır (Ünak, 2003).

2.5.1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ işaretli bileşiklerin kalite kontrolü

Radyofarmasötiklere duyulan ihtiyaç dünyanın her yerinde olduğu gibi Türkiye'de de giderek artmaktadır. Radyofarmasötiklerin hazırlanmasında ve uygulanmasında insan sağlığına zarar verilmemesi ve mümkün olan en kaliteli bilginin temin edilmesi şarttır. Nükleer tıpta radyofarmasötiklerin yaklaşık % 90'ı tanı, geri kalanı ise tedavi amacıyla kullanılır. Genellikle eser miktarda kullanıldıkları için farmakolojik etkileri yoktur. İnsanlara verildikleri için steril, apirojen olmalıdır ve normal ilaçlara uygulanan kalite kontrollere tabi olmalıdırlar. Radyofarmasötiklere uygulanan kalite kontrol testleri Avrupa farmakopesinde (Eur-Ph) verilen tariflere uygun olarak yapılmaktadır. Eur-Ph'da radyofarmasötikler için verilen monogramlarda belirtilen kalite kontrol testleri bulunmaktadır. Radyonüklidik saflık, uygulanması amaçlanan radyonüklide ait radyoaktivitenin radyofarmasötikte bulunan

toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanır. Radyonüklid üretimi sırasında radyonüklid safsızlıklar ürün olarak oluşabilir. Bu radyonüklid safsızlıkların radyofarmasötikte bulunuşunun sakıncaları vardır. Hem hastaya fazla radyasyon dozunun verilmesine neden olur, hem de sintigrafik imajlamada görülmek istenilen organı örtebilir. Radyokimyasal saflık, bileşikte belirtilen kimyasal yapıdaki radyonüklidin radyoaktivitesinin toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanır. Çoğu tanı radyofarmasötiklerinde radyokimyasal saflığın % 95'in üzerinde olması istenir. Radyokimyasal saflık tayini için kağıt kromatografisi, ince tabaka (TLC) ve hızlı ince tabaka (ITLC) kromatografisi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) jel kromatografisi, kağıt ve selüloz asetat elektroforezi kullanılır. Son yıllarda ^{99m}Tc radyofarmasötiklerinin radyokimyasal saflık tayininde ITLC çabuk olması açısından tercih edilmektedir (Akgün et al., TAEK, 2002).

2.5.1.1 İnce tabaka kromatografisi (Thin layer chromatography):

İnce tabaka kromatografisi (TLC), bir 'katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir'. Bu yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki cam plakalar üstüne, ince tabaka halinde kaplanmış katı adsorban maddeden oluşmaktadır. Asorblanan madde olarak; alumina, silika jel, selüloz v.b. katı maddeler kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür. Bu işlem sırasında, plakanın alt kesimlerine mikropipetle önceden damlatılmış

olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır (Yurt, 1998).

Bileşiklerin saptanmasına yardımcı olmak amacıyla, referans materyali de plağa uygulanır ve örneklerle birlikte kromatografi işlemi yürütülür. Örneklerin aldıkları yolların ve lekelerin özelliklerinin referans bileşiklerle karşılaştırılması ile geçici bir saptama yapılır. Bileşiğin göreceli-göç ettiği uzaklık göç uzaklığı 'R_f' olarak gösterilir. R_f örnek lekesinin göç uzaklığının hareketli faz göç uzaklığına bölümüdür. TLC'nin avantajları; bir bileşiğin ayrılma ve görüntülenme kolaylığı; temizleme aşamasına gerek olmadan, saf olmayan 'kirli' örneklerin kromatografisinin yapılabilme olanağı; tek bir çalışmada birden çok örneği analiz edebilme kapasitesi ve düşük maliyetli olmasıdır (Bowers et al., 2008).

$$R_f = \frac{\text{radyokimyasal bileşenin ilerlediği uzaklık}}{\text{çözgenin ilerlediği uzaklık}}$$

2.5.1.2 Kağıt elektroforezi

Elektroforez, çözeltideki iyonların elektrik akımının tesiri ile meydana gelen hareketlerini tanımlamak için kullanılan terimdir. Elektroforez çok çeşitli iyonize maddelerin ayırımı ve analizi için uygulanan çok yönlü ve güçlü bir analitik tekniktir. Klinik laboratuarlarda ayrılması istenen analizler arasında vücut sıvı ve

dokularında bulunan proteinler, peptidler, aminoasitler, nükleik asitler, oligonükleotitler, nükleotitler, nükleozitler, organik asitler ve küçük anyon ve katyonlar sayılabilir. Elektriksel alan içerisindeki göç, elektrik akımının şiddetine, net yüke, molekül şekline, solüsyonun iyonik gücüne, viskozitesine ve sıcaklığına bağlıdır. Göç hızı protein molekülü üzerindeki yükün büyüklüğü ile doğru orantılıdır. İyonik bileşiklerin iyonlaşması, elektroforezin temelini oluşturmaktadır. Elektriksel alanda (+) yüklü tanecikler (katyonlar), (-) kutba (katoda); (-) yüklü tanecikler (anyonlar), (+) kutba (anoda) doğru hareket ederler (Skoog, 1998).

2.5.1.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografi bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasının uygun olması ve hepsinden de önemlisi sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu gibi maddelere örnek olarak; aminoasitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilmektedir. HPLC'nin en önemli avantajı ayırma gücü, duyarlılığı ve ger kazanımın yüksek, hızlı bir yöntem olmasıdır. Bu yöntemde hareketli faz 10-400 atm basınç altında kolondan 0.1-5 mL/dk. gibi yüksek bir hızla geçirilir. Bunun sonucu ayırma hızı çok daha düşük olan ve hidrostatik basınçla

çalışan açık sıvı kolon kromatografisine göre çok daha yüksek olmaktadır. Ayrılmak istenen karışım, kolonun başından enjekte edilir. Birbirinden ayrılan maddeler kolonu terk edip dedektörden geçtikten sonra kaplarda toplanır. Sonuçta ayrılan maddeler pikler halinde kağıda kaydedilir. Bu maddelerin kimyasal özelliklerindeki farklılık kolonda alıkonna süreleri (Rt) olarak yansımaktadır (Skoog, 1998; Theobald, 1989).

2.6 Lipofilite

Lipid znrlğ (lipofilite), maddenin yağda çözünme eğiliminin ls; lipid/su katsayısı, yani lipofilitesidir. Maddenin lipid/su katsayısı ne kadar büyükse; lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur. Küçük suda çözünür moleküller normal su akışını sağlayan su porları (iç su dolu kanallar) aracılığı ile geçerler. Büyük suda çözünür moleküller membranın lipid kısmından yavaş bir Şekilde geçerler. Genellikle fazla iyonize olan maddelerin yağda znrlğ azalır. Bu nedenle membrandan zor geçerler (Theobald, 1989).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

Tc-99m ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) (Monrol A.Ş.) (E.Ü.Nükleer Tıp A.D.'ndan sağlanmıştır),

Folik Asit (Sigma-Aldrich),

Kalay klorür dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck),

Sitrik Asit (Merck),

N-Hidroksisüksinimid (NHS) (Merck),

1,3-Disikloheksilkarbodiimide (DCC) (Aldrich),

Hidrazin hidrat ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich),

Dimetilsülfoksit (DMSO) (Merck),

Hidroklorik asit (Merck),

Dietileter ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-C}_2\text{H}_5$) (Merck),

Asetonitril (CH_3CN) (Merck),

Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck),

Kalsiyum klorür (CaCl_2) (susuz),

Aseton (CH_3COCH_3) (Merck),

Kloroform (CHCl_3) (Merck),

2-Propanol (Merck),

Metanol (CH_3OH) (Merck),

Trifloroasetikasit (TFA) (Merck),

Asit-sitrat-dekstroz tampon solüsyonu (ACD) (Eczacıbaşı-Baxter),

n-Oktanol (Merck),
Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi),
Membran Filtre (Sartorius),
Filtre Kağıdı (Whatman),
ITLC-SG (Merck-5554),
Elektroforez Kağıdı (Whatman 1).

3.1.2 Kullanılan cihazlar

- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı sayım sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- TLC Scanner (Bioscan AR-2000) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- HPLC Shimadzu Kromatografi (LC-10Atpv quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- Sıvı Kromatografisi/Kütle Spektrometre (LC-MS/MS), [Agilent LC-MSD SL ion trap] (Ege Üniversitesi İlaç Araştırma Enstitüsü),
- Liyoflizatör (Labcom) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- Kağıt Elektroforezi Cihazı (Gelman) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),

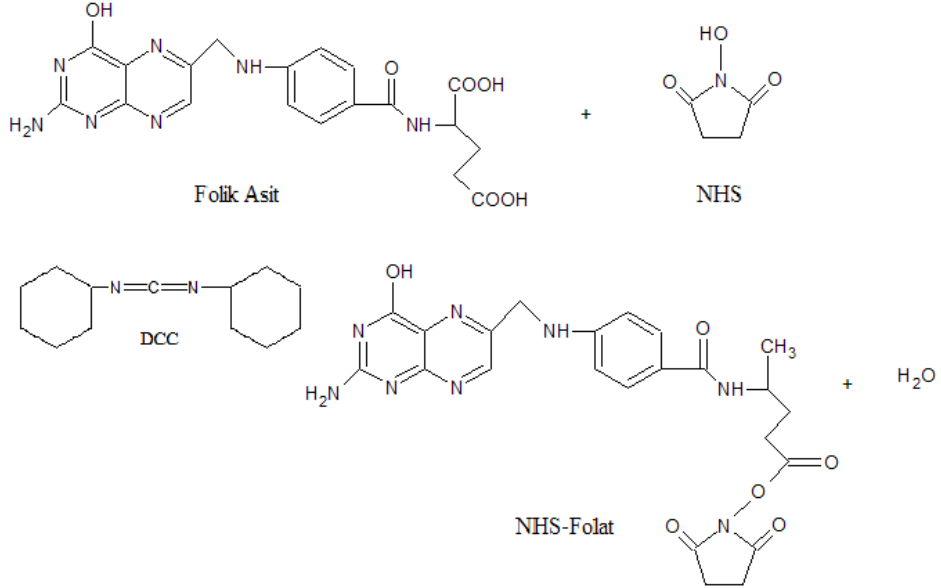
- UV lamba (G15T8 15W Germicidal Lamp UV-C) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı).

3.2 Kimyasal Sentez Basamakları

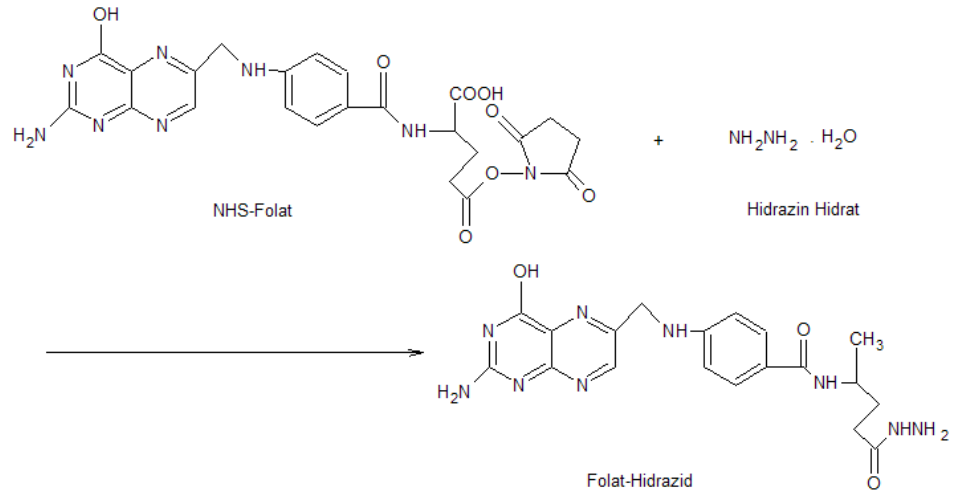
3.2.1 Folat Hidrazid Sentezi

B grubu bir vitamin olan folik asit ticari olarak temin edilmiştir. İlk olarak folik asitin N-hidroksisüksinimid (NHS) esteri sentezlenmiştir. Folik asitin folat hidrazid yapısına dönüştürülmesi için gerekli bir aşamadır. Bu sentezin gerçekleşmesi için 1 g folik asit, 50 mL dimetilsülfoksitte (DMSO) çözülmüştür ve çözeltiliye 1:1 oranında N-hidroksisüksinimid (NHS) / disikloheksilkarbonimid (DCC) eklenmiştir. Bu reaksiyonun tamamlanması için 16 saat, oda sıcaklığında ve ışıksız ortamda bekletilmiştir. Reaksiyon sonucunda oluşan yan ürün disikloheksilüre filtre edilerek uzaklaştırılmıştır. Oluşan NHS-folat çözeltisi kullanılabildiği kadar -20°C ' de saklanmıştır (Şekil 3.1). Daha sonra folat-hidrazid sentezi için, NHS-folat çözeltisine Hidrazin hidrat'ın aşırı miktarda ilave edilmiş ve bu karışım oda sıcaklığında 4 saat karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Folat-hidrazid çözeltisine HCl ilave ederek ürün, hidroklorid tuzuna dönüştürülmüştür ve 1:1 oranında aetonitril/dietileter ile işleme sokulmuştur. Çöktürme işlemini gerçekleştirmek için etanolle muamele edilmiştir ve santrifüjlenmiştir. Elde edilen çökelek liyofilize edilerek kurutma işlemi gerçekleştirilmiş ve çalışmalarda buradan alınarak yapılmıştır. Folat-Hidrazid bileşiği elde

edilmiştir (Şekil 3.2). Daha sonraki sentez basamaklarında kullanılmak üzere -20°C 'de derin dondurucuda saklanmıştır.



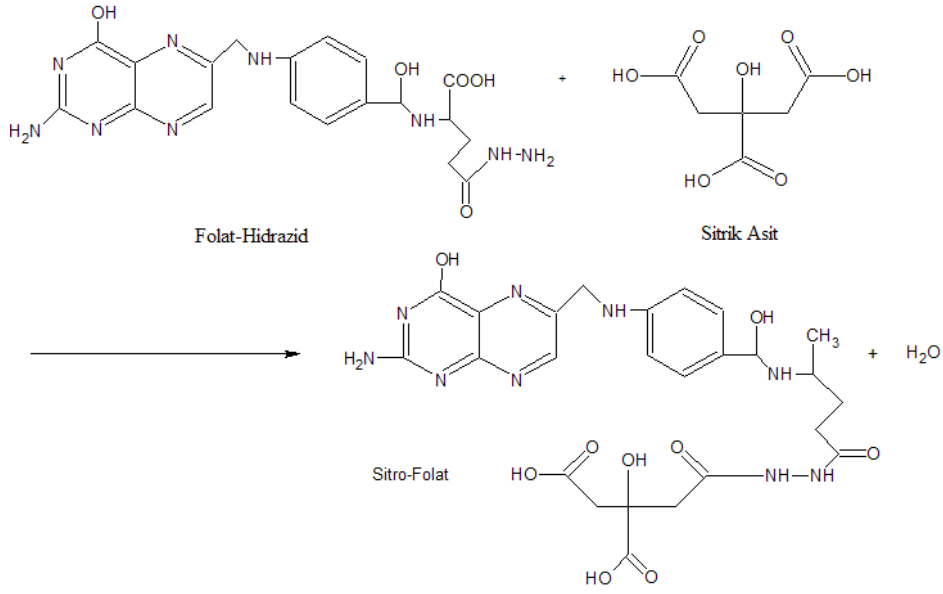
Şekil 3.1 NHS-Folat bileşiğinin sentezi



Şekil 3.2 Folat-Hidrazid bileşiğinin sentezi

3.2.2 Sitro-Folat bileşiğinin elde edilmesi

Bu sentez basamağında, sitrik asitten 0.1 mmol tartılmıştır ve bir beher içerisine alınarak DMSO (dimetilsülfoksit)'da çözülmüştür. Sentezlenen folat-hidrazid bileşiğinden 0.01 mmol alınıp, hazırladığımız sitrik asit çözeltisine ilave edilmiştir. Bu karışım üzerine 0.05 mmol CaCl_2 ilave edilmiştir ve reaksiyonun tamamlanması için yaklaşık 1 saat karıştırılmıştır. Reaksiyon sonucunda elde edilen çözelti etanole çöktürülerek liyofilize edilmiştir. Sonuç olarak elde edilen portakal renkli sitro-folat bileşiğidir.



Şekil 3.3 Sitro-Folat Bileşiğinin Sentezi

3.3 İnaktif Bileşenler için Kullanılan Kromatografik Yöntemler

Folik asit, NHS-folat, Folat-hidrazid, Sitro-folat ve Sitrik asit maddelerinin kalite kontrolü İnce Tabaka Kağıt Kromatografi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 TLC yöntemi

Bileşiklerin ince tabaka kromatografisi ile kalite kontrolü için silikajel kaplı, kalınlıkları 0.1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki alimünyum tabakalar (Merck 5554) kullanılmıştır ve bu tabakalar 1.5 x 10 cm' lik şeritler halinde kesilmiştir. Her bileşik için ayrı şerit hazırlanmıştır ve şeritlerin başlangıç noktasından üzerine 0.5 cm içeriye kapiler (kılcal boru) yardımıyla inaktif bileşenler damlatılmıştır. Solvent sistemi olarak 2-propanol: kloroform (7:3) kullanılmıştır. TLC'ler tankın içerisine yerleştirilmiştir ve bitiş noktasına yaklaşık 8 cm varken şeritler çıkartılıp, oda sıcaklığında kurutulmuşlardır. Kurutulan TLC şeritlerine UV lamba altında bakılmıştır ve R_f değerlerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Bu bölüme ait sonuçlar 4. Bölüm'de belirtilmiştir.

3.3.2 HPLC yöntemi

Bu çalışmada uygulanan HPLC analizlerinde Nucleodur 100-5 C18 RP-C18 kolonu (250 x 4.6 mm I.D.) (Macharey-Nagel) kolon kullanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olup, dalga boy 240 ve 280 nm'ye ayarlanmıştır. Şekil 3.1'de gradient sistemi açıklanmıştır. İnaktif Folik asit, NHS-folat, Folat-hidrazid, Sitro-folat ve Sitrik asit bileşenlerine ait kromatogramlar 4. Bölüm'de verilmiştir.

Çizelge 3.1 HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar

Kolon	RP-C18 (100 x 5 mm I.D.)
Akış hızı	1 mL / dak
Dalga boyu	240 nm ve 280 nm
Mobil faz	% 0.1 TFA Asetonitril ve TFA su
Sıcaklık	40 °C

Çizelge 3.2 HPLC solvent sistemi zaman programı

Uygulanan	Zaman (dk.)	(%) Konsantrasyon (Asetonitril)	(%) Konsantrasyon (Su)
Zaman	0.03	15	95
Programı	20	10	90

3.4 İşaretleme Yöntemi

^{99m}Tc -Sitrata, ^{99m}Tc -Sitra-Folat, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İndirgenmiş teknesyum (İnd. ^{99m}Tc) bileşiklerine ait RHPLC ve RTLC R_f değerlerini içeren çizelgeler ve elektroforez diyagramları 4. Bölüm'de verilmiştir.

3.4.1 ^{99m}Tc-Sitrat' ın hazırlanması

10 mg sitrik asit 2 mL saf suda çözülerek çözelti hazırlanmıştır. Çözeltinin pH' ı 0.5 N NaOH ile 5'e çekilmiştir. Hazırlanan sitrat çözeltisi üzerine 0.2 mL SnCl₂ (1 mg SnCl₂.2H₂O / 1 mL H₂O) ilave edilmiştir. Üzerine 0.1 mL 37 MBq (1 mCi) ^{99m}TcO₄⁻ ilave edilerek 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir (Ercan et al., 1992).

3.4.2 ^{99m}Tc-Sitro-Folat' ın hazırlanması

Sentez sonucu elde edilen Sitro-folat'tan 0.5 mg alınıp 1 mL DMSO' da çözülerek çözelti hazırlanmıştır. Buradan 300 µg alınıp üzerine 100 µL kalay klorür çözeltisi (1 mg SnCl₂.2H₂O / 1 mL H₂O) ilave edilmiştir. Çözelti üzerine 0.1 mL 37 MBq (1 mCi) ^{99m}TcO₄⁻ ilave edilmiş ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretleme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

3.5 Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler

3.5.1 Kağıt elektroforezi yöntemi

Elektroforez işlemi 1.5x24 cm boyutlarındaki Whatman elektroforez kağıtları kullanılmıştır. Kağıtların pozitif ve negatif uçları ile kağıdın 10. cm'sine uygulama noktası işaretlendikten sonra kağıtlar banyo çözeltisi olan % 0.9'luk serum fizyolojik (SF) çözeltisinde ısıtılarak elektroforez kabına yerleştirilmiştir. Uygulama noktasına 5 µL'lik örnekler ^{99m}Tc -Sitat, ^{99m}Tc -Sitrafolat, $^{99m}\text{TcO}_4^-$, İnd. ^{99m}Tc damlatılmıştır. 1.5 saat boyunca 250 Volt potansiyel fark altında elektroforez işlemi gerçekleştirilmiştir. İşlem tamamlandıktan sonra Whatman kağıtlar elektroforez kabından çıkarılarak oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kağıtlar ortadan kesilerek TLC-Scanner'da ayrı ayrı aktiviteleri ölçülmüştür. Elde edilen yürüme mesafeleri ile örneklerin yükleri hakkında bilgi edinilmiştir.

3.5.2 Radyo ince tabaka kromatografi (RTLC) yöntemi

Sentezlenen aktif bileşiklerin, ^{99m}Tc -Sitat, ^{99m}Tc -Sitrafolat, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc için RTLC ile kalite kontrol çalışmalarında sabit faz olarak (10 x 1.5 cm) boyutlarında silikajel kaplı plakalar kullanılmıştır ve TLC-Scanner cihazı kullanılarak sayımları gerçekleştirilmiştir. RTLC banyo çözeltisi olarak % 0.9'luk NaCl (SF), aseton ve ACD çözeltileri

kullanılmıştır. ^{99m}Tc ile işaretli bileşenlerin, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc ' a ait R_f değerleri ve verimleri Bölüm 4'te verilmiştir.

3.6. n-Octanol / Su Oranın Bulunması (Lipofilite)

^{99m}Tc -Sipro-folat bileşiğinin lipofilite tayini için, bir santrifüj tüpüne eşit hacimde n-oktanol ve su koyulduktan sonra işaretli bileşikten 100 μL (0.5 mg /1 mL) alınarak karışıma ilave edilmiştir. Vortekslenen santrifüj tüpü 1 saat boyunca kurşun kabın içerisinde karıştırılmaya bırakılmıştır. Karıştırma işlemi tamamlandıktan sonra santrifüj tüpü 3000 rpm' de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrasında alt ve üst fazdan farklı tüplere 100'er μL örnek alınmıştır ve Cd(Te) dedektörü ile aktiviteleri sayılmıştır. Aynı işlemler üç kez tekrarlanmıştır. Elde edilen deneysel ve teorik sonuçlar 4. Bölüm'de yer almaktadır.

3.7. Serumda Stabilite

^{99m}Tc -Sipro-folat bileşiğinin serumdaki stabilitesine bakılmıştır. Bu amaçla ^{99m}Tc -Sipro-folat işaretli bileşiğinden 300 μL (0.5 mg/1 mL) alınıp üzerine 600 μL kan serumuna eklenmiş ve 15 dk, 1 saat, 3 saat, 4 saat ve 24 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. RTLC yöntemi ile işaretli bileşiğin kan serumundaki verimi aseton, serum fizyolojik ve ACD solventleri kullanılarak tayin edilmiştir. Serum stabilitesine ait sonuçlar 4. Bölüm'de bulunmaktadır.

3.8. Dişi Albino Wistar Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyodağılım Çalışmaları

Biyodağılım çalışması yapmak için etik kurul izni raporu E. Ü. Hayvan Etik Kurulu'ndan alınmıştır. İşaretli bileşiğin biyodağılımını incelemek amacıyla 16 adet 100-150 g ağırlığında dişi normal Albino Wistar sıçan kullanılmıştır.

Reseptörlü ve reseptörsüz çalışmalar için sıçanlar iki gruba ayrılmıştır. Her bir zaman periyodu için üç adet hayvan kullanılmış olup bunların ortalaması sonuçlar olarak verilmiştir.

Reseptör doyurma çalışması için her bir sıçana 300 µg folik asit intraperitoneal olarak radyoişaretli folat konjugasyonun enjeksiyonun hemen öncesinde verilmiştir.

Her sıçana 20 µg Sitro-folat içeren ^{99m}Tc işaretli bileşik sıçanlara intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir. Enjeksiyondan önce ve sonra enjektörlerin sayımları alınmıştır. Sıçanlar enjeksiyondan sonra 60., 120., ve 180., dakikalarda eter ortamında öldürülmüştür. Organlar (kalp, akciğer, karaciğer, böbrek, incebağırsak, kalınbağırsak, mide, dalak, pankreas, kas, mesane, kan, beyin, over, meme, uterus) tek tek çıkartılarak tartılmıştır ve aktiviteyi Cd(Te) dedektöründe ölçülmüştür. Aktivitelerinin ortalamaları alınmış ve her bir organ için gram başına düşen doz değeri (% ID/g) hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak Excel programında zamana karşı biyodağılım grafikleri elde edilmiştir.

3.9. İstatistik Analizler

Biyodağılım çalışmaları sonucunda elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 10 programı kullanılarak yapılmıştır. Bu amaçla tüm verilerin varyans analizleri yapılmış ve uygulanan işaretli bileşik ile organlar arasındaki ilişki Pearson Korelasyonu Analizi uygulanarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonuçlarına ilişkin bilgiler 4. Bölüm'de bulunmaktadır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İnaktif Bileşenler (Folik Asit, NHS-folat, Folat-hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-folat) için Kullanılan Kromatografik Yöntem Sonuçları

4.1.1 TLC yöntemi ile elde edilen R_f sonuçları

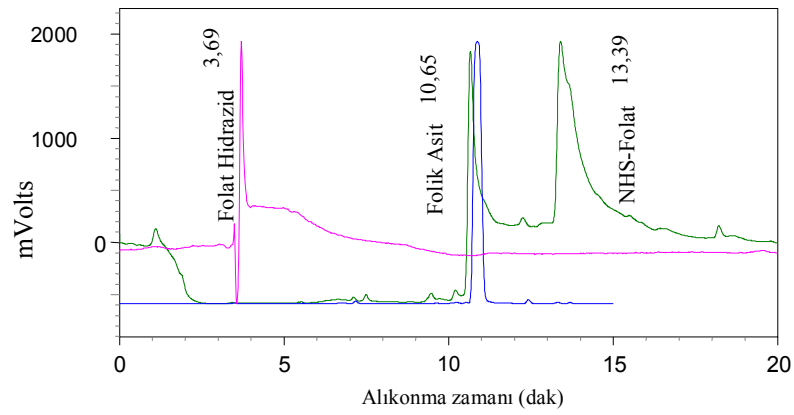
Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi sentez ürünü olan bileşiklerin R_f değerlerinin farklı olması sentez reaksiyonunun gerçekleştiğini göstermektedir. Burada literatüre göre benzer sonuçlar elde ettik (Wang et al., 1997).

Çizelge 4.1 Folik Asit, NHS-Folat, Folat-Hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-Folat bileşiklerinin 2-propanol : kloroform (7 : 3) çözeltisindeki R_f değerleri.

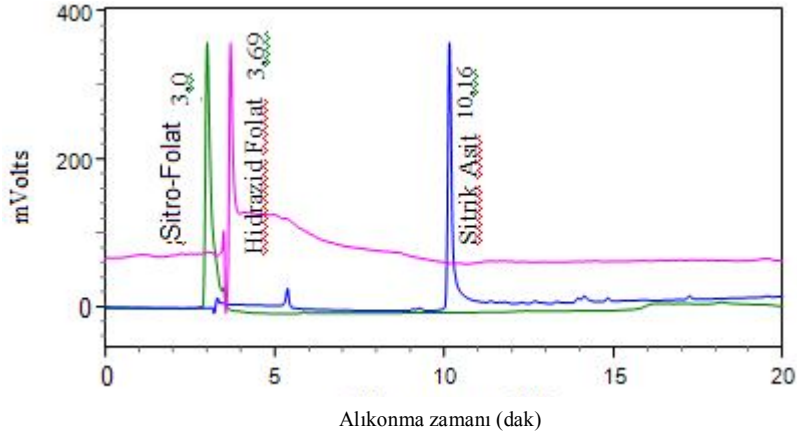
Bileşik	R_f değeri
Folik Asit	0.2
NHS-Folat	0.6
Folat-Hidrazid	0.2
Sitrik Asit	0.7
Sitro-Folat	0.8

4.1.2 HPLC ve RHPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar

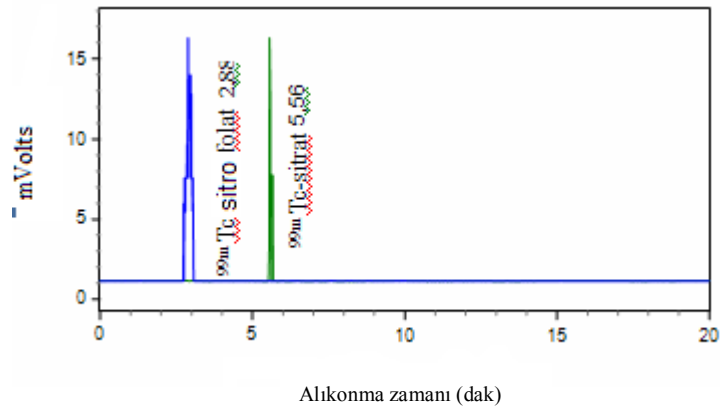
Folik Asit, NHS-Folat, Folat-Hidrazin bileşiklerine ilişkin HPLC kromatogramları Şekil 4.1’de Folat-Hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-Folat bileşiklerine ilişkin HPLC kromatogramları Şekil 4.2’de ^{99m}Tc -Sitro-Folat ve ^{99m}Tc -Sitrat radyoaktif bileşiklere ait RHPLC kromatogramları ise Şekil 4.3’te görülmektedir.



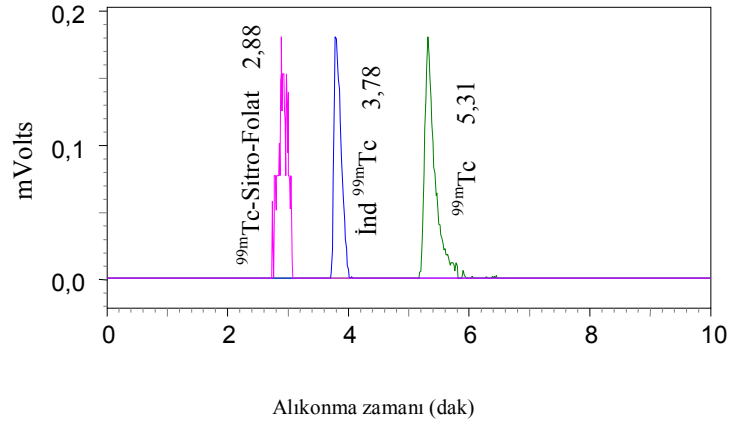
Şekil 4.1 Folik Asit, NHS-Folat ve Folat-Hidrazid bileşiklerinin HPLC kromatogramları



Şekil 4.2 Folat-Hidrazid, Sitrik Asit ve Sitro-Folat bileşiklerin HPLC kromatogramları



Şekil. 4.3 İşaretli ^{99m}Tc -Sitrat ve ^{99m}Tc -Sitro-Folat bileşiklerinin RHPLC kromatogramları



Şekil. 4.4 İşaretili ^{99m}Tc-Sitro-Folat ^{99m}TcO₄⁻ ve İnd. ^{99m}Tc bileşiklerinin RHPLC kromatogramları

280 nm’de UV dedektöründen alınan HPLC ve RHPLC kromatogramları incelendiğinde, başlangıç maddesi olarak kullanılan Folik Asitin 3. Bölüm’de belirtilen koşullardaki R_t (Alıkonma Zamanı) değeri 10.65 dakika, NHS-Folat bileşiğinin ise 13.39 dakika, Folat-Hidrazid bileşiğinin 3.69, Sitrik Asit’in 10.16, Sitro-Folat’ın 3.00, ^{99m}Tc-Sitro-Folat’ın 2.88, ^{99m}Tc-Sitrat’ın ise 5.56, ^{99m}TcO₄⁻’in 5.31 ve İnd. ^{99m}Tc’un 3.78 olarak saptanmıştır. Verilen HPLC ve RHPLC kromatogramlarında R_f değerlerine bakılarak sentezlenen bileşiklerin oluştuğu gözlenmektedir.

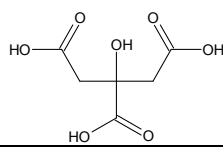
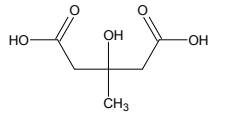
4.2 Moleküler Yapının Belirlenmesi

Folik asit, Sitrik Asit, Hidrazid-Folat, NHS-Folat ve Sitro-Folat bileşiklerinin molekül yapısının belirlenmesi için LC-MS/MS spektrumu alınmıştır. Çizelge 4.2’de ise Sitro-Folat bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC–MS/MS spektrumlarındaki gözlenen m/z değerleri verilmiştir (m: kütle, z: yük). Şekil 4.8 ve 4.9’da asetonitril çözgeni kullanılmıştır ve bu spektrumlara ait şekillerde çözgen etkisi çıkarılmıştır.

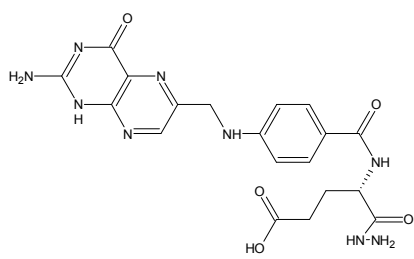
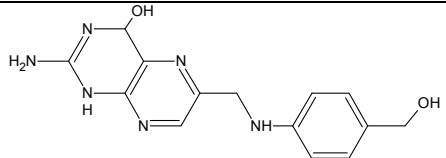
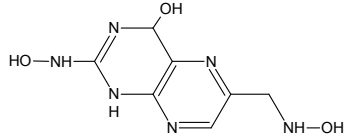
Çizelge 4.2.1 Folik Asit bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC– MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.

	Fragman	m/z
1.		441
2.		295

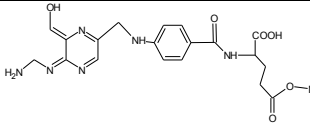
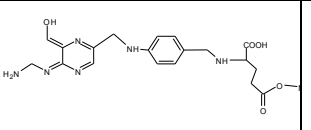
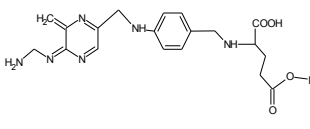
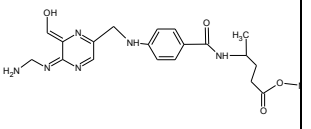
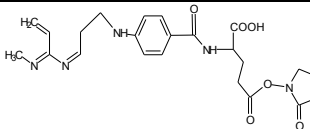
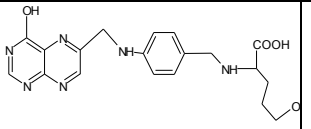
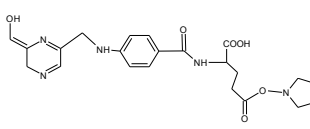
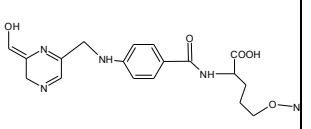
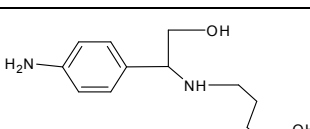
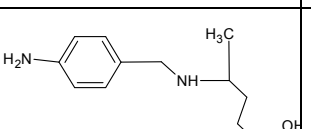
Çizelge 4.2.2 Sitrik Asit bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.

	Fragman	m/z
1.		192
2.		162

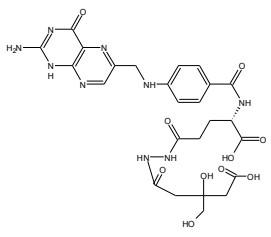
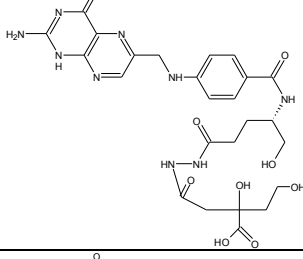
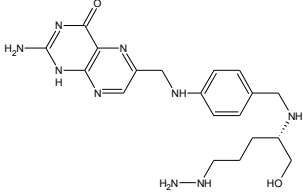
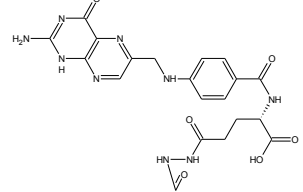
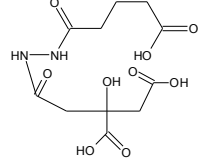
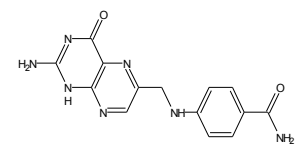
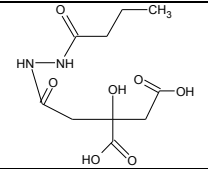
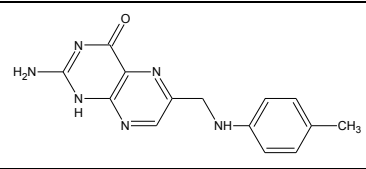
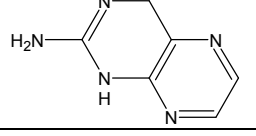
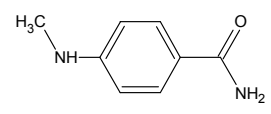
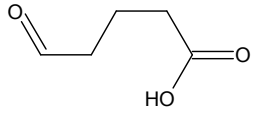
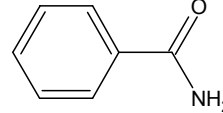
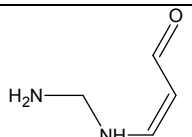
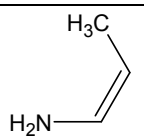
Çizelge 4.2.3 Folat-Hidrazid bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.

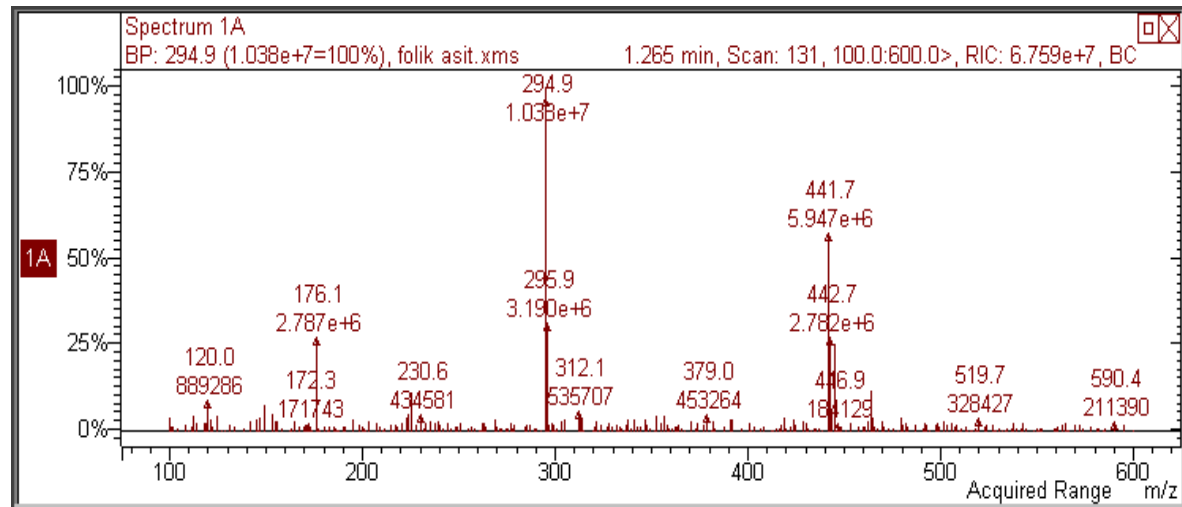
	Fragman	m/z
1.		455
2.		300
3.		226

Çizelge 4.2.4 NHS-Folat bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.

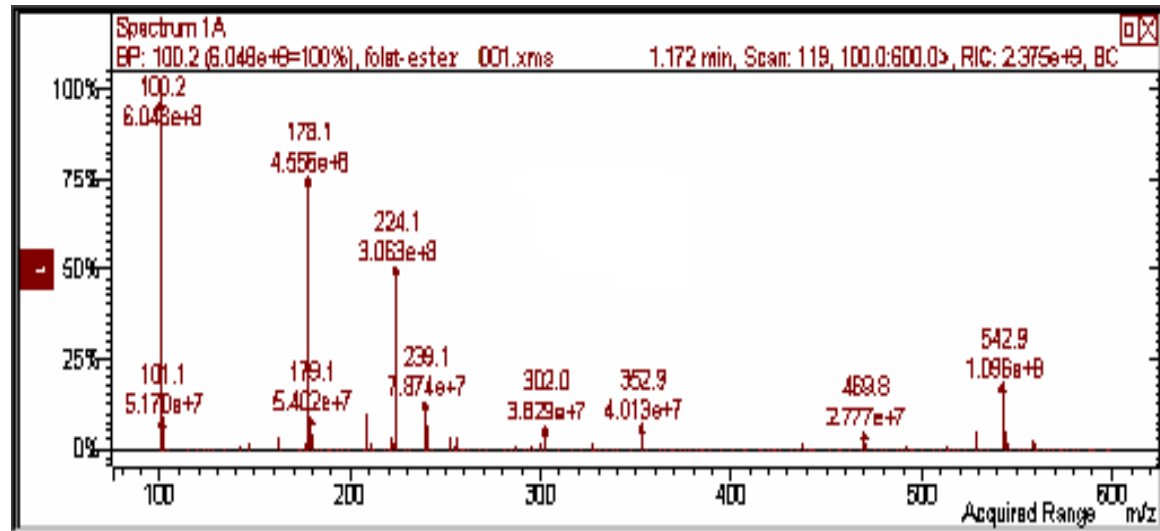
	Fragman	m/z		Fragman	m/z
1.		527	6		513
2,		497	7		497
3.		471	8		469
4.		457	9		443
5.		224	10		208

Çizelge 4.2.5 Sitro-Folat bileşiğine ve çeşitli fragmanlara ait LC – MS / MS spektrumlarındaki gözlenen m / z değerleri.

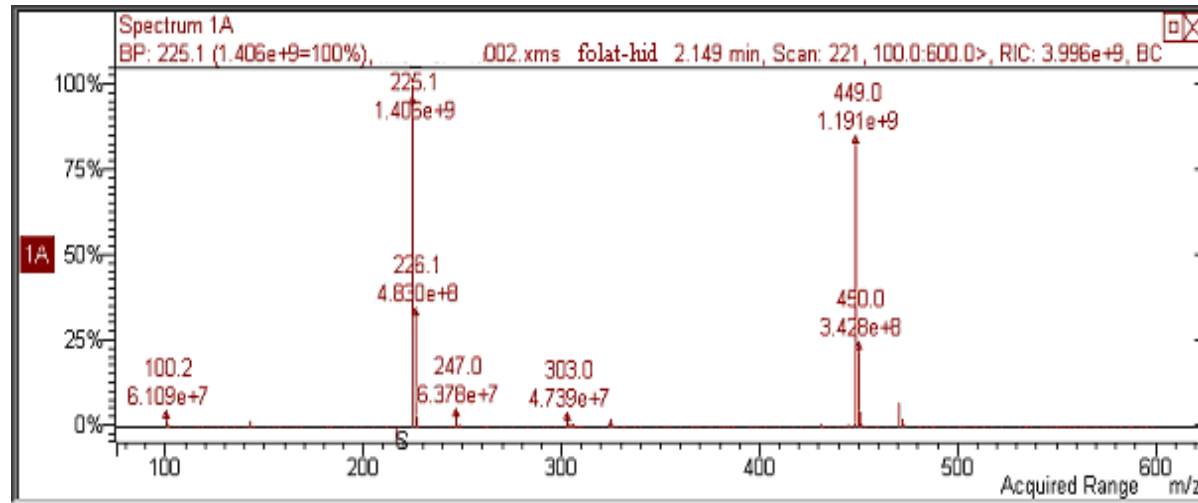
	Fragman	m/z		Fragman	m/z
1.		615	8.		601
2.		413	9.		483
3.		320	10.		311
4.		276	11.		282
5.		149	12.		150
6.		116	13.		121
7.		100	14.		57



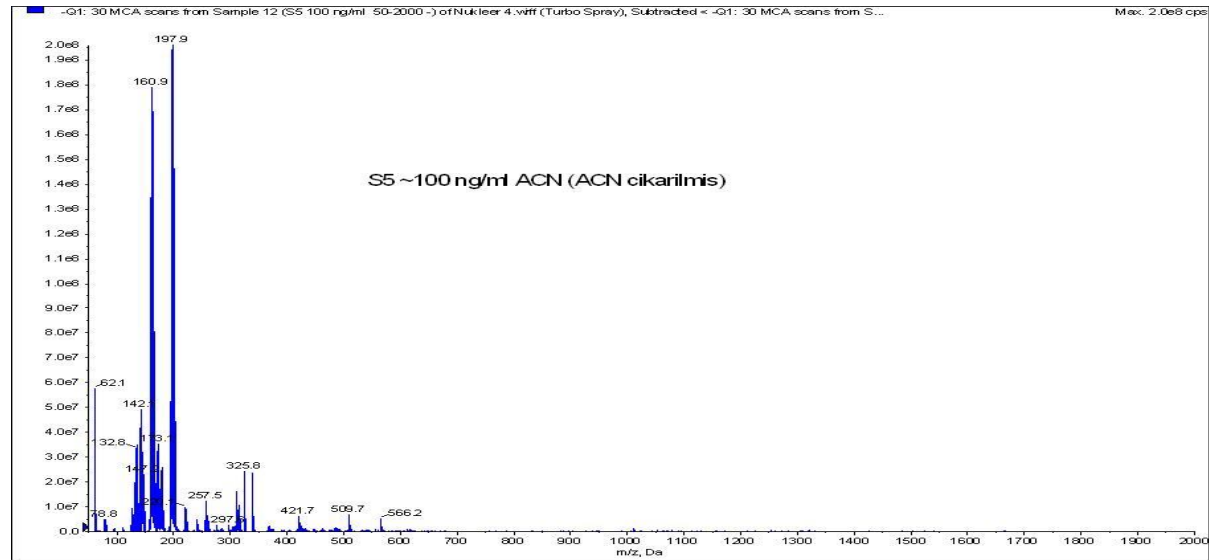
Şekil 4.5 Folik Asit LC-MS/MS Spektrumları



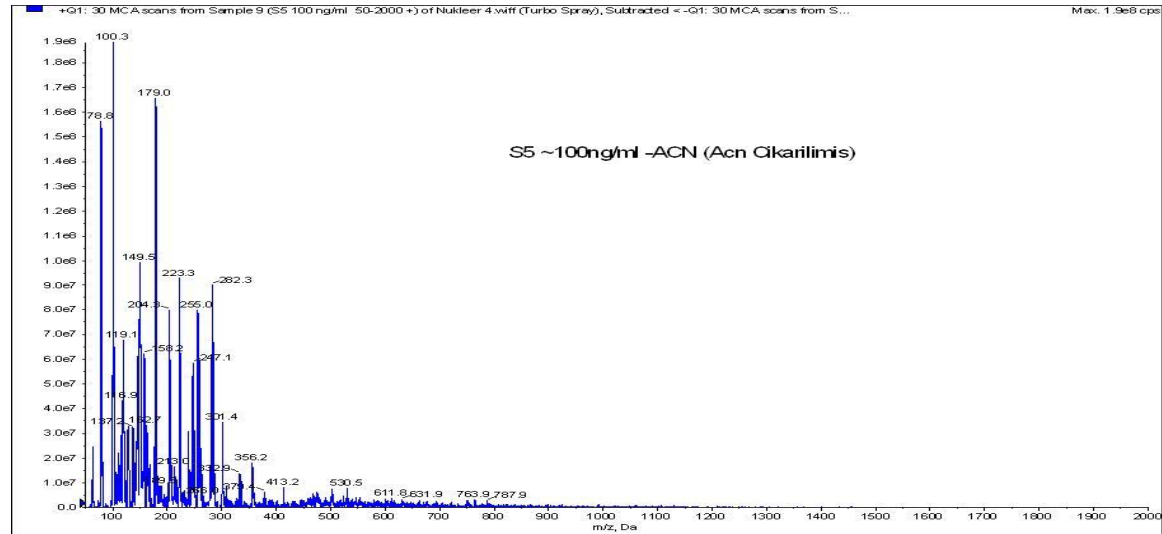
Şekil 4.6 NHS-Folat LC-MS/MS Spektrumları



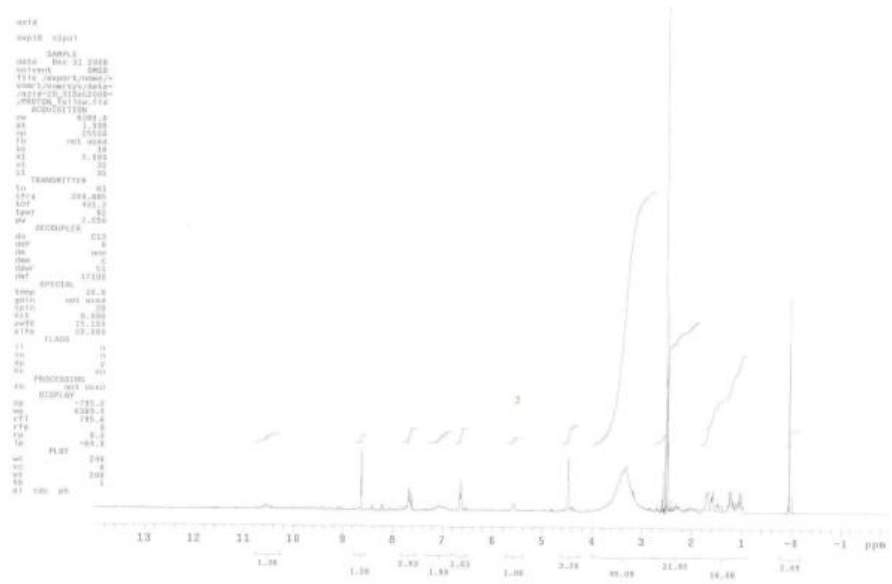
Şekil 4.7 Folat-Hidrazid LC-MS/MS Spektrumları



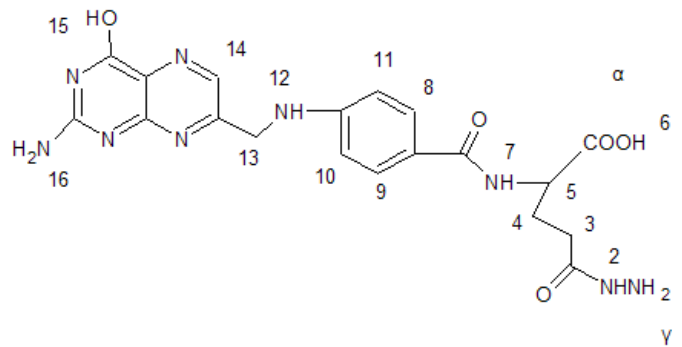
Şekil 4.8 Sitrik Asit LC-MS/MS Spektrumu



Şekil 4.9 Sitro-Folat'ın LC-MS/MS Spektrumu



Şekil 4.10 Hidrazid-Folat'ın H-NMR Spektrumu



Şekil 4.11 Hidrazid-Folat'ın molekül yapısı

4.47 ppm'de gelen 5 nolu CH protonuna ait pik COOH'ın γ pozisyonundan azıdendiğinin en belirgin kanıtıdır. Şayet α pozisyonundan azıdlenmiş olsaydı, CH protonu daha asidik olacağından biraz daha yüksek alanda (~5.50 ppm gibi) pik göstermesi gerekmektedir.

4.3 Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Sonuçları

4.3.1 Kağıt elektroforezi ile elde edilen sonuçlar

^{99m}Tc -Sitrik Asit, ^{99m}Tc -Sitro-Folat, İnd. ^{99m}Tc ve $^{99m}\text{TcO}_4^-$ elektroforez sonuçları Çizelge 4.3'de yer almaktadır. Banyo çözeltisi olarak % 0.9'luk SF kullanılmıştır. Bileşiklerin ilerleme mesafeleri cm cinsinden verilmiştir. Maddelerin uygulama noktası 24 cm'lik Whatman kağıtlarının orta noktası yani 12. cm olup, pozitif kutup 12 cm'den sıfıra doğru, negatif kutup ise 12 cm'den 24'e doğrudur.

Sonuçlardan da görüleceği üzere ^{99m}Tc -Sitrik Asit ve ^{99m}Tc -Sitro-folat'ın her ikisi de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ile pozitif kutuba doğru ilerlediği için negatif yüklü oldukları sonucuna varılmaktadır.

Çizelge 4.3.1 Elektroforez Sonuçları

Banyo Çözeltisi	^{99m}Tc - Sitrik Asit	^{99m}Tc -Sitro- Folat	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	İnd ^{99m}Tc
SF	8.5	10	10	12

4.3.2 RTLC ile elde edilen sonuçlar

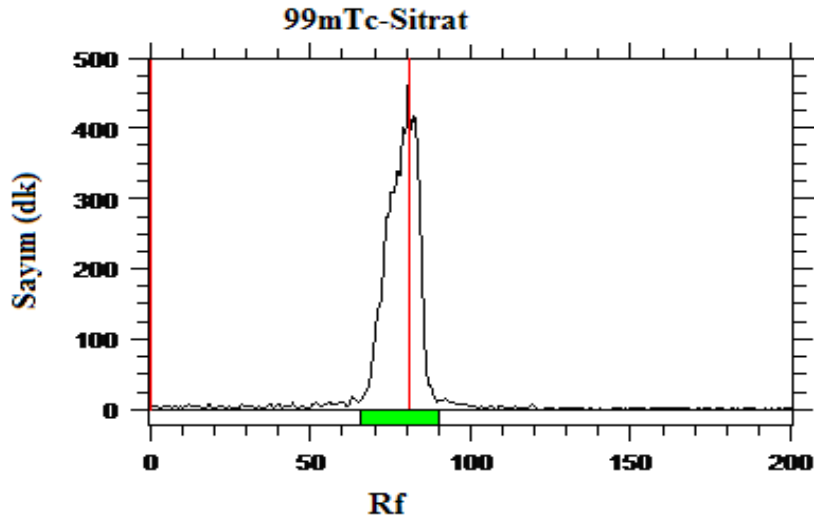
TLRC yönteminde kullanılan banyo çözeltileri % 0.9'luk SF, aseton ve ACD' dir. ^{99m}Tc -Sitrata, ^{99m}Tc -Sitra-Folata, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc bileşiklerine ait R_f değerleri Çizelge 4.4'de yer almaktadır.

Çizelge 4.3.2 R_f değerleri.

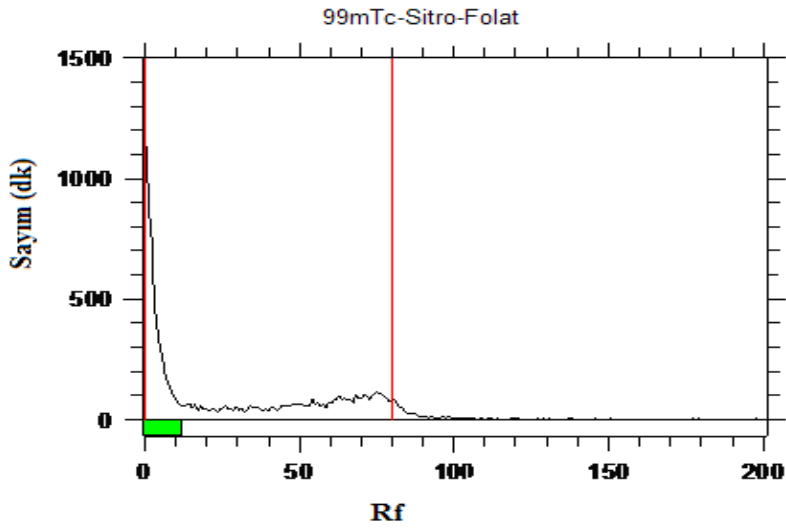
Banyo Çözeltilisi	* R_f			
	^{99m}Tc -Sitrata	^{99m}Tc -Sitra-Folata	$^{99m}\text{TcO}_4^-$	İnd. ^{99m}Tc
SF	0.95	0.03	0.99	0.00
Aseton	0.10	0.03	0.99	0.00
ACD	0.97	0.03	0.96	1.00

(* Silikajel TLC plakaları)

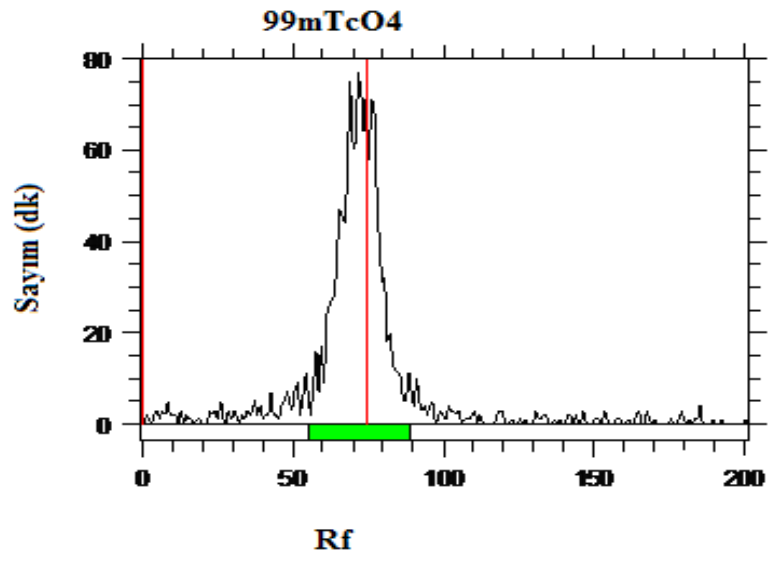
^{99m}Tc -Sitrata, ^{99m}Tc -Sitra-Folata, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve ind. ^{99m}Tc bileşiklerine ait ACD banyosu kullanılarak alınan RTLC kromatogramları Şekil 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'de görülmektedir. ^{99m}Tc -Sitrata, ^{99m}Tc -Sitra-Folata, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve ind. ^{99m}Tc bileşiklerine ait SF banyosu kullanılarak alınan kromatogramlar Şekil 4.16, 4.17, 4.18 ve 4.19'de görülmektedir. ^{99m}Tc -Sitrata, ^{99m}Tc -Sitra-Folata, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve ind. ^{99m}Tc bileşiklerine ait aseton banyosu kullanılarak alınan kromatogramlar Şekil 4.20, 4.21, 4.22 ve Şekil 4.23'de görülmektedir.



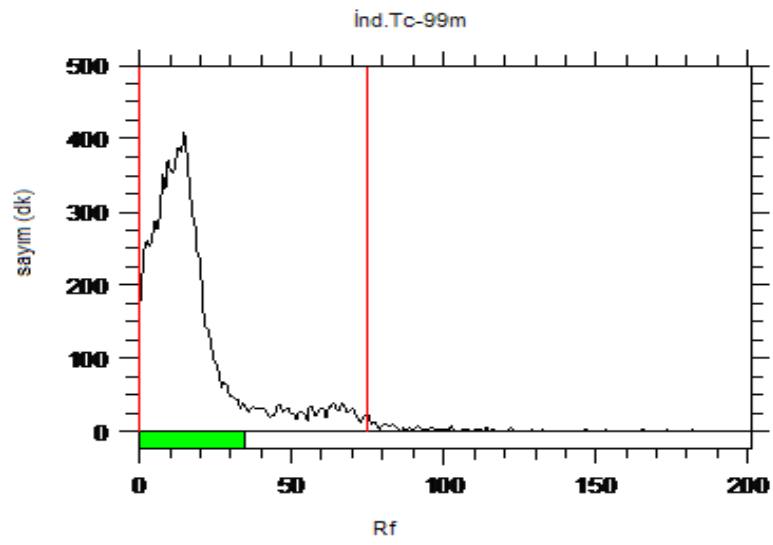
Şekil 4.12 ^{99m}Tc -Sitrat'ın ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



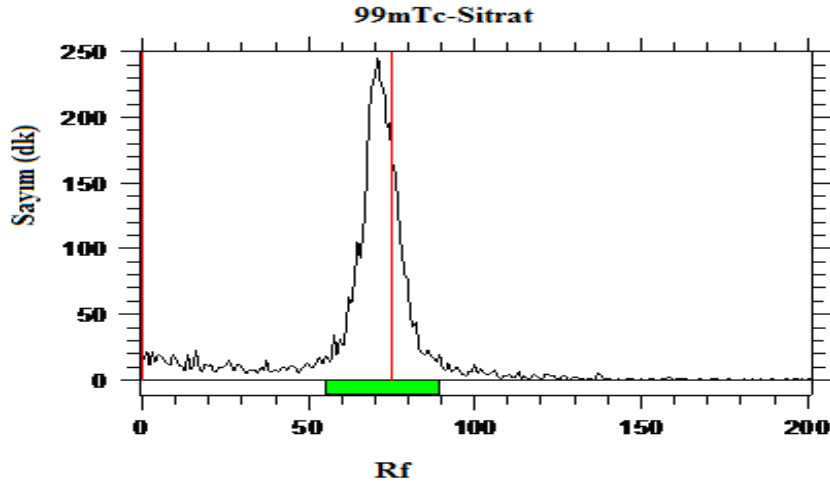
Şekil 4.13 ^{99m}Tc -Sitro-folat'ın ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



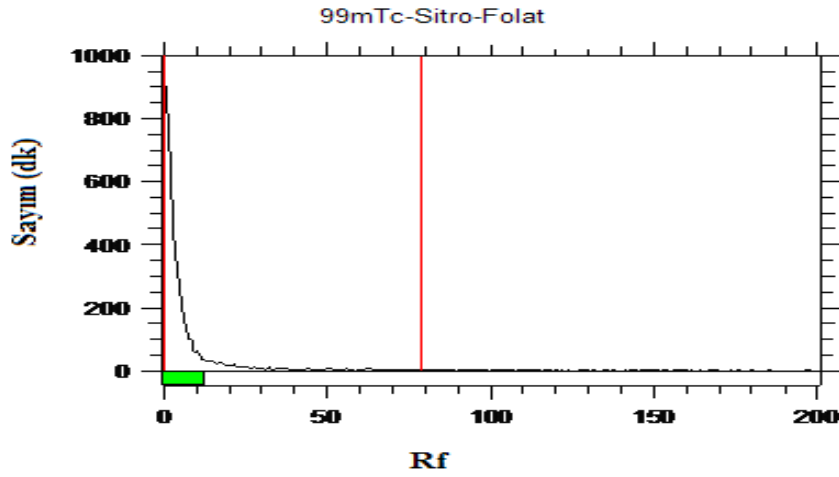
Şekil 4.14 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'in ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



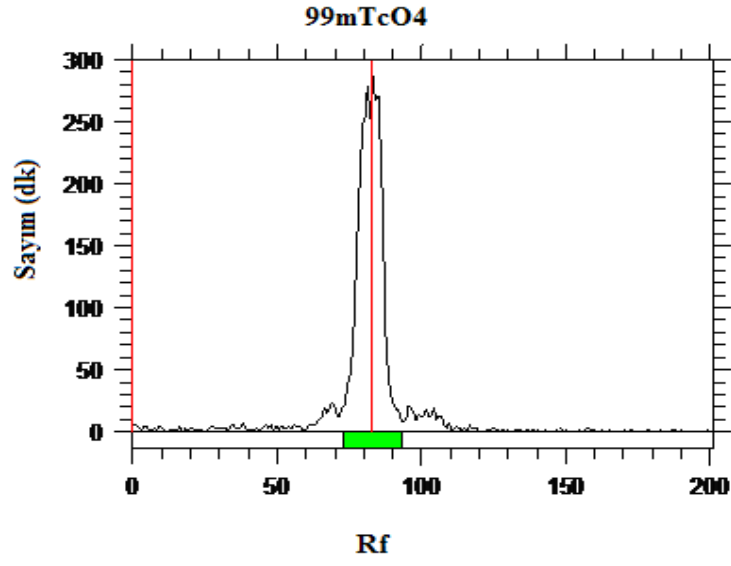
Şekil 4.15 İnd. ^{99m}Tc 'in ACD çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



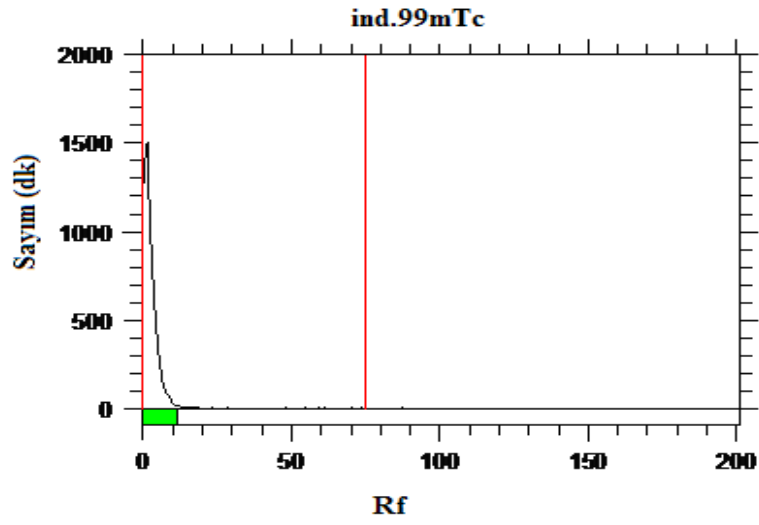
Şekil 4.16 ^{99m}Tc -Sitrat'ın SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları



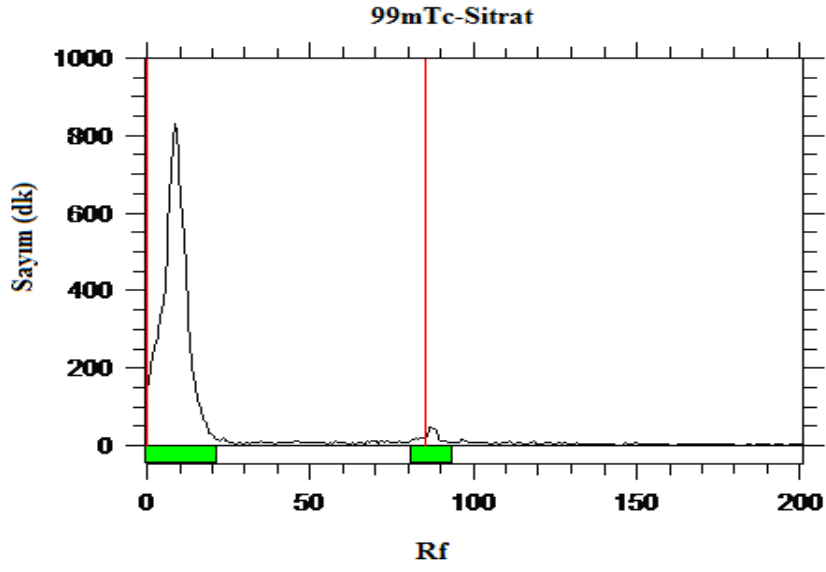
Şekil 4.17 ^{99m}Tc -Sitro-Folat'ın SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramları



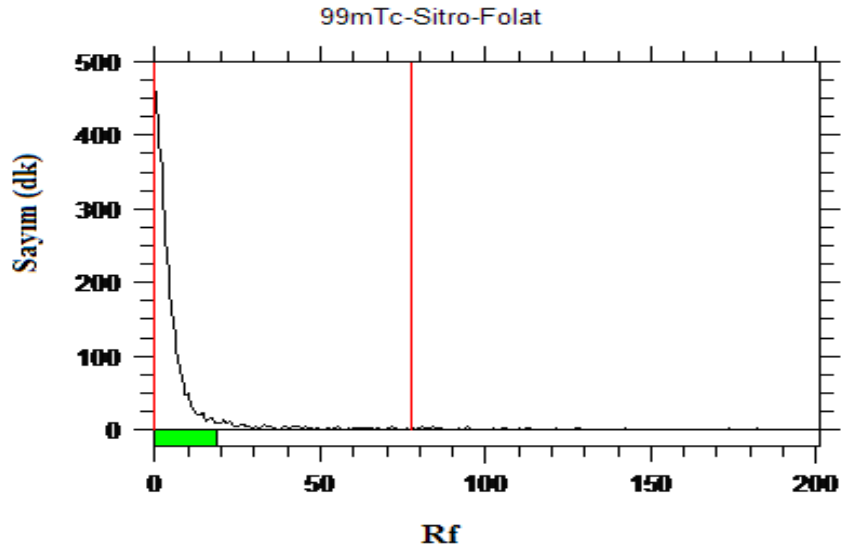
Şekil 4.18 $^{99m}\text{TcO}_4$ 'm SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



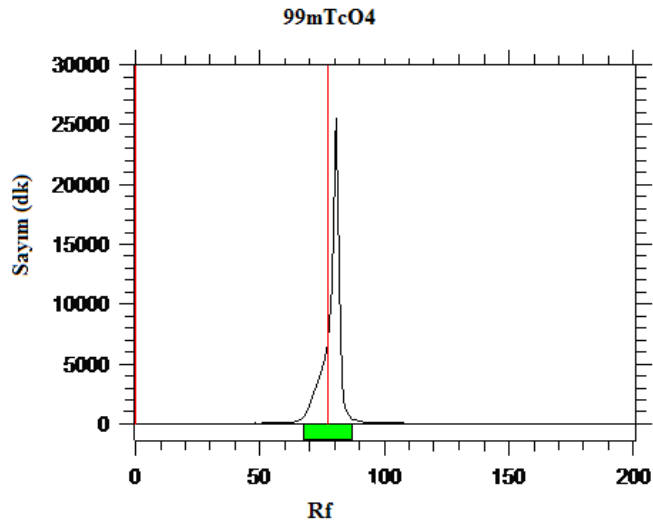
Şekil 4.19 İnd. ^{99m}Tc 'ni SF çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



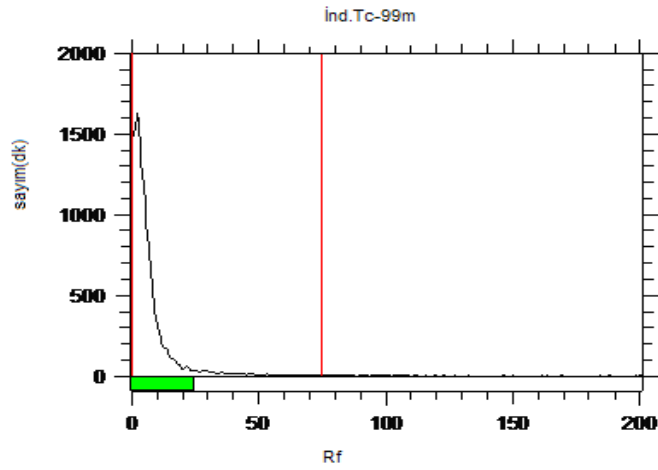
Şekil 4.20 ^{99m}Tc-Sitrat'ın aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.21 ^{99m}Tc-Sitro-Folat'ın aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.22 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'nin aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı



Şekil 4.23 ,İnd. ^{99m}Tc 'nin aseton çözeltisi kullanılarak elde edilen RTLC kromatogramı

İşaretili bileşiklerin RTLC kromatogramları incelendiğinde aseton ve SF banyolarının ind. ^{99m}Tc Rf değerlerinin aynı olduğu fakat

ACD banyosundaki Rf değerlerinin farklı olmasından dolayı ACD banyosunun ayırıcı bir banyo olduğu görülmektedir. Aynı şekilde SF banyosunda ^{99m}Tc -Sitrata sona yürümüştür ve ^{99m}Tc -Sitrato-Folat bileşiği ise başlangıçta kalmıştır. Bundan dolayı SF banyosundaki Rf değerleri farklılık göstermektedir. Aseton banyosundaki Rf değerlendirmesi için bir farklılık göstermemektedir. İşaretili bileşiğe ilişkin pikin RTLC kromatogramlarına göre hesaplanan bağlanma verimi 97 ± 1.0 olduğu gözlenmiştir.

4.4 n-Octanol / Su oranı (Lipofilité) sonuçları

^{99m}Tc -Sitrato-folat bileşiğinin deneysel olarak logP değeri -0.96 ± 0.39 (n = 3) olarak bulunmuştur. Çizelge 4.4'de Folik Asit, Sitratik Asit ve Sitrato-Folat bileşenlerinin teorik logP değerleri ACD/logP Algorithm programına göre verilmiştir.

Çizelge 4.4 Bileşiklerin LogP değerleri

Bileşik	Teorik logP	Deneysel logP
Folik Asit	-2.32 ± 0.66	----
Sitratik Asit	0.63 ± 0.40	----
Sitrato-Folat	-2.35 ± 0.81	----
^{99m}Tc -Sitrato-Folat	----	-0.96 ± 0.39

Çizelge 4.4'de verilen değerlere göre ^{99m}Tc -Sitro-Folat bileşiği elektroforez yöntemiyle kanıtlandığı üzere anyonik yapıda ve lipofilitesi düşüktür. Deneysel sonuç değerlendirildiğinde, işaretli bileşiğin lipofilitesi Folik asitin ve Sitro-Folat'ın lipofilitesinden düşük, Sitrik asit' in lipofilitesinden yüksek olduğu görülmüştür. İşaretli bileşiğin reseptöre ilgisini arttırmak için hidrofilitesini arttırmak gerekmektedir. Bulunan sonuçlar bunu doğrulamaktadır. Literatür ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir (Okarvi et al., 2006).

4.5. Serumda stabilite sonuçları

İnsan kan serumundaki ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenen Sitro-Folat bileşiğinin $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyonu sonucunda elde edilen ince tabaka sonuçlarına göre, 3. saatin sonunda işaretleme verimi $\% 97\pm 0.5$, 4. saatte $\% 95\pm 1.5$ ve 24. saatin sonunda işaretli bileşiğin tamamen bozunduğu gözlenmiştir.

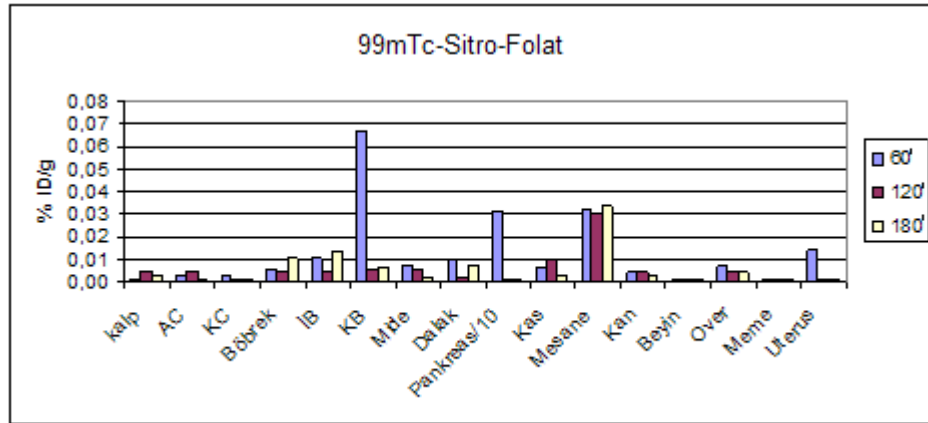
4.6 Dişi Albino Wistar sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarının sonuçları

İşaretli bileşik için alınan dişi, Albino Wistar cinsi sıçanlarda biyodağılım çalışmaları yapılmıştır. Reseptör doyurulmuş ve reseptör doyurulmamış olmak üzere sıçanlar ikiye ayrılmıştır.

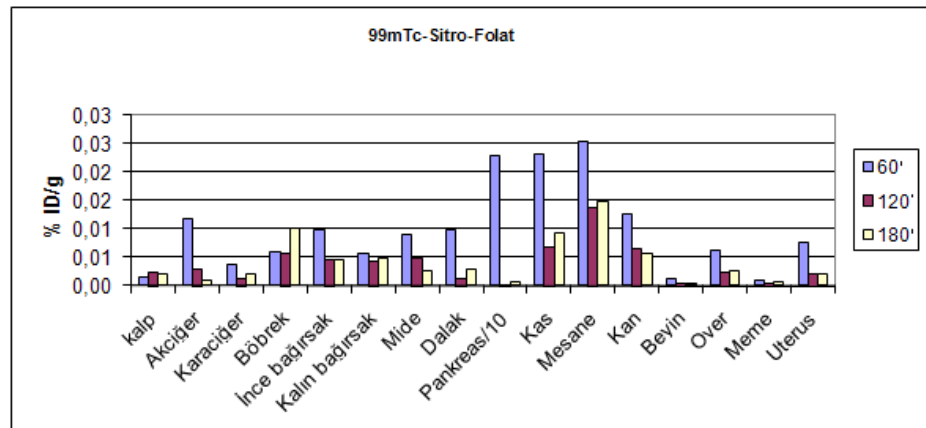
Çizelge 4.5 Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -Sitro-Folat bileşiğinin biyodağılım verileri

	60 Dak.	120 Dak.	180 Dak.
Kalp	1.301±0.321	0.005±0.001	0.003±0.001
Akciğer	3.100±0.220	0.005±0.002	0.002±0.000
Karaciğer	2.800±0.100	0.001±0.000	0.002±0.000
Böbrek	5.510±1.210	0.006±0.001	0.011±0.001
İnce Bağırsak	10.420±1.910	0.004±0.001	0.014±0.002
Kalın Bağırsak	66.900±1.990	0.005±0.001	0.006±0.002
Mide	6.800±1.130	0.006±0.001	0.002±0.000
Dalak	9.820±1.200	0.002±0.001	0.007±0.001
Pankreas	31.500±1.220	0.001±0.000	0.001±0.001
Kas	6.801±0.920	0.010±0.000	0.003±0.0001
Mesane	32.300±1.200	0.031±0.000	0.034±0.001
Kan	4.430±0.500	0.004±0.000	0.003±0.000
Beyin	0.603±0.010	0.001±0.000	0.001±0.000
Over	7.020±0.660	0.004±0.001	0.004±0.000
Meme	0.747±0.100	0.007±0.000	0.001±0.000
Uterus	14.103±0.820	0.002±0.000	0.001±0.000

^{99m}Tc -Sitro-Folat bileşiğine ait biyodağılım sonuçları Şekil 4.24 ve 4.25' de de organlardaki zamana göre aktivite yüzde değişim grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.24 ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin Albino Wistar sıçanlardaki reseptör doyurulmamış biyodağılım sonuçları



Şekil 4.25 ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin Albino Wistar sıçanlardaki reseptör doyurulmuş biyodağılım sonuçları

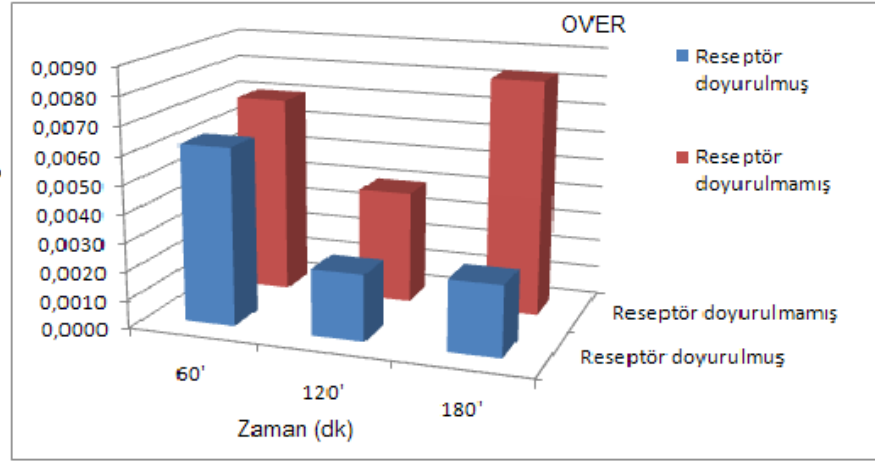
Şekil 4.24'den görüldüğü gibi 60. dakikadaki ince bağırsak, kalın bağırsak, mide, pankreas, uterus ve overdeki radyoaktivite tutulumlarının en yüksek değerlere ulaştığı görülmektedir. Bu değerler sırasıyla 0.010, 0.066, 0.006, 0.314, 0.014 ve 0.007 olarak gözlenmiştir. Bu tutulumların zamanla azaldığı saptanmıştır. Midedeki tutulumun spesifik organ uterus, over ve pankreastan düşük olması in-vivo bozunumun olmadığını göstergesidir. 180. dakikada ince bağırsak, kalın bağırsak ve midedeki tutulumların düşmüş olduğu gözlenmektedir (% ID/g: 0.013, 0.006, 0.002).

İşaretli folat bileşiğinin hedef olmayan organlardan hızlı atılımı sözkonusudur. Folat reseptörü içeren pankreas, over ve uterus daki tutulumların 180. dakikada (% ID/g:0.007, 0.008 ve 0.005) düştüğü gözlenmiştir.

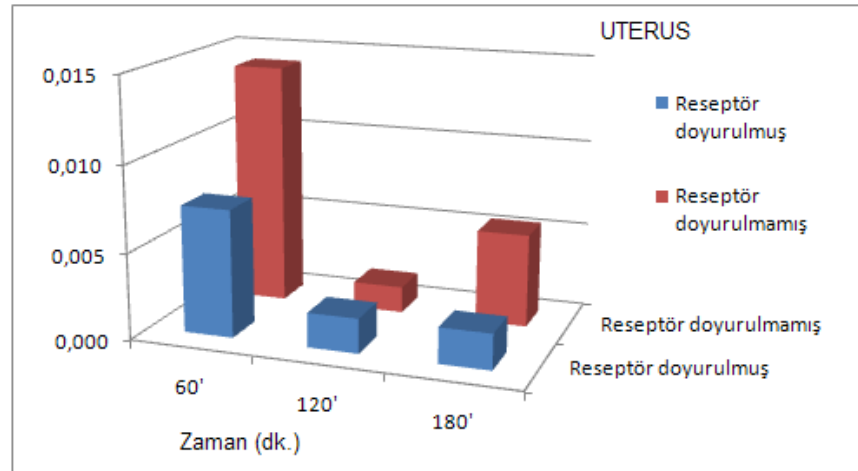
Reseptör doyurma çalışmalarında her bir sıçanın 300 µg folik asit intraperitoneal enjekte edildikten hemen sonra ^{99m}Tc-Sitro-folat enjekte edilmiştir. Reseptör doyurma işleminden sonra elde edilen veriler Şekil 4.25'de özetlenmiştir. Şekil 4.26'de görüldüğü gibi ince bağırsak, kalın bağırsak ve midedeki radyoişaretli sitro-folat'ın tutulumunu 60. dakikada maksimuma ulaştığı ve zamanla tutulumunda düşmenin olduğu gözlenmiştir. Bu % ID/g değerlerin sırasıyla 0.009, 0.005, 0.008, 0.22, 0.006, 0.007 olduğu saptanmıştır.

Over ve uterus organları için 60, 120 ve 180. dakikalarda ^{99m}Tc-Sitro-Folat'ın reseptörsüz ve reseptör doyularak yapılan biyodağılım

çalışmaları sonucunda elde edilen grafikler Şekil 4.26 ve 4.27'de görülmektedir.



Şekil 4.26 ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin over reseptör doyurulmamış ve reseptör doyurulmuş biyodağılım çalışmaları



Şekil 4.27 ^{99m}Tc -Sitro-folat bileşiğinin uterus reseptör doyurulmamış ve reseptör doyurulmuş biyodağılım çalışmaları

Bu şekilden de görüldüğü gibi reseptör doyurulmuş çalışmada bu organlardaki tutulumun düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar işaretli bileşiğin pankreas over ve uterus organları için spesifik olabileceğini göstermektedir. Pankreasta 60. dakikada % 29 oranında radyoaktif maddenin tutulumu düştüğü gözlenmektedir. 60. dakikada over/kas oranı 1, over/kan oranı 1.75 iken reseptör doyurma işlemi gerçekleştirildikten sonra over/kas oranı 0.3, over/kan 0.6, olduğu gözlenirken; uterus/kas oranı 2.3, uterus/kan oranı 3.5 olduğu gözlenmiştir ve bu değerler reseptör doyurulduğunda sırasıyla 0.3 ve 0.6'ya düştüğü gözlenmiştir. Çalışmamızda normal sıçanlar kullanılmıştır. Literatürde ise tümör oluşturulmuş sıçanlar ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Guo ve arkadaşları ^{99m}Tc-HYNIC-folat bileşiği ile yapmış olduğu çalışma sonucunda enjeksiyondan 4 saat sonra tümör/kan, tümör/kas oranı 55 ve 28 olarak tespit edilmiştir (Guo et al., 1999). Mathias ve arkadaşları tarafından ^{99m}Tc-DTPA-folat bileşiği ile yapmış olduğu çalışma sonucunda enjeksiyondan 4 saat sonra tümör/kan ve tümör/kas oranı sırasıyla 4.8 ve 4.3 olarak tespit edilmiştir (Mathias et al., 2000). Okarvi ve Jammaz'ın ^{99m}Tc-MAG3-folat ve ^{99m}Tc-MAG2-folat bileşiklerinin sırasıyla tümör/kan ve tümör/kas oranları 2.5 saat sonra 2.22 ve 1.55 olarak kaydedilmiştir (Okarvi and Jammaz, 2006).

Her iki deney sonucunda da böbreklerdeki tutulumun zamanla düştüğü gözlenmiştir. Radyoışaretli folat konjugatları ile yapılan çalışmalarda üriner sistemle böbrekler yoluyla atıldığı bildirilmektedir (Trump et al., 2002). Ayrıca işaretli bileşiğimiz hidrofilik ve anyonik olması atılımın böbrekler yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir.

4.7 İstatistik Analiz Sonuçları

^{99m}Tc-Sitro-folat bileşiği için organlar arasında Pearson Korelasyon Analizi yöntemi uygulanmıştır (p<0.05). Pearson korelasyonuna göre işaretli bileşiğin tutulumu organlar arasında bir ilişki tanımlamaktadır. ^{99m}Tc-Sitro-folat bileşiği için, reseptör doyurulmuş ve reseptörsüz çalışmalar pankreas, over ve uterus için farklılık olduğunu, istatistiksel olarak da anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0.05).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Sitro-folat bileşiğinin sentezlenmiş, ^{99m}Tc ile işaretlenmiş ve bu radyoaktif konjugatın Albino Wistar sıçanlar üzerinde biyodağılım çalışması yapılarak radyofarmasötik potansiyeli araştırılmıştır.

Sitro-folat ve sitrat bileşikleri ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenmesi ile elde edilen ^{99m}Tc -Sitro-folat'ın radyoişaretleme verimi % 97 ± 1.0 , ^{99m}Tc -Sitrat'ın radyoişaretleme verimi % 98 ± 0.2 olarak saptanmıştır.

^{99m}Tc -Sitro-folat ve ^{99m}Tc -Sitrat bileşiklerinin her ikisinin de anyonik yapıda olduğu yapılan elektroforez çalışmaları sonucunda saptanmıştır.

Radyoişaretili ^{99m}Tc -Sitro-folat'ın 37°C ' de serumdaki stabiliteyi incelendiğinde, ince tabaka sonuçlarına göre, 3. saatin sonunda işaretleme verimi % 97 ± 0.5 , 4. saatte % 95 ± 1.5 ve 24. saatin sonunda işaretili bileşiğin tamamen bozunduğu gözlenmiştir.

İşaretili bileşiğin lipofilitesi Folik asitin ve Sitro-Folat'ın lipofilitesinden düşük, Sitrik asit'in lipofilitesinden yüksek olduğu görülmüştür. İşaretili bileşiğin reseptöre ilgisini arttırmak için hidrofilitesini arttırmak gerekmektedir. Elde edilen sonuçlar ^{99m}Tc -Sitro-folat'ın hidrofilik ve anyonik yapıda olduğunu kanıtlamaktadır.

Biyodağılım çalışmaları sonucunda yapılan değerlendirmelere göre ^{99m}Tc -Sitro-folat radyoaktif bileşimine hedef olmayan organlardan hızlı atılımı sözkonusudur. Folat reseptörü içeren pankreas, over ve uterus daki tutulumların 180. dakikada azaldığı görülmektedir.

Reseptörlü çalışmada over, uterus ve pankreas organlarındaki tutulumun düştüğü gözlenmiştir. Bu sonuçlar işaretli bileşimin pankreas over ve uterus organları için spesifik olabileceğini göstermektedir. Pankreasta 60. dakikada %29 oranında radyoaktif maddenin tutulumu düştüğü gözlenmektedir.

Her iki deney sonucundada böbreklerdeki tutulumun zamanla düştüğü gözlenmiştir. Radyoişaretli folat konjugatları ile yapılan çalışmalarda anyonik yapıdan beklendiği gibi üriner sistemle böbrekler yoluyla atıldığı bildirilmektedir (Mathias et al., 2000; Trump et al., 2002). Ayrıca işaretli bileşimiz hidrofilik olması atılımın böbrekler yoluyla gerçekleştiğini göstermektedir.

Sitrat şelatlayıcı ajanı kullanılarak Tc-99m ile işaretlenen folatın biyodağılım çalışmalarında, işaretli bileşimin over, uterus ve pankreas organlarında belirgin derecede tutulduğu saptanmıştır.

Elde edilen sonuçlar, ^{99m}Tc ile işaretli Sitro-folat'ın reseptörce zengin olduğu bilinen organ veya dokular için spesifik olduğunu gösteren kanıtlar mevcuttur. Sentezlenen ve radyoişaretlenmiş folat konjugesinin

bu organlar için bir görüntüleme ajanı olabilme potansiyeline sahip olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Akgün F., Yıldız H., Ergün A., Bostan N., Bodur N., Saygı N., Aydın N., Büyükkaya F., Hasgül E., 2005, Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü, *VIII. Ulusal Nükleer Bilimler ve Teknolojileri Kongresi*, Sözlü Bildirim

http://88.255.58.195/internet_tarama/dosyalar/cd/4115/pdf/162.pdf

Ankara Ticaret Odası, 2006, “Kanser Yüğü 2006” Raporu Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu ve Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü ortaklığı.

Bowers L. D., 1998, Clinical Chemistry, *Analytical goals in therapeutic drug monitoring.* 44: 375-380p.

Burtis A. And Ashwood R., 2005, Tietz Fundamentals Clinical Chemistry. Palme Yayıncılık. 543-567p.

Baker J., 2005, Bilkent University-UNAM-Material Science and Nanotechnology.

Campe C. and Haver A., 1997, Biochemistry, *Nobel Tıp Kitabevleri,* 319s.

Ercan M., Aras T., Ünsal S., Arıkan Ü., Ünlener E., Haşçelik Z., 1992, Technetium-99m Citrate For Imaging Inflammation An Experimental Study, *Journal of Islamic Academy of Sciences,* 5:3, 180-182p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Guo W., Hinkle G., Lee J.,** 1999, ^{99m}Tc -HYNIC-Folate: A Novel Receptor-Based Targeted Radiopharmaceutical for Tumor Imaging, *J. Nuc Med*, 40; 1563-1569p.
- Kim S., Jeong H., Kim E., Lee C., Kwon T., Sohn M.,** 2007, Folate Receptor Targeted Imaging Using Poly (ethylene-glycol)-folate: In-Vitro and In-Vivo Studies, *J Korean Med Sci*, 22: 405 – 11p.
- Kisliuk L.,** 2006, Folates, Encyclopedia of Life Science. *J. Med. Chem*, 49; 1055-1065p.
- Mathias C., Hubers D., Low P., Green M.,** 2000, Synthesis of [^{99m}Tc]DTPA-Folate and Its Evaluation as a Folate-Receptor-Targeted Radiopharmaceutical, *Bioconjugate Chem.*, 11: 253-257p.
- Okarvi S. M., Jammaz I. A.,** 2006, Preparation and In Vivo and In Vitro Evaluation of Technetium-99m Labeled Folate and Methotrexate Conjugates as Tumor Imaging Agents, *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* , 21: 1p.
- Siegel B., Dehdaashti F., Mutch G., Podoloff A., Wendt R., Sutton G., Burt W., Ellis E., Mathias J., Green A., Gershenson M.,** 2003, Evaluation of ^{111}In -DTPA-Folate as a Receptor-Targeted Diagnostic Agent for Ovarian Cancer: Initial Clinical Results, *J. Nucl Med.*, 44: 700-707p.
- Skoog A., West M.,** 1998, Fundamentals of Analytical Chemistry, 2. Baskı Türkçe çeviri.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Sudimack J., Lee J.,** 2000, Tarrgeted drug delivery via the folate receptor, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41: 147-162p.
- Theobald, A. E.,** 1989, Radiopharmaceuticals using radioactive compouns in pharmaceutics and Medicine, Great Britain; 30-34, 83-103p.
- Trump D., Mathias J., Yang Z., Low S., Marmion M., Green M.,** 2002, Synthesis and evaluation of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3\text{-DTPA-folate}$ as a folate-receptor-targeted radiopharmaceutical, *Nuclear Medicine and Biology*, 29: 569 – 573p.
- Türk B.,** 2006, Adneksiyal Kitlelerin Bening ve Malign Ayrımında Transvajinal B Mod Ultrasonografi ve Renkli Doppler Ultrasonografinin Yeri, *Radyoloji Uzmanlık Tezi.*, 52p.
- Ünak P.,** 1996, Ulusal Radyofarmasi Kursu Ders Notları Bölüm I Radyonüklidlerin Üretimi.
- Wang S., Luo J., Lantrip A., Waters J., Mathias J., Green P., Low S.,** 1997, Desing and Synthesis of $^{111}\text{In-DTPA-Folate}$ for Use as a Tumor-Targeted Radiopharmaceutical, *Bioconjugate Chem.*, 8: 673-679p.
- Yurt, F.,** 1998, Benzodiazepin (Diazepam) ve Cycloprrolone (Zopiklone) Grubu Farmasötiklerin I-131 İle İşaretlenmesi, *Doktora Tezi, E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir*, 176p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

<http://www.aof.anadolu.edu.tr/>, 2008

http://www.adnanaydiner.com/hastalar_kanser_nedir_02.htm, 2007

<http://www.biyolojiegitim.yyu.edu.tr/>, 2008

<http://www.kanseroloji.com/kanser-nedir/>, 2008

<http://www.wikipedia.org/wiki/Folate/>, 2008

<http://www.wikipedia.org/wiki/Technetium>, 18.12.2007

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Burcu ALTIPARMAK

DoğumYeri : Bursa

Doğum Yılı : 29.07.1982

Öğrenim Durumu:

Lisans: 2000 – 2005 Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans: 2006 - Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

Mesleki Durumu:

05.2006 - 07.2006 : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, Farmakoloji, Kimyager

2006- : Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp
Anabilim Dalı, Radyofarmasist

