

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
FİZİKOKİMYA BİLİM DALI

FESLEĞEN BİTKİSİNDEN İZOLE EDİLEN ESTRAGOL'UN
RADYOİYODİNASYONU VE *İN VİTRO* HÜCRE KÜLTÜRÜ
YÖNTEMLERİ İLE BEYİN KANSERİ HÜCRE HATLARI
ÜZERİNDEKİ DAVRANIŞININ İNCELENMESİ

Mouhaman Toukour DEWA

Danışman
Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI



MANİSA-2021

**Mouhaman
Toukour DEWA**

**FESLEÇEN BİTKİSİNDEKİ İZOLE EDİLEN ESTRAGOL' UN RADYOİYODİNASYONU
VE İN VİTRO HÜCRE KÜLTÜRÜ YÖNTEMLERİ İLE BEYİN KANSERİ HÜCRE
HATLARI ÜZERİNDEKİ DAVRANIŞININ İNCELENMESİ**

2021

TAAHHÜTNAME

Bu tezin Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nde, akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

Mouhaman Toukour DEWA



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLO DİZİNİ	IVII
TEŞEKKÜR.....	VII
ÖZET	IX
ABSTRACT.....	X
1 GİRİŞ.....	1
2 GENEL BİLGİ.....	3
2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar	3
2.2 Geçmişten Bugüne Bitkilerin Önemi	5
2.2.1 Fesleğen	6
2.2.2 Estragol (EST)	7
2.3 Radyoişaretleli bitki kökenli bileşikler.....	8
2.4 ¹³¹ I (İyot-131)	9
2.5 Yaşam Bilimlerinde Teranostik Yaklaşımlar	10
2.6 Proje Kapsamındaki Çalışmalarda Kullanılan Metodlar.....	10
2.6.1 Ekstraksiyon	10
2.6.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi	11
2.6.2.1 Kromatogramlar.....	11
2.6.2.2 Sıvı kromatografi	12
2.6.2.3 Normal-Faz kromatografi	12
2.6.2.4 Ters-Faz kromatografi	13
2.6.3 Radyoiyodinasyon	13
2.6.3.1 İyodojen Metodu.....	14
2.6.4 İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Yöntemi.....	15
2.6.5 Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC/QTOF/MS)	16
2.6.6 Stabilite	16
2.6.7 Lipofilite	17
2.6.8 Hücre Kültürü Yöntemleri	17
2.6.8.1 Sitotoksosite.....	18
2.6.8.2 İnkorporasyon	18

3	GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1	Gereç	19
3.1.1	Kullanılan kimyasallar ve cihazlar	19
3.1.2	Kullanılan kimyasallar.....	19
3.1.3	Kullanılan Cihazlar.....	20
3.2	Yöntem.....	20
3.2.1	Fesleğen bitkisinin yetiştirilmesi ve fesleğen yapraklarının ekstraksiyonu	20
3.2.2	HPLC analizi ve saflaştırma.....	22
3.2.3	İzole edilen Estragol için LC/Q-TOF/MS analizi	22
3.2.4	Estragol'un radyoiodinasyonu (¹³¹ I-EST)	23
3.2.4.1	İyodojen hazırlama	23
3.2.4.2	Radyoiodinasyon	23
3.2.5	¹³¹ I-EST için Kalite Kontrol Analizleri	24
3.2.6	Stabilite Çalışmaları	25
3.2.7	Lipofilite çalışmaları	25
3.2.8	<i>İn vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	25
3.2.8.1	Hücre Hatlarının Hazırlanması.....	25
3.2.8.2	Sitotoksosite Çalışmaları.....	26
3.2.8.3	İnkorporasyon Çalışmaları	26
4	ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	28
4.1	HPLC Analiz Sonuçları	28
4.2	LC/QTOF/MS Analiz Sonuçları	29
4.3	Kalite Kontrol Sonuçları	30
4.4	Stabilite Sonuçları	33
4.5	Lipofilite Sonuçları	34
4.6	<i>İn Vitro</i> Çalışmalar.....	34
4.6.1	Sitotoksosite	34
4.6.2	İnkorporasyon.....	35
5	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	38
	KAYNAKLAR	39

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

EST	Estragol
FYE	Fesleğen yaprakları ekstraktı
KBB	Kan-beyin bariyeri
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
TLRC	İnce Tabaka Radyo Kromatografisi
EST	Estragol
DAOY	İnsan medulloblastoma
U87-MG	İnsan glioblastoma-astrocyoma
¹²⁵I	İyot-125
¹³¹I	İyot-131
¹³¹I-EST	İyot-131 ile işaretli Estragol
LC/Q-TOF/MS	Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
R_f	Alıkonma faktörü
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mCi	Milüküri
mg	Miligram
P	Dağılım Katsayısı
mL	Mililitre
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. ^{131}I 'in bozunma şeması.....	10
Şekil 2.2. İyodojen'in kimyasal yapısı.....	15
Şekil 3.1. Saksıda yetiştirilen fesleğen bitkisi.....	21
Şekil 3.2. Kurutulmuş fesleğen yapraklarının ekstraksiyonu.....	21
Şekil 4.1. Estragol standardına ait HPLC kromatogramı.....	28
Şekil 4.2. Fesleğen yaprağı ekstraktına (FYE) ait HPLC kromatogramı.....	28
Şekil 4.3. FYE ve std EST HPLC kromatogramları.....	29
Şekil 4.4. LC/QTOF/MS kromatogramı.....	30
Şekil 4.5. Na^{131}I için TLRC kromatogramı.....	31
Şekil 4.6. Yük. ^{131}I için TLRC kromatogramı.....	31
Şekil 4.7. ^{131}I -EST için TLRC kromatogramı.....	32
Şekil 4.8. ^{131}I -EST için radyoyodinasyon veriminin zamana göre değişim grafiği.....	33
Şekil 4.9. ^{131}I -EST için tahmin edilen moleküler formül yapısı.....	34
Şekil 4.10. Na^{131}I ve ^{131}I -EST'un U-87 MG ve Daoy hücre hatları üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamana bağlı değişimi grafiği.....	36

TABLO DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. HPLC analizi koşulları	22
Tablo 4.1. FYE HPLC kromatogramına ait piklerin R_f değerleri	29
Tablo 4.2. n-butanol/bidistile su/asetik asit (4:2:1) karışımı hareketli faz ile elde edilen R_f değerleri	31
Tablo 4.3. Teorik ve deneysel LogP değerleri	34
Tablo 4.4. Sitotoksosite çalışmaları sonunda EST için elde edilen IC_{50} değerleri	35



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmamın her aşamasında bana destek olan bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren ilgilerini esirgemeyen değerli danışman hocam Sayın Prof. Dr. Uğur AVCIBASI'ya yoğun çalışma temposu içerinde deneyimli ve bilgisiyle yol gösterip ilgiyle sevgiyle yaklaşan güler yüzlü hocam Prof. Dr. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER ve ekibine, bilgili ve tecrübeli çok anlayışlı hocam Doç. Dr. Ayfer YURT ve Doktora ęrencisi Kadriye BÜŐRA hayatımın tüm zorlu aşamasında her yönden yardımcı olan tecrübeleri ile beni aydınlatan ve yüksek lisans ęrencisi Cansu KAYAŐ desteklerini hiç eksik etmeyen ve çalışmalarım sırasında her zaman hissettiğim, bana çalışma imkânı sunan laboratuvarlarını açan Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü çalışmalarına ve öğrenim hayatım boyunca mesafe olsa da beni madde ve manevi olarak destekleyen ve hep yanımda olan bütün aileme teŐekkürlerimi sunarım.

Mouhaman Toukour DEWA
Manisa, 2021

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

Fesleğen Bitkisinden İzole Edilen Estragol'un Radyoyodinasyonu Ve *In Vitro* Hücre Kültürü Yöntemleri İle Beyin Kanseri Hücre Hatları Üzerindeki Davranışının İncelenmesi **Mouhaman Toukour DEWA**

Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Fizikokimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

Günümüzde bitki kökenli tedavi uygulamaları önem kazanmaya devam etmektedir. Özellikle çok yaygın ve tedavisi zor olan kanser türleri üzerinde daha az toksik özelliği bulunan bitkiler üzerinde çeşitli araştırmalar önem kazanmıştır. Klinik öncesi çalışmalarda fesleğen ve bileşenlerinin kemoterapiye yardımcı, tümör hücrelerinin gelişimini önleyici etkilerinin olduğu raporlanmıştır.

Nükleer Tıp; radyoaktif maddelerin yaydıkları ışıklardan yararlanılarak bir hastalığın tanı veya tedavisini amaçlayan bir tıp dalıdır. Nükleer Tıp'ta kullanılan bazı radyonüklidlerin, kanserli dokular tarafından seçici olan bitki kökenli bileşikler ile bu dokulara yönlendirilebilir oldukları bilinmektedir. ¹³¹I; enerjisi ve yarı ömrü nedeniyle hem tanı hem de tedavide tercih edilen önemli bir radyoizotopur.

Bu tez kapsamında öncelikle fesleğen bitkisi ekstrakte edilerek bileşenlerinden Estragol (EST) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) sisteminde izole edilmiştir. Radyoyodinasyon işlemi saflaştırılan EST'ün hem tanı hem de tedavide kullanılabilme potansiyeli oluşturması amacıyla ¹³¹I ile gerçekleştirilmiştir. İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi kullanılarak radyoşaretli EST'nin (¹³¹I-EST) kalite kontrolü yapılmıştır. Radyoşaretli ve bitki kökenli EST'nin insan medulloblastoma (Daoy) ve insan glioblastoma-astrocytoma (U-87 MG) hücre hatları üzerindeki biyoetkinliğinin inlenmesi amacıyla *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalar kapsamında, EST bileşiğinin sitotoksitesisi incelenmiş ve ¹³¹I-EST'nin inkorporasyon çalışmaları ile hücreler üzerindeki tutulumu incelenmiştir.

Fesleğen yaprakları ekstraktından izole edilen EST bileşeni ¹³¹I radyoizotobu ile yüksek verimle işaretlendiği, radyokararlılığını 24 saat koruduğu görülmüştür. ¹³¹I-EST, ¹³¹I'e kıyasla özellikle Daoy hücreleri üzerinde yüksek tutulum (~%8-9) sergilemiştir.

Tez kapsamında sentezlenen ¹³¹I-EST'un beyin hücreleri üzerinde hem tanı hem tedavi potansiyeline sahip olması projenin önemli bir çıktısı olarak düşünülmektedir. *In vitro* hücre kültürü yöntemleri ile temeli atılan bu çalışmanın ileriki çalışmaları kapsamında *in vivo* olarak deney hayvanları üzerinde çalışmalar yürütülebilecektir.

Anahtar Kelimeler: Fesleğen, Estragol (EST), ¹³¹I işaretli estragol (¹³¹I-EST), İyot-131 (¹³¹I), DAOY, U87-MG

2021, 56 sayfa



ABSTRACT

M.Sc. Thesis

ISOLATION, RADIOIODINATION OF ESTRAGOLE FROM BASIL PLANT AND INVESTIGATION OF THE BEHAVIOUR ON BRAIN CANCER CELL LINES BY USING *IN VITRO* CELL CULTURE METHODS

Mouhaman Toukour DEWA

Manisa Celal Bayar University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Physical Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Uğur AVCIBAŞI

Nowadays, plant originated treatment applications continue to gain importance. Especially, various investigations have gained more importance on plants that are less toxic especially on very common and difficult-to-treat cancer types. Preclinical studies have reported that basil and its components have anti-chemotherapeutic, tumor-cell inhibiting effects.

Nuclear Medicine; is a medical discipline that aims at the diagnosis or treatment of a disease by utilizing the rays of radioactive materials. It is known that some radionuclides used in Nuclear Medicine can be directed to these tissues with plant-derived compounds selective for cancerous tissues. ^{131}I is an important radioisotope that is preferred both for diagnosis and treatment because of its energy and half life.

In present project, initially Estragole (EST) was isolated from basil leaves extract. Isolation process was performed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) system. The isolated EST was radioiodinated with ^{131}I by using iodegen method. Radioiodination performed with the aim of examining both of the diagnosis and therapy potential of the EST. Quality control of the radiolabeled EST (^{131}I -EST) was performed by using Thin Layer Radio Chromatography (TLRC). *In vitro* cell culture studies were performed to investigate the bioaffinity of radiolabeled and plant originated EST on human medulloblastoma (Daoy) and human glioblastoma-astrocytoma (U-87 MG) cell lines. Within these studies, toxicity of EST was determined and cell uptake of ^{131}I -EST was investigated by incorporation studies.

It was observed that the EST isolated from the extract of basil leaves was radioiodinated with ^{131}I in high yields and preserved its radiostability for 24 hours. ^{131}I -EST exhibited higher uptake (~ 8-9%) especially on Daoy cells compared to ^{131}I .

As outputs of this project, ^{131}I -EST, which synthesized within the scope of current project, is thought to have a great prospect for both diagnosis and treatment potential on brain cancer. It is proposed that the radioiodinated EST would have both diagnostic and therapeutic effects on the brain cells. *In vitro* cell culture studies of

current project form the basis of future studies and *in vivo* studies on experimental animals may be carried out as part of further studies of present study.

Keywords: Basil, Estragole (EST), ^{131}I labeled estragole (^{131}I -EST), Iodine-131 (^{131}I), DAOY, U87-MG

2021, 56 pages



1 GİRİŞ

XXI. yüzyılda hastalıkların tanı/tedavisinde bitki ve bitki kökenli ürünlerin potansiyellerine vurgu artmış ve çeşitli özelliklerinin hastalıklar üzerinde kullanımına ilişkin araştırmalara önemli bir ilgi başlamıştır [1,2]. Bu bitkilerin içeriğindeki etken maddeler, kemoterapötik ve kanser önleyici ajanlar olarak kabul görmüş ve birçok hastalık için kullanılmaya başlanmıştır [3]. Bu alanda kanser hedefleyici bitki kökenli radyoışaretle ajanların geliştirilmesine yönelik çalışmalar yapılmaktadır [4]. Bitki veya bitki kökenli doğal içeriklerden türetilmiş ajanlar, sahip oldukları çeşitli potansiyelleri ve doğal anti-oksidan özelliklerinden dolayı bu alanda popüler olarak araştırılmakta ve kullanılmaktadır [1,5]. Ayrıca, bu doğal ajanların, geleneksel kemoterapi ajanlarına kıyasla daha düşük toksisite gibi birçok avantaja sahip olduğu bildirilmektedir [6]. Onkolojik tedavide halen kullanılmakta olan birçok ilacın (Doxorubicin, Docetaxel, Oxaliplatin, Melphalan, Carboplatin, Paclitaxel v.b.) bitki kökenli olduğu bilinmektedir.

Klinik öncesi çalışmalarda fesleğen ve bileşenlerinin kemoterapiye yardımcı, tümör hücrelerinin gelişimini önleyici etkilerinin olduğu raporlanmıştır. Ayrıca, fesleğenin doğal antioksidan içeriğinden dolayı gıda üretimi ve ilaç sanayisindeki kullanımında artış görülmektedir. Fesleğen ürünlerini içeren çalışmalar giderek artmış ve sağlık üzerindeki olumlu etkileri fark edilmiştir. Literatürde fesleğen (*Ocimum basilicum*) ekstraktının küresel serebral iskemi ve reperfüzyon kaynaklı beyin hasarı ve motor disfonksiyonları üzerinde iyileştirici yönde etki gösterdiği görülmüştür [7]. Fesleğen bitkisinin beyin üzerindeki çeşitli biyolojik etkilerinin içeriğindeki etken maddelerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Fesleğen bitkisi (*Ocimum basilicum*) içeriğindeki temel bileşenlerin başında Estragol (EST) gelmektedir. Otlar ve baharatların ortak bir bileşeni olan EST, kemirgenlerde iyi bilinen bir genotoksik hepatokarsinojendir. EST içeren preparatların, insan hepatoma (HepG2) hücre hattı üzerinde sitotoksosite, genotoksosite, apoptoz ve hücre döngüsü üzerindeki etkileri incelenmiştir [8].

Nükleer Tıp; radyoaktif maddelerin yaydıkları ışıklardan yararlanılarak hastalıkların tanı veya tedavisini amaçlayan bir tıp dalıdır. Nükleer Tıp alanında tanı ve tedavi amacıyla birçok radyoizotop kullanılmaktadır. Kullanılan bu radyonüklidlerin, kanserli dokular tarafından seçici olan bitki kökenli bileşikler ile bu

dokulara yönlendirilebilir oldukları bilinmektedir. ¹³¹I; enerjisi ve yarı ömrü nedeniyle hem tanı hem tedavide tercih edilen önemli bir radyoizotoptur. “Teranostik” terimi, kliniklerde, çeşitli hastalıklar için daha spesifik, bireyselleştirilmiş terapiler geliştirmek ve tanısal ile terapötik yetenekleri tek bir ajan olarak birleştirmek için devam eden çabaları tanımlamaktadır [9]. Nükleer Tıp’ta hastalıkların tanı ve tedavisi için çeşitli radyoizotoplar kullanılmaktadır. İyot birden fazla farklı özelliklerde radyoizotopa (¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I ve ¹³¹I) (¹²³I t_{1/2} 13,3 saat; ¹²⁴I t_{1/2} 4,18 gün; ¹²⁵I t_{1/2} 59,4 gün ve ¹³¹I t_{1/2} 8 saat) sahip olduğundan Nükleer Tıp’ta en çok tercih edilen radyoizotoplar arasındadır [10].

Bu tez çalışması ile bitki kökenli EST’nin, fesleğen bitkisinden izolasyonu ve radyoiodinasyonu ile elde edilen radyoişaretli ajanın sentezlenmesi ve teranostik yaklaşımla aynı anda görüntüleme ve tedavi imkânı sunabilme potansiyeline sahip, beyin kanser hücreleri üzerinde etkili olabilecek bu ajanın *in vitro* hücre kültürü çalışmaları ile öngörülen potansiyelinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda, öncelikle fesleğen yaprakları ekstrakte edilerek bileşenlerinden EST Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) sistemi kullanılarak izole edilmiştir. Radyoiodinasyon işlemi saflaştırılan EST’nin hem tanı hem de tedavide kullanılabilme potansiyelinin incelenmesi amacıyla ¹³¹I ile gerçekleştirilmiştir. İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi kullanılarak radyoişaretli EST’nin (¹³¹I-EST) kalite kontrolü yapılmıştır. Radyoişaretli ve bitki kökenli EST’ün insan medulloblastoma (Daoy) ve insan glioblastoma-astrocytoma (U-87 MG) hücre hatları üzerindeki biyoaktivitesinin irdelenmesi amacıyla *in vitro* hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, EST bileşiğinin sitotoksitesi incelenmiş ve ¹³¹I-EST’un inkorporasyon çalışmaları gerçekleştirilerek hücreler üzerindeki tutulumu incelenmiştir.

Fesleğen yaprakları ekstraksiyonu sonucunda izole edilen bitki kökenli EST’un radyoiodinasyonu teranostik yaklaşıma imkân sunmuştur. *İn vitro* beyin kanseri hücre hatları üzerinde öngörülen potansiyelinin incelendiği bu proje kapsamında ¹³¹I-EST’nin bu teranostik yaklaşımla nörodejeneratif hastalıklar ve beyin kanseri üzerinde etkili olabilecek ajanların geliştirilmesi yönünde bir ön çalışma niteliğinde olduğu düşünülmektedir.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Nörodejeneratif Hastalıklar

Beyin kanseri ve nörodejeneratif hastalıklar, dünyada önemini ve ciddiyetini koruyan sağlık problemleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır. Beyin kanseri tanı ve tedavisindeki zorluklar, çeşitliliği ve heterojenitesinin dışında kan beyin bariyeri (KBB) ile doğrudan ilişkilidir. Nörodejeneratif hastalıklar ise nöronal hücrelerin kademeli olarak kaybı ve yaşlanmada etkili sinir sisteminin fonksiyonel bozukluğu ile ilişkilidir. Alzheimer hastalığı (AD), Parkinson hastalığı (PD), Huntington hastalığı (HD), Multipl Skleroz ve Prion hastalıkları majör nörodejeneratif hastalıklardır [11].

Nörodejenerasyon; yapısal veya fonksiyonel olarak nöronların ilerleyici kaybı olarak tanımlanabilir. Nörodejeneratif hastalıklar temel olarak beyin, omurilik ve periferik sinirler gibi sinir sistemini etkilemektedir.

KBB, merkezi sinir sisteminin homeostazını korumada önemli bir rol oynamaktadır ve bozulması, birçok beyin bozukluğunun önemli bir ayırt edici özelliğidir. Kan-beyin bariyeri, beynin kan ve parankima hücreleri arasında zorlu bir bariyer sağlamaktadır [12].

Alzheimer (AD), Parkinson (PD), Huntington (HD), Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıklar, merkezi sinir sisteminde görülür ve bu hastalıkların nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte, oksidatif stres, mitokondriyal hasar, inflamatuvar reaksiyonlar ve hücre apoptozisi gibi çeşitli patolojik süreçler gösterdikleri tespit edilmiştir [11].

- Alzheimer (AD) Genel olarak bilişsel bozukluk, hafıza kaybı ve bunama ile ilerleyen nörodejeneratif bir hastalıktır. Hastalıklı beyin dokularında amiloid beta öncül (precursor) proteinlerinden köken alan beta amiloid plakları ve hücre içi nörofibriler yumakların birikimi gözlenmektedir. Amiloid plaklar, amiloid öncül proteinin anormal işlemesi ve aşırı üretiminden dolayı birikir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, hücre içi anormal protein temizleme temel yollarındaki (übikitin proteazom sistemi ve otofaji) aksaklıkların, hastalık oluşum ve ilerlemesine katkıda bulunduğuna işaret etmektedir [13].

- Parkinson (PD) ise, beynin Substantia Nigra pars compacta (SNc) adı verilen bölgedeki dopamin üreten sinir hücrelerinin ölümüne bağlı olarak ortaya çıkan bir hastalıktır. Parkinson Hastalığı da ilerleyici nörodejenerasyon gözlenen bir sağlık sorunudur. Ailesel ve sporadik formları mevcuttur. Parkinson Hastalığı, bradikinezi, titreme ve kas katılığını gibi semptomlar ortaya çıkarır. Hastalık, sinir hücrelerinde mutant alfa-sinüklein proteinleri ifadesi ve bunların bir araya gelip birikiminin katkıda bulunduğu Lewy cisimcikleri oluşumu ile seyreder [14].
- Huntington (HH) hastalığı kronik, nörodejeneratif bir beyin hastalığıdır. Bu beyninizdeki sinir hücrelerinin zamanla yıkıma uğradığı anlamına gelir. Hastalık tipik olarak 30-50 yaşları arasında başlar, ancak başlangıç yaşı daha erken olabilir. HH şu durumları etkiler;
 - Hareket,
 - Davranış,
 - Düşünme, anlama, öğrenme ve hatırlama,
 - Kişilik
- Amyotrofik Lateral Skleroz (ALS) hastalığı, beyin ve omurilikte bulunan ve kasların hareket etmesini sağlayan sinir hücrelerinin hasar görmesi sonucu ortaya çıkar. Motor nöronların (kaslara hareket emri veren sinir hücreleri), kaslara uyarılar gönderemediği zaman kaslarda güçsüzlük başlar.

Mevcut ilaçlar: dopaminerjik nöronları ve anti-kolinerjik ilaçları etkileyen ilaçlar olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Ne yazık ki, mevcut ilaçlar çok sayıda yan etkiye sahiptir ve dopaminerjik nöronların dejeneratif sürecini iyileştirmede yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, yüksek verime ve daha az yan etkiye sahip olan yeni terapötik yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bitkisel kökenli bileşikler geleneksel tıpta uzun yıllardır nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılırken, son yıllarda modern tıpta da teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır [15]. Bitkisel kökenli bileşikler nörolojik hastalıklar açısından da düşük toksik etkileri ve çoklu hedeflenmeleri gibi özelliklere sahip olmaları nedeniyle potansiyel nöroprotektif ajanlar olarak araştırılmaktadır [16].

2.2 Geçmişten Bugüne Bitkilerin Önemi

Tarihsel açıdan bakıldığında, ilaçların üretimi ve hastalıkların farmakolojik tedavisi, bitkilerin kullanımıyla başlamaktadır [17]. Klasik tıbbın bitkilerle ilişkili tarihinin, antik çağdan modern zamanlara kadar 2500 yıldan fazla olduğu düşünülürse bitkilerin potansiyelinin sağlık uygulamaları için önemli ve uygulanabilir olduğu görülmektedir. Bitkilerin içeriğindeki alkaloidler, flavonoidler, lignanlar, saponinler, terpenler, taksanlar, vitaminler, mineraller, glikozitler, zamklar, yağlar, biyomoleküller, diğer birincil ve ikincil metabolitler gibi çeşitli etkin maddelerinin kanser hücresi aktive edici proteinleri, enzimleri ve sinyal yollarını inhibe etmede önemli rol aldıkları bilinmektedir [18]. Diyet faktörleri kanserlerin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Flavonoid içeren meyve ve sebzelerin kanser kemopreventif ajanları olduğu bildirilmiştir. Flavonoidler çok iyi toksisiteye sahip, biyolojik olarak iyi bileşikler olarak kabul edilmektedirler ve bu da onları iyi terapötik adaylar yapmaktadır [19]. Doğada bulunan çeşitli flavonoidler kendi fiziksel, kimyasal ve fizyolojik özelliklerine sahiptir. Antibakteriyel, hepatoprotektif, anti-enflamatuar, anti-kanser ve anti-viral ajanlar gibi birçok flavonoidlerin tıbbi etkinliği araştırmalarla desteklenmiştir [20].

Bununla birlikte birçok tıbbi bitkinin ve içeriğindeki fitokimyasalın kanser oluşumunu ve ilerlemesini önlediği literatürde bildirilmiştir. Ayrıca; tıbbi bitkiler ile flavonoidler gibi aromatik özelliklere sahip bitkiler, fitoterapi ve veteriner tıbbi kullanımları, gibi kavramlar ile kullanım alanını genişleten "endüstriyel ürünler" haline gelmiştir [21].

Yaklaşık 250.000 bitki türü taksonomik olarak sınıflandırılmış ve farklı hastalıkların tedavisi için bunlardan yalnızca %10 kadarı günümüze kadar araştırılabilmiştir [22,23]. Birçok araştırma sonunda elde edilen bilgiler ışığında klinik alana aktarılan birçok bitki kökenli ilaç bulunmaktadır. Bunlar arasından bazı örnekler aşağıda sıralanmıştır:

- Adriamycin (Pfizer, Badford)
- Taxol (BristolMyers)
- Reminyl (Janssen-Cilag)

- Apokyn (UsWorldMeds, Mylan)
- Avmacol (NMx Wellness Innovations)
- Alvocidib
- Seliciclib
- Hycamtin (GlaxoSmithKline)
- Alkaban-AQ
- Arymo ER

2.2.1 Fesleğen

Fesleğen yaprakları; içerdiği yağ, protein, karbonhidrat, vitaminler ve madensel maddeler ile insanlar ve hayvanlar için değerli bir besin kaynağıdır. Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Labiatae familyasına bağlı kuvvetli ve güzel kokulu, 30-40 cm boyunda, yaz aylarında beyaz veya pembe renkli çiçekler açan tek yıllık bir bitkidir [24]. Birçok varyeteye sahip olan *Ocimum basilicum* L. 2n=48 kromozom sayısına sahip doğal bir tetraploidtir [24]. Toprak üstü organları son derece hoş ve güçlü koku içermektedir. Bitkinin tohumları, kurutulmuş ve taze çiçekli dalları, yaprakları kullanılır. Yaprak ve çiçeklerinde karakteristik aromatik kokuyu oluşturan yağ bezelerine sahiptir [25]. Fesleğen Güney Asya, Afrika, Amerika ve Orta Doğu'nun yerli bitkisidir. Bugün Filipinler'den Afrika'nın yağmur ormanlarına, Tropikal Asya'dan Polonya'ya kadar geniş bir alanda yetiştirilmektedir. Ayrıca bütün Akdeniz ülkeleri ile Türkiye'nin ılıman iklim bölgelerinde yetiştirilmektedir. Türkiye'de ev bahçelerinde ve saksılarda yetiştirilen fesleğen (*Ocimum basilicum* L.)'nin İstanbul, Elâzığ, Mardin, Denizli, Maraş ve Hatay illerinde de seyrek olarak bulunduğu bildirilmektedir [26]. Jansen (1981), Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) bitkisinin gelişiminde ekolojik faktörlerin önemli etkisinin olduğunu, farklı lokasyon ve iklimlerde yetiştirilen aynı genotipe sahip bitkilerin morfolojik ve kimyasal yapılarında büyük farklılıkların olduğunu belirtmiştir [27]. Araştırmacı Hollanda (Wageningen)'da ışık yoğunluğu az olan bir serada yetiştirilen fesleğen bitkisi, Etiyopya'da sıcak iklim koşullarında yetiştirildiğinde morfolojik yapısının iyileştiğini, farklı lokasyonlarda farklı büyüklükte yaprak ve çiçeğe sahip olduğunu gözlemlemiştir.

Menghini ve ark. (1984) İtalya'da yürüttükleri çalışmada; aynı toprak özelliklerine sahip dağ ve ova koşullarında yetiştirilen fesleğenlerin verim ve kalite

özelliklerini belirlemişlerdir. 60x30 cm dikim sıklığında yetiştirilen fesleğenlerde, ova koşullarında üretilenlerin, yüksek alanlarda yetiştirilenlere göre daha fazla taze uçucu yağ oranı ve uçucu yağ verim değerlerine ulaştığı belirlenmiştir [28]. Yapılan çalışmalara göre fesleğenin birçok kanser türünü önleyici etkisi olduğu belirtilmiştir. Yüksek antioksidan içeriği ile hücreleri hücre hasarına karşı korur. Bunun sonucunda cilt kanseri, meme kanseri, ağız kanseri gibi birçok kanser türüne karşı koruma sağladığı belirtilmiştir.

Günümüzde kanser için ciddi araştırmalar yapılmakta ve şu anda çeşitli kanser türleri için geliştirilmiş, sitotoksik veya DNA'ya hasar verici etkiye sahip birçok kanser ilacı bulunmaktadır [29]. Ancak, bu ilaçların doku seçiciliği olmadığından, ilaç sağlam dokulara da ulaşır zarar vermekte ve ciddi yan etkiler oluşturmaktadır. Bu zarardan en çok etkilenen organlar, üreme sistemi organları ile karaciğer ve böbrekler. Kanser araştırmalarının da cevabı aranan başlıca üç temel soru vardır.

- Sağlam hücreler kemeoterapi ilaçların zararlı etkilerinden nasıl korunabilir?
- İlaçların yan etkileri nasıl azaltılabilir?
- En uygun ilaç dozu hasta hücrelere nasıl gönderilebilir?

Bu soruların yanıtının bir kısmı hedef yönlenebilen ilaç taşıma sistemlerinde yatmaktadır. Tümörlü dokuya hedefleme iki metotla yapılmaktadır.

-Pasif Hedefleme: Makromoleküller ilaç etken maddesinin bağlanmasıyla

-Aktif Hedefleme: seçici moleküller kullanılarak

Fesleğen bitkisinin anti-inflamatuvar, antibakteriyel, migren, baş ağrısı etkili olduğu ve aynı zamanda asit ve pepsin sekresyonunu azalttığı gösterilmiştir. Plasebo kontrollü çift kör çalışmada fonksiyonel dispepsili 200 hasta 4 hafta kullanmış ve % 80'inde semptomların iyileştiği gözlenmiştir.

2.2.2 Estragol (EST)

Dünya nüfusunun yaklaşık %70-80'i bitki kaynaklı geleneksel tıp uygulamaları ile tedavi görmektedir. İnsanlar bitki ekstratlarını tedavi amaçlı ilaç, şurup, tablet ve oral

sprey şeklinde stres azaltıcı, yorgunluk ve uykusuzluk giderici ve sinirsel bazı hastalıkların tedavisinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar [30]. Bu ekstraktlardan biri Estragoldur. Uçucu yağlar bitkilerden elde edilir ve kimyasal olarak birçok bileşen içerirler. Bazen bir yağda 100'den fazla bileşen bulunabilmektedir. Her uçucu yağın kendine özgü kokusu ve aromaterapik özellikleri, söz konusu yağı oluşturan bileşenlerin kombinasyonu ve miktarına bağlıdır [31]. Estragol (EST), esas olarak fesleğen bitkisinden izole edilen önemli bir moleküldür. Özcan ve ark tarafından yapılan bir çalışmada fesleğenin çiçek, yaprak ve gövde yağlarının ana bileşenleri sırasıyla uçucu yağ estragol (% 58,26, % 52,60 ve % 15,91) ve limonen (% 19,41, % 13,64 ve % 2.40) ve p-simen (% 0.38, % 2.32 ve % 2.40)'dir [32].

Kan-beyin bariyeri (KBB)'ni geçmek için, moleküller beyin kılcal endotel hücrelerini geçmelidir. Küçük moleküller olan beyin kapiler endotel hücrelerinin plazma membranı boyunca basit difüzyonu lipofilitesine bağlıdır, bu nedenle bu moleküllerin lipofilitesinin artması KBB geçirgenliğini arttırmak için etkili bir stratejidir ve uzun zamandır ilaç endüstrisinde ilaç geliştirme için uygulanmaktadır [33]. Literatürde Estragol'un lipofilitesine ve KBB'ni aşabileceğine değinilmiştir [34,35]. Bu sebeple bu tez kapsamında beyin kanserini hedefleyen bitki kökenli radyoşaretli ajanın KBB'ni geçebilmesi amacıyla fesleğen bitkisinin etken bileşenlerinden biri olan Estragol molekülü seçilmiştir.

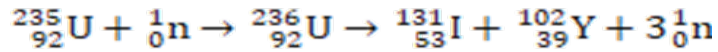
2.3 Radyoşaretli bitki kökenli bileşikler

Son yıllardaki toplumsal eğilim, bitkisel yiyeceklerin artan tüketimi doğrultusunda ilerlemektedir. Gıdalarla alınan doğal antioksidan maddeler, özellikle kalp rahatsızlıklarını ve kansere yakalanma riskini azaltmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda bitkisel kökenli yiyeceklerin tüketilmesi sağlıklı bir yaşam için önemli hale gelmiştir. Bitkisel kökenli bileşikler geleneksel tıpta uzun yıllardır nörolojik hastalıkların tedavisinde kullanılırken, son yıllarda modern tıpta da teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaya başlanmıştır. Nükleer Tıp'ta kullanılan bazı radyonüklidler, kanserli dokular tarafından seçici olan moleküller ile bu dokulara yönlendirilebilirler. Literatürde, belirli organ veya dokulara spesifik bitki kökenli bileşiklerin, uygun radyoizotoplarla işaretlenerek çeşitli kanser türleri üzerinde biyoetkinliklerinin incelendiği birçok bilimsel araştırma mevcuttur. Erken tanı ise organ ve doku görüntüleme ile mümkün olmaktadır.

Görüntüleme ve tedavi aşamalarında, yarılanma süresi, foton salınımı ve enerji kriterlerine uygun olan radyonüklidler kullanılmaktadır. Nükleer görüntüleme radyonüklidleri yarı ömürlerine, fotonların ve enerjilerin salınımına göre seçilmelidir. Bu nedenle, çalışmalar genellikle bitki ekstraktlarından biyoaktif bileşiklerin izolasyonu, ^{131}I , ^{125}I ve $^{99\text{m}}\text{Tc}$ gibi bazı radyoizotoplarla radyoişaretleme, biyolojik aktivitelerini *in vivo* / *in vitro* metotlar kullanarak incelemeye odaklanmıştır. Bu bitkilerin nörolojik hastalıklar açısından da düşük toksik etkileri ve çoklu hedeflenmeleri gibi özelliklere sahip olmaları nedeniyle potansiyel nöroprotektif ajanlar olarak araştırılmaktadır.

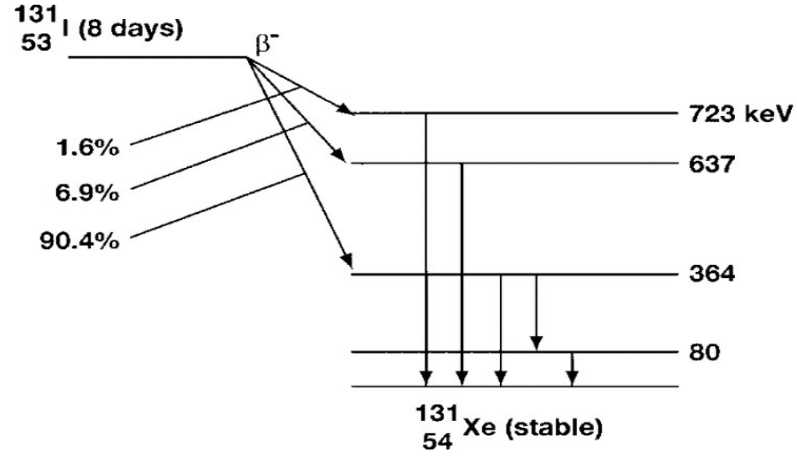
2.4 ^{131}I (İyot-131)

İyot, VIIA (Halojen) grubunda, atom numarası 53 olan metal elementtir ve tek kararlı izotopu ^{127}I 'dir. Birçok izotopa sahip olmasının yanı sıra ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I ve ^{131}I gibi önemli radyoizotoplara sahiptir. ^{131}I radyoizotopunun yarı ömrü 8 gün, foton enerjisi ise 364 keV'dir. Rutin Nükleer Tıp uygulamalarında ^{131}I , kapsül veya sıvı formda oral yolla hastaya verilir [36]. ^{131}I radyoizotopu reaktörde ^{235}U 'in termal nötron ile bombardımanı sonucu fisyon ürünü olarak üretilmektedir. ^{131}I 'in üretimine ilişkin reaksiyon aşağıdaki gibidir:



İşinlenen ^{235}U hedef ürünlerinden sodyum iyodür (Na^{131}I) olarak ayrılır. ^{131}I 'in kimyasal ayrımı, ürünün %18'lik NaOH içerisinde ısıtılarak çözülmesi ve birçok metal iyonlarının hidroksitlerinin soğutularak çökeltilmesi ile gerçekleştirilir. Süpernatant içeren sodyum iyodür, kapalı bir destilasyon sisteminde sülfürik asit ile asitleştirilir, asitle iyodür oksitlenir ve iyot destilasyonla bir NaOH çözeltisinde toplanır [36].

^{131}I radyoizotopu nötron fazlalığı nedeniyle negatif beta bozunumu yapar. Beta ve gama ışınması yaparak iki kademedeki kararlı ^{131}Xe radyoizotopuna dönüşür. ^{131}I 'e ait bozunma şeması ve bozunumun zamana bağlı değişimi Şekil 2.1'de görüldüğü gibidir.



Şekil 2.1 ^{131}I 'in bozunma şeması

2.5 Yaşam Bilimlerinde Teranostik Yaklaşımlar

Klinik çalışmalarda, geniş hasta popülasyonlarındaki genetik değişkenlik nedeniyle ilaç yanıtındaki değişikliklerin üstesinden gelebilmek için çalışmalar yapılmaktadır. Kişiselleştirilmiş tedavi bu sorunu çözebilmek için seçilen mevcut stratejidir. Son birkaç on yıl boyunca, klinik uygulama alışkanlıklarının kişiselleştirilmiş tedaviye dönmesinin için umut verici faydalar sağladığı düşünülmektedir.

2002 yılında “teranostik” Funkhouser tarafından tanımlanmıştır. Yöntem, terapi ve tıbbi görüntülemenin, biyolojik dağılımın doğru gerçekleşebilmesi ve terapötik etkinlikteki istenmeyen değişikliklerin önlenmesi için tek bir “paket” materyale entegrasyon olarak tanımlanmaktadır [37-40]. Nükleer teranostik kavramı ise 75 yıl önce Sam Seidlin, iyot-131'i tanısal görüntüleme, hedef ifadenin doğrulanması ve tiroid kanserinin radyonüklid tedavisi için kullandığında gelişmiştir [41].

2.6 Tez Kapsamındaki Çalışmalarda Kullanılan Metodlar

2.6.1 Ekstraksiyon

Ekstraksiyon, katı karışımlardan veya çözeltilerden bir maddeyi ayırmak için ve/veya çözücü yardımı ile istenmeyen safsızlıkları karışımlardan uzaklaştırmak için yapılan bir işlemdir. Kesintili, sürekli ve kimyasal etkileşmeye dayanan olmak üzere üç çeşit ekstraksiyon çeşidi vardır. Kesintili ekstraksiyon ayırma hunisiyle yapılır. Bu

yöntemde öncelikle sulu çözeltinin hacminin yaklaşık iki katına eşit ayırma hunisi seçilir. Huninin musluğu ve kapağı iyice kapanıp, içine çekilecek çözelti ve yaklaşık üçte biri kadar eter konur. Atmosfer eter buharıyla doyuncaya kadar çalkalama tekrarlanır. Yeterince maddenin eter fazına geçtiği düşünülünce, huni bir halkaya konup bekletilir. Alttan sulu faz ve üstten eterli faz alınır. Sulu faz tekrar ayırma hunisine konularak, taze çözücüyle tekrar işlem tekrarlanır. Sürekli ekstraksiyon ise; organik maddelerin, suda organik çözücülerden daha fazla çözündüklerinde ya da katı bir fazda bulunup organik çözücülerde az çözündüklerinde uygulanır. Organik çözücünün sudan ağır ve hafif olmasına göre iki farklı şekilde gerçekleşir. Sürekli ekstraksiyon düzeneğinde bir soğutucu, sudan ağır ya da hafif ekstraksiyon çözücüsünün bulunduğu balon ve çekilen organik madde çözeltisinin toplandığı balon vardır. Bu yöntemde, ekstraksiyon çözeltisi kaynatılarak, soğutucuda yoğunlaştırılıp, organik maddeyi içeren faz damlalar halinde balona düşürülerek elde edilir. Kimyasal etkileşmeye dayanan ekstraksiyonda ise ekstraksiyondan ayrılacak madde çekme çözeltisi ile kimyasal reaksiyon verir. Bu türünde, karışımlardan bileşikleri ayırmak ya da organik madde içindeki safsızlıkları uzaklaştırmak için uygulanır [42].

2.6.2 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) Yöntemi

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), bir karışım içindeki bileşenleri ayırmak için kullanılan kromatografik bir sistemdir. Çalışma prensibi, bir sütun içindeki katı adsorban maddelerden, sıvı fazın geçirilmesi ve bu şekilde sıvı örneklerin sürüklenmesi şeklindedir. Sürüklenme sırasında, örneğin bileşenleri, katı materyalle etkileşime girerken, etkileşim zayıf ise kolon dışına çıkması kısa sürede, etkileşim güçlü ise uzun sürede olmaktadır. Bu durum sürüklenme farklılıkları yaratarak, kromatogramda farklı pikler elde edilmesini sağlamaktadır [43].

2.6.2.1 Kromatogramlar

Çözünen maddenin bileşimlerine tepki veren algıç, kolon çıkışına yerleştirilip kullanılan mobil faz hacminin veya algıç sinyali zamanın bir fonksiyonu olarak kaydedilirse, çok sayıda pik oluşur ve bu tip grafiğe *kromatogram* denir. Böyle grafikler kantitatif ve kalitatif analiz için kullanılabilir. Numune bileşenlerini tanımadada

zaman eksenindeki pik yerleri (alınma zamanları) kullanılır. Her bir bileşenin miktarının kantitatif ölçüsü olarak bu piklerin alanlarından yararlanılır.

2.6.2.2 Sıvı kromatografi

Sıvı kromatografi (LC), numunede ilgilenilen bileşenin polaritesine ve onların kolon ile etkileşimine dayanarak kromatografi kolonunda karmaşık sıvı karışımlarındaki bileşenleri ayırma yöntemidir. Ek olarak, bu ayırmalar numunenin mobil faz ile sabit fazla etkileşimine bağlı olarak gerçekleştirilir. Karışım ayırımında uygulanan birçok mobil faz ve sabit faz kombinasyonu olunca, bu fazların fiziksel durumuna dayanarak sınıflandırılan bir sürü kromatografi çeşitleri bulunmaktadır. Karışımdaki bileşenlerin her biri mobil fazla yakınlığına göre kolonda ayrılırlar. Eğer bileşenler farklı polaritelere sahip olurlarsa, belirli polariteli mobil faz kolondan geçirilince, bileşenlerin biri diğerlerine göre daha hızlı kolonu terk edecektir. Aynı bileşimin molekülleri genellikle gruplar halinde hareket edeceğinden, bileşikler kolon içinde ayrı bantlara ayrılırlar. Eğer ayrılacak bileşikler renkli olurlarsa, onlara ait olan bantlar görülebilmektedir. Aksi takdirde, yüksek performanslı sıvı kromatografide (HPLC) olduğu gibi, piklerin mevcudiyeti diğer enstrümantal analiz teknikleri, (örneğin; UV-VIS spektroskopisi) ile belirlenmektedir.

2.6.2.3 Normal-Faz kromatografi

Karışım bileşenleri birbirinin polaritesine dayanarak farklı oranlarda uzaklaşırlar. Ayırmak için kullanılan kolon polaritesi mobil faza göre daha büyük ise deneyler normal fazda yapıldığını gösterir. Normal-faz kromatografisinde durgun faz polardır, ayrılmakta olan daha polar çözünen bileşenler durgun adsorban fazında daha fazla bağlı kalacaklar. Çözücü ya da gradiyent çözücüleri kolondan geçirildiğinde, az polar olan bileşenler, daha güçlü polar olanlara göre daha hızlı geçerler. Polaritelerinin artmasının sırasıyla yeterli bir ayrılmanın sağlandığını varsayılarak, bileşenler daha sonra ayrı bir şekilde toplanabilirler. Bu tip kromatografi sıvı-katı kolon kromatografisine benzemez ve çoğunlukla HPLC uygulanırken kullanılır.

2.6.2.4 Ters-Faz kromatografi

Ters-faz kromatografide mobil ve sabit fazların polariteleri uygulanan normal-faz kromatografiye göre tam tersidir. Polar olmayan mobil faz çözücüsünü seçmek yerine polar çözücü tercih edilir. Eğer deneyde çözücü polarite gradiyenti kullanılacaksa, gradiyente önce en çok polar çözücü ile başlanır ve polaritesi düşük çözücü ile gradiyent sonlandırılır. Katı adsorbentler kendileri polar olunca, sabit fazı non-polar olan kolonu elde etmek zordur hem pahalıdır.

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), yüksek hızda ayırmanın yapıldığı LC sistemidir. Bu yöntemin kullanışlı olmasının sebepleri, hassasiyeti, kantitatif analize kolayca uygulanabilmesi, sıcaklıkla kolay bozulan bileşiklerin veya büyük moleküllü bileşiklerin ayrılması sağlamasıdır. Mesela, amino asitler, proteinler, biyojenik aminler, karbonhidratlar, steroidler, pestisitler, antibiyotikler, anorganik bileşikler, metal-organik bileşikler ve ilaçların analizinde kullanılabilir. HPLC’de mobil faz sıvı ve sabit faz ise çok küçük katı taneciklerden oluşur. Uygun akış hızları elde etmek için sıvıya birkaç yüz psi’lik veya daha yüksek bir basınç uygulanması gerekir.

2.6.3 Radyoiyodinasyon

İyot radyoizotoplarının, farklı yöntemler ile farklı oksidasyon seviyelerinde hedef moleküllerle radyoişaretlenmesidir. İşaretleme için genellikle proteinler, nükleik asitler ve hücre yüzeyleri tercih edilmektedir. Radyoişaretleme çalışmalarında iyot radyoizotopları, diğerlerine göre, yaydığı radyasyon tipi ve yarılanma ömürleri nedenleriyle daha uygundur. ^{123}I ’ün yarı ömrü 13 saat, ^{125}I ’in 59,4 gün ve ^{131}I ’in 8 gün olup, görüntüleme ve terapi hedefli çalışmalarda tercih edilmektedirler.

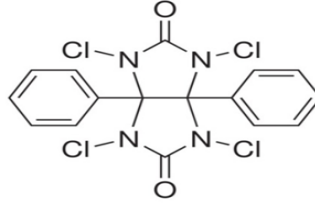
Serbest iyot molekülle bağlanma yeteneğinde değildir. Bunun için iyod’un oksidasyon seviyesinin değişmesi gerekmektedir. Yükseltgenmiş durumdaki iyot birçok moleküle kuvvetle bağlanır. İyot yükseltgenmesi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan iyodojen yöntemidir. Bu yöntemde; cam deney tüpü içine tepkime şartlarına göre ayarlanan miktarda iyodojen (1,3,4,6-tetrachloro-3 α ,6 α -diphenylglycoluril) eklenerek, diklorometan içerisinde çözülür.

Diklorometan'ın tamamen buharlaşması sağlanır ve cam tüp tabanında film tabakası elde edilir. Daha sonra, cam tüp içerisine işaretlenecek madde ve iyot eklenerek inkübasyon sağlanır. İyodojen yöntemi, radyoişaretlenecek maddenin fiziki ve kimyasal deformasyonunu engellediğinden, iyot yükseltgenmesi için en çok tercih edilen yöntemdir [44].

İyodinasyonun elektrofilik ya da nükleofilik sübsitüsyon tepkimeleri ile gerçekleştiği düşünülmektedir. Bir organik molekülde kovalent bağ temel olarak iki farklı yoldan kırılır. Atomlardan birinin ya da bir grubun bağ elektronlarının üzerine alarak, karbon atomunu bağ elektronlarından ayırması sonucu pozitif yüklü karbokasyon oluşur. Karbokasyon, elektron çifti içeren atom veya grup ile etkileşirse nükleofilik tepkimeler gerçekleşir. Atomlardan birinin ya da bir grubun bağ elektronlarını karbon üzerinde bırakması ile negatif yüklü karbanyon oluşur. Karbanyon, elektron eksikliği olan bir atom veya grupla etkileşirse elektrofilik tepkime gerçekleşir.

2.6.3.1 İyodojen Metodu

İyodojen (1,3,4,6-tetrakloro-3 α ,6 α -digenilglükouril) ilk olarak Fraker ve ekibi tarafından ılımlı yükseltgeyici bir ajan olarak ifade edilmiş ve ortaya çıkarılmıştır. Yapıdaki N-kloro bileşiği sulu ortamlarda çözünmeme özelliğine sahiptir, bu nedenle "katı faz" yükseltgeyici ajan olarak kullanılır. İyodojen metodunda, tepkime karışımı basit olarak yükseltgeyici maddeden dekantasyon yolu ile ayrılır. Bu amaçla, bileşik kloroform içerisinde çözülür ve tepkime tüpüne alınır. Daha sonra çözgen madde dikkatli bir biçimde uçurulur ve iyodojen yüzeyde kristal biçiminde toplanır. İyodojen kaplı tüpler daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere desikatörde saklanabilir. İşaretlenecek bileşik ve radyoiyodür karışımı birkaç dakikalığına tepkime tüpünde inkübe edilir. Bu kademedan sonra, karışım iyon değiştirici kolona alınır ve bağlanmamış iyot ayrılır. Bu olay katı fazdaki iyodojenin tepkimesi ile açıklanabilir. İyodojen'in kimyasal yapısı aşağıda verilmiştir. Kolay uygulanabilir olması ve ligand'ın kimyasal yapısını değiştirmemesi ve nedenleriyle sık tercih edilen bir yöntemdir [45].



Şekil 2.2 İyodojen'in kimyasal yapısı

2.6.4 İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) Yöntemi

Radyoişaretli bileşiklerin ayırma işlemlerinde kullanılan TLRC yönteminde sabit faz olarak silikajel veya alümina, hareketli faz olarak nonpolar veya orta polaritedeki çözücüler veya tamponlar kullanılmaktadır. Destek madde olarak alüminyum, cam ya da plastik plakalar kullanılmaktadır. İnce tabaka kromatografisinde örnek sabit faz olan plakanın tabanına damlatılarak, hareketli faz olan çözgenin bulunduğu cam banyo tankına daldırılmaktadır. Plakaların üzerindeki kapiller etkisi sayesinde çözgen plakanın yukarısına sürüklenmektedir. Böylece sabit faz boyunca radyofarmasötik ve radyokimyasal safsızlıklar ayrılmaktadır. Adsorban madde olarak ise selüloz, silikajel gibi katı maddeler tercih edilmektedir. Oto-radyografide, ayrılmış radyoaktif bölgeleri (nokta veya bantları) içeren tabaka direkt olarak kromatogram görüntülerini gösteren bir fotografik film (x-ışınları filmi) içerisine konulur. Kromatogramların kalitatif olarak değerlendirilmeleri farklı optik yoğunluklara sahip, kararmış bölgeler biçiminde görülen radyoaktivite bölgelerini tespit etmek amacıyla, filmin görsel olarak incelenmesiyle gerçekleştirilir. Optik yoğunluk, bölgedeki radyoaktivitenin miktarı ile ilişkilidir, bu yüzden sayım, radyoaktif standartlara maruz bırakılarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi kullanılarak, dansitometre kullanılarak yapılır [46].

Numune kromatogramlarının bilinen referans materyallerin kromatogramları ile karşılaştırılması ile numunenin karakterize edilmesi sağlanır. Kromatogramdaki bileşenlerin ilerleme mesafeleri R_f değeri (alınma faktörü) denilen basit bir parametre ile belirlenebilmektedir. Bu değer bileşenin ilerlediği yolun hareketli fazın ilerlediği yola oranı ile bulunur. R_f değerinin matematiksel olarak ifadesi aşağıdaki eşitlikte verilmiştir.

$$R_f = \frac{\text{Radyokimyasal Bileşenin İlerlediği Uzaklık}}{\text{Çözgenin İlerlediği Uzaklık}}$$

2.6.5 Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi (LC/QTOF/MS)

LC/MS sistemleri, sıvı kromatografinin fiziksel ayırma gücü ile kütle spektrometresinin kütle analiz gücünün kombinasyonundan oluşmuş bir sistemlerdir. QTOF LC/MS sisteminde, fiziksel özelliklerine göre ayrılır, iyonlaştırılarak hem quadropol hem de uçuş zamanlı dedektörler ile çok küçük derişimlerdeki örneklerin bile teşhis ve miktar tayini yapılabilmektedir. Uçuş zamanlı (TOF) kütle spektrometresinde iyonlar elektrik alan tarafından ivmelendirilir ve iyonların dedektöre uçuş süresi ölçülür. Hafif olan iyonlar ağır olan iyonlara göre daha hızlı uçacağı için iyonlar uçuş zamanının bir fonksiyonu olarak ayrılmış olur. TOF-MS ünitesi bileşimlerin elementel formlarını spesifik ve seçicilikle aydınlatır [44].

2.6.6 Stabilite

Radyokimyasal saflık, radyonüklidin bağlı olduğu bileşimin radyoaktivitesinin toplam radyoaktiviteye oranı olarak tanımlanmaktadır. Ortamda istenilen bileşimin dışında oluşan radyoaktif bileşikler veya bağlanmamış olarak bulunan radyonüklidler “Radyokimyasal Safsızlık” olarak nitelendirilmektedir.

Radyokimyasal safsızlıklar radyonüklidin üretimi sırasında, biyoaktif bileşenin sentezi sırasında (reaksiyonun tamamlanmamış olması, yan reaksiyonlar vermesi, çözücü veya safsızlıklarla oluşturduğu reaksiyonlar ve koruyucu grupların tam olarak ortamdaki uzaklaştırılmaması) ve saflaştırmanın tam olarak yapılamamasından kaynaklanmaktadır [47].

Hazırlandığı sırada kimyasal yönden saf olan bir radyofarmasötik dış etkenlere ve zamana bağlı olarak, radyonüklidin bağlı olduğu molekülden ayrılarak veya radyasyonla bozularak ve bunlar yanında pH ve sıcaklık gibi nedenlerle safsızlıklarını yitirmektedirler. Bu olay radyofarmasötiğin kararlılığı ile ilgili bir durumdur. Bu noktada ortaya çıkan radyokimyasal safsızlıklar, hedef organ veya bölgenin dışındaki

yerlere lokalize olarak gereksiz yere verilen bir radyasyon dozuna ve sintigrafik incelemede olası yanılmalara neden olmaktadır.

Yukarıda bahsedilen Radyokimyasal Saflık, Radyonüklid Saflık ve Fizikokimyasal Saflık bileşenlerinin bileşkesi olarak tasarlanan bir radyofarmasötüğün biyolojik bir ortamda süregelen çalışmalar boyunca bozunmadan kendi kimyasal yapısını korumasına “Stabilite (Kararlılık)” denmektedir. Nükleer tıp açısından, ideal bir radyofarmasötüğün hazırlanması ve kullanılması sırasında kimyasal kararlılığını koruması gerekmektedir ve kimyasal kararlılık radyonüklidin bağlandığı ligand ve farmakokinetik değişkenlerine bağımlılık göstermektedir.

2.6.7 Lipofilite

Lipofilite, kimyasal bileşiğin katı yağlar, sıvı yağlar, lipidler gibi apolar çözücüler içinde çözünme yeteneğini ifade etmektedir. Lipofilite diğer bir adı ile ayrılma katsayısı P, iyonize olmayan bir bileşiğin su veya su ile karışmayan türdeki bir yağ çözücünde içerisindeki (genellikle oktanol) bağlı geçirgenliğini ifade eden bir parametredir. P değerleri ilaçların biyolojik ortamlarda kullanılmaları ve farmakolojik etkinliklerinin geliştirilmesi için çok önemlidir. Hidrofilik maddeler suda çözünme eğiliminde iken, lipofilik maddeler yağlarda çözünme eğilimindedir. Lipofilite; $C_{oktanol} / C_{su}$ oranıdır ve bu oranın büyüklüğü, maddenin lipofilik olması ile doğru orantılıdır. Oranlama yapıldıktan sonra bu değer P olarak adlandırılmakta ve bu değer logaritması alınarak lipofilite'nin sembolü (LogP) olarak kullanılmaktadır. Çözelti içerisinde bulunan, iyonize olmayan çözünen madde konsantrasyonlarının logaritması logP olarak ifade edilir. LogP, lipofilitenin ölçüsüdür Lipofilite, aşağıdaki eşitlikte verildiği gibi ifade edilir [48].

$$LogP_{oktanol+su} = Log [C_{oktanol} \div C_{deiyonize su}]$$

2.6.8 Hücre Kültürü Yöntemleri

Hücre kültürü ökaryot canlılardan elde edilen devamlı ve primer olmak üzere optimum koşullarda elde edilen *in vitro* çalışmalardır. Sıklıkla kullanılan hücre hatları insan, hayvanlardan elde edilmektedir. Sadece insan ve hayvanlardan elde edilen

kültürle sınırlı kalmamakla birlikte bitki, mantar, virüs ve protistanalardanda kültür elde edilip uygulama alanına sahiptir [43].

In vivo deneyler yerine öncelikle *in vitro* çalışmalar ucuz, kolay bir şekilde veri edinilmesini sağlamaktadır. Devamlı hücrelerden elde edilen kültür çalışmaları maksimum 30 pasaj sayısına ulaşana kadar çalışmalar gerçekleştirilir. *In vivo* özellik gösteren primer kültür direkt canlı kesilerek çıkarılır ve enzimler yardımıyla tek hücre süspansiyonu halinde ayrışarak çalışma için oluşturulur. Hücre kültürü çalışmaları; kanser araştırmaları, aşı üretimi, genetik analiz, DNA replikasyonları, ilaç geliştirme alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır.

2.6.8.1 Sitotoksosite

Toksosite; bir maddenin organizmanın tamamına zarar verebilme derecesidir. Sitotoksosite; bir maddenin hücreye toksik etki göstermesi, bir organa toksik etki göstermesi ise hepatotoksosite ya da organototoksosite olarak adlandırılmaktadır [42].

2.6.8.2 İnkorporasyon

Hücre kültürü çalışmaları, *in vivo* çalışmalara yol gösterici, ucuz, hızlı sonuç verdiği için aşı üretimi, ilaç çalışmaları, protein sentezi, hormon, enzim üretimi, DNA çalışmaları, metabolizma izlenimi için çok tercih edilen ve sıklıkla kullanılan yöntemdir. İnkorporasyon çalışmalarında doğru hücre hattı seçmek en önemli etkindir. Bu tez çalışmasında tercih edilen SH-SY5Y insan nöroblastoma hücre hattı kültür ortamında hem yüzen hem de yapışan popülasyona sahiptir. Ortam değiştiğinde yüzen hücreler besiyer yardımıyla ortamdan uzaklaşmaktadır. SH-SY5Y hücreleri, nöronal markörler ile karakterize edilen daha olgun bir nöron benzeri fenotip ile ayırt edilebilirler [41]. Yapılan literatür taramaların sonucunda dopaminerjik nöron özelliğine sahip olması etkisiyle çalışmalarda sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir.

3 GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1 Gereç

3.1.1 Kullanılan kimyasallar ve cihazlar

3.1.2 Kullanılan kimyasallar

HPLC mobil fazları için kullanılan çözümler; Asetonitril, metanol, (HPLC gradient grade); *Merck Co.*, Argon (Ar) gazı, Şırınga ucu filtre (0.45 µm, Hidrofilik, Nylon, 33 mm, non steril); *Merck Millex-FH* (Cat.No: SLHV033NK), HPLC vialı (1.5mL Amber Short Thread, 9 mm Thread 11.6*32mm, USP type 1); (Cat.No: V935), HPLC vial kapağı ve septumu (PTFE/White Silicone Septa, 9 mm Blue Short Screw); (Cat.No: SC9291), Kolon (Inertsil ODS-3 5µm 4.6*250 mm); *GL Sciences Inc.* (Cat.No: 5020-01732), ¹³¹I (Ege Üniversitesi Hastanesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Bornova, İzmir), İodojen (Merck), Standart Estragol (Sigma).

75 cm²'lik filtreli kapaklı flasklar; (*corning*), 1,5 mL'lik kriyotüpler; (*ISOLAB*®), 15 ve 50 mL dereceli plastik falkon tüpler; (*BIOFIL*®) 96 kuyucuklu plakalar; (*COSTAR*®), Plastik ve cam pipetler, şişeler, pipet uçları ve eppendorf tüpler; (*COSTAR*®, *eppendorf*®, *BIOFIL*®), Fetal Bovin Serum (FBS); Steril süzölmüş ve hücre kültürü için uygun; *Sigma* (Cat.No: F6178), Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS); MgCl₂ ve CaCl₂ içeren ve steril filterlenmiş hücre kültürü için uygun sıvı tamponlu tuz; *Sigma* (Cat.No: D8662), Penisilin- Streptomisin Çözeltisi; Stabilize edilmiş; Steril filtrelenmiş ve hücre kültürü için uygun solüsyon; *Sigma* (Cat.No: P0781), Tripsin-EDTA (0,25%), Dimetil Sülfoksit (DMSO); *EMPLURA*® (Cat.No: 116743), Deiyonize su, Tripkan mavisi, L-Glutamic Acid, Pharmagrade G5667-100G, Pharmagrade PHG0001-100G, Minimum Essential Medium; *Sigma* (Cat.No: 51412C-1000ML), MTT Formazan tozu; *Sigma* (Cat.No: M2003), Dead End Fluorimetric Tünel System (Promega), Serological pipette 10 mL; *SARSTEDT*, (Cat.No: 86.1254.001), Stragol; *Sigma* (Cat.No: 501-36-0)

3.1.3 Kullanılan Cihazlar

TLRC scanner (Bioscan AR2000, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), HPLC sistemi (Shimadzu, LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörlü) (E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Liyofilizatör (Labconco Free Zone 2.5 770, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), doz kalibratörü (Biodex AtomLab 100 Plus, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Vorteks cihazı (Ika, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), hassas terazi (Ohaus, Pioneer PA214C), Sıvı Sintilasyon dedektörü (Packard Tri-carb-1200, Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı), CO₂ inkübatörü (Sanyo- MCO-20AIC CO₂, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), İnvirt Mikroskop (Leica Dm1l Trinokuler, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Laminar Flow Kabin (Nüve-LN-120, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Soğutmalı santrifüj (Hettich Marka Rotina 38 R Model, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü), Spektrofotometre (Thermo Varioscan, E.Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü).

Ayrıca; fesleğen ekstraktına ait LC/Q-TOF/MS (Sıvı Kromatografisi-Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi) analizi Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGE MATA) tarafından yapılmıştır. ¹²⁷I-EST bileşiğine ait Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) analizi Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji ve Uygulama Merkezi (EBİLTEM) tarafından yapılmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Fesleğen bitkisinin yetiştirilmesi ve fesleğen yapraklarının ekstraksiyonu

Fesleğen bahçede yetiştirilecek ise mayıs ayında, saksıda yetiştirilecekse tohumlarının mart ayında ekilmesi gerekmektedir. Saksıya ekilen fesleğen ortalama 7 gün içinde köklenmeye başlamaktadır. Fesleğenin tek ihtiyacı gün ışığı ve sıcak hava olduğundan mutlaka gün ışığı görmesine dikkat edilmelidir. Fesleğen sık sulama istememekle birlikte hafta da bir kez derinlemesine sulamak yeterli olmaktadır. Kökleri sığ bir bitki olduğundan toprağın yüzeyi kuruduğu zaman sulanabileceği anlamına gelmektedir. Eğer fesleğenin yaprakları sararmaya başlarsa bu durum çok

fazla sulandığını ifade etmekte, kurumaya başlarsa ise sulama miktarının az olduğuna işaret etmektedir. Fesleğen yaprakları, çiçek açana kadar toplanabilmekte, toplarken koparmak yerine üstten dallarının kesilmesi hem daha doğru hem de bir sonraki seferde daha gür çıkmasına sebep olmaktadır.



Şekil 3.1 Saksıda yetiştirilen fesleğen bitkisi.

Bu tez çalışmasında, ticari olarak temin edilen fesleğen bitkisi yukarıda değinilen koşullar dikkate alınarak çoğaltılarak yetiştirilmiş ve fesleğen yaprakları dallarından toplanmıştır. Ardından toplanan yapraklar 37⁰C’de etüvde bekletilerek kurutulmuştur. Kuruyan yapraklar toz haline getirilmiş ve elde edilen toz haldeki fesleğen yaprakları (25 g) 24 saat boyunca 50⁰C’de manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak %80 etanol (250 mL) ortamında ekstrakte edilmiştir. Etanol ekstraksiyonu için Gülçin ve arkadaşlarının uyguladığı yöntem modifiye edilerek kullanılmıştır [11].



Şekil 3.2 Kurutulmuş fesleğen yapraklarının ekstraksiyonu.

Eksraksiyon sonrasında elde edilen fesleğen yaprakları ekstraktı (FYE) katı parçacıkların ortandan uzaklaştırılması amacı ile whatman filtre kâğıdı kullanılarak filtre edilmiştir. Ardından çözügen uzaklaştırılması için liyofilize edilmiştir.

3.2.2 HPLC analizi ve saflaştırma

Liyofilizyon sonrasında toz haldeki fesleğen yaprakları ekstraktının HPLC analizi gerçekleştirilmiştir. HPLC analizleri için uygulanan HPLC koşulları, Tablo 3.1’de verilmiştir.

Analizler sırasında LC-10ATvp quaterner pompalı, SIL-20A HT otomatik örnekleyici, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü SPD-10AVP UV-VIS, RF-10AXL Floresan, SPD-M20A Diode Array, RID-10A Refraktif İndeks ve Raytest radyoaktivite dedektörlerini içeren Shimadzu sistemi kullanılmıştır.

Tablo 3.1 HPLC analizi koşulları

<i>Kolon</i>	<i>Inertsil ODS-3 10- µm C18 (10x250mm I.D) (Saflaştırma kolonu)</i>
<i>Akış hızı</i>	5,0 mL/ dak
<i>Mobil faz</i>	ACN/dH ₂ O (40/60)
<i>Dalga boyu</i>	221 nm
<i>Sıcaklık</i>	25 °C
<i>Enjeksiyon hacmi</i>	500 µL

FYE, HPLC analizleri sırasında ticari olarak temin edilen Estragol analitik standardı (std EST) aynı koşullarda sisteme enjekte edilerek değerlendirilmiş ve FYE için elde edilen kromatogramlarda Estragol (EST)’e ait pik belirlenerek fraksiyonlama kollektörü (FRC-10A) aracılığı ile FYE’ndan izole edilmiştir. İzole edilen Estragol liyofilize edilerek kuru halde -20°C’de muhafaza edilmiştir.

3.2.3 İzole edilen Estragol için LC/Q-TOF/MS analizi

FYE’ndan izole edilen EST’un yapı tayini amacıyla Ege Üniversitesi Merkez Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (EGE MATA)’nde mevcut “Agilent 6550 QTOF LC/MS” cihazı kullanılarak LC/Q-TOF/MS analizi gerçekleştirilmiştir.

Kromatografik ayırım; ikili pompa, gaz giderici, otomatik örnek dağıtıcı ile donatılmış bir HPLC Agilent 1260 Infinity serisi (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Poroshell 120 EC-C18 (3.0x50 mm, parçacık boyutu 2,7 µm) (Agilent) kolonu bileşikleri ayırmak için tercih edilmiştir. Mobil fazlar tabloda verilen basamaklara dayanan gradient yıkama (elution) kullanılarak, su ve %0,1'lik formik asit karışımı mobil faz A ve asetonyril mobil faz B olarak kullanılmıştır. Kolon 35°C 'de tutulmuş, enjekte edilen örnek hacmi 3 µL ve kullanılan akış oranı 0,4 mL/dk olarak belirlenmiştir. Gradient elüsyon şu şekilde gerçekleştirilmiştir: 0. dk %5 B; 7,5. dk %25 B; 15. dk %50 B; 22,5. dk %75 B; 30. dk %5 B; 37,5. dk %5 B ve 2,5 dk şartlanma döngüsü

MS analizi, kurutucu gaz akışı 14,0 L/dk; nebilözör gaz basıncı 35 psi; kurutucu gaz sıcaklığı 290°C; sheath gaz sıcaklığı 400°C; sheath gaz akışı 12 L/dak azotta pozitif iyonda çalışan Agilent Dual Jet Stream elektrosprey iyonizasyon (Dual AJS ESI) ara yüzü ile donatılmış bir Agilent 6550 iFunnel yüksek çözünürlüklü Doğru Kütle QTOF-MS kullanılarak yürütülmüştür. Kütle spektrumları, 50-1800 m/z 'lik bir kütle aralığında negatif ve pozitif iyonizasyon modunda kaydedilmiştir.

3.2.4 Estragol'un radyoiyodinasyonu (¹³¹I-EST)

3.2.4.1 İyodojen hazırlama

250 µg iyodojen (1,3,4,6-tetrachloro-3α,6α-diphenylglycoluril) tartılarak, iyodojen tüpü içerisinde 250 µL diklorometan ile çözülmüş ve diklorometan'ın buharlaşması için oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. İyodojen tüpü inkübasyon sırasında belli aralıklarla çalkalanmıştır. Diklorometan'ın tamamen buharlaşması sonrasında, tüp içerisindeki 250 µg'lık iyodojenin, cam tüp çeperinde bir film tabakası şeklinde kaplanması sağlanmış ve kullanılmaya anına kadar + 4°C'de saklanmıştır.

3.2.4.2 Radyoiyodinasyon

EST (1 mg), etanol (1 mL) içerisinde çözümlenerek stok (1 mg/mL) çözelti oluşturulmuştur. Stoktan 0,03 mL (30 µg) alınıp etanol (160 µL) ile seyretilerek önceden hazırlanan cam iyodojen tüpüne (250 µg) eklenmiştir. Daha sonra üzerine

radioaktivitesi doz kalibratöründe ölçülmüş olan 100 µCi (3,7 MBq) Na¹³¹I eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda ¹³¹I-EST elde edilmiştir.

Kontrol amacıyla hazırlanan cam iyodojen tüpüne 100 µCi (3,7 MBq) Na¹³¹I eklenerek iyotun yükseltgenmesi sağlanmıştır. Oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyon süresi sonucunda yükseltgenmiş iyot (yük. ¹³¹I) formu elde edilmiştir.

3.2.5 ¹³¹I-EST için Kalite Kontrol Analizleri

EST'un radyoiodinasyon tepkimesi sonunda elde edilen ¹³¹I ile işaretli EST'un (¹³¹I-EST) radyoışaretleme veriminin belirlenmesi amacıyla ince tabaka radyokromatografi (TLRC) yöntemi kullanılmıştır. Kalite kontrol analizleri sırasında Na¹³¹I ve aynı reaksiyon koşullarında EST eklenmeden elde edilen yükseltgenmiş iyot (yük. ¹³¹I) kontrol amacıyla kullanılmıştır.

TLRC yönteminin temel iki bileşeni olan sabit ve hareketli (mobil) faz olarak sırasıyla, selüloz TLC tabakaları ve (4:2:1) oranlarında hazırlanan n-butanol/bidistile su/asetik asit karışımı kullanılmıştır. Bu doğrultuda, ¹³¹I-EST'un TLRC analizi sırasında 20 x 20 cm boyutlarındaki 0,1 mm kalınlığındaki selüloz tabakalar, 1,50 x 10 cm'lik tabakalar halinde kesilerek kullanılmıştır. Bu tabakalar başlangıç noktası tabandan 0,50 cm olacak şekilde işaretlenmiş ve bu noktaya otomatik pipet (10 µL'lik) yardımıyla analizi yapılacak örneklerden (Na¹³¹I, yük. ¹³¹I, ¹³¹I-EST) 2'şer µL damlatma yapılmıştır. Örnekler uygulama noktalarına damlatıldıktan sonra her örneğe ait tabaka, hareketli faz olan n-butanol/bidistile su/asetik asit (4:2:1) mobil faz karışımının bulunduğu TLC tanklarının içerisine uygulama noktası mobil faza değmeyecek şekilde yerleştirilmiştir. Mobil faz karışımının TLC tabakalarının üzerinde yaklaşık olarak 8-9 cm kadar ilerlemesinin ardından tabakalar TLC tanklarından çıkartılarak mobil faz sisteminin ilerlediği nokta işaretlenmiş ve oda sıcaklığında kurutulmuştur. Kurutulan TLC tabakaları ölçüm yüzeylerine radyoaktif bulaşın önlenmesi amacıyla yapışkan bant yardımı ile kaplanmıştır.

Ardından, radyoaktivite ölçümüne imkân sunan dedektör sistemini içeren TLC tarayıcı (Bioscan AR2000) cihazında kaplı plakaların ölçümleri sırasıyla alınmış ve

herbir plaka için ayrı ayrı radyokromatogramlar elde edilmiştir. Burada elde edilen radyokromatogramlar aracılığıyla her bir örnek için radyoaktivitenin taşındığı alıkonma faktörü (relatif front; R_f) ve pik alanları elde edilerek radyokimyasal saflık değerlendirilmiş ve radyoiyodinasyon verimi yüzde olarak belirlenmiştir.

3.2.6 Stabilite Çalışmaları

Stabilite herhangi sistemin kararlılığı sürdürme yeteneği olarak ifade edilebilmektedir. Özellikle Nükleer Tıpta, tanı ve tedavi amacıyla kullanılan radyoişaretli bir bileşiğin, kararlı olması ve uygulama süresi boyunca stabilitesini sürdürebilmesi büyük önem taşımaktadır. Hazırlanan bileşiğin uygulama anına kadar kararlılığını koruyamaması durumunda hasta için risk oluşturabilmektedir.

Radyoiyodinasyonun herhangi bir uygulamadan (hastadan) bağımsız olarak zamanla değişiminin izlenmesi amacıyla ¹³¹I-EST için 0., 30., 60., 120., 240., 480. ve 1440. dk'larda TLRC yöntemi kullanılarak stabilite çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.2.7 Lipofilite çalışmaları

Beyine iletimin bir ifadesi olan deneysel logP değeri hesaplamaları için gerçekleştirilen lipofilite çalışmaları kapsamında; santrifüj tüpünde hazırlanan n-oktanol (300 µL) ve pH:7 PBS (300 µL) karışımı üzerine ¹³¹I-EST (100 µL) eklenmiş ve 1 dk vorteks ardından 15 dk santrifüjlenerek (2500 rpm) faz ayrımı sağlanmıştır. Alt (PBS) ve üst (n-oktanol) fazlardan 100'er µL örnekler alınarak Cd(Te) dedektöründe radyoaktivite sayımları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sayımlar (CPS; saniyedeki sayım, count per second) kullanılarak deneysel logP değerleri $\log(\text{Sayım}_{n\text{-oktanol fazı}} / \text{Sayım}_{\text{PBS fazı}})$ formülü ile hesaplanmıştır.

3.2.8 *In vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.2.8.1 Hücre Hatlarının Hazırlanması

Bu tez çalışması kapsamında, radyoişaretli Estragol'un *in vitro* potansiyelinin incelenmesi amacıyla beyin kanser hücreleri DAOY ve U87-MG hücreleri üzerinde hücre kültürü (sitotoksikite ve tutulum) çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

U-87 MG hücreleri dulbecco's modified medium (Eagle), %10 FBS, 1,5 g/L sodyum bikarbonat, 0,1 mM non-esensiyel amino asitler, 2 mM glutamin, 1 mM sodyum piruvat bulunan medyumda, Daoy hücreleri ise minimum essential medium (Eagle), %10 FBS, 1.5 g/L sodyum bikarbonat, 0.1 mM non-esensiyel amino asitler, 2 mM glutamin, 1 mM sodyum piruvat bulunan medyumda üretilmiştir.

Çalışılan hücre hatları kullanılan flaskın yaklaşık %80'ini kaplayacak kadar çoğaltılmıştır. Çoğalan hücreler 0,25 (W/V) tripsin-EDTA solüsyonu ile flask yüzeyinden kaldırılıp, toksisite ve inkorporasyon çalışmaları için uygun kuyucuklara ekilmiştir. Çalışmada kullanılmayacak hücreler ise %5 DMSO içeren medyum içerisine eklenerek önce -80°C'de dondurulup daha sonra 190°C sıvı azot tankına kaldırılmıştır.

3.2.8.2 Sitotoksisite Çalışmaları

EST'un U-87 MG ve Daoy hücre hatları üzerinde sitotoksisite çalışmaları incelenmiştir. Her bir hücre hattı için, 96 kuyucuklu plakalara kuyu başına 5×10^4 hücre/mL olacak şekilde hücreler hazırlanmıştır. 37°C, %5 CO₂ ortamında 1 gün inkübe edilmiştir. EST içeren 6 farklı konsantrasyon (1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM) hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde kuyulara eklenmiştir. Negatif kontrol kuyucuklarına hücre ve madde içermeyen medyum kullanılmıştır. Her bir parametre beş tekrar ile çalışılmıştır. Hücreler 37°C'de %5 CO₂ ortamında inkübe edilmiştir. 24. ve 48. saatte her kuyuya 10 µL MTT solüsyonu eklenip 4 saat inkübe edilmiştir. 570 nm dalga boyunda ve 690 nm referans aralığında spektrofotometre kullanılarak okutulmuştur. Aşağıdaki formülden yararlanılarak % canlılık değerleri hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Ölçülen Absorbans Değeri} / \text{Kontrol Değeri}) \times 100$$

3.2.8.3 İnkorporasyon Çalışmaları

¹³¹I-EST'un U-87 MG ve Daoy hücre hatları üzerindeki bağlanma etkinliğinin incelenmesi için hücreler 24'lük plakalara ekilmiştir. Çalışmada incelenecek zaman parametreleri 60., 120., 240. ve 1440. dk'lar olarak belirlenmiştir. ¹³¹I-EST,

radyoiodinasyon tepkimesi sonunda medyum içerisine alınmıştır. İşaretli örneği içeren besiyer hücrelerin üzerine eklenmeden önce 24'lük plakalarda bulunan ölü hücreleri ortamdan uzaklaştırmak için her bir kuyucuk PBS ile yıkanmıştır. Yıkamanın ardından her bir örnek için hazırlanan plakaların her bir kuyucuğuna 0,5 mL işaretli örnek içeren besiyer ilave edilmiştir.

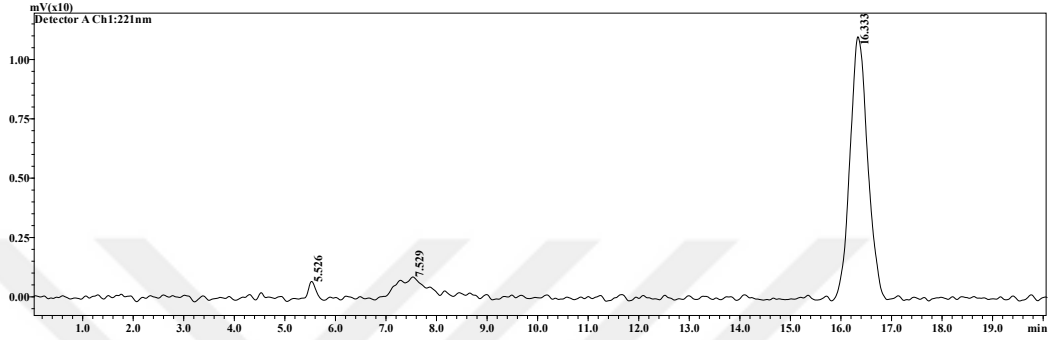
60. dakika, 120. dakika, 240. dakika ve 1440. dk'larda hücreler üzerindeki işaretli besi ortamı atılmış ve PBS ile yıkandıktan sonra her bir göze 200'er μL Ripa tamponu eklenerek, hücrelerin yüzeyden kalkıp çözeltiye karışması sağlanmıştır.

Hücrelerde bulunan aktivite tespiti için örneklerin 100 μL 'si ependorf tüplerine alınmış ve üzerine 0,9 mL sintilatör eklenmiştir. Yapılan her çalışma iki farklı günde, her bir parametre için 3 kuyucukta (n=6) çalışılarak deneylerin tekrarlanabilirliği ortaya koyulmuştur. Aynı protokol Na^{131}I için de uygulanmıştır.

4 ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1 HPLC Analiz Sonuçları

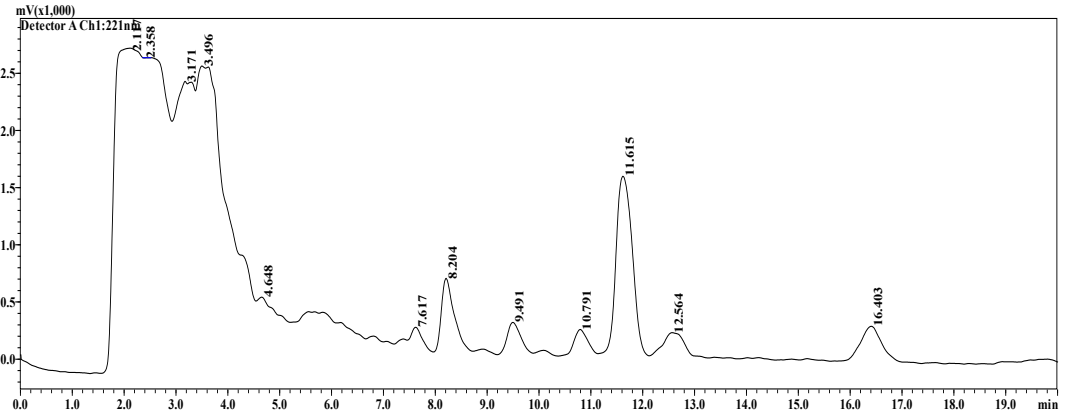
Ticari olarak satın alınan analitik Estragol standardı için Çizelge 3.1’de verilen HPLC koşullarında elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.1’de verilmiştir.



Şekil 4.1 Estragol standardına ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.1 incelendiğinde analitik Estragol standardının 16,33 dk alıkonma süresine (R_t) sahip olduğu görülmüştür.

Fesleğen yaprağından elde edilen FSE için elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.2’de verilmiştir.



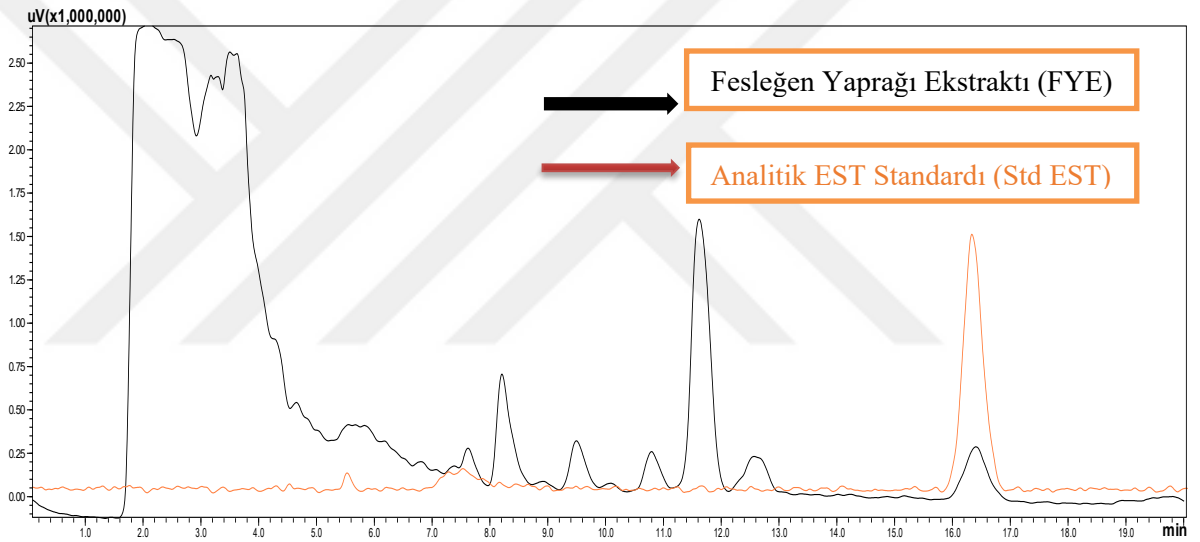
Şekil 4.2 Fesleğen yaprağı ekstraktına (FYE) ait HPLC kromatogramı

Şekil 4.2’de verilen FYE’na ait HPLC kromatogramı incelendiğinde ekstre içerisindeki bileşenlere ait birçok pik görülmektedir, bu piklere ait alıkonma zamanları (R_t) Tablo 4.1 de verilmiştir.

Tablo 4.1 FYE HPLC kromatogramına ait piklerin R_t değerleri.

PİK NO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
R _t (dakika)	2,11	2,36	3,17	3,50	4,65	7,62	8,20	9,49	10,79	11,62	12,56	16,40

FYE'na ait HPLC piklerinden hangisinin EST bileşiğine ait olduğunu tespit etmek için ticari olarak satın alınan analitik EST standardına ait HPLC kromatogramı esas alınmış ve bu kromatogramda alıkonma zamanı 16.40 dk olan 12 numaralı pikinin EST bileşiğine ait olduğu tespit edilmiştir. Saflaştırılan EST bileşiğine ve EST standardına ait HPLC kromatogramları birlikte Şekil 4.3'te verilmiştir.

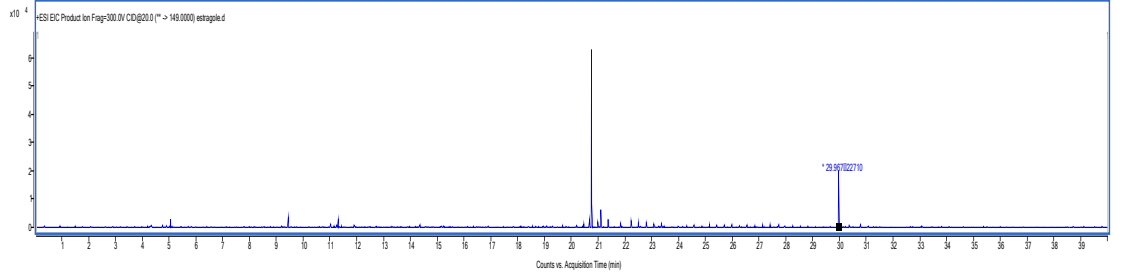


Şekil 4.3 FYE ve std EST HPLC kromatogramları

HPLC analizleri sonunda elde edilen kromatogramlarda 16.40 dk alıkonma zamanına sahip olan pikin, EST bileşiğine ait olduğu belirlenmiştir. Bu pik aynı HPLC koşulları uygulanarak saflaştırılarak izole edilmiştir. FYE ve FYE'ndan izole edilen EST örnekleri için Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Merkezi (Ege MATAL)'nde LC/QTOF/MS analizi gerçekleştirilmiş ve izole edilen EST'un yapı analizi yapılmıştır.

4.2 LC/QTOF/MS Analiz Sonuçları

LC/QTOF/MS ait kromatogramı Şekil 4.4'de verilmiştir.



Şekil 4.4 LC/QTOF/MS kromatogramı

Estragole maddesinin exact mass'ı 148,0888 olarak ölçülmüştür. Pozitif modda M+1 iyonu negatif modda M-1 iyonu aranmıştır. Cihazda bu işlemin adı extracted ion chromatogram olarak geçmektedir. O yüzden kromatogramların üstünde EIC yazar.

Negatif modda 147 m/z iyonu 0,5'inci dk görülen piktir. Numunelerde de aynı yerde pik bulunmaktadır. EIC altında mass spectrumları bulunmaktadır. Burada görülen 146,93 iyonu estragol'ün varlığını göstermektedir.

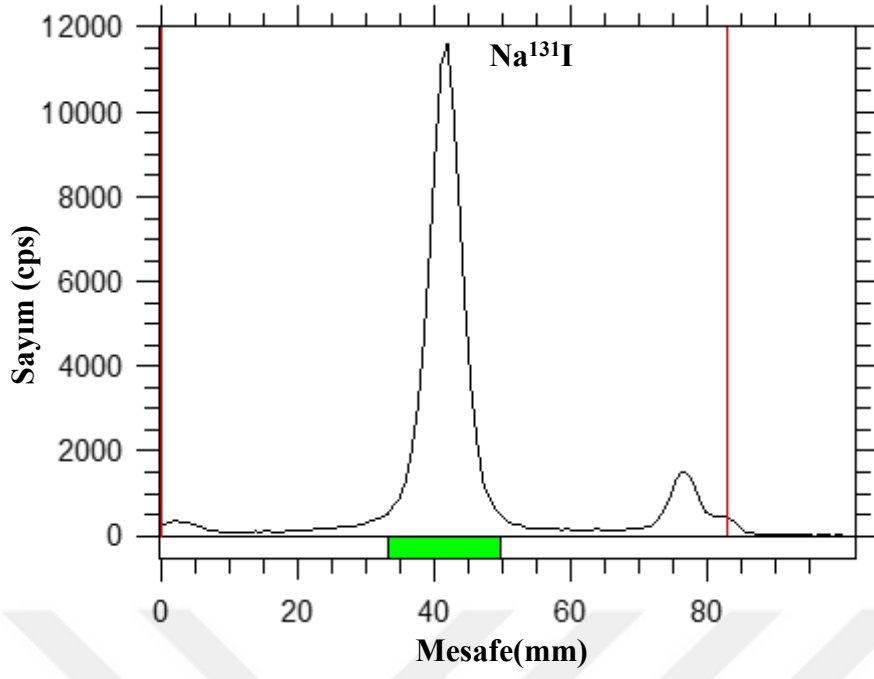
Pozitif modda M+1 iyonu yani 149 extract edilmiştir. Pozitif modda 20,77'de görülen pik estragol pikidir çünkü spektrumda 149 iyonunu çok net olarak görmekteyiz.

4.3 Kalite Kontrol Sonuçları

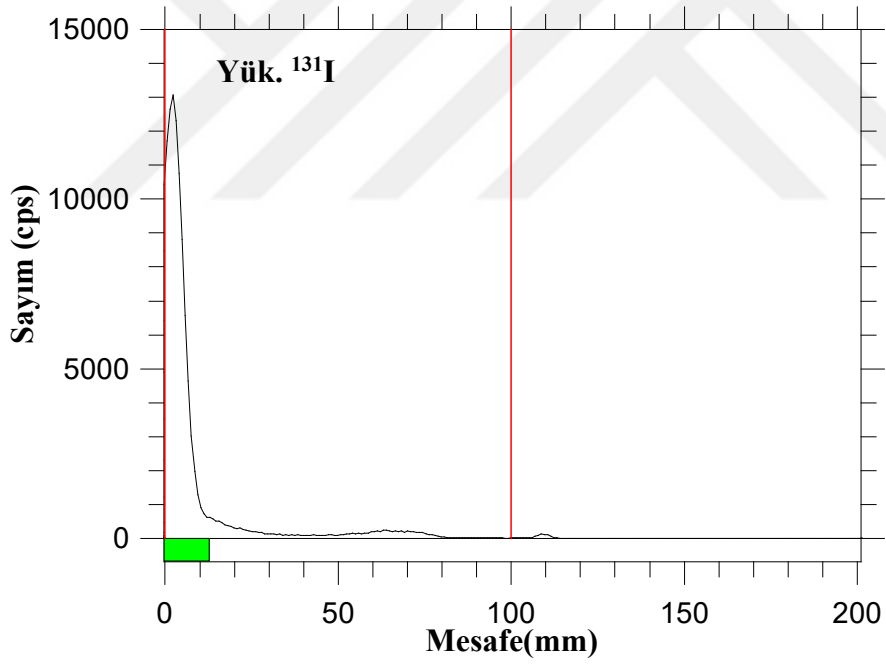
^{131}I -EST'un radyoiyodinasyon veriminin belirlenmesi amacıyla TLRC yöntemi kullanılarak kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirilmiştir. ^{131}I ile radyoşaretli EST'un TLRC analizinde sabit faz olarak selüloz TLC tabakalar ve mobil faz olarak n-butanol/bidistile su/asetik asit (4:2:1) karışımı kullanılmıştır. TLRC analizi sonunda Na^{131}I , yük. ^{131}I ve ^{131}I -EST için Tablo 4.2'de verilen alıkonma faktör (relatif front; R_f)'leri belirlenmiştir.

Tablo 4.2 n-butanol/bidistile su/asetik asit (4:2:1) karışımı hareketli faz ile elde edilen R_f değerleri

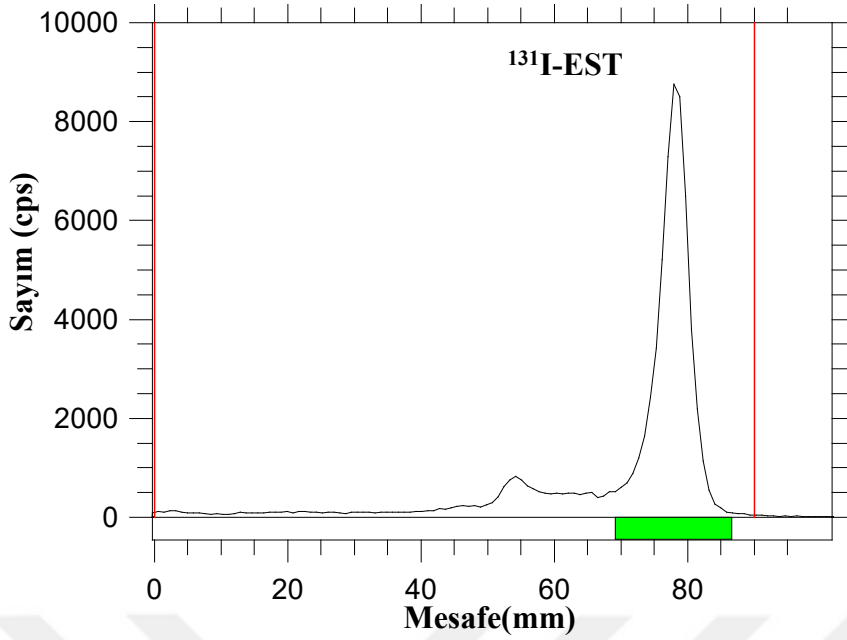
Na^{131}I	Yük. ^{131}I	^{131}I -EST
0,50	0,03	0,86



Şekil 4.5 Na¹³¹I için TLRC kromatogramı



Şekil 4.6 Yük. ¹³¹I için TLRC kromatogramı



Şekil 4.7 ^{131}I -EST için TLRC kromatogramı

Kromatogramlar değerlendirildiğinde Na^{131}I pikinin ($R_f=0,50$) mobil faz ile birlikte TLC tabakasının orta noktasına doğru ilerlediği görülürken (Şekil 4.5), yükseltgenmiş ^{131}I 'in uygulama noktasında kaldığı ($R_f=0,03$) ve tabaka üzerinde ilerlemediği görülmüştür (Şekil 4.6). ^{131}I -EST kromatogramında ise ortamda perteknetat ve yükseltgenmiş ^{131}I pikinin bulunmadığı ve mobil faz ile Na^{131}I göre daha hızlı bir şekilde TLC tabakasının sonuna doğru yürüdüğü ($R_f=0,86$) görülmüştür (Şekil 4.7). Sonuç olarak bu tez çalışmasında uygulanan radyoışaretleme koşullarında ^{131}I -EST için radyoiodinasyon verimi %100 ($n=6$) olarak belirlenmiştir. Böylelikle;

- Kullanılan Na^{131}I radyoaktivitesi ile yükseltgeyici ajan (iyodojen) miktarlarının yeterli olduğu ve ortamda yükseltgenmemiş ^{131}I kalmadığı,
- TLRC için kullanılan sabit ve mobil fazların uygun olduğu,
- EST'un yüksek verimle ^{131}I ile radyoışaretlendiği görülmüştür.

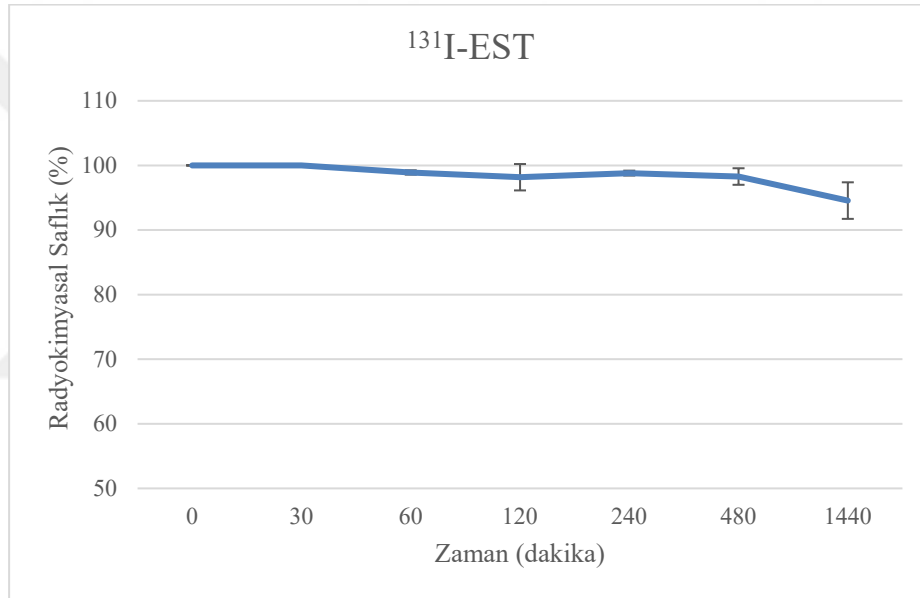
Klinik uygulamalarda kullanılan ^{131}I radyofarmasötiklerinin radyokimyasal saflığının %95 veya üzerinde olması gerektiği bilinmektedir. Dolayısıyla, prelinik çalışmalar kapsamında radyoışaretleme potansiyeli araştırılan ^{131}I ile radyoışaretleli ajanların radyoışaretleme verimlerinin de bu doğrultuda olması beklenmektedir.

4.4 Stabilite Sonuçları

Stabilite, nükleer tıpta görüntüleme ve tedavi yöntemlerinde kullanılan radyonüklid işaretli ajanlar / radyofarmasötikler için hazırlanma ve vücuda verildikten

sonraki dağılım süresini koruması için önemli parametrelerden bir tanesidir [32]. Ayrıca, herhangi bir maddenin kararlılığını sürdürebilme eğilimi stabilite olarak bilinmektedir [33].

Radyoişaretli bileşiğin stabilite çalışmaları kararlılığı sürdürebilme yeteneğini saptamaktadır. Nükleer Tıp'ta görüntüleme amacı ile kullanılan ^{131}I radyonüklidi ile işaretlenen bileşiğin uygulama süresince stabilitesinin sürdürmesi önemlidir. ^{131}I -EST'un kararlılığının incelenmesi amacıyla işaretleme reaksiyonunun tamamlanmasından sonra, oda sıcaklığında gerçekleştirilen 0., 30., 60., 120., 240., 480. ve 1440. dk'lardaki radyokimyasal saflığın zamana bağlı değişimini gösteren grafik Şekil 4.7'de verilmiştir.



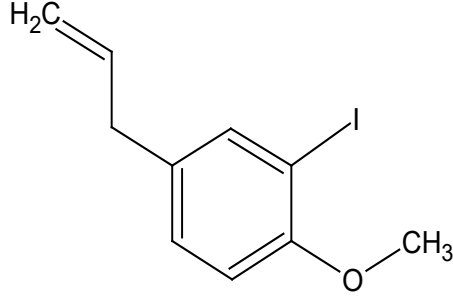
Şekil 4.8 ^{131}I -EST için radyoiodinasyon veriminin zamana göre değişim grafiği

Grafik değerlendirildiğinde, ^{131}I -EST'in 24 saat sonunda yaklaşık %95 olarak kararlılığını koruduğu görülmüştür.

4.5 Lipofilite Sonuçları

^{131}I -EST için elde edilen deneysel lipofilite değeri ($\log P$) $0,62 \pm 0,17$ ($n=6$) olarak hesaplanmıştır. Sonuçlara bakılarak ^{131}I -EST'un lipofilik bir yapısı olduğu anlaşılmıştır. Lipofilik bileşiklerin kan-beyin bariyerini geçebildiği belirtilmektedir. Kan beyin bariyerini geçmek için ideal teorik $\log P$ değeri 0,9 ile 2,5 arasında olmalıdır

[46]. Literatüre göre veriler yorumlandığında teorik olarak ^{131}I -EST'un yaklaşık olarak %95 oranında kan beyin bariyerini aşabileceği öngörülmektedir.



Şekil 4.9 ^{131}I -EST için tahmin edilen moleküler formül yapısı

Tablo 4.3 Teorik ve deneysel LogP değerleri

	Teorik (LogP)	Deneysel
EST	3,15 ± 0,22	-
^{131}I -EST	4,30 ± 0,35	0,62 ± 0,17

4.6 *In Vitro* Çalışmalar

4.6.1 Sitotoksosite

EST için U-87 MG ve Daoy hücreleri üzerinde sitotoksosite çalışmaları MTT kiti kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

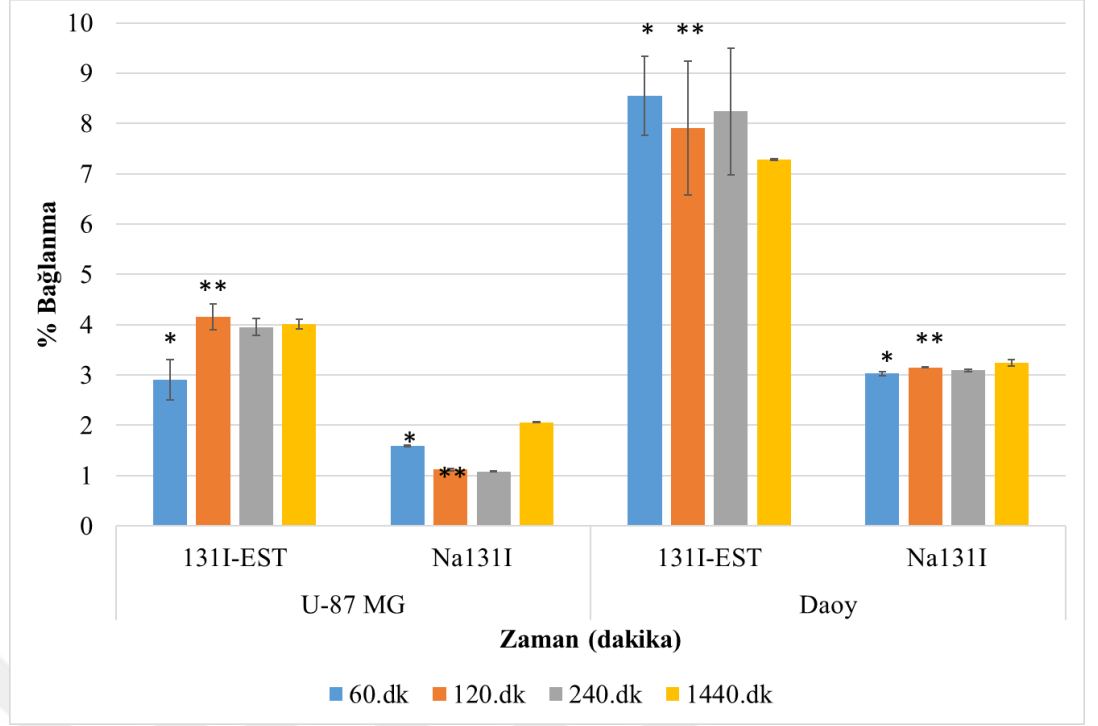
Hücre çoğalmaları devam ettikçe proliferasyon gösterdiği gözlemlenmiştir. Sitotoksosite çalışmaları ile 24. saat sonunda elde edilen canlılık verileri kullanılarak EST için IC₅₀ (µg/mL) değeri U-87 MG ve Daoy hücreleri için sırasıyla 84,69 ± 0,15 ve 25,63±0,17 olarak hesaplanmıştır. Tablo 4.4 incelendiğinde IC₅₀ konsantrasyonlarının her iki hücre hattı için de 48 saat sonunda arttığı görülmektedir.

Tablo 4.4 Sitotoksosite çalışmaları sonunda EST için elde edilen IC₅₀ değerleri

Zaman (Saat)	IC ₅₀ (µM)	
	Hücre Hattı	
	U-87 MG	Daoy
24	84.69 ± 0.15	25.63 ± 0.17
48	344.00 ± 0,11	36.66 ± 16.85

4.6.2 İnkorporasyon

Beyin görüntüleme ajanlarının bulunmasında *in vitro* çalışmalarının önemi ve etkisi önemlidir. Primer memeli nöronların, embriyonik merkezi sinir sistemi dokusundan türetildiği ve olgun nöronlar şeklinde etki göstermelerinden dolayı bu dönüştürülmüş hücre hatları *in vitro* yöntemlerde kullanım tercihi sağlamaktadır. Malign tümörlerinden türetilen hücreler çalışmalarda kullanıldığında çeşitli etkiler göstermektedir ve U-87 MG ile Daoy hücre hatları *in vitro* sistemlere uygunluk göstermektedir. Bu proje kapsamında yapılan *in vitro* çalışmalarda, U-87 MG ve Daoy hücre hatları üzerinde ¹³¹I-EST'un hücrelere tutulumu yüzde bağlanma ile incelenmiştir. Şekil 4.10'da inkorporasyon çalışmaları sonunda elde edilen inkorporasyon grafiği sunulmuştur.



Şekil 4.10 Na¹³¹I ve ¹³¹I-EST'un U-87 MG ve Daoy hücre hatları üzerindeki bağlanma etkinliğinin zamana bağlı değişimi grafiği

Şekil 4.10'daki grafik değerlendirildiğinde her iki hücre hattı içinde Na¹³¹I'in yaklaşık %2-3 oranında tutulduğu gözlenirken, U-87 MG hücre hattında ikinci saat ve sonrasında, ¹³¹I-EST'un yaklaşık 2 katı kadar tutulum gösterdiği görülmektedir. Daoy hücre hattında da daha yüksek değerlere benzer tablo oluşmaktadır. ¹³¹I-EST; Daoy hücrelerinde U-87 MG hücrelerine göre yaklaşık 2 kat bir tutulum sergilemiştir. Daoy hücreleri üzerindeki maksimum ¹³¹I-EST tutulumunun 60. dk başlayarak 4 saate kadar aynı seviyede kalırken 24.saatin sonunda %1-2 seviyelerinde bir düşüş olduğu görülmektedir. İstatistiksel olarak 60. ve 120. dk'lardaki tutulumların anlamlı (* p<0,05 ; ** p<0,01) olduğu hesaplanmıştır (Graphpad Prism 6.0).

Özetle; bu çalışma kapsamında fesleğen yapraklarının etanol ekstrasyonu sonrasında elde edilen ekstraktın HPLC analizi ile ekstrakt içeriğinde tespit edilebilen bileşenlere ait pikler elde edilmiştir. HPLC sistemindeki fraksiyon kollektörü ve analitik EST standardı kullanılarak bu pikler arasından FYE içerisinde bulunan EST saf olarak izole edilmiştir. LC/QTOF/MS analizi ile izole edilen EST bileşiğinin yapı tayini yapılmıştır. EST bileşiğini ¹³¹I ile radyoiyodinasyonu gerçekleştirilmiş ve TLRC

sistemi kullanılarak radyoyodinasyon veriminin %100 olduğu belirlenmiştir. Stabilité çalışması sonucunda ¹³¹I-EST'un 24. saate kadar oldukça kararlı kaldığı (%94,56 ± 2,83) bulunmuştur. ¹³¹I-EST'un lipofilik yapıda olduğu tespit edilmiştir. Sitotoksosite çalışmaları sonucunda EST bileşiminin insan medulloblastoma (Daoy) ve insan glioblastoma-astrocytoma (U-87 MG) hücre hatlarındaki IC₅₀ konsantrasyonlarının 48 saat sonunda; 24 saat sonundaki konsantrasyonlara kıysla U-87 MG hücrelerinde yaklaşık 4 kat, Daoy hücrelerinde ise yaklaşık 1,4 kat artış gösterdiği tespit edilmiştir. ¹³¹I-EST'un U-87 MG hücre hattına kıysla Daoy hücre hatlarında daha fazla oranda tutulum gösterdiği bulunmuştur.

Tüm bu verilerin bir sonucu olarak, tez kapsamında sentezlenen ¹³¹I-EST'un beyin kanseri için tanı ve tedavi potansiyeli açısından önemli bir potansiyele sahip olabileceği düşünülmektedir. *In vitro* hücre kültürü yöntemleri ile temeli atılan bu çalışma *in vivo* olarak deney hayvanları üzerinde yürütülecek ileriki çalışmalar için bir ön basamak niteliğindedir.

5 SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında fesleğen bitkisinin etken maddelerinden biri olan Estragol FYE'ndan izole edilerek nükleer tıpta aynı anda görüntüleme ile tedaviye imkan sunan, ^{131}I radyonüklidi ile radyoiyodinasyonu gerçekleştirilmiştir. Radyoiyodinasyon çalışmasının kalite kontrol çalışmaları TLRC yöntemi ile tamamlanmıştır. Kalite kontrol çalışmalarının sonucunda radyoişaretleme veriminin %95'in üzerinde olduğu belirlenmiştir. ^{131}I -EST için *in vitro* kararlılığın 24 saat boyunca korunduğu, deneysel lipofilité çalışmaları ile radyoişaretle EST'un lipofilik yapıya sahip olduğu belirlenmiştir.

EST'un insan medulloblastoma (Daoy) ve insan glioblastoma-astrocytoma (U-87 MG) hücre hatları üzerinde IC_{50} değerleri belirlenmiştir. ^{131}I -EST için Daoy hücreleri üzerinde hücre tutulumunun Na^{131}I 'e kıyasla 2 kat oranda yüksek olduğu görülmüştür.

Elde edilen bu radyoişaretle bitki kökenli ajanın *in vitro* çalışmaları ile beyin kanseri görüntülenmesinde kullanılma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Söz konusu radyoişaretle ajanın beyin kanseri ve nörolojik hastalıklarda görüntüleme süreçlerin izlenmesine yönelik kullanım potansiyelinin değerlendirilebilmesi amacı ile deney hayvanı modelleri üzerinde *in vivo* çalışmaların planlanması gerekmektedir.

Bu çalışma ile radyoişaretle bitki kökenli ajanların nükleer tıpta nöroonkoloji ve nörodejeneratif hastalıkların tanı ve tedavisine yönelik yeni teranostik ajanlar olarak geliştirilmesi yönünde sınırlı sayıda yapılan çalışmalara katkıda bulunacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Bapat K., Chintalwar G.J., Pandey U., Thakur V.S., Sarma H.D., Samuel G., Pillai M.R.A., Chattopadhyay S., Venkatesh M. Preparation and in vitro evaluation of radioiodinated bakuchiol as an antitumor agent. *Applied Radiation and Isotopes*. 2005, 62, 389–393.
- [2] Biber Muftuler F.Z., Yurt Kilcar A., Unak P. A perspective on plant origin radiolabeled compounds, their biological affinities and interaction between plant extracts with radiopharmaceuticals. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 2015, 306(1): 1–9.
- [3] Blum-Silva C.H., Gobbo Luz A.B., Nascimento M.V.P.S., Campos Facchin B.M., Baratto B., Silvia Fröde T., Pergaud Sandjo L., Monguilhott Dalmarco E., Henrique Reginatto F. Qualitative and quantitative analysis data of the major constituents of *Ilex paraguariensis* leaves by UPLC-PDA and QTOF-MS. *Data Brief*. 2016, 8, 295–299.
- [4] Chen M, Lai L, Li X. Baicalein Attenuates Neurological Deficits and Preserves Blood–Brain Barrier Integrity in a Rat Model of Intracerebral Hemorrhage. *Neurochemical Research*. 2016, 41, 3095–3102.
- [5] Dave G.S., Galvadiya B., Bariya H., Vyas S.R. A dataset of LC-MS QTOF analysis of potato and mustard crop residue smoke water. *Data in Brief*. 2018, 21, 343–350.
- [6] Derviş E. Zonisamid'in Radyoışaretlenmesi ve *in vitro* Potansiyelinin İncelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Bilimler Ana Bilim Dalı, İzmir, 2020, 52 s (Yüksek Lisans Tezi).
- [7] Desai A.G., Qazi G.N., Ganju R., El-Tamer M., Singh J., Saxena A., Bedi Y., Taneja S., Bhat H.K. Medicinal plants and cancer chemoprevention. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9(7): 581–591.
- [8] Freshney, R. I. *Basic Principles of Cell Culture*. Cult. Cells Tissue Eng. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 2002, 1–22 s.
- [9] Gold V. Lipophilic compounds. *Compendium of Chemical Terminology*. 1987, 32(1), 765-771.
- [10] Greenwell M., Rahman P. Medicinal plants: Their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceuticals Sciences Research*. 2015, 6(10), 4103–4112.
- [11] Gülçin I, Elmasta M, Aboul-enein H.Y. Determination of Antioxidant and Radical Scavenging Activity of Basil (*Ocimum basilicum* L . Family Lamiaceae) Assayed by Different Methodologies. 2007, 361, 354–361.
- [12] Hooler, F.J., Skoog, D.A., Crouch S.R. *Enstrümantal Analiz* (E. Kılıç ve H. Yılmaz, Çev.). Ankara, Bilim Yayınevi, 2013, 1037 s.

- [13] Iqbal J., Abbasi B.A., Mahmood T., Kanwal S., Ali B., Shah S.A., Khalil A. T. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 2017, 7(12), 1129–1150.
- [14] Jivad N, Rabiei Z. Review on herbal medicine on brain ischemia and reperfusion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 5, 789–795.
- [15] Jivad N, Rabiei Z. Review on herbal medicine on brain ischemia and reperfusion. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015, 5, 789–795.
- [16] Karatay, K.B. Yer fıstığı filizinden resveratrol bileşiğinin izolasyonu, radyoiodinasyonu ve nöroblastoma hücre hatları üzerinde biyoetkinliğinin incelenmesi. Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Bilimler Ana Bilim Dalı, İzmir, 2019, 47 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [17] Khaki A. Protective Effect of *Ocimum basilicum* on Brain Cells Exposed to Oxidative Damage by Electromagnetic Field in Rat : Ultrastructural Study by Transmission Electron Microscopy. *Crescent Journal of Medicinal Biological Sciences*. 2016, 3, 1–7.
- [18] Kienhuis C.B., Heuvel J.J., Ross H.A., Swinkels L.M., Foekens J.A., Benraad T.J. Six methods for direct radioiodination of mouse epidermal growth factor compared: effect of nonequivalence in binding behavior between labeled and unlabeled ligand. *Clinical Chemistry*. 1991, 37(10), 1749-1755.
- [19] Kočevár N., Glavač I., Kreft S. Flavonoidi lesa in drevesne skorje. *Farmacevtski Vestnik*. 2007, 58(4), 145–148.
- [20] Kovalevich J., Langford D. Considerations For The Use Of SH-SY5Y Neuroblastoma Cells In Neurobiology. *Methods of Molecular Biology*. 2013, 1078, 9-21.
- [21] Levorato S, Dominici L, Fatigoni C. In vitro toxicity evaluation of estragole-containing preparations derived from *Foeniculum vulgare* Mill. (fennel) on HepG2 cells. *Food Chemical Toxicology*. 2018, 111, 616–622.
- [22] March, J. *Advanced Organic Chemistry*. Wiley, New York, 1992, 560 s.
- [23] Máthé Á. Introduction: Utilization/significance of medicinal and aromatic plants. *Medicinal and Aromatic Plants of the World*. 2015, 12(2), 1–12.
- [24] Menghini A, Cenci C.A, Cagiotti M.R, Pagiotti R. Biorhythms and Yields of *Ocimum basilicum* L. In Different Environmental Conditions. *Annali Fac Agr*. 1994, 38, 287-296.
- [25] Metwally A.E, Toivola P., Rashidi M.A., Nooruddin S., Jawed M., Alkanhal R., Razzak H.A., Albawardi N. Epidemiology of Alzheimer's Disease and Dementia in Arab Countries: A Systematic Review. *Behavioural Neurology*. 2019, 5(3), 145-163.

- [26] Mijatović S., Bramanti A., Nicoletti F., Fagone P., Kaluđerović G.N., Maksimović-Ivanić D. Naturally occurring compounds in differentiation based therapy of cancer, *Biotechnology Advances*. 2018, 36(6), 1622–1632.
- [27] Nebi Y. Kan-Beyin bariyerinin fizyopatolojisi. *Van Tıp Dergisi*. 2006, 13(1), 25-27.
- [28] Padhye S., Dandawate P., Yusufi M. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs. *Medicinal Research Reviews*. 2012, 32(6), 1131–58.
- [29] Patel A.C., Matthewson S.R. Radiolabeling of Peptides and Proteins. *Molecular Biomethods Handbook*. 1998, 5(2), 411-411.
- [30] Radhakrishnan D.M., Goyal V. Parkinson's disease: A review. *Neurology of India*. 2018, 66, 26-35.
- [31] Romano B., Pagano E., Montanaro V., Fortunato A.L., Milic N., Borrelli, F. Novel insights into the pharmacology of flavonoids. *Phytotherapy Research*. 2013, 7(11), 1588–1596.
- [32] Özcan M.S., Chalchat J.C. Comparative essential oil composition of flowers, leaves and stems of basil (*Ocimum basilicum* L.) used as herb. *Food Chemistry*. 2008, 110, 501-503.
- [33] Russo M., Spagnuolo C., Tedesco I., Russo G.L. Phytochemicals in cancer prevention and therapy: Truth or dare. *Toxins*. 2010, 2(4), 517–551.
- [34] Saha, G. B. *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, New York, 2010, 410 s.
- [35] Sajja H., East M.P., Mao H., Wang A.Y., Nie S., Yang, L. Development of multifunctional nanoparticles for targeted drug delivery and non-invasive imaging of therapeutic effect. *Current Drug Discovery Technology*. 2009, 6(1), 43-51.
- [36] Schulz V., Hänsel R., Blumenthal M., Tyler V.E. Medicinal plants, phytomedicines, and phytotherapy. *Rational Phytotherapy*. 2004, 3(7), 1–42.
- [37] Seleem D., Pardi V., Murata R.M. Review of flavonoids: A diverse group of natural compounds with anti-candida albicans activity in vitro. *Archives of Oral Biology*. 2017, 76, 76–83.
- [38] Şen M., Ay U., Tüzün E., Küçükali C.İ. The role of dna repair mechanisms in neurodegenerative diseases. *Deneysel Tıp Dergisi*. 2017, 7(13), 47-58.
- [39] Sherma, J. Basic Techniques, Materials and Apparatus, In *Handbook of Thin Layer Chromatography*, New York, Marcel Dekker Inc., 1991, 41 s.
- [40] Sherma J., Larkin J.D., Larkin F.H. Thin Layer radiochromatography, a field guide to instrumentation. *Journal Of AOAC International*. 2009, 92,15-22.
- [41] Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J, Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *NCI Journal of National Cancer Institute*. 1990, 82(13), 1107-1112.

- [42] Stodola, J., Volak, J. The Illustrated Encyclopedia of Herbs Their Medicinal and Culinary Uses (Editor, D. BUNNEY) Herb, Chencellor Press, Michelin House, LONDON. 1998, 168 s.
- [43] Suppakul P. Alternative technique of antimicrobial activity of lipophilic antimicrobial packaging film. *Antimicrobial Food Packaging*. 2016, 5(2), 479-490.
- [44] Theobald, A.E. Radiopharmaceuticals Using Radioactive Compounds in Pharmaceutics and Medicine, England, *Ellis Horwood Limited*; 1998, 231 s.
- [45] Tunç M. Penisilamin ve penisilamin di sülfid'in ^{99m}Tc ile işaretlenmesi, Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Nükleer Bilimler Ana Bilim Dalı, İzmir, 1996, 43 s. (Yüksek Lisans Tezi).
- [46] Vera-Ruiz H., Marcus C.S., Pike V.W., Conen H.H., Fowler J.S., Meyer G. J., Cox P.H., Vaalburg W., Cantineau R., Helu F., Lambrecht R.M. Report of an international atomic energy agency's advisory group meeting on quality control of cyclotron-produced radiopharmaceuticals. *Nuclear Medicinal Biology*. 1990, 17(5), 445-456.
- [47] Xiong Q., Zhang Q., Zhang D., Shi Y., Jiang C., Shi X. Preliminary separation and purification of resveratrol from extract of peanut (*Arachis hypogaea*) sprouts by macroporous adsorption resins. *Food Chemistry*. 2014, 145, 1-7.
- [48] Yıldız G, Çamlıca M, Eratalar SA, Kulak M. Farklı Dozda Kıbele Gübre Uygulamasının Fesleğen (*Ocimum basilicum* L.) Verimine Etkisi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilim Enstitüsü Dergisi*. 2017, 7, 363-370.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mouhaman Toukour DEWA

Doğum Yeri ve Yılı : İDOOL (KAMERUN) ,1991

Medeni Hali : BEKAR

Yabancı Dili : Fransızca, İngilizce

E-posta : mhtdewa@gmail.com

Eğitim Durumu

Lise : Lyceé classique et moderne de Ngaoundere

Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Kimiya Bölümü

Yüksek Lisans : Celal Bayar Üniversitesi, Fizikokimiya Anabilim Dalı

Mesleki Deneyim

Kentçim 2017-2018

Ferçelik Hasır 2018-2019

Acıbadem Atakent Hastanesi 2019-devam ediyor.