

**T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HEDEFLİ RADYONÜKLİD TEDAVİLERDE YENİ NESİL AJANLAR



BURCU UÇAR

**DOKTORA TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI
BİYOMÜHENDİSLİK PROGRAMI**

**DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ ZEYNEP MUSTAFAEVA AKDESTE**

İSTANBUL, 2018

T.C.
YILDIZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEDEFLİ RADYONÜKLİD TEDAVİLERDE YENİ NESİL AJANLAR

Burcu UÇAR tarafından hazırlanan tez çalışması 07.06.2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyomühendislik Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Eş Danışman

Prof. Dr. Mehmet Onur DEMİRKOL
Koç Üniversitesi

Jüri Üyeleri

Dr. Öğr. Üyesi Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE
Yıldız Teknik Üniversitesi

Doç. Dr. Banu MANSUROĞLU
Yıldız Teknik Üniversitesi

Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ
Medipol Üniversitesi

Prof. Dr. Işıl ALBENİZ
İstanbul Üniversitesi

Doç. Dr. Serap DERMAN
Yıldız Teknik Üniversitesi

ÖNSÖZ

Hedef terimi, ilaç keşfi bağlamında çok farklı çağrışımlar taşır. Biyomühendislik alanındaki kayda değer ilerleme, hem normal hem de anormal hücrelerin işlevinde önemli rolleri olan çok sayıda proteinin tanımlanmasına yol açan, hastalıkla bağlantılı tanımlanan proteinlerin işlevinin nasıl modüle edileceği konusunda spesifik hipotezlerin oluşumunu sağlayan yeni ilaçlara bir tür yönelim olabilir.

Kanseri tedavi etmek ve/veya önlemek için birçok heyecan verici yeni hedef olmasına rağmen, klasik kemoterapi ve radyoterapi yaklaşımları, sadece cerrahi eksizyonla tedavi edilemeyen tümörler için kanser tedavisinin ana dayanağı olmaya devam etmektedir. Tanı veya hedefli tedavi için yeni radyofarmasötiklerin hazırlanması ancak biyologlar, kimyagerler ve hekimler arasındaki yakın etkileşim devam ederse gelişecektir. Yeni nesil biyolojik hedefler belirlendiğinde, radyokimyagerler pek çok sentetik zorluklar ile karşılaşacak ve umuyorum ki tüm bu zorluklara hükmedilecektir. Radyo-izleyici gelişimine katkı sağlayan diğer tüm etkileyici bilim dallarının aksine, nükleer tıp nihai hedef bilim değil, yaşam kalitesini arttırmadaki kabiliyettir. Bu nedenle, bu alandaki mevcut zorluk; bir radyo-izleyicinin spesifikliği, radyo-izleyicinin gerekli validasyonu ve radyo-izleyiciden yarar sağlayacak hasta sayısı arasında bir denge kurmaktır.

Birçok kişi bu tezin eksiksiz olmasına katkıda bulundu.

Minnettarlığımı sunmak istediğim ilk kişi; “bilim heyecanı ile bir ömür”: Bu tezin tamamlanmasını mümkün kılan, öncelikle bilmenin hoşgörüsünü bize aşıl原因, biyopolimer, peptid ve aşı kavramının gölgesi, ricalarını emir kabul ettiğim yegane hocam Sn. Dr. Öğr. Üyesi Zeynep A. MUSTAFAEVA sizi tanımak, sizinle çalışmak benim için çok büyük bir ödüldür. Beni ekibinize dahil ettiğiniz, öğretilerinizi ve güveninizi için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bilimciler ve tıpçılar arasındaki etkileşimin en iyi örneği; “geçmiş yıllar ve çok büyük bir deneyim-big boss-”: Ülkenin en iyi Nükleer Tıp ekibinin bir parçası olarak şefim hocam abim olan Sn. Prof. Dr. Mehmet Onur DEMİRKOL tezimin gidişatını cesaretlendirici rehberlik ve cömert desteğiniz için, diğer projelerimizde olduğu gibi bu tezin tasarımı ve yürütülmesi adına verdiğiniz maddi manevi özgürlük ve güven için sonsuz teşekkür ederim. Radyokimyageriniz ve öğrenciniz olarak sizinle çalışmak bölümün gizli kahramanı için çok iyi bir başlangıç ve çok büyük bir şanstı.

“..Ve siz mutfağın büyük şefleri”: Biyomühendislik zehirlenmesinden beni kurtaran, mutfağımızın en iyi şefleri yardımlarınız ve sürekli ilginiz sayesinde bu tez tamamlandı.

Siz olmasaydınız o laboratuvarlarda o günler (geceler) nasıl geçerdi. Sevgili hocam Dr. Tayfun ACAR-Pierre- sen olmasaydın peptidler Japonya’da sentezlenecekti. Solid faz peptid sentezi, LC/MS, preparatif HPLC ve diğer analitik yöntemler konusunda bizzat desteğin ve öğretilerin için sonsuz teşekkürler.. Sevgili hocam Dr. Pelin PELİT ARAYICI-kraliçe- sen olmasan o metaller o peptidlerin yüzüne bakmazdı. Konjugasyon ve polimer sentezi konularında yetkinliğiyle yanımda olduğun ve en içten en doğal paylaşımların için sonsuz teşekkürler.. Nöron apoptozuyla geçirdiğimiz sayısız saatler için radyasyoncu ikinize de minnettar. Bu muhteşem ekibin nice başarılarla elele yürümesi dileğiyle..

En sabırlı öğretmenlerim, akıl hocalarım, varlık sebebim büyüklerim; Semiya-Nihat UÇAR, Şenay-Uğur ERDEM ve sevgi pıtırıcılarım; Ali Efe ve Elif Ece kardeşler: Her biriniz bir renk oldunuz hayatımda, gökkuşağımız altında bir ömür sağlıklı bir arada olmak dileğiyle.. Tüm dileklerimi gerçek kıldığınız için bir ömür minnettar kalacağım.

Bilim camiasına hoş geldin demişken, kanserle girdiği fizyolojik savaştan mağlub ayrılan kuzenim Kimyager Beste BAYAR anısına..

“Kanımca, kimya merkez bilimdir.

Biyolojide veya tıpta süregelen her şeyin kimyasal bir temeli vardır.”

R. Lerner, Chem. Eng. News 1996, 74(20), 39.

Haziran, 2018

Burcu UÇAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGE LİSTESİ.....	ix
KISALTMA LİSTESİ.....	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÇİZELGE LİSTESİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT.....	xvii
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
1.1 Literatür Özeti.....	1
1.2 Tezin Amacı.....	4
1.3 Hipotez	5
BÖLÜM 2	
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Peptid	6
2.1.1 Biyomedikal önemi	6
2.1.2 Peptidlerin Yazılışı ve Adlandırılışları	9
2.1.3 Nükleer Tıpta Peptidler.....	11
2.1.4 Organizmada Bulunan Bazı Peptidler	12
2.1.4.1 Oksitosin ve Vazopressin.....	13
2.1.4.2 Somatostatin	14
2.1.4.3 Vapreotid (RC 160).....	14
2.1.4.4 Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)	14
2.1.4.5 P Maddesi.....	14
2.1.4.6 Kolesistokinin (CCK).....	15
2.1.4.7 Nörotensin	15
2.1.4.8 Kalsitonin.....	15

2.1.4.9	Bombesin ve Bombesin Benzeri Peptidler	15
2.1.4.10	Kadherinler	17
2.1.4.11	Terapötik Olarak Peptidler	22
2.1.4.12	Anti-Kanser Ajan Olarak Peptidler	22
2.2	Reseptör Kavramı	23
2.2.1	İlaç-Reseptör Etkileşmesi	24
2.2.2	Mesaj Moleküller	25
2.2.3	Peptid ve peptid reseptörlerinin kanserdeki önemi	25
2.2.3.1	Radyoligandlar için bağlanma bölgeleri	26
2.2.3.2	Fonksiyonel cevaplar ortaya çıkarmak	26
2.3	Mikrodalga Destekli Katı Fazda Peptid Sentezi (SPPS)	26
2.4	Radyofarmasötik	29
2.4.1	Peptid Radyofarmasötikleri	31
2.4.2	Tanısal Radyofarmasötikler	33
2.4.2.1	Nükleer (fiziksel) özellikler	34
2.4.2.2	Biyolojik Özellikler	37
2.4.2.3	Kimyasal Özellikler	40
2.4.3	Terapötik Radyofarmasötikler	41
2.4.3.1	Nükleer Özellikler	42
2.4.3.2	Biyolojik Özellikler	43
2.5	Radyoişaretleme	44
2.5.1	İşaretleme Metodları	44
2.5.1.1	İzotopla Yerdeğiştirme Reaksiyonları	45
2.5.1.2	Yabancı İşaretin Girişi	45
2.5.1.3	Bifonksiyonel Şelatlar İle İşaretleme	45
2.5.1.4	Biyosentez ve Kimyasal Sentez	45
2.5.1.5	Geri Tepme (Recoil) İşaretleme	46
2.5.1.6	Eksitasyon İle İşaretleme	46
2.5.2	İşaretlemede Önemli Faktörler	46
2.5.3	İşaretleme işleminin verimi	47
2.5.3.1	Ürünün kimyasal stabilitesi	47
2.5.3.2	Bozunma veya değişiklik	47
2.5.3.3	İzotop Etkisi	47
2.5.3.4	Carrier-free veya taşıyıcı ilave edilmemiş durum (NCA)	47
2.5.3.5	Bekletme koşulları	48
2.5.3.6	Spesifik aktivite	48
2.5.3.7	Radyoliz	48
2.5.3.8	Saflaştırma ve Analiz	48
2.5.3.9	Raf Ömrü	49
2.5.4	Radyoişaretlemede Kullanılan Radyonüklidler	49
2.5.4.1	Teknesyum	49
2.5.4.2	Galyum-68	54
2.5.5	Bifonksiyonel Şelatlayıcı Ajanlar (BFCA)	60
2.5.6	Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü	63
2.5.6.1	Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolünde Uygulanacak Basamaklar	63

2.5.6.2	Radyofarmasötiklerde Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri	65
2.6	Kullanılan Ölçüm Yöntemleri	71
2.6.1	UV-VIS Spektroskopisi.....	71
2.6.2	Zeta Potansiyeli ve Boyut Ölçümü	71
2.6.3	LC-MS	73
2.6.3.1	HPLC	74
2.6.3.2	İyonlaştırma	75
2.6.3.3	Kütle Analizörü	76

BÖLÜM 3

DENEYSEL KISIM.....	77
3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar	77
3.2 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler	78
3.3 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler	79
3.3.1 Fosfat (PBS) Tamponu	79
3.3.2 Amonyum Asetat Çözeltisi.....	79
3.3.3 EDTA (etilendiamintetraasetik asit) Çözeltisi	79
3.4 Peptid Dizisinin Sentezi	79
3.4.1 Lineer ADH-1 Peptid Dizisinin Sentez Döngüsü Prosedürü	80
3.4.2 Lineer ADH-1 Peptid Dizisinin Makrosiklizasyon Prosedürü	82
3.5 Anti-Kanser Özellikteki Siklik (ADH-1)c Peptid Molekülünün EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) Şelatörü İle Konjugasyon Prosedürü	82
3.6 ⁶⁸ Ga-EDTA-ANTI-CAD Ligandının Radyosentezi.....	84
3.6.1 ⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga Jeneratör Elusyonu Prosedürü.....	84
3.6.2 ⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün Klinik Öncesi Radyoişaretlenmesi Prosedürü	84
3.6.2.1 ⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün Radyo-HPLC ile Analizi	85
3.6.2.2 ⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün Radyo-TLC ile Analizi.....	85
3.6.3 İşaretli ⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün İn Vitro Değerlendirilmesi	86
3.6.3.1 Lipofilisite tayini	86
3.6.4 İşaretli [⁶⁸ Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün İn Vivo Değerlendirilmesi.....	86
3.6.4.1 Yaralı Hayvan Modeli	86

BÖLÜM 4

SONUÇ VE ÖNERİLER	87
4.1 Peptid Molekülünün Analizleri	87
4.1.1 Lineer ADH-1 Peptidine Ait LC-MS Analizi	87
4.1.2 Lineer ADH-1 Peptidinin Saflaştırılmasına Ait Preparatif HPLC Analizi	88
4.1.3 Lineer ADH-1 Peptidinin Siklizasyon Takibine Ait LC-MS Analizi	89
4.1.4 Saflaştırılmış Siklik (ADH-1)c Peptidine Ait LC-MS Analizi	90
4.2 (ADH-1)c Peptidinin EDTA ile Biyokonjugatının Analizleri.....	91

4.2.1	EDTA-(ADH-1)c Konjugatının Floresans Spektrofotometre ile Analizi	91
4.2.2	EDTA-(ADH-1)c Konjugatının Zeta Sizer ile Analizi	92
4.2.3	EDTA-(ADH-1)c Konjugatının LC-MS ile Analizi.....	93
4.3	⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Analizleri	94
4.3.1	⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Radyo-HPLC Analizi.....	94
4.3.2	⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Radyo-TLC ile Analizi.....	95
4.4	[⁶⁸ Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün <i>İn Vitro</i> Değerlendirilmesi	96
4.4.1	Lipofilisite tayini.....	96
4.5	[⁶⁸ Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün <i>İn Vivo</i> Değerlendirilmesi	97
4.5.1	Gama Kamera ile [⁹⁹ Tc ^m O ₄] ⁻ ve ¹⁷⁷ Lu-PSMA Görüntüleme Çalışmaları	97
4.5.2	[⁶⁸ Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c PET/CT Görüntüleme Çalışmaları.....	100
4.5.2.1	PET/CT SUV _{maks.} Değerlerine Dayanan Pearson Faktörü Hesaplanması.....	100
BÖLÜM 5		
TARTIŞMA		103
KAYNAKLAR.....		109
EK-A.....		117
TANIMLAR.....		117
ÖZGEÇMİŞ.....		118

SİMGE LİSTESİ

α	Alfa
Å	Amström
β	Beta
Da	Dalton
°C	Derece santigrat
kDa	Kilodalton
keV	Kiloelektron volt
L	Litre
mL	Mililitre
μ L	Mikrolitre
μ m	Mikrometre
mCi	Mili Cruie
mg	Miligram
M	Molar
n	Mol
nm	Nanometre
pH	Bir çözeltinin asitlik veya bazlık derecesi (potential of hydrogen)
psi	İnç kare başına kuvvet (pounds per square inch)

KISALTMA LİSTESİ

APCI	Atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma
APPI	Atmosferik basınç foto-iyonlaştırma
AVA	5-Aminovaleriyonik asit
BBB	Kan beyin bariyeri (Blood-brain barrier)
BG	Background
BFCA	Bifonksiyonel şelatlayıcı ajan
BN	Bombesin
Boc	tert-Bütoksi karbonil
DCM	Diklormetan
DIC	Diizopropilkarbodiimid
DIEA	Diisopropil etil amin
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid
EDT	1,2-Etan ditiol
EDTA	Etilen diamin tetra asetik asit
ESI	Elektrosprey iyonlaştırma
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu
Fmoc	9-Fluorenylmethoxycarbonyl
GI	Gastrointestinal
HBTU	O-Benzotriazole-N,N,N',N'- tetrametilüronyum hekzaflorofosfat (O- (Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate)
HCl	Hidroklorik asit
HCTU	N, N, N', N'-tetrametil-O- (6-kloro-1 H-benzotriazol-1-il) üronyum hekzaflorofosfat (N,N,N',N'-Tetramethyl-O-(6-chloro-1H- benzotriazol-1-yl)uronium hexafluorophosphate)
HOBt	N-Hidroksibenzotriazol
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (High performance liquid chromatography)
iTK	İnce tabaka kromatografisi
İV	İntravenöz
LAL	Limulus Amebosit Lizat (Limulus Amebocyte Lysate)

LC-MS	Sıvı kromatografi-kütle spektroskopisi (Liquid chromatography-mass spectroscopy)
LDE	Lazer doppler elektroforez
m/z	Kütle/yük oranı
MAA	Makro agregat albumin
MALDI	Matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonlaştırma
MAG3	Merkaptoasetiltriglisin
MBS	m-Maleimidobenzoil-N-hidroksisüksinimid ester
MoAB	Monoklonal antikor
Mw	Molekül ağırlığı
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat
NaCl	Sodyum klorür
NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O	Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat
NHS	N-Hidroksisüksinimid ester
NMP	N-Metil-2-pirolidon
NaN ₃	Sodyum azid
PBS	Fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline)
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
pI	İzoelektrik nokta
RECIST	Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)
RES	Retiküloendotelyal Sistem
SCLC	Küçük hücreli akciğer kanseri
SSTR4	Somatostatin Reseptörü 4
SPPS	Katı faz peptid sentezi (Solid phase peptide synthesis)
SPECT	Bilgisayarlı tek foton emisyon tomografi
TFA	Trifluoro asetik asit
THF	Tetrahidrofuran
TIS	Triizopropilsilan
TOC	[Try3] octreotide
UV	Ultraviolet
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2. 1 Peptid bağının oluşumu	7
Şekil 2. 2 Alanilglisin dipeptidinin yapısı	8
Şekil 2. 3 Peptidlerin primer yapısı.....	8
Şekil 2. 4 Alanilglisin ve Glisilalanin dipeptidlerinin yapısı	9
Şekil 2. 5 (ADH-1)c'nin yapısı.....	22
Şekil 2. 6 Katı fazda peptid sentezinin genel döngüsü [62].....	29
Şekil 2. 7 Peptid molekülünün radyoaktif atomla işaretlenmesi a) radyo işaretli peptid b) hedeflendirilmiş radyo işaretli peptid c) etkin maddenin kanser hücrelerine ulaştırılması d) kanser hücresinin iyonize radyasyona maruz bırakılması e) kanser hücresinin yok edilmesi.....	31
Şekil 2. 8 Geçici denge eğrisi	51
Şekil 2. 9 Teknesyum jeneratörü.....	52
Şekil 2. 10 ⁹⁹ Tc ^{m'} in oluşum eğrisi [63]	52
Şekil 2. 11 ⁹⁹ Mo'un bozunma şeması [63]	52
Şekil 2. 12 Bazı galyum-şelatlama ligandlarının yapısal formülü	54
Şekil 2. 13 Galyumun hidroliz basamakları	55
Şekil 2. 14 Galyum jeneratörü.....	59
Şekil 2. 15 Bifonksiyonel şelatörlerin uygulama alanları	60
Şekil 2. 16 (A) N-hidroksisüksinamidil hidrazinonikotinat ve (B) bis (hidroksiamamid) türevi bifonksiyonel şelatlayıcı ajan	61
Şekil 2. 17 Elektroferez sisteminin şematik gösterimi [63].....	67
Şekil 2. 18 Işığın c konsantrasyonunda, b cm kalınlığındaki ortamdan geçerken absorbsiyon nedeniyle şiddetindeki azalma [100]	71
Şekil 2. 19 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli [101]	73
Şekil 2. 20 HPLC'nin şematik gösterimi [98]	75
Şekil 2. 21 İyonlaştırma teknikleri [54].....	75
Şekil 3. 1 Kırma işleminden sonra kokteylin uzaklaştırılması.....	81
Şekil 3. 2 (ADH-1)c molekülünün sentezi	82
Şekil 3. 3 Konjugasyon prosedürü	83
Şekil 3. 4 EDTA-(ADH-1)c konjugatının molekül yapısı.....	84
Şekil 3. 5 [⁶⁸ Ga]Ga-AntiCAD1'in molekül yapısı	85
Şekil 4. 1 Ham ADH-1 peptid molekülüne ait A) LC-UV kromatogram, B) LC-MS TIC (toplam iyon kromatogramı).....	88
Şekil 4. 2 ADH-1 peptid molekülüne ait kütle spektrumu.....	88

Şekil 4. 3	Ham peptidin preparatif HPLC kromatogramı.....	89
Şekil 4. 4	Ham peptidin preparatif HPLC kromatogramı.....	89
Şekil 4. 5	Lineer ADH-1 peptid molekülünün disülfid oksidasyonu prosesi takibi A) LC-UV Kromatogramı B) LC-UV 1. ve 24. saat karşılaştırmalı kromatogramı C) LC-MS toplam iyon kromatogramı.....	90
Şekil 4. 6	Saflaştırılmış (ADH-1)c peptid molekülüne ait LC-UV kromatogramı.....	90
Şekil 4. 7	(ADH-1)c peptid molekülüne ait kütle spektrumu.....	91
Şekil 4. 8	EDTA ve matriks ile karşılaştırmalı olarak EDTA-(ADH-1)c konjugatına ait floresans spektrumu	92
Şekil 4. 9	EDTA-(ADH-1)c konjugatının LC-UV kromatogramı.....	93
Şekil 4. 10	EDTA-(ADH-1)c konjugatının LC-MS iyon kromatogramı	93
Şekil 4. 11	EDTA-(ADH-1)c konjugatının kütle spektrumu	94
Şekil 4. 12	Serbest Galyum-68'e ait radyo-HPLC	95
Şekil 4. 13	⁶⁸ Ga-EDTA-(ADH-1)c'ye ait radyo-HPLC.....	95
Şekil 4. 14	Ajanın farklı solüsyonlarda yürütülmesinden elde edilen TLC parçalarına ait Rf değerleri ve ölçülen aktivite miktarları.....	96
Şekil 4. 15	Yaralı hayvan modeli.....	97
Şekil 4. 16	İntraperitoneal enjeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL perteknetat; 5., 10., 15., 30., 60., 120., 180., 240. dakikalarda gama kamera görüntüleri.....	98
Şekil 4. 17	İntravenöz enjeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL Lu-PSMA; 10., 60., 120., 180. dakikalarda ve 24. saatte gama kamera görüntüleri	99
Şekil 4. 18	Hedefli [⁶⁸ Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c ajanının PET/CT görüntüsü	100
Şekil 5. 1	Kadherin alan yapısı ve N-kadherin aracılı hücre-hücre kavşakları. (ADH-1)c, kadherin bazlı hücre-hücre adezyonunu (yapışmasını) bozmak için sinyal molekülleri olarak işlev görebilir.....	108

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa
Çizelge 2. 1 Amino asitlerin tek ve üç harfli kısaltmaları	9
Çizelge 2. 2 İnsan vücudunda bulunan bazı önemli düzenleyici peptidler	13
Çizelge 2. 3 Bombesine benzer peptidlerin sınıflandırılması	16
Çizelge 2. 4 Epitelyal mezenkimal dönüşümün belirleyicileri	20
Çizelge 2. 5 Epitelyal mezenkimal dönüşümün rol oynadığı tümörler	20
Çizelge 2. 6 Tanısal radyofarmasötiklerin lokalizasyon mekanizması.....	38
Çizelge 2. 7 İşaretleme metodları [66]	44
Çizelge 2. 8 Teknesyum izotopları	50
Çizelge 2. 9 Nükleer tıpla ilgili galyum radyonüklidleri	55
Çizelge 2. 10 Bazı galyum koordinasyon komplekslerinin kararlılık sabitleri	56
Çizelge 2. 11 Stokes-Einstein denklemi.....	72
Çizelge 3. 1 Kullanılan cihazlar	77
Çizelge 3. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler	78
Çizelge 3. 3 Peptidin (ADH-1)c sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları	81
Çizelge 4. 1 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranında sentezlenen konjugatın boyut ve zeta potansiyeli değerleri	92
Çizelge 4. 2 Radyoaktif bileşiklerin TLC üzerindeki bağlanma oranları	96
Çizelge 4. 3 Pearson Faktörü hesap çizelgesi	101

HEDEFLİ RADYONÜKLİD TEDAVİLERDE YENİ NESİL AJANLAR

Burcu UÇAR

Biyomühendislik Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Eş Danışman: Prof. Dr. Mehmet Onur DEMİRKOL

Kadherinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlayan, adezyon mekanizmasının başlatılması ve devamı için kritik öneme sahip olan hücre adezyon ve hücre sinyal molekülleridir. Kadherin aile üyelerinden N-kadherinler, tümör hücreleri ve tümörlere ait genişlemiş kan damarlarında yoğun olarak sunulmaktadır. N-kadherin antagonistleri ise, antineoplastik ve antianjiyogenik aktiviteye sahip vasküler hedefleme ajanlarıdır. Bu ajanlar N-kadherin reseptörüne seçici ve yarışmalı bir şekilde bağlanır, böylece tümör vaskülatürü bozulur, tümör hücre büyümesi inhibe olur ve tümör hücrelerinin endotel hücre apoptozu indüksiyonu meydana gelir. Bu tez çalışması kapsamında, epitelyal mezenkimal dönüşümün meydana geldiği doku ve hücrelerde sunulan N-kadherini hedeflemek üzere, teranostik platformda uygulanabilecek yeni nesil bir peptid radyofarmasötığının sentezlenmesi ve bu analogun in vitro ve in vivo değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla kimerik antijen reseptörü dizisine dayanan seçici bağlayıcı His-Ala-Val (HAV) motifi içeren N-kadherin antagonisti olarak işlev gören ve (ADH-1)c olarak tasarlanan sentetik N-Ac-CHAVC-NH₂ siklik peptid dizisi sentezlendi. Peptid sentezinde verimi yükselten ve rasemleşme miktarını düşüren Fmoc kimyası ile çalışan mikrodalga destekli katı fazda peptid sentez sistemi kullanıldı. (ADH-1)c, lineer eşdeğerinin sentezi ve karakterizasyonu sonrası amonyum asetat (% 5 w/v) kullanarak i→i+5 makrosiklizasyonu ile elde edildi. Peptidin saflaştırılması için ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC), karakterizasyonu için sıvı kromatografisi-elektrosprey iyonizasyon-kütle spektrometresi (LC-ESI-MS) kullanıldı.

Siklik peptidin EDTA şelatörü ile konjugatı (AntiCAD1) suda çözünür karbodiimid yöntemi uygulanarak sentezlendi. AntiCAD1 ajanının karakterizasyonu için floresans spektrofotometre, zetasizer ve LC-ESI-MS sistemlerinden yararlanıldı. Karakterize edilen AntiCAD1, [⁶⁸Ga]Ga radyonüklidi ile işaretlendi. [⁶⁸Ga]Ga-AntiCAD1 analogunun radyokimyasal saflığı TLC metodları ile analiz edildi. Analogun lipofilisitesini belirlemek için P dağılım katsayısı hesaplanarak 'çalkalama şişesi' yöntemi uygulandı (logP=-2.69±0.54). Analogun biyodağılımı, Wistar Albino sıçanları üzerinde PET/CT kullanılarak araştırıldı. Karaciğer, böbrekler, dalak, tükürük bezi ve hedeflenen hasarlı bölgede sırasıyla ortalama 1.36, 1.96, 1.38, 1.16 ve 2.14 SUV_{max} değerleri ile kayda değer oranda tutulum tespit edildi. Ajanın hedeflenen bölge ile diğer vücut dokuları arasında olan ilişkiyi test etmek ve bu ilişkinin derecesini ölçmek için istatistiksel Pearson Faktörü hesaplama yöntemi kullanıldı. Korelasyon katsayısı 0.73 olarak hesaplandı. 0.70-0.89 arasında yer alan bu değer kuvvetli pozitif korelasyon olarak yorumlandı.

Bu tez çalışmasında; kanser epitelyal mezenkimal dönüşüm belirteçlerinden olan adezyon molekülü ADH-1 peptidinden türevlenen radyo işaretli konjugat [⁶⁸Ga]Ga-AntiCAD1, N-kadherin protein sunumu artan hasarlı dokularda ve metastatik solid tümörlerde kadherin aktivitesinin görüntülenmesinde kullanılabilecek potansiyel bir radyofarmasötik olduğu anlaşılmıştır. Çalışma teranostik platformda dizayn edildiğinden konjugatın terapi radyonüklidleri ile işaretlenmesi durumunda analog terapi amaçlı olarak uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Peptid sentezi, N-kadherin, (ADH-1)c, siklizasyon, konjugasyon, PET/CT

ABSTRACT

NOVEL AGENTS IN TARGETED RADIONUCLIDE THERAPY

Burcu UÇAR

Department of Bioengineering

Ph.D. Thesis

Adviser: Assist. Prof. Dr. Zeynep MUSTAFAEVA AKDESTE

Co-Adviser: Prof. Dr. Mehmet Onur DEMİRKOL

Cadherins are cell adhesion and cell signaling molecules that provide the molecular link between adjacent cells, and have critical prescription for initiation and continuation of the adhesion mechanism. N-cadherin, which is a member of the cadherin family, is extensively presented in enlarged blood vessels of tumor cells and tumors. N-cadherin antagonists are vascular targeting agents with antineoplastic and antiangiogenic activity. These agents bind to the N-cadherin receptor in a selective and competitive manner and by this way inhibit tumor vasculature and tumor cell growth, also induce endothelial cell apoptosis induction of tumor cells. As part of this thesis, it is aimed to synthesize a new generation of peptide radiopharmaceuticals that can be applied on the theranostic platform to target N-cadherin present in tissues and cells where epithelial-mesenchymal transformation has taken place and evaluate this agent in vitro and in vivo. For this purpose, a synthetic N-Ac-CHAVC-NH₂ cyclic peptide sequence, designed as (ADH-1)c, was synthesized which functions as an N-cadherin antagonist containing a selective binding His-Ala-Val (HAV) motif based on the chimeric antigen receptor sequence. A microwave-assisted solid phase peptide synthesis system based on the Fmoc chemistry was used for raising the yield and reducing the amount of racemization in the peptide synthesis. (ADH-1)c was synthesized by $i \rightarrow i + 5$ macrocyclization using ammonium acetate (5% w/v) after synthesis and

characterization of the linear counterpart (ADH-1). For the characterization and purification, liquid chromatographic-electrospray ionization-mass spectrometry (LC-ESI-MS) and reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) were used respectively. The conjugate of cyclic peptide and EDTA chelator (AntiCAD1) was synthesized by the water-soluble carbodiimide method. For the characterization of the AntiCAD1 agent the fluorescence spectrophotometer, zetasizer and LC-ESI-MS systems were used. The identified AntiCAD1 has been labeled with [^{68}Ga]Ga radionucleotides. The [^{68}Ga]Ga-AntiCAD1 analytical radiochemical purity was analyzed by TLC methods. In order to determine the analytical lipophilicity, the P dispersion coefficient was calculated and the 'shake flask' method was applied ($\log P = -2.69 \pm 0.54$). Analytical biodistribution was investigated using PET/CT on Wistar Albino rats. Mean values of SUV_{max} were 1.36, 1.96, 1.38, 1.16 and 2.14 in the liver, kidney, spleen, salivary gland, and target lesion areas, respectively. The statistical Pearson Factor calculation method was used to test the relationship between the agent's target region and other body tissues and to measure the degree of this association. The correlation coefficient was calculated to be 0.73. This value, which ranged from 0.70 to 0.89, was interpreted as a strong positive correlation.

In this study; identified that radio-labeled conjugate [^{68}Ga]Ga-AntiCAD1 derived from the ADH-1 peptide - an adhesion molecule which is one of the cancer epithelial mesenchymal transformation markers can be used as a potential radiopharmaceutical in imaging cadherin activity in damaged tissues in which the increase of N-cadherin protein presentation has been identified and metastatic solid tumors with increased expression of the adhesion molecule. Because the study was designed on a terranostatic platform, it was concluded that the conjugate could be used for analogue therapy if it was marked with therapy radionuclides.

Keywords: Peptide synthesis, N-cadherin, (ADH-1)c, cyclization, conjugation, PET/CT

1.1 Literatür Özeti

Kanser hastalarının tedavisinde hedefe yönelik kişisel tedavi uygulamalarının artması ile birlikte bu hastaların takip ve tedavilerinin değerlendirilmesinde yeni tartışmalar gündeme gelmektedir. Solid tümörlerin sitotoksik kemoterapi ile tedavisinin değerlendirilmesinde kullanılan RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors- Solid Tümörlerde Yanıt Değerlendirme Kriterleri) ve WHO (World Health Organization- Dünya Sağlık Örgütü) kriterleri hedefe yönelik kişisel tedavi uygulamalarının yaygınlaşması ile birlikte bir takım sorulara cevap verememektedir; tümörün boyut olarak küçülmesi veya çekmesi (shrinkage) her zaman tedavinin başarılı olduğunu göstermemektedir. Bu yüzden, moleküler görüntülemenin hedeflenen tedavi uygulamalarının takibinde başarı ile kullanılabilme durumu çok ciddi olarak tartışılmaya başlanmıştır. Umut veren gelişmeler ile birlikte son yıllarda klinik uygulamalarda daha spesifik hücresel yolakları (DNA replikasyonu, hücre zarı değişiklikleri, hipoksi, protein sentezi vb.) baz alan birçok PET (Pozitron Emisyon Tomografisi) radyofarmasötığının hastaların takip ve tedavilerinin değerlendirilmesinde uygulanmaya başladığı görülmektedir. Son 30 yılda nükleer onkolojik görüntülemede kullanılmak üzere sayısız PET radyofarmasötığı geliştirilmiştir. İçlerinden hala birincil tercih olan ¹⁸F-FDG (¹⁸Flor-Floro Deoksi Glikoz) ajanı sadece tanı amaçlı değil, aynı zamanda kanser evrelemesinde, tedaviye yanıtların değerlendirilmesinde veya tekrar nüks tespitinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Standart klinik evreleme metodları içinde yer alan konvansiyonel anatomik görüntüleme yöntemleri özellikle patolojik boyuta ulaşmayan ancak metastatik tutulumu olan lenf nodlarının gösterilmesinde ve rezidüel kitlelerin

değerlendirilmesinde yetersiz kalır. Sonuç olarak; bu ajan doğruluk ve duyarlılığı nedeniyle her kanser türü için optimal değildir ve bazı durumlarda (iyi diferansiye veya düşük dereceli kanserler gibi) istatistiksel olarak belirgin 18F-FDG tutulumu gözlenmemektedir. Birçok iyi huylu durumlarda (normal yara iyileşmesi, enfeksiyon, inflamasyon, aktive olmuş kahverengi yağ dokusu) ise artan 18F-FDG tutulumu görmekteyiz. Normal dokuları etkilemeden kanser hücrelerini yok etmek kanser hücrelerinin selektif olarak hedeflendirilmesi ile mümkündür. Tümöre hedeflendirmedeki ideal özelliklerden biri, etkin maddenin tümördeki yerleşiminin aktif veya pasif hedeflendirilme ile artırılmasıdır. Hedeflendirme ile konvansiyonel, biyoteknolojik ve gen kökenli ilaçlar, vücudun organ, doku ve hücre gibi spesifik bölgelerine seçici olarak taşınabilmektedir. Bu seçici hedeflendirme ile, istenmeyen yan etkiler azalmakta, en uygun terapötik yanıt elde edilmekte ve yüksek dozlarda toksik etkileri gözlenen maddeler güvenli olarak kullanılabilirler [1]. İlaçların hedeflendirilmesi iki şekilde sağlanır; bunlardan biri pasif hedeflendirme, diğeri de aktif hedeflendirmedir [2]. Pasif hedeflendirme, intravenöz enjeksiyondan sonra taşıyıcının doğal olarak hedeflendirilmesi; organ, doku ve hücreye yerleşmesidir. Aktif hedeflendirme; manyetik hedeflendirme, ultrasonik hedeflendirme ve ligant – reseptör aracılı hedeflendirme olmak üzere 3 ana başlık altında incelenebilir. Ligant – reseptör aracılı hedeflendirmede kullanılan ligantlar arasında monoklonal antikorlar, peptid yapıdaki büyüme faktörleri, glikoproteinler sayılabilir [2]. Etkin madde, hedef hücrenin yüzeyindeki reseptöre bağlanabilen liganda (hormon, peptid gibi) konjuge edilir. Böylece; etkin madde spesifik olarak hedef hücreye yönlendirilmiş olur. Günümüzde, özgün monoklonal antikorlar ile tümöre hedeflendirme çalışmaları yapılmaktadır. Ancak, hedeflendirilmiş antikor tedavisini kısıtlayan birtakım faktörler bulunmaktadır [3]. Antikorların büyük boyutlu olmaları ve bu moleküllerin hedef bölgede düşük penetrasyon ve hücre içine alımı ile karaciğer ve RES (Retikuloendotelial Sistem) tarafından özgün olmayan alımları, bu tip moleküllere ilişkin en önemli sakıncadır [4]. Bunun sonucunda, tümöre zayıf penetrasyon ile karaciğer ve kemik iliğinde dozun sınırlandırılmasına yol açan toksisite görülebilir. Antikorların; radyonüklid, sitotoksik ilaç ve toksinlerin tümör bölgesine taşınması için kullanımında bu kısıtlayıcı faktörler etkili olabilir. Antikor hedeflendirilmesinde çıkan sorunları azaltmak açısından, peptidler

tümöre hedeflendirmede mükemmel alternatifler olarak düşünülmektedir. Peptidlerin antikorlara göre küçük boyutlu olmaları, kimyasal olarak dayanıklı ve türevlendirmeye uygun olmaları ile genel olarak RES' e yakalanmamaları gibi üstünlükleri bulunmaktadır [3]. Ayrıca; kanser hücrelerine özgü aminoasit dizilimine sahip peptidler ile kanserde hedeflendirme mümkün olabilmektedir [4-6]. Kanserde hedeflendirmenin ve hedeflendirmede peptid molekülleri kullanımının üstünlüklerine istinaden, bu tez kapsamında solid tümörlü kanser hastalarının tanı ve tedavilerini geliştirmek amacıyla ve enfeksiyon odaklarının tespitinde, (ADH-1)c peptidinin sentetik olarak üretilmesi, hedeflendirilmesi ve biyodağılımı keşfedilecektir. Eksherin (ADH-1)c antineoplastik ve antianjiogenik aktiviteye sahip, siklik pentapeptid vasküler-hedefleyici, küçük bir ajandır; N-kadherini spesifik ve yarışmalı olarak bloklama özelliğine sahiptir. Bunun sonucu olarak tümör vasküler sistemi hasar görür, tümör hücre büyümesi inhibe edilir, tümör hücresi ve endotelyal hücre apoptozu indüklenir. N(Nöral)-kadherin kalsiyum-aracılı hücre-hücre adezyonu ve sinyal mekanizmasına katkı sağlayan proteinlerin, kadherin süper familyasından bir hücre-yüzey transmembran glikoproteinidir. Bazı agresif tümörlerde, endotelyal hücrelerde veya bazı tümör kan damarlarının perisitlerinde düzenleyici olabilir. N-kadherin, nöronal hücrelerin tümünde ve nöronal olmayan hücrelerin pek çok tipinde hücreler arası adezyon mekanizmasını başlatan, kalsiyum-aracılı birbirine bağlı tekrarlayan ilmiklerden oluşan bir integral membran glikoproteinidir. Hücrelerin ekstrasellüler bölgesinde, N-kadherin monomerleri eşzamanlı olarak kendi aralarında (cis etkileşimler) ve karşılıklı hücreler arasında (trans etkileşimler) adezyon mekanizmasının başlamasını ve devamını sağlar. N-kadherin monomerinin her birinin N-terminal ucundaki Trp kalıntısı bir Ala içeren karşıt hidrofobik paketi yükler. Artan tümör büyümesi yeterli kan kaynağına bağlıdır [7]. Bunun sonucu olarak anjiogenez tümör büyümesini sağlamada merkezi bir rol oynar. N-kadherin kan damarı stabilitesini sağlar ve anjiyogeneze katkıda bulunur. Sonuç olarak tümör büyümesi N-kadherine bağlıdır. CAM'ın antagonistleri tümör büyümesini yeterli oranda etkiler. N-kadherin zayıf farklılaşmış karsinomlarda, melanoma, nöroblastoma ve multipl myeloma gibi pek çok tümör türünde sunulabilir [7]. İyi huylu karsinom hücreleri E-kadherin sunumunu durdurur ve yerine N-kadherin sunar. E-kadherin kaybı N-kadherinin anormal sunumu tümör hücrelerinde polarite kaybına,

apoptoz direncine, invaziv ve metastatik oluşuma neden olur. Sonuç olarak N-Kadherin antagonistleri tümör hücre apoptozuna ve metastaz oluşumuna neden olma potansiyeline sahiptir. Tümör hücrelerinin davranışını düzenlemede N-kadherinin yeteneği fibroblast büyüme faktörü reseptörü ile iç etkileşime ve fibroblast büyüme faktörü reseptörünün aktivasyonuna katkı sağlar [7]. N-kadherinin kanser hücre metastazlarını etkileyen moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Hücrede N-kadherin sunumunun artışıyla meydana gelen metastatik oluşum sürecindeki N-kadherin-tümör hücreleri ya da endotelial hücreler arasındaki iç etkileşim tam manasıyla keşfedilememiştir. Çalışmalar metastazların oluşumunda kadherinin rolünün belirlenmesine gerek duymaktadır. Peptid radyofarmasötikleri aktif hedeflendirme ile reseptörlerine spesifik bağlanma gösterdiği vücut bölümlerinde tümör dokularına çok daha yüksek oranda bağlanırlar. Gama veya pozitron yayan radyonüklidler ile işaretli peptidler (radyofarmasötikler) kullanılarak, gama kameralar (sintigrafi) ve pozitron emisyon tomografi (PET) yöntemleri ile beyin ve diğer organlardaki reseptörlerin canlı organizmada görüntülenmesi mümkün olmuştur. Böylece radyoışaretli peptidler ile tümör görüntülemesi (evreleme ve yeniden evreleme) ve tedavisi yapılabilmektedir. Bu yaklaşımda, üreteceğimiz teranostik ajanlar ile; tanısal yöntem ve tedavi yöntemi birleştirilecek, yani terapötikle benzer kimyasal yapıdaki tanısal ajanla moleküler görüntüleme ya da inceleme yaparak, tedaviye yanıt konusunda öngöründe bulunmak mümkün olacaktır. Bu yöntemin özellikle kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında radyoışaretli peptidlerin hedeflendirilmesi yoluyla kullanılması söz konusudur. Bahsi geçen radyoışaretli peptidlerin tümör hücrelerine yüksek affinitesinin olması bir çok kanser türünün teşhis ve tedavisi için moleküler hedefleri gösterir ve bu da onkolojik nükleer görüntüleme ve endoradyoterapinin temelini oluşturmaktadır.

1.2 Tezin Amacı

Kanserde hedeflendirmenin ve hedeflendirmede peptid molekülleri kullanımının üstünlüklerine istinaden, bu tez kapsamında klinikte solid tümörlü kanser hastalarının tanı ve tedavilerini geliştirmek, enfeksiyon odakları ve epitel dejenerasyon tespiti

amacıyla, (ADH-1)c peptidinin sentetik olarak üretilmesi, hedeflendirilmesi ve görüntüleme çalışmalarının ardından biyodağılımının keşfedilmesi amaçlanmıştır.

1.3 Hipotez

Bu tez çalışmasında kemoterapotik özellikteki sentetik peptidin sentezi, saflaştırılması ve karakterizasyonunun yapılması, peptidin şelatörle biyokonjugatının sentezlenmesi ve karakterize edilmesi, biyokonjugatın radyonüklid ile işaretlenerek radyokimyasal ve radyonüklidik oranlarının belirlenmesi ve biyodağılım-biyogörüntüleme çalışmalarının gerçekleştirilmesi beklenmektedir.

Sentezlenen biyokonjugat daha sonraki çalışmalarda farklı radyonüklidik metaller ile işaretlenecek ve buradan alınan sonuçların Dünya’da ve ülkemizde yapılmakta olan ve yapılacak tüm çalışmalara ışık tutacağı düşünülmektedir.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

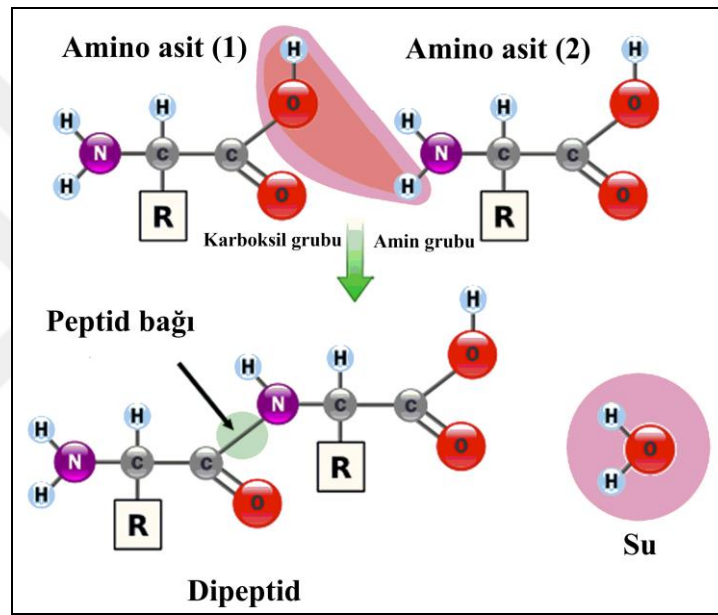
2.1 Peptid

Peptidler, kimyasal doğalarına göre asit amidlerdir. Hidrolizle amino asitlere parçalanırlar [8]. Peptidler yapılarında bulunan amino asitlerin fonksiyonel gruplarına ve dizilişine göre farklı özellikler göstermektedir. Canlı organizmalardaki kan basıncı, ağrı, hafıza, iştah, büyüme gibi birçok olayı kontrol etmeleri peptidleri potansiyel tedavi araçları olarak ilgi odağı haline getirmektedir. Peptidler genel olarak üç şekilde elde edilebilirler. Bunlar dokudan saflaştırma ile, genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanımı ile ve kimyasal sentez yoluyla. Peptid ve proteinlerin yer aldığı biyolojik işlemlerin ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olmak, bu işlemlerin kontrolü ve sonuçları bakımından büyük önem taşımaktadır. Peptidler hücre-hücre haberleşmesi, metabolizma, immün cevap ve üreme gibi pek çok biyokimyasal işlemde yer almaktadır. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda çok önemli roller üstlenmeleri onların birer potansiyel ilaç adayı olmalarına arttırıcı etki göstermektedir [9-11].

2.1.1 Biyomedikal önemi

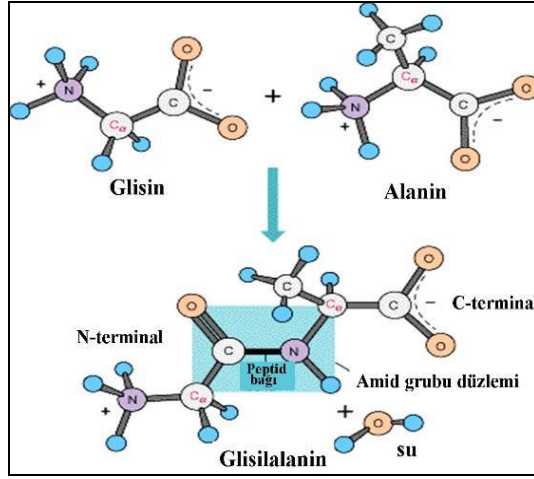
Peptidlere biyomedikal açıdan, özellikle endokrinolojide büyük ilgi duyulmuştur. Vücudun temel hormonlarının birçoğu peptiddir ve noksanlıkları ile ortaya çıkabilecek durumları düzeltmek üzere hastalara verilebilirler (örneğin; diyabetli hastalara insülin verilmesi). Belirli bazı antibiyotikler (örneğin; valinomisin ve gramisidin A) gibi az

sayıdaki antitümör ajanlar (örneğin; bleomisin) peptiddir. Birçoğu vücutta oldukça az miktarlarda bulunan ve bu nedenle tedavi için yeterli miktarlarda izole edilmeleri güç olan peptid hormonların, hızlı kimyasal sentez ve rekombinant teknoloji ile yapımları mümkün olmuştur. Aşılarla kullanılmak üzere, doğal kaynaklarda da az miktarlarda bulunabilen bazı peptidlerin (örneğin, viral peptidlerin ve proteinlerin) sentezleri, aynı teknoloji ile mümkün olmuştur [12]. Bir amino asidin karboksil grubu ile ikinci bir amino asidin amino grubunun bir mol su ayrılması sonucunda birleşmesiyle bir dipeptid, üç amino asidin aynı şekilde birleşmesiyle bir tripeptid meydana gelir, dört amino asit ise bir tetrapeptid teşkil eder.



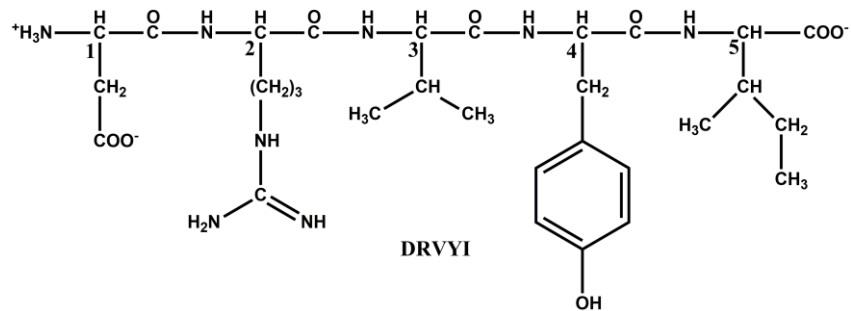
Şekil 2. 1 Peptid bağının oluşumu

Şekil 2.1’de peptid bağı görülmektedir. Bir dipeptidte iki amino asit yalnız bir peptid bağı ile birbirine bağlanmıştır. Bir dipeptide örnek olarak verilen Alanilglisin yapısı Şekil 2.2’de görülmektedir. Bir tripeptidte ise üç amino asit iki peptid bağı ile birbirine bağlanmıştır. Şayet söz konusu bir polipeptid zinciri ise ve bu zincirde n kadar amino asit varsa n-1 kadar da peptid bağı var demektir.



Şekil 2. 2 Alanilglisin dipeptidinin yapısı

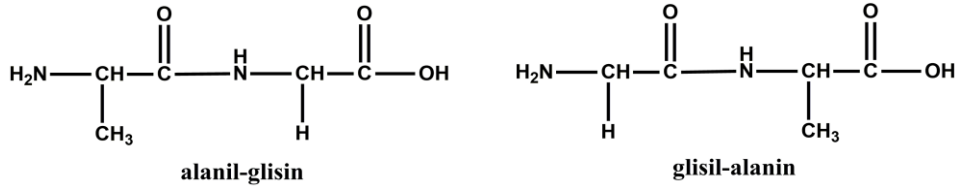
Protein yapısındaki peptid bağının rolü 1902 yılında Hofmeister ve Fischer tarafından açıklanmıştır. Peptid bağlarının varlığını göstermek için kullanılan test biüret testidir. Bu testin temel reaksiyonu, çok seyreltik bakır sülfat solüsyonuna alkali pH sınırları içinde protein solüsyonunun ilave edilmesi ile meydana gelen renk reaksiyonunun oluşmasıdır. En az iki komşu peptid bağının bulunduğu çözeltilerde kısa zamanda eflatun renk (leylak rengi) ortaya çıkmaktadır. Biyolojik bakımdan aktif moleküller olan vazopresin, oksitosin, insülin ve ribonükleazın başarılı yapay sentezleri, proteinlerin primer yapısında peptid bağlarının ne kadar önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Bir peptid molekülündeki amino asit kalıntısı sayısı ondan fazla değilse buna oligopeptid denir. Ondan fazla amino asit peptid bağları ile birleşirse polipeptid meydana gelir. Polipeptidler yüzden fazla amino asit kalıntısı ihtiva ederlerse protein adını alırlar [8], [13].



Şekil 2. 3 Peptidlerin primer yapısı

Bir peptidin tam olarak bilinmesi için; peptidi oluşturan ve hidrolizlendiğinde serbest hale geçen amino asitlerin cins ve sayısını bilmek yetmez, bunların zincirdeki diziliş sıralarının da bilinmesi gerekir (Şekil 2.3). İki farklı amino asit olduğunda, bunlardan iki

farklı dipeptid türer. Örneğin, glisin ve alanini alalım: Oluşan dipeptidler “Alanil-glisin” ve “Glisil-alanin” şeklinde adlandırılır ki bunlar farklı bileşiklerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4 Alanilglisin ve Glisilalanin dipeptidlerinin yapısı

Bu dipeptid üçüncü bir amino asitle birleşerek bir tripeptid meydana gelirse, bunun 6 izomeri olur. Böylece yüzlerce amino asitten meydana gelmiş bir proteinin sayısız izomeri olabilir. Her peptid molekülünün bir ucunda serbest bir amino, diğer ucunda serbest bir karboksil grubu vardır. Bu gruplara terminal (uç) gruplar denir; serbest terminal amino grubuna N-terminal grubu, serbest terminal karboksil grubuna ise C-terminal grubu adı verilir [14].

2.1.2 Peptidlerin Yazılışı ve Adlandırılışları

Yaygın bir kural olarak peptidler, $-NH_2$ amin grubu sola ve $-COOH$ karboksilik asit grubu sağa gelecek şekilde yazılır. Polipeptidleri adlandırırken, $-NH_2$ tarafında olan amino asit kalıntıları “-il” şeklinde olan son ekli köklerle birbirine bağlanır, en sağdaki $-COOH$ karboksilik asit içeren amino asidin adı en son belirtilir. Simgelerle gösterilişte, üç harfli veya tek harfli simgeler kullanılabilir ve böylece formüllerin yazılışı da oldukça kısaltılmış olur. Yukarıda formülleri verilen “Alanil-glisin” (Simgelerle: Ala-Gly veya A-G) ve “Glisil-alanin” ise (Gly-Ala veya G-A) şeklinde gösterilir. Çizelge 2.1’de amino asitlerin tek ve üç harfli kısaltmaları görülmektedir [8], [15].

Çizelge 2. 1 Amino asitlerin tek ve üç harfli kısaltmaları

Genel İsim	Üç Harf / Tek Harf	Sistematik İsim
Alanin	Ala / A	2-Aminopropanoik asit
Arjinin	Arg / R	2-Amino-5-guanidinopentanoik asit
Asparajin	Asn / N	2-Amino-3-karbamoilpropiyonik asit

Çizelge 2. 1 Amino asitlerin tek ve üç harfli kısaltmaları (Devamı)

Aspartik asit	Asp / D	2-Aminobütandioik asit
Sistein	Cys / C	2-Amino-3-merkaptopropiyonik asit
Glutamin	Gln / Q	2-Amino-4-karbamoilbütanoik asit
Glutamik asit	Glu / E	2-Aminopentandioik asit
Glisin	Gly / G	Aminoetanoik asit
Histidin	His / H	2-Amino-3-(1H-imidazol-4-il)propiyonik asit
İzolösin	Ile / I	2-Amino-3-metilpentanoik asit
Lösin	Leu / L	2-Amino-4-metilpentanoik asit
Lizin	Lys / K	2,6-Diaminohegzanoik asit
Metiyonin	Met / M	2-Amino-4-(metiltiyo)bütanoik asit
Fenilalanin	Phe / F	2-Amino-3-fenilpropanoik asit
Prolin	Pro / P	Pirolidin-2-karboksilik asit
Serin	Ser / S	2-Amino-3-hidroksipropiyonik asit
Treonin	Thr / T	2-Amino-3-hidroksibütanoik asit
Triptofan	Trp / W	2-Amino-3-(1H-indol-3-il)propiyonik asit
Tirozin	Tyr / Y	2-Amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit
Valin	Val / V	2-Amino-3-metilbütanoik asit

Polipeptidler (proteinler) 100 veya daha fazla sayıda amino asit kalıntısı içerebildiklerinden, primer yapılarını göstermek üzere amino asitler için 3-harfli veya 1-harfli kısaltmalar kullanılmıştır [8], [12].

2.1.3 Nükleer Tıpta Peptidler

Peptidler diğer moleköl sınıflarından ziyade daha temel biyolojik proseslerde gerekli elementlerdir. Hücresel fonksiyonu, hücrelerarası iletişim, immün yanıt ve bilgi-transdüksiyon yollarını kontrol ve modüle etmek için en yaygın mod, peptid-protein arası non-kovalent etkileşim yoludur. Örneğin; hormonlar, nörotransmitterler, nöromodülatörler, büyüme ve büyüme inhibisyon faktörleri ve sitokinler gibi peptid fonksiyonları. İnsülin, oksitosin ve kalsitonin gibi sayısız istisnaya rağmen, çoğu peptid-ligandları ilaç olarak direkt kullanılmaz ve sıklıkla terapi için en kullanışlı ligandlar nativ ligandların antagonist veya agonistleri olarak hareket eden analogları olmalıdır. Biyolojik aktiviteleri modüle eden reseptörleri hedef alan peptidlerin veya peptidomimetiksin geliştirilmesi, biyoloji, kimya ve tıpta öncelik taşır. Peptidler büyümede ve diğer hücresel işlevlerde sadece normal dokularda değil, aynı zamanda tümörlerde de önemli rol oynar. Çoğu tümör sıklıkla yüksek yoğunlukta olan farklı peptidler için reseptör sunar ve bu reseptörlerin birçoğu *in vitro* büyüme düzenleyici etkilere aracılık eder. Belli türdeki tümörler ayrıca peptidlerin büyüme inhibisyonu veya büyümeyi teşvik eden sinyallere tepki verir. Bu, *in vivo* olarak, insanlardaki tümörlerin tedavisinde önemli bir klinik yaklaşım haline gelen bir etkidir. İdeal örnek, reseptörleri birçok neoplastik dokuda aşırı eksprese olan somatostatin analoglarının kullanımıdır. Peptid reseptör hedeflemesi yoluyla tümörlerin görüntülenmesi, yaklaşık 28 yıl önce radyonüklidle işaretlenmiş somatostatin analoglarının, bir gama kamera kullanılarak insan tümörlerinin *in vivo* görüntülenmesi için nükleer tıpta kullanılmasıyla başladı. Nükleer tıp esas olarak tanısal bir disiplindir; gücü morfolojik bilgilerden ziyade (pato) fizyolojik fonksiyonları görüntüleyebilmektir. Bu alandaki gelişme, biyokimyasal belirteçlerin görüntülenmesi yoluyla *in vivo* doku karakterizasyonu yönünde ilerlemektedir. Regülatör peptidlerin radyoışaretli analoglarının nükleer onkolojide kullanılması bu doğrultuda önemli bir adımdır. Hedefleme ajanları olarak peptidler, örneğin antikolar gibi proteinlere kıyasla birçok avantaj sağlar. Yüksek moleküler

ağırlıkları nedeniyle, antikorlar sıklıkla hedef bölgede sınırlı bağlanmaya/tutuluma ve hedef-arka plan oranına neden olan kandan yavaş atılıma neden olur. Aksine, peptidler kolayca sentezlenirler (katı faz sentezi, paralel ve kombinasyonel yaklaşımlar, faj sunumu), daha ucuzdurlar, modifikasyon ve etiketleme için zor koşullara dayanabilirler. İmmünojenik yanıt oluşturma olasılığı daha az, kandan temizlenme, doku penetrasyonu ve tümör tutulumu ise daha hızlıdır. Ancak, radyofarmasötikler olarak kullanılan peptidlerin bazı önkoşulları vardır. Öncelikle, reseptörler hedef üzerinde uygun miktarlarda eksprese olmalı, yüksek ekspresyon veya spesifik ekspresyon istenen özellikler olmalıdır. Peptid ligandı, doğal bileşik olarak reseptöre karşı yüksek afiniteye sahip olmalıdır. Terapötik uygulamalar için, endositoz ile internalizasyon, daha yüksek tutulum süresi nedeniyle mutlak bir önkoşul gibi görünmektedir. Ayrıca klinik öncesi biyolojik dağılım çalışmaları uygun sonuçlar vermelidir. Son olarak, radyoaktif işaretli peptidlerin temel sorunu, metabolik stablitedir (sadece peptid kısmı için değil, aynı zamanda metal-şelatlayıcı kompleksinin stablitesi için de) [16].

2.1.4 Organizmada Bulunan Bazı Peptidler

Birçok kısa peptid dizisi çok düşük derişimlerde etkisini gösterir. Çok sayıda omurgalı hormonu küçük peptidlerdir. Bunlardan oksitosin (dokuz amino asit kalıntısı) arka hipofizden salınan ve uterus kasılmasını uyaran hormondur, bradikinin (dokuz amino asit kalıntısı) doku inflamasyonunu inhibe eder, tirotropin salgılayıcı hormon (üç amino asit kalıntısı) hipotalamusda oluşur ve bir başka hormon olan ön hipofiz bezindeki tirotropinin salınımını uyarır. Oldukça toksik bir mantar zehiri olan amanitin ve bazı antibiyotikler de ufak peptidlerdir. Küçük polipeptidler ve oligopeptidlerden büyükçe olanlarına örnek ise biri 30 diğeri 21 amino asit kalıntısı olan iki polipeptid zincirinden oluşmuş pankreatik hormon insülidir. Glukagon ise insüline zıt etki gösteren bir diğerk pankreatik hormon olup 29 amino asit kalıntısı içerir. Ön hipofiz bezi hormonu kortikotropin ise 39 amino asit kalıntısı içerir; siğir kimotripsinojeni ise 245 amino asit kalıntısı içerir [17].

Doğada çok çeşitli spesifik özelliklerde peptidler bulunmaktadır. Bunlar kimyasal haberciler, nörotransmitterler, uyarıcılar veya inhibitörler şeklinde pek çok vücut fonksiyonunu düzenlerler. Peptidler daha çok beyinde özellikle nöronlarda

sentezlenirler ve bunlara nöropeptidler adı verilir. Genellikle bu düzenleyici peptidler insan vücudunda çok düşük konsantrasyonlarda bulunurlar. Başlıca beyin, gastrointestinal sistem, endokrin sistem, böbrekler, akciğer, immünvasküler sistemde bulunurlar. Görüldüğü üzere düzenleyici peptidler neredeyse tüm anahtar organları ve metabolik prosesleri kontrol eder ve düzenlerler. Bazı önemli “düzenleyici peptidler” Çizelge 2.2’de verilmiştir [18], [19].

Çizelge 2. 2 İnsan vücudunda bulunan bazı önemli düzenleyici peptidler

Kısaltma	İsim	Bazı Biyolojik Etkiler
α -MSH	α -melanosit uyarıcı hormon	Melanogenezis
AT	Anjiyotensin	Vazokonstrüksiyon
VP	Vazopressin	Vazokonstrüksiyon, Antidiürezis
ANF	Atrial natriüretik faktör	Natriürezis, Vazodilatasyon
BN	Bombesin/Gastrin salgılayıcı peptid	Bağırsak hormonları salımı
BK	Bradikinin	Vazodilatasyon, Hipotansiyon
CT	Kalsitonin	Kalsiyum dengesi
CCK	Kolesistokinin	Mesane kasılması
GAL	Galanin	Gastrointestinal immotilite
LHRH	Luteinize hormon salgılayıcı hormon	LH ve FSH uyarımı
NPY	Nöropeptid-Y	Anksiyete baskılanması, İştah artışı
NT	Nörotensin	Vazokonstrüksiyon, Vasküler permeabilitenin azalması
SEC	Sekretin	Pankreatik NaHCO_3 salımı
SST	Somatostatin	Hormon ve ekzokrin salgının baskılanması
SP	P maddesi	Hipotansiyon, Tükrük salımı
VIP	Vazoaktif intestinal peptid	Vazodilatasyon, Bağırsakta su ve elektrolit salımı

2.1.4.1 Oksitosin ve Vazopressin

Oksitosin ve Vazopressin hipofiz iç salgı bezinin arka kısmından salgılanan iki farklı peptid hormonudur. Her iki molekülde de 7 amino asit birbirinin aynısıdır, sadece 3. ve 8. amino asit kalıntıları farklıdır. Oksitosin, düz kasları gevşetir, oysa Vazopressin derideki kan damarlarını büzerek kan basıncının yükselmesine yol açar [12].

2.1.4.2 Somatostatin

28 aminoasite kadar ulaşabilen 14 aminoasitli uzun siklik bir peptiddir. Somatostatin büyüme hormonu, thyrophin, insulin, glukagon, gastrin gibi çeşitli hormonların salgılanmasında, düz kas kasılmalarında, nörotransmitasyon ve hücre çoğalmasında rol oynar [15].

2.1.4.3 Vapreotid (RC 160)

Octreotid'in bu analogunu TOC'tan ([Try3] octreotide) ayıran, Thr6 yerine Val6; Thr8 (ol) yerine Trp8 gelmesidir. Octreotide ile kıyaslandığında vapreotide'in SSTR4'e (Somatostatin Reseptörü 4) bağlanma eğiliminin arttığı bulunmuştur. Bu durum octreotide göre daha geniş bir spektrumda tümör tiplerinin tanımlanabileceği ümitlerini arttırmıştır. Vapreotid'in kan-beyin bariyerini geçebileceği söylenmektedir. Aynı metal ve koligand ile işaretlendiğinde TOC vapreotide göre *in vivo* olarak daha yüksek tutuluma sahiptir [15].

2.1.4.4 Vazoaktif İntestinal Peptid (VIP)

Disülfid bağları içermeyen 28 amino asitli bir nöropeptiddir. VIP, hipofiz adenilat siklaz aktive edici polipeptid ile yakından ilişkilidir. Bilinen iki tane VIP reseptörü (VIPR) bulunmaktadır. VIPR1 merkezi sinir sisteminde, VIPR2 ise periferel dokularda bulunmaktadır. VIP'nin çeşitli hormonların salgılanmasını baskılamak, immün cevabı modüle etmek, normal ve malin hücrelerin proliferasyonunu ve büyümesini baskılamak gibi çeşitli biyolojik aktiviteleri bulunmaktadır. Bu biyolojik aktiviteler, periferel kan hücrelerinde, böbreklerde, gastrointestinal sistemde, akciğerlerde bulunan hücre yüzey reseptörlerine VIP' nin bağlanması ile gerçekleşir [15].

2.1.4.5 P Maddesi

Tacikinin ailesine ait düzenleyici bir peptiddir. Üç farklı tacikinin reseptörü (NK1, NK2 ve NK3) tanımlanmıştır. P maddesi, beyin, lenfatik doku, damarlar, bağırsak düz kası, bronşiyolar duvarlarda da bulunan NK1' e yüksek afinite (ilgi) göstermektedir. P maddesi reseptörleri inflamatuvar hastalık ile timus ve tükürük bezlerinde de

bulunmaktadır. P maddesi reseptörleri aynı zamanda meme kanseri, nöroblastoma, kolon kanseri, pankreatik kanser ve malin lenfomada da bulunur [15].

2.1.4.6 Kolesistokinin (CCK)

İlk olarak bağırsaktan izole edilmiş olan bir peptiddir (33 amino asitli, CCK-33). Duedunumdaki ve jejunumun yukarı kısmındaki kripta ve villus epitellerinde bulunan i-hücreleri tarafından salgılanan bir bağırsak hormonudur. Daha sonra beyinden izole edilmiştir. Nöronlarda ve sinir uçlarında çeşitli homologlar halinde bulunur. Merkezi sinir sisteminde nörotransmitter olarak rol oynar. En fazla bulunan homoloğu 8 amino asitli olanıdır (CCK-8) [15], [20].

2.1.4.7 Nörotensin

Nörotensin, ileum ve hipotalamusda yüksek konsantrasyonlarda bulunan ve hipotansiyon, analjezi, bağırsak büzülmesi, vasküler geçirgenliğin artması gibi çeşitli fizyolojik etkilere neden olan 13 amino asitli bir peptiddir. İlk olarak sığır hipotalamusundan izole edilmiştir. Nörotensin reseptörleri pankreas ve prostat kanserlerinde salgılanmaktadır [15].

2.1.4.8 Kalsitonin

Kalsiyum seviyelerini düzenleyen 32 amino asitli bir nöropeptiddir. Kalsitonin reseptörleri normal osteoklastlar, lenfositler, beyin, böbrek, testis ve prostatta bulunaktadır. Reseptörler, meme kanseri, bronşiyal kanser, prostat kanseri, malin limfoid dokularda, medullar tiroid karsinomasında ve osteolitik kemik hastalığında artan oranlarda bulunmaktadır [15].

2.1.4.9 Bombesin ve Bombesin Benzeri Peptidler

Bombesin (BN), hem karada hem suda yaşayan (amfibiyan) Bombina bombina kurbağasının derisinden elde edilen bir tetradekapeptiddir. Memelideki karşılığı 27 aminoasit uzunluğunda gastrin salgılayıcı peptiddir. Gastrin salgılayıcı peptidin C-terminal dizilimi aynen bombesin gibidir. Farmakolojik aktiviteler bağırsak hormonunun salınımını, pankreatik ve gastrik asit sekresyonunu içerir. Tüm bunlara ek

olarak GRP ve BN mitojenik etkilere sahiptirler ve hücre çoğalmasını tetikler. Akciğer, prostat, meme, pankreas ve kolon gibi organlarda reseptörlerinin bulunduğu pek çok çeşitli tümör dokuları tespit edilmiştir [21-23]. Amfibiyan derisinden elde edilen yapısal olarak bombesine benzer bazı peptidler üç gruba ayrılır:

- a) Bombesin ve alytesini içeren bombesin ailesi,
- b) Litorin ve ranatensini içeren ranatensin ailesi,
- c) Leu(8) ve Phe(8)-Phyllolitorinleri içeren Phyllolitorin ailesi

Çizelge 2.3’de bombesine benzer peptidlerin sınıflandırılması görülmektedir [21-23].

Çizelge 2. 3 Bombesine benzer peptidlerin sınıflandırılması

İsim	Amino Asit Dizilimi	Ma(Da)
Bombesinler		
Bombesin	pEQRLGNQWAVGHLM-NH ₂	1618
[pGlu1] bombesin (6-14)	pEQWAVGHLM-NH ₂	1053
[Phe13] bombesin	pEQRLGNQWAVGHFM-NH ₂	1621
Alytesin	pEGRLGTQWAVGHLM-NH ₂	1536
Ranatensinler		
Litorin	pEQWAVGHFM-NH ₂	1084
[Glu(OMe) ₂] litorin	pEE(OMe) ₂ WAVGHFM-NH ₂	1098
PG litorin	pEGGGPGinWAVGHFM-NH ₂	1352
Rohdei litorin	pELWATGHFM-NH ₂	1034
Ranatensin	pEVPQWAVGHFM-NH ₂	1280
Phyllolitorinler		
Phyllolitorin	pELWAVGSFM-NH ₂	1019
[Leu8] phyllolitorin	pELWAVGSLM-NH ₂	985
[Thr5, Leu8] phyllolitorin	pELWATGSLM-NH ₂	987

Bombesin insan ve fare kanser modellerinde çeşitli kanserlerin büyümesini uyaran, 14 amino asitlik, ciltten izole edilen bir peptiddir. Hücre yüzeyine G-proteinine bağlı reseptör seçici olarak bağlanır. Bu nedenle, nöroendokrin hücrelerinden BN/GRP'nin salgılanmasının androjen-bağımsız prostat kanserinin ilerlemesinden sorumlu olabileceği önerilmiştir [21]. GRP yaygın olarak akciğer ve gastrointestinal yollarda dağılır. Küçük hücreli akciğer kanseri (SCLC), meme, prostat, ve pankreas kanserlerinde üretilir, büyüme faktörü ve tümör belirteci olarak işlev görür. Şu günlerde, GHRH'nin (Growth hormone–releasing hormone; Büyüme hormonu salgılatıcı hormon) prostat kanseri içeren insan tümörleri tarafından üretilmesi nedeniyle, pek çok araştırmacı potansiyel anti-kanser terapötikleri olarak GHRH antagonistlerinin gelişimine odaklanmış durumdadır. Prostat kanseri ve metastazlarındaki peptidler için reseptörlere hedeflendirilebilen bombesinin sitotoksik analoglarının kullanılabilmesi, prostat kanseri tedavisinde ekibimiz için umut verici bir yaklaşımdır.

GRPR (gastrin-releasing peptide receptor, gastrin salgılayan peptid reseptörü) agonistlerinden;

AGBBN (Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) ve MAGBBN (Gly-Gly-Gly-Arg-Asp-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met-NH₂) ile

GRPR antagonistlerinden;

ATBBN (D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NHCH₂CH₃) ve MATBBN (Gly-Gly-Gly-Arg-Asp-Asn-D-Phe-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-NHCH₂CH₃) dizileri bombesinin analoglarıdır.

2.1.4.10 Kadherinler

Kanser Patolojisinde Epitelyal Mezenkimal Dönüşüm

Epitelyal mezenkimal dönüşüm çok dinamik ve çok basamaklı bir olaydır. Olaylar koordineli bir şekilde gelişir. Önce kohezyon kaybı oluşur, bazal membran ve ekstrasellüler matriks hasara uğrar. Daha sonra motiliteyi artıran hücre iskeletinin aktivasyonu ve yeniden düzenlenmesi gerçekleşir. Son olarak stromal kompartmana göç gelişir. Epitelyal mezenkimal dönüşüm gelişmesinde birçok faktör rol almaktadır. Bunlar:

-Büyüme faktörleri ve bunların reseptörleri (tirozin veya serin treonin kinaz reseptörleri);

-Hücre dışı matriks ile ilişkili moleküller (integrinler, kollajenler, matriks parçalayan protezlar);

-Signal taşıyıcı Ras, Src veya β -katenin yollarındaki aktivasyon ve Rho GTPaz aktivite dengesindeki kayma, aktin bağlanmasını sağlayan protein fascin oluşumuna yol açabilir, bu da daha fazla hücre-hücre bağlantılarının ayrışmasına neden olur.

Sonuç olarak tümör hücreleri komşu hücrelerden ayrılarak hareket kazanır, epitelyal kompartmanı terk eder ve migrasyon yaparak çevre stromaya invazyon gösterir. Vimentin epitelyal mezenkimal dönüşüm sırasında upregüle olur, onun ekspresyonu migratuar fenotiple ilişkili görünmektedir.

Kadherinler, embriyolojik dokuların oluşumu ve stabiliteleri için gerekli, hücreler arası yapışma olaylarının başlaması ve devamı için kritik öneme sahip olan hücre adezyon molekülleridir. Bu ailenin bireyleri, sıçan embriyosunun blastomerlerinde tek hücre aşamasında saptanmıştır ve hücrelerin implantasyonu ve sonraki morfojeneze yol açan olaylarda vazgeçilmez yapılardır. Kadherinlere karşı oluşmuş antikorlar, embriyolojik dokulara eklendiğinde, hücre-hücre yapışmasının kopması sonucu doku yapısında şiddetli bozulmalara neden olur. Kadherinler, moleküler ağırlıkları 120,000-140,000 kDa arasında değişen, yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{+2} bağımlı transmembran proteinlerdir. Kadherinler, plazma membranındaki dağılımlarına dayanarak, klasik ve desmozomal olarak sınıflandırılabilirler. Kadherin aracılı adezyon, ısıya bağımlıdır ve Ca^{+2} gerektirir. Kadherinler yapısal olarak birbirleri ile benzerlik gösterirler. Birçok tekrarlayan ilmikten (domain) oluşan ve Ca^{+2} 'a bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre dışı N-ucu ile, kadherinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümle bağlantılı tek bir transmembran kısımdan oluşur. Sitoplazmik kısım üç sitoplazmik protein ile ilişkilidir; bunlar alfa, beta, gama katenindir. Kadherinler üzerinde bulundukları dokulara göre isimlendirilirler ve bugün bilinen beş kadherin grubu vardır [24].

E-kadherinler: Epitel hücrelerinde eksprese olurlar.

P-kadherinler: Plasentada eksprese olurlar, ancak belirli dönemlerde diğer dokularda da bulundukları bildirilmiştir.

V-kadherinler: Endotel hücreleri üzerinde eksprese olurlar.

N-kadherinler: Nöral dokularda ve kas hücrelerinde eksprese olurlar.

H-kadherinler: Kalp kasında eksprese olurlar. Desmoglein, desmocollin gibi kadherin ailesi ile daha uzak ilişkili moleküller de vardır [24].

Kadherinlerin adeziv fonksiyonunda Kadherin/katenin haberleşmesinin önemli olduğu düşünülmektedir. Fibroblastlarda sitoplazmik kısmı bulunmayan E-kadherin ekspresyonunun fonksiyonel bir hücre-hücre adezyonu sağlayamadığı bildirilmiştir. Bunun muhtemel sebebi kateninlerle irtibat kurulamaması olabilir. Kadherinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. Yapışma kavşaklarında fermuara benzer yapılar oluştururlar. Bu grupta bulunan desmosomlar hücre iskeletinin ara flamanları için kutuplaşma noktaları oluştururlar. Kadherinler, birbiri ile genelde homofilik karakterde ilişkiye girerler. Karşılıklı hücrelerde bulunan aynı kadherinler birbirine bağlanarak hücre-hücre adezyonunu sağlarlar. Kadherinlerin bu özelliği yukarıda bahsedilen histogenetik dağılımı sağlar. Kadherinler embriyoda morfogenezden, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Embriyoda özgün adezyon moleküllerinin ekspresyonu hücre göçü ve doku diferansiyasyonu için gereklidir.

Epitelyal bir hücrenin mezenkimal bir hücreye dönmesi ile birlikte morfolojisinde, arşitektüründe, adezyonunda ve migrasyon kapasitesinde değişiklikler oluşmaktadır. Epitelyal mezenkimal dönüşümde N-kadherin, vimentin, β -katenin, snail 1, snail 2, twist, EF1/ZEB 1, SIP1/ZEB2, E47 artarken, E-kadherin azalır. Epitelyal mezenkimal dönüşümde migrasyon kapasitesi ve invazyon artarken apoptoza direnç gelişir [25].

Epitelyal mezenkimal dönüşümün belirleyicileri Çizelge 2. 4'de görülmektedir [26].

Çizelge 2. 4 Epitelyal mezenkimal dönüşümün belirleyicileri

Artan proteinler	Azalan proteinler	Aktivitesi artan proteinler	Nukleusta artan proteinler	Gelişen olaylar
N-kadherin Vimentin Fibronektin Snail 1 (snail) Snail 1 (slug) Twist Goosecoid FOXC-2 Sox10 MMP-2 MMP-3 MMP-9 İntegrin	E-kadherin Desmoplakin Sitokeratin Ocludin	İLK (Integrin-linked protein kinase-İntegrin bağlantılı protein kinazı) GSK-3beta Rho	β-katenin Smad-2/3 NF-k beta Snail 1 (snail) Snail 1 (slug) Twist	Migrasyon artışı İnvazyon artışı Hücre şeklinde uzama

Şunu da belirtmek gerekir ki, tümörlerin büyük çoğunluğunda epitelyal mezenkimal dönüşüm gelişmemektedir. Tümör patolojisinde epitelyal mezenkimal dönüşüm gelişen tümörler tüm tümörler içinde % 1'den azdır. Gelişiminde epitelyal mezenkimal dönüşümün rol oynadığı tümörler Çizelge 2. 5'te verilmiştir.

Çizelge 2. 5 Epitelyal mezenkimal dönüşümün rol oynadığı tümörler

Tümör tipi	Lokalizasyon	Dokunun orijini
Karsinosarkom/Sarkomatoid karsinom	Uterus, meme, akciğer, gastrointestinal sistem	Epitel (endo-mezo-ektoderm)
Malign mezotelyoma	Periton ve plevra serozal yüzeyi	Mezotel (mezoderm)
Seks kord stromal tümör	Over	Over yüzey epiteli
Ameloblastom	Oral kavite, maksilla	Ameloblastik epitel (endoderm)

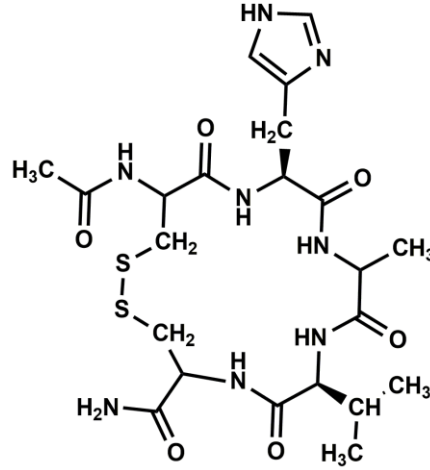
Eksherin (ADH-1): (ADH-1)c, antineoplastik ve antianjiogenik aktiviteye sahip, siklik pentapeptid vaskular-hedefleyici küçük bir ajandır. N-kadherini spesifik ve yarışmalı olarak bloklama özelliğine sahiptir. Bunun sonucu olarak tümör vaskular sistemi hasar görür, tümör hücre büyümesi inhibe edilir, tümör hücresi ve endotelyal hücre apoptozu indüklenir.

N-kadherin kalsiyum-aracılı hücre-hücre adezyonu ve sinyal mekanizmasına katkı sağlayan, kadherin süperfamilyasından bir hücre-yüzey transmembran glikoproteinidir. Bu proteinler bazı agresif tümörlerde ve bazı tümör kan damarlarının perisitlerinde düzenleyici olabilir. Normal epitel hücreleri epitelyal (E)-kadherini sunar. İyi huylu karsinom hücreleri ise E-kadherin sunumunu durdurur ve yerine N-kadherin sunar. E-kadherin kaybı ile N-kadherinin anormal sunumu tümör hücrelerinde polarite kaybına, apoptoz direncine, yayılıma ve metastatik oluşuma neden olur. Sonuç olarak N-kadherin antagonistleri tümör hücre apoptozuna ve metastaz oluşumuna neden olma potansiyeline sahiptir. Tümör hücrelerinin davranışını düzenlemede N-kadherin, fibroblast büyüme faktörü reseptörü ile iç etkileşime ve fibroblast büyüme faktörü reseptörünün aktivasyonuna katkı sağlar [27-29].

N-kadherinin kanser hücre metastazlarını etkileyen moleküler mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Metastatik proses süresince N-kadherin-tümör hücreleri ya da endotelyal veya stromal hücreler arasındaki iç etkileşim tam manasıyla keşfedilememiştir. Özellikle metastazların oluşumunda kadherinin rolünün belirlenmesine gerek duyulmaktadır.

Çalışmalar gösteriyor ki, metastazların oluşumu için potansiyel olarak önemli bir faktör olan N-kadherin, insan prostat kanserinde androjen tüketimi ile indüklenir. Dahası, N-kadherinin sunumu Gleason skoru ve metastazlar ile pozitif bir bağlantı göstermiştir. Araştırma sonuçlarına göre; tümör büyümesindeki artış yeterli kan kaynağına bağlıdır. Bunun sonucu olarak anjiogenez tümör büyümesini sağlamada merkezi bir rol oynar. N-kadherin kan damarı stabilitesinin sağlanmasına ve anjiyogeneze katkı sağlar. Sonuç olarak tümör büyümesi N-kadherine bağlıdır [30].

Çalışmalar ile tümör ve tümör damar yapısındaki bu antagonistlerin etkisi, ek olarak; ADH-1'e en çok yanıt veren tümör tipleri tespit edilmelidir.



Şekil 2. 5 (ADH-1)c'nin yapısı

2.1.4.11 Terapötik Olarak Peptidler

Peptidler, amid bağı yoluyla bağlanmış amino asitlerden oluşur. Hayvanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar dahil olmak üzere doğal yollarla oluşan tıbbi olarak aktif peptidlerin çeşitli kaynakları mevcuttur. Bu tıbbi doğal peptid ürünleri, anti-mikrobik, anti-viral, anti-enflamatuar ve anti-kanser aktiviteler [31-33] içeren farmasötik etkinliklere sahiptir ve terapötiklerin geliştirilmesi için yeni iskeleler sağlar [34-37]. Doğal olarak oluşan amino asitler (L-amino asitler), D-amino asitler ve doğal olmayan amino asitler tıbbi olarak aktif peptidleri sentezlemek için farklı bir kaynak sağlamıştır. Bir peptid içindeki amino asit yan zincirlerini modifiye etmek, arzu edilen profilde ilaç dizaynında kimyagerlerin istenen özellikte peptid tasarlamasını sağlar. Buna ek olarak, peptid metabolitleri toksik değildir ve insan vücudundan hızla atılır [38]. Bu avantajlar, peptidleri etkili terapötikler olarak iyi bir kaynak haline getirir. Lineer peptidler biyolojik moleküller ile spesifik olmayan bağlanmayı sağlayan yüksek derecede konformasyonel esneklik sergiler. Lineer peptidler, esneklikleri ve korumasız uçları nedeniyle enzimatik bozunmaya da duyarlıdır [39]. Alternatif olarak, siklik peptidler biyolojik hedeflere seçici olarak bağlanan rijit ve sınırlı konformasyonlara sahiptir [40], [41]. Bu da hücrelerde uzun yarı ömür sağlar [41], [42].

2.1.4.12 Anti-Kanser Ajan Olarak Peptidler

Kanser, hücresel mutasyonların neden olduğu, sınırsız hücre çoğalması, bölünme ve apoptoz direncinin artmasına neden olan bir hastalıktır [43]. Kontrolsüz hücre

döngüsü, komşu dokuları istila edebilen, kan ve lenf sistemleri yoluyla vücudun diğer bölgelerine yayılabilen habis tümörlerin oluşumuyla (metastaz) sonuçlanır. Yayılma kontrol dışı olduğu takdirde kanser ölüme neden olur. Kanser sonradan kazandığı sekiz özellik ile de tanımlanmıştır: (I) çoğaltıcı sinyal vermeyi sürdürme, (II) büyüme inhibisyonundan kaçınma, (III) invazyon ve metastazı aktive etme, (IV) çoğalma immortaliteyi sağlama, (V) anjiyogenezi indüklemeye, (VI) hücre ölümüne direnç, (VII) enerji metabolizmasının yeniden programlanması ve (VIII) bağışıklık tahribatından kaçmak [44]. Kanser tedavilerinin üç ana kategorisi vardır: cerrahi, radyasyon ve kemoterapi [45]. Kemoterapi, kanserli hücreleri öldürmek için bir sitotoksik ajan kullanır. Konvansiyonel kemoterapötikler olarak yıllardır Fluorourasil [46], Sisplatin [47] ve Paclitaxel [48] gibi ajanlar kullanılır. Fluorourasil 40 yıldan uzun süredir kanseri tedavi etmek için kullanılmıştır. Fluorourasil bir pirimidin analogudur ve hücre apoptozuna sebep olan DNA sentezinin sona ermesiyle sonuçlanan timidilat sentezazı geri dönüşümsüz olarak inhibe eder. Sisplatin, DNA hasarına neden olan ve hücre apoptozunu indükleyen platin içeren bir anti kanser maddesidir. Başlangıçta *Taxus brevifolia* bitkisinden izole edilen Paclitaxel, mitotik engelleyicidir ve sonuçta hücre büyümesinin yanı sıra mitozun sona ermesiyle sonuçlanan mikrotübülleri stabilize eder. Bununla birlikte, konvansiyonel kemoterapinin ilaç direnci ve spesifikite eksikliği gibi bazı dezavantajları vardır [49]. Bu nedenle, yeni spesifik anti-kanser ajanları dizaynı önemlidir. Peptidler, proteinleri spesifik olarak modüle etmek için büyük bir ilham kaynağı olarak görev yapmaktadır [34-37].

2.2 Reseptör Kavramı

Hedef hücre membranında ya da sitoplazmada bulunan protein yapısındaki makromoleküler odaklara “reseptör” adı verilir. Reseptörler, hücrelerin çevreleriyle haberleşmesini sağlayan anahtar moleküllerdir. Hücre ya da hücre topluluğunun oluşturduğu organizmanın canlılığı için mutlaka gereklidirler. Reseptör kavramının tarihçesi oldukça eskilere dayanır. Langley’in 1905 yılında nöromusküler plakta nikotin ve kürarın etkilerine duyarlı maddelerden söz etmesi ve 1910’da Ehrlich’in “Corpora non agunt nisi fixata” (bağlanmayan maddelerin etkisi yoktur) teorisini ortaya atmasıyla, reseptör kavramı ilk kez farmakolojiye girmiştir. Uzun yıllar farmakolojide,

ilaçların etki mekanizmalarının açıklanmasında ve sınıflandırılmasında, reseptörler hipotetik bir kavram olarak kullanılmıştır. 1970 yılından sonra, reseptörler üzerinde yapılan çalışmalarda önemli gelişmeler olmuştur. Reseptörler bir kavram olmaktan çıkıp, enzimler gibi birçok özellikleri bilinen, izole edilebilen, protein yapısındaki makromoleküller oldukları gösterilmiştir. Günümüzde, trityum, C-14 (karbon-14) ve bazen de I-125 ile işaretlenmiş yüksek spesifik radyoaktif ligandlarla, duyarlı bir şekilde *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda, ilaç-reseptör etkileşimleri incelenebilmektedir. Fizyolojik ve klinik kavramların çoğu reseptör mekanizmalarıyla aydınlatılmıştır.

2.2.1 İlaç-Reseptör Etkileşmesi

İlaç ya da mediyatör molekülüyle, reseptör molekülü arasındaki etkileşim anahtar-kilit örneğine benzemektedir. Kilit rolü oynayan reseptörler, ancak kendilerine uyan (spesifik) moleküllerle bağ kurarak farmakodinamik etki (intrensek aktivite) oluştururlar. Tanımadıkları, yani kendilerine uymayan moleküllerle bağlanmazlar. Spesifik reseptörlere bağlanmalarıyla biyolojik bir etki başlatabilen moleküllere agonist adı verilir. Hareket halindeki ilaç ya da mediyatör molekül ile hücre çevresinde kısmen sabit durumda bulunan reseptör molekül arasındaki bağlanma olayı fizikokimyasal yasalara göre olmaktadır. Reseptörlerle, kendine bağlanan molekül arasındaki bağlar, çoğunlukla fazla enerjiye gereksinim duymayan van der Waals (1 kcal/mol), hidrojen (2-5 kcal/mol) ve iyonik (5 kcal/mol) bağlardır.

$[M] + [R] \rightarrow [M-R] \rightarrow \text{Farmakodinamik etki (intrensek aktivite)}$

M: İlaç ya da mediyatör molekülü

R: Reseptör

Bunlar kolaylıkla çözülebilen (tersinir) bağlardır. Bazı durumlarda tersinmez kovalent (40- 140 kcal/mol) güçlü bağlar da oluşabilmektedir. Tedavide çoğunlukla sakıncalı olan bu tür bağlar, asetilkolinesteraz ya da DNA' nın alkilasyon reaksiyonunun, yavaş tersinir (ya da tersinmez) inhibisyonunun istendiği durumlarda yararlı olabilmektedirler.

2.2.2 Mesaj Moleküller

Memelilerinki gibi multiselüler bir organizmada intraselüler mesaj iletişimi, mesajcı (ulak) ya da kısaca mesaj moleküllerin aracılığı ile olmaktadır. Mesaj molekülleri örneğin, nörotransmitterlerde olduğu gibi, özel hücre gruplarından (hormon) kan yoluyla hedef hücreye mesaj taşırlar. Kendisine ulaşan bu mesajlarla aktivitesi değişen hücreler, spesifik olarak bu mesaj molekülleri tanıyan yani, tersinir olarak kendine bağlayan reseptörlere sahiptirler. Bu reseptörlerin çoğu, hücre ile çevresi arasında bulunan “hücre membranı” üzerine yerleşmişlerdir. Reseptörler üç yönlü kompleks bir yapıya sahip proteinlerdir. Spesifik olarak bir mesaj molekül bağlarlar. Reseptör-mesaj molekül bağlanması karşılıklı olarak birbirlerini tanımayla (anahtar-kilit örneği) gerçekleşir. Organizmanın doğal mesaj moleküllerinin (nörotransmitterler, hormonlar) çoğu agonist özelliktedirler. Bu moleküller kendilerine duyarlı reseptörleri işgal ettiklerinde (bağlandıklarında) fizyolojik bir etkinin (örneğin kas kasılması) başlamasına yol açarlar. Ortaya çıkan bu fizyolojik etki gücü agonist molekülün konsantrasyonu ile orantılıdır. Diğer taraftan aynı reseptöre bağlanıp herhangi bir etki oluşturmeyen, ancak mesaj molekülün oraya bağlanıp etki oluşturmaya engel olan antagonist adı verilen moleküller vardır. Birçok ilaç molekülü, aynı reseptörde doğal mesaj molekülün etkisini antagonize ederek, kendi etkilerinin, ortaya çıkmasını sağlarlar. Örneğin, antihistaminikler, organizmanın doğal bir mediyatörü olan histaminin kendi reseptörleri ile etkileşmesine engel olarak, oluşturabileceği patolojik etkileri (allerji, bronkokonstriksiyon, vb.) önlerler [50].

2.2.3 Peptid ve peptid reseptörlerinin kanserdeki önemi

Kanser alanında peptid ve peptid reseptörlerine artan ilginin ana nedenlerinden biri de belli başlı pek çok insan kanser türünde peptid reseptörlerinin bulunması ve bu sayede uygun peptid tarafından hedef alınabilme imkanının olmasıdır. Kanserli dokularda peptid reseptörlerinin kanserli dokulara yakın normal dokular ve/veya üretildiği dokulara göre daha fazla bulunduğu pek çok çalışma ile kanıtlanmıştır. Bu reseptörlerin moleküler olarak hedef alınması temel olarak iki yolla gerçekleştirilir.

2.2.3.1 Radyoligandlar için bağlanma bölgeleri

Reseptörler temel olarak peptid analogları için bağlanma bölgeleri olarak kullanılırlar. Biyolojik fonksiyonları çok fazla dikkate alınmaz. Bu strateji peptidin, reseptör aracılığı ile fizyolojik veya patofizyolojik davranışına değil, tümörden kaynaklanan reseptörler varlığında peptid analoglarının yüksek ilgi ile bağlanmasına eğilmiştir. Peptid reseptörlerinin radyoışaretleli peptidler ile teşhis ve radyoterapi amaçlı hedef alınması bu prensibin başarılı klinik uygulamalarıdır. Bu prosedür G protein ile eşleşmiş peptid reseptörlerinin önemli bir karakteristik özelliğinden faydalanır. Bu özellik hücre membranında reseptör-ligand etkileşimiyle ikisinin birden hücre içine alınmasıdır. Hücre içine alınmış olan reseptör-radyoligand kompleksi radyoizotopun hücre içinde birikmesini ve böylece hedef bölgedeki radyoaktif sinyalin artmasını sağlar. Böylece hedeflenen hücrenin seçici olarak yok edilmesi sağlanabilir.

2.2.3.2 Fonksiyonel cevaplar ortaya çıkarmak

Alternatif olarak radyoışaretlenmemiş toksik olmayan peptid analoglarını kullanarak belirli bir biyolojik cevap çıkarmak çok uzun zamandır kullanılmaktadır. Somatostatin ve analogu octreotid' in hormon salgılanmasını inhibe etmesi peptid reseptörleri aracılığı ile oluşan biyolojik cevaba en iyi örnektir. Ek olarak çeşitli peptidlerin pek çok tümör çeşidinde *in vitro* olarak büyüme düzenleyici rol oynadıkları düşünüldüğünde belirli peptid analogları uzun dönem tedavide *in vivo* olarak tümörün büyümesini yavaşlatabilir ya da durdurabilirler. Schally ve ark. ile Moody ve ark. çeşitli peptid reseptörlerinin bulunduğu hayvan tümör modelleri üzerinde yaptıkları çalışmalarda spesifik, radyoaktif ve sitotoksik olmayan peptid analogları kullanarak tümör büyümesinin yavaşlatılabileceğini ya da durdurulabileceğini göstermişlerdir [51], [52].

2.3 Mikrodalga Destekli Katı Fazda Peptid Sentezi (SPPS)

Peptid, amino asit monomerlerinden oluşmuş kimyasal bir yapıdır. Peptidler yapılarında bulunan amino asitlerin fonksiyonel gruplarına ve dizilişine göre farklı özellikler göstermektedir. Canlı organizmalardaki kan basıncı, ağrı, hafıza, iştah, büyüme gibi birçok olayı kontrol etmeleri peptidleri potansiyel tedavi araçları olarak ilgi odağı haline getirmektedir. Peptidler genel olarak üç şekilde elde edilebilir. Bunlar

dokudan saflaştırma ile, genetik mühendisliği yöntemlerinin kullanımı ile ve kimyasal sentez yoluyla. Peptid ve proteinlerin yer aldığı biyolojik işlemlerin ilerleyişi hakkında bilgi sahibi olmak, bu işlemlerin kontrolü ve sonuçları bakımından büyük önem taşımaktadır. Peptidler hücre-hücre haberleşmesi, metabolizma, immün cevap ve üreme gibi pek çok biyokimyasal işlemde yer almaktadır. Peptidlerin fizyolojik ve biyokimyasal olaylarda çok önemli roller üstlenmeleri onların birer potansiyel ilaç adayı olmalarına arttırıcı etki göstermektedir [11], [53], [54].

Peptid sentezi klasik çözelti yöntemi ve katı faz yöntemi olmak üzere iki kategoride toplanmaktadır. Son yıllarda klasik çözelti yöntemi ile kısa peptid dizilerinin sentezi ilaç sektöründe devamlılığını korusa da, özellikle uzun peptid dizilerinde katı fazda peptid sentezi (SPPS) yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır [55].

Katı faz tekniğinin çözeltiyle yapılan sentezlere göre oldukça fazla avantajları bulunmaktadır. Katı faz tekniğinde, çözünmeyen reçineye bağlı peptid, reçinenin yıkanması veya filtrasyonu sırasında önemli bir kayba neden olmadan ayrılmaktadır. Tüm reaksiyonların tek bir haznede gerçekleştirilmesi ile, kap değiştirme ve aktarma gibi işlemler sırasında olası kayıplar engellenmiş olmaktadır [56].

1962 yılına kadar birçok organik kimyacının üzerinde çalıştığı peptid sentezi, çözelti fazında gerçekleştirilmekteydi. 1962 yılında, Bruce Merrifield, polipeptidlerin çözünmeyen katı bir polimer destek (reçine) üzerine bağlanarak kimyasal olarak sentezlenmesini araştırmış ve geliştirdiği metodla ilgili olarak 1984 yılında Nobel ödülüne layık görülmüştür [57], [58]. Aynı zamanda, ilk yarı otomatik peptid sentez cihazı da Merrifield tarafından geliştirilmiştir [55].

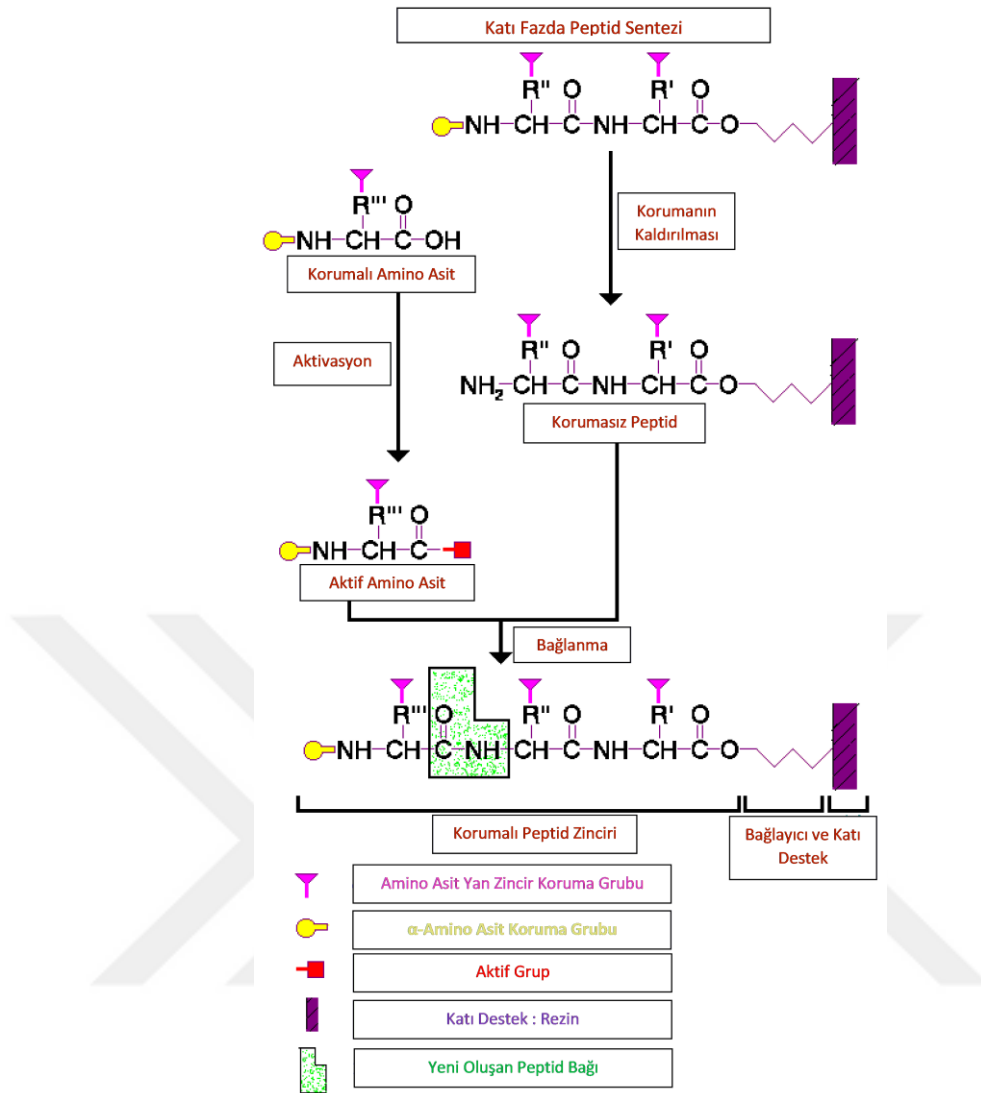
Katı faz peptid sentezi tekniği ile ilgili önemli gelişmeler, 1968'de Arnold, 1966'da Ferriere, 1973'de Gaozza, 1968'de Izdebski ve Draberek, 1970'de Losse ve Neuburt, 1971'de Marshall, 1973'de Meinoffer, 1968'de Okuda, 1973'de Shappard ve 1968'de Shimonishi, 1967'de Suziki ve Ando, 1968'de Vesa, 1970'de Waki ve Izumiye, 1971'de Jojima tarafından yapılmıştır [53], [54].

SPPS tekniği, peptid dizisinde sıradaki aminoasit kalıntısının (peptid ya da başka tür oligomer) durgun ve katı bir parçacık (katı faz, reçine) üzerindeki bağlı aminoaside tutturulması ve bu aminoasit diziliminin sentez boyunca bu reçine üzerine bağlı

kalmasına dayanır. Sentez, koruma gruplarının ayrılması (deprotection), yıkama (washing), aktivasyon (activation), bağlanma (coupling) ve kırılma (cleavage) aşamalarından oluşur. Deprotection için %20'lik piperidin-DMF çözeltisi kullanılır. Sentez sırasındaki tüm yıkama işlemleri DMF ile yapılır. Aktivasyonda aktivatörler (HOBt, HCTU, HBTU vb.) ve aktivatör bazlar (DIEA, NMP vb.) kullanılır. Son adımda, istenilen ürün reçineden kırma işlemi ile ayrılır [56].

Katı faz peptid sentezinde kullanılan polimerik destek maddeleri için gerçek katılardan daha çok jeller tercih edilmektedir. Peptid sentezi esnasında gerçekleşen reaksiyonlar polimerin partikülleri arasında olmaktadır. Bu nedenle seçilecek olan reçinelerin, çözücülerde şişmesi ve reaktanların bu polimerin partikülleri ile difüzyon yoluyla etkileşimleri gerekmektedir.

Bu yöntemde, amino asitlerin N uçları ve yan zincirleri (R) koruma grupları ile korunmaktadır. Koruma grupları ile hem amino asidin yan zincirlerinin birbirleri ile reaksiyona girmeleri engellenmiş olur hem de diziye her amino asitin eklenmesi ile dizinin sadece bir amino asit uzaması sağlanmış olur. Bu amaçla, baza karşı duyarlı ve piperidin, piperazin gibi bazlarla kolayca uzaklaştırılabilen bir N- α koruma grubu olan Fmoc (9-Fluorenylmethoxycarbonyl) peptid sentezinde kullanılmaktadır [59-61].



Şekil 2. 6 Kıyafet fazda peptid sentezinin genel döngüsü [62]

2.4 Radyofarmasötik

Radyofarmasi, radyofarmasötiklerin hazırlanması, kalite kontrolü ve uygulanması ile uğraşan bilim dalıdır. Radyofarmasötikler ise; insanlarda teşhis ve tedavi amacı ile kullanılan, bileşiminde radyonüklid içeren ilaçlardır. Günümüz nükleer tıpta hemen hemen radyofarmasötiklerin % 95'i teşhis % 5'i ise tedavi amacıyla kullanılır. Radyofarmasötikler pek çok durumda izleyici miktarlarda kullanıldıkları için farmakolojik etkiye sahip değillerdir. Bu durumlarda herhangi bir doz-cevap ilişkisi göstermezler ve böylece de konvansiyonel ilaçlardan farklılık gösterirler. İnsanlara verildikleri için steril, pirojensiz olmalıdırlar ve bir konvansiyonel ilaç için gerekli tüm kalite kontrol ölçümlerine tabidirler. Radyofarmasötik terimi yaygın olarak

kullanılmasına rağmen çeşitli çalışma grupları radyoizleyici, radyodiagnostik ajan, işaretli izleyici gibi terimler de tarafından kullanılmıştır. Kullanılan bu isimlendirmeler, bu bileşiklerin gerçek anlamda ilaç olarak değil, teşhis amaçlı ajanlar olarak kullanıldıklarını gösterir. Bu görüşlerin aksine, FDA (Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu) radyofarmasötikleri, teşhis veya tedavi ajanları olmalarına bakmadan ilaç olarak kategorize eder. Dikkat edilmesi gereken bir diğer nokta da radyokimyasallar ile radyofarmasötikler arasındaki farklılıktır. Radyokimyasalların sterilite ve nonpirojenite eksikliğinden dolayı insanlara verilmesi uygun değildir. Diğer taraftan radyofarmasötikler steril ve nonpirojendirler ve insanlara güvenle verilebilirler. Radyokimyasallar steril ve nonpirojen hale getirilseler bile ilaç ruhsatlama ile ilgili ulusal ve uluslararası mevzuatlar tamamlanmadan radyofarmasötik olarak kullanılamazlar. Bir radyofarmasötik: radyonüklid ve ligand olmak üzere iki kısımdan oluşur. Radyofarmasötiklerin kullanışlılığı bu 2 kısmın özellikleri ile belirlenir. Bir radyofarmasötiğin dizaynında; öncelikle bir organ içinde lokalize olacak veya organın fizyolojik fonksiyonuna katılacak ligand seçilir. Daha sonra uygun bir radyonüklid, seçilen liganda takılır, bu işleme işaretleme denir. Radyofarmasötiğin verilmesinden sonra, ondan yayılan radyasyonlar bir radyasyon dedektörü ile algılanır. Böylece morfolojik yapı veya organın fizyolojik fonksiyonu belirlenebilir. Bir radyofarmasötiğin insana verilmesi için güvenli ve nontoksik olması gereklidir. Vücuda verilen radyofarmasötiklerden yayılan radyasyonlar gama kamera ile kolayca saptanabilir [63].

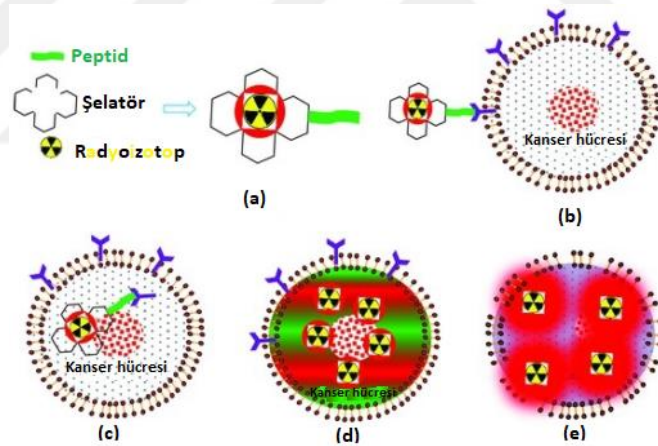
Nükleer tıpta uygun radyofarmasötiğin seçimi çok önemlidir. Tanısal çalışmaların amacı, biyolojik etkisi en az olan izlenebilir fotonu tercih etmek olduğundan ideal tanısal radyofarmasötiklerin özellikleri sitotoksik etkiye sahip olması istenen terapötik radyofarmasötiklerin özelliklerinden çok farklıdır. Her iki durumda da bazı ortak özellikler vardır; bunlar patolojik dokuda yüksek bir hedef/zemin (artan) oranı elde etmek ve normal organlardaki radyasyon etkisini en az tutmaktır. Sonuçta tanısal radyofarmasötiklerde istenen özelliklerin birçoğu tedavide kullanılan radyofarmasötikler için de söylenebilir.

Günümüzde çoğunlukla kanser olmak üzere pek çok hastalığın tanı ve tedavisine yönelik olarak radyoaktif maddeler ve bunlarla ilgili görüntüleme yöntemleri sıklıkla

kullanılmaktadır. Kullanılan radyoaktif maddeler çoğunlukla radyofarmasötik ajanlar haline getirilerek uygulanır.

2.4.1 Peptid Radyofarmasötikleri

Bir radyofarmasötik radyonüklid ve farmasötik kısım olmak üzere iki temel bileşenden oluşur: Bunlardan birinin eksikliğinde radyofarmasötik yararsızdır. Radyofarmasötiklerin tasarımında, ilk önce istenen organ tarafından alınacak veya organın fizyolojik fonksiyonu ile uyumlu bir farmasötik seçilir. Daha sonra ise, yaydığı radyasyonun radyasyon dedektörlerince kolayca tespit edilebileceği, uygun bir radyonüklidle (radyoaktif çekirdek) birleştirilir (Şekil 2.7). Bu sayede, organ fizyolojik fonksiyonu ve morfolojik yapısı değerlendirilebilir. Seçilen farmasötik, insana uygulamada güvenilir olmalı ve toksik olmamalıdır. Seçilen radyonüklid ise; hastaya en az radyasyon dozu verecek ve nükleer ölçüm araçları ile kolayca belirlenebilecek nitelikte olmalıdır [64].



Şekil 2. 7 Peptid molekülünün radyoaktif atomla işaretlenmesi a) radyo işaretli peptid b) hedeflendirilmiş radyo işaretli peptid c) etkin maddenin kanser hücresine ulaştırılması d) kanser hücresinin iyonize radyasyona maruz bırakılması e) kanser hücresinin yok edilmesi

Nükleer Tıp güvenilir, ağrısız ve pek çok yönleme göre bazı hastalıkları önceden gösterebilen görüntülemenin kullanıldığı bir alandır. Nükleer Tıp'ta hazırlanan bazı özel kimyasal bileşikler vücuda verilerek ilgili organ ve sisteme ait fizyolojik görüntüler elde edilmekte ve bu yolla birçok organ ve sistemin fonksiyonları değerlendirilmektedir [65]. Nükleer Tıp'ta radyoaktif elementlerin tedavide kullanılmasında temel prensip, bir organ veya doku içerisine lokal olarak verilen veya metabolik taşıyıcılar aracılığı ile

hedef dokuya yönlendirilen radyoaktif maddelerin, çevresine yaydığı ışımlar yoluyla hedef hücrelerde oluşturduğu yıkıcı etkiden faydalanmaktadır. Bu amaçla gerek onkolojik amaçlı gerekse onkoloji uygulamaları dışında, etkinliği ve güvenilirliği kanıtlanmış birçok radyonüklidin tedavi amaçlı uygulaması bulunmaktadır. Genel olarak kanser tedavisinde kullanılan lokal (cerrahi, radyoterapi ve lokal kemoterapi) veya sistemik (kemoterapi) tedavi yaklaşımlarından farklı olarak Nükleer Tıp, kanser tedavisinde hedefe yönlendirilmiş sistemik tedavi yaklaşımını kullanmaktadır.

Bu tedavilerde amaç, hedef hücrelerde radyasyon etkisine bağlı sitotoksik etki (hücre ölümü) oluşturulurken, hedef hücreleri çevreleyen dokularda hücre hasarını mümkün olan en az seviyede tutmak ve vücudun geri kalan kısımlarını radyasyonun zararlı etkilerinden korumaktır [65]. Radyoaktif maddeler ışıma yaparak belli bir yarı ömür kuralı uyarınca sürekli azalma gösterirler. Ayrıca vücuttan idrarla ve barsaklar yoluyla da atılmaktadırlar.

Radyofarmasötiklerden;

1. İlgili organın yeri ve morfolojik yapısını saptamak,
2. Organa ait hücrelerin ömürlerini belirlemek,
3. Organın veya kanın hacmini belirlemek,
4. Organda bir tümör veya kist bulunup bulunmadığını araştırmak,
5. Organa ait faaliyetlerin kontrolünü yapmak,
6. Organın ameliyattan önceki ve sonraki durumunu incelemek,
7. Organdaki doku kayıpları, infarktlar, nekrozlar ve abseleri anlamak,
8. Organda bulunması muhtemel olan yer değiştirme, eksiklik, durum değiştirme, ters dönme gibi durumları tespit etmek,
9. Herhangi bir tümöral dokuyu tedavi etmek,
10. Herhangi bir metastatik oluşumun önlenmesi konularında yararlanılmaktadır [65].

Radyonüklidik Tedavinin önemli avantajları vardır [65]:

- Sistemik olarak uygulandığı için hastalık tutulumu olan tüm alanlara etkilidir.
- Seçici absorpsiyon nedeniyle normal doku dozu düşüktür.
- Non-invazifdir.
- Orta ve uzun vadeli yan etkileri minimal düzeydedir.
- Tümördeki uptake tedavi öncesi belirlenebilir. Böylece toksisite azalır ve terapötik oran artar.

Peptid radyofarmasötikleri, reseptörlerine spesifik normal doku ve hücrelere kıyasla tümör dokularına çok daha yüksek oranda bağlanırlar. Gama veya pozitron yayan radyonüklidler ile işaretli peptidler (radyofarmasötikler) kullanılarak, gama kameralar (sintigrafi) ve pozitron emisyon tomografi (PET) yöntemleri ile beyin ve diğer organlardaki reseptörlerin canlı organizmada görüntülenmesi mümkün olmuştur. Böylece radyoilaşaretli peptidler ile tümör görüntülenmesi (evreleme ve yeniden evreleme) ve tedavisi yapılabilmektedir.

Bu yaklaşımda, ülkemizde ilk olarak bizzat üreteceğimiz teranostik ajanlar ile; tanısal yöntem ve tedavi yöntemi birleştirilerek, yani terapötikle benzer kimyasal yapıdaki tanısal ajan kullanarak moleküler görüntüleme ya da inceleme yaparak, tedaviye yanıt konusunda öngörüle bulunmak mümkün olacaktır. Bu yöntemin özellikle kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında radyoilaşaretli peptidlerin hedeflendirilmesi yoluyla kullanılması söz konusudur.

Bahsi geçen radyoilaşaretli peptidlerin tümör hücrelerine yüksek affinitesinin olması bir çok kanser türünün teşhis ve tedavisi için moleküler hedefleri gösterir ve bu da onkolojik nükleer görüntüleme ve endoradyoterapinin temelini oluşturur.

2.4.2 Tanısal Radyofarmasötikler

Tanısal radyofarmasötiklerin seçiminde gözönünde bulundurulan kriterler şunlardır; nükleer özellikler, biyolojik özellikler, kimyasal özellikler, ekonomi ve düzenleme durumları.

2.4.2.1 Nükleer (fiziksel) özellikler

Radyonüklidin verilen dört fiziksel özelliği incelenmelidir.

- Fiziksel yarı ömür,
- Bozunma türü,
- Yayılan foton enerjisi,
- Elde edilebilirliği.

•Yarı ömür

Bir radyonüklidin yarı ömrü; senteze, uygulamaya, biyolojik lokalizasyona ve radyofarmasötiğin artalan doku klirensine izin verecek uzunlukta olmalıdır. Eğer radyonüklit çok uzun ömürlü ise vücut gereksiz yere radyasyona maruz kalır. Altın kural, fiziksel yarı ömrün radyofarmasötiğin hazırlanması, uygulanması ve görüntülenmenin tamamlanması için geçen zamana eşit olmasıdır. Radyofarmasötiğin biyolojik tutulumunun ve klirensinin önemli değişkenler olduğu unutulmamalıdır. Eğer radyofarmasötiğin biyolojik tutulumu ve klirensi akciğer ventilasyon çalışmalarındaki gibi çok hızlı ise, radyonüklidin fiziksel yarı ömrü dozimetrenin görüş noktasından birbirini tutmaz. Efektif yarı ömür hem fizyolojik hem de fiziksel yarı ömrün etkilerini içerir. Efektif yarı ömür daima fiziksel ve fizyolojik yarı ömürden daha kısadır (eşitlik 2.1).

$$T_{eff} = \frac{T_p \cdot T_b}{T_p + T_b} \quad (2.1)$$

T_{eff} : Efektif yarıömür, T_p : Fiziksel yarıömür, T_b : Biyolojik yarıömür

Radyofarmasötiğin metabolik durumu renal ve hepatobiliyer atılım yolunu içerir ve biyolojik yarı ömrü belirlemeye yardım eder. Renal atılım yolu, mesanenin neden kritik organ olduğunu açıklar. Radyofarmasötikler kritik organ olarak genellikle bağırsakları içeren gastrointestinal yol ile atılır. Uzun yarı ömürlü radyofarmasötikler bağırsaklardan atılır ve sıklıkla uzatılmış kalış süresi nedeniyle kalın bağırsaklar yüksek doza sahiptir (Örneğin Ga-67 sitrat genellikle renal yoldan atılmasına rağmen kalın bağırsak kritik organdır).

•Bozunma Türü

Görüntüleme işlemleri, bir görüntü oluşturmak için bir elektromanyetik foton (gama ışını, x ışını) gerektirir. Fotonun yüksek oranda (abundance) yayılması ve monoenerjitik olması istenir. Beta ya da alfa ışınları gibi ayrı partiküllerden oluşmuş radyasyonlar detekte edilmez. Bu radyasyonlar her bir birim uzunluğa yüksek yoğunlukta iyonlar üretmelidir ve bundan dolayı önemli oranda doku hasarına neden olur. Bununla beraber beta ya da alfa ışınları dokudan 1-2 cm'den fazla penetre olamaz. Diyagnostik kullanım için saf bir gama yayıcı istenir ama elektromanyetik radyasyon bozunma modunun olmadığı kabul edilmelidir. İsoimerik geçiş (IT, örneğin, ⁹⁹Tc^m, Kr-81m) ile ya da elektron yakalama (EC, örneğin Tl-201, Ga-67, In-111, I-123) ile bozunan radyonüklitler en kullanışlıdır ve diyagnostiktir. İsoimerik geçiş ile ilgilendiğimiz enerji aralığı için daima bazı dönüşüm ürünleri ve auger elektronları vardır. Elektron yakalama ile daima auger elektronları ve bazı dönüşüm elektronları vardır. Bu sekonder elektronlar beta partikülleri gibi yüksek oranda iyonizedir. Bununla beraber bu bozunma türlerinden birisiyle bozunan bir radyonüklit kullanıldığı zaman maruz kalınan radyasyon oranı kabul edilebilir olmalıdır. Pozitron bozunması istisnadır, PET (pozitron emisyon tomografi) teknolojisinin temelidir. PET'de bir parçacık (pozitron) yayılır ve bir elektronla etkileşir ve 511 keV'lik bir çift anihilasyon fotonu oluşur. Bu durumda ideal pozitron radyonüklidi sadece pozitron yayar ve elektromanyetik fotonlar yaymaz.

•Foton Enerjisi

Nükleer tıptaki önemli olaylardan birisi rezolüsyon ve hassasiyet arasındaki dengedir. Bu durum gama kamera sistem kristallerini, kolimatörleri ve elektronikleri dizayn edilirken başlıca bir kaygı konusudur çünkü dizayn önemli oranda foton enerjisine bağlıdır. Enerji çok fazla azaltılmadan vücuttan çıkmasına yetecek kadar yüksek olmalıdır aynı zamanda kamera kristalinde bir fotoelektrik etkileşmeye uğrayacak kadar da düşük olmalıdır. Gama kamera elektronikleri konvansiyonel olarak radyasyonu 60-400 keV aralığında ölçecek şekilde kurulur ama bu aralığın PET için 511 keV'lik anihilasyon fotonlarının deteksiyonuna izin verecek şekilde genişletilmesi gerekir. Kristalin kalınlaştırılması etkileşme olasılığını artırır ama rezolüsyonu düşürür. Yüksek enerjili fotonlarla fotoelektrik pik ve daha iyi rezolüsyon sağlayan Compton olayı

arasında çok ayırım vardır ama yüksek enerji fotonunun kristalin içinden doğruca geçmesi muhtemeldir böylece düşük hassasiyet verir. Yüksek enerji fotonları kalın duvarlı kolimatörleri gerektirir ki bunlar uzaktaki hassasiyeti düşürür. Anger kameraları ile rezolüsyon ve sensitivite arasındaki optimum bir denge için radyofarmasötiğin emisyon enerjisi 100-200 keV arasında olmalıdır. Bu durumda ideal radyonüklitler $^{99}\text{Tc}^m$ (140 keV) ve I-123 (159 keV)'dir. Aynı günde birden fazla çalışma gerektiğinde (örneğin akciğer ventilasyon ve perfüzyon çalışmaları ya da stres ve dinlenmiş miyokard perfüzyon çalışmaları) iki yaklaşım mümkündür. Eğer farklı foton enerjilerine sahip radyonüklitlerin bir karışımı varsa, düşük enerjili radyofarmasötiği ilk önce kullanmak en iyisidir. Eğer ventilasyon çalışmaları için Xe-133 (80 keV) kullanılıyorsa, ventilasyon taraması, $^{99}\text{Tc}^m$ (140 keV) makroagregat albümin (MAA) perfüzyon imajından önce yapılmalıdır. Bu problemlidir çünkü bir ventilasyon imajı, inert gazın tek bir dozu ile elde edilebilmektedir ve bu hangi uygulamanın perfüzyon defektini göstermekte en iyisi olduğunu anlamamıza yardımcı olur. $^{99}\text{Tc}^m$ pentetat aerosolu ventilasyon çalışmaları için kullanılan en popüler radyofarmasötiktir çünkü kolayca hazırlanır, makul fiyatlıdır, birden çok görüntü verir ve $^{99}\text{Tc}^m$ 'in tüm doğal avantajlarını taşır (örn; fiziksel yarı ömrü, enerjisi, bozunma türü). Çünkü $^{99}\text{Tc}^m$ -MAA olarak aynı enerjiye sahip olduğu için, aşağı yukarı 0.5 mCi'nin total dozunda perfüzyon imajından önce verilir. $^{99}\text{Tc}^m$ -MAA pentetat aktivitesinin dağılımı için 4 mCi dozunda verilir.

•Elde Edilebilirliği

İdeal bir radyofarmasötiğin önemli özelliklerden birisi elde edilebilirliğidir. Eğer elde edilebilir değilse, diğer açılardan nasıl ideal olduğunun önemi yoktur ve yaygın bir kullanımı olmayacaktır. En kolay elde edilebilir $^{99}\text{Tc}^m$ dışındaki radyonüklitler, beta bozunması gösterir ama diyagnostik kullanım için partiküler olmayan radyasyon daha iyidir ve elektron yakalama (EC) ile oluşur. EC radyonüklitleri çekirdeklerinde nötronlardan çok proton fazlalığıyla karakterizedir. Bunlar tipik olarak bir proton hızlandırıcısından, genellikle siklotronla bombardımanla üretilir. En kolay elde edilebilen radyonüklit $^{99}\text{Tc}^m$ 'dir. Çünkü bir $^{99}\text{Mo}/^{99}\text{Tc}^m$ jeneratöründen elüe edilir. Bu jeneratör bir iyon-değişimi kolonundan farklı değildir. Jeneratörden kız $^{99}\text{Tc}^m$, anne molibden'den ayrılır. Anne ^{99}Mo β ile bozunur, yarı ömrü 66 saattir, kısa yarıömürlü (6 saat) kız $^{99}\text{Tc}^m$ ile sonuçlanır. Yeni bir jeneratör haftada bir alınır ve bir haftada ihtiyaç

duyulan tüm $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 'i sağlar, günde 24 saat elde edilebilir. Bu elde edilebilirlik, ideal yarı ömür, bozunma şekli ve γ enerjisiyle $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, radyofarmasötik üretimi için verimli bir radyonüklittir.

2.4.2.2 Biyolojik Özellikler

Radyonüklidin nükleer özellikleri görüntüleme ve sayımla deteksiyon için bir radyofarmasötiğin kullanışlılığını tayin eder ama radyofarmasötiğin biyolojik özellikleri radyofarmasötiğin lokalizasyonunu ve uygulamadan sonraki durumunu belirler. Bazı radyofarmasötikler radyonüklidin kendi elementel veya iyonik durumu nedeniyle lokalize olur. Klinik olarak en çok kullanılan radyofarmasötikler lokalizasyon mekanizmaları nedeniyle alınır. İdeal radyofarmasötik aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır.

- Hızlı lokalize olmalı ve ilgili bölgede seçici olarak lokalize olmalıdır.
- Patolojik durumlarda dokuda normal dokuya göre daha fazla lokalize olmalıdır.
- Metabolik olarak inert olmalıdır.
- Background (BG) dokulardan hızla temizlenmelidir.
- Çalışma tamamlandıktan sonra hızla atılmalıdır. İdeal radyofarmasötik farmakolojik olarak da inert olmalıdır, sistemi altüst etmemelidir, yan etkisi olmamalıdır, hasta hazırlama süresi kısa olmalıdır, birkaç ilaç etkileşimine sahip olmalıdır.

•Lokalizasyon Mekanizmaları

Gerçek lokalizasyon mekanizması kimyasal, fiziksel, reseptör ve fizyolojik özellikleri içeren spesifik ve non-spesifik işlemleri kapsar. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ gibi radyofarmasötikler, çok küçük ligand değişiklikleriyle oluşan biyodağılıma sahiptir, örneğin FDA onaylı üç hepatobilier sistem ajanı küçük yapısal değişikliklere göre farklı renal atılım gösterir (%15, %9 ve %1). Farmakologlar radyoaktif izleyicileri kullanarak spesifik fizyolojik reseptörlerin yerlerini bulmuşlardır. Diyagnostik kullanım için reseptöre spesifik ilaçları görüntüleme radyonüklitleri ile işaretlemek küçük bir ilerlemeydi. İlk FDA onaylı reseptör spesifik radyofarmasötik In-111 pentetretid'dir ve 1994 yılında onay almıştır.

Çizelge 2. 6 Tanısal radyofarmasötiklerin lokalizasyon mekanizması

Fonksiyonel	Mekanik
Pasif transfer (basit difüzyon) Kan beyin engeli için $^{99}\text{Tc}^m$ $[\text{TcO}_4]^-$ Glomerular filtrasyon için $^{99}\text{Tc}^m$ DTPA	Kapillar blokaj Akciğer perfüzyon sintigrafisinde $^{99}\text{Tc}^m$ MAA
Aktif transport ya da uptake Tiroitde I-123 ve karaciğerde $^{99}\text{Tc}^m$ -IDA	Fagositöz Karaciğerde dalak scan için $^{99}\text{Tc}^m$ -SC
Metabolik tuzak F-18 FDG tarama	Sekestrasyon Dalak için ısıyla denatüre edilen $^{99}\text{Tc}^m$ -RBC
Reseptöre bağlanma In-111 pentetreotid	Kompartmanlı lokalizasyon In ¹¹¹ -DTPA CSF akımı için Kardiyak fonksiyon çalışmaları için $^{99}\text{Tc}^m$ -RBC Ventilasyon çalışmaları için Xe-133
Antikor bağlama $^{99}\text{Tc}^m$ -arcitumomab In-111 satumomab pentetide	Anormal ekstrasvazasyon $^{99}\text{Tc}^m$ IDA ile safra sızıntısı GI kanamada $^{99}\text{Tc}^m$ RBC

In-111 pentetreotid birçok nöroendokrin tümör tarafından tarif edilen somatostatin reseptörlerine bağlanır. Bu tip tümörler için terapötik olarak kullanılan işaretli olmayan analog oktreotid'dir. In-111 pentetreotisin onayını feokromositomas ve nöroblastoma da bir norepinefrin analogları olarak kullanılması için I-131 iobenguene (metaiyodobenzilguanidin, MIBG)'in onayı takip etmiştir. Birçok diğer reseptöre spesifik radyofarmasötikler dopamin reseptörleri, serotonin reseptörleri, östrojen reseptörleri, progesteron reseptörleri, benzodiazepin reseptörleridir ve klinik araştırma amacıyla sentezlenmişlerdir. Bunlar sıklıkla bir pozitron yayıcıyla işaretlenmiştir (F-18, C-11 ya da N-13) ama I-123 gibi tek foton yayan radyonüklitler de kullanılır. Bu teknolojinin diyagnostik potansiyeli sınırsızdır.

•Uygulama Yolu

Absorbsiyon ve uygulama yolu genellikle radyofarmasötiklerin lokalizasyon karakteristikleri ile tayin edilir. Akciğer ventilasyonu bir aerosol ya da gazın inhalasyonu ile çalışılabilir, oysaki pulmoner perfüzyon işaretli bileşiğin intravenöz (İV) enjeksiyonu ile çalışılır. Radyofarmasötiklerin birçoğu İV olarak uygulanır. Uygulama yolunun seçimi için farklı biyodağılım ve kinetikler elde edilmelidir; İV olarak verilen $^{99}\text{Tc}^m$ -SC Retiküloendotelial Sistem (RES)'de konsantre olur, subkutan olarak

uygulanırsa lenfatikler tarafından temizlenir ve oral olarak uygulandıında Gastrointestinal (GI) yola hapsolur.

•Hedef Uptake (Tutulum)

İyi bir hedef tutulumuyla ajanın superior görüntüleme ajanı olup olmadığı kendiliğinden belli olur. Tutulum oranı ve buna bağı olarak görüntüleme süresi de önemlidir. Genel olarak hastanın rahatlığı için erken imajların alınması tercih edilir, örneğin; tiroid imajı için I-123 NaI yerine $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -perteknetatın kullanılması. Tiroid, $[\text{TcO}_4]^-$ ile 20. dakikada görüntülenir ancak I-123 ile 4-6 saat arasında görüntülenebilir.

•İzleyicinin Atılımı

Radyofarmasötik tutulumunun hızı ve uzunluğu gibi atılım hızı da önemlidir. Organ görüntülemede hedef organdan daha az tutulumu olan BG dokularda daha iyidir ve BG düzeyi hedef/hedef olmayan oranı ve kinetiklerini belirler. Radyofarmasötiğin yüksek oranda lokalize olması için kan ve BG dokulardan temizlenmelidir. Bu genellikle küçük lezyonlar için doğrudur. Renal klirensin hızı sıklıkla plazmada protein bağlanma miktarının bir fonksiyonudur çünkü sadece bağlanmamış ilaç glomerüler filtrasyonla atılır. Diğer major atılım yolları GI yol ve hepatobilier yoldur. Birçok diyagnostik uygulamanın amacı patolojik bir dokunun görüntüsünü sağlamaktır. Bazı uygulamalarda amaç sadece bir organı (bir prob ile) ya da kan veya idrar numunesini (iyi bir sayıcıda) sayarak aktivite miktarını bulmaktır.

Radyofarmasötiklerin istenilen özellikleri aşağıdadır:

- Mevcut cihazlarla kolayca detekte edilebilmeli ve sayılabilmeli,
- İlgili dokuda lokalize olmalı ve diğerlerinden temizlenmeli,
- Uygun fiziksel ve biyolojik yarı ömrü olmalı,
- Hazırlama ve *in vivo* uygulama sırasında kimyasal olarak stabil olmalı,
- Düzenleme kurulu tarafından onaylı olmalı,
- Ucuz olarak elde edilebilmelidir.

2.4.2.3 Kimyasal Özellikler

Nükleer kriterler favori olan kısa yarı ömürlü radyonüklitlere yöneldiği için ürünün inhouse ya da ticari nükleer eczane sentezini gerekli kılmıştır. Bu sentez yolu $^{99}\text{Tc}^m$ 'e bağlı uygun radyofarmasötikler için rutin hale gelmiştir, genellikle ticari hazır kitlerdir. Bunlar ayrıca; In-111 işaretli monoklonal antikor (MoAbs), işaretli kan elementleri, pozitron radyofarmasötikleri ve yeni In-111 pentetrotid somatostatin reseptör ajanları gibi diğer ürünlerle lokal olarak birleştirmek için gereklidir. Bazı durumlarda In-111 pentetat, I-131 iyodür ya da Tl-201 klorür gibi ürünler kimyasal olarak stabildir ve fiziksel yarı ömrü, sentezi ve gerekli kalite kontrolleri üretici tarafından yapılmasına yetecek uzunluktadır. Bu hastanede kullanımı kolaylaştırır.

•Hazırlama Kolaylığı ve Elde Edilebilirliği

Daha önce de belirtildiği gibi, radyofarmasötüğün kolay elde edilebilir olması klinikte, pratikte üstünlük sağlar.

•Stabilite ve Miyad

En iyi $^{99}\text{Tc}^m$ kit formülasyonları, hazırlamadan en az 6 saat sonra stabil olan ürünlerdir ve bazıları 24 saat stabildir. Hazırlamada sentez ve kalite kontrol yapmak için belli bir emek harcanmalıdır, tüm gün kullanılabilecek bir ürün elde etmek avantajlıdır. Eğer birden fazla doz günün farklı saatlerinde kullanılıyorsa stabilize kemik tarama (medronat) kitleri, nonstabil kitlere tercih edilir. En kötü radyofarmasötik stabil olmayandır ve kullanım süresi 30 dakika ya da daha azdır. Amersham/Medi-Physics stabilize dimerkaptosüksinik asit (DMSA) ve hegzametilpropilenaminoksim (HMPAO) kit formülasyonları için birçok kaynak yaratmışlardır ve FDA onayı almışlardır.

•Formülasyon

Aynı kimyasal ürünün farklı formülasyonları önemli bir etkiye sebep olabilir. MDP'deki stabilizer olan askorbik asit bir antioksidandır ve $^{99}\text{Tc}^m$ 'un yeniden okside olmasını önler. Askorbik asitin yokluğunda, hazırlamadan 4 saat sonra perteknetat düzeyleri midede tutulmasına izin verecek yükseklikte olur, böylece görüntü kötüleşir. Stabilize formülasyonun kullanımıyla, birçok doz 12-24 saatde bir vialden elde edilebilir. Bu formülasyon doz başına maliyeti düşürür ve yüksek kontrast imajı oluşturur.

HMPAO'nun yeni stabilize formülasyonu bir tampon ve metilen mavisi antioksidanını içerir. Sonuç olarak HMPAO 30 mCi yerine 50 mCi $^{99}\text{Tc}^m$ ile işaretlenebilir ve 5 saat stabil kalır (30 dakika yerine).

2.4.3 Terapötik Radyofarmasötikler

Terapötik radyofarmasötiklerin kullanımı 1911'e kadar gider, o tarihte Ra-226 lupusu tedavi etmek için etkisiz bir şekilde kullanılmıştı. 1939'larda P-32 fosfat lösemi tedavisinde kullanılmıştır, bu yapay olarak üretilen bir radyonüklidin ilk medikal kullanımıdır. 1942'de Sr-89 prostat kanserinde metastatik kemik lezyonlarını tedavi etmek için kullanılmıştır. Aynı yıl I-131 üretildi ve tiroid kanserinde etkili bir şekilde kullanıldı. Gelecek, terapötik MoAB ler için parlaktır ve terapötik MoAB'lar ileri B-hücre non-Hodgkin's lenfomada diğer tedaviler başarısız olduğunda etkili olacaktır. Radyofarmasötiklerle tedavinin, diğer kemoterapi ve eksternal maruz kalmaya göre önemli avantajları vardır.

- Radyofarmasötiklerin carrier-free (taşıyıcısız) olması farmakolojik etki olmaksızın terapötik etki göstermesini sağlar. Bu yan etkileri minimuma düşürür ve çok düşük konsantrasyonlu reseptörlerin hedeflenmesine izin verir.

- Radyofarmasötikle tedavi, nükleit hücrelere bağlı olmasa bile komşu malign hücreleri de letal radyasyona maruz bırakır. Halbuki kemoterapide ilaç molekülü letal dozda hücre tarafından alınmak zorundadır.

- Radyofarmasötikle tedavi seçicidir, yüksek bir hedef/hedef olamayan oranına erişebilir. Eksternal ışınlar buradaki tüm dokuları irradie eder ve kemoterapi tüm hızlı çoğalan hücre popülasyonunu etkiler. Sr-89 ile metastatik kemik uptake oranının normal kemik uptake'ine oranı 36:1 kat fazla olduğu kayıtlıdır.

- Farklı enerji emisyonları olan radyonüklitlerin kullanımıyla dokudaki emisyon/tümör büyüklüğü oranı seçilebilir. Geniş tümörler için, daha geniş emisyon aralığı gereklidir, oysa lösemi gibi kan sistemine ait malignitelerde kısa bir emisyon aralığı yeterlidir. Eğer bir nükleit çekirdek içinde intarsellüler olarak lokalize oluyorsa, çok küçük bir aralıktaki auger elektronu yayılır, örneğin, I-125, 10 nm aralığıyla kullanılmalıdır. Bu

avantajlarının sonucu olarak terapötik radyofarmasötiklerde önemli oranda çaba sarfedilmektedir ve bu gelecekte ümit verici bir alandır.

2.4.3.1 Nükleer Özellikler

İstenilen etki, görüntülemekten çok hedef dokuda letal olması nedeniyle, tanısal amaçla kullanılan radyofarmasötiklerden farklıdır özellikle de nükleer özellikler nedeniyle.

•Yarı-Ömür

Kısa bir yarı ömür, yüksek bir doz oranı demektir ve sonuçta daha büyük bir biyolojik etkidir. Diğer taraftan uzun bir yarı ömür büyük doz fraksiyonu ve uzun zaman almaktadır ve radyofarmasötik tümör hücrelerinden temizlenmekte ve metabolize olmaktadır. Yarı ömür hasta hücrelerde lokalize olacak kadar ve normal hücrelerden temizlemeye yetecek kadar olmalıdır. Uzun yarı ömürlü radyofarmasötiklerde atıklar problem olur. Yarı ömür radyofarmasötiğin sentezine, hazırlanmasına ve hastaya verilmesine izin verecek uzunlukta, hastalarda hazırlama ve lokalizasyonu kolaylaştırmak için en az 12 saat olmalıdır. Radyonüklitlerin yarıömürü 4-5 gün arasında ise radyofarmasötiğin uygun bir doz için $>33\text{mCi}$ uygulanması gerekir ve bu da hastanın hastanede yatmasını gerektirir.

•Bozunma Türü

Yüksek lineer enerji transferi olan radyasyon maksimum maruz kalma ve doku hasarı için istenir. Tarihte beta yayıcılar kullanılmıştır (tüm onaylı terapötik radyofarmasötikler I-131, P-32, Sr-89 beta yayıcıdır) ancak alfa yayıcılar ve auger elektron yayıcılar (EC dikey mod) da tedavi edici potansiyele sahiptir ve araştırılmıştır. Optimal dikey mod, özel bir uygulama gerektiren dokuya bağlıdır. Beta partikülü milimetrelerde tutulur, alfa partikülleri mikrometrelerde tutulur ve auger elektronları nm lerde tutulur. Alfa parikülleri ve auger elektronlarının bir avantajı beta partiküllerinin aksine monoenerjitik oluşlarıdır ve sürekli enerji spektrumu karakteristik maksimum enerjiye sahip (E_{max}) olmalıdır.

•Enerji ve Aralık

Optimal partikül aralığı, tümör büyüklüğüne bağlıdır, büyük (geniş) tümörler daha büyük aralık gerektirir. Optimal aralığı sağlayan enerjiye sahip partikül yayan bir radyonüklit seçilir. Beta partikülleri için, ortalama enerji yaklaşık E_{max} 'ın üçte biridir.

•Gama Enerji ve Verim

Radyofarmasötiğin lokalizasyonunu *in vivo* olarak gösterebilmek, bir gama kamera ve hastaya spesifik dozimetreyi hesaplamayı mümkün kılmak için gama ışınının görüntülenebilir bir enerjiye sahip olması istenir. Ayrıca doz kalibratör ölçümleri eğer bir gama emisyonu varsa daha kolay ve hatasız olur. Gama ışınının yokluğunda doz kalibratörü breemstrahlung radyasyonunu ölçer ki bu radyofarmasötiğin bulunduğu kaba, dedektör yapısına ve materyalin geometrisine bağlıdır. Optimal radyonüklit 150 keV'lik bir gama ışınına yaklaşık %10 verimle sahiptir.

•Stabil ya da Uzun Yarı Ömürlü Daughter (kız)

Dikeyden ve sonraki biyolojik klirensden sonra normal dokunun maruz kaldığı radyasyonu minimuma indirmek için eğer radyonüklidin bir önceki hali stabil ya da uzun bir yarı ömre sahipse en iyisidir.

2.4.3.2 Biyolojik Özellikler

İdeal terapötik radyofarmasötiğin hedef dokuda tercihli olarak tutulması beklenir. Uzun kalış süresi daha yüksek doz verir. Kısa sürede normal dokularda minimum maruz kalma önemlidir. Eğer normal dokularda lokalize oluyorsa tutulum minimum olmalı ve kısa sürede temizlenmelidir. I-131 iyodür, tiroid dokusunda oldukça etkili tutulum mekanizması nedeniyle tiroid tedavisi için çok etkilidir. Aşırı iyot, glomerular filtrasyon ile çabukça uzaklaştırılır, minimal normal doku uptake'i ile sonuçlanır. İyodun konsantre olduğu tiroid tümörlerinde başarılı olmaktadır.

•Metabolizma ve Atılım

İdeal olarak, radyofarmasötik metabolize olmamalıdır. Daha hızlı bir metabolizma organların radyasyona maruz kalmasını azaltır ve eğer hızlı eliminasyon ya da hızlı hedef tutulumuna katkısı olursa faydalı olabilir. Genel bir kural olarak, renal atılım hızlıdır ve eğer mevcutsa kan seviyelerinin, tüm vücut ve kemik iliğinin radyasyona

maruz kalmasını azaltır. Karaciğer-safra salgısı ile atılım daha yavaştır ve yüksek GI tüm vücudun radyasyona maruz kalmasına neden olur. GI atılımla kan içinde reabsorbsiyon için bir potansiyel olsa da kan klirensini geciktirir ve tüm vücut maruz kalır. Karaciğer radyofarmasötüğün metabolizmasını içeren bir organdır. Terapötik MoAB ajanlarının problemlerinden birisi karaciğer metabolizmasındaki dozla sınırlı hepatik maruziyete neden olur. Radyofarmasötiklerin terapötik kullanımının zengin bir tarihi olmasına rağmen, biz buzdağının sadece ucunu görmekteyiz. Birçok potansiyel uygulama araştırılmaktadır ve bu nükleer tıbbın gelişiminde bir alan açacaktır. Tedavinin optimal karışımını tanımlayabilmek için klinik araştırmaya ihtiyaç vardır. Örneğin, değişik oranlarda farklı kemik ajanlarının kokteyli mümkündür ve bu tek bir terapötik ajandan daha etkilidir. Şimdiye kadar diğer tedavilerle sonuç alınamayan terminal hastalarda radyofarmasötiklerle birçok araştırma yapılmıştır. Radyofarmasötikle tedavi büyük tümör kitlelerinden çok, küçük mikrometastazların öldürülmesinde çok etkilidir.

2.5 Radyoişaretleme

2.5.1 İşaretleme Metodları

İşaretleme bileşiklerinin hazırlanmasında klinik kullanım için başlıca altı büyük teknik vardır. Bunlar Çizelge 2.7’de gösterilmiştir [66].

Çizelge 2. 7 İşaretleme metodları [66]

METODLAR	ÖRNEKLER
İzotop değişimi	^{125}I işaretle T3 ve T4
Yabancı bir işaretleylecinin girişi	Tüm $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -radyofarmasötikleri ^{125}I işaretle proteinler ^{125}I işaretle hormonlar ^{111}In -işaretle hücreler ^{111}In -bleomisin
Bifonksiyonel şelatlarla işaretleme	^{111}In -DTPA-albumin $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -DTPA-antikör
Biyosentez ve kimyasal sentez	^{75}Se -selenometiyonin ^{57}Co -siyanokobalamin ^{14}C -işaretle bileşikler
Geri tepme (recoil) işaretleme	^3H -işaretle bileşikler İyonlanmış bileşikler
Eksitasyon ile işaretleme	^{123}I -işaretle bileşikler (^{123}Xe ’dan bozunma) ^{77}Br -işaretle bileşikler (^{77}Kr ’dan bozunma)

2.5.1.1 İzotopla Yerdeğiştirme Reaksiyonları

Bu reaksiyonlarda bir moleküldeki bir veya birden fazla atom, aynı elementin farklı kütle numaralarına sahip izotopları ile yer değiştirir. ^{125}I -işaretli triyodotironin (T3), ^{125}I -işaretli tiroksin (T4) ve ^{14}C , ^{32}S ve ^3H -işaretli bileşikler örnektir. Bu işaretleme reaksiyonları geri dönüşümlüdür ve trityum ile birçok bileşiğin işaretlenmesinde ve iyot radyoizotopları ile iyot içeren materyalin işaretlenmesinde çok kullanışlıdır.

2.5.1.2 Yabancı İşaretin Girişi

Bu tip işaretlemede bir radyonüklit, biyolojik rolü bilinen bir molekülle kovalent bağların oluşması veya kovalent bağların düzenlenmesi ile bağlanır. Takılan radyonüklit moleküle yabancıdır. $^{99}\text{Tc}^m$ ile işaretli albumin, $^{99}\text{Tc}^m$ -DTPA, ^{51}Cr işaretli kırmızı kan hücreleri ve birçok iyotlanmış protein ve enzim örnektir. Çeşitli örneklerde, materyalin *in vivo* stabilitesi kararsızdır ve işaretli bileşiğin kimyasal ve biyolojik özelliklerinde bir değişiklik olabilir. Bazı örneklerde kimyasal olarak radyonüklit analogu molekülde mevcut bir atomun yerine geçebilir. Örnek olarak ^{75}Se , ^{75}Se -selenometiyonin olarak, metiyonin içindeki sülfürün yerine geçebilir. Bu grubun birçok bileşiğinde kimyasal bağ şelasyonla olur. Örneğin genellikle bir geçiş metali olan yabancı aseptör atoma elektronlarının bir kısmını verir. $^{99}\text{Tc}^m$, DTPA'ya şelasyonla bağlanır.

2.5.1.3 Bifonksiyonel Şelatlar ile İşaretleme

EDTA (Etilendiamintetraasetik asit), DTPA (dietilentriaminpentaasetik asit) ve desferoksamin, çeşitli proteinlerin işaretlenmesinde başarıyla kullanılmıştır. Bu methodda, proteinler bifonksiyonel şelat ile kompleks oluşturur daha sonra uygun bir radyonüklid ile şelasyon yaparak işaretlenir. ^{111}In işaretli DTPA-albumin, ^{67}Ga işaretli desferoksamin-albumin ve $^{99}\text{Tc}^m$ işaretli DTPA-antikör bazı örneklerdir. Şelat bulunuşu nedeniyle, işaretli proteinin biyolojik özellikleri değişebilir ve klinik kullanımdan önce miktarı belirlenmelidir.

2.5.1.4 Biyosentez ve Kimyasal Sentez

Biyosentezde yaşayan bir organizma radyoaktif izleyici (tracer) içeren bir kültür ortamında büyür; izleyici, organizmanın metabolik işlemleri ile metabolitleri içine alır

daha sonra kimyasal olarak ayrılır. Örneğin Vit B12, Streptomyces Griseus'un ürettiği bir kültür ortamına izleyici ilave edilerek ^{60}Co veya ^{57}Co ile işaretlenir. ^{14}C işaretli karbonhidratlar, proteinler ve yağlar L-75Se-selenometiyonin biyosentezi diğer örneklerdir.

2.5.1.5 Geri Tepme (Recoil) İşaretleme

Çok fazla kullanılan bir yöntem değildir. Nükleer bir reaksiyonda partiküller çekirdekten saçıldığında recoil atom veya iyonlar oluşur ki bunlar hedef materyalde mevcut diğer moleküllerde bir bağ yaparlar. Yüksek enerjili recoil atomları zayıf verimlidir ve bu yüzden işaretli bileşiğin spesifik aktivitesi düşüktür. Pek çok trityumlanmış bileşik reaktörde $6\text{Li} (n, \alpha) 3\text{H}$ reaksiyonu ile hazırlanabilir. İşaretlenecek bileşik lityum tuzuyla karıştırılır ve reaktörde ısıtılır. Yukarıdaki reaksiyonla üretilen trityum daha sonra bileşiği işaretler ki bu da esas olarak izotop değişimi mekanizması ile oluştuktan sonra işaretli bileşik ayrılır.

2.5.1.6 Eksitasyon İle İşaretleme

Nükleer bozunma sırasında oluşan yüksek derecede reaktif daughter'lara (kız) ihtiyaç vardır. Beta bozunma veya elektron yakalanması esnasında enerji yüklü ^{44}Ti iyonlar oluşur ki bunlar değişik bileşiklere işaretlemeye yeteneklidir. ^{77}Kr , ^{77}Br 'a bozunur ve eğer işaretlenecek bileşik ^{77}Kr 'a maruz kalırsa enerjik ^{77}Br iyonları bileşiği işaretler ve bromlanmış bileşik haline getirir. Benzer şekilde değişik proteinler ^{123}Xe 'a maruz bırakılır bu da ^{123}I 'e bozunur. Verim çok düşüktür.

2.5.2 İşaretlemede Önemli Faktörler

Klinik uygulamalarda kullanılan radyofarmasötiklerin büyük bir kısmı iyonik, kolloidal, makroagregat halinde veya şelat formunda kolaylıkla hazırlanır ve birçoğu piyasada bulunan kitler kullanılarak yapılabilir. İşaretlemede önemli faktörler kısaca aşağıda belirtilmiştir.

2.5.3 İşaretleme işleminin verimi

Ürünün daima yüksek oranda işaretlenmesi istenir ancak bazı durumlarda bu olmayabilir. Daha yüksek oranda ürün eldesi daha iyi işaretleme metodu ile olur. Bununla beraber daha düşük ürün bazen, eğer ürün saf ve işaretleme giderleri minimal olduğunda ve kullanılabilecek daha iyi metod yoksa kullanılabilir.

2.5.3.1 Ürünün kimyasal stabilitesi

Stabilite bileşik ile radyonüklit arasındaki kimyasal bağın tipi ile ilgilidir. Kovalent bağlar ile bileşikler çeşitli fizikokimyasal şartlar altında oldukça stabildir. Stabilitenin iyi olması için işaretli bileşiğin stabilite sabitinin büyük olması gerekir.

2.5.3.2 Bozunma veya değişiklik

Yapı ve/veya işaretli bileşiğin biyolojik özellikleri, işaretleme işlemi sırasında çeşitli fizikokimyasal durumlarla değişir. Örneğin proteinler ısıtma ile pH 2'nin altında ve pH 10'un üzerinde aşırı iyotlama ile ve kırmızı kan hücreleri de ısıyla denatüre olur.

2.5.3.3 İzotop Etkisi

İzotop etkisi sonucu, izotop ağırlığındaki farklılıklara bağlı olarak farklı fiziksel bazen de biyolojik özellikler oluşur. Örneğin; trityumla etkileştirilmiş bileşiklerde, işaretli bileşiğin özellikleri değişebilir. Trityumlu suyun fizyolojik davranışları, vücuttaki normal sudan farklı bulunmuştur. İzotoplar daha ağır olduğunda izotop etkisi önemli değildir.

2.5.3.4 Carrier-free veya taşıyıcı ilave edilmemiş durum (NCA)

Radyofarmasötikler taşıyıcısız veya NCA durumunda camda absorbe olur. Taşıyıcı serbest bileşiklerin molar konsantrasyonları nanomolar düzeyde veya daha azdır. Düşük konsantrasyonda çalışmak çok zordur. Taşıyıcısız veya NCA durumda izleyicinin düşük konsantrasyonu ile işaretli üründe teknik geliştirmek etkili değildir.

2.5.3.5 Bekletme koşulları

Birçok işaretli bileşik yüksek sıcaklıkta dekompoze olur. Proteinler ve işaretli boyalar ısıyla indirgenir bu nedenle düşük sıcaklıkta saklanmalıdır. Örneğin Albumin buzdolabında saklanmalıdır. Işık bazı işaretli bileşikler bozabilir. Örneğin radyoizotoplanmış rose bengal karanlıkta saklanmalıdır. Taşıyıcısız izleyicilerin kaybı, kabın duvarlarında absorpsiyonla oluşabilir. Silikon kaplı kaplarda bu önlenir.

2.5.3.6 Spesifik aktivite

Spesifik aktivite işaretli bileşiğin gram başına aktivitesi olarak tarif edilmektedir. İşaretli bileşiklerin uygulamalarında, birçok örnekte yüksek spesifik aktivite gerekir ve uygun metodlar bulunmalıdır. Bazılarında ise işaretli bileşikte yüksek spesifik aktivite daha fazla radyolize sebep olabilir ve önemlidir.

2.5.3.7 Radyoliz

Birçok işaretli bileşik içindeki radyonüklitlerle radyasyon yayarak dekompoze olur. Dekompozisyonun bu çeşidi radyoliz olarak isimlendirilir. Yüksek spesifik aktivite radyolizin etkisini artırır. Kimyasal bağlar kendi molekülünden radyasyonla kırılır. Olay otoradyoliz olarak adlandırılır. Radyasyonlar çözeltiyi bozabilir. İndirek radyolizi önlemek için solventin pH'sı nötral yapılmalıdır. Çünkü asidik ya da alkali pH'da daha fazla reaksiyon olabilir. Daha uzun ömürlü radyonüklitde radyoliz daha fazladır ve daha enerjik radyasyonda radyoliz daha büyüktür.

2.5.3.8 Safleştirme ve Analiz

Radyonüklidik safsızlıklar, radyonüklitlerin üretim metodundan doğan radyoaktif kontaminantlardır. Aynı zamanda işaretli safsızlıklar radyonüklidik kirliliklere eklenir. Radyonüklit üretim basamağında radyoaktif kirliliklerin uzaklaştırılması çeşitli kimyasal ayrıştırma metodları ile yapılabilir. Radyokimyasal ve kimyasal safsızlıklar bileşiklerin işaretlenmesinin tam işaretlenmemesinden doğar ve elektroforez, jel, kağıt ve İTK (ince tabaka kromatografisi), iyon değiştirme, solvent ekstraksiyonu gibi çeşitli analitik metodlarla saptanabilir. Sıklıkla bu safsızlıklar radyolizden olduğu kadar işaretlenmeden sonra doğal parçalanmadan da doğar.

2.5.3.9 Raf Ömrü

İşaretlenmiş bileşik istenen amaç için güvenle kullanılabilecek bir raf ömrüne sahip olmalıdır. İşaretlenmiş bileşiğin etki kaybı, işaretli bileşik ve radyonüklit uç arasındaki kimyasal bağın çeşidi, yayılan radyasyonun çeşidi, işaretlenmiş moleküle herhangi bir ilave, çözücü, radyonüklitin fiziksel yarıömrüne bağlıdır. Genellikle üç fiziksel yarı ömrün bir periyodu veya altı ayın bir maksimumu işaretlenmiş bileşiğin raf ömrü için limit olarak önerilir. $^{99}\text{Tc}^m$ bileşiklerinin raf ömrü 0.5-18 saat arasında değişir.

2.5.4 Radyoışretlemede Kullanılan Radyonüklidler

2.5.4.1 Teknesyum

Teknesyum, 25 izotopu ve 10 izomeri olan; 88 -113 arasında atomik kütle değerlerine sahip yapay bir elementtir [67]. Atom sayısı 43 olup, “Tc” şeklinde sembolize edilir. Periyodik tabloda VII B grubunda bulunan Teknesyum, aynı grupta yer alan Renyum ve Mangan geçiş metallerine kimyasal özellik bakımından benzerlik göstermektedir.

Nükleer tıpta teşhis amacıyla geniş bir spektrumda kullanım alanına sahip $^{99}\text{Tc}^m$ isimli kısa yarı ömürlü, γ salıcı bir nükleer izomeri bulunmaktadır. Elementin keşfinden önce, 43 numaralı elementin çoğu özelliği Dmitri Mendeleev tarafından ön görülmüştür. Mendeleev oluşturduğu periyodik tablosunda bu elementin yerini boş bırakarak, bu elementi “ekamanganese” olarak isimlendirmiştir. 1937’de izotopu olan ^{97}Tc , üretilen ilk yapay element olmuştur. Dünyada üretilen teknesyumun çoğu nükleer reaktörlerde U-235’in fisyonu sonucu oluşan bir yan üründür ve nükleer yakıt çubuklarından ekstrakte edilirler.

•Teknesyum İzotopları

Teknesyumun metal formu nemli havalarda yavaşça kararır ve oksitleri TcO_2 ve Tc_2O_7 ’ dir. Oksitlenme koşulları altında Tc(VII) , perteknetat $[\text{TcO}_4]^-$ iyonu halinde bulunur. Teknesyum 0, +2, +4, +5, +6 ve +7 oksidasyon basamaklarına sahiptir. Teknesyumun toz hali oksijenle yanabilir. Nitrik asitte ve konsantre sülfürik asitte çözünür ancak hidroklorik asitte çözünmez. Metal formu zayıf paramanyetik özellik gösterir. Kristal yapısı ise hekzagonaldir. Teknesyum nükleer fisyonla üretilir ve çoğu radyonüklitten

daha kolay ayrılır. İnsanlar ve hayvanlar üzerindeki toksisitesinin anlaşılması önemli olmasına rağmen, bu konudaki deneysel sonuçlar yetersizdir. Düşük kimyasal toksisite gösterir. Radyolojik toksisitesi ise, bileşiğin fonksiyonuna, söz konusu izotobun radyasyon türüne ve yarı ömrüne bağlıdır [63].

Çizelge 2. 8 Teknesyum izotopları

İzotop	Yarı-ömür	Radyoaktif bozunum	Bozunma enerjisi (MeV)	Bozunma ürünü
^{95m}Tc	61 g	EC	-	^{95}Mo
		γ	0.204, 0.582, 0.835	-
		IT	0.0389, e	^{95}Tc
^{96}Tc	4.3 g	EC	-	^{96}Mo
		γ	0.778, 0.849, 0.812	-
^{97}Tc	2.6×10^6 y	EC	-	^{97}Mo
^{97m}Tc	90 g	IT	0.965, e	^{97}Tc
^{98}Tc	4.2×10^6 y	β^-	0.4	^{98}Ru
		γ	0.745, 0.652	-
^{99}Tc	2.1×10^6 y	β^-	0.294	^{99}Ru
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.01 s	IT	0.142, 0.002	^{99}Tc
		γ	0.140	-

•Teknesyum-99m

Teknesyum-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Nükleer Tıpta en yaygın olarak kullanılan radyonüklittir. Yarıömrü 6.01 saattir ve 140 keV'luk bir gama ışıması vardır. Bu özellikleri $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'i hala Nükleer Tıpta en yaygın olarak kullanılan görüntüleme radyonüklidi yapar. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 67 saat yarıömürlü molibdenyum-99'un (^{99}Mo) bozunmasından oluşur. ^{99}Mo 'un daha uzun yarıömrü $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile geçici denge oluşturmalarına yol açar. Geçici dengenin oluşumu Şekil 2.8'de gösterilmiştir (eşitlik 2.2). Ana radyonüklidin yarıömrü üründen daha uzun

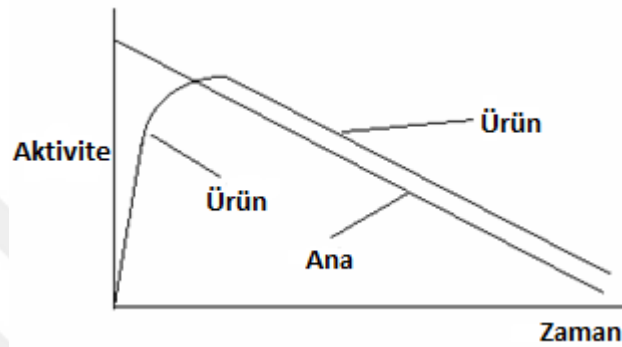
olduğu zaman geçici denge oluşur. Geçici dengede ana ve ürün radyonüklidin aktiviteleri birbirine yakındır. Geçici dengenin matematiksel bağıntısı aşağıda gösterildiği gibidir:

Geçici Denge:

1. $T_{1/2} \text{ ana} > T_{1/2} \text{ ürün}$

2. Ürün aktivitesi > Ana radyonüklidin aktivitesi (denge anında)

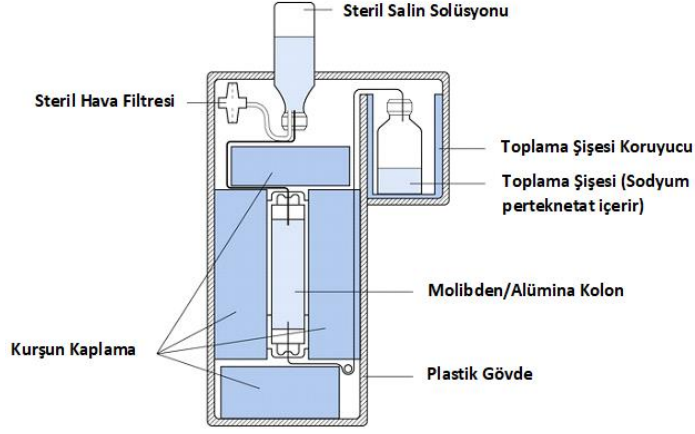
$$1 \left(1 \right) N_1 \times \lambda = N_2 \times (\lambda_2 - \lambda_1) \quad (2.2)$$



Şekil 2. 8 Geçici denge eğrisi

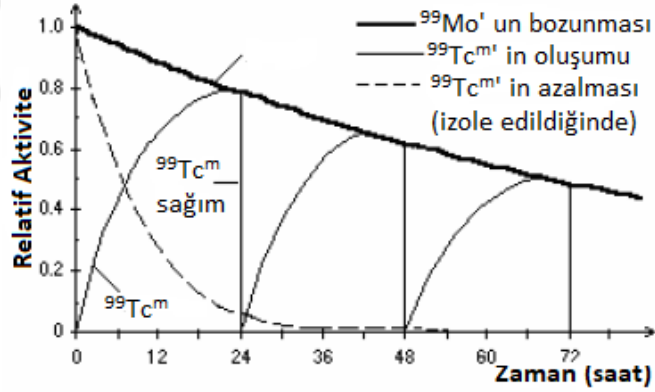
•Teknesyum Jeneratörü

Şekil 2.9'da görülen bir jeneratörün çalışma prensibi, kısa yarıömürlü bir radyonüklidin kendisini oluşturan uzun ömürlü bir radyonüklidten ayrılmasına dayanır. Ana radyonüklid (^{99}Mo) bir β^- bozunumu yapar, böylece ürün radyonüklid ($^{99}\text{Tc}^m$) ana radyonüklitten farklı kimyasal kimlikte oluşur (Şekil 2.9). Bu durum iki radyonüklidin kolayca kimyasal olarak birbirinden ayrılmasına olanak sağlar. ^{99}Mo 'un bozunumu sırasında $^{99}\text{Tc}^m$ 'in oluşumu ve ayrılması Şekil 2.10 ve Şekil 2.11'de gösterilmiştir. Genellikle $^{99}\text{Tc}^m$ jeneratörden her 24 saatte bir sağılır, çünkü iki radyonüklid arasında dengeye gelme zamanı yaklaşık olarak 23 saattir.

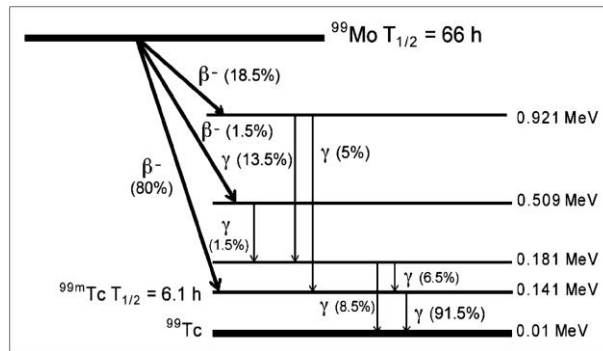


Şekil 2. 9 Teknesyum jeneratörü

Düşük spesifik aktiviteli radyofarmasötikler görüntü kalitesini azaltır. $^{99}\text{Tc}^m$ 'un zamanla spesifik aktivitesi azaldığından, kaliteli görüntü elde etmek için jeneratör haftada bir değiştirilir. Alüminyum kolondan serum fizyolojik geçirildiğinde; ^{99}Mo alüminyum kolonda kalırken $^{99}\text{Tc}^m$ serum fizyolojik vasıtası ile vakumlu toplama şişesine alınır. Bu işleme sağım denir [63].



Şekil 2. 10 $^{99}\text{Tc}^m$ 'in oluşum eğrisi [63]



Şekil 2. 11 ^{99}Mo 'un bozunma şeması [63]

•Peptidlerin $^{99}\text{Tc}^m$ ile İşaretlenme Yöntemleri

Peptidlerin $^{99}\text{Tc}^m$ ile işaretlenmesinde çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu yöntemler üç kategoride incelenebilir.

Direkt İşaretleme Yöntemi: Peptidlerin $^{99}\text{Tc}^m$ ile direkt işaretlenmesi, peptiddeki disülfid bağlarının indirgenmesi ile oluşan tiyol grupları ile Tc-^{99m} 'in kompleksleşmesini içerir. Ancak bu yöntemle işaretleme sistein içermeyen peptidler için de uygulanabilmektedir. Sadece sülfür grubu değil, aynı zamanda imidazolün azot grubu ile $^{99}\text{Tc}^m$ bağ yapabilmektedir (Ancak sisteinlerin varlığında oluşan bu kompleksler teknesyumla işaretlemede şart değildir.) [68]. Melendez tarafından yapılan çalışmada sistein amino asidi içermeyen Ubiquidine (UBI) antimikrobiyal peptidi direk işaretleme yöntemi kullanılarak $^{99}\text{Tc}^m$ ile kararlı $^{99}\text{Tc}^m$ -UBI kompleksi oluşturulmuştur. Bu yöntem kullanılarak oluşturulan komplekslerde $^{99}\text{Tc}^m$ merkezi etrafındaki koordinasyon geometrisi ve donör atomlarının sayısı hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Bununla birlikte, kolay uygulanabilir olması ve işaretleme sonrası saflaştırma basamaklarına ihtiyaç duyulmaması gibi çeşitli avantajları mevcuttur [69], [70].

Ön işaretleme yöntemi: Öncelikle $^{99}\text{Tc}^m$ bifonksiyonel şelatlayıcı ajan (BFCA) ile bağlanır, daha sonra oluşan bu kompleks peptid veya protein ile bağlanır. Metal radyonüklidlerinin sahip oldukları farklı oksidasyon basamaklarına bağlı olarak çok çeşitli bifonksiyonel şelatlayıcı ajan kullanılabilir, böylece farklı kor simetrileri ve koordinasyon davranışları meydana gelir [68]. Bu yöntemin hazırlanması ve saflaştırılması birkaç basamaktan oluştuğu, uzun zaman aldığı için hazır kit kullanımları için uygun değildir. Ancak araştırma amaçlı ve diğer işaretleme yöntemlerinin kullanılamadığı durumlarda uygulanabilir [71].

İndirekt işaretleme yöntemi: Bifonksiyonel şelatlayıcı ajan öncelikle peptide bağlanır. BFCA –N veya –C terminaline bağlanabilir veya yan zincirlerle de birleşebilir. Eğer uygun BFCA kullanılırsa radyoişaretleme BFCA-konjugat varlığında perteknetatin direkt indirgenmesi veya ligand değişimi veya teknesyum trikarbonil eklenmesiyle gerçekleşir [68].

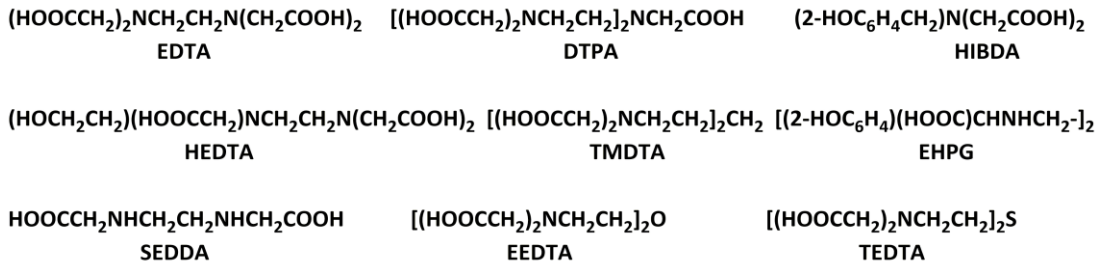
2.5.4.2 Galyum-68

^{68}Ga , aile/kız jeneratör sisteminden temin edilebilen, pozitron yayan, kısa ömürlü az sayıdaki radyonüklidlerinden biri olma özelliğini taşıyor [72]. ^{68}Ga kızının 68 dakikalık yarı-ömrü radyofarmasötik sentez için elverişlidir ve hasta tarafından alınan radyasyon dozu sınırlıdır, ^{68}Ge jeneratör iletiminde sorunlardan kaçınacak kadar uzun sürelidir. Dolayısıyla Ge/Ga jeneratörü, bir siklotrona erişimi olmayan fakat pozitron emisyon tomografisi (PET) ile hasta görüntülemeyi yapmak isteyen kurumlar için pozitron yayma radyo-farmasötiklerinin "en iyi" kaynağı olabilir [73]. Bu tekniği kullanarak, pozitron-elektron inhalasyonu ile üretilen iki eş-doğrusal 511 keV fotonun algılanması ve elektronik kolimasyonunu takiben, doku aktivite seviyelerini haritalandıran ve nicelleştiren görüntüler sağlayan *in vivo* radyonüklid dağılımının üç boyutlu yeniden yapılandırılması mümkündür [74], [75].

•Galyum Kimyası

Galyum, yer kabuğunda sadece az miktarda bulunur ve doğal olarak meydana gelen biyokimyasal bir fonksiyona sahip olup olmadığı bilinmemektedir. Bazı düşük değerlikli galyum bileşikleri bilinmesine rağmen, radyofarmasötik sentezlerde tüm galyum kimyası +3 oksidasyon basamağında meydana gelir.

Ga^{3+} iyonu, grup III bileşiklerinde (bor, alüminyum ve indiyum gibi..) olduğu gibi kuvvetli iyonik, apolar Lewis bazlarına sıkı sıkıya bağlanan "kuvvetli asit" olarak sınıflandırılır [76]. Sonuç olarak, Ga^{3+} 'nın şelat kimyası, oksijen ve azot donör atomları içeren ligandlara bağlıdır (Şekil 2.12, Çizelge 2.9).

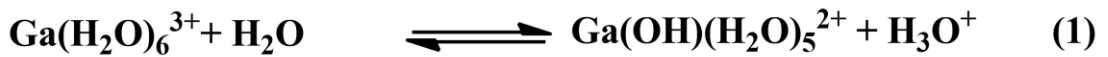


Şekil 2. 12 Bazı galyum-şelatlama ligandlarının yapısal formülü

Çizelge 2. 9 Nükleer tıpla ilgili galyum radyonüklidleri

	İzotop	
	⁶⁷ Ga	⁶⁸ Ga
Yarı-ömür	3.3 gün	68 dk
γ-bozunma enerjileri (keV)	93 (38%), 185 (24%), 300 (16%), 394 (4%)	511 (β ⁺)
Üretim yöntemleri	⁶⁷ Zn (p, n)	⁶⁸ Ge'un bozunması (t _{1/2} =275 gün)

Benzer yük, iyonik yarıiletken yarıçapı (Ga³⁺ için 0.62 Å ve Fe³⁺ için 0.65 Å), koordinasyon sayısı (altı) ve elektronik konfigürasyonu (Ga³⁺ için tam dolu 3d¹⁰ ve Fe³⁺ için yarı dolu 3d⁵) nedeniyle galyumun genel koordinasyon kimyası, yüksek spinli demir iyonunkine oldukça benzerdir. Sulu çözeltideki, serbest hidratlı Ga (III) iyonu sadece asidik koşullar altında kararlıdır. Çözünmeyen galyum trihidroksit oluşumuna neden olan pH yükseldikçe hidroliz meydana gelir. Galyum hidroksitin çökmesi, stabilize edici ligandların yokluğunda, non-carrier konsantrasyonlarda (1 mCi / mL, 4 x 10⁻¹⁰ M ⁶⁸Ga ve 2.5 x 10⁻¹⁰ M ⁶⁷Ga'ya eşdeğer) pH 3'de başlar [77]. ⁶⁸Ga demir hidroksit kolloidi, pozitron emisyon tomografisi ile karaciğer/dalak görüntüleme için kullanılmasına rağmen genel olarak radyofarmasötik hazırlık aşamasında bu hidrolizden kaçınmak gerekir (Şekil 2.13 eşitlik 1-3) [78].



Şekil 2. 13 Galyumun hidroliz basamakları

Galyum hidroksit, indiyum hidroksitin aksine amfoterik ve bazik (Şekil 2.13 eşitlik 4) ortamda asidik çözeltide olduğu gibi çok iyi çözünür. Böylece, pH arttıkça Ga(OH)₃ çöker ama sonra Ga(OH)₄⁻ olarak yeniden çözülür. pH > 7.4'de, sulu galyum, çözünebilir Ga(OH)₄⁻ ile kısmen çözünmeyen Ga(OH)₃ arasında 49:1 oranında bölünür ve bu pH'da,

$\text{Ga}(\text{OH})_3$ 'ün çözünürlüğünü aşmadan maksimum 2.5×10^{-6} M'lık $\text{Ga}(\text{OH})_4$ konsantrasyonu elde edilebilir [79]. Bu nedenle, non-carrier $^{68}\text{Ga}[\text{Ga}(\text{OH})_4]^-$, $\text{Ga}(\text{OH})_3$ 'nin solüsyondaki diğer eser metallerle birlikte çökelmediği varsayılarak fizyolojik pH'da çözeltide bulunabilir. $\text{Ga}(\text{OH})_4^-$ 'ün çözünürlüğü radyofarmasötik sentezde kullanılmamasına rağmen, galyum radyofarmasötik saflığının saptanması için kromatografik sistemleri tasarlarken akılda tutulmalıdır. Galyum radyofarmasötiği *in vivo* uygulamada, Ga^{3+} için yüksek afiniteye sahip iki demir bağlama kapasitesine sahip plazma protein transferini (2-4 g/L) ile hiçbir değişime uğramamıştır [80].

İki transferrin metal bağlama kapasitesinde Fe^{3+} ve Ga^{3+} 'ün koordinasyonu, bikarbonat gibi sinerjik bir anyonun, eş zamanlı bağlanmasını gerektirir. Serum bikarbonat düzeylerinde, galyum için insan transferin bağlanma sabitleri, $\log K_1 = 20.3$ ve $\log K_2 = 19.3$ 'tür [79]. Bazı galyum koordinasyon komplekslerinin kararlılık sabitleri Çizelge 2.10'da verilmektedir.

Çizelge 2. 10 Bazı galyum koordinasyon komplekslerinin kararlılık sabitleri

Ligand	LogK ₁
I ⁻	-0.2
Br ⁻	-0.1
Cl ⁻	0.01
Salisilik asit	0.69
5-Sülfosalisilik asit	1.36
HF	4.92
Okzalik asit	6.45
Glisin	9.33
Asetilaseton	9.4
Sitrik asit	10.02
OH ⁻	11.01
Glutamik asit	11.15
HIDA	11.33
IDA	12.76
8-Hidroksikinolin	14.5
NTA	16.19
UEDDA	16.75
HEDTA	17.2
TEDTA	17.3
SEDDA	18.15
Tiron	19.4
TMDTA	20.8

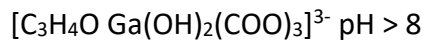
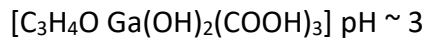
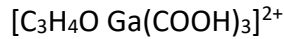
Çizelge 2. 10 Bazı galyum koordinasyon komplekslerinin kararlılık sabitleri (devamı)

EEDTA	21.0
HBIDA	21.55
EDTA	21.7
CDTA	22.34
DTPA	23.32
EHPG	31.61
3,4 DiP-LICAM	38.6
PLED	36.35
HBED	39.57
TiP-MECAMS	42.0
3,4 DiP-MECAMS	42.1

Bu ligandların birçoğu, transferrin ile değişim yoluyla termodinamik olarak stabil olmayan kompleksleri oluştururken, daha az stabil olan bazı şelat kompleksleri radyofarmasötik açıdan daha uygundur, çünkü hem transferrin ile bunların değişimi kinetik olarak yavaştır hem de transferrinsiz ortamda kan bileşenlerini işaretlemek için kullanılabilirler. Galyum stabilite sabitlerinin bilinmediği durumlarda, Fe (III)'e karşılık gelen komplekslerinin kararlılık sabitlerinden aşağıdaki denklemle tahmin edilebilirler (eşitlik 2.3):

$$\log K_1 \text{Ga}^{3+} = 0.9624 + 0.8397 \log K_1 \text{Fe}^{3+} ; r = 0.961, S_e = 2.057 \quad (2.3)$$

Ga^{3+} 'nın çok-dişli şelat komplekslerinin oluşturulması için bir ligand değişimi gereklidir. Çünkü kinetik olarak yavaş bu ligandları metali bağlamak için galyum hidroksitin çökertilmesi çok düşük bir pH değerinde hızla meydana gelir [81]. Galyum çözeltileri, komplekslerin ardışık oluşumundan dolayı metalin hidrolizi olmaksızın sitrik asit varlığında 7-8 kadar yüksek pH değerlerine yükseltilebilir [77].



Galyum sitratından daha büyük kararlılık sabitlerine sahip radyofarmasötik kompleksleri daha sonra sitrat kompleksiyle değiştirilerek hazırlanabilir [81].

•Galyum Radyofarmasötiklerinin Yapısı

Transferrin, 80.000 daltonluk bir molekül ağırlığına sahiptir ve galyumun rekabet edebileceği, neredeyse eşdeğer olan iki bağımsız demir iyonu bağlama bölgesine sahiptir [79], [82-85]. Bağlanmış demirin tirozil residlerinin iki veya üç fenolat grubu tarafından koordine edildiği ve bağlama bölgesinin aynı zamanda iki histidil rezidüsü ve belirsiz sayıda triptofan rezidüsü içerdiği düşünülür [83]. Karboksil içeren bir anyonun her biri bağlı demir ile ilişkilidir ve bu tür anyon bağlanması galyum transferrin kompleksinde meydana gelmektedir [82], [86]. Enterobaktin ile oluşturulmuş galyum kompleksinin solüsyonu yapı, paramanyetik Fe (III) analogunun yapısı hakkında bilgi edinmek için nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile incelenmiştir. Spektrumlar, serbest ligand ve galyum kompleksi için C3 simetri yapılarıyla tutarlıydı. Şelat kompleksinin yapısal analizi, komşu proton-proton coupling sabitlerine dayanarak mümkün olmuştur. Galyum radyofarmasötikleri yapısal olarak x-ışını kristalografisi ile karakterize edilmiştir.

•Galyum-68 Jeneratörleri

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radyonüklid jeneratör sisteminden elue edilen pozitron yayan ^{68}Ga 'nın önemli bir özelliği ile siklotrondan bağımsız kullanılabilirliğidir. Nispeten uzun ömürlü ^{68}Ge (yarı ömür [$t_{1/2}$] 270.95 gün) kısa ömürlü ^{68}Ga ($t_{1/2}$ 67.71 dk), üretir daha sonra ^{68}Ga bozunur ve kararlı ^{68}Zn oluşur. Düşük foton emisyonu(1.077 keV,% 3.22) sayesinde % 89 pozitron dallanması ile ^{68}Ga mükemmel bir pozitron yayıcısıdır (1,2). $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radyonüklid jeneratörler neredeyse 50 yıldır keşif ve geliştirme aşamasındadır. Bugün, ticari olarak mevcut en yaygın $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radyonüklid jeneratör TiO_2 katı faz esaslıdır (Cyclotron Co. Ltd.). 7 GBq'ye kadar ^{68}Ge aktivitesine sahip jeneratörler üretiliyor. “ İyonik ” $^{68}\text{Ga}^{3+}$ 0.1 N HCl asit çözeltisi içinde elue edilir. ^{68}Ga verimi eluatın 5 mL'sinde % 60'tır. ^{68}Ge salınımı genellikle % 5×10^{-3} 'ü aşmaz [87].

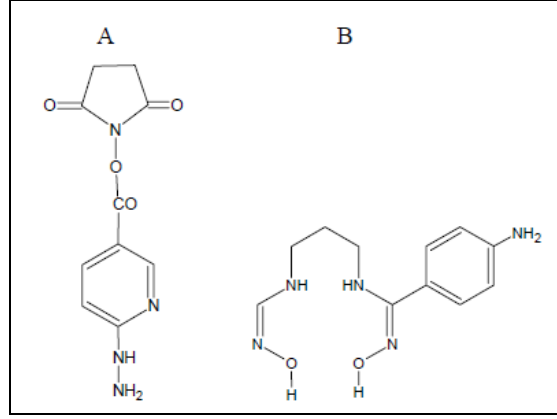
$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratörü mükemmel bir pozitron yayıcı kaynak olan ^{68}Ga radyonüklidini sağlar. Bununla birlikte, mevcut iyonik $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ radyonüklid jeneratörler, ^{68}Ga işaretli radyofarmasötiklerin sentezi için tam olarak optimize edilmemiştir. $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratörü eluatların büyük hacimlerine, yüksek hidrojen iyonu konsantrasyonuna (pH 1), kullanım süresi ve kullanım sıklığı ile artan ve ^{68}Ga bozunmasıyla oluşan kararlı Zn

2.5.5 Bifonksiyonel Şelatlayıcı Ajanlar (BFCA)

Küçük moleküler ağırlıklı polipeptidlerin ve peptidlerin hızlı farmakokinetiklerinin $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ 'in fiziksel yarıömrü açısından da uygun olması nedeniyle biyomoleküllerin $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretlenmesinde uygun işaretleme prosedürlerinin araştırılmasına geçilmiştir. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretli proteinlerin hazırlanmasında dietilentriamin pentaasetikasitin siklik türevi BFCA olarak kullanılmıştır. Ancak bu prosedür molekül içi çapraz bağlanma meydana gelmesine neden olduğu için radyoışaretlemenin kararlılığı düşmektedir. Bu nedenle orijinal proteinin moleküler aktivitesini düşürmeden yüksek *in vivo* kararlılıkta $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretli protein hazırlamak için çok sayıda bifonksiyonel şelatlayıcı ajan geliştirilmiştir. P-karboksietilfenilgliyoksal di(N-metiltiyosemikarbazon) işaretleme için istenen bu iki kriteri sağlayan ilk BFCA'dır [88]. MAG3, MAG2, HYNIC, DADT, EC, tetraamin ve N3S gibi çeşitli BFCA'lar geliştirilmiştir [89], [90]. Bunların dışında N2S2, N3S veya N4 koordinasyon moleküllerini içeren BFCA'lar da bulunmaktadır. Bunun yanında BFCA'larda bulunan tiyol grupları mononükleer $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ komplekslerinin yüksek kararlılıkta oluşumunu kolaylaştırmaktadır. Ancak şelatlayıcıdaki tiyol gruplarıyla proteindeki disülfid bağları yerdeğiştirme reaksiyonu verebilir bu reaksiyonda istenilen konjugasyon reaksiyonunun oluşumunu engeller. Bu istenilmeyen yan reaksiyonun oluşumunu engellemek için şelatlayıcıda ki tiyol grupları N3S şelatlayıcı molekülü ile kapanarak korumaya alınır. Şekil 2.16'da iki tür serbest tiyol grubu içeren bifoksiyonel şelatlayıcı ajan görülmektedir.



Şekil 2. 15 Bifonksiyonel şelatörlerin uygulama alanları



Şekil 2. 16 (A) N-hidroksisüksinamidil hidrazinonikotinat ve (B) bis (hidroksiamamid) türevi bifonksiyonel şelatlayıcı ajan

2-hidrazinonikotinamid (HYNIC) monoklonal antikorların, kemotatik peptidlerin, somatostatin analoglarının ve oligonükleotidlerin $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bifonksiyonel şelatlayıcı ajanların geliştirilmesi bugün biyomolekülün biyoaktivitesini değiştirmeden yüksek radyokimyasal verimlilikte $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretli protein ve peptidlerin eldesine olanak sağlamıştır. Bu sonuçlar hedef radyoterapi için protein ve peptidlerin $[(186/188)\text{Re}]$ ile işaretlenmesine olanak sağlayabilir. Ancak $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ kullanıldığında meydana gelen istenmeyen böbrek radyoaktivite tutulumu $[(186/188)\text{Re}]$ radyonüklidinin de terapötik uygulamalarını sınırlamaktadır. Sonuç olarak eğer böbreklerdeki bu istenilmeyen radyoaktivite tutulumu ortadan kaldırılabilirse $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretli düşük moleküler ağırlıklı polipeptidlerin ve peptidlerin kullanımı nükleer tıpta daha etkin hale gelecektir [88]. Peptid molekülü içindeki şelat kısmının doğası ve konumu farmakokinetiğini değiştirebilir. Bağlanma afinitesini korumak için, işaretleme, peptidin reseptör bağlayıcı bölgesinden uzakta gerçekleşmek zorundadır. Ligand konsantrasyonu, işaretleme karışımının pH'ı, exchange ligand, reaksiyon sıcaklığı, ve zaman gibi faktörler işaretleme kinetiğini etkilemektedir ve BFCA seçileceği zaman bunlar göz önünde bulundurulmalıdır [89]. Daha ilginç yaklaşımlar yüksek stabiliteli beş-koordinatlı kare piramidal teknesyum kompleksleri formundaki diaminoditiyoller (N2S2), N3S veya tetramin (N4) donör gruplarını içeren oksoteknesyum tetradentat şelatlarının kullanımını kapsamaktadır. Bu multidentat ligandlar ya peptidle doğrudan konjüge olabilir ya da peptid modifiye olabilir veya metal şelatlayıcı ligandın peptidin amino asitleriyle kısmen birleşmesi yoluyla genişleyebilir. MAG3, sülfür içeren merkaptasetil

kısmı ile Gly-Gly-Gly tripeptidinin birleşmesiyle oluşur. MAG3' deki karboksil grubu aktif estere dönüşebilir ve sonradan radyoışaretlemeden önce ya da sonra peptidteki amin gruplarına bağlanabilir. Literatürde metallotiyoninler, bityosemikarbazonlar, HYNIC ve fosfin içeren ligandlar gibi diğer birçok şelatlayıcı ajanlar tanımlanmıştır. Ligand sisteminin tipi biyodağılım ve kinetiği için sonraki sonuçları ile işaretlenmiş peptidin yükünü ve lipofilisitesini etkiler. Genel olarak daha hidrofilik ligand sistemler çoğunlukla böbrekten atılım gösterir. Lipofilisitenin artması hepatobiliyer atılımın tercih edilmesine yol açar. Sülfür donör atomlu ligand sistemleri tiyol fonksiyonunun hızlı oksidasyonunu elimine etmek için sıklıkla S-koruyucu grubu içerir [91].

Bombesin ve bombesin benzeri peptidler mitojenik etkilere sahiptirler ve hücre çoğalmasını tetiklerler. Akciğer, prostat, meme, pankreas ve kolon gibi organlarda bombesin reseptörlerinin bulunduğu çok çeşitli tümör dokuları tespit edilmiştir. Bu yüzden nükleer tıpta radyoışaretleli bombesin analogları önem kazanmıştır. Peptidler plazma içinde kısa yarı ömre sahip olduklarından metabolik olarak daha kararlı analogları geliştirilmelidir. Breeman ve arkadaşları ^{111}In ile işaretleyebilmek için çeşitli BN analogları ile DTPA'yı birleştirmişlerdir ve yalnızca (^{111}In -DTPA-Pro1, Tyr4)-BN bileşiğinin bombesin reseptör bağlayıcı hücrelerinin içine alındığını ancak (^{111}In -DTPA-Tyr5, D-Phe6)-BN(5-13)NH₂ bileşiğinin alınmadığını bulmuşlardır. [^{111}In -DTPA-Pro1, Tyr4]-BN bileşiği tümör spesifik radyofarmasötik olarak klinik uygulamalara uygun olmasına rağmen fizyolojik açıdan (^{111}In -DTPA-Tyr5, D-Phe6)-BN(5-13)NH₂ inhibe edici etkisinden dolayı tercih edilebilir. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$, BN ve BN benzeri peptidlerin işaretlenmesinde de başarıyla kullanılmıştır [92]. Baidoo ve arkadaşları [Lys3]-BN'i $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ile işaretlemek için diaminoditiol şelatlayıcılar kullanmışlar ve işaretli analog yüksek bağlanma ilgisi göstermiştir [93]. Karra ve arkadaşları yeni bir ditiyofosfin bazlı BFCA geliştirmişler ve bunu AVA (5-aminovaleriyonik asit) ile BN (7-14)'e bağlamışlardır. AVA, peptidin reseptör bağlayıcı C-terminali ile şelatlayıcı kısmın girişim yapmasını önlemek için BFCA ile peptid arasına yerleştirilir. *In vitro* çalışmalar sonucu ürün bileşiğin yüksek bağlanma ilgisi gösterdiği bulunmuş farmakokinetik çalışmalar sonucu ürünün hedefe spesifik olduğu ve kandan hızlı atıldığı belirlenmiştir [94]. La Bella ve arkadaşları bombesin analogu [PADA-Ava]- bombesin(7-14)'ün [$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ (OH_2)₃(CO)₃]⁺ ile işaretlendiğinde teşhis radyofarmasötiği olarak kullanılma potansiyeli

olduğunu rapor etmişlerdir. Sentez sonrası işaretleme biyolojik aktivite kaybı ile sonuçlandığından sentez öncesi işaretleme yaklaşımı seçilmiştir. Bağlanma çalışmaları sonucu [Re(I)-PADA-AVA]-bombesin(7-14)'ün hızlı bir şekilde hücre içine alındığı tespit edilmiştir. PC-3 (prostat kanser hücresi) tümörlü fareler üzerinde gerçekleştirilen biyodağılım çalışmaları sonucu radyoaktivitenin kandan hızlı bir şekilde atıldığı gözlenmiştir [71], [95].

2.5.6 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü

Radyofarmasötiklerin insanlara uygulamak amacıyla üretilen maddeler olması nedeniyle kalite kontrollerinin titizlikle yapılması gerekir. Kalite kontrolü, birkaç spesifik test ve radyofarmasötiğin verimi, biyolojik güvenliği, ürün kimliği, etkisi ve safsızlığı ile ilgili testleri içerir. Tüm kalite kontrol testleri, radyoaktif olmayan farmasötiklerde de uygulanmaktadır, ilaveten radyoizotop ve radyokimyasal saflık için testler yapılmalıdır. Çoğunlukla bu kontrol testleri, ürünün mümkün olduğu kadar başlangıcından bitişine kadar olan üretim basamaklarında gerçekleştirilmelidir. Radyofarmasötiklerin kalite kontrollerinde aşağıdaki basamaklar izlenmektedir.

2.5.6.1 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolünde Uygulanacak Basamaklar

•Radyoaktiflik Ölçümü

Radyofarmasötiklerin güvenli ve etkili kullanımı radyoizotop ve kimyasal bileşimlerinin yüksek saflıkta olmasını gerektirir. Her nükleer tıp prosedürü kısmen kimyasal yapıda bir radyoizotopun uygulanmasını gerektirir. İstenilen radyoizotopun farklı kimyasal yapıları veya diğer radyoizotopların mevcudu diyagnostik prosedürlerden istenilmeyen bilgi öğretilmesi safsızlıkların mevcudiyetini gösterir. Radyofarmasötik hazırlandıktan sonra aktivitesinin ölçülmesi gerekir ve radyofarmasötiğin ismi, uygulama yolu, aktivitesi, kullanım süresi kap üzerine yazılır. Ticari radyofarmasötiklerin aktivite ölçümü radyoizotop kalibratörleri ile yapılır ve bu aletlerin kalibrasyonlarının Ra-226 (Radyum-226), Cs-137 (Sezyum-137) ve Co-57 (Kobalt-57) gibi uzun yarı-ömürlü standart kaynaklar kullanılarak sıklıkla kontrol edilmesi gerekir.

•Radyonüklid Safsızlık

İstenilen yapıdaki radyonüklidin aktivitesinin, kaynaktaki toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanmaktadır. Radyofarmasötiklerde radyonüklid safsızlıklar genelde radyokimyasal işlemler sırasında reaksiyona girmemiş radyonüklidin ayrılmasından veya radyonüklid üretim metodundan doğar. Radyonüklid safsızlıklar diagnostik bilgiye etki etmeksizin radyasyon dozunu arttırdığından dolayı önemlidir. En önemlisi istenilen radyonüklidin yarı-ömrü daha uzun olan safsızlıklar içermemesidir. Çünkü safsızlık yüzdesi zamanla artacaktır. Örneğin; yarıömrü 6 saat olan $^{99}\text{Tc}^m$ 'in yanında yarıömrü 67 saat olan ^{99}Mo safsızlığı gibi. Radyonüklidlerin safsızlığının ölçümü örneklerden salınan γ -ışınlarının spektrumunu çok kanallı analizör ile NaI(Tl) kristalli sintilasyon dedektörü veya Ge dedektörü kullanılarak yapılır.

•Radyokimyasal Saflık

Radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığı, radyofarmasötüğün uygulanmasından sonra biyolojik davranışları saptayabilmek ve bununla beraber araştırmanın başarısı ve hastaya verilen doz açısından oldukça önemlidir [96], [97].

•Kimyasal Saflık

Kimyasal saflık, işaretlenen bileşiğin başlangıçtaki saflığına bağlı olduğu kadar, işaretleme esnasındaki şartlar nedeniyle (pH, ısı, ışık ve indirgen maddeler gibi) ortaya çıkan yeni bir takım yabancı maddelere bağlıdır. Bu yabancı maddeler de işaretlenip radyokimyasal saflığı bozabilirler. Kimyasal saflık tayinlerinde spektrofotometrik, kromatografik, titrimetrik yöntemler kullanılabilir [97].

•Sterilite

Hazırlanan radyofarmasötiklerin steril olması gerekmektedir. Sterilite, standart kültür ortamında üreyen bakteri, mantar gibi canlı organizmaların bulunmaması demektir. Sterilizasyon ise bu organizmaların yok edilmesidir. Radyofarmasötikler hastaya verilmeden önce ya otoklavda ya da membran filtrasyonu yapılarak steril edilir. Otoklavla sterilizasyonda radyofarmasötik 121 °C'de, 18 psi (pounds per square inch) basınç altında 15-20 dakika tutulur. Bu tür sterilizasyon ısıya dayanıklı radyofarmasötikler için kullanılır. Isıyla bozulan radyofarmasötikler özellikle $^{99}\text{Tc}^m$ radyofarmasötikleri selüloz esterlerden yapılmış belirli gözenek boyutunda membran

filtrelerden süzülerek steril edilirler. Çok küçük organizmaların giderilmesi için 0.22 µm gözenek boyutlu filtreler yeterli olur [97].

•Pirojenite

Pirojenler, mikroorganizmaların metabolizmasıyla ortaya çıkan ya polisakkaridler ya da proteinlerdir. 0.05-1 µm büyüklüğünde, suda çözünen ve suya dayanıklı moleküllerdir. Bakterilerin ürettikleri pirojenlere endotoksin denir. Pirojenler insana ve hayvana enjekte edildikleri zaman vücut sıcaklığında artışa neden olurlar. Radyofarmasötik hazırlamada kullanılan kimyasal maddeler de pirojen madde içerebilirler. Pirojenik kontaminasyondan kaçınmak için çok saf kimyasallar ve steril maddeler kullanmak gerekir. Pirojenite kontrol testleri tavşanlar veya LAL (Limulus Amebocyte Lysate) testi ile yapılır. At nalı yengecinin kanından elde edilen LAL çözeltisi pirojen ve endotoksinlerle katı bir jel oluşturur. Hastaya verilmeden önce her radyofarmasötiğe pirojenite testi uygulanamayabilir. Çoğu radyofarmasötikler hazırlandıktan sonra ilk yarım saat içinde hastaya verilirler [63].

2.5.6.2 Radyofarmasötiklerde Kullanılan Kalite Kontrol Yöntemleri

•Kromatografi

Kromatografi, bir durgun ve bir hareketli faz arasında moleküllerin diferansiyel etkileşimlerine dayalı bir “ayırma teknikleri ailesi” dir. Durağan faz sıvı veya katı olabilir diğeri ise sıvı veya gaz olabilir. Ayrılacak maddeler, durgun ve hareketli fazlar arasında belirlenen bir yönde hareket ederek dağılırlar. Farklı maddeler farklı derecelerde dağılırlar ve bundan dolayı biri diğerinden ayrılır. Kromatografi diğer yöntemlerle ayrılması zor hatta imkansız olan birbirine çok benzer bileşiklerin ayrılmasına da olanak sağlar [63].

•İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

Radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığının saptanması için çok geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. TLC plakaları, destek maddesi (alüminyum, plastik, cam gibi) üzerine bir adsorbanın kaplanmasıyla oluşmuştur. Adsorban maddeleri ise çoğunlukla selüloz, silikajel ve alüminyum oksit gibi maddelerdir. İnce tabaka şeridi orijinine mikrolitre miktarındaki örnek uygulanmış olan ince tabaka şeridi, içinde uygun bir

çözgen bulunan tank içerisine batırılır. Bu tankın çözgenle doyurulmuş bir atmosfere sahip olması gerekir. Çözgen hareketli, adsorban ise durgun faz olarak adlandırılır. Çözgen çözünebilen radyofarmasötiklerin adsorban boyunca taşınımını sağlarken durgun fazın elektrostatik çekim kuvvetleri çeşitli radyokimyasal özelliklerin taşınımını geciktirir. Bu etki radyokimyasal özelliklerin hareketli fazla farklı çözünebilirliğe sahip olmasından dolayı farklı hızlarda taşınımına sebep olur. Böylece adsorban boyunca radyofarmasötik ve radyokimyasal safsızlıklar ayrılmış olur. Bu radyokimyasalların farklı özelliklere sahip olmaları nedeniyle durgun ve hareketli fazlar arasındaki ilişkiye göre farklı dağılım gösterirler. Çoğunlukla kullanılan çözgenler; hekzan, kloroform, dietil eter, etil asetat, n-bütanol, aseton, izopropil alkol gibi organik maddelerdir. Bu çözgenler bir veya birkaç çözgenin bileşiminden oluşan sistemler de olabilir. Tank içinde bulunan TLC şeritinde çözgen istenilen mesafeye taşındıktan sonra, şerit tanktan çıkarılır. Oda sıcaklığında kurutulur ve şerit orjinden itibaren 5 mm parçalar halinde kesilir. Her bir parça sintilasyon detektöründe sayılır veya TLC-tarama cihazında taratılarak kromatogramı alınır. Her bir radyokimyasal bileşenin taşınım mesafesi R_f (relative front) değeriyle ifade edilir (eşitlik 2.3). Bu mesafeler orjinden çözgenin taşındığı nokta ve radyokimyasal bileşenlerin konsantre olduğu mesafe orjinden ölçülerek tespit edilir.

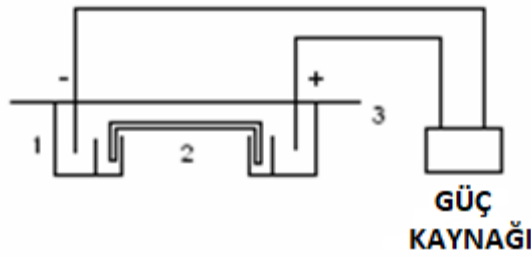
$$R_f = \frac{\text{Radyokimyasal bileşenin ilerlediği uzaklık}}{\text{Çözgenin ilerlediği uzaklık}} \quad (2.3)$$

Tespit edilen R_f değerleri radyofarmasötüğün radyokimyasal saflığının hesaplanmasında önem taşırlar [97].

•Elektroforez

Yüklü moleküllerin net yüklerine göre elektrik alanda artı ve eksi kutuplara doğru farklı hızlarda hareketleri temel alınarak İsveçli A. Tiselius tarafından tasarlanan elektroforez cihazı, özellikle yüklü biyolojik polimerlerin karakterizasyonu, saflaştırılması ve analizinde kullanılan bir tekniktir. Yüklü bir molekülün iki elektrod arasında bir elektrik alanına konulduğunda (+), ya da (-) yüklü olmasına göre katod ya da anoda göçer. Bu elektrik alanında göçme işine “elektroforez” denir. Burada; elektro, elektrik; phoresis

de göçme anlamına gelir. Bu nedenle, elektroforez; elektrik etkisi ile göçme anlamına gelir [63]. Şematik olarak elektroforez sistemi şöyle gösterilebilir:



Şekil 2. 17 Elektroforez sisteminin şematik gösterimi [63]

Elektroforez sistemi

- 1- Tampon çözelti
- 2- Destek ortamı
- 3- Buharlaşmayı önleyici kapak

Elektroforez makromoleküllerin, özellikle amino asitlerin, peptidlerin, proteinlerin, nükleotidlerin ve nükleik asitlerin birbirlerinden ayrılmaları ve saflık analizi için kullanılan bir tekniktir. Karışımdaki her molekülün kendine özgü bir yük ve boyutu olması beklenir ki bunun sonucu da elektrik alandaki göçü de kendine özgüdür. Bu beklenti bütün elektroforetik yöntemlerde analiz ve ayırımın temelini oluşturur. Farklı iki molekülde yük aynı olsa bile boyut aynı değildir. Boyut aynı olsa o zaman da yük aynı olmaz. Yükü aynı olan iki molekülden boyutu küçük olan elektrik alanında daha hızlı hareket eder. Aynı şekilde yükü fazla olan molekül de yükü az olandan daha hızlı hareket eder. Geliştirilmiş olan bütün elektroforez tipleri (kağıt ve selüloz asetat elektroforezi, jel elektroforezi, immünoelektroforez, izoelektrik fokuslama, 2D-PAGE ve kapiler elektroforez) yukarıda verilen prensibe dayanır. Kullanılan yöntemlerdeki ana fark kullanılan destek maddesinin türüdür.

•Kağıt Elektroforezi

Kağıt elektroforezi kullanım kolaylığı ve ucuz olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir. Selüloz kağıt şeritlerinin (genelde Whatman No. 1 kromatografi kağıdı) destek maddesi olarak kullanıldığı elektroforez türüdür. Kağıt elektroforezi tekniğinde destek maddesi olan selüloz kağıt şerit iki ucundan tampon çözeltisi ve iki elektrod ile

temas eder. Güç kaynağı bu iki elektrod arasında voltajı sağlar ve gerekli elektrik alanını veya voltaj gradientini kağıt şeridinin üzerindeki likit şerit üzerinde oluşturur. Örnek tatbikinden önce kağıt şerit tampon çözeltisine batırılarak tamponla doyurulur, filtre kağıdı ile şerit üzerindeki tampon fazlalığı uzaklaştırılır ve fazla beklemeden örnek şeridin ortasına nokta şeklinde veya düz bir hat şeklinde iz bırakacak şekilde tatbik edildikten sonra voltaj açılarak elektrik alanda, önceden belirlenmiş süre göçe bırakılır. Bu süre sonunda voltaj kapatılır ve örnek görünür değilse boya ile görünürleştirilerek göç yön ve göç mesafesi kaydedilir [63]. Birçok maddenin ayrılmasında kullanılan kağıt elektroforezi yöntemi radyokimyasal saflığın saptanmasında da çok kullanılan bir yöntemdir. Elektroforez işlemi sonunda elektroforez kağıdı kurutulur, belirli parça boyutlarında kesilen her bir parçanın aktivitesi uygun sayım sisteminde sayılır. Parça sayısı ve sayım değerleri arasında çizilen grafikten net bir şekilde ayrılması sağlanmış olan kompleksin işaretlenme veriminin saptanmasında büyük kolaylık sağlar. Ayrıca nükleer tıp uygulamalarında büyük önem taşıyan kompleks yapıdaki radyofarmasötiklerin yükü hakkında bilgi edinilmesi mümkündür [97].

•Lipofilisite

Lipofilisite, bileşiğin lipid faza ilgisidir ve bileşiğin *in vivo* lipid biyolojik membranları geçme kabiliyetini gösterir. Biri su diğeri organik olmak üzere (birbiri içinde çözünmez) iki sıvı arasında test edilen bileşiğin dağılma katsayısı olarak ölçülür. Standart organik faz olarak n-oktanol tercih edilir. $n_{\text{oktanol}}/n_{\text{su}}$ oranı P dağılım katsayısı olarak verilir ve kantitatif yapı-dağılım ilişkilerinde bu değer “log P” olarak ifade edilir (eşitlik 2.4):

$$\log P = n_{\text{oktanol}}/n_{\text{su}} \quad (2.4)$$

$^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -radyofarmasötikleri için oktanol/su sistemi bazı sınırlamalara sahiptir. Gerçek P değerleri saf bileşiklerin kullanımlarına bağlıdır. Oysa $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ kimyasında saflığın aktif olarak gerekliliği son derece nadirdir. Sıklıkla kompleks karışımları, tekli ligand ve hidroliz olmuş indirgenmiş $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ ve indirgenmemiş $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ miktarı her zaman ortamda mevcuttur. Hidrofilik safsızlığın küçük miktarı kompleksin lipofilisite değerinde gözlenen dağılma oranını önemli derecede düşürebilir [97]. n-Oktanol, basit bir fosfolipid membran modeli olarak seçilen bir organikdir, fakat ilacın kan-beyin bariyeri veya deri içine girişini tahmin etmekte ciddi kusurlar göstermektedir. Lipofilisite, ilaç

bileşiminin biyolojik sistemde dağılımını tahmin etmekte kullanılan çok yararlı bir parametredir [63]. Peptidlerin, proteinlerin ve enzimlerin biyolojik aktivitesini, ilaç dağılım bilgisini ve dozaj formülasyonunun saptanması için hidrofobite ve lipofilisite önemlidir. Peptidin biyolojik transport özelliklerini anlamada $n_{\text{oktanol}}/n_{\text{su}}$ çoğu zaman iyi bir yol göstericidir. Peptidlerin çoğu hidrofilik özelliğe sahiptir [63].

•Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performans sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography) en yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden biridir. HPLC’de bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli faz kullanılır. Bu bileşenler ilk olarak çözgünde çözünürleştirilirler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar. Kromatografik bir kolonun ayırma gücü; kolon boyu ve uzunluk başına teorik plaka sayısı ile artmaktadır. Ancak kolon uzunluğunun artması pik yayılmasına sebep olmaktadır. Teorik plaka sayısı ise sabit fazın küçük partikül boyutuna sahip olması ayırma gücünü iyileştirmektedir. Ancak partikül boyutu küçüldükçe, hareketli fazın akışına direnç büyür. Bu ise kolonda geri basınç oluşturur ve stasyonier fazın matriks yapısına zarar verir. Böylece elüent akışı ve ayırma gücü azalır. Son yıllarda kolon kromatografi teknolojisindeki gelişme ile yüksek basınçlara dayanıklı kolon dolgu maddeleri ile yüksek basınç altında çalışabilen sistemler geliştirilmiştir [98], [99].

Başlangıçta basınç, modern sıvı kromatografisinin temel kriteri olarak düşünülmekteydi ve bu nedenle “Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi” olarak adlandırılmaktaydı. Ancak bu günümüzde geçersiz kabul edilmektedir. Çünkü yüksek performans yalnız basıncın değil bir çok faktörün birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır [98].

Bu faktörler:

- Dar bir dağılım aralığında çok küçük partiküllerin kullanılması,
- Uniform gözenek boyutu ve dağılımı,
- Yüksek basınçta kolon paketleme,
- Doğru, düşük hacimli örnek enjektörleri,
- Duyarlı, düşük hacimli dedektörler,

- İyi pompalama sistemi kullanımı,

olarak sıralanabilir. Bu nedenlerden dolayı “Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi” terimi kullanılmaktadır. HPLC’nin diğer klasik tekniklere göre kıyaslaması yapıldığında; küçük boyutlu paslanmaz çelik kolonların kullanılması, partikül boyutları çok küçük (3.5-10 μm) matrislerin kullanılması, yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızı sağlanabilmesi, örnek gereksinimlerinin az olması, sürekli akış dedektörleri ile küçük miktarların tayinine olanak sağlaması, otomasyona müsait olması, hızlı analiz ve yüksek ayırma gücüne sahip olmaları nedeniyle çok yönlü uygulamalara daha açık olduğu görülmektedir. Kromatografik ayırma işlemi örnek moleküllerinin hareketli faz ve sabit faz arasında paylaşımından ibarettir. Ayırma performansı bileşenin alıkonma ve band genişleme faktörüne bağlıdır. Band genişleme genelde bir kinetik parametredir ve adsorbanın partikül büyüklüğü, porosite, por (gözenek) boyutu, kolon boyutu, şekli ve doldurma performansına bağlıdır. Diğer yandan alıkonma, bu parametrelerin yanı sıra moleküler yüzey etkileşimleri ve toplam adsorbent yüzeyine de bağlıdır. Kromatografik alıkonmayı bulmanın en kolay yolu ilgili bileşiğin enjeksiyon noktası ve dedektör cevabının maksimumları arasındaki zamanın ölçümüdür. Bu parametre genelde “alıkonma zamanı” olarak adlandırılır. Alıkonma zamanı, R_t elüentin akış hızı ile ters orantılıdır. HPLC cihazları genelde, hareketli faz deposu, pompa, enjektör, kolon, dedektör ve kaydedici (veya veri sistemi) içerirler. Sistemin kalbi ayırmanın gerçekleştirildiği kolondur. Sabit faz μm boyutlu poröz partiküllerden oluşur, bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır. Kromatografik işlem kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar. Bileşenlerin ayrılması analit ve hareketli fazın kolona pompalanması ile devam eder. Ayrılarak elüe olan her bir komponentin pikleri kaydedilir. Elüe olan bileşenlerin dedeksiyonu önemlidir. Kullanılan dedektöre göre seçimli veya universal olabilir. Her bir komponent için alınan dedektör cevabı bir kaydedici veya bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir. Kromatografik verilerin toplanması, saklanması ve analizi, bilgisayarlar ve diğer data işlemcileri kullanılarak yapılır [63].

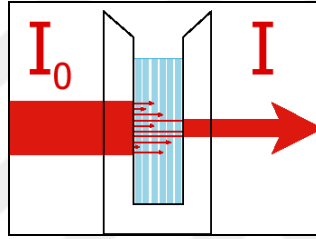
2.6 Kullanılan Ölçüm Yöntemleri

2.6.1 UV-VIS Spektroskopisi

Tek renkli ve I_0 şiddetindeki ışık demeti kalınlığı 1 cm olan bir tüpte bulunan çözeltideki moleküller tarafından absorplandığında şiddeti azalır ve tüpü I şiddetinde terk eder. Bu azalma Lambert-Beer eşitliği ile ifade edilir (eşitlik 2.5) [100].

$$\log I_0 / I = \epsilon bc = A \quad (2.5)$$

Burada c mol/lit cinsinden derişimi, ϵ lt/mol.cm cinsinden molar sönümlenme katsayısını ve b de cm cinsinden örnek kabının kalınlığını temsil etmektedir. A ise absorbands ya da optik yoğunluk denir (eşitlik 2.6 ve eşitlik 2.7).



Şekil 2. 18 Işığın c konsantrasyonunda, b cm kalınlığındaki ortamdan geçerken absorbsiyon nedeniyle şiddetindeki azalma [100]

Geçirgenlik;

$$T = I/I_0 \quad (2.6)$$

Absorbans;

$$A = \log I_0/I \quad (2.7)$$

Absorbans ile derişim arasındaki bu ilişkiden analitik olarak yararlanılır. Ancak bu çalışmamızda peptidlerin ve proteinlerin belli dalga boyunda (280 nm) absorbands piki verdikleri gerçeğine dayanarak UV-VIS moleküler absorbsiyon spektroskopisi yöntemini tanıma amaçlı olarak kullanıldı [100].

2.6.2 Zeta Potansiyeli ve Boyut Ölçümü

En az bir boyutu 1nm - 1 μ m arasında olan peptid, protein gibi katı bir maddenin sıvı bir çözücü içinde çözünmesiyle oluşan kolloidal sisteme kolloidal süspansiyon denir.

Kolloidal sistemlerin doğalarını gösteren en önemli özelliklerden ikisi, partikül boyutu ve yüzey özellikleridir. Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının ortalama boyut analizlerinde Zetasizer Nano ZS cihazında; 633 nm dalga boyunda 4,0 mV He-Ne lazer kullanılarak 25 °C’de foton kolerasyon spektroskopisi yöntemi uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP ve kırılma indisinin 1.33 olarak alındığı ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm’lik membranlardan filtre edilerek analiz yapılır. Bir korelatör tarafından kaydedilen zaman ölçümlerinden G2(τ) saçılma siddetine ait otokorelasyon fonksiyonu bulunur, bu fonksiyona en iyi uyan 3. dereceden polinom saptanır, polinomun katsayılarından translasyonel difüzyon katsayısı D ve polidispersite sabiti hesaplanır. Boyut değeri, Stokes-Einstein denkleminde bulunur (Çizelge 2.11) [54].

Çizelge 2. 11 Stokes-Einstein denklemi

$d_H = \frac{kT}{3\pi\eta D}$
d_H = hidrodinamik çap (m)
kT = ortalama kinetik enerji (J)
k = Boltzmann sabiti = $1,381 \times 10^{-23}$ J/K
T = mutlak sıcaklık (K)
η = dispersantın viskozitesi (Pa•s)
D = difüzyon katsayısı (kümülant analizinden bulunur) (J/Pa•s•m)

Peptid, protein, polimer çözeltilerinin ya da bunların karışımlarının Zeta Potansiyeli analizlerinde ise Zetasizer Nano ZS cihazında bir kapiler hücre içerisinde Lazer Doppler Elektroforez (LDE) tekniği uygulanarak ölçüm yapılmaktadır. Vizkozitenin 0,8872 cP, dielektrik sabitinin 79; f(ka)’nın 1.50 (Smoluchowski) olarak alındığı 25°C’de ki ölçümlerde tüm çözeltiler 0,22 µm’lik membranlardan filtre edilerek analiz yapılır. Örneğin zeta potansiyel ölçümü için pH 7’de negatif yüklü olan BSA molekülünü ele alalım. BSA partikülleri ortamda bulunan iyonlarla girdiğı elektrostatik etkileşim sonucu pozitif iyonları çekerken negatif iyonları da iterek partikül yüzeyinin hemen dışında, pozitif iyonların yüzeye sıkı bağılı olduğı ve Stern katmanı denilen bir tabaka

oluşturmaktadır. Stern katmanından sonra iyonların hareket edebildiği bir difüz bölgesi mevcuttur. Difüz bölgesinde; hayali olarak var olduğu düşünülen bir Kayma düzlemi vardır ve bu düzlemin içinde kalan pozitif iyonlar, partikülle birlikte hareket etmeye zorlanırken, dışında kalanlar ise bağımsız olarak hareket edebilmektedirler. Molekülün Stern katmanındaki elektrik potansiyeline Stern potansiyeli, kayma düzlemindeki elektrik potansiyeline ise Zeta Potansiyeli denmektedir ve Zeta Potansiyeli Henry denkleminde hesaplanmaktadır (eşitlik 2.8) [20].

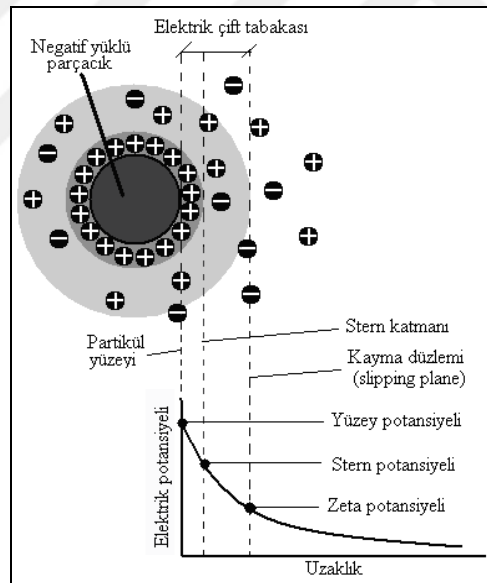
$$U_E = [2\varepsilon z f(ka)] / 3\eta \quad (2.8)$$

U_E = Elektroforetik hareketlilik

ε = Ortamın dielektrik sabiti

η = Ortamın viskozitesi

$f(ka)$ = Henry Fonksiyonu



Şekil 2. 19 Negatif yüklü partikülün zeta potansiyeli [101]

2.6.3 LC-MS

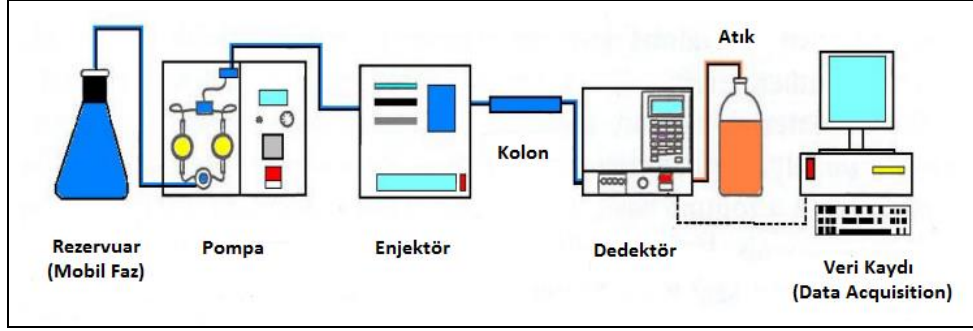
LC-MS temel olarak HPLC ile MS'in birlikte kullanıldığı bir sistemdir. LC-MS 1970'lerde kullanılmaya başlanılmıştır ve günümüzde biyolojik maddelerin analizinde en çok başvurulan laboratuvar cihazlarından biridir. Bunun altında yatan sebep düşük konsantrasyonlarda analize imkan vermesi, yapısal analizi olanaklı kılması, otomatik

olarak kullanılabilmesidir. LC-MS ile fizyolojik sıvıların, ilaç etkileşimlerinin incelenmesi, proteinlerin ve peptidlerin yapı analizleri yapılabilmektedir. HPLC, kütle spektrometresine bağlandığında, kolondan birçok bileşen çıkarken her birinin kütle spektrumu aynı anda alınabilir. Bazı durumlarda, eğer ölçümler yeterli doğrulukla yapılırsa, protein veya peptidin hangi protein veya peptid olduğu saptanabilir. Kütle spektrometresinde aslında molekülün kütlesi değil, kütle/yük (m/z) oranı tayin edilmektedir. Kütle spektrumu ise iyon miktarıyla m/z arasında çizilen bir grafikdir. Molekülün yüke sahip olması için iyonlaştırılması gerekmektedir ve bu işlem gaz fazında gerçekleştirilir. LC-MS cihazı 4 temel kısımdan oluşmaktadır. Bu kısımlar sırasıyla HPLC, iyonlaştırıcı, kütle analizörü ve dedektördür [54], [98].

2.6.3.1 HPLC

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır. Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne Sıvı Kromatografi (SK); hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise Gaz kromatografi denir. Gaz kromatografi (GK), gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır [98].

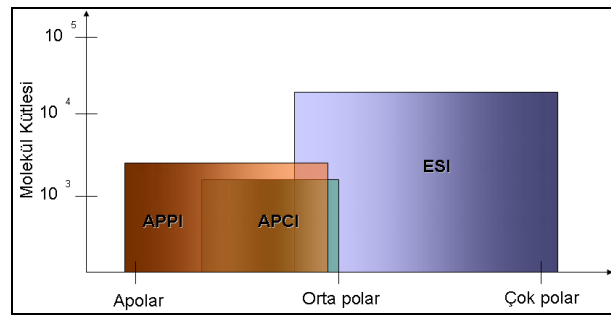
Sıvı kromatografisinde bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşmelere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terk ederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı 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 performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) denir.



Şekil 2. 20 HPLC'nin şematik gösterimi [98]

2.6.3.2 İyonlaştırma

MS cihazında ölçümün gerçekleştirilebilmesi için öncelikle numunenin iyonlaştırılması gerekmektedir. Bu işlem, uygulamaya ve sahip olunan MS cihazına uygun iyonlaştırma yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. MS'teki en önemli basamak analitlerin gaz fazındaki iyonlara dönüştürüldüğü iyonlaştırma işlemidir. Çoğu iyonlaştırma işlemi genelde iki basamaklıdır: Önce örnek gaz hale getirilir ve sonra iyonlaştırılır. Çoğu biyolojik örnek yüksek molekül ağırlığına sahip olduğu için gaz hale dönüştürülmeleri oldukça zordur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda büyük ve uçucu olmayan moleküllerin çoğu gaz fazındaki iyonlara çevirecek yeni iyonlaştırma teknikleri geliştirilmiştir. Bu tekniklerden en önemlileri elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ve matris destekli lazer desorpsiyon iyonlaştırma (MALDI) yöntemleridir. Bu yöntemler atmosferik basınç kimyasal iyonlaştırma (APCI) ve atmosferik basınç foto-iyonlaştırma (APPI) tekniklerinin gelişmesini sağlamıştır. Genellikle ESI, APPI ve APCI'ye göre daha duyarlıdır [54].



Şekil 2. 21 İyonlaştırma teknikleri [54]

2.6.3.3 K t le Analizörü

Farklı tipteki k t le analizörleri farklı yöntemler kullanarak iyonları ölçmektedir. K t le analizörlerinin görevi, iyonlaştırma kaynağında oluşan iyonları k t le/yük (m/z) oranlarına göre ayırmaktır. En çok kullanılanları:

- Kuadropol analizörler
- Uçuř zamanlı (TOF) analizörler
- Manyetik sektörlü analizörler
- İyon tuzağı analiz rleridir.

Çoğu analitik ölçümde, bahsedilmesi gereken iki önemli nokta bulunmaktadır: doğruluk ve kesinlik. MS cihazında ölçümün kesinliği rezolüsyona (iki pikin birbirinden ayrılması) bağlıdır. Günümüzde kullanımda olan bes temel k t le analizörü bulunmaktadır. Bunlar iki grupta toplanabilir: yollu analizörler ve tuzaklı analizörler. Yollu analizörlerde iyonlar iyon kaynağını bir ışın demetiyle terk ederler ve analizörde ilerleyerek dedektöre ulaşırlar. Tuzaklı analizörlerde ise, iyonlar analizörde tutulur. İyonlar ya analizörün içinde oluşurlar ya da bir iyonlaştırma kaynağından gelirler [54].

BÖLÜM 3

DENEYSEL KISIM

3.1 Deneysel Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Kullanılan cihazlar

CİHAZ/EKİPMAN	KULLANIM AMACI
Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez Sistemi (CEM / Liberty)	Peptid Dizilerinin Sentezi
Isıtmalı Vakum Kabı (Büchi Glass Oven B-585)	Peptidlerin Isı Uygulamadan Vakumda Kurutulması
Çalkalayıcı (Heidolph Unimax 1010)	Peptid Sentezi Sonrası Kırma (Cleavage) İşleminde
Döner Buharlaştırıcı (Heidolph Laborota4010)	Peptid Sentezinde Kırma İşleminde Sonra TFA Kokteylinin Uzaklaştırılması
LC-MS Analiz Sistemi (Shimadzu)	Sentezlenen Peptidlerin Karakterizasyonunun Yapılması
Azot Jeneratörü (PEAK Scientific)	LC-MS Cihazının Taşıyıcı Gaz Olarak Kullandığı Saf Azot Gazının Üretilmesi
Preparatif HPLC Analiz Sistemi (Shimadzu)	Peptidlerin Saflaştırılması
Floresans Spektrofotometre Analiz Sistemi	Peptid-Şelatör Konjugatlarının Analizi
HPLC Analiz Sistemi (Shimadzu / SPD-10AV VP UV-VIS Detector)	Peptid-Şelatör Konjugatlarının Yapı Analizleri
Zetasizer Nano ZS (Malvern / Zen3600)	Peptid-Şelatör Konjugatlarının Yapı Analizleri (Boyut Ve Zeta Potansiyel Ölçümleri)
RadioHPLC Agilent/Activity Det.	İşaretlenen Konjugatın Analizi
UV-VIS Spektrofotometre	Konjugat ve Komplekslerin Analizleri
Liyofilizatör	Örneklerin Dondurularak Kurutulması

Çizelge 3. 1 Kullanılan cihazlar (devamı)

⁶⁸ Ge/ ⁶⁸ Ga Jeneratörü IDB Holland	Galyum-68 Radyonüklidinin Sağımı
Milipore-Q Gradient Ultra Saf Su Cihazı	Çalışmalarda Kullanılacak Ultra Saf Suyun Temini
Vakum Etüvü	Vakum Altında Kurutma
GE Healthcare/Discovery 710 PET/CT Cihazı	Deney Hayvanı Görüntüleme Çalışmaları
Siemens Gama Kamera/SPECT	Deney Hayvanı Görüntüleme ve Organ Doğrulama Çalışmaları
AtomLab 100 Plus Biodex Dose Calibrator	Radyoaktif Doz Ölçümlerinde

3.2 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kullanılan kimyasal maddeler Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler

Kimyasalın Adı	Alındığı Firma	Katalog Nosu
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid (EDC)	Sigma	E-7750
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Sigma	E-9884
Sodyum dihidrojen fosfat, (NaH ₂ PO ₄)	Riedel-de Haën	04361
Sodyum hidrojen fosfat, (Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O)	Fluka	71647
Sodyum klorür, (NaCl)	Fluka	71376
Sodyum hidroksit, (NaOH)	Fluka	06203
Hidroklorik asit, (HCl)	Riedel-de Haën	07102
Sodyum azid, (NaN ₃)	Applichem	A1430
Asetonitril CHROMASOLV	Sigma	34851
2-propanol LC-MS CHROMASOLV	Riedel-de Häen	34965
Piperidin	Merck	8.22299.2500
N-Hidroksibenzotriazol (HOBt)	Fluka	54804
N,N-Diisopropilethilamine (DIEA)	Sigma-Aldrich	D125806
N-Metil-2-pirrolidon (NMP)	Sigma	M6762
Diklorometan (DCM)	Riedel-de Haen	24233
Dimetilformamid (DMF)	Fluka	40255
Thioanisol	Fluka	88470
Trifluoroasetikasit (TFA)	Fluka	91700
O-Benzotriazole-N,N,N',N'-tetrametil-uronyum-hekzafluoro-fosfat (HBTU)	Fluka	12804
1,2-Etan ditiol (EDT)	Aldrich	398020
Dietileter	Riedel-de Haen	24005
Etil asetat	Riedel-de Häen	27227
Tetrahidrofuran (THF)	J.T.Baker	9441

Çizelge 3. 2 Kullanılan Kimyasal Maddeler (devamı)

Asetik Anhidrit	Merck	1.00042.1000
Fmoc-Cys(Trt)-Rink-Amide MBHA Resin	MyBioSource	MBS406746
Fmoc-His(Trt)-OH	Aldrich	47639
Fmoc-Ala-OH	Aldrich	531480
Fmoc-Val-OH	Fluka	47638
Fmoc-Cys(Trt)-OH	Fluka	47695
n-Octanol	Merck	820931

3.3 Deneyisel Çalışmalarda Kullanılan Kimyasal Çözeltiler

Deneylerde sıklıkla kullanılan çözeltilerin hazırlanma prosedürleri verilmiştir.

3.3.1 Fosfat (PBS) Tamponu

2,6807 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=268,07$ g/mol) tartılarak 1 L'lik balon joje içerisindeki 450 mL ultra saf suda çözünür. Aynı zamanda 1,56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($M_w=156,01$ g/mol) tartılarak 450 mL ultra saf suda çözünür. Hazırlanan NaH_2PO_4 çözeltisi balon jojedeki Na_2HPO_4 çözeltisinin üzerine eklenir ve tekrar karıştırılır. Bu karışıma son olarak 8,766 g NaCl eklenir ve tekrar karıştırılır. Karışımın pH'ı ölçülür ve 1 M NaOH veya 1 M HCl ile pH 7'ye ayarlanır. Ultra saf su ile çözeltinin son hacmi 1 L'ye tamamlanır.

3.3.2 Amonyum Asetat Çözeltisi

7,708 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ($M_w=77,08$ g/mol) tartılarak 100 mL'lik balon joje içerisindeki ultra saf suda çözülür. Ultra saf su ile çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

3.3.3 EDTA (etilendiamintetraasetik asit) Çözeltisi

2,9224g $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ($M_w=292,24$ g/mol) tartılarak 100 mL'lik balon joje içerisindeki ultra saf suda çözülür. Ultra saf su ile çözeltinin son hacmi 100 mL'ye tamamlanır.

3.4 Peptid Dizisinin Sentezi

Bu tez kapsamında kanser vaskularizasyonunu, adeziv yapılanmayı ve enfeksiyon odaklarını hedefleyen N-kadherin antagonisti siklik pentapeptid (ADH-1)c (CHAVC; Cys-His-Ala-Val-Cys) (siklik adhezyon molekülü) sentezlenmiştir.

3.4.1 Lineer ADH-1 Peptid Dizisinin Sentez Döngüsü Prosedürü

Lineer ADH-1 (Ac-Cys-His-Ala-Val-Cys-CONH₂), CEM Liberty Mikrodalga Destekli Katı Faz Peptid Sentez sisteminde Fmoc kimyası kullanılarak sentezlendi. Rezin taneciklerinin (200 mg, 0.1 mmol) DMF (25 mL) içinde şişirilmesinin ardından, 30 mL'lik standart cam reaksiyon kabına aktarıldı. % 20 piperidin içeren DMF içinde iki kademeli mikrodalga koruma kaldırma yönteminin ardından bağlama basamağı izlendi. Mikrodalga bağlama basamağında DMF içine Fmoc korumalı amino asit (0.2 M) ilave edildi ve HCTU/HOBt.H₂O (DMF içinde 0.5 M) ve DIEA/NMP (2 M) solüsyonları sırasıyla aktivatör ve aktivatör baz olarak kullanıldı. Lineer ADH-1 dizisindeki tüm amino asitler için korumanın kaldırılması ve bağlanma prosedürleri tekrarlandı. 4 amino asit kalıntısı bağladıktan sonra, peptid dizisinin N-ucunun asetillenmesi için rezine bağlı peptide asetik anhidrid çözeltisi ile muamele edildi. Prosedürün bitiminden sonra, kırma işlemi için hazırlık olarak DMF ve DCM ile sırasıyla üç ve beş kez yıkama yapıldı. Önceden hazırlanan TFA/TIS/EDT/H₂O (94:1:2.5:2.5) kırma kokteyl çözeltisi ile peptidin resin taneciklerinden ayrılması gerçekleştirildi ve aynı zamanda amino asit yan zincir koruma grupları da kaldırıldı. Ham peptid, vakum altında TFA kokteylinin uzaklaştırılmasından sonra soğuk (-20 °C) eter ile çöktürüldü (Heidolph Laborota 4010) (Şekil 3.1). Beyaz toz halinde çöktürülen peptid siklizasyon işlemi için literatüreuygun olarak -18 °C'de muhafaza edildi [26-29]. Sentez ve kırma prosedürü sonunda 51.39 mg ham peptid elde edildi (Çizelge 3.3).

Çizelge 3. 3 Peptidin (ADH-1)c sentezi için kullanılan kimyasallar ve miktarları

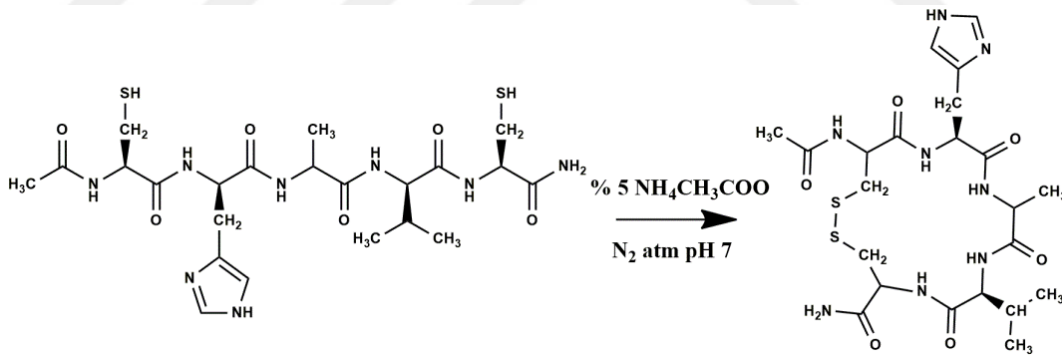
Kullanılan kimyasalın cinsi	Kullanılan kimyasalın adı	Miktar	Miktar
Rezin (Katı faz)	Fmoc-Cys(Trt)-Rink-Amide MBHA Resin	204 mg	20 mL
Amino asitler	Fmoc-His(Trt)-OH	620 mg	5 mL
	Fmoc-Ala-OH	310 mg	5 mL
	Fmoc-Val-OH	340 mg	5 mL
	Fmoc-Cys(Trt)-OH	700 mg	6 mL
Çözücü	DMF	1200 mL	
	DCM	85 mL	
Aktifleştirici (Activator)	HOBt.H ₂ O + HCTU	459 mg + 1241 mg	6 mL
Aktifleştirici Baz (Activator Base)	DIEA + NMP	1.4 mL + 2.6 mL	
Kaplama (Capping)	Asetik Anhidrit	8 mL	
Koruma Grubunun Kaldırılması (Deprotection)	Piperidin + DMF	19 mL + 74 mL	
Kırma Kokteyli (Cleavage Cocktail)	75 mL (% 94 TFA, % 2.5 H ₂ O, % 1 TIS, % 2.5 EDT)		



Şekil 3. 1 Kırma işleminden sonra kokteylin uzaklaştırılması

3.4.2 Lineer ADH-1 Peptid Dizisinin Makrosiklizasyon Prosedürü

Siklizasyon prosesi Dubey ve ark. [102] tarafından tanımlanan prosedüre dayanmaktadır. $i \rightarrow i+5$ siklizasyonu lineer ADH-1 peptid zincirinin sentez, kırma ve karakterizasyon basamaklarından sonra %5 amonyum asetat kullanılarak gerçekleştirildi. Peptid makrosiklizasyonunda halka kapanması metodunun seçilmesi siklizasyonda kilit rol oynar. Halka kapanması için uygun olmayan metodun seçimi reaksiyon hızını yavaşlatacağı gibi, düşük verime ve C-terminal ucunda rasemleşme veya dimerizasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonların oluşumuna neden olur. Disülfid bağı oluşumu yoluyla makrosiklizasyon tipik bir yan zincir siklizasyon metodudur (baş grup-yan zincir ve yan zincir-yan zincir). Bu prosedürde iki sistein arasında bir disülfid köprüsü oluşturuldu. Disülfid bağları sistein residlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu ile oluşturuldu. Lineer ADH-1 peptid ürünü, 1 mM olacak şekilde % 5'lik amonyum asetat çözeltisinde çözüldü ve azot atmosferinde disülfid bağı oluşumu için % 25'lik amonyum hidroksit ile pH 7'ye ayarlandı. Oksidasyon süresince çapraz bağlanmayı önlemek amacıyla seyreltme yapıldı. İşlem tamamlandıktan sonra siklik peptid liyofilize edildi.



Şekil 3. 2 (ADH-1)c molekülünün sentezi

3.5 Anti-Kanser Özellikteki Siklik (ADH-1)c Peptid Molekülünün EDTA (Etilen Diamin Tetraasetik Asit) Şelatörü İle Konjugasyon Prosedürü

N-cadherin antagonistlerinden (ADH-1)c peptidinin EDTA şelatörü ile konjugatı EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid] çapraz bağlayıcısı varlığında suda çözünür karbodiimid prosedürü ile sentezlenmiştir.

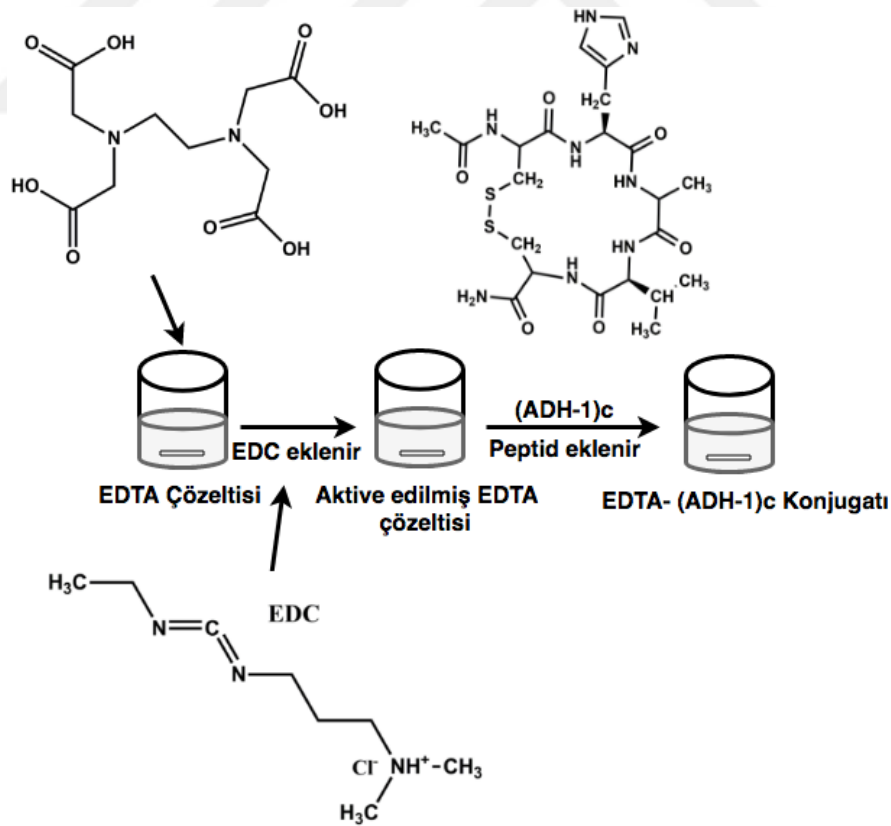
Peptidin çözelti içerisindeki konsantrasyonu 1 mg/mL olarak çalışıldı.

$M_{EDTA} = 292,34$; $M_{peptid} = 573$ Da olmak üzere gerekli EDTA miktarının belirlenmesi için gerekli olan hesaplamalar şu şekildedir (eşitlik 3.1):

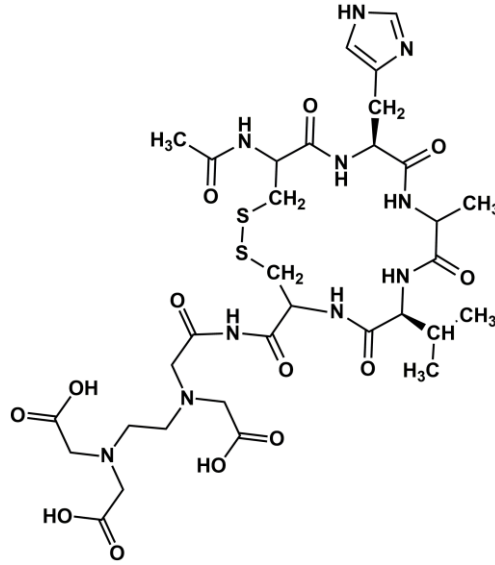
$$n_{peptid}/n_{EDTA} = 1$$

$$\frac{n_{peptid}}{n_{EDTA}} = \frac{c_{peptid} M_{EDTA}}{c_{EDTA} M_{peptid}} \rightarrow 1 = \frac{\frac{3 \text{ mg}}{3 \text{ mL}} 292.24}{\frac{x \text{ mg}}{3 \text{ mL}} 573} \rightarrow x = 1,53 \frac{\text{mg}}{3 \text{ mL}} \text{ EDTA çözeltisi} \quad (3.1)$$

$n_{peptid}/n_{EDTA} = 1$ oranı için ne kadar EDTA gerektiği hesaplandı ve EDTA stok çözeltisi hazırlandı. Belirlenen miktarda EDTA çözeltisinin pH'ı 5'e düşürüldü ve aktivasyon amacıyla EDC eklendi. 2 saat karıştırıldı. Konjugasyon için sabit konsantrasyondaki peptid çözeltisi –COOH grupları aktive edilmiş gerekli miktardaki EDTA çözeltisi üzerine eklendi ve karışım 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırıldı. Daha sonra 4 °C'ye alınarak gece boyunca karıştırıldı ve sonrasında pH 7.4'e yükseltildi. 2 saat daha karıştırıldı ve sentezlenen konjugat floresans spektrofotometre, zetasizer ve LC-ESI-MS cihazları ile karakterize edildi.



Şekil 3. 3 Konjugasyon prosedürü



Şekil 3. 4 EDTA-(ADH-1)c konjugatının molekül yapısı

3.6 ⁶⁸Ga-EDTA-ANTI-CAD Ligandının Radyosentezi

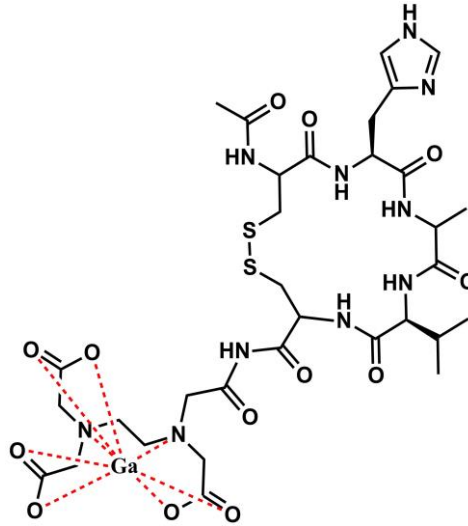
3.6.1 ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga Jeneratör Elusyonu Prosedürü

⁶⁸Ga ($t_{1/2}=67.7$ min, β^+ : %89, $E_{\beta+\text{maks}}$, 1.9 MeV, EC: %11, $E_{\gamma\text{maks}}$: 4.0 MeV) SnO₂-bazlı ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga jeneratöründen (IDB Holland Ticari iThemba Lab. Jeneratörü, 1110 MBq (30mCi)) 15-16 mL 0,6 M HCl ile disposable şırınga kullanılarak manual olarak elue edildi ve 9.5 M 1mL HCl içeren bir vialin içine toplandı. Bu aşamada hiçbir metal teması olmaması için tüm malzemeler plastik tercih edildi. Elde edilen ⁶⁸Ga çözeltisine, peptidlerle işaretlenmeye imkan verecek seviyeye getirmek için katyonik ön saflaştırma yapıldı. Solüsyon kuvvetli anyon değiştirici reçineye yüklendi (100 mg Dowex 1x8), ve aktivite [GaCl₄]⁻ kompleksi olarak reçinede tutuklandı. Son solüsyon 1.2 mL 5 M NaCl ve su ile elue edildi. Yaklaşık 1.5 mL 14-15 mCi aktiviteye sahip Galyum-68 radyonüklidi elde edildi. Oluşan ürün ile radyoişaretleme sonrası liganda bağlanmayan serbest galyum oranı Radyo-HPLC analizi ile değerlendirildi.

3.6.2 ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün Klinik Öncesi Radyoişaretlenmesi Prosedürü

⁶⁸Ge/⁶⁸Ga jeneratöründen elue edilen galyum-68 radyonüklidi ile işaretleme işlemini yapmak için, pH'ı 7.4'e ayarlanmış 50 µg EDTA-(ADH-1)c konjugatı ısıya dayanıklı reaksiyon vialine aktarıldıktan sonra üzerine 1.5 M HEPES tamponu eklendi. Hemen

ardından elue edilen 1,5 mL GaCl_4^- eklendi ve reaksiyon vialine azot ve kuru hava ortamında mikrodalga ısıtıcıda 90°C 'de 10 dk. süreyle reakte edildi. Sürenin sonunda reaksiyon vialine 15 mL PBS tamponu ilave edildi.



Şekil 3. 5 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-AntiCAD1}$ 'in molekül yapısı

3.6.2.1 $^{68}\text{Ga-EDTA-(ADH-1)c}$ Molekülünün Radyo-HPLC ile Analizi

Radyonüklidin ajana bağlanması aktivite dedektörü kullanarak Radio-HPLC (Agilent 1260 Infinity Quaternary LC) ile doğrulandı. 100 mm X 4.6 mm X 3.5 μm (uzunluk, iç çap, gözenek boyutu) boyutundaki Eclipse Plus C18 LC kolonu kullanıldı. Eluent A'dan (asetonitril, % 0.1 formik asit) eluent B'ye (su, % 0.1 formik asit) 0-5. dk %20 A; 5-15. dk % 20-60 A; 15-25 dk %60-80A; 25-30. dk %80-20A; 30-35. dk %20 A gradyent elüsyon ile 0.6 mL/dk'lık akış hızında çalışıldı. Ayırma pozitif iyon modunda asidik koşullar altında gerçekleştirildi. Daha iyi bir rezolüsyon için iyon çifti ajanları olarak formik asit ilave edildi.

3.6.2.2 $^{68}\text{Ga-EDTA-(ADH-1)c}$ Molekülünün Radyo-TLC ile Analizi

$^{68}\text{Ga-EDTA-(ADH-1)c}$ molekülünün saflık analizi için TLC yapıldı. Bu amaçla üç farklı mobil faz solüsyonu hazırlandı. Çözücü A; İzopropil alkol:n-butanol:0.2 N amonyum hidroksit (2:1:1 (v:v:v)), Çözücü B; n-butanol:su:asetik asit (4:2:1 (v:v:v)), Çözücü C; % 0.1 TFA:MeOH (30:70 (v:v)). Çözücü A, B, C TLC tanklarına koyuldu. Sentezlenen ürünün 10 μL 'si, hazırlanan her bir kromatografik şeridin başlangıç çizgisinde numune yerine ekildi. Şeritler tank içine koyularak solüsyonların yürümesi sağlandı. Çözücü şeridin üst

sınırına ulaştıktan sonra her şerit oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Kuruyan tabakalar eşit uzunlukta parçalara ayrıldı. Her bir parçanın aktivite değeri gama sayacında okundu (Biodex, Atom Lab 500). Her bir parça için Rf değerleri ve doz miktarları hesaplandı. Radyoaktif işaretli ajan ve serbest metal miktarını belirlemek için radyoaktif lekeler gama sayacında okunarak kantitatif analizi yapıldı.

3.6.3 İşaretli ^{68}Ga -EDTA-(ADH-1)c Molekülünün *In Vitro* Değerlendirilmesi

3.6.3.1 Lipofilisite tayini

Lipofilisite değerleri P dağılım katsayısı (n-oktanol/su oranı) hesaplanarak belirlendi. Radyoişaretlenmiş olan bileşiğin çözeltisinden 100 μL alınarak, önceden hazırlanmış 3 mL n-oktanol ve 3 mL su ikili fazı içeren tüp üzerine eklendi. Bu karışım manyetik karıştırıcı yardımıyla 1 saat karıştırıldı. Fazların tamamen ayrılmasını sağlayabilmek için 5 dakika 3000 devirde santrifüjlendi ve her iki fazdan 500 μL alınarak kuyu sayacında aktivite değeri okundu. Lipofilisite formülünde fraksiyonlarındaki sayım değerleri yerine konularak hesaplandı (eşitlik 2.4).

3.6.4 İşaretli [^{68}Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün *In Vivo* Değerlendirilmesi

3.6.4.1 Yaralı Hayvan Modeli

Deney hayvanı çalışmaları 2016.HADYEK.018 no'lu etik kurul izni uyarınca gerçekleştirildi. Albino Wistar rat üzerinde uygulanacak radyofarmasötiklerin tanı ve tedavi süreçlerine etkisi pozitron emisyon tomografisi/bilgisayarlı tomografi ve sintigrafik görüntüleme teknikleri ile Nükleer Tıp ve Moleküler Görüntüleme bölümünde klinik koşullar altında gerçekleştirildi. Tüm girişim ve görüntüleme çalışmaları izofluran anestezisi altında yapıldı. Her girişim öncesinde 4 saatlik açlık uygulandı.

SONUÇ VE ÖNERİLER

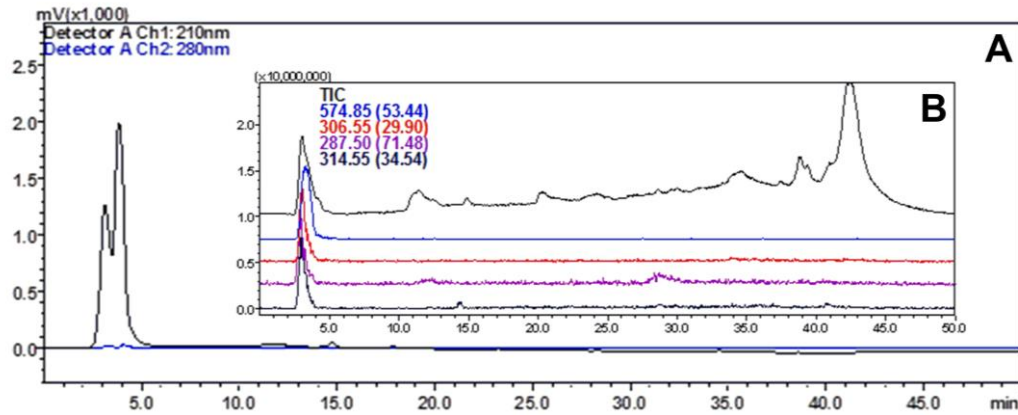
4.1 Peptid Molekülünün Analizleri

4.1.1 Lineer ADH-1 Peptidine Ait LC-MS Analizi

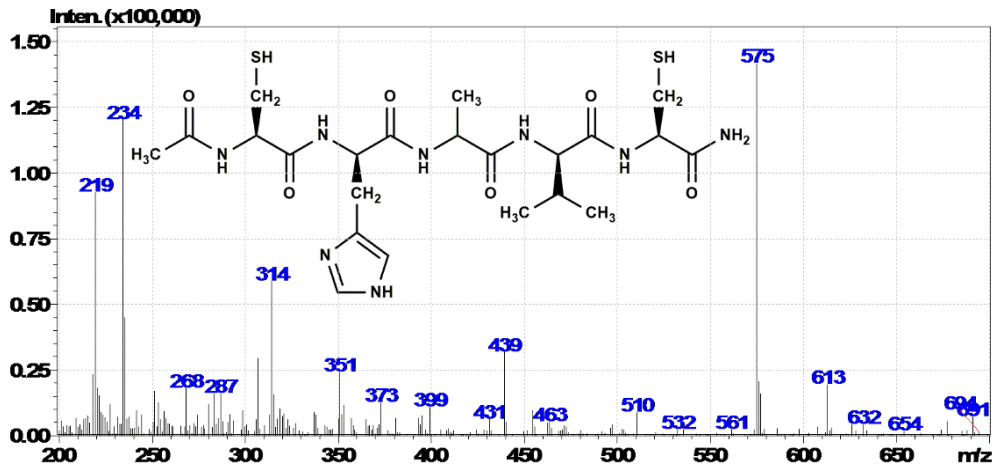
Peptid oluşumu, Elektro Sprey İyonlaşma (ESI) probu kullanılarak LC-MS (Shimadzu 2010 EV) ile doğrulandı. LC kolonu olarak 20 cm uzunluğunda ve 2.1 mm iç çapında 5 µm gözenek boyutlu Teknokroma Tracer Exel 120 ODS-A kullanıldı. Eluent A'dan (su, % 0.1 formik asit) eluent B'ye (asetonitril, % 0.1 formik asit) gradyent elüsyon ile 0.2 mL/dk'lık akış hızında çalışıldı. Peptidlerin kütle spektrometrisi pozitif iyon modunda asidik koşullar altında gerçekleştirildi. Daha iyi bir rezolüsyon için iyon çifti ajanları olarak formik asit ilave edildi. Nebülizör gaz olarak 1,5 L.min⁻¹ akış hızı ile nitrojen kullanıldı. Kütle spektrumu, s'de 1000 m/z tarama hızı ile 200 ila 700 m/z arasında elde edildi.

Şekil 4.1-A'da peptidin LC-UV kromatogramı ve Şekil 4.1-B'de LC-MS toplam iyon kromatogramı verilmiştir. Lineer peptidin LC'deki elüsyon zamanı yaklaşık 3-4 dk'dır. Bu alıkonma zamanına denk gelecek şekilde verilen iyon kromatogramında iyonların oluştuğu görülmüştür. Buradan yola çıkarak; M lineer ADH-1 peptidinin moleküler kütlesi olmak üzere Şekil 4.2'deki kütle spektrumunda oluşan iyonların m/z değerleri $[M+2H]^2+=287$; $[M+2(H_2O+H^+)+H^+]^+=613$; $[M+28(CO)]^2+=314$ $[M+2(H_2O+H)^++H^+]^2+=306,5$ olarak formüle edildi. Moleküler iyon ise $[M+H^+]^+=575$ şeklinde gözlenmiştir.

$m/z=575$ değeri gözlenen moleküler iyon piki peptid moleküllerine H^+ atomlarının tutunduğunu ifade ederken (ampirik formülde hesaplanan değer: 572,71 Da), $m/z=314$ değeri LC-MS cihazında iyon-çifti molekülü olarak kullanılan formik asitin formil grubunun peptide tutunduğunu gösterir. Bu, peptidin amin grubundan bir hidrojen atomunun ayrıldığı basamaktır. $m/z=306,5$ değeri ise peptid moleküllerine iki molekül hidronyum iyonunun bağlandığını gösterir.



Şekil 4. 1 Ham ADH-1 peptid molekülüne ait A) LC-UV kromatogram, B) LC-MS TIC (toplam iyon kromatogramı)

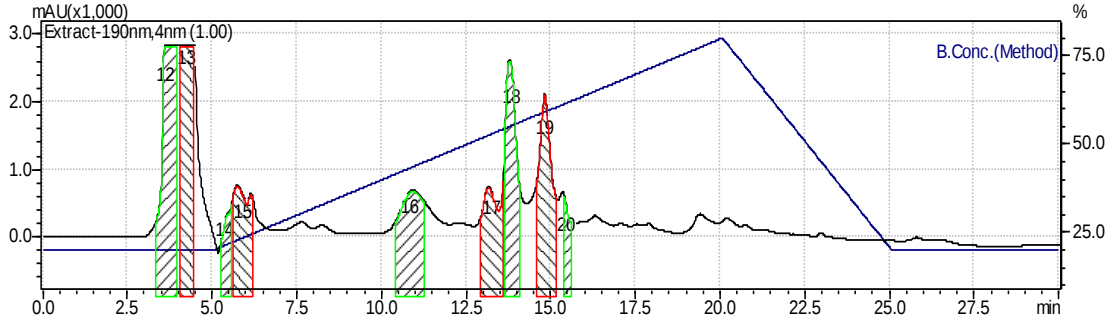


Şekil 4. 2 ADH-1 peptid molekülüne ait kütle spektrumu

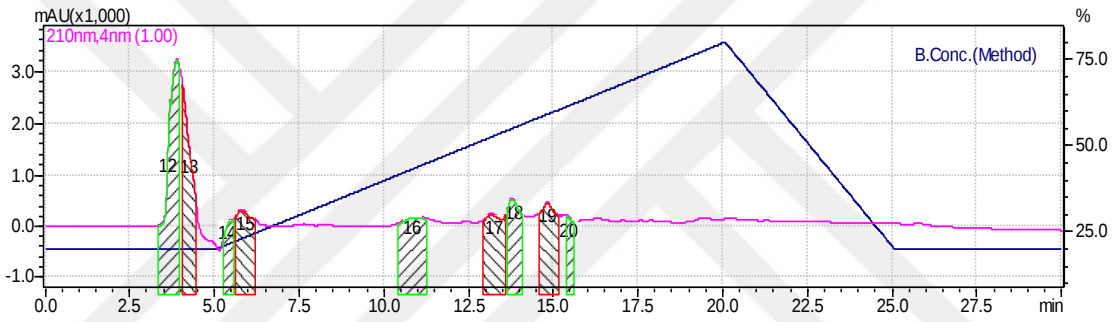
4.1.2 Lineer ADH-1 Peptidinin Safaştırılmasına Ait Preparatif HPLC Analizi

Safaştırma analizleri Shim-pack PRC-ODS HPLC kolonu (20 mm x 25 cm) ve UV-PDA dedektörü ile donatılmış analitik ters faz (RP)-HPLC (Shimadzu) sisteminde gerçekleştirildi. Eluent A'dan (su, % 0.1 formik asit) eluent B'ye (asetonitril, %0.1 formik

asit) gradyent elüsyonda 14.0 mL/dk akış hızında çalışıldı. Şekil 4.3 ve 4.4'deki 12 ve 13 nolu pikler toplandı ve bu fraksiyonlar molekül ağırlığının doğrulanması için LC-MS ile tekrar analiz edildi.



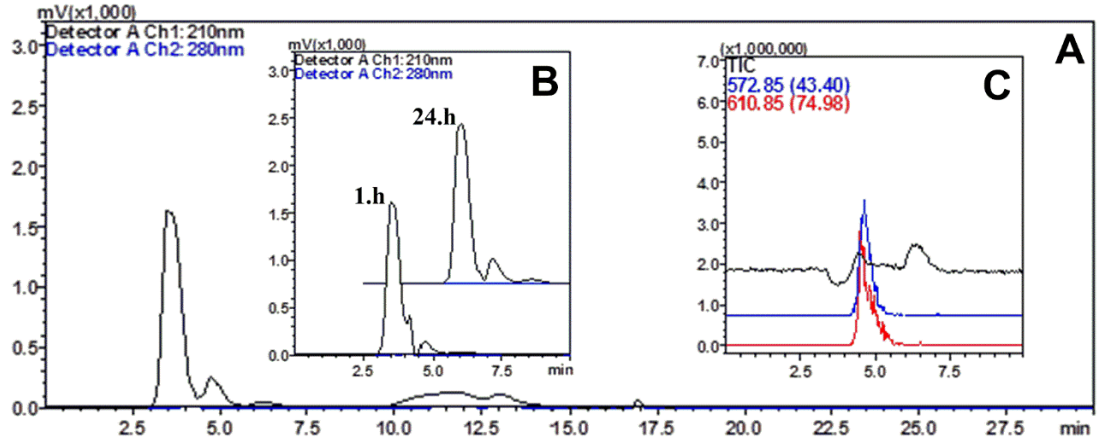
Şekil 4. 3 Ham peptidin preparatif HPLC kromatogramı



Şekil 4. 4 Ham peptidin preparatif HPLC kromatogramı

4.1.3 Lineer ADH-1 Peptidinin Siklizasyon Takibine Ait LC-MS Analizi

İndirgenmiş peptidin disülfid oksidasyonunu takip edebilmek için siklizasyon prosedürü boyunca 1. ve 24. saatte örnekten 25 μ L numune alındı ve analitik kolona (20 cm x 2.1 mm x 5 μ m boyutunda TeknoKroma Tracer Exel 120 ODS-A) enjekte edildi. 24 saatlik süreçte disülfid oksidasyonunun %90'nın üzerinde olduğu görüldü (Şekil 4.5-A ve Şekil 4.5-B). Şekil 4.5-C'de de LC-MS toplam iyon kromatogramı verilmiştir.



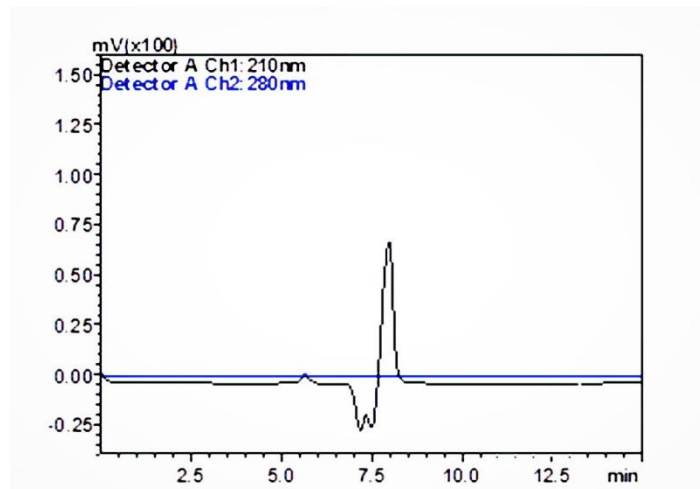
Şekil 4. 5 Lineer ADH-1 peptid molekülünün disülfid oksidasyonu prosesi takibi A) LC-UV Kromatogramı B) LC-UV 1. ve 24. saat karşılaştırmalı kromatogramı C) LC-MS toplam iyon kromatogramı

4.1.4 Saflaştırılmış Siklik (ADH-1)c Peptidine Ait LC-MS Analizi

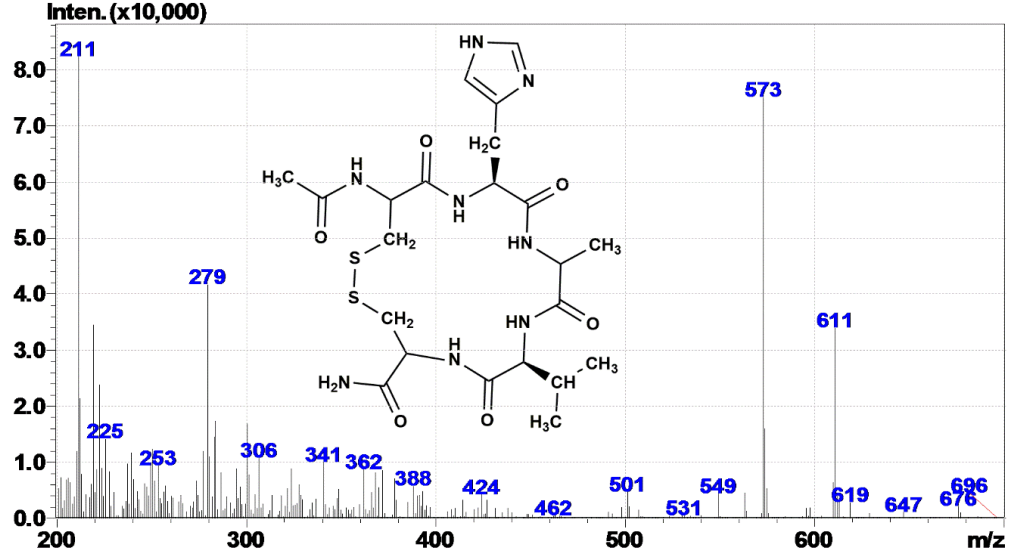
Lineer ADH-1 peptidi siklik hale getirildikten sonra preparatif HPLC ile saflaştırıldı ve saf peptid tekrar LC-MS ile analiz edildi.

Şekil 4.6'da (ADH-1)c siklik peptidinin MS spektrumu sunuldu. Disülfid bağı LS-ESI-MS ile doğrulandı. Teorik moleküler ağırlığı (570,69 Da) olmak üzere elde edilen moleküler iyon pikleri m/z değerleri; $[M+H]^+=573$, $[M+2H]^{2+}=287$, $[M+2(H_2O+H^+)+H^+]=611$ ve $[M+2(H_2O+H^+)+2H^+]^{2+}=306$ olarak formüle edildi.

m/z=573 değeri monoizotopik peptid pikini gösterirken, m/z=287 değeri molekül içi disülfid bağına sahip peptid molekülünün çift yüklü iyonunu doğruladı.



Şekil 4. 6 Saflaştırılmış (ADH-1)c peptid molekülüne ait LC-UV kromatogramı

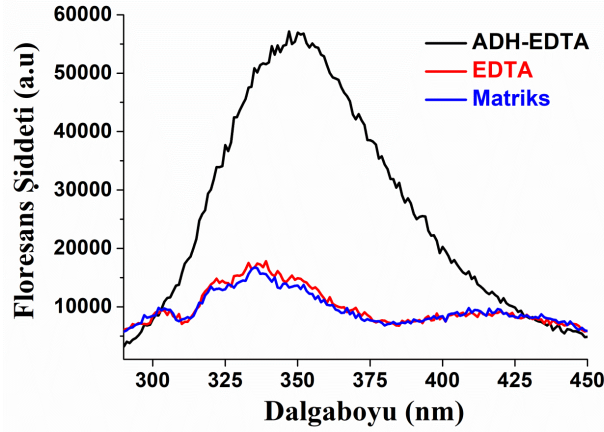


Şekil 4. 7 (ADH-1)c peptid molekülüne ait kütle spektrumu

4.2 (ADH-1)c Peptidinin EDTA ile Biyokonjugatının Analizleri

4.2.1 EDTA-(ADH-1)c Konjugatının Floresans Spektrofotometre ile Analizi

Elektrostatik etkileşimler ve hidrofobik iç-etkileşimlerle yapısı güçlendirilmiş peptid ve karbodiimid ile aktiflenmiş şelatör arasındaki primer konjugat oluşumu ilk ve en önemli basamaktır. Konjugasyon floresans spektrumunda değişikliklere neden olabileceğinden, bu analizde konjugat ve şelatör maksimum emisyonundaki ve maksimum floresans şiddetindeki dalga boyuyla karakterize edildi. Analiz için quanta sayım modunda QM-4/2003 Quanta Master Steady State (Photon Technology International, Canada) spektrofotometre ile çalışıldı. Uyarma ve emisyon monokromatörlerinin yarıkları 2 veya 3 nm'ye ayarlandı. Uyarma, 280 nm'de elde edildi. Analiz 290-450 nm aralığında gerçekleştirildi. Şekil 4.8'de pH 7'de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranında EDTA şelatörü ve Bölüm 3.5'de anlatılan yöntem kullanılarak sentezlenen EDTA-(ADH-1)c konjugatının tipik floresans spektrumu görülmektedir. (ADH-1)c peptid molekülünün amin grupları ile anyonik EDTA şelatörünün karboksil gruplarının çapraz bağlanması sonrası sentezlenen konjugatın floresans şiddetinde ($I_{\text{maks.}}$) artma ve $\lambda_{\text{maks.}}$ değerinde 339 nm'den 347 nm'ye 8 nm'lik kırmızıya kayma gözlemlendi.



Şekil 4. 8 EDTA ve matriks ile karşılaştırmalı olarak EDTA-(ADH-1)c konjugatına ait floresans spektrumu

4.2.2 EDTA-(ADH-1)c Konjugatının Zeta Sizer ile Analizi

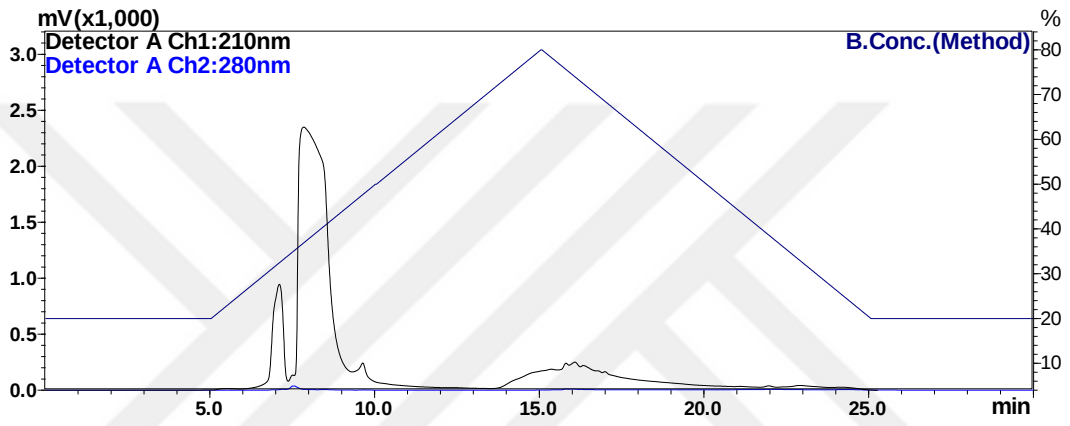
Peptid ((ADH-1)c) ve EDTA'nın Bölüm 3.5'de anlatılan yöntem kullanılarak sentezlenen $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranındaki biyokonjugatının zeta potansiyel değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. Konjugatın zeta potansiyeli (-61.3 mV) ve EDTA şelatörünün zeta potansiyeli ise (-42 mV) olarak bulunmuştur. $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranında sentezlenen konjugatın zeta potansiyelleri incelendiğinde konjugasyon ile zeta potansiyeli değerinin azaldığı görülmektedir. Konjugatın ve şelatlayıcı ajanın boyutlarının kıyaslanması ile peptidin konjugat oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Analiz sonuçları Çizelge 4.1'de verilmiştir. Peptid bağlı konjugatın serbest şelatöre oranla boyutlarında meydana gelen artış, konjugasyonun oluştuğunu ve şelatöre peptid bağlanması nedeniyle konjugatın daha büyük hale geldiğini göstermektedir.

Çizelge 4. 1 $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranında sentezlenen konjugatın boyut ve zeta potansiyeli değerleri

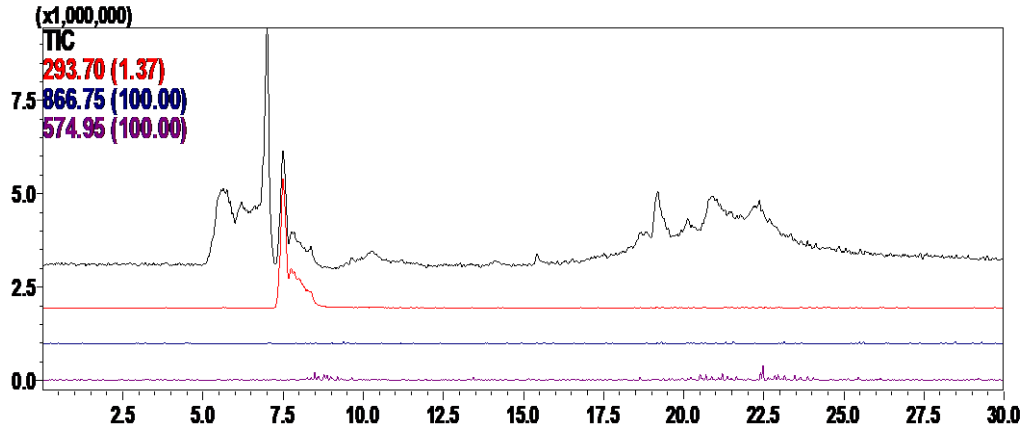
	Z-Ave	Zeta Potansiyeli (mV)
ADH-EDTA Konjugatı	327,8 ± 29,07	-61,3
EDTA (DMSO + PBS)	214,5 ± 10,95	- 42 ± 1,89
DMSO + PBS	115,4 ± 12,17	- 13,2 ± 1,53

4.2.3 EDTA-(ADH-1)c Konjugatının LC-MS ile Analizi

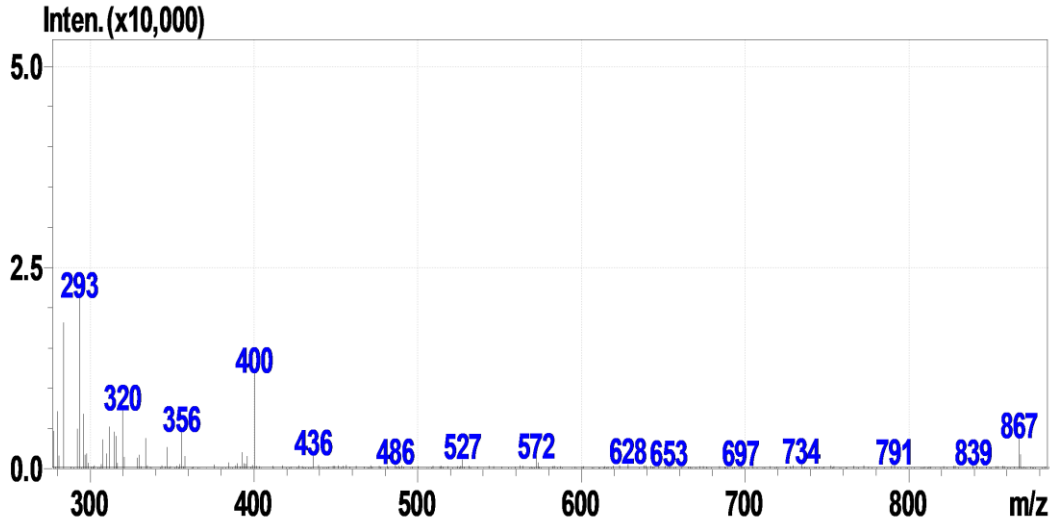
MS spektrumlarında LC kromatogramındaki 7.5 ve 9. dk. arasındaki iyonlara ait pikler verilmiştir (Şekil 4.9). $[EDTA] + [(ADH-1)c] = 294 + 573 = 867$ $[(ADH-1)c] - [H_2O] 867 - 18 = 849$ görülmüştür. Ayrıca konjugatın parçalanma ürünleri $[EDTA] + [(ADH-1)c] - [EDTA] - [H^+] = 572$ ve $[EDTA] = 294'$ de görülmüştür. 294 EDTA ve 572 peptid piklerinin konjugatın ki gibi 867 ile aynı dakikada çıkması, 294 ve 572'nin ortamda bağlanmadan kalabilecek EDTA ve peptidden kaynaklı değil, konjugatın iyonlaşması sonucu oluşan iyonlardan meydana geldiğini kanıtlamıştır (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4. 9 EDTA-(ADH-1)c konjugatının LC-UV kromatogramı



Şekil 4. 10 EDTA-(ADH-1)c konjugatının LC-MS iyon kromatogramı

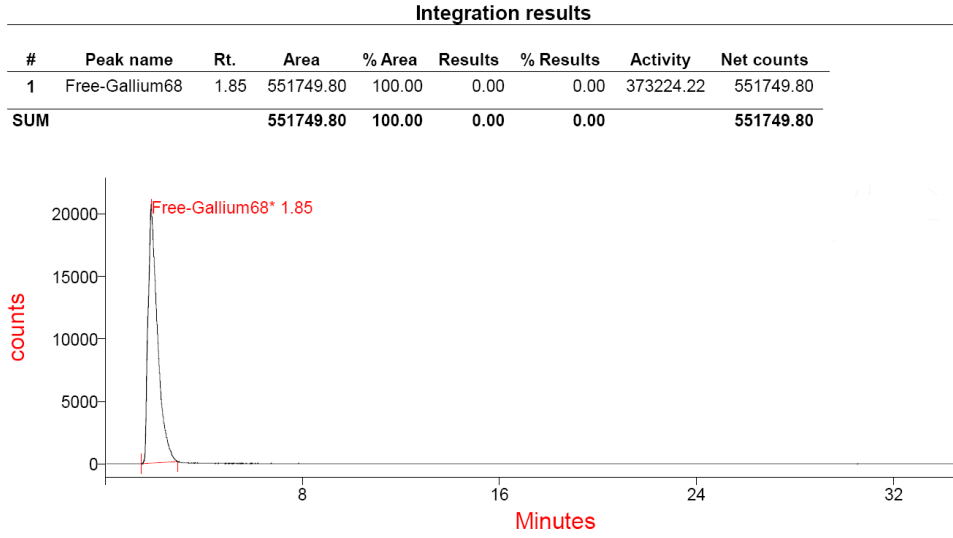


Şekil 4. 11 EDTA-(ADH-1)c konjugatının kütle spektrumu

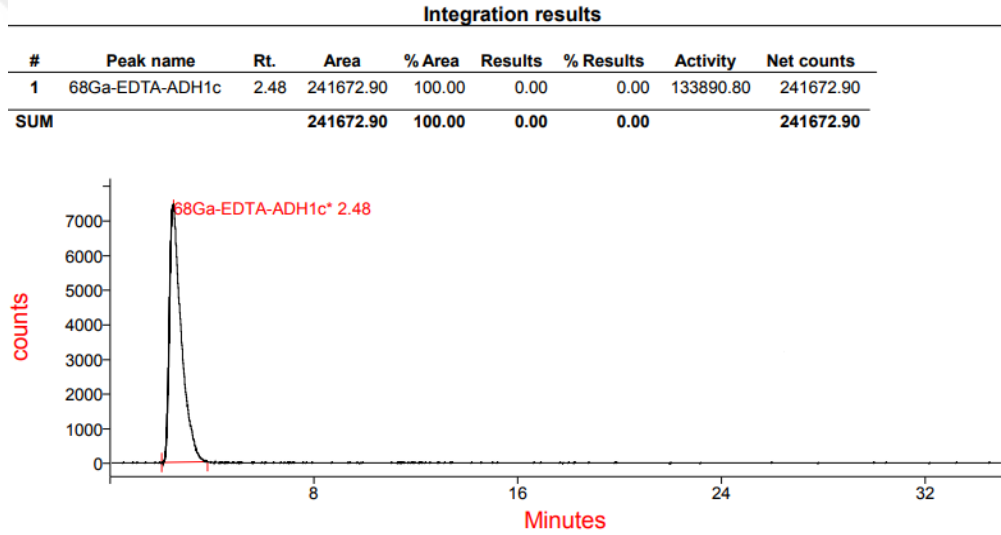
4.3 ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Analizleri

4.3.1 ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Radyo-HPLC Analizi

Sentezlenen radyofarmasotiğin saflığını tayin etmek için radyo-HPLC yapılmıştır. Aktivite dedektörü kullanarak Radio-HPLC (Agilent 1260 Infinity Quaternary LC) ile radyonüklidin bağlandığı doğrulandı. Analizde (100 mm X 4.6 mm X 3.5 µm) C18 kolon kullanıldı. Eluent A'dan (asetonitril, % 0.1 formik asit) eluent B'ye (su, % 0.1 formik asit) 0-5. dk %20 A; 5-15. dk % 20-60 A; 15-25 dk %60-80A; 25-30. dk %80-20A; 30-35. dk %20 A gradyent elüsyon ile 0.6 mL/dk'luk akış hızında çalışıldı. Ayırma pozitif iyon modunda asidik koşullar altında gerçekleştirildi. Daha iyi bir rezolüsyon için iyon çifti ajanları olarak formik asit ilave edildi. İşaretleme öncesi 25 µL'lik serbest galyum-68 analizi yapıldı. Böylece işaretli radyofarmasotik molekülü ile aynı matris ortamında bağlanmadan kalan serbest galyum-68'in alıkonma zamanı tespit edildi. Sentez sonrası işaretlenen radyofarmasotik molekülün analizi sonrası elde edilen aktivite kromatogramında işaretli bileşiği alıkonma zamanı 2,48. dk olarak tespit edildi. Serbest galyum-68'in aktivite kromatogramındaki alıkonma zamanı ise 1,85. dk olarak tespit edildi. Tanısal radyofarmasotik olarak değerlendirildiğinde işaretleme verimi %95'in üzerindedir (Şekil 4.12, Şekil 4.13).



Şekil 4. 12 Serbest Galyum-68'e ait radyo-HPLC

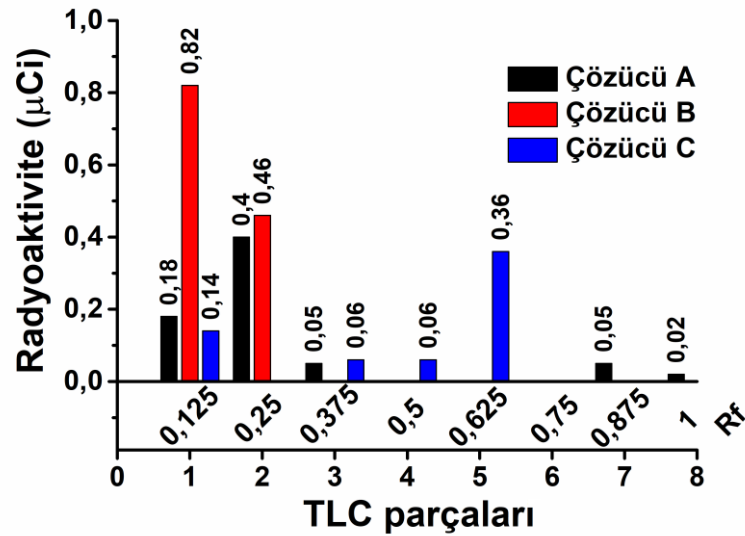


Şekil 4. 13 ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c'ye ait radyo-HPLC

4.3.2 ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c Radyofarmasotik Molekülünün Radyo-TLC ile Analizi

Elde edilen ⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c radyofarmasotik ajanının saflığı iTLC-SG tabakalarda TLC ile kontrol edildi ve Şekil 4.14'de üç farklı mobil fazla yapılan analizlere ait Gama sayacında okunan her aktivite değeri için hesaplanan R_f değerleri verilmiştir. Radyoaktif bileşiklerin TLC üzerindeki bağlanma oranları da Çizelge 4.2'de görülmektedir. Serbest metal, üç çözücü türü için de birinci bölgede (R_f=0.125) ve ayrıca A ve B çözücü sistemleri için ikinci parçada C sistemi için ise beşinci bölge ve daha yüksek R_f değerlerinde bulunmuştur. Örneğimizdeki safsızlıklar, A çözeltisinin kimyasal yapısı (çözünürlüğü ve polaritesi) nedeniyle üst bölgeye taşınmıştır. Solüsyon

B'deki birinci parçanın nispeten yüksek radyoaktivite değeri, B çözeltisinin, safsızlıkları sürüklemekten serbest metal ile aynı kısımda aktiviteye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Solüsyon A ve C'deki serbest metale ait Rf değerleri ve ölçülen dozları birbirini desteklemektedir. Bu çalışma için B çözücü sistemi yeterli bulunmakla birlikte yapılan radyo-TLC çalışması farklı solüsyon türleri de kullanılarak daha detaylı çalışıldığında daha iyi sonuçlar elde etmek mümkün olacaktır.



Şekil 4. 14 Ajanın farklı solüsyonlarda yürütülmesinden elde edilen TLC parçalarına ait Rf değerleri ve ölçülen aktivite miktarları

Çizelge 4. 2 Radyoaktif bileşiklerin TLC üzerindeki bağlanma oranları

Madde	Çözücü A	Çözücü B	Çözücü C
[⁶⁸ Ga]Ga-AntiCAD1	57.14%	64.06%	58.06%
[⁶⁸ Ga]Ga-bileşikleri	25.71%	35.94%	22.58%

4.4 [⁶⁸Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c Molekülünün *In Vitro* Değerlendirilmesi

4.4.1 Lipofilisite tayini

⁶⁸Ga-EDTA-(ADH-1)c'nin lipofilisite değeri (logP) pH 7'de $-2,69 \pm 0,54$ (n=3) olarak hesaplanmıştır. logP değerlerinin eksi bulunması, işaretli bileşiklerin sudaki konsantrasyonunun oktanol içindeki konsantrasyonundan büyük olduğunu gösterdi. Bu ajandan DKFZ 1007 PSMA ajanına göre daha az karaciğer tutulumu, DCFpyl ajanına

göre daha az idrar atılımı ve ılımlı vücut atılımı beklenmektedir. Bunun temel nedeni ise bu bileşiğin organik asit türevi olduğu için suda çözünmüş olma olasılığıdır.

4.5 $[^{68}\text{Ga}]\text{Ga-EDTA-(ADH-1)c}$ Molekülünün *In Vivo* Değerlendirilmesi

Ajanın *in vivo* değerlendirilmesi için yaralı hayvan modelinde sintigrafik ve tomografik görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.15’de hayvan modeline ait yaralı el (injured) gösterilmiştir.

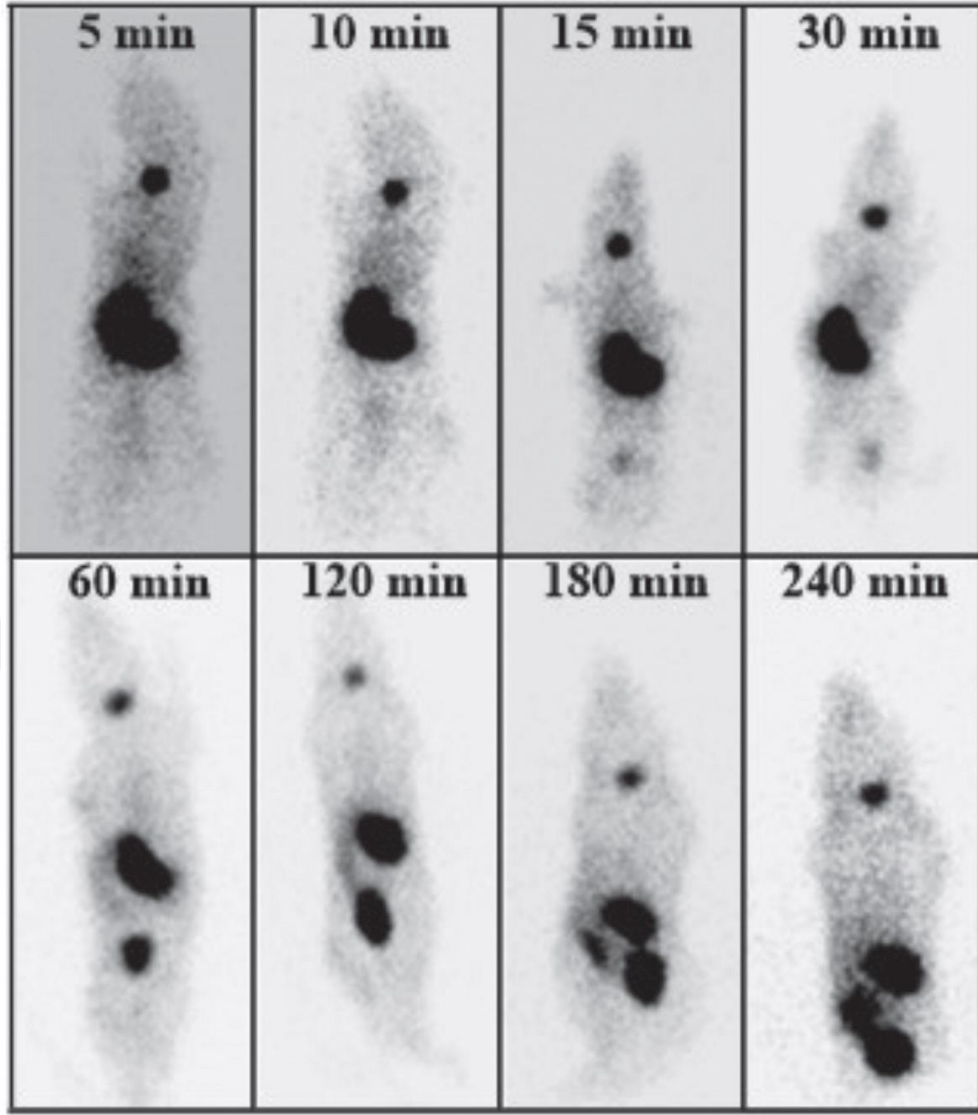


Şekil 4. 15 Yaralı hayvan modeli

4.5.1 Gama Kamera ile $[^{99}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4]^-$ ve $^{177}\text{Lu-PSMA}$ Görüntüleme Çalışmaları

Radyofarmasotik ajanın enjeksiyonu öncesi uygulama yapılacak deney hayvanına farklı zamanlarda fizyolojik pH’da perteknetat ve Lu-PSMA enjeksiyonu yapıldı. Böylece tiroid, bağırsak, mide, dalak, böbrek, karaciğer ve tükürük bezi tutulumları ile hayvanın organ bölgeleri tam olarak tespit edildi.

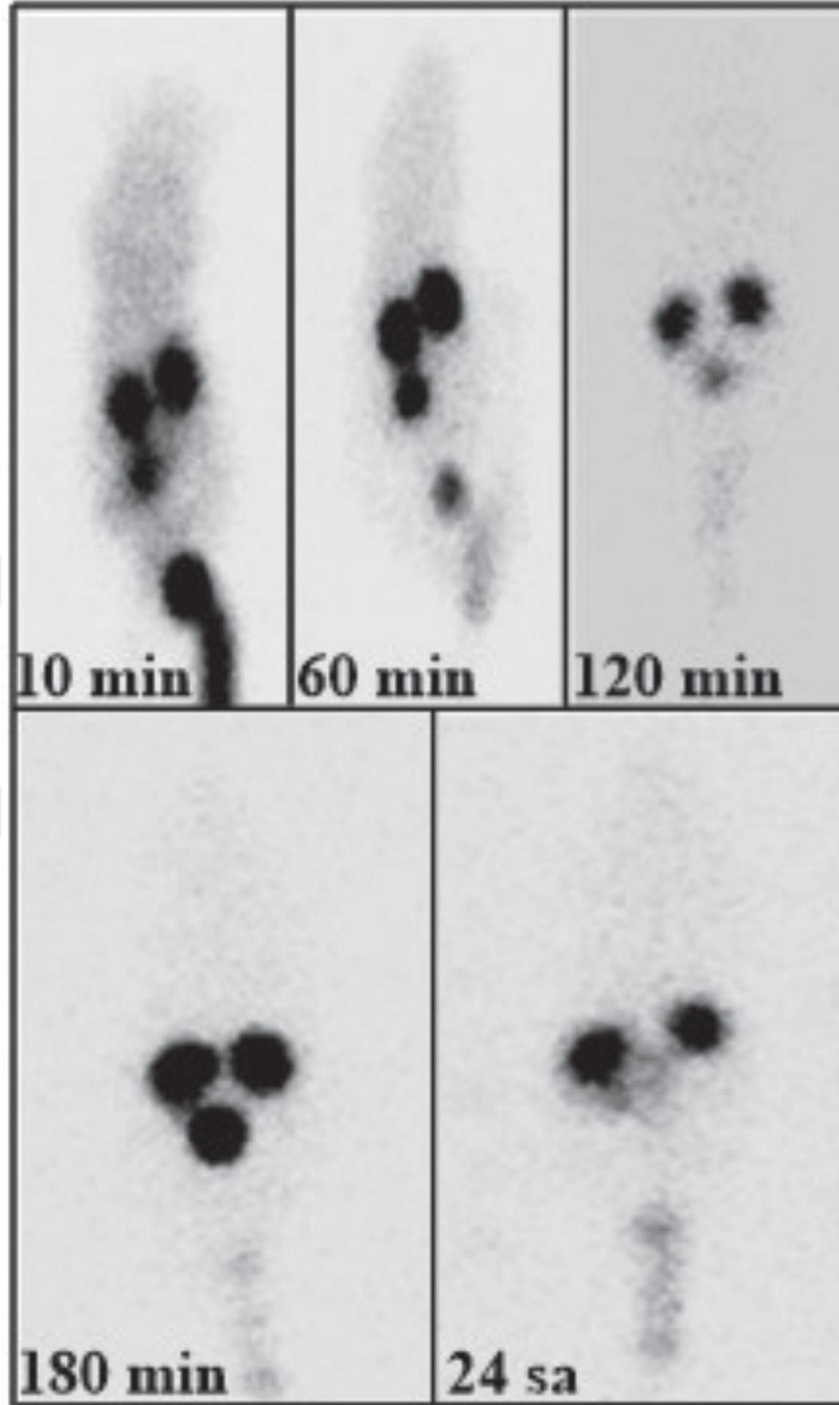
Perteknetat için; intraperitoneal enjeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL perteknetat; 5., 10., 15., 30., 60., 120., 180., 240. dakikalarda gama kamera görüntüleri incelendi. Sağlıklı hayvanda ilk 10 dakikada enjeksiyon bölgesi olan mide ve perteknetat için seçici bir hedef olan tiroid tutulumu görüntülendi. 15. ve 120. dakikalarda mesanede perteknetat birikmesi başladı. 120. dk itibarıyla ise bağırsak birikimi görüntülendi. Böylece kobyada tiroid, bağırsak, mide ve mesane bölgeleri belirlendi.



Şekil 4. 16 İntraperitoneal injeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL perteknetat; 5., 10., 15., 30., 60., 120., 180., 240. dakikalarda gama kamera görüntüleri

Lutesyum-PSMA için; kuyruk veninden intravenöz injeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL fizyolojik pH' da Lu-PSMA; 10., 60., 120., 180. dakikalarda ve 24. saatte gama kamera görüntüleri incelendi. Sağlıklı hayvanda 10. dakikada enjeksiyon bölgesi olan kuyruk veni ve epididymis-testis bölgesi, prostata spesifik membran ajanına selektif sağ-sol böbrek tutulumu ve mesane-prostat bölgesi birikimi görüntülendi. 1. saat görüntüleme enjeksiyon bölgesi birikimi azalmakta diğer bölgeler yoğunlaşmaktaydı. 2. ve 3. saat görüntülemesinde prostata spesifik membran ajanına selektif sağ-sol böbrek tutulumu ve mesane-prostat bölgesi birikimi görüntülendi. 24. saat görüntülemesinde ise yoğun olarak sağ-sol böbrek tutulumları görüntülendi. Böylece; Lutesyum-PSMA injeksiyonu

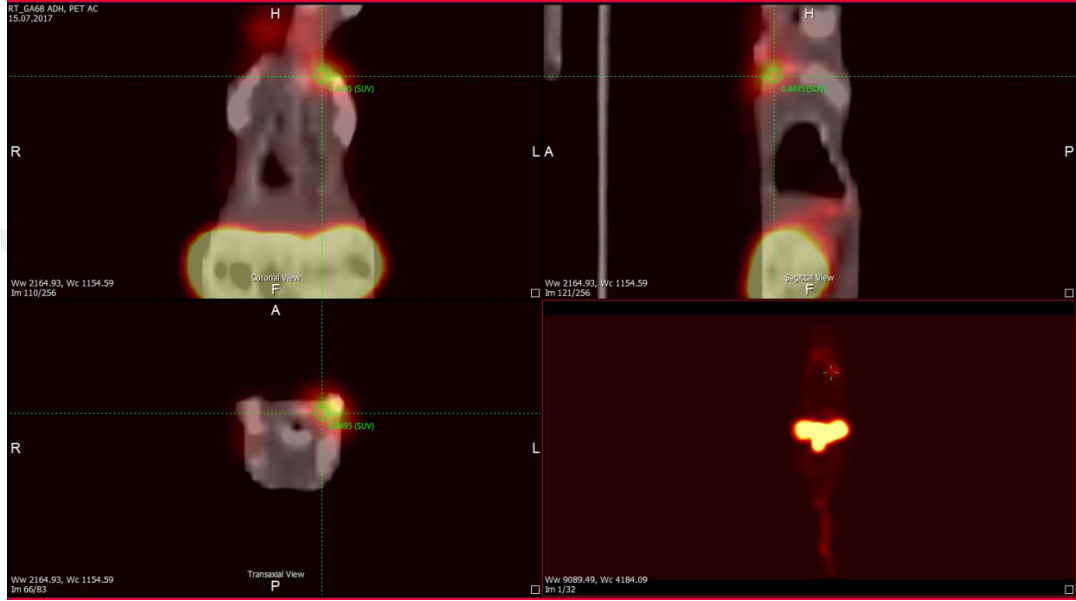
ile sağ-şol böbrek, idrar kesesi-prostat bölgesi, testis-epididymis bölgesi ve kuyruk veni belirlendi.



Şekil 4. 17 İntravenöz injeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL Lu-PSMA; 10., 60., 120., 180. dakikalarda ve 24. saatte gama kamera görüntüleri

4.5.2 [⁶⁸Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c PET/CT Görüntüleme Çalışmaları

Yaralı sol el, kobay ile yapılan çalışmada, hayvanın kuyruk veninden intravenöz enjeksiyon ile 0,1 mCi 0,1 mL fizyolojik pH'da [⁶⁸Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c enjeksiyonu yapıldı. 1. ve 3. saat PET/CT görüntüleri incelendi. Yoğun böbrek ve mesane tutulumu yanısıra sentezlenen radyofarmasötik ajanın beklendiği üzere hedefli bölgede selektif olarak tutunduğu gözlemlendi.



Şekil 4. 18 Hedefli [⁶⁸Ga]Ga-EDTA-(ADH-1)c ajanının PET/CT görüntüsü

4.5.2.1 PET/CT SUV_{maks}. Değerlerine Dayanan Pearson Faktörü Hesaplanması

Hedef bölgenin diğer vücut dokuları ile olan ilişkisini, test etmek ve varsa bu ilişkinin derecesini ölçmek ve benzer sonuçları önceden tahmin edebilmek için kullanılan bir istatistiksel yöntem Pearson Faktörü hesaplama yöntemidir. Böylece tutulum bölgelerine ait iki sürekli yani parametrik değişkenin tüm vücut tutulumları için doğrusal ilişkisinin derecesi hesaplanabilir.

Çizelge 4. 3 Pearson Faktörü hesap çizelgesi

Tutulum Bölgesi	X	Y	$X - M_x$	$Y - M_y$	$(X - M_x)^2$	$(Y - M_y)^2$	$(X - M_x)(Y - M_y)$
Yaralı el-Karaciğer	2,14	1,36	-6.000	-22.750	36.000	517.562	136.500
Yaralı el-Böbrek	2,14	1,96	6.000	12.250	36.000	150.062	73.500
Yaralı el-Dalak	2,14	1,38	-6.000	-22.750	36.000	517.562	136.500
Yaralı el-Tükürük Bezi	2,14	1,16	6.000	72.250	36.000	5.220.062	433.500
			-6.000	-22.750	36.000	517.562	136.500
			6.000	14.250	36.000	203.062	85.500
			-6.000	-22.750	36.000	517.562	136.500
			6.000	-7.750	36.000	60.062	-46.500
			M_x: 8.000	M_y: 23.750	Toplam: 288.000	Toplam: 7703.500	Toplam: 1092.000

Cetvel

X: X Değerleri; Y: Y Değerleri; M_x : X Değerlerinin Ortalaması; M_y : Y Değerlerinin Ortalaması;

$X - M_x$ & $Y - M_y$: Sapma Skoru ; $(X - M_x)^2$ & $(Y - M_y)^2$: Sapma Skoru Değerinin Karesi; $(X - M_x)(Y - M_y)$: Sapma Skorunun Sonucu

X Değerleri

$$\Sigma = 64$$

$$\text{Ortalama} = 8$$

$$\Sigma(X - M_x)^2 = SS_x = 288 \quad (4.1)$$

Y Değerleri

$$\Sigma = 190$$

$$\text{Ortalama} = 23.75$$

$$\Sigma(Y - M_y)^2 = SS_y = 7703.5 \quad (4.2)$$

R Değeri Hesaplama

$$r = \Sigma((X - M_x)(Y - M_y)) / \sqrt{(SS_x)(SS_y)}$$

$$r = 1092 / \sqrt{(288)(7703.5)} = 0.7331$$

$$r = 0.7331 \quad (4.3)$$

R değeri 0.7331 olarak hesaplandı (eşitlik 4.1, 4.2, 4.3). Bu değer 0.70-0.89 arasında olduğundan kuvvetli pozitif korelasyondur ve yüksek Y değerine ulaştıkça adeziv odak için yüksek X değerine ulaşılabilir. R^2 , determinasyon katsayısı değeri ise 0.5374 olarak hesaplandı.

TARTIŞMA

Tez çalışmamda anti-kadherin antagonisti olan (ADH-1)c peptidi; EDTA kullanılarak ^{68}Ga ile işaretlenmiş ve normal sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarıyla organlarda radyoişaretli peptid konjugatının adezyona karşı biyoaktif potansiyelleri belirlenmiştir.

Kadherinler embriyoda morfogeneze, erişkin organizmada seçici hücre tanınmasından ve yaşam boyu normal doku mimarisinden sorumlu hücre yüzey glikoproteinleridir. Embriyoda özgün adezyon moleküllerinin ekspresyonu hücre göçü ve doku diferansiyasyonu için gereklidir. Kadherinler, yanyana hücreler arasındaki moleküler bağlantıyı sağlarlar. Embriyolojik dokuların oluşumu ve stabiliteleri için gerekli, hücreler arası yapışma olaylarının başlaması ve devamı için kritik öneme sahip olan hücre adezyon molekülleridir. Bu ailenin bireyleri, sıçan embriyosunun blastomerlerinde tek hücre aşamasında saptanmıştır ve hücrelerin implantasyonu ve sonraki morfojeneze yol açan olaylarda vazgeçilmez yapılardır. Kadherin aracılı adezyon, ısıya bağımlıdır ve Ca^{+2} gerektirir. Kadherinlere karşı oluşmuş antikorlar, embriyolojik dokulara eklendiğinde, hücre-hücre yapışmasının kopması sonucu doku yapısında şiddetli bozulmalara neden olur. Ağırlıkları 120,000-140,000 kDa arasında değişen bu moleküller, yapı ve fonksiyonları açısından Ca^{+2} bağımlı transmembran proteinlerdir. Birçok tekrarlayan ilmikten (domain) oluşan ve Ca^{+2} a bağlanmada önem taşıyan geniş bir hücre dışı N ucu ile, kadherinler arasında çok iyi korunan sitoplazmik bölümle bağlantılı tek bir transmembran kısımdan oluşur. Epitelyal bir hücrenin mezenkimal bir hücreye dönmesi ile birlikte morfolojisinde, arşitektüründe, adezyonunda ve migrasyon kapasitesinde değişiklikler oluşmaktadır. Guarino ve ark.'

nın yaptığı bir çalışmaya göre; epitelyal mezenkimal dönüşümde N-kadherin, vimentin, β -katenin, snail 1, snail 2, twist, EF1/ZEB1, SIP1/ZEB2, E47 artarken, E-kadherin azalır. Epitelyal mezenkimal dönüşümde migrasyon kapasitesi ve invazyon artarken apoptoza direnç gelişir [25]. Tümör hücreleri komşu hücrelerden ayrılarak hareket kazanır, epitelyal kompartmanı terk eder ve migrasyon yaparak çevre stromaya invazyon gösterir [25]. Şunu da belirtmek gerekir ki, tümörlerin büyük çoğunluğunda epitelyal mezenkimal dönüşüm gelişmemektedir. Tümör patolojisinde epitelyal mezenkimal dönüşüm gelişen tümörler tüm tümörler içinde % 1' den azdır. Gelişiminde epitelyal mezenkimal dönüşümün rol oynadığı tümörler karsinosarkom/sarkomatoid karsinom, malign mezotelyoma, seks kord stromal tümör, ameloblastom' dur. Lee ve ark.'nın çalışmalarına göre epitelyal mezenkimal dönüşümün belirleyicileri arasında N-kadherin proteini de yer almaktadır [26].

Anti-kadherin peptidi ADH-1, Mikrodalga Destekli Katı Fazda Peptid Sentezleme sisteminde Fmoc kimyası kullanılarak (Ac-Cys-His-Ala-Val-Cys-CONH₂) sentezlendi. Sentez ve kırma prosedürü sonunda 51.39 mg ham peptid elde edilmiştir. Peptid oluşumu, elektrosprey iyonizasyon (ESI) probu kullanılarak LC-MS ile doğrulanmıştır. MS spektrumunda M lineer ADH-1 peptidinin moleküler kütlesi olmak üzere; moleküler iyonların m/z değerleri; $[M+H]^+=575$; $[M+2H]^{2+}=287$; $[M+2(H_2O+H^+)+H]^+=613$; $[M+28(CO)]^{2+}=314$ $[M+2(H_2O+H)^++H]^{2+}=306,5$ olarak formüle edildi. m/z=575 değerinde gözlenen moleküler iyon piki peptid moleküllerine H⁺ atomlarının tutunduğunu ifade ederken (ampirik formülde hesaplanan değer: 572,71 Da), m/z=314 değeri LC-ESI-MS cihazında iyon-çifti molekülü olarak kullanılan formik asitin formil grubunun peptide tutunduğunu gösterir. Bu, peptidin amin grubundan bir hidrojen atomunun ayrıldığı basamaktır. m/z=306,5 değeri ise peptid moleküllerine iki molekül hidronyum iyonunun bağlandığını gösterir.

Peptid makrosiklizasyonunda halka kapanması metodunun seçilmesi kilit rol oynar. Halka kapanması için uygun olmayan metodun seçimi reaksiyon hızını yavaşlatacağı gibi, düşük verime ve C-terminal ucunda rasemleşme veya dimerizasyon gibi istenmeyen yan reaksiyonların oluşumuna neden olur. Disülfid bağı oluşumu yoluyla makrosiklizasyon tipik bir yan zincir siklizasyon metodudur (baş grup-yan zincir ve yan zincir-yan zincir). İki sistein arasında bir disülfid köprüsü oluşturuldu. Disülfid bağları

sistein residlerinin tiyol gruplarının oksidasyonu ile oluşturulmuştur. Siklizasyon oluşumu, elektrosprey iyonizasyon (ESI) probu kullanılarak LC-MS ile doğrulanmıştır. Teorik moleküler ağırlığı (570,69 Da) olmak üzere elde edilen moleküler iyon pikleri m/z değerleri; LC-ESI-MS $[M+H]^+=573$, $[M+2H]^{2+}=287$, $[M+2(H_2O+H^+)+H]^+=611$ ve $[M+2(H_2O+H^+)+2H]^{2+}=306$ olarak formüle edildi. m/z=573 değeri monoizotopik peptid pikini gösterirken, m/z=287 değeri moleküliçi disülfid bağına sahip peptid molekülünün çift yüklü iyonunu doğrular.

N-cadherin antagonistlerinden (ADH-1)c peptidinin EDTA şelatorü ile EDC [γ -1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid] çapraz bağlayıcısı varlığında pH 5' de konjugatı sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugat floresans spektrofotometre ve zetasizer cihazları ile karakterize edilmiştir. Ayrıca LC-ESI-MS ile konjugatın oluşumu doğrulanmıştır. pH: 7'de $n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}} = 1$ oranında EDTA şelatörü kullanılarak sentezlenen EDTA-(ADH-1)c konjugatının tipik floresans spektrumunda (ADH-1)c peptid molekülünün amin grupları ile anyonik EDTA şelatörünün karboksil gruplarının çapraz bağlanması sonrası sentezlenen konjugatın floresans şiddetinde ($I_{\text{maks.}}$) artma ve $\lambda_{\text{maks.}}$ değerinde 339 nm'den 347 nm'ye 8nm değerinde kırmızıya kayma gözlenmiştir.

$n_{\text{peptid}}/n_{\text{EDTA}}=1$ sentezlenen biyokonjugatının zeta potansiyel değeri (-61.3 mV) ve EDTA şelatörünün zeta potansiyeli ise (-42 mV) olarak bulunmuştur. Konjugatın zeta potansiyeli incelendiğinde konjugasyon ile zeta potansiyeli değerinin azaldığı görülmektedir. Konjugatın ve şelatlayıcı ajanın boyutlarının kıyaslanması ile peptidin konjugat oluşturup oluşturmadığı incelenmiştir. Analiz sonucuna göre peptid bağlı konjugatın serbest şelatöre oranla boyutlarında meydana gelen artış, konjugasyonun oluştuğunu ve şelatöre peptid bağlanması nedeniyle konjugatın daha büyük hale geldiğini göstermektedir.

Konjugatın MS kromatogramındaki 7,5 ve 9. dk arasındaki iyonlara ait pikler verilmiştir. MS spektrumunda $[EDTA] + [(ADH-1)c]=294+573=867$ ve $[(ADH-1)c]-[H_2O]= 867-18=849$ görülmüştür. Ayrıca konjugatın parçalanma ürünleri $[EDTA] + [(ADH-1)c] - [EDTA] - [H^+]= 572$ ve $[EDTA]=294$ de görülmüştür. 294 EDTA ve 572 peptid piklerinin konjugatın piklerinden olan 867 ile aynı dakikada çıkması, 294 ve 572'nin ortamda

kalabilecek EDTA ve peptidden kaynaklı değil, konjugatın iyonlaşması sonucu oluşan iyonlardan meydana geldiğini kanıtlamıştır.

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratöründen elue edilen 1,5 mL GaCl_4^- radyonüklidi işaretleme işlemi için pH'ı 7,4 değerine ayarlanmış 50 μg EDTA-(ADH-1)c konjugatıyla 1.5 M HEPES tamponu varlığında 90°C'de 10 dk. süreyle reakte edildi. Sentezlenen radyofarmasötüğün işaretleme verimi RadyoHPLC ve TLC ile belirlendi. RadyoHPLC sonuçlarına göre işaretleme verimi %95' in üzerindedir. Bu oran güncel farmakopiye göre sentezlenen radyofarmasötik ajanın diagnostik amaçla uygulanabileceğini gösterdi.

Ürün saflığı iTLC-SG tabakalarda TLC ile kontrol edilmiştir. Radyafarmasötik ajan amonyum asetat ve metanol mobil faz ortamında yürütülmüş ve 10 eşit parçaya kesilen şeritin her bir parçası için yapılan gama sayımı sonucunda, % saflık hesaplanmıştır.

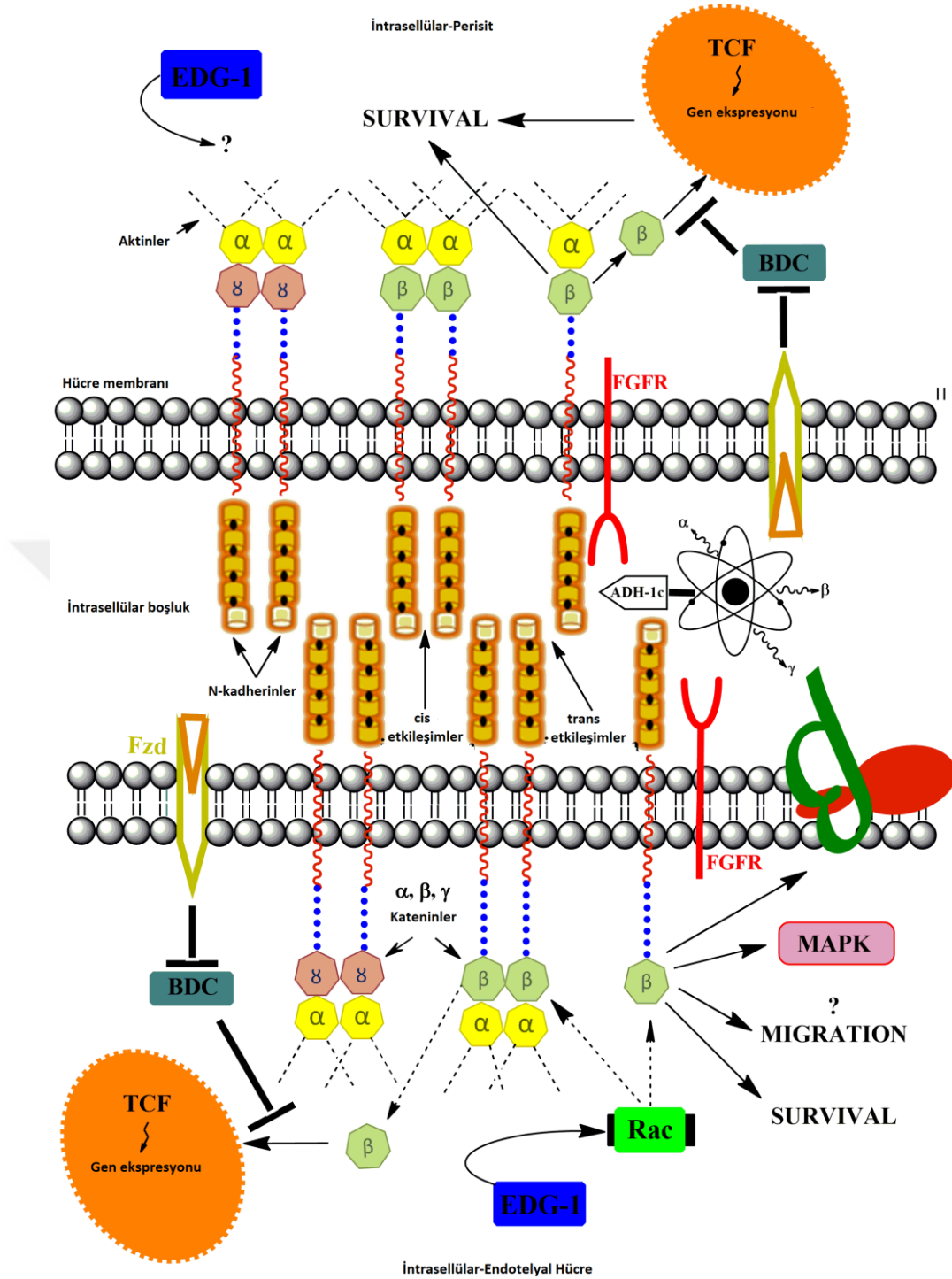
Sentezlenen radyofarmasötik ajanın *in vitro* değerlendirme için lipofilisite çalışması yapılmıştır. ^{68}Ga -EDTA-ADH-1c'nin deneysel lipofilisitesi pH 7'de (logP) $-2,69 \pm 0,54$ (n=3) olarak hesaplanmıştır. Lipofilisite değeri logP değerlerinin eksi bulunması, radyoaktif işaretli bileşiğin sudaki konsantrasyonunun oktanol içindeki konsantrasyonundan oldukça büyük olduğunu gösteriyor. Bunun temel nedeni ise bu bileşiğin organik asit türevi olduğu için suda çözünmüş olma olasılığıdır. Ayrıca EDTA molekülünün konjugatın lipofobitesini arttırdığı da öngörülebilir.

In vivo çalışma kapsamında sentezlenen ajanın klinik koşullarda kobay injeksiyonu yapılarak PET/CT çekimleri gerçekleştirildi. Elde edilen görüntüler değerlendirildiğine;

Biyodağılım çalışmalarından, radyoşaretli anti kadherin konjugatıyla yapılan çalışmada 1. ve 3. saat PET/CT görüntüleri incelendi. Yoğun böbrek ve mesane tutulumu yanısıra sentezlenen radyofarmasötik ajanın beklendiği üzere hedef bölgeye selektif olarak tutunduğu gözlemlendi. ^{68}Ga -EDTA-(ADH-1)c molekülünün karaciğer, dalak, böbrek, tükürük bezi ve yaralı sol eldeki tutulumlarını $\text{SUV}_{\text{maks.}}$ değerlerini baz alarak karşılaştıracak olursak yaralı eldeki tutulumun daha yüksek olduğu gözlenmektedir. Konjugat kullanımı durumunda hedef dokuda yüksek ve diğer dokularda tutulumun az olması hedef dışı olan organların korunması açısından önem arz etmektedir. Ayrıca; radyofarmasötik ajanın düşük lipofilisiteye sahip olması nedeniyle karaciğer, dalak ve

tükürük bezi tutulumlarına kıyasla böbrek tutulumu daha yüksek bir $SUV_{maks.}$ değerine sahiptir. Dolayısıyla böbrek ve mesane bölgesinde yoğun tutulum, hızlı atılım gerçekleşmektedir. Yani vücut atılımı üriner yolla gerçekleşmektedir. Tutulum bölgelerine ait iki sürekli yani parametrik değişkenin tüm vücut tutulumları için doğrusal ilişkisinin derecesi Pearson faktörü yöntemi ile hesaplandı. R değeri 0.7331 olarak hesaplandı. Bu değer 0.70-0.89 arasında olduğundan kuvvetli pozitif korelasyondur ve yüksek Y değerine ulaştıkça adeziv odak için yüksek X değerine ulaşılabilir. R^2 , determinasyon katsayısı, değeri ise 0.5374 olarak hesaplanmıştır.

Adeziv dokularda anti-N-kadherin antagonistinin normal dokulara göre daha yüksek olması nedeniyle hasarlı, yaralı ya da tümörlü doku ile yapılacak çalışmalarda ^{68}Ga -EDTA-(ADH-1)c' nin iyi bir potansiyeli olacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak; kanser epitelyal mezenkimal dönüşüm belirteçlerinden olan adezyon molekülü olan siklik ADH-1 peptidinden türevlenen radyo işaretli konjugat (^{68}Ga -EDTA-(ADH-1)c) N-kadherin protein ekspresyonu artan hasarlı dokularda ve metastatik solid tümörlerde kadherin aktivitesinin görüntülenmesinde kullanılabilecek potansiyel bir radyoişaretli bileşik olabilir (Şekil 5.1).



Şekil 5. 1 Kadherin alan yapısı ve N-kadherin aracılı hücre-hücre kavşakları. (ADH-1)c, kadherin bazlı hücre-hücre adezyonunu (yapışmasını) bozmak için sinyal molekülleri olarak işlev görebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Lammers, T. Hennink, W. ve Storm, G., (2008). "Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice", *British journal of cancer*, 99: 392-397.
- [2] Kaş, H. ve Eldem, T., (2002). "Kontrollü Salım Sistemlerinin Hedeflendirilmesi", Gürsoy, A. (Editör), *Kontrollü Salım Sistemleri*, 2. baskı, *Kontrollü Salım Sistemleri Derneği Yayını*, İstanbul.
- [3] Aina, O.H. Sroka, T.C. Chen, M.L. ve Lam, K.S., (2002). "Therapeutic cancer targeting peptides", *Peptide Science*, 66: 184-199.
- [4] Enbäck, J. ve Laakkonen, P., (2007). "Tumour-homing peptides: tools for targeting, imaging and destruction", *Biochemical Society Transactions*, 35(4): 780-783.
- [5] Shadidi, M. ve Sioud, M., (2003). "Identification of novel carrier peptides for the specific delivery of therapeutics into cancer cells", *The FASEB Journal*, 17: 256-258.
- [6] Karmali, P.P. Kotamraju, V.R. Kastantin, M. Black, M. Missirlis, D. Tirrell, M. ve Ruoslahti, E., (2009). "Targeting of albumin-embedded paclitaxel nanoparticles to tumors", *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 5: 73-82.
- [7] Blaschuk, O.W., (2015). "N-cadherin antagonists as oncology therapeutics", *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370: 20140039.
- [8] Telefoncu, A., (1992). *Tıp ve Fen Bilimleri İçin Biyokimya*, 1. baskı, Sermet Matbaası, Kırklareli.
- [9] Ün, H. Eskiizmirli, S. Ünal, N. Freuling, C.M. Johnson, N. Fooks, A.R. Müller, T. Vos, A. ve Aylan, O., (2012). "Oral vaccination of foxes against rabies in Turkey between 2008 and 2010. Orale Immunisierung von Füchsen gegen die Tollwut in der Türkei zwischen 2008 und 2010", *Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.*, 6: 203-208.
- [10] Macfarlan, R. Dietzschold, B. Wiktor, T. Kiel, M. Houghten, R. Lerner, R. Sutcliffe, J. ve Koprowski, H., (1984). "T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides", *The Journal of Immunology*, 133: 2748-2752.

- [11] Parnham, M.J. ve Nijkamp, F.P., (2005). Principles of immunopharmacology, 2. Baskı, Springer, Basel.
- [12] Menteş, G. ve Ersöz, B., (1993). "Harper'in Biyokimyası", 1. Baskı, Barış Kitabevi, İstanbul.
- [13] Çekmen, M.B. Türköz, Y. Turgut, M. ve Gözükara, E.M., (1997). "Lipoprotein (a):genel bir bakış ve çeşitli hastalıklarla ilişkisi", 4(4):462-471.
- [14] Tüzün, C., (1992). Biyokimya, 1.Baskı, Palme Yayınları, Ankara.
- [15] Zalutsky, M. Lewis, J. Welch, M. ve Redvanly, C., (2003). "Radiolabeled antibodies for cancer imaging and therapy", Welch, M.J. ve Redvanly, C.S. (Editörler), Handbook of Radiopharmaceuticals: Radiochemistry and Applications, Wiley, USA.
- [16] Maecke, H., (2005). "Radiolabeled peptides in nuclear oncology: influence of peptide structure and labeling strategy on pharmacology", Bogdanov, A.A ve Licha, K. (Editörler) Molecular Imaging. Springer, Berlin.
- [17] <http://tip.cumhuriyet.edu.tr/cutf/Donem1/DonemI20042005/IIAhmetAker/aa.doc>, 8 Aralık 2017.
- [18] Langer, M. Kratz, F. Rothen-Rutishauser, B. Wunderli-Allenspach, H. ve Beck-Sickinger, A.G., (2001). "Novel Peptide Conjugates for Tumor-Specific Chemotherapy", Journal of medicinal chemistry, 44: 1341-1348.
- [19] Körner, M. Stöckli, M. Waser, B. ve Reubi, J.C., (2007). "GLP-1 receptor expression in human tumors and human normal tissues: potential for in vivo targeting", Journal of Nuclear Medicine, 48: 736-743.
- [20] Ertay, T., (2004). Tc-99m ile işaretli ekzorfin C'nin glukuronid türevinin sentezi ve radyofarmasötik potansiyelinin incelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [21] Ohki-Hamazaki, H. Iwabuchi, M. ve Maekawa, F., (2003). "Development and function of bombesin-like peptides and their receptors", International Journal of Developmental Biology, 49: 293-300.
- [22] Pradhan, T.K. Katsuno, T. Taylor, J.E. Kim, S.H. Ryan, R.R. Mantey, S.A. Donohue, P.J. Weber, H.C. Sainz, E. ve Battey, J.F., (1998). "Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes", European journal of pharmacology, 343: 275-287.
- [23] Pukala, T.L. Bowie, J.H. Maselli, V.M. Musgrave, I.F. ve Tyler, M.J., (2006). "Host-defence peptides from the glandular secretions of amphibians: structure and activity", Natural product reports, 23: 368-393.
- [24] Güç, D., (2004). "Adezyon molekülleri", Astım Allerji İmmünoloji, 2: 95-102.
- [25] Guarino, M. Rubino, B. ve Ballabio, G., (2007). "The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology", Pathology, 39: 305-318.

- [26] Lee, J.M. Dedhar, S. Kalluri, R. ve Thompson, E.W., (2006). "The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease", *J Cell Biol*, 172: 973-981.
- [27] Wheelock, M.J. Shintani, Y. Maeda, M. Fukumoto, Y. ve Johnson, K.R., (2008). "Cadherin switching", *Journal of cell science*, 121: 727-735.
- [28] Qian, X. Anzovino, A. Kim, S. Suyama, K. Yao, J. Hult, J. Agiostratidou, G. Chandiramani, N. McDaid, H. ve Nagi, C., (2014). "N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties", *Oncogene*, 33: 3411-3421.
- [29] Suyama, K. Shapiro, I. Guttman, M. ve Hazan, R.B., (2002). "A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor", *Cancer cell*, 2: 301-314.
- [30] Volk, T. ve Geiger, B., (1984). "A 135-kd membrane protein of intercellular adherens junctions", *The EMBO Journal*, 3: 2249.
- [31] Corey, E.J. ve Czakã, B., (2012). *Molecules and medicine*: John Wiley & Sons.
- [32] Belofsky, G.N. Jensen, P.R. ve Fenical, W., (1999). "Sansalvamide: A new cytotoxic cyclic depsipeptide produced by a marine fungus of the genus *Fusarium*", *Tetrahedron Letters*, 40: 2913-2916.
- [33] Tamilarasu, N. Huq, I. ve Rana, T.M., (2000). "Design, synthesis, and biological activity of a cyclic peptide: An inhibitor of HIV-1 tat–TAR interactions in human cells", *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 10: 971-974.
- [34] Chatterjee, J. Mierke, D. ve Kessler, H., (2006). "N-methylated cyclic pentaalanine peptides as template structures", *Journal of the American Chemical Society*, 128: 15164-15172.
- [35] Heller, M. Sukopp, M. Tsomaia, N. John, M. Mierke, D.F. Reif, B. ve Kessler, H., (2006). "The Conformation of cyclo (– d-Pro– Ala4–) as a Model for Cyclic Pentapeptides of the dL4 Type", *Journal of the American Chemical Society*, 128: 13806-13814.
- [36] Smith, A.B. Razler, T.M. Ciavarri, J.P. Hirose, T. Ishikawa, T. ve Meis, R.M., (2008). "A second-generation total synthesis of (+)-phorboxazole A", *The Journal of Organic Chemistry*, 73: 1192-1200.
- [37] Tyndall, J.D. ve Fairlie, D.P., (2001). "Macrocycles mimic the extended peptide conformation recognized by aspartic, serine, cysteine and metallo proteases", *Current medicinal chemistry*, 8: 893-907.
- [38] Vlieghe, P. Lisowski, V. Martinez, J. ve Khrestchatisky, M., (2010). "Synthetic therapeutic peptides: science and market", *Drug discovery today*, 15: 40-56.
- [39] Hubbard, S.J., (1998). "The structural aspects of limited proteolysis of native proteins", *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1382: 191-206.
- [40] Amidon, G.L. ve Lee, H., (1994). "Absorption of peptide and peptidomimetic drugs", *Annual review of pharmacology and toxicology*, 34: 321-341.

- [41] Liu, S. Gu, W. Lo, D. Ding, X.-Z. Ujiki, M. Adrian, T.E. Soff, G.A. ve Silverman, R.B., (2005). "N-Methylsalsalvamide A peptide analogues. Potent new antitumor agents", *Journal of medicinal chemistry*, 48: 3630-3638.
- [42] Nicolaou, K. Chen, J.S. ve Dalby, S.M., (2009). "From nature to the laboratory and into the clinic", *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17: 2290-2303.
- [43] Singh, E.K. Sellers, R.P. Alexander, L.D. ve McAlpine, S.R., (2008). "Conformationally based design of macrocycles as antitumor agents", *Current opinion in drug discovery & development*, 11: 544-552.
- [44] Hanahan, D. ve Weinberg, R.A., (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation", *Cell*, 144(5): 646-674.
- [45] Society, A.C., (2013). *Cancer facts and figures 2013*, American Cancer Society Atlanta.
- [46] Longley, D.B. Harkin, D.P. ve Johnston, P.G., (2003). "5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies", *Nature Reviews Cancer*, 3: 330-338.
- [47] Einhorn, L.H., (1990). "Treatment of testicular cancer: a new and improved model", *Journal of clinical oncology*, 8: 1777-1781.
- [48] Jordan, M.A. ve Wilson, L., (2004). "Microtubules as a target for anticancer drugs", *Nature Reviews Cancer*, 4: 253-265.
- [49] Kakde, D. Jain, D. Shrivastava, V. Kakde, R. ve Patil, A., (2011). "Cancer therapeutics-opportunities, challenges and advances in drug delivery".
- [50] Dökmeci, İ. Akçasu, A. Banoğlu, N. ve Berkarda, Ş., (1992). "Farmakoloji", *İlaç Uygulamalarında Temel Kavramlar*. Dökmeci, İ. (Editör) Nobel Tıp Kitabevleri.
- [51] Schally, A.V. Comaru-Schally, A.M. Nagy, A. Kovacs, M. Szepeshazi, K. Plonowski, A. Varga, J.L. ve Halmos, G., (2001). "Hypothalamic hormones and cancer", *Frontiers in neuroendocrinology*, 22: 248-291.
- [52] Moody, T.W. Leyton, J. Garcia-Marin, L. ve Jensen, R.T., (2003). "Nonpeptide gastrin releasing peptide receptor antagonists inhibit the proliferation of lung cancer cells", *European journal of pharmacology*, 474: 21-29.
- [53] Dilgimen S., A., (1998). *Hepatit B Yüzey Antijenleri Polipeptidlerinin Kimyasal Yolla Sentezi ve Karakterizasyonu*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [54] Özdemir, Z.Ö., (2008). *Sentetik Viral Peptidler Kullanılarak Polielektrolit Esaslı Biyokonjugatların Geliştirilmesi*, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [55] Jakubke, H.D. ve Sewald, N., (2008). *Peptides from A to Z: a concise encyclopedia*, John Wiley & Sons.
- [56] Atherton, E. ve Sheppard, R., (1989). *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford.

- [57] Hlaváč, J. Sural, M. ve Krchňák, V., (2011). "Practical Aspects of Combinatorial Solid-Phase Synthesis", Solid-Phase Organic Synthesis: Concepts, Strategies, and Applications: 95-130.
- [58] Mitchell, A.R., (2008). "Bruce Merrifield and solid-phase peptide synthesis: A historical assessment", Peptide Science, 90: 175-184.
- [59] Carpino, L.A. ve Han, G.Y., (1972). "9-Fluorenylmethoxycarbonyl amino-protecting group", The Journal of Organic Chemistry, 37: 3404-3409.
- [60] Kimmerlin, T. ve Seebach, D., (2005). "'100 years of peptide synthesis': ligation methods for peptide and protein synthesis with applications to β -peptide assemblies*", The Journal of peptide research, 65: 229-260.
- [61] Anderson, G.W. ve McGregor, A.C., (1957). "t-Butyloxycarbonylamino acids and their use in peptide synthesis", Journal of the American Chemical Society, 79: 6180-6183.
- [62] Duro-Castano, A. Conejos-Sánchez, I. ve Vicent, M.J., (2014). "Peptide-based polymer therapeutics", Polymers, 6: 515-551.
- [63] Durkan, K., (2008). Bombesin'e benzer peptidlerden litorin'in Tc-99m ile işaretlenme yöntemlerinin araştırılması ve radyofarmasötik potansiyelinin incelenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.
- [64] Saha, G.B., (2010). Radiopharmaceuticals and methods of radiolabeling, Fundamentals of Nuclear Pharmacy. 3. Baskı, Springer, New York.
- [65] Sivri, N.N. ve Özer, A.Y., (2011). "Radyonüklidik Tedavi ".
- [66] Saha, G.B., (1992). Uses of radiopharmaceuticals in nuclear medicine, ed. Fundamentals of Nuclear Pharmacy. Springer, 227-304.
- [67] Welch, M.J. ve Redvanly, C.S. (Editörler) (2003). Handbook of radiopharmaceuticals: radiochemistry and applications, John Wiley & Sons.
- [68] Stichelberger, A., (2002). Chemical and Enzymatic Methods to Improve Biodistribution of fac-[M (H₂O) 3 (CO) 3](M= ⁹⁹Tc, ^{99m}Tc, and Re) Labeled Proteins and Peptides, Doktora Tezi, Zürih Üniversitesi, Zürih Federal Teknoloji Enstitüsü, Lenzburg.
- [69] Meléndez-Alafort, L. de María Ramírez, F. Ferro-Flores, G. de Murphy, C.A. Pedraza-López, M. ve Hnatowich, D.J., (2003). "Lys and Arg in UBI: A specific site for a stable Tc-99m complex?", Nuclear medicine and biology, 30: 605-615.
- [70] Sosabowski, J. Melendez-Alafort, L. ve Mather, S., (2003). "Radiolabelling of peptides for diagnosis and therapy of non-oncological diseases", The Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging, 47(4): 223-237.
- [71] Langer, M. ve Beck-Sickinger, A., (2001). "Peptides as carrier for tumor diagnosis and treatment", Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 1: 71-93.

- [72] Hnatowich, D., (1977). A review of radiopharmaceutical development with short-lived generator-produced radionuclides other than ^{99m}Tc , Welch, M.J. (Editör) Radiopharmaceuticals and Other Compounds Labelled with Short-Lived Radionuclides. Elsevier, USA.
- [73] Welch, M.J. ve Wagner, S.J., (1978). Preparation of positron-emitting radiopharmaceuticals, Lawrence, J.H., Budinger, T.F. (Editörler) Recent advances in nuclear medicine, New York.
- [74] Ter-Pogossian, M.M., (1981). "Special characteristics and potential for dynamic function studies with PET", Seminars in Nuclear Medicine, 11(1):13-23.
- [75] Ter-Pogossian, M.M., (1983). Positron emission tomography (PET), Richard C. Reba, R.C, Goodenough, D.J. ve Davidson, H.F. (Editörler) Diagnostic Imaging in Medicine. Springer, USA.
- [76] Pearson, R.G., (1963). "Hard and soft acids and bases", Journal of the American Chemical Society, 85: 3533-3539.
- [77] Dymov, A.M. ve Savostin, A.P., (1970). "Analytical chemistry of gallium", Ann Arbor Science Baskı.
- [78] Kumar, B. Miller, T.R. Siegel, B.A. Mathias, C.J. Markham, J. Ehrhardt, G.J. ve Welch, M.J., (1980). "Positron tomographic imaging of the liver with Ga-68 iron hydroxide colloid": International Society for Optics and Photonics.
- [79] Harris, W.R. ve Pecoraro, V.L., (1983). "Thermodynamic binding constants for gallium transferrin", Biochemistry, 22: 292-299.
- [80] Kulprathipanja, S. ve Hnatowich, D., (1977). "A method for determining the pH stability range of gallium radiopharmaceuticals", Welch, M. (Editör) Radiopharmaceuticals and Other Compounds Labelled with Short-Lived Radionuclides. 1. baskı, Elsevier, USA.
- [81] Moerlein, S. ve Welch, M., (1981). "The chemistry of gallium and indium as related to radiopharmaceutical production", International journal of nuclear medicine and biology, 8(4): 277-287.
- [82] Chasteen, N.D., (1977). "Human serotransferrin: structure and function", Coordination Chemistry Reviews, 22(1-2): 1-36.
- [83] Llinás, M., (1973). Metal-polypeptide interactions: the conformational state of iron proteins, Metal Bonding in Proteins. Springer, USA.
- [84] Larson, S.M. Allen, D.R. Rasey, J.S. ve Grunbaum, Z., (1978). "Kinetics of binding of carrier-free/sup ^{67}Ga to human transferrin", Journal of Nuclear Medicine, 19(11).
- [85] Bradley, W. Alderson, P. Eckelman, W. Hamilton, R. ve Weiss, J., (1978). "Decreased tumor uptake of gallium-67 in animals after whole-body irradiation", Journal of Nuclear Medicine, 19(2): 204-209.

- [86] Nishiyama, H. Deutsch, E. Adolph, R.J. Sodd, V.J. Libson, K. Saenger, E.L. Gerson, M.C. Gabel, M. Lukes, S.J. ve Vanderheyden, J.-L., (1982). "Basal kinetic studies of Tc-99m DMPE as a myocardial imaging agent in the dog", *Journal of Nuclear Medicine*, 23: 1093-1101.
- [87] Zhernosekov, K.P. Filosofov, D.V. Baum, R.P. Aschoff, P. Bihl, H. Razbash, A.A. Jahn, M. Jennewein, M. ve Rösch, F., (2007). "Processing of generator-produced 68Ga for medical application", *Journal of Nuclear Medicine*, 48: 1741-1748.
- [88] Arano, Y., (2002). "Recent advances in 99m Tc radiopharmaceuticals", *Annals of nuclear medicine*, 16(2): 79-93
- [89] Okarvi, S., (2004). "Synthesis, radiolabeling and in vitro and in vivo characterization of a technetium-99m-labeled alpha-M2 peptide as a tumor imaging agent", *Chemical Biology & Drug Design*, 63: 460-468.
- [90] Faintuch, B. Santos, R. Souza, A. Hoffman, T. Greeley, M. ve Smith, C., (2005). "99mTc-HYNIC-bombesin (7-14) NH₂: radiochemical evaluation with co-ligands EDDA (EDDA= ethylenediamine-N, N'-diacetic Acid), tricine, and nicotinic acid", *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 35: 43-51.
- [91] Blok, D. Feitsma, R. Vermeij, P. ve Pauwels, E., (1999). "Peptide radiopharmaceuticals in nuclear medicine", *European journal of nuclear medicine*, 26: 1511-1519.
- [92] Breeman, W.A. de Jong, M. Erion, J.L. Bugaj, J.E. Srinivasan, A. Bernard, B.F. Kwekkeboom, D.J. Visser, T.J. ve Krenning, E.P., (2002). "Preclinical comparison of 111In-labeled DTPA-or DOTA-bombesin analogs for receptor-targeted scintigraphy and radionuclide therapy", *Journal of Nuclear Medicine*, 43: 1650-1656.
- [93] Baidoo, K.E. Lin, K.-S. Zhan, Y. Finley, P. Scheffel, U. ve Wagner, H.N., (1998). "Design, synthesis, and initial evaluation of high-affinity technetium bombesin analogues", *Bioconjugate chemistry*, 9: 218-225.
- [94] Karra, S.R. Schibli, R. Gali, H. Katti, K.V. Hoffman, T.J. Higginbotham, C. Sieckman, G.L. ve Volkert, W.A., (1999). "99mTc-labeling and in vivo studies of a bombesin analogue with a novel water-soluble dithiadiphosphine-based bifunctional chelating agent", *Bioconjugate chemistry*, 10: 254-260.
- [95] Bella, L. Garcia-Garayoa, E. Bähler, M. Bläuenstein, P. Schibli, R. Conrath, P. Tourwe, D. ve Schubiger, P., (2002). "A 99mTc (I)-postlabeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent", *Bioconjugate chemistry*, 13: 599-604.
- [96] Yurt, F. Unak, P. Ozkiliç, H. Uluc, F. Bağcı, S. ve Tuglular, I., (1999). "Labeling of zopiclone with iodine-131", *Nuclear medicine and biology*, 26: 827-831.
- [97] Yurt, F., (1998). Benzodiazepin (Diazepam) ve cyclopyrrolone (Zopiclone) grubu formasötiklerinin I-131 ile işaretlenmesi, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İzmir.

- [98] Acar, T., (2012). Veteriner hekimliğinde Brucella abortus hastalığına karşı immunojen olarak kullanılabilen sentetik peptid-polimer konjugatlarının sentezlenmesi ve yapılarının incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [99] Uçar, B., (2011). İyon kromatografi kullanarak çeşitli örneklerde perklorat analizi (musluk suyu, havuz suyu, yüzey suyu, süt), Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [100] Karahan, M., (2009). Metal İçeren Fonksiyonel Biyopolimer Sistemlerin Geliştirilmesi, Doktora Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [101] Acar, S., (2006). Peptid Protein Kovalent Konjugasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- [102] Dubey, N. Varshney, R. Shukla, J. Ganeshpurkar, A. Hazari, P.P. Bandopadhaya, G.P. Mishra, A.K. ve Trivedi, P., (2012). "Synthesis and evaluation of biodegradable PCL/PEG nanoparticles for neuroendocrine tumor targeted delivery of somatostatin analog", Drug delivery, 19: 132-142.

TANIMLAR

Değişik tanımlamalar yapılabilirse de aşağıdakiler kelime anlamına en yakın olanlardır.

Nüklit: Belli sayıda nötron ve protonu olan atom.

İzotop: Aynı sayıda proton, farklı sayıda nötron taşıyan nüklit.

Radyoaktivite: Her radyonüklit için kendine özgü partikül veya elektromanyetik radyasyon (γ veya X ışını) yayma olayı.

Radyonüklit: Radyoaktif nüklit.

Radyoizotop: Aynı sayıda proton taşıyan radyonüklit (Örn, I-123, I-125, I-131).

Radyofarmasötik: Tıbbi amaçla hastaya verilen madde (ilaç).

Tracer (iz): Herhangi bir etkiye sebep olmaksızın biyolojik yollardan geçerken izlenebilen çok az miktardaki madde.

Radyotracer: Radyoaktif tracer.

Spesifik aktivite: Bir nüklidin birim kütlesinin radyoaktivitesi

Spesifik konsantrasyon: Birim ağırlık veya hacimdeki radyoaktivite.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Burcu UÇAR
Doğum Tarihi ve Yeri :07.07.1987 – İSTANBUL
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :brccr87@gmail.com, burcu.ucar@std.yildiz.edu.tr

ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Y. Lisans	Analitik Kimya	İstanbul Teknik Üniversitesi	2011
Lisans	Kimya	Trakya Üniversitesi	2009
Lise	Fen Bilimleri	Cibali Lisesi	2004

İŞ TECRÜBESİ

Yıl	Firma/Kurum	Görevi
2012-Halen	V.K.V. Amerikan Hastanesi Nükleer Tıp ve Moleküler Görüntüleme	Sentez ve RİA Lab. Sorumlusu
2010-2011	İstanbul Teknik Üniversitesi	Asistan Öğrenci
2008	Yeni Recordati İlaç Sanayii	Stajyer
2007	Ren Gıda Sanayii	Stajyer

YAYINLARI

Makale

1. Demirkol, M.O. Acar, Ö. Uçar, B. Ramazanoğlu, S.R. Sağlıcan, Y. ve Esen, T., (2015). "Prostate-specific membrane antigen-based imaging in prostate cancer: Impact on clinical decision making process", *The Prostate*, 75(7): 748-757.
2. Demirkol, M.O. Kiremit, M.C. Acar, Ö. Uçar, B. ve Sağlıcan, Y., (2017). "The Utility of 68Ga-PSMA PET/CT in Poorly Differentiated Metastatic Prostate Cancer", *Clinical nuclear medicine*, 42(5): 403-405.
3. Uçar, B. Acar, T. Arayıcı Pelit, P. Mustafaeva, Z. ve Demirkol, M.O., (2018). "[⁶⁸Ga]Ga-AntiCAD1: Radiosynthesis and First Imaging Study on Rats", *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24(4): 531-538.
4. Ucar, B. Acar, T. Arayıcı Pelit, P. Demirkol, M.O. ve Mustafaeva, Z. A., (2018). "A New Radio-Theranostic Agent Candidate: Synthesis and Analysis of (ADH-1)c-EDTA Conjugate", *Fresenius Environmental Bulletin*, 27(7): 4751-4758.

Bildiri

1. Staging and Restaging Prostate Cancer with ⁶⁸Ga-PSMA-ligand PET/CT : Initial Results of a Contemporary Cohort. 12-Kasım 2015, European Association of Urology, Section of Urological Imaging, Annual Meeting, Barcelona, Spain.

ÖDÜLLERİ

1. Üroonkoloji Bilimsel Araştırma Ödülü 2015, Üçüncülük Derecesi