

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYOAKTİF İYOD-131 İLE İŞARETLİ BLEOMYCİN-GLUKURONİD'İN HÜCRE
DÜZEYİNDE TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Melis EDİZ**

Anabilim Dalı : Kimya

Bilim Dalı : Fizikokimya

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Uğur AVCIBAŞI

MANİSA 2011

**CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RADYOAKTİF İYOD-131 İLE İŞARETLİ BLEOMYCİN-GLUKURONİD'İN HÜCRE
DÜZEYİNDE TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Melis EDİZ**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih: 23-06-2011

Tezin Savunulduğu Tarih: 06-07-2011

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Uğur AVCIBAŞI

Diğer Jüri Üyeleri: Prof. Dr. Perihan ÜNAK

Yrd. Doç. Dr. Ümran HİÇSÖNMEZ

Manisa 2011

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans çalışmalarım boyunca değerli destek ve katkılarını esirgemeyen tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Uğur AVCIBAŞI' na, yaptığım deneysel çalışmalar boyunca sonuçlarımı değerlendirmemde her zaman yardımcı olan ve verdiği bilimsel desteklerden dolayı Sayın Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER' e, Nükleer Bilimler Enstitüsü laboratuvarlarında her türlü çalışma olanağını sağlayan Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK' a, hücre kültürü çalışmalarımda benden her türlü destek ve özveriye esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Emin İlker MEDİNE' ye, FITC ile görüntüleme çalışmalarında verdiği desteklerden dolayı, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (ADÜBİLTEM) ve Sayın Prof. Dr. Serhan SAKARYA' ya teşekkürlerimi bir borç bilirim. Başta dostluğunu ve yardımseverliğini esirgemeyen Araş. Gör. Ayfer Yurt KILÇAR, Araş. Gör. Dr. Çiğdem ACAR İÇHEDEF ve değerli arkadaşım Özge KOZKUŞ olmak üzere, her zaman büyük özveriyle yanımda olan arkadaşlarıma ve benim bugünlere gelmemde büyük katkıları olan aileme en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Temmuz 2011

Melis EDİZ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖNSÖZ	V
İÇİNDEKİLER	VII
ÇİZELGE LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XIII
KISALTMALAR	XV
ÖZET	XVII
ABSTRACT	XIX
1. GİRİŞ	1
1.1 Genel Bilgiler ve Yapılmış Çalışmalar.....	1
2. RADYASYON	4
2.1 α Bozunması.....	6
2.2 β Bozunması.....	6
2.3 Gama Işınları.....	7
2.4 X Işınları.....	7
2.5 Radyasyonun Saptanması.....	8
2.5.1 Gaz İyonizasyonunu Tespit Eden Dedektörler.....	8
2.5.2 Katı Dedektörler.....	9
2.5.3 Sıvı Sintilasyon Sayaçları.....	9
2.5.4 Floresan Ekranları.....	9

2.6	Radyasyon Kaynakları.....	9
2.7	Radyasyonun Biyolojik Etkileri.....	10
	2.7.1 Radyasyonun Doku/Organ Düzeyine Etkisi.....	10
	2.7.2 Radyasyonun Moleküler/Hücresele Düzeye Etkisi.....	11
2.8	Radyofarmasötikler.....	13
	2.8.1 Ön- İlaç (Produg).....	13
2.9	Bleomycin (BLM).....	14
2.10	Kromatografi.....	15
	2.10.1 Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	16
	2.10.2 İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC).....	16
2.11	İyod ve İyodun Radyoaktif İzotopları.....	17
	2.11.1 I-131 (¹³¹ I).....	18
2.12	Metabolizmada Zehirsizleştirme.....	19
	2.12.1 Bileşik Teşkilii.....	19
	2.12.2 Glukuronid Oluşumu.....	19
2.13	β- Glukuronidaz Enzimi.....	20
2.14	İodojen Yöntemi.....	20
2.15	Hücre Kültürü.....	21
	2.15.1 Primer Hücre Kültürü.....	21
	2.15.2 Sekonder Hücre Kültürü.....	22
	2.15.3 Sürekli Hücre Kültürü.....	22
	2.15.4 Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları.....	22

2.16	Hücre Pasajlama.....	22
2.17	Toksisite.....	23
	2.17.1 İnsan Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Avantajları.....	23
	2.17.2 İnsan Hücre Kültürlerinin Toksisite Araştırmalarındaki Dezavantajları...	24
2.18	Floresan Mikroskopi.....	24
3.	MATERYAL VE METOD	25
3.1	Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	25
	3.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	25
	3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	26
3.2	UDPGT Enziminin Elde Edilmesi.....	26
3.3	BLMG'nin Enzimatik Yöntemle Sentezi.....	27
3.4	İyod-131 (¹³¹ I) ile İşaretleme Çalışmaları.....	28
	3.4.1 İodojen Tüplerinin Hazırlanması.....	28
	3.4.2 BLM'nin ¹³¹ I ile İşaretlenmesi.....	28
	3.4.3 BLMG'nin ¹³¹ I ile İşaretlenmesi.....	29
3.5	İnaktif Bileşenler İçin Yapılan HPLC Analizi.....	29
3.6	İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC) Ölçümleri.....	30
3.7	¹³¹ I ile İşaretli BLM ve BLMG ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları.....	30
	3.7.1 Hücre Dizinleri.....	31
	3.7.2 ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG ve ¹³¹ I' in PC-3 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi.....	32
	3.7.3 ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG ve ¹³¹ I' in PC-3 Hücreleri için Yapılan Protein Tayini.....	33
	3.7.4 ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG ve ¹³¹ I' in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Madde Miktarının Etkisi.....	34

3.7.5	^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Aktivite Miktarının Etkisi.....	34
3.7.6	^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin A-549 (akciğer), Caco (kalın barsak) ve HuTu-80 (ince barsak) Hücre Hatlarına Uygulanması.....	34
3.8	BLM ve BLMG'nin FITC (fluorescein isothiocyanate) ile Görüntüleme Çalışması.....	35
3.9.	BLM ve BLMG'nin PC-3 Kanser Hücre Hattı Üzerindeki sitotoksitelerinin İncelenmesi.....	35
3.10	İstatistiksel Analizler.....	36
4.	BULGULAR VE TARTIŞMA	37
4.1	BLM ve BLMG'e ait HPLC Sonuçları.....	37
4.2	Enzimatik Yöntemle Sentezlenen BLMG'nin HPLC Kromatografik Yöntemi İle Saflaştırma İşlemi.....	38
4.3	İnce Tabaka Radyokromatografi (TLRC) Sonuçları.....	39
4.4	BLM ve BLMG'nin FITC (fluorescein isothiocyanate) ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarının Sonuçları.....	44
4.5	^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in PC-3 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi.....	45
4.6	^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Madde Miktarının Etkisi.....	47
4.7	^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Aktivite Miktarının Etkisi.....	49
4.8	^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin PC-3(Prostat), A-549 (akciğer), Caco (kalın barsak) ve HuTu-80 (ince barsak) Hücre Hatlarındaki Bağlanma Etkinliği.....	52
4.9	BLM ve BLMG'nin PC-3 Kanser Hücre Hattındaki Sitotoksite Sonuçları.....	55
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	57
	KAYNAKLAR	58
	ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

ÇİZELGE 2.1 : RADYASYON ÇEŞİTLERİ.....	6
ÇİZELGE 2.2 : TÜM VÜCUT IŞINLAMALARININ İNSANLARDA OLUŞTURABİLECEĞİ ETKİLER.	11
ÇİZELGE 3.1 : İNAKTİF BİLEŞENLER İÇİN HPLC YÖNTEMİNDE UYGULANILAN KROMATOĞRAFİK KOŞULLAR.....	29
ÇİZELGE 3.2 : PC-3 (PROSTAT), A-549 (AKCİĞER), CACO (KALIN BARSAK) VE HUTU 80 (İNCE BARSAK) HÜCRELERİYLE YAPILAN ÇALIŞMALARDA KULLANILAN OPTİMUM KOŞULLAR.	34
ÇİZELGE 4.1 : HPLC YÖNTEMİNDE UYGULANAN KROMATOĞRAFİK KOŞULLAR.....	37
ÇİZELGE 4.2 : KALİTE KONTROL ÇALIŞMALARINDA KULLANILAN TLRC BANYOLARI.	39
ÇİZELGE 4.3 : İŞARETLİ BİLEŞİKLERE VE RADYOAKTİF BİLEŞENLERE AİT R _F DEĞERLERİ ...	40
ÇİZELGE 4.4 : ¹³¹ I-BLM' İN FARKLI MİKTAR VE AKTİVİTELERİ İÇİN ORTAMA BAĞLANMA VERİMLERİ İLE STANDART SAPMALARİ.....	41
ÇİZELGE 4.5 : ¹³¹ I-BLMG' İN FARKLI MİKTAR VE AKTİVİTELERİ İÇİN ORTAMA BAĞLANMA VERİMLERİ İLE STANDART SAPMALARİ.....	41
ÇİZELGE 4.6 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN 30, 60 VE 120. DAKİKALARDA PC-3 HÜCRELERİNE BAĞLANMA YÜZDELERİ.....	47
ÇİZELGE 4.7 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN 1,3,10,30 µG MADDE MİKTARLARINDA PC-3 HÜCRELERİNE BAĞLANMA YÜZDELERİ.....	49
ÇİZELGE 4.8 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN 1,3,10,30 VE 100 µCi' LİK SPESİFİK AKTİVİTE MİKTARLARINDA PC-3 HÜCRELERİNE BAĞLANMA YÜZDELERİ..	51
ÇİZELGE 4.9 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN PC-3, A-549, CACO VE HUTU-80 HÜCRE HATLARINA BAĞLANMA YÜZDELERİ.	54
ÇİZELGE 4.10 : BLM VE BLMG' NİN PC-3 HÜCRE HATTINA UYGULANDIKTAN 48 SAAT SONRA ORTALAMA CANLI KALAN HÜCRE YÜZDESİ	55

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

ŞEKİL 2.1 : ELEKTROMANYETİK SPEKTRUM.	5
ŞEKİL 2.2 : ¹³¹ I'İN BOZUNMA ŞEMASI	7
ŞEKİL 2.3 : İYONLAŞTIRICI RADYASYONUN GİRİCİLİKLERİ.....	8
ŞEKİL 2.4 : DOĞAL RADYASYON KAYNAKLARINDAN MARUZ KALINAN RADYASYON DOZLARININ ORANLARI.....	9
ŞEKİL 2.5 : DNA MOLEKÜLÜNÜN YAPISI	13
ŞEKİL 2.6 : BLM A ₂ VE BLM B ₂ 'NİN KİMYASAL YAPISI.....	15
ŞEKİL 2.7 : HPLC CİHAZI.....	16
ŞEKİL 2.8 : ¹³¹ I'İN BOZUNMA ŞEMASI.....	18
ŞEKİL 2.9 : GLUKURONİDASYON MEKANİZMASI	19
ŞEKİL 2.10 : İODOJEN'İN KİMYASAL YAPISI.....	21
ŞEKİL 3.1 : KANSERLİ HÜCRELER ÜZERİNDEKİ BAĞLANMA ETKİNLİĞİNİN ZAMANLA DEĞİŞİMİ ÇALIŞMASI.....	31
ŞEKİL 3.2 : ÜZERİNDE BESİYERİ BULUNAN HÜCRE PLAKA	32
ŞEKİL 3.3 : RADYOİŞARETLİ BİLEŞİĞİN HÜCRE KÜLTÜRÜNE UYGULANMASI	33
ŞEKİL 3.4 : BCA™ PROTEİN KİTLERİNİN HÜCRELERE UYGULANMASI	33
ŞEKİL 4.1 : BLM'E AİT HPLC KROMATOGRAMI	37
ŞEKİL 4.2 : BLMG'E AİT HPLC KROMATOGRAMI.....	38
ŞEKİL 4.3 : SAFLAŞTIRILAN BLMG MADDE MİKTARI/YÜZDE VERİM GRAFİĞİ	38
ŞEKİL 4.4 : SAFLAŞTIRMA İŞLEMİ SONUCUNDA ELDE EDİLEN SAF BLMG KROMATOGRAMI.....	39
ŞEKİL 4.5 : NA ¹³¹ I'İN TLRC-2 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	42
ŞEKİL 4.6 : ¹³¹ I ⁺ İN (YÜKSELTGENMİŞ İYOD) TLRC-2 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	42
ŞEKİL 4.7 : NA ¹³¹ I'İN TLRC-4 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	42
ŞEKİL 4.8 : ¹³¹ I ⁺ İN (YÜKSELTGENMİŞ İYOD) TLRC-4 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	43
ŞEKİL 4.9 : ¹³¹ I-BLM'İN TLRC-2 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	43
ŞEKİL 4.10 : ¹³¹ I-BLMG'İN TLRC-2 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN RADYOKROMATOGRAMI.....	43
ŞEKİL 4.11 : ¹³¹ I-BLM'İN TLRC-5 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN ORTALAMA VERİM GRAFİĞİ.....	44
ŞEKİL 4.12 : ¹³¹ I-BLMG 'İN TLRC-7 BANYOSU KULLANILARAK ELDE EDİLEN ORTALAMA VERİM GRAFİĞİ	44
ŞEKİL 4.13 : FITC İŞARETLİ BLEOMYCİN-GLUKURONİD' İN PC-3 HÜCRELERİNDEKİ İNKORPORASYON GÖRÜNTÜSÜ.....	45

ŞEKİL 4.14 : FITC İŞARETLİ BLEOMYCİN-GLUKURONİD' İN PC-3 HÜCRELERİNDEKİ 10X BÜYÜLTEREK ALINAN İNKORPORASYON GÖRÜNTÜSÜ	45
ŞEKİL 4.15 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN 30, 60 VE 120. DK'LARDA PC-3 HÜCRELERİNE BAĞLANMA ORANLARI.	46
ŞEKİL 4.16 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN KENDİ İÇLERİNDE GRUPLANDIRILARAK TÜM SÜRELERDE GÖSTERDİKLERİ BAĞLANMA ORANLARI..	46
ŞEKİL 4.17 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN TÜM MADDE MİKTARLARINDAKİ BAĞLANMA ORANLARI.	48
ŞEKİL 4.18 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN KENDİ İÇLERİNDE GRUPLANDIRILARAK TÜM MADDE MİKTARLARINDA GÖSTERDİKLERİ BAĞLANMA ORANLARI..	48
ŞEKİL 4.19 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I'İN TÜM SPESİFİK AKTİVİTE MİKTARLARINDA GÖSTERDİKLERİ BAĞLANMA ORANLARI.	50
ŞEKİL 4.20 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN KENDİ İÇLERİNDE GRUPLANDIRILARAK TÜM SPESİFİK AKTİVİTE MİKTARLARINDA GÖSTERDİKLERİ BAĞLANMA ORANLARI.	50
ŞEKİL 4.21 : ¹³¹ I'İN FARKLI SPESİFİK AKTİVİTE MİKTARLARINDAN OLUŞAN % BAĞLANMA GRAFİĞİ ..	52
ŞEKİL 4.22 : ¹³¹ I-BLM, ¹³¹ I-BLMG VE ¹³¹ I' İN PC-3, A-549, CACO VE HUTU-80 HÜCRE HATLARINA BAĞLANMA ORANLARI.....	53
ŞEKİL 4.23 : BLM VE BLMG' NİN PC-3 HÜCRE HATTINA UYGULANDIKTAN 48 SAAT SONRA ORTALAMA CANLI KALAN HÜCRE YÜZDE GRAFİĞİ.....	56

KISALTMALAR

BLM	: Bleomycin
BLMG	: Bleomycin glukuronid
¹³¹I-BLM	: İyod-131 ile İşaretli Bleomycin
¹³¹I-BLMG	: İyod-131 ile İşaretli Bleomycin-glukuronid
UDPGA	: Üridin difosfat glukuronik asit
UDPGT	: Üridin difosfat glukuronil transferaz
DNA	: Deoksi ribo nükleik asit
R_f	: Başlangıçtan uzaklık
R_t	: Alıkonma zamanı
TLRC	: İnce tabaka kromatografisi
HPLC	: Yüksek performans sıvı kromatografisi
⁹⁹Tc^m	: Teknesyum- 99 m
SSA	: Sığır Serum Albumin
MeV	: Megaelektron volt
Gy	: Gray
Sv	: Sievert
KeV	: Kiloelektron volt
¹⁷⁷Lu	: Lutenyum-177
Bq	: Becquerel
Ci	: Curie
¹⁵³Sm	: Samarium-153
¹⁶⁶Ho	: Holmium-166
FSS	: Fetal Sığır Serum
WST	: (2-(4-Iodophenyl)- 3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)- 2H-tetrazolium, monosodium salt)
SPECT	:Single Photon Emission Computerized Tomography

ÖZET

RADYOAKTİF İYOD-131 İLE İŞARETLİ BLEOMYCİN-GLUKURONİD'İN HÜCRE DÜZEYİNDE TERAPÖTİK ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

Melis EDİZ, Haziran 2011, 61 Sayfa

Antikanser ajanı olarak kullanılan Bleomycin (BLM) ilk olarak 1966 yılında, Japon bilim adamı Umezawa ve arkadaşları tarafından *Streptomyces verticillus*'ün bir mayalanma ürünü olarak izole edilmiş önemli glikopeptid yapılı bir antibiyotiktir. BLM'in iki türü vardır. Bunlar BLM A2 ve BLM B2'dir. Her ikisinin sitotoksik etkileri DNA fragmentasyonuna neden olma yeteneklerinden kaynaklanır. Etki spektrumu oldukça geniştir. BLM başlıca lenfosit kanseri olmak üzere yassı epitel karsinomları, testis kanseri ve taban siğilleri gibi birçok hastalık çeşidinde tedavi potansiyeline sahiptir.

Yaptığımız bu çalışmanın amacı enzimatik olarak sentezlenen Bleomycin-glukuronid'i (BLMG) ¹³¹I ile işaretlemek ve işaretli bileşiklerin terapötik etkinliğinin insandan elde edilen PC-3 (prostat), Caco (kalın barsak), Hutu (ince barsak) ve A549 (akciğer) kanser hücre hatları üzerindeki inkorporasyonları *in vitro* olarak incelemek ve radyoışaretli bileşiklerin kanser hücreleri üzerindeki bağlanma verimlerini hesaplamaktır. Bunun için ilk olarak UDP-glukuronil transferaz enziminin yoğun şekilde lokalize olduğu sıçan karaciğerinden izole edilen UDP-glukuronil transferaz enzimi (UDPGT) ile BLMG enzimatik yolla sentezlenmiş daha sonra, HPLC yöntemi ile BLMG'nin izolasyon çalışmaları yapılmıştır. Bir sonraki adımda ¹³¹I ile işaretli BLM (¹³¹I-BLM) ve BLMG'nin (¹³¹I-BLMG) kalite kontrol çalışmaları radyokromatografik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda yapılan çalışmalardan ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG için bağlanma verimleri sırasıyla % 90 ve % 80 olarak bulunmuştur. Daha sonraki adımda hücre kültürü çalışmalarına geçilmiş, ¹³¹I, ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin PC-3 (Prostat) kanser hücrelerine bağlanma verimleri incelenerek optimum zaman, madde miktarı ve spesifik aktivite parametreleri belirlenmiştir. Belirlenen optimum şartlar kullanılarak ¹³¹I, ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin Caco (kalın barsak), Hutu (ince barsak) ve A549 (akciğer) kanser hücre hatları üzerindeki bağlanma verimleri incelenmiş, deneysel verilerin tamamı GraphPad istatistik programı kullanılarak değerlendirilmiş ve yorumlanmıştır. Ayrıca BLM ve BLMG'nin PC-3 kanser hücre hattı üzerindeki sitotoksiteleri incelenmiş ve BLM ile BLMG FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenerek PC-3 kanser hücre hattı üzerinde floresan görüntüleri alınmıştır.

Sonuç olarak incelenen tüm hücre hatlarındaki işaretli bileşiklerin tutulumları karşılaştırıldığında ¹³¹I-BLMG'nin hücrelerdeki tutulumunun ¹³¹I-BLM'nin tutulumuna göre yaklaşık 5-6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuç da, BLMG bileşiğinin konvansiyonel kemoterapötik ajan olarak kullanılan BLM'ye göre çok daha etkili bir anti-tümör ajan olabileceği potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Ahahtar Kelimeler : Bleomycin, Bleomycin-glukuronid, I-131, Hücre Kültürü.

ABSTRACT

Bleomycin (BLM) which is used as an anti-cancer agent, was first isolated by Japanese scientist Umezawa as a fermentation product of *Streptomyces verticillus* and BLM is an important antibiotic which is in glycopeptide form. There are two types of BLM. These are BLM A2 and BLM B2. Cytotoxic effect of both arises from the ability of causing DNA fragmentation. Effect spectrum is quite wide. BLM has a therapeutic potential in diseases such as lymphocyte cancer, platy epithelia carcinoma, testicle cancer and bottom wart.

The aim of our study is to radiolabeling Bleomycin (BLM) and Bleomycin-glucuronide (BLMG) which is enzymatically synthesized enzymatically with ^{131}I and to investigate the incorporation of therapeutical activity of radiolabeled compounds on PC-3 (prostate), Caco (large intestine), Hutu (small intestine) and A549 (lung) on cancerous cell lines *in vitro* and measure the binding yield of radiolabeled compounds on cancerous cells. Thus, firstly UDP-glucuronyl transferase enzyme was isolated from rat liver and then, BLMG was enzymatically synthesized using BLM and UDPGT and isolation studies of BLMG was carried out by using HPLC method. In the latter step, quality-control studies of BLM and BLMG labeled with ^{131}I were carried out by using radiochromatographic method. In this context, it was found that the binding yields were obtained to be % 90 and % 80 for ^{131}I -BLM and ^{131}I -BLMG respectively. Subsequently, cell culture studies were carried out and binding yields of ^{131}I , ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG on PC-3 (prostate) cancerous cells were investigated. Optimum time, the amount of matter and specific activity parameters were determined. With using the optimum conditions, the binding yields of ^{131}I , ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG on Caco, Hutu and A549 cancerous cell lines were investigated and then, all of the experimental data were evaluated and interpreted by using GraphPAD statistical program. Besides, cytotoxicities of BLM and BLMG on PC-3 cancerous cell line were investigated and BLM, BLMG were labeled with FITC. Fluorescent images of BLM and BLMG were taken by focused on 100x and 10x, respectively.

In conclusion when uptakes of radiolabeled compounds on all cell lines are compared, it is found that uptake of ^{131}I -BLMG on cells are 5-6 times higher than uptake of ^{131}I -BLM. This result shows that BLMG has a much more efficient anti-tumor agent potential than that of BLM used as a conventional chemotherapy agent.

Keywords: Bleomycin, Bleomycin-glucuronid, I-131, Cell Line.

1. GİRİŞ

1.1 Genel Bilgiler Ve Yapılmış Çalışmalar

Kanser, birden fazla genetik ve epigenetik faktörün etkisiyle çok aşamalı olarak ve kalıtsal ya da sonradan kazanılmış mutasyonların somatik hücrelerde birikmesiyle ortaya çıkan bir somatik genetik hastalıktır [1]. Normal vücut hücreleri sistemli bir şekilde büyür, bölünür ve ölür. Hayatımızın ilk yıllarından yetişkin oluncaya dek normal hücreler daha hızlı bölünür. Yetişkinliğe ulaşılanın ardından, pek çok dokuda hücreler yalnızca ölen hücreleri yenilemek ve yaralanmaları gidermek amacı ile bölünmeye devam eder. Normal şartlar altında, eğer yeni hücreler gerekmiyorsa her hücrenin içinde bulunan bazı mekanizmalar hücreye bölünmesini durdurmasını söyler [2]. Hücreler bir taraftan programlı ölüm ya da "apoptoz" denen olay ile yok olurken, diğer taraftan da büyüme faktörlerinin etkisiyle çoğalır. Büyüme faktörleri normalde DNA'daki çeşitli genlerin etkisiyle oluşan proteinlerdir. Bu genler mutasyona (değişime) uğrayarak hücrelerin aşırı büyümesine sebep olurlarsa, o zaman kanser oluşur ve bu genlere de "onkogen" denir. Onkogenleri oluşturan mutasyonlar, karsinogen maddelerin, virüslerin ve x-ışınlarının etkisiyle meydana gelir.

Kanser çok önemli bir hastalıklar grubudur. Tedavisi ve tanısı birçok uzmanlık dallarının işbirliğini gerektirmektedir. Tedavisi güçtür ve erken tanı önemlidir. Cerrahi ve radyoterapi lokal tedavi yöntemleri olup, onların arkasından kemoterapi, hormon tedavisi, lazer tedavisi ve biyolojik tedavi (immünoterapi) gibi sistemik tedaviler de uygulanmaktadır [3].

Birçok antitümör ajan klinik olarak fayda sağlasa da kanserli olmayan dokularda oluşan ilaç kaynaklı toksisite, terapötik ilaç konsantrasyonlarına ulaşarak engellenmesi gerekmektedir [4]. İnsan metabolizması için önemli bir hidrolaz sınıfı enzim olan β -glukuronidaz enzimi son yıllarda bilim adamlarının araştırma konuları arasında yerini almıştır. β -glukuronidaz enzimi metabolizmada konjuge glukuronidlerin lizozomal yıkımından sorumlu bir enzimdir. Yakın bir zamanda bu enzimin, bazı hastalıkları teşhis etmede, örneğin; lizozomal bellek rahatsızlıklarında, kanserde ve viral enfeksiyonlarda önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Tümör dokularındaki β -glukuronidaz aktivitesi histokimyasal olarak tespit edilebilmektedir.

Aynı zamanda idrardaki β -glukuronidaz aktivitesi boşaltım sistemi ve diğer organlardaki kanser teşhisi için kullanılabilir. Yapılan bilimsel bir çalışmada kanserli hastaların idrarlarında bulunan β -glukuronidaz enzimi normal insanlarınkinden daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada Üroloji Tümör Kliniğinde bulunan 146 kanserli hastadan alınan idrar örnekleri alınarak β -glukuronidaz aktivitesi ölçülmüş ve bu prosedüre ek olarak hastalara biyopsi yapılmış, radyografi ve tomografi görüntüleri çekilmiştir. Yapılan deney sonucunda kanserli hastalardaki β -glukuronidaz aktivitesinin normal insanlardaki β -glukuronidaz aktivitesinden daha fazla olduğu kanıtlanmıştır [5].

Kanserli dokularda β -glukuronidaz enzim aktivitesinin yüksek olması günümüzde kanserin teşhis ve tedavisinde çeşitli anti-kanser ilaçlarının bulunmasına yönelik bilim adamlarını çeşitli araştırmalar yapmaya yöneltmiştir. Bu araştırmalar kapsamında yüksek β -glukuronidaz aktivitesi olan kanser hücrelerine bazı radyonüklidler (^{123}I , ^{131}I , ^{125}I , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, vb) ile işaretlenmiş bir glukuronid türevi bileşiğin seçimli olarak gönderilmesi halinde, aglikonun toksisitesi ile radyonüklid'in yüksek radyotoksitesisi birleşerek kanser hücrelerinin etkili bir şekilde içten tahrip edilmesi mümkün olabilecektir.

Literatürde, β -glukuronidaz enzimin kanserli dokulardaki yüksek aktivitesinden yola çıkarak *in-vitro* olarak glukuronid bileşikler sentezlenmiş ve ^{131}I ile işaretlenmiştir. Daha sonra işaretlenen bu bileşiklerin terapötik potansiyelleri biyodağılım ve hücre kültürü çalışmaları ile desteklenmiştir. Farklı radyonüklidlerle işaretli BLM türevlerinin kanserin teşhis ve tedavisi üzerine kullanım potansiyellerinin tespit edilmesine yönelik bazı çalışmalar bulunmaktadır.

Avcıbaşı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada BLM ve enzimatik olarak sentezlenen Bleomycin-glukuronid'i (BLMG) ^{131}I ile işaretleyerek ve işaretli bileşiklerin radyofarmasötik potansiyellerini nükleer teknikler kullanarak deney hayvanları üzerinde incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda, ^{131}I ile işaretli BLM ve BLMG bileşiklerin özellikle testis ve prostatla ilgili kanserlerin teşhis ve tedavisine yönelik oldukça yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olabileceği bulunmuştur [6].

Yousefnia ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ^{177}Lu ve anormal hücre çoğalması karşıtı antibiyotik (BLM)'nin ilginç terapötik özelliklerinden dolayı, ^{177}Lu -BLM terapötik bir bileşik olarak geliştirilmiştir. Spesifik aktivitesi 2.6-3 GBq/mg olan ^{177}Lu doğal ^{203}Lu den termal nötron akımı $4 \times 10^{13} \text{ ncm}^{-2}\text{s}^{-1}$ ile elde edilmiştir. Ürün BLM işaretlemelerinde kullanılan klorit formuna dönüştürülmüştür. ^{177}Lu -BLM'nin radyokimyasal saflığı 740 GBq/mmol aktivite ile ITLC (Instant Thin Layer

Chromatography) kullanılarak % 98 olarak optimize edilmiştir. ¹⁷⁷Lu klorit ve ¹⁷⁷Lu-BLM'nin sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarında radyoişaretli bileşiğin birikiminin diğer BLM işaretli bileşiklerde olduğu gibi daha çok akciğerde ve dalakta olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak ¹⁷⁷Lu-BLM'nin insanlarda bulunan kötü huylu tümörler için iyi bir terapötik ajan olduğuna ve bileşiğin etkinliğinin çeşitli tümör içeren modellerde incelenmesi gerektiğinin sonucuna varılmıştır [7].

Marx ve arkadaşları tarafından yapılan bir *in-vitro* çalışmada tiroid karsinoma (B-CPAP) hücreleri artan ¹³¹I aktivite konsantrasyonlarında 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücre ışınlamadaki değişiklik, nekroz ve apoptoz oranları hemen ve ışınlamadan 2 gün sonra değerlendirilmiştir. B-CPAP hücreleri ¹³¹I aktivite konsantrasyonunun atmasıyla azalma göstermiştir. Işınlamadan hemen sonra apoptoz tespit edilememiştir. Işınlamadan 2 gün sonra apoptoza rastlanmıştır. Apoptozun tespit edildiği en düşük ¹³¹I konsantrasyonu 1 MBq/mL oranındadır. Daha yüksek aktivitelere daha yüksek yüzdelerde hücreler apoptoza uğrar fakat konsantrasyon 10MBq/mL olduğu zaman bu oran düşer. Aynı şekilde nekroz düşük ¹³¹I konsantrasyonlarında minimaldir ve ¹³¹I konsantrasyonu 5-10 MBq/mL olduğu zaman büyük bir artış gösterir. Sonuç olarak ¹³¹I in apoptotik ya da nekrotik hücre ölümünün doza bağlı olduğu bulunmuştur. Yüksek ¹³¹I dozlarının nekrotik etki gösterdiği, düşük ¹³¹I dozlarının ise apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir [8].

Bahrami-Samari ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada potansiyel terapötik DNA ajanı ¹⁵³Sm-BLM geliştirilmiş ve tümör üzerindeki çalışmaları foton emisyonu tomografisi (SPECT) ile yapılmıştır. ¹⁵³Sm-BLM'nin optimizasyonunda (oda sıcaklığında 4-8 saat), 0.1 mg BLM ve 740-3700 MBq ¹⁵³SmCl₃ kullanılmış, radyokimyasal saflığı %98 olarak bulunmuştur. HPLC'de spesifik aktivitesi 55 TBq/mmol'dür. ¹⁵³Sm-BLM insandan alınan göğüs kanser hücreleri fareye nakil edilmiş ve biyodağılım yapılmıştır. Alınan SPECT (Single Photon Emission Computerized Tomography) görüntülerinde, meme kanserli farelerin göğüs bölgesindeki tümörlerde tutulum olduğu açıkça görülmüştür. Yapılan bu ilk çalışma ¹⁵³Sm-BLM'nin tümörlü dokularda önemli derecede tutulduğunu göstermiştir [9].

Glukuronidlerle yapılan bir çalışmada HuTu-80 hücrelerinden elde edilen UDP-glukuronil transferaz (UDPGT) enzimi içeren mikrozom preparatları ve UDP glukuronik asit (UDPG) kullanılarak Urasil glukuronid'in 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 nano-parçacıklara kovalent olarak konjuge olmuş ve daha sonra ¹²⁵I ve ¹³¹I ile ayrı

ayrı işaretlenmişlerdir. Hem ^{125}I ve hem de ^{131}I ile işaretli UOG ve UNG, HuTu-80, Caco-2 ve PHIC normal insan barsak epitel hücrelerine bağlanmaları *in vitro* olarak incelenmiştir. PHIC normal insan barsak epiteli hücreleri ile HuTu-80 ince barsak kanser hücreleri arasında UNG yönünden bir fark görülemezken UOG'nin hücreye ilgisi yönünden istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Elde edilen sonuçlar hem radyoyod bağlı glukuronid bileşiklerinin hem de radyoyod işaretli manyetik nano-parçacıkların tedavi ve görüntüleme etkinliğinin ön klinik düzeyde de araştırılmaya devam etmesi açısından umut verici görünmüştür [10].

Zolghadri ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ^{166}Ho 'nın ve bir antikanser ajanı olan BLM'nin ilginç terapötik potansiyellerinden dolayı (^{166}Ho -BLM) bir terapötik bileşik olarak geliştirilmiştir. ^{166}Ho klorit termal nötron ışınması sonucu $\text{Ho}(\text{NO}_3)_3$ 'den elde edilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında ITLC ve HPLC sonuçlarına göre Ho-166'nın radyokimyasal saflığı %94-97 arasında bulunmuştur. ^{166}Ho klorit ve Ho-166-BLM'nin sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım sonuçlarına göre radyo işaretli bileşiğin en fazla tutulum gösterdiği organların akciğer, karaciğer ve dalak olduğu anlaşılmıştır [11]. Yapılan bir çalışmada, BLM ve BLMG $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidiyle işaretlenmiş ve nükleer teknikler kullanılarak bu bileşiklerin radyofarmasötik potansiyelleri deney hayvanları üzerinde araştırılmıştır. Deney hayvanları üzerinde yapılan biyodağılım ve sintigrafi çalışmalarının sonucunda her iki işaretli bileşiğin radyofarmatik potansiyellerinin birbirinden farklı olduğu, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BLM için en fazla tutulumun karaciğer, omurilik ve dalakta, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BLMG için ise böbrek, kalınbarsak ve omurilikte gerçekleştiği ve biyodağılım çalışmalarının alınan sintigrafi çalışmalarıyla desteklenmesi sonucunda, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BLM kompleksinin karaciğer, omurilik ve dalağa; $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BLMG kompleksinin ise böbrek, omurilik ve kalınbarsağa spesifik olabileceği öngörülmüştür [12].

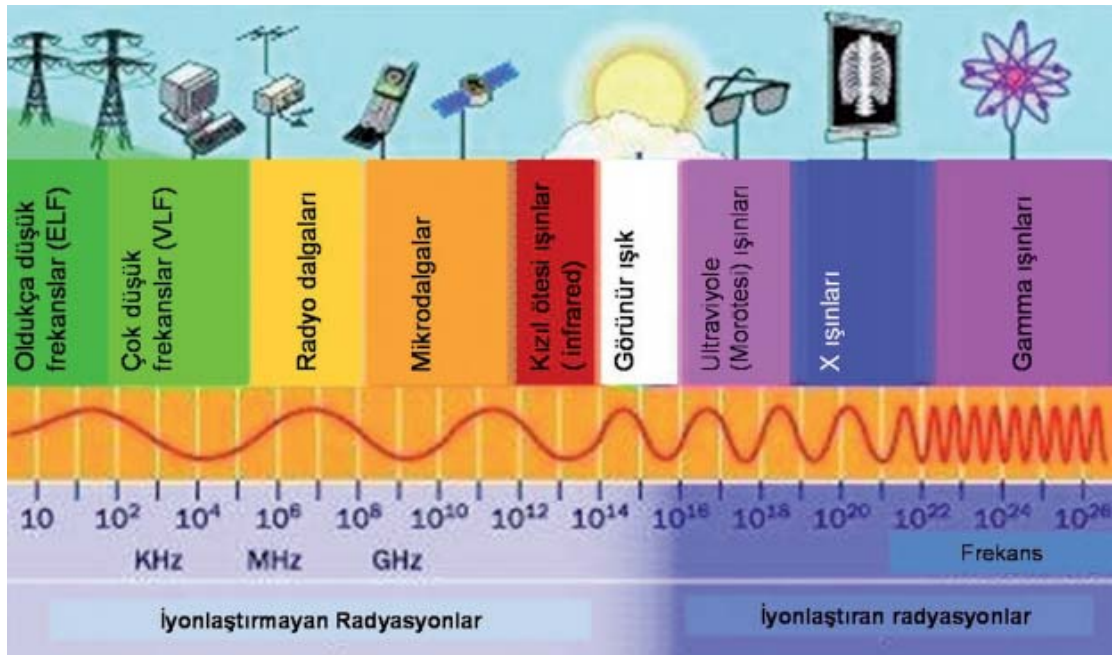
2. RADYASYON

Radyasyonu, en temel anlamda "ortamda yol alan enerji" olarak tanımlamak mümkündür ve bu kapsamda doğal ya da yapay radyoaktif çekirdeklerin kararlı yapıya geçebilmek için dışarı saldıkları hızlı parçacıklar ve elektromanyetik dalga şeklinde taşınan fazla enerjileri de "radyasyon" olarak adlandırılır [13]. Radyasyonlar genellikle doğal ve yapay olmak üzere iki grupta değerlendirilir. Doğal radyasyonlar dünya'nın kendi yapısından, atmosfer ve güneşin yer aldığı uzaydan gelen radyasyonlardır. İnsan yapımı araç, gereç ve sistemler aracılığıyla elde edilen radyasyon üreten kaynaklar ise yapay kaynaklar olarak tanımlanmaktadır. Radyasyonlar da kendi aralarında iyonlaştırıcı ve iyonlaştırıcı olmayan radyasyonlar

olmak üzere iki grupta incelenmektedir. Madde ile etkileştiğinde elektrik yüklü parçacıklar veya iyonlar oluşturan x-ışınları ile radyoaktif maddelerden yayılan alfa, beta, gama ışınları gibi radyasyonlar iyonlaştırıcı radyasyon olarak tanımlanır. İyonlaştırıcı radyasyonlar da kendi aralarında dalga ve parçacık özelliği gösteren olmak üzere iki grupta incelenmektedir (Çizelge 2.1). Dalga özelliği gösterenler radyasyonlar x- ve gama ışınlarıdır. Parçacık özelliği gösteren radyasyonlar ise alfa ve beta parçacıklarıdır.

Dalga özelliği gösteren x- ve gama ışınları madde veya vücuttan rahatlıkla geçtikleri için iç radyasyon tehlikeleri yoktur. Alfa ve beta parçacıkları da kütleleri ağır olduğu için havada uzun bir yol kat edemezler ve pratikte iç radyasyon tehlikesi oluşturmazlar. Ancak solunum, sindirim veya yara yoluyla bu parçacıkların vücut içerisine alınması ciddi iç radyasyon tehlikelerine neden olabilir.

Elektromanyetik dalgaların tümünün dalga boylarına ve enerji düzeylerine göre sınıflandırıldığı tabloya elektromanyetik spektrum adı verilmektedir (Şekil 2.1) [14].

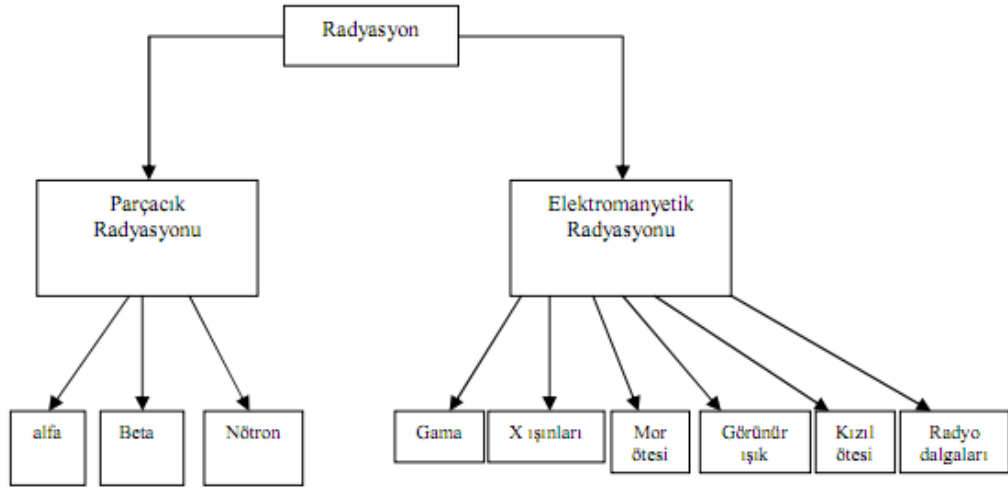


Şekil 2.1 : Elektromanyetik Spektrum [14].

Radyasyonu tanımlamada üç ana parametre kullanılır. Bunlar;
- Enerjisi (düşük ve yüksek enerjili radyasyon)

- Türü (parçacık radyasyonu ve elektromanyetik radyasyon)
- Kaynağı (doğal ve yapay radyasyon kaynakları)

Çizelge 2.1 : Radyasyon Çeşitleri [15].



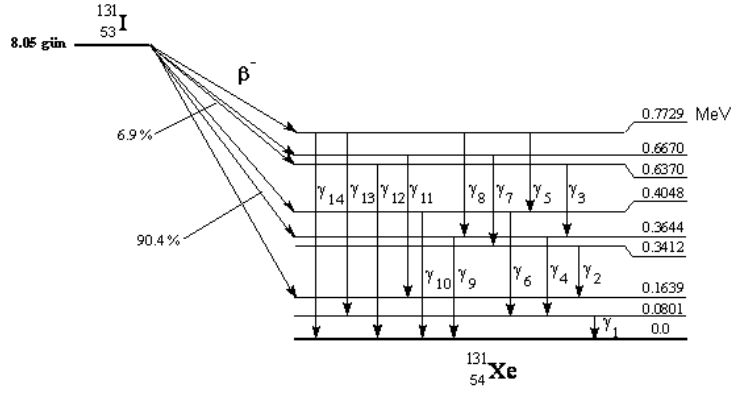
Yüksek enerjili radyasyon iyonize radyasyon olarak da tanımlanır ve atomdan elektron koparabilen dolayısıyla atomu iyonize edebilen radyasyon türüdür. Bunlar: α , β , γ ve x-ışınları'dır.

2.1. α Bozunması

Kararsız ağır çekirdekler genellikle α parçacığı dediğimiz, yani bir ${}^4\text{H}$ çekirdeği atmak suretiyle bozunur. Yani 2 nötron ile 2 protonunu dışarıya salar. α - bozunması yapan çekirdeklerden salınan α parçacıkları çekirdek dışına büyük kinetik enerjilerle salınmaktadır. α - parçacıklarının bu kinetik enerjileri yaklaşık 2 MeV ile 11 MeV arasındadır.

2.2 β Bozunması

Radyoaktif çekirdeklerin büyük çoğunluğu beta bozunumu yaparak kararlı hale geçebilirler. Hem hafif hem de ağır aktif çekirdeklere görülebilen bu bozunmaların yaklaşık 1/3' ü saf β bozunumdur. Diğer 2/3 oranındaki bozunmalarda β partikül enerjisi ile birlikte γ foton enerjisinin de çıktığı gözlenir. Eğer çekirdeğin kararsızlığı nötron ve proton sayılarının farklı olmasından ise β bozunumu yapar. β parçacıkları, α parçacıklarının aksine her bozunmada farklı enerjilere sahip olmaktadır [16].



Şekil 2.2 : ^{131}I 'in bozunma şeması [17].

Örneğin ^{131}I in β^- bozunması sonucunda ^{131}Xe ürün çekirdeğinin 5 değişik uyarılmış enerji düzeyi oluşmaktadır. Bu bozunma sırasında yukarıdaki ^{131}I bozunma şemasında görüldüğü gibi 5 farklı enerjide β^- ışını salınmaktadır. Fakat bunlardan % 90,4 olasılıkla gerçekleşen 364 KeV'lik ışımaya göz önüne alınır. ^{131}I 'e ait bozunma şeması Şekil 2.2'de verilmiştir.

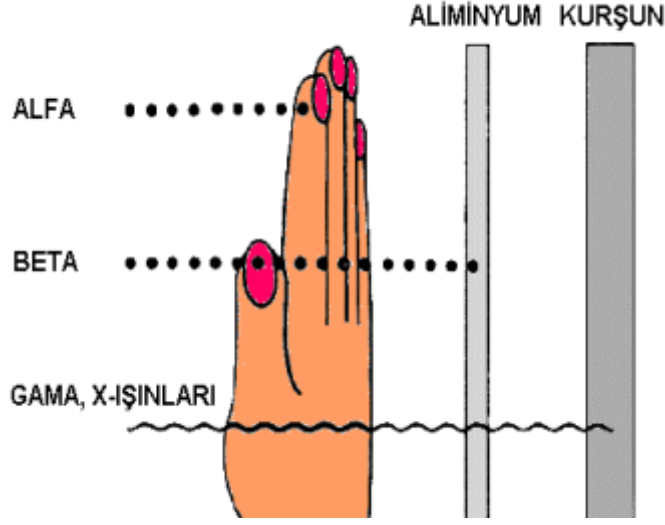
2.3 Gama Işınları

Gama ışınları, elektromanyetik spektrumdaki en kısa dalga boylu ve en fazla enerjili elektromanyetik radyasyonlardır. Gama ışınlarının kaynağı esas olarak atom çekirdekleridir. Uyarılmış bir çekirdek yüksek enerji değerine sahip olur ve gama yayımı yaparak fazla enerjisini dışarı verir γ ışınlarının enerjileri yaklaşık 10 KeV ile 10 MeV arasında değişim göstermektedir.

2.4 x-ışınları

X-ışınlarının esas kaynağı atomların yörünge elektronlarıdır. Gama ışınlarının enerjisinden biraz daha düşük enerjili elektromanyetik radyasyonlardır [18]. Bir atoma dışarıdan gelen veya gönderilen yüksek enerjili elektronlar o atomun ilk yörüngelerinden elektronlar koparılır. Atomdan kopan bu elektronların yerine daha yüksek düzeylerden (üst yörüngelerden) elektronlar atlayarak kopan elektronun yerindeki boşluğu doldururlar. Bu sırada ortaya çıkan enerji fazlalığı x-ışını şeklinde dışarı salınır [19].

Her bir iyonlaştırıcı radyasyonun madde içersindeki giricilikleri farklıdır. Şekil 2.3'de iyonlaştırıcı radyasyonun giricilikleri gösterilmiştir.



Şekil 2.3 : İyonlaştırıcı radyasyonun giricilikleri [19].

Düşük enerjili ya da iyonize olmayan radyasyon ise etkileştiği materyal içindeki atomları yeteri kadar enerjisi olmadığı için iyonize edemez ve sadece uyarmakla yetinir. Mikrodalgalar, görünür ışık, radyo dalgaları, kızılötesi ve (çok kısa dalga boyları hariç olmak üzere) morötesi ışık iyonize olmayan radyasyona örnektir. Elektromanyetik spektrumu oluşturan bütün radyasyonlarda enerji, yüksüz ve kütsüz fotonlar tarafından taşınmaktadır. Eğer iyonize edici elektromanyetik radyasyon çekirdekten yayımlanıyorsa gama, yörüngeden yayımlanıyorsa x ışını adını alır.

2.5 Radyasyonun Saptanması

Radyasyon bir enerji olduğu için saptanmasında madde ile etkileşimi temel alınır. Farklı ölçüm prensiplerine sahip detektörler mevcut olup en sık kullanılanları aşağıda belirtildiği gibidir.

2.5.1 Gaz İyonizasyonunu Tespit Eden Detektörler

En sık kullanılan detektör tipidir. Radyasyonun detektörde bulunan havayı ya da özel gazı iyonlaştırması ve uygulanan voltaj ile bu iyonların bir elektrik akımı oluşturarak bu akımın bir sinyal olarak kaydedilmesi esasına dayanır. İyon odaları, Geiger-Muller (GM) cihazı ve orantılı sayaçlar bu tip detektörlerdir, ancak gaz çarpım katsayıları farklıdır.

2.5.2 Katı Dedektörler

Silikon ve germanyum gibi maddeler kullanılır. Bu maddelerle etkileşen radyasyon belirli dalga boyunda ışık saçılımına neden olur. Işığın yoğunluğu ile orantılı elektriksel akım oluşur ve sinyal olarak kaydedilir.

2.5.3 Sıvı Sintilasyon Sayaçları

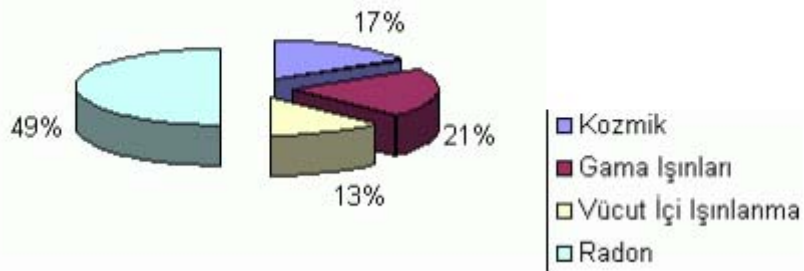
Burada radyasyon detektördeki sintilasyon sıvısındaki molekülleri uyarır. Uyarılmış moleküller eski hallerine dönerken foton yayarlar. Oluşan foton miktarının radyasyon miktarı ile orantılı olmasından ölçümde yararlanılır.

2.5.4 Floresan Ekranları

Radyasyonun bu tip detektörlerde kullanılan floresan maddelerle etkileşiminden sonra floresan moleküllerin başlangıç hallerine dönerken görünen ışık yayması ve yayılan ışığın radyasyon miktarı ile orantılı olması prensibinden yararlanılır.

2.6 Radyasyon Kaynakları

Yeryüzündeki tüm canlılar ve cansızlar havada, suda, toprakta, hatta kendi vücutları içerisindeki doğal radyasyon kaynakları ve bunlara ek olarak insanlar tarafından üretilen yapay radyasyon kaynaklarının her gün ışınımına maruz kalmaktadırlar.



Şekil 2.4 : Doğal radyasyon kaynaklarından maruz kalınan radyasyon dozlarının oranları [20].

Havadaki doğal radyasyon, ya yeryüzündeki çeşitli çatlaklardan çıkan radyoaktif gazlardan özellikle de radon gazından ya da kozmik ışınlardan kaynaklanmaktadır. Bilhassa deniz aşırı yapılan uçak yolculuklarında kozmik ışınlarla daha çok maruz kalırız. Topraktaki radyoaktivite ise uranyum, toryum ve bu radyoizotopların

bozunum serilerinde yer alan diğer radyoaktif maddelerden kaynaklanır. Sudaki radyasyon, gerek havadaki gerekse topraktaki bu radyoaktif kaynakların su ile etkileşiminin bir sonucudur. Vücudumuzda da bazı radyoaktif maddeler bulunmaktadır. Bunlar içinde en önemlileri ^{40}K , ^{226}Ra ve ^{14}C 'tür. Yapay radyasyon insanlar tarafından çeşitli amaçlarla üretilmiş radyoaktif izotopların kullanımından kaynaklanmaktadır. Bu radyasyon kaynakları tedavi amaçlı olarak radyoterapide, teşhis amaçlı olarak ise röntgen, tomografi ve sintigrafi çekimlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca endüstride kalite kontrol, gıda sektöründe ürünlerin raf ömrünü uzatmak için sterilizasyonda ve nükleer reaktörlerde enerji üretiminde radyoaktif maddelerden faydalanılmaktadır [15]. İnsanlar tüm yaşamları boyunca radyasyonla iç içe olmuşlardır. Radyasyon kaynakları var olduğu müddetçe radyasyon olacak ve bundan kaçınmak mümkün olmayacaktır. 19. yüzyılın sonlarına doğru x ışınları ve radyoaktivitenin keşfiyle birlikte tıbbi ve endüstriyel alanlardaki kullanımının günümüze kadar giderek artan bir hızla yaygınlaşması radyasyonu yaşantımızın ayrılmaz bir parçası haline getirmiştir. Radyasyon teknolojisi toplumsal yaşamı kolaylaştırmasının yanında maruziyete bağlı birçok sağlık sorununu da beraberinde getirmiştir [20].

2.7 Radyasyonun Biyolojik Etkileri

2.7.1 Radyasyonun Doku/Organ Düzeyine Etkisi

Radyasyonların biyolojik etkileri, radyasyonun doku içinden geçerken, dokuyu oluşturan veya dokuda bulunan atomların uyarılması, iyonlaşması veya moleküler yapıların bozulması sonucu ortaya çıkan etkilerdir. Radyasyonun biyolojik açıdan iki tür etkisi bulunmaktadır. Bunlar sırasıyla somatik ve genetik etkilerdir. Somatik etkiler, radyasyon ile etkileşen kişi veya kişilerin bizzat kendisinde oluşan etkilerdir. Genetik etkiler ise radyasyonla etkileşen kişi veya kişilerde değil de daha sonraki nesillerinde ortaya çıkan etkilerdir. Tüm vücudun veya büyük bir bölümünün yüksek dozlarda radyasyona maruz kalması sonucu ortaya çıkan etkiler radyasyonun akut veya ani etkisi olarak adlandırılır. Bu tür radyasyon etkileşmesini izleyen dönemlerde, maruz kalınan radyasyon dozunun büyüklüğüne bağlı olarak farklı etkiler oluşabilir [14]. Radyasyona maruz kalan kişinin edindiği 1 joule/kg'lık enerji miktarına uluslar arası edinilmiş doz birimi olan Rad veya Gray (Gy) adı verilir. Radyasyonun etkileri maruz kalınan akut doz miktarına göre değişir [21]. Bir radyasyonun biyolojik etkisinin sadece absorplanmış radyasyona değil aynı zamanda RBE'sine de (250 keV'lik ışınımın oluşturduğu biyolojik etki standart değeri) bağlı olması, REM denilen bir birimin tanımlanmasına neden olmuştur.

Tanım olarak 1 Rem, 1 Röntgen'lik x veya gama radyasyonun oluşturduğu biyolojik etkinin aynısını oluşturan herhangi bir radyasyonun miktarıdır. SI yeni birimler sisteminde doz eşdeğeri olarak Rem karşılığı Sievert (Sv) kullanılır. 1 Sv=100 Rem'dir [16]. Tüm vücut ışınlamalarının insanlarda oluşturabileceği etkiler Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.2 : Tüm vücut ışınlamalarının insanlarda oluşturabileceği etkiler [14].

Doz (Rem)	Gözlenen Klinik Etkiler
(1rem=0.01Sv)	
0 – 25	Gözlenen klinik etki yok
25 -100	Kan tablosunda meydana gelebilecek değişiklikler dışında gözlenebilen etki yok
100-200	Yorgunluk ve iştahsızlık
	Mide bulantıları ve 3 saat içinde kusmalar
	Kan tablosunda orta derecede değişiklikler
	Kan yapıcı organlar dışında birkaç hafta içinde iyileşme
2000 – 600 alanlarda)	2 saat veya daha kısa sürede kusmalar (300 Rem ve üzerinde doz
	İç kanamalar ve enfeksiyon
	Kan tablosunda büyük değişiklikler
	2 hafta içinde saç dökülmesi (300 Rem ve üzerinde doz alanlarda)
	Alınan radyasyon dozuna bağlı olarak bir ay ile bir yıl arasında % 20 - % 100 iyileşme.
600 – 1000	1 saat veya daha kısa sürede kusmalar
	Kan tablosunda büyük değişiklikler
	2 ay içinde % 80 - % 100 oranında ölüm gerçekleşecek.

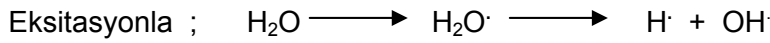
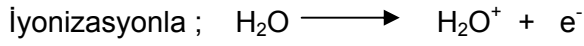
2.7.2 Radyasyonun Moleküler/Hücresel Düzeye Etkisi

İyonlaştırıcı radyasyon ya direkt olarak DNA zincirinde kırılmalar oluşturur ya da hücre içindeki moleküllerle etkileşerek oksijen radikalleri oluşumunu sağlar ve bu oksijen radikalleri DNA bileşenleri ile etkileşerek zincirde kırılmalar (baz hasarı, tek ve çift zincir kırılmaları) ve diğer tip bozulmalara yol açarlar. Her hücre tipinin radyasyona duyarlılığı farklıdır. Sık bölünen hücrelerin (over ve testisin germinal hücreleri) duyarlılığı fazla iken, bölünmeyen hücrelerin (Karaciğer, Böbrek, Kas, Sinir hücreleri) duyarlılığı daha azdır [13].

Canlı sistemi etkileyerek onda biyolojik hasarlar oluşturacağı düşünülen her fiziksel ve kimyasal etmen için, etki mekanizmasıyla ilgili göz önüne alınacak öncelikli

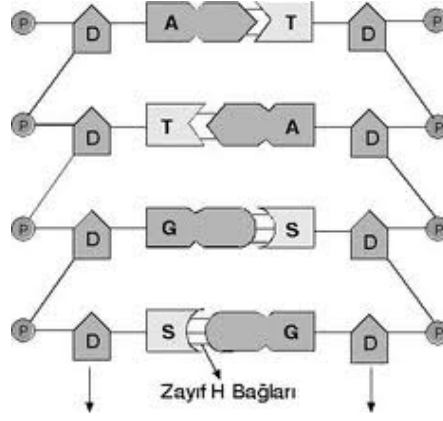
husus, canlı yapının yüksek oranda su içermesidir. Bu nedenle radyasyonun canlı sisteme etkisini direkt ve indirekt olarak ayırmak mümkündür.

Radyasyon enerjisi özellikle DNA gibi çok önemli bir makromolekülde veya RNA'ya da özel bir enzimde yani bir özel biyolojik yapıda bir fiziksel olaya neden olmuşsa bu etkiye radyasyonun **direkt etkisi** denir. Eğer radyasyon enerjisi biyolojik molekül tarafından değil, o biyolojik yapının içinde bulunduğu başta su molekülü olmak üzere diğer ortam molekülleri ile etkileşmeye girmişse, biyolojik molekül bu olaydan indirekt etkileneceği için, bu tip etkilenmeye radyasyonun **indirekt etkisi** denir. Radyasyon enerjisinin su molekülü ile etkileşmesi, yani su moleküllerinde iyonizasyona veya eksitasyona neden olması yüksek bir olasılıktır. Bu olay 10^{-12} sn' den de kısa bir sürede ve



şeklinde başlayan çok aktif hidrojen ve hidroksil radikallerinin oluşmasına neden olur. Ayrıca ortamda oksijenin miktarıyla doğru orantılı olarak H_2O_2 ile HO_2^\cdot (hidroperoksit) gibi aktif yapıların varlığı da görülür. Serbest radikaller, genellikle elektriksel açıdan yüksüz yapılar olup, dış yörüngelerinde eşleşmemiş elektrona sahip atom ya da moleküllerdir. Bu nedenle kimyasal olarak son derece aktiftirler, ortamdaki diğer atom ya da moleküllerle reaksiyona girerek kararlı hale geçme eğilimindedirler. Bu aşamada reaksiyona girdiği molekül örneğin DNA ise, bu molekülde tahripkâr bir etkiye sebep olması muhtemeldir ve indirekt bir etki şeklinde başlayan olaylar, biyolojik bir hasara neden olacaktır.

DNA molekülünün hücre faaliyetlerini yönettiği ve kalıtsal direktiflerin DNA molekülünde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle radyasyonun DNA ya olan etkisi diğer moleküllere olduğundan çok daha fazla önem taşır. Hücrenin esas yapısını içindeki proteinler oluşturur. Proteinlerin yapımında diğer nükleik asit RNA'da önemli bir rol oynar.



Şekil 2.5 : DNA molekülünün yapısı

DNA'nın aynı eksen etrafında dolanmış sarmal iki diziden oluşur. Sarmalın iki kenarında fosfat ve deoksiriboza (şeker) bağlı pürin (Adenin ve Guanin) ile pirimidin (Timin ve Sitozin) bazları bulunur. Karşılıklı iki dizide bir pürin karşısına mutlaka uygun pirimidin bazı gelir. Radyasyonun DNA'yı etkilemesinin radyasyonun dozu ve hücrenin çekirdeğindeki durumu ile ilgili olduğu bilinmektedir. DNA üzerinde kalıcı bir hasarın meydana gelmesi için bu doz 1000 cGy üzerinde olması gerekmektedir. Bu değerlerdeki radyasyon DNA' da zincirlerin kırılması, denatürasyon bölgelerinin oluşması, baz hasarları ve baz kayıpları ile çapraz bağlanma gibi olumsuzluklara yani hasarlara sebep olmaktadır [16].

2.8 Radyofarmasötikler

Yapısında bir radyonüklid bulunduran, nükleer tıpta hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılan radyoaktif bileşiklere radyofarmasötik denir. Kullanılan radyofarmasötiklerin %95'i tanı, %5'i tedavi amaçlıdır. Bir radyofarmasötik radyonüklid ve farmasötik olmak üzere iki bileşenden meydana gelmektedir. Bir radyofarmasötiğin tasarımında, öncelikle dikkat edilmesi gereken husus, radyofarmasötiğin seçilecek organın fizyolojisine uygun olmasıdır. Uygun radyonüklidin seçilen bileşiğe kimyasal olarak bağlanmasına **işaretleme** adı verilir. İdeal bir radyofarmasötik, hastanın mümkün olan en düşük radyasyon dozunu alabileceği şekilde tasarlanmalıdır. Genellikle eser miktarda kullanıldıkları için farmakolojik etkileri yoktur [22,23].

2.8.1 Ön-ilaç (Produg)

İlaç hedeflendirilmesi, farmakolojik etken maddenin etki veya absorpsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesi olup, hazırlanan preparat etken maddeyi taşıyan özel

bir yapıdır. Hedef özel bir organ, hücresel bir yapı veya intraselüler bir yapı olabilmektedir.

Vücutta belli odaklarda ilacın seçici olarak taşınmasının 2 yaşamsal yararı vardır.

1) İlacın, etki bölgesi veya bölgelerinde, istenen hızda etkinliği bakımından en uygun etkileşmeyi sağlamaktadır.

2) Buna eşdeğer önemde olan ikinci yararı ise, etken maddenin dozunun azaltılması ve etken maddenin sadece hedef organa dağılımıyla sınıflandırılmasıdır. Böylece oluşabilecek yan etkiler minimuma indirilebilecektir.

Hedeflendirme basamakları

-İlacın seçici olarak hedef bölgeye girişi

-O bölgede tutulması

- İlacın etkinliği

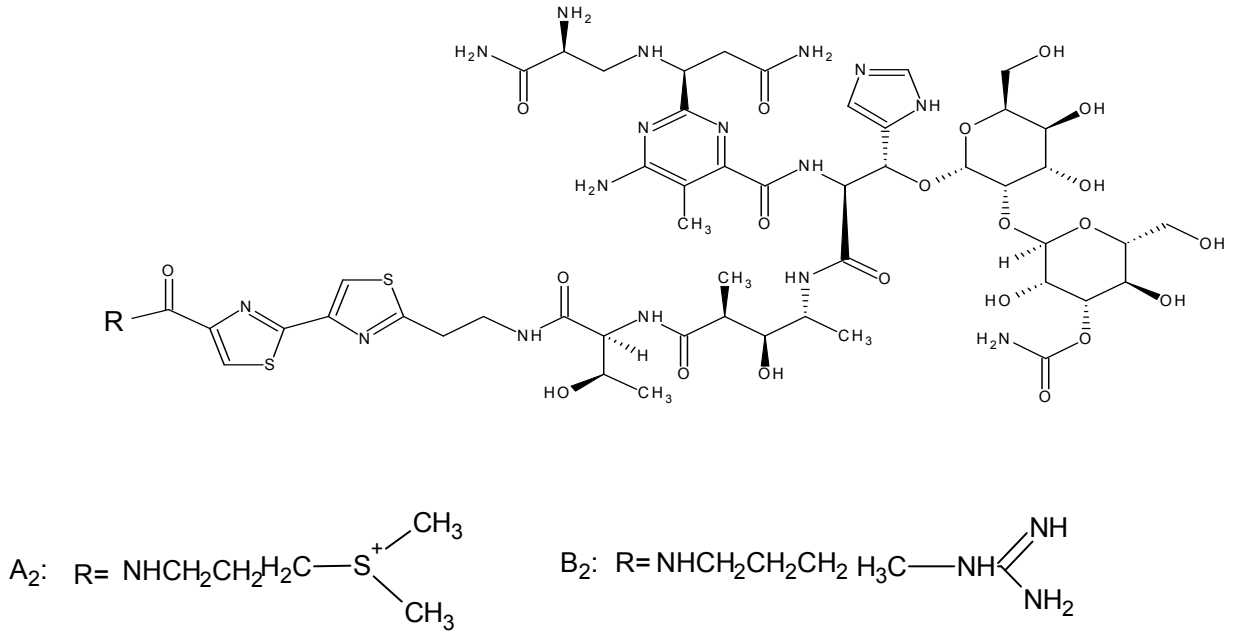
-Uygun dozu uygulama sıklığı ve sürenin ayarlanması şeklindedir.

İnsan bedeni bir seri anatomik kompartmanlara ayrılmaktadır. Dokular, hücreler, hücre içi yapılar şeklindeki bu kompartmanlar birbirlerine fiziksel geçiş yolları ile bağlanmaktadır. Yine fonksiyonel olarak bu kompartmanlar birbirleriyle biyokimyasal mediatörler aracılığı (örneğin hormonlar) ile iletişim kurmaktadır. Bu fiziksel ve kimyasal iletişimler, bölgeye özgü ilaç taşınım sistemlerinin, tasarımındaki yeni imkanlara olanak sağlamaktadır. Hedeflendirmenin tedavideki yeri açıktır. İlaç istenen bölgeye gönderilir. Böylece diğer dokularda yan etkiler ve istenmeyen reaksiyonlar oluşmaz. Kanser kemoterapisi ilaç hedeflendirmenin önemli yarar sağlayacağı bir örnektir. Antitümör ajanların etkileri seçici olmamalarına karşın sürekli kullanılmaktadır. İlaç hedeflendiren sistemlerde etkin ilaç geliştirilmesi seçiciliği arttıracak olan uygun mekanizmaların anlaşılmasına bağlıdır. Bu mekanizmalar, biyokimyasal ve immunolojik, hücre biyolojisi ve kolloid bilimi gibi multidisiplinli gruplarda çalışmayı gerektirir [24].

2.9 Bleomycin (BLM)

Bleomycin (BLM) ilk olarak 1966 yılında, Japon bilim adamı Umezawa ve arkadaşları tarafından *Streptomyces verticillus*'ün bir mayalanma ürünü olarak izole edilmiştir (Şekil 2.6) [6]. Anti-kanserojen ajan olarak kullanıldığında başlıca A₂ (%65), B₂ (%30) kemoteropik formlarında bulunmaktadır. BLM başlıca lenfosit kanseri olmak üzere yassı epitel karsinomları, testis kanseri ve taban siğilleri gibi birçok hastalık çeşidinde tedavi potansiyeline sahip olup, sitotoksik etkiye sahiptir [25]. BLM DNA'ya bağlanarak pürin ve pirimidin bazlarının ayrılmasına sebep olmaktadır, bunun yanında DNA sentezini inhibe ederek, az bir derecede de RNA ve

protein sentezinin inhibüsyonuna neden olmaktadır. BLM moleküler oksijen ve demirli kompleksler oluşturarak DNA kırılmalarına neden olabilir. Bu etki radyasyona benzer bir etkidir. Hibrid hücre kullanılarak yapılan çalışmada gama radyasyon ve BLM dozunun artırılmasına paralel olarak ortamda yaşayan hücre sayısında azalma olmaktadır [26]. En sık lenfomalarda ve baş boyun katı tümörlerinde kullanılmaktadır. İntralevral olarak uygulanan BLM'nin %31-85 arasında başarı sağladığı bildirilmektedir. Orta dereceli ateş, lokalize göğüs ağrısı ve gastrointestinal sistem şikayetleri gibi yan etkilere yol açan BLM, plevra boşluğunda sınırlı emilimi nedeniyle hastalarda az oranda sistemik toksisiteye yol açar. İmmün sistemi bozuk olan hastalarda veya eşzamanlı kemoterapi uygulamalarında güvenli bir şekilde uygulanabilir [27].



Şekil 2.6 : BLM A₂ ve BLM B₂'nin kimyasal yapısı [6].

2.10 Kromatografi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adıdır. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

2.10.1 Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, aynı örnek içinde bulunan ve sıvı içinde çözünmeyen bileşikleri ayırma, tespit etme ve ölçme yeteneğine sahiptir. Bugün eser miktardaki bileşikler kolaylıkla tespit edilebilir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) denir [28]. Böyle bir HPLC cihazı Şekil 2.7'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7 : HPLC cihazı

2.10.2 İnce Tabaka Radyokromatografisi (TLRC)

İnce tabaka kromatografisi bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Adsorban madde olarak (alumina, slika jel, selüloz vb) kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür. Bu işlem sırasında plakanın alt kesimine bir damlalıkla damlatılmış olan karışımında farklı hızlarla yukarı doğru sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin ve çözünenin polarlığına bağlıdır. Kromatografisi yapılacak olan madde bir damlalık yardımıyla plağın alt tarafından yaklaşık 1.5-2 cm yukarisına damlatılır.

Kromatografide kullanılan tanklar ağzı iyice kapanan çukur, cam kaplar olmalıdır. Bu kapların atmosferlerinin çözücü buharıyla iyice doyurulması gerekir. Aksi takdirde maddelerin ayrılması iyi gerçekleşmez. Çözücü tanklarının içine çözücü tabandan 1-2 cm yüksekliğe kadar konur daha sonra damlatma yapılan plakalar tanka damlatılan noktaya temas etmeyecek biçimde yerleştirilir. Plakaların üzerindeki madde karışımları birbirlerinden farklı hızlarla yükselmeye başlarlar. Ayrılma çok yavaşsa kullanılan çözücü değiştirilebilir. Polar olması beklenen maddeler için polar çözücüler kullanılır [29].

2.11 İyod ve İyod'un Radyoaktif İzotopları

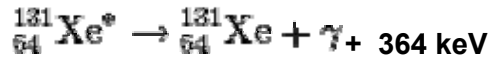
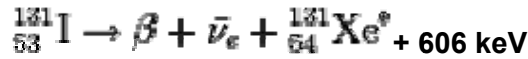
Doğal iyod, Bernard Courtois tarafından 1811 yılında suda ve su yosunu külünün belli kısımları çözümlenerek keşfedilmiştir. İyod, eflatun-siyah kristalli ametal bir katıdır. Temelde kararlı iyod-127 olarak doğada bulunur. Kararlı iyod, su yosunları ve süngerler tarafından sindirildiğinden doğada deniz suyu, su yosunları, süngerler ve diğer materyallerde mevcuttur. Başlangıçta katı olan iyod, sıvı fazını oluşturmaksızın gaz faza doğrudan geçebilen ender bir süblimleşme özelliğine sahiptir. Oda sıcaklığında renkli buharlarına dönüşerek süblimleşir. Bu buhar gözleri, burunu ve boğazı tahriş eder. İyod, alkolde ve suda çözünür. Kaynama noktası 184,3 °C'dir. İyod, kolayca diğer kimyasallarla reaksiyona girer. İzotopları, saf element çekirdeklerinden ziyade bileşiklerde bulunur. İyodun hem radyoaktif hem de radyoaktif olmayan izotopları vardır. Bunlardan iyod-129 ve iyod-131, çevredeki en önemli radyoaktif izotoplardır. Doğal olarak radyoaktif iyod-129, atmosferin üst katmanlarında yüksek enerjili parçacıkların ksenonla etkileşimiyle oluşur. Çevrede kararlı iyod-127'nin radyoaktif iyod-129'a oranı 10 milyonda 1'den daha fazladır. Radyoaktif iyod-131, 1930 yıllarının sonunda California Üniversitesi'ndeki (Berkeley) Glenn T. Seaborg ve John Livingood tarafından keşfedilmiştir. Hem iyod-129 hem de iyod-131, nükleer reaktörlerin çalışması sırasında uranyum atomlarının fisyonu ve nükleer silahların patlamasındaki plütonyumla üretilir. İyodun radyoaktif izotopunun nükleer fisyon tarafından üretimi şu şekilde olur: U-235 atomu (ya da diğer bölünebilir nüklidler) fisyon uğradığında genellikle asimetric bir şekilde yaklaşık 90-140 arasında kütle numarasına sahip fisyon ürünleri olan iki büyük parçaya ve 2 ya da 3 nötrona bölünür. İyod-129 ve iyod-131 bu tür olan iki üründür. İyod-129'un fisyon verimi yaklaşık %1 ve iyod-131'in fisyon verimi %3'e yakındır. Yani, 100 fisyon başına yaklaşık bir iyod-129 atomu ve üç iyod-131 atomu üretilir.

İyod-129, yaklaşık 16 milyon yıllık yarı ömre sahip beta parçacıkları yayınlamak bozunur. Diğer iyot radyonüklidlerinin yarı ömürleri 60 günden azdır. İyod-131,

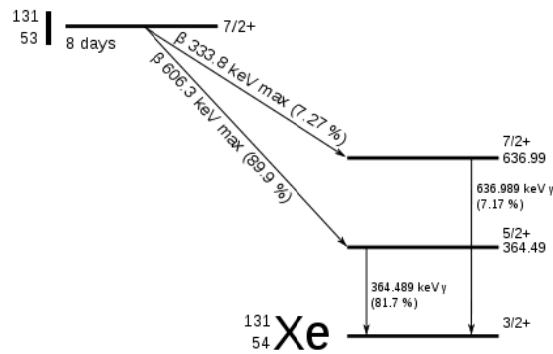
8 günlük bir yarı ömre sahiptir. Bazı iyod izotopları teşhis amacı ile görüntülemeye yaygın olarak kullanılmaktadır (iyod-131, I-125, I-124 ve I-123) I-123 ve I-124 gibi iyod izotopları tıbbi görüntüleme ve teşhiste kullanılır, fakat genelde bunlar çok kısa yarıömürlü olduklarından dolayı çevrede bir problem yaratmazlar. Radyoaktif iyodlar kararlı iyod ile aynı fiziksel özelliklere sahiptir. Bununla beraber, radyoaktif iyodlar zamanla bozunur [30].

2.11.1 İyod-131 (^{131}I)

İyod-131, iyod'un diğer izotopları içinde bilinen en önemli radyoizotopudur. Radyoaktif yarılanma süresi 8 gündür, β^- ve gama emisyonu yapar. En çok medikal ve radyofarmasi alanında kullanılır [31]. Kararlı izotopu olan ^{127}I 74 nötrona sahipken, ^{131}I 'in nötron sayısı 78' dir. ^{131}I radyoaktif bozunma sırasında kararlı halde bulunan ^{131}Xe e dönüşürken önce β^- bozunması, ardından da gama bozunması yaparak 971 keV lik enerjisini kaybeder.



^{131}I 'in β^- bozunması sırasında 606 keV'lik enerji açığa çıkarken, gama emisyonu sırasında 364 keV'lik enerji açığa çıkar [32]. β^- -bozunması sırasında değişik miktarlarda β^- bozunma enerjisi içeren antinötrino oluşur [33]. İyod-131, kısa yarı ömrü ve yararlı beta yayılımı nedeni ile nükleer tıpta yoğun bir şekilde kullanılır. İyod-131, tiroitten gelen tiroksin akışını izlemeyi ve görüntülemeyi içeren birçok tıbbi işlemler için faydalıdır [30]. ^{131}I 'in bozunma şeması Şekil 2.8'de verilmiştir.



Şekil 2.8 : ^{131}I 'in bozunma şeması [34].

2.12 Metabolizmada Zehirsizleştirme

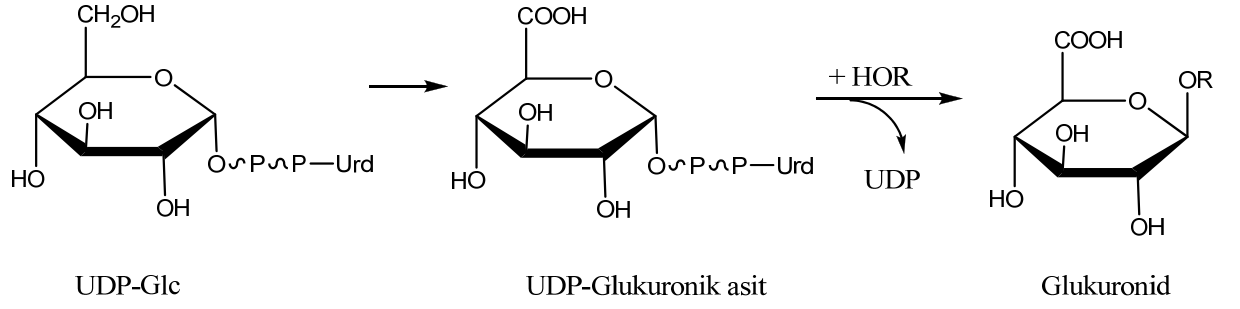
Organizmada metabolizma esnasında meydana gelen veya dışarıdan giren zararlı maddelerin kimyasal reaksiyonlar sonucunda zararsız hale getirilmesine *zehirsizleştirme* denir. Zehirsizleştirmede meydana gelen bu reaksiyonlar (1) bileşik teşkili, (2) yükseltgenme (3) indirgenme, (4) hidrolizdir. Zehirsizleştirme reaksiyonlarının tipi özellikle zehirsizleştirilecek bileşiğin kimyasal yapısına bağlıdır. Bileşik teşkili, insanlarda en çok rastlanan zehirsizleştirme reaksiyonu olup özellikle karaciğerde ve çok daha az olmak üzere böbreklerde meydana gelir.

2.12.1 Bileşik Teşkili

Zehirsizleştirilecek olan birçok madde idrarla atılmadan önce, organizmada normal olarak bulunan bazı maddelerle bileşik teşkil ederler. İnsan organizmasındaki başlıca zehirsizleştirme maddeleri; glukuronik asit (glukuronat), sülfirik asit (sülfat), glisin, sistein, glutamin, asetik asit (asetat), metil grupları ve tiosülfat'tır. Glukuronik asit (glukuronat), zehirsizleştirilecek madde ile ya eter (glukuronozid) veya ester (glukuronid) meydana getirir. Her iki bağın varlığında da glukuronik asit, üridin difosfat glukuronik asit (UDPGA)'den sağlanır [35].

2.12.2 Glukuronid Oluşumu

Üridin difosfat-glukoz enzimatik olarak (akseptör olarak NAD ile) glukuronildifosfat-üridine yeni aktif glukuronik asite oksitlenir. Aktif glukuronik asit organizmada bulunan veya organizmaya ilaç olarak verilen hidroksil bileşikleri ile uygun transferaz enzimi (UDPGT)'nin katkısıyla glukuronidleri oluşturur. Bu reaksiyon karaciğerde gerçekleşmekte olup, ilaçlar ve zehirler gibi vücuda yabancı birçok maddenin bu şekilde bağlanarak dışarı atılmasını sağlar (Şekil 2.9) [36].



Şekil 2.9 : Glukuronidasyon mekanizması [37].

2.13 β -Glukuronidaz Enzimi

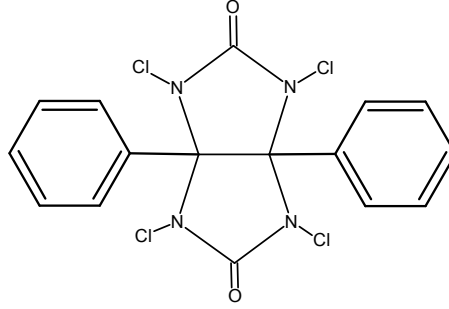
β -Glukuronidaz enzimi hidroliz yapan enzimler (hidroksilaz) sınıfına giren en önemli enzimlerden biridir ve glukuronid türevi bileşiklerin deglukuronidasyonunu gerçekleştirir. β -glukuronid bağı bu enzim tarafından kopartılarak deglukuronidasyon gerçekleşir. Böylece, glukuronid bileşiğine bağlı olan grup (aglikon) yapıdan ayrılır. Bu enzimler ilaçların, endüstriyel kimyasalların, karsinojenlerin, besin katkı maddelerinin, pestisitlerin ve insan yapımı substratların konjugasyonlarını sağlayarak organizmayı birçok toksik maddenin yarattığı zararlı etkilerden koruyabilme özellikleri vardır.

β -Glukuronidaz enzimi daha çok dalak, karaciğer ve endokrin bezlerinin mikrozomal fraksiyonlarında bulunur [10]. β -Glukuronidaz enziminin karaciğer mikrozomlarından izole edilebilmesi için, taze sıçan karaciğeri kullanarak deneysel çalışmalar yapmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bazı kanser dokularında bu enzimin normal dokulara göre çok daha yüksek aktivite gösterdiği rapor edilmiştir [38,39,40].

2.14 İodojen Yöntemi

İodojen'in (1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -difenil-glikouril) kendisi suda çözünmez ancak sulu çözeltilerde heterojen olarak iyod'un yükseltgenmesini sağlayarak hızlı iyodinasyonu sağlar. Bu nedenle bu yöntemde yan reaksiyonlar ihmal edilebilir düzeydedir. İodojen ile iyodür'ün oksidasyonu gerçekleşerek (I^+) üretilir ve aromatik halkaya elektrofilik yer değiştirmeyle iyodun bağlanması gerçekleşir [41]. Şüphesiz ki radyoiyodlanmış iodojen bir organik solvent ile kolaylıkla cam yüzeyden alınabilir. İodojen kloroformda veya diklorometanda çözünmesi ve kloroformun uçurulmasıyla iyodinasyonun yapıldığı kabın duvarlarında tabakalaşmayı sağlar ve reaksiyon katı fazda iodojen'in bulunduğu kaptaki reaksiyon çözeltisi ayrılarak sonlandırılır. Sonuç olarak bir kimyasal bileşiğin elektrofilik sübstitüsyon üzerinden radyoiyodasyonu

için iyi özellikleri olmaması durumunda, iodojen'in kendi kendine radyoiodlanması söz konusu olacaktır ve bu nedenle radyoiodlanma verimi azalır. ¹³¹I ile işaretli anti-body bileşikler kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle radyoaktif iyod ile işaretleme iodojen yöntemiyle basit bir proses ile gerçekleştirilir. Serbest iyod birikimi kolaylıkla ortadan kaldırılabilir. Önceden hazırlanmış tüplerin 0-5°C'de altı ay muhafaza edilebileceği rapor edilmiş olmakla birlikte 3 aydan uzun sürelerde verimin düştüğü gözlenmiştir [10].



Şekil 2.10 : Iodojen'in kimyasal yapısı [17].

2.15 Hücre Kültürü

Hücre kültürünün temel ilkesi, canlı dokulardan alınan parçaların *in-vitro* koşullarda yaşama ve üremelerini sağlamaktır. Tüp, şişe gibi laboratuvar gereçlerinde uygun besleyici sıvıların içinde üretilerek kullanılan canlı dokulardır. Bu amaçla çeşitli canlıların; insan, fare, tavşan vb. çeşitli organları; böbrek, akciğer, ince barsak, tümürlü organ zarları önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılır. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino asitler, vitaminler içeren besleyici sıvılarda süspansiyon edilerek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspansiyonu 37° de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya **hücre kültürü** denir. Bu teknik özellikle 1950 ve 1960'li yıllarda virüslerin memeli hücrelerinde üretilmesi üzerine yapılan çalışmalar ile gelişme göstermiş ve son yıllarda deneysel kanser araştırmaları ve kök hücre konusunun bilimsel olarak öneminin ortaya konmasıyla toplumda da popülerlik kazanmıştır.

Çok çeşitli kaynaklardan sağlanan ve dokulardan elde edilen hücre kültürleri üç bölümde incelenir.

- Primer (birincil) hücre kültürleri
- Sekonder hücre kültürleri
- Sürekli hücre kültürleri

2.15.1 Primer Hücre Kültürü

Dokulardan tripsin ile ayrıştırılarak *in-vitro* üretilmeleri ile elde edilen kültürler denir. Primer kültürler elde edildikleri dokunun özelliklerini taşırlar. Genellikle heterojen bir yapı gösterirler, tek tip hücre hatları değildirler.

2.15.2 Sekonder Hücre Kültürleri

Normal kromozom sayısına sahip diploid hücrelerden elde edilir. En fazla 50 kez pasajları yapılabilir.

2.15.3 Sürekli Hücre Kültürü

Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir [42].

2.16 Hücre Kültürlerinin Kullanım Alanları

- a. İlâç metabolizmasından sorumlu enzim sisteminin saptanması,
- b. İlâç metabolize edici enzim aktivitesini etkileyebilecek faktörlerin saptanması,
- c. İlâç metabolitleri ve bu maddelerin toksik etki potansiyellerinin saptanması,
- d. İlâcın metabolik yıkılma süresinin saptanması,
- e. İlâçların birbirleri üzerine olan etkileşim derecesinin saptanması,
- f. İlâç metabolizmasında genetik, yaş, çevre ve hastalık faktörlerinin araştırılması,
- g. Bireylerin ilâç allerjisi potansiyeline sahip olup olmadığının öngörülmesi

Yukarıda sayılan ilâç metabolizmasıyla ilgili hususları araştırmada insan karaciğer hücre kültürleri son derece önemli bir kaynaktır [43].

2.17 Hücre Pasajlama

Hücreler sıkışık (konfluent) duruma gelince hem besi ortamı hücreler için yetersiz hale gelir, hem de kültür kabında yer olmadığı için kontakt inhibisyon adı verilen mekanizma ile hücrelerin çoğalmaları durur. Bu nedenle hücrelerin pasajlanmaları gerekir. Hücre pasajlama işlemi flasklarda tek tabaka halinde bulunan hücre dizilerinin zarar verilmeden yüzeyden ısı ve tripsin yardımıyla sıvı içinde süspanse ederek başka ortamlara aktarma prensibine dayanır. Aktarılan ortam (tüp, flask, vial vb) %5 CO₂'li etüvde 37°C de hücreler tam tabaka olana kadar inkübe edilir [42].

2.18 Toksikite

Toksikoloji zehir bilimidir. Zehir ise, canlı organizmada zararlı etki gösteren herhangi bir madde olarak tanımlanabilir. Uygun yol ve dozda alınmayan her madde zehir etkisi yapabilir. Bu etki bir yapı değişikliği şeklinde olabileceği gibi biyokimyasal lezyon şeklinde de olabilir [43]. Ortaya çıkan etki, tersinir olabileceği gibi hücre ölümü şeklinde de olabilir. Canlı hücreler üzerinde kimyasal maddelere bağlı önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla deneysel toksikolojik çalışmalar yapılır.

Toksikite testleri, sadece kimyasal maddelerin canlı organizmalar üzerindeki zararlı etkilerini açıklamak için yapılmaz. Bu maddelerin toksik etkilerinin görülmeyeceği doz, değerlerini saptamak için de yapılır. Eğer, uzun süreli madde maruziyetine bağlı toksik etkiler araştırılacak ise, deneyin yapıldığı zaman periyodu içinde de aynı özellikte maddelerin ve koşulların uygulanması gerekir. Beklenen toksik etkinin görülmeye yönelik testlerde, bu etkiyi oluşturduğu bilinen bir kimyasal maddenin, pozitif kontrol grubuna uygulanması ve deneyin sağlıklı işlediğinin test edilmesi gerekir. Tüm ilaçlar, tarımsal ve zirai amaçlı maddeler, temizlik maddeleri, bazı kozmetikler vs. kullanıma sunulmadan önce toksikite testlerinden geçirilirler.

Herhangi bir ilâcın belli organ veya dokular üzerine zararlı etkileri, kanserojen, mutajen veya teratojen etkilerinin olup olmadığını saptamaya yönelik alternatif testler geliştirilmektedir

Amerika Ulusal Kanser Enstitüsü kanser araştırmalarında fare kullanımından vazgeçerek, 60 çeşit insan, kanser hücre kültürü üzerinde barsak, akciğer, melanoma, böbrek, beyin ve kan kanseri için haftada 300 yeni kimyasal maddenin antikanser etkinliğini araştırabilmekte, hücre kültürlerinden alınan sonuçların daha gerçekçi ve daha spesifik olduğu ifade edilmektedir [43,44].

2.18.1 İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Avantajları

- a. Tür farklılığını ortadan kaldırır,
- b. Kimyasal maddelerin muhtemel toksik etki yapacağı düşünülen deri, karaciğer gibi spesifik doku hücreleri üzerinde araştırma yapılmasını sağlar,
- c. Toksikite mekanizmalarının hücreler üzerinde aydınlatılmasına imkân verir,
- d. Deneyde kullanılan hayvanların acı çekmesi veya ölmesi söz konusu değildir.

2.18.2 İnsan Hücre Kültürlerinin Toksikite Araştırmalarındaki Dezavantajları

- a. Tekli sistemdir. Multifaktöriyel ilaç metabolizması için uygun değildir,
- b. Teknolojik alt yapı maliyeti ve deneyimi gerektirir,
- c. İn vitro ortamda hücrelerin yaşam siklusu kısadır,
- d. Enzim stabilitesi kısıtlıdır,
- e. Kültür ortamının penetrasyon kabiliyeti kısıtlıdır,
- f. Ko-faktörlere gereksinim duyar [43,45].

Sonuç olarak, ilaçlar başta olmak üzere, yeni geliştirilen ve günlük hayatta yaygın olarak kullanılacak kimyasal maddelerin insanlarda emniyetli kullanımı için toksisite testlerinin önemi büyüktür. İnsan hücre kültürleri kullanılarak ilaçların toksik etkileri araştırılabilir. Bunun da ötesinde, ilaçların vücutta nasıl yıkıldıkları, buna bağlı olarak aynı ilaca verilen bireysel yanıtların değişkenlik mekanizmaları araştırılabilir [46].

2.19 Floresan Mikroskopisi

Floresan mikroskopisi, floresan maddelerin (örn. Hoechst boyası, DAPI “4,6-diamidino-2-fenilindol”, propidium iyodür, akridin orange, etidyum bromür, FITC (fluorescein isothiocyanate) kullanılmasıyla yapılan bir boyama şeklidir. Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilir [47]. Kullanılacak olan hücrelerin sıvı içinde süspansiyon halinde bulunması gerekir. Solid dokular ise hücreler disaggrege edilip hücre süspansiyonu hazırlanarak kullanılmaktadır. Hücreler yüzeylerindeki veya hücre içindeki proteinlere özgün antikorlarla inkübe edilerek antijenlere bağlanmaları sağlanır. Her spesifik antikor flokrom denilen maddelere bağlanır. FITC, PE, PerCP gibi floresan boyalar en yaygın olarak kullanılan flokromlardır.

Flokromlar: radyasyon enerjisini emen ve bu enerjiyi değişik uyarılarla özel ışık şeklinde yayabilen maddelerdir. Bu maddelerin uyarı ile görülebilir, özel renkte ışık yaymalarına floresans denir. Flokromların diğer bir özelliği de, üzerlerinde kimyasal aktif grupların bulunması ve bu aktif grupların, proteinlerin serbest amino grupları ile bağlanabilmeleridir. Böylece belirli antijene sahip hücrelerin laser ışını ile karşılaştığında verdiği floresan sinyalleri değerlendirilerek o hücrenin hangi spesifik antijeni taşıdığı belirlenebilir. Hücrelerin üzerine bağlanan monoklonal antikorlar laser ışını absorbe ederek üzerlerindeki flokromun özelliğine göre farklı dalga boylarında ışın saçarlar, her hücreden saçılan ışınlar çoklu dedektörler yardımı ile her hücre için ayrı ayrı belirlenir ve bu bilgiler bilgisayar ortamına aktarılır [48].

3. MATERYAL ve METOD

3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan Kimyasallar

- İyod-131 (Na^{131}I) (Monrol A.Ş, Türkiye)
- Trishidroksiaminometan
- Kalsiyum klorür (CaCl_2) (Merck)
- Hidroklorik Asit (HCl) (Merck)
- Asetonitril (CH_3CN) (Merck)
- Tris Buffer (Merck)
- Amonyum Asetat ($\text{NH}_4\text{OOCCH}_3$)
- Etil Asetat (Merck)
- Etil Alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck)
- Kloroform (CH_3OCl) (Merck)
- Asetik Asit (CH_3COOH) (Merck)
- N-bütanol ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{OH}$) (Merck)
- Amonyak (NH_3) (Merck)
- Sitrik Asit Monohidrat (Merck)
- Sodyum Hidroksit (NaOH) (Riddel-de-haen)
- Diklorometan (CH_2Cl_2) (Riddel-de-haen)
- İodojen (Fluka)
- Bleomycin Sülfat (Fluka)
- pH= 7 Tamponu (Merck)
- Phosphate Buffer Solution (PBS) (Bio.Ind.)
- Fetal Sığır Serum (FSS)
- n-oktanol (Merck)
- Serum Fizyolojik (SF) (% 0,9 NaCl çözeltisi)
- TLC-SG (Merk-5552)
- Sığır Serum Albumini (SSA)
- Serum Fizyolojik (%0,9 NaCl), (Eczacıbaşı-Baxter H.Ü.San. ve Tic. A.Ş)
- Ripa (Sigma-Aldrich Co.)

- PC-3 prostat (karsinoma) epiteli (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi)
- A-549 akciğer (karsinoma) epiteli (Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesi)
- 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)

3.1.2 Kullanılan Cihazlar

- HPLC Shimadzu (LC-10Atp quaterner pompalı, SPD-10A UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kolektörlü.
- Bench-Top Centrifuge (Nüve) Type= NF 800R
- Denver Instrument (TB-224A) (Hassas Terazi)
- Biodex Medical Systems (Atomlab 100 Dose Calibratör) Type=086-251
- Nüve Sanayi Malzemeleri İmalat Ve Ticaret A.Ş Water Bath NB5
- TLRC Küvetleri (Sigma)
- RadyoTLC (Bioscan 2000)
- Ultra Turrax T8 Kika Werke marka homojenizatör (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)
- Beckman Coulter Optima L-100XP ultrasantrifüj (Aydın Adnan Menderes Üniversitesi)
- Packard Tri-corb-1200 sıvı sintilasyon sayacı (E. Ü., Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim. Dalı.)
- Olympus Bx51 Floresan Mikroskop

3.2 UDPGT Enziminin Elde Edilmesi

UDPGT enziminin yoğun şekilde lokalize olduğu sıçan karaciğeri bu kısımda enzim kaynağı olarak kullanıldı ve karaciğer mikrozomlarının temini sağlandı. 10 Haftalık iki adet Albino Wistar dişi sıçan temin edilerek servikal dislokasyon yöntemiyle ötenazi işlemi uygulandı ve 14.51 g olan toplam karaciğer miktarı öncelikle çok az miktarda 250 mM sukroz / 5 mM HEPES (pH=7.4) tamponuyla yıkanarak kanı akıtılıp kurutma kağıdı ile kurularak -85°C 'de daha sonraki işlemler için derin dondurucuda beklemeye alındı.

Homojenizatör cihazı kullanılarak karaciğer, makasla küçük parçalara bölünüp tartım değerinin dört katı olacak şekilde 250 mM sukroz / 5 mM HEPES (pH=7.4) çözeltisi ilave edilerek buzlu ortamda 1700 g (1500 rpm)'de yaklaşık olarak 30 dk homojenize edildi. Bunun ardından, elde edilen homojenat 2 mL'lik ependorf tüplerine paylaştırılarak derin dondurucuda -85°C 'de saklandı. Daha sonra ADÜBİLTEM'de homojenat ultrasantrifüj cihazı kullanılarak 12000 g (10500 rpm)'de $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dk santrifüjlendi. Santrifüjden sonra çökelek atıldı ve geri kalan süpernatant 1 saat süre ile 105000 g (31500 rpm) $+4^{\circ}\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Bu işlem sonrasında elde edilen ve mikrozom çökeleği olan kısma ise, bulunduğu tüpün tartımının iki katı kadar çözünürleştirmeyi gerçekleştirmek için [0.2 M potasyum fosfat, 2 mM merkaptetanol, 0.4 % TritonX100 (pH = 7)] tamponundan ilave edilerek 30 dk buz banyosunda karıştırıldı ve yeniden 105000 g'de 1 saat santrifüjlendi. Santrifüj sonunda süpernatant ve çökelek ayrılıp derin dondurucuda saklandı. İkinci santrifüj işleminden sonra elde edilen sıvı kısmın hacmi 7.5 mL olarak bulundu ve ependorf tüpüne alınarak yeniden derin dondurucuya konuldu. Mikrozomal örnekleri içeren süpernatanttaki protein miktarı Bradford yöntemi ile hesaplandı [49]. Bu yöntemde kullanılan Bradford reaktifi 50 mL etanol içinde 40 mg Coomassie Brilliant Blue ve 55 mL % 88 w / v fosforik asit 1 L'ye tamamlanıp süzölmüştür. Standart olarak sığır serum albumini (SSA) kullanılmıştır. Standartlara ait protein konsantrasyonları 0.02, 0.05, 0.01, 0.12, 0.15, 0.20, 0.25 mg / 1 mL şeklindedir. Hazırlanan çözünür mikrozomal enzim preparatından 50, 100, 250 kat seyreltilerek farklı konsantrasyonda 3 ayrı örnek hazırlandı ve sırasıyla kör (blank), standartlara ve konsantrasyonları farklı hazırlanmış protein değeri bilinmeyen süpernatant içeren deney tüplerine 2'şer mL Bradford reaktifi ilave edilerek oda sıcaklığında 10 dk beklenildi ve E. Ü. Fen Fakültesi Biyokimya Bölümü'nde UV/VIS Spectrophotometer (V-530) cihazında 595 nm'de absorbans değerleri okunarak standartlara ilişkin konsantrasyon-absorbans değerleri arasında çizilen lineer grafikten örneklerle ait protein konsantrasyon değeri bulunup ortalama bir değer hesaplandı. Buna göre süpernatantın içerdiği protein değeri 8.22 mg / 1 mL'dir.

3.3 BLMG'nin Enzimatik Yöntemle Sentezi

0.151 g trishidroksimetan 23 mL suda çözüldü. pH 1 M HCl ile 8'e ayarlandı ve üzerine 0.016 g CaCl_2 eklendi. Ardından 0.0038 g DTT koyuldu ve 25 mL saf suyla tamamlanarak tris tamponu elde edildi. 0.0058 g UDPGA üzerine 5 mL tampon, 0.5 mL mikrozomal enzim ilave edilerek 10 dk 37°C 'de su banyosunda bekletildi. Daha sonra 2 mg BLM 1 mL DEMSO'da çözülerek su banyosundan alınan çözeltinin

üzerine ilave edildi. Bu karışım 18 saat 37 °C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı. Su banyosundan çıkarılan karışıma 0.5 mL asetonitril ilave edildi ve 2000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldı. Daha sonra sıvı faz alınıp ependorf tüplerine konuldu. Toplam 7 mL BLMG elde edildi.

3.4 İyod-131 (¹³¹I) ile İşaretleme Çalışmaları

3.4.1 İodojen Tüplerinin Hazırlanması

1 mg iodojen 1.5 cm yarıçaplı bir deney tüpü içerisinde 2 mL CH₂Cl₂ ile çözüldü. Her bir tüpte 50 µg iodojen olacak şekilde 20 tüpe dağıtıldı. Daha sonra tüpler ağzı açık şekilde +4 °C'de bekletilerek CH₂Cl₂'nin uçması sağlandı.

3.4.2 BLM'nin ¹³¹I ile İşaretlenmesi

BLM ve BLMG'nin ¹³¹I ile işaretlenip çeşitli kanserli hücre hatlarında incelenmesi için öncelikle optimum şartlar belirlendi. Bu optimum şartların sağlanması için önce farklı aktivite ve madde miktarları kullanılarak işaretleme çalışmaları yapıldı. Hücre kültürü çalışmaları için kullanılan işaretleme maddeleri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

- 5 µg (5 µL) BLM, 2.7 µL (5 µCi) Na¹³¹I ve 50 µL saf su iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 5 µCi/5 µg ¹³¹I-BLM elde edildi.
- 15 µg (15 µL) BLM ve 9 µL (15 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 15 µCi ¹³¹I-BLM elde edildi.
- 33 µg (33 µL) BLM ve 19 µL (33 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 33 µCi ¹³¹I-BLM elde edildi.
- 50 µg (50 µL) BLM ve 14 µL (50 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 50 µCi ¹³¹I-BLM elde edildi.
- 150 µg (150 µL) BLM ve 40 µL (150 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 50 µCi ¹³¹I-BLM elde edildi.

3.4.3 BLMG'nin ¹³¹I ile İşaretlenmesi

- 5 µg (120 µL) BLMG ve 1.4 µL (5 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 5 µCi ¹³¹I-BLMG elde edildi.
- 15 µg (360 µL) BLMG ve 4.2 µL (15 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 15 µCi ¹³¹I-BLMG elde edildi.
- 33 µg (800 µL) BLMG ve 8.4 µL (33 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 33 µCi ¹³¹I-BLMG elde edildi.
- 50 µg (1200 µL) BLMG ve 14 µL (50 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 50 µCi ¹³¹I-BLMG elde edildi.
- 150 µg (3600 µL) BLMG ve 40 µL (150 µCi) Na¹³¹I iodojen tüpü içerisine konularak 20 dk inkübasyona bırakıldı. Bu sürenin sonunda 150 µCi ¹³¹I-BLMG elde edildi.

3.5 İnaktif Bileşen İçin Yapılan HPLC Analizi

Çizelge 3.1 : İnaktif bileşenler için HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.

Kolon	EC 250 / 4,6 NUCLEODUR 100-5 C18 (250 × 4.6 mm I.D.) Analitik Kolon (Macherey- Nagel)
Akış hızı	1 mL/ dk
Dalga boyu	260 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C
Mobil faz	% 60 Asetonitril % 40 Su

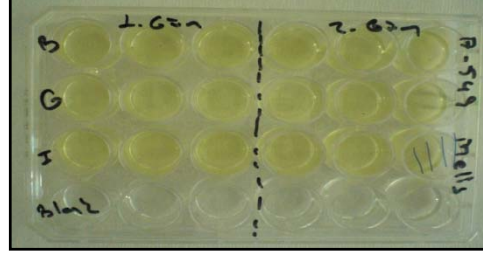
Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) çalışmaları düşük basınçlı LC-10Atvp dörtlü pompa ve (SPD-10AV)UV dedektörüne sahip olan Shimadzu marka HPLC cihazında yapılmıştır. Bu çalışmada uygulanan kromatografik koşullar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

3.6 İnce Tabaka Radyokromatografi (TLRC) Ölçümleri

Bu çalışmalarda 10 x 1.5 cm boyutlarında kesilen silika kaplı TLC tabakalar (Merck 5552) kullanılmıştır. İşaretili örnekler tabakanın altından 0.5 cm yukarıda olacak şekilde damlatılmış, damlatılan örnekler kuruduktan sonra örneğin uygulama noktası çözügene değmeyecek şekilde TLC tanklarına yerleştirilmiştir. Çözgen TLC kağıdının tepe noktasının 1 cm altına kadar yürütülerek TLC kağıtları tanktan çıkarılmış, kağıtlar kuruduktan sonra kontaminasyona karşı önü ve arkası izolabantla kaplanmıştır. Daha sonra TLC kağıtları belirli bir düzene göre gazlı dedektöre yerleştirilerek radyoaktiviteleri sayılmış ve radyoaktif maddenin taşındığı mesafe çözücünün ilerlediği mesafeye bölünerek R_f değerleri tespit edilmiştir. Sayım (cps) ve kat edilen mesafe değerleri grafiğe geçirilerek TLRC kromatogramları elde edilmiş ve bağlanma verimleri pik alanının sayımı toplam sayıya bölünerek hesaplanmıştır. Kalite kontrol çalışmalarında işaretili bileşiklerin bağlanma verimini elde etmek için deneyler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Kalite kontrol çalışmalarında BLM'e ait bağlanma verimleri TLRC-5 banyo sistemi kullanılarak hesaplanmış, BLMG'e ait bağlanma verimleri ise TLRC-7 banyo sistemi kullanılarak hesaplanmıştır.

3.7 ¹³¹I ile İşaretili BLM ve BLMG ile Yapılan Hücre Kültürü Çalışmaları

Yapılan hücre kültürü çalışmaları kapsamında ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin, insandan elde edilen PC-3 (prostat), Caco (kalın barsak), Hutu (ince barsak) ve A549 (akciğer) kanser hücrelerinin ekimi yapılarak hücre çalışmaları başlatılmıştır. Hücrelerin yeteri kadar çoğalması sağlandıktan sonra bu üç farklı hücre ayrı ayrı 24'lük flasklara ekilmiş ve her bir hücre hattı için iki paralel çalışma gerçekleştirebilmek üzere 2'şer flask kullanılmıştır. Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0.25 (W/V) tripsin-EDTA çözeltisi kullanılarak flasktan ayrılmış ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %10 DMSO içeren ortama konularak -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Radyoişaretili bileşiklerin hücre hatları üzerindeki inkorporasyonları *in vitro* olarak incelenmiş ve kanser hücreleri üzerindeki bağlanma verimleri hesaplanmıştır. Bağlanma veriminin en yüksek değerde olabilmesi için ilk olarak prostat kanser hücre hattı üzerinde optimum çalışma şartları belirlenmiş ve bunun için sırasıyla zaman, madde miktarı ve spesifik aktivite parametreleri incelenmiştir.



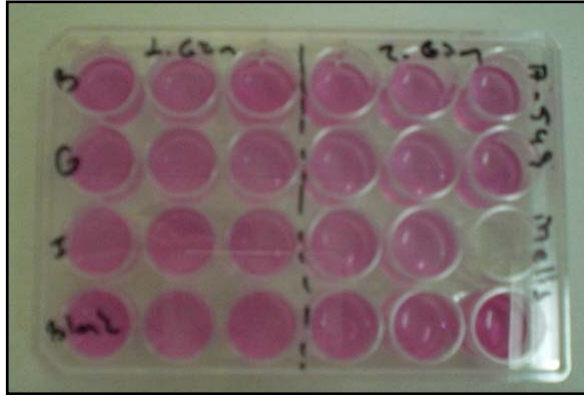
Şekil 3.1 : Kanserli hücreler üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamanla değişimi çalışmasında kullanılan hücre plakası.

3.7.1 Hücre Dizimleri

Çalışmada kullanılan PC-3 prostat (karsinoma) epiteli, A-549 karaciğer (karsinoma) epiteli Ege Üniversitesi Biyomühendislik Fakültesinden, Caco-2 kolon (adenokarsinoma) epiteli, Hutu-80 ince barsak (adenokarsinoma) epiteli American Type Culture Collection (Rockville, MD, ABD)'den temin edilmiştir.

PC-3 hücreleri Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum piruvat ve %5 fetal sığır serum (FSS)'den oluşan medyumda, A-549 hücreleri Dulbecco's MEM, 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 1 mM sodyum piruvat ve %10 fetal sığır serum (FSS)'den oluşan medyumda, Caco-2 hücreleri Minimum essential medium (Eagle), 2 nM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 1mM sodyum piruvat ve %20 fetal sığır serum (FSS)'den oluşan medyumda; Hutu-80 hücreleri, minimum essential medium (Eagle), 2 mM glutamin, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 nM non-esensiyel amino asitler, 1 mM sodyum piruvat ve %10 fetal sığır serum (FSS)'den oluşan medyumda üretildi.

Tüm hücreler flaskları %80 kaplayacak kadar üretildikten sonra %0.25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu aracılığı ile flasktan ayrılarak çalışmaların yapılacağı 24 kuyucuklu plakalara ekildi ve çalışmada kullanılmayacak olan hücreler %5 DMSO içeren medyumların içine konularak -80°C de dondurulup, -190°C sıvı azot içinde saklandı.

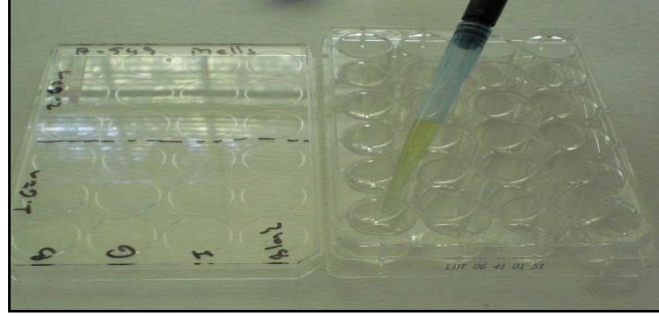


Şekil 3.2 : Üzerinde Besiyeri Bulunan Hücre Plakası

3.7.2 ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in PC-3 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi

Hücre çalışmalarında ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG kısım 3.4'de belirtilen yöntemle göre hazırlanarak kalite kontrol işlemleri tamamlandıktan sonra kullanıma hazır hale getirilmiştir. Radyoişaretli bileşiklerin hücre hatları üzerindeki bağlanma verimleri zaman (30 dk., 60 dk., 120 dk.) parametresi denenerek bulunmuştur. Radyo işaretli bileşikler hücre ekili flasklara uygulanmadan önce 0.5 mL SF ile yıkanmış ve böylece ortamda bulunabilecek ölü hücreler temizlenmiştir. Daha sonra kuyucuk başına $3\mu\text{g}$ - $3\mu\text{Ci}$ denk gelecek şekilde radyoişaretli bileşikler hazırlanmış, kullanılan 24'lük flasklara ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve saf iyod kuyucuk başına 0.5 mL besi ortamı ile karıştırılarak her bir kuyucuğa tek tek uygulanmıştır. Radyoişaretli bileşiklerin kanserli hüclere uygulanmasından sonra hücreler 37°C 'de belirlenen zamanlarda etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda hücrelerin üzerinde bulunan işaretli ortamlar vakumlu pompa yardımıyla çekilip 0.5'er mL SF ile yıkanmış ve 0.2'şer mL ripa her bir kuyucuğa ilave edilerek hücreleri yapışık buldukları flasktan kaldırmak için kuyucukların kazıma işlemine geçilmiştir. Bütün kuyucuklar kazındıktan sonra hücrelerin yüzeye çıkması sağlanmış ve daha sonra her bir kuyucukdaki hücreler mikropipetle çekilerek numaralandırılmış ependorflara sırasıyla konulmuştur. Bu ependorfların her birinden 0.1 mL alınarak protein tayini için başka ependorflara sırasıyla konulmuş ve buzdolabında $+4^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır. Diğer ependorflarda kalan hücrelere ise 0.9 mL sintilasyon sıvısı eklenerek sintilasyon dedektöründe sayımları alınmıştır. Ayrıca, her bir parametre seviyesi için elde edilen % bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup

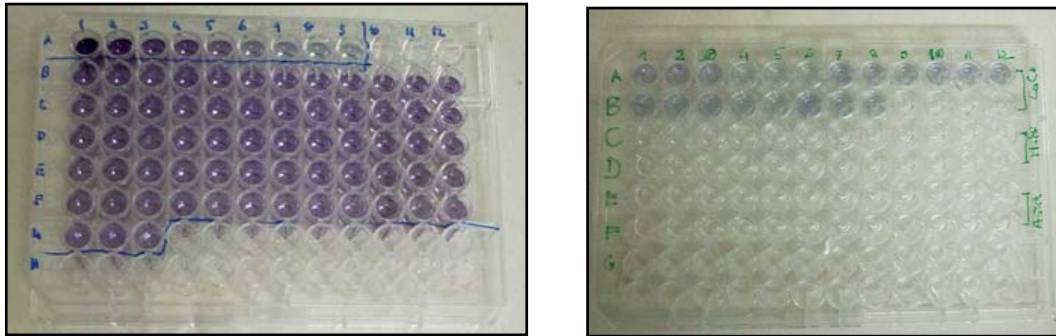
olmadığını belirlemek için tek yönlü varyans analizi yapılmıştır. Üzerinde çalışılan hücre plakaları ve radyoşaretli bileşiklerin hücre kültürüne uygulanması sırasıyla Şekil 3.2 ve 3.3'te gösterilmiştir.



Şekil 3.3 : Radyoşaretli Bileşiğin Hücre Kültürüne Uygulanması

3.7.3 ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I'in PC-3 Hücreleri için Yapılan Protein Tayini

Her bir kuyucukta bulunan 10^5 hücre/mL için yapılan protein tayinin amacı, hücrelere radyoşaretli bileşik uygulandıktan sonra kuyucuklarda bulunan hücre konsantrasyonunun değerini ve hücre başına düşen spesifik aktivite miktarını tespit etmektir. SSA (Sığır Serum Albumin) stoğundan alınan 3 farklı miktarlardaki standartlara gerekli seyreltmeler yapılarak 9 tane albumin standardı oluşturuldu. Kullanılan 96'lık plakanın ilk 9 kuyucuğuna bu standartlar 25'er μ L pipetlendi. Diğer kuyucuklara ise hücre örneklerinden 25'er μ L koyuldu. Daha sonra standartların ve hücre örneklerinin üzerlerine BCATM Protein Assay kitleri kullanılarak hazırlanan karışımdan 200'er μ L her bir kuyucuğa ilave edildi (Şekil 3.4). Kuyucuklarda bulunan hücre konsantrasyonu 462 nm de spektrofotometre ile ölçüldü.



Şekil 3.4 : BCATM Protein Kitlerinin Hücelere Uygulanması

3.7.4 ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Madde Miktarının Etkisi

Zaman parametresi deneyinin sonucuna göre optimum süre 120 dk olarak belirlendi. Sintilasyon dedektörü ile yapılan sayım sonuçlarına göre hücrelerdeki en iyi aktif madde tutulumunun 120 dk sonunda olduğu belirlenmiştir. Bu sonucun doğrultusunda madde miktarı ve spesifik aktivite parametrelerinin gerçekleşme süresi de 120 dk olacaktır. Bu çalışmada kuyucuk başına 1-3-10-30 µg ve 1-3-10-30 µCi aktivite gelecek şekilde işaretlemeler yapıp prostat kanser hücrelerine 120 dk süresince uygulanmıştır. Sonrasındaki prosedür zaman parametresinde olduğu gibi aynen uygulanmıştır. Bu parametrenin sonunda yine protein tayini yapılmış ve kuyucuklarda bulunan hücre konsantrasyonları belirlenmiştir.

3.7.5 ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Aktivite Miktarının Etkisi

Madde miktarı parametresi deneyinin sonucu kuyucuk başına 3 µg olarak belirlenmiş ve spesifik aktivite parametresi deneyi de kuyucuk başına 3 µg madde kullanılarak, kuyucuk başına 1-3-10-30 ve 100 µCi aktivitelerle ayrı ayrı işaretlemeler yapılarak kanserli hücrelere uygulanmıştır. Uygulama prosedürü yukarıda belirtildiği gibi aynen gerçekleştirilmiştir.

3.7.6 ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin A-549 (Akciğer), Caco (kalın barsak) ve HuTu-80 (ince barsak) Hücre Hatlarına Uygulanması

¹³¹I ile işaretli BLM ve BLMG bileşikleri belirlenen optimum koşullarda sırasıyla PC-3 (Prostat), A-549 (Akciğer), Caco (kalın barsak) ve HuTu-80 (ince barsak) hücrelerine uygulanmıştır. Uygulanan optimum koşullar Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 : PC-3 (Prostat), A-549 (Akciğer), Caco (kalın barsak) ve HuTu-80 (ince barsak) hücreleriyle yapılan çalışmalarda kullanılan optimum koşullar

Optimum Koşullar		
Zaman	Madde Miktarı	Aktivite
120 dk	3 µg	1 µCi

3.8 BLM ve BLMG'nin FITC (Fluorescein İsothiocyanate) ile Görüntüleme Çalışması

İlk olarak 0.1 M sodyum karbonat tamponu (pH=9) içinde 2 mg/mL protein solüsyonu hazırlandı. FITC, susuz DMSO'da 1mg/mL olacak şekilde çözüldü. Her 1 mL protein solüsyonuna 50 µL FITC solüsyonu eklendi. 1 mg/mL BLM ve BLMG maddelerinden alınan örnekler 5 µL'lik hacimlerde karanlık ortamda FITC karışımına yavaş yavaş ve karıştırılarak eklendi. Bu işlemlerden sonra hazırlanan FITC'li bileşikler +4 °C'de 8 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra 50 mM NH₄Cl ilave edilerek 2 saat +4 °C'de inkübe edildi. Daha sonra bileşiklere bağlanmayan FITC moleküllerini ortamdan uzaklaştırmak için Sephadex G-25 kolon dolgu maddesi kullanarak örnekler kolondan geçirildi. Böylece ortamdaki bağlanmayan FITC'ler uzaklaştırılmış oldu. İki farklı petri kabında bulunan PC-3 hücrelerinin üzerindeki besi ortamı atıldıktan sonra (PBS) ile 3 kez yıkandı daha sonra FITC işaretli örnekler petri kabındaki hücrelere uygulandı. 120 dk 37°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda FITC işaretli örnekler hücrelerin üzerinden alındı. Hücreler PBS ile yıkandı. Son olarak da FITC işaretli örneklerin bağlandığı hücreler, Adnan Menderes Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde (ADÜBİLTEM) floresan mikroskopu altında incelendi.

3.9 BLM ve BLM-G' nin PC-3 Kanser Hücre Hattı Üzerindeki Sitotoksitelerinin İncelenmesi

BLM ve BLMG örneklerinden alınan 25'er µM miktarlar ile PC-3 hücrelerinde toksisite tayini yapılmıştır. Plakada bulunan her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ekilerek hücre sayısı 10⁵ hücre/mL olacak şekilde ekim yapıldı. BLM ve BLMG örneklerinden 25000 nM, 10000 nM, 1000nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3nM ve 1nM olmak üzere 8 farklı konsantrasyonlarda çalışıldı. Hücre süspansiyonu, 96 kuyucuklu mikropalakalarda her bir kuyucuğa 1 x 10⁶ hücre / mL olarak hazırlandı.

Her bir kuyucuğa 100 µL hücre süspansiyonu ve kontrol dışındaki kuyucuklara sekiz farklı konsantrasyonda BLM ve BLMG eklendi. Negatif kontrol olarak hücre ve reaktif içermeyen besi yeri kullanıldı. Çalışmada her bir parametre üçer tekrarlı olarak çalışıldı. Hücreler 37 °C'de % 5 CO₂ ortamında inkübe edildi. 48. saatte her kuyucuğa 10 µL (WST) solüsyonu eklendi ve 4 saat inkübe edildi. Her 30 dk'da bir 450-690 nm dalga boyu aralığında her bir kuyucuğun absorbans değeri (A), spektrofotometre kullanılarak okundu. Negatif kontrol sıfır absorbans olarak kabul edildi.

3.10 İstatistiksel Analizler

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların istatistiksel analizleri GraphPad istatistik programı kullanılarak yapıldı. Her bir parametre için iki ayrı deneme ve toplam 6 tekrar yapılmış olup, ortalama bağlanma değerleri ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Her bir parametre için elde edilen bağlanma değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olup olmadığını tespit etmek için tek yönlü ANOVA analizi yapılmıştır. ¹³¹I'in farklı spesifik aktivite miktarlarının yüzde bağlanma verimlerinin tespit edilmesi için lineer regresyon analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarının değerlendirilmesi, bağlanma değerleri arasında 0.95 güven düzeyinde anlamlı bir farkın olup olmadığı P değerlerine bakılarak anlaşılmış olup, P değeri 0.05'den küçük olanlar anlamlı kabul edilmiştir.

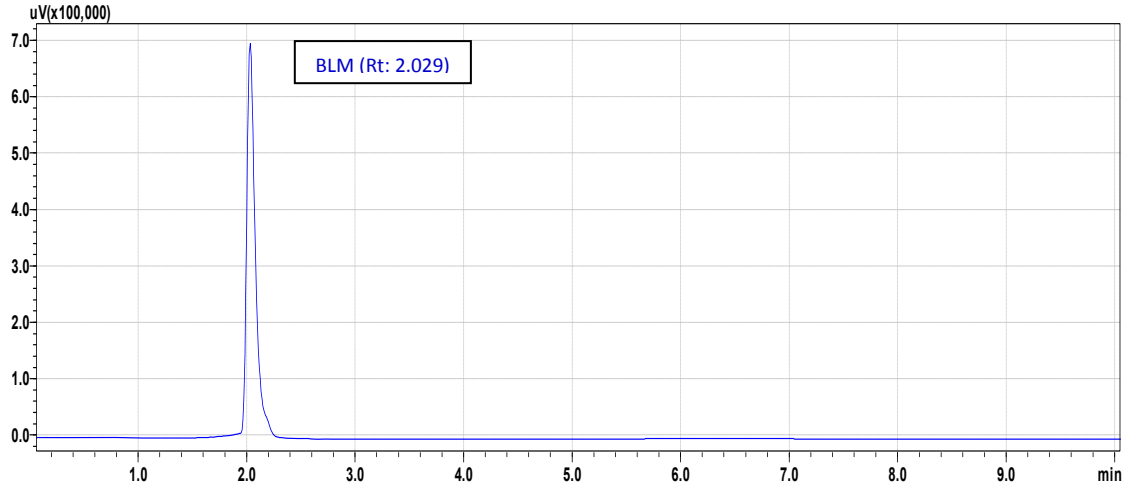
4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 BLM ve BLMG'e ait HPLC Sonuçları

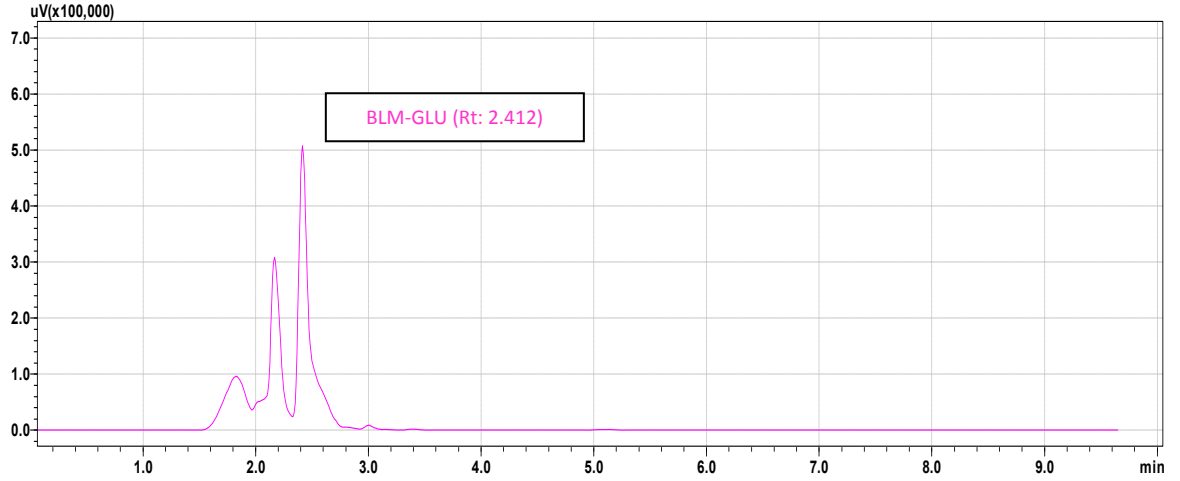
BLM ve BLMG kullanılarak yapılan HPLC çalışmalarında kullanılan kromatografik koşullar ve elde edilen kromatogramlar sırasıyla Çizelge 4.1, Şekil 4.2 ve 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 : HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.

Kolon	EC 250 / 4,6 NUCLEODUR 100-5 C18 (250 × 4.6 mm I.D.) Analitik Kolon (Macherey- Nagel)
Akış hızı	1 mL/ dk
Dalga boyu	260 nm
Kolon sıcaklığı	25 °C
Mobil faz	% 60 Asetonitril % 40 Su



Şekil 4.1 :BLM'e ait HPLC kromatogramı.

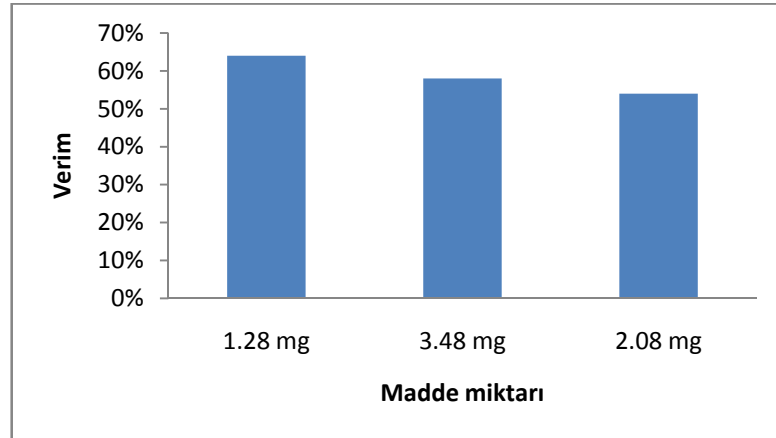


Şekil 4.2 : BLMG'e ait HPLC kromatogramı.

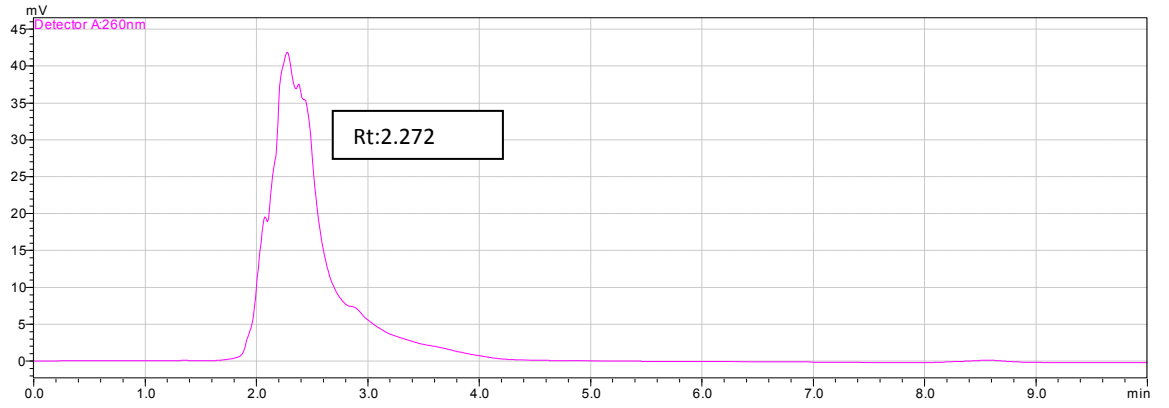
Yapılan HPLC çalışmalarından elde edilen tüm kromatogramlar 260 nm'de UV dedektörü kullanılarak elde edilmiştir. BLM ve BLMG'in R_t değerleri sırasıyla 2.029 dk ve 2.412 dk olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada BLMG'e ait kromatogramda 3 pik elde edilmiştir. Bu pikler BLM piki ile karşılaştırıldığında BLMG'nin ortamda farklı glukuronid türevleri şeklinde olduğu söylenebilir.

4.2. Enzimatik Yöntemle Sentezlenen BLMG'nin HPLC Kromatografik Yöntemi İle Saflaştırma İşlemi

Deneysel çalışmamız sırasında 3 farklı zamanda BLMG sentezi yapılmıştır. Yola çıkılan madde miktarları sırasıyla ; 2 mg, 6 mg ve 3 mg dir. Sentez ürünü olan BLMG, HPLC kromatografik yöntemi ile saflaştırılmıştır. Yapılan saflaştırmalar sonucu elde edilen Verim-Madde miktarı grafiği Şekil 4.3 de, elde edilen HPLC kromatogramı da Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.3 : Saflaştırılan BLMG madde miktarı/yüzde verim grafiği



Şekil 4.4 : Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen saf BLMG kromatogramı

4.3 İnce Tabaka Radyokromatografi (TLRC) Sonuçları

TLRC çalışmalarında kullanılan banyolar Çizelge 4.2’de verilmiştir. İşaretli bileşiklere (^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG) ve radyoaktif bileşenlere ($^{131}\text{I}^+$ ve $^{131}\text{I}^-$) ait R_f değerleri Çizelge 4.3’de ve elde edilen radyokromatogramlar ise sırasıyla Şekil 4.5-4.10 arasında verilmiştir.

Çizelge 4.2 : Kalite kontrol çalışmalarında kullanılan TLRC banyoları.

TLRC 1	n-bütanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$)–Etil Alkol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)–Amonyum Hidroksit (0,2N NH_4OH)(5:2:1)
TLRC 2	Sitrat Tamponu (Sitrik Asit Mono Hidrat) %100 (10mM) pH:6
TLRC 3	n-bütanol ($\text{C}_4\text{H}_9\text{OH}$)–Su (H_2O)–Asetik Asit (CH_3COOH)(4:2:1)
TLRC 4	İzopropil alkol($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$)- n bütanol – 0.2 N Amonyum Hidroksit (NH_4OH) (2:1:1)

Çizelge 4.3 : İşaretili bileşiklere ve radyoaktif bileşenlere ait R_f değerleri

R_f				
Banyo Çözeltilisi	^{131}I -BLM	^{131}I -BLMG	$^{131}\text{I}^+$	$^{131}\text{I}^-$
TLRC 1	0.860	0.854	0.894	0.497
TLRC 2	0.285	0.423	0.914	0.913
TLRC 3	0.611	0.932	0.954	0.183
TLRC 4	0.573	0.954	0.064	0.688

Çizelge 4.3'de verilen R_f değerleri incelendiğinde TLRC-1'de ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG' e ait R_f değerlerinin birbirleriyle çakıştıkları, TLRC-3'de ise $^{131}\text{I}^+$ ve ^{131}I -BLMG'in R_f değerlerinin çakıştıkları görülmektedir. TLRC-2'de $^{131}\text{I}^+$ ve $^{131}\text{I}^-$ 'nin R_f değerlerinin çakışmasına karşın Çizelge 4.4'de verilen farklı miktar ve aktiviteler için hesaplanan ^{131}I -BLM'nin bağlanma verimlerinin % 60-100 aralığında değiştiği, TLRC-4'de ise $^{131}\text{I}^+$ ve $^{131}\text{I}^-$ R_f değerlerinin birbirinden farklı olduğu ve ^{131}I -BLMG'nin bağlanma verimlerinin Çizelge 4.5'de görüldüğü gibi %60-100 aralığında değerler aldığı gözlenmiştir. Bütün bu radyokromatografik çalışmaların sonucu olarak, TLRC-2 banyosunun ^{131}I -BLM, TLRC-4 banyosunun da ^{131}I -BLMG için en uygun banyo sistemleri olduğu belirlenmiş ve bundan sonra yapılacak olan tüm TLRC çalışmalarında her iki işaretili bileşik için bu banyoların kullanılmasına karar verilmiştir. Şekil 4.11 ve 4.12'de ise işaretili bileşiklere ait % ortalama bağlanma verim grafikleri verilmiştir.

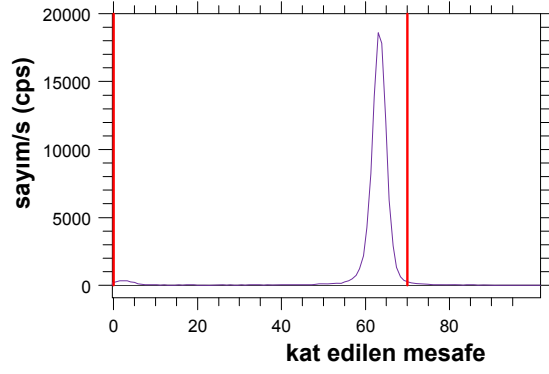
TLRC kromatogramlarından yararlanılarak işaretili bileşiğe ilişkin pikin toplam alanına karşılık gelen sayımlar, toplam sayıma bölünerek bağlanma verimleri hesaplanmıştır. Bağlanma verimleri (n=9) ortalamaları alınarak ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin farklı miktar ve farklı aktivite değerleri için hesaplanmıştır.

Çizelge 4.4 : ^{131}I -BLM'in farklı miktar ve aktiviteleri için ortama bağlanma verimleri ile standart sapmaları

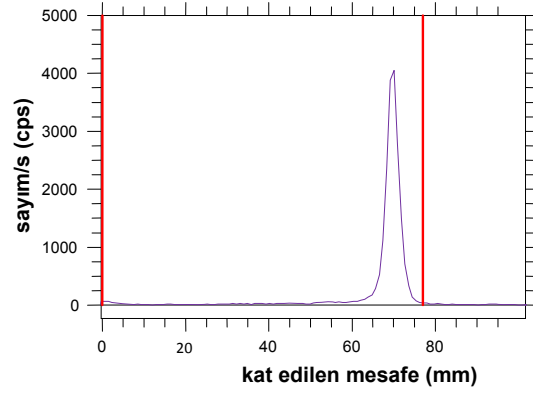
Madde Miktarı ve radyoaktivite	% Bağlanma Verimi ^{131}I -BLM (TLRC-2)				Std sapma
	n=3	n=3	n=3	ort	
5 μg -5 μCi	82	77	90	83	6.5
15 μg -15 μCi	80	78	79	79	1
33 μg -33 μCi	100	86	95	96	7
50 μg -50 μCi	68	76	72	72	4
150 μg -150 μCi	62	73	68	68	5

Çizelge 4.5 : ^{131}I -BLMG'in farklı miktar ve aktiviteleri için ortama bağlanma verimleri ile standart sapmaları

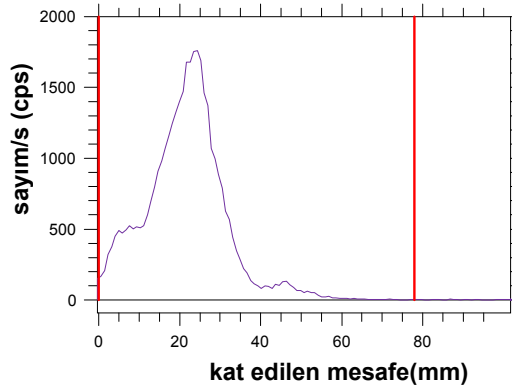
Madde Miktarı ve radyoaktivite	% Bağlanma Verimi ^{131}I -BLMG (TLRC-4)				Std sapma
	n=3	n=3	n=3	ort	
5 μg -5 μCi	100	79	89	89	10
15 μg -15 μCi	78	72	70	73	4
33 μg -33 μCi	68	68	70	68	1
50 μg -50 μCi	81	78	80	79	2
150 μg -150 μCi	59	76	63	66	8



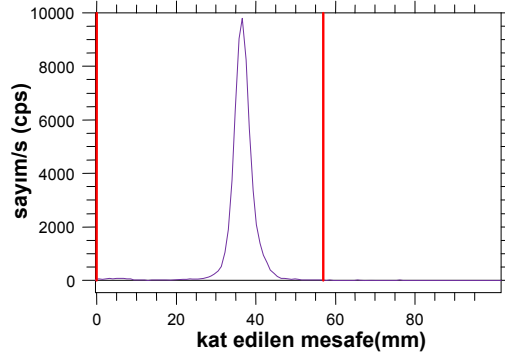
Şekil 4.5 : Na¹³¹I'in TLRC-2 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı



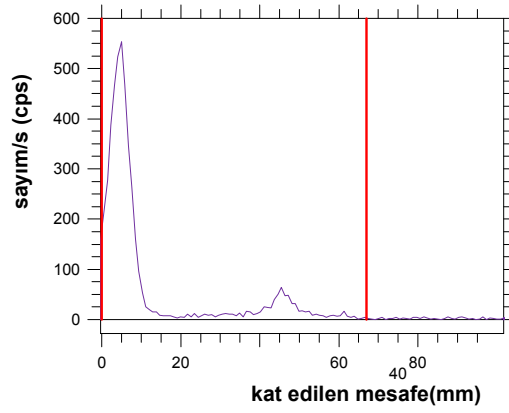
Şekil 4.6 : ¹³¹I⁺'in (yükseltgenmiş iyod) TLRC-2 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı



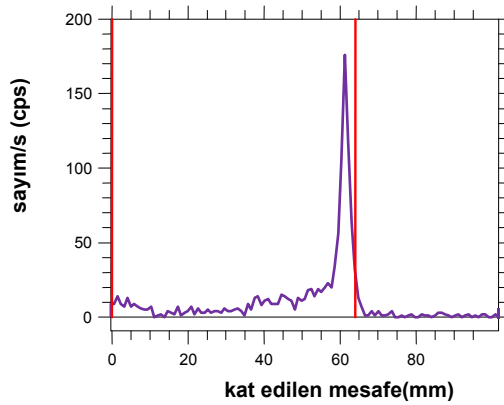
Şekil 4.7 : ¹³¹I-BLM'in TLRC-2 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı



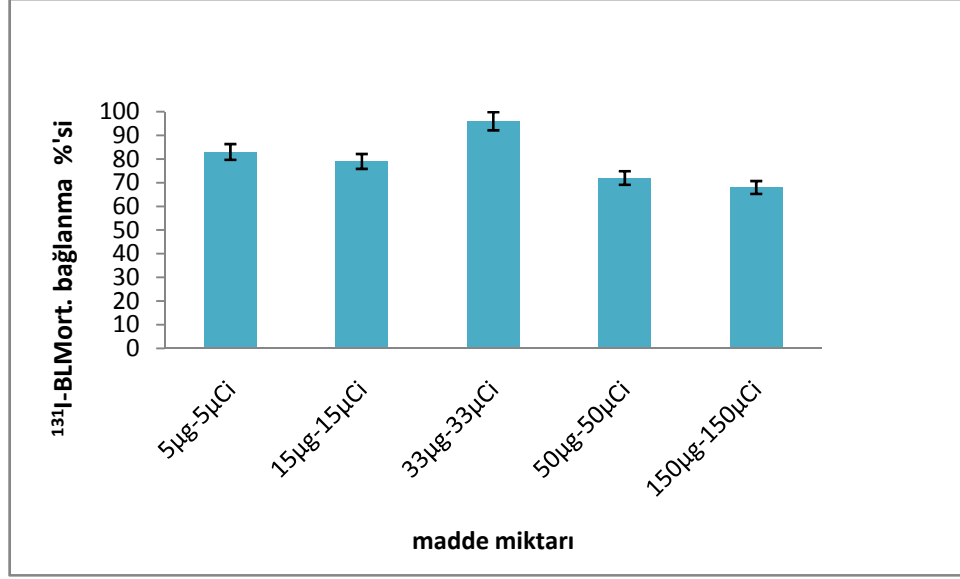
Şekil 4.8 : Na¹³¹I'in TLRC-4 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı.



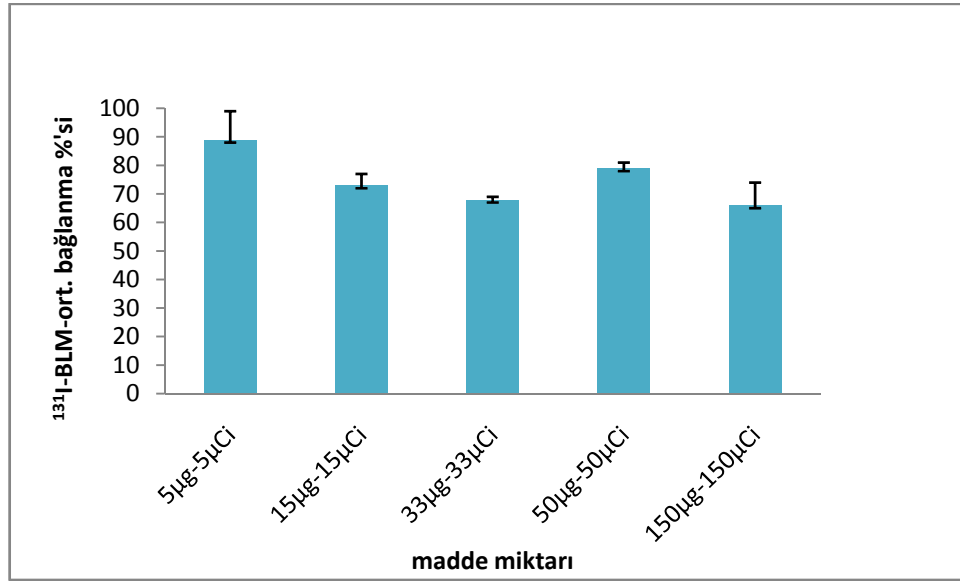
Şekil 4.9 : ¹³¹I⁺'in (yükseltgenmiş iyod) TLRC-4 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı.



Şekil 4.10 : ¹³¹I-BLMG'in TLRC-2 banyosu kullanılarak elde edilen radyokromatogramı



Şekil 4.11 : ¹³¹I-BLM'in TLRC-2 banyosu kullanılarak elde edilen ortalama verim grafiği

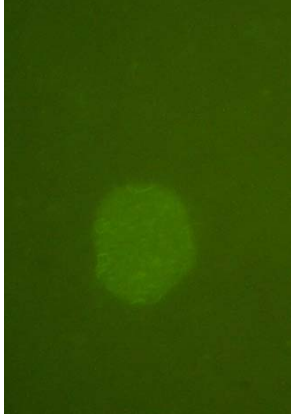


Şekil 4.12 : ¹³¹I-BLMG 'in TLRC-4 banyosu kullanılarak elde edilen ortalama verim grafiği

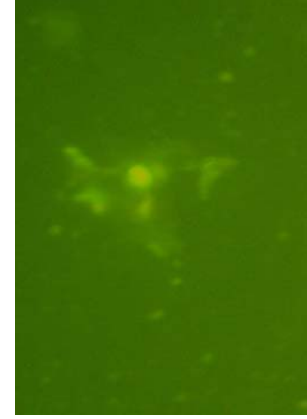
4.4. BLM ve BLMG'nin FITC (Fluorescein İsothiocyanate) ile Yapılan Görüntüleme Çalışmalarının Sonuçları

FITC (fluorescein isothiocyanate) ile işaretlenen BLM ve BLMG bileşiklerinin PC-3 hücreleriyle yaptığı inkorporasyon görüntüleri floresan mikroskop altında incelenmiştir. Bu incelemelerde, FITC-BLM ve FITC-BLMG bağlı floresan maddelerin bağlandığı hücrelere 10x ve 100x optik zoom yapılarak görüntüler

alınmıştır. Alınan görüntüler sırasıyla Şekil 4.13 ve 4.14'de verilmiştir. Bu görüntüler incelendiğinde her iki bileşimde PC-3 hücrelerindeki tutulumlarının gerçekleştiği net olarak görülmektedir.



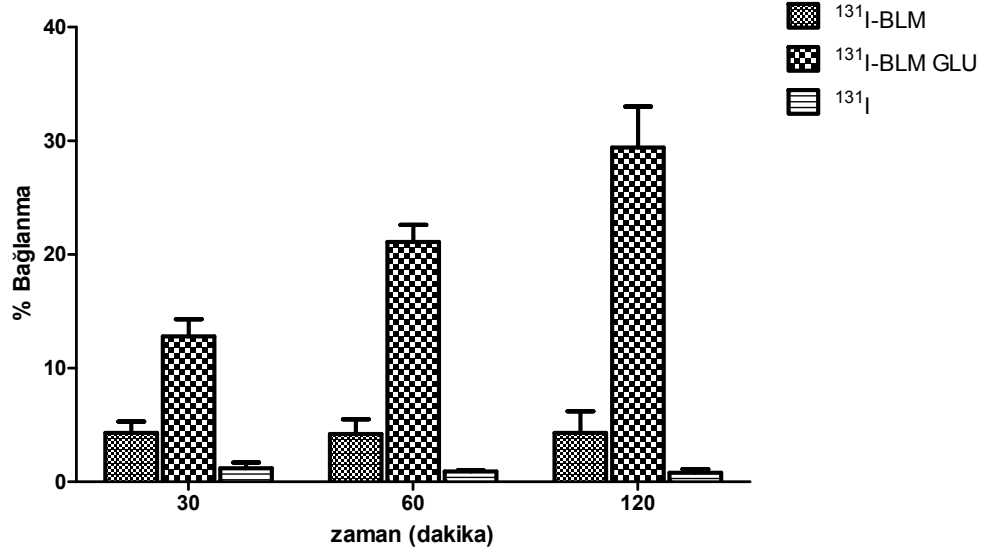
Şekil 4.13 : FITC işaretli BLM'nin PC-3 hücrelerindeki 100x büyütülmüş alınan inkorporasyon görüntüsü



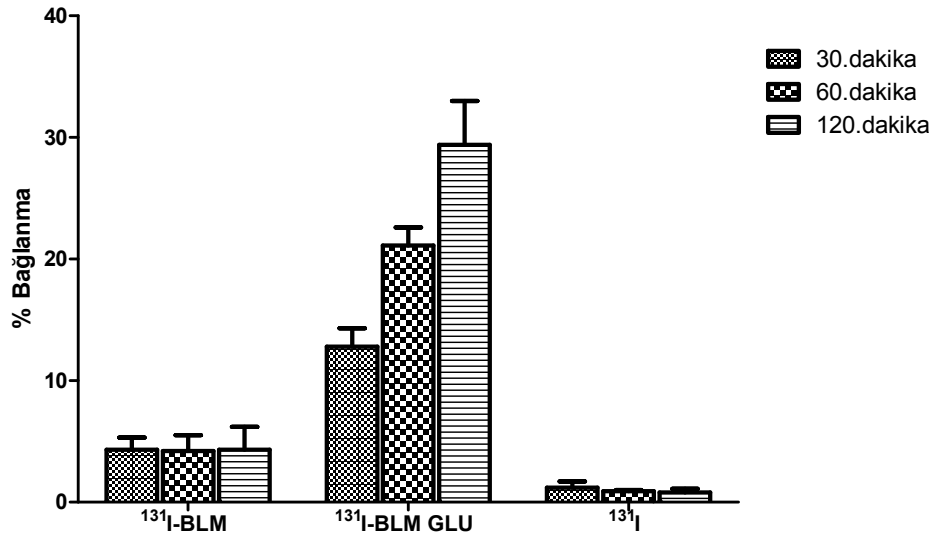
Şekil 4.14 : FITC işaretli BLMG'nin PC-3 hücrelerindeki 10x büyütülmüş alınan inkorporasyon görüntüsü

4.5 ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in PC-3 Hücrelerindeki Bağlanma Etkinliğinin Zamanla Değişimi

^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in 30, 60 ve 120. dk'larda PC-3 hücrelerindeki bağlanma %'leri Şekil 4.15 de verilmiştir. Şekil 4.15 incelendiğinde ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin PC-3 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ^{131}I 'e göre incelenen üç zaman aralığında da daha yüksek değer aldığı görülmektedir. ^{131}I -BLMG'nin bağlanma yüzdesinin en yüksek olduğu süre 120 dk olarak bulunmuştur. ^{131}I -BLM ve ^{131}I 'in yüzde bağlanma oranlarının 30, 60 ve 120. dk'larda birbirlerine çok yakın olduğu ve istatistiksel olarak aralarında anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir ($P>0.05$). ^{131}I -BLMG'nin ise 30, 60 ve 120. dk'lardaki yüzde bağlanma oranları karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($P<0.05$). Şekil 4.16'da ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in kendi içlerinde gruplandırılarak belirlenen tüm sürelerde gösterdikleri bağlanma %'leri verilmiştir.



Şekil 4.15 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I' in 30, 60 ve 120. dklarda PC-3 hücrelerine bağlanma oranları.



Şekil 4.16 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I' in kendi içlerinde gruplandırılarak PC-3 hücrelerinde tüm sürelerde gösterdikleri bağlanma oranları.

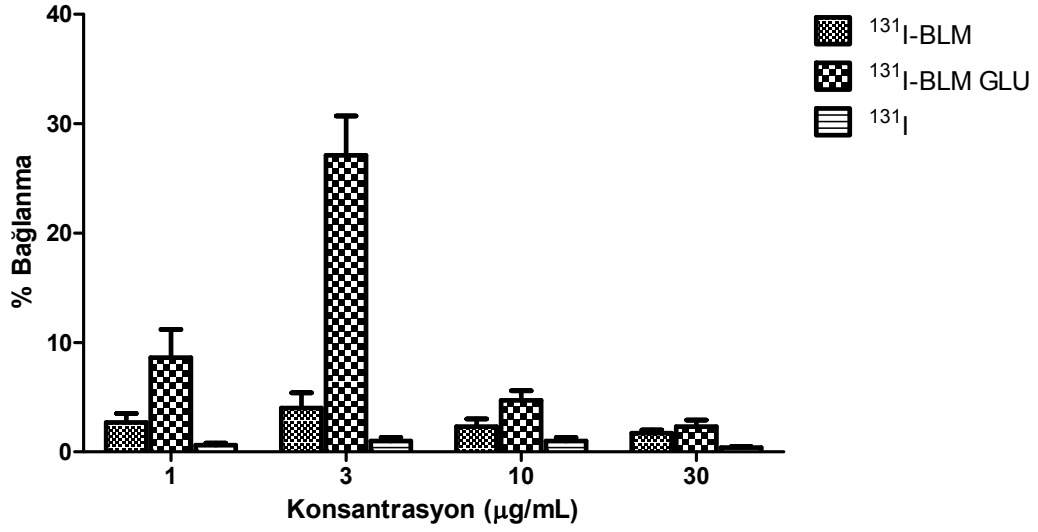
Çizelge 4.6 : ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 30, 60 ve 120. dakikalarda PC-3 hücrelerine bağlanma yüzdeleri.

Zaman	^{131}I -BLM	^{131}I -BLMG	^{131}I
30.dakika	%4.3±1	%12.8±1.5	%1.2±0.5
60.dakika	%4.2±1.3	%21.1±1.5	%0.9±0.1
120.dakika	%4.3±1.9	%29.4±3.6	%0.8±0.3

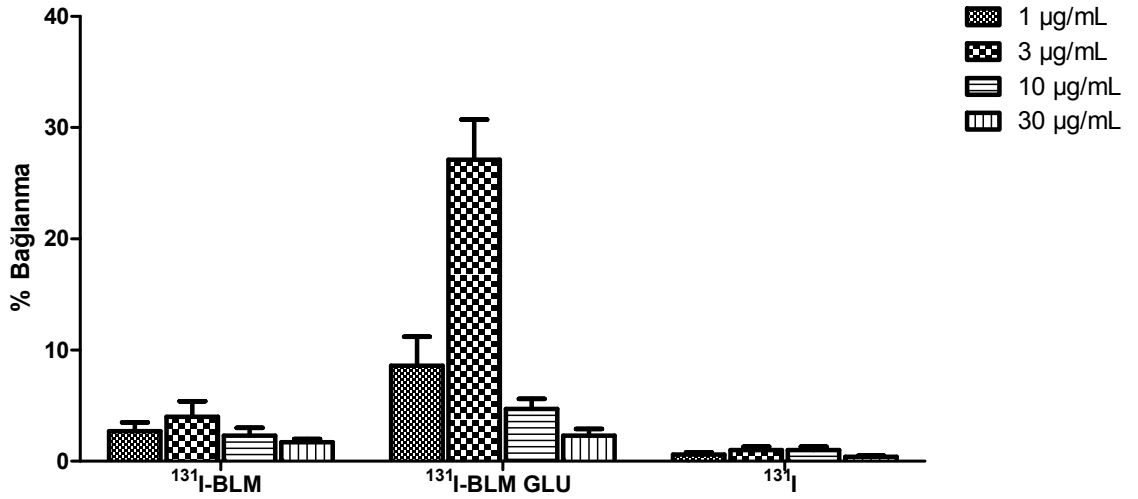
Çizelge 4.6'da görüldüğü gibi ^{131}I -BLM ve ^{131}I 'in tüm sürelerde bağlanma oranlarında hemen hemen bir farklılık görülmezken, ^{131}I -BLMG'nin en fazla bağlanma gösterdiği sürenin 120.dk olduğu görülmektedir.

4.6. ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG'in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Madde Miktarının Etkisi

^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 1, 3, 10 ve 30 μg madde miktarları kullanılarak elde edilen PC-3 hücrelerindeki bağlanma %'leri Şekil 4.17'de verilmiştir. Şekil 4.17 incelendiğinde ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin PC-3 hücreleri üzerindeki bağlanma etkinliğinin ^{131}I 'e göre incelenen madde miktarlarında daha yüksek değer aldığı görülmektedir. ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin bağlanma yüzdesinin en yüksek olduğu madde miktarı 3 μg olarak bulunmuştur. ^{131}I -BLM'nin bağlanma oranları arasında sadece 3 μg , 10 μg ve 30 μg madde miktarlarındaki bağlanma oranlarında anlamlı bir fark görülmüştür ($P<0.05$). ^{131}I -BLMG'nin bağlanma oranları incelendiğinde ise 10 ve 30 μg madde miktarlarındaki bağlanmalarda anlamlı bir fark görülmezken ($P>0.05$) diğer madde miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür ($P<0.05$). Şekil 4.18'de ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in kendi içlerinde gruplandırılarak belirlenen tüm madde miktarlarında gösterdikleri bağlanma %'leri verilmiştir. ^{131}I 'in eşdeğer dozlarında hiçbir grupta istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($P>0.05$). Çizelge 4.7'de ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 1, 3, 10, 30 μg madde miktarlarında PC-3 hücrelerine bağlanma yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 4.17 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I' in tüm madde miktarlarındaki bağlanma oranları.



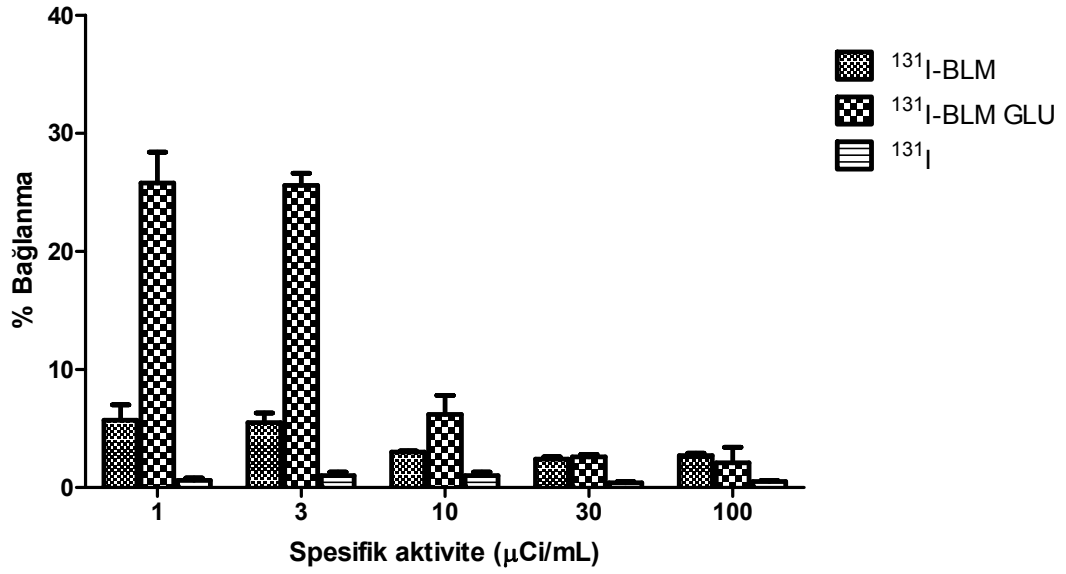
Şekil 4.18 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I' in kendi içlerinde gruplandırılarak tüm madde miktarlarında gösterdikleri bağlanma oranları.

Çizelge 4.7 : ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 1,3,10,30 μg madde miktarlarında PC-3 hücrelerine bağlanma yüzdeleri.

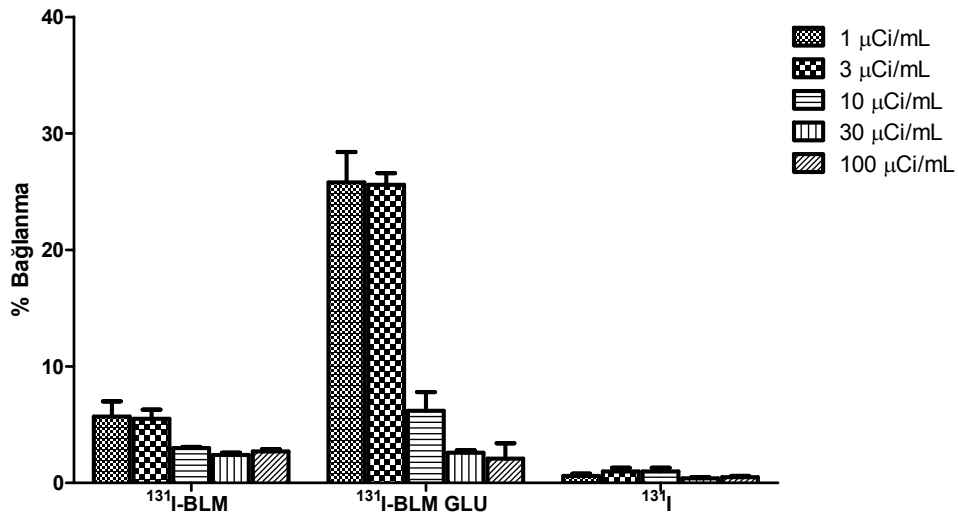
Madde miktarı	^{131}I -BLM	^{131}I -BLMG	^{131}I
1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	%2.7 \pm 0.8	%8.6 \pm 2.6	%0.6 \pm 0.2
3 $\mu\text{g}/\text{mL}$	%4.0 \pm 1.4	%27.1 \pm 3.6	%1.0 \pm 0.3
10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	%2.3 \pm 0.7	%4.7 \pm 0.9	%1.0 \pm 0.3
30 $\mu\text{g}/\text{mL}$	%1.7 \pm 0.3	%2.3 \pm 0.6	%0.4 \pm 0.1

4.7. ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG'in PC-3 Hücrelerine Bağlanma Etkinliğine Aktivite Miktarının Etkisi

^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve 1, 3, 10, 30 ve 100 μCi 'lik aktivitelerde PC-3 hücrelerindeki bağlanma %'leri Şekil 4.18 de verilmiştir. Şekil 4.18 incelendiğinde ^{131}I -BLM ve BLMG için yalnızca 1 ve 3 μCi 'lik dozlarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenememiştir ($P>0.05$). ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin bağlanma oranları arasında en fazla bağlanmanın 3 μCi 'lik aktivitede olduğu görülmüştür. ^{131}I 'in ise farklı dozları arasındaki bağlanma yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($P>0.05$). Şekil 4.19'da ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I 'in kendi içlerinde gruplandırılarak tüm aktivite miktarlarında gösterdikleri bağlanma oranları verilmiştir. Çizelge 4.8'de ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 1,3,10,30 ve 100 μCi 'lik aktivite miktarlarında PC-3 hücrelerine bağlanma yüzdeleri verilmiştir.



Şekil 4.19 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I'in tüm spesifik aktivite miktarlarında gösterdikleri bağlanma oranları.

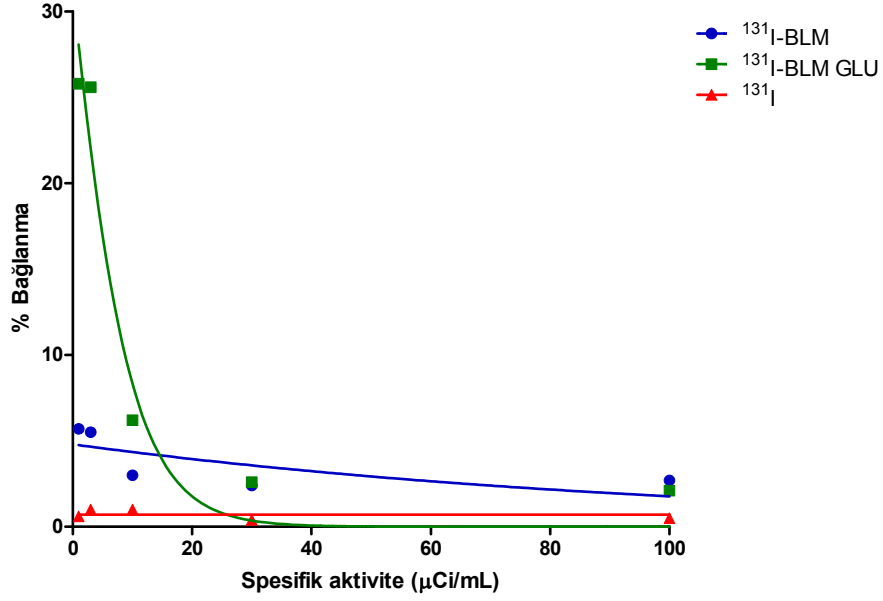


Şekil 4.20 : ¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I' in kendi içlerinde gruplandırılarak tüm spesifik aktivite miktarlarında gösterdikleri bağlanma oranları.

Çizelge 4.8 : ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in 1, 3, 10, 30 ve 100 μCi 'lik aktivite miktarlarında PC-3 hücrelerine bağlanma yüzdeleri.

Aktivite	^{131}I -BLM	^{131}I -BLMG	^{131}I
1 μCi	%5.7 \pm 1.3	%25.8 \pm 2.6	%0.6 \pm 0.2
3 μCi	%5.5 \pm 0.8	%25.6 \pm 1.0	%1.0 \pm 0.3
10 μCi	%3.0 \pm 0.1	%6.2 \pm 1.6	%1.0 \pm 0.3
30 μCi	%2.4 \pm 0.2	%2.6 \pm 0.2	%0.4 \pm 0.1
100 μCi	%2.7 \pm 0.2	%2.1 \pm 1.3	%0.5 \pm 0.1

Çizelge 4.8'de görüldüğü gibi ^{131}I -BLM ve ^{131}I -BLMG'nin en yüksek bağlanma gösterdiği spesifik aktivite miktarı 1 μCi 'dir. ^{131}I 'in hücrelere bağlanma oranları incelendiğinde artan aktivite miktarı ile bağlanma oranının düştüğü görülmektedir. Bu durum, muhtemelen artan aktivitelerde ^{131}I 'in gama enerjisinin yüksek olması ve hücreler üzerinde olumsuz etki yaratarak hücrelerin ölümüne yol açmasından kaynaklanmaktadır. Hücre ölümü ile hücre sayısı azaldığı için bağlanma oranları artan aktivite ile düşmektedir.



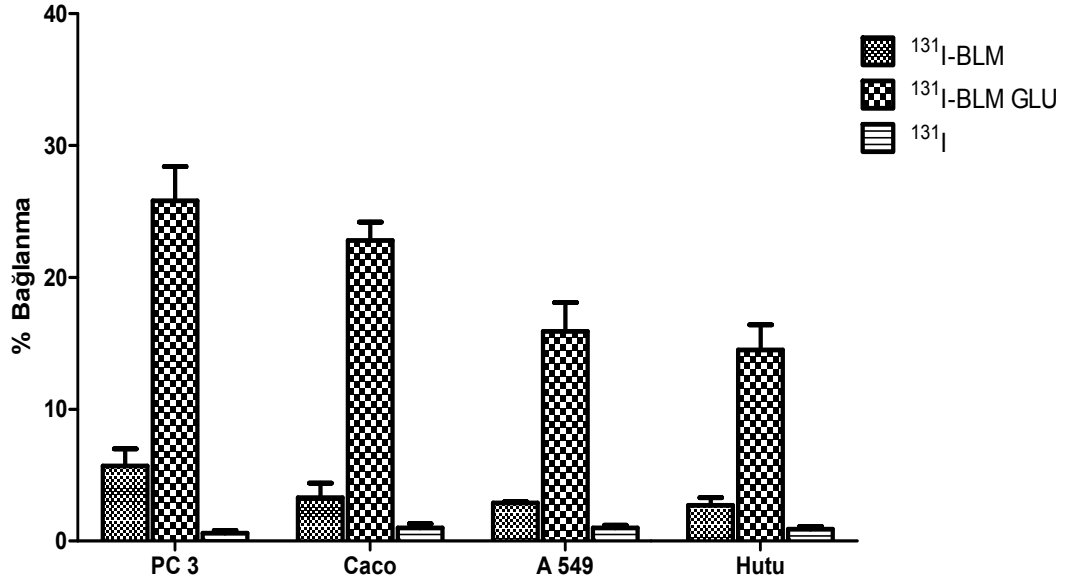
Şekil 4.21 : ¹³¹I'in farklı spesifik aktivite miktarlarından oluşan % bağlanma grafiği

¹³¹I-BLM, ¹³¹I-BLMG ve ¹³¹I için çizilen % bağlanma grafiğinde (Şekil 4.19) görüldüğü üzere artan spesifik ¹³¹I aktivitesi ile ¹³¹I-BLM'nin bağlanma oranında belirgin bir değişim olmazken, ¹³¹I-BLMG'nin bağlanma oranı giderek azalmaktadır. ¹³¹I'in ise artan aktiviteyle tek başına hücrede anlamlı bir bağlanma göstermediği görülmektedir. ¹³¹I ile yapılan bir *in-vitro* çalışmada troid karsinoma (B-CPAP) hücreleri artan iyod-131 aktivitelerinde 2 gün boyunca inkübe edilmiştir. Hücre yaşamındaki değişiklikler, nekroz ve apoptozisdeki artış hemen ve ışınlamadandan 2 gün sonra değerlendirilmiştir. Buna göre, B-CPAP hücrelerinin sayısı artan I-131 aktivite konsantrasyonu ile azalma göstermiştir. Sonuç olarak I-131'in apoptotik ya da nekrotik hücre ölümünün doza bağlı olduğu bulunmuştur. Yüksek I-131 dozlarının nekrotik etki gösterdiği, düşük I-131 dozlarının ise apoptotik etki gösterdiği tespit edilmiştir [8].

4.8 ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin PC-3(Prostat), A-549(Akciğer), Caco(Kalın barsak) ve HuTu-80 (İnce barsak) Hücre Hatlarındaki Bağlanma Etkinliği

Şekil 4.20'de görüldüğü üzere, ¹³¹I işaretli BLM ve BLMG'nin PC-3(prostat), Caco(kalın barsak), A-549(akciğer), ve HuTu-80 (ince barsak) hücre hatlarındaki bağlanma etkinliği incelendiğinde ¹³¹I-BLM'nin Caco, A-549 ve Hudu hücrelerindeki bağlanma oranları arasında anlamlı bir fark görülememiştir (P>0.05). ¹³¹I-BLM'nin en yüksek oranda bağlanma gösterdiği hücre hattı PC-3 olarak tespit edilmiştir. ¹³¹I-

BLMG'nin hücelere bağlanma oranlarına bakıldığında ise A-549 ve Hutu hücelere bağlanma oranları arasında anlamlı bir fark görülememiştir ($P>0.05$). ^{131}I -BLMG'nin en yüksek oranda bağlanma gösterdiği hücre hattı PC-3 olarak tespit edilmiştir. ^{131}I 'in farklı hücre hatlarına bağlanma oranları incelendiğinde ise, PC-3, Caco ve A-549 hücelere bağlanma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür ($P>0.05$).



Şekil 4.22 : ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I ' in PC-3, A-549, Caco ve HuTu-80 hücre hatlarına bağlanma oranları

Çizelge 4.9 : ^{131}I -BLM, ^{131}I -BLMG ve ^{131}I in PC-3, A-549, Caco ve HuTu-80 hücre hatlarına bağlanma yüzdeleri

	^{131}I -BLM	^{131}I -BLMG	^{131}I
PC-3	%5.7±1.3	%25.8±2.6	%0.6±0.2
Caco	%3.3±1.1	%22.8±1.4	%1.0±0.3
A-549	%2.9±0.1	%15.9±2.2	%1.0±0.2
HuTu-80	%2.7±0.6	%14.5±1.9	%0.9±0.2

İncelenen tüm hücre hatlarındaki işaretli bileşiklerin tutulumları karşılaştırıldığında ^{131}I -BLMG'nin hücrelerdeki tutulumunun ^{131}I -BLM'nin tutulumuna göre yaklaşık 5-6 kat fazla olduğu tespit edilmiştir. Radyoışaretli BLM ile yapılan bir çalışmada, $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -BLM kompleksleri PtCl_4K_2 veya $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2$ ile metal ligandları biçiminde sentezlenmiş ve bu komplekslerin dağılımı fareler üzerinde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar BLM'nin $^{195\text{m}}\text{Pt}$ komplekslerinin, *in vitro* biçimde 96 saate kadar, *in vivo* biçimde ise 48 saate kadar metabolize olmadan kaldıkları için çok kararlı oldukları görülmüştür ve bu maddelerin daha önce çalışılan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ komplekslerine göre BLM ile çok daha iyi bir biçimde kompleks verdikleri tespit edilmiştir. $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -BLM'nin radyoaktivitesinin kanda 1 saatlik enjeksiyonunda en yüksek konsantrasyonunda akciğer tümörleri, karaciğer ve deride de izlenebilir. Bu maddenin kandan temizlenmesinin çok yavaş olduğu görülmüştür. $^{195\text{m}}\text{Pt}$ -BLM'nin tümör teşhisi ve kontrolü için olası kullanımının bulunabileceği sonucuna varılmıştır [51]. Avcıbaşı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada BLM ve enzimatik olarak sentezlenen BLMG ^{131}I ile işaretlenerek ve işaretli bileşiklerin radyofarmasötik potansiyelleri nükleer teknikler kullanarak deney hayvanları üzerinde incelenmiştir. Yapılan biyodağılım ve sintigrafi çalışmalarının sonucunda, her iki işaretli bileşiğin metabolik davranışlarının benzer olduğu, en fazla mide, mesane, prostat, testis ve omurilik'te tutulumlarının gerçekleştiği ve aynı zamanda yapılan sintigrafi çalışmalarının biyodağılım çalışmaları ile uyum içerisinde olduğu bulunmuştur. Bütün bunlara ek olarak ^{131}I -BLM'nin prostat'a ^{131}I -BLMG'nin de hem omurilik hem de prostat'a spesifik olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ^{131}I ile işaretli BLM ve BLMG bileşiklerinin özellikle testis ve prostatla ilgili kanserlerin teşhis ve tedavisine

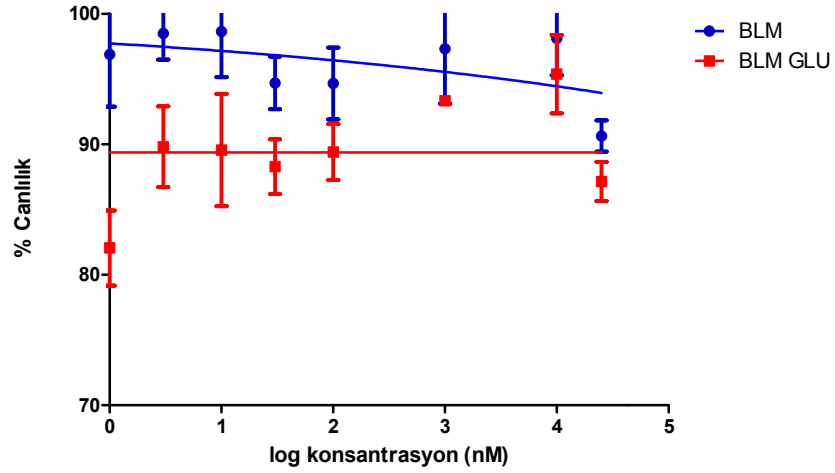
yönelik oldukça yüksek bir kullanım potansiyeline sahip olabileceği bulunmuştur [17]. Glukuronidlerle ilgili yapılan bir başka çalışmada urasil ve enzimatik yöntemle sentezlenen urasil-N-glukuronid (UNG) ve urasil-O-glukuronid (UOG) olarak tanımlanan glukuronid ligandlar manyetit bazlı nano-parçacıklara kovalent olarak konjuge edilmiş ve daha sonra ¹²⁵I ve ¹³¹I ile ayrı ayrı işaretlenmişlerdir. Hem ¹²⁵I ve hem de ¹³¹I işaretli UOG ve UNG'nin, HuTu-80, Caco-2 ve PHIC normal insan barsak epitel hücrelerine bağlanmaları *in vitro* olarak incelenmiş, sonuçlar karşılaştırıldığında radyoişaretli UNG ve UOG'in hücre inkorporasyon oranlarının radyoişaretli urasile göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir [50]. Glukuronidlerle ilgili yapılan başka bir çalışmada, ¹³¹I ile işaretli anilin, fenolftalein ve bu bileşiklerin glukuronidlerinin metabolik davranışları incelenmiş, yapılan deneyler biyodağılım ve sintigrafi çalışmaları ile desteklenmiştir. Sonuç olarak, bileşikler iodojen metodu ile %100 işaretlenmiş, max. tutulum mesane ve barsaklarda gözlemlenmiştir [40].

4.9 BLM ve BLMG'nin PC-3 Kanser Hücre Hattındaki Sitotoksite Sonuçları

BLM ve BLMG örneklerinden 25000 nM, 10000 nM, 1000nM, 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM ve 1 nM olmak üzere 8 farklı konsantrasyonda hazırlanan miktarların PC-3 hücre hattındaki sitotoksite sonuçlarına göre 1-25000 nM madde konsantrasyon aralığında ortamda canlı kalan PC-3 hücrelerinin yüzdesi Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.10 : BLM ve BLMG'nin PC-3 hücre hattına uygulandıktan 48 saat sonra ortalama canlı kalan hücre yüzdesi

nM	BLM		BLMG	
	% Ort	std sp	% Ort	std sp
1	96.87	4	82.04	2.88
3	98.48	2	89.8	3.1
10	98.63	3.5	89.55	4.3
30	94.69	2.01	88.28	2.1
100	94.65	2.75	89.39	2.14
1000	97.3	4.2	93.32	0.2
10000	98.1	2.81	95.36	3
25000	90.62	1.2	87.14	1.5



Şekil 4.23 : BLM ve BLMG'nin PC-3 hücre hattına uygulandıktan 48 saat sonra ortalama canlı kalan hücre yüzde grafiği

Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi 1-25000 nM konsantrasyon aralığında ortamdaki ortalama canlı kalan hücre sayısı her iki bileşik için de %80'nin üzerindedir. Şekil 4.23'de BLM ve BLMG'nin PC-3 hücre hattına uygulandıktan 48 saat sonra ortalama canlı kalan hücre yüzde grafiği verilmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak BLM ve BLMG'nin sitotoksik etkileri karşılaştırıldığında BLMG'nin, konvansiyonel kemoterapik ajan olarak kullanılan BLM'ye göre PC-3 hücrelerinde göstermiş olduğu sitotoksik etkinin daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, BLMG enzimatik olarak başarılı bir şekilde sentezlenmiş, BLM ve enzimatik yöntemle sentezlenen BLMG iodojen metodu kullanılarak ¹³¹I ile yüksek verimde sırasıyla (%90 ve %80) işaretlenmiş, radyoişaretli bileşiklerin 4 farklı hücre hattındaki (PC-3, A-549, Caco ve HuTu-80) bağlanma verimleri incelenmiştir. Bu çalışma ile, ¹³¹I-BLM ve ¹³¹I-BLMG'nin en yüksek tutulum gösterdiği hücre hattının Prostat (PC-3) hücreleri (sırasıyla %5.7 ve %25.8) olduğu, ¹³¹I'in ise tek başına hiçbir hücre hattında istatistiksel olarak anlamlı bir tutulum göstermediği görülmüştür. İncelenen tüm hücre hatlarındaki işaretli bileşiklerin tutulumları karşılaştırıldığında ¹³¹I-BLMG'nin hücrelerdeki tutulumunun ¹³¹I-BLM'nin tutulumuna göre yaklaşık 5-6 kat fazla olduğu bulunmuştur. Bu sonuca göre, BLMG bileşiği konvansiyonel kemoterapötik ajan olarak kullanılan BLM ile karşılaştırıldığında çok daha etkili bir anti-tümör ajan olabilme potansiyeline sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Daha sonraki aşamalarda yapılması planlanan Apoptozis çalışmaları neticesinde işaretli BLMG'nin terapötik etkinliğinin kantitatif olarak belirlenmesi mümkün olabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] **Ekmekçi A., Konaç E., Önen H.i.**, 2008. Gen Polimorfizmi ve Kansere Yatkinlık, *Marmara Medical Journal*, Vol.21(3);282-295.
- [2] **Kosova F., Arı Z.**, 2008. *F.Ü. Saç. Bil. Dergi*, 22 (6): 377 – 384.
- [3] **Url-1** <<http://www.cancer.org>>, alındığı tarih 12.04.2011
- [4] **Chen K-C., Cheng T-L., Leu Y-L., Prijovich ZM., Chuang C-H., Chen B-M., Roffler SR.**, 2007. Membrane-Localized Activation of Glucuronide Prodrugs by B-glucuronidase Enzymes, *Cancer Gene Therapy* 14, 187–200.
- [5] **Kang-Jey Ho, M. D., Ph.D., and Sow-Hsong Kuo, M. D.** 1995. Urinary Beta-Glucuronidase Activity as an Initial Screening Test for Urinary Tract Malignancy in High Risk Patients, *Cancer*, August 2, Vol. 76, No. 3.
- [6] **Avcıbaşı U., Demiroğlu H., Ünak P., Müftüler F. Z. B., İçhedef Ç. A., Gümüşer F. G.**, 2010. In Vivo Biodistribution of ¹³¹I Labeled Bleomycin (BLM) and İsomers (A2 and B2) on Experimental Animal Models, *Journal of Radioanalytical And Nuclear Chemistry*, Vol.285(2): 207-214.
- [7] **Yousefnia H., Jalilian A.R., Zolghadri S., Bahrami-Samani A., Shirvani-Arani S., Ghannadi-Maragheh M.**, 2010. Preparation and quality control of lutetium-177 bleomycin as a possible therapeutic agent., *Nukleonika.*, Vol. 55: 285-291.
- [8] **Marx K., Moka D., Schomacker K., Fischer T., Gabruk-Szostak B., Kobe C., Dietlein M., Schicha H.**, 2006. Cell death induced by I-131 in a differentiated thyroid carcinoma cell line in vitro: Necrosis or apoptosis, *Nuclear Medicine Communications.*, Vol.27: 353-358.
- [9] **Bahrami -Samani A ., Ghannadi-Maragheh M., Jalilian A.R. , Mazidi M.**, 2010. Biological studies of samarium-153 bleomycin complex in human breast cancer murine xenografts for therapeutic applications., *Radiochimica Acta.*, Vol. 98: 237-242.
- [10] **Medine, E.İ.**, 2008. ¹²⁵I/¹³¹I işaretli Urasil'in Glukuronid sentezi ve manyetik özellik kazandırılarak yeni bir manyetik ilaç taşıyıcı oluşturulması, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [11] **Zolghadri S., Jalilian A.R., Yousefnia H., Bahrami-Samani A., Shirvani-Arani S., Ghannadi-Maragheh M.**, 2010. Development of Ho-166 bleomycin as a possible therapeutic complex, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, Vol.285: 461-467.
- [12] **Koçan,F.**, 2010. Bleomycin ve Bleomycin-glukoronid'in ^{99m}Tc ile İşaretlenmesi ve Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [13] **Yaren, H., Karayılanoglu, T.**, 2005. Radyasyon ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni*, 4 (4).
- [14] **Daşdağ, S.** 2010. İyonlaştırıcı Radyasyonlar ve Kansere, *Dicle Tıp Dergisi Cilt / Vol. 37*, No 2, 177-185.

- [15] **Çabuk, T.**, 2010. Radyasyon Terapilerinde Çeşitli Radyoizotoplarının Doz Eşdeğerinin Hesaplanması *Yüksek Lisans Tezi* Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fizik Anabilim Dalı, Adana.
- [16] **Algüneş, Ç.**, 2002. *Radyasyon Biyofiziği*, Trakya Üniversitesi Rektörlüğü Yayınları.
- [17] **Demiroğlu, H.**, , 2009. ¹³¹I İle İşaretli Bleomycin ve Bleomycin-Glukuronid'in Radyofarmasötik Potansiyelinin İncelenmesi, *Yüksek Lisans Tezi*, Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Manisa.
- [18] **Ünak, T.**, 2007. *Temel Nükleer Kimya Kitabı*, E.Ü Fen Fakültesi Baskı İşleri.
- [19] **Büyüksulu, H.**, 2007. Isparta'nın Yalvaç İlçesi Ve Çevresinin Doğal Fon (Background) Radyasyon Düzeylerinin Araştırılması *Yüksek Lisans Tezi* Fizik Anabilim Dalı, Isparta.
- [20] **Url-3** < www.taek.gov.tr > alındığı tarih 18.04.2011
- [21] **Bozbiyık, A., Özdemir, Ç., Hancı, Y.H.**, 2002. Radyasyon Yaralanmaları ve Korunma Yöntemleri, *Sted*, cilt:11 sayı: 7
- [22] **Enginar, H.**, 2002. ^{99m}Tc İle İşaretli Estradiol Türevi Radyofarmasötiklerin Sentezi Ve Radyofarmasötik Potansiyellerinin İncelenmesi, *Doktora Tezi*, Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [23] **Acar, Ç.**, 2005. ^{99m}Tc İle İşaretli D – Penisilamin 'in Bifonksiyonel Şelatlama Ajansı Olarak Kullanılması, *Yüksek Lisans Tezi*, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı.
- [24] **Canefe, K., Duman, G.**, 1994. İlaçların Seçici Taşınması ve Hedeflendirilmesi, *Ecz . Fak. Der.* 23, 1-2. Ankara.
- [25] **Lewis T.G, ED.** 2006. Intralesional Bleomycin for Warts : a review. *Druga Dermatol*, Jun; 5(6):499-504.
- [26] **İsi, H., Türkyılmaz, A.B., Budak, T.**, 2004. Kronik Olarak Radyasyona (x-ışını) Maruz Kalmış Bireylerde Bleomycin'nin Kromozomlar Üzerine Etkisi, *Dicle Tıp Dergisi* Cilt:31, Sayı:2, (50-55).
- [27] Malign Plevral Efüzyonlarda İntraplevral Bleomisin Tedavisi,Türk Toraks Dergisi, Aralık 2000. Cilt 1, Sayı 3, 35-39.
- [28] **Url-2**<w3.balikesir.edu.tr/~hnamli/calisma/p2009-2010/fatma_tekeli.ppt> alındığı tarih 14.04.2011
- [29] **Gündüz T.**, 1996. *Kantitatif Analiz Ders Kitabı*, Bilge Yayınları.
- [30] **Çam, S., Ereeş, F.S., Hiçsönmez, Ü.**, 2008. Nükleer Tehlikelerde Radyoaktif İyot ve Korunma, *TAF Prev Med Bull*; 7(5):449-454.

- [31] Rivkees, S.A., Sklar,C., Freemark, M.J., Endocrinol,C., 1998. The Management of Graves' Disease in Children, with Special Emphasis on Radioiodine Treatment, *Metab* Vol.83: 3767-3776.
- [32] **Url-6** < www.hpschapters.org > alındığı tarih 16.05.2011
- [33] **Skugor, M.**, 2006. Thyroid Disorders (A Cleveland Clinic Guide). *Cleveland Clinic Press*. pp. 82.
- [34] **Url-5** < wikipedia.org > alındığı tarih 12.05.2011
- [35] **S. Erlaçın.**, 1994. Temel İlkeleri ile Biyokimya, *Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*.
- [36] **Telefoncu, A.**, 1988. *Tıp ve Fen Bilimleri için Biyokimya*, Arkadaş Tıp Kitapları.
- [37] **Tekman Ş., Öner N.**, 1994. *Genel Biyokimya Kitabı*, İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- [38] **Ünak, T., Akgün, Z., Duman, Y., Yıldırım, Y., Avcıbaşı, U., Çetinkaya, B.**, 2003. Radioiodination and preliminary biological tests of aniline-mustard and its glucuronide conjugate as a potential anticancer prodrug, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.*, Vol. **256**, No. 3: 529-534,
- [39] **Ünak, T., Avcıbaşı, U., Yıldırım, Y.**, 2005. A Radioanalytical Technique for Measurement of Beta-glucuronidase Activities, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry.*, Vol. **266**, No. 3: 503–506.
- [40] **Avcıbaşı. U., Avcıbaşı. N., Ünak. T., Ünak. P., Müftüler. F.Z., Yıldırım. Y., Dinçalp. H., Gümüşer F.G., Dursun. E.R.**, 2008. Metabolic comparison of radiolabeled aniline- and phenol-phthaleins with ¹³¹I., *Nuclear Medicine and Biology.*, Vol. **35**: 481–492.
- [41] **Ünak, T., Ünak, P., Ongun, B., and Duman, Y.**, 1997. Synthesis and Iodine-125 Labelling of Glucuronide compounds for combined Chemo- and radiotherapy of cancer, *Appl. Radiat. Isot.*, Vol. **48**, No. 6. pp. 777-783.
- [42] *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*; 2006. 20 (3): 232-233.
- [43] **Vural, N.**, 1996. Toksikoloji, *A.Ü.Ecz.F. Yayınları*, s. 1-20.
- [44] **Davila, J.C., Rodriguez, R.J., Melchert, R.B., Acosta, D.**, 1998. Predictive value of in vitro model systems in toxicology, *Ann Rev Pharmacol Toxicol* Vol.38: 63-96.
- [45] **Guanaratna, C.**, 2000. Drug metabolism and pharmacokinetics in drug discovery, *A primer for bioanalytical chemists*, Part I. Current Separations Vol. **19** (1): 17-23.
- [46] **Saygı, Ş.**, 2003. Deneysel Toksikolojide Toksikite Testleri Ve Test Sonuçlarının Önemi, *Gülhane Tıp Dergisi*, Vol. **45** (3) : 291 – 298.
- [47] **Güleş, Ö., Eren, Ü.**, 2008. Apoptozun Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler, *Y.Y.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi*, (2) 73-78

[48] **Url-4** < [http://www.turkjpath.org/pdf/pdf_PB_282 .pdf](http://www.turkjpath.org/pdf/pdf_PB_282.pdf)> alındığı tarih 12.05.2011

[49] **Bradford, M.M.**, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, Vol.72: 248-254.

[50] **Medine, İ.E., Ünak, P., Sakarya, S., Toksoz, F.**, 2010. Enzymatic Synthesis of Uracil Glucuronide, Labeling with (125)I-131, and In Vitro Evaluation on Adenocarcinoma Cells, *Cancer Biotherapy And Radiopharmaceuticals*, Vol.25: 335-344.

[51] **Leh, F.K.V., Wolf, W.**, 1977. Preparation and Distribution of ¹⁹⁵Pt^m-labeled Bleomycin, Radiopharmacy Program, Cancer Hospital and Research Institute.

ÖZGEÇMİŞ

- Doğum Tarihi** : 11 Mart 1986
- Doğum Yeri** : İstanbul
- İlkokul** : Cengiz Topel İlköğretim Okulu-1993
- Ortaokul** : Cengiz Topel İlköğretim Okulu-1997
- Lise** : Torbalı Anadolu Lisesi , İzmir-2000
- Lisans** : Celal Bayar Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
Manisa – 2005

