

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**^{125/131}I İŞARETLİ URASİL'İN GLUKURONİD SENTEZİ VE
MANYETİK ÖZELLİK KAZANDIRILARAK YENİ BİR
MANYETİK İLAÇ TAŞIYICI OLUŞTURULMASI**

**Emin İlker MEDİNE
Nükleer Bilimler Anabilim Dalı
Bilim Dalı Kodu : 622.02.01
Sunuş Tarihi : 26.09.2008**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Perihan ÜNAK
2.Tez Danışmanı: Doç. Dr. Serhan SAKARYA**

Bornova, İZMİR

Sayın Emin İlker MEDİNE tarafından DOKTORA TEZİ olarak sunulan ‘^{125/131}I İşaretli Urasil’in Glukuronid Sentezi ve Manyetik Özellik Kazandırılarak Yeni Bir Manyetik İlaç Taşıyıcı Oluşturulması’ 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 26.09.2008 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri

İmza

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Perihan Ünak

.....

Üye: Doç. Dr. Serhan Sakarya

.....

Üye: Prof. Dr. Fatma Yurt Lambrecht

.....

Üye: Doç. Dr. Recep Bekiş

.....

Üye: Yard. Doç. Dr. Serap Teksöz

.....

ÖZET**^{125/131}I İŞARETLİ URASİL'İN GLUKURONİD SENTEZİ VE
MANYETİK ÖZELLİK KAZANDIRILARAK YENİ BİR
MANYETİK İLAÇ TAŞIYICI OLUŞTURULMASI**

MEDİNE, Emin İlker

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi : Prof. Dr. Perihan Ünak

Eylül 2008, 222 sayfa

Bu çalışmada HuTu-80 hücrelerinden elde edilen UDP-glukuronil transferaz enzimi içeren mikrozom preparatları ve UDP glukuronik asit kullanılarak urasil glukuronidin enzimatik sentezi yapılmış ve toplam %22.95±2.4 glukuronidasyon verimi ile iki farklı glukuronid türevi elde edilmiştir. HPLC-MS ile yapılan yapısal analiz sonucunda urasil-N-Glukuronid (UNG) ve Urasil-O-glukuronid (UOG) olarak tanımlanan glukuronid ligandlar manyetit bazlı nanoparçacıklara kovalent olarak konjuge olmuş ve daha sonra I-125 ve I-131 ile ayrı ayrı işaretlenmişlerdir. SEM (Scanning electron microscopy) analizleri manyetit nanoparçacıkların boyutlarının 40-60 nm olduğunu göstermiştir. Bağlanma yüzdeleri I-131 işaretli UOG bağlı silanlı manyetik parçacıklar için % 89.4, I-131 işaretli UNG bağlı silanlı manyetik parçacıklar için % 92.6 olarak bulunmuştur.

Hem I-125 ve hem de I-131 işaretli UOG ve UNG, HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC normal insan bağırsak epitel hücrelerine bağlanmaları in vitro olarak incelenmiştir. I-125 ve I-131 işaretli UOG ve UNG üzerinde çalışılan hücreler üzerinde farklı bağlanma oranları göstermişlerdir. O-glukuronid türevi tüm hücre tiplerinde n-glukuronid türevine göre daha yüksek bağlanma oranı göstermiştir.

PHIC normal insan bağırsak epiteli hücreler ile HuTu 80 ince bağırsak kanser hücreleri arasında UNG yönünden bir fark görülemezken UOG'nin hücreye ilgisi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür.

N ve o glukuronidler urasil ile karşılaştırıldığında hücre bağlanma etkinlikleri çok yüksek iken manyetik parçacıklara konjuge olan urasil, o glukuronid ve n glukuronid'in her bir durumda HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC hücrelerine bağlanma etkinliği yüksek olmakta ve aglikona bağlı seçicilik azalmaktadır. Manyetik alan uygulandığında ise hücre bağlanma etkinliği çok daha yüksek olmaktadır. Elde edilen sonuçlar hem radyoiyot bağlı glukuronid bileşiklerinin hem de radyoiyot işaretli manyetik nanoparçacıkların terapi ve görüntüleme etkinliğinin ön klinik düzeyde de araştırılmaya devam etmesi açısından umut verici görünmektedir.

Anahtar sözcükler: Manyetik parçacıklar, I-131, I-125, HuTu-80, Caco-2, Detroit 562, PHIC hücresi, UDP Glukuronidaz, urasil glukuronid.

ABSTRACT**SYNTHESIS OF ^{125/131}I LABELLED URACIL
GLUCURONIDE AND FORMING A NEW MAGNETIC
DRUG CARRIER WITH MAGNETIC PROPERTIES**

MEDİNE, Emin İlker

PhD Thesis, Institute of Nuclear Sciences

Supervisor: Prof. Dr. Perihan Ünak

September 2008, 222 pages

Enzyme UDP-glucuronyl transpherase was prepared from Hutu-80 cells and used for enzymatic synthesis of uracil glucuronide with a yield of %22.95±2.4. O-glucuronide and n- glucuronide of uracil was obtained then radioiodinated with I-131 and I-125. Magnetite nanoparticles coated with silica were synthesized and characterized by scanning electron microscopy (SEM) and X-Ray diffraction (XRD). After surface modification with an amino silane coupling agent, *N*-[3-(trimethoxysilyl) propyl]-ethylenediamine, uracil (U), uracil-O-glucuronide (UOG) and uracil-N-glucuronide (UNG) was covalently linked to the amine group using glutaraldehyde as cross-linker. The magnetic nanoparticles were then radiolabeled with ^{125/131}I with a labeling yield of 89.4% for silanated nanoparticles 92.6% for glucuronide conjugated magnetite nanoparticles. Both I-125 and I-131 labeled nanoparticles presented good incorporation ratio for the HuTu-80, Caco-

VIII

2, Detroit 562 and PHIC human intestinal epithelial cells. Incorporation ratio of I-125 and I-131 labeled uracil-o-glucuronid was the highest for all cells comparing to I-125 and I-131 labeled uracil-n-glucuronid and other labeled components. Also incorporation ratio of I-125 and I-131 labeled uracil-o-glucuronid was statistically significant than I-125 and I-131 labeled uracil-n-glucuronid between PHIC human intestinal epithelial cells and Hutu-80 cells.

Comparing to uracil cell incorporation rates of n- and o-glucuronides was higher and o-glucuronides were more selective, incorporation rates were high for all cells and there is not so much difference between the uracil conjugated nanoparticles, only I-125 and I-131 labeled nanoparticles and I-125 and I-131 labeled glucuronide conjugated nanoparticles. Applying magnetic field incorporation rates are increasing for all components and difference are decreasing between them. Results show that both I-125 and I-131 labeled glucuronides and I-125 and I-131 labeled glucuronide conjugated nanoparticles promise in imaging and therapy and further research should be done in preclinical stages.

Keywords: Magnetic nanoparticles, I-125, HuTu-80, Caco-2, Detroit 562, PHIC cell, UDP glucuronidase, uracil glucuronid.

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan ve bu çalışmanın yapılması için gerekli olan maddi desteğin TÜBİTAK dan alınmasını sağlayan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Perihan Ünak'a, Enstitü Laboratuvarlarında çalışma olanağını sağlayan E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Meral Eral'a, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Merkez Araştırma Laboratuvarlarında hücre kültürü çalışmalarının yapılması sağlayan, bilgi ve deneyimlerini paylaşan 2. tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Serhan Sakarya'ya, projeye ilgili maddi desteklerinden dolayı ARGEFAR Müdürü Sayın Prof. Dr. Işık Tuğlular'a, çalışmalarım sırasında bana yardımcı olan Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalındaki Araştırma Görevlisi ve öğrenci arkadaşlarıma, Enstitümüzün tüm çalışanlarına, desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XIX
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XXIX
KISALTMALAR DİZİNİ.....	XXXV
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	9
2.1 Kanser.....	9
2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri	10
2.3 Manyetik Kontrollü İlaç Hedefleme.....	11
2.3.1 Manyetik ilaç taşıyıcılar.....	13
2.3.2 Manyetik nanoparçacıkların polimerle kaplanması.....	16
2.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler.....	19

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.4.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	19
2.4.2 Kağıt elektroforezi.....	22
2.4.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC).....	23
2.4.4 Lipofilite (Lipit çözünürlüğü).....	27
2.5 Yapı Analizinde Kullanılan Kütle Spektrofotometresi (MS).....	28
2.6 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler.....	29
2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscope).....	29
2.6.2 X-Işınları kırınım ölçümleri (XRD, X-Ray Diffraction).....	31
2.6.3 VSM (Vibrating Sample Magnetometer).....	32
2.7 Hücre Kültürü Çalışmasında Kullanılan NdFeB Mıknatısları.....	34
2.8 Radyoaktif İyot İzotopları.....	35
2.9 İyododeoksiuridin (IUdR).....	40
2.10 Glikozit ve Glukuronid Türevi Bileşiklerin Kanser Araştırmalarındaki Rolü.....	41
2.11 Urasil ve UdR'nin Glukuronidasyonu.....	42
2.11.1 UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi.....	42
2.11.2 UDPGT enziminin özellikleri.....	43

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
2.11.3 β -Glukuronidaz enzimi.....	43
2.11.4 Glukuronidasyon reaksiyonu.....	44
3 MATERYAL VE METOD.....	49
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar	49
3.1.1 Kullanılan kimyasallar	49
3.1.2 Kullanılan cihazlar	52
3.2 Urasil Glukuronid'in Enzimatik Sentezi	53
3.2.1 UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi içeren mikrozom preparatlarının elde edilmesi	53
3.2.2 Hücre dizinleri	53
3.2.3 Çoğaltılan HuTu-80 hücrelerinden UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enziminin elde edilmesi	54
3.2.4 Urasil glukuronid'in HuTu-80 hücrelerinden ayrılan UDP-glukuronidaz enzimi kullanılarak enzimatik sentezi	56
3.3 Deneilerin Tekrarlanabilirliği ve Yapısal Analiz Çalışmaları	56
3.4 Urasil, UdR (Deoksiuridine) ve U-Glu (Urasil Glukuronid)'in ¹³¹ I ve ¹²⁵ I ile İşaretleme Çalışmaları	57
3.4.1 İodojen yöntemi	57
3.4.2 Urasil'in ¹³¹ I/ ¹²⁵ I ile işaretlenmesi	58
3.4.3 2'-Deoksiuridin (UdR)'in ¹³¹ I/ ¹²⁵ I ile işaretlenmesi	59
3.4.4 Urasil glukuronid'in ¹³¹ I/ ¹²⁵ I ile işaretlenmesi	59

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
3.5 Analiz ve Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler	60
3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi	60
3.5.2 Kağıt elektroforezi yöntemi	62
3.5.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi	63
3.5.4 Lipofilite tayini.....	63
3.5.5 Serum stabilite tayini	64
3.6 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması	64
3.6.1 Dextran kaplı manyetik nanoparçacıkların oluşturulmasında parçacık özelliklerine etki edebilecek parametrelerin incelenmesi.....	65
3.6.2 Dextran kaplı manyetik nanoparçacıklar varlığında urasil, UdR, urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid'in I-131 ile işaretlenmesi.....	68
3.6.3 Manyetik magnetit parçacıklarında yüzey modifikasyonu	69
3.6.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi	74
3.6.5 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid'in I-131 ile işaretlenmesi	76
3.7 Urasil Glukuronid (U-Glu) ve Urasil'in Hücre Düzeyinde Etkinliğinin İncelenmesi	76

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
3.7.1 İyot-125 işaretli urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi	77
3.7.2 İyot-125 işaretli urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ligand miktarına bağlı değişimi.....	80
3.7.3 İyot-125 işaretli manyetik parçacıklara takılı urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğine manyetik parçacık miktarının etkisi.....	83
3.7.4 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid ve ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği.....	85
3.7.5 ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid, ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid ve ¹³¹ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği.....	89
3.7.6 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid ve ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80, primer insan bağırsak epitel hücrelerine bağlanma (PHIC) etkinliğinin karşılaştırılması.....	92
3.7.7 I-125 ve I-131'in farklı spesifik aktivitelerde kullanılması ile urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin incelenmesi.....	95
3.8 İstatistik Analizler.....	97
4 BULGULAR VE TARTIŞMA.....	98
4.1 Urasil Glukuronid'in HuTu-80 Hücrelerinden Ayrılan Mikrozomal UDPGT Kullanılarak Enzimatik Sentezi.....	98
4.2 HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar.....	99

İÇİNDEKİLER (Devam)	Sayfa
4.3 Pik 1 ve Pik 2'nin moleküler yapıları.....	101
4.4 Radyoiyodinasyon Sonucu Radyoiyot İşaretli (I-131/I-125) Moleküllerde Beklenen Yapı.....	104
4.5 Urasil Glukuronid'in (U-Glu) Yapı Tayini.....	109
4.5.1 HPLC-MS sonuçları.....	109
4.5.2 IR sonuçları.....	112
4.6 Farklı Koşullarda Hazırlanan Manyetik Nanoparçacıkların Özelliklerine Etki Eden Parametreler.....	119
4.7 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi.....	124
4.7.1 Fe ₃ O ₄ manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi.....	124
4.7.2 Yüzey modifikasyonu ile silika kaplanan manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi.....	127
4.7.3 Amino silan ile yüzey modifikasyonu sonrası manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi.....	131
4.8 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları.....	137
4.8.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	137
4.8.2 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid'in I-131 ile işaretlenmesi.....	144
4.8.3 Elektroforez yöntemi ile elde edilen sonuçlar.....	145
4.8.4 Lipofilite sonuçları.....	149
4.8.5 Serum stabilite sonuçları.....	150

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
4.9 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi.....	152
4.10 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid, Urasil ve I-125'in Farklı Dozlarda (Ligand miktarı) HuTu-80 Hücrelerine Bağlanma Oranları.....	154
4.11 I-125 İşaretli Manyetik Parçacıklara Takılı Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğine Manyetik Parçacık Miktarının Etkisi.....	156
4.12 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğine Etki Eden Parameteler (Zaman, Ligand, Nanoparçacık Oranı).....	158
4.13 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid ve ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücrelerinde Bağlanma Etkinliği.....	159
4.14 ¹²⁵ I-Urasil-O-Glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-Glukuronid ve ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80 ve Primer İnsan Bağırsak Epiteli hücreleri (PHIC) Üzerindeki Bağlanma Etkinliği.....	169
4.15 HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC Hücrelerinde O-Glukuronidlerin Bağlanma Oranlarının N-Glukuronidlere Oranı	177
4.16 ¹³¹ I-Urasil-O-Glukuronid, ¹³¹ I-Urasil-N-Glukuronid ve ¹³¹ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliği.....	178

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
4.17 ^{125}I ve ^{131}I 'in Farklı Spesifik Aktivitelerde Kullanılması ile Elde Edilen I-125 ve I-131 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin İncelenmesi.....	184
4.18 ^{125}I ve ^{131}I işaretli Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliklerinin Karşılaştırılması.....	186
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	194
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	197
ÖZGEÇMİŞ.....	222

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Terapi ilaçlarının vücut içerisinde dolaşım ile genel dağılımı.....	11
2.2 Manyetik ilaç hedefleme.....	13
2.3 İnce tabaka kromatografisi.....	21
2.4 SEM'in şematik yapısı.....	30
2.5 Hücre kültürü çalışmasında kullanılan NdFeB mıknatısları.....	34
2.6 I-131'in bozunum şeması.....	36
2.7 I-131'in aktivitesinin zamanla azalması grafiği.....	38
2.8 I-125'in bozunum şeması.....	39
2.9 Glukuronid oluşumun enzimatik basamakları.....	48
3.1 İodojen'in moleküler yapısı.....	58
3.2 Manyetik nanoparçacıkların amino silan (SG-Si900) ile konjugasyonu.....	71
3.3 Silika kaplı manyetik parçacıklarda amino silan ile yüzey modifikasyonu sonrasında glutaraldehit ile parçacıklar üzerinde CHO grubunun oluşturulması reaksiyonu.....	74
3.4 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.5 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ligand miktarına bağlı değişimi çalışması.....	81
3.6 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğine manyetik parçacık miktarının etkisi çalışması.....	83
3.7 I-125 işaretli örneklerin HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.....	86
3.8 NdFeB mıknatısları ile flasklara manyetik alan uygulanması.....	88
3.9 I-131 işaretli örneklerin HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.....	90
3.10 I-125 işaretli örneklerin HuTu-80 ve PHIC hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.....	93
3.11 Farklı spesifik aktivitelerde iyot kullanılmasının HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin incelenmesi çalışması.....	95
4.1 Urasil glukuronid (U-Glu) ve Urasil (U)'in RP-C18 kolonu (250 x 4.6 mm I.D.) ile elde edilen HPLC kromatogramı.....	100
4.2 Urasil'in Tautomerik formları.....	101
4.3 Urasil-O-Glukuronid (pik1).....	102
4.4 Urasil-N-Glukuronid (Pik2).....	102

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.5 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin teorik lipofiliteleri.....	103
4.6 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin teorik HPLC kromatogramı.....	103
4.7 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin deneysel HPLC kromatogramı	104
4.8 İşaretli bileşiğe ait kimyasal yapıyı göstermektedir.....	106
4.9 Urasil'in I-131/I-125 ile işaretlenmesi.....	106
4.10 2'-Deoksiuridin (UdR) ¹³¹ I ile işaretlenmesi.....	107
4.11 Urasil o- glukuronid (U-Glu) ¹³¹ I ile işaretlenmesi.....	107
4.12 Urasil n glukuronid (U-Glu) ¹³¹ I ile işaretlenmesi.....	108
4.13 Urasil-o-glukuronid'in (Pik1) pozitif ESI spektrumu.....	111
4.14 Urasil-n-glukuronid'in (Pik 2) pozitif ESI spektrumu.....	112
4.15 Urasil-o-glukuronid'in IR spektrumu.....	116
4.16 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid'in IR spektrumu.....	116

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.17 Urasil-n-glukuronid'in IR spektrumu.....	117
4.18 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-n-glukuronid'in IR spektrumu.....	117
4.19 Urasil'in IR spektrumu.....	118
4.20 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil'in IR spektrumu.....	118
4.21 T=60 °C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 2,5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 21.6±3.3 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	119
4.22 T=60 °C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 10 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 27.5±4.9 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	120
4.23 T=25 °C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 22.2±2.1 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	120
4.24 T=80°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 13.2±5.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	121
4.25 T=60°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 5 M, pH 8 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 21±3.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	121

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 T=60°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 5 M, pH 12 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 15.4±2.3 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	122
4.27 T=60°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =0.5, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 17.9±3.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	122
4.28 T=60°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =1, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 15.4±3.8 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	123
4.29 T=60°C; Fe ²⁺ /Fe ³⁺ =2, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 27.5±4.9 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.....	123
4.30 Fe ₃ O ₄ manyetik parçacıkların 100.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	125
4.31 Fe ₃ O ₄ manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	125
4.32 Fe ₃ O ₄ manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.....	126
4.33 Fe ₃ O ₄ manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu.....	127
4.34 Silika kaplı manyetik parçacıkların 25.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	129

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.35 Silika kaplı manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	129
4.36 Silikalı manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.....	130
4.37 Silika kaplı manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu.....	131
4.38 Amin ve silan grupları arasında etkileşim sonucu nanoparçacıkların stabilizasyonu.....	132
4.39 Silanlı manyetik parçacıkların 25.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	134
4.40 Silanlı manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.....	134
4.41 Silanlı manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.....	135
4.42 Silanlı manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu.....	136
4.43 TLRC-1 çözeltisi sonuçlarına göre ¹³¹ I-Urasil Glukuronid bileşiğinin iodojen miktarına bağlı % verim değişimi.....	140
4.44 ¹³¹ I ile işaretli Urasil glukuronid'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi kromatogramı.....	145
4.45 ¹³¹ I ile işaretli Urasil'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi kromatogramı.....	146

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.46 ¹³¹ I'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi kromatogramı.....	146
4.47 U-O-G, U-N-G, Urasil ve I-125'in HuTu-80 hücrelerine 10, 30, 60 ve 120. dakikalarda bağlanma oranları.....	153
4.48 U-O-G, U-N-G ve Urasil'in 1, 3, 10, 30 ve 100 µg dozlarda ve bu dozlara eşdeğer I-125 miktarlarının HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları.....	155
4.49 I-125 işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in manyetik parçacık oranının HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranlarına etkisi.....	157
4.50 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	161
4.51 ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	162
4.52 ¹²⁵ I-Urasil, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	163

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.53 ¹²⁵ I, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I ve manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri...	164
4.54 Urasil-o-glukuronid (UOG), manyetik parçacıklara takılı Urasil-o-glukuronid (m-UOG) ve manyetik alan etkisi altında parçacıklara takılı Urasil-o-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranlarının urasil, parçacıklara takılı urasil ve manyetik alan etkisi altında parçacıklara takılı urasile oranları.....	167
4.55 Urasil-n-glukuronid (UNG), manyetik parçacıklara takılı urasil-o-glukuronid (m-UNG) ve manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı urasil-n-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranlarının urasil, manyetik parçacıklara takılı urasil ve manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı urasile oranları.....	168
4.56 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	173
4.57 ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	174
4.58 ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	175
4.59 ¹²⁵ I'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	176

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.60 HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC hücrelerinde o-glukuronidlerin bağlanma oranlarının n-glukuronidlere oranı...	177
4.61 ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	179
4.62 ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	181
4.63 ¹³¹ I-Urasil, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	182
4.64 ¹³¹ I, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	183
4.65: ¹²⁵ I ve ¹³¹ I'in artan spesifik radyoaktiviteleriyle hazırlanan glukuronid ligandların ve urasil ve ¹³¹ I (Na ¹³¹ I) ve ¹²⁵ I (Na ¹²⁵ I) HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma oranları (30 µg ligand, 30 dakika inkübasyon süresi).....	186

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.66: ^{125}I ve ^{131}I işaretli Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid, Urasil'in ve ^{125}I , ^{131}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.....	187
4.67 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid, Urasil ve manyetik parçacıklara takılı ^{125}I , ^{131}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.....	189
4.68 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid, Urasil ve manyetik parçacıklara takılı ^{125}I , ^{131}I 'in manyetik alan etkisi altında HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.....	191
4.69 Timidin ve IUdR'nin Moleküler Yapıları.....	192

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Glukuronik asit ile konjugasyona giren fonksiyonel gruplar.....	45
2.2 -O, -N, -S, ve glukuronidleri.....	47
4.1 HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.....	100
4.2 LC-MS/MS spektrumlarında görülen belli başlı tanımlanabilen pikler.....	110
4.3 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid, urasil ve silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid, urasilin IR spektrumları.....	114
4.4 1mg iodojen tüpü kullanılarak ¹³¹ I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile R _f değerleri.....	138
4.5 100 µg iodojen tüpü kullanılarak I-131 ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	139
4.6 500µg iodojen tüpü kullanılarak ¹³¹ I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	139
4.7 1 mg iodojen tüpü kullanılarak ¹³¹ I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	139
4.8 ¹²⁵ I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile R _f değerleri.....	141
4.9 ¹²⁵ I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	141

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.10 ¹³¹ I ile işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile R _f değerleri...	142
4.11 I-131 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	142
4.12 ¹²⁵ I ile işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile R _f değerleri...	143
4.13 I-125 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.....	143
4.14 I-131 işaretli Urasil-O-Glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklar ve I-131 işaretli Urasil-N-Glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklara ait gama aktivite sayım değerleri.....	144
4.15 1 mg iodojen kullanılarak ¹³¹ I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.....	147
4.16 Farklı miktarlarda iodojen kullanılarak ¹³¹ I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi % verim sonuçları.....	147
4.17 ¹²⁵ I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.....	148
4.18 I-131 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.....	149

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.19 I-125 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.....	149
4.20 Serum stabilite sonuçlarının zamanla değişimi.....	151
4.21 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil ve ¹²⁵ I'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın zamanla değişimi.....	153
4.22 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil ve İyot-125'in farklı dozlarda HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları.....	155
4.23 Manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-O- glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N- glukuronid ve ¹²⁵ I-Urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanma değerinin kullanılan manyetik parçacık oranı ile değişimi.....	157
4.24 ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	160
4.25 ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	162

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.26 ^{125}I -Urasil, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	163
4.27 ^{125}I , manyetik parçacıklara takılı ^{125}I ve manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı ^{125}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri...	164
4.28 Manyetik parçacıklara bağlanmanın ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki etkisi.....	166
4.29 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	172
4.30 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in manyetik parçacıklara bağlanmasının ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80 ve PHIC üzerindeki etkisi.....	172
4.31 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'nin HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	173
4.32 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in manyetik parçacıklara bağlanmasının ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80 ve PHIC üzerindeki etkisi.....	174
4.33 ^{125}I -Urasil'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	175
4.34 İyot-125'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.....	176

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.35 ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	179
4.36 ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	180
4.37 ¹³¹ I-Urasil, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	182
4.38 ¹³¹ I, manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ¹³¹ I'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.....	183
4.39 ¹²⁵ I-Urasil-O- glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil-N- glukuronid, ¹²⁵ I-Urasil ve ¹²⁵ I'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın işaretlemeye kullanılan ¹²⁵ I'in spesifik aktivitesine bağlı değişimi.....	185
4.40 ¹³¹ I-Urasil-O-glukuronid, ¹³¹ I-Urasil-N-glukuronid, ¹³¹ I-Urasil ve İyot-131'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın işaretlemeye kullanılan ¹³¹ I'in spesifik aktivitesine bağlı değişimi.....	185

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.41 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma değerleri.....	188
4.42 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in manyetik alan etkisi altında HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma değerleri.....	190

KISALTMALAR

MTC	Manyetik hedefli taşıyıcılar
TLC	İnce Tabaka Kromatografi
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi
SEM	Scanning electron microscopy
VSM	Vibrating Sample Magnetometer
XRD	X-Ray diffraction
PHIC	İnsan Primer intestinal epiteli
IUdR	Iodo-2-deoxyuridin
UdR	2'-Deoksiuridin
UDPGT	UDP-glukuronil transferaz enzimi
DMSO	Dimetilsülfoksit (CH ₃) ₂ SO
DTT	DL-Dithiothreitol
TEOS	Tetra etil orto silikat
SG-Si 900	N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoksisilan)
U-Glu	Urasil Glukuronid
U-O-G	Urasil-O-glukuronid

KISALTMALAR (Devam)

U-N-G	Urasil-N-glukuronid
U	Urasil
M U-O-G	Manyetik parçacıklara takılı urasil-O-glukuronid
M U-N-G	Manyetik parçacıklara takılıUrasil-N-glukuronid
M U	Manyetik parçacıklara takılıUrasil
M I-125	Manyetik parçacıklara takılı I-125
M I-131	Manyetik parçacıklara takılı I-131
MA-M U-O-G	Manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid
MA-M U-N-G	Manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-N-glukuronid
MA-M U	Manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil
MA-M I-125	Manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı I-125
MA-M I-131	Manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı I-131

1. GİRİŞ

Ara ilaç molekülleri kendi başına etkili olmayan ancak vücuda girdikten sonra enzimler gibi bazı etkenlerle aktif moleküllere dönüşen ilaçlardır. Ara ilaç molekülleri vasıtasıyla bazı enzimatik mekanizmalar kullanılarak tümör hücrelerinin farklı aktivasyonu sağlanabilir. Beta-glukuronidaz enziminin tümör hücrelerinde yüksek oranda bulunduğu ve aktivitesinin tümör hücrelerinde normal hücrelerden daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu sebeple radyotoksik ajanların radyoışaretleli glukuronid türevleri bu tip tümörler için teşhis ve terapide uygun ajanlar olabilirler. Urasil, RNA'nın yapısındaki dört bazdan birisidir. Üç pirimidin'den birisidir. DNA'da urasil yerine timin kullanılır. Timin gibi, urasil de adenin ile iki hidrojen bağı kullanarak bir baz çifti oluşturabilir. Urasil ile timin arasındaki fark, urasilde timindeki metil grubunun olmamasıdır. Metil grubu ve iyot atomunun Van der Waals çapları birbirine çok yakın olduğundan IUdR (iododeoksiuridin) nispeten timidin benzeri bir yapı oluşturur. Timidin analogu olarak IUdR hücre içine alınır, fosforillenir ve DNA'ya taşınır. ¹²⁵I ile radyoışaretleli UdR gibi çeşitli kemoterapötiklerin ve radyoterapötiklerin hücre düzeyinde etkinliği, hayvan tümör oluşturma modelleme çalışmaları kanser hastalarında kullanılmış ve IUdR'nin tümör hücreleri tarafından yüksek düzeyde tutulduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada UdR'e benzer bir yapı oluşturmak için urasilin glukuronidasyon sentezi yapılmış ve sentezlenen ürünün etkinliğini arttırmak için yüzey modifikasyonu yapılan manyetik nanoparçacıklar ile konjuge edilmiştir.

Bazı kanser dokularının β -glukuronidase enziminin daha zengin olduğu ilk defa Fishman tarafından rapor edilmiştir. (Fishman and Anlyan, 1947, Fishman, 1995). Daha sonra 1974'de Bicker 8-hidroksikinolin glukuronid'in spindle-shaped sarcoma'da normal hücreye göre 3-4 kat daha fazla biriktiğini rapor etmiştir (Bicker, 1974). İnsan β -glukuronidazı gibi insan kaynaklı bir enzimin kullanılması ADEPT de (Antibody-directed enzyme prodrug therapy) tercih edilir. Çünkü hastaya verildiği zaman immunojenik olmaz. Houba ve ark. doxorubicinin glukuronid türevlerini sentezleyerek ADEPT için potansiyelini araştırdı (Houba et al., 1996). Wang tarafından glukuronid türevlerinin β -glukuronidaz-monoklonal antibody konjugatların bağlanabildiği tümör hücrelerinde enzimatik olarak antineoplastik ilaçlara dönüşebileceğini rapor edildi. Uronik asidin tetra-n-bütül amonyum tuzu (p-di-chloroethylaminopheyl- β -glucopyranosid) glukuronid türevi BHAMG insan hepatoma hücrelerinin ana bileşiği olan N,N-di(2-kloroetil)4-hidroksianil'den 150 defa daha az toksik ve AS-30D sıçan hepatom hücrelerinden ise 1000 defa daha az toksikti (Wang et al., 1992). Seramid (Schmelz et al., 1999), dexamethasone (Haeberlin et al., 1993), retionoyl (Barua, 1997) gibi diğer bazı ilaç veya moleküllerin glukuronid türevlerinin kolon kanseri terapisinde kullanımına ilişkin de raporlar vardır.

Yaklaşık 40 yıldır in vitro teşhislerde küçük parçacık uygulamaları kullanılmaktadır. Büyük bir yüzey alanının hacme oranı ile ilgili yararlı faktörlerin olması ve her yerde olan dokulara ulaşabilme kabiliyeti sebebiyle bu parçacıklar tercih edilir. Son on yılda artmış olan araştırma

ve geliştirmeler nano boyuttaki manyetik parçacıkların alanında gözlenmiştir. Manyetik taşıyıcılar, ilk kez doxorubicin gibi sitotoksik ilaçların sıçan kuyruklarına aşılanması ile sarcoma tümörlerini hedeflemek için kullanılmıştır. Bu çalışmadan sonra sitotoksik ilaç taşınımı ve tümörlerin gerilemesindeki başarılar birkaç gurubun domuzlar ve sıçanlar üzerindeki hayvan çalışmaları sonrası rapor edilmiştir. Akışkan demirler bölgesel tümör terapisinde antikanser ajanlar için taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir olan süperparamanyetik nanoparçacıklardır (10-500 nm). Yüksek mıknatıs gücü olan akışkan demirler 1960'dan beri tıpta kullanılmaktadır. Örneğin bu sıvılar, karaciğer ve dalak tümörlerinin teşhisinde MRI için kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında kanserin erken teşhisi için yapılan spesifik hücre ayrılmasında kullanılır.

1960 ların sonuna doğru polimer kimyacılarının dikkatini çeken uygulama alanlarından biri, ilaç etkisini arttırmak için gelişmiş ilaç dağıtım sistemlerinin gereğiydi. Bu sebeple son yıllarda polimer kimyacılar, biyomedikal uygulamalar için tasarlanan polimer maddeleri üzerinde çalışmaktadır. Yapılan tıbbi uygulamalarda dextran demir oksitleri en çok kullanılan stabilizatrdr (Ohgushi et al., 1978; Pouliquen et al., 1991). Bununla birlikte arabinogalactan (Josephson et al., 1990) nişasta (Fahlvik et al., 1990), glycosaminoglycans veya proteinler diğer stabilizatörler de kullanılmıştır. Demir tuzları içeren böyle sentezlerde sıcaklık, kaplama polimeri (stabilizör), titrasyon hızı, alkali seçimi, saflaştırma koşulları vs. Ürünün kimyasal ve fiziksel

özelliklerini dolayısı ile farmasötik kalitesini dolayısıyla tıbbi değerini etkiler.

Manyetik özelliği sahip nanoparçacıklar görüntüleme, teşhis, tedavi ve biyolojik malzemelerin ayrılmasında kullanılabilirler. Manyetik özellik göstermeleri nedeniyle bu sınıflar manyetik alanda yönlendirilebilmektedir. Manyetik özellik gösteren parçacıklara ilaç molekülleri yükleyerek ilacın vücutta yönlendirilmesinde de kullanmak mümkündür. Manyetik nanoparçacıklar radyoaktif maddeler ile işaretlenebilmekte ve parçacıklara radyoaktif özellik katılmaktadır. Radyonüklid işaretli tümöre hedeflendirilmiş manyetik parçacıklar bazı klinik çalışmalarda denenmiştir. Şimdiye kadar Re-188, In-111, Y-90, I-125 ve I-131 işaretli mikro ve nanoparçacıklar hazırlanmıştır. (Yu et al., 2003; Hafeli et al., 1995).

Literatürde manyetit nanoparçacıkların herhangi bir radyoaktif iyot izotopuna bağlanması ve biyolojik uygulamaları ile ilgili olarak grubumuzca yapılan bazı çalışmalar dışında bir çalışmaya rastlanmamıştır. (Unak et al., 2007a; Unak et al., 2007b; Dağdeviren et al., 2007; Medine and Unak, 2006; Dağdeviren et al., 2005a; Dağdeviren et al., 2005b; Unak and Medine, 2007; Bekiş vd., 2008). Bunun dışında Alexiou ve ark. iodojen yöntemini kullanarak I-123 işaretli nişasta ile kompleks yapıp bu kompleksi manyetik nanoparçacıkların stabilizatörü olarak kullanmışlar ve ayrıca magnetit nanoparçacıkları Fe-59 ile işaretlemişlerdir. Tümörlü tavşanlar üzerinde tümör üzerinde bir saatlik manyetik uygulama ile tümörde kalan aktiviteyi izlemişler, ayrıca bu

parçacıklar ile mitoxantrone gibi kemoterapötiklerin taşınabilirliğini incelemişlerdir. Tümör üzerine dışardan manyetik alan uygulandığında tümör ve peritümöral alanda kemoterapötiklerin daha fazla konsantrasyonda olduğunu göstermişlerdir. Bu şekilde manyetik hedeflemenin tavşanda VX2 squamous hücre karsinoma terapisinin etkinliğini arttırabildiğini ve manyetik ilaç hedeflemenin kemoterapötiklerin yan etkilerinin azaltılmasında etkili olabilecek bir yöntem olabileceğini rapor etmişlerdir (Alexiou et al., 2002).

Segal ve ark. silil modifiye edilmiş alkonalamın magnetit-oleik asit nanoparçacıkların hazırlamışlar, insan fibrosarkoması (HT-1080), fare hepatoması (MG-22A) ve normal fare fibroblastları üzerinde yaptıkları deneyler ile nanoparçacıkların orta düzeyde sitotoksik olduğunu, yüksek derecede NO-indükleme özelliğine sahip olduklarını ve tümör hücre morfolojisini kuvvetle değiştirebildiklerini rapor etmişlerdir (Segal et al., 2008).

Babic ve ark. polilisin konjuge olmuş magnetit nanoparçacıkların kemik iliği (rMSCs) ve insan mesenchymal sistem hücreleri (hMSC) üzerinde etkinliğini incelemişler ve %92 oranında hücre tarafından tutulduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca sıçan beyninde yaptıkları MR çalışmalarında parçacıklar enjeksiyonun yapıldığı yerde kalmıştır. Polilisin kaplı olmayan endoreme göre hücre tutulumunu daha yüksek bulmuşlardır (Babic et al., 2008).

Katayose ve ark magnetit nanoparçacıkların meme kanseri metastasının ölçülmesi ile ilgili çalışma yapmışlar ve magnetitin

mikrometastasin tespit edilmesinde kolay ve yararlı bir alternatif olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Katayose, 2008).

Zhang ve Misra magnetit bazlı ve ısıya duyarlı polimerler ile kaplı doxorubicin gibi terapötikler ile konjuge ilaç taşıyıcı sistemler tasarlamışlardır. Önerilen sistemin manyetik hedefleme ile ilaç taşınmasında uygun olacağı önerilmiştir (Zhang and Misra, 2007).

Mohapatra ve ark. folik asit konjuge edilmiş manyetik nanoparçacıkların folat reseptörü kanser hücreleri tarafından spesifik olarak tutulduğunu rapor etmişlerdir. Manyetik nanoparçacıklar Fe^{2+} ve Fe^{3+} nin birlikte çöktürülmesi ve 2-karboksietil fosfonik asit ile yüzey modifikasyonu yapılarak hazırlanmışlardır. Bu şekilde nanoparçacığın ucuna bir karboksi gurup takılmış ve folik asit ve fluorescein isothiocyanate (FITC) nanoparçacıklara 2,2-(ethylenedioxy)-bisethylamine kullanılarak konjuge edilmişlerdir (Mohapatra et al., 2007). Folate-ile bağlanmış manyetik nanoparçacıklar hücreler üzerinde toksik etki göstermemiş HeLa ve B16 melanoma F0 kanser hücrelerine folat reseptörleri üzerinden bağlanmışlardır. Ayrıca hazırlanan nanoparçacıklar oda sıcaklığında superparamanyetik özellik göstermişlerdir. Moritake ve ark. 3 nm boyutlu magnetit nanoparçacıkları (3-aminopropyl) triethoxysilane ile silanlamışlar, amino grupları ile yüzey fonksiyonu yapıldıktan sonra farmasötik ve biyomoleküllere bağlanabileceğini rapor etmişlerdir. Son derece küçük nanoparçacıkların başka modifikasyona gerek kalmadan katyonik yapı nedeniyle endositik bağlanmayı arttırdığı ve hücre içine girdiği rapor edilmiştir.

Nanoparçacıkların bağlandığı hücreler çoğalmaya devam etmişler ve mitosis ile ilgili herhangi bir söndürücü etki göstermemişlerdir. İlaveten parçacıklar fare kulak derisi altına enjekte edildiğinde dış manyetik alan altında lokalize olmuşlardır (Moritake et al., 2007).

Wank ve ark. tetraheptilammonium kaplı manyetik nanoparçacıkların kemoterapötik olarak daunorubicin ile birlikte leukemia K562 hücreleri üzerinde zamanla etki ederek ilaç direncini önlediğini rapor etmişlerdir (Wang et al., 2007).

Selim ve ark. hidrofilik, uniform, süperparamanyetik, ve toksik olmayan maltotrionik acid (MA)-kalpli manyetit nanoparçacıkları hazırlamışlar ve hücre içi spesifik bağlanmasını incelemişlerdir. MAM nanoparçacıklara folik asit konjuge olduğunda (FAMAM), kalın bağırsak kanser hücrelerindeki hücre membranını geçerek folik asit reseptörlerine tutulduğunu göstermişlerdir. Her iki nanoparçacığın da hücreye bağlandığı ancak folat takılı olanların daha çok bağlandığı rapor edilmiştir. Bu şekilde hazırlanan nanoparçacıkların kalın bağırsak kanser hücrelerinin görüntülenmesinde kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (Selim et al., 2006).

Manyetik nanoparçacıkların hipertermia ile kanser terapisinde başarı ile kullanılabileceğini rapor edilmiştir (Bahadur et al., 2003). Terapi olacak bölgede manyetik alan altında kısa süreli sıcaklık artışına dayalı bu teknik kanser ile ilgili üzerinde çalışılan terapi yöntemlerinden biridir. Hipertermiada lokal olarak terapi olacak bölgenin sıcaklığı 45 °C ye çıkarılarak oradaki hücreler öldürülür. İyi tasarlanmış nanoparçacıklar

ile hipertermia ile normal dokuya zarar vermeden tümör dokusuna hasar verilebilir. Nanoparçacıklar tümör olan organa verildiği zaman tümörde iyi organize olmamış damar sistemi nedeniyle tümörde birikirler. Fe_3O_4 gibi manyetik nanoparçacıklar iyi seçilmiş alternatif manyetik frekansta ısıtılırlar. 450 KHz veya daha düşük frekans 10-30 nm boyutundaki nanoparçacıkları etkili olarak ısıtırken normal doku bileşenlerine zarar vermez. Altın nanoparçacıklar iyi infrared absorbanları olarak bilinirler. 150 nm boyutunda %0.01 konsantrasyonda Au nanoparçacıklar 1-2.5 cm derinliğe yerleştirildiği zaman kuvvetli yakın IR absorbanıdır. Tümördeki parçacıklar optik kontrastı 1 den 3.5'e çıkarılırlar. FDA tarafından onaylanmış manyetik kontrast ajanları düşünülerek altın kaplı Fe_3O_4 ajanları güvenli optik ve termal işaretleyici olarak meme kanseri teşhisinde ve kanser spesifik hipertermia terapide güvenle kullanılabilirler (Jin and Kang, 2007).

Bu çalışmanın amacı ise urasilin glukuronidasyon sentezinin yapılması ve bu sentez ürüne Fe_3O_4 parçacıkları ile manyetik taşıyıcı özelliğin kazandırılması, $^{125/131}I$ ile işaretlenerek manyetik ilaç taşıyıcı olarak etkinliğinin hücre düzeyinde saptanmasıdır. Bu şekilde yan etkileri daha az, toksit etki göstermeyen, daha düşük dozlarda spesifik ve bölgesel etkinliği olan yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kanser

Kanser, günümüzün en önemli sağlık sorunlarından biridir. Sık görülmesi 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 edilmektedir. Türkiye İstatistik Kurumu'nun 2003 yılı verileri, ölüm nedeni olarak, kalp krizi, kalp yetmezliği, hipertansiyon gibi kardiyovasküler hastalıkların % 42 ile ilk sırada, kanserin ise % 12.9 ile ikinci sırada geldiğini gösteriyor. Uluslararası Kanseri Araştırma Merkezi'nin Türkiye ile ilgili 2002 yılı verilerine göre, erkeklerde en sık görülen kanser türleri arasında ilk sırayı % 33.8 ile akciğer kanseri almaktadır. Mide kanseri % 8.7 ile 2.sırada, mesane kanseri % 7.8 ile 3.sırada, barsak kanseri % 6.7 ile 4.sırada, gırtlak kanseri % 5.8 ile 5.sırada, prostat kanseri % 5.5 ile 6.sırada bulunmaktadır. Kadınlarda en sık görülen kanser türü % 24.2 ile meme kanseridir. Bu kanser türünü sırasıyla barsak kanseri (% 9.3), mide kanseri (% 6.9), yumurtalık kanseri (% 5.9), akciğer kanseri (% 5.7) ve lösemi (% 5.4) izlemektedir. Türkiye'de en sık ölüme yol açan kanser türleri ise erkeklerde sırasıyla akciğer kanseri (% 40.2), mide kanseri (% 9.5), barsak kanseri (% 5.5) ve mesane kanseri (% 5.4). Kadınlarda kanserden ölümlerde meme kanseri (% 16.7) ilk sırada gelmektedir. Meme kanserini % 9.3 ile barsak kanseri,

% 9.1 ile mide kanseri ve % 8.2 ile akciğer kanseri izlemektedir (<http://www.turkcancer.org>), (www.atonet.org.tr).

2.2 Kanser Tedavi Yöntemleri

Kanser tedavi yöntemleri aşağıdaki gibidir.

- Ameliyat
- Radyasyon terapi
- Kemoterapi
- Hormonal terapi
- Manyetik ilaç hedefleme

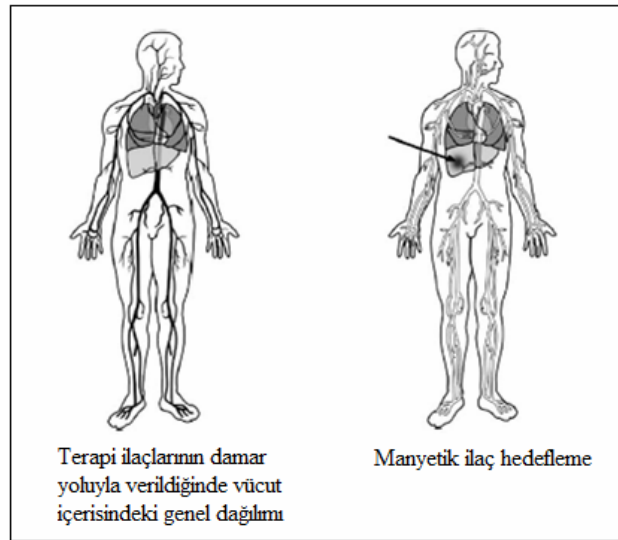
Tedavinin seçimi tümör dokularının ve komşu dokuların muhtemel bölümlerinin kesip çıkarılması, birleştirilmiş kemoterapi, immunoterapi, radyasyon tedavisi veya bunların bir kombinasyonunu içerebilir. Başarılı bir tedavi için kanser hücrelerinin kökünün kurutulması zorunludur. Bu sebeple kesip çıkarma uygulanabilir tedavi seçimidir. Doku çevresi, içeriği ve bölgesine bağlı olarak her zaman cerrahi müdahale mümkün olmayabilir. Bu gibi durumlarda radyasyon terapi ve kemoterapi gerekli olur. Fakat bu tedavilerin uygulanması sırasında şiddetli zorluklar gözlenmiştir (Lubbe, 2001).

Kemoterapi kanser tedavisi için en yaygın yöntemdir. Kemoterapik ilaçlar çok etkili olmalarına rağmen istenmeyen durumlara sebep olması, nispeten spesifik olmaması ve toksit etki göstermesi gibi dezavantajlara sahiptir. Toksikite terapinin faydasının azalmasına ve istenmeyen etkilere

sebepler olur (Hafeli, 2003). Bir kemoterapi ilacının etkili olabilmesi için her bir tümör hücresine ulaşması ve hücre içerisine girmesi gerekir. İlacın terapötik tedavi aralığı yüksek tümör baskısı, hypoxia ve necrosis gibi faktörler tarafından etkilenen diffüzyona bağlıdır (Hafeli, 2001).

2.3 Manyetik Kontrollü İlaç Hedefleme

Terapi ilaçları damar yoluyla verildiğinde vücut içerisinde Şekil.2.1’de görüldüğü gibi genel dağılıma sebep olur. Bu sebeple hedeflenmiş hücrelerin yanında sağlıklı hücrelerde zarar verici şekilde yan etki gösterir (Chunfu, 2004).



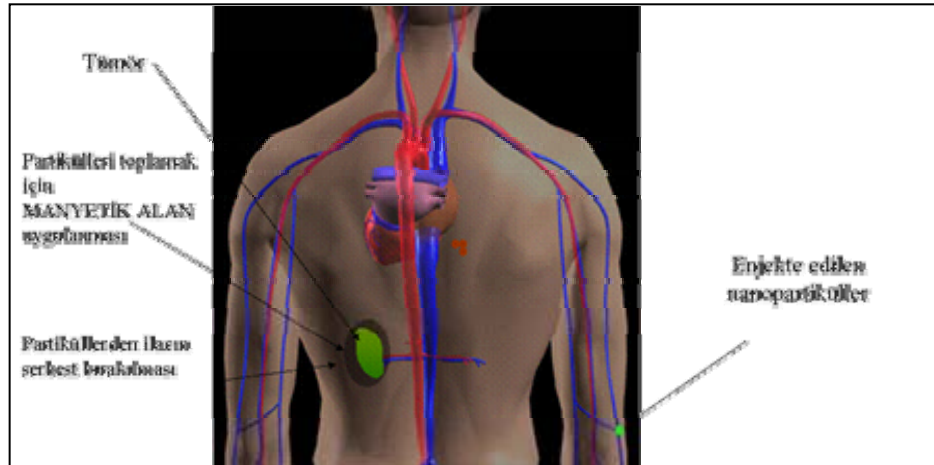
Şekil 2.1 Terapi ilaçlarının vücut içerisinde dolaşım ile genel dağılımı

Kemoterapi ajanlarının seçici olarak taşınmasını amaçlayan birçok sistem ve stratejiler araştırılmaktadır. Onlardan bazıları şimdi insanlar üzerinde denenmektedir. Bölgesel kanser tedavisi yaklaşımları ile

kemoterapik ilaçların sisteme taşınması, bölgesel etkinliği sağlamanın bir yoludur. Bölgesel terapi kullanılarak, tümör bölgesinde daha yüksek ilaç konsantrasyonu sağlamak mümkündür. Bu sebeple kanser tedavisinde ilaç taşıma metodlarının uygulanabilmesi için manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi amaçlanmıştır. Manyetik kontrollü hedeflenmiş kemoterapi kullanılmasıyla; yan etkilerin giderilmesi, sitotoksit ilaçların sistem içindeki dağılım miktarının azalması ve ihtiyaç duyulan doz miktarının azaltılması amaçlanır (Chunfu, 2004; Hafeli, 2001).

Manyetik ilaç hedefleme, insan vücudunda doğru bölgeye, doğru dozda, istenilen zamanda, tedavi edici ilaçların ulaştırılması için manyetik parçacıkların ve manyetik alanın kullanılmasıdır.

Manyetik kontrollü ilaç hedefleme, bir manyetik alan yardımıyla tanımlanan hedef bölgeye ilaçların konsantrasyonunun reticular endothelial system (RES) den uzakta tutmaya yarar. Kullanılması düşünülen ilaç manyetik özellikteki bileşim ile uygun bir farmakolojik formulasyonda hazırlanır. Henüz bunlardan çok azı hayvanlarda başarıyla kullanılmaktadır. Şekil 2.2’de görüldüğü gibi bu bileşim damar yoluyla enjekte edilir ve tümörlü dokuya ulaşması sağlanır. Bileşimin hedef dokuya daha iyi taşınması için yeterli şiddet ve yükseklikte harici bir manyetik alan uygulanır (Lubbe, 2000).



(<http://deutsche-boerse.com>)

Şekil 2.2 Manyetik ilaç hedefleme

Manyetik ilaç taşınımı son 20 yıldır hareketli bir çalışma alanıdır. Windder ve arkadaşları tarafından amaçlanan manyetik hedeflemenin genel düşüncesi, bir manyetik alan etkisinde kalan ilaçla kaplı maddenin enjekte edilmesi ve sonrasında hedef bölgeye ilaç matriksini yönlendirmek için harici olarak bir mıknatısın kullanılmasına dayanmaktadır. Hedeflemenin etkisi manyetik alan şiddetine ve parçacıkların dolaşımdaki kalma süresine bağlıdır (Rudge, 2000).

2.3.1 Manyetik ilaç taşıyıcılar

Manyetik ilaç taşıyıcılar, farmasötik ajanların spesifik dağılımı için geliştirilmektedir. Bu parçacıklar demir ve aktif karbon içerebilir ve yüksek enerji öğütme prosesleri veya kimyasal yöntemlerle hazırlanırlar.

Boyutları 10-500 nm aralığında olan manyetik ilaç taşıyıcılar manyetik nanosferler olarak adlandırılırken, boyutları 1-100 µm aralığında olan manyetik ilaç taşıyıcılar manyetik mikrosferler olarak adlandırılır. Büyük parçacıklar (300 nm-3,5 µm) gastrointestinal görüntüleme için kullanılır. 60-150 nm boyutlarındaki nanoparçacıklar hızlı bir şekilde karaciğer ve dalakta ortaya çıkar ve enjeksiyona bağlı olarak vücudun reticuloendothelial sistemi tarafından ayrılabilir. Hatta klinik saptamaların altında olan daha küçük parçacıklar (10-40 nm) büyük parçacıklardan daha fazla kan dolaşımında bulunarak kapiler duvarları aşabilir ve sıklıkla lenf başlarında ve kemik iliğinde etkili bir şekilde tutulur. Hatta bu boyutta parçacık yüzeyinde spesifik hedef ligand olmaksızın farklı organ sistemleri görüntülenebilir. Ayrıca kanserli ve normal dokular arasındaki farktan dolayı kanserli dokularda farklı oranda tutulurlar ve bu klinik olarak kanser teşhisi için kullanılabilir. Manyetik ilaç taşıyıcılar yüksek manyetik hassaslığı sebebiyle manyetik alanın fiziksel etkisiyle hedeflenen alana gönderilebilir. Manyetik ilaç taşıyıcıların damar duvarlarına herhangi bir zararı da gözlenmemiştir (Hafeli, 2001, 2003, 2004).

Nanoparçacıklar bazı materyaller ile birleştirildiğinde eşsiz kimyasal, optik, elektronik, manyetik ve mekanik özelliklere sahip olur. Manyetik parçacıkların yüksek manyetizasyon doygunluğu ve manyetik hassaslığı farmasötik ve medikal uygulamalar için büyük bir kazançtır. Örneğin mükemmel bir manyetik doygunluğa (~78emu/g) sahip olan Fe₃O₄ manyetit nanoparçacıkları diğer bir çok materyale (demir, nikel ve kobalt vb.) oranla güçlü ferromagnetik davranışları, nispeten düşük

toksitesini ve oksidasyona duyarlılığın az olması nedeniyle bu uygulamalar için tercih edilir. Bu manyetit nanoparçacıkları pH= 9-10 da amonyum hidroksit varlığında Fe(II) ve Fe(III) klor tuzlarının çökmesi ile üretilir ve apolar çözücülerde oleik asit ile kolaylıkla kararlı hale getirilebilir (Asmatulu, 2005).

Biyoyumlu sıvı demirler “manyetik ilaç taşıyıcı” adlı bölgesel tümör terapisinde antikanser ajan içinde bir taşıyıcı sistem olarak kullanılabilir olan süperparamagnetik nanopartiküllerdir. Sıvı demirler (ferro fluids) 1960 dan beri tıpta kullanılmaktadır. Örneğin sıvı demirler karaciğer ve dalak tümörlerinin teşhisinde MRI için kontrast ajan olarak kullanılmaktadır. Bunun yanında kanserin erken teşhisi için yapılan “immuno-magnetic cell separation” adlı spesifik hücre ayrılmasında kullanılır. Ayrıca sıvı demirler yapay kalp naklinin geliştirilmesinde önemli bir maddedir (Alexiou, 2002).

Yaklaşık 40 yıldır in vitro teşhislerde küçük parçacıkların uygulamaları kullanılmaktadır. Büyük bir yüzey alanının hacme oranı ile ilgili yararlı faktörlerin olması ve her yerde olan dokulara ulaşabilme kabiliyeti sebebiyle bu partiküller tercih edilir. Son on yılda artmış olan araştırma ve geliştirmeler nano boyuttaki manyetik parçacıklar alanında gözlenmiştir (Berry, 2003).

Manyetik uyumlu mikrosferlerin geliştirilmesi, bu alana yeni bir güç getirmektedir. Manyetik sıvılara bağlı parçacıklar uygulanan manyetik alan etkisiyle kısıtlı erişime sahip anatomik bölgelerde ilaçları konsantre etmek, hücre ve moleküllerden uzaklaştırmak için

kullanılabilir. Bunun yanında manyetik parçacıkların antikorlar, lektinler, peptitler, proteinler, nükleik asitler veya hormonlarla modifikasyonu bu uygulamaları daha etkili ve yüksek seçici yapar. Bu iki avantajın birleşimi, manyetik mikrosfer uygulamalarını moleküler ve hücre biyolojisinde, artmakta olan temel bilim ve klinik çalışmalarda oldukça başarılı yapar (Hafeli, 2003; Lubbe, 2001).

Manyetik taşıyıcılar, ilk kez cytotoxic ilaçları (doxorubicin) rat kuyruklarına aşılana sarcoma tümörlerine hedeflemek için kullanılmıştır. Bu çalışmadan sonra cytotoxic ilaç taşınımı ve tümörlerin hafiflemesindeki başarılar birkaç gurubun domuzlar ve rat lar üzerindeki hayvan çalışmaları sonrası rapor edilmiştir (Chunfu, 2004).

2.3.2 Manyetik nanoparçacıkların polimerle kaplanması

Son 10 yıldır polimer kimyacıları, biyomedikal uygulamalar için tasarlanan polimer maddeleri üzerinde çalışmaktadır. 1960 lıların sonuna doğru polimer kimyacılarının dikkatini çeken uygulama alanlarından biri, ilaç etkisini arttırmak için gelişmiş ilaç dağıtım sistemleriydi . Bunun için sisteme sokulabilen veya enjeksiyon için depo veya matriks olarak amaçlanan polimerler tasarlandı. Polimerik prodrug lar veya polimer-drug birleşimlerinin tasarlanması terapatik uygulamalar için geliştirilmiş ilaç kullanımlarına öncülük etmiştir (Hoste, 2004).

Polimerler, yardımcı bir in vivo veya in vitro reaksiyona katılacak olan genetik materyal, ilaç, antikor, veya bir kimyasal için solvent olarak

davranırlar. Bunun yanında, polimerler bakterilerle ayrışabilen bir özelliğe sahip olup bir çok organik çözücü içinde çözünebilmektedirler (Ramanujan, 2004).

Polimerlerle kaplı manetik parçacıklar mikrosfer olarak adlandırılırlar. Bu mikrosferler, hücre ayırmaları ve analizleri, moleküler biyoloji, bakterilerin hızlı bulunması, ilaç dağılımı, radyonüklid terapi, MRI ve hyperthermia gibi bir çok uygulama alanına sahiptir (Ramanujan, 2004; Saiyed, 2003).

Literatürlerde, bakterilerle ayrışabilen uygun polimer olarak dextran, aktif karbon (Rudge, 2000), human serum albumin (HSA) (Chunfu,2004),polylactides,poly(e-caprolactone),polyalkylcyanoacrylate, polyglycolides,poly(lactide-coglycolides),polyanhydrides,polyorthoesters (Asmatulu, 2005) ve poly(bis(p-carboxyphenoxy)-propane) gibi polimerlerin varlığı tespit edilmiştir (Ramanujan, 2004). Bu doğal ve sentetik polimerler, manyetik nanoparçacık (manyetit, maghematite, demir, kobalt, nikel vs.) ve ilaçlarla (veya diğer aktif ajanlarla) çeşitli teknikler kullanılarak birleştirilirler. İlaç taşıyıcı manyetik nanoparçacıklar vücutta spesifik bölgeye gönderildiğinde kolloidal nanoparçacıklar ilaç moleküllerini yaklaşık olarak 30-45 dakika içinde serbest bırakmaya başlar ve 2-3 saat içerisinde serbest bırakma işlemi sona erer. Fakat bu süre polimerin tipine ve diğer koşullara bağlı olarak değişmektedir. Mikrosferlerin boyutu karıştırma hızına ve polimerin konsantrasyonuna bağlıdır. Polimerin konsantrasyonu azalınca, mikrosferlerinde boyutu azalır. Bunun yanında mikrosfer yüzeylerinde

kuru demir oksit tozu keseleri, demir oksit balonlarının patlakları ve yüzeydeki toz yayılmaları gibi istenmeyen sıkıntılarda oluşur. Manyetik partiküllerin manyetik özelliğinin polimerle kaplandıktan sonra azaldığı literatürde görülmüştür (Asmatulu, 2005; Ramanujan, 2004).

Hedeflenmiş ilaç taşıma sistemlerinde, kandamarları ve dokuları içinde bulunan kolloidal parçacıklardan ilaç moleküllerinin serbest bırakılmasının 3 ana mekanizması vardır. Bunlar difüzyon, ayrışma ve difüzyonu takiben olan şişmedir. İlaç molekülleri beden sıvısında (bodily fluids) veya parçacıklar içinde çözüldüğünde difüzyon meydana gelir. Polimer zincirleri tarafından tuzaklanmış olan ilaç moleküllerinin düşük moleküler ağırlıktaki türlerinin etkili olarak serbest bırakılması için polimer zincirleri hidrolizlendiğinde ayrışma başlar. Şişme basamağında sistem önce kurudur. Polimerler vücuda yerleştiğinde iç basıncı arttırmak ve vücut içinde şişen kısımdan ilaç moleküllerini difüzelemek için şişerler (Asmatulu, 2005).

Polimer kaplı manyetik ilaç taşıyıcıların başarısı, hedef bölgede yüksek manyetik alan seviyesini üretebilecek güçlü mıknatıs yapılarına bağlıdır. Yaygın olarak bulunan ve kullanılan homojen manyetik alanların çoğu difüzyona karşı parçacıkların idare edilmesi için yeterli güçtedir ve canlı sistemlerinde kan akım hızları mıknatıs kutbunun tam sınırından birkaç cm mesafede bulunmuştur. Diğer bir deyişle, teknik olarak, küçük bir alan üzerinde odaklanan yeterli şiddette manyetik alan yapmak ve dokuda lineer kan akış hızını önleyebilmek zordur. Manyetik kuvvet damarlarda 10cm/s ve kılcaldamarlarda 0,05 cm/s lineer kan akış

oranlarını aştığında, manyetik parçacıklar hedef bölgede tutulur ve hedef bölgenin endothelial hücreleri tarafından özümsebilir (Chunfu, 2004; Lubbe, 2000).

Minimum toksisite, maksimum bakterilerle ayrışabilme ve biyouyumluluğa izin veren eşsiz yüzey özelliklerine sahip olan kolloidal manyetik parçacıklar ilaç taşıma araçları için uygun olabilir. Böyle parçacıklar harici manyetik alan uygulanarak istenilen zaman periyodu için spesifik alana sürüklenebilir ve orada tutulabilir. Kontrollü ilaç dağılımının bu yöntemi, daha düşük dozlarda ve daha etkili tedaviler için kullanılabilir. Bunun yanında gereken hasta rızasının artırılması ve daha az ilaç kullanma tasarrufu ve istenilen orandaki ilaç seviyelerinin muhafazası bu yöntemin diğer avantajlarıdır (Asmatulu, 2005; Lubbe, 2000).

2.4 Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

2.4.1 İnce tabaka kromatografisi (TLC)

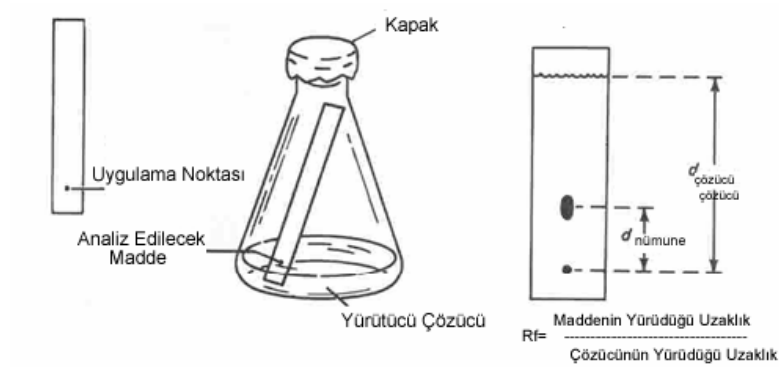
Kromatografi, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri temeline dayanır. İnce tabaka kromatografisi, bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. İnce tabaka kromatografisinde, cam, alüminyum gibi maddelerden yapılmış levhalar üzerine silikajel, alüminyum oksit, sellüloz vb gibi malzemelerin ince bir katman halinde yayılmasıyla hazırlanmış tabakalar sabit faz

olarak kullanılır. Hareketli faz olarak ise tek veya karışım halindeki sıvı kimyasallar kullanılır. Hareketli faz ağız iyi kapanan kromatografi tankı içine konulur ve tankın içinin çözücü buharı ile iyice doyması sağlanır. 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 bir damlalıkla önceden damlatılmış olan karışımı farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. Polar maddeler, çözücü/adsorban madde ikilisinden daha polar olan ile daha sıkı etkileşim gösterirler.

Kromatografisi yapılacak numunenin yaklaşık 5 μL 'lik bir kısmı mikropipet veya enjektör yardımıyla tabakanın alt kenarından belli bir uzaklığa damlatılır ve damlanın kuruması beklenir. Daha sonra kromatografi kağıtları tank içerisine dikkatlice yerleştirilerek hareketli fazın tabaka üzerinde yükselmesi sağlanır. Hareketli faz, kromatografi kağıdı üzerinde, numune içerisindeki maddelerin birbirinden ayrılması için gereken yüksekliğe kadar yürütülmelidir. Plaka yürütme kabından alınır. Çözücünün ulaştığı seviye kurşun kalemle hafifçe işaretlenir ve çözücünün buharlaşması sağlanır. Renksiz maddelerin ayrılması gerçekleştirildiyse bazı metotlarla görünür hale getirilebilir. Bazı ticari plakalardaki adsorblayıcı maddeler, florasan indikatör boyalar içermektedir. Plaka UV lambasının altına yerleştirildiğinde, spotlar belirgin hale gelirler. Buna alternatif olarak da, plakayı içerisinde iyot kristalleri yerleştirilmiş kapalı bir erlen içerisine yerleştirilerek iyot

buharı banyosu oluşturur ve iyotla reaksiyona giren spotlar renklendirilerek belirginleşir.

R_f Değeri (Relative Front); kromatogram üzerindeki her maddenin çözücü ile sürüklenme miktarı, birbirinden farklıdır. Maddenin sürüklendiği noktanın başlangıç noktasına uzaklığının toplam yürütme mesafesine oranına R_f değeri (alıkonma değeri) denir (Şensoy, 2007; Zor, 2000).



Şekil 2.3 İnce tabaka kromatografisi

İnce tabaka Kromatografisi kimyasal bileşiklerin sınıflandırılmasında etkili, çabuk, hızlı ve ucuz ayırma yöntemlerinden birisidir. Küçük miktarlarda solvent ve örnek kullanıldığı için ucuz bir yöntemdir. Diğer kromatografi yöntemlerine göre düşük cihaz maliyeti, analiz süresinin kısa olması ve aynı anda 20 örneği ayırabilme kabiliyeti gibi bazı avantajları sebebiyle ince tabaka kromatografisi analitik, bio-

medikal ve farmasötik alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. (Soponar et al., 2008; Djozan et al., 2008; Johnson et al., 2007)

2.4.2 Kağıt elektroforezi

Kağıt elektroforezi çözelti içindeki bileşiklerin yükünü tespit etmek amacıyla kullanılan bir tekniktir. Belirli bir pH'da ve belirli bir elektrik alanında yüklü taneciklerin farklı hızlarda yürüyerek ayrılmaları tekniğine elektroforez denir.

Elektroforez için üç şeye ihtiyaç vardır:

- iyonların hareket edebileceği uygun bir ortam (destek ortamı),
- elektriksel alanı oluşturmak için doğru akım sağlayacak güç kaynağı,
- uygun pH'da bir tampon çözelti.

Çözeltide bulunan bir iyon elektrik alan altında sabit hızla hareket eder. Bu hız uygulanan elektrik alanının şiddeti ve iyonun hareketlilik katsayısına bağlıdır. Aynı çözelti içinde bulunan fakat hareketlilik katsayısı farklı olan iki iyonun elektrik alan altında alacakları yol farklı olacaktır. Dolayısıyla yüklü iyonların elektrik alan altındaki göçlerinden yararlanılarak molekülleri ayırmak, özelliklerini ve konsantrasyonlarını belirlemek mümkündür (Şensoy, 2007; Kobayashi et al., 1994).

2.4.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

Sıvı kromatografisi 1900'ü yılların başlarında bulunmuş ve 1960'lı yıllardan itibaren sıvı kromatografisinin geliştirilmesi için geniş çapta araştırmalar yapılmıştır. Kromatografik yöntemler sabit faz ve hareketli faz arasında olan kütle aktarımını içeren ayırma teknikleri olarak ifade edilebilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımının kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir kromatografik yöntemdir. Uygun çözücü kullanılarak çözülen örnek karışımı, yüksek basınç altında kromatografik kolondan geçirilir ve burada bileşenlerine ayrılır. Bileşenlerin birbirinden ayrılması ve bunun derecesi (resolution parameter) önemlidir ve çözülmüş bileşenler ile sabit faz arasındaki etkileşime bağlıdır. Sabit faz kolon içerisindeki hareketsiz dolgu materyali olarak tanımlanır. Çözülmüş bileşenler ile sabit ve sürekli fazlar arasında istenilen etkileşim, sürekli faz olarak kullanılan çözücülerin ve sabit fazın değiştirilmesi ile elde edilebilir.

2.4.3.1 HPLC sistemleri

HPLC sistemi pompa, enjektör, kolon, dedektör ve bilgisayar birimlerinden oluşmaktadır. Sistemin önemli bir bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya

başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına kromatogram adı verilir.

HPLC uygulamalarında mobil ve bileşimi kromatografik performansı etkileyen faktörlerden biridir. HPLC sistemlerinde kullanılan mobil fazların ortak özellikleri yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olmasıdır.

Her bir HPLC türünde kullanılan mobil fazların özel farklılıkları vardır. İyon değişim kromatografisi genellikle farklı pH değerlerine ayarlanmış sulu tampon çözeltileri sürekli faz olarak kullanılır. Normal-faz sıvı kromatografisinde apolar, ters-faz sıvı kromatografisinde su ve asetonitril karışımı gibi polar çözücü karışımları mobil faz olarak kullanılır.

HPLC uygulamalarındaki ayırma, yüzey etkileşimlerinden yararlanılarak yapılır ve adsorbent çeşidine ve özelliklerine bağlıdır. Modern HPLC adsorbentleri geniş yüzey alanına sahip ve küçük yapıdaki partiküllerdir. Temel adsorbent özellikleri şunlardır: 3-10 µm partikül boyutu, olabildiğince eşboyutlu, ortalamanın \pm % 10'una denk gelecek partikül boy dağılımı, 70-300 Å gözenek boyutu, 50-250 m²/g yüzey alanı, yüzeye tutturulan ligand türüne bağlı olarak, adsorbent normal faz (-OH, -NH₂) veya ters faz (C8, C18, fenil) hatta anyon (NH₄) ya da katyon (-COO-) değiştirici yapıda olabilir.

Kararlı akış hızı pompalarda aranan bir özelliktir. Modern pompalar 0.01-10 mL/dak. arasında akış hızı, % 1'den fazla sapmayan akış hızı kararlılığı (büyüklükçe ayırma kromatografisinde % 0.2'den az olmalıdır), 5000 psi'ya kadar çıkabilen maksimum basınç değeri gibi özelliklere sahiptir.

Tipik HPLC kolonları 2-30 cm aralığında uzunluğa sahip, mikron boyutlu partikül içeren (1-10 µm) ve iç çapı 2-10 mm arasında olan yüksek basınca (400 atm) dayanıklı çelik kolonlardır. Bu boyutlar örnek kapasitesi, sürekli faz tüketimi, hız ve ayırıcılık açısından yüksek performans sağlayan değerlerdir.

Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektör tipi UV absorpsiyon dedektörleridir. Bu dedektörler ile 190-600 nm aralığında analiz mümkün olmaktadır. Kullanılan diğer dedektör türleri içinde kırılma indisi RI, floresans FL, elektrokimyasal EC ve kütle spektrometresi MS dedektörleri bulunmaktadır. İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır: Yüksek duyarlılık, hızlı tepki, düşük sinyal gürültüsü, minimum pik yayılması, ayrılan bantların tekrar karışmasını engelleyen hücre yapısı, çalışma kolaylığı ve genişliği.

2.4.3.2 HPLC kullanım alanları

Günümüzde HPLC, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

- Bileşen Ayırma: HPLC’de bileşen ayırma işlemi, her maddenin belli bir sabit faz ve mobil faz bileşiminde farklı çıkış süresinin olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Yapılan ayırmanın derecesi çoğunlukla sabit faz ve mobil faz seçimine bağlıdır.

- Saflaştırma: Saflaştırma hedeflenen bir maddenin diğer maddelerden ya da atıklardan ayrılması işlemidir. Her maddenin belli kromatografik koşullar altında karakteristik bir piki bulunur. Kromatografik saflaştırma işleminde, istenilen madde kolon çıkışında toplanarak diğer fraksiyonlardan izole edilir.

- Tanımlama: Bir maddenin HPLC ile tanımlanması HPLC analizlerinin önemli bir parçasını oluşturur. HPLC’de madde tanımlaması, bilinmeyene ait olan pik alıkonma süresinin standarda ait alıkonma süresiyle karşılaştırılması ile yapılabilir.

- Derişim Tayini: HPLC’de tanımlı bir maddenin, bir sıvı çözeltilisinde derişimi tayin edilebilir. Bu işlem istenilen maddenin değişik konsantrasyonlarda HPLC’ye enjekte edilmesi işlemi içerir. Bilinen konsantrasyonlar bir seri pik verir. Bu piklerin altında kalan alanlar hesaplanarak derişime karşı grafiğe geçirilir ve kalibrasyon grafiği çizilir. Bilinmeyen derişime ait pik alanı saptanarak kalibrasyon eğrisi aracılığıyla bilinmeyen derişim bulunur (Ünsal, 2006).

2.4.4 Lipofilite (Lipid çözünürlüğü)

Maddenin yağda çözünme eğiliminin ölçüsü; lipid /su partiyon katsayısı, yani lipofilitesidir. Maddenin lipid/su partiyon katsayısı ne kadar büyükse; lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur. Küçük suda çözünür moleküller normal intraselüler su akışını sağlayan su porları (içi su dolu kanallar) aracılığı ile geçerler. Büyük suda çözünür moleküller membranın lipid kısmından yavaş bir şekilde geçerler. Genellikle fazla iyonize olan maddelerin yağda çözünürlüğü azalır. Bu nedenle membrandan zor geçerler (www.istanbul.edu.tr).

Lipofilite ölçümleri, ilacın biyolojik aktivitesini tayin etmek için onun fizikokimyasal özellikleri ve yapısını ilişkilendirmede yararlanılır. Yapılan çalışmalar iyonların dağılma katsayılarının (log Poct) 2'den daha düşük olması gerektiğini göstermektedir. Düşük dağılma katsayılı moleküller, sudan lipit membran içine yavaş yavaş dağılacaklar, eğer alıcı, membranın içinde ya da ötesindeyse zaman aralıklarında ona ulaşmada düşük ihtimale sahip olacaklardır. Tersine, yüksek lipofilite olan moleküller, lipit membranın ilk tabakasına çabucak dağılacaklar, fakat burada tutulacaklardır. log Poct'nin çok yüksek değerlerinden, ilaç absorpsiyonu ve protein bağlamadaki ters etkiler yüzünden kaçınılmalıdır. Deneysel olarak, ilaç moleküllerinin lipofilitesini tayin etmek için, kullanılan en yaygın sistem oktanol/su sistemidir. Biyolojik membranlar için oktanol kullanmak iyi bir modeldir. Ancak, oktanol hemen hemen su kadar iyi hidrojen bağları yapabildiği için, gerçeğinden daha yüksek lipofilite değerleri verir (Özçelik, 2006).

2.5 Yapı Analizinde Kullanılan Kütle Spektrofotometresi (MS)

MS özellikle çok çeşitli organik maddelerin su ve atıksu içerisinde analiz edilmesinde LC ve GC ile birlikte kullanılan bir yöntemdir. MS aslında bir cihazdır ve LC veya GC'ye verilen numunedeki molekülleri veya iyonları kütlelerine göre sınıflandırabilen bir cihazdır. Analizi yapılacak madde hızlı elektron akımları ile bombardıman edilerek buharlaştırılıp iyonize edilirler ve oluşturulan elektrik akımı yardımı ile iyonize hale gelen iyonlar bu elektrik alan yardımı ile gaz akımından çekilirler ve seçilen uygun bir detektör yardımı ile hem nitelik hem de nicelik olarak farklı ağırlıklardaki partiküller kaydedilir.

MS sisteminde kütle-uygulanan (m/z) elektrik yük önemlidir. Her bir organik molekülün parçalanması için belirli bir yük alma kapasitesi (m/z) vardır. Yoğunluğu bilinen bir maddenin sahip olduğu m/z oranı ile elde edilen ölçülen maddenin m/z değeri kıyaslanarak mutlak tanımlama yapılabilir (Avşar, 2006).

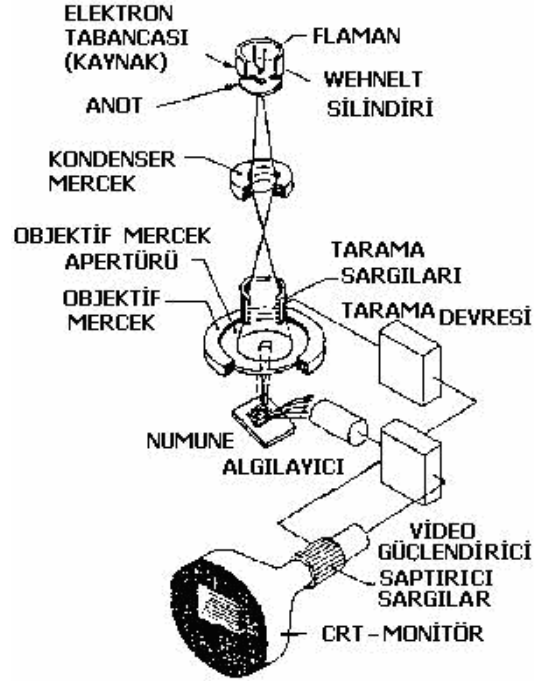
2.6 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesinde Kullanılan Yöntemler

2.6.1 Taramalı elektron mikroskobu (SEM, Scanning Electron Microscope)

Manyetik parçacıkların parçacık büyüklüklerinin belirlenmesinde kullanılan yöntem Taramalı Elektron Mikroskobudur (SEM). SEM, bir elektron tabancasından yüksek potansiyel altında fırlatılarak hızlandırılmış elektronların incelenecek malzemeye çarptırılarak yansması ve yansıyan elektronların tespit edilmesi prensibine göre çalışmaktadır (Kolat, 2007). Bu elektron demetinin numune yüzeyinde taratılması sırasında elektron ve numune atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkilerin uygun algılayıcılarda toplanması ve sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla elde edilir. Modern sistemlerde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilip bilgisayar monitörüne verilmektedir.

Taramalı Elektron Mikroskobu optik kolon, numune hücresi ve görüntüleme sistemi olmak üzere üç temel kısımdan oluşmaktadır. Optik kolon kısmında; elektron demetinin kaynağı olan elektron tabancası, elektronları numuneye doğru hızlandırmak için yüksek gerilimin uygulandığı anot plakası, ince elektron demeti elde etmek için kondenser mercekle, demeti numune üzerinde odaklamak için objektif merceği, bu merceğe bağlı çeşitli çapta apertürler ve elektron demetinin numune

yüzeyini taraması için tarama bobinleri yer almaktadır. Mercek sistemleri elektromanyetik alan ile elektron demetini inceltmekte veya numune üzerine odaklamaktadır. Tüm optik kolon ve numune 10^{-4} Pa gibi bir vakumda tutulmaktadır. Görüntü sisteminde, elektron demeti ile numune girişimi sonucunda oluşan çeşitli elektron ve ışınları toplayan dedektörler, bunların sinyal çoğaltıcıları ve numune yüzeyinde elektron demetini görüntü ekranıyla senkronize tarayan manyetik bobinler bulunmaktadır.



Şekil 2.4 SEM'in şematik yapısı

Yüksek enerjili demet elektronları numune atomlarının dış yörünge elektronları ile elastik olmayan girişimi sonucunda düşük enerjili Auger elektronları oluşur. Bu elektronlar numune yüzeyi hakkında bilgi taşır ve Auger Spektroskopisinin çalışma prensibini oluşturur. Yine yörünge elektronları ile olan girişimler sonucunda yörüngelerinden atılan veya enerjisi azalan demet elektronları numune yüzeyine doğru hareket ederek yüzeyde toplanırlar. Bu elektronlar ikincil elektron olarak tanımlanır. İkincil elektronlar numune odasında bulunan sintilatörde toplanarak ikincil elektron görüntüsü sinyaline çevrilir. İkincil elektronlar numune yüzeyinin 10 nm veya daha düşük derinlikten geldiği için numunenin yüksek çözünürlüğe sahip topografik görüntüsünün elde edilmesinde kullanılır (www.istanbul.edu.tr).

2.6.2 X-Işınlari kırınım ölçümleri (XRD, X-Ray Diffraction)

Kristal malzemelerdeki farklı kristal yapılar (fazlar) ve kristal yapının parametrelerinin tespiti için X-ışını kırınımı yöntemi kullanılmaktadır. Bu yöntem temelde Bragg yansımaya dayanmaktadır. Sistemde üretilip örnek üzerine gönderilen X-ışınları, örnekte kırınıma uğrayarak saçılır. Bu saçılan veya yansıyan ışınlar bir dedektör tarafından algılanarak bilgisayara aktarılır ve bir yazılım (software) yardımıyla yansıyan ışının şiddetinin 2θ değerine karşı grafiği oluşturulur (Kolat, 2007).

X-Ray kısa dalga boylu yüksek elektrik enerjili elektromagnetik radyasyondur. Daha uzun dalga boylu olanları (görünür ışık) özellikle

analiz çalışmalarında kullanılmaktadır. X-Ray absorpsiyonu atomik seviyelerde gerçekleşmektedir. X-Ray absorpsiyonu öncelikle düşük atomik ağırlıklı maddelerden oluşan örneklerdeki ağır elementlerin analizlerinin yapılması amacıyla kullanılmaktadır. Özellikle uranyumun belirlenmesi için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

X-Ray sistemleri özellikle metal analizlerinde oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Numune yüksek enerjiye sahip X-Ray ile bombardımana maruz bırakılır. Numunedeki belli elementler X-Ray i absorbe eder ve tekrar daha düşük enerji ile X-Ray i geri verir. X-Ray atomda bir boşluk oluşturarak bir elektronu dışarı çıkarır ve atom etrafında bir elektron halkası oluşturur ve diğer halkalardaki elektronlarla bu atomdaki boşluklar doldurularak atom tekrar eski kararlılığına kavuşur. Her seferinde bir elektron alınır ve atom daha az enerjili bir ortama doğru hareket eder ve ortaya çıkan radyasyon, ilk ve son enerji durumlarına göre belli bir dalga boyu ile yayılır. Yayılan radyasyonun enerjisi, açığa çıkan her elementin analiz edilmesini sağlamaktadır (Avşar, 2006).

2.6.3 VSM (Vibrating Sample Magnetometer)

VSM Foner S. tarafından geliştirilmiştir. Düşük sıcaklıkta, yüksek manyetik alan çalışmalarında basitliği, ölçüm kolaylığı, kabul edilebilir duyarlılığı nedeniyle çok başarılı olmuştur.

Elde edilen manyetik parçacık numunelerinin manyetik özellikleri Vibrating Sample Magnetometer (VSM) sistemi kullanılarak ölçülmüştür. Ölçümlerde kullanılan sistem 2-300 K sıcaklık aralığında ve ± 7 Tesla lık manyetik alan değişimi altında ölçüm yapabilme kapasitesindedir. Sistemin sıcaklık kontrolü kapalı çevrime sahip sıvı helyum ile sağlanmakta ve manyetik alan bipolar (çift kutuplu) güç kaynağı ile beslenen süperiletken selenoid tarafından üretilmektedir. Bir VSM sistemi temel olarak süperiletken selenoid titreşen numune ve toplayıcı bobinler ile sinyali analiz eden kısımdan oluşmaktadır. VSM sistemi, manyetik alan altında numunenin titreştirilmesi ve böylelikle numunenin manyetik özelliklerine bağlı olarak referans bobinlerine göre toplayıcı bobinlerde oluşan sinyalin analizi prensibine göre çalışmaktadır (Kolat, 2007).

VSM de incelenen örnek, uygulanan bir magnetik alanda sabit frekans ve genlikte algılama kanalının içinde titreştirilmektedir. Örneğin oluşturduğu değişken magnetik alan nedeni ile algılama kanalında indüklenen gerilim kilitlemeli yükselteç ile ölçülmektedir. Kilitlemeli yükseltecin faz ayarı, örneği titreştiren AC kaynaktan gelen frekans işaretine göre yapılarak sistemden gelen gürültü süzölmektedir. Ölçülen bu gerilim kalibrasyon sabiti ile çarpılarak magnetik moment birimi emu'ya çevirilir (Kervan, 2001).

2.7 Hücree Kùltürü Çalışmasında Kullanılan NdFeB Mıknatısları

Nadir toprak element mıknatısları; Neodim (Nd), Demir (Fe), Bor (B) tiplerinde ve Samarium (Sm), Kobalt (Co) sınıflarındadırlar. En genel tip neodimdemirbor (NdFeB) dur. Neodimium mıknatıslar Neodimium-demirbor elementlerinin alışımlama yöntemi ile üretilir. Üretilen alışımlar toz meterolojisi yöntemiyle presleme sinterleme ve ısıl işlemlere tabii tutularak manyetik karakter kazandırılmaktadır.

Neodimdemirbor mıknatısları en güçlü manyetik enerjiyi verir ve küçük boyutlarda yüksek mıknatıs değerlerine ulaşır. Enerji seviyeleri 199-350 KJ/m³tür. Neodimium mıknatıslar yüksek manyetik şiddet, yüksek kuvarsivite gibi avantajların yanında kolay kırılması ısı karşısında manyetik özelliğini kaybetmesi gibi dezavantajlara sahiptir.



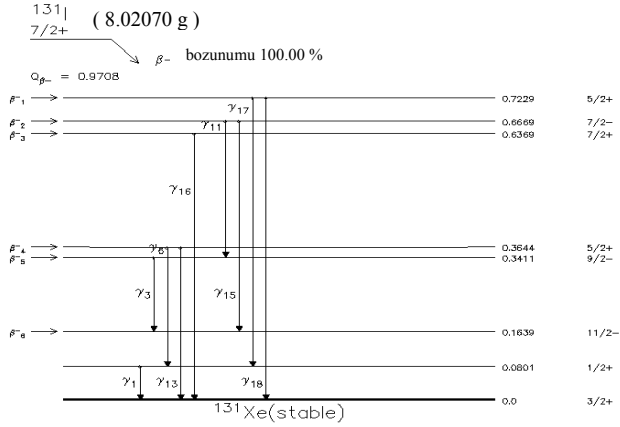
Şekil 2.5 Hücree kùltürü çalışmasında kullanılan NdFeB mıknatısları.

Son yıllarda birleşimi fazla pahalı olmayan neodmium (Nd) ve demir (Fe)'e dayanan ikinci jenerasyon nadir toprak elementi mıknatısın keşfedilmesi ile malzeme maliyetinin düşürülmesinde önemli bir adım atıldı. Nd, Sm'den daha bol bulunan bir elementtir. Günümüzde artan miktarda üretilen NdFeB mıknatıslar SmCo mıknatıslardan sadece oda sıcaklığı şartında daha iyi manyetik özelliklere sahiptir. En önemli özelliği yüksek kalıcı manyetik akı yoğunluğu ve düşük sıcaklık sabitidir. Bu özellikler yüksek hava aralığı akı yoğunluğu ve yüksek çalışma sıcaklığı sağlar. Bu alaşımların Curie sıcaklığı oldukça yüksektir (700-800°C). Curie sıcaklığı sürekli mıknatıs malzemesinin manyetik özelliklerini kaybetmeye başladığı en yüksek sıcaklık değeri olarak tanımlanmaktadır ve sürekli mıknatısın işletme koşullarının belirlenmesi bakımından önemlidir. Bunun yanı sıra NdFeB mıknatıs korozyona karşı da duyarlıdır. Özellikle NdFeB mıknatıslar, 1.2 T'yı geçen yüksek remanans indüksiyonları, 900 kA/m civarındaki zorlayıcı alan şiddetleri ve 120°C'lik maksimum çalışma sıcaklıkları nedeni ile separatorler, manyetik filtreler, tıbbi cihazlar, elektrik motorları, otomotiv, elektronik sektörü gibi bir çok alanda kullanılmaktadır (www.aksamagnet.com.tr).

2.8 Radyoaktif İyot İzotopları

İyot; periyodik tabloda halojenler olarak bilinen VIIA gurubunun bir üyesidir. Doğal iyodun atom numarası 53, nötron sayısı 74 ve kütle numarası 127 dir. Yapay iyot izotopları nötron sayısı 74 den az veya fazla olacak şekilde yapılır. İyodun 115 den 141 kütle numarasına kadar

radioizotopları vardır. Nükleer tıp çalışmaları için iyodun en uygun radioizotopları I-123, I-125 ve I-131 dir (Yurt, 1998; Kowlsky and Perry, 1987).



Şekil 2.6 I-131'in bozunum şeması

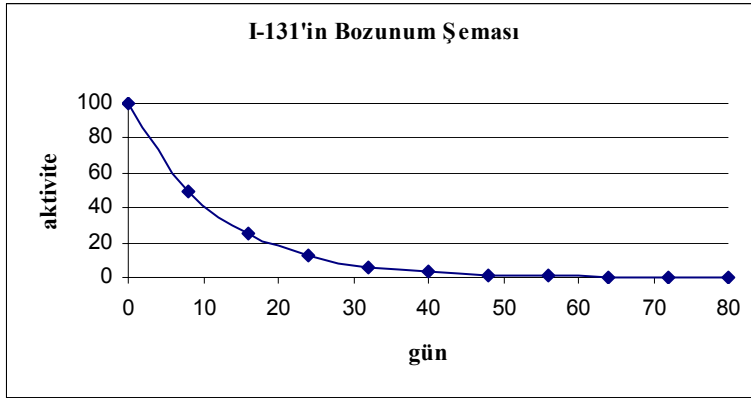
(MIRD; <http://www.nds.iaea.or.at>)

İyot-131'in nötron sayısı I-127'den 4 nötron fazladır. I-131 izotopu nötron bolluğu sebebiyle negatif beta bozunumu yapar ve kararlı Xe-131 izotopu oluşur. I-131 ve Xe-131' in temel enerji düzeyi arasındaki değişim enerjisi 971 keV dir. I-131'in bozunumunda birkaç β geçişi mevcuttur. Şekil 2.6.'da gösterildiği gibi, maksimum enerjisi 607 keV olan β ışını salınır ve bu enerji β ve ν^- arasında paylaşılır ve 364 keV γ ışını olarak uyarılmış Xe-131 çekirdeğinin temel düzeye geçişinde salınır. γ ışınlarının enerjisi yüksek olması sebebiyle görüntülemeye yüksek enerjili kolimatörler kullanılır. İyi bir bolluğa (% 82) sahip olan 364 keV'lik γ - ışını dokuya etkili bir şekilde geçer fakat kalınlığı yarım

inch olan NaI kristali ile (% 23) yetersiz bir şekilde durdurulmaktadır. I-131 β ışınması nedeniyle terapi için uygun bir radyonüklid olmakla birlikte görüntüleme çalışmalarında da kullanılabilir. I-131'in yarı ömrü 8 gündür. Bu süre kullanılmak istenen radyofarmasötüğü ticari olarak hazırlamak için uygun bir raf ömrüdür. I-131 β salınımından doğan yüksek radyasyon dozundan dolayı görüntüleme için kullanılmaz. Bunun yanında tiroid kanserlerinin tedavisinde yüksek dozda kullanılmaktadır. I-131'in avantajları şu şekilde sıralanabilir; ekonomiktir, 364 keV'lik γ radyasyonu ideal bir görüntüleme radyonüklidine göre yüksek olmakla birlikte organ görüntüleme için kullanılabilir ve γ ışınları pahalı olmayan sintilasyon dedektörleri ile dedekte edilebilir (Yurt, 1998; Kowlsky and Perry, 1987).

U-235'in fisyonundan aşağıdaki reaksiyona göre reaktörde üretilir;
 $\text{Te-130} (n,\gamma) \text{Te-131} \rightarrow \text{I-131}$ (Kahn and Kleinberg, 1977)

İyot-131, 8 günlük yarılanma süresi ile bozunur. Bugünkü aktivitesi 100 MBq olan bir şişe iyot-131'in aktivitesi 8 gün sonra 50 MBq 16 gün sonra 25 MBq olacak ve bu böylece devam edecektir. I-131'in aktivitesinin zamanla azalmasını gösteren grafik Şekil 2.7 de verilmiştir.



Şekil 2.7 I-131'in aktivitesinin zamanla azalması grafiği

I-131'in etkin yarılanma süresi 3 gündür. Etkin yarılanma süresi, vücuttaki aktivitenin yarılanması için gereken süre olarak tanımlanır.

$$1/t(\text{etkin}) = 1/t(\text{fiziksel}) + 1/t(\text{biyolojik})$$

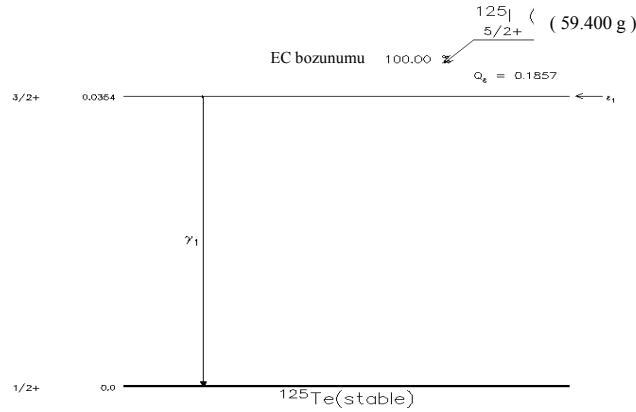
$$1/t(\text{etkin}) = 1/8 + 1/5$$

$$t(\text{etkin}) \approx 3\text{gün}$$

Normal bir insan için iyot-131 miktarı her üç günde bir yarıya iner. Etkin yarılanma süresi, iyot tutulmasına sebep olacak belirli bir hastalığı olan hastalarda 3 günden daha uzun olabilir. Fakat asla 8 günden daha uzun olamaz (www.taek.gov.tr).

İyot-125 çekirdeği 53 proton ve 72 nötrona sahiptir. Nötron sayısı I-127'den 2 nötron daha azdır. I-125 nötron eksikliği nedeniyle elektron yakalama (EC) bozunumuna uğrar ve yarı kararlı Te-125m'e dönüşür. Bu bozunumda geçiş enerjisi 178 keV dir. 178 keV enerjiye sahip olan

nötrino, uyarılmış Te-125'in geçişinde 143 keV'lik enerji taşır ve Te-125'in temel düzeyine geçişinde 35 keV'lik γ ışını salınır.

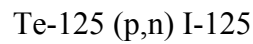
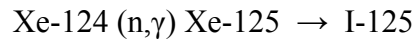


Şekil 2.8 I-125'in bozunum şeması

(MIRD; <http://www.nds.iaea.or.at>)

I-125'in yarı ömrü uzun olması ve düşük gama ışınması nedeniyle radyoimmunoassay gibi in vitro çalışmalar için uygun bir radyonüklittir. Bu sebeple I-125, I-131'e göre radyoişaretleme kullanımı için daha uygundur. Ayrıca β radyasyonunun olmaması nedeniyle de radyolitik dekompozisyonu azdır (Yurt, 1998).

Reaktörde üretilir ve üretim metodları aşağıdaki reaksiyonlarda olduğu gibidir;



2.9 İyododeoksiuridin (IUdR)

IUdR olağan üstü derecede timidin (TdR) gibi davranan bir timidin eşdeğeridir. IUdR ve TdR hücre içinde timidin kinase tarafından sırayla IUdR monofosfata (IdUMP) ve TdR monofosfata (dTMP) fosfatlanır. dTMP, DNA içinde oldukça yavaş bir reaksiyonda daha fazla fosfatlanır. Diğer taraftan IdUMP ya fosforilizasyonun benzer bir kaderini ve DNA temasını sürdürebilir yada timidin sentezi (TS) tarafından katalizlenmiş TS reaksiyonu vasıtasıyla daha fazla dTMP'ye dönüştürülüyor olan dUMP'ye dehalojene olur. IUdR in vitro olarak son derece kararlı olmasına rağmen in vivo olarak hayli kararsızdır. IUdR'nin dolaşımdaki yarı ömrü insanlarda 5 dakika farelerde 7 dakikadır. Özellikle IUdR'nin in vivo olarak kısa yarı ömrü, karaciğerde hızlı halojenizasyonu ve hücre içi tutulumun hücre çevriminin yalnız S fazında olması bu bileşiğin kullanımındaki faktörleri sınırlar. Araştırmacılar, tümör içi veya tümöre yakın bileşiklerin idaresi ile hızlı dehalojenizasyon düzenlenmesine, sürekli veya aralıklarla enjeksiyon uygulaması ilede özellikle hücre çevriminin ayarlanmasına çalışmaktadırlar. Buna rağmen tümör hücreleri tarafından IUdR'nin yüksek tutulumu gözlenmiştir (Semnani, 2005).

İşlevsel olarak büyük türdeki tümörlerin teşhis ve tedavisi için hücre çoğalmasının görüntülenmesi önemli bir etkiye sahip olan yaklaşımdır. Uygun radyoaktif izleyici DNA içine alınmak zorundadır. Bu yüzden ölçülmüş radyoaktivite, hücre çoğalması ve ilişkili tümörlerin değişikliklerini DNA içinde sinyal vermelidir. Bu yaklaşımları onaylamak için farklı beyin tümör durumları biline 30 hasta üzerinde

radioaktif izleyici olarak 5-[¹²⁴I]Iodo-2-deoxyuridin kullanılarak PET (positron emission tomography) ile tespit edilmiştir (Guenther, 1998).

2.10 Glikozit ve Glukuronid Türevi Bileşiklerin Kanser Araştırmalarındaki Rolü

Beta-glukuronidaz enziminin pek çok tümör tipinde normal dokuya göre yüksek düzeyde bulunması, ayrıca bu enzimin tümör dokusu gibi daha asidik ortamlarda daha aktif olması ve nispeten kolay ölçülebilmesi bazı sitotoksik moleküllerin glukuronid türevlerinin iyi birer antikanser ajan olabileceği fikrinin doğmasına yol açmıştır (Bicker, 1974). Beta glukuronidaz enzimi tümör asitlik derecesi olan pH 5.2 de optimum şartlara sahipken normal şartlara sahipken normal doku pHsi olan 7.4 de daha az aktiftir. Tümörde yüksek enzim düzeylerinin kombinasyonu ve enzim aktivitesinin arttırılması için sağlanan uygun şartlar tümör hacmi içinde glukuronidli toksinleri serbest bırakabilir. Bu öngörülere göre;

- 1) Suda çözünebilen glukuronid bileşikleri suda çözünmeyen aglikonlarını tümör içinde biriktirerek tümör hücreleri üzerinde seçimli bir toksik etki yaratabilir.
- 2) Glukoz ile birlikte tümörün asitliliğinin arttırılması normal hücrelere zarar vermeden tümör üzerinde daha fazla bir toksik etki oluşturulmasını sağlar.
- 3) Çevredeki normal doku glukozlu veya glukozsuz, glukuronid bileşiğini dekonjuge etmez, dolayısı ile bir toksik etki ortaya çıkmaz.

Bu terapinin başarılı olabilmesi için ideal bir glukuronid bileşiği:

- Yüksek konsantrasyonlarda bile toksik olmamalı, fakat aglikonu düşük konsantrasyonlarda bile yüksek biyolojik aktivite göstermelidir.
- Nötral pH'da kararlı fakat asidik ortamda aktif olmalıdır.
- Tümör beta glukuronidazı için yüksek etkinlik göstermelidir.
- Aglikon beta glukuronidaz üzerinde inhibitor etki göstermemelidir.
- Glukuronid bileşiği kolay temin edilebilmeli veya kolayca sentez edilebilmelidir.

2.11 Urasil ve UdR'nin Glukuronidasyonu

2.11.1 UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi

UDP-Glukuronil Transferaz enzimi çoğunlukla karaciğer ve böbrekler de ayrıca da ince bağırsaklar, akciğer, deri, böbrek üstü bezi ve dalak gibi pek çok organda çeşitli oranlarda bulunur. Enzim genellikle hepatik endoplazmik retikulum bölgesinde lokalize olur ve ideal olarak glukuronidasyon reaksiyonları burada gerçekleşir. Enzim bir prostetik grup içermez ve iyi saflandırılmış enzimin monomerik moleküler ağırlığı 50000-60000 D civarındadır (Zihnioğlu, 1992; Biber, 2004).

2.11.2 UDPGT enziminin özellikleri

Glukuronidasyon reaksiyonları bir enzim ailesi olan UDP-glukuronil transferazlarca katalizlenir. Bu enzimler ilaçların, endüstriyel kimyasalların, karsinojenlerin, besin katkı maddelerinin, peptisitlerin ve insan yapımı substratların konjugasyonlarını sağlayarak organizmayı birçok toksik maddenin yarattığı zararlı etkilerden koruyabilme özellikleri vardır. Karaciğer mikrozomlarından izole edilmiş enzimler ve onların kararlılıklarını sağlamadaki zorlukların üstesinden gelmek için, birçok araştırmacı taze karaciğer kullanarak deneysel çalışmalar yapmaktadır. Karaciğer mikrozomları homojenize edilmiş taze ciğerden santrifüjlenerek toplanmış mikrozomlardır. Kararlı olma gibi bir avantaja sahiptirler (Zihnioğlu, 1992; Biber, 2004).

2.11.3 β -Glukuronidaz enzimi

Hidroliz yapan enzimler sınıfına giren enzimlerden biri olan β -glukuronidaz hidroliz reaksiyonunu kataliz eden enzim olup substratın parçalanacak olan bağına su ilave ederek hidrolizini sağlar. β -Glukuronid bağlarını hidrolize eden enzimlerden biri de β -glukuronidaz enzimidir. Doğal ve sentetik glukuronid'lerdeki glukozid bağlarını hidroliz ile parçalayan bu enzim dalak, karaciğer ve endokrin bezlerinde bulunur.

Son yıllarda bazı kanserli dokularda bu enzimin daha yüksek oranda bulunduğu rapor edilmiştir. Meme ve uterus kanserleri de bu tür kanserlerdendir. Kemoterapide β -glukuronidaz enziminin güçlü bir

potansiyeye sahip olduğu vurgulayan raporlar mevcuttur (Wanget al., 1992).

2.11.4 Glukuronidasyon reaksiyonu

En önemli detoksifikasyon reaksiyonlarından biri glukuronid konjugasyonudur. Pek çok ilaç bu yolla metabolize olur. Çizelge 2.1 de glukuronidleşebilen fonksiyonel gruplar gösterilmiştir. Bu şekilde potansiyel olarak pek çok ilaç molekülü glukuronik asit ile detoksifiye olarak glukuronidleşebilir. Glukuronidasyon reaksiyonları hücre içi UDPGAdan geniş bir aralıktaki hücreiçi ve hücredışı aglikon substratlara endojen glukuronik asit transferi ile –OR, –SR, –NR₁R₂ or –CR bağlarının oluşumu reaksiyonlarıdır (Avcıbaşı, 2004).

Çizelge 2.1 Glukuronik asit ile konjugasyona giren fonksiyonel gruplar

fonksiyonel grup	Tip	Örnek
Hidroksil	Primer, segonder ve tersiyer alkolller, fenoller, hidroksilamin	Indomethacin Paracetamol 4-Hydroxy- coumarin Aspirin Chloromphen Morfin
Karboksil	Aromatik, arylalkyl	Nicotinik asit Aminosalisilik asit Clofibrate
Amino	Aromatic amines Sulfonamides aliphatic Tetary amines	Meprobamate Dapsone Sulfafurazole
Sulfhydryl	Thiols, dithioic asit	2-Mercapto- benzothiazole

UDPGA sentezinin en önemli basamağı ATP ve glukozdan oluşan NAD^+ ya bağımlı UDP-glukozun asyonudur. (Gibson and Skett, 1986). UDP-glucuronyltransferases glukuronid konjugasyonu oluşturarak uygun ilaç akseptor molekülüne glukuronik asit taransferini katalizler. UDPGT nin ROH ile glukuronidasyonu basitçe aşağıdaki gibi gösterilir.



Reaksiyon tersinirdir. Bu nedenle aglikona transglukuronidasyon reaksiyonu da mümkündür.

Glukuronid reaksiyonunun oluşum mekanizması Şekil 2.9. da gösterilmiştir. Bu reaksiyonun erken basamakları UDP-glukozun ara basamakları üzerinden glikojen sentezini kapsar. UDP-glukuronik asitteki glukuronik asidin α -konfigurasyondaki C1 atomu ve alıcı ilaç substrata transfer sırasında dönerek beta konfigürasyonuna dönüşür (Gibson and Skett, 1986).

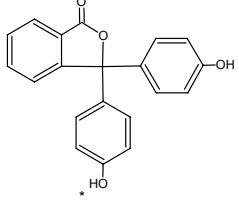
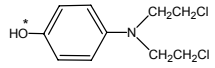
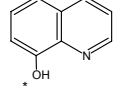
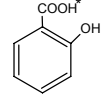
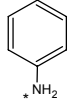
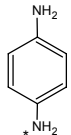
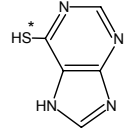
Glukuronik asidin alkol, fenol, hidroksilamin, karboksilik asit, amin, sulfonamid ve tiyol gibi, farklı reaktif gruplara takılması –O, -N, -S, ve C-glukuronidler oluşturarak takılması Çizelge 2.2 de gösterilmiştir.

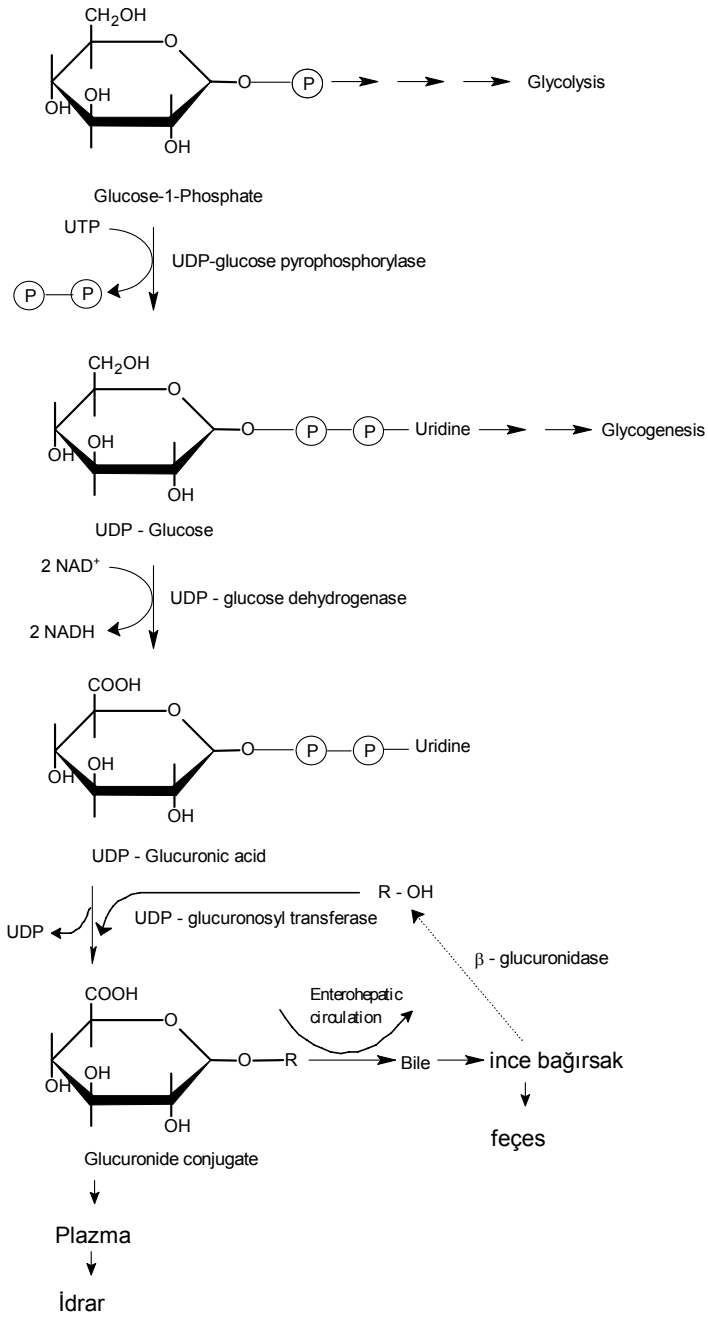
O-Glukuronidler: Fenol, alkol, karboksilik asit,

N-Glukuronidler: N-Glukuronidler aminlerden (aromatic aminler), amitler ve sulfonamidlerden oluşur. Tersiyer aminlerin de quaterner nitrojen konjugatları oluşturduğu ileri sürülmüştür.

S-Glukuronidler: Tiyol grupları UDPGA ile UDP-glucuronyltransferase varlığında S-Glukuronidleri vererek reaksiyona girebilir.

Çizelge 2.2 -O, -N, -S, ve glukuronidleri

Çeşit	Örnek	Yapı
O-Glukuronide Hydroxyl Phenols	Phenolphthalein	
	p-Hydroxy aniline- mustard	
	8-hydroxy-quinolyl	
Carboxyl	Salicylic acid	
N-Glukuronide Amino	Aniline	
	1,4-benzenediamine	
S-Glukuronide	7H-6-purinethiol	



Şekil 2.9 Glukuronid oluşumun enzimatik basamakları.

3. MATERYAL VE METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

- Demir (III) klorür anhidrid FeCl_3 (Fluka)
- Demir klorür tetrahidrat $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Fluka)
- İyot-131 (I-131) (Monrol, Türkiye)
- İyot-125 (I-125) (Institute of isotopes Co., Ltd., Budapest)
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)
- Aseton (CH_3COCH_3) (Merck)
- Metanol (CH_3OH) (Merck)
- Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- N-bütanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) (Merck)
- Asetik asit (CH_3COOH) (Merck)
- İzopropil alkol ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$) (Merck)
- Sodyum hidroksit (NaOH) (Merck)
- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Merck)
- Sodyum sülfid (Na_2S) (Fluka)
- Hidroklorik asit (HCl) (Merck)
- Amonyak (NH_3) (Merck)
- Sodyum klorür (NaCl) (Merck)
- Dimetilsülfoksit ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$) (Merck)
- Kalsiyum klorür (CaCl_2) (Merck)

- DL-Dithiothreitol (DTT) ($C_4H_{10}O_2S_2$) (Fluka)
- Urasil(MP Biomedicals, Fransa)
- 2'-Deoksiuridin ($C_9H_{12}N_2O_5$) (Fluka)
- Tetra etil orta silikat (TEOS) ($C_8H_{20}O_4Si$) (Merck)
- SG-Si 900 [N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoksisilan] ($C_8H_{22}N_2O_3Si$) (Merck)
- Glutaraldehit (Merck)
- Borat tamponu (pH=9.18 25⁰C) (Merck)
- MES (Sigma)
- 1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl-glycoluril ($C_{16}H_{10}C_{14}N_4O_2$) (Sigma)
- Caco-2 kolon (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD)
- HuTu-80 ince barsak (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD),
- Detroit 562 farenks (adenokarsinoma) epiteli (American Type Culture Collection, Rockville, MD, ABD),
- İnsan Primer intestinal epiteli (Applied Cell Biology Research Institute, Kirkland, WA, ABD)
- Min. Essential Medium (Mem Eagle) (Bio.Ind.)
- L-Glutamine (Bio.Ind.)
- Sodyum bicarbonate (Bio.Ind.)
- Essential amino acid (Bio.Ind.)
- Sodyum pyruvate (Bio.Ind.)
- Fetal bovine serum (Bio.Ind.)

- Penisilin/ streptomisin (Bio.Ind.)
- Tripan mavisi (Bio.Ind.)
- PBS (Bio.Ind.)
- Tripsin EDTA (Bio.Ind.)
- Sucros (Merck)
- Hepes (Merck)
- Tris Buffer (Fluka)
- Şişe üstü 500 ml, 70 mm Diatemer Selüloz asetat filtre (Corning)
- 1.17-1.21 Tesla NdFeB mıknatısları (DMEGC Metallic Magnetic Material)
- Dipotasyum hidrojenfosfat (K_2HPO_4) (Merck)
- Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck)
- Anti koagulan sitrat dekstroz çözeltisi (ACD) (Eczacıbaşı / Baxter)
- Dextran T-40 (Eczacıbaşı / Baxter)
- pH = 7 Tamponu (Merck)
- pH = 10 Tamponu (Merck)
- Metil Etil Keton (MEK) (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi)
- Triton X100 (Sigma)
- Tween 80 (Sigma)
- ITLC-SG Selüloz kaplı plastik şeritler (Merck-5555)
- ITLC-SG Silika kaplı plastik şeritler (Merck-5554)
- Elektroforez Kağıdı (Whatman 1)

3.1.2 Kullanılan cihazlar

- RAD-501 Cd(Te) tek kanallı gammasayım sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- HPLC Shimadzu (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- RadyoTLC (Bioscan 2000)
- Kağıt Elektroforezi (Gelman) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı),
- TLC küvetleri (Sigma) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı)
- Su banyosu Nüve BM 302 (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).
- Millipor (Milli-Q Gradient A-10) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Metrohm 686 Titroprocessor (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü)
- Ultra Turrax T8 Kika Werke marka homojenizatör (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)
- Beckman Coulter Optima L-100XP ultrasantrifüj (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)
- Thermolabsystems Multiskan Spectrum (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)
- SEM (Scanning electron microscopy) (Phillips XL-30 S FEG) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)

- XRD (Phillips X'Pert Pro) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü)
- VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü)
- Gaz Kromatografi / Kütle Spektrometre (GS - MS / MS), [GC – Varian Star 3400 CX, MS – Varian Saturn 2000 (GC – MS / MS (Ion Trap))] (İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü),
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (E. Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim. Dalı.)

3.2. Urasil Glukuronid'in Enzimatik Sentezi

3.2.1. UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi içeren mikrozom preparatlarının elde edilmesi

Urasilin glukuronidasyonu için gerekli olan UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi olarak HuTu-80 ince bağırsak kanseri hücrelerinden ayrılan mikrozom preparatı kullanılmıştır.

3.2.2 Hücre dizinleri

Çalışmada kullanılan Caco-2 kolon (adenokarsinoma) epiteli, HuTu-80 ince barsak (adenokarsinoma) epiteli, Detroit 562 farenks (adenokarsinoma) epiteli American Type Culture Collection (Rockville, MD, ABD) den, İnsan Primer intestinal epiteli Applied Cell Biology

Research Institute (Kirkland, WA, ABD) den temin edilmiştir. Caco-2 hücreleri Minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pyruvat ve %20 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda; HuTu-80 hücreleri, minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pyruvat ve %10 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda; Detroit hücreleri Minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum pyruvat, %0.1 laktalbümin ve %10 fetal bovine serum (FBS) den oluşan medyumda üretildi. İnsan primer intestinal epitel firmanın hücreleri için önerdiği Complete Serum-Containing Medium Kits ile üretildi.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0.25 (W/V) tripsin-EDTA solusyonu aracılığı ile flasktan ayrıldılar ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren medyumları içine koyularak -80°C de dondurulup, -190°C sıvı azot içinde saklandılar.

3.2.3 Çoğaltılan HuTu-80 hücrelerinden UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enziminin elde edilmesi

Hazırlanan 10 flaskın içindeki besi ortamı döküldü. Flasklar 5'er mL PBS ile üç kez yıkandı. Daha sonra her flaska 3 mL tripsin ilave edilerek hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. 1dakika inkübatörde bekletildikten sonra mikroskopta hücreler kontrol edildi. Hücrelerin

yüzeyden kalktığı görülünce 15'er mL besi ilavesi yapıldı. Her bir flasttaki hücreler ayrı ayrı flakonlara alındı ve 2010 rpm 4 °C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası besi dökülüp 1'er mL sucros/hepes ilave edilerek tüplerin diplerindeki hücreler karıştırılarak iki tüpte toplandı. Bu iki tüp içindeki hücreler 2010 rpm 4 °C de 10 dakika santrifüj edilerek yıkandı.

İki tüp içerisindeki hücreler santrifüj edildikten sonra üzerindeki sucros/hepes çözeltisi atıldı. Yeniden 2'şer ml sucros/hepes ilave edilip santrifüj edilerek yıkandı. Santrifüj sonrası sucros/hepes çözeltisi döküldü. Elde kalan hücrelerin üzerine 1'er mL sucros/hepes tamponundan ilave edildi. Konulan miktar hücrelerin tartımının en az dört katı kadar olmalıdır. Bu çözelti dört ependorf tüpüne paylaştırıldı ve Ultra Turrax T8 Kika Werke marka homojenizatörle buz banyosunda 4 dakika homojenize edildi. Elde edilen homojenat 10500 rpm 4 °C de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası çökelek atıldı. Süpernatant iki tüpe paylaştırılarak hassas terazide her iki tüpteki süpernatant miktarı birbirine eşit olacak şekilde paylaştırıldı. Bu iki süpernatant 28000 rpm, 4 °C de 1 saat Beckman Coulter Optima L-100XP ultrasantrifüj ile santrifüj edildi. Santrifüj sonunda sıvı kısım (sitozil) ayrılarak saklanmak üzere ependorf tüpüne konuldu. Bizim için gerekli olan mikrozom çökeleği olan kısma çökeleğin 2 katı kadar (0.2 M potasyum fosfat, 2 mM merkaptetanol, 0.4% Triton X 100 pH=7) tamponundan ilave edildi. Bir süre pipetle çekilip bırakılarak buz üzerinde karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika buz dolabında karıştırıldı. Karıştırmanın ardından 28000 rpm 4 °C de 1 saat Beckman Coulter Optima L-100XP ultrasantrifüj ile ikinci kez

santrifüj edildi. Santrifüj sonunda süpernatant ve çökelek ayrıldı. Mikrozomal örnekleri içeren süpernatant daki protein miktarı Thermolabsystems Multiskan Spectrum cihazı kullanılarak Bicinchoninic asit yöntemi ile 260 nm de bakıldı. Protein değeri 153.11 mg/mL olarak tespit edildi.

3.2.4 Urasil glukuronid'in HuTu-80 hücrelerinden ayrılan UDP-glukuronidaz enzimi kullanılarak enzimatik sentezi

Protein değeri saptanan mikrozomal enzimden 15 mg/0.1 mL protein, 6 mM CaCl₂, 10 mM UDPGA ve 1 mM DTT içeren 50 mM Tris Buffer (pH = 8) tamponunun 5 mL'si ile karıştırılıp 10 dakika 37 °C'deki su banyosunda karıştırıldı. Daha sonra 10 mg/mL DMSO da hazırlanan urasil ilave edildi ve reaksiyon aynı sıcaklıkta 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında çözeltiye 300 µL asetonitril ilave edilip 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.

Sentezi yapılan bileşik Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsünde HPLC (Schimadzu LC10 ATVP) cihazında analiz edildi.

3.3 Deneylerin Tekrarlanabilirliği ve Yapısal Analiz Çalışmaları

Enzimatik sentezde deneylerin tekrarlanabilirliğini göstermek için enzimatik sentez ilk sentezden 6 ay ve 1 yıl sonra olmak üzere 2 kez daha önce açıklanan koşullarda tekrarlanmış, Schimadzu HPLC cihazında

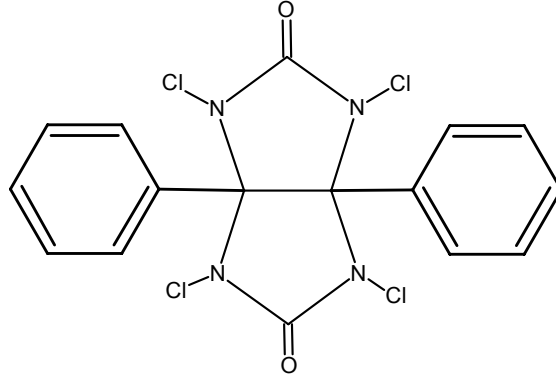
aynı koşullarda saflandırılmış ve ayrılan Pik 1 (urasil-o-glukuronid) ve Pik 2 (urasil-n-glukuronid)'nin yapısal analizleri tekrarlanmıştır.

3.4 Urasil, UdR (Deoksiuridine) ve U-Glu (Urasil Glukuronid)'in ¹³¹I ve ¹²⁵I ile İşaretleme alışmaları

Urasil'in, UdR'nin ve U-glu'nun ¹³¹I ve ¹²⁵I ile işaretleme çalışmaları iodojen yöntemine göre yapıldı.

3.4.1 İodojen yöntemi

İodojen'in (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenyl-glycoluril) kendisi suda çözünmez ancak sulu zltelerde heterojen olarak iyodun yükseltgenmesini sağlayarak hızlı iyodinasyonu sağlar. Bu nedenle bu yöntemde yan reaksiyonlar ihmal edilebilir düzeydedir. İodojen kloroformda veya diklorometanda çözünmesi ve kloroformun uçurulmasıyla iyodinasyonun yapıldığı kabın duvarlarında tabakalaşmayı sağlar ve reaksiyon katı fazda iodojen'in bulunduğu kapta reaksiyon zltisi ayrılarak sonlandırılır. Önceden hazırlanmış tüplerin 0-5 C'de altı ay muhafaza edilebileceği rapor edilmiş olmakla birlikte kendi koşullarımızda 3 aydan uzun sürelerde verimin düştüğü gözlendi.



Şekil 3.1 İdojen'in moleküler yapısı

3.4.1.1 İdojen film kaplı tüplerin hazırlanması

Belli miktar iodojen (100 µg, 500 µg veya 1 mg) cam tüp içinde 1 mL CH₂Cl₂'de çözüldü. Oda sıcaklığında CH₂Cl₂'nin uçarak iodojenin cam tüpün çeperine ince bir film şeklinde kaplanması sağlandı.

3.4.2 Urasil'in ¹³¹I/¹²⁵I ile işaretlenmesi

Urasil'in (MP Biomedicals, Fransa) 10 mg/mL çözeltisi dimetilsülfo oksit (DMSO) içerisinde hazırlandı. Bu çözelti stok olarak buzdolabında +4 °C de saklandı.

50 µL urasil'in stok çözeltisi ve 100 µL (74-130 Mbq/mL) ¹³¹I/¹²⁵I önceden hazırlanan iodojen tüpü içerisine konuldu. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 15-20 dakika beklendi. Daha sonra 100 µL 1 mM

Na₂SO₃ çözeltisi ilave edildi. İşaretlenme verimi TLRC ve kağıt elektroforezi yöntemleri ile yapıldı.

3.4.3. 2'-Deoksiuridin (UdR)'in ¹³¹I/¹²⁵I ile işaretlenmesi

2'-Deoksiuridin'in (Fluka) 10 mg/mL Millipor (Milli-Q Gradient A-10) cihazından elde edilmiş bidistile sudaki çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti stok olarak buzdolabında +4 °C de saklandı.

50 µL 2'-Deoksiuridin'in stok çözeltisi ve 100 µL (74-130 MBq/mL) ¹³¹I/¹²⁵I önceden hazırlanan iodojen tüpü içerisine konuldu. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 15-20 dakika beklendi. Daha sonra 100 µL 1 mM Na₂SO₃ çözeltisi ilave edildi. İşaretlenme verimleri TLRC ve kağıt elektroforezi yöntemleri ile yapıldı.

3.4.4 Urasil glukuronid'in ¹³¹I/¹²⁵I ile işaretlenmesi

Glukuronidasyon reaksiyonu sonucu elde edilen Urasil glukuronid (U- Glu) çözeltisinden 50 µL, 100 µL (~74-130 MBq/mL) ¹³¹I/¹²⁵I ile beraber önceden hazırlanan iodojen tüpü içerisine konuldu. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 15-20 dakika beklendi. Daha sonra 100 µL 1 mM Na₂SO₃ çözeltisi ilave edildi. İşaretleme verimi TLRC ve elektroforez yöntemi ile yapıldı.

3.5 Analiz ve Kalite Kontrol İşlemlerinde Kullanılan Kromatografik Yöntemler

3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi

TLRC için 1.5 x 10 cm'lik parçalara ayrılmış silika kaplı plastik şeritler (Merck 5554) kullanıldı. Şeritlerin tabanından 0.5 cm yukarısına işaretli çözeltiler kapiler yardımıyla damlatıldı. Damlatılan örnekler şerit üzerinde kuruduktan sonra ağzı kapalı olan TLC küvetlerine (Sigma) uygulama noktası değmeyecek şekilde konuldu. Çözgen, şerit üzerinde tepe noktasının yaklaşık 1-2 cm aşağısına kadar yürüdüktan sonra tank içinden çıkarılıp oda sıcaklığında kurutuldu. Kontaminasyonu önlemek için şeritler kağıt bantla kaplandı. I-131 ile yapılan çalışmalarda bu şeritler 5 mm parçalar halinde kesilerek numaralandırıldı. Kesilen 5 mm'lik parçaların aktivitesi Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayıldı. Radyoaktif maddenin taşındığı mesafe çözücünün ilerlediği mesafeye bölünerek R_f değerleri tespit edildi. Saniyedeki sayıma karşı R_f değerleri grafiğe geçirilerek TLRC kromatogramları elde edildi ve işaretleme verimleri pik alanının sayımı toplam sayıma bölünerek hesaplandı.

I-125 ile yapılan çalışmalarda ise radyokromatogram tarayıcı cihazı (Bioscan 2000) kullanıldı. Radyokromatogram tarayıcı cihazının ise doz kalibratörüne benzer olarak başlık kısmı iyon odası şeklinde tasarlanmıştır. İyon odasının orta kısmında bir anot ve bunu çevreleyen bir katot bulunmaktadır. Oda içerisi % 90 argon ve % 10 metan

karışımından oluşan P10 gazı ile doludur. Radyoaktif çekirdekten yayınlanan beta veya gama ışınlarının etkisiyle P10 gazı iyonlaşır ve anot ile katot arasında voltaj farkı oluşturur. Oluşan bu fark sayaca bağlı olan elektronik bir sistemle sayılır ve bilgisayar ortamında kromatogram olarak görüntülenir (Şensoy, 2007). Kontaminasyonu önlemek için kağıt bantla kaplanan şeritler cihaza yerleştirildikten sonra tarama işlemine başlamadan önce piklerin Rf değerlerinin cihaz tarafından belirlenebilmesi için numune ile ilgili bilgiler cihaza ait bilgisayar programına kaydedilir. Bu bilgilerden bazıları tarama süresi, damlatma noktasının ve yürütme işleminin sonlandırıldığı noktanın kromatografi kağıdına olan uzaklığıdır. Kromtogramın y-ekseninde sayım değeri, x-ekseninde ise kromatografi kağıdının uzunluğu verilmektedir.

Kalite kontrol çalışmalarında işaretli bileşiklerin bağlanma verimini elde etmek için deneyler en az 5 kez tekrarlandı.

Kullanılan TLRC Banyo Çözeltileri:

TLRC-1 : n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)

TLRC-2 : etil alkol-su (3-2)

TLRC-3 : izopropil alkol-n bütanol-0.2N NH₄OH (4-2-1)

Ayrıca 1M NaOH-eter-asetik asit (15-2-40) çözeltisi de kalite kontrol çalışmaları için banyo çözeltisi olarak denenmiş ancak iyi bir ayırma sağlamadığından bütün deneylerde kullanılmamıştır.

3.5.2 Kağıt elektroforezi yöntemi

Kağıt elektroforezi çalışmalarında Gelman elektroforez cihazı kullanıldı. Elektroforez işlemi Whatman kağıtları (Whatman 1) kullanılarak yapıldı. Kağıtlar 1.5 x 24 cm boyutlarında kesildikten sonra anot, katot ve uygulama yapılacak olan noktalar işaretlendi. Daha sonra kağıtlar elektroforez kabı içerisindeki banyo çözeltisinde ısıtıldı. Kağıtlar elektroforez kabına yerleştirildikten sonra orta noktasına 5'er μL 'lik $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Urasil, $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ -Urasil glukuronid ($^{131}\text{I-U-Glu}$), ^{131}I -2'-Deoksiuridin ($^{131}\text{I-UdR}$), yükseltgenmiş iyot ve $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ örnekleri damlatıldı. n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) çözeltisi içinde 300 V'luk gerilim altında 90 dakika elektroforez işlemi uygulandı. Süre sonunda kağıt şeritler elektroforez kabından çıkarılarak kurutuldu. I-131 ile yapılan çalışmalarda 1 cm'lik parçalar halinde kesilen kağıtların aktivitesi Cd(Te) dedektörüyle sayıldı. Parça sayısına karşı gelen sayımların grafiği çizilerek elektroforez sonuçları elde edildi. İşaretleme verimleri pik alanının sayımı toplam sayıma bölünerek hesaplandı. I-125 ile yapılan çalışmada ise elektroforez kabından çıkartılıp kurutulan kağıtlar radyokromatogram tarayıcı cihazına yerleştirildi ve radyokromatogram tarayıcıda taranarak kromatograma ait piklerin Rf değerleri ve yüzde verimleri görüntüledi. Elde edilen grafiklerden $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ ile işaretli bileşiklerin yükü hakkında bilgi edinildi.

3.5.3 Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) çalışmaları düşük basınçlı LC-10Atvp dörtlü pompa ve (SPD-10AV)UV dedektörüne sahip olan Shimadzu marka HPLC cihazında yapılmıştır.

Çalışma 30°C, 0.8 mL akış hızı ve 240 ile 280 nm dalga boyları koşullarında Nucleodur 100-5 RP-C18 (Macherey-Nagel) (250 x 4.6 mm I.D) kolon kullanılarak yapılmış ve Urasil, Urasil glukuronid ve 2'-Deoksiuridin (UdR)'e ait kromatogramlar elde edilmiştir.

3.5.4 Lipofilite tayini

Bu çalışmada ¹³¹I-Urasil-o-glukuronid, ¹³¹I-Urasil-n-glukuronid ve ¹³¹I-Urasil örneklerinin lipofilite tayini yapıldı. Bunun için 200 µL işaretli bileşikten alınarak içerisinde 200 µL n-oktanol ve 200 µL pH 7 tampon çözeltisi bulunan tüpe ilave edildi. 1 saat oda sıcaklığında karıştırmanın ardından 2500 rpm de 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında alt faz (su) ve üst faz (oktanol) ayrılarak aktiviteleri Cd(Te) dedektörlü RAD501 tek kanallı sayıcıda sayıldı. $n_{oktanol}$ 'ün n_{su} 'ya oranı ile log P değerleri hesaplandı. Denemeler her bir örnek için 5 kez tekrar edildi.

3.5.5 Serum stabilite tayini

Bu çalışma örneklerin fizyolojik ortamdaki stabilitesini tespit etmek amacıyla yapılmış ve çalışmada sağlıklı gönüllü insandan alınan kanın serumu kullanılmıştır. ^{131}I -Urasil-o-glukuronid, ^{131}I -Urasil-n-glukuronid, ^{131}I -Urasil'in ve silanlı manyetik parçacıklara bağlı ^{131}I -Urasil-o-glukuronid, ^{131}I -Urasil-n-glukuronid, ^{131}I -Urasil'in insan serumundaki stabilitesini tespit etmek için 30 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$ işaretli örnek 300 μL insan serumu içene konuldu ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. 0, 30, 60, 240. dakikalarda ve 24. saat de örnekler alındı. Örneklerin işaretleme verimi n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1) banyo çözeltisi kullanılarak ince tabaka kromatografisi ile tespit edildi.

3.6 Manyetik Nanoparçacıkların Hazırlanması

Manyetik nanoparçacıkların hazırlanması için iki yöntem kullanılmıştır. İlk prosedürde 1M FeCl_3 (1 birim) ve 1M $\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$ (2 birim) 70°C su banyosunda ısıtılarak manyetik bar ile karıştırıldı. 5 M NaOH ile pH=10'a kadar titre edilerek magnetit (Fe_3O_4) nanoparçacıklar elde edildi. Elde edilen nanoparçacıklar 3500 rpm de 5 kez saf su ile yıkanarak nötral hale getirildi ve saf suda bekletildi.

İkinci prosedürde 0.37 g FeCl_3 ve 1.51 g $\text{FeCl}_2.4\text{H}_2\text{O}$, dextran T-40 (50w%, 10 mL, MW 40000) çözeltisi içerisinde çözüldükten sonra su banyosunda $60-65^\circ\text{C}$ de otomatik titratör ile 1 mL/dk. akış hızında NH_4OH (7.5% w/v) ile pH=10'a kadar titre edildi. Elde edilen

nanoparçacıklar 3500 rpm de 5 kez saf su ile yıkanarak nötral hale getirildi ve saf suda bekletildi.

3.6.1 Dextran kaplı manyetik nanoparçacıkların oluşturulmasında parçacık özelliklerine etki edebilecek parametrelerin incelenmesi

Yapılan çalışmada kısmi indirgeme metodu kullanılarak nanoparçacıklar hazırlanmış; demir kaynağı olarak demir klorid, baz olarak NH_4OH (%7.5 w/v) veya NaOH çözeltileri kullanılmıştır. Elde edilen manyetik nanoparçacıklar dextran T-40 (50w%, 10 mL, MW 40000) ile kaplanmıştır. Optimum koşulları tesbit etmek için bazın türü, baz konsantrasyonu, sıcaklık, pH ve $\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3}$ oranı parametreleri incelenmiştir. Çalışmalarda Nüve BM 302 su banyosu ve Metrohm 686 Titroprocessor cihazları kullanılmıştır.

3.6.1.1 Baz türünün parçacık boyutuna etkisi

Baz türleri olarak NH_4OH (%7.5 w/v) veya 5 M lık NaOH çözeltileri kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre manyetik nanoparçacıklar hazırlanmıştır.

5 mL 1 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 5 mL 0.5 M FeCl_3 10 mL dextran T-40 içinde çözüldü. Su banyosunda 60-65⁰C de karıştırılarak aynı zamanda otomatik titratör (Metrohm 686 Titroprocessor) kullanılarak 1 mL/dk. akış hızında NH_4OH (%7.5 w/v) çözeltisi ile pH 10'a kadar titre edildi. Elde edilen parçacıklar saf su ile 5 kez yıkanarak 3000 rpm de 1 dakika

santrifüj edildi. Nötral hale getirilerek dextran çözeltisinde depolandı. Yukarıdaki deney basamağında baz olarak kullanılan amonyum hidroksit yerine 5 M lık NaOH kullanılarak deney tekrarlandı.

3.6.1.2 Baz konsantrasyonunun parçacık boyutuna etkisi

Baz konsantrasyonunun parçacık boyutuna etkisini incelemek için 2.5 M, 5 M ve 10 M lık NaOH çözeltileri kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre manyetik nanoparçacıklar hazırlanmıştır.

5 mL 1 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 5 mL 0.5 M FeCl_3 çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözüldü. Su banyosunda $60-65^\circ\text{C}$ 'de karıştırılarak aynı zamanda otomatik titratör ile 1 mL/dk. akış hızında 2.5 M lık NaOH çözeltisi ile pH 10'a kadar titre edildi. Elde edilen parçacıklar saf su ile 5 kez yıkanarak 3000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Nötral hale getirilerek dextran çözeltisinde depolandı. Aynı işlem 5 M ve 10 M lık NaOH çözeltileri kullanılarak tekrarlanmıştır.

3.6.1.3 Sıcaklığın parçacık boyutuna etkisi

Bu parametre incelenirken parçacıklar sırasıyla 25°C , 60°C ve 80°C de hazırlanmıştır. Baz olarak 5 M lık NaOH çözeltisi kullanılmıştır. 5 mL 1 M $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ve 5 mL 0.5M FeCl_3 çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözüldü. Su banyosunda 25°C de karıştırılarak aynı zamanda otomatik titratör ile 1ml/dk. akış hızında 5 M lık NaOH çözeltisi ile pH 10'a kadar titre edildi. Elde edilen parçacıklar saf su ile 5 kez yıkanarak

3000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Nötral hale getirilerek dextran çözeltisinde depolandı. Bu deney 60⁰C ve 80⁰C sıcaklıklarda aynı koşullarda tekrarlanmıştır.

3.6.1.4 pH'ın parçacık boyutuna etkisi

Genel olarak manyetik parçacıklar pH 10 da hazırlanmasına rağmen, pH ın parçacık boyutuna etkisini incelemek için pH 6, pH 8, pH 10 ve pH 12 de manyetik parçacıklar 5 M lık NaOH ile hazırlanmıştır. 5 ml 1 M FeCl₂.4H₂O ve 5 mL 0.5 M FeCl₃ çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözüldü. Su banyosunda 60-65⁰C de karıştırılarak aynı zamanda otomatik titratör ile 1mL/dk. akış hızında 5 M lık NaOH çözeltisi ile pH 6'ya kadar titre edildi. Elde edilen parçacıklar saf su ile 5 kez yıkanarak 3000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Nötral hale getirildikten sonra dextran çözeltisine alındı.. Aynı yöntem kullanılarak pH 8, pH 10 ve pH 12'ye kadar titrasyonlar yenilendi.

3.6.1.5 Fe⁺²/Fe⁺³ oranının parçacık boyutuna etkisi

Fe⁺²/Fe⁺³ oranının parçacık boyutuna etkisini incelemek için 0.5 M FeCl₃, 1 M FeCl₃ ve 0.5 M FeCl₂.4H₂O, 1 M FeCl₂.4H₂O çözeltileri hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak Fe⁺²/Fe⁺³ oranı parametresinde

$$\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3} = 0.5,$$

$$\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3} = 1 \text{ ve}$$

$$\text{Fe}^{+2}/\text{Fe}^{+3} = 2 \text{ oranları denenmiştir.}$$

$Fe^{+2}/Fe^{+3} = 0.5$ için 5 mL 0.5 M $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve 5 mL 1 M $FeCl_3$ ve çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözüldü. Su banyosunda 60-65⁰C de karıştırılarak aynı zamanda otomatik titratör ile 1mL/dk. akış hızında 5 M lık NaOH çözeltisi ile pH 10'a kadar titre edildi. Elde edilen parçacıklar saf su ile 5 kez yıkanarak 3000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi. Nötral hale getirilerek dextran çözeltisinde depolandı. $Fe^{+2}/Fe^{+3} = 1$ için 5 mL 1 M $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve 5 mL 1 M $FeCl_3$ ve çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözülp yukarıdaki prosedür tekrarlanmıştır. $Fe^{+2}/Fe^{+3} = 2$ için 5 mL 1 M $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ ve 5 mL 0.5 M $FeCl_3$ ve çözeltileri 10 mL dextran T-40 içinde çözülp yukarıdaki prosedür tekrarlanmıştır.

3.6.2 Dextran kaplı manyetik nanoparçacıklar varlığında urasil, UdR, urasil glukuronid-1 (urasil-o-glukuronid) ve urasil glukuronid-2'nin (urasil-n-glukuronid) I-131 ile işaretlenmesi

Dextranlı manyetik nanoparçacıklar varlığında Urasil, UdR, Urasil-o-glukuronid ve Urasil-n-glukuronid I-131 ile iodojen yöntemi ile işaretlendi. İşaretleme sonrasında sıvı faz bir mıknatıs kullanılarak manyetik parçacıklardan ayrıldı. Daha sonra manyetik parçacıklar 1'er mL dextran çözeltisiyle 10 kez yıkanarak, hem elüsyon çözeltileri hem de her yıkama sonrasındaki I-131 işaretli manyetik parçacıklar Cd(Te) dedektörlü RAD 501 tek kanallı analizör ile sayıldı. Sayım sonrasında manyetik parçacıkların yıkama ile radyoaktivitesini kaybettiği gözlemlendi ve bu bağlanmanın fiziksel bir bağlanma olduğu tespit edildi.

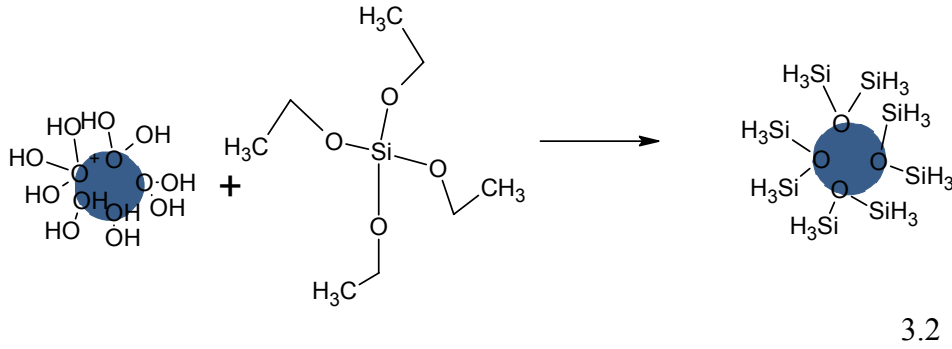
3.6.3 Manyetik magnetit parçacıklarında yüzey modifikasyonu

Dextran kaplı manyetik nanoparçacıkların I-131 ile işaretleme çalışmaları sonucunda Urasil, UdR, Urasil-o-glukuronid ve Urasil-n-glukuronid'in nanoparçacıklara kimyasal olarak bağlanamadığı tespit edildi. Bunun üzerine, manyetik nanoparçacıklar oluşturulmasında amino silan kullanılarak manyetik demir parçacıklarında yüzey modifikasyonu oluşturuldu ve ¹³¹I/¹²⁵I işaretli örneklerle kovalet bağlanması sağlandı. Bunun için aşağıda açıklanan prosedür uygulandı.

3.6.3.1 Manyetik nanoparçacıkların tetraetil ortosilikat ile kaplanması

Silika kaplı manyetik parçacıkların oluşum mekanizması eşitlik 3.1 ve eşitlik 3.2 de gösterilmiştir. Reaksiyonun ilk aşamasında Fe₃O₄ manyetit nanoparçacıklar oluşurken, ikinci aşamada bu parçacıklar silika ile kaplanır.

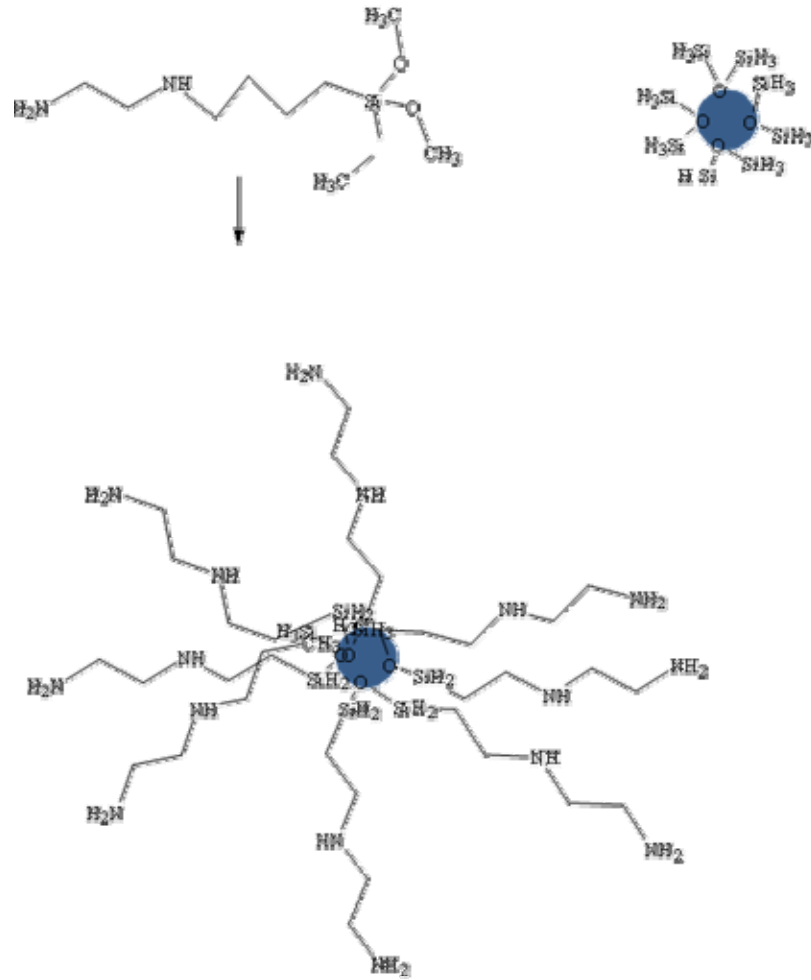




Silika kaplı manyetik nanoparçacıklar Fe^{3+} iyonunun azot altında sodyum sülfite ile kısmi indirgenmesine dayalı olarak yapılmıştır.

12 mL 2 M $FeCl_3$, 2 M HCl'de hazırlandı ve 500 mL'lik üç boyunlu balon jöjeye konulup 100 mL saf su ile seyreltilti. Balon jöjeye azot gazı gönderilirken taze hazırlanan 50 mL 0.08 M Na_2SO_3 yavaşça ilave edildi. %28'lik 8 mL NH_3 , 40 mL saf su ile seyreltikten sonra azot gazı altında yavaş karıştırma ile eklendi. Çözelti sıcaklığı $70^\circ C$ 'de 15-30 dakika korundu. Sonrasında $45^\circ C$ 'nin altına kadar soğutuldu. Siyah manyetik çökelekler harici bir mıknatıs ile uzaklaştırılarak birkaç kez saf suyla yıkandı ve daha sonra su-etanol (2-1) karışımı ile yıkamaya devam edildi. Çökelek 80 mL etanol ve 20 mL su içerisinde tekrar dağıtıldı. 5 mL tetra etil orto silikat (TEOS) ve %10'luk 5 mL NH_3 sırası ile ilave edildi. $40^\circ C$ 'de 12 saat karıştırmanın ardından parçacıklar metanol ile birkaç kez yıkanarak reaksiyona girmeyen TEOS ve bağlanmamış silika uzaklaştırıldı. Son olarak çökelek 100 mL metanolde süspanse edildi. Çökelekler küçük porsiyonlar halinde vakum altında kurutularak karakterizasyon için kullanıldı.

3.6.3.2 Silika kaplı manyetik parçacıkların amino silan ile konjugasyonu



Şekil 3.2 Manyetik nanoparçacıkların amino silan (SG-Si900) ile konjugasyonu

Manyetik nanoparçacıkların aminosilan ile konjugasyonuna ilişkin reaksiyon mekanizması Şekil 3.2’de gösterilmiştir. SG-Si900 (N-[3-(trimethoxy)silyl]propyl]-ethylenediamine) gibi trialkoksisililalkil-substitue polimethilen diamin bileşikleri inorganik materyallerin yüzey kaplanmasında kullanılmaktadır.

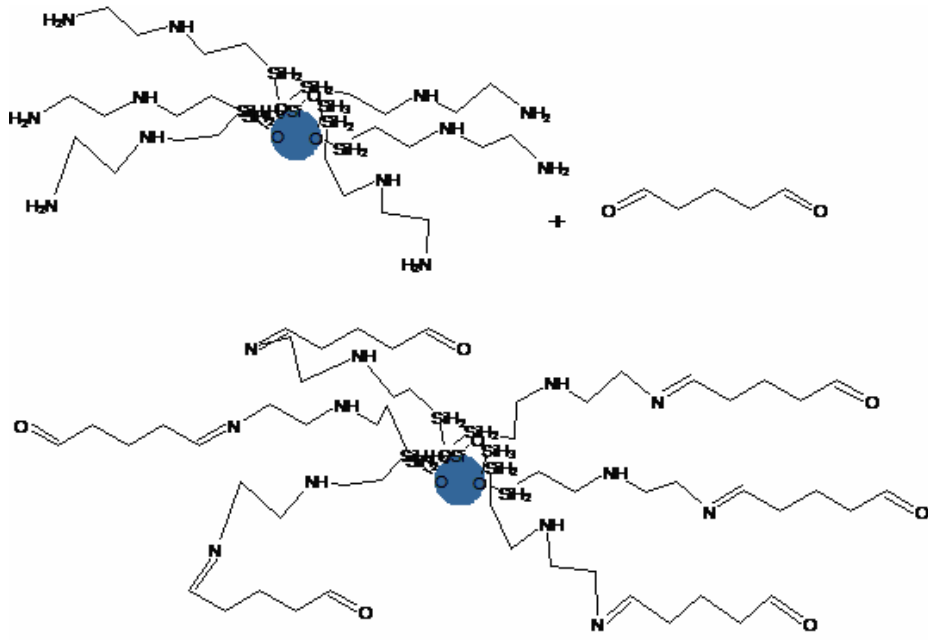
%20’lik bir konsantrasyona ulaşıncaya kadar metanol süspansiyonu içerisinde bulunan silika kaplı manyetik parçacıklar üzerine silan çifti ajanı SG-Si 900 [N-(2-aminoetil)-3-aminopropil-trimetoksisilan] eklendi. Çözelti 5 dakika ultrasonik banyoda tutulduktan sonra 60°C’de 12 saat süre ile geri soğutma altında bekletildi. Reaksiyona girmeyen SG-Si 900’u uzaklaştırmak için çözelti metanol ile birkaç kez yıkandı. Oluşan çökelek küçük miktarlarda vakum altında kurutulmuş analiz için kullanıldı.

3.6.3.3 Urasil, UdR, urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid manyetik parçacıklarla immobilizasyonu

Konsantrasyonu >20 mg katı/ mL olacak şekilde metanol içerisindeki SG-Si 900 ile işlenmiş silika kaplı manyetik nanoparçacıklardan 1 mL kolloidal sistemden ayrıldı. 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (PBS pH=7.0 25°C) ile yıkandı. Yıkanan parçacıklar 0.1 M PBS (pH=7.0) içindeki %2.5’lik glutaraldehit içinde ultrasonik banyoda tekrar dağıtıldı. 4°C’de 4 saatin üzerinde inkübe edildi.

Süspansiyon santrifüj edildi ve solvent uzaklaştırıldı. 0.1 M PBS ile yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılıp tespit edilen örnek miktarları 0.15 M NaCl ve 0.005 M EDTA (pH=7.2) içeren 1 mL 0.1 M PBS içerisinde çözüldü. Oda sıcaklığında 12 saat inkübasyondan sonra parçacıklar 0.5 mg/ mL NaBH₄ içeren 0.1 M borat tamponu (pH=9.2) ile yıkandı ve yine bu tampon çözelti içerisinde tekrar dağıtıldı. Reaksiyona girmeyen aldehit grupları ve çift bağları elemek için 4°C'de 30 dakika tutuldu. Partiküller 0.1 M PBS (pH=7.0 25°C) ile yıkandı ve 1 mL 0.5 M MES'de (pH=6.6) tekrar dağıtıldı.

Glutaraldialdehit bağlayıcı olarak kullanılarak Urasil, urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid'in manyetik parçacıklara konjugasyonu Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3 Silika kaplı manyetik parçacıklarda amino silan ile yüzey modifikasyonu sonrasında glutaraldehit ile parçacıklar üzerinde CHO grubunun oluşturulması reaksiyonu.

3.6.4 Manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

Yüzey modifikasyonu sonrasında manyetik parçacıkların karakterizasyonu SEM (Scanning Electron Microscope), XRD (X-Ray diffractometer) ve VSM (Vibrating Sample Magnetometer) ile İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde yapılmıştır.

Manyetik parçacıkların yüzey morfolojisinin ve boyutlarının tespit edilmesi için SEM (Scanning Electron Microscope) (Phillips XL-30 S

FEG) görüntüleri alınmıştır. Bu çalışmada görüntü alınabilmesi için örneklerin kuru olması zorunluluğu nedeniyle manyetik parçacıklar etanol-su çözeltisiyle 3 kez yıkandıktan sonra kolay uçabilen bir çözelti (metanol) içerisinde dağıtıldı. Mikropipet yardımıyla alınan örnekler ölçümün yapılacağı SEM cihazına ait çelik plateler üzerine kondu. Yaklaşık 5 dakika sonra metanolün uçması ile çelik plakalar üzerinde kuruyan örneklerin görüntüleri alındı.

Manyetik parçacıkların XRD (X-Ray diffractometer) (Phillips X'Pert Pro) analizi yapıldı. X-ışını kırınımı ile parçacıkların kristal yapısı dedekte edildi. Örnekler kolime edilmiş monokromatik x-ışını kaynağı ile ışınıldı. Kırınım açısı ve kırılan x-ışınlarının şiddeti örneğin bilinen çeşitli fazların desenleri ile karşılaştırılabilir desenini verdi.

Manyetik parçacıkların manyetik özellikleri İzmir Yüksek Teknolojisi Enstitüsündeki VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) cihazı ile incelendi. Analiz öncesinde silikalı manyetik parçacıklar 0.0069 g, silanlı manyetik parçacıklar 0.0036 g olarak tartıldı. Bu çalışmada kuru örneklerin tartımı yapıldı. Her bir kuru örneğin manyetik momenti 0.1 emu/g duyarlılık ile -3000 ve +3000 Gauss arasında uygulanan manyetik alan aralığında ölçüldü. Daha sonra Gauss'a karşı elde edilen moment (emu) değerleri örnek miktarına bölünerek emu/g değerleri bulundu. Gauss'a karşı emu/g grafikleri çizilerek manyetik parçacığın manyetik doygunluğa ulaştığı nokta emu/g cinsinden tespit edildi.

3.6.5 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid'in I-131 ile işaretlenmesi

30µg/500µL Urasil Glukuronid-1 (urasil-o-glukuronid) ve 30µg/500µL Urasil Glukuronid-2 (urasil-n-glukuronid) içeren silanlı manyetik parçacıklar 150 µL (4 mCi/0.5 mL) ¹³¹I ile iodojen metodu kullanılarak işaretlendi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 15-20 dakika beklendi. Daha sonra 100 µL 1 mM Na₂SO₃ çözeltisi ilave edildi. ¹³¹I ile işaretlemenin ardından urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid içerikli silanlı parçacıklar işaretlemenin yapıldığı tüpten ependorf tüpüne alındı. Sıvı ve manyetik kısım Cd(Te) dedektörlü RAD 501 tek kanallı analizör ile sayılarak toplam aktivite bulundu. Daha sonra mıknatısla sıvı ve manyetik kısım ayrıldı ve ayrı ayrı sayılarak sıvı kısımdaki ve manyetik kısımdaki aktiviteler tespit edildi. Manyetik parçacıkların ayrılmasından sonra parçacıklar 0.5 mL saf su ile üç kez yıkanarak yıkama sıvıları ile manyetik parçacıklar birbirinden ayrılarak sayıldı.

3.7 Urasil Glukuronid (U-Glu) ve Urasil'in Hücre Düzeyinde Etkinliğinin İncelenmesi

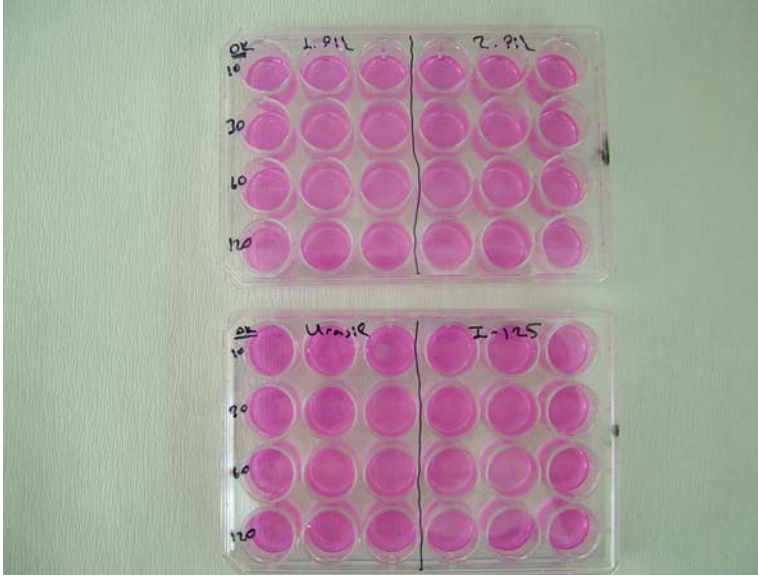
Bundan önceki çalışmalarda, HuTu-80 ince bağırsak hücrelerinden UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimince zengin mikrozom preparatları elde edilmiş ve bu mikrozomlar kullanılarak Urasilin glukuronik asit ile konjugasyonu reaksiyonu sonucunda urasil glukuronid bileşiği sentezlenmiştir. Elde edilen iki farklı Urasil glukuronid (U-Glu) ürünü, Urasil-O-glukuronid (1.pik) ve Urasil-N-glukuronid (2.pik) olarak

adlandırıldı. Urasil ve urasil glukuronid bileşiklerinin HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğini inceleyerek enzimin ortaya çıkardığı farkı tespit etmek amacıyla HuTu-80 ince bağırsak hücreleri üzerinde çalışıldı. Yapılan her çalışma iki farklı günde, her bir parametre en az 6'şar gözde çalışılarak deneylerin tekrarlanabilirliği ortaya konuldu.

3.7.1 İyot-125 işaretli urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi

Hücreler üzerindeki inkorporasyon oranlarının daha sağlıklı belirlenmesi ve sitotoksik etkiler üzerindeki I-131'den gelen radyolitik etkileri ayırabilmek amacıyla mekanizma çalışmaları I-125 ile yapıldı.

İyot-125 işaretli Urasil-O-glukuronid (pik 1), urasil-N-glukuronid (pik 2) ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanmanın optimum zamanını tespit etmek için HuTu-80 ince bağırsak hücrelerinin ekimi yapıldı. Hücrelerin yeteri kadar çoğalmasından sonra hücreler 3 adet 24 lük flasklara ekildi. Çalışmada incelenecek zaman parametreleri 10.dakika, 30. dakika, 60.dakika ve 120. dakika olarak belirlendi.



Şekil 3.4 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışması.

Çalışmada flasklardaki her bir göz için ligand miktarı 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve I-125 spesifik aktivitesi 4 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$ olarak belirlendi. Her bir göze 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ligand gelmesi için 210 μg urasil-O-glukuronid, 210 μg urasil-N-glukuronid ve 210 μg urasil içeren 75.35 μL urasil-O-glukuronid, 81.34 μL urasil-N-glukuronid ve 1 mg/mL urasil stoğundan 210 μL iodojen tüplerine (1 mg/mL) konuldu ve her bir tüpe 4.97 μL ^{125}I (5.63 mCi/mL) ilave edildi. Reaksiyonun gerçekleşmesi için 20-25 dakika beklendikten sonra 70'şer μL 1 mM Na_2SO_3 eklenerek örneklerin ^{125}I ile işaretlenmesi tamamlandı. Daha sonra çalışmanın yapılacağı hücrelerin bulunduğu 24 lük flaskların her bir gözüne 0.5 mL besiyer gelecek şekilde üç farklı tüpte bulunan 7'şer mL MEM besiyerine ^{125}I işaretli urasil O-glukuronid

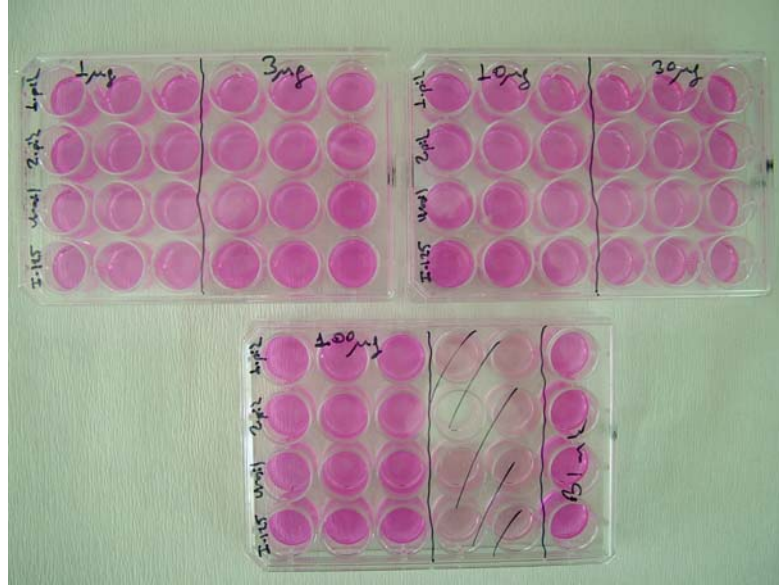
(pik1), urasil N-glukuronid (pik2) ve Urasil eklendi. Kontrol olarak ^{125}I 'in etkisi de inceleneceği için her bir göze 4 $\mu\text{Ci/mL}$ ^{125}I gelecek şekilde toplam 4.97 μL ^{125}I (5.63 mCi/mL) 7 mL MEM besiyerine eklendi. İşaretli besiyerler hücrelerin bulunduğu flasklara eklenmeden önce hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamları atılıp hücreler %0.9'luk NaCl ile üç kez yıkandı. Yıkamanın ardından 24 lük flasttaki her bir göze 0.5 mL ^{125}I işaretli örnekleri içeren besiyer konuldu. 10. dakika, 30. dakika, 60.dakika ve 120. dakikalarda hücreler üzerindeki işaretli besi ortamı atıldı ve %0.9 luk NaCl ile üç kez yıkandıktan sonra her bir göze 200'er μL Ripa tamponu eklenerek pipet ucuyla hücre yüzeyi kazındı ve aynı zamanda pipetle çözelti çekilip bırakılarak hücrelerin Ripa tamponuna geçmesi sağlandı. Hücrelerin yüzeyden kaldırılıp çözeltiye karışması sağlandıktan sonra hücreleri içeren bu çözeltinin 50 μL 'si protein analizi için ependorf tüplerine alındı. Protein miktarı Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, Merkez Laboratuvarlarında bulunan Thermolabsystems Multiskan Spectrum cihazı kullanılarak Bicinchoninic asit yöntemi ile 260 nm de tespit edildi. Hücreler üzerinde bulunan aktiviteyi tespit etmek için ise çözeltinin kalan 100 μL 'si ependorf tüplerine alındı ve üzerine 1.9 mL sintilatör eklendi. Ependorf tüpler sintilasyon cihazı için özel olarak kullanılan kapların içerisine konulup Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalında bulunan Packord Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacında sayıldı.

Yapılan bu çalışma ile ^{125}I -urasil-O-glukuronid, ^{125}I -urasil-N-glukuronid ve ^{125}I -urasil'in HuTu-80 ince bağırsak hücreleri üzerindeki optimum bağlanmanın hangi zaman parametresinde olduğu tespit edildi.

Ayrıca, her bir parametre seviyesi için elde edilen % bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. P-değeri göz önüne alınarak % bağlanma değerleri arasında 0.95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı tesbit edilmiştir.

3.7.2 İyot-125 işaretli urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ligand miktarına bağlı değişimi

İyot-125 işaretli Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki optimum bağlanmanın gerçekleştiği madde miktarını tespit etmek için HuTu-80 ince bağırsak hücrelerinin ekimi yapıldı. Hücreler çoğaltıldıktan sonra üç adet 24 lük flaska ekildi. Çalışmada incelenecek madde miktarları 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL ve 100 µg/mL olarak belirlendi.



Şekil 3.5 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ligand miktarına bağlı değişimi çalışması.

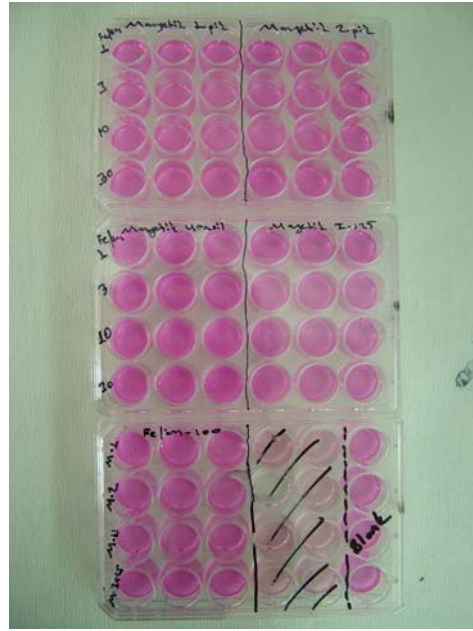
HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanmanın optimum zamanı tespit edilirken her bir göz için 30 $\mu\text{g/mL}$ madde ve 4 $\mu\text{Ci/mL}$ I-125 ile işaretlenmişti. Bu sebeple madde miktarına bağlı değişim incelenirken 1 $\mu\text{g/mL}$, 3 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$ ve 100 $\mu\text{g/mL}$ maddeler sırasıyla 0.1 $\mu\text{Ci/mL}$, 0.4 $\mu\text{Ci/mL}$, 1.3 $\mu\text{Ci/mL}$, 4 $\mu\text{Ci/mL}$, 13.2 $\mu\text{Ci/mL}$ İyot-125 ile işaretlendi. İşaretleme aşamasında 432 μg madde miktarı içeren 155 μL Urasil-O- glukuronid, 167.3 μL Urasil-N-glukuronid ve 1 mg/mL urasil stoğundan 432 μL iodojen tüplerine (1 mg/mL) konuldu ve her bir tüpe 13 μL I-125 (4.37 mCi/mL) ilave edildi. 20-25 dakika reaksiyonun gerçekleşmesi için beklendikten sonra 70'şer μL 1 mM Na_2SO_3 eklenerek örneklerin I-125 ile işaretlenmesi tamamlandı. İşaretlemenin

ardından, 1 µg/mL, 3 µg/mL, 10 µg/mL, 30 µg/mL ve 100 µg/mL iyot-125 işaretli urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil için gerekli miktarlar işaretlemenin yapıldığı tüplerden alındı ve içerisinde 2.5 mL besiyer olan falkon tüplerine konuldu. İyot-125'in etkisini incelemek için 0.1 µCi/mL, 0.4 µCi/mL, 1.3 µCi/mL, 4 µCi/mL, 13.2 µCi/mL içeren İyot-125 miktarları da içerisinde 2.5 mL besiyer olan falkon tüplerine eklendi. Hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamları atılıp hücreler %0.9'luk NaCl ile üç kez yıkandıktan sonra 24 lük flasktaki her bir göze 0.5 mL I-125 işaretli örnekleri içeren besiyerler konuldu. Ayrıca her bir örneğe ait işaretli besiyerlerin 0.5 mL'si kontrol grubu olarak ayrıldı. Optimum zaman olarak belirlenen 30. dakikada hücreler üzerindeki işaretli besi ortamı atıldı ve %0.9 luk NaCl ile üç kez yıkandıktan sonra her bir göze 200'er µL Ripa tamponu eklendi. Pipet ucuyla hücreler yüzden kazınarak yüzeyden kalkması sağlandı. Ripa tamponuna geçen hücrelerin 50 µL'sinde Bicinchoninic asit yöntemi ile protein analizi yapıldı. Hücreleri içeren çözeltinin ve kontrol gruplarının 100 µL'sinde aktivite sayımı yapıldı. Bu işlem için 100 µL'lik çözeltiler, 2 mL'ye sintilatör ile tamamlandı. Özel olarak kullanılan kapların içerisine konulan örneklerin sayımı sıvı sintilasyon cihazı ile yapıldı. Protein sonuçları kullanılarak hücre başına düşen aktivite değerleri hesaplandı. Kontrol grubu sayımları ile bu değerler oranlanarak % bağlanma değerleri bulundu.

Bu çalışmada I-125 işaretli urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 ince bağırsak hücreleri üzerinde optimum bağlanmasına neden olan madde miktarı tespit edildi.

3.7.3 İyot-125 işaretli manyetik parçacıklara takılı urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğine manyetik parçacık miktarının etkisi

Bu çalışmada Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil farklı miktarlardaki silanlı manyetik parçacıklar ile konjuge edildi ve bu örnekler I-125 ile işaretlenerek HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinlikleri tespit edildi. Yapılan bu çalışma ile kullanılan silanlı manyetik parçacık miktarı optimize edilmiştir. Çalışma iki farklı günde tekrarlanmış ve her bir örnek için her parametre toplam 6 gözde çalışılmıştır. Bu çalışma için HuTu-80 ince bağırsak hücrelerinin ekimi yapıldı ve hücreler çoğaltıldıktan sonra iki adet 24 lük flaska tekrar ekildi.



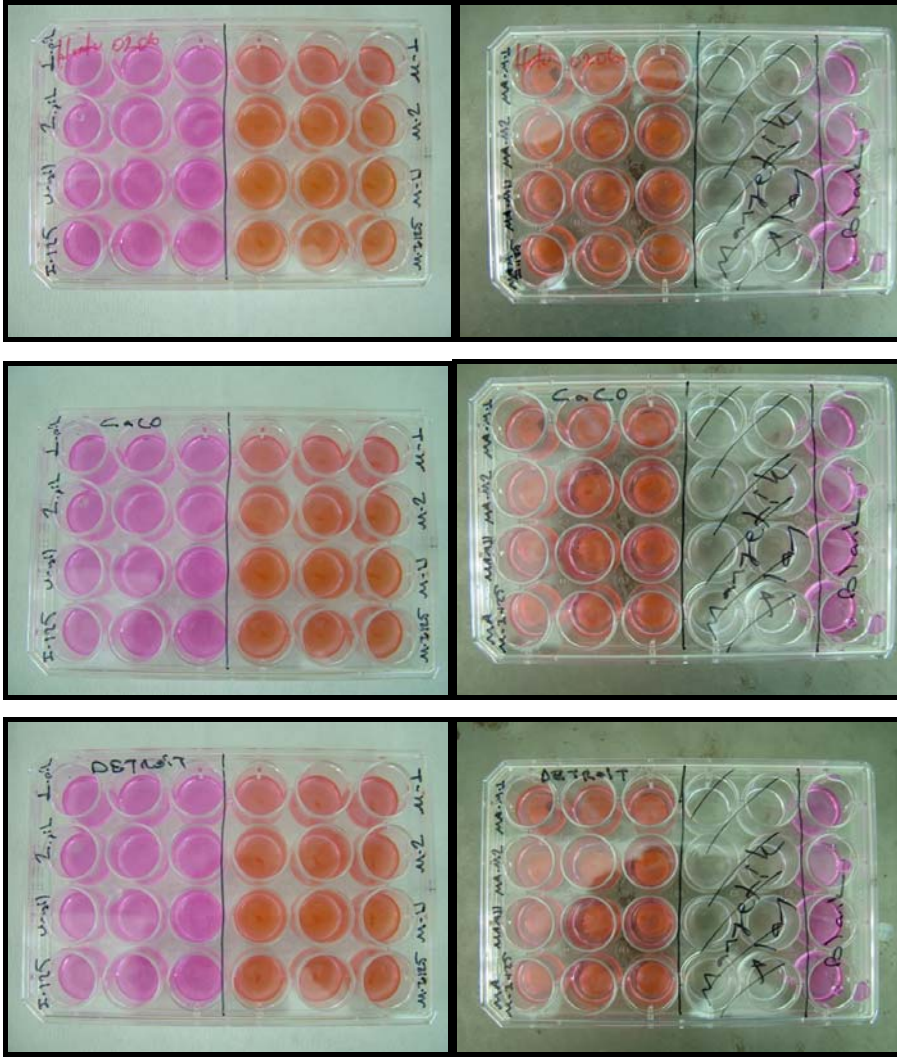
Şekil 3.6 HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğine manyetik parçacık miktarının etkisi çalışması

Çalışmada optimum zaman 30 dakika ve optimum örnek konsantrasyonu her bir göz için 30 µg/mL olarak daha önce yapılan deneyler ile tespit edildi. Ayrıca her bir göz için 4 µCi/mL I-125 işaretli örnekler kullanıldı. Örneklerle bağlanacak silanlı manyetik parçacık miktarının ise kullanılan örnek miktarının 1, 3, 10, 30 ve 100 katı olması kararlaştırıldı. Her bir göz için 30 µg/mL olan urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil miktarı 0 µg/mL, 90 µg/mL, 300 µg/mL, 900 µg/mL, 3 mg/mL silanlı manyetik parçacıklar ile konjuge edildi. Bu şekilde manyetik parçacıklara takılan urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil iodojen yöntemi ile I-125 ile işaretlendi. İşaretlemenin ardından her bir parametreye ait örnek ayrı ayrı besiyerlere eklenip vortex cihazı ile karıştırıldı. Çalışmada kullanılacak olan hücrelerin üzerindeki besi ortamları atılıp %0.9'luk NaCl ile üç kez yıkandıktan sonra 24 lük flasktaki her bir göze 0.5 mL I-125 işaretli örnekleri içeren besiyerler konuldu. Flasklar herhangi bir manyetik alan etkisi altında bırakılmadı. Ayrıca her bir örneğe ait işaretli besiyerlerin 0.5 mL'si kontrol grubu olarak ayrıldı. 30. dakika olan optimum zamanda işaretli besiyerler hücrelerin bulunduğu ortamdan uzaklaştırılarak flasklar %0.9 luk NaCl ile tekrar üç kez yıkandı. Yıkamanın ardından her bir göze 200 µL Ripa tamponu ilave edilerek pipet ile flask yüzeyi kazınarak hücrelerin yüzeyden kalkıp çözelti ile süspanse olması sağlandı. Hücreleri içeren bu süspanse çözeltinin 50 µL'sinde Bicinchoninic asit yöntemi ile protein analizi yapıldı. Geriye kalan 100'er µL çözeltilerde ve daha önce ayrılan kontrol grubu çözeltilerinin 100 µL'sinde aktivite sayımı sıvı sintilasyon cihazı ile yapıldı. Bu cihazda sayım yapmak için 100'er µL olan çözeltiler 2 mL'ye

sintilatör ile tamamlandı. Protein değerleri sonuçlarından hücre başına düşen aktiviteler hesaplanıp bu aktiviteler kontrol grupları ile oranlanarak % bağlanma değerleri tespit edildi.

3.7.4 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, ^{125}I -Urasil-N-glukuronid ve ^{125}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği

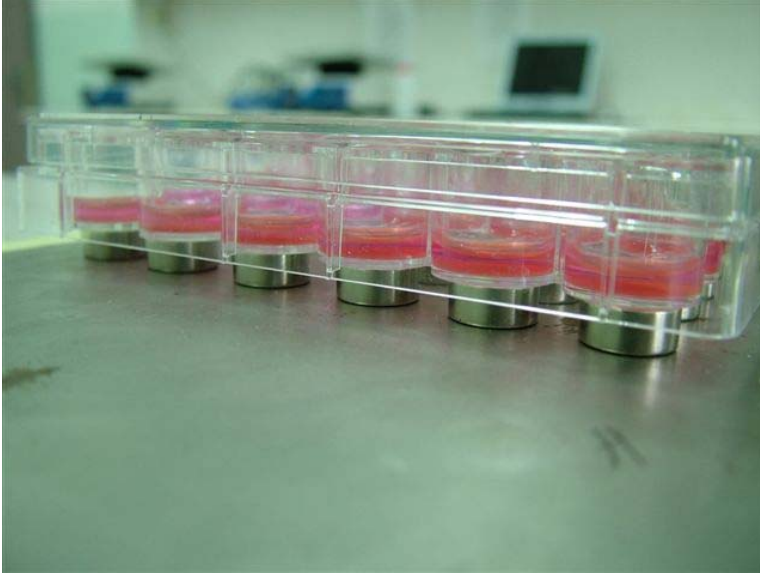
HuTu-80 ince barsak hücrelerinden elde edilen UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enziminin glukuronid reaksiyonunda kullanılması ile elde edilen urasil glukuronid 'in sadece bu tip hücrelere spesifik olup olmadığını tespit etmek için Detroit 562 (farenks) ve Caco-2 (kolon) gibi farklı iki tür hücre üzerinde de deneyler tekrarlandı. Bunun için bu hücre tiplerinden ekim yapıldı ve yeteri kadar çoğalmasından sonra bu üç farklı hücre 24 lük flaslara ekildi.



Şekil 3.7 I-125 işaretli örneklerin HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.

Manyetik parçacıklar üzerinde silanlama yoluyla yüzey modifikasyonu sağlandıktan sonra oluşan CHO grubuna glukuronid reaksiyonu sonucunda elde edilen iki farklı Urasil glukuronid (U-Glu)

ürünü olan Urasil-O- glukuronid ve Urasil-N- glukuronid bağlandı. Aynı işlem urasil içinde yapıldı. Bu işlem sırasında Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil miktarı her bir göz için 30 µg/mL kullanılırken manyetik parçacık miktarı her bir göz için örnek miktarının 30 katı alındı. Bu şekilde manyetik özellik kazandırılan Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil ile manyetik olmayan Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil iodojen yöntemi kullanılarak iyot-125 ile işaretlendi. İşaretlemede her bir göz için 4 µCi/mL I -125 kullanıldı. Daha sonra işaretli örnekler içerisinde besiyer bulunan falkon tüplerine konulup karıştırıldı. Bu falkon tüplerinden 0.5'er mL kontrol grubu olarak sayımı yapılmak için ayrıldı. İşaretli besiyerler hücrelerin bulunduğu flaslara eklenmeden önce hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamları atılıp hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandı. Yıkamanın ardından 24 lük flastaki her bir göze 0.5 mL I-131 işaretli örnekleri içeren besiyer konuldu.



Şekil 3.8 NdFeB mıknatısları ile flasklara manyetik alan uygulanması.

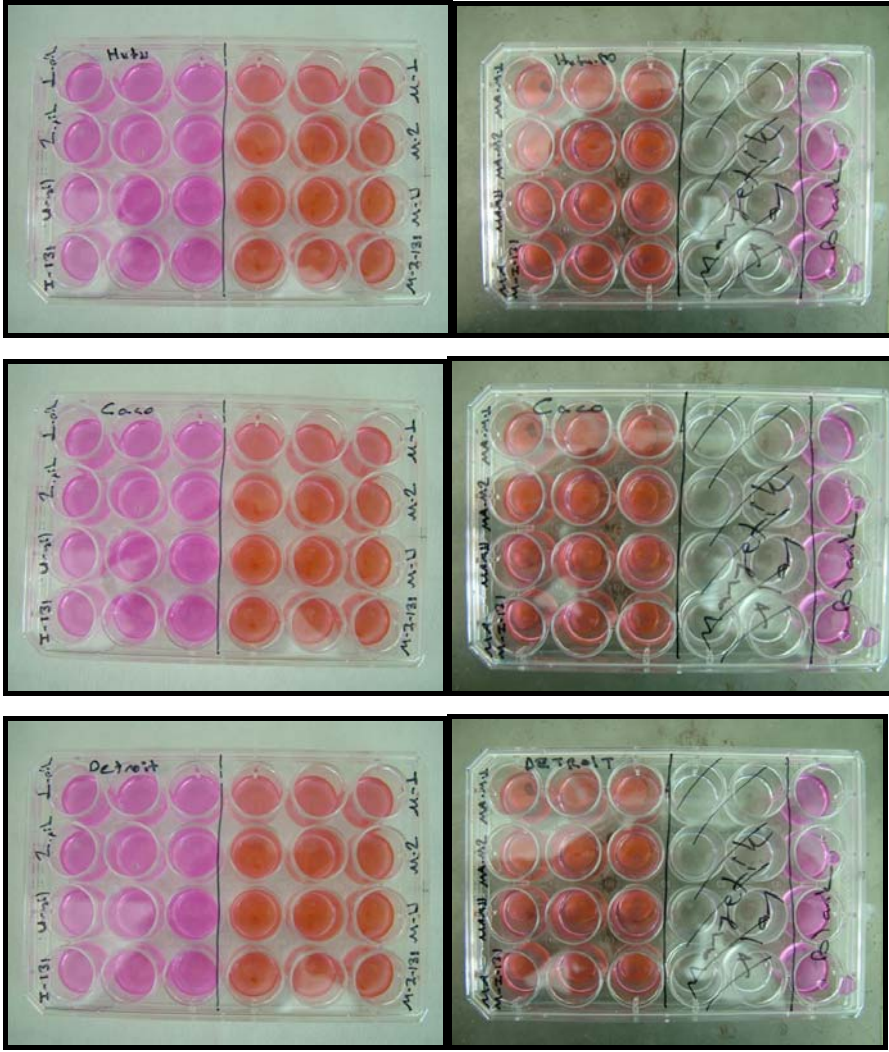
Çalışmada manyetik parçacıklara takılı örnekler iki farklı 24'lük flaskta çalışıldı. Şekil 3.8'de gösterildiği gibi flasklardan birisine flastaki her bir gözün altına eşit büyüklükte ve eşit manyetik akım yoğunluğuna (1.17-1.21 Tesla) sahip NdFeB mıknatısları (DMEGC) konularak manyetik alan uygulanırken diğerine uygulanmadı. Optimum süre olarak belirlenen 30.dakikada hücreler üzerindeki işaretli besi ortamı atıldı ve %0.9 luk NaCl ile yıkandıktan sonra hücrelerin bulunduğu her göze 200'er μL Ripa tamponu eklendi. Pipet ucuyla hücre yüzeyi kazındı ve aynı zamanda pipetle çözelti çekilip bırakılarak hücrelerin Ripa tamponuna geçmesi sağlandı. Hücreleri içeren bu çözeltilerin 50'şer μL sinde Bicinchoninic asit yöntemi ile protein analizi yapıldı. Çözeltilerin

100'er µL sinde ve daha önce ayrılan kontrol grubu çözeltilerinin 100 µL'sinde aktivite sayımı sıvı sintilasyon cihazı ile yapıldı.

Yapılan bu çalışmada silanlı manyetik parçacıklara bağlı ¹²⁵I-Urasil-O- glukuronid, ¹²⁵I-Urasil-N-glukuronid ve ¹²⁵I-Urasil'in manyetik alan altında ve manyetik alan uygulamaksızın farklı hücrelerdeki bağlanma düzeyleri tespit edildi. Ayrıca manyetik özellik taşımayan ¹²⁵I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵I-Urasil-N- glukuronid ve ¹²⁵I-Urasil ile manyetik özellik taşıyan aynı örnekler arasındaki bağlanma etkinlikleri arasındaki fark incelendi. Çalışmanın tekrarlanabilirliğini ortaya koymak için çalışma iki farklı günde tekrarlandı ve her bir örnek için her parametre toplam 6 gözde çalışıldı.

3.7.5 ¹³¹I-Urasil-O-Glukuronid, ¹³¹I-Urasil-N-Glukuronid ve ¹³¹I-Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği

I-125 işaretli Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği incelendikten sonra I-125 ve I-131 işaretli Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinlikleri arasındaki farkı tespit etmek için aynı çalışma I-125 yerine I-131 kullanılarak aynı koşullarda tekrarlandı. Çalışma için gerekli hücre tiplerinden ekim yapıldı ve yeteri kadar çoğalmasından sonra çalışmanın yapılacağı 24 lük flasklara ekildi.



Şekil 3.9 I-131 işaretli örneklerin HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.

Yüzey modifikasyonu ile manyetik parçacıklar üzerinde oluşturulan CHO gruplarına urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve urasil bağlandı. Bu işlem sırasında urasil-O-glukuronid, urasil-N-

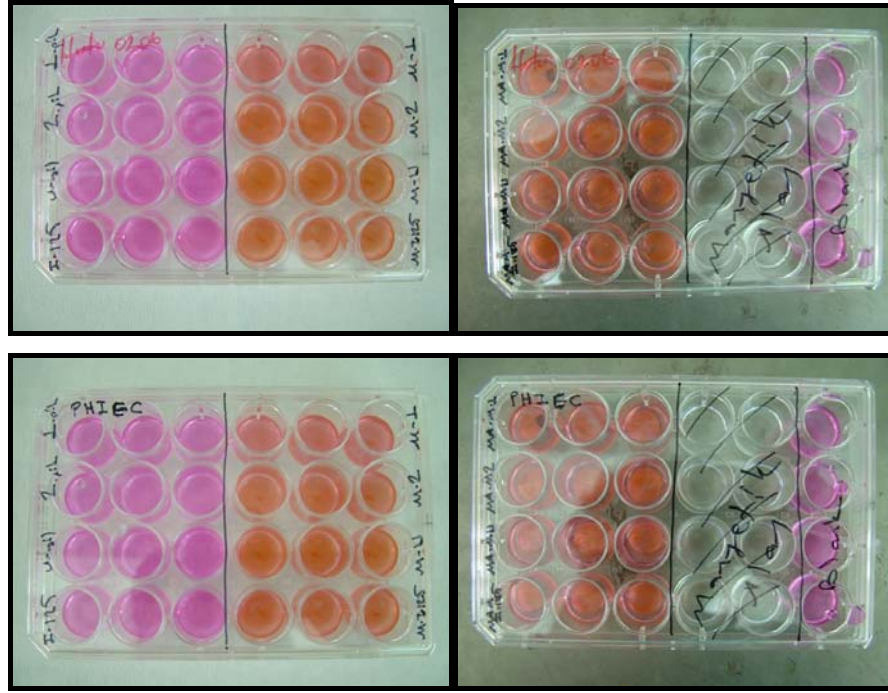
glukuronid ve urasil'in miktarı ile manyetik parçacık miktarı daha önce tespit edilen optimum miktar olan her bir göz için 30 µg/mL örnek ve her bir göz için örnek miktarının 30 katı manyetik parçacıktır. Bu koşullarda manyetik özellik kazandırılan U-O-glukuronid, U-N-glukuronid ve U ile manyetik olmayan U-O-glukuronid, U-N-glukuronid ve U iyot-131 ile iodojen yöntemi kullanılarak işaretlendi. İşaretlemede için her bir göze 4 µCi/mL iyot -131 konuldu. İşaretlemenin ardından örnekler besiyerlerin üzerine eklendi ve karıştırıldı. Bu işaretli besiyerlerden 0.5'er mL kontrol grubu olarak sayımı yapılmak için ayrıldı. Hücrelerin üzerinde bulunan besi ortamları atıldı ve hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandı. Yıkamadan sonra 24 lük flasttaki her bir göze 0.5 mL I-131 işaretli örnekleri içeren besiyer konuldu. Manyetik parçacıklara takılı örnekler iki farklı 24'lük flastta çalışıldı. Flastlardan birisine flasttaki her bir gözün altına eşit büyüklükte ve eşit manyetik akım yoğunluğuna (1.17-1.21 Tesla) sahip NdFeB mıknatısları (DMEGC) konularak manyetik alan uygulanırken diğerine uygulanmadı. İşaretli besiyerler eklendikten 30.dakika sonra hücreler üzerindeki işaretli besi ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandı. Yıkamanın ardından hücrelerin üzerine 200'er µL Ripa tamponu eklendi. Pipet ucuyla hücre yüzeyi kazınarak hücreler yüzeyden kaldırıldı. Hücreleri içeren çözeltilerin 50'şer µL sinde protein analizi yapıldı. Çözeltilerin 100'er µL sinde ve daha önce ayrılan kontrol grubu çözeltilerinin 100 µL'sinde aktivite sayımı sıvı sintilasyon cihazı ile yapıldı.

Bu çalışmada manyetik özellik taşımayan ¹³¹I-U-O- glukuronid, ¹³¹I-U-N- glukuronid ve ¹³¹I-U ile manyetik özellik taşıyan örneklerin

bağlanma etkinlikleri arasındaki fark incelendi. Bunun yanından manyetik parçacıklara takılı örneklere manyetik alan uygulamanın hücreler üzerindeki bağlanmaya etkisi tespit edildi. Ayrıca aynı koşullarda yapılan deneyler sonucunda I-125 ve I-131 işaretli örneklerin hücreler üzerindeki bağlanma etkinlikleri karşılaştırıldı.

3.7.6 ¹²⁵I-Urasil-O-Glukuronid, ¹²⁵I-Urasil-N-Glukuronid ve ¹²⁵I-Urasil'in HuTu-80 ve primer insan bağırsak epitel hücrelerine bağlanma (PHIC) etkinliğinin karşılaştırılması

HuTu-80 (ince barsak), Caco-2 (kolon) ve Detroit 562 (farenks) gibi kanserli hücreler üzerinde yapılan çalışmalardan sonra bu çalışmada urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in normal insan bağırsak epitel hücreleri üzerindeki etkileri incelenerek enzimin kanserli hücrelere olan spesifitesi araştırıldı. Çalışma için HuTu-80 ince bağırsak hücreleri ile normal insan bağırsak epitel hücreleri kullanıldı. Bu hücrelerin ekimi yapıldı ve yeteri kadar çoğaldıktan sonra hücreler çalışmanın yapılacağı 24'lik flasklara alındı.



Şekil 3.10 I-125 işaretli örneklerin HuTu-80 ve PH1C hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliği çalışması.

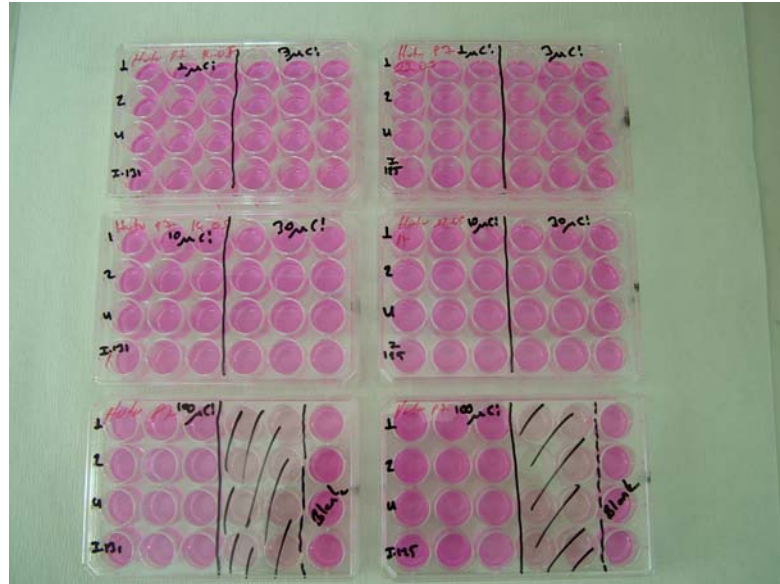
Çalışmada urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in yanında yüzey modifikasyonu yapılmış olan manyetik parçacıklar ile konjuge edilen urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil örnekleri de çalışıldı. Konjugasyonda her bir göz için 30 µg/mL örnek ile örnek miktarının 30 katı kadar olacak şekilde silanlı manyetik parçacıklar kullanıldı. Manyetik ve manyetik özellikte olmayan urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil örnekleri I-125 ile iodojen metodu kullanılarak işaretlendi. İşaretlemede kullanılan I-125'in spesifik aktivitesi her bir göze 4 µCi/mL aktivite gelecek şekilde ayarlandı.

İşaretli örnekler falkon tüplerinde bulunan besiyerlere eklendi. İşaretli besiyerleri hücrelerin üzerine koymadan önce hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandı. Bu şekilde ölü hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı. Daha sonra her bir göze 0.5 mL I-125 işaretli besiyerler eklendi. Manyetik parçacıklara takılı olan örnekler için hazırlanan iki farklı flaskın birine flasktaki her bir gözün altına eşit büyüklükte ve eşit manyetik akım yoğunluğuna (1.17-1.21 Tesla) sahip NdFeB mıknatısları (DMEGC) konularak manyetik alan uygulanırken diğerine uygulanmadı. Bağlanma için gerekli olan 30 dakika optimum süre geçtikten sonra hücrelerin üzerindeki işaretli besiyerler uzaklaştırıldı ve hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandı. Daha sonra her bir göze 200 µL ripa tamponu eklendi ve pipet ucu ile hücreler yüzeyden kazınarak süspanse hale getirildi. Hücrelerin bulunduğu bu 200 µL'lik çözeltinin 50 µL'si protein analizi için kullanılırken 100 µL'si sıvı sintilasyon cihazında (Packard Tri-corb-1200) sayılarak aktiviteleri tespit edildi.

Bu çalışma ile glukuronidleşme reaksiyonu sonucunda elde edilen U-O-glukuronid ve U-N- glukuronid bileşiklerinin kanserli hücrelere karşı gösterdiği spesifitenin yanında normal insan bağırsak epitel hücreleri üzerindeki spesifitesi tespit edildi.

3.7.7 I-125 ve I-131'in farklı spesifik aktivitelere kullanılması ile urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin incelenmesi

Urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in radyoiyot ile işaretlenmesinde farklı spesifik aktivitelere sahip I-125 ve I-131 kullanılarak I-125 ve I-131'in radyoaktivitelerinin hücresel düzeyde etkileri görülmeye çalışıldı. I-125 işaretli örnekler ile I-131 işaretli örnekler şekil görüldüğü gibi farklı flasklarda çalışıldı.



Şekil 3.11 Farklı spesifik aktivitelere iyot kullanılması HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin incelenmesi çalışması.

U-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil örneklerinin her bir göz için miktarları 30 µg/mL olarak sabit tutulurken, bu miktarlar her bir göz için 1 µCi/mL, 3 µCi/mL, 10 µCi/mL, 30 µCi/mL ve 100 µCi/mL spesifik aktiviteye sahip I-125 ve I-131 ile iodojen metodu kullanılarak ayrı ayrı işaretlendi. İşaretlemenin ardından farklı spesifik aktivitelere sahip olan I-125 işaretli urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil örnekleri ile I-131 işaretli urasil-O glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil örnekleri farklı falkon tüplerinde bulunan besiyerlere eklendi ve karıştırıldı. HuTu-80 hücreleri üzerindeki besi ortamları uzaklaştırılıp hücreler %0.9 luk NaCl ile yıkandıktan sonra 0.5 mL işaretli besiyer her bir göze eklendi. 30 dakika inkübasyon süresinden sonra işaretli besiyerler hücreler üzerinden alındı. Tekrar %0.9 luk NaCl ile yıkandı ve her bir göze 200 µL Ripa çözeltisi eklendi. Pipet ucu ile kazıyarak hücrelerin yüzeyden kaldırılması sağlandı. Çözeltinin 50 µL sinde protein analizi yapıldı. 100 µL'lik çözeltide ise sıvı sintilasyon cihazı ile aktivite sayımı yapıldı.

Yapılan bu çalışma ile işaretlemede kullanılan artan spesifik aktivitelere I-125 ve I-131'in HUTU-80 ince bağırsak hücreleri üzerindeki bağlanma etkinlikleri incelenerek artan aktivitenin hücreler üzerindeki hasar etkisi ortaya konuldu. Aynı zamanda I-125 ve I-131'in hücreler üzerindeki etkisi karşılaştırıldı.

3.8 İstatistik Analizler

Çalışmalardan elde edilen sonuçların istatistik analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapıldı. Her bir parametre için iki ayrı denemede toplam altı tekrar yapıp, ortalama bağlanma değerleri ile standart sapmaları hesap edilmiştir. Her bir parametre seviyesi için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını belirlemek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. I-125 ve I-131'in farklı spesifik aktivitelerde kullanılması ile elde edilen bağlanma değerlerinin incelenmesinde de lineer regresyon analizi yapılmıştır. 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 Urasil Glukuronid'in HuTu-80 Hücrelerinden Ayrılan Mikrozomal UDPGT Kullanılarak Enzimatik Sentezi

Uridin difosfo-glukuroniltransferaz (UDPGT) içeren sıçan veya diğer hayvan karaciğerinden çıkarılan mikrozom preparatları kullanılarak çeşitli moleküllerin glukuronide sentezi ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (Kim and Wainer, 2005, 2006; Khymenets et al., 2006). Bu çalışmalar ADEPT prodrug oluşturma veya ilaç metabolitlerinin incelenmesi gibi çeşitli amaçlar taşımaktadır. Aynı amaçla insan mikrozom preparatlarının kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur (Ethell, 2003; Vashishtha, 2000). Ancak kanser hücrelerinden mikrozom preparatları çıkararak enzimatik sentez yapılması ile ilgili olarak sadece bir çalışmada MCF7 meme kanseri hücrelerinden çıkarılan mikrozom preparatı çıkarılarak tümöre spesifik mucin antijen konjugatı hazırlanmıştır. Bu çalışmada hazırlanan MUC6-Tn glycoproteinlerinin tümöre spesifik olduğu ve immunoterapide kullanılabileceği rapor edilmiştir (Freire et al., 2006).

UDP-glukuronil transferaz ve UDP glukuronik asit kullanılarak yapılan enzimatik glukuronid sentezine kullanılan substratın türü, enzim konsantrasyonu, reaksiyon zamanı, enzim hazırlandıktan sonra kullanılıncaya kadar geçen zaman, solvent türü ve konsantrasyonu gibi parametrelerin etkili olduğu rapor edilmiştir. Stevenson ticari UDP-glukuronil transferaz kullanarak yapılan benzil glukuronid'in enzimatik

sentezi için 20 mg/ml enzim konsantrasyonunu optimum verirken bu çalışmada 150 mg/ml enzim konsantrasyonu seçilmiş ve iki farklı ürün için toplam $\%22.95 \pm 2.4$ glukuronidasyon verimi elde edilmiştir. Stevenson'a göre 10 saatten daha az ve 30 saatten daha çok olan reaksiyon sürelerinde verim düşmektedir (Stevenson and Hubl, 1999). Bu çalışmada reaksiyon süresi olarak 18 saat seçilmiştir. Yine Stevenson'a göre DMSO etil alkole göre daha iyi bir solventtir. Bu çalışmada da solvent olarak DMSO kullanılmıştır. Bu çalışmada enzim hazırlandıktan sonra sentez için hemen bekletilmeden kullanılmış. Yaklaşık 6 ay ve 1 yıl sonra yapılan ikinci ve üçüncü sentezde de benzer sonuç elde edilmiştir. Stevenson çalışmasında 8 mM UDPGA kullanırken bu çalışmada 10 mM UDPGA kullanılmıştır.

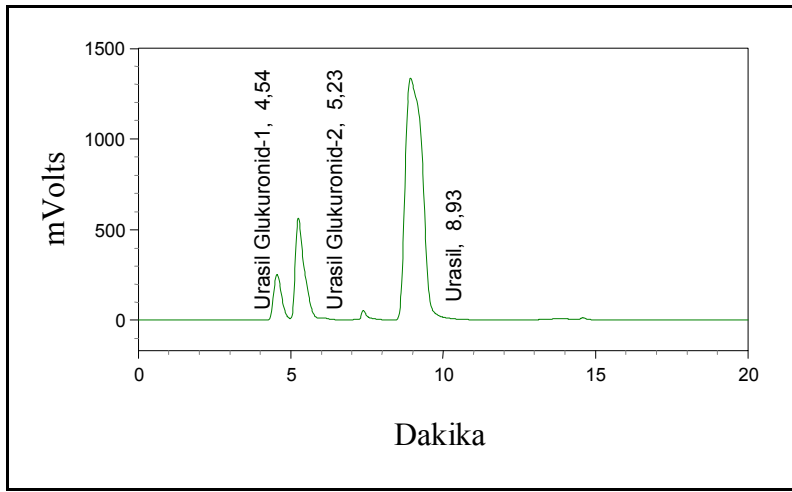
Trans-3'-hydroxycotinine de metabolize olduğunda insan idrarında yalnızca o-glukuronidi görülürken insan karaciğer mikrozoamları kullanılarak yapılan enzimatik sentezde n- ve o-glukuronidleri tespit edilmiştir (Yamanaka, 2005).

4.2 HPLC Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar

30°C, 0.4 mL akış hızı ve 254 ile 280 nm dalga boyları koşullarında analitik RP-C18 (250 x 4.6mm I.D) kolon kullanılarak Çizelge 4.1'de gösterilen koşullarda urasil ve urasil glukuronid (U-Glu)'e ait kromatogram Şekil-4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.

Kolon	RP-C18 (250 x 4.6 mm I.D)
Akış hızı	0.4 mL / dak.
Dalga boyu	254 nm ve 280 nm
Mobil faz	3.10-3M Tetrametil Amonyum Hidroksit %50 3.10-3M Formik asit %50 (pH=8)



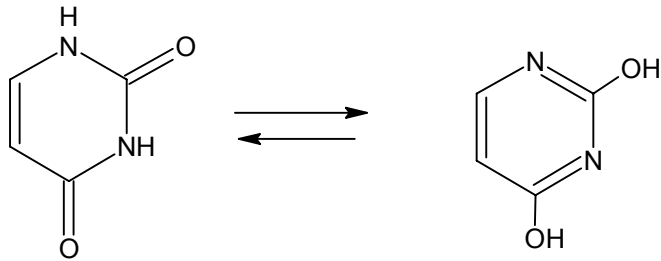
Şekil 4.1 Urasil glukuronid (U-Glu) ve Urasil (U)'in RP-C18 kolonu (250 x 4.6 mm I.D.) ile elde edilen HPLC kromatogramı.

Çizelge 4.1'de gösterilen koşullarda, C18 kolonunda 280 nm'de UV dedektöründen alınan bileşiklere ait Rt (Alıkonma Zamanı) değerleri urasil için 8.93 iken, Glukuronidasyon sentezi ile oluşturulan iki farklı urasil glukuronid (U-Glu) ürünü için 4.54 ve 5.23 dür.

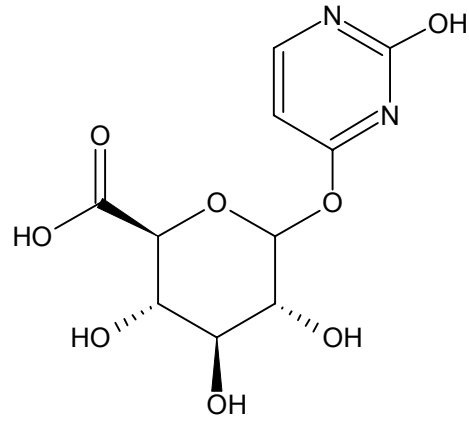
Glukuronidasyon reaksiyonları sonucu elde edilen iki farklı urasil glukuronid (U-Glu) bileşiğinin reaksiyon verimi HPLC kromatogramlarından hesaplanan pik alanlarının oranı ile hesaplanmıştır. Üç kez tekrarlanan glukuronidasyon reaksiyonu sonucunda verim $\%22.95 \pm 2.4$ olarak bulunmuştur.

4.3 Pik 1 ve Pik 2'nin moleküler yapıları

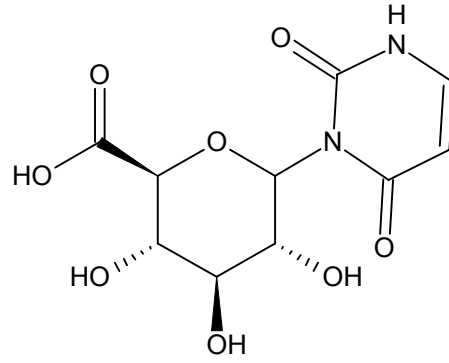
Pik 1 ve Pik 2'nin urasil'in Şekil 4.2'de gösterilen tautomerik denge sonucu oluşan amid- iminol yapıları nedeniyle oluşan o-glukuronid ve n-glukuronidler olması muhtemeldir. O- ve N-glukuronidlerin beklenen yapıları Şekil 4.3 ve şekil 4.4'de gösterilmiştir. Bu durumda pik 1'in yapısı Şekil 4.3, pik 2'nin moleküler yapısı Şekil 4.4'deki gibidir.



Şekil 4.2 Urasil'in Tautomerik formları



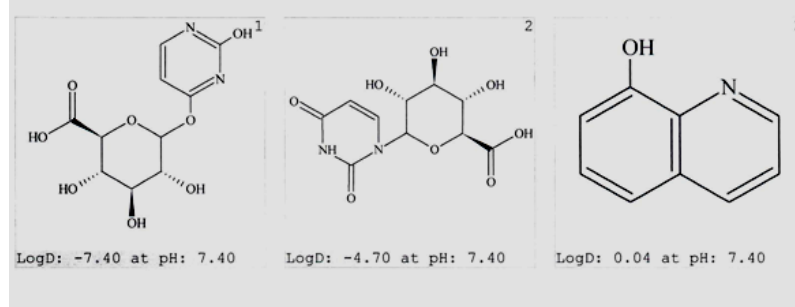
Şekil 4.3 Urasil-O-Glukuronid (pik1)



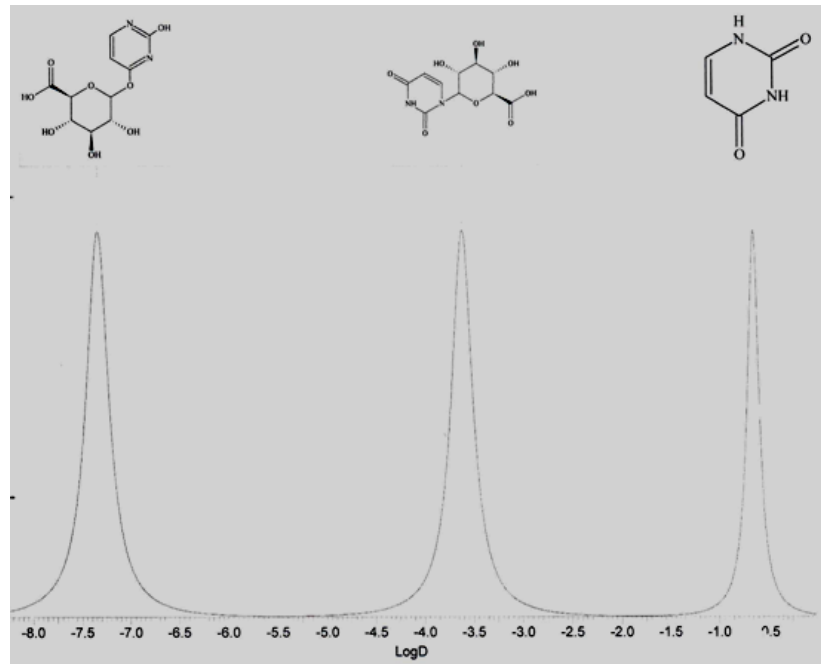
Şekil 4.4 Urasil-N-Glukuronid (Pik2)

Urasil-O-Glukuronid ve U-N-Glukuronid'in ACD/Log P Algorithm programı kullanılarak teorik lipofilite ve teorik HPLC kromatogramları bulunmuştur (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). Teorik lipofilite ve HPLC simulasyon kromatogramları Şekil 4.7'deki deneysel

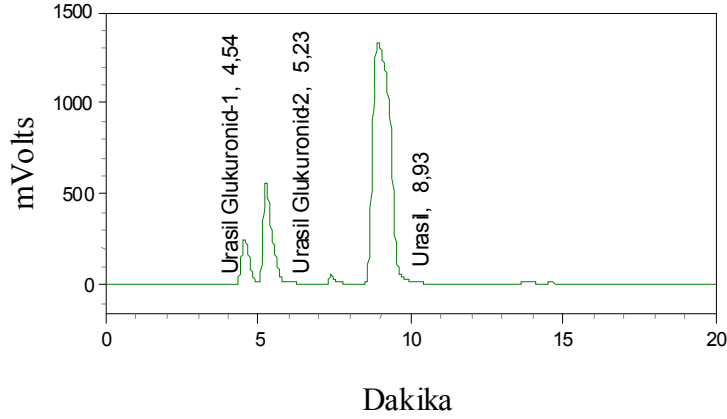
kromatogramlar ile karşılaştırıldığında birinci pikin urasil-o-glukuronid ikinci pikin de urasil-n-glukuronid olduğu anlaşılmaktadır.



Şekil 4.5 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin teorik lipofiliteeri



Şekil 4.6 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin teorik HPLC kromatogramı



Şekil 4.7 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid ve urasilin deneysel HPLC kromatogramı

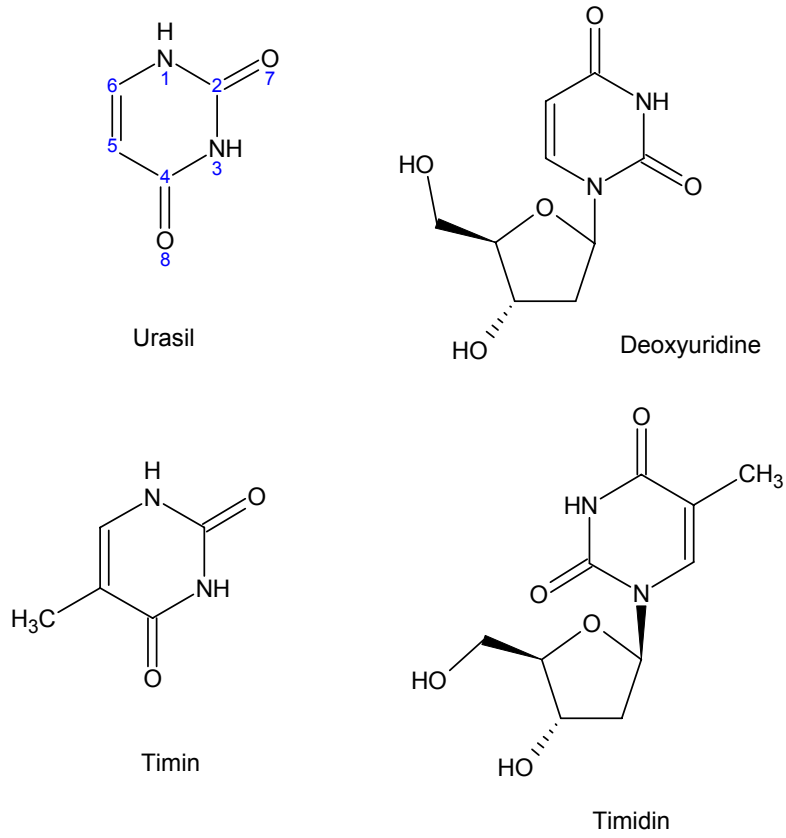
4.4 Radyoyodinasyon Sonucu Radyoyot İşaretli (I-131/I-125) Moleküllerde Beklenen Yapı

Urasili'nin iodogen yöntemi ile radyoyodinasyonuna ilişkin bir çalışma bulunamamıştır. Ancak IUdR iodogen yöntemi de dahil çeşitli yöntemler ile işaretlenmiştir (Guenther et al., 1998; Foulon Et al., 1995, 1996). Bunun dışında iodogen 5-Iodo-4'-thio-2'-deoxyuridine (ITdU) ve 5-iodo-1-(4-thio-beta-D-arabinofuranosyl)uracil (ITAU) gibi IUdR türevi bir molekül trimetil stannil türevinin hidrolizi ile I-125 ile %99 verimle işaretlenmiştir. IUdR ile şeker molekülü üzerindeki O atomunun S ile substitue olmuş olan bu molekülün bazı organlarda IUdR den daha fazla alıkonulduğu bulunmuş ve bu molekülün IUdR gibi bir DNA sentez işaretleyicisi ve SPECT de kullanılabilir bir tümör görüntüleme ajanı olabileceği rapor edilmiştir. Tiyotimidin C-11 ile de işaretlenmiş ve bu

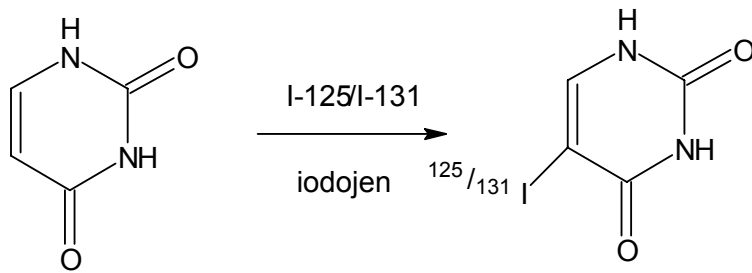
çalışmada da PET tümör görüntüleme ajanı olabileceği rapor edilmiştir (Toyohara et al., 2008). Diğer bir urasil türevi olan cis-1-[4-(hydroxymethyl)-2-cyclopenten-1-yl]-5-[124I] iodourasil de organo kalay arabileşikleri üzerinden %80 verim %95 radyokimyasal saflıkta hazırlanmış ve mikroPET çalışmalarıyla HSV1-tk-taşıyan hücreler için görüntüleme ajanı olabileceği gösterilmiştir (Ahn et al., 2007).

Glukuronid bileşiklerinin radyoiyodinasyonuna ilişkin ise yine grubumuzca yapılmış farklı bazı glukuronid bileşiklerinin radyoiyodinasyonuna ilişkin bazı çalışmalar mevcuttur (Özdemir and Unak, 1994; Unak and Unak, 1996; Unak et al., 1997; Aşıkoğlu et al., 2000; Unak et al., 2007; Avcıbaşı et al., 2008).

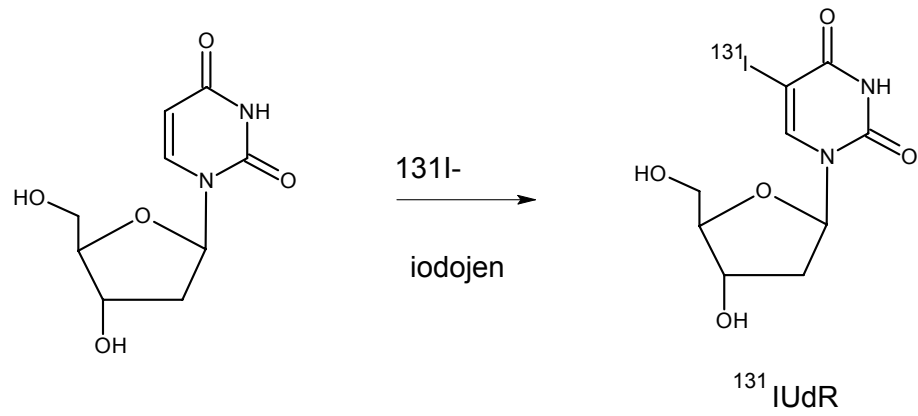
Şekil 4.8 de gösterilen Urasili'in deoxyuridin ile yapısal benzerliği de göz önüne alınarak 5 inci carbon atomu iyotlanarak iyodibasyon sonucu yapının timin'e benzemesi gerekmektedir.



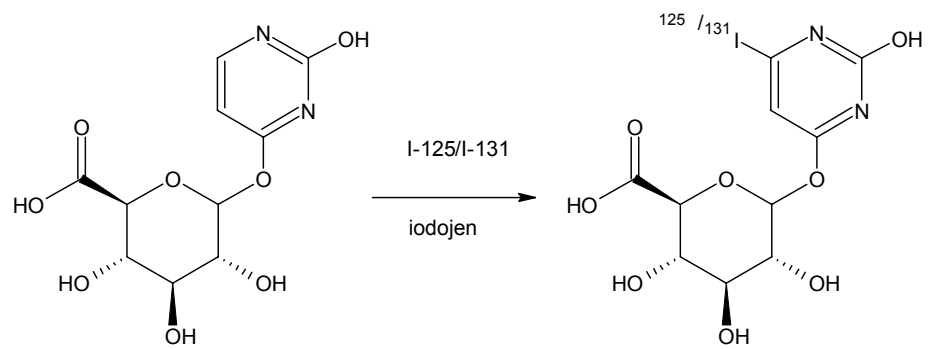
Şekil 4.8 İşaretli bileşiğe ait kimyasal yapıyı göstermektedir.



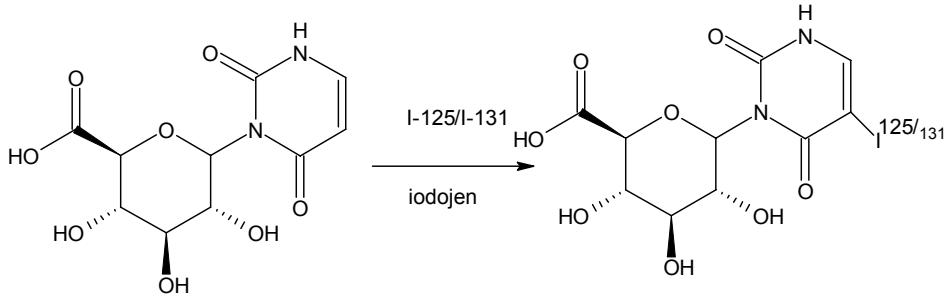
Şekil 4.9 Urasil'in I-131/I-125 ile işaretlenmesi



Şekil 4.10 2'-Deoksiuridin (UdR) ^{131}I ile işaretlenmesi



Şekil 4.11 Urasil o- glukuronid (U-Glu) ^{131}I ile işaretlenmesi



Şekil 4.12 Urasil n glukuronid (U-Glu) ^{131}I ile işaretlenmesi

Bu çalışmada urasil, urasil glukuronid, UdR iodojen yöntemine göre I-131 ile sırasıyla 96.01 ± 1.7 , 96.91 ± 0.9 ve 91.99 ± 1.2 gibi iyi bir verimle işaretlenmişlerdir. Ayrıca I-125 ile işaretleme verimleri de oldukça yüksek olup urasil-o-glukuronid için 93.86 ± 1.5 , urasil-n-glukuronid için 95.04 ± 1.1 ve urasil için 94.19 ± 1.7 dir. İdojen, 1,3,4,6-tetrachloro-3 alpha, 6 alpha-diphenylglucoluril açık isimli bir yükseltgeyici ajandır ve iyodun yükseltgenmesi sırasında elektrofilik substitusyon ile yer değiştirmesine dayanır ve bu substitusyonu yapabilen pek çok farklı molekülün radyoiyodinyasyonunda kullanılmıştır (Özdemir and Unak, 1994; Unak and Unak, 1996; Unak et al., 1997; Aşıkoğlu et al., 2000; Unak et al., 2007; Avcıbaşı et al., 2008). İdojenin oksidasyon mekanizması çok açık olmamakla beraber yapıdaki iki karbonil grubunun yükseltgeme mekanizmasında rol oynadığı düşünülmektedir.

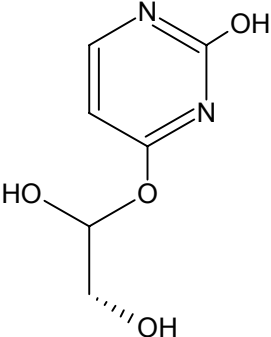
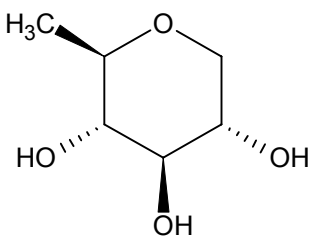
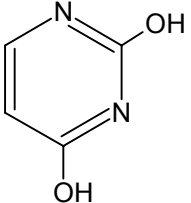
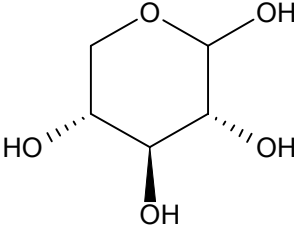
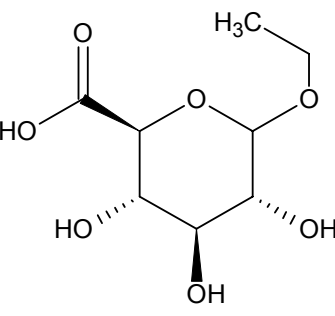
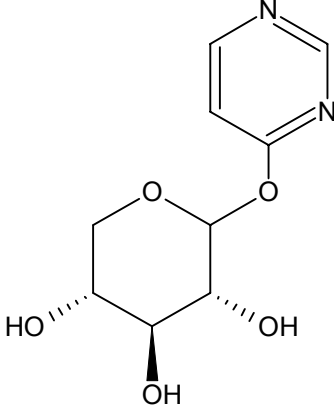
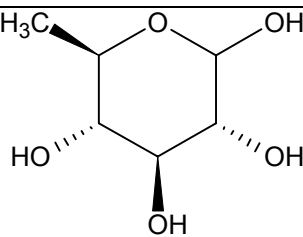
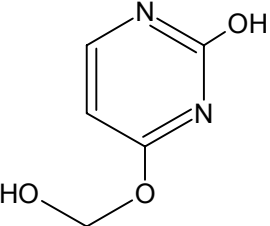
4.5 Urasil Glukuronid'in (U-Glu) Yapı Tayini

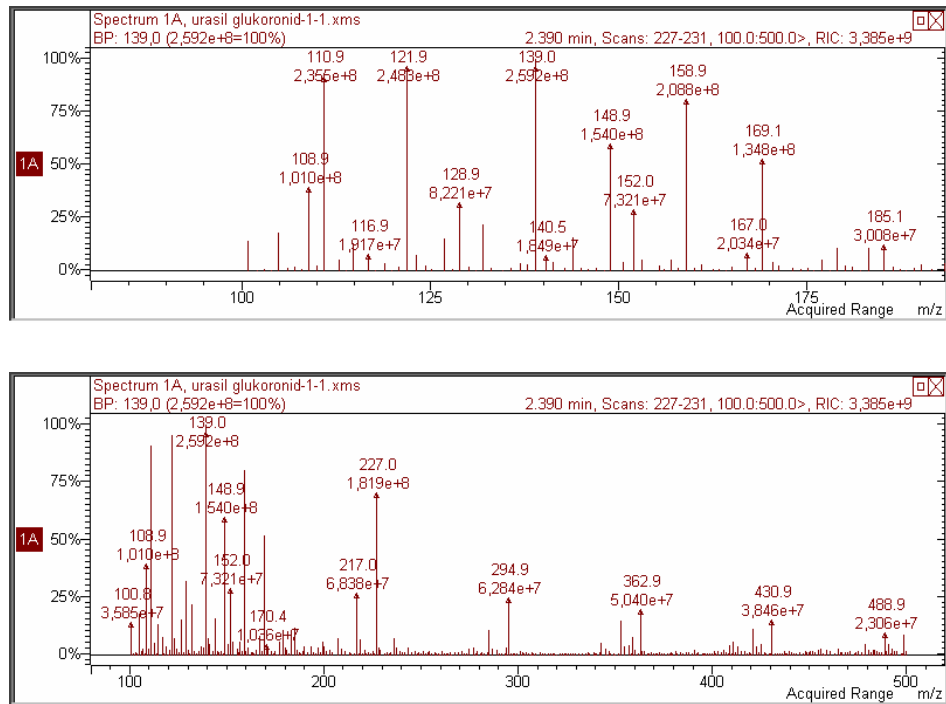
4.5.1 HPLC-MS sonuçları

Urasil-o-glukuronid ve Urasil-n-glukuronid'in enzimatik sentezi üç kez tekrarlanmış ve örneklerin pozitif ESI spektrumları LC-MS/MS (Zivac-Tandem Gold) cihazında farklı zamanlarda alınarak spektrumlar incelenmiş ve bu şekilde deneylerin tekrarlanabilirliği de ortaya konulmuştur.

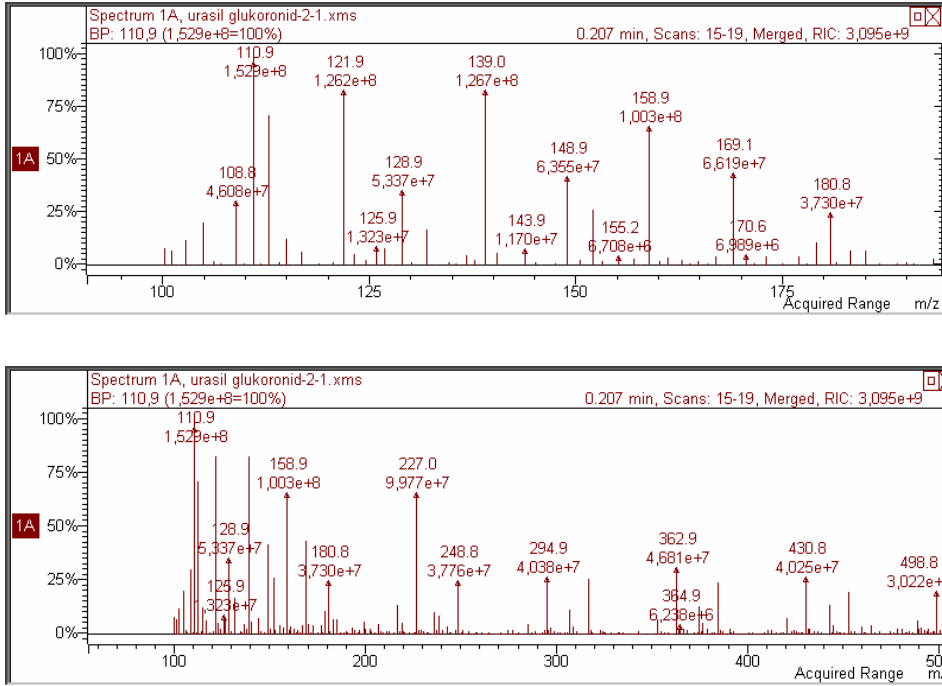
Sonuçlar her iki bileşiğin benzer spektrumlar verdiğini ve önceki spektrumlar ile uyum içinde olduklarını göstermiştir. LC-MS/MS spektrumlarında görülen belli başlı tanımlanabilen pikler Çizelge 4.2'de verilmiştir. LC-MS/MS spektrumları ise Şekil 4.13 ve Şekil 4.14'de yer almaktadır.

Çizelge 4.2 LC-MS/MS spektrumlarında görülen belli başlı tanımlanabilen pikler.

Fragman	m/z	Fragman	m/z
	169		144
	111		148
	217		227
	159		139



Şekil 4.13 Urasil-o-glukuronid'in (Pik1) pozitif ESI spektrumu



Şekil 4.14 Urasil-n-glukuronid'in (Pik 2) pozitif ESI spektrumu

4.5.2 IR sonuçları

Kırmızı ötesi (infrared) ışınması, elektromanyetik spektrumda görünür bölge ve mikro dalgalar arasında bulunur ve dalga boyu 0.8-500 μm (dalga sayısı $12500\text{-}20\text{cm}^{-1}$) olan ışımadır. 0.8-2.5 μm ($12500\text{-}4000\text{cm}^{-1}$) bölgesine yakın kırmızı ötesi, 2.5-25 μm ($4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$) bölgesine kırmızı ötesi ve 25-500 μm ($400\text{-}20\text{cm}^{-1}$) bölgesine uzak kırmızı ötesi denir. Bazı kaynaklarda kırmızı ötesi ışınmanın sınırı 2.5-15 μm ($4000\text{-}666\text{cm}^{-1}$) olarak verilir. Kırmızı ötesi spektrumları her iki sınır

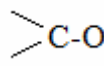
içinde de kaydedilebilir. Yakın kırmızı ve uzak kırmızı ötesi bölgeleri organik yapı analizinde pek yararlı değildir.

Kırmızı ötesi spektrumları iki türlü bilgi verir;

- Organik bileşiklerin yapısındaki fonksiyonel gruplar bulunur,
- İki organik bileşiğin aynı olup olmadığı tespit edilir.

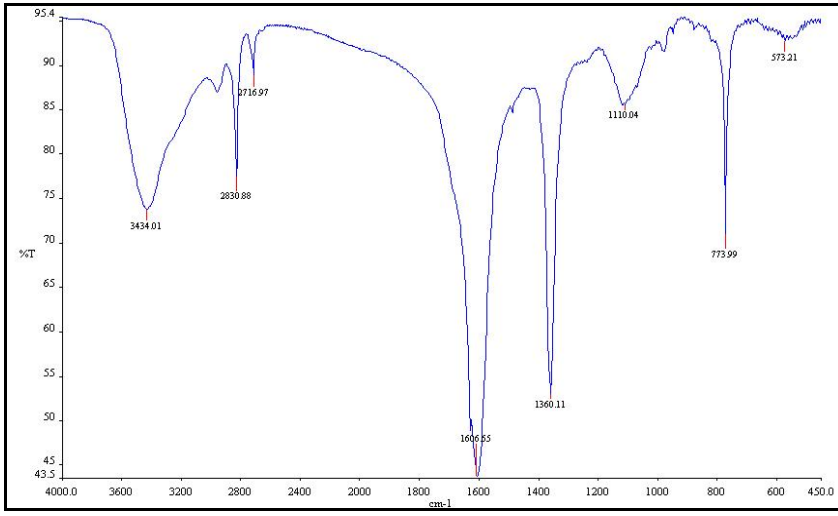
Tüm bu bilgiler ışığında ve IR spektrumları incelendiğinde bileşiklerin yapılarındaki fonksiyonel gruplar Çizelge 4.3'deki gibi gösterilebilir.

Çizelge 4.3 Urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid, urasil ve silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid, urasil-n-glukuronid, urasilin IR spektrumları.

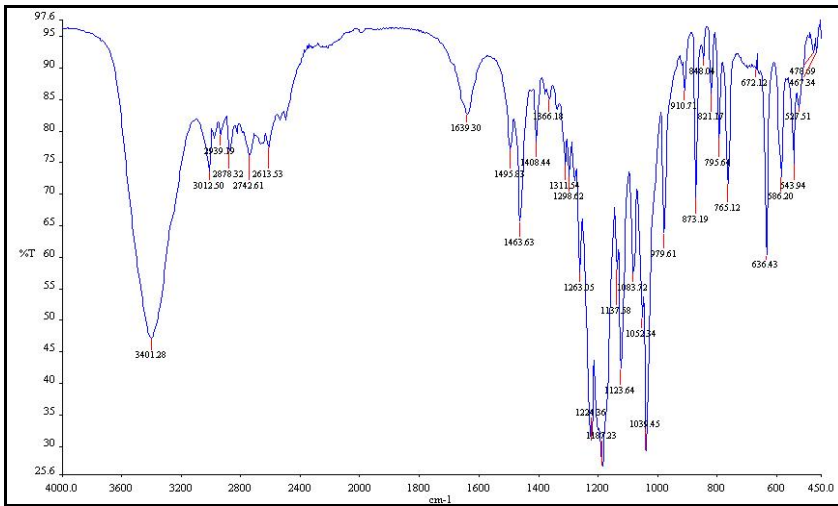
$\square \text{ cm}^{-1}$	Grup	Açıklama
3600-3400	O-H gerilmesi	3600 cm^{-1} assasiye olmamış O-H, 3400 cm^{-1} (geniş) assasiye O-H her iki band alkol spektrumlarında görülür, şiddetli assasiye O-H bandı (COOH bileşikleri) çok geniştir (500 cm^{-1}) ve merkezi 2900-3000 cm^{-1} 'e kayar
3400-3200	N-H gerilmesi	3400 cm^{-1} (kesin) assasiye olmamış N-H, 3200 cm^{-1} (geniş) assasiye N-H, -NH ₂ grubu, genellikle iki pik verir.
2980-2900	C-H gerilmesi	Bu bölgede soğurmanın olmaması alifatik karbona bağlı hidrojen bulunmadığını gösterir.
2000-2500	Si-H gerilmesi	Bu bölgede Si-H grubu pik verir.
1720-1710	C=O gerilmesi	Bu değer asiklik, konjuge olmamış ve karbonil yanında elektronegatif atomlar bulunmayan aldehitler ve ketonlar içindir. Karbonilin aromatik halkaya, çift bağa veya üçlü bağa konjuge olması frekansı 30 cm^{-1} kadar azaltır.
1360		Bu bandların C-O eğilme veya gerilme titreşimlerinden oluştuğu pek kesin değildir. Alkollerin, eterlerin ve esterlerin spektrumlarında bu bölgede bir veya iki kuvvetli band bulunur.
1250	Si(CH ₃) ₃ ve Si(CH ₃) ₂ gerilmesi	Silanlı manyetik parçacıklarda 1200 cm^{-1} bölgesinde pik vermiştir.
1100-900	Silikat gerilmesi	1039 cm^{-1} de silikatlara ait olan pikleri vermiştir.
325-675	Si(OCH ₃) ₃ , SiH ₃ ve SiH ₂ gerilmeleri	Manyetik parçacıklarda bulunan silanlı bileşikler 325-675 cm^{-1} bölgesinde yoğun pik verir.

Bu verilerden yola çıkarak urasil-o-glukuronid ile silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid'in IR spektrumları kıyaslandığında; yaygın OH piki şiddetinin silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid de biraz daha arttırarak yayganlığını azalttığı gözleniyor. Ayrıca urasil-o-glukuronid de gözlenen şiddetli (1606.65 cm^{-1}) C=O piki şiddetinin, silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid bileşiğinde dikkate değer bir şekilde azaldığı gözlenmiştir (1639.30 cm^{-1}). Ayrıca $1400-600 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki yoğunluk silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid'in urasil-o-glukuronid'den tamamen farklı olduğunu ortaya koymaktadır.

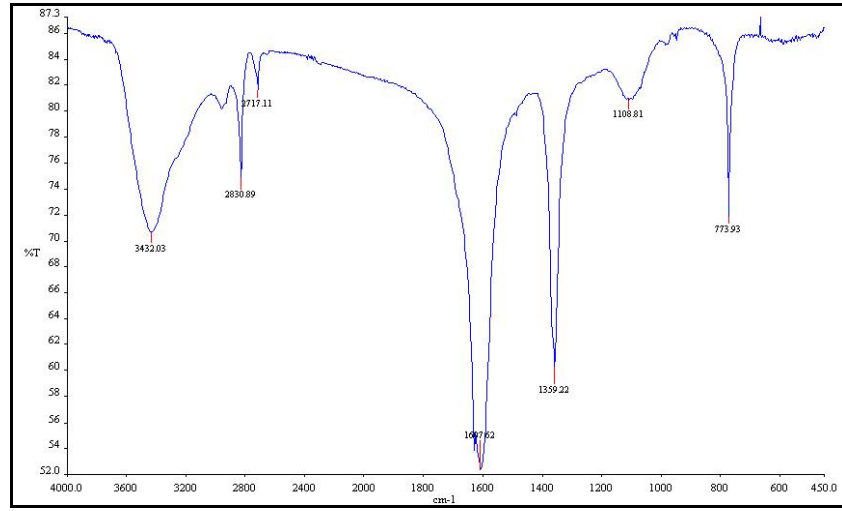
Urasil-n-glukuronid ile silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-n-glukuronid'in ve urasil ile silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil'in IR spektrumları incelendiğinde yukarıdaki açıklama ile benzerlik göstermekte ve bu bileşikler için de aynı yorumlar yapılmaktadır.



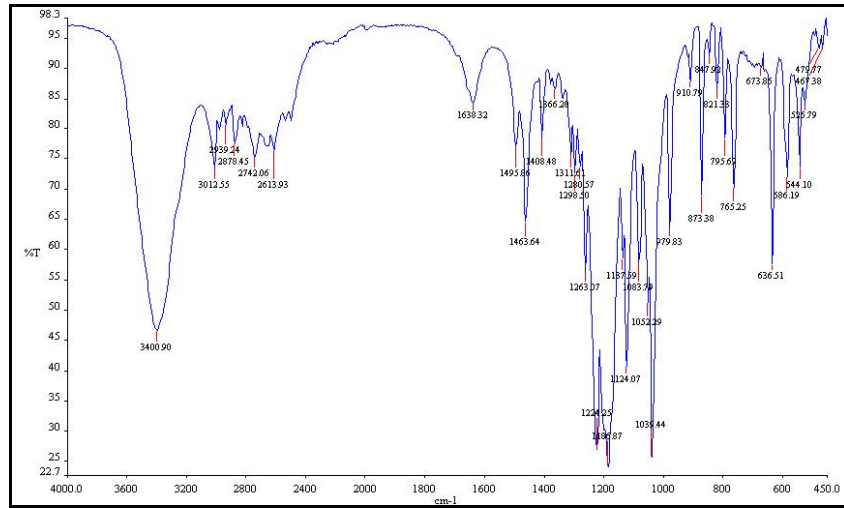
Şekil 4.15 Urasil-o-glukuronid'in IR spektrumu.



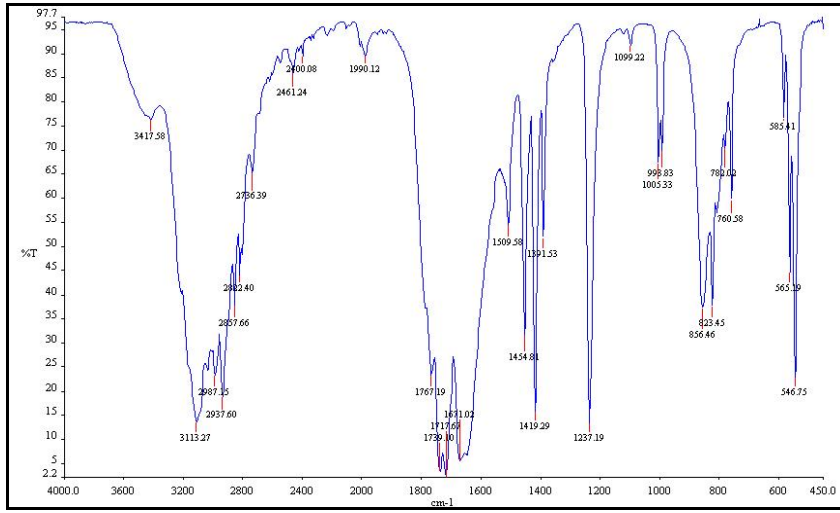
Şekil 4.16 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid'in IR spektrumu.



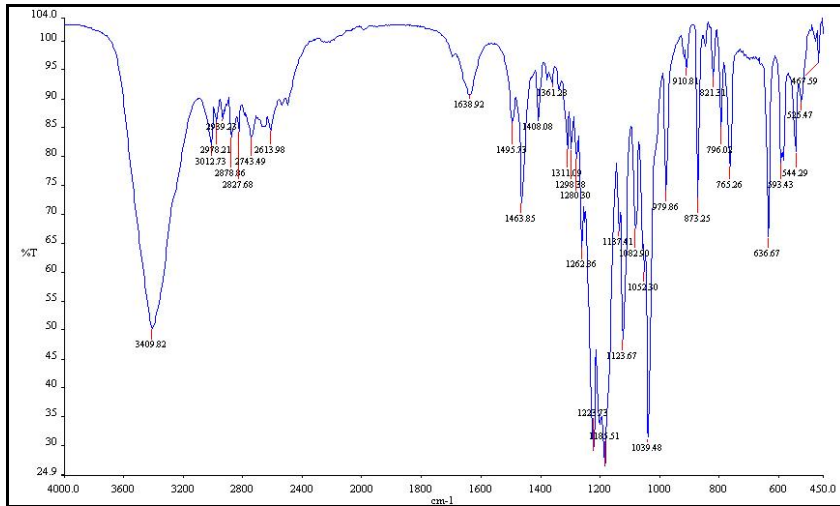
Şekil 4.17 Urasil-n-glukuronid'in IR spektrumu.



Şekil 4.18 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-n-glukuronid'in IR spektrumu.



Şekil 4.19 Urasil'in IR spektrumu.

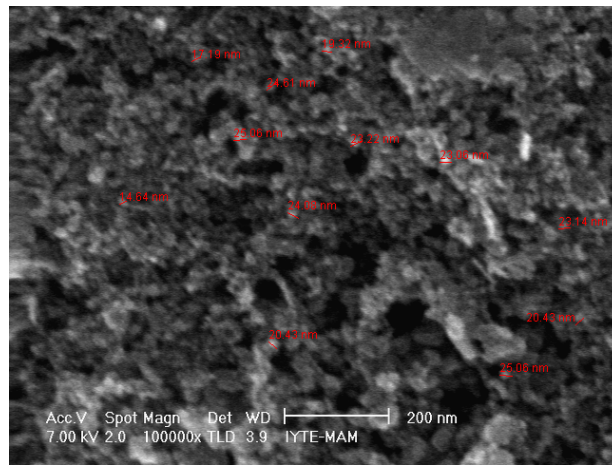


Şekil 4.20 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil'in IR spektrumu.

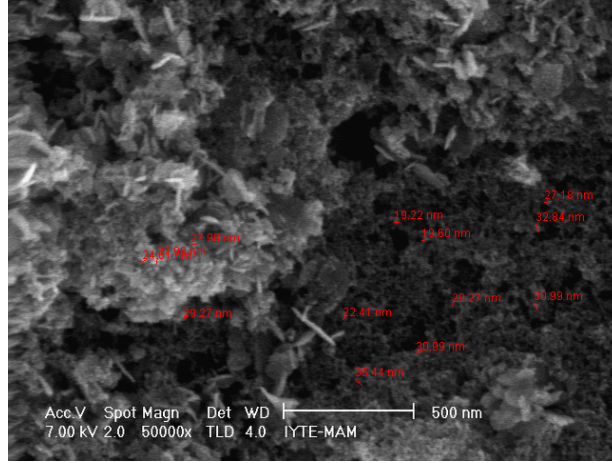
4.6 Farklı Koşullarda Hazırlanan Manyetik Nanoparçacıkların Özelliklerine Etki Eden Parametreler



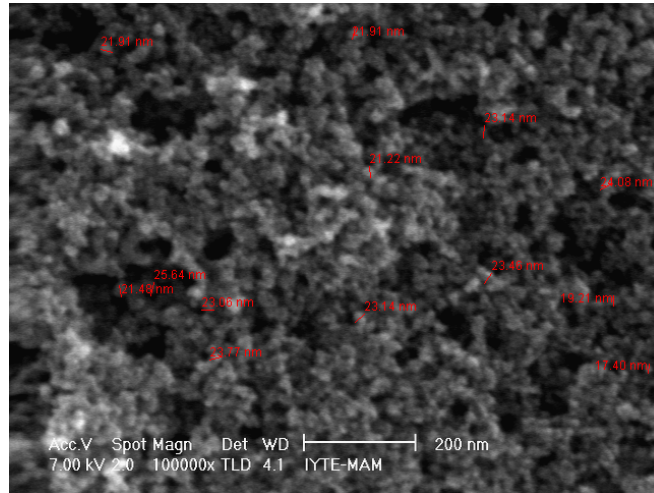
Fe^{2+} ve Fe^{3+} 'ün karıştırılması veya Fe^{3+} 'ün kısmi indirgenmesi ile elde edilen manyetik nanoparçacıkların SEM analizleri sonuçları ortalama parçacık boyutunun 10-30 nm olduğunu göstermiştir. Ayrıca SEM analizleri $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ oranı, pH, sıcaklık, baz konsantrasyonu gibi parametrelerin ortalama parçacık boyutlarını biraz değiştirdiğini göstermiştir. Parametreler sonucunda elde edilen parçacık boyutları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde aralarında anlamlı bir farklılık tespit edilememiştir ($P>0.05$).



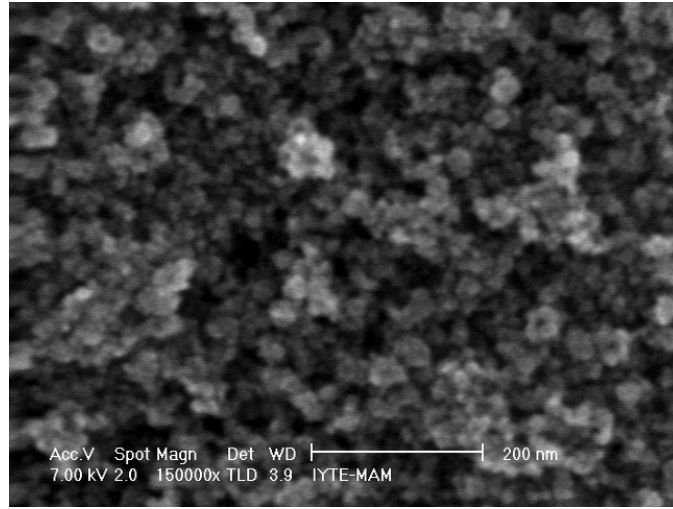
Şekil 4.21 $T=60\text{ }^\circ\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2$, NaOH 2,5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 21.6 ± 3.3 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



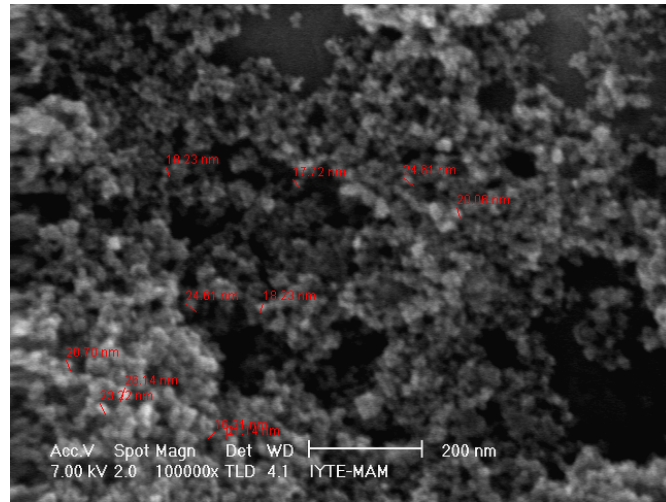
Şekil 4.22 T=60 °C; $Fe^{2+}/Fe^{3+}=2$, NaOH 10 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 27.5 ± 4.9 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



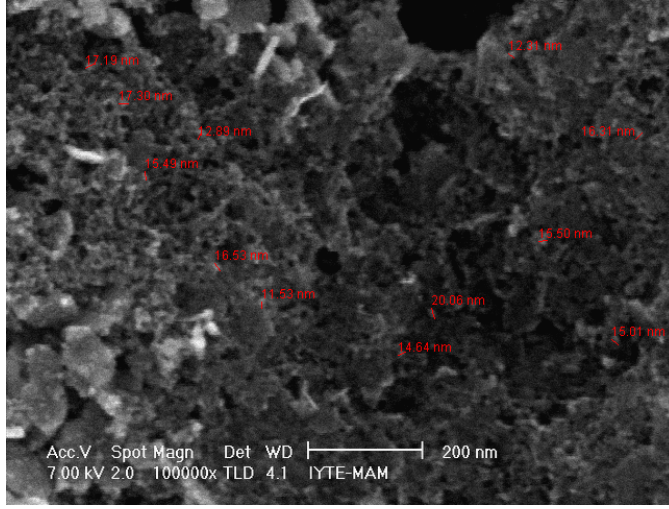
Şekil 4.23 T=25 °C; $Fe^{2+}/Fe^{3+}=2$, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 22.2 ± 2.1 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



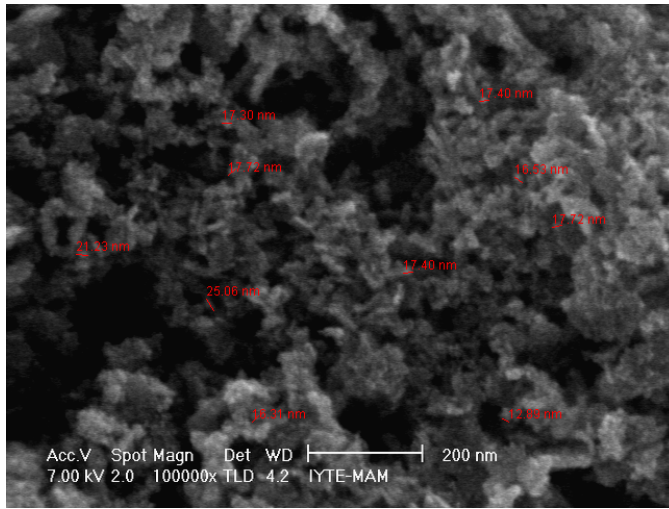
Şekil 4.24 $T=80^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2$, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 13.2 ± 5.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



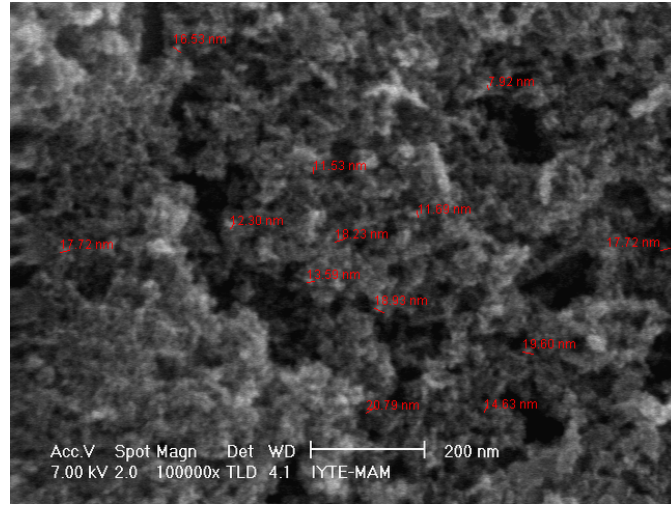
Şekil 4.25 $T=60^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2$, NaOH 5 M, pH 8 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 21 ± 3.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



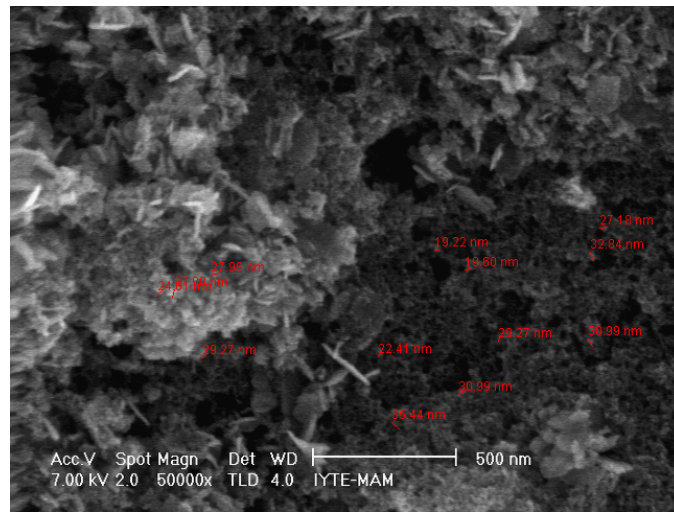
Şekil 4.26 $T=60^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2$, NaOH 5 M, pH 12 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 15.4 ± 2.3 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



Şekil 4.27 $T=60^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=0.5$, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 17.9 ± 3.2 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



Şekil 4.28 $T=60^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=1$, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 15.4 ± 3.8 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.



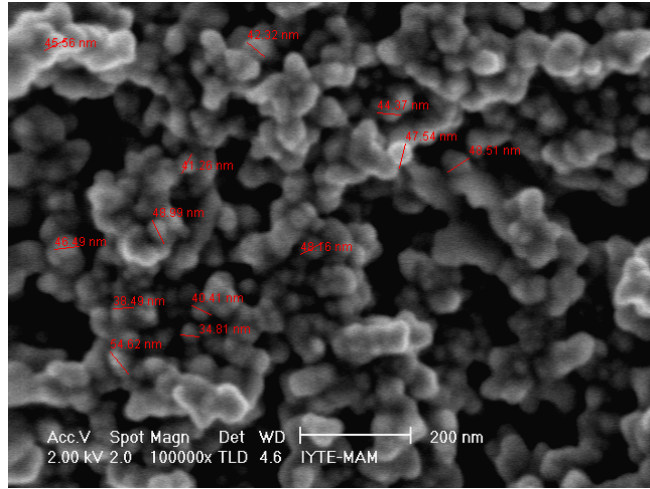
Şekil 4.29 $T=60^{\circ}\text{C}$; $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}=2$, NaOH 5 M, pH 10 koşullarında hazırlanan dextran kaplı manyetik parçacıkların boyutunu 27.5 ± 4.9 nm olarak gösteren SEM görüntüsü.

4.7 Manyetik Parçacıkların Özelliklerinin İncelenmesi

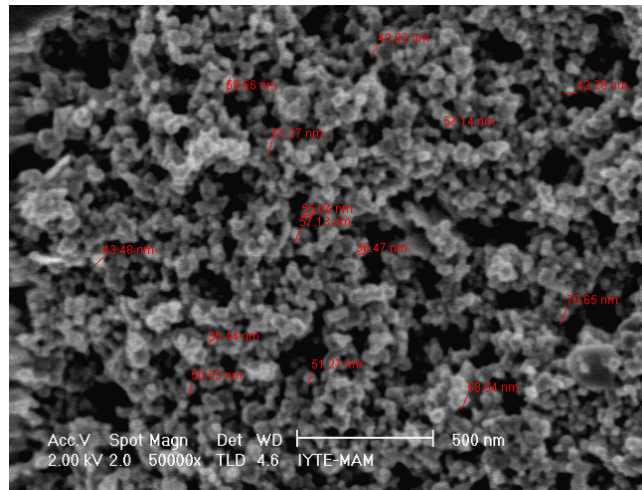
4.7.1 Fe₃O₄ manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

4.7.1.1 SEM analiz sonuçları

Manyetik parçacıkların yüzey morfolojisi ve boyut analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleri alınarak incelenmiştir. Örneklerin analize hazırlanmak için nanoparçacıklar etanol-su çözeltisiyle 3 kez yıkandıktan sonra metanol içerisinde bekletildi. Daha sonra SEM cihazına ait çelik plakeler üzerine konularak görüntüleri alındı. SEM görüntüleri ile manyetik parçacıkların ortalama olarak 40-55 nm aralığında ve küresel olduğu tespit edilmiştir.



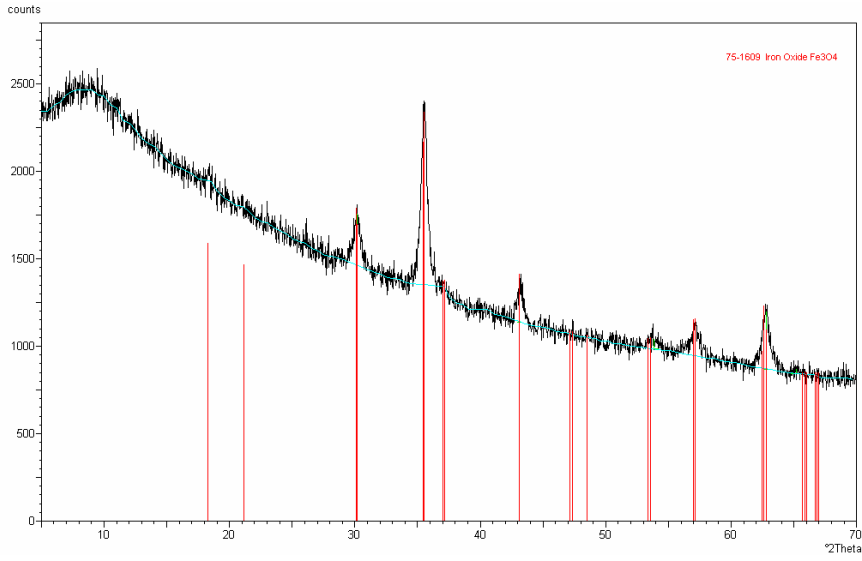
Şekil 4.30 Fe₃O₄ manyetik parçacıkların 100.000 büyütmede SEM görüntüsü.



Şekil 4.31 Fe₃O₄ manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.

4.7.1.2 XRD analiz sonuçları

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde yapılan XRD analiz sonuçları ile manyetik parçacık örneklerinden elde edilen x-ışını kırılım deseninin Fe_3O_4 kırınım piki ile eşleştiğini göstermiştir (Şekil 4.32).

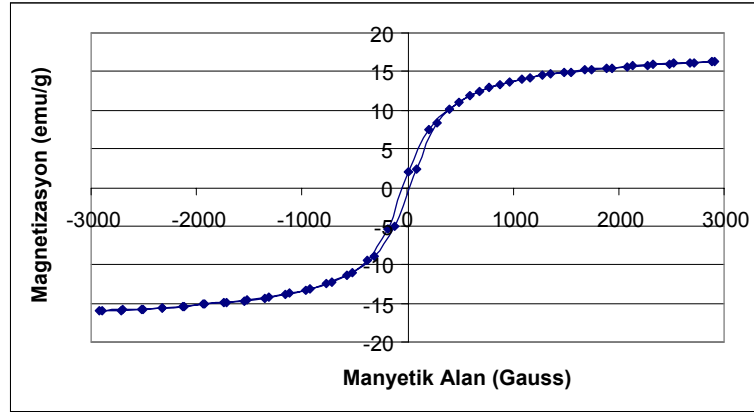


Şekil 4.32 Fe_3O_4 manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.

4.7.1.3 VSM analiz sonuçları

Manyetik parçacıkların manyetik özellikleri İzmir Yüksek Teknolojisi Enstitüsündeki VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) cihazı ile incelendi. Manyetik parçacıkların

manyetizasyon değeri 16.28 emu/g olarak Şekil 4.33’de verilen grafikten bulunmuştur.



Şekil 4.33 Fe₃O₄ manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen manyetizasyonu.

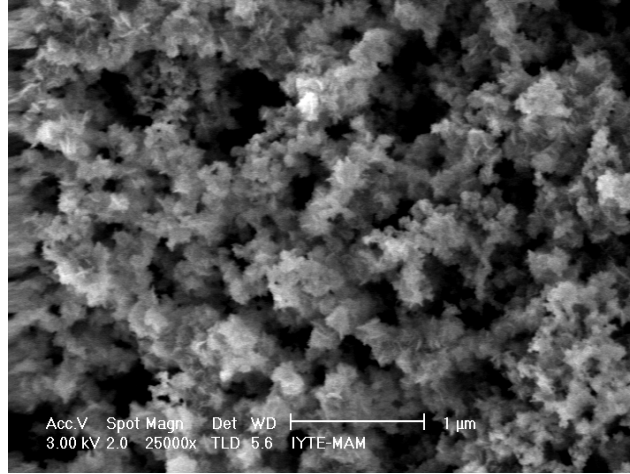
4.7.2 Yüzey modifikasyonu ile silika kaplanan manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

Silika kaplı manyetik nanoparçacıklar Fe³⁺ iyonunun azot altında sodyum sülfid ile kısmi indirgenmesine dayalı olarak yapılmıştır. Bu yöntem modifiye olarak Re-188, gibi farklı radyonüklid takılı manyetik nanoparçacıkların sentezinde kullanılmıştır (Cao et al., 2004; Qu et al., 1999). Bu çalışmada manyetik nanoparçacıkların oluşumu sırasında oluşan Fe²⁺’nin Fe³⁺’e geri yükseltmesini önlemek için azot atmosferi altında çalışılmış ve Fe³⁺/SO₃ oranı 6 alınmıştır. Cao ve ark. Re-188 işaretli nanoparçacıklar hazırlarken benzer koşulları uygularken daha eski

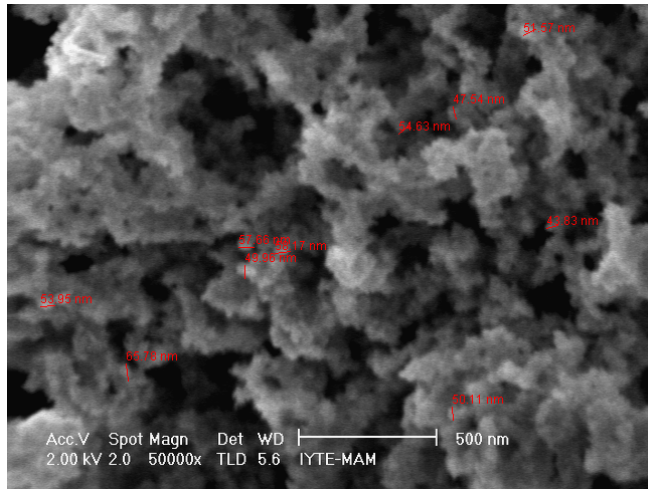
çalışmalarda bu oran azot akımı kullanılmadan 2-3 olarak uygulanmıştır (Qu ve ark., 1999).

4.7.2.1 SEM analiz sonuçları

Yüzey modifikasyonu sonrasında manyetik parçacıkların yüzey morfolojisi ve boyut analizleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde SEM (Scanning Electron Microscope) görüntüleri alınarak incelenmiştir. SEM görüntüleri silika kaplı manyetik parçacıkların boyutlarının ortalama olarak 40-60 nm aralığında olduğunu göstermiştir (Şekil 4.34 ve Şekil 4.35). Cao ve ark. hazırladıkları silika kaplı manyetit nanoparçacıkların 20 nm olduğunu rapor etmişlerdir (Cao et al., 2004). Bununla birlikte her iki çalışma sonucunda hazırlanan parçacıkların SEM görüntüleri birbirine benzer küresel görüntü vermektedir.



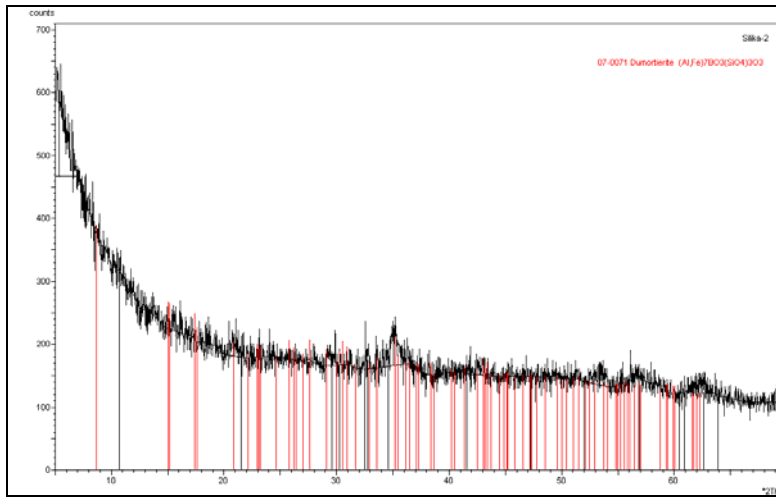
Şekil 4.34 Silika kaplı manyetik parçacıkların 25.000 büyütmede SEM görüntüsü.



Şekil 4.35 Silika kaplı manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.

4.7.2.2 XRD analiz sonuçları

Yüzey modifikasyonu sonrasında manyetik parçacıkların İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde yapılan XRD analiz sonuçları örneklerin elde edilen x-ışını kırılım deseninin Fe_3O_4 kırınım piki ile eşleştiğini göstermiştir (Şekil 4.36).

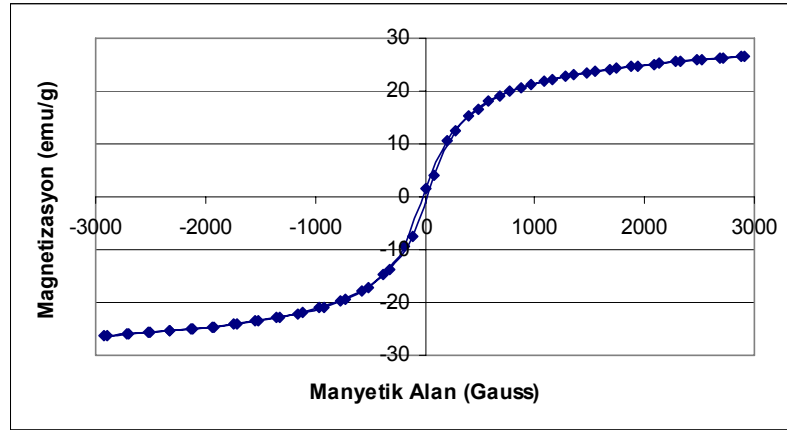


Şekil 4.36 Silikalı manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.

4.7.2.3 VSM analiz sonuçları

Manyetik parçacıkların manyetik özellikleri İzmir Yüksek Teknolojisi Enstitüsündeki VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) cihazı ile incelendi. Silika kaplı manyetik parçacıkların uygulanan manyetik alana karşı emu/g cinsinden

manyetizasyon değerleri Şekil 4.37’de verilmiştir. Hazırlanan nanoparçacıkların boyutu süperparamanyetiklik için kritik ölçü olan 25 nm den büyüktür.

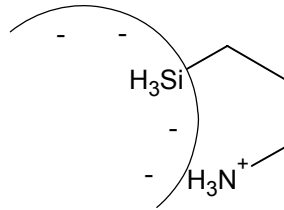


Şekil 4.37 Silika kaplı manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen manyetizasyonu

4.7.3 Amino silan ile yüzey modifikasyonu sonrası manyetik parçacıkların özelliklerinin incelenmesi

Bilinen diğer bir amino fonksiyonlama ajanı olan 3-aminopropyltriethoxysilane (APS) ile karşılaştırıldığında N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]-ethylenediamine (SG-Si900) ek ile inorganik destek ile alkiloksisilan fonksiyonu arasında daha geniş yer tutar ve daha hidrofildir. Organosilanlar kullanılarak manyetik nanoparçacıklara çeşitli gruplar takılabilecek bazı çalışmalar yapılmıştır (Del Campo et al.,

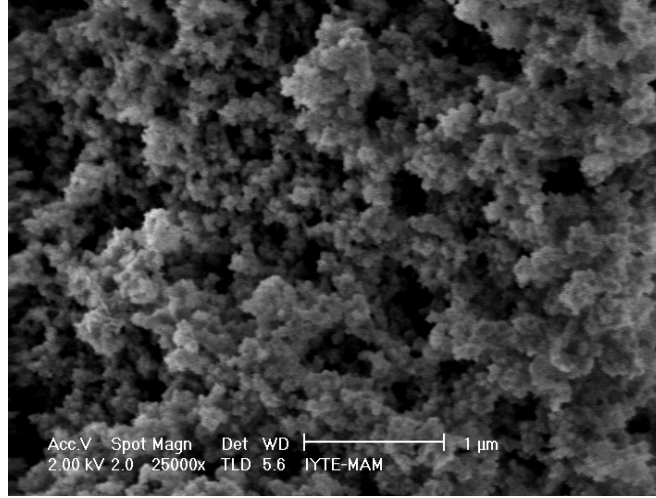
2005; Cao et al., 2004; Zhang et al., 2005; Xia et al., 2005; Woo et al., 2005; Nouze and Schubert, 2008). Organosilanlar parçacığın yüzeyinde bulunan serbest OH gruplarına kovalent olarak bağlanabilen trialkoxy veya trichlorosilane gruplarıdır. Grubun fonksiyonu sağlayan organik kısmı modifiye edilen yüzeyin kimyasal karakterini belirler (örn $-NH_2$, $-OH$, $-SH$ gibi). Alkoksilanlar ile çalışmanın bazı zorlukları vardır. Alkoksilanların neme duyarlı olmaları ve kimyasal olarak son derece reaktif yapıları eğer uygun olmayan deneysel koşullarda yapılırsa kontrol edilemeyen, homojen olmayan ve tekrarlanamayan reaksiyonlara girmelerine neden olur. Bu çalışmada silika kaplı manyetit N-[3-(trimethoxysilyl)propyl]-ethylenediamine (SG-Si900) ile yüzey modifikasyonunda basit ve etkili bir prosedür uygulanmıştır ve tekrarlanan deneylerde aynı sonuçlar elde edilmiştir. Amin aktiflenmiş yüzey daha sonraki aşamada glutaraldehitin ve urasil, NOG ve NUG nin konjugasyonu için kullanılmıştır.



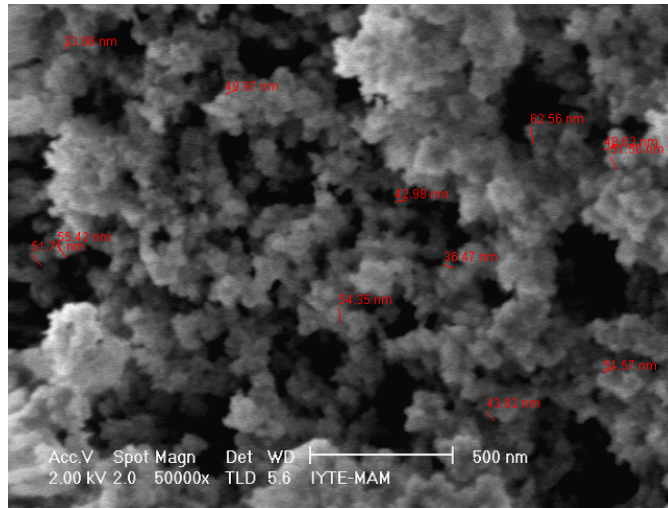
Şekil 4.38 Amin ve silan grupları arasında etkileşim sonucu nanoparçacıkların stabilizasyonu

4.7.3.1 SEM analiz sonuçları

SEM görüntüleri silika kaplı silanlanan manyetik parçacıkların boyutlarının ortalama olarak 40-60 nm aralığında olduğunu göstermiştir. Cao ve ark. hazırladıkları silika kaplı manyetit nanoparçacıkların 20 nm olduğunu rapor etmişlerdir (Cao et al., 2004). Bununla birlikte her iki çalışma sonucunda hazırlanan parçacıkların parçacıkların SEM görüntüleri birbirine benzer küresel görüntü vermektedir. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde parçacıkların silika ile kaplandıktan sonra silanlanmalarının parçacık boyutunda herhangi bir değişime sebep olmadığı tespit edilmiştir.



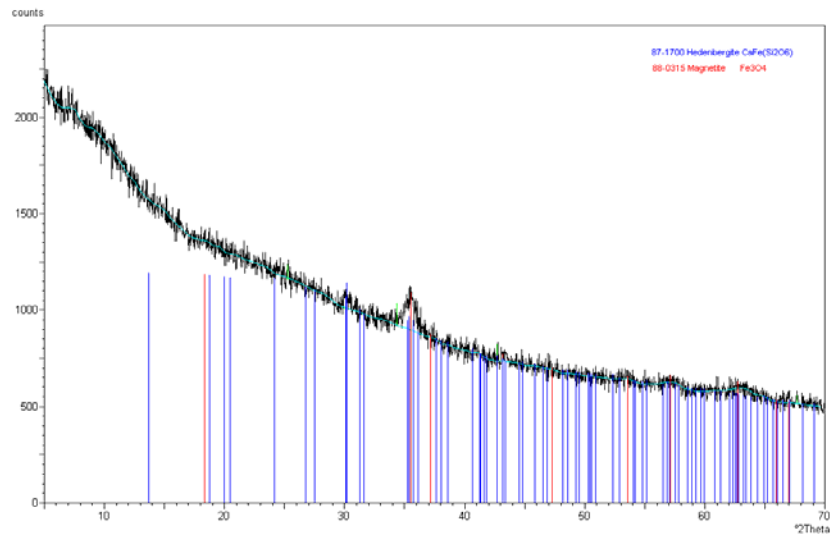
Şekil 4.39 Silanlı manyetik parçacıkların 25.000 büyütmede SEM görüntüsü.



Şekil 4.40 Silanlı manyetik parçacıkların 50.000 büyütmede SEM görüntüsü.

4.7.3.2 XRD analiz sonuçları

Yüzey modifikasyonu sonrasında manyetik parçacıkların İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsünde yapılan XRD analiz sonuçları örneklerin elde edilen x-ışını kırılım deseninin Fe_3O_4 kırınım piki ile eşleştiğini göstermiştir (Şekil 4.41).

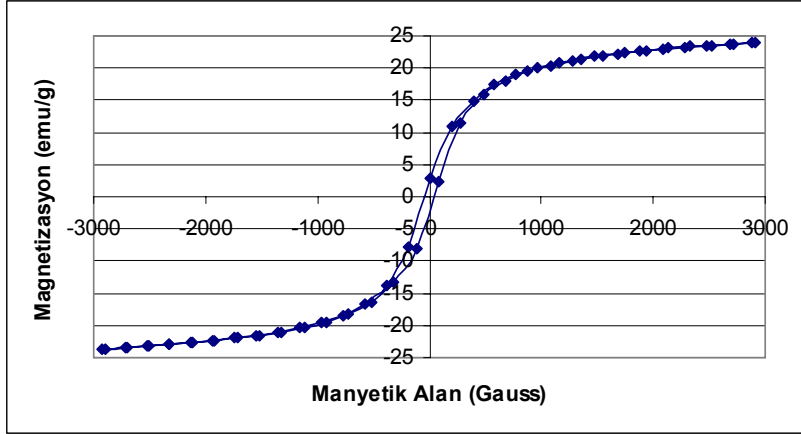


Şekil 4.41 Silanlı manyetik parçacıkların XRD görüntüsü.

4.7.3.3 VSM analiz sonuçları

Manyetik parçacıkların manyetik özellikleri İzmir Yüksek Teknolojisi Enstitüsündeki VSM (Vibrating Sample Magnetometer) (LakeShore 7407) cihazı ile incelendi. Silanlı manyetik parçacıkların

uygulanan manyetik alana karşı emu/g cinsinden manyetizasyon değerleri Şekil 4.42’de verilmiştir. Sonuçlar silanlama işlemi sonunda parçacıkların özelliklerini değiştirmedini göstermektedir.



Şekil 4.42 Silanlı manyetik parçacıkların VSM analizi ile elde edilen magnetizasyonu.

Hazırlanan nanoparçacıkların boyutu süperparamanyetiklik için kritik ölçü olan 25 nm’den büyüktür. Bu nedenle ferromanyetik özellik göstermeleri beklenmelidir. Cao ve ark. hazırladıkları manyetit nanoparçacıkların 20 nm olduğunu ileri sürmelerine rağmen agregatlaşma nedeniyle benzer sonuçlar bulmuşlardır. Bu çalışmada hazırlanan parçacıkların manyetik doyma değeri ($\sigma_s = 30$ emu/g) de Cao’nun manyetik parçacıklarının ($\sigma_s = 60.9$ emu/g) ve manyetitin 90 emu/g değerindeki manyetik doyma değerinden küçüktür. Bu fark muhtemelen boyut farkından ve kaplanan silika tabakasından kaynaklanmaktadır.

4.8 Kalite Kontrol Çalışmalarının Sonuçları

4.8.1 TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

4.8.1.1 Urasil glukuronid ve urasil örneklerinin ¹³¹I/¹²⁵I ile işaretlenmesine ilişkin TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Kalite kontrol çalışmaları için yapılan ince tabaka radyokromatografisi (TLRC) deneyleri sonucunda elde edilen R_f ve % verim değerleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir.

Kullanılan Banyo Çözeltileri:

TLRC-1 : n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)

TLRC-2 : etil alkol-su (3-2)

TLRC-3 : izopropil alkol-n bütanol-0.2N NH_4OH (4-2-1)

Farklı miktarlarda iodojen kullanılarak I-131 ile işaretlenen bileşiklerin % verimleri Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7 gösterilmiştir. TLRC-3 banyo çözeltisine ait sonuçlar incelendiğinde I-131 ile I-131 işaretli bileşiklerin R_f değerlerinin birbirine çok yakın olduğu, dolayısıyla yeterince ayırt edici olmadığı görülmüştür. I-131 ile işaretlenen bileşiklerin % verimlerine ait çizelgeler incelendiğinde TLRC-2 banyo çözeltisinde %100 verimler elde edilmesine rağmen işaretli bileşiklerin R_f değerlerinin hemen hemen aynı olduğu tespit edilmiş ve bu banyo çözeltisinin de ayırt edici bir çözelti olmadığına karar verilmiştir. TLRC-1 banyo çözeltisi sonuçları incelendiğinde 1 mg

iodojen miktarı ile yapılan çalışmada ^{131}I -urasil glukuronid bileşiğinin R_f değeri 0.75-0.79, ^{131}I -urasil bileşiğinin R_f değeri 0.56 ve ^{131}I 'in R_f değeri 0.25-0.43 dür. Bu sebeble TLRC-1 banyo çözeltisinin ayırt edici olduğu anlaşılmıştır. Bunun yanında iodojen miktarı arttıkça ^{131}I -urasil glukuronid bileşiğinin % veriminin arttığı görülmüş ve 1 mg/ml iodojen kullanmanın yeterli olacağı tespit edilmiştir.

Çizelge 4.4 1mg iodojen tüpü kullanılarak ^{131}I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile R_f değerleri

Banyo Çözeltisi	R_f				
	^{131}I -Urasil Glukuronid	^{131}I -Urasil	^{131}I -UdR	Yükseltgenmiş İyot	^{131}I
TLRC-1	0.75-0.79	0.56	0.79	0.07-0.13	0.25-0.43
TLRC-2	0.79	0.71	0.79	0.93	1.00
TLRC-3	0.71	0.71	0.71	0.71	0.71

Çizelge 4.5 100 µg iodojen tüpü kullanılarak I-131 ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri

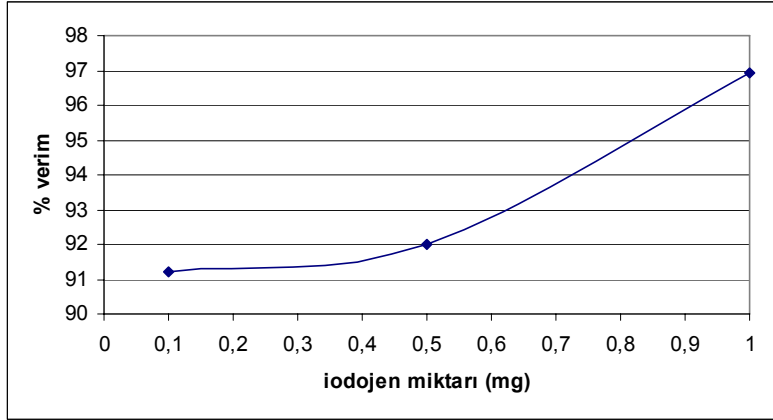
Banyo Çözeltisi	% Verim		
	¹³¹ I-Urasil Glukuronid	¹³¹ I-Urasil	¹³¹ I-UdR
TLRC-1	91.22±3.8	97.01±1.9	79.92±5.5
TLRC-2	100±0	100±0	86.81±6.1
TLRC-3	91.88±2.1	98.17±2.4	90.17±3.4

Çizelge 4.6 500µg iodojen tüpü kullanılarak ¹³¹I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri

Banyo Çözeltisi	% Verim		
	¹³¹ I-Urasil Glukuronid	¹³¹ I-Urasil	¹³¹ I-UdR
TLRC-1	92.0±0.4	92.7±2.0	80.9±2.9
TLRC-2	98.40±1.0	98.82±0.8	90.62±2.6
TLRC-3	93.67±2.6	94.20±0.9	91.23±6.0

Çizelge 4.7 1 mg iodojen tüpü kullanılarak ¹³¹I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri

Banyo Çözeltisi	% Verim		
	¹³¹ I-Urasil Glukuronid	¹³¹ I-Urasil	¹³¹ I-UdR
TLRC-1	96.91±0.9	96.01±1.7	91.99±1.2
TLRC-2	95.98±0.3	98.01±0.2	92.46±1.5
TLRC-3	99.21±0.1	99.66±0.1	95.32±0.6



Şekil 4.43 TLRC-1 çözeltisi sonuçlarına göre ^{131}I -Urasil Glukuronid bileşiğinin iodojen miktarına bağlı % verim değişimi.

I-125 ile yapılan işaretleme çalışmalarında I-131 ile yapılan deneyler sonucunda optimum % verim için tespit edilen 1 mg/ml iodojen miktarı kullanılmıştır. I-125 ile işaretlenen bileşiklerin R_f değerleri Çizelge 4.8 de, I-125 ile işaretlenen bileşiklerin % verimleri Çizelge 4.9 da gösterilmiştir. TLRC-1 banyo çözeltisine ait sonuçlar incelendiğinde ^{125}I -urasil-o-glukuronid bileşiğinin R_f değeri 0.80, ^{125}I -urasil-n-glukuronid bileşiğinin R_f değeri 0.8, ^{125}I -urasil bileşiğinin R_f değeri 0.56 ve ^{125}I 'in R_f değeri 0.41 dir. TLRC-1 banyo çözeltisinin ayırt edici olduğu görülmüştür. I-125 ile işaretlenen bileşiklerin % verimlerine ait çizelge incelendiğinde TLRC-1 banyo çözeltisinde %90'ın üzerinde verimler elde edilmiştir.

Çizelge 4.8 ^{125}I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile R_f değerleri

Banyo Çözeltisi	R_f				
	^{125}I -Urasil-O Glukuronid	^{125}I -Urasil-N Glukuronid	^{125}I -Urasil-	Yükseltgenmiş İyot	^{125}I
TLRC-1	0.80	0.81	0.56	0.05	0.41

Çizelge 4.9 ^{125}I ile işaretli bileşiklerin TLRC yöntemi ile % Verim değerleri

Banyo Çözeltisi	% Verim		
	^{125}I -Urasil-O Glukuronid	^{125}I -Urasil-N Glukuronid	^{125}I -Urasil
TLRC-1	93.86±1.5	95.04±1.1	94.19±1.7

4.8.1.2 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil glukuronid ve urasil'in $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ ile işaretlenmesine ilişkin TLRC yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Kullanılan Banyo Çözeltisi:

TLRC-1 : n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)

Çizelge 4.10 ^{131}I ile işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile R_f değerleri

	R_f				
Banyo Çözeltisi	^{131}I -UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{131}I -UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{131}I -Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	Yükseltgenmiş İyot	^{131}I
TLRC-1	0.04	0.04	0.04	0.05	0.43

Çizelge 4.11 I-131 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile % Verim değerleri.

	% Verim		
Banyo Çözeltisi	^{131}I -UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{131}I -UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{131}I -Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar
TLRC -1	84.6±1.2	87±0.6	85±1.9

Çizelge 4.12 ^{125}I ile işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile R_f değerleri

	R_f				
Banyo Çözeltisi	^{125}I -UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{125}I -UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{125}I -Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	Yükseltgenmiş İyot	^{125}I
TLRC-1	0.04	0.04	0.04	0.05	0.41

Çizelge 4.13 ^{125}I işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC yöntemi ile % Verim değerleri

	% Verim		
Banyo Çözeltisi	^{125}I -UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{125}I -UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	^{125}I -Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar
TLRC -1	87.8±0.9	91±1.4	89±1.7

4.8.2 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil-o-glukuronid ve urasil-n-glukuronid'in I-131 ile işaretlenmesi

Aşağıdaki çizelgeden de görüldüğü gibi % bağlanma değerleri I-131 işaretli urasil-o-glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklar için % 89.4, I-131 işaretli urasil-n-glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklar için % 92.6 olarak bulundu.

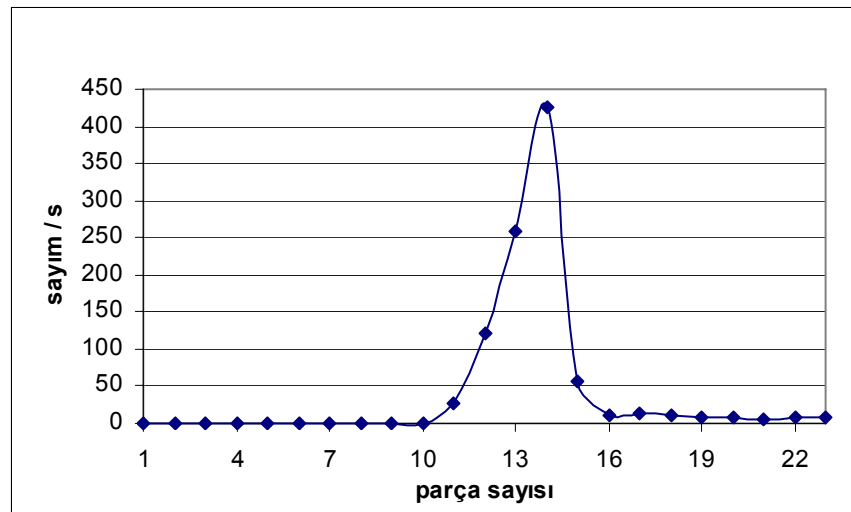
Çizelge 4.14 I-131 işaretli Urasil-O-Glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklar ve I-131 işaretli Urasil-N-Glukuronid bağlı silanlı manyetik parçacıklara ait gama aktivite sayım değerleri.

	¹³¹ I-UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar (sayım/s)	¹³¹ I-UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar (sayım/s)
İyot(150µL)	25135	25135
İşaretleme sonrasındaki radyoaktivite	19241	19011
Manyetik parçacıklarda kalan radyoaktivite	18887	18959
Sıvı kısımda kalan radyoaktivite	1888	1450
Yıkama ile elüe edilen radyoaktivite	889	845
Elüsyon sonrası manyetik parçacıklarda kalan radyoaktivite	17200	17609
% Verim	% 89.4	% 92.6

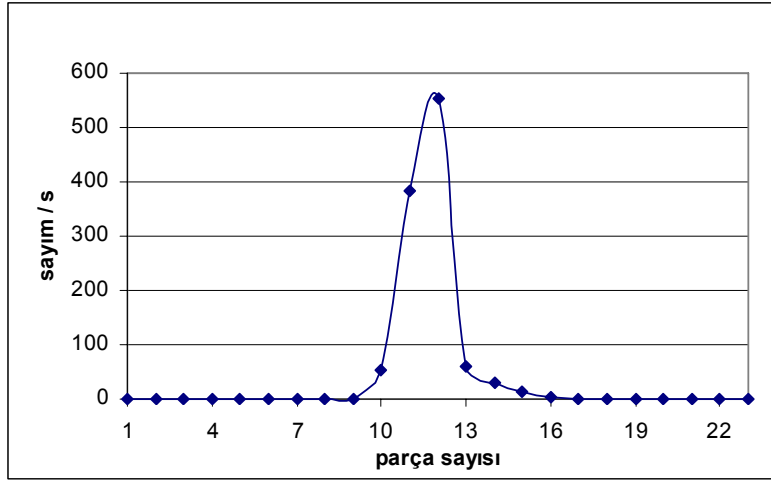
4.8.3 Elektroferez yöntemi ile elde edilen sonuçlar

4.8.3.1 Urasil ve urasil glukuronid'in $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ ile işaretlenmesine ilişkin elektroferez yöntemi ile elde edilen sonuçlar

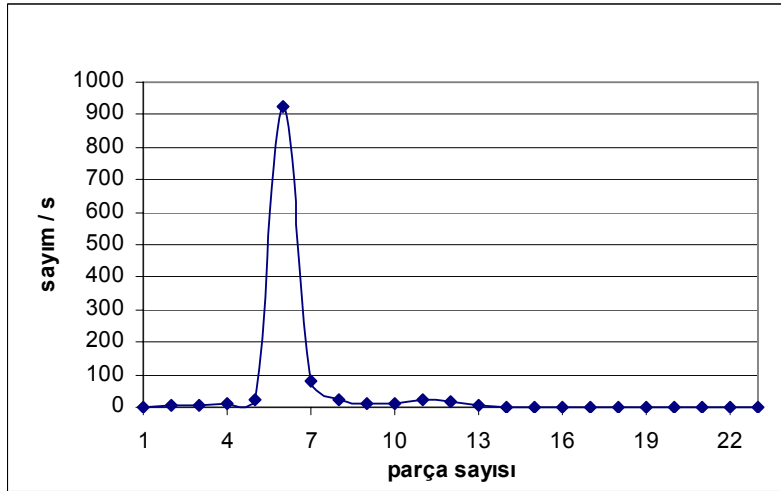
Elektroferez kromatogramlarında işaretli bileşik elektroferez kağıdına uygulanma noktası 12. cm dir. Pozitif kutup 12 cm'den sonra sıfıra doğru, negatif kutup ise 12 cm'den 23'e doğrudur. Farklı miktarlarda iodojen kullanılarak elde edilen ^{131}I ile işaretli bileşiklere ait olan sayımlar, toplam sayımlara bölünerek bağlanma verimleri bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 4.16'da verilmiştir. ^{131}I -Urasil bileşiğinin uygulama noktasında kaldığı ve nötr olduğu tespit edilirken banyo ortamının asidik olması nedeniyle ^{131}I -Urasil Glukuronid bileşiğinin katoda doğru yürüdüğü ve katyonik yapıda olduğu elektroferez kromatogramlarından anlaşılmaktadır.



Şekil 4.44 ^{131}I ile işaretli Urasil glukuronid'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroferezi kromatogramı.



Şekil 4.45 ^{131}I ile işaretli Urasil'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi kromatogramı.



Şekil 4.46 ^{131}I 'in TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi kromatogramı.

Kullanılan Banyo Çözeltileri:

TLRC-1 : n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)

Çizelge 4.15 1 mg iodojen kullanılarak ^{131}I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.

Banyo Çözeltisi	^{131}I -Urasil Glukuronid	^{131}I -Urasil	^{131}I -UdR	Yükseltgenmiş İyot	^{131}I
TLRC-1	12	12	12	11	6

Çizelge 4.16 Farklı miktarlarda iodojen kullanılarak ^{131}I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi % verim sonuçları.

İodojen miktarı	% Verim		
	^{131}I -Urasil Glukuronid	^{131}I -Urasil	^{131}I -UdR
100 μg	88.76 \pm 1.6	97.20 \pm 0.7	89.15 \pm 0
500 μg	97.94 \pm 1.3	93.25 \pm 5.2	90.40 \pm 4.7
1 mg	97.86 \pm 1.5	99.11 \pm 0.9	95.38 \pm 3.3

Çizelge 4.17 ^{125}I ile işaretli bileşiklerin TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.

Banyo Çözeltisi	^{125}I -Urasil-O Glukuronid	^{125}I -Urasil-N Glukuronid	^{125}I -Urasil	^{125}I -UdR	Yükseltgenmiş İyot	^{125}I
TLRC-1	12	12	12	12	11	6

4.8.3.2 Silanlı manyetik parçacıklara bağlı urasil ve urasil glukuronid'in $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ ile işaretlenmesine ilişkin elektroforez yöntemi ile elde edilen sonuçlar

Elektroforez kromatogramlarında işaretli bileşiğin elektroforez kağıdına uygulanma noktası 12. cm dir. Pozitif kutup 12 cm'den sonra sıfıra doğru, negatif kutup ise 12 cm'den 23'e doğrudur. $^{131}\text{I}/^{125}\text{I}$ işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların uygulama noktasında kaldığı ve nötr olduğu Çizelge 4.18 ve Çizelge 4.19'dan anlaşılmaktadır.

Kullanılan Banyo Çözeltisi: TLRC-1: n-bütanol-su-asetik asit (4-2-1)

Çizelge 4.18 I-131 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.

Banyo Çözeltisi	¹³¹ I-UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	¹³¹ I-UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	¹³¹ I-Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	Yükseltgenmiş İyot	¹³¹ I
TLRC-1	12	12	12	11	6

Çizelge 4.19 I-125 işaretli urasil ve urasil glukuronid örneklerine bağlı silanlı manyetik parçacıkların TLRC-1 banyo çözeltisindeki kağıt elektroforezi sonuçları.

Banyo Çözeltisi	¹²⁵ I-UOG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	¹²⁵ I-UNG bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	¹²⁵ I-Urasil bağlı Silanlı Manyetik Parçacıklar	Yükseltgenmiş İyot	¹²⁵ I
TLRC-1	12	12	12	11	6

4.8.4 Lipofilite sonuçları

Urasil-o-glukuronid, Urasil-n-glukuronid ve Urasil örneklerinin teorik lipofilite değerleri ACD/Log P Algorithm programı kullanılarak sırasıyla -7.40, -4.70 ve +0.04 olarak hesaplanmış ve Şekil 4.5’de verilmiştir. Örneklerin deneysel lipofilite değerleri de ¹³¹I-Urasil-o-

glukuronid için -5.05 ± 0.91 , ^{131}I -Urasil-n-glukuronid için -2.13 ± 0.72 ve ^{131}I -Urasil için $+0.03 \pm 0.02$ olarak bulunmuştur. Sonuçlar değerlendirildiğinde bulunan teorik lipofilite değerleri ile hesaplanan deneysel lipofilite değerlerinin uyum içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

4.8.5 Serum stabilite sonuçları

^{131}I -Urasil-o-glukuronid, ^{131}I -Urasil-n-glukuronid, ^{131}I -Urasil'in ve silanlı manyetik parçacıklara bağlı ^{131}I -Urasil-o-glukuronid, ^{131}I -Urasil-n-glukuronid, ^{131}I -Urasil'in serumdaki stabilitesi incelendiğinde örneklerin alındığı tüm zamanlarda işaretleme verimi %90'ın üzerinde bulunmuş ve sonuçlar Çizelge 4.20'de verilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde işaretli örneklerin in vitro stabilitesinin 24. saate kadar oldukça yüksek olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.20 Serum stabilite sonuçlarının zamanla değişimi.

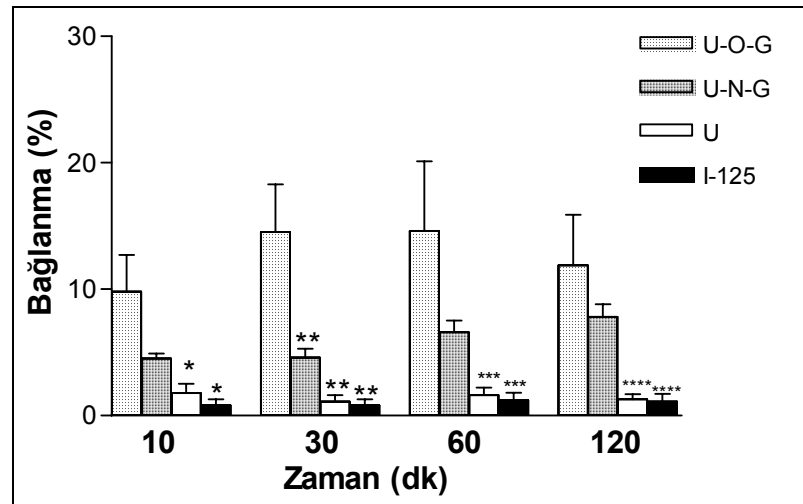
	0. dakika	30. dakika	60. dakika	240. dakika	24. saat
UOG	%90.38 ±1.2	%91.12 ±1.9	%89.72 ±0.2	%94.91 ±2.2	%91.28 ±3.2
UNG	%93.18 ±3.2	%95.0. 7±4.3	%91.34 ±1.8	%89.28 ±1.2	%90.28 ±2.3
Urasil	%88.37 ±1.7	%89.97 ±1.1	%92.86 ±0.7	%91.72 ±2.9	%91.46 ±3.1
UOG bağlı Sılanlı Manyetik Parçacıklar	%92.12 ±2.5	%89.92 ±3.7	%91.19 ±3.5	%91.11 ±4.7	%93.90 ±3.1
UNG bağlı Sılanlı Manyetik Parçacıklar	%89.88 ±3.2	%89.17 ±4.4	%92.49 ±1.2	%91.34 ±2.3	%92.35 ±1.8
Urasil bağlı Sılanlı Manyetik Parçacıklar	%90.97 ±2.9	%92.15 ±1.5	%91.57 ±3.8	%91.32 ±1.9	%89.28 ±3.7

4.9 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi

$^{125}\text{I-U-O-Glukuronid}$ ve $^{125}\text{I-U-N-Glukuronid}$ 'nin HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin $^{125}\text{I-urasil}$ ve I-125'e göre her koşulda daha yüksek olduğu görülmüştür. $^{125}\text{I-urasil-O-glukuronid}$ ve $^{125}\text{I-urasil-N-glukuronid}$ kendi aralarında değerlendirildiğinde $^{125}\text{I-urasil-O-glukuronid}$ 'in $^{125}\text{I-urasil-N-glukuronid}$ 'den daha yüksek bir bağlanma etkinliğine sahip olmasına rağmen 30. dakika dışındaki sürelerde bu farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bunun yanında $^{125}\text{I-U-O-Glukuronid}$; $^{125}\text{I-urasil}$ ve ^{125}I 'in bağlanma oranları ile karşılaştırıldığında her zaman aralığında istatistiksel olarak yüksek oranda bağlandığı görülmüştür. $^{125}\text{I-urasil-N-glukuronid}$ 'in bağlanma oranı $^{125}\text{I-urasil}$ ve ^{125}I 'den yüksek olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlılık tespit edilememiştir.

Çizelge 4.21 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, ^{125}I -Urasil-N-glukuronid, ^{125}I -Urasil ve ^{125}I 'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın zamanla değişimi.

Zaman	^{125}I -Urasil-O-glukuronid	^{125}I -Urasil-N-glukuronid	^{125}I -Urasil	^{125}I (Na ^{125}I)
10.dakika	% 9.8±2.9	% 4.5±0.4	% 1.8±0.7	% 0.8±0.5
30.dakika	% 14.5±3.8	% 4.6±0.7	% 1.1±0.5	% 0.8±0.5
60.dakika	% 14.6±5.5	% 6.6±0.9	% 1.6±0.6	% 1.2±0.6
120.dakika	% 11.9±4.0	% 7.8±1.0	% 1.3±0.4	% 1.1±0.6



Şekil 4.47 U-O-G, U-N-G, Urasil ve I-125'in HuTu-80 hücrelerine 10, 30, 60 ve 120. dakikalarda bağlanma oranları gösterilmiştir. Gruplar kendi içlerinde zamana göre karşılaştırıldığında sadece U-N-G'nin 120.dakikadaki bağlanma oranları 10 ve 30. dakikadaki bağlanma oranlarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

* 10. dakikada U-O-G'nin bağlanma oranında Urasil ve ^{125}I 'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.05$).

** 30. dakikada U-O-G'nin bağlanma oranında U-N-G, Urasil ve I-125'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.05$).

*** 60. dakikada U-O-G'nin bağlanma oranında Urasil ve I-125'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.05$).

**** 120. dakikada U-O-G'nin bağlanma oranında Urasil ve I-125'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.05$).

4.10 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid, Urasil ve I-125'in Farklı Dozlarda (Ligand miktarı) HuTu-80 Hücrelerine Bağlanma Oranları

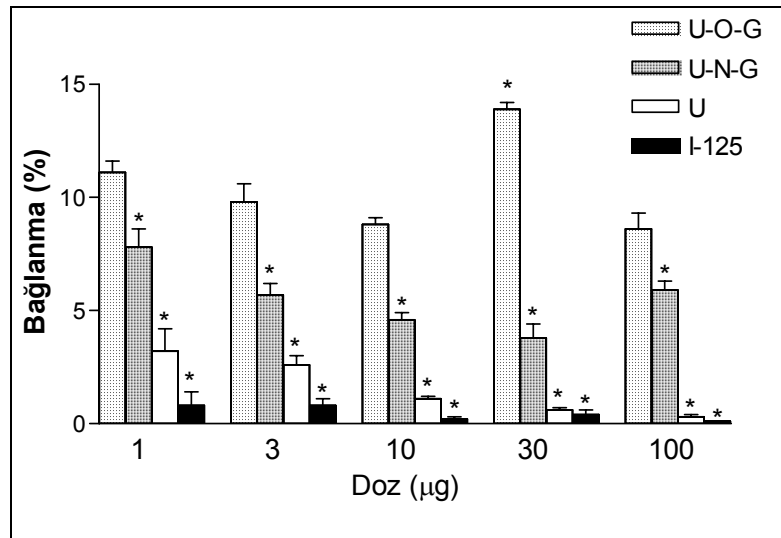
Farklı dozlarla yapılan bağlanma çalışmasında gruplar kendi içlerinde doza göre karşılaştırıldığında; UOG'nin bağlanma oranı 30 μg da diğer tüm dozlarla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($P<0.05$). UNG 1 μg dozda 10 ve 30 μg dozlarla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık varken diğer dozlarda anlamlı farklılık bulunamamıştır. Urasil 1 μg dozda 10 μg , 30 μg ve 100 μg dozlarla karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlılık varken 3 μg dozda anlamlı farklılık bulunamamıştır.

I-125'in eşdeğer dozlarında hiçbir grupta anlamlı farklılık yoktur.

Gruplar toplu olarak karşılaştırıldığında UOG'nin her dozda bağlanma oranları UNG, Urasil ve I-125'in bağlanma oranlarından istatistiksel olarak farklılık göstermiştir.

Çizelge 4.22 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, ^{125}I -Urasil-N-glukuronid, ^{125}I -Urasil ve İyot-125'in farklı dozlarda HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları.

Ligand miktarı	^{125}I -Urasil-O-glukuronid	^{125}I -Urasil-N-glukuronid	^{125}I -Urasil	İyot-125 (Na^{125}I)
1 $\mu\text{g/mL}$	% 11.1 \pm 0.5	% 7.8 \pm 0.8	% 3.2 \pm 1.0	% 0.8 \pm 0.6
3 $\mu\text{g/mL}$	% 9.8 \pm 0.8	% 5.7 \pm 0.5	% 2.6 \pm 0.4	% 0.8 \pm 0.3
10 $\mu\text{g/mL}$	% 8.8 \pm 0.3	% 4.6 \pm 0.3	% 1.1 \pm 0.1	% 0.2 \pm 0.1
30 $\mu\text{g/mL}$	% 13.9 \pm 0.3	% 3.8 \pm 0.6	% 0.6 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.2
100 $\mu\text{g/mL}$	% 8.6 \pm 0.7	% 5.9 \pm 0.4	% 0.3 \pm 0.1	% 0.1 \pm 0.0



Şekil 4.48 U-O-G, U-N-G ve Urasil'in 1, 3, 10, 30 ve 100 μg dozlarında ve bu dozlara eşdeğer I-125 miktarlarının HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları gösterilmiştir.

* U-O-G tüm dozlarda U-N-G, Urasil ve I-125'e göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık ($P<0.05$).

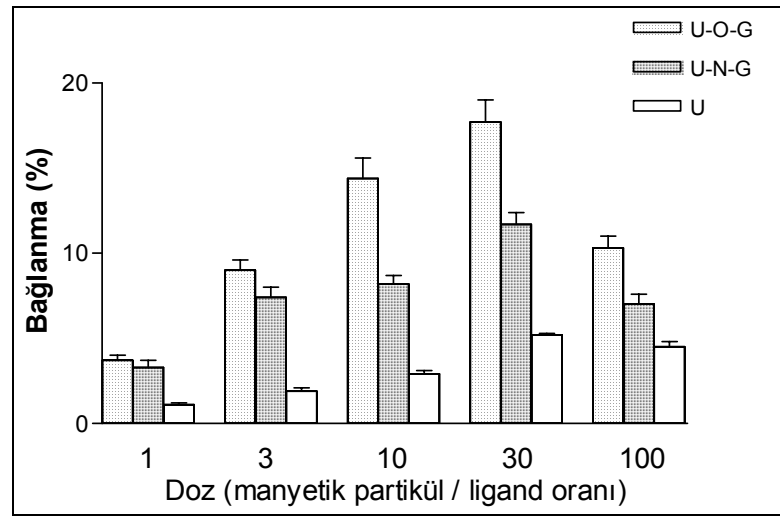
Doz ve zaman çalışmalarının sonuçlarına göre 30 dakika ve 30 µg bundan sonraki çalışmalarda optimal zaman ve doz olarak belirlenmiştir.

4.11 I-125 İşaretli Manyetik Parçacıklara Takılı Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğine Manyetik Parçacık Miktarının Etkisi

¹²⁵I-Urasil-O-glukuronid, ¹²⁵I-Urasil-N-Glukuronid ve ¹²⁵I-Urasil'e takılacak optimal manyetik parçacık belirlemek üzere daha önce çalışmalarda belirlediğimiz 30 µg ligand miktarı başına 1, 3, 10, 30 ve 100 katı manyetik parçacık bağlayarak HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları test edildi. Her grup 30 katına kadar aralarında istatistiksel anlamlılık olan bir artış göstererek yükseldi ($P<0.05$). Gruplar birbirleriyle karşılaştırıldığında Urasil-O-glukuronid ve Urasil-N-Glukuronid tüm dozlarda urasil'den istatistiksel olarak anlamlı bir yükseklik gösterdiler ($P<0.05$). Urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ile 1 ve 3 katında herhangi bir farklılık oluşturmazken daha sonraki dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermiştir ($P<0.05$). Bu çalışma sonucunda çalışmalarımızda kullanılacak manyetik parçacık dozu 30 kat olarak belirlenmiştir.

Çizelge 4.23 Manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-O- glukuronid, ^{125}I -Urasil-N- glukuronid ve ^{125}I -Urasil'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanma değerinin kullanılan manyetik parçacık oranı ile değişimi.

Manyetik parçacık oranı	Manyetik ^{125}I -Urasil-O- glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil-N- glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil
1	% 3.7±0.3	% 3.3±0.4	% 1.1±0.1
3	% 9.0±0.6	% 7.4±0.6	% 1.9±0.2
10	% 14.4±1.2	% 8.2±0.5	% 2.9±0.2
30	% 17.1±1.3	% 11.7±0.7	% 5.2±0.1
100	% 10.3±0.7	% 7.0±0.6	% 4.5±0.3



Şekil 4.49 I-125 işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in manyetik parçacık oranının HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranlarına etkisi

4.12 I-125 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğine Etki Eden Parameteler (Zaman, Ligand, Nanoparçacık Oranı)

UOG 30 ve 60 dakikada %14.5'lik en yüksek bağlanma gösterirken, 2 saatte bağlanma yüzdesi bir miktar düşmüştür. UNG ise UOG den daha düşük bir bağlanma gösterirken iki saate kadar sürekli bir yükseliş göstermiştir. UOG ve urasilin istatistiksel olarak anlamlı olan benzer davranışlar göstermesi, UOG'nin beta glukuronidaz enzimi ile urasile hidroliz olduğunu ve urasile dönüştüğünü, urasil ve UOG'nin benzer kinetiklerinin olduğunu, göstermektedir. 2 saatteki bağlanma oranındaki azalma ¹²⁵I'in bozunmasından (2 saate bir saattekinden iki kat fazla radyasyon dozu) olamaz çünkü çok daha küçük bağlanma gösteren ¹²⁵I ile işaretli urasil de aynı davranışı göstermektedir.

Ligand miktarı arttıkça istatistiksel olarak da anlamlı olarak urasil ve ¹²⁵I de HuTu-80 hücrelerine bağlanma azalırken UOG ve UNG de urasil ve ¹²⁵I göre daha düşük oranda azalma görülmüştür. En yüksek ligand miktarı olan 100 mg da büyük ligandları için hücre bağlanma oranı en düşük çıkmıştır. Mol sayısı olarak bu miktarlar urasil için 9-900 nmol, glukuronidler için 3.5-350 nmol mertebelerindedir.

Glukuronid ligandlara takılı manyetik nanoparçacık oranı 100 katına kadar çıkarıldığında her glukuronid ligand için de 30 katına kadar HuTu-80 hücrelerine bağlanmada anlamlı bir artış görülürken 100 kat fazla manyetik parçacık ile bağlanmaya çalışıldığında hücre bağlanma

oranları her iki ligand için de anlamlı bir şekilde azalmıştır. Bu azalmayı her ne kadar manyetik nanoparçacıkların beta glukuronidaz enzim aktivitesini azaltması sonucu hidrolizin azalarak ligandın hücre bağlanmasını azalttığına yormak mümkün ise de aynı oranda azalmanın glukuronid bağlı olmayan ^{125}I bağlı urasil ile de görülmesi, manyetik parçacıklar hücreler üzerindeki toksik etkisi sonucu olması daha muhtemeldir.

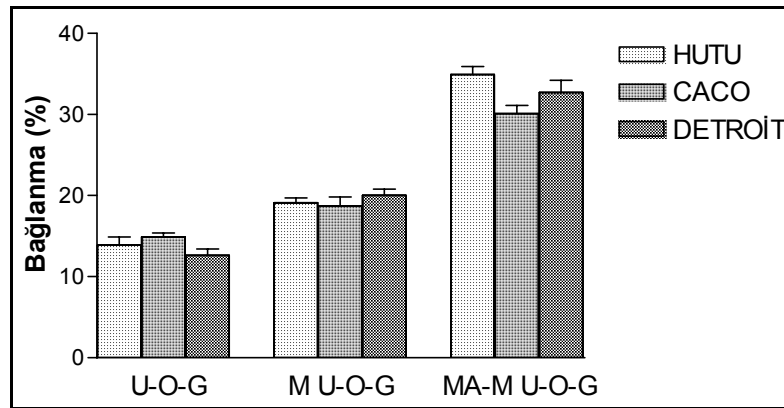
4.13 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, ^{125}I -Urasil-N-glukuronid ve ^{125}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücrelerinde Bağlanma Etkinliği

Urasil-O-glukuronid'in bağlanma etkinliğinin üç hücre tipinde de urasil-N-glukuronid, urasil ve ^{125}I 'den fazla olduğu tespit edildi ($P < 0.05$). Bunun yanında manyetik parçacıklara bağlı bütün ligandların bağlanma etkinliklerinin arttığı ve bu oranın HuTu-80 hücrelerinde 1.37 iken, Caco-2 hücrelerinde 1.26 ve Detroit 562 hücrelerinde ise 1.59'a çıktığı gözlenmiştir. Hücreler üzerine manyetik alan uygulandığında ise bağlanma etkinliği sırasıyla 2.5, 2.02 ve 2.6'ya çıkmaktadır. Urasil ve ^{125}I 'in her üç hücre tipinde bağlanma etkinliklerinin çok düşük olmasına rağmen manyetik parçacıklara bağlı urasil ve manyetik parçacıklara bağlı ^{125}I 'in bağlanma etkinliklerinde ciddi derecede artış meydana gelmiştir. Bu artışlar Urasil-O-glukuronid'in tüm uygulamalarıyla paralellik göstermekte olup manyetik parçacığın tümör seçiciliği açısından anlamlı olmadığını düşündürmektedir.

İstatistiksel veriler incelendiğinde P değerleri göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede örneklerin üç hücre tipinde de benzer bağlanma etkinliklerine sahip olduğu tespit edildi. Bu sonuçlardan glukuronidleşmenin bağlanma etkinliğini arttırdığı fakat her iki glukuronid türevinin de her üç hücre tipi içinde benzer derecelerde seçicilik gösterdiği tespit edildi.

Çizelge 4.24 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid
HuTu-80	%13.9±1.0	%19.1±0.6	%34.9±1.0
Caco-2	%14.9±0.5	%18.7±1.1	%30.1±1.0
Detroit 562	%12.6±0.8	%20.0±0.8	%32.7±1.5



Şekil 4.50 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

U-O-G : Urasil-O-glukuronid

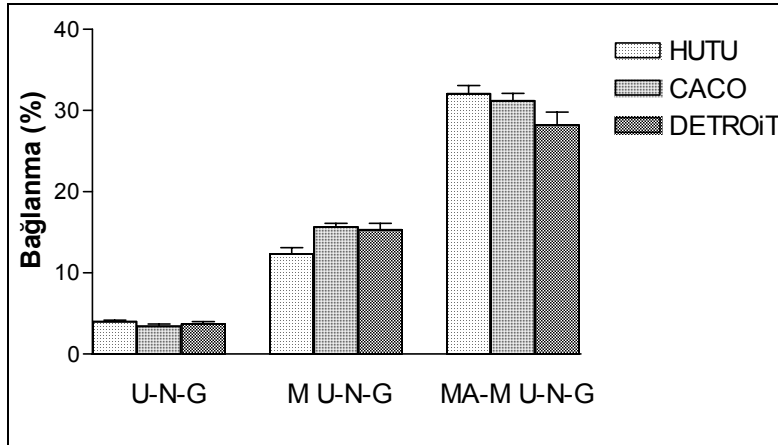
M U-O-G : manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid

MA-M U-O-G : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid

Çizelge 4.25 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki % bağlanma değerlerini göstermektedir. İstatistiksel hata sınırları içinde ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in her üç hücre tipine de bağlanma etkinliği de bir birinin aynı olduğu görülmektedir. Ancak ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in her üç hücre türü üzerinde de bağlanma etkinlikleri ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'e göre 3-4 defa daha küçüktür.

Çizelge 4.25 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-N-glukuronid
HuTu-80	%4.0±0.2	%12.3±0.8	%32.1±1.0
Caco-2	%3.4±0.3	%15.7±0.4	%31.2±0.9
Detroit 562	%3.7±0.3	%15.3±0.8	%28.2±1.6



Şekil 4.51 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri

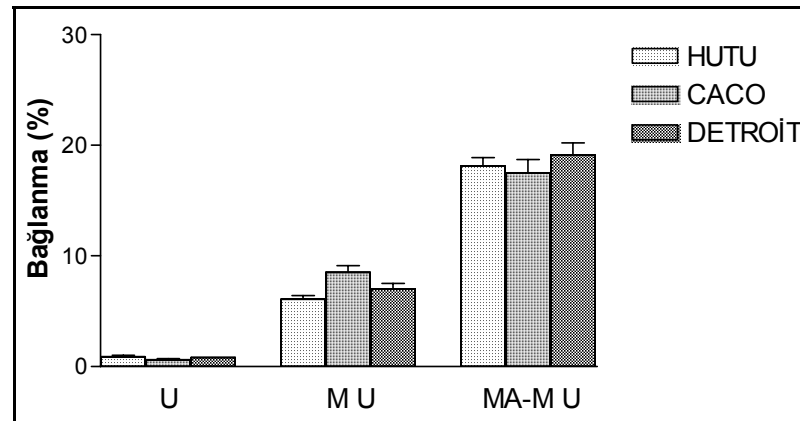
U-N-G : Urasil-N-glukuronid

M U-N-G : manyetik parçacıklara takılı Urasil-N-glukuronid

MA-M U-N-G : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-N-glukuronid

Çizelge 4.26 ^{125}I -Urasil, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I -Urasil	Manyetik ^{125}I -Urasil	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil
HuTu-80	%0.9±0.1	%6.1±0.3	%18.1±0.8
Caco-2	%0.6±0.1	%8.5±0.6	%17.5±1.2
Detroit 562	%0.8±0.0	%7.0±0.5	%19.1±1.1



Şekil 4.52 ^{125}I -Urasil, manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{125}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

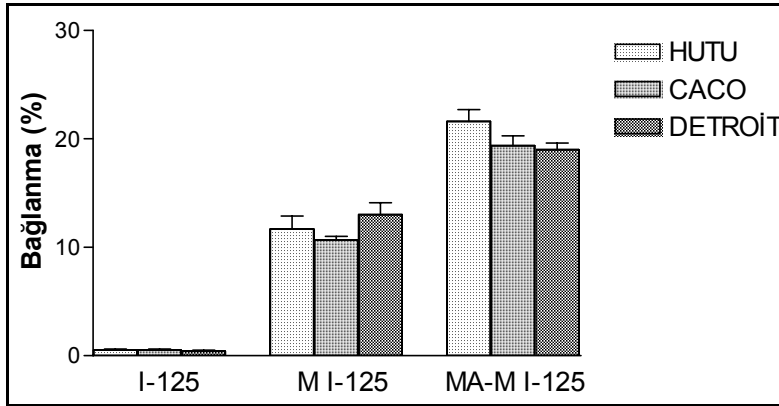
U : Urasil

M U : manyetik parçacıklara takılı urasil

MA-M U : manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı urasil

Çizelge 4.27 ^{125}I , manyetik parçacıklara takılı ^{125}I ve manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı ^{125}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I	Manyetik ^{125}I	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I
HuTu-80	%0.5±0.1	%11.7±1.2	%21.6±1.1
Caco-2	%0.5±0.1	%10.7±0.3	%19.4±0.9
Detroit 562	%0.4±0.1	%13.0±1.1	%19.0±0.6



Şekil 4.53 ^{125}I , manyetik parçacıklara takılı ^{125}I ve manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı ^{125}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

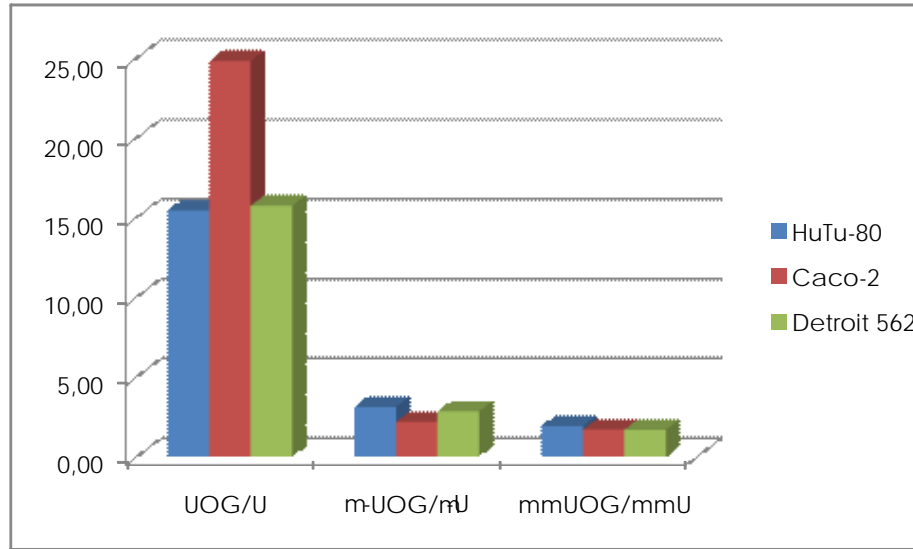
M I-125 : manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵I

MA-M I-125: manyetik alan uygulanmış manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵I

¹²⁵I-Urasil-N-glukuronid'in manyetik parçacıklara bağlanması ise her üç hücre tipinin de bağlanma etkinliğini arttırmaktadır. Bu oran HuTu-80 hücrelerinde 3.08 iken, Caco-2 hücrelerinde 4.62 ve Detroit 562 hücrelerinde ise 4.14'dür. Hücreler üzerine manyetik alan uygulandığında ise bağlanma etkinliği oranları 8-9'a çıkmaktadır. Buradan ¹²⁵I-Urasil-N-glukuronid'in ve ¹²⁵I-Urasil-O-glukuronid'in hücreye ilgileri farklı iken manyetik parçacıklara bağlandığında oranın azaldığı manyetik alan uygulandığında ise iki molekülün aynı etkiyi yaptığı ancak urasile göre farklı olduğu ve çok daha yüksek oranlarda hücreler tarafından tutulduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 4.28 Manyetik parçacıklara bağlanmanın ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki etkisi

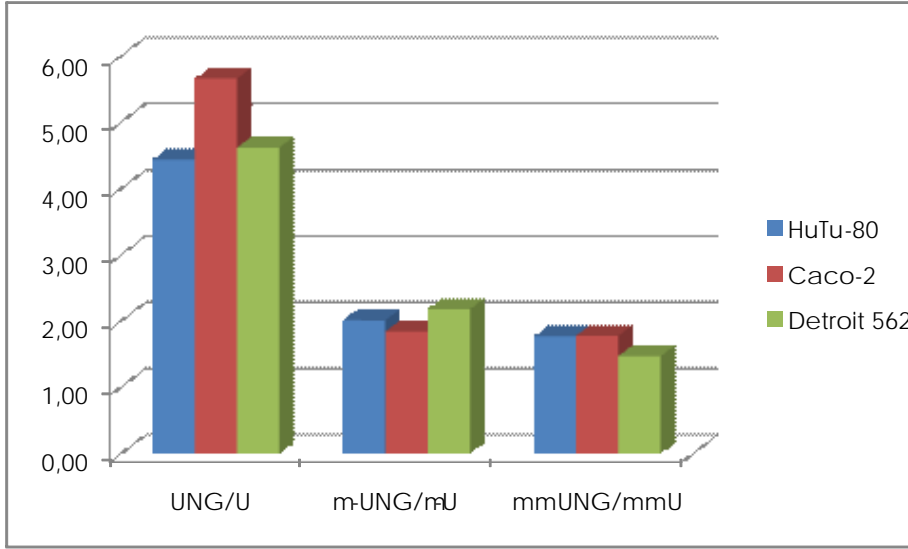
	HuTu-80	Caco-2	Detroit 562
Manyetik ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid/ ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid	1,37	1,26	1,59
Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid/ ¹²⁵ I-Urasil-O-glukuronid	2,51	2,02	2,60
Manyetik ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid/ ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid	3,08	4,62	4,14
Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid/ ¹²⁵ I-Urasil-N-glukuronid	8,03	9,18	7,62



Şekil 4.54 Urasil-o-glukuronid (UOG), manyetik parçacıklara takılı Urasil-o-glukuronid (m-UOG) ve manyetik alan etkisi altında parçacıklara takılı Urasil-o-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranlarının urasil, parçacıklara takılı urasil ve manyetik alan etkisi altında parçacıklara takılı urasile oranları.

Şekil 4.54 Urasil-o-glukuronid (UOG), manyetite bağlı Urasil-o-glukuronid (m-UOG) ve manyetik alan uygulanmış manyetite bağlı Urasil-o-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranlarının urasil, manyetite bağlı urasil ve manyetik alan uygulanmış manyetite bağlı urasil ile karşılaştırmaktadır. Şekilde görüldüğü gibi urasil ile karşılaştırıldığında UOG'nin hücrelerindeki bağlanma oranları HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerinde farklılık göstermektedir ve Caco-2 hücrelerinde 25 kate kadar çıkmaktadır. Buradan Caco-2 hücrelerinin beta glukuronidaz aktivitelerinin HuTu-80 ve Detroit 562 hücrelerinden daha fazla olduğu sonucu çıkarılabilir.

Manyetik parçacık bağlı moleküllerle yapılan deneylerde ise toplam bağlanma daha çok olmasına karşın manyetik parçacıklar ile ilgili mekanizmanın enzimatik mekanizmadan daha etkin olması nedeniyle farklılıklar azalmaktadır. Benzer durum Şekil 4.55’de görüldüğü gibi N-glukuronidler için de geçerli olmasına rağmen oranlar daha düşüktür.



Şekil 4.55 Urasil-n-glukuronid (UNG), manyetik parçacıklara takılı urasil-o-glukuronid (m-UNG) ve manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı urasil-n-glukuronid’in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranlarının urasil, manyetik parçacıklara takılı urasil ve manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı urasile oranları

Bu durum o-glukuronidlerin prodrug olarak hedefe yönelik terapide daha etkili olabileceğini göstermektedir. Benzer durum kontrol olarak

kullanılan ^{125}I için de geçerlidir. İyodür formunda olan ^{125}I 'in tek başına hücreye afinitesinin olmadığı bilinmesine rağmen, ^{125}I manyetik nanoparçacıklara bağlandığında ve manyetik alan uygulandığında hücreye inkorporasyon artmaktadır. Ancak en yüksek bağlanma her zaman o-glukuronid bağlı manyetik nanoparçacıklara manyetik alan uygulandığında görülmektedir. Bu durum manyetik nanoparçacıkların çok iyi birer taşıyıcı olduklarını ve enzimatik mekanizmalar ile birlikte kullanıldıklarında daha etkili kullanılabileceklerini göstermektedir.

Wang ve ark. p-di-2-chloroethylaminophenyl-beta-D-glucopyranosid'in ana molekül N,N-di-(2-chloroethyl)-4-hydroxyanilinden HepG2 human hepatoma hücrelerinde 150 defa az toksik olduğunu ve beta-glukuronidase varlığında bu prodrug moleküllerinin aktiflenerek toksik olan ana moleküle dönüştüğünü rapor etmişlerdir AS-30D rat hepatoma hücrelerinde de 1000 defa daha az toksik olduğunu ileri sürmüşler ve glukuronid prodrugların hedefe yönelik terapide etkili olabileceğini rapor etmişlerdir (Wang et al., 1992).

4.14 ^{125}I -Urasil-O-Glukuronid, ^{125}I -Urasil-N-Glukuronid ve ^{125}I -Urasil'in HuTu-80 ve Primer İnsan Bağırsak Epiteli hücreleri (PHIC) Üzerindeki Bağlanma Etkinliği

Urasil-O-glukuronid'in bağlanma etkinliğinin her iki hücre tipinde diğer örneklerden fazladır. Bunun yanında urasil ve ^{125}I 'in bağlanma etkinlikleri her iki hücre tipinde de çok düşüktür. Manyetik özellik kazandırmanın ve manyetik alan uygulamanın hücre bağlanma etkinliğini

arttırdığı her iki hücre tipinde de görülmüştür. ^{125}I 'in tek başına her iki hücre tipi üzerinde önemli bir bağlanması yokken, manyetik parçacıklara takıldığında ve manyetik alan uygulandığında manyetik alan etkisindeki manyetik parçacıklara takılan ^{125}I 'in HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları PHIC hücrelerinden istatistiksel olarak farklıdır. İstatistiksel veriler incelendiğinde P değerleri göz önüne alınarak yapılan değerlendirmede urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 hücreleri üzerinde insan bağırsak epitel (PHIC) hücrelerine oranla daha fazla tutulduğu görülmüştür. Bu sonuçlardan glukuronidleşmenin bağlanma etkinliğini arttırdığı ve Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 ince bağırsak kanser hücresine karşı normal insan epitel (PHIC) hücrelerine göre daha fazla seçicilik gösterdiği tespit edildi. Bu durum tümör hücrelerinde beta glukuronidaz enzim konsantrasyonunun daha fazla oranda bulunmasından kaynaklanmaktadır. Glukuronosil transferaz aktivitesinin kolorektal kanser hücrelerinde ve normal insan bağırsak epitel hücreleri dahil normal dokuda farklı oranlarda bulunduğu bilinmektedir. Franklin ve ark kolorektal kanser hücrelerinde yaygın olarak bulunan glukuronosil transferaz'ın glukuronid konjugasyonu ile inaktive olan ilaç direncine katkısı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Franklin et al., 1996). Manyetik nanoparçacıklara bağlı urasil o ve n glukuronidlerde çok daha yüksek bağlanma etkisi görülmekte ancak en yüksek bağlanma her zaman urasil o-glukuronid de görülmektedir. Manyetik nanoparçacıkların hücreye afiniteyi arttırdığı fakat enzimatik mekanizmanın hala geçerli olduğu anlaşılmaktadır.

Glukuronidasyonun kolon kanser hücrelerinin ilaç direnci mekanizmasında rol oynadığı ileri sürülmüştür. Cummings ve ark. antikanser bir ilaç olan SN-38'in UGT1A1 ile glukuronidleşirken bu enzimin izoformunun karaciğerde detoxifikasyondan sorumlu olduğunu ve NU/ICRF 505 adlı antikanser ilacın ilaç direncinin tumöre özel modülasyon ile giderilebileceğini ileri sürmüşlerdir (Cummings et al., 2006).

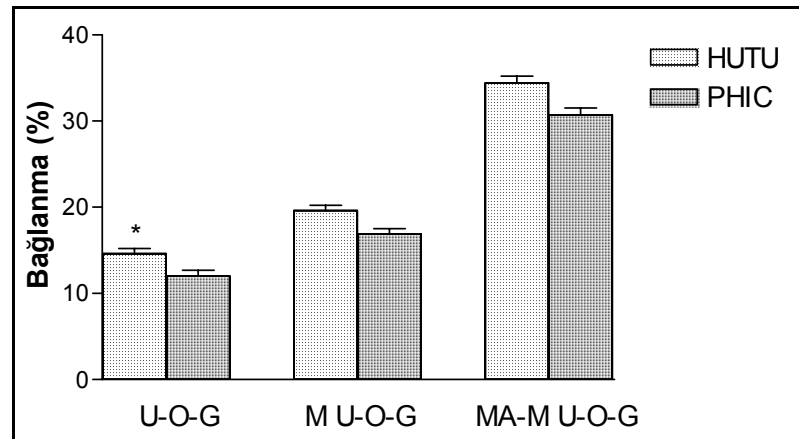
Ritter de karaciğer ve böbreklere ilaveten glukuronosil transferaz aktivitesinin gastrointesitinal sistemden alınan ilaç ve ksenobiyotiklerin metabolizmasında rol aldığını ve insan gastrointestinal sisteminde bulunan Uridine 5'-diphosphate-glucuronosyltransferases tiplerinin bilinmesine rağmen ince bağırsaktaki oranlardaki kişisel farklılıkların nedenlerinin araştırılması gerektiğini ileri sürmüşlerdir (Ritter, 2007). Sonuç olarak glukuronidasyon kolon kanserlerinin pek çok antikanser ilacının ilaç direnci mekanizmasında tek ve önlenebilir yolu olarak ileri sürülmüştür (Cummings et al., 2002)

Çizelge 4.29 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid
HuTu-80	%14.6±0.6	%19.6±0.6	%34.4±0.8
PHIC	%12.0±0.7	%16.9±0.6	%30.7±0.8

Çizelge 4.30 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in manyetik parçacıklara bağlanmasının ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80 ve PHIC üzerindeki etkisi

	Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid/ ^{125}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid/ ^{125}I -Urasil-O-glukuronid
HuTu-80	1.34	2.35
PHIC	1.41	2.56



Şekil 4.56 ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

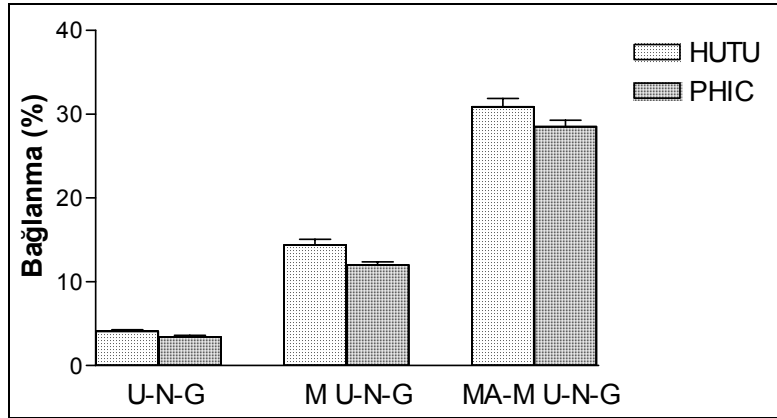
* ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları PHIC hücrelerinden istatistiksel olarak farklıdır ($P < 0.001$).

Çizelge 4.31 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'nin HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

	^{125}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik ^{125}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-N-glukuronid
HuTu-80	%4.1±0.2	%14.4±0.7	%30.9±1.0
PHIC	%3.4±0.2	%12.0±0.4	%28.5±0.8

Çizelge 4.32 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in manyetik parçacıklara bağlanmasının ve manyetik alan uygulamanın HuTu-80 ve PHIC üzerindeki etkisi

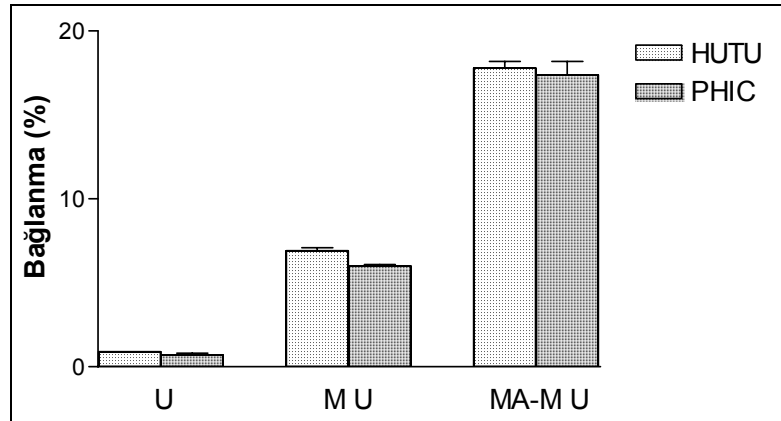
	Manyetik ^{125}I -Urasil-N- glukuronid/ ^{125}I -Urasil- N- glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil-N- glukuronid/ ^{125}I -Urasil-N- glukuronid
HuTu-80	3.51	7.53
PHIC	3.52	8.38



Şekil 4.57 ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

Çizelge 4.33 ^{125}I -Urasil'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

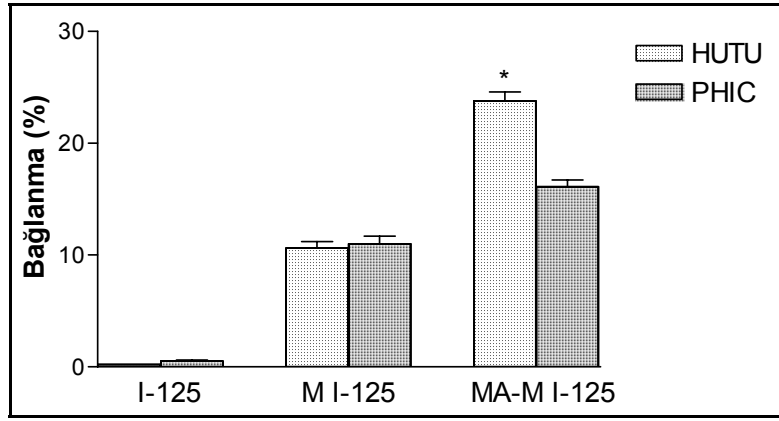
	^{125}I -Urasil	Manyetik ^{125}I -Urasil	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{125}I -Urasil
HuTu-80	%0.9±0.0	%6.9±0.2	%17.8±0.4
PHIC	%0.7±0.1	%6.0±0.1	%17.4±0.8



Şekil 4.58 ^{125}I -Urasil'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

Çizelge 4.34 İyot-125'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

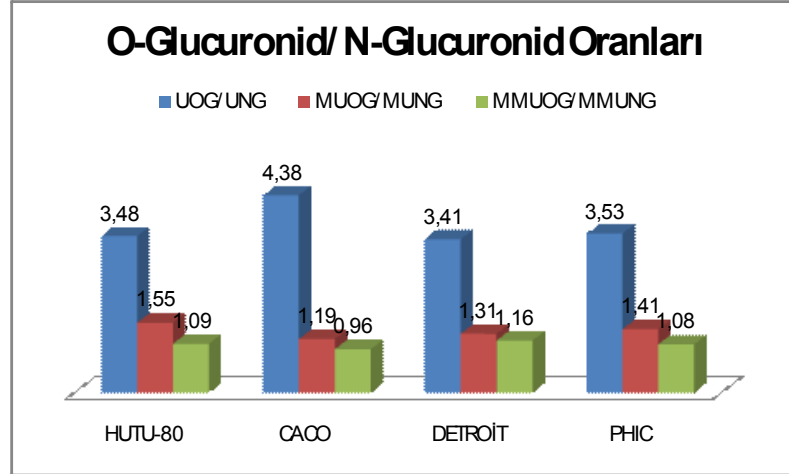
	İyot-125	Manyetik İyot-125	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik İyot-125
HuTu-80	%0.2±0.0	%10.6±0.6	%23.8±0.8
PHIC	%0.5±0.1	%11.0±0.7	%16.1±0.6



Şekil 4.59 ¹²⁵I'in HuTu-80 ve PHIC üzerindeki % bağlanma değerleri.

* Manyetik alan etkisindeki manyetik parçacıklara takılan ¹²⁵I'in HuTu-80 hücrelerine bağlanma oranları PHIC hücrelerinden istatistiksel olarak farklıdır (P<0.001).

4.15 HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC Hücrelerinde O-Glukuronidlerin Bağlanma Oranlarının N-Glukuronidlere Oranı



Şekil 4.60 HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC hücrelerinde o-glukuronidlerin bağlanma oranlarının n-glukuronidlere oranı

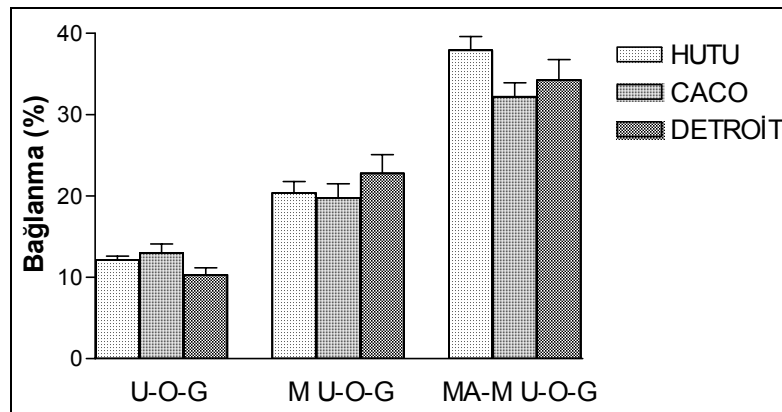
O ve n-glukuronid ligandların hücre bağlanma oranlarını kıyasladığımızda o-glukuronidler ve n-glukuronidler arasında en büyük fark Caco hücrelerinde görülmektedir. Glukuronid ligandları manyetik parçacıklara bağladığımızda bu fark azalmakla birlikte o-glukuronidlerin bağlanma oranı HuTu-80 hücrelerinde 1.55 olurken Caco hücrelerinde 1.19'a düşmektedir. Hücreler üzerinde manyetik alan uygulandığında ise hücre bağlanma oranı yükselmekte fakat iki ligand arasında fark kalmamaktadır.

4.16 ^{131}I -Urasil-O-Glukuronid, ^{131}I -Urasil-N-Glukuronid ve ^{131}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliği

Bu deney ^{125}I ve ^{131}I 'in farklı bozunmalarından kaynaklanan radyasyonun hücreler üzerinde hasar mekanizmasında rol oynayıp oynamadığını anlamak için yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, ^{131}I ile işaretli ligand bağlı manyetik nanoparçacıkların hücre bağlanma etkinliğini arttırdığı, hatta manyetik alan uygulamanın bağlanma etkinliğini yaklaşık iki kat fazlalaştırdığı görülmektedir. Bunun yanında urasil-O-glukuronid'in bağlanma etkinliğinin üç hücre tipinde de urasil-N-glukuronid, urasil ve ^{131}I 'den fazla olduğu tespit edildi. Urasil ve ^{131}I 'in her üç hücre tipinde bağlanma etkinliklerinin çok düşük olduğu ancak manyetik özellik kazandırıldıklarında bağlanma etkinliklerinde ciddi derecede artış meydana geldiği gözlemlendi. Urasil glukuronid örneklerinin üç hücre tipindeki bağlanma etkinlikleri incelendiğinde ve istatistiksel verilerdeki P değerleri göz önüne alındığında üç hücre tipinde de benzer bağlanma etkinliklerine sahip olduğu tespit edildi. Bu sonuçlardan yola çıkarak glukuronidleştirilenin bağlanma etkinliğini bu örneklerde de arttırdığı fakat sadece HuTu-80 hücrelerine karşı seçici olmadığı diğer kanserli hücre tipleri için de yaklaşık olarak aynı derecede seçicilik gösterdiği tespit edildi. ^{131}I işaretli ligandlar ile yapılan çalışmada ^{131}I 'in 1 $\mu\text{Ci/ml}$ spesifik radyoaktivitede radyasyondan kaynaklanan bir hücre hasar etkisi görülmemiştir.

Çizelge 4.35 ^{131}I -Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{131}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik ^{131}I -Urasil-O-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{131}I -Urasil-O-glukuronid
HuTu-80	%12.1±0.5	%20.4±1.4	%37.9±1.7
Caco-2	%13.0±1.1	%19.8±1.7	%32.2±1.7
Detroit 562	%10.3±0.9	%22.8±2.3	%34.3±2.5



Şekil 4.61 ^{131}I -Urasil-O-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-O-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-O-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

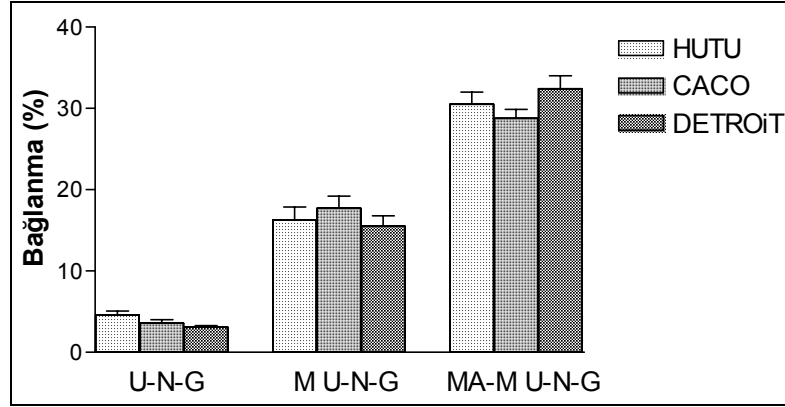
U-O-G : Urasil-O-glukuronid

M U-O-G : manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid

MA-M U-O-G : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid

Çizelge 4.36: ^{131}I -Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{131}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik ^{131}I -Urasil-N-glukuronid	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{131}I -Urasil-N-glukuronid
HuTu-80	%4.6±0.5	%16.3±1.6	%30.5±1.5
Caco-2	%3.6±0.4	%17.7±1.5	%28.8±1.1
Detroit 562	%3.1±0.2	%15.5±1.3	%32.4±1.6



Şekil 4.62 ^{131}I -Urasil-N-glukuronid, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-N-glukuronid ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil-N-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

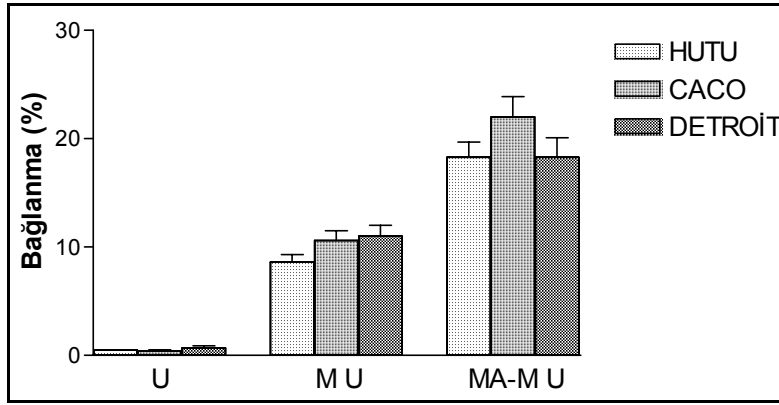
U-N-G : Urasil-N-glukuronid

M U-N-G : manyetik parçacıklara takılı Urasil-N-glukuronid

MA-M U-N-G : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı Urasil-N-glukuronid

Çizelge 4.37 ^{131}I -Urasil, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{131}I -Urasil	Manyetik ^{131}I -Urasil	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{131}I -Urasil
HuTu-80	%0.5±0.0	%8.6±0.7	%18.3±1.4
Caco-2	%0.4±0.1	%10.6±0.9	%22.0±1.9
Detroit 562	%0.7±0.2	%11.0±1.0	%18.3±1.8



Şekil 4.63 ^{131}I -Urasil, manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I -Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

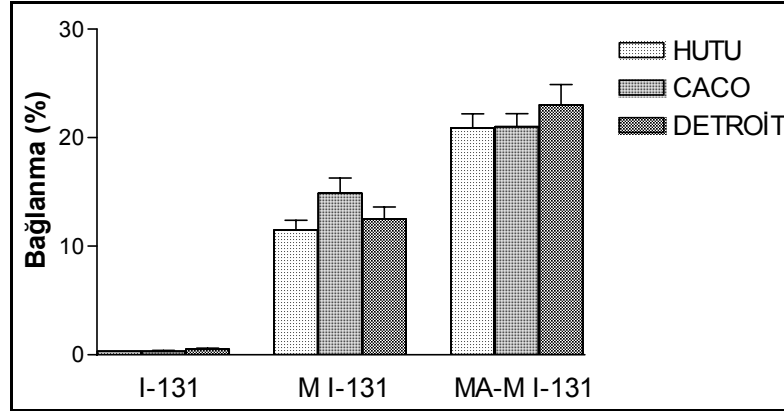
U : urasil

M U : manyetik parçacıklara takılı urasil

MA-M U : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı urasil

Çizelge 4.38 ^{131}I , manyetik parçacıklara takılı ^{131}I ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

	^{131}I	Manyetik ^{131}I	Manyetik Alan Etkisi Altında Manyetik ^{131}I
HuTu-80	%0.3±0.0	%11.5±0.9	%20.9±1.3
Caco-2	%0.3±0.1	%14.9±1.4	%21.0±1.2
Detroit 562	%0.5±0.1	%12.5±1.1	%23.0±1.9



Şekil 4.64 ^{131}I , manyetik parçacıklara takılı ^{131}I ve manyetik alan etkisi altındaki manyetik parçacıklara takılı ^{131}I 'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki % bağlanma değerleri.

M ¹³¹I: manyetik parçacıklara takılı ¹³¹I

MA-M ¹³¹I : manyetik alan etkisi altında manyetik parçacıklara takılı ¹³¹I

4.17 ¹²⁵I ve ¹³¹I'in Farklı Spesifik Aktivitelerde Kullanılması ile Elde Edilen I-125 ve I-131 İşaretli Urasil-O-Glukuronid, Urasil-N-Glukuronid ve Urasil'in HuTu-80 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliğinin İncelenmesi

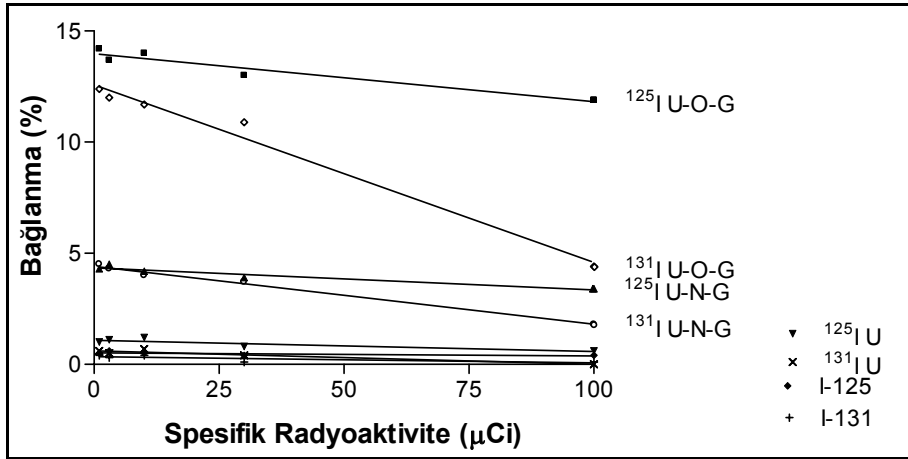
¹²⁵I ve ¹³¹I farklı bozunma özellikleri gösteren radyonüklidler olduğundan farklı spesifik aktivitelerde hazırlanan ¹²⁵I ve ¹³¹I ile işaretli glukuronid ligandların ve glukuronid bağlı manyetik nanoparçacıkların üzerinde çalışılan hücreler üzerinde etkisi incelenmiştir. Kullanılan farklı ¹²⁵I ve ¹³¹I spesifik radyoaktiviteleri ile yapılan işaretlemeler sonucunda urasil-O-glukuronid ve urasil-N-glukuronid'nin bağlanma etkinliğinin urasil, Na¹³¹I ve Na¹²⁵I'e göre yüksek olduğu tespit edildi. Bunun yanında ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli urasil-O-glukuronid'in bağlanma etkinliğinin tüm denemelerde urasil-N-glukuronid'den fazla olduğu görüldü. Ayrıca ¹²⁵I işaretli urasil-O- glukuronid ve urasil-N-glukuronid'in bağlanma etkinliği artan spesifik rdayoaktivite ile çok fazla değişmemekle birlikte ¹³¹I işaretli urasil-O-glukuronid ve ¹³¹I işaretli urasil-N-glukuronid'in bağlanma etkinlikleri artan spesifik aktiviteyle azalma göstermektedir. İstatistiksel veriler incelendiğinde Urasil-O-glukuronid ve Urasil-N-glukuronid'in ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli gruplarında radyasyon dozuna bağlı olarak oluşan değişim her iki grupta ¹²⁵I ¹³¹I arasında lineeritede istatistiksel olarak anlamlılık göstermiştir (P<0.005).

Çizelge 4.39 ^{125}I -Urasil-O- glukuronid, ^{125}I -Urasil-N- glukuronid, ^{125}I -Urasil ve ^{125}I 'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın işaretlemde kullanılan ^{125}I 'in spesifik aktivitesine bağlı değişimi.

^{125}I aktivitesi	^{125}I -Urasil-O- glukuronid	^{125}I -Urasil-N- glukuronid	^{125}I -Urasil	^{125}I (Na ^{125}I)
1 $\mu\text{Ci/mL}$	% 14.2 \pm 0.4	% 4.3 \pm 0.1	% 1.0 \pm 0.1	% 0.5 \pm 0.1
3 $\mu\text{Ci/mL}$	% 13.7 \pm 0.7	% 4.5 \pm 0.1	% 1.1 \pm 0.1	% 0.6 \pm 0.0
10 $\mu\text{Ci/mL}$	% 14.0 \pm 0.2	% 4.2 \pm 0.1	% 1.2 \pm 0.1	% 0.5 \pm 0.0
30 $\mu\text{Ci/mL}$	% 13.0 \pm 0.2	% 3.9 \pm 0.0	% 0.8 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.1
100 $\mu\text{Ci/mL}$	% 11.9 \pm 0.4	% 3.4 \pm 0.1	% 0.6 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.0

Çizelge 4.40: ^{131}I -Urasil-O-glukuronid, ^{131}I -Urasil-N-glukuronid, ^{131}I -Urasil ve İyot-131'in HuTu-80 hücreleri üzerindeki % bağlanmanın işaretlemde kullanılan ^{131}I 'in spesifik aktivitesine bağlı değişimi.

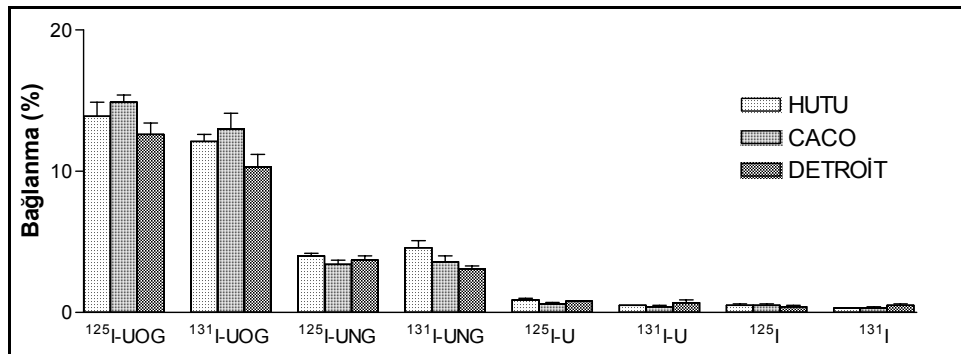
^{131}I aktivitesi	^{131}I -Urasil-O- glukuronid	^{131}I -Urasil-N- glukuronid	^{131}I -Urasil	İyot-131 (Na ^{131}I)
1 $\mu\text{Ci/mL}$	% 12.4 \pm 0.1	% 4.5 \pm 0.0	% 0.6 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.0
3 $\mu\text{Ci/mL}$	% 12.0 \pm 0.2	% 4.3 \pm 0.1	% 0.5 \pm 0.1	% 0.3 \pm 0.1
10 $\mu\text{Ci/mL}$	% 11.7 \pm 0.2	% 4.0 \pm 0.1	% 0.7 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.0
30 $\mu\text{Ci/mL}$	% 10.9 \pm 0.2	% 3.7 \pm 0.1	% 0.4 \pm 0.0	% 0.1 \pm 0.0
100 $\mu\text{Ci/mL}$	% 4.4 \pm 0.2	% 1.8 \pm 0.0	% 0.0 \pm 0.0	% 0.1 \pm 0.0



Şekil 4.65: ¹²⁵I ve ¹³¹I'in artan spesifik radyoaktiviteleriyle hazırlanan glukuronid ligandların ve urasil ve ¹³¹I (Na¹³¹I) ve ¹²⁵I (Na¹²⁵I) HuTu-80 hücreleri üzerindeki bağlanma oranları (30 µg ligand, 30 dakika inkübasyon süresi)

4.18 ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 Hücreleri Üzerindeki Bağlanma Etkinliklerinin Karşılaştırılması

¹²⁵I işaretli urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil ile ¹³¹I işaretli urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinlikleri karşılaştırıldığında bağlanma düzeylerinin benzer olduğu görülmüştür. Yapılan tek yönlü ANOVA testi sonucunda elde edilen P değerleri göz önüne alındığında ¹²⁵I-Urasil-O-glukuronid ve ¹³¹I-urasil-O-glukuronid, ¹²⁵I-urasil-N-glukuronid ve ¹³¹I-urasil-N-glukuronid, ¹²⁵I-urasil ve ¹³¹I-urasil'in her üç hücrede de P değerlerinin 0.05 den büyük olduğu ve aralarında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir.

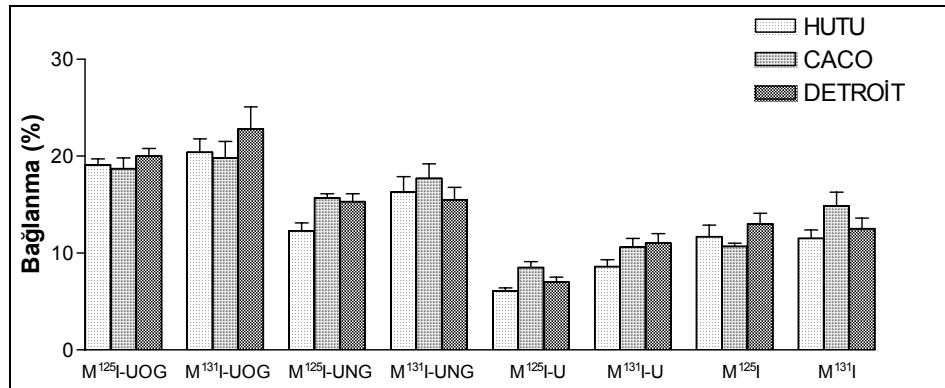


Şekil 4.66: ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid, Urasil'in ve ¹²⁵I, ¹³¹I'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.

¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N- glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinlikleri karşılaştırıldığında manyetik parçacıklara takılı Urasil-O- glukuronid'in Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma düzeyleri arasında anlamlı bir fark olduğu yapılan tek yönlü ANOVA testi sonucunda elde edilen 0.05 den küçük P değerleri ile ortaya konmuştur. İncelenen bütün örneklerde ¹³¹I işaretli örneklerde daha düşük bir bağlanma görülürken yalnız Detroit 562 hücrelerinde istatistiksel olarak bir anlamlılık görülmüştür.

Çizelge 4.41 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma değerleri.

	HuTu-80	Caco-2	Detroit 562
Manyetik ^{125}I -Urasil-O-glukuronid	%19.1±0.6	%18.7±1.1	%20.0±0.8
Manyetik ^{131}I -Urasil-O-glukuronid	%20.4±1.4	%19.8±1.7	%22.8±2.3
Manyetik ^{125}I -Urasil-N-glukuronid	%12.3±0.8	%15.7±0.4	%15.3±0.8
Manyetik ^{131}I -Urasil-N-glukuronid	%16.3±1.6	%17.7±1.5	%15.5±1.3
Manyetik ^{125}I -Urasil	%6.1±0.3	%8.5±0.6	%7.0±0.5
Manyetik ^{131}I -Urasil	%8.6±0.7	%10.6±0.9	%11.0±1.0
Manyetik ^{125}I	%11.7±1.2	%10.7±0.3	%13.0±1.1
Manyetik ^{131}I	%11.5±0.9	%14.9±1.4	%12.5±1.1

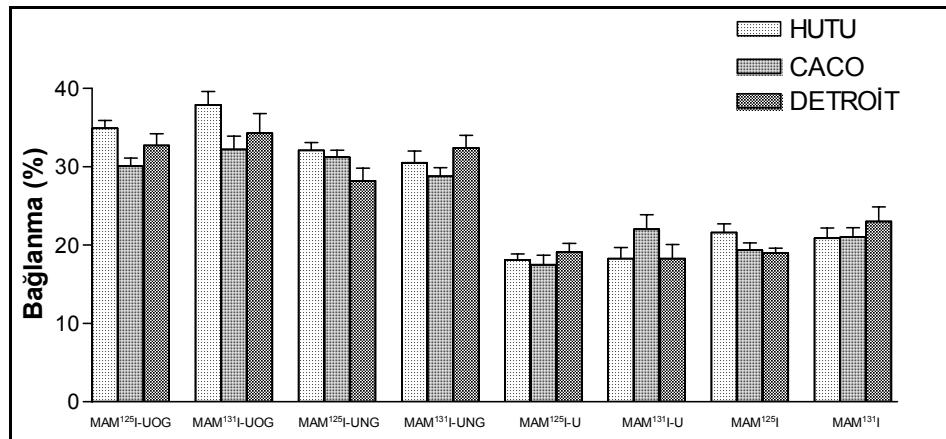


Şekil 4.67 ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid, Urasil ve manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵I, ¹³¹I'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.

¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli manyetik parçacıklara takılı urasil-O-glukuronid, urasil-N-glukuronid ve urasil'in manyetik alan etkisi altında HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma değerleri ayrı ayrı karşılaştırıldığında yapılan tek yönlü ANOVA testi sonucunda elde edilen P değerleri 0.05 den büyük bulunmuş dolayısıyla aralarında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. İncelenen bütün örneklerde ¹³¹I bağlı olanlarda daha büyük hücre bağlanması görülmesine rağmen istatistiksel bir anlamlılık görülmemiştir. ¹³¹I'li örneklerin istatistiksel olarak anlamlı olmasa bile daha yüksek hücre bağlanması göstermesi çalışılan koşullarda nanoparçacıkların ¹³¹I'den gelen radyasyonun hücre üzerinde hasar etkisini self absorpsiyonla azalttığını göstermektedir.

Çizelge 4.42 ^{125}I ve ^{131}I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O-glukuronid, Urasil-N-glukuronid ve Urasil'in manyetik alan etkisi altında HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücreleri üzerindeki bağlanma değerleri.

	HuTu-80	Caco-2	Detroit 562
MA-M ^{125}I - Urasil-O- glukuronid	%34.9±1.0	%30.1±1.0	%32.7±1.5
MA-M ^{131}I - Urasil-O- glukuronid	%37.9±1.7	%32.2±1.7	%34.3±2.5
MA-M ^{125}I - Urasil-N- glukuronid	%32.1±1.0	%31.2±0.9	%28.2±1.6
MA-M ^{131}I - Urasil-N- glukuronid	%30.5±1.5	%28.8±1.1	%32.4±1.6
MA-M ^{125}I - Urasil	%18.1±0.8	%17.5±1.2	%19.1±1.1
MA-M ^{131}I - Urasil	%18.3±1.4	%22.0±1.9	%18.3±1.8
MA-M ^{125}I	%21.6±1.1	%19.4±0.9	%19.0±0.6
MA-M ^{131}I	%20.9±1.3	%21.0±1.2	%23.0±1.9

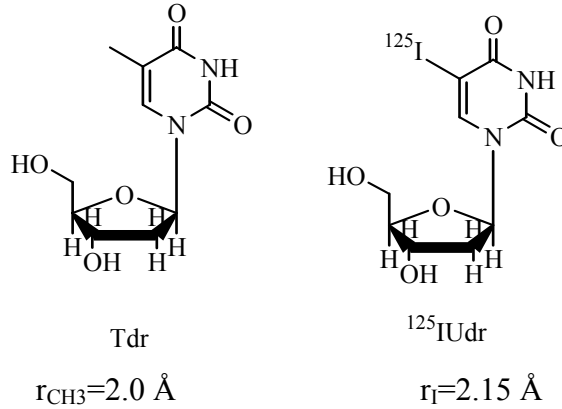


Şekil 4.68 ¹²⁵I ve ¹³¹I işaretli manyetik parçacıklara takılı Urasil-O- glukuronid, Urasil-N- glukuronid, Urasil ve manyetik parçacıklara takılı ¹²⁵I, ¹³¹I'in manyetik alan etkisi altında HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerine bağlanma düzeyleri.

UDP glukuronil transferaz ve beta glukuronidaz enzimlerinin endoplasmik retikulumda oluştuğu ve hepatositler tarafından alındığı ve glukuronid transportunun da plasma membranından ve endoplasmik retikulumdan olduğu bilinmektedir (Csala et al., 2000; Chen et al., 2007). Elde edilen sonuçlar ile karşılaştırıldığında I-125'in ve I-131'in bozunma şekillerine bakılırsa ¹²⁵I hücre DNA sında etkili olabilecek bir radyonükliddir Elektron yakalaması ile birlikte ve bozunduğu Te-125m'in yaklaşık 30 keV'lik gama fotonları ile birlikte çok sayıda düşük enerjili Auger ve iç dönüşüm elektronu salar (Unak, 2002). Bunlar da ancak DNA gibi biryapı içinde olursa etkili bir terapötik etki gösterebilirler. ¹³¹I ise negatif beta ışıması yanında 364 keV'lik gama fotonları salar, hücre membranı gibi pozisyonlarda daha etkili terapötik etki gösterir (Unak and Çetinkaya, 2005). Edilen sonuçlar da o-ve n-

glukuronidlerin ve endoplazmik retikulum membranından transport olduğu ve bu nedenle ^{131}I 'in daha etkili bir hasar etkisi ile sonuçlandığını göstermektedir.

Ertl ve Feinendegen ^{125}I 'in bir timidin türevi olan ioddodeoksiuridine (IUdR) vasıtasıyla DNA'ya girdiği zaman, beklenenden daha yüksek radyotoksik etki gösterdiğini göstermişlerdir (Ertly and Feinendegen, 1969). Bu konu ile ilgili Auger elektron salıcı radyonüklidlerin DNAda tek ve çift zincir kırılması ve hücre ölümü ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. (Adelstein, 1992; Charlton et al., 1994; Geselowitz et al., 1995; Hofer et al., 1996; Hofer et al., 2000; Karaginnis et al., 2000; Lobachevsky and Martin, 2000; Schneiderman et al., 2001; Sedelnikova et al., 1998; Vandenabeele et al., 1992). IUdR radyoiodu thimidine benzer bir yapıda DNA içine girmesini sağlar. IUdR, timidinin 5 pozisyonundaki metil grubunun yerine iyot gelmiş türevidir. ^{125}I 'in ve diğer Auger elektron salıcıların DNA içinde bozunması sonucu tek ve çift zincir kırılması ve hücre ölümü ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır (Şekil 4.69).



Şekil 4.69 Timidin ve IUdR'in Moleküler Yapıları

Metil grubu ve iyot atomunun Van der Waals çapları birbirine çok yakın olduğundan nispeten timidin benzeri bir yapı oluşturur. Timidin analogu olarak IUdR hücre içine alınır, fosforillenir ve DNA'ya taşınır. ¹²⁵IUdR gibi bir molekülü taşıyan radyoişaretli DNA proliferasyonun in vitro olarak izlenmesi, migrasyon, normal ve kanser hücrelerinin ölümü, çeşitli kemoterapötiklerin ve radyoterapötiklerin hücre düzeyinde etkinliği (Charlton et al., 1994; Geselowitz et al., 1995; Hofer et al., 1996; Hofer et al., 2000; Kasis et al., 2000; Karaginnis et al., 2000; Lobachevsky and Martin, 2000; Schneiderman et al., 2001; Sedelnikova et al., 1998; Pomplun et al., 1992; Panyutin et al., 2001; Vandenabeele et al., 1992) ve hayvan tümör oluşturma modelleme çalışmaları (Kassis et al., 1996a; Kassis et al., 1996b) ve kanser hastalarında (Harrison et al., 1996; Mariani et al., 1993, 1994, 1996), Vandenabeele et al., 1993) kullanılmıştır.

Roeske ve ark. nanoparçacıkların tümöre verilen radyasyon dozunu arttırıcı rol oynayabileceğini ileri sürmüşler ve nanoparçacıkların atom nolarına bağlı olarak x-ışınları ve çok kullanılan radyonüklidler için doz zenginleştirme faktörünü 5 mg/ml nanoparçacık konsantrasyonu için Co-60, Ir-192, Au-198, Cs-137, 6, 18, and 25 MV x-rays için 1.05 den küçük iken 50, 80, 100, ve 140 KVp luk daha düşük x-ışınları ve Pd-103 and 1-125 gibi daha düşük enerjili foton ve elektronlar salan daha büyük olduğunu rapor etmişlerdir. (Roeske et al., 2007). Bu etki ise dışardan eksternal radyasyon ile ışınlama sonucu nanoparçacıkların daha yüksek atom no nedeni ile daha çok radyasyon absorplaması ve fotoelektrik olay sonucu ortama fotoelektron, Auger ve Compton elektronlarından verdiği enerji nedeni iledir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

HuTu-80 hücrelerinden elde edilen UDP-glucuronil transferaz enzimi içeren mikrozom preparatları ve UDP glukuronik asit kullanılarak urasil glukuronidin enzimatik sentezinde 22.95 ± 2.4 glukuronidasyon verimi elde edilmiştir. Bu çalışmada glukuronidasyon verimi yönünden iyi bir verim elde edilmiştir. Ancak daha ilerideki çalışmalarda glukuronidasyon verimi üzerine etkili olabilecek parametreler yönünden de incelenmelidir.

Urasil-n-glukuronid (UNG) ve Urasil-o-glukuronid (UOG) olarak adlandırılan iki farklı ürün tespit edilmiştir.

Amin fonksiyonlu ve silika fonksiyonlu manyetit nanoparçacıklar sentezlenmiş ve urasil, UNG ve UOG bu parçacıklara konjuge edilerek ^{125}I ve ^{131}I ile ayrı ayrı işaretlenmişlerdir. SEM analizleri manyetit nanoparçacıkların boyutu 40-60 nm olduğunu göstermiştir.

Hem ^{125}I ve hem de ^{131}I işaretli urasil-o-glukuronid (UOG) ve UNG, HuTu-80, Caco-2, Detroit 562 ve PHIC normal insan bağırsak epitel hücreleri üzerinde iyi bağlanma oranları göstermişlerdir.

^{125}I ve ^{131}I işaretli urasil-o-glukuronid (UOG) ve urasil-n-glukuronid UNG üzerinde çalışılan hücreler üzerinde farklı bağlanma oranları göstermişlerdir. O-glukuronid türevi tüm hücre tiplerinde daha aktif görünmekte ve N-glukuronid türevine göre daha yüksek bağlanma

göstermiştir. Buradan beta glukuronidaz enziminin O-glukuronidi daha fazla hidrolizleyebildiği sonucu çıkarılmaktadır.

PHIC normal insan bağırsak epitel hücreler ile HuTu 80 ince bağırsak kanser hücreleri arasında urasil-n-glukuronid (UNG) yönünden bir fark görülemezken urasil-o-glukuronid (UOG)'nin hücreye ilgisi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Daha ilerdeki çalışmalarda gastrointestinal sistem dışındaki diğer tip kanserli hücrelerden elde edilen UDP-glukuronidaz enzim içeren mikrozom preparatlarından elde edilen farklı glukuronid bileşikleri farklı tümör hücrelerine spesifik yeni glukuronid prodrugların gelişmesine yardımcı olabilecektir.

İstatistiksel hata sınırları içinde ^{125}I -Urasil-N-glukuronid'in her üç hücre tipine de bağlanma etkinliği de bir birinin aynı olduğu görülmektedir. Ancak ^{125}I -urasil-n-glukuronid'in her üç hücre türü üzerinde de bağlanma oranları ^{125}I -Urasil-O-glukuronid'e göre 3-4 defa daha küçüktür.

Urasil-o-glukuronid (UOG), manyetite bağlı urasil-o-glukuronid (m-UOG) ve manyetik alan uygulanmış manyetite bağlı urasil-o-glukuronid'in HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerindeki bağlanma oranları urasil, manyetite bağlı urasil ve manyetik alan uygulanmış manyetite bağlı urasil ile karşılaştırıldığında UOG'nin bağlanma oranları HuTu-80, Caco-2 ve Detroit 562 hücrelerinde farklılık göstermektedir ve Caco-2 hücrelerinde 25 kata kadar çıkmaktadır. Buradan Caco-2 hücrelerinin beta glukuronidaz aktivitelerinin HuTu-80 ve Detroit 562

hücrelerinden daha fazla olduğu sonucu çıkarılabilir. Manyetik parçacık bağlı moleküllerle yapılan deneylerde ise toplam bağlanma daha çok olmasına karşın manyetik parçacıklar ile ilgili mekanizmanın enzimatik mekanizmadan daha etkin olası nedeniyle farklılıklar azalmaktadır. Benzer durum n-glukuronidler için de geçerli olmasına rağmen oranlar daha düşüktür. Bu durum o-glukuronidlerin prodrug olarak hedefe yönelik terapide daha etkili olabileceğini göstermektedir.

N ve O glukuronidlerin urasil ile karşılaştırıldığında hücre inkorporasyonu çok yüksek iken urasil ve n veya o glukuronid konjuge manyetik parçacıklar her bir durumda hücre inkorporasyonu yüksek olmakta aglikona bağlı seçicilik azalmaktadır. Manyetik alan uygulandığında ise hücre inkorporasyonu çok daha yüksek olmaktadır. Elde edilen sonuçlar glukuronidlerden başka aglikonların bağlı olduğu manyetik nanoparçacıklarla ve farklı hücre türleri ile de araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar hem radyoiyot bağlı glukuronid bileşiklerinin hem de radyoiyot işaretli manyetik nanoparçacıkların terapi ve görüntüleme etkinliğinin prelinik düzeyde de araştırılmaya devam etmesi açısından umut verici görünmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Adelstein, S.J., Howell, R.W., Narra, V. R., Sastry, K. S. R. and Rao D. V.**, 1992, Am Biophysical Aspects of Auger Processes: A review of The Literature, In- Biophysical Aspects of Auger Processes, *Ass. Phys. In Med. Sym. Series*, (8), 1-13
- Ahn, H., Choi T., De Castro K., Lee K., Kim B., Moon B., Hong S., Lee J., Chun K., Cheon G., Lim S., An G. and Rhee H.**, 2007, Synthesis and evaluation of cis-1-[4-(Hydroxymethyl)-2-cyclopenten-1-yl]-5-[I-124]iodouracil: A New Potential PET Imaging Agent for HSV1-tk Expression, *Journal Of Medicinal Chemistry*, 50-24, 6032-6038p.
- Alexiou, C., Bergemann, C., Schmid, R., Hulin, P., Schmidt, A., Jurgons, R., Arnold, W. and Parak, F.G.**, 2002, Enrichment And Biodistribution Of A Magnetically Targeted Drug Carrier, *European Cells and Materials* Vol. 3. Suppl. 2, 135-137p.
- Asmatulua, R., Zalichb, M. A., Clausa, R. O. and Riffleb, J. S.**, 2005, Synthesis, Characterization And Targeting Of Biodegradable Magnetic Nanocomposite Particles By External Magnetic Fields, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 292, 108–119p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Aşıkoğlu, M., Yurt, F., Çağlayan, O., Ünak, P. and Özkılıç, H., 2000,** Detecting Inflammation with ^{131}I -labeled Ornidazole, *Appl. Radiat. Isot.*, 53, 411-413p.
- Avcıbaşı, U., 2004,** Radyoaktif İyod-131 İle İşaretli Bazı Glukuronid Türevi Bileşiklerin Biyolojik Aktivitelerinin Test Edilmesi Ve β -Glukuronidaz Ölçümlerinde Kullanım Potansiyellerinin İncelenmesi, *E.Ü.Fen Bilimleri Doktora Tezi*, 165s.
- Avcıbaşı, U., Avcıbaşı, N., Ünak, T., Ünak, P., Müftüler, F. Z., Yıldırım, Y., Dinçalp, H., Gümüşer, F.G. and Rükşen, E., 2008,** Metabolic Comparison Of Radiolabeled Aniline- And Phenol-Phthaleins With ^{131}I , *Nucl Med.Biol.*, 35(4), 481-492p.
- Babic, M., Horak, D., Trchova, M., Jendelova, P., Glogarova, K., Lesny, P., Herynek, V., Hajek, M. and Sykova, E., 2008,** Poly(L-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles For Stem Cell Labeling, *Bioconjugate Chemistry*, 19, 3, 740-750p.
- Bahadur, D. and Giri, J., 2003,** Biomaterials and Magnetism, *Sadhana-Academy Proce,ings In Engineering Sciences*, 28, 639-656, 3-4p.
- Barua, A.B., 1997,** Retinoyl- β -D-Glucuronide: A Biologically Active Form of Vitamin A., *Nutr. Rev.*, 55, 259-267p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Bekis, R., Medine, I., Dağdeviren, K. And Unak, P.,** 2008, Sentinel Lenf Düğümü Saptanmasında Yeni Bir Yöntem, Turkish Journal of Nuclear Medicine, 17, 1, No22, 49s.
- Berry, C.C. and Curtis, A.S.G.,** 2007, Functionalisation Of Magnetic Nanoparticles For Applications in Biomedicine, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 36, 198, 206p.
- Biber, F. Z.,** 2004, Estradiol Glukuronid Türevi Bir Radyofarmasötiğin Tasarlanması, Sentezi Ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, *Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 27-28s.
- Bicker, U.,** 1974, Application of β -D-Glucuronides and Glucose Together Suggest A New Direction For Cancer Chemotherapy, *Nature*, 252, 726-730p.
- Cao. J., Wang, Y., Yu, J., Xia, J., Zhang, C., Yin, D. and Hafeli, U. O.,** 2004, Preparation And Radiolabeling Of Surface-Modified Magnetic Nanoparticles With Rhenium-188 For Magnetic Targeted Radiotherapy, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 277, 165, 74p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Charlton, D. E., Hofer, K. G., Vanloon, N. and Schneiderman, M. H.,** 1994, Double-strand Breaks From I-125 Incorporated in the DNA and Cell-Death, *Int. J. Radiat. Biol.*, 66 : (5), 437-440p.
- Chen, K.C., Cheng, T.L., Leu, Y.L., Prijovich, Z.M., Chuang, C.H., Chen, B.M. and Roffler, S.R.,** 2007, Membrane-Localized Activation Of Glucuronide Prodrugs By Beta-Glucuronidase Enzymes, *Cancer Gene Therapy*, 14, 2, 187-200p.
- Chunfua, Z., Jinquana, C., Duanzhia, Y., Yongxiana, W., Yanlinb, F. and Jiaju, T.,** 2004, Preparation And Radiolabeling Of Human Serum Albumin (HSA)-Coated Magnetite Nanoparticles For Magnetically Targeted Therapy, *Applied Radiation and Isotopes*, 61, 1255–1259p.
- Csala, M., Banhegyi, G., Braun, L., Szirmai, R., Burchell, A., Burchell, B., Benedetti, A. and Mndll, J.,** 2000, Beta-Glucuronidase Latency In Isolated Murine Hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, 59, 7, 801-805p.
- Cummings, J., Boyd, G., Ethell, B., Macpherson, J., Burchell, B., Smyth, J. and Jodrell, D.,** 2002, Enhanced Clearance Of Topoisomerase I Inhibitors From Human Colon Cancer Cells By Glucuronidation, *Biochemical Pharmacology*, 63, 4, 607-613p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Cummings, J., Ethell, B., Jardine, L. and Burchell, B., 2006, Glucuronidation of SN-38 and NU/ICRF 505 in Human Colon Cancer And Adjacent Normal Colon, *Anticancer Research*, 26-3B, 2189-2196p.

Dağdeviren, K., Unak, P., Bekis, R., Muftuler, F.Z.B., Ertay, T., Ulker, O. and Durak, H., 2007, Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC), *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 273, 3, 635-639p.

Dagdeviren, K., Unak, P., Bekis, R., Muftuler, F.Z.B., Ertay, T., Ulker, O. and Durak, H., 2005, Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC), 1st-INCC, 1st International Nuclear Chemistry Congress, Kuşadası, Turkey Abstract Book p. 373, 22-29p.

Dağdeviren, K., Ünak, P., Bekis, R., Müftüler, F.Z.B., Ertay, T., Ulker, O. and Durak, H., 2005, Radioiodinated Magnetic Targeted Carriers (I-131-MTC). Annual Congress of the EANM, Istanbul 2005, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 314, Suppl 1, 32p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Dandamudi, S. and Campbell, R.,** 2007, The Drug Loading, Cytotoxicity And Tumor Vascular Targeting Characteristics Of Magnetite in Magnetic Drug Targeting, *Biomaterials*, 28-31, 4673-4683p.
- Djozan, D., Baheri, T., Karimian, G. and Shahidi, M.,** 2008, Forensic Discrimination Of Blue Ballpoint Pen Inks Based On Thin Layer Chromatography And Image Analysis, *Forensic Science International* 179 199–205p.
- Ender, Ü.,** 2006, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi İçin Farklı Polaritelere Sahip, Fonksiyonel Gruplu Kolon Dolgu Materyallerinin Sentezi Ve Kromatografik Karakterizasyonu, *Doktora tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 16-20s.
- Ertl, H. and Feinendegen, L.,** 1969, Microdosimetry of I-125 With Reference To The Auger Effect., *2nd Sym. Microdosimetry*, Stresa Italy.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ethell, B.T., Riedel, J., Englert, H. and Jantz, H.,** 2003, Oekonomopoulos R, Burchell B, Source: Glucuronidation of HMR1098 in Human Microsomes: Evidence For The Involvement Of UGT1A1 in The Formation of S-Glucuronides, *Drug Metabolism And Disposition* 31-8, 1027-1034p.
- Fahlvik, A.K., Holtz, E., Leander, P., Schroder, U. and Klaveness, J.,** 1990, Magnetic Starch Microspheres, Efficacy And Elimination - A New Organ-Specific Contrast Agent For Magnetic-Resonance-Imaging, *Investigative Radiology*, 25, 2, 113-120p.
- Fishman, W.H. and Anlyan, A.J.,** 1947, The Presence Of High β -Glucuronidase Activity In Cancer Tissue., *J. Biol. Chem.*, 169, 449-450p.
- Fishman, W.H.,** 1995, Isozymes, Tumor Markers and Oncodevelopmental Biology, *Tumor Biol.*, 16, 394-402p.
- Foulon, C.F., Adelstein, S. and Kassis, A.,** 1996, Kit Formulation For The Preparation Of Radiolabeled Iododeoxyuridine By Demetallation, *Journal Of Nuclear Medicine*, 37-4, 1-3 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Foulon, C.F., Zhang, Y., Adelstein, S. and Kassis, A.,** 1995, Instantaneous Preparation Of Radiolabeled 5-Iodo-2'-Deoxyuridine, *Applied Radiation And Isotopes*, 46-10, 1039-1046p.
- Franklin, T., Jacobs, V., Jones, G., Ple, P. and Bruneau, P.,** 1996, Glucuronidation Associated With Intrinsic Resistance To Mycophenolic Acid In Human Colorectal Carcinoma Cells, *Cancer Research* ,56-5 984-987p.
- Freire, T., Lo-Man, R., Piller, F., Piller, V., Leclerc, C. and Bay, S.,** 2006, Enzymatic Large-Scale Synthesis Of MUC6-Tn Glycoconjugates For Antitumor Vaccination, *Glycobiology*, 16, 5, 390-401p.
- Geselowitz, D.A., McManaway, M.E., Hofer, K.,G. and Neumann, R.D.,** 1995, The Cytotoxicity of Decays of Tritium and I-125 Incorporated in DNA of Mammalian-Cells Implications for the Low-LET Dosimetry of Incorporated Nuclides, *Radiat. Res.*, 142 : (3), 321-326p.
- Gibson, G.G.and SKETT, P.,** 1986, Introduction To Drug Metabolism, Chapman and Hall, Ltd, London, 1-281p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Guenther, I., Wyer, L., Knust, E., Finn, R.D., Kozirowski, J. and Weinreich, R., 1998, Radiosynthesis And Quality Assurance Of 5-[I-124]Iodo-2'-Deoxyuridine For Functional PET Imaging Of Cell Proliferation, *Nuclear Medicine & Biology*, 25-4, 359-365p.

Haeberlin, B., Rubas, W., Nolen, H.W. and Friend, D.R., 1993, In Vitro Evaluation Of Dexamethasone- β -D-Glucuronide For Colon-Specific Drug Delivery, *Pharmacol. Res.*, 10, 1553-1562p.

Hafeli, U.O., Roberts, W.K., Pauer, G.J., Kraeft, S.K. and Macklis, R.M., 2001, Stability Of Biodegradable Radioactive Rhenium (Re-186 And Re-188) Microspheres After Neutron-Activation, *Applied Radiation and Isotopes*, 54, 6, 869-879p.

Hafeli, U.O., 2004, Magnetically Modulated Therapeutic Systems, *International Journal of Pharmaceutics* 277, 19–24p.

Hafeli, U.O., Sweeney, S.M., Beresford, B.A., Humm, J.L. and Macklis, R.M., 1995, Effective Targeting of Magnetic Radioactive ^{90}Y -Microspheres to Tumor Cells by an Externally Applied Magnetic Field. Preliminary In Vitro and In Vivo Results, *Nucl. Med. Biol.* Vol. 22, No. 2, 147-155p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Hafeli, U.O., Yub, J., Farudic, F., Lid, Y. and Tapolskyd, G.,** 2003, Radiolabeling Of Magnetic Targeted Carriers (MTC) With Indium-111, *Nuclear Medicine and Biology* 30, 761–769p.
- Hofer, K.G., Lin, X. and Bao, S.P.,** 1996, DNA Damage, Micronucleus Formation, and Cell Death From I-125 Decays in DNA, *Acta Oncologica*, 35, (7), 825-832p.
- Hofer, K.G., Lin, X. and Schneiderman, M.H.,** 2000, Paradoxial Effects of I-125 Decays in Parent and Daughter DNA: A New Target Model for Radiation Damage, *Radiat. Res.*, 153(4), 428-435p.
- Hoste, K., Winne, K.D. and Schacht, E.,** 2004, Polymeric Prodrugs, *International Journal of Pharmaceutics* 277, 119–131p.
- Houba, P.H.J., Leenders, R.G.G., Boven, E., Scheeren, J.W., Pinedo, H.M. and Haishma, H.J.,** 1996, Characterization of Novel Antracycline Prodrugs Activated by Human β -glucuronidase for Use in Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy. *Biochem. Pharm.*, 52, 455-466p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Jin, H.Z. and Kang, K.,** 2007, Application Of Novel Metal Nanoparticles As Optical/Thermal Agents In Optical Mammography And Hyperthermic Treatment For Breast Cancer, Oxygen Transport To Tissue XXVIII Series: *Advances In Experimental Medicine And Biology*, 599, 45-52p.
- Johnsson, R., Traff, G., Sunden, M. and Ellervik, U.,** 2007, Evaluation Of Quantitative Thin Layer Chromatography Using Staining Reagents, *Journal of Chromatography A*, 1164 298–305p.
- Josephson, L., Groman, E.V., Menz, E., Lewis, J.M. and Bengel, H.A.,** 1990, Functionalized Superparamagnetic Iron-Oxide Colloid As A Receptor Directed MR Contrast Agent, *Magnetic Resonance Imaging*, 8. 5, 637-646p.
- Kahn, M. and Kleinberg, J.,** 1977, Radiochemistry of Iodine, National Academy of Sciences-National Research Council, 25-34p.
- Karaginnis, T.C., Lobachevsky, P.N. and Martin, R.F.,** 2000, Cytotoxicity of An I-125-Labelled DNA Ligand, *Acta Oncologica*, 39(6), 681-685p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kasis, A. I., Walicka, M. A. and Adelstein, S. J.,** 2000, Double-Strand Break Yield Following I-125 Decay-Effects Of DNA Conformation, *Acta Oncologica*, 39 (6), 721-726p.
- Kasis, A.I. and Adelstein, S.J.,** 1996, Preclinical Studies With Radioiododeoxyuridine, *J. Nucl. Med.*, 37(4), 10-12p.
- Kasis, A.I., Tumeç, S.S., Wen, P.Y.C., Braranowska, K.J., Vandenabeele, A.D., Zimmermann, R.E., Carvalho, P.A., Garada, B.M., DeSisto, W.C., Bailey, N.O., Castronovo, F.P., Mariani, G., Black, P.M. and Adelstein, S.J.,** 1996, Intratumoral Administration of -[I-123]Iodo-2'-Deoxyuridine in A Patients With A Brain Tumor, *J. Nucl. Med.*, 37 , (4), 1922p.
- Katayose, Y., Nanjo, H., Ito, A., Minamiya, Y. and Ogawa, J.,** 2008, Relationship Between Micrometastasis and Magnetite Distribution in Breast Cancer Patients, *Annals Of Surgical Oncology*, 15-1,39p.
- Kervan, S.,** 2001, $R_{1-x}R_xMn_2Ge_2$ İntermetalik Bileşiklerin Kristal Yapı ve Magnetik Özelliklerinin İncelenmesi, *Ankara Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 57s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Khymenets, O., Joglar, J., Clapes, P., Parella, T., Covas, M. and De La Torre, R.,** 2006, Biocatalyzed Synthesis And Structural Characterization Of Monoglucuronides Of Hydroxytyrosol, Tyrosol, Homovanillic Alcohol, and 3-(4-hydroxyphenyl)propanol, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 348-15, 2155-2162p.
- Kim, H., and Wainer, I.,** 2005, The Covalent Immobilization Of Microsomal Uridine Diphospho-Glucuronosyltransferase (UDPGT): Initial Synthesis And Characterization Of An UDPGT Immobilized Enzyme Reactor For The On-Line Study Of Glucuronidation, *Journal Of Chromatography B-Analytical Technologies In The Biomedical And Life Sciences*, 823-(2),158-166p.
- Kim, H., and Wainer, I.,** 2006, On-Line Drug Metabolism In Capillary Electrophoresis. 1. Glucuronidation Using Rat Liver Microsomes, *Analytical Chemistry*, 78-20, 7071-7077p.
- Kobayashi, M., Kitaoka, Y., Tanaka, Y. and Kawamoto, K.,** 1994, Electrophoretic Behaviour And Infrared Spectra Of Dihydroxyboryl Compounds in Aqueous Di- And Tricarboxylic Acids: Paper Electrophoresis As A Tool For Determining The Chemical States Of A Substance in Solution, *Journal of Chromatography A*, 678-2 (2) 351-358p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Kolat, V.S.**, 2007, Lacamno Ve Fecrcunbsib Numunelerinin Manyetik Ve Manyetokalorik Özellikleri, *İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2007, 76-77s.
- Kowalsky, R.J., and Perry, J.R.**, 1987, Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice Labeled Compounds, Vol. I. Vienna, *International Atomic Energy Agency*, 29:26765., 185-189p.
- Kuhn, S.J., Finch, S.K., Hallahan, D.E. and Giorgio, T.D.**, 2006, Proteolytic Surface Functionalization Enhances In Vitro Magnetic Nanoparticle Mobility Through Extracellular Matrix, *Nano Letters*, 6, 2, 306-312p.
- Kyoungja, W., Jangwon, H. and Jae-Pyoung, A.**, 2005, Synthesis And Surface Modification Of Hydrophobic Magnetite To Processible Magnetite Silica-Propylamine, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 177–181p.
- Laconte, L., Nitin, N. and Bao, G.**, 2005, Dispersion Of Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles In Poly(D,L-Lactide-Co-Glycolide) Microparticles, *Magnetic Nanoparticle Probes Elsevier*, Research Report may. 32-38p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Lobachevsky, P. N. and Martin, R. F.,** 2000, Iodine-125 Decay In A Synthetic Oligodeoxynucleotide. II. The Role Of Auger Electron Irradiation Compared To Charge Neutralization In DNA Breakage, *Radiat. Res.*, 153 (3), 271-278p.
- Lubbe, A. S., Alexiou, C. and Bergemann, C.,** 2001, Clinical Applications of Magnetic Drug Targeting, *Journal of Surgical Research* 95, 200–206p.
- Medine, E.I. and Ünak P.,** 2006, Preparing ^{99m}Tc Labeled Magnetite Nanoparticles As Drug Carriers, *Ed. U. Mazzi, Proceedings of the 7th Int Sym on Technetium Chemistry and Nuclear Medicine*, Bressanone Congress Center (Italy), September 6-9, 515p.
- Micha, B., Daniel, H., Miroslava, T., Pavla, J., Kater, I.G., Petr, L., Vit, H., Milan, H. and Eva, S.,** 2008, Poly(L-lysine)-Modified Iron Oxide Nanoparticles for Stem Cell Labeling, *Bioconjugate Chem.*, 740, 19, 740–750p.
- Miklos, C., Gabor, B., Laszlo, B., Rita, S., Ann, B., Brian, B., Angelo, B., and Jozsef, M.,** 2000, β -Glucuronidase Latency in Isolated Murine Hepatocytes, *Biochemical Pharmacology*, 59, 801–805p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Mohapatra, S., Mallick, S.K., Skghosh, T. and Pramanik, P.,** 2007, Synthesis Of Highly Stable Folic Acid Conjugated Magnetite Nanoparticles For Targeting Cancer Cells, *Nanotechnology*, 18, 385102, 9p
- Moritake, S., Taira, S., Ichiyanagi, Y., Morone, N., Song, S., Hatanaka, T., Yuasa, S., Setou, M.,** 2007, Functionalized Nano-Magnetic Particles For An In Vivo Delivery System, *Journal Of Nanoscience And Nanotechnology*, 7-3, 937-944p.
- Neouze, M.A. and Schubert, U.,** 2008, Surface Modification And Functionalization Of Metal And Metal Oxide Nanoparticles By Organic Ligands, *Monatshefte Fur Chemie*, 139 3, 183-195p.
- Ohgushi, M., Nagayama, K., Wada, A.,** 1978, Conception Of The First Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents: A Brief History, *J. Magnetic Resonance*, 29; 599-601p.
- Ozdemir, D. and Unak, P.,** 1994, Study On Labelling Conditions Of ¹²⁵I-Synkavit With Iodogen Method., *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, 187,(4), 277-283p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Özçelik, M.**, 2006, Bazı Tiyosemikarbazonların Lipofilisitelerinin Dönüşümlü Voltametri İle İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 2006, 7s.
- Panyutin, I.V., Luu, A.N., Panyutin, I.G. and Neuman, R.D.**, 2001, Strand Breaks in Whole Plasmid DNA Produced by the Decay of I-125 in a Triplex-Forming Oligonucleotide, *Radiat. Res.*, 156 (2), 158-166p.
- Pomplun, E., Roch, M. and Terrsol, M.**, 1992, Simulation of Strand Break Induction by DNA Incorporated 125I, In- Biophysical Aspects of Auger Processes, eds. Howell, R. W. Narra, V. R. Sastry, K. S. R. Rao D. V., *Am. Ass. Phys. Med. Sym. Series*, (8), 137-152p.
- Pouliquen, D., Le Jeune, J.J., Perdrisot, R., Ermias, A. and Jallet, P.**, 1991, Iron Oxide Nanoparticles For Use As An MRI Contrast Agent: Pharmacokinetics And Metabolism., *Magnetic Resonance Imaging*, 9:275-283p.
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D. and Li, M.**, 1999, Magnetite Nanoparticles Prepared by Precipitation from Partially Reduced Ferric Chloride Aqueous Solutions, *Journal of Colloid and Interface Science* 215, 190–192p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Ramanujan, R.V. and Chong, W.T.**, 2004, The Synthesis And Characterization Of Poliper Coated Iron Oxide Microspheres, *Journal Of Materials Science: Materials İn Medicine*, 15, 901-908p.
- Ritter, J.**, 2007, Intestinal UGTs As Potential Modifiers Of Pharmacokinetics And Biological Responses To Drugs And Xenobiotics, *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 3-1 93-107p.
- Roeske, J., Nunez, L., Hoggarth, M., Labay, E. and Weichselbaum, R.**, 2007, Characterization of The Theoretical Radiation Dose Enhancement From Nanoparticles, *Technology In Cancer Research & Treatment*, 6-5, 395-401p.
- Rudge, S.R., Kurtz, T.L., Vessely, C.R., Catterall, L.G. and Williamson, D.L.**, 2000, Preparation, Characterization, And Performance Of Magnetic Iron-Carbon Composite Microparticles For Chemotherapy, *Biomaterials* 21, 1411-1420p.
- Saiyed, Z.M., Telang, S.D. and Ramchang, C.N.**, 2003, Application Of Magnetic Technigues İn The Field Of Drug Discovery And Bionedicine, *BioMagnetic Research and Technology*, 1-2, 1-8p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Schmelz, E.M., Bushnev, A.S., Dillehay, D.L., Sullards, M. C., Liotta, D.C. and Merrill, A.H., 1999, Ceramide-beta-D-glucuronide: Synthesis, Digestion, And Suppression Of Early Markers Of Colon Carcinogenesis, *Cancer Res.*, 59 (22), 5768-5772p.

Schneiderman, M.H., Hofer, K.G. and Schneiderman, G.S., 2001, Targets for Radiation-induced Cell Death: When DNA Damage Doesn't Kill?, *Radiat. Res.*, 155 (4), 529-535p.

Sedelnikova, O.A., Panyutin, I.G., Thierry, A.R. and Neuman, R.D., 1998, Radiotoxicity of Iodine-125 Labeled Oligodeoxyribonucleotides in Mammalian Cells, *J. Nucl. Med.*, 39 (8), 1412-1418p.

Segal, I., Zablotskaya, A., Lukevics, E., Maiorov, M., Zablotsky, D., Blums, E., Shestakova, I. and Domracheva, I., 2008, Synthesis, Physico-Chemical And Biological Study Of Trialkylsiloxyalkyl Amine Coated Iron Oxide/Oleic Acid Magnetic Nanoparticles For The Treatment Of Cancer, *Applied Organometallic Chemistry*, 22-2, 82-88p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Selim, K.M.K., Lee, J.H., Kim, S.J., Xing, Z.C., Kang, I.K., Chang, Y. and Guo, H.Q.**, 2006, Surface Modification Of Magnetites Using Maltotronic Acid And Folic Acid For Molecular Imaging, *Macromolecular Research*, 14, 6, 646-653p.
- Semnani, E.S., Wang, K., Adelstein, S.J. and Kasis, A.I.**, 2005, 5- $[^{123}\text{I}/^{125}\text{I}]$ Iodo-2'-Deoxyuridine in Metastatic Lung Cancer: Radiopharmaceutical Formulation Affecets Targeting, *The Journal of Nuclear Medicine*, 46, 5, 800-806p.
- Soponar, F., Catalin A.M., and Sarbu, C.**, 2008, Quantitative Determination Of Some Food Dyes Using Digital Processing Of Images Obtained By Thin-Layer Chromatography, *Journal of Chromatography*, 1188 295–300p.
- Stevenson, D.E. and Hubl, U.**, 1999, Optimization of b-D-glucuronide Synthesis Using UDP-Glucuronyl Transferase, *Enzyme Microb. Technol.*, 24, 388-396p.
- Şensoy, S.**, 2007, Tc-99m (V) DMSA Radyofarmasötığinin Üretim Ve Kalite Kontrol Parametrelerinin Belirlenmesi, *Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, 24-25s.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Toyohara, J., Okada, M., Toramatsu, C., Suzuki, K. and Irie, T., 2008, Feasibility Studies of 4 '-[methyl-C-11]thiothymidine As A Tumor Proliferation Imaging Agent in Mice, *Nuclear Medicine And Biology*, 35-1, 1 67-74p.

Unak, P. and Cetinkaya, B., 2005, Absorbed Dose Estimates at the Cellular Level For ¹³¹I, *Appl. Radiat. Isot.* 62, 861-869p.

Unak, P. and Medine E.I., 2007, Tc-99m Labeled Magnetite Nanoparticles As Drug Carriers, EANM'07 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, in Copenhagen/Denmark October 13-17 (2007). 34, Suppl 2, 133p.

Unak, P., 2002, Targeted Tumor Radiotherapy, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 45, 117-130p.

Unak, P., Bekiş R. ve Dağdeviren, K., 2007, İlaç Taşıyıcısı Olarak I-131 İşaretli Manyetik Nanoparçacıklar, Türk Patent Enstitüsü Başvuru tarihi: 18.09.2007, Basvuru No 2007-G-185024.

Unak, P., Bekiş R. ve Medine E.İ., 2007, Görüntüleme Ajanı Olarak ^{99m}Tc işaretli Magnetite Nanoparçacıklar, Türk Patent Enstitüsü Başvuru tarihi 07.08.2007, Basvuru No 2007-G-157120.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Unak, T. and Unak, P.** 1996, Direct Radioiodination of Metabolic 8-Hydroxy-Quinoly-Glucuronide, as a Potential Anti-Cancer Drug, *Appl. Rad. Isot.*, 47, 7, 645-647p.
- Unak, T., Unak, P. and Ongun, B.**, 1997, Synthesis and Iodine-125 Labelling of Glucuronide Compounds for Combined Chemo- and Radiotherapy of Cancer, *Appl. Radiat. Isot.*, 48, 6, 777-783p.
- Unak, T., Yıldırım, Y., Avcıbaşı, U., Biber, Z., Duman, Y. and Unak, P.**, 2007, Comparison of the Radiopharmaceutical Potentials of Radiolabeled Dithiozone with ^{131}I and with $^{99\text{m}}\text{Tc}$, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 273, 3, 767-770p.
- Vandenable, A.D., Bararanowska, D., Kortylewicz, J., Adelstein, S.J., Carvalho, P.A., Tutrone, R.F., Richie, J.P., Wen, P.Y.C., Black, P., McL. Marriani, G. and Kassis, A.I.**, 1993, Diagnostic and Therapeutical Applications of Auger Electron Emitting 5-[$^{123}\text{I}/^{125}\text{I}$] Iodo-2'-Deoxyuridine in Cancer, *Journal Of Nuclear Medicine* 34, 5, 221p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Vashishtha, S.C., Hawes, E., Mckay, G. and Mccann, D.,** 2000, Synthesis and Identification of the Quaternary Ammonium-Linked Glucuronide of 1-phenylimidazole in Human Liver Microsomes and Investigation of The Human UDP-glucuronosyltransferases Involved, *Drug Metabolism And Disposition*, 28-9, 1009-1013p.
- Wang, X., Zhang, R., Wu, C., Dai, Y., Song, M., Gutmann, S., Gao, F., Lv, G., Li, J., Li, X., Guan, Z., Fu, D.,** 2007, The Application Of Fe_3O_4 Nanoparticles in Cancer Research: A New Strategy To Inhibit Drug Resistance, *Journal of Biomedical Materials Research Part*, 80A-4, 852-860p.
- Wangs, S.M., Chern, J.W., Yeh, M.Y., Ng, J.C., Tung, E. and Roffler, S.R.,** 1992, Spesific Activation of Glucuronide Prodrugs by Antibody-targeted Enzyme Conjugates for Cancer Therapy, *Cancer Res.*, 52, 4484-4491p.
- Woo, K. and Hong, J.W.,** 2005, Surface Modification Of Hydrophobic Iron Oxide Nanoparticles For Clinical Applications, *IEEE Transactions On Magnetics*, 41, 10, 4137-4139p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

- Xia, J., Wang, Y., Yu, J., Cao, J., Zhang, C. and Yin, D.,** 2005 Characterization And Application Of The Fac-[188Re(CO)₃(H₂O)₃]⁺ Core, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 266, 2, 313-316p..
- Yamanaka, H., M, Katoh M., Kanoh, A., Tamura, O. and Ishibashi, H., Yokoi, T.,** 2005, Trans-3'-Hydroxycotinine O- and N-Glucuronidations in Human Liver Microsomes *Drug Metabolism And Disposition*, 33-1, 23-30p.
- Yu, J.F., Hafeli, U.O., Sands, M. and Dong, Y.H.,** 2003, Y-90-Oxine-Ethiodol, A Potential Radiopharmaceutical For The Treatment Of Liver Cancer, *Applied Radiation And Isotopes*, 58, 5, 567-573p.
- Yurt, F.,** 1998, Benzodiazepin (DİAZEPAM) ve Cyclopyrrolone (ZOPİCLONE) Grubu Farmasötiklerin I-131 ile İşaretlenmesi, Doktora Tezi, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, 22-29s.
- Zhang, C.F, Sun, H.W., Xia, J.Y., Yu, J.F., Yao, S., Yin, D.Z. and Wang, Y.X.,** 2005, Synthesis Of Polyacrylamide Modified Magnetic Nanoparticles And Radiolabeling With Re-188 For Magnetically Targeted Radiotherapy, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293, 1, 193-198p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (Devam)

Zhang, J., and Misra, R.D.K., 2007, Magnetic Drug-Targeting Carrier Encapsulated With Thermosensitive Smart Polymer: Core-Shell Nanoparticle Carrier And Drug Release Response, *Acta Biomaterial*, 3-6, 838-850p.

Zihniöğlu, F., 1992, Isolation, Purification and Immobilization of UDP-GLUCUROYL TRANSFERASE, Doktora Tezi, E. U. Graduate School of Natural and Applied Sciences Chemistry Department Biochemistry Section Code, p. 169.

Zor, L., 2000, Ayırma ve Saflaştırma İşlemleri, Ünite 11, *Anadolu Üniversitesi Yayınları*, 183-184s.

www.cem.yildiz.edu.tr/belgeler/ders_notlari/2006-07

www.istanbul.edu.tr, İ.Ü. Mühendislik Fakültesi, SEM cihazı katalogu.

www.ctf.istanbul.edu.tr/stek/pdfs/32/3201SO.pdf, I.U. Cerrahpafla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, *Zehirlenmeler Sempozyum Dizisi No: 32 • Aralık 2002;9-19s.*

www.atonet.org.tr/yeni/index.php?p=804&l=1

<http://deutsche-boerse.com/dbag>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emin İlker MEDİNE

Doğumyeri : Aşkale

Doğum Yılı : 22.10.1974

Öğrenim Durumu:

Lisans 1992-1998 Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi,
Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 2002-2003 Ege Üniversitesi, Nükleer Bilimler Enstitüsü,
Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Doktora 2003- Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü,
Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı

Mesleki Durumu:

2006- E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü Öğretim Görevlisi,
Bornova, İzmir