

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÜKLEER BİLİMLER ANABİLİM DALI

10.8888.6700.000

(DOKTORA TEZİ)

77386

**BENZODİAZEPİN (DİAZEPAM) VE CYCLOPYRROLONE
(ZOPİCLONE) GRUBU FARMASÖTİKLERİN I-131 İLE
İŞARETLENMESİ**

Fatma Yurt

1998-İZMİR

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ**

III

..FATMA.....YURT.....'unDoktora..... TEZİ olarak
hazırladığı ..Benzodiazepin(Diazepam) ve Cyclopyrrolone....
..(Zepiclone). Grubu.....Farmasetiklerin.....I-İSİ ile.....İşaretleme.....
adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonunda juri tarafından Lisansüstü
Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek
oybarlığı..... ile kabul edilmiştir.

..6/2/1998

Adı soyadı

İmza

Başkan; Prof. Dr. Ali Nuri Bilge
Üye ; Prof. Dr. Perihan Ünak
Üye ; Prof. Dr. Meral ERAL

[Handwritten signatures of Prof. Dr. Ali Nuri Bilge, Prof. Dr. Perihan Ünak, and Prof. Dr. Meral ERAL]

Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
2/3/98 gün ve 9/..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

[Handwritten signature]

Prof. Dr. İsmet ERAL

[Handwritten signature of Prof. Dr. İsmet ERAL]

Prof. Dr. İsmet ERAL

Enstitü Müdürü

IV

ÖZET

BENZODİAZEPİN (DİAZEPAM) VE CYCLOPYRROLONE (ZOPİCLONE) GRUBU FARMASÖTİKLERİN I-131 İLE İŞARETLENMESİ

YURT, Fatma

Doktora Tezi, Nükleer Bilimler

Tez Yöneticisi; Prof. Dr. Perihan ÜNAK

1998, 176 sayfa

Kısa ömürlü radyoizotoplarla işaretli radyofarmasötiklerin Nükleer Tıp'taki kullanımlarının günden güne artması bu radyoizotopların elde edilmesi ve radyofarmasötiklerin hazırlanması ile ilgili diğer disiplinlerin de önemini arttırmıştır. Kuşkusuz Nükleer Tıp'ın gelişmesi bu konu ile ilgili disiplinler olan Radyofarmasi ve Radyokimya'nın da gelişmesine bağlıdır.

Bu çalışmada bu düşünceden hareketle yeni bir radyofarmasötikler grubu olarak benzodiazepin grubundan 1.4 benzodiazepin ailesinin bir üyesi olan ve geniş çapta uyku ilacı olarak kullanılan diazepam, cyclopyrrolone ailesinin yeni bir türevi olan zopiclone (4-metil -1-piperazin karboksilik asit, 6-(5-kloro-2-piridin)-6-7-dihidro 7-okso-5 H-pirrol [3.4-b] pirazin-5 ester) isimli farmasötikler I-131 ile işaretlenmiş ve radyofarmasötik potansiyelleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi ile ilgili olarak CAT ve iodogen yöntemleri denenmiş ve her iki yöntem için de optimum işaretlenme koşulları belirlenmiştir. CAT yöntemi için en uygun koşullar;

diazepam miktarı 1 mg, CAT miktarı 11.2 mg, reaksiyon süresi 30 dakika, reaksiyon sıcaklığı oda sıcaklığı'dır. Bu yöntemle göre elde edilen ^{131}IDZ verimi % 72.5'dir.

İodogen yöntemine göre ise uygun koşullar; diazepam miktarı 1-5 mg, iodogen miktarı 1 mg, reaksiyon süresi 15-20 dakika ve reaksiyon sıcaklığı oda sıcaklığı olarak belirlenmiştir. Asidik şartlarda yapılan işaretlemelerde % 84 işaretleme verimi elde edilirken ticari ampul çözeltisi içindeki nötral şartlarda % 64 işaretlenme verimi elde edilmiştir. Bu şartlarda elde edilen ^{131}IDZ 'in spesifik aktivitesi 0.28 Ci/mmol mertebesindedir.

Zopiclone'nun I-131 ile işaretlenmesinde bu yöntemler başarılı olmamış ve erime noktasında halojen yer değiştirme yöntemi iyi sonuç vermiştir. Bu yöntemde en uygun işaretleme koşulları; zopiclone miktarı 1 mg, reaksiyon sıcaklığı 70-80 °C, reaksiyon süresi 1 saat'dir. Bu koşullarda ^{131}IZP verimi % 96.8 dir. Spesifik aktivite 0.15 Ci/mmol mertebesindedir.

Her iki radyofarmasötüğün lipofilitesini tesbit için n-oktanol/su oranları tayin edilmiş ve ^{131}IDZ için 1.9, ^{131}IZP için 1.6 bulunmuştur. Her iki işaretli bileşiğinde radyofarmasötik potansiyelleri belirlemek için in vivo deneyler yapılmıştır. Sıçanlar üzerinde yapılan biyolojik dağılım çalışmaları ^{131}IDZ 'ın böbrek, karaciğer, akciğer, beyin gibi organlarda ^{131}IZP 'nin ise dalak, kas, akciğer, karaciğer, yağ dokusu, beyin gibi organlarda en çok birikim gösterdiklerini göstermiştir. Gama kamera ile tavşanlar üzerinde yapılan sintigrafik çalışma sonuçları da sıçanlar ile yapılan biyolojik dağılım çalışması sonuçlarını desteklemektedir.

Anahtar sözcükler: Diazepam, Zopiclone, iodogen yöntemi, I-131 ile işaretleme, halojen yer değiştirme yöntemi, CAT yöntemi.

ABSTRACT**LABELING OF BENZODIAZEPINE (DIAZEPAM) AND
CYCLOPYRROLONE (ZOPICLONE)
PHARMACEUTICALS WITH I-131****YURT, Fatma****PhD, in Nuclear Sciences****Supervisor; Prof. Dr. Perihan ÜNAK****1998, 176 pages**

Since usage of radioisotopically labeled radiopharmaceuticals increase day by day, importance of the other disciplines that is related with this area have increased.

Certainly developing of the Nuclear Medicine depends on the Radiopharmacy and Radiochemistry that are the most related disciplines with this scientific area.

In this study, diazepam is a derivative of the 1.4 benzodiazepine family that the most widely used drugs as anticonvulsant agents and zopiclone (4-methyl-1-piperazine carboxylic acid, 6-(5-chloro-2-pyridyl)-6,7-dihydro-7-oxo-5 H- pyrrolo-[3.4-b]-pyrazin 5-yl ester) is a new derivative of the cyclopyrrolone family have been labeled with I-131, as new radiopharmaceuticals and their radiopharmaceutical potentials have been determined.

CAT and iodogen methods have been tried for labeling of diazepam with I-131 and optimum labeling conditions have been determined for both methods. The optimum conditions for CAT

methods; diazepam amount is 1 mg, CAT amount is 11.2 mg, reaction time is 30 minutes, reaction temperature is room temperature. ^{131}IDZ yield is 72.5 % according to this method. The specific activity of labeled compound was 0.28 Ci/mmol level.

The optimum conditions for iodogen method; diazepam amount is 1-5 mg, iodogen amount is 1 mg, reaction time is 15-20 minutes and reaction temperature is room temperature. Eighty-four percent and 64 % labeling yields were obtained for acidic and neutral media respectively. Specific activity of labeled compound was 0.28 Ci/mmol level.

Labeling of zopiclone with I-131 couldn't be succeeded by these methods. For this reason, halogen exchange at melting point method was tried and gave good result. Optimum labeling conditions according to this method; zopiclone amount is 1 mg, reaction temperature is 70-80 °C, reaction time is one hour. Labeling yield is 96.8 %. The specific activity of labeled compound was 0.15 Ci/mmol level.

The ratios of n-octanol/water were determined for both radiopharmaceuticals 1.9 for ^{131}IDZ , 1.6 for ^{131}IZP were found. In vivo experiments have been done to determine radiopharmaceutical potentials of both labeled compounds. Biodistribution studies on rats showed that ^{131}IDZ has accumulated in kidneys, liver, lungs, brain tissues while ^{131}IZP has accumulated in spleen, muscle, lungs, liver, fat tissues and brain tissues.

Scintigraphic results taken with gamma camera on rabbits agree with biodistribution results of rats.

Key words: Diazepam, Zopiclone, iodogen method, labelled with I-131, halogen exchange method, CAT method.

VI

TEŞEKKÜR

Doktora çalışmalarım sırasında derin bilgisini, her türlü destek ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a, sağladığı imkanlardan dolayı Enstitü Müdürü Prof. Dr. Güngör YENER'e, Nükleer Tıp A.B.D Başkanı Prof. Dr. Hayal Özkılıç'a, Dr. Fatoş ULUÇ'a, Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalından Yrd. Doç. Dr. Makbule AŞIKOĞLU'na Toksikoloji Anabilim Dalından Ar. Gör. Seyfi BALCI'ya, İlaç Araştırma Geliştirme ve Farmokinetik Uygulamalar Merkezi'nden Prof. Dr. Işık TUĞLULAR'a, ayrıca zopiclone farmasötigini Eczacıbaşı A.Ş.'den sağlamamıza yardımcı olan Eczacıbaşı Bölge şefi ağabeyim Ahmet YURT'a, Eczacıbaşı A.Ş'e ve desteklerini esirgemeyen annem ve babama, Enstitümüzün tüm çalışanlarına, arkadaşlarıma yardımlarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
TEŞEKKÜR	V
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1.GİRİŞ	1
1.1Benzodiazepin Grubundan; Diazepam'ın Farmakolojik Özellik ve Etkileri	1
1.2 Cycloprrolone Grubundan; Zopiclone'nun Farmakolojik Özellik ve Etkileri	10
2. GENEL BİLGİLER	17
2.1RadyoizotoplarınÜretimi	17
2.2 Radyoaktif İyot İzotopları	22
2.3 Radyoiyotlu Bileşiklerin Başlıca Kullanım Alanları	26
2.3.1 Radyoimmunoassay (RIA)	26
2.3.2 Görüntüleme (Imaging)	27
2.4 Radyoiyodun Çözelti Kimyası	27
2.5 İyot ile İşaretleme Yöntemleri	29
2.6 Radyofarmasötik	38
2.6.1 Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü	41
2.6.2 Kalite Kontrolden Sonra Radyofarmasötiklerde Aranan Özellikler	48
2.6.2.1 pH	48
2.6.2.2 Kimyasal Saflık	49
2.6.2.3 Partikül Büyüklüğü	49

	<u>Sayfa</u>
2.6.2.4 Biyolojik Safılık	50
3. DENEYSEL BÖLÜM	54
3.1 Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar	54
3.2 Kullanılan Yöntemler	55
3.2.1 İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi (Instant Thin- Layer Chromatography)	55
3.2.2 Elektroforez Yöntemi	56
3.3 İodogen Kaplı Tüplerin Hazırlanması	56
3.4 İnaktif Diazepam'ın UV Spektrumları ve UV Spektrofotometrisi Kullanılarak R _f Değerlerinin Tesbiti	57
3.5 İnaktif İyododiazepam'ın Elde Edilmesi	59
3.6 I-131'in ITLC Kromatogramları	60
3.7 Yükseltgenmiş I-131'in Farklı ITLC Ortamlarına Göre R _f Değerlerinin Belirlenmesi	61
3.8 Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesi (Kontrol)	62
3.8.1 % 50 HCl Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesi (Kontrol)	62
3.8.1.1 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesi	64
3.8.2 Ampul Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesi (Kontrol)	67
3.9 Kloramin-T (CAT) Yöntemine Göre Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesi	67
3.9.1 Diazepam'ın CAT Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler	68

	<u>Sayfa</u>
3.9.1.1 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi	68
3.9.1.2 CAT Miktarının İşaretlenme Verimine Etkisi	69
3.9.1.3 Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi	72
3.10 İodogen Yöntemine Göre Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesi	72
3.10.1 Asidik Ortamda iodogen Yönteminin Uygulanması	72
3.10.2 Ampul Ortamında İodogen Yönteminin Uygulanması	74
3.11 Lipofilite Tayini	76
3.12 İn Vivo Çalışmalar	76
3.12.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmaları	76
3.12.2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalar	77
3.13 Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenmesi	78
3.14 İnaktif Zopiclone'nun UV Spektrumu	78
3.15 İnaktif iyodozopiclone'nun Elde Edilmesi	79
3.16 İodogen Yöntemine Göre Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenmesi	80
3.17 Zopiclone'nun Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesi	82
3.17.1 Zopiclone'nun Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler	83
3.17.1.1 Reaksiyon Sıcaklığının İşaretlenme Verimine Etkisi	83
3.17.1.2 Optimum Sıcaklıkta İşaretlenme Veriminin Zamana Göre Değişimi	88
3.18 Oda Sıcaklığında Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenme Veriminin Zamana Göre Değişimi	89
3.19 İn Vivo Çalışmalar	92

	<u>Sayfa</u>
3.19.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmaları	92
3.19.2 Tavşanlar Üzerinde Yapılan Sintigrafik Çalışmalar	92
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	93
4.1 Yükseltgen Ajan Olmadan Kendiliğinden Yükseltgenen I-131'in R _f Değerleri	93
4.2 Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	94
4.2.1 % 50 HCl Ortamında Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesine (Kontrol Deneyleri) İlişkin Sonuçlar	94
4.2.1.1 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	94
4.2.2 Ampul Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesine (Kontrol Deneyleri) İlişkin Sonuçlar	94
4.3 CAT Yöntemine Göre Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	95
4.3.1 CAT Yönteminde I-131 ile İşaretlenmeye Etki Eden Etmenler	96
4.3.1.1 Sıcaklığın Etkisi	96
4.3.1.2 CAT Miktarının Etkisi	96
4.3.1.3. Reaksiyon Süresinin Etkisi	97
4.4 İodogen Yöntemi ile Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	99
4.4.1 % 50 HCl Ortamında Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenme Sonuçları	99
4.4.2 Ampul Ortamındaki İşaretlenme Sonuçları	99

	<u>Sayfa</u>
4.5 İşaretlenen Bileşiklerin Kimyasal Yapılarının Aydınlatılması	101
4.5.1 IR Spektrumları	101
4.5.2 ¹ H NMR Spektrumları	105
4.5.3 Kütle Spektrumları (GC-MS)	109
4.5.4 Erime Noktası Tayini	120
4.6 İn Vivo Çalışmaların Sonuçları	123
4.6.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmalarının Sonuçları	123
4.6.2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	128
4.7 Zopiclone'nun İodogen Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	136
4.8 Zopiclone'nun Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	139
4.8.1 Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Göre İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler	139
4.8.1.1 Sıcaklığın Etkisine İlişkin Sonuçlar	139
4.8.1.2 Reaksiyon Süresinin Etkisi	140
4.9 Oda Sıcaklığında Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar	141
4.10 İşaretli Bileşiğin Kimyasal Yapısının Aydınlatılması	142
4.10.1 IR Spektrumları	142
4.10.2. Kütle Spektrumları	143
4.10.3 Erime Noktasının Tayini	151
4.11 İn Vivo Çalışmaların Sonuçları	153
4.11.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmalarının Sonuçları	153

4.11.2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar	159
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	167
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	171
ÖZGEÇMİŞ	177



VI

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 1.4 Benzodiazepin'in kimyasal formülü.	1
1.2 Diazepam'ın kimyasal formülü.	3
1.3 Cyclopyrrolone'ların genel kimyasal yapısı.	10
1.4 Zopiclone'nun kimyasal formülü.	11
1.5 Zopiclone'nun metabolik bozunum mekanizması.	14
2.1 I-131'in bozunma şeması.	23
2.2 İodogen'in kimyasal formülü.	36
3.1 % 50 HCl ortamdaki diazepam'ın UV spektrumu.	57
3.2 Ampul ortamdaki diazepam'ın UV spektrumu.	58
3.3 % 50 HCl ortamdaki diazepam'ın kromatogramı (ITLC 1).	59
3.4 ¹³¹ I- 'in kromatogramı (ITLC 1).	60
3.5 ¹³¹ I- 'in kromatogramı (ITLC 2).	60
3.6 ¹³¹ I-'in elektroforez diagramı.	61
3.7 Yükseltgenmiş I-131'in kromatogramı (ITLC 1).	61
3.8 Yükseltgenmiş I-131'in kromatogramı (ITLC 2).	62
3.9 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹ IDZ'ın (kontrol) kromatogramı (ITLC 1).	63
3.10 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹ IDZ'ın (kontrol) kromatogramı (ITLC 2).	63
3.11 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹ IDZ'ın (kontrol) elektroforez diagramı.	64
3.12 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹ IDZ'ın (kontrol) kromatogramı (ITLC 1).	65
3.13 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹ IDZ'ın (kontrol) kromatogramı (ITLC2).	65

3.14 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (kontrol) Dowex 1'den sonra kromatogramı (ITLC 1).	65
3.15 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (kontrol) Dowex 1'den sonra kromatogramı (ITLC 2).	66
3.16 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in 20-25 °C'deki kromatogramı (ITLC 1).	67
3.17 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in 20-25 °C'deki kromatogramı (ITLC 2).	68
3.18 :% 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in 50-60 °C'deki kromatogramı (ITLC 1).	69
3.19 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in 50-60 °C'deki kromatogramı (ITLC 2).	69
3.20 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (11.2 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC1).	70
3.21 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (11.2 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 2).	70
3.22 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (22.5 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 1).	71
3.23 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in (22.5 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 2).	71
3.24 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in kromatogramı (ITLC 1).	72
3.25 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in kromatogramı (ITLC 2).	73
3.26 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'in elektroforez diagramı.	73
3.27 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'in kromatogramı (ITLC 1).	74
3.28 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'in kromatogramı (ITLC 2).	74

3.29 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'in elektroforez diagramı.	75
3.30 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'in Dowex 1'den sonra kromatogramı (ITLC 2).	75
3.31 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'in Dowex 1'den sonra elektroforez diagramı.	76
3.32 Zopiclone'nun UV spektrumu.	78
3.33 Propilen glikol ortamında I-131 ile işaretlenmiş zopiclone'nun ITLC 1 kromatogramı.	80
3.34 Dowex 1'den geçirildikten sonra ITLC 1 kromatogramı.	80
3.35 Elüsyonun ITLC 1 kromatogramı.	81
3.36 ^{131}IZP 'nun 45-50 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.	84
3.37 ^{131}IZP 'nun 45-50 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.	84
3.38 ^{131}IZP 'nun 45-50 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.	84
3.39 ^{131}IZP 'nun 70-80 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.	85
3.40 ^{131}IZP 'nun 70-80 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.	85
3.41 ^{131}IZP 'nun 70-80 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.	85
3.42 ^{131}IZP 'nun 90-100 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.	86
3.43 ^{131}IZP 'nun 90-100 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.	86
3.44 ^{131}IZP 'nun 140-150 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.	86
3.45 ^{131}IZP 'nun 140-150 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.	87
3.46 ^{131}IZP 'nun 140-150 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.	87
3.47 ^{131}IZP 'nun 190-200 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.	87
3.48 ^{131}IZP 'nun 190-200 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.	88
3.49 ^{131}IZP 'nun 190-200 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.	88
3.50 Oda sıcaklığında ^{131}IZP 'nun zamana göre değişim grafikleri.	91
4.1 Diazepam'ın IR spektrumu.	102
4.2 Ampul ortamında iyododiazepam'ın IR spektrumu.	102

4.3 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın (kontrol) IR spektrumu.	104
4.4 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın IR spektrumu.	104
4.5 Ampul ortamında iyododiazepam'ın ¹ H NMR spektrumu.	105
4.6 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın (kontrol) ¹ H NMR spektrumu.	107
4.7 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın ¹ H NMR spektrumu.	108
4.8 Diazepam'ın GC-MS spektrumu.	110
4.9 Diazepam'ın A bölünmesi.	111
4.10 a Ampul ortamında iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	112
4.10 b Ampul ortamında iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	113
4.11 a % 50 HCl ortamındaki (kontrol) iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	113
4.11b % 50 HCl ortamındaki (kontrol) iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	114
4.12 a % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	115
4.12 b % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.	116
4.13 ¹³ IHD'ün öngörülen yapısal formülü.	117
4.14 ¹³ IDZ'ın A bölünmesi.	118
4.15 ¹³ IDZ'ın öngörülen yapısal formülü.	119
4.16 a IDZ'ın erime noktası grafiği.	121
4.16 b KKIDZ'ın erime noktası grafiği.	121
4.16 c KIDZ'ın erime noktası grafiği.	122

Sekil

Sayfa

4.17 Organların % aktive/g oranlarının zamana-göre değişimi.	127
4.18 ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 5 dakika sonra gama kamera ile elde edilen postesiror pozisyonunda vücut sintigrafisi.	129
4.19 ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 40 dakika sonra gama kamera ile elde edilen postesiror pozisyonunda vücut sintigrafisi.	130
4.20.a ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 60 dakika sonra gama kamera ile elde edilen genel vücut sintigrafisi.	131
4.20.b ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 60 dakika sonra gama kamera ile elde edilen postesiror pozisyonunda vücut sintigrafisi.	132
4.21 Zopiclone'nun IR spektrumu.	137
4.22 Zopiclone'nun hidroliz ürününün IR spektrumu.	137
4.23 Oda sıcaklığında ^{131}IZP 'nün işaretlenme veriminin zamana göre değişimi.	141
4.24 İyodozopiclone'nun IR spektrumu.	142
4.25 a Zopiclone'nun CI kütle spektrumu.	144
4.25 b Zopiclone'nun EI kütle spektrumu.	145
4.26 Zopiclone'nun A bölünmesi.	146
4.27 a İyodozopiclone'nun CI kütle spektrumu.	148
4.27 b İyodozopiclone'nun EI kütle spektrumu.	149
4. 28 İyodozopiclone'nun A bölünmesi.	150
4.29 ^{131}IZP 'nün öngörülen yapısal formülü.	151
4.30 İyodozopiclone'nun erime noktası grafiği.	152
4.31 Organların % aktivite/g oranlarının zamana göre değişimi.	156
4.32.a ^{131}IZP 'nün tavşana enjeksiyonundan 25 dakika sonra gama kamera ile elde edilen postesiror pozisyonunda vücut sintigrafisi.	160
4.32.b ^{131}IZP 'nün tavşana enjeksiyonundan 5 dakika sonra gama kamera ile elde edilen genel vücut sintigrafisi.	161

- 4.33.a ^{131}I ZP'nun tavşana enjeksiyonundan 90 dakika sonra gama kamera ile elde edilen postesiror pozisyonda vücut sintigrafisi. 162
- 4.33.b ^{131}I ZP'nun tavşana enjeksiyonundan 90 dakika sonra gama kamera ile elde edilen genel vücut sintigrafisi. 163



VII

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Nükleer Tıp'ta Kullanılan Bazı Radyoizotoplar	21
3.1 ^{131}I IDZ ve ^{131}I ile İşaretli Hidroliz Ürünü Bileşiklerinin Farklı ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.	66
3.2 Zopiclone'nun ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.	79
3.3 ^{131}I ZP'nun ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.	83
4.1 $^{131}\text{I}^-$ ve Yükseltgenmiş I-131'e Ait R_f ve % Verim Değerleri.	93
4.2 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın (^{131}I IDZ ve ^{131}I HÜ) Farklı ITLC Ortamlarına Ait % İşaretlenme Verimleri.	95
4.3 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi.	96
4.4 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}I IDZ'ın İşaretlenmesinde CAT Miktarının Etkisi.	97
4.5 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}I IDZ'ın (11.2 mg/ml CAT) Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi.	98
4.6 CAT Yöntemine Ait Optimum Koşullar.	98
4.7 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}I IDZ'ın % İşaretlenme Verimleri.	99
4.8 Ampul Ortamındaki ^{131}I IDZ'ın % İşaretlenme Verimleri.	100
4.9 İodogenli Yöntemine Ait Optimum Koşullar.	101
4.10 IR Spektrum Sonuçları.	103
4.11 ^1H NMR Spektrumlarından Elde Edilen Veriler.	106
4.12 Diazepam'ın Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.	111
4.13 İyododiazepam'ın Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.	118
4.14 Zamana Bağlı Olarak Organlardaki % Aktivite/g Değişimi.	124
4.15 Organların % Aktivite Dağılımlarının Zamana Bağlı Olarak Değişimi.	128

4.16 Zamana Göre ^{131}I DZ'ın Baştaki Piksel Başına Ortalama Sayım /Background Oranı.	133
4.17 IR Spektrum Sonuçları.	138
4.18 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi.	140
4.19 Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi.	140
4.20 Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Ait Optimum Koşullar.	141
4. 21 Zopiclone'nun Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.	146
4.22 İyodozopiclone'nun Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.	150
4.23 Zamana Bağlı Olarak Organlardaki % Aktivite/g Oranı.	157
4.24 Organların % Aktivite Dağılımlarının Zamana Bağlı Olarak Değişimi.	158

VIII

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

Açıklama

^{125}IDZ	I-125 ile işaretli diazepam.
$2'\text{IDZ}$	2' iyododiazepam.
^{131}IDZ	I-131 ile işaretli diazepam.
^{131}IZP	I-131 ile işaretli zopiclone.
ITLC1	n-bütanol- H_2O -asetik asit (4/2/1).
ITLC2	izopropil alkol-n-bütanol-0.2 N NH_4OH .
$^{131}\text{IHÜ}$	I-131 ile işaretli diazepamın hidroliz ürünü.
IDZ	Ampul ortamında sentezlenen iyododiazepam.
KKIDZ	% 50 HCl kontrol ortamında sentezlenen iyododiazepam.
KIDZ	% 50 HCl ortamında sentezlenen iyododiazepam.
Ph	Fenil.

Kısaltmalar

UV	Ultraviolet.
GABA	γ -aminobutyric acid.
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography.
PET	Positron Emission Tomography.
RIA	Radioimmunoassay.
CAT	Chloroamine-T.
ALARA	As Low As Reasonably Achievable.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
ITLC	Instant Thin Layer Chromatography.
R_f	Relative Front.
IR	Infrared.
$^1\text{H NMR}$	Proton Nuclear Magnetic Resonance.

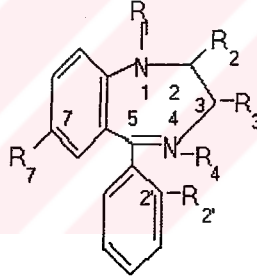
EI	Electron Impact.
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometric.
CI	Chemical Ionization.



1. GİRİŞ

1.1 BENZODİAZEPİN GRUBUNDAN; DİAZEPAM'IN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE ETKİLERİ

Benzodiazepin'ler kas gevşetici, sakinleştirici ve teskin edici ajanlar olarak etki eden ilaçlardır. Şekil 1.1'de kimyasal formülü görülen benzodiazepin klinik tıpta geniş çapta kullanılırken farklı özelliklerinden dolayı bunların türevlerinin biyokimyasal mekanizmaları iyi anlaşılamamaktadır (Tallman et al., 1980).



Şekil 1.1 1.4 Benzodiazepin'in kimyasal formülü.

Benzodiazepin türevleri fonksiyonel gruplara bağlı olarak adlandırılırlar. Klinik uygulamalarda en çok kullanılan türevleri ise diazepam, klorodiazepoxide, oxazepam, klorozepate, flurazepam'dır.

Klorodiazepoxide: Saf klorodiazepoxid'in suda çözünen hidroklorit tuzu klinik kullanım için zayıf bazik madde ile desteklendirilmiştir. Bu ilaç; çözelti halinde ve UV ışınları etkisinde kararsızdır. Bu nedenlerden

ötürü, oral yoldan kullanılacak klorodiazepoxide opak kapsüller içinde paketlenmeli, parenteral enjeksiyon çözeltileri ise taze hazırlanmalı ve hemen kullanılmalıdır. Çoğu uygulamalarda, kandaki konsantrasyon 4 saat içinde maksimuma ulaşır. Böylece oral veya intravenöz dozlar kullanılarak hızlı bir şekilde güvenilir ağrı kesici etkileri oluşturulur. Normal insanlarda yarı-ömrü 6-30 saat arasındadır. Yaşlı kimselerde ve hepatit hastalarında ilaç metabolizmasının çok daha yavaş olması mümkündür. Klorodiazepoxid'in tekrarlanan dozları halinde ilaç ve iki aktif metabolitinin insan vücudunda birikmesi dolayısıyla kümülatif klinik etkiler oluşabilir.

Oxazepam: Oxazepam'ın biyotransformasyonu 3-hidroksidin substitüsyonu ile kolaylaştırılmıştır. İdrardan glukuronid türevi olarak doğrudan bir şekilde dışarı atılmaktadır. Metabolit olmayan ara ürünleri insanda tanımlanmıştır. Hasta kişilerde biyotransformasyon yarı-ömrü 3-21 saat arasındadır. Oxazepam'ın psikofarmakolojik olarak inaktif ürüne nispeten hızlı bir şekilde metabolize olmasından dolayı kronik terapi sırasında kümülatif etkiler diazepam veya klorodiazepoxid'den çok daha az önemlidir.

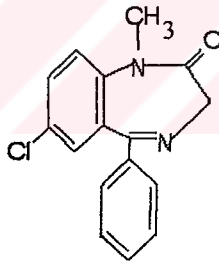
Flurezapam: Flurezapam'ın, oral uygulamalar için suda çözünebilir şekli mevcuttur ve dihidroklorid türevi olarak piyasaya sunulmaktadır. Flurezapam N-1 bulunduran halkanın bozunumuyla çok hızlı bir şekilde metabolize olur. Kronik terapi sırasında veya hatta çok büyük tekli dozlardan sonra kanda dedekte edilebilir. N-1 substitüe olmamış analogu, kanda esas metaboliti 50-100 saatlik yarı-ömür ile yavaş transformasyona uğrar. Bu psikofarmakolojik aktiviteye sahip olan metabolit flurezapam ile kronik tedaviler sırasında kanda birikebilir. Böylece flurezapam terapinin sonlanmasından sonra artık etkileri ile tekrarlanan dozlarla kümülatif klinik etkiler gösterebilir.

Klorazepate: Literatürlerde klorazepate ile ilgili çok fazla kliniksel farmokinetik çalışmalar yoktur. İlaç diazepamın N-1 demetil

analoğunun çok hızlı bir şekilde hidrolizlenmesi sonucu üretilmiştir. Klorazepate ile tedavi sırasında, demetildiazepam'ın insanda yavaş bir şekilde biyotransformasyonundan dolayı uzun süreli ve kümülatif etkileri önceden beklenebilir (Greenblatt et al., 1974; Tallman et al., 1980; Zoghbi et al., 1992).

Diazepam: Açık formülü 7 kloro 1.3 dihidroksi-1-metil-5-fenil-2H- olan bir 1.4 benzodiazepin türevidir. Sarı veya beyaz renkli kristal toz yapısındadır. Erime noktası 133-135 °C molekül ağırlığı 284.74 gr dır. Havada kararlı bir maddedir. Suda çok az, alkol ve kloroformda iyi çözünür.

Diazepam ampul de uygun bir ortamda sterilize edilmiştir. Taşıyıcı çözügen olarak % 5 sodyum benzoat, % 40 propilen glikol, % 10 etil alkol, % 1.5 benzil alkol içerir (USP XXII.NF XVII The Uni. States Pharm. The National Formulay, 1990).



Şekil 1.2 Diazepam'ın kimyasal formülü.

Şekil 1.2'de kimyasal formülü verilen diazepam vücutta yavaş metabolize edilmesi nedeniyle etki süresi uzun olan benzodiazepin türevi bir trankilizan olup insanda 50-100 saatlik yarı ömrü ile uzun etkili bir ilaçtır (Greenblatt et al.; 1974, Kayaalp, 1982). Diazepam insan terapisinde geniş bir şekilde kullanılan bir sakinleştiricidir. Trankilizan

ve santral kas gevşetici etkisine ilave olarak belirgin antikonvülsan etki göstermesi nedeniyle benzodiazepinler arasında en güçlü ilaçtır. Yeni bulunan bir ilaç olan lorazepam hariç, trankilizan etkisi yönünden de en güçlü benzodiazepin türevidir. 5 mg'lık bir dozu trankilizan etki bakımından 10 mg klorodiazepoxide, oxazepam veya medazepam ile eşdeğerdir.

Benzodiazepin'lerin eliminasyon yarılanma ömürleri bireyler arasında geniş ölçüde değişkenlik gösterir. Bunun nedeni kişilerin biyotransformasyon kapasiteleri ve ilaç dağılım hacimleri bakımından farklılık göstermeleridir. Değişkenlikte rol oynayan diğer bir faktör yaştır. Diazepam mide-barsak kanalından hızlı absorbe edildiği için etkisi çabuk başlar. Absorpsiyonu % 75 oranında olur. Karaciğerde kısmen demetilasyona uğrar ve etkin bir metabolit olan demetildiazepam'a dönüşür. Eliminasyonu yavaştır. Her gün aynı dozda devamlı alındığında bir haftada kararlı duruma erişir, etkisi bu süre içinde giderek artar ve sonunda maksimum düzeye ulaşır. Diazepam mide-barsak kanalından hızla absorbe olurken plazma konsantrasyon pikine oral uygulamalarda yaklaşık 30-90 dakika içinde ulaşılır. Kan beyin bariyerini geçer ve düşük plazma konsantrasyonu piki, yüksek lipid çözünürlüğü gibi özelliklerinden dolayı intravenöz uygulamaları kısa süreli anestezi işlemlerde kullanılabilir. Diazepam'ın intravenöz enjeksiyonu dakikada en fazla 5 mg/1 ml ilaç verilecek şekilde yavaş olarak yapılmalıdır. Beyinde hemen etkili olan diazepam doku ve yağ depolarına yeniden dağılıma başlarken başlangıçtaki etkisi hızla azalır. Diazepam geniş bir şekilde karaciğerde demetildiazepam'a metabolize olur. Demetildiazepam'a ilaveten aktif metabolitleri oxazepam ve temazepam'dır. Bu aktif metabolitlerin relatif oranları değişmekle birlikte (Martindale The Extra Pharm. 1989), farede ve gine domuzunda (Bastos, 1990) baskın olan aktif metabolitin N-demetildiazepam; fare ve gerbilde ise oxazepam olduğu rapor edilmiştir. Metabolit ürünleri serbest

veya bileşik yapısında idrardan dışarı atılırlar. Çok geniş bir şekilde plazma proteinine bağlanır. İlaveten kan-beyin bariyerini geçen diazepam ve onun metabolitleri de plasental bariyeli aşar ve göğüs sütü ile bebeğe geçer (Martindale The Extra Pharm. 1989; Kayaalp, 1982).

Benzodiazepin'lerin moleküler etki mekanizmaları ile ilgili olarak değinilmesi gereken konulardan bir diğeri benzodiazepin reseptörleri ile GABA (gama aminobütirik asit) reseptörleri arasındaki ilişkidir. Nöronlarda inhibisyonundan sorumlu iyon olan klorürün geçtiği kanal, tıpkı reseptör molekülü gibi büyük bir makromolekül olarak kabul edilir ve klorür iyonoforu diye adlandırılır. Beyinde benzodiazepin reseptörlerinin dağılımı GABA reseptörlerinininki ile yakın bir korelasyon göstermez, bu nedenle ancak bazı yerlerdeki GABA reseptörlerinin benzodiazepin reseptörleri ile kenetlenmiş olduğu sanılmaktadır. Benzodiazepin reseptörü, GABA reseptörü ve kloro iyonoforu üçlü bir kompleks oluştururlar. Bu komplekse bazı kaynaklarda 'GABA reseptörü regülatör birimi' adı verilmiştir (Kayaalp, 1982).

Radyoreseptör bağlanma deneyleri, benzodiazepin reseptör sisteminin biyolojik, nörolojik, farmakolojik çalışmalarında önemli bir teknik olarak geniş bir şekilde kullanılmaktadır (Saji et al., 1993). Benzodiazepin reseptörlerinin in vivo olarak gösterilebilmesi için bu ligand beyin tarafından hızla tutulmalı ve ayrıca hedef reseptör bu ligandla yüksek bir aktivite ile birleşmelidir. Diazepam gibi 1.4 benzodiazepin bileşikleri, beyin tarafından yüksek ekstraksiyon potansiyeli gösterir (Iıda et al., 1994). Bilindiği gibi radyoaktif işaretli reseptör görüntüleme ajanları, yüksek spesifik aktiviteye sahip ve kastedilen reseptör için spesifik olmalıdır. Radyoaktif işaretli benzodiazepin antagonistleri, insan beyinde benzodiazepin -GABA reseptör yerlerin, miktarını ve in vivo görüntülemeler için faydalıdır. Bu zararsız görüntüleme teknolojisinin epilepsi hastaları için tedavi

planlaması ve diagnosis için de kullanılabileceği ileri sürülmektedir (McBride et al., 1991).

Tallman ve arkadaşlarına (1980) göre; GABA ve benzodiazepin'lerin etkileşimi ile ilgili birkaç mekanizma olduğu ileri sürülmüştür. Laboratuvarda elde edilen elektrofizyolojik çalışmalar da benzodiazepin ve GABA arasında olduğu ileri sürülen sinerjistik ilişkiyi destekler. Benzodiazepin bağlanma yerlerinin çevresi oldukça kompleksdir ve beyin bazı bölgelerinde en aza ulaşır, diazepam açık klor iyonoforu GABA reseptörleri ile birbirlerini etkilerler. Bu girişimlerin bir kısmı doğrudan ve diğerleri fosfolipid sentezi kontrollu membrana-bağlı enzimler ile girişimine bağlı olabilir (Tallman et al., 1980).

Innis ve arkadaşları (1991) tarafından yapılan çalışmada benzodiazepin türevlerinin (^{125}I Ro 16-0154'in, ^3H Ro 15-1788) aynı yerden işaretli olmasına rağmen 37°C 'de iyot- bileşiğinin (Ro 16- 0154) florür içeren (Ro 16-0154) bileşikten beyinde 10 kat daha fazla ilgiye sahip olduğu görülmüştür. Ro 15-1788'in ^{11}C ile işaretli bileşiği insan ve insan olmayan beyindeki benzodiazepin reseptörlerinin dağılım miktarı ve lokalizasyonun tesbiti için başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar sonucunda ^{123}I ile işaretli Ro 16-0154'in insanlarda benzodiazepin reseptörlerinin SPECT ile görüntülemek için faydalı olduğu önerilmiştir. İlaveten iyot ile işaretli bileşik flor ile işaretli bileşikten daha fazla lipofiliteye sahiptir, su ve oktanol arasındaki dağılım katsayısı 2 kat daha büyüktür. (Ro 16-0154)'ın yüksek lipofilitesi onun nadir olarak yüksek beyin alınımından (enjekte edilen dozun % 10) mesul olabilir (Innis et al., 1991).

Benzodiazepin reseptör sisteminin biyokimyasal bütünlüğündeki değişimler psikiyatrik bozukluklar, çeşitli nörolojik gelişmeler ve Huntington ve Alzheimer hastalıkları ve epilepsi'de içine alan gelişmelerle ilişkilidir. PET (Positron Emission Tomography) ve SPECT

(Single Photon Emission Computed Tomography) görüntüleme yöntemleri kullanılarak benzodiazepin reseptörlerinin in vivo görüntülenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmıştır. Böyle çalışmalar için tek radyoligand ile SPECT ve PET yöntemine göre benzodiazepin reseptörlerinin araştırılması ve heriki görüntüleme metodunun doğrudan bir şekilde karşılaştırılması için pozitron ve tek ışın salan radyoizotopların herikisiyle de işaretli ligandın kullanımı faydalı olacaktır. Buna göre Iıda ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada diazepam'ın 2'IDZ (2' iyododiazepam) türevi kimyasal sentez ile hazırlanmış ve N-1 pozisyonundaki metil grubuna C-11 atomu ve 2' pozisyonuna I-123 atomu bağlanmıştır. Bu bileşiğin beyin benzodiazepin reseptörleri için diazepam'dan yaklaşık 9 kat daha büyük ilgiye sahip olduğu gösterilmiştir (Iıda et al., 1994).

PET ve SPECT teknolojisi insan ve insan olmayan (maymun) beyinde çoklu neurotransmitter reseptörlerindeki lokalizasyonu görüntülemeye kullanılmaktadır. SPECT'te nispeten uzun yarı-ömürlü γ -ışını salan radyoizotoplar kullanılır. Bu nedenle kısa ömürlü β^+ salan radyoizotopların üretimi için kullanılması gereken siklotrona ihtiyaç duyulmaz. Bununla beraber SPECT epilepsi hastalarında benzodiazepin reseptörleri için PET ile kaydedilen alımlardaki farklılıkları güvenilir bir şekilde dışarıdan ölçme yeteneğine sahiptir. Böylece beyindeki benzodiazepin reseptörleri için SPECT araştırmalarının geliştirilmesi karşılaştırılabilen PET radyoligandı kadar faydalı olabilecektir (Johnson et al., 1990).

Genel olarak benzodiazepin reseptör denemeleri için ^3H işaretli 1.4. Benzodiazepin'lerden; ^3H Diazepam ve ^3H Flunitrezapam radyoligand olarak kullanılmıştır. Bununla beraber ^3H ile işaretli bileşiklerle çalışmak karmaşık ve zaman alıcıdır, radyoaktivitenin ölçümü için sıvı sintilasyon dedektörü gerekli olduğundan dolayı sistem karmaşıktır. Bunun yanı sıra ^{125}I ile işaretli ligand NaI(Tl) kuyu tipli sintilasyon

dedektöründe daha kolay ve nicel olarak saptanabilir. Ayrıca ^{125}I ile işaretli diazepam'ın ($2'\text{IDZ}$) beyindeki benzodiazepin reseptörlerinin nükleer tıp çalışmaları için *in vivo* görüntüleme ajanı olarak kullanılabileceği önerilmiştir. $2'\text{IDZ}$ 'ın kimyasal sentez yöntemi ile işaretlenme şartlarına pH ve sıcaklık gibi parametrelerin etkisi incelenmiştir. $^3\text{HDiazepam}$ için rapor edilen bulgulara benzer bir şekilde ^{125}I 'in $2'\text{IDZ}$ 'e bağlanması sıcaklığa bağlı olarak düşer. 4-15 °C'de spesifik aktivitenin arttığı ve optimum pH'ın pH= 7-7.4 arasında olduğu ve bunun $^3\text{HDiazepam}$ 'inkine benzediği görülmüştür. Bu çalışmada bu heriki bileşiğin ($^3\text{HDiazepam}$ ve ^{125}IDZ) aynı reseptörlere bağlandığı görülmüştür. Bu sonuçlar ^{125}IDZ 'ın benzodiazepin reseptörlerinin tesbitinde kullanılabileceğini gösterir. Yüksek spesifik aktiviteli radyofarmasötiklerin avantajı küçük doku örneklerin kullanımına ve çok düşük bağlanma düzeylerinin dedeksiyonuna, radyoreseptör deneylerinin yüksek bir şekilde hassasiyetinin gelişmesine izin verir. Saji ve arkadaşları diazepam'ın fenil halkasındaki (C-5) $2'$ pozisyonu iyodinasyon için en iyi pozisyon olduğu ve bu $2'\text{IDZ}$ 'ın ilgisinin diğer iyotlu diazepam türevleri ($3'$ ve $4'$) ile karşılaştırıldığı ifade edilmiştir.

Diazepam türevleri kullanılarak yapılan fare deneylerinde; farenin corticalinde test edilen türevler arasında yalnızca $2'\text{IDZ}$ diğer diazepam türevlerinden 3 kez daha fazla ilgiye sahip olduğu görülmüştür. Kullanılan $2'\text{IDZ}$ 'ın elde edilmesi; Na^{125}I ile diazepam'ın bromlu türevinin Br-I yer değiştirme reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu radyofarmasötiklerin beyinde hızlı ve yüksek alımın gösterdikleri ileri sürülmektedir. Saji ve arkadaşları ^{125}I ile işaretli benzodiazepin'lerin reseptörlerde yüksek ilgiye sahip bileşikler olmaları nedeniyle SPECT çalışmaları için uygun olabileceklerini ileri sürmüşlerdir (Saji et al., 1993).

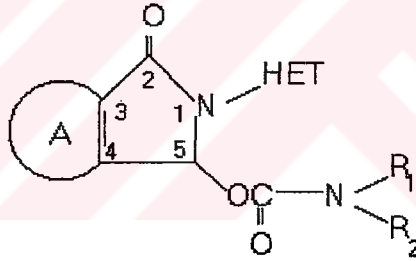
Maziere ve arkadaşları (1980) tarafından yapılan bir çalışmada insan ve hayvanların beyin hücre membranlarında benzodiazepin reseptör yerlerinin tesbiti için C-11 ile işaretli flunitrezepam ve diazepam kullanılmıştır. Bu çalışmada bu benzodiazepin'lerin işaretlenmesi için C-11 radyonüklidi seçilmiştir. C-11 kısa yarı-ömrü'dür ($t_{1/2} = 20.4$ dak.), pozitron ve buradan 511 keV'lik γ anihilation fotonları salarak bozunur. Bu radyoizotopla işaretli radyofarmasötik yüksek spesifik aktiviteye sahiptir, insana güvenilir bir şekilde verilebilir ve PET vasıtasıyla dıştan dedekte edilebilir (Maziere et al., 1980).

Saji ve arkadaşları (1993) ^{125}I ile işaretli diazepamın benzodiazepin reseptör yerlerini görüntülemekte ideal bir radyofarmasötik olduğunu ileri sürmüşlerdir. ^{125}I ile diazepam'ın işaretlenmesinde oldukça karmaşık ve uzun zaman alıcı bir yöntem kullanılmıştır. 2' bromodiazepam sentezlenerek daha sonra ortama Na^{125}I ilave edilmiş ve halojen-yer değiştirme reaksiyonu ile 2-IDZ elde edilmiştir (Saji et al., 1993).

Enstitümüzde yapılan bu çalışmada I-131 kullanılarak diazepam'ın işaretlenmesi, iodogen ile yükseltgeme yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. I-131'in yarı-ömrü 8.04 gün olması nedeniyle I-125'e ($t_{1/2} = 65$ gün) göre daha avantajlıdır. I-131'in bozunumuyla salınan 364 keV'lik γ fotonları SPECT çalışmaları için kullanılabilir.

1.2 CYCLOPRROLONE GRUBUNDAN; ZOPİCLONE'NUN FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ VE ETKİLERİ

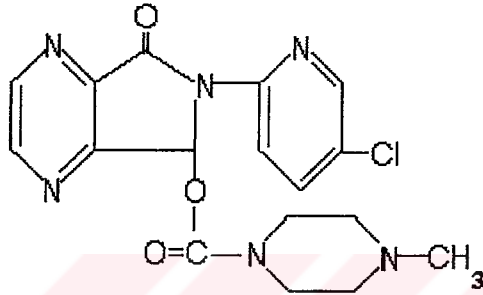
Benzodiazepin'ler dışındaki bileşikler arasında "GABA reseptör-benzodiazepin reseptör-klor kanal kompleksi" ile girişim yapan bileşikler olduğu bulunmuştur, cyclopyrrolone ailesi bu bileşikler arasında özel bir yere sahiptir. İlk olarak Rhone Poulenc firmasında 500 bileşik sentezlenmiş ve cyclopyrrolone ailesinin genel formülü Şekil 1.3'de de görüldüğü gibi karbamik asit tarafından 1-pozisyonundaki heterosiklik ve 5- pozisyonundaki alkol fonksiyonu ile esterleşmiş ve 3-4 pozisyonundaki siklik (benzen çekirdeği veya heterosiklik) ile 2-prolin kondense olmuş durumdadır (Julou, 1985).



Şekil 1.3 Cyclopyrrolone'ların genel kimyasal yapısı.

A (örnekler)	HET (örnekler)
Benzen	Pridin
Pridin	Pridazin
Pirazin	Kinolin
Dihidro dithinin	Naftahidridin

A ve HET gruplarına göre cyclopyrrolone'lar farklı isimler ile adlandırılmaktadırlar. Buna göre zopiclone'nun moleküler formülü Şekil 1.4'de verilmektedir.



Şekil 1.4 Zopiclone'nun kimyasal formülü.

Şekil 1.4'de moleküler yapısı görülen zopiclone'nun 4-metil-1-piperazin karboksilik asit 6 (5-kloro-2-piridin)-6,7-dihidro-7-okso-5-H-pirrol [3,4-b]pirazin-5-ester açık formülü ile bilinir. Moleküler ağırlığı 388.8 g, erime noktası 178 °C'dir. Bir cyclopyrrolone türevidir. Zopiclone benzodiazepin'lerden oldukça farklı bir yapıya sahiptir fakat benzer farmakolojik etkiler gösterir (Vire et al. 1993; Brun, 1988). Zopiclone'nun aktif spektrumu, uyutucu, endişe giderici, sakinleştirici ve kas gevşetici özellikleri ile benzodiazepin'lere benzer. Benzodiazepin reseptörleri omuriliğin merkezi sinir sisteminde keşfedilmiş, lokalizasyonu ve etki mekanizması geniş bir şekilde araştırılmıştır.

Zopiclone uykusuzluğun kısa süreli tedavisinde hipnotik olarak kullanılmaktadır. Genelde 7.5 mg'lık dozlar şeklinde oral olarak kullanılmaktadır. Yetişkinlerde uykusuzluğun kesin tedavisi için genelde kullanılan doz 7.5 mg'dır, büyük dozlar kullanılması halinde hipnotik etki olmaksızın yan etkilerin olmasına sebep olur. Psikiyatri hastaları gibi

bazı tedavi gruplarında zopiclone'nun 10-15 mg kullanılması faydalı olabilir. Klinik çalışmalarda zopiclone'nun kronik uykusuzluğun kısa süreli tedavisinde ve uykusuzluğun tekrar tedavisi için benzodiazepin'ler kadar etkilidir.

İlaç iyi tolere edilebilir ve kısa yarı ömürlü olmasından dolayı 'sabah-sonra' uyuklama ve yorgunluk etkisi uzun etkili hipnotiklerden daha azdır ve minimum kalıcı psikomotor bozukluklara sebep olur.

Zopiclone'nun sakinleştirici, anticonvulsant ve kas gevşetici özellikleri benzodiazepin'lerle karşılaştırıldığında az etkili olmasına rağmen, etkinin kısa sürmesi ve hipnotik olarak daha iyi kullanılabileceği gösterilmiştir (Martindale The Extra Pharm., 1989).

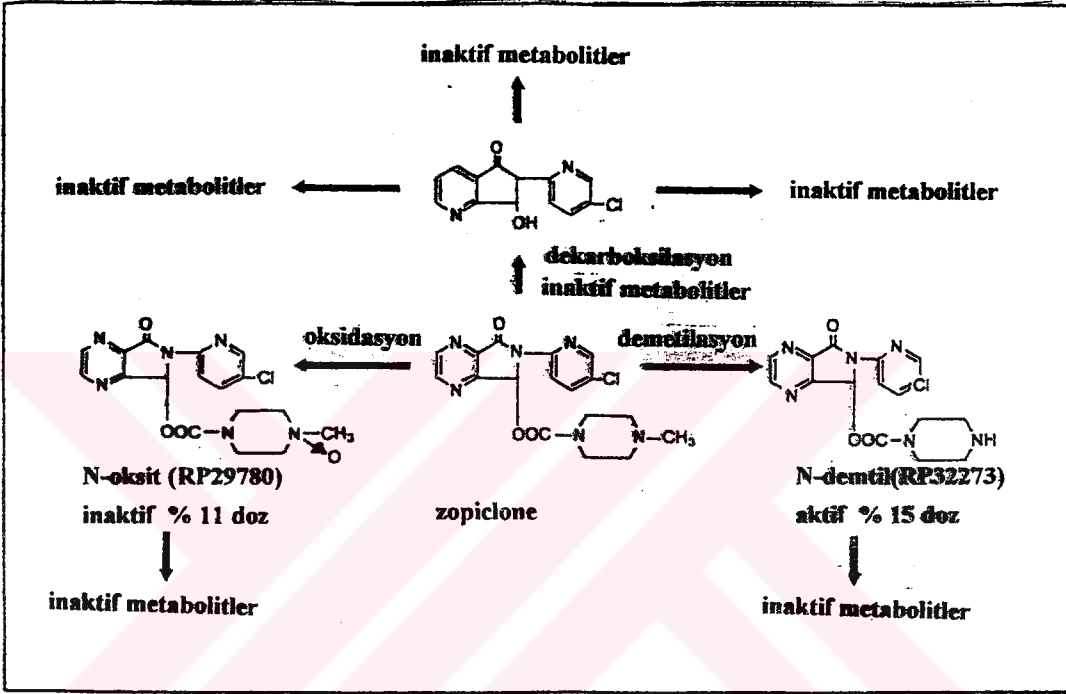
Zopiclone uyutucu bir maddedir. Goa ve arkadaşları (1986) tarafından yapılan çalışmada 5, 7.5, 10 mg oral zopiclone dozları, yetişkin ve ihtiyar hastalar üzerindeki etkilerini incelemiştir (Goa and Heel, 1986). Bunun yanısıra Duriez ve arkadaşları (1979) tarafından yapılan bir çalışmada kronik uykusuzluk hali olan hastalar üzerinde çalışılmıştır. Zopiclone tüm dozlarda ve 10 mg dozdan sonra uyku kalitesi ve uykudan önceki sürenin kısılması nedenleriyle tercih edilir. Uykusuzluk çeken ihtiyar hastalara; 3.75-10 mg arasında zopiclone verilmiş ancak uyutucu etki oluşturan optimum doz olarak 7.5 mg kabul edilmiştir (Duriez et al., 1979).

Zopiclone'nun farmokinetiği şu şekildedir: Oral yolla verilen 7.5 mg zopiclone hızlı bir şekilde absorblanmaktadır. Alındıktan sonra 1 saat içinde % 95'den fazlası absorbe olmuş olması gerektiği Goa ve arkadaşları (1986) tarafından ifade edilmiştir. Diğer taraftan Gaillet ve arkadaşları (1983) tarafından yapılan bir çalışmada kadın ve erkekler arasında absorbsiyonda farklılıklar olduğu bulunmuştur. Benzer bir şekilde yaşlı gönüllülerde (65-85 yaşlar) görülen absorbsiyon oranı ve zamana bağlı olarak konsantrasyon değerinin değişimi gençlerin ki (20-25 yaş) ile karşılaştırılabilir değerde olduğu ifade edilmektedir.

Zopiclone'nun intervenöz alınımı, oral alınıma göre oranı daha hızlıdır. İnsanda; 'ilk geçiş' etkinin yaklaşık % 80'i gibi önemli bir değer olduğu ileri sürülürken, ilk geçiş etkisi oral kullanımlarda % 65 olarak kaydedilmiştir.

Zopiclone'nun intravenöz uygulamalarında vücut içindeki dağılımı incelenmiş; vücut dokularında hızlı bir şekilde dağıldığı görülmüştür. Zopiclone'nun artan oral dozları ve intravenöz dozları, 16 sağlıklı insanda incelenmiş; zopiclone'nun dağılım hacmi yaklaşık 100 L ve ilacın % 45 oranında plazma proteinine bağlandığı tespit edilmiştir (Goa and Heel, 1986; Gaillot et al., 1983).

Zopiclone'nun insanda plazma kinetiği iki kısma ayrılan açık model ile iyi bir şekilde tanımlanmıştır, terminal yarı-ömrü 4-5 saat, toplam vücut temizlenmesi uzun (300 ml/dakika), böbrekler ile temizlenme çok yavaş (10 ml/dakika) dır. Doz ve konsantrasyon arasındaki ilişki; dozlar ve değişmeyen bileşiğin, önemli metabolitlerin idrarda temizlenmesi tüm örnekler (tavşan hariç) için lineerdir. Önemli metabolit bozunmalar (fare ve köpeklerde) dozun % 50'sinden çoğu dekarboksilasyon, idrarda (insanda) N-demetil ve N-oksit türevleri oluşumuna sebep olan N-demetilasyon ve N-oksidasyon etkisi % 30'dan fazlasını içerir. Metabolizmanın şiddetine bağlı olarak, dozun yalnızca % 7-10'u değişmeyen bileşikler olarak idrarda tesbit edilmektedirler. Çocuklu annelerde zopiclone'nun süt ve plazma kinetiği ise; süt/plazmadaki oranı 0.80 oranındadır. Karaciğer ve böbrek hastalarında farmokinetik parametrelerin düzensiz veya çok yavaş olduğu görülürken gönüllü insanlarda zopiclone'nun plazma yarı-ömrü yaş ile artmaktadır (Gaillot et al., 1983).



Şekil 1.5 Zopiclone'nun metabolik bozunum mekanizması.

Goa ve arkadaşları (1986) ise zopiclone'nun üç temel yolla geniş bir şekilde metabolize olduğunu ve alınan dozun yalnızca % 4-5'i idrarla değişmeden atıldığını öne sürmüşlerdir. Metabolizma üç basamakta gerçekleşmektedir:

- 1) Oksidasyon basamağı: Yan zincir Şekil 1.5'de moleküler yapısı görülen az aktif olan N-oksit türevine dönüşür (dozun %11).
- 2) Demetilasyon basamağı: İnaktif N-demetil zopiclone'na dönüşür. Dozun % 15'i böbreklerden dışarı atılır.
- 3) Dekarboksilasyon basamağı: % 50'si de dekarboksilasyon yoluyla inaktif metabolite dönüşen kısmı CO₂ olarak akciğer yoluyla elimine olur.

Zopiclone % 100 olarak 24-48 saat içinde 2 esas metabolizma ile elimine edilmektedir. Tekli doz verilen hastalarda inaktif N-demetil zopiclone için 7-11 saat, aktif N-oksit metabolite ve zopiclone'nun eliminasyon yarı ömrü 3.5 ve 6 saat arasındadır. Zopiclone'nun çoklu dozu verilen gönüllü hastalarda elde edilen datalar 6.5 saatlik eliminasyon yarı-ömrü olduğunu saptamışlardır. İntravenöz uygulamadan sonra zopiclone 5 saatlik eliminasyon yarı-ömrü ile iki aşamalı eliminasyona maruz kalır (Goa and Heel,1986).

Zopiclone'nun diğer bir hipnotic olan benzodiazepin'ler ile karşılaştırıldığında, 7.5 mg zopiclone ağrıları dindirme ve uykusuzlukta 5-10 mg nitrezepam ve 15-30 mg flurezapam, 0.5 mg triazolam, 20 mg temazepam, 10 mg diazepam kadar etkili olduğu görülmüştür. 7.5 mg zopiclone, kronik uykusuzluk çekenlerde 2 mg flunitrozepam kadar etkiliyken Wickstrom ve arkadaşları (1983) tarafından yapılan çalışmada zopiclone'nun flunitrozepam'a tercih eden hastalarda uykuya dalış süresinin kısa olduğunu ifade etmişlerdir. Sonuçta zopiclone alan hastalarda 1 mg flunitrozepam verilenlerden daha iyi kalitede daha uzun uyku görülmüştür (Goa and Heel, 1986; Liboux et al. 1987, Wickstrom et al., 1983).

Gaillot ve arkadaşları (1983) tarafından hayvan ve insanlar ile yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen bulgular şunlardır:

1. Zopiclone; beyin ve çeşitli dokularda hızlı birşekilde absorbe olmakta ve dağılmaktadır.

2. İnsanda oral biyolojik alım yaklaşık % 80'dir.
3. Farmokinetiği doza bağlı olmaksızın terapik sınırlarda lineer dir.
4. Zopiclone'nun kinetiği sekse bağlı değildir.
5. İnsanda ilk-geçiş etkisi önemli değildir, plasma temizlenmesi uygulamanın yolundan bağımsızdır.
6. İnsanlarda esas metabolik bozunmalar yan zincirdeki N-oksidasyon ve N-demetilasyon dur.
7. Üründe N-oksit ve N-demetil türevleri dozun % 30 sayılabilir.
8. Anne sütüne geçiş yaptığı için sütte mevcuttur.
9. Tekrarlanan uygulamalardan sonra zopiclone kinetiğinde hiçbir değişiklik gözlenmez.
10. Zopiclone'nun eliminasyonu yaşlı hastakarda, karaciğer ve böbrek yetmezliği çekenlerde daha geç olmaktadır (Gaillot et al., 1983).

Saji ve arkadaşları sentez yöntemi ile diazepam'ı I-125 ile işaretlemişlerdir. Fakat bu yöntem oldukça zor ve zaman alıcı olması iyi laboratuvar koşulları istemesi ve bileşiğin önemi daha pratik işaretleme yapılabilmesinin gerekliliğini ortaya koymuştur.

Bu çalışmada diazepam doğrudan CAT ve iodogen yöntemleri ile I-131 ile işaretlenmesi ve etki eden parametreler incelenmiştir. Kullanılan yöntemler için en uygun koşullar saptanmıştır.

Literatürde zopiclone'nun sadece ^3H ile işaretli bileşiği dışında bir radyonüklid ile işaretli radyofarmasötiği mevcut değildir. Çalışmamızda zopiclone'nu erime noktasında halojen yer değiştirme yöntemine göre ^{131}I ile işaretlemek mümkün olmuştur. İşaretlenmeye etki eden parametreler incelenerek optimum koşullar saptanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 RADYOİZOTOPLARIN ÜRETİMİ

Nükleer tıpta kullanılan radyoizotopların hepsi yapay olarak üretilmektedir. Bu radyoizotoplar kararlı hedef çekirdeğin bir parçacık ile bombardıman edilerek başka bir çekirdeğe dönüştürülmesi ile oluşturulurlar. Bu olay transmutasyon olarak adlandırılır. Nükleer reaksiyon iki basamakta oluşur.

Birinci basamakta, bombardıman eden parçacık hedef çekirdeğe girer ve bu çekirdek tarafından bu parçacığın kinetik enerjisi ve bağlanma enerjisi çekirdeğe ilave edilerek yakalanır. Yeni oluşan bileşik çekirdek bu ekstra enerjiyi nükleonlar arasında bölüştürür.

İkinci basamakta bir veya daha fazla nükleon çekirdekteki bağlanma enerjisini azaltacak yeterli enerjiye sahip olunca, çekirdekten ayrılan parçacık bu ekstra enerjinin tamamını taşıyabilir veya yalnızca çekirdekten kurtulacak kadar enerjiye sahip olabilir. Kalan enerji yeni oluşan çekirdekten γ -ışını şeklinde salınacaktır. Bunun radyoaktiflik olmadığını, sadece basit olarak nükleer reaksiyonun ikinci kısmını teşkil ettiğini belirtmek gerekir. Bombardıman eden ve çekirdekten kurtulan parçacıklar değişik olabilirler ve genellikle bunlar $^1\text{H}^+$, $^2\text{H}^+$, veya $^4\text{He}^{2+}$ (α - parçacıkları) dır.

Tıbbi radyoizotoplar ya nükleer reaktörde ya da partikül hızlandırıcılarda ve radyoizotop jenaretörlerinde üretilmektedir.

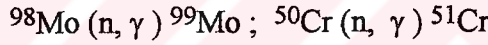
Nükleer Reaktörler: Reaktörde zenginleştirilmiş U-235 nükleer yakıt, reaktör kalbine yerleştirilmiştir. Yakıt çubukları hızlı nötronları yavaşlatan bir moderatör tarafından kuşatılmıştır. Termal nötronlar

fisyondaki diğer U atomları tarafından yakalanır, üretilen çoğu nötronlar bir zincir reaksiyonuna devam edebilir. Hızlı nötronları yavaşlatmak için kullanılan moderatörler genelde ağır su veya grafitir.

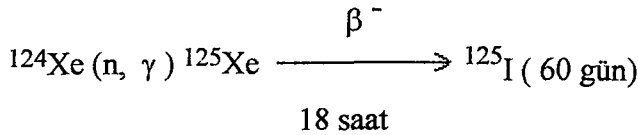
Reaktörde oluşan ısı su veya ısı değiştirici denilen diğer soğutucularla alınır. İzotop üretimi için, hedef materyalin reaktöre ulaşabilmesini sağlayan kapılar yapılır.

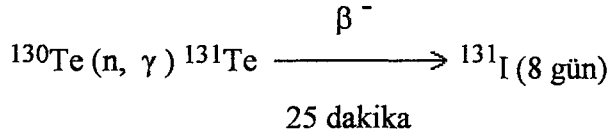
n,γ reaksiyonları: Nötronlar ile oluşan nükleer reaksiyonun en genel tipidir ve reaksiyon 1) 0.025 eV enerjili (düşük enerjili) termal nötronlar ile oluşur, 2) Ürün çekirdek hedefin izotopudur. Kimyasal ayırma mümkün değildir ve düşük spesifik aktiviteli ürün elde edilmektedir.

Örnekler:

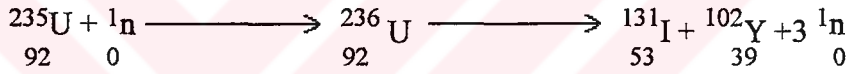


Bazı örneklerde, ürünün ayrılması (n,γ) reaksiyonları ile mümkündür, çünkü ilk radyoizotop ürün A* kısa yarı-ömürlüdür ve uzun ömürlü radyoizotop B'ye bozunur ve izole edilebilir. Bazı örnekler

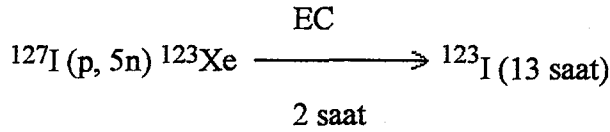




Fisyon Reaksiyonu $^{235}\text{U} (n, f)$: U-235 termal nötronları yakalar, bileşik çekirdek oluşur; bu çekirdek çok aktiftir ve orta kütleli radyoaktif çekirdeklere bölünür. Orta kütleli parçalar izotop olmamaları nedeniyle, kimyasal bir şekilde ayrılabilirler. Birçok radyoizotopu bu yolla elde etmek mümkündür. I-131, Mo-99, Xe-133 ve Cs-137 gibi birçok klinikte faydalı radyoizotoplar U-235'in fisyonundan üretilmektedir (Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987).



Parçacık Hızlandırıcılar: Hızlandırıcılarla elde edilen radyoizotoplar siklotron veya lineer hızlandırıcılarda üretilmektedir. Yüklü parçacık hızlandırıcılarda elektriksel yük taşıyan proton, döteron, veya α partikülleri kullanılmaktadır. Kullanılan yöntem; nükleer reaksiyonun tipi ve istenilen verimde olmasına bağlıdır. Genelde radyofarmasötik üretimi için 30 MeV enerjili siklotronlar uygundur. Lineer hızlandırıcılar 100-200 MeV enerji aralığında parçacıklar üretebilir. Pozitif yüklü yüksek enerjili bombardıman parçacıklarının hedef çekirdeğin itici coulomb engelini yenmesi gerekmektedir. Yüklü parçacıklı nükleer reaksiyonlar ile oluşturulmuş ürün çekirdek; hedef çekirdeğin izotopları değildir. Bu nedenle yüksek spesifik aktivitede elde edilebilir. Nükleer tıpta kullanılan bazı tipik hızlandırıcılarda üretilen radyoizotoplara örnek:



Hızlandırıclarda üretilen radyoizotopların genel özellikleri:

- 1) Elektron yakalama veya β^+ bozunumu gösterirler.
- 2) Bu radyoizotoplar genellikle (carrier free) taşıyıcısızdırlar.
- 3) Siklotron ürünleri nükleer reaktörde üretilenlere oranla çok küçük miktardadır. Bu nedenle siklotron ürünleri daha çok pahalıdır.

Radyoizotopların üretimi için kullanılan diğer metodlar: Yeterince uzun yarı-ömre sahip olan çoğu radyoizotoplar nükleer reaktörler, siklotronlar ve lineer hızlandırıclarda üretilmektedir. Bu radyoizotoplar nükleer tıpta kullanım için hazır kimyasal yapıda üretilmektedir. Bununla beraber yarı-ömrü oldukça küçük çok faydalı bazı radyoizotoplar; ticari üreticiler tarafından faydalı radyofarmasötiklere dönüştürülebilecek hazır kitler şeklinde satılırlar. Bu radyoizotopların bazıları için kısa ömürlü radyoizotop üretimine izin verecek jeneratör sistemi geliştirilmiştir.

Jeneratörlerdeki ana ve ürün nüklidler izotop değildirler, ana çekirdekten oluşan ürün çekirdeği kimyasal olarak ayırmak mümkündür. Jeneratörler vasıtasıyla ana izotopların aktivitesi azalınca kadar kısa ömürlü ürün izotopların taze elde edilmesi mümkün olur.

Nükleer tıp'ta en çok kullanılan jeneratör Mo-99 $\rightarrow$ Tc-99m jeneratörüdür. Jeneratörlerdeki Mo-99 nükleer reaktörlerde uranyumun fisyonundan ürün olarak elde edilmektedir. Saflaştırılmış Mo-99 jeneratör hazırlamak için kullanılmaktadır. Nükleer tıpta kullanılan radyoizotopların listesi Çizelge 2.1'de verilmektedir.

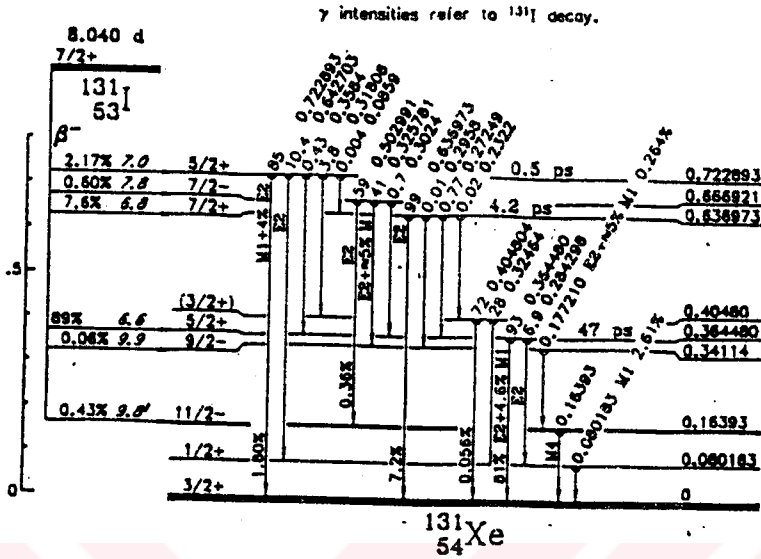
Çizelge 2.1 Nükleer Tıp'ta Kullanılan Bazı Radyoizotoplar.

<u>Radyonüklid</u>	<u>Bozunma şekli</u>	<u>Yarı-ömrü</u>	<u>Foton Enerjisi (keV)</u>	<u>Bolluk (%)</u>
C-11	β^+	20.3 dak.	511	200
F-18	β^+	109.0 dak.	511	194
P-32	β^-	14.3 gün	-	-
Cr-51	EC	27.7 gün	320	10
Co-57	EC	270.0 gün	122	86
			136	10
Co-58	EC, β^-	71.3 gün	811	99
			511	31
Fe-59	β^-	45.0 gün	1099	55
			1292	44
Ga-67	EC	78.1 saat	93	38
			185	24
			300	16
Se-75	EC	120.0 gün	121	16
			136	54
			265	57
			280	24
			401	12
Kr-81m	IT	13.0 san.	191	66
Mo-99	β^-	66.7 saat	740	14
			778	4
Tc-99m	IT	6.0 saat	140	88
In-111	EC	2.8 gün	172	90
			247	94
In-113m	IT	99.4 dak.	392	62
I-123	EC	13.0 saat	159	84
			27 (X-ışını)	71
I-125	EC	60.0 gün	35	7
			27 (X-ışını)	115
Xe-127	EC	36.4 gün	172	25
			203	68
			375	18
I-131	β^-	8.1 gün	364	82
			637	7
Xe-133	β^-	5.3 gün	81	36
Hg-197	EC	65.0 saat	77	25
Hg-203	β^-	46.5 gün	279	82
Tl-201	EC	73.0 saat	69 (X-ışını)	27
			71 (X-ışını)	47
			80 (X-ışını)	20

2.2 RADYOAKTİF İYOT İZOTOPLARI

İyot VIIA halojen grubuna ait metalik bir elementtir. Atom numarası 53 olan doğal iyotun 74 nötronu bulunur ve kütle numarası 127'dir. Suni iyot izotopları 74 nötrondan az veya daha fazlasını içerecek şekilde oluşturulmuştur. Bu izotoplar bir veya daha çok ısımayla bozunurlar. Nükleer tıp çalışmaları için en faydalı iyot izotopları uygun fiziksel özelliklerinden dolayı I-123, I-125, I-131 dir. Bunun yanısıra C-14 ve H-3 da radyoaktif işaretlemede yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. İyot izotopları; C-14 ve H-3 a göre iki büyük avantaja sahiptir: 1. Bozunma sırasında yayınlamış oldukları radyasyon tipidir; ^3H ve ^{14}C düşük enerjili beta ışını yayınlayıcıdır bu nedenle sıvı sintilasyon dedektörüne ihtiyaç vardır. Bu izotopların birçok alanda başarıyla kullanılmasına rağmen protein ve peptidlerin işaretlenmesi için radyoiyodinasyon tercih edilen bir yöntemdir. 2. İyot izotoplarının tümü γ -ışını yayınlamalıdır. Bozunmaları sonucu oluşan bir veya daha fazla fotonun enerjileri izotopun karakteristiğidir (Seevers and Counsell 1982; Kowalsky and Perry, 1987; Saha, 1992).

I-131; Kararlı bir izotop olan I-127 izotopundan 4 nötron fazladır. Nötronca zengin I-131 böylece negatron bozunumuna gider. Kararlı Xe-131 oluşur.



radasyonu organ görüntülemek için uygundur. Ayrıca I-131'in diğer bir avantajı ise γ ışınlarının pahalı olmayan sintilasyon sistemleri ile doğrudan dedekte edilebilmesidir. Diğer bir avantajı ise diğer iyot izotoplarına göre yarı-ömrülerinin oldukça kısa olmasıdır. Çünkü verilen izotop ile ulaşılabilen teorik maksimum spesifik aktivite yarı-ömrünün tersi ile ilişkilidir, bu nedenle kısa yarı-ömrürlü radyoizotopların kullanılması istenilir.

I-125; I-127 den 2 nötron azdır ve nötron eksikliği nedeniyle elektron yakalama (EC) bozunumuna uğrar, metastabil Te-125m'e dönüşür. Bu bozunum için geçiş enerjisi 178 keV'dir. 178 keV'lik bu enerji nötrino, uyarılmış olan Te-125'in geçişinde 143 keV taşır ve 35 keV eksite olmuş Te-125'in temel düzeyine geçişinde γ ışını olarak salınır.

Uzun yarı-ömrürlü olduğundan bir çok faydalı radyoişaretleme ekonomik bir şekilde I-125 ile yapılır. Bu takdirde I-125 radyoişaretleme için I-131'den daha avantajlıdır; çünkü β salımının eksikliği işaretli moleküllerin radyolitik dekompozisyonunu minimuma indirir.

I-125, tiroid bezi gibi organları görüntülemede klinik olarak kullanılmaktadır. Fakat zayıf fotonların doku tarafından foton absorpsiyonundan dolayı derin-yerleşmiş organlar için faydasızdır. Bununla beraber β radyasyonu bulunmadığı için I-131 ile karşılaştırıldığında radyolitik dekompozisyon probleminin azalması nedeni ile işaretli organik bileşikler için I-125 iyi bir seçim olur. Yarı-ömrü 60 gün olması nedeniyle bileşiklerin uzun süren metabolizma çalışmaları için tercih edilir ve böyle bileşikler için uzun raf ömrü sağlar; böylece sıklıkla hazırlama ihtiyacını önler. I-125, 60 gün yarı ömrü ve 35 keV γ -ışını, 27 keV karakteristik X ışını enerjisi ile önceleri tiroid görüntülenmesinde kullanılmışsa da günümüzde büyük çoğunlukla in vitro çalışmalarda yararlanılmaktadır. I-125 izotopu in vitro ürünler için

diğer bileşiklerden antijen radyoişaretlenmesi için çok genel bir şekilde kullanılmaktadır ve uzun yarı-ömre sahip olması (60 gün) bir avantajdır. Bunula beraber düşük enerjili (27-35 keV) fotonlar in vivo görüntüleme için uygun değildir.

I-123; I-123 çekirdeğinde 53 proton ve 70 nötron vardır. I-127'den 4 nötron eksik olduğu için Elektron yakalama (EC) ile Te-123m'e bozunur. Bozunma sonucunda açığa çıkan enerji 1230 keV dir. Bu enerji birkaç EC bozunumuyla paylaşılmaktadır. Te-123'e uyarılma basamağında 1071 keV'lik nötrino salınır. Uyarılmış olan Te-123 temel düzeye geçerken 159 keV'lik γ -ışını salınır (Saha, 1992).

Bu iyot izotopu tiroid çalışmaları için ideal özelliklere sahiptir. I-125 ve I-131 reaktörde üretilmesine rağmen I-123 siklotronda üretilmektedir. Ancak siklotron ürünü olması ve pahalılığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmamaktadır. Birkaç yöntemle siklotronda üretilmektedir. Üretimde kullanılan en eski yöntemdeki en önemli problem radyoiyot kontaminasyonun anında üretilmesidir. Bu kontaminantlar I-124, I-125, I-130 ve I-131 dir. Siklotron üretiminden sonra bozunum süresinde I-123 relatif uzun ömürlü kontaminanatlardan safsızlık yüzdesi de artmaktadır. Böylece kontaminantlardan oluşan yüksek enerjili fotonların radyasyon dozuna katkıları artar ve kontaminanatlardan oluşan yüksek enerjili fotonların görüntü ayırmacılığı önemli bir şekilde azalır, kamera görüntüleri düşük enerjili kolimatörler ile elde edilmektedir. I-127 (p, 5n) reaksiyonu veya Xe-124 (p, 2n) reaksiyonu gibi üretim metodları ile üretilir.

13.3 saatlik yarı-ömrü, 159 keV γ radyasyonu ve β radyasyonu bulunmadığı için klinik çalışmalar için ideal bir izotoptur. Nükleer tıpta iyot izotoplarının en önemli avantajı; bir çok faydalı radyofarmasötiklerin üretimi için bir çok bileşik ile reaksiyon verme yeteneğinde olmasıdır. Tüm iyot izotoplarından I-123 in vivo diagnostik ürün için uygundur. Çünkü uygun yarı-ömre (13.2 saat) ve

foton enerjisine (159 keV) sahiptir ve hastaya düşük radyasyon dozu verir. Siklotronda üretilmesi nedeniyle pahalıdır (Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987; Seevers and Counsell 1982).

I-123 diğer iyot radyonüklidleri ile karşılaştırıldığında bir çok özelliğinden dolayı tercih edilir. Bu gibi özellikleri iyot-işaretle radyofarmasötiklerin hazırlanmasını kolaylaştırır, bu bileşiklerin mümkün olduğu kadar hızlı hazırlanmasını sağlar (Seevers and Counsell 1982).

2.3 RADYOİYOTLU BİLEŞİKLERİN BAŞLICA KULLANIM ALANLARI

2.3.1 Radyoimmunoassay (RIA): Bu yöntemin temeli, tayini yapılacak madde ile ona karşı özel olarak oluşturulan antikor arasındaki antijen-antikor reaksiyonuna dayanır. Değişen miktarlarda madde ve radyoaktif işaretleli sabit miktarda aynı madde, sabit fakat sınırlı sayıda antikor bağlanma yerine karşı yarışmaya girerler. Konsantrasyona bağlı olarak oluşan bir dengeden sonra antijen-antikor kompleksi ile bağlanmamış madde ayrılır ve iki fazdan birinde radyoaktivite ölçümü yapılır ve radyoaktif madde ile antikor arasındaki bağlanma yüzdesi maddenin konsantrasyonunun ölçümü olarak kullanılır (Gladtko et al. 1979). Bu amaç için ^{125}I başlıca kullanılan izotoptur. ^{125}I 'ın yarı-ömrünün 60 gün olması ve düşük enerjili γ -ışını salması nedeniyle hazırlanan işaretleli materyaller daha az bir radyolitik etki ile radyokimyasal stabilitede uzun süre depolanabilir. ^{125}I , radyofarmakolojik görüntüleme ajan potasyelinin incelenmesinde çalışmalar için faydalıdır. Bu çalışmalarda hayvanlarda çeşitli zaman periyotlarında radyoizotoplanmış bileşiğinin doku dağılımının saptanması gerekir. Herbir hayvana işaretleli bileşiğin uygulanmasından

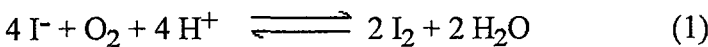
sonra uygun sürede öldürülür ve organları RIA için kullanıldığı gibi gama sayacında radyoaktivite sayımı yapılabilir.

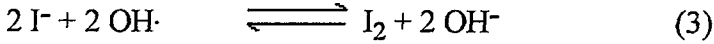
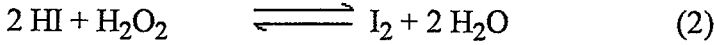
^{131}I , RIA için nadiren kullanılmaktadır. Kısa yarı-ömürlü olması yüksek spesifik aktivite ile elde edilme güçlüğü gibi birçok engelde sahiptir. ^{131}I taşıyıcı ilave etmeksizin genelde mevcut olamaz ve ^{125}I 'inki kadar verimli sayılamaz.

2.3.2 Görüntüleme (Imaging): Radyoiyotlanmış bileşiklerin diğer kullanımı nükleer tıpta görüntüleme (imaging) amacıyla. Görüntüleme kısmen organ veya dokuda lokalize olan bileşiklerden salınan γ -ışınlarının vücut dışında dedekte edilmesiyle yapılır. Görüntüleme dışardan yapıldığı için vücutun dışındaki radyasyon şiddeti yeterince kuvvetli olmak zorundadır. Bunun için gama yayınlayan izotoplar ile işaretlenmiş bileşikler gerekir, C-14 ve H-3 gibi radyoizotoplar bu amaç için uygun değildir. C-11'in pozitron ışıması sonucu salınan anihilasyon ışınları görüntülemede kullanılabilir, fakat son derece kısa yarı-ömürlü olmasından dolayı kullanımı siklotron izotop üretim imkanları ile sınırlı kalmaktadır (Seevers and Counsell 1982).

2.4 RADYOİYODUN ÇÖZELTİ KİMYASI

Radyoiyot genel olarak NaI formunda elde edilmektedir. Uygun koşullar altında iyot sulu çözeltilerde oksidasyon reaksiyonuna girecektir. Sulu çözeltilerde iyodun dolaylı oksidasyonu radyolitik etkiler ile oluşabilir. Radyasyonun çözelti ortamında oluşturduğu kimyasal reaksiyonlara radyoliz denir. Radyoliz veya oksidasyon ile oluşan çok önemli reaksiyonları, aşağıda gösterilmiştir.





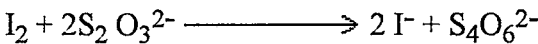
Reaksiyon 1 alkali pH'da radyoiyot çözeltisi tamponlanarak tersinir, reaksiyon ise sodyum tiyosülfat gibi indirgeyici ajanlar kullanılması vasıtasıyla etkili bir şekilde geciktirilebilir, fakat reaksiyon 2 ve 3'ü içine alan reaksiyonları tamamen önlemek zordur. Spesifik aktivite düşürülerek radyoliz etkisi minimuma indirilebilir.

İyot anyonu kimyasal olarak oldukça reaktiftir. Uygun koşullar altında hızla elementel iyot ve HI gibi uçucu yapılara okside olur. Bu her iki şekildeki radyoiyot çözeltilerini elde tutan personel için sağlık tehlikesi mevcuttur. İyot asidik ortamda atmosferik ve çözünmüş oksijen veya herhangi bir iyodat kontaminasyonu vasıtasıyla aşağıdaki reaksiyonlara göre okside olabilir.



Oksidasyon reaksiyonu birkaç yolla azaltılabilir.

- 1) pH= 7.5- 9.0 alkali çözelti içeren tampon çözeltisi iyodun uçucu yapılara yükseltgenmesini önler.
- 2) Sodyumtiyosülfat gibi indirgenlerin kullanımı aşağıdaki reaksiyona göre iyodun iyodüre geri indirgenmesini sağlar.



- 3) Metal iyonları vasıtasıyla olan katalitik oksidasyonu engellemek için EDTA tuzları gibi şelatlayıcı ajanlar kullanılır.

İlaveten iyodun suda ki çözünürlüğünün az olması nedeniyle (20 °C'de % 0.03) buz dolabında saklanması halinde buhar basıncı azalacaktır.

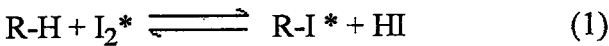
Radyasyonun sebep olduğu serbest radikaller ve peroksitler I-131 çözeltisinde iyodürü, iyota (I₂) ve iyodata (IO₃⁻) yükseltger. Bu reaksiyonlar oksijenin mevcudiyetinde ve yüksek radyoaktif konsantrasyonu vasıtasıyla hızlanmaktadır. I-131'in β-ışınından dolayı I-131 çözeltisinde radyolitik etkiler çok daha önemlidir. Bu etkiler antioksidantın kullanımı ve düşük radyoaktivite konsantrasyonu vasıtasıyla azaltılabilir. Radyoiyot I-131'in seyreltik çözeltisi distillenmiş suda % 0.2 sodyum tiyosülfat gibi antioksidant ile yapılması gerekir. Çeşme suyu kullanılmaması gerekir, çünkü içindeki klor iyodu yükseltgemeye yeterlidir (Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987).

2.5 İYOT İLE İŞARETLEME YÖNTEMLERİ

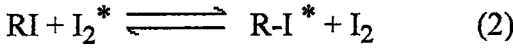
Teknesyum kimyasındaki gibi iyodun kimyasal ve biyolojik davranışları, yükseltgenmesi (iyot) veya indirgenmesi durumlarına (iyodür) bağlıdır. Tc'un tam tersine iyodun indirgenmiş basamağı moleküler işaretlemeyi olumsuz kılar. Bununla, reaksiyon oksidasyon aşamasında gerçekleşir. Radyoiyot ile işaretleme genelde ilgili molekülde aromatik halkada I⁺ elektrofilik özellikleri girişimi ile başarılmaktadır. Bu ya H⁺ ile iyodun yerdeğiştirmesi reaksiyonu ya da radyoiyot atomu molekülde mevcut olan stabil iyot ile yer değiştirmesi, izotopik yer değiştirme reaksiyonu ile oluşmaktadır.

Bu reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir:

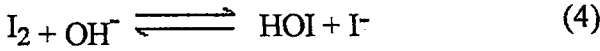
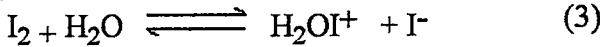
Yer değiştirme (Süstitüsyon) reaksiyonu:



İzotopik yer değıştirme reaksiyonu:

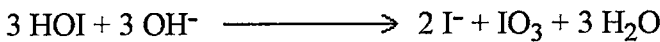


Serbest moleküler iyotta I_2 yapı ($I^- + I^+$) olarak tahmin edilmektedir. Bununla beraber serbest olarak I^+ iyot mevcut değildir, fakat genelde sulu çözeltilerde nükleofilik özellikleri ile bir kompleks oluşturur. Aşağıdaki reaksiyonlar mümkündür.



İyot ile işaretleme reaksiyonlarında iyodinasyonun ya hidrate olmuş kompleks (H_2OI^+) ya da hipoiyodür asit (HOI) ile olduğu düşünülmektedir. Protein iyodinasyonu nükleer tıpta çok önemli radyoişaretleme tekniklerinden biridir. Protein moleküllerinde tipik iyodinasyon yerleri iyodinasyonun asıl yeri olarak tyrosinin aromatik zincirini veya sekonder yer olarak histidinin imidazol halkasını içermektedir. Düşük pH'da tyrosinin işaretlenme verimleri düşüktür. Bununla beraber bazik pH'da tyrosinin anyon yapısı için tyrosin hidrolizlenerek diassosyonuna izin verir ve 4. reaksiyona göre I_2 hidrolize olur. Bu olay tyrosin halkasının iyodinasyonunu büyük oranda kolaylaştırır.

Genelde proteinlerin iyodinasyonu pH=7-9'da olur. Aşağıdaki reaksiyondan görüldüğü gibi iyodata HOI 'ın dönüşümsüz bozunumundan dolayı yüksek pH değerlerinde (>10) çalışılması zordur.



Hatta pH=7-9'da bile iyodat yapısı oluşabilir. Reaktiflerin karışımların tertibi yüksek iyodinasyon verimi elde etmekte önemlidir. Bu elbette radyoiyodinasyon için kullanılan yöntemle bağlıdır, fakat genelde işaretlemeye önce molekül ilave edilir, tampon, radyoiyot ve iyodinasyon ajanı onu izler. Protein molekülünün dekompozisyonunu önlemek için orta şiddetle iyodinasyon ajanları kullanılmalıdır. Çoğunlukla oldukça kuvvetli oksidasyon ajanları kullanması da gerekebilir. Ancak bu ajanlar protein molekülüne zarar verebilir. Genelde protein bütünlüğünü korumak için ortalama olarak proteinin molü başına bir iyot atomundan fazla iyot olmaması tavsiye edilmektedir.

Moleküler İyot (I_2): Radyoaktif iyot genelde NaI olarak mevcut olması nedeniyle radyoaktif moleküler iyot yükseltgenerek elde edilir. SeEVERS ve Counsell (1982) yayınlarında proteinlerin işaretlenmesinde taşıyıcı moleküler iyot ve $Na^{131}I$ kullanılarak gerçekleştirilebildiğini ifade etmişlerdir. Diğer araştırmacılar moleküler iyotla işaretleme yapmak için çok farklı oksidasyon ajanları kullanmışlardır. Proteinlerin işaretlenmesi için yükseltgen olarak iyot/iyodat sistemi veya demir (III) sülfat, H_2O_2 , amonyum persülfat gibi yükseltgenler kullanılmıştır.

Radyoaktif işaretleme için elementel iyot molekülünün kullanılmasının birçok dezavantajları vardır.

1. Mümkün olan radyokimyasal verim % 50 dir. Çünkü işaretlemenin yarısı radyoiyot olarak sonuçlanır (Saflaştırma yapmak çok zordur).
2. Önceki yükseltgenme basamakları, bazı aktivite kayıplarını içerir ve çalışan kişinin maruz kalacağı aktivite yüksektir.
3. Moleküler iyodun uçuculuğu nedeniyle risklidir.

Bu zorluklara rağmen radyoaktif moleküler iyot küçük organik moleküllerin işaretlenmesinde kullanılmaktadır.

Triiyot metodu, iyot ve KI'un karışımını içindeki işaretlenebilecek bileşiklere radyoiyodun ilavesi ile sağlar.



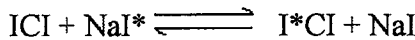
R: organik bileşik

Bu metotta radyoiyot, iyot -KI çözeltisi ve işaretlenecek bileşik ile karıştırılır. KI triiyot kompleksi oluşur. HOI için I_2 'ın hidrolizinden sonra radyoiyot I^* iyotlu bileşikte HOI^* üretmek için HOI ile izotopik yer değiştirme yapılır. Teorik olarak radyoiyodun yalnızca yarısı, I^+ formuna dönüştürüldüğünden genelde işaretlenme verimi yalnızca % 10-20'dir. Bununla beraber reaksiyon koşulları hafif olduğu için protein bozunumu azdır. Kararlı olarak iyotlanmış ve radyoiyotlanmış bileşikler oluşturulabilir. Bu metot çok geniş alanda kullanılmaktadır.

İyot Monoklorür: ICI de iyot; klorun elektronegatifliği büyük olduğundan dolayı I^+ formdadır. ICI aşağıdaki reaksiyona göre kuvvetli asidik ortamda iyodat ile iyodun oksidasyonu ile oluşturulur.



ICI ile radyoiyot izotopu karıştırılarak yer değiştirme reaksiyonu ile radyoiyot bağlanır. Çünkü ICI, iyodun tümü ve aşırısıda I^+ formundadır, esasen radyoiyodun tümü aşağıdaki reaksiyona göre I^+ 'a dönüştürülmektedir.



Bundan sonra I^*CI , HOI^* 'ya hidrolizlenerek iyotlanan bileşiğe girer. Yüksek işaretleme verimi (% 75) mümkündür fakat ürünün spesifik aktivitesi düşüktür. Çünkü kararlı iyot; mevcut kararlı ICI aşırısından dolayı bileşikle birleşebilir. Bu radyoiyot işaretleme

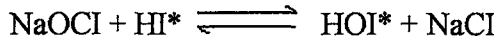
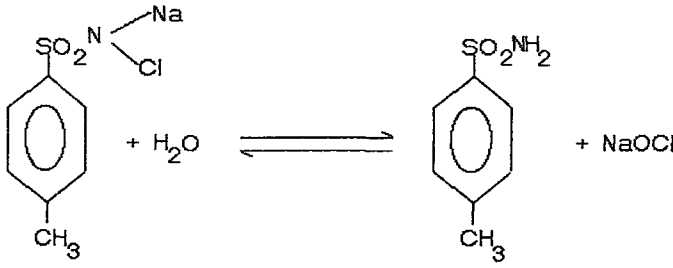
teknikinde tamponlanmış bileşik ve ICI karışımı ilave edilir. Radyoiyottan önce ICI ilave edilirse işaretleme verimleri düşer çünkü bileşik ile doğrudan bir şekilde ICT'in reaksiyonundan dolayı izotop yer değiştirme reaksiyonu azalır.

Bununla beraber ICI kullanımının avantajları bileşik ile birleştirilmiş iyodun miktarı kullanılan ICT'in miktarıyla kontrol edilmektedir. ICI metodu ile radyoiyot seyreltik HCl'de (ICT'de karalı I-127 ile ilk kez) dengelenir ve daha sonra karışıma özel sıcaklık ve pH'da işaretleme için ilgili bileşik doğrudan ilave edilmektedir. Bu proses ile % 50-80 verim elde edilir.

Kloramin-T Yöntemi: Kloramin-T yöntemi, yüksek spesifik aktivitedeki peptid ve proteinlerin radyoiyodinasyonu için kullanılan çok genel bir yöntemdir. Kloramin-T yöntemi ile radyoiyodinasyondaki problem; işaretlenmede bileşiğin sert oksidasyon koşullarına maruz bırakılmasıdır. Bu istenmeyen birçok yan reaksiyonlara sebep olabilir. Bu tip zorluklara rağmen kloramin-T çok sayıda küçük organik molekülün radioiyodinasyonunda başarı ile kullanılmıştır (Seevers and Counsell, 1982).

Kloramin-T yöntemi yüksek spesifik radyoaktiviteli peptid ve proteinlerin radyoiyodinasyonunda başarı sağlar. Ancak burada ortaya çıkan başlıca problem reaksiyon koşullarının protein bozunumuna sebep olmasıdır.

CAT yönteminde kullanılan iyodinasyon ajanının kimyasal adı N-kloro 4-metil benzen sülfonamid sodyum tuzu'dur. CAT, pH= 7-8'de aşağıdaki reaksiyonu izleyerek sodyum hipokloride hidroliz olur. Sodyum hipoklorid de hidroiyodik asidi hipoiyodos asidine yükseltir.



Genel teknik; radyoiyot ve tampon ile işaretlenecek bileşik birleştirildikten sonra hızlı bir şekilde taze CAT çözeltisi ilave edilerek karıştırılır. Çünkü CAT güçlü bir yükseltgen ajandır. Proteinlere zarar verebilir. Eğer işaretleme koşulları dikkatli bir şekilde kontrol edilirse, yüksek radyoiyodinyasyon verimleri elde edilebilir. CAT'ın avantajı taşıyıcı iyota ihtiyaç yoktur ve bununla beraber yüksek spesifik aktivitelere ulaşılabilir (Seever and Counsell; 1982 .Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987).

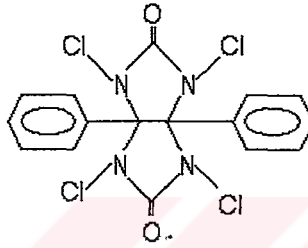
Elektroliz Yöntemi: İyot, çözeltide inert bir elektrodda oluşturulmuş elektronlar ile yükseltgenerek işaretlenecek bileşiğe bağlanabilir. Bu yöntem ile bir çok protein radyoiyotlanabilir. İşaretlemede, işaretlenecek madde ve radyoiyodun karışımının elektrolizi ile olur. Elektroliz hücresinde anot ve katot bölümler dializ bölümü ile ayrılmıştır. Katot bölgesi doldurulmuş tuz çözeltisi içerir, halbuki anot bölgesi elektrolitik karışım içerir. Elektrolizle iyot serbest bırakılarak bileşik işaretlenir. Yavaş ve taşıyıcı iyot mevcut olmadığından işaretleme verimi genellikle yüksektir. Bu yöntem diğer yöntemlere göre daha karmaşık bir yapıda olduğu için geniş çapta kullanılmaz (Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987).

Enzimatik Yöntemler: Enzimatik iyodinasyonda kloroperoksidaz ve laktoperoksidaz gibi enzimler H_2O_2 'ın nanomolar miktarı; işaretlenecek bileşik ve radyoiyot içeren karışımına radyoiyodinasyon için ilave edilmektedir. H_2O_2 , reaktif iyodu iyoda yükseltgeyerek, bileşik iyotlanır. Organik moleküllerde değişim veya proteinlerin bozunumu; H_2O_2 'ın yalnızca düşük konsantrasyonda ilave edildiğinde minimuma indirilebilir. Bu yöntemle % 60-% 85 verimlere ve yüksek spesifik aktivitelere ulaşılabilmektedir.

Laktoperoksidaz yönteminde laktoperoksidaz enzimi ve H_2O_2 eksi yüklü radyoiyodürü elementel radyoiyoda yükseltger. Genellikle protein radyoiyot ve laktoperoksidaz ile karıştırılmaktadır. H_2O_2 'ın küçük miktarları daha sonra etkili işaretleme reaksiyonu için ilave edilmektedir. Reaksiyon; seyreltmek vasıtasıyla veya sisteinin ilavesiyle bitirilmektedir. Bu metodun proteinlere daha az zarar verebileceğine inanılmaktadır (Saha, 1992; Kowalsky and Perry, 1987).

İodogen Yöntemi: İodogen (1,3,4,6 tetrakloro 3 α -6 α difenil glukoril) (Şekil 2.2) suda çözünmez, çözgen olarak CH_2Cl_2 veya CH_3Cl 'de kullanılır daha sonra çözgen uçurularak iodogenin kabın duvarında ince film oluşturulması sağlanır, böylece oksidasyon reaktifi ile organik bileşiğin çok zayıf teması bile işaretlenme olayının gerçekleşmesine imkan sağlar. İodogen, uraciller ve thiouraciller serisinin radyoiyodinasyonunda başarıyla kullanılmaktadır. Bu reaksiyonlarda iodogen kloramin-T'den daha iyi sonuç vermiştir. Proteinler ve hücre membranları da iodogen yöntemiyle radyoiyotlanabilir. Reaksiyona girmemiş iyot Sephadex jel veya iyon değiştiriciler kullanılarak kolon kromatografisiyle ayrılmaktadır. Proteinlerin bozunumu minimumdur, çünkü reaksiyon katı fazda oluşur ve iodogen suda zayıf çözünür.

Hunter ve Greenwood yöntemi de radyoiyotlamada yükseltgen olarak çok geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Bolton ve Hunter reaktifi ise çok geniş bir şekilde kullanılmaz. Bu reaktif 4 hidroksi 5 iyodo fenil propanoik asitin N-süccinimid esteridir. Reaktif serbest asitli suda yavaş birşekilde kendi kendine hidrolizlenir. Reaksiyon pH-8.5'de tamponda ve buz banyosu sıcaklığında gerçekleştirilir.



Şekil 2.2 İodogen'in kimyasal formülü.

Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemi: Birçok bileşik izotop yer değiştirme yöntemi kullanılarak radyoaktif I-ile işaretlenemez. Erime noktasında halojen yer değiştirme yöntemi böyle bileşikler işaretlemek için alternatif bir yöntemdir. Bu yöntem üç farklı şekilde uygulanabilir.

Erime noktasında halojen yer değiştirme yönteminin en basit şekli radyoaktif olmayan aromatik bileşiğin erimesi sırasında oluşan halojen atomu ile yer değiştirmedir. Bu durumda işaretlenecek organik bileşiğin erime noktası civarında kararlı olması zorunludur ve eriyiğin radyoaktif iyoda karşı yeterince yüksek değerde dielektrik sabitine sahip olması gerekir. Bu teknik ilk olarak m-iodohippuric asidin halojen yer değiştirme ile işaretlenmesi için geliştirilmiş ve o-iodohippuric ve 2-3-5-triyodo benzoik asidin işaretlenmesinde kullanılmıştır.

Diğer bir yol; ^{123}Xe 'un bozunma ürünü ile düşük erime noktalı acyl türevlerinin erimesi sırasında oluşan halojen yer değiştirme vasıtasıyla 4-iodofenilalanin, 5 ve 6-iodotriptophan gibi bileşiklerin radyoaktif iyot ile işaretlenmesidir. Bu yöntem geri tepilme ile işaretleme ve erime yönteminin kombinasyonu olarak düşünülebilir.

Düşük dielektrik sabitli bileşiklerin bu yöntemle işaretlenmesinde ortaya çıkan güçlükleri gidermenin bir yolu asetamid ortamında erime sırasında halojen yer değiştirme dir. Asetamid'in erime noktası $82\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'dir ve $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ altında kararlıdır. Reaksiyon yaklaşık $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de gerçekleşir. Bu yöntemle iyodobenzoik asidin üç izomeri işaretlenmiştir. Formamidin erimesi sırasındaki halojen yer değiştirme ile elektron verici gruplar zayıf bir şekilde ve elektron-alıcı gruplar ve aromatik bileşikler iyi bir verimle işaretlenir (Seever and Counsell, 1982).

Erime ile halojen yer değiştirmenin üçüncü şekli halojen yer değiştirme erime noktası altındaki bir sıcaklıkta yapılmasıdır. Madde 1-4 saat için (amonyum sülfatın veya maddenin erime noktası altında) $120\text{--}160\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de radyoiyot ve amonyum sülfat ile birlikte ısıtılır. Bu yöntemle organik moleküllerin işaretlenmesi amonyum sülfatın NH_3 kaybı ile bozunması sırasında kalan asidik ortamın halojen yer değiştirmeyi katalizlemesi ile olur. Bu yolla halojen yer değiştirme ortamının asitliğinin kademeli bir şekilde arttığı ileri sürülür (G-El Shaborg and Farah, 1991). Amonyum sülfatın bozunması ile açığa çıkan sülfürik asit halojen yer değiştirmeyi iletir. Üç çeşit olan iyodo benzoik asitler, diğer iyotlu aromatik bileşikler ve iyodobenzilguanid serileri amonyum sülfat yöntemi ile radyoiyotlanmışlardır. 4-(alkilamin) iyodoquinolil serileri ise fosfat tuzları kullanılarak halojen yer değiştirme yöntemi ile işaretlenmişlerdir. pH düşerken radyokimyasal verimin arttığı ileri sürülmüştür.

G-El-Shabourg ve arkadaşı (1991) tarafından yapılan çalışmada kuru-ortam diamonyum hidrojen o-fosfat kullanılarak halojen yer

değiştirme (2-5 dakika) ile saf [4-¹³¹I] iyottripyrene % 95-98.5 verim ile elde edilmiştir. İlk basamakta [4-¹³¹I] iyottripyrene sentezi yapılmış ve daha sonra bu bileşik ve diamonyum hidrojen ortafosfat, taşıyıcısız Na¹³¹I kullanılarak azot gazı ortamında kuruluğa getirilmiş, kuruluğa getirilen karışım kapalı ortamda silikon yağ banyosunda 160-165 °C'de 5 dakika reaksiyon süresinde gerçekleştirilmiştir. Örnek alınarak radyokimyasal saflık ITLC yöntemi ile saptanmıştır. Bu çalışmada farklı amonyum tuzları ve miktarları parametre olarak incelenmiştir. Sonuç olarak 15 mg diamonyum hidrojen orto fosfat kullanılarak 160 °C'de % 98.5 oranında radyokimyasal verim elde edilmiştir. Radyokimyasal verimlerin ortamın asitliğinin ve sıcaklığın artışı ve amonyum tuz konsantrasyonlarına çok bağlı olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar ve reaksiyon koşullarına dayanan kuru-ortam izotop halojen yer değiştirme reaksiyonu kısa ömürlü radyoiyot izotopları (I-123 ve hatta I-121 $t_{1/2}$ = 2.12 saat) kullanımı ile diğer organik moleküllerin işaretlenmesinin mümkün olduğu ileri sürülmüştür (G-El-Shaboury and Farah, 1991).

2.6 RADYOFARMASÖTİK

Radyofarmasötik, bir hastalığın tedavisi veya teşhisi için insanlara uygulanması uygun olan ve yapısında radyoaktif atomlar içeren kimyasal maddeler olarak tanımlanabilir. Radyofarmasötikler, vücudun belli yerlerinde lokalize olarak, radyasyon vermek için çeşitli kimyasal ve fiziksel şekillerde hazırlanırlar. İlaç moleküllerinden yayınlanan γ radyasyonu doku içine hızlı bir şekilde girer ve vücuttan kurtularak, dışarıdan radyofarmasötiğin ölçüm ve dedeksiyonuna izin verir. Bu şekilde nükleer tıpta vücuttaki çeşitli organların fonksiyonel ve morfolojik incelemeleri mümkün olur. Her tür farmasötiğin radyoaktif

elementlerle işaretlenmesi mümkün olmadığı gibi, Nükleer tıp'ta her radyoizotop ile inceleme yapılması da mümkün değildir.

Nükleer tıp'ta rutin olarak oluşturulan prosedürlerin tiplerini incelemek radyofarmasötiklerin nasıl kullanılacağına anlaşılmada faydalı olabilecektir. Bu prosedürleri 4 grupta sınıflandırabiliriz:

1. Görüntüleme prosedürü.
2. İn vivo testler.
3. İn vitro testler.
4. Terapik prosedürler.

Nükleer tıp'ta birinci amaç istenilen diagnostik bilgiyi elde etmek için adsorbe edilen radyasyon dozunun mümkün olduğu kadar düşük tutulmasıdır (ALARA). Bu, uygulanan radyoaktif miktarın sınırlandırılması ile sağlanır ve kısa ömürlü radyoizotoplar kullanılmasıyla da maruz kalınan süre azalır. Kısa ömürlü radyoizotoplar tercih edilir, çünkü bu durumda daha büyük radyoaktivite miktarı uygulanabilir. 'Nükleer fotoğraf' için fazla foton mevcut olacağından bu daha iyi bilgi edinilmesini sağlar. Kısa ömürlü radyoizotopların radyoaktif bozunmaları çabuk bir şekilde olacağından radyasyon dozu da indirgenecektir. Birçok nükleer tıp çalışmalarında genel olarak kullanılan radyoizotop Tc-99m'dir. Yarı-ömrü 6 saattir. Tc-99m ile işaretli radyofarmasötikleri hazırlamak için ticari amaçla üretilmiş ilaçlar bulmak zordur ve bunun nedeni radyoaktivitenin % 90'dan fazlası bir gün sonra bozunmadan dolayı kaybolacağından kullanımdan hemen önce hazırlanması gerekir. Tc-99m ve diğer kısa-ömürlü radyofarmasötikler bu nedenle lokal olarak veya hastanede hazırlanmaları gerekir. Herbir Tc-99m ajanı günlük olarak hazırlanır ve tanımlanan kimyasal yapıda Tc-99m'in bileşimini içerir. İlâveten saf bir ürün temin etmek için kalite kontrol testi yapılması zorunludur. Bu ajanlar intravenöz enjeksiyon ile uygulanacağından hazırlama sırasındaki temiz şartlar sağlanmalı ve işaretlenme verimi yüksek olmalıdır. Bu işlemleri yapan kişiler

radıofarmasötikçiler, radyokimyacılar veya nükleer tıp teknolojistleri olabilir.

Nükleer tıp'ta daha uzun yarı-ömürlü radyofarmasötikler de kullanılmaktadır. Örneğin I-131 $t_{1/2} = 8$ gün'dür. Bu süre bu maddeye ihtiyaç olduğunda kullanılabilmesi için nükleer tıp labratuvarında depolanmasına ve kullanımdan önce I-131'li radyofarmasötiklerin test edilebilme ve ticari üretimine izin verecek yeterli uzunluktadır. I-131 radyasyon dozu bakımından bir dereceye kadar istenmeyen fiziksel özelliklere sahip olmasına rağmen uzun yarı-ömürlü, yüksek enerjili γ ve β radyasyonları gibi özellikleri nükleer tıpta tiroid çalışmalarına ve kimyasal reaktivitesi de farklı kimyasal moleküllerin işaretlenmesine izin veren değerli bir radyoizotop dur.

Geleneksel terapik ilaçlar ile karşılaştırıldığında radyofarmasötiklerin spesifik özellikleri vardır; radyoaktifirler ve radyasyonun oluşturduğu biyolojik hasar potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle insana uygulanmadan önce dokuda dağılım çalışmaları kritik organı belirlemek için ve radyasyon dozu tahmin etmek için özel olarak hayvanlarda denenmektedir. Kritik organlar radyofarmasötikten adsorbe edilen en yüksek radyasyon dozunu alır. Bu tahminlerin önemi radyoaktivite miktarında limit oluşturmak ve diagnostik çalışmalarda insanlara tehlikesiz uygulamalar yapabilmesi içindir. Bu radyofarmasötikler son derece küçük miktarlarda uygulandığından dolayı kimyasal toksite geleneksel farmasötikler ile aynı derecede değildir. Gerçekte verilen radyofarmasötiklerin miktarı, farmokolojik etki yaratacak kadar yeterli değildir (Kowalsky and Perry, 1987; Theobald, 1989).

2.6.1 RADYOFARMASÖTİKLERİN KALİTE KONTROLÜ

Radyofarmasötiklerin insanlara uygulamak amacıyla üretilen maddeler olmaları nedeniyle kalite kontrollerinin titizlikle yapılması gerekir. Kalite kontrolü, birkaç spesifik test ve radyofarmasötiğin verimi, biyolojik güvenliği, ürün kimliği, etkisi ve safsızlığı ile ilgili testlerini içerir. Tüm kalite kontrol testleri, radyoaktif olmayan farmasötiklerde uygulanabileceği gibi radyofarmasötiklerde 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.

Radyoaktivite: 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 diagnostik prosedürlerden istenilmeyen bilgi üretilmesi safsızlıkların mevcudiyetini gösterir. Radyofarmasötik hazırlandıktan sonra aktivitesinin ölçülmesi gerekir ve radyofarmasötiğin ismini göstermek için kap işaretlenir, uygulama yolu, aktivitesi, kullanım süresi yazılır.

Ticari radyofarmasötiklerin aktivite ölçümü radyoizotop kalibratörleri ile yapılır ve bu aletlerin kalibrasyonlarının Ra-226, Cs-137 ve Co-57 gibi uzun yarı-ömürlü standart kaynaklar kullanılarak sıklıkla kontrol edilmesi gerekir.

Radyonüklid Safsızlık: Radyonüklid safsızlık, istenilen 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. İstenmeyen radyonüklidler, nükleer reaktör veya siklotronda radyonüklidin üretimi sırasında, hedef safsızlıklar nedeniyle oluşan istenilmeyen nükleer reaksiyonlardan oluşabilir. Bazen hedef materyali ve nükleer reaksiyonun tipinin değişimi ile sistem düzeltilebilir. Örneğin hedef Te-124'de (p,2n) reaksiyonundan I-123'ün üretimi; yalnızca I-125 safsızlığı üretilirken hedef I-127'de (p,5n) reaksiyonundan I-124, I-126, I-130, I-131 gibi daha fazla radyonüklid üretilir.

Radyonüklid safsızlıklar diagnostik bilgiye etki etmeksizin radyasyon dozunu arttırdığından dolayı önemlidir. En önemlisi istenilen radyonüklidin yarı-ömrü daha uzun olan safsızlıkları içermemesidir. Çünkü safsızlık yüzdesi zamanla artacaktır. Bu duruma bazı örnekler yarı-ömrü 6 saat olan Tc-99m'in yanında yarı-ömrü 67 saat olan Mo-99 safsızlığı, yarı-ömrü 13 saat olan I-123'de yarı-ömrü 4 gün olan I-124 safsızlıklarının mevcut olması gibi.

Radyonüklidlerin safsızlığının ölçümü örneklerden salınan γ -ışınlarının spektrumunu çok kanallı analizör ile NaI (TI) kristalli sintilasyon dedektörü veya Ge dedektörü kullanılarak yapılır. Ge dedektörü çok yüksek ayırma sağlar fakat çok pahalıdır.

Radyokimyasal Safılık: Radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığı, radyofarmasötüğün uygulanmasından sonra biyolojik davranışları saptayabilmek ve bununla beraber araştırmanın başarısı ve hastaya verilen doz açısından oldukça önemlidir. Radyokimyasal safsızlık son ürünün radyolitik veya kimyasal bileşenin işaretleme işlemi sırasında kimyasal reaksiyona girmesinin sonucu oluşabilir.

İşaretli bileşiklerin radyoliz ile bozunması konusunda radyoaktif materyalin spesifik aktivitesi, yayınlanan radyasyon enerjisi ve radyoizotop yarı-ömrü etkindir. Bileşiğin kararlılığı, ısıya maruz kalma süresi, sıcaklık değişimi ve radyoliz süresine bağlıdır. Sodyum askorbat, askorbik asit, sodyum sülfid radyofarmasötiklerin kararlılığı için sıklıkla ilave edilen maddelerdir. Hazırlanan radyofarmasötiklerin bozunmasını önlemek için buzdolabında ve karanlıkta saklanılmalıdır.

Radyokimyasal safsızlıklar önemlidir; çünkü istenilen radyofarmasötikten farklı biyodağılım gösterirler. Bu durum görüntüleme kalitesini azaltır, absorbe edilen radyasyon dozunu artırır ve diagnostik açıdan problemlere sebep olabilir. Radyokimyasal saflık in vitro analitik metodlar ve hayvanlarda in vivo biyolojik dağılım ile genelde saptanmaktadır. Örneğin; ^{99m}Tc ile işaretli bir radyofarmasötikte bulunan çok genel radyokimyasal safsızlık olan perteknetatın, triod ve karında lokalize olması nedeniyle SPECT (Single-photon Emission Computed Tomography) görüntüleme işlemleri sırasında görüntü kalitesi azalır. İn vitro olarak yapılan kalite kontrol yöntemleri aşağıda verilmektedir:

HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

İnce tabaka kromatografisi

Kağıt kromatografisi

Elektroforez

Jel filitrasyonu

Bu çalışmada kullanmış olduğumuz radyokimyasal safsızlık tesbiti yöntemleri ise aşağıda ayrıntılı olarak anlatılmaktadır.

İnce tabaka kromatografisi (ITLC): Bu yöntem radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığının saptanması için çok geniş çapta kullanılan bir yöntemdir. ITLC plakaları, destek maddesi (aliminyum, plastik, cam gibi) üzerine bir adsorbanın kaplanmasıyla oluşmuştur. Adsorban

maddeleri ise çoğunlukla selüloz, silikajel ve aliminyum oksit gibi maddelerdir.

İnce tabaka kromatografisinde orjine mikrolitre miktarındaki örnek uygulanmış olan ince tabaka şeriti, 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 çözünabilirliğe 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. Çözgenin polaritesi radyofarmasötiklerde radyokimyasal özellikleri ve çözünürlüğü etkiler. Çözgenler durgun fazda radyofarmasötiklerin bileşenlerinin uygun hızla taşınmasını sağlayacak şekilde seçilir. 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 ITLC (Instant Thin Layer Chromatography) şeritinde çözgen istenilen mesafeye taşındıktan sonra tanktan çıkarılır. Oda sıcaklığında kurutulur ve şerit orjinden itibaren 5 mm parçalar halinde kesilir. Herbir parça sintilasyon dedektöründe sayılır.

Diğer bir sistemde ITLC plakaları hareketli yatay bir dedektör sistemiyle plaka boyunca taratılarak sayım alınabilir. Bu sistemlerde genelde tek kanallı kolimatörlerle donatılmış Nal dedektörü kullanılır. Hem sayım hem de kesip/sayma ile herbir pikte toplam aktivitenin

yüzdesinden ITLC plaka boyunca aktivitenin profili tesbit edilir ve radyofarmasötiğin radyokimyasal saflığı hesaplanabilir.

Herbir radyokimyasal bileşenin taşınım mesafesi R_f (relative front) değeriyle gösterilir. Bu mesafeler orjinden çözgenin taşındığı nokta ve radyokimyasal bileşenlerin konsantre olduğu mesafe orjinden ölçülerek tesbit edilir.

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

R_f değerleri bilinen radyokimyasallar farklı çözgen ortamlarında saptanabilmektedir. Bu tesbit edilen R_f değerleri radyofarmasötiğin radyokimyasal saflığın hesaplanmasında önem taşırlar (Kowalsky and Perry, 1987; Theobald, 1989; Saha, 1992).

Kağıt Elektroforezi: Mikrogram düzeyindeki maddeler diğer maddelerden hızlı bir şekilde ayrılmayabilir. Karışımında maddeler iyonize olabildiğinde veya bazıları iyonize olup diğerleri olmadığında maddelerin iyonizasyon yükü ve kütlelerine göre elektrik alanda çözelti içinde karışıma bağlı olarak oldukça basit bir şekilde ayrılımları sağlanabilir.

Elektroforezin iki esas tekniği vardır; serbest elektroferez ve bölge elektroforezi. Serbest elektroferezde ayrılacak maddeler çözeltidedir, devre kapatıldığında difüzyon hareketi ile serbest kalırlar. Bu bir dinamik sistemdir ve genelde ilerleme hesaplanarak tayin edilir.

Bölge elektroforezinde test maddeleri destek ortamına relatif genişlikte çözelti iz veya nokta şeklinde uygulanır. Destek ortamı genelde filtre kağıdıdır.

Kağıt elektroforezi kağıt kromatografisinden çok daha basittir. Test maddeleri çekici elektrodlar yoluyla taşınır. Çözeltide iyonize olan maddeler elektrik yüküne sahiptir. Elektrik alanında her bir iyon taşınım yüküne bağlı olarak iki kutuptan birine taşınacaktır. Ters yükler birbirini çektiğine göre negatif yüklü iyon pozitif yüklü 'anoda' taşınacak, negatif yüklü iyonlar ise pozitif yüklü 'katot' a doğru taşınacaklardır. Herhangi bir kutba taşınmayanlar ise yüksüz maddelerdir.

Yüklü iyonların yapısı valens teorisinden türetilmektedir. Bu teori bileşik içindeki atomlar arasında halkalı yapılar veya bağların iki tipinin olabileceği durumlardır; elektrovalent ve kovalent. Elektrovalent bağda bir atomun dış orbitallerindeki elektronlar birleştiği atomun orbitallerine tamamen transfer edilmiştir. Böylece her ikisi de birbirinden zıt yüklere sahip olurlar ve aralarında elektrostatik çekim vardır. Böylece bileşik sulu çözeltide yüklü parçacıklara ayrılır. Transfer edilen elektronları olmaksızın dolaşan pozitif yük taşıyan atom diğer atomdan bağımsız bir şekilde gezer, transfer edilmiş elektronları alan da negatif yük taşır. Bunlar yüklü atomlar veya radikal iyonlardır ve bileşiğin iyonize olabileceğini gösterir.

Kovalent bağda bir atom elektronlarını diğerleri ile paylaşır. İki bağlı atomlar da karşılıklı elektron çiftleri paylaşılır. Elektrovalent bileşiklerin iyonizasyonu elektroforez için temel sağlar. Farklı işaretli elektrovalent iyonlar ve yükler farklı hızlarda zıt elektrotlara taşınması ile elektrik alanlarda maddelerin ayrılması ve taşınımını mümkün kılarlar. Yüksüz kovalent moleküller taşınmazlar.

Pratikte elektroforez filitre kağıdının uygun bir parçası tampon çözelti ile nemlendirilir ve kullanılacak elektrik devresi ile temas edebilecek şekilde yerleştirilir. Elektroforez kabı iki bölümden oluşur ve her bir bölüm tampon çözelti içerir. Bir bölümde pozitif kutbu (anot) diğer bölüm negatif kutuba (katot) ulaşır. Islak kağıt her iki ucu tampon çözeltiye batacak şekilde yerleştirilir. Örnek nokta veya iz şeklinde

kağıdın ortasına uygulanır. Elektrik devresi açılır, devrenin yönetiminde tampon-tuzları hareketinden dolayı tamponla ıslatılmış kağıt iki elektrod bölme arasında köprü oluşturmuştur. Pozitif yüklü iyonlar katoda doğru, negatif yüklüler ise anoda doğru taşınmaktadır. Elektroforez sonuçları iyonların boyutlarının büyüklükleri hakkında bilgi verir. Büyük bir boyuta sahip olanlar yavaş taşınacaklardır, büyük yüklüler ise hızlı taşınırlar (Feinberg and Smith, 1962).

Kağıt veya poliakrilamid jel elektroforezi uygun bir tamponda kağıt veya poliakrilamid jel üzerine radyoaktif örneğin uygulanmasından ibarettir ve belirli zaman aralığında voltaj ayarlanarak kağıt veya jele uygulanır. Örneğin bileşenleri kağıt veya jel ortamı boyunca iyonik mobiliteye bağlı olarak farklı pozisyonlarda taşınır. Elektroforezden sonra şerit veya jel kolonu boyunca aktivitenin dağılımı radyokromatografik sayıcı veya dedektör tarafından saptanabilir.

İsoelektrik pH'nın altında veya üstündeki tampon çözeltide protein molekülleri yüklü olacaklarından çoğu proteinler uygun bir tampon kullanımı ile bu metot ile ayrılabilir. Taşınan miktar yeterli ise uygun maddeler (proteinler ve amino asitler için ninhidrin gibi) ve örnekler arasında renklendirme yapılması elektrogramların gelişiminde avantaj sağlar, örneğin iyotlanmış insan serum albümini ve serbest iyodun iyi ayrılması veronal tamponda elektroforez ile yapılabilir. Radyoiyotlanmış albümin ninhidrin püskürtülmüş elektrogram ile tanımlanabilir, bu durumda albümin renklenmiş nokta olarak görünür (Saha, 1992).

March ve arkadaşları (1989) tarafından yapılan bir çalışmada sulu çözelti ortamında $^{99m}\text{TcBr}_6^{2-}$ ün ligand-değişim reaksiyonları sonucunda üç kompleksin olduğu ($\text{TcBr}_4(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{TcBr}_5(\text{H}_2\text{O})_2^-$, TcBr_6^{2-}) görülmüştür. Bu ürünlerden ikisi anoda taşınırken diğeri nötral bir kompleks olduğu için orjinde kalmaktadır (March et al., 1989).

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 herbir parçacığın 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 da bilgi edinilmesi mümkündür.

2.6.2 KALİTE KONTROLDEN SONRA RADYOFARMASÖTİKLERDE ARANAN ÖZELLİKLER

2.6.2.1 pH

Tüm radyofarmasötikler kararlık için optimum pH aralığına sahip olmalıdırlar. pH kontrolü radyofarmasötiklerin stabilitesinde önemli bir faktördür. pH saptamaları rutin olarak yapılmamasına rağmen potansiyel problem bölgelerini tanımlamak için önemlidir. Kanın yüksek tamponlama kapasitesinden dolayı pH 2-9 arasında değişebilir ancak radyofarmasötiğin ideal pH'nın 7.4 olması gerekir. İyonik kuvvet ve pH radyofarmasötiğin stabilitesi için önemli bir faktördür.

Örneğin radyoiyot çözeltisi içindeki iyodun uçuculuğunu önlemek için alkalide tutulması gerekir. Diğer bir örnekte İndiyum-113m ve İndiyum-111 ile çalışırken In'un kolloid oluşumunu önlemek için düşük pH'larda çalışılması gerekir. Radyofarmasötiklerin işaretlenmesinde kullanılan işaretleme reaksiyonları pH'ya bağlı olabilir. Birkaçı dışında çoğu ürünlerin pH'sı 4-8 aralığındadır.

2.6.2.2 Kimyasal Saflık

Kimyasal saflık, radyofarmasötiklerde tanımlanamayan kimyasal özelliklerin mevcudiyetinin ölçümüdür.

Siklotronlarda üretilen radyoizotoplar; In-111'de Cd ve Ga-67'de Zn gibi hedef maddeden gelen kimyasal safsızlıkları içerirler. Bu safsızlıkların düzeyi % 0.5'in üzerinde olabilir ve bunların dedeksiyonu için atomik absorpsiyon spektrofotometrisi kullanılmaktadır.

Radyoizotop jeneratörlerinde üretilen radyoizotoplardaki safsızlıklar radyoizotop jeneratörünün eluantlarından gelir. En genel kimyasal safsızlıklar jeneratör kolonundaki paket maddesinden gelir. Tc-^{99m} kolonunda, safsızlık alimünyum kolonundan gelen alimünyumdur. Eluantta alimünyumun mevcudiyeti işaretleme reaksiyonu sırasında interferasyon yapabilir. Örneğin alimünyumun mevcudiyetinde ^{99m}Tc-sülfür kolloidin stabil olmamasına sebep olduğu görülmüştür.

2.6.2.3 Parçacık Büyüklüğü

Kolloidal olan veya olmayan bütün ilaçlar verilen amaç için uygun parçacık büyüklüğünde olmak zorundadır. Örneğin ^{99m}Tc-sülfür kolloidal ürünlerde parçacık büyüklüğü 80-500 nm arasında oldukça farklı boyutlarda olabilirler. Bu, elektron mikroskobu veya ultra-mikroskopu ile kontrol edilebilir. Bu gözlemlere ilaveten istenen özelliklerin hayvanlarda doku dağılım çalışmaları ile doğrulanması gerekir. Büyük tanecikli parçacıklar akciğerde toplanırken uygun boyuttaki kolloidlerinde karaciğerde lokalize olması gerekir.

Nükleer tıpta kullanılan radyoaktif işaretli parçacıkları iki grupta toplayabiliriz. Örneğin ^{99m}Tc-mikroforez ve ^{99m}Tc makroagretet albumin gibilerin yarıçapı 10-15 µ m'dir. Halbuki karaciğer perfisyonu görüntülemek için başlıca kullanılmakta olan ^{99m}Tc kolloidleri ve ^{99m}Tc

milimikroforez albumin gibilerin yarıçapı 10 nm ila 2 μm 'dir. Karaciğeri görüntüleyebilmek için kolloidin parçacık boyutunun 10 nm-2 μm aralığında olması gerekir. Bu aralığın üstündeki boyuttaki kompleksler dalağın görüntülenmesinde kullanılır.

2.6.2.4 Biyolojik Safılık

Biyolojik safsızlığın aşamaları, sterilizasyon, apirojenite, toksite dir.

Sterilizasyon: Steril çözelti, patolojik veya patolojik olmayan yaşayan organizmalar içermeyen bir çözeltidir. Sterilizasyon radyofarmasötüğün hazırlanmasında mikroorganizmalar veya hiç bir yaşayan bakterinin olmadığını gösterir. Uygulamalar için tüm hazırlıklarda her zaman söz konusu olan çözgen ve çeşitli ilave maddelerin, ürünün yapısına bağlı olarak uygun yöntemler ile sterilize edilmeleri gerekmektedir.

Otaklavda, radyofarmasötikler 15-20 dakika için 18 psi (pound per square inch) basınç altında 121 °C'de buharla ısıtılarak sterilize edilmektedir. Buhar sterilizasyonunun bu tipi radyofarmasötik çözeltilerinde mevcut olan mikroorganizmaları öldürür. Otaklav yalnızca ısıya dayanıklı sulu çözeltiler için uygulanır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -işaretli örnek ve iyotlu proteinler gibi yağ-bazlı örnekler ve ısıya hassas radyofarmasötiklerde ısı moleküle zarar vereceğinden buhar sterilizasyonu kullanılmaz. Bu yöntemin oldukça uzun olmasından dolayı $^{113\text{m}}\text{In}$ ve ^{18}F gibi kısa-ömürlü radyoizotoplar için de uygun değildir.

Isıtılmıyan ürünler için steril membranlar ile filtrasyon tercih edilir. Radyofarmasötikler membran filtrelerden süzülerek kolayca sterilize edilebilir. Genel olarak, membran filitrelerin boyutu 0.45 μm dir. Kan ürünlerinin sterilizasyonu ve küçük mikroorganizmalarla kontaminasyonundan şüphelenen örneklerin sterilizasyonu için 0.22 μm m'den daha küçük pore boyutundaki membranlar kullanılır. Bu

radyofarmaside çok genel bir sterilizasyon yöntemidir ve kısa ömürlü radyoizotoplarla, ısıtılamıyan radyofarmasötikler için seçilen bir yöntemdir. Radyofarmasötikler, ham maddelerden oluşuyorsa ürünlerin pirojenik materyel ve organizmaları içermemesi için sterilize cam malzeme ve kaplar kullanılmalıdır.

Apirojenite: İnsana uygulamak için tüm radyofarmasötiklerin apirojen olması gerekmektedir. Pirojenik: madde; ya bakteri, mantar veya virüslerin metabolizma atıkları ya da bazı organik maddelerin parçalanma mahsulleri olabilir. Fosfolipid, polisakkarit, protein yapısındaki maddelerdir. 0.05-1 μm boyutunda ve genelde çözünebilir ve ısıya dayanıklıdır.

Bakteriyal ürünler olarak adlandırılan endotoksinler pirojenlerin başlıca örneğidir, fakat çeşitli kimyasallarla birlikte radyofarmasötiğin çözeltisine istenmeyen pirojenler ilave edilmiş olabilir. Pirojenik reaksiyonlar, hastalarda uygulamadan sonra 15 dakika -1 saat içinde gelişmektedir. Fakat ilk belirtilerden sonra 10-12 saat içinde genelde azalır. Bu reaksiyonlar nadiren öldürücüdürler. Pirojenler; başlıca bakteri metabolizmasından arttığından dolayı, pirojenik kontaminasyonu önlemek için filtrasyon en çok başvurulmuş bir yöntemdir. Herhangi bir hazırlanan prosedürdeki temiz koşullar altında; alet, çözelti ve cam malzemelerin steril olması gerekir. Cam malzemeler; birkaç saat 175 ° C'de sıcak-hava sterilizasyonu ile apirojen yapılabilir.

Toksisite: Herhangi bir radyofarmasötiğin insan için kullanımı uygun görülmeden önce, diğer ilaçlarda olduğu gibi onun toksik etkisi ve güvenli dozu saptanmalıdır. Toksik etkiler radyofarmasötiğin uygulanmasından dolayı, vücutta farklı organların fizyolojik fonksiyonları veya histolojisinde değişimler görülmesidir. Hatta ölüme

sebepe olabilir. Şiddetli ve kronik toksisite için bu testler sıçan, tavşan, fare, köpek gibi çeşitli hayvanlarda gerçekleştirilebilir.

Miktar, radyofarmasötiklerin toksik etkisi olarak tanımlanır. LD 50/30 olarak adlandırılır; radyofarmasötiklerin uygulanmasından sonra herhangi bir türde 30 gün içinde % 50 ölümü oluşturmak için gerekli dozdur. LD 50/30 saptaması için test maddesi büyük bir hayvan grubunda arttırılan dozlarda enjekte edilir, materyalin uygulanmasını izleyen 30 gün içinde % 50 ölüme sebep olduğu gözlenen doza materyal için LD 50/30 dir. Bazı örneklerde LD 50/30 yerine LD 50/60 ilacın güvenlik faktörünün kriteri olarak seçilmektedir.

Kullanılan radyofarmasötiklerin miktarı genelde küçük olduğundan toksik etki minimuma indirilmiştir (Saha, 1992; Theobald, 1989; Kowalsky and Perry, 1987).

Lipofilite (Hidrofobiklik): Hidrofobiklik ve lipofilite arasında ince farklılıklar olmasına rağmen hidrofobiklik ve lipofilite terimleri bileşiklerin aynı fiziksel parametrelerini tanımlamak için kullanılırlar. Lipofilite, 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. Oktanol / C_{su} oranı P dağılım katsayısı olarak verilir ve kantitatif yapı-dağılım ilişkilerinde bu değer 'log p' olarak ifade edilir.

^{99m}Tc-radyofarmasötikleri için oktanol/su sistemi bazı sınırlamalara sahiptir. Gerçek P değerleri saf bileşiklerin kullanımlarına bağlıdır. Oysa ^{99m}Tc kimyasında saflığın aktif olarak gerekliliği son derece nadirdir. Sıklıkla kompleks karışımları, tekli ligand ve hidroliz olmuş indirgenmiş Tc ve indirgenmemiş Tc miktarı her zaman ortamda mevcuttur. Hidrofilik safsızlığın küçük miktarı kompleksin lipofilite değerindeki gözlenen dağılma oranını önemli bir derecede düşürebilir.

$$P (\text{Lipofilite}) = \frac{\text{Sayım (oktanol)}}{\text{Sayım (su)}}$$

İyonlaşabilen bileşikler lipofilite incelemesinde karışıklığa neden olurlar. Bir bileşiğin iyonlaşma şeklinin lipofilitesinin iyonlaşma şeklinden daha az olması gerektiği açıktır. Bu durumda gözlenen lipofilite iyonlaşma derecesine ve bununla ilgili olarak sulu ortamın pH'sına kuvvetle bağlıdır. Genellikle bileşiğin iyonize şeklinin lipofilik membranlardan geçemediği düşünülür ve radyofarmasötiğin kantitatif yapı-dağılımı ile iyonlaşmayan şeklin ilgili olduğu düşünülür. Bu durumda gerçek lipofilite

$$P = \frac{C (\text{oktanol})}{C (\text{su}) (1-X)}$$

X= iyonizasyon derecesi

Radyofarmasötiğin intravenöz uygulamasından hemen sonra plazmada serbest olan radyofarmasötik konsantrasyonu ve plazma proteini ve kan hücrelerinin yüzeyleri gibi kan bileşenlerine bağlı olanlar arasında bir denge oluşur. Bazı fiziksel ve kimyasal faktörler bu bağlanmayı etkileyebilir fakat hidrofobik etkileşim bu dengeyi etkileyen ana faktörlerden biri olarak düşünülür. Plazma proteinine bağlanmayı inceleyen hiçbir yeterli yöntem olmamasına rağmen (herhangi bir ölçme şekli serbest ve plazma proteinine bağlı madde arasındaki dengeyi göstermez) plazma proteinine bağlanma ve lipofilite arasında lineer, pozitif bir ilişki vardır. Bağlanma gücü ve denge şekli radyofarmasötiğin nihai kaderini kuvvetle etkiler (Theobald, 1989).

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar

Na ¹³¹I (p=7-11 NaOH çözeltisi) CIS (Nükleer Tıp A.B.D'dan sağlandı).

İodogen (Sigma)

Diazepam (Roche)

Zopiclone (Rhone Poulenc) (Eczacıbaşı İlaç A.Ş.'nden hediye olarak sağlandı).

HCl (Merck)

İzopropil alkol (Merck)

n- Bütanol (Merck)

Asetik asit (United)

NH₃ (Merck)

Propilen glikol (Merck)

Serum fizyolojik (Eczacıbaşı)

Diklorometan (Merck)

Etil alkol (Teknik)

Kloramin T (Merck)

Sodyum sülfid (Merck)

ITLC Plastic sheets Sellüloz F (Merck)

Elektroforez cihazı (Gelman Deluxe)

UV Spektrofotometresi (Shimadzu UV. Vis. 260)

3 x3 NaI(Tl) kuyu tipi sintilasyon gama dedektörü (Tenneltec marka ve Tenneltec PCA II 8196 bilgisayar programlı analizör).

3.2 KULLANILAN YÖNTEMLER

3.2.1 İnce Tabaka Kromatografisi Yöntemi (Instant Thin-Layer Chromatography)

İnce tabaka kromatografisi yöntemi ile ilgili genel bilgiler 2.6.1'de verilmiştir.

ITLC Koşulları:

ITLC destek maddesi: Merck 0.1 mm Cellulose F

Banyo ortamları :

ITLC1: [n-bütanol- H₂O- asetik asit (4/2/1)] (pH=3) (BuOH/Su/AcOH).

ITLC2: [izopropil alkol- n-bütanol- 0.2 N NH₄OH (2/1/1)] (pH=10).
(İzo/BuOH/NH₄OH)

ITLC süresi : 2.5 saat.

20×20 cm boyutlarındaki (Merck 5565) ITLC selüloz kaplı ITLC tabakaları 1.5×1.0 cm boyutlarında kesildi. Tabandan 0.5 cm yüksekliğinde işaretlenerek ITLC'sine uygulanacak örnekten damlatıldı. Damlatma noktası banyo çözeltisine değmeyecek şekilde ITLC banyosuna daldırıldı. Banyodan sonra kurutuldu ve sellobant ile kaplandıktan sonra 0.5 cm'lik parçalar halinde kesildi. Bu parçalar kuyu tipli NaI(Tl) dedektörü ile çok kanallı analizörde I-131'in 364 keV'lik γ pikinin işaretlendiği kanal aralığında sayıldı.

ITLC kromatogramları R_f ile sayım değerleri arasında grafik çizilerek elde edildi. Çalışılan bileşiklere ait R_f ve işaretleme verimleri bu grafiklerden yararlanılarak hesaplandı.

3.2.2 Elektroforez Yöntemi

Elektroforez yöntemi ile ilgili genel açıklamalar 2.6.1'de verilmiştir.

Elektroforez Koşulları:

Uygulanan voltaj :250 volt.

Uygulama süresi :2 saat.

Tampon çözeltisi :[n-bütanol- H₂O- asetik asit (4/2/1)] (pH=3).

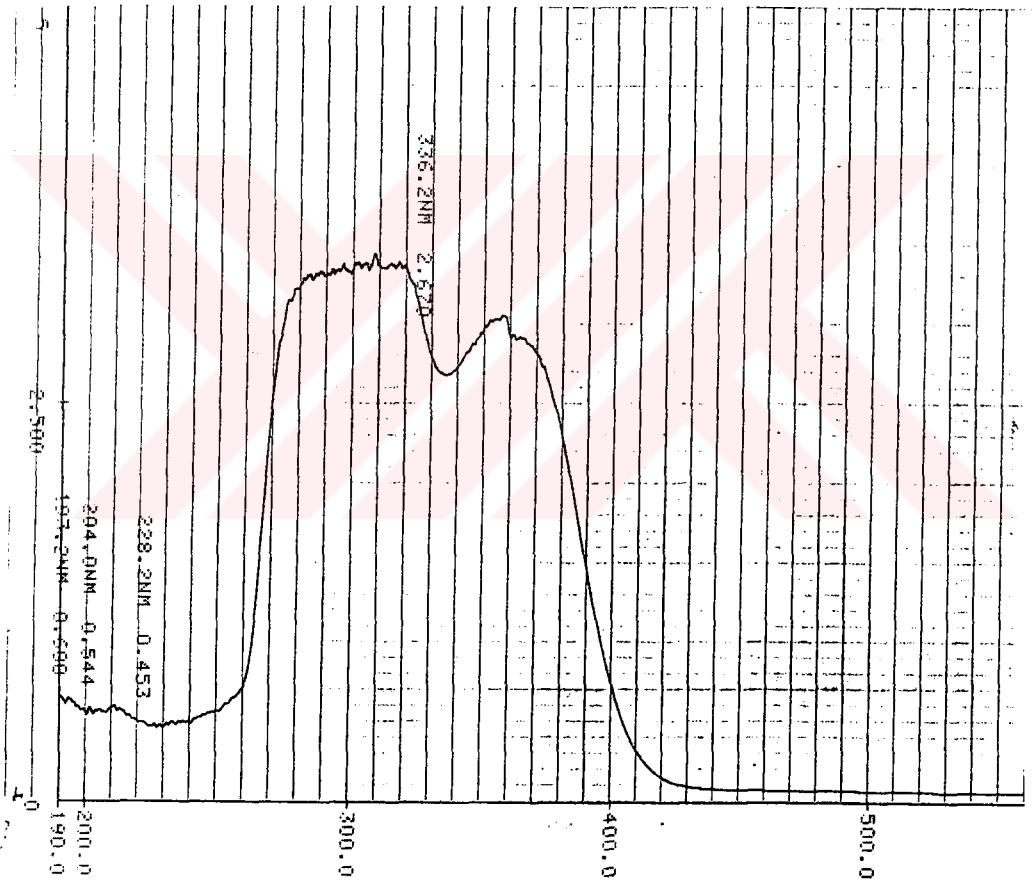
Esası poliselüloz asetat olan elektroforez kağıdının pozitif, negatif kutup ve uygulama noktaları işaretlenerek kağıt tampon çözeltisinde ıslatıldı. Örnek ortada bulunan uygulama noktasına damlatıldıktan sonra içinde tampon çözeltisi bulunan küvet içine konuldu. 2 saat süre ile 250 voltluk voltaj uygulandı. Deney sonucunda kağıt kurutularak 1 cm'lik parçalar halinde kesildi. Bu parçalar kuyu tipli dedektör ile NaI(Tl) çok kanallı analizörde I-131'in 364 keV'lik γ piki işaretlenmiş kanal aralıklarında sayıldı. Elektroforez diagramları parça sayısı ile sayım değerleri arasında grafik çizilerek elde edildi. İşaretlenen bileşiklere ait işaretlenme verimleri bu grafiklerden yararlanılarak hesaplandı.

3.3 İodogen Kaplı Tüplerin Hazırlanması

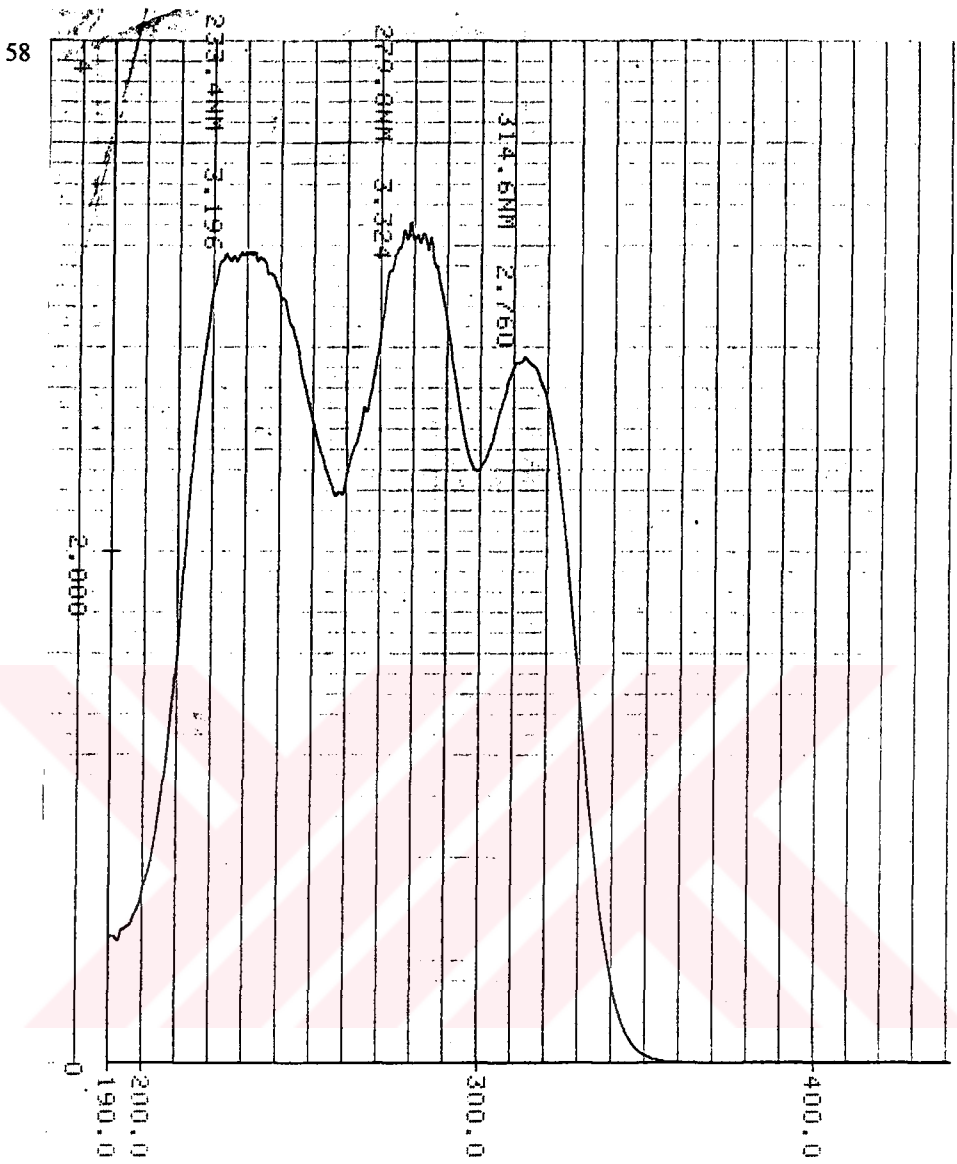
1 mg iodogen, 1.5x6 cm'lik kapaklı tüpler içinde 1 ml CH₂Cl₂'de çözülerek hazırlandı. CH₂Cl₂ hava akımı ile uçuruldu ve duvarları ince film şeklinde iodogen kaplı tüpler, kullanılıncaya kadar 0°C'de saklandı.

3.4 İnaktif Diazepam'ın UV Spektrumları ve UV Spektrofotometrisi Kullanılarak R_f Değerlerinin Tesbiti

% 50'lik HCl çözelti ortamındaki toz halindeki diazepam ve ampul (% 40 propilen glikol, % 5 sodyum benzoat, % 10 etil alkol, % 1.5 benzil alkol) diazepam örnekleri UV vis. spektrofotometrisi'nde dalga boyu taratılarak UV spektrumları alındı (Şekil 3.1 ve Şekil 3.2).



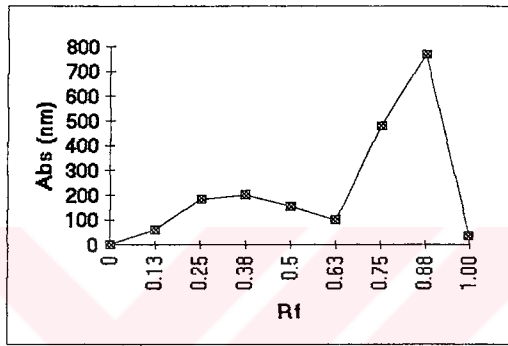
Şekil 3. 1 % 50 HCl ortamdaki diazepam'ın UV spektrumu.



Şekil 3.2 Ampul ortamdaki diazepam'ın UV spektrumu.

10x1 cm'lik ITLC şeriti dipten 0.5 cm işaretlenerek diazepam örneği uygulandı. Banyo çözeltisi içine ITLC şeridi daldırıldı ve banyo çözeltisinin ilerlediği son nokta işaretlendi. Bu şerit başlangıçtan itibaren 0.5'er cm kesilerek asidik ortamdaki örnek için % 50 HCl içeren ve ampul ortamındaki örnek için ise alkol içeren numaralandırılmış tüpler içine her bir parça konularak yarım saat beklendi. Her bir tüpteki örneğin

absorpsiyonları 336 nm dalga boyunda ölçüldü. R_f ve absorpsiyon değerleri arasında grafik çizildi. Böylece diazepam'ın R_f değerleri inaktif olarak farklı banyo ortamlarına göre saptandı. Şekil 3.3'de % 50'lik HCl ortamındaki diazepam'ın ITLC 1 kromatogramı görülmektedir. Ampul ortamı için de benzer grafik elde edildi.



Şekil 3.3 % 50 HCl ortamdaki diazepam'ın kromatogramı (ITLC 1).

3. 5. İnaktif İyododiazepam'ın Elde Edilmesi

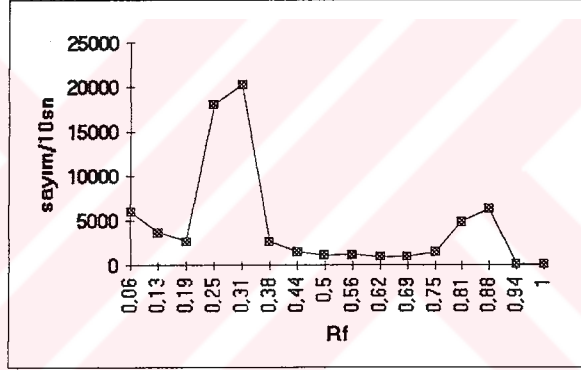
10 mg diazepam içeren çözelti 15 mg iodogenli tüp içine konuldu ve diazepam/iyot/iodogen oranları stökiyometrik olarak 1/2/1 olacak şekilde 0.0116 gr KI ilave edildi. 2 saat beklendi ve oluşan çökelek Whatman 41 süzgeç kağıdı kullanılarak süzüldü. Ortamdaki iyodun aşırısını uzaklaştırmak için 0.2 N Na₂SO₃ çözeltisi ile yıkandı. Dowex 1 anyon değiştirici reçineden geçirildi ve pH nötralleştirildi, 3 ml fosfat tamponu (pH= 6.78) ile çöktürüldü. Çökelek kurutuldu ve desikatörde saklandı.

% 50 HCl ortamda yapılan çöktürme işleminden önce doymuş NaOH ile pH=7'e yükseltildikten ve fosfat tamponu ile çöktürme işlemi gerçekleştirildi. Çökelek santrüfjülenerek alındı ve daha sonra açık hava

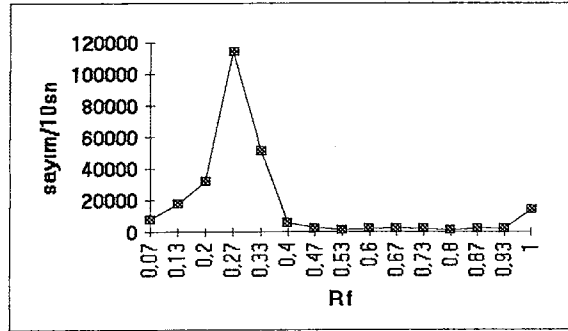
ortamında kurutularak desikatörde saklandı. Bu örnekler IR (Infrared) ve NMR (Proton Nükleer Manyetik Rezonans), MS (Kütle) spektrumlarının alınmasında ve erime noktasının tesbitinde kullanılmak üzere saklandı.

3.6 I-¹³¹'in ITLC Kromatogramları

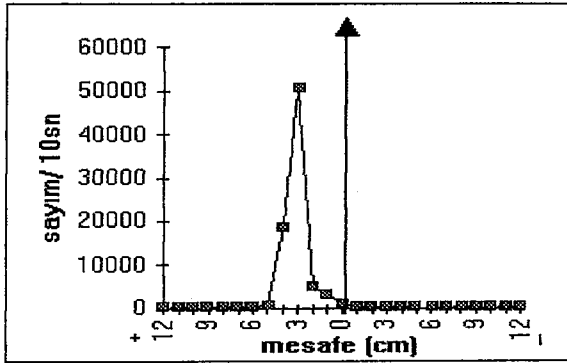
İlk olarak ¹³¹I-'ın farklı banyo ortamlarında ITLC yöntemine göre R_f değerleri tesbit edildi. Şekil 3.4'de ITLC 1 ortamında, Şekil 3.5'de ise ITLC 2 ortamında elde edilen kromatogramlar ve Şekil 3.6'da ise elektroforez diagramı görülmektedir.



Şekil 3.4 ¹³¹I- 'in kromatogramı (ITLC 1).



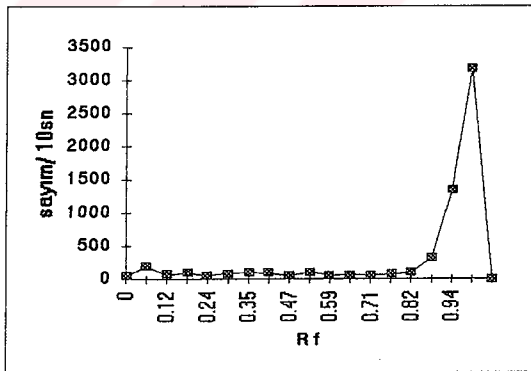
Şekil 3.5 ¹³¹I- 'in kromatogramı (ITLC 2).



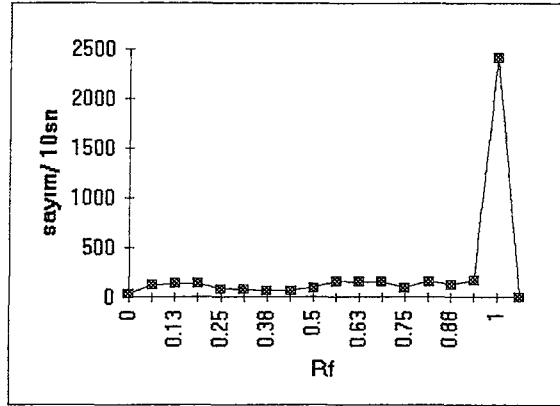
Şekil 3.6 $^{131}\text{I}^-$ 'in elektroforez diagramı.

3.7 Yükseltgenmiş I-131'in Farklı ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerlerinin Belirlenmesi

İodogenli tüpler içersine $^{131}\text{I}^-$ konularak 25 dakika beklendi ve örnek ITLC şeritlerine uygulandı. Bu deneylere ait ITLC kromatogramlar Şekil 3.7 ve 3.8'de verilmiştir.



Şekil 3.7 Yükseltgenmiş I-131 'in kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.8 Yükseltgenmiş I-131 'in kromatogramı (ITLC 2).

3.8 DIAZEPAM'IN YÜKSELTGEN AJAN OLMADAN I-131 ile İŞARETLENMESİ (KONTROL)

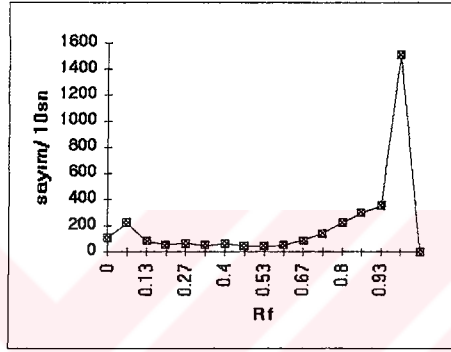
Diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi için iki farklı ortam kullanıldı.

1. % 50 HCl (v/v) çözeltisinde çözünmüş diazepam (Kuvvetli asidik ortam).
2. % 40 propilen glikol, % 5 sodyum benzoat, % 10 etil alkol, % 1.5 benzil alkol karışımında çözünmüş diazepam (pH= 6).

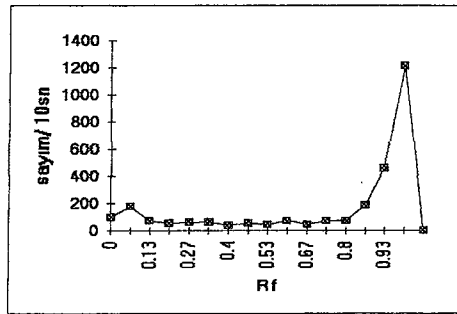
3.8.1 % 50 HCl Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesi (Kontrol)

Toz halindeki diazepam'ı çözmek için su, alkol ve aseton gibi çözügenler denenmiş, fakat çözünürlüğünün çok küçük olması nedeniyle çözme işlemi için % 50'lik HCl (v/v) tercih edilmiştir. Konsantrasyonu 1 mg/ml olacak şekilde diazepam çözeltileri taze olarak hazırlanmıştır.

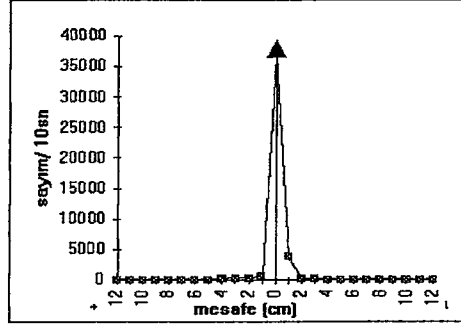
İlk olarak iodyensiz ortamda (kontrol) ^{131}I ile işaretlenme olup olmadığına bakıldı. 1 ml taze hazırlanmış diazepam çözeltisi bir tüpe konuldu ve üzerine 3.7-11.1 MBq (100-300 μCi) aktivitede Na^{131}I ilave edildi, 25 dakika beklendi. Radyokimyasal saflığı ITLC ve elektroforez yöntemleri ile saptandı (Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11).



Şekil 3.9 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'nin (kontrol) kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.10 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'nin (kontrol) kromatogramı (ITLC 2).

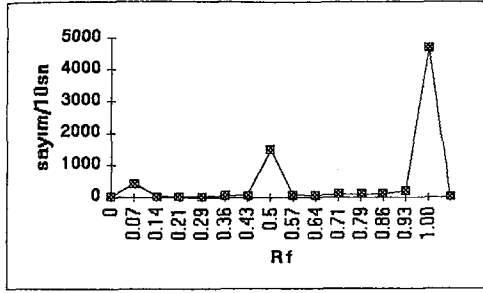


Şekil 3.11 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (kontrol) elektroforez diagramı.

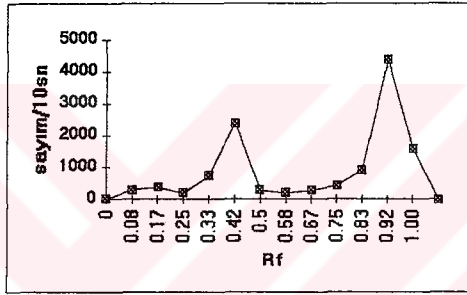
3.8.1.1 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesi

1 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan diazepam çözeltisi yaklaşık 10 gün oda sıcaklığında bekletildikten sonra alınan çözelti ile yapılan I-131 ile işaretleme deneyleri sonucunda elde edilen ITLC kromatogramları Şekil 3.12 ve Şekil 3.13'de verilmiştir. Şekillerden de işaretlenme sonunda iki farklı bileşiğin oluştuğu görülmektedir.

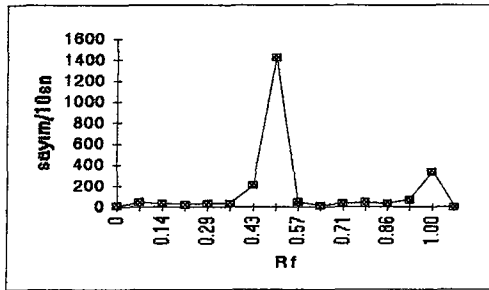
Bu işaretlenme sonucunda reaksiyona girmemiş radyoaktif iyodun ayrılması amacıyla işaretli diazepam çözeltisi Dowex 1 anyon değiştirici kolondan geçirilmiştir. Dowex 1 anyon değiştirici kolonda reaksiyona girmemiş iyodür tutulurken ^{131}IDZ eluent ile aşağı geçmiştir. Kolondan çıkan çözeltiden örnek alınarak ITLC yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15).



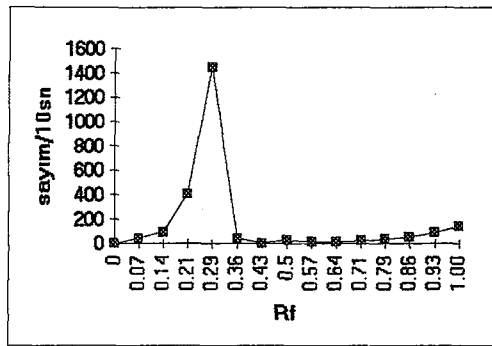
Şekil 3.12 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'nin (kontrol) kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.13 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'nin (kontrol) kromatogramı (ITLC 2).



Şekil 3.14 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'nin (kontrol) Dowex 1'den sonra kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.15 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (kontrol) Dowex1'den sonra kromatogramı (ITLC 2).

% 50 HCl ortamındaki diazepam'ın stabilite deneyleri sonucunda elde edilen kromatogramlardan faydalanılarak belirlenen iyododiazepam (IDZ) bileşiklerinin R_f değerleri Çizelge 3.1'de görülmektedir.

Çizelge 3.1 ^{131}IDZ ve $^{131}\text{IHidroliz}$ Ürünü Bileşiklerinin ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.

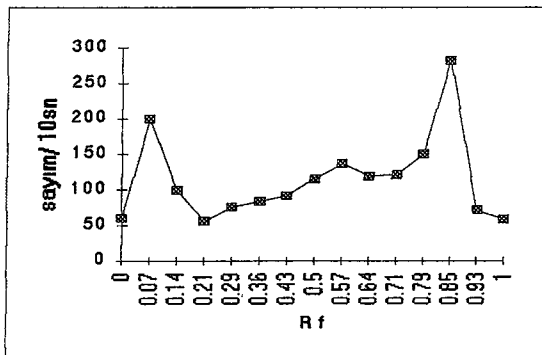
Banyolar	ITLC1 (BuOH/Su/AcOH)	ITLC2 (İzo/BuOH/NH ₄)
	R_f	R_f
$^{131}\text{IHidroliz}$ Ürünü	0.33 - 0.50	0.43 - 0.57
^{131}IDZ	0.91 - 1.00	0.88 - 1.00

3.8.2 Ampul Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesi (Kontrol)

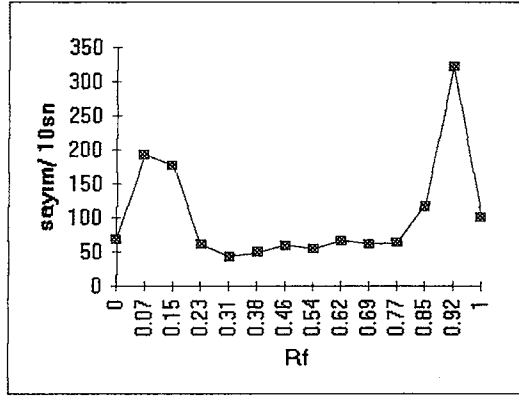
Ampul (% 40 propilen glikol, % 5 sodyum benzoat, % 10 etil alkol, % 1.5 benzil alkol) ortamdaki diazepam içinde herhangi bir yükseltgen olmadan kontrol deneyleri yapıldı. Fakat bu ortamda diazepam'ın I-131 ile kendiliğinden işaretlenmesinin mümkün olmadığı görülmüştür.

3.9 KLORAMİN-T (CAT) YÖNTEMİNE GÖRE DİAZEPAM'IN I-131 İLE İŞARETLENMESİ

İlk basamakta 1 mg/ml % 50 HCl ortamındaki diazepam örneği alınarak 5.6 mg/ml konsantrasyonundaki CAT çözeltisi ve taşıyıcısız aktivitesi 3.7-11.1 MBq (100-300 μ Ci) olan Na¹³¹I ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra örnek alınarak radyokimyasal saflığı ITLC kromatogramları ile saptandı. ITLC kromatogramları Şekil 3.16 ve Şekil 3.17'de görülmektedir.



Şekil 3.16 % 50 HCl ortamındaki ¹³¹IDZ'ın 20-25 °C'deki kromatogramı (ITLC 1).



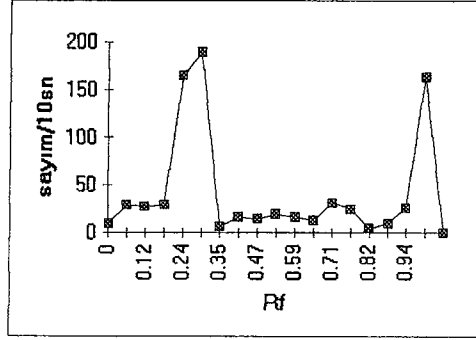
Şekil 3.17 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın 20-25 °C'deki kromatogramı (ITLC 2).

3.9.1 Diazepam'ın CAT Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler

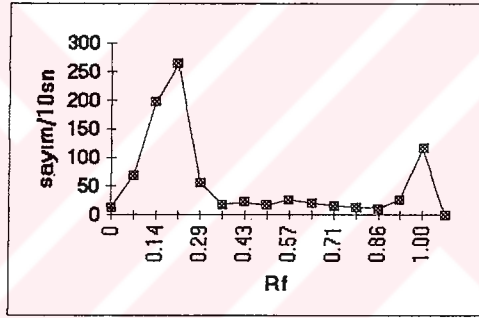
Kloramin-T yöntemine göre diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesinde işaretlenme verimine etki eden sıcaklık, CAT miktarı ve reaksiyon süresi gibi parametreler incelenmiştir.

3.9.1.1 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi

ITLC kromatogram sonuçlarından da görüldüğü gibi işaretlenme verimin düşük olması nedeniyle sıcaklık uygulanmasına karar verildi. Aynı koşullarda 50-60 °C sıcaklıkta 30 dakika beklenerek yapılan deney sonucunda elde edilen ITLC kromatogramları Şekil 3.18, 3.19'da verilmiştir.



Şekil 3.18 :% 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın 50-60 °C'deki kromatogramı (ITLC 1).

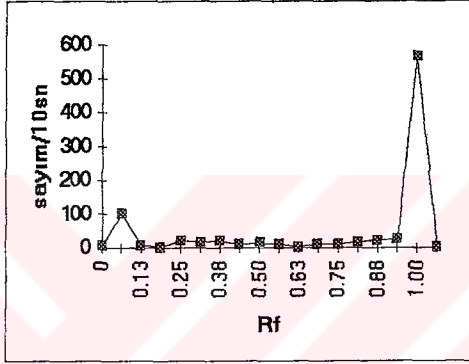


Şekil 3.19 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın 50-60 °C'deki kromatogramı (ITLC 2).

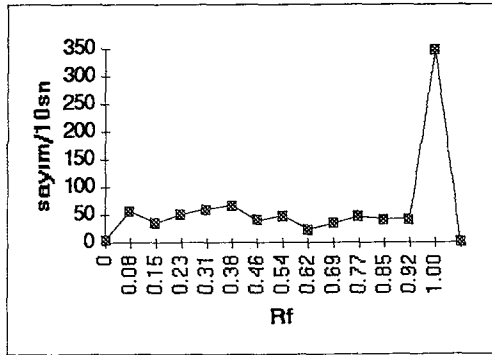
3.9.1.2 CAT Miktarının İşaretlenme Verimine Etkisi

% 50 HCl ortamındaki 1 mg/ml konsantrasyonlu diazepam'dan alınarak bir tüp içine konuldu ve 5.6-22.5 mg/ml konsantrasyonları arasında değişen CAT konsantrasyonlarını kullanarak aktivitesi 3.7-11.1 MBq (100-300 μCi) olan Na^{131}I ile işaretlenme deneyleri yapıldı.

Yapılan deney sonuçlarından elde edilen kromatogramlara göre işaretlenme veriminin düşük olması nedeniyle CAT miktarının artırılmasına karar verilmiştir. 1 mg/ml diazepam örneği alınarak 11.2 mg/ml konsantrasyonundaki CAT çözeltisi ilave edildi ve oda sıcaklığında 30 dakika beklendikten sonra örnek alındı. Bu deney sonucunda elde edilen ITLC kromatogramları Şekil 3.20 ve Şekil 3.21'de görülmektedir.

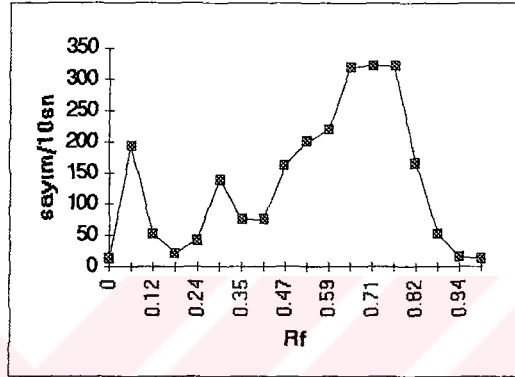


Şekil 3.20 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (11.2 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 1).

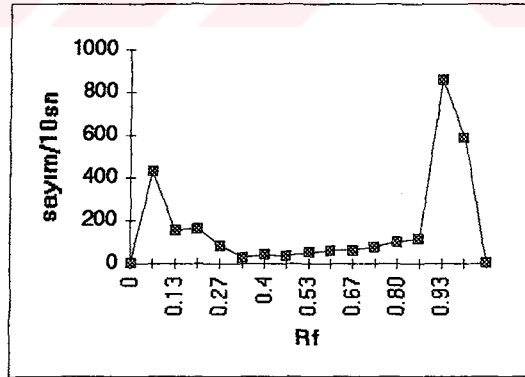


Şekil 3.21 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (11.2 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 2).

Bu deney koşullarında elde edilen % 85.0 verimin daha yükseltilmesi için; 1 mg/ml diazepam örneği alınarak 22.5 mg/ml konsantrasyonundaki CAT çözeltisi ilave edildi ve 30 dakika sonra örnek alındı. Bu deney sonucunda elde edilen ITLC kromatogramları Şekil 3.22 ve Şekil 3.23'de görülmektedir.



Şekil 3.22 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (22.5 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.23 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (22.5 mg/ml CAT) kromatogramı (ITLC 2).

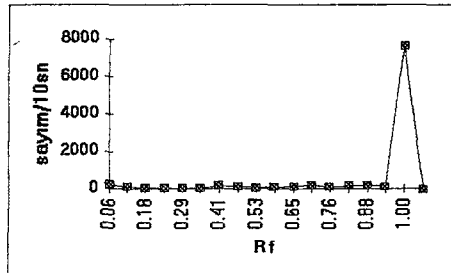
3.9.1.3 Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi

Oda sıcaklığında optimum CAT konsantrasyonu olan 11.2 mg/ml kullanılarak ^{131}I DZ'ın işaretlenme verimine reaksiyon süresinin etkisi incelenmek için 30, 60, 120 dakikalık sürelerde denemeler yapılmıştır.

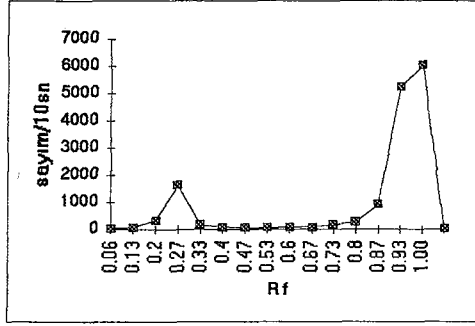
3.10 İODOGEN YÖNTEMİNE GÖRE DİAZEPAM'IN I-131 ile İŞARETLENMESİ

3.10.1 Asidik Ortamda İodogen Yönteminin Uygulanması

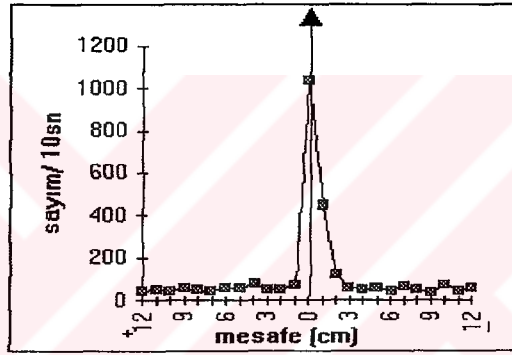
% 50 HCl ortamda bulunan 1 mg/ml konsantrasyonundaki diazepam çözeltisi alınarak 1 mg iodogen ile kaplı reaksiyon tüpüne konularak taşıyıcısız aktivitesi 3.7-11.1 MBq (100-300 μCi) olan Na^{131}I çözeltisi ilave edildi. 15-20 dakika reaksiyon süresinden sonra reaksiyona girmemiş iyodun indirgenmesi için 0.2 N Na_2SO_3 çözeltisinden 100 μl ilave edildi. Örnek alınarak ITLC ve elektroforez yöntemleri ile radyokimyasal saflık analizleri yapıldı. Farklı banyo ortamları kullanılarak elde edilen kromatogramlara göre R_f değerleri tesbit edildi ve % işaretlenme verimleri saptandı. ITLC kromatogramları Şekil 3.24 ve Şekil 3.25, Şekil 3.26'da ise elektroforez diagramı görülmektedir.



Şekil 3.24 % 50 HCl ortamındaki ^{131}I DZ'ın kromatogramı (ITLC 1).



Şekil 3.25 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın kromatogramı (ITLC 2).



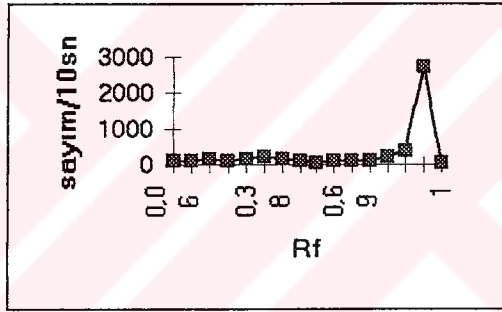
Şekil 3.26 % 50 HCl ortamındaki ^{131}IDZ 'ın elektroforez diagramı.

İşaretleme verimine iodojenli tüp sayısının etkisini incelemek amacıyla ilk tüpteki çözelti ikinci ve daha sonra üçüncü tüpe aktarılarak her bir tüpte iki dakikalık bekleme süresinden sonra örnek alınarak işaretlenme verimleri saptanmıştır. Bu deneyler sonucunda işaretlenme verimlerinde kayda değer bir artış görülmemiştir. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda tek bir iodojenli tüp kullanılarak yapılmıştır.

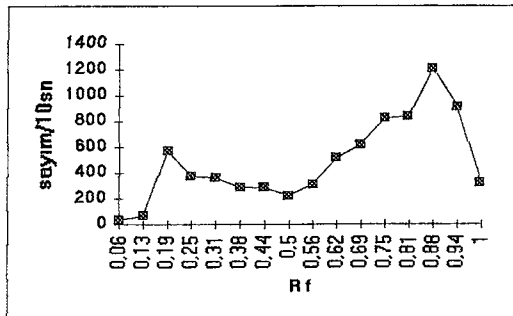
3.10.2 Ampul Ortamında İodogen Yönteminin Uygulanması

Ampul ortamındaki 5 mg/ml konsantrasyonundaki diazepam çözeltisi 1 mg iodogen kaplı tüp içersine konularak % 50 HCl ortamındaki gibi aynı koşullarda I-131 ile işaretleme deneyleri yapılmıştır. Bu deney sonuçları ile ilgili kromatogramlar Şekil 3.27 ve Şekil 3.28'de Şekil 3.29'da ise elektroforez diagramı görülmektedir.

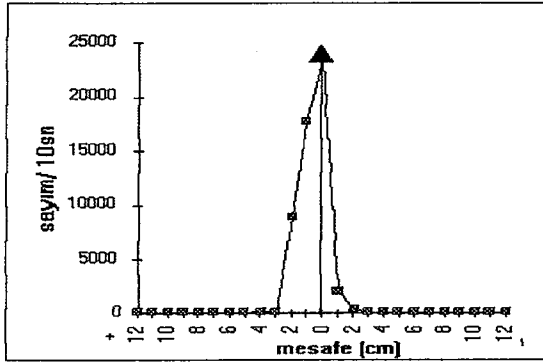
İodogenli tüp sayısının artırılmasının işaretlenme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu deneylerde elde edilen sonuçların % 50 HCl ortamda elde edilen sonuçlara benzer bulunmuştur. Ampul ortamında da tek iodogenli tüp kullanılması yeterli olmaktadır.



Şekil 3.27 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'nin kromatogramı (ITLC 1).

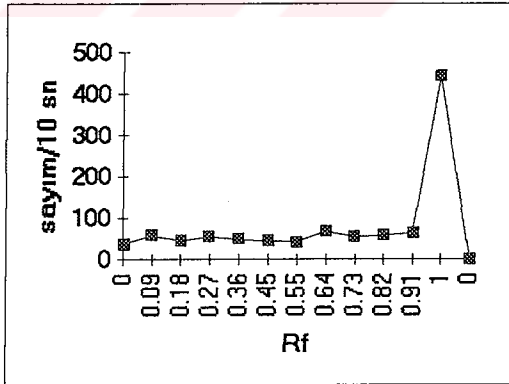


Şekil 3.28 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'nin kromatogramı (ITLC 2).

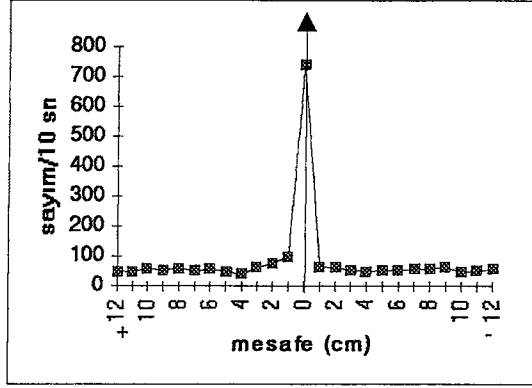


Şekil 3.29 Ampul ortamındaki ^{131}I DZ'ın elektroforez diagramı.

Bu işaretleme sonucunda reaksiyona girmemiş iyodun ^{131}I 'in ayrılması amacıyla işaretli bileşik Dowex 1 anyon değiştirici kolondan geçirildi. Kolon 1 ml 0.1 N HCl çözeltisi ile elue edildi ve örnek alınarak ITLC ve elektroforez yöntemi ile incelendi. Şekil 3.30'da ITLC 2 kromatogramı ve 3.31'de elektroforez diğramı görülmektedir.



Şekil 3.30 Ampul ortamındaki ^{131}I DZ'ın Dowex1'den sonra kromatogramı (ITLC 2).



Şekil 3.31 Ampul ortamındaki ^{131}IDZ 'ın Dowex1'den sonra elektroforez diagramı.

3.11 Lipofilite Tayini

Lipofilitesi saptanacak örnekten (^{131}IDZ veya ^{131}IZP) 50 μl tüp içersine konuldu. $\text{pH} = 6.89$ fosfat tamponundan 3 ml ve 3 ml n-oktanol ilave edilerek, 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. 1 saat bekletildikten sonra her bir fazdan 0.5 ml alınarak bir tüp içersine konuldu. Bu tüpler NaI(Tl) dedektöründe I-131'in 364 keV'luk γ pikini içine alan kanal aralıklarında sayıldı. Lipofilite formülüne oktanol, su fraksiyonlarındaki sayım değerleri yerine konularak hesaplandı.

3.12 İN VİVO ÇALIŞMALAR

3.12.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmaları

3 mg/ml olacak şekilde ampul diazepam kullanılarak 21.4 GBq/mmol spesifik aktiviteli ^{131}IDZ bileşiği izotonik olarak hazırlandı.

Ortalama 210 g ağırlığındaki sıçanlara intraperitonel olarak enjekte edildi. Eter anestezisi uygulanmış olan hayvanlara enjeksiyon yapıldıktan sonra 10-120 dakika arasında belirli bekleme sürelerinden sonra hayvanlar kesildi. Organlar çıkartıldı; tartıldı ve tüm bu organların aktivitesi NaI(TI) dedektöründe sayıldı. Elde edilen sayım değerlerinden gram doku başına % aktivite ve organ başına % aktivite hesapları yapıldı.

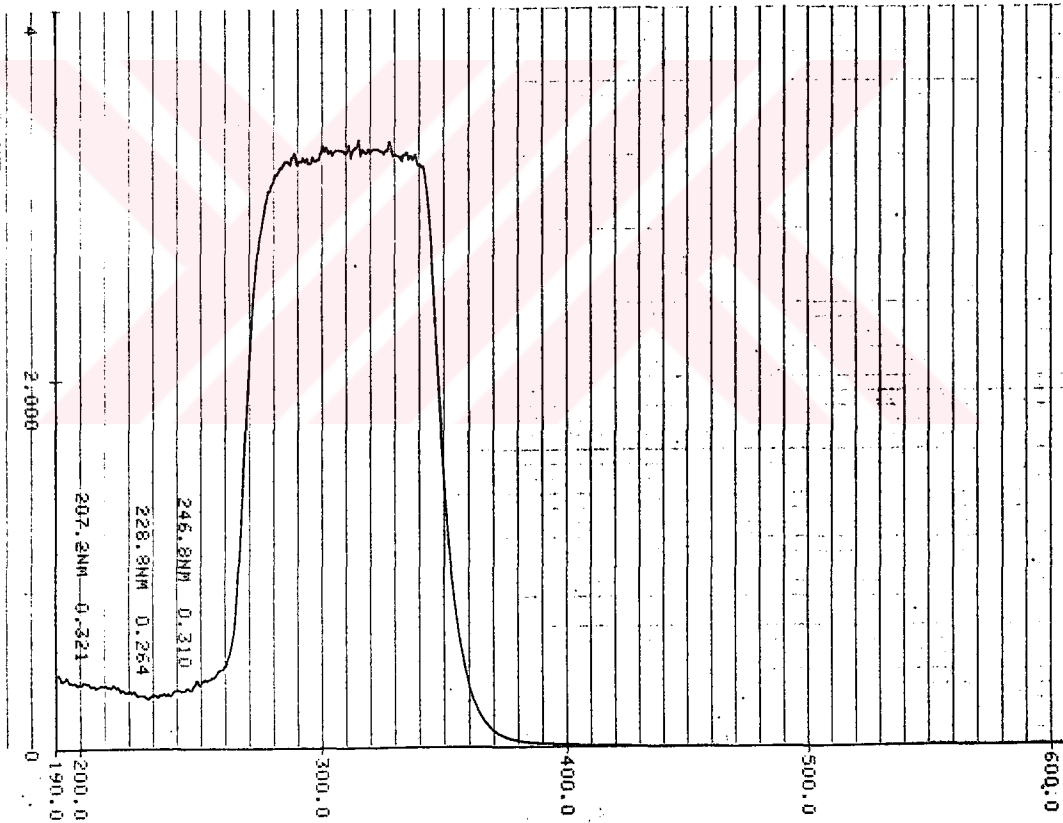
3.12. 2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalar

Yaklaşık 3 kg ağırlığındaki tavşanlara ampul ortamındaki 5 mg/ml konsantrasyonundaki diazepam kullanılarak 0.335 GBq/mmol spesifik aktiviteli izotonik, steril olarak hazırlanan ¹³¹IDZ intravenöz olarak kulak veninden enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra 5-60 dakika aralıklarında gama kamera ile görüntü alındı. Elde edilen sintigramlardan tavşanın başının işaretli bölgesinden elde edilen sayımın background sayımına oranı bulundu.

3.13 ZOPICLONE'NUN I-131 İLE İŞARETLENMESİ

3.14 İnaktif Zopiclone'nun UV Spektrumu

İnaktif zopiclone'nun UV vis. spektrofotometresi kullanılarak UV spektrumu alındı (Şekil 3.32).



Şekil 3.32 Zopiclone'nun UV spektrumu.

10×10 cm ölçülerinde olan plastik destek üzerine 0.1 mm kalınlığında selüloz kaplı ITLC plakaları (Merck 5565) 10x1.5 cm'lik şeritler halinde kesildi. 10x1.5 cm'lik şerit; alttan 0.5 cm işaretlenerek örnek uygulandı. ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH) ve ITLC 2 (İzo/BuOH/NH₄OH) banyo ortamlarına batırıldı. Banyo sonucunda ITLC şeritleri UV lambası ile bakılarak lekeli olan kısımları işaretlendi ve lekeli kısmın başlangıç noktasına uzaklığı, frontun başlangıç noktasına olan uzaklığına bölünerek R_f değerleri hesaplandı. Çizelge 3.2'de ITLC banyo ortamlarına göre elde edilen R_f değerleri görülmektedir.

Çizelge 3.2 Zopiclone'nun ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.

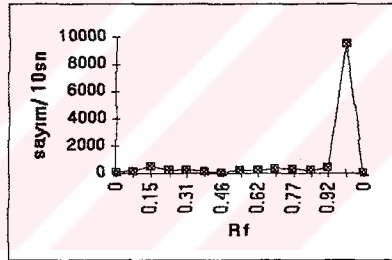
ITLC Banyo Ortamları	R _f
ITLC 1 [n-bütanol-H ₂ O-asetik asit (4/2/1)]	0.33-0.57
ITLC 2 [izopropil alkol-n-bütanol-0.2N NH ₄ OH (2/1/1)]	0.60-0.79

3.15 İnaktif İyodozopiclone'nun Elde Edilmesi

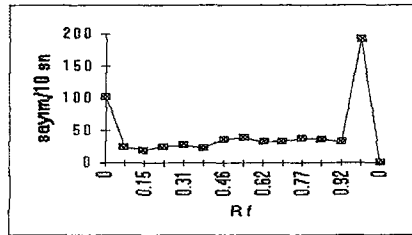
20 mg zopiclone 1 ml % 50'lik HCl ile çözüldü. Stokiyometrik olarak 1/1 oranında olacak şekilde 10 mg KI ilave edildi. Kuruluğa kadar uçurulduktan sonra ~ 180-200 °C silikon yağ banyosunda 1 saat bekletildi. Sentezlenen bileşik toluende çözüldü. Çözünme işleminin yavaş olması nedeniyle bu işlem birkaç kez tekrarlandı. Ortamdaki iyot fazlasının giderilmesi amacıyla doygun Na₂SO₃ çözeltisinden 1 ml ilave edildi. Çözgen uçurularak bileşik kurutuldu. MS ve IR spektrumları almak üzere desikatörde saklandı.

3.16 İodogen Yöntemine Göre Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenmesi

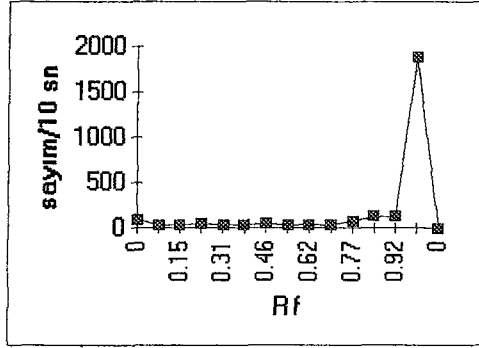
Zopiclone'nu çözmek için önce su, dioksan, 8 M HCl, propilen glikol ve % 50'lik HCl gibi çözümler denendi. 10 mg zopiclone en iyi çözümler olarak 12.5 ml propilen glikolde çözüldü ve üzerine 8 M HCl'den 1 ml ilave edildi. İodogenli tüp içersine konuldu. Yaklaşık 3.7-11.1 MBq (100-300 μ Ci) aktivitede Na^{131}I ilave edildi ve 25 dakika beklendi. Radyokimyasal saflık analizi ITLC yöntemi ile belirlendi (Şekil 3.33). Saflaştırma için işaretli bileşik Dowex 1 kolonundan geçirildi. Elde edilen ITLC1 kromatogramı Şekil 3.34'de görülmektedir. Kolonda tutulan bileşiği alabilmek için propilen glikol ile elüe edildi. Elüanttan alınan örneğin ITLC1 kromatogramı Şekil 3.35'de verilmiştir.



Şekil 3.33 Propilen glikol ortamında I-131 ile işaretlenmiş zopiclone'nun ITLC 1 kromatogramı.



Şekil 3.34 Dowex 1'den geçirildikten sonra ITLC 1 kromatogramı.



Şekil 3.35 Elüsyonun ITLC 1 kromatogramı.

Deneylerde kullanılan elektoroforez ve ITLC koşulları aşağıdaki gibi belirlendi.

ITLC koşulları:

ITLC destek maddesi: Merck 5565; 0.1 mm Cellulose F.

Banyo ortamları : ITLC 1 [n-bütanol-H₂O-asetik asit (4/2/1)].

ITLC 2 [izopropil alkol-n-bütanol-0.2N NH₄OH (2/1/1)]

ITLC süresi : 2.5 saat.

Elektroforez koşulları:

Uygulanan voltaj: 300 volt.

Uygulama süresi: 2 saat.

Tampon çözeltisi: n-bütanol-H₂O-asetik asit (4/2/1).

Yapılan deneyler sonucunda iodogen yöntemi kullanılarak zopiclone'nun I-131 ile işaretlenmesinin mümkün olmadığı anlaşıldığından dolayı başka işaretleme yöntemleri araştırıldı. Zopiclone'nun metabolik ürünü olan demetilzopiclone basamağı

üzerinden I-131 ile işaretlenmesi planlandı. Fakat ilk aşama olarak N-demetilzopicle'nun elde edilmesi gerekti. Bunun için 86 mg zopicle 6 ml asetik asitte çözüldü, 0.5 ml H₂O₂ ilave edildi. Karışım 70 °C'de su banyosunda 1 saat bekletildi, pH= 7'ye ayarlandı ve kristallendirildi. IR spektrumları alındı. Spektrum çalışma şartlarında zopicle'nun hidrolizlenerek bozulduğunu gösterdiğinden bu yöntemden de vazgeçildi.

3.17 ZOPICLE'NUN ERİME NOKTASINDA HALOJEN YER DEĞİŞTİRME YÖNTEMİNE GÖRE I-131 İLE İŞARETLENMESİ

İki farklı çözgen kullanılarak halojen yer değiştirme yöntemi denendi.

1) 1 mg zopicle 0.5 ml toluen içinde çözüldü, 3.7-11.1 MBq (100-300 µCi) aktivitede Na¹³¹I ilave edilerek karıştırıldı. Vakum altında kuruluğa kadar buharlaştırıldı kuruluğa gelen tüp 200 °C'de silikon yağ banyosunda 1 saat ısıtıldı. Reaksiyon sonunda 1 ml toluen tüp içine ilave edilerek işaretlenen zopicle çözülmeye çalışıldı. ITLC ve elektroforez yöntemleri kullanılarak elde edilen sonuçlardan işaretlenme veriminin düşük olduğu gözlemlendi.

2) 1 mg zopicle 100 µl'lik (% 50 HCl) içinde çözüldü ve 3.7-11.1 MBq (100-300 µCi) aktivitede Na¹³¹I ilave edildi. Bu karışım kuruluğa kadar vakum altında bırakıldı. 75 °C-100 °C arasındaki sıcaklıkta silikon yağ banyosu kullanılarak ısıtıldı. Reaksiyon süresi sonunda % 50 lik HCl'den 100 µl ilave edilerek çözüldü ve üzerine doymuş Na₂SO₃ çözeltisinden 50 µl ilave edildi. Radyokimyasal saflığın saptanması ITLC ve elektroforez yöntemleri ile yapıldı. Bu yöntemde göre yapılan işaretlenmeyi etkileyen sıcaklık, reaksiyon süresi gibi parametreler incelendi.

3.17.1 Zopiclone'nun Erime Noktasında Halojen Yer Değiştirme Yöntemine Göre I-131 ile İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler

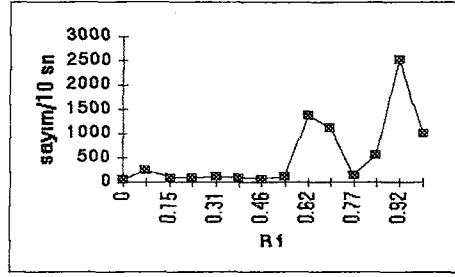
3.17.1.1 Reaksiyon Sıcaklığının İşaretlenme Verimine Etkisi

1 mg zopiclone 100 μ l % 50'lik HCl çözeltisi içinde çözüldü. 3.7-11.1 MBq (100-300 μ Ci) aktivitede Na¹³¹I ilave edildi, kuruluğa kadar vakum altında buharlaştırma yapıldıktan sonra tüpe silikon yağ banyosunda 45-50, 70-80, 90-100, 140-150, 190-200 °C sıcaklıklar uygulandı. İşaretlenme sonucunda radyokimyasal saflık analizleri ITLC ve elektroforez yöntemleri ile yapıldı. ITLC kromatogramlardan faydalanarak R_f değerleri ve işaretlenme verimleri tesbit edildi. Çizelge 3.3'de I-131 ile işaretli iyodozopiclone'nun R_f değerleri verilmektedir.

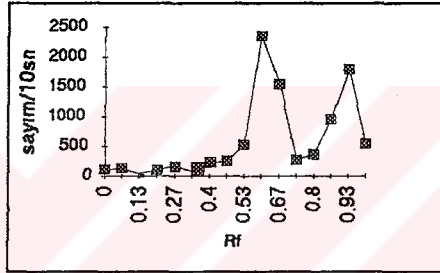
Çizelge 3.3 ¹³¹IZP'nun ITLC Ortamlarına Göre R_f Değerleri.

Banyo Ortamları	R _f
ITLC 1 [n-bütanol-H ₂ O-asetik asit (4/2/1)]	0.42-0.71
ITLC 2 [izopropil alkol-n-bütanol-0.2N NH ₄ OH (2/1/1)]	0.34-0.63

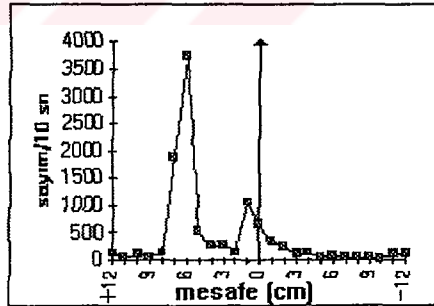
Halojen yer değiştirme yönteminde sıcaklığın işaretlenme verimine etkisi incelenmiş ve bu deneyler sonucunda elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 3.36' dan 3.49'a kadar).



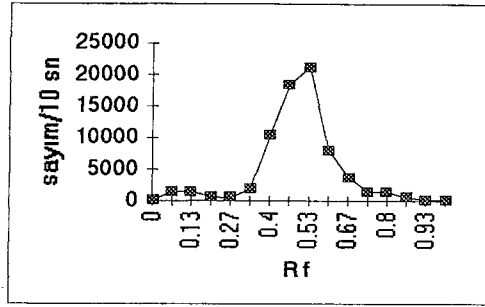
Şekil 3.36 ^{131}I ZP'nun 45-50 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.



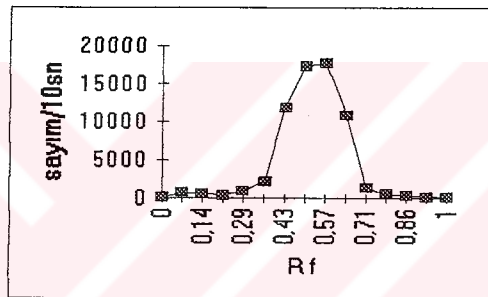
Şekil 3.37 ^{131}I ZP'nun 45-50 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.



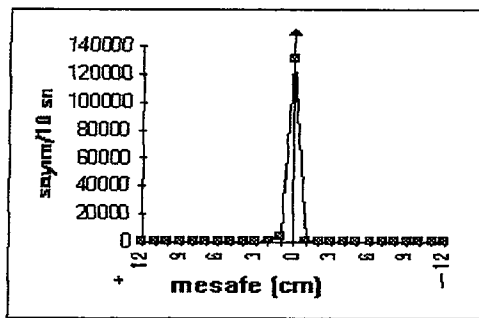
Şekil 3.38 ^{131}I ZP'nun 45-50 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.



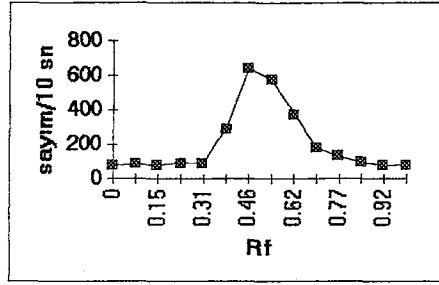
Şekil 3.39 ^{131}I ZP'nun 70-80 °C sıcaklıktaki ITLC1 kromatogramı.



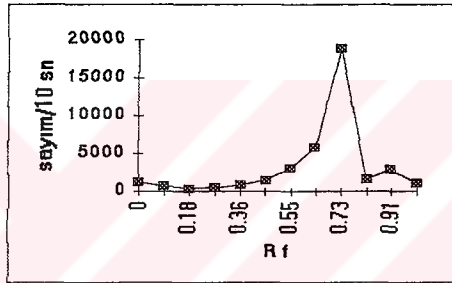
Şekil 3.40 ^{131}I ZP'nun 70-80 °C sıcaklıktaki ITLC2 kromatogramı.



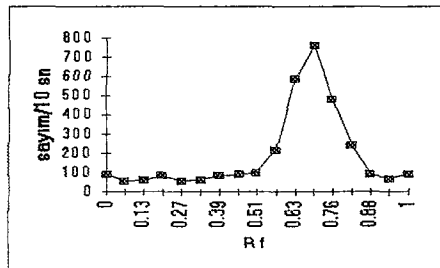
Şekil 3.41 ^{131}I ZP'nun 70-80 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.



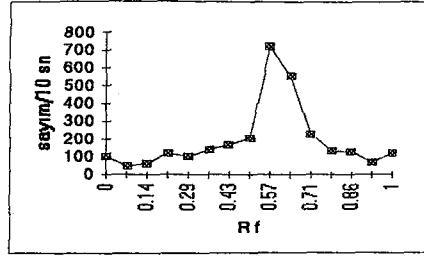
Şekil 3.42 ^{131}I ZP'nun 90-100 °C sıcaklıkdaki ITLC 1 kromatogramı.



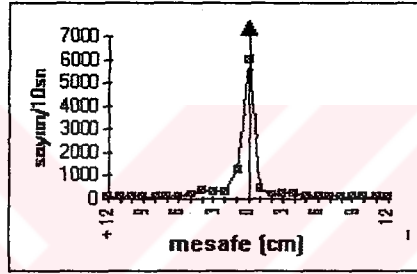
Şekil 3.43 ^{131}I ZP'nun 90-100 °C sıcaklıkdaki ITLC 2 kromatogramı.



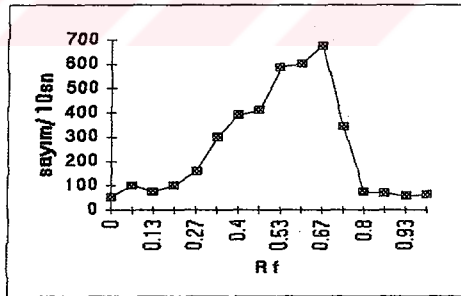
Şekil 3.44 ^{131}I ZP'nun 140-150 °C sıcaklıkdaki ITLC 1 kromatogramı.



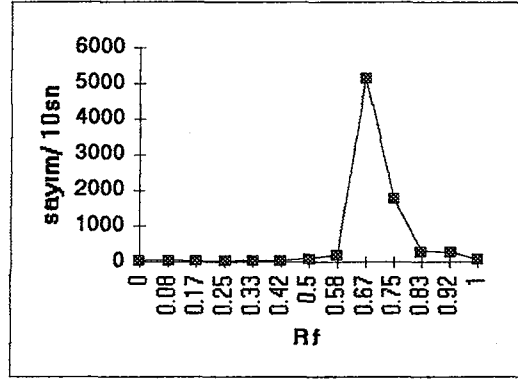
Şekil 3.45 ^{131}I ZP'nun 140-150 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.



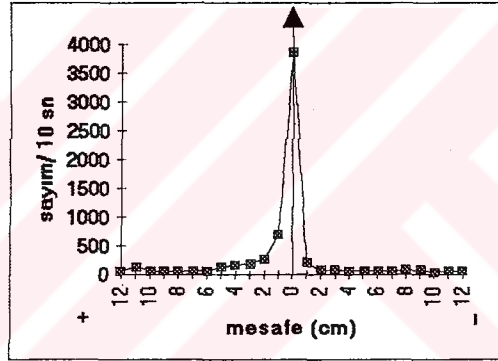
Şekil 3.46 ^{131}I ZP'nun 140-150 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.



Şekil 3.47 ^{131}I ZP'nun 190-200 °C sıcaklıktaki ITLC 1 kromatogramı.



Şekil 3.48 ^{131}I ZP'nun 190-200 °C sıcaklıktaki ITLC 2 kromatogramı.



Şekil 3.49 ^{131}I ZP'nun 190-200 °C sıcaklıktaki elektroforez diagramı.

3.17.1.2 Optimum Sıcaklıkta İşaretlenme Veriminin Zamana göre Değişimi

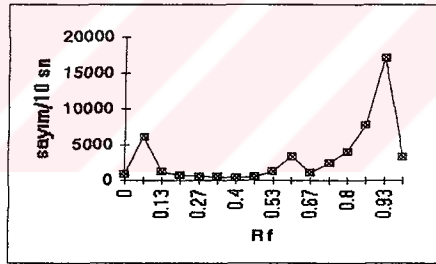
Reaksiyon sıcaklığının işaretlenme verimine etkisi incelenmiş ve sonuçlardan da görüldüğü gibi 70-80 °C üzerindeki sıcaklıklarda işaretlenme veriminin % 99 olması nedeniyle optimum sıcaklık olarak 70-80 °C seçilmiştir. Bu aynı deney koşullarında 15, 30, 45, 60 dakikalık

reaksiyon süreleri denenmiştir. Deneyler sonucunda radyokimyasal saflık analizleri ITLC ve elektroforez yöntemleri ile yapılmış ve işaretlenme verimleri tesbit edilmiştir.

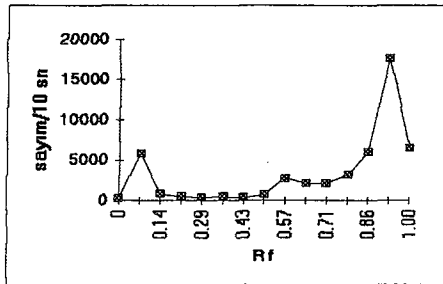
3.18 Oda Sıcaklığında Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenme Veriminin Zamana Göre Değişimi

Oda sıcaklığında işaretlenme veriminin zamanla değişimi incelenmiştir. Bu amaçla; 1 mg zopiclone % 50 lik 100 μ l HCl içinde çözülmüş ve 3.7-11.1 MBq (100-300 μ Ci) aktivitede Na¹³¹I ilave edilmiştir. Çeşitli zaman aralıklarında örnekler alınarak işaretlenme verimleri saptanmıştır. ITLC yöntemi ile elde edilen ITLC 2 kromatogramları Şekil 3.50'de verilmiştir.

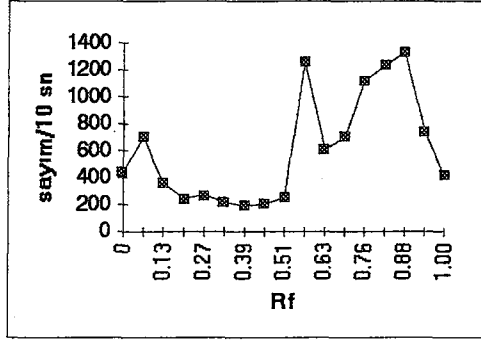
1 saat



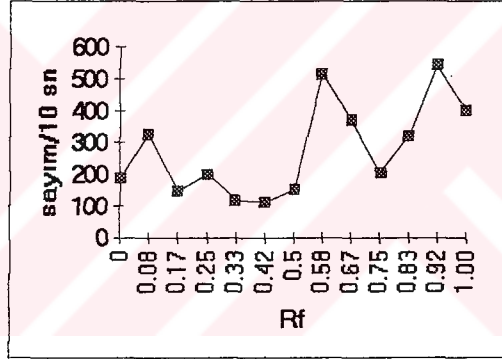
2 saat



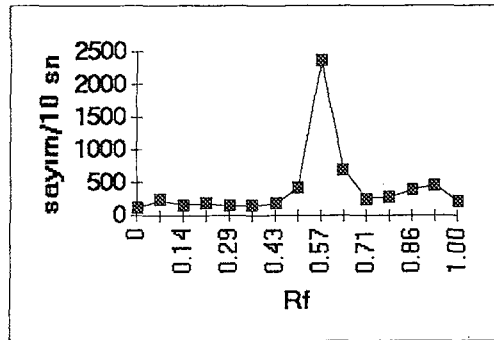
3saat



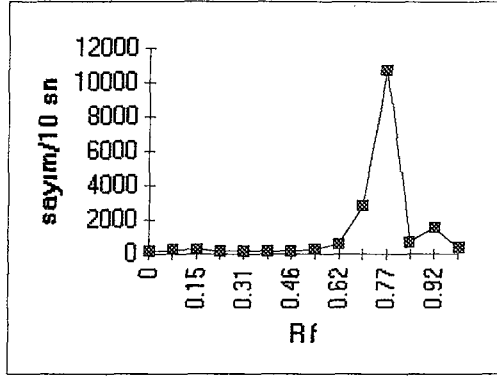
6 saat



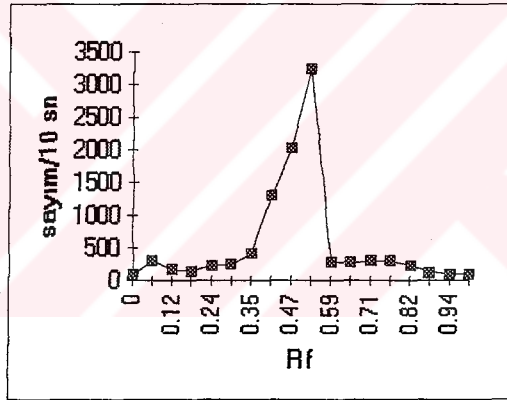
1 gün



2 gün



3 gün



Şekil 3.50 Oda sıcaklığında ^{131}I -ZP'nun zamana göre değişim grafikleri.

3.19 İN VİVO ÇALIŞMALAR

3.19.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmaları

% 98 verim ile hazırlanan ^{131}I ZP bileşiğinin biyolojik dağılımını tesbit etmek amacıyla 300 ± 10 g ağırlığındaki hayvanlara 0.3 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde zopiclone alınarak I-131 ile işaretlendi. 6.8 GBq/mmol spesifik aktivitedeki bu radyofarmasötik pH ve izotonikliği ayarlandıktan sonra sterilizasyon için milipordan geçirildi. Hazırlanan radyofarmasötik intreperitonal olarak sıçanlara uygulandı. Eter anestezi uygulanmış olan hayvanlara enjeksiyon yapıldıktan sonra 20-120 dakika arasında belirli bekleme sürelerinden sonra hayvanlar kesildi. Herbir hayvanın organları çıkarılarak tartıldı ve herbir organın aktivitesi NaI (TI) dedektöründe sayıldı. Elde edilen sayım değerlerinden herbir organ için gram doku başına % aktivite ve organ başına % aktivite hesapları yapıldı.

3.19.2 Tavşanlar Üzerinde Yapılan Sintigrafik Çalışmalar

Yaklaşık 3 kg ağırlığındaki tavşanlara 1 mg/ml konsantrasyonunda 4.23 GBq/mmol spesifik aktivitedeki iyodozopiclone izotonik ve steril olarak hazırlanarak kulak veninden intravenöz olarak enjekte edildi. Enjeksiyondan sonra 5-60 dakika da belirli aralıklarda gama kamera ile görüntüler alındı. Yapılan bu çalışma sonucu elde edilen sintigramlarda tavşanın başında işaretlenen kısmından elde edilen sayımlar ile background sayımları karşılaştırıldı.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

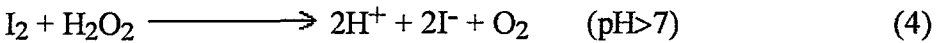
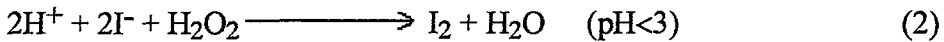
4.1 Yükseltgen Ajan Olmadan Kendiliğinden Yükseltgenen I-131'in R_f Değerleri

Na¹³¹I (NaOH çözeltisi) şeklinde bulunan I-131'in ve bu çözelti içinde kendiliğinden yükseltgenmiş iyodun R_f ve % verim değerleri saptanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.1'de görülmektedir.

Çizelge 4.1 ¹³¹I⁻ ve Yükseltgenmiş I-131'e Ait R_f ve % Verim Değerleri.

	ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
	R _f	Verim (%)	R _f	Verim (%)
¹³¹ I ⁻	0.19 - 0.38	76.0±1.0	0.21 - 0.43	92.0±1.5
¹³¹ I ₂	0.81 - 1.00	24.0±1.0	0.93 - 1.00	8.5±1.5

I-131'in ITLC 1 kromatogramlarından da görüldüğü gibi yükseltgenmiş iyodun % verimi 24.0±1.0 ITLC 2 banyo ortamında ise % verim 8.5±1.5'dir. ITLC 1 ortamında elde edilen verim diğerine göre daha yüksektir. Bunun nedeni banyo ortamlarının pH değerlerinden kaynaklanmaktadır. pH ile iyodun radyolitik etkileri aşağıdaki denklemlerde verilmiştir (Toth et al., 1984).



^{131}I 'in elektroforez diagramından ^{131}I 'in pozitif kutup yönüne doğru 2-6 cm mesafede bir pik verdiği görülmektedir (Şekil 3.6).

Yükseltgen ajan olarak iodogen kullanıldığında iyodun tamamen yükseltgendiği Şekil 3.7 ve Şekil 3.8'de görülmektedir.

4.2 DİAZEPAM'IN YÜKSELTGEN AJAN OLMADAN I-131 İLE İŞARETLENMESİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

4.2.1 % 50 HCl Ortamında Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesine (Kontrol Deneyleri) İlişkin Sonuçlar

% 50'lik HCl'de çözünmüş toz halindeki diazepam'la yapılan kontrol deneylerinde diazepam % 79.0 ± 1.0 verimle I-131 ile işaretlenmiştir. Şekil 3.9 ve 3.10, 3.11 bu işaretlenmelere ilişkin ITLC kromatogramları ve elektroforez diagramı görülmektedir. Kuvvetli HCl ortamı elektrofilik süstitüsyon için uygun koşul sağladığından diazepam'ın kuvvetli asidik şartlarda elektrofilik süstitüsyon ile iyi bir verimle işaretlendiği anlaşılmaktadır. Elektroforez diagramından işaretlemenin yüksek bir (% 79.0 ± 1.0) verimle gerçekleştiği ayrıca işaretli bileşiğin nötral yapıda olduğu görülmektedir.

4.2.1.1 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar

Diazepam çözeltisi oda sıcaklığında yaklaşık 7-10 gün bekletildiğinde hidrolizlenmektedir ve bu nedenle I-131 ile işaretleme işlemi sonucunda iki farklı ürün oluşmaktadır (Şekil 3.12). İşaretli bileşik Dowex 1 anyon değiştiriciden geçirilerek serbest iyottan ayrılması sağlanmıştır. Deneye ait kromatogram sonuçları Çizelge 4.2'de

verilmiştir. ITLC 1 banyo ortamındaki ^{131}IDZ 'in % verimi 72.0 ± 7.0 iken ITLC 2 ortamında $\% 66.5 \pm 1.5$ olduğu görülmektedir.

Bunun nedeni banyo ortamının asidik olmasından kaynaklanmaktadır. Diazepam ve ($^{131}\text{IHÜ}$) hidroliz ürünün kuvvetli asidik şartlarda elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu ile işaretlendiği düşünülmektedir.

Çizelge 4.2 % 50 HCl Ortamında Bekletilmiş Diazepam'ın (^{131}IDZ ve $^{131}\text{IHÜ}$) Farklı ITLC Ortamlarına Ait % İşaretlenme Verimleri.

İşaretlenme Verimi (%)			
ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
$^{131}\text{IHÜ}$	$^{131}\text{IDZ} + ^{131}\text{I}_2$	$^{131}\text{IHÜ}$	^{131}IDZ
28.0 ± 7.0	72.0 ± 7.0	33.5 ± 1.5	66.5 ± 1.5

4.2.2 Ampul Ortamındaki Diazepam'ın Yükseltgen Ajan Olmadan I-131 ile İşaretlenmesine (Kontrol Deneyleri) İlişkin Sonuçlar

Ampul çözeltisindeki diazepam ile yapılan kontrol deneyinde diazepam'ın I-131 ile işaretlenmediği yalnızca ortamda çözgen olarak bulunan etanol ve propilen glikolün işaretlendiği tesbit edilmiştir.

4.3 CAT YÖNTEMİNE GÖRE DİAZEPAM'IN I-131 İLE İŞARETLENMESİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

CAT (Kloramin-T) yöntemine göre yapılan çalışmalarda; öncelikle 5.6 mg/ml CAT konsantrasyonu kullanılarak diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi deneyleri yapılmış ve oda koşullarında yapılan deney sonuçlarında (Şekil 3.17 ve Şekil 3.18) işaretlenme verimi % 59.0 olarak elde edilmiştir. Verimin düşük olması nedeniyle sıcaklık, CAT miktarı

ve reaksiyon süresi gibi parametreler denenerek daha uygun işaretlenme koşulları araştırılmıştır.

4.3.1 CAT Yönteminde I-131 ile İşaretlenmeye Etki Eden Etmenler

4.3.1.1 Sıcaklığın Etkisi

İşaretlenme verimine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla 20-25 ve 50-60 °C sıcaklıklarda çalışılmış ve bu deneyler sonucunda elde edilen değerler Çizelge 4.3'de verilmiştir.

Çizelge 4.3 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi.

Sıcaklık (°C)	İşaretlenme Verimi (%)			
	ITLC 1 (BuOH/su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
	¹³¹ I ⁻	¹³¹ IDZ+ ¹³¹ I ₂	¹³¹ I ⁻ + ¹³¹ I ₂	¹³¹ IDZ
20-25	29.5±1.5	70.5±1.5	40.5±0.5	59.5±0.5
50-60	62.5± 2.5	37.5±2.5	73.5± 2.5	26.5±2.5

4.3.1.2 CAT Miktarının Etkisi

İşaretlenme verimine CAT miktarının etkisini incelemek için 5.6, 11.2, 22.5 mg'lık yükseltgenler kullanılarak yapılan deneylerin ITLC banyo ortamlarına göre elde edilen işaretlenme verimleri Çizelge 4.4'de verilmektedir. 11.2 mg CAT kullanıldığında; ITLC 1 banyo ortamında işaretlenme verimi % 80.0±5.0 bulunurken ITLC 2 ortamında ise % 72.5 ±2.5 olduğu bulunmuştur. Bunun yanı sıra 22.5 mg CAT kullanıldığında verimin % 69.5±0.5 ve 62.0±2.0 (ITLC 2) olduğu görülmüştür. ITLC 1

banyo ortamında işaretlenme veriminin yüksek olması banyo pH'ından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.4 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}IDZ 'ın İşaretlenmesinde CAT Miktarının Etkisi.

CAT mik. (mg)	İşaretlenme Verimi (%)			
	ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
	$^{131}\text{I}^-$	$^{131}\text{IDZ} + ^{131}\text{I}_2$	$^{131}\text{I}^- + ^{131}\text{I}_2$	^{131}IDZ
5.6	22.5±1.5	77.5±1.5	40.5±0.5	59.5±0.5
11.2	20.0±5.0	80.0±5.0	27.5±2.5	72.5±2.5
22.5	29.5±0.5	69.5±0.5	36.5±0.5	62.0±2.0

4.3.1.3. Reaksiyon Süresinin Etkisi

Optimum CAT miktarı 11.2 mg olarak saptandıktan sonra reaksiyon süresinin diazepam'ın I-131 ile işaretlenme verimine etkisini incelemek için 30, 60, 120 dakikalık reaksiyon sürelerinde deneyler yapıldı. Bu deneylerden ITLC yöntemi ile elde edilen ortalama işaretlenme verimleri sonuçları Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}IDZ 'ın (11.2 mg/ml CAT) Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi.

Süre (dak.)	İşaretlenme Verimi (%)	
	$^{131}\text{I}^-$	^{131}IDZ
30	27.5	72.5 ± 2.5
60	33.0	67.0 ± 3.0
120	40.0	60.0 ± 5.0

CAT yöntemine göre % 50 HCl ortamında diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi için etki eden parametreler incelenmiş ve optimum koşullar belirlenmiştir. Bu optimum koşullar Çizelge 4.6'da verilmektedir.

Çizelge 4.6 CAT Yöntemine Ait Optimum Koşullar.

Sıcaklık	Oda Sıc.
Reaksiyon Süresi	30 dak.
CAT Miktarı	11.2 mg
Diazepam Miktarı	1 mg
İyot Miktarı	Taşıyıcısız
Çözgen	% 50 HCl

4.4 İODOGEN YÖNTEMİ İLE DIAZEPAM'IN I-131 İLE İŞARETLENMESİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

4.4.1 % 50 HCl Ortamında Diazepam'ın I-131 ile İşaretlenme Sonuçları

Yükseltgen ajan olarak iodogen kullanılarak % 50 HCl ortamındaki diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi sonucunda elde edilen ITLC sonuçları Çizelge 4.7'de verilmektedir. Çizelge 4.7'den de görüldüğü gibi ITLC 1 ortamındaki $^{131}\text{IDZ}+^{131}\text{I}$ verim % 97.5 ± 2.5 iken ITLC 2 banyo ortamında ise % 84.0 ± 1.0 olduğu bulunmuştur. Banyo ortamları arasındaki % 13.5'lük işaretlenme verimi farkı ITLC 1 banyo ortamının asidik (pH=3) olmasından kaynaklanmaktadır. Bu deneye ait elektroforez diagramına (Şekil 3.26) bakıldığında işaretli bileşiğin nötral olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.7 % 50 HCl Ortamındaki ^{131}IDZ 'ın % İşaretlenme Verimleri.

İşaretlenme Verimi (%)			
ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
$^{131}\text{I}^-$	$^{131}\text{IDZ}+^{131}\text{I}_2$	$^{131}\text{I}_2+^{131}\text{I}^-$	^{131}IDZ
2.0 ± 2.5	97.5 ± 2.5	16.0 ± 1.0	84.0 ± 1.0

4.4.2 Ampul Ortamındaki İşaretlenme Sonuçları

Ampul ortamındaki diazepam'ın iodogen kullanılarak yapılan deney sonuçlarından elde edilen % işaretlenme verim değerleri Çizelge 4.8'de verilmiştir. Bu çizelgeden de görüldüğü gibi ITLC 1 ortamındaki $^{131}\text{IDZ}+^{131}\text{I}_2$ işaretlenme verimi % 99.5 ± 0.5 iken ITLC 2 ortamında ise

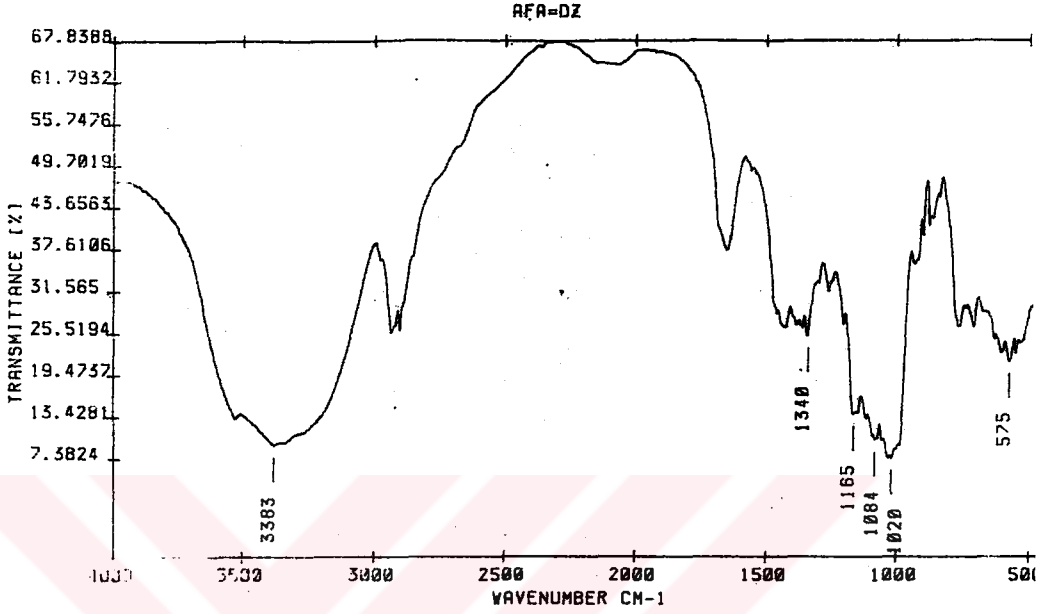
% 64.0 ± 1.0 olarak tesbit edilmiştir. Bu % verim değerleri aradaki % 35.5'luk fark yine kullanılan banyo ortamlarının pH'dan ileri gelmektedir. ^{131}IDZ 'ın saflaştırılması için Dowex 1 anyon değiştirici kolondan geçirilmiştir. Ampul ortamının pH= 6 olması nedeniyle kolonda tutulan ^{131}IDZ 0.1 N HCl çözeltisi ile elue edilmiştir. Elüsyon işleminin gerçekleştiği Şekil 3.30 ve Şekil 3.31'den görülmektedir.

Çizelge 4.8 Ampul Ortamındaki ^{131}IDZ 'ın % İşaretlenme Verimleri.

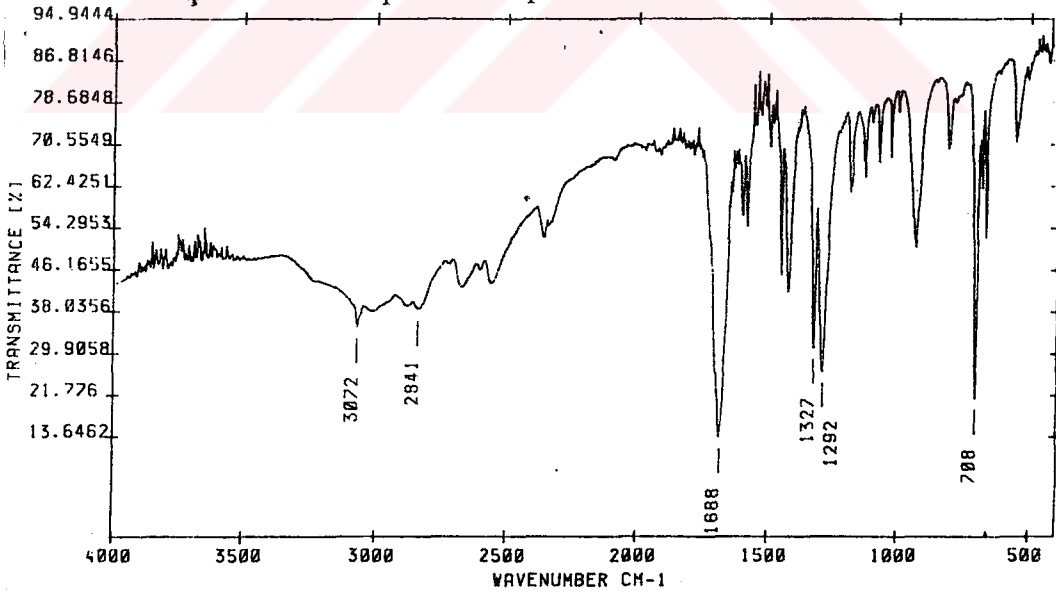
İşaretlenme Verimi (%)			
ITLC 1 (BuOH/Su/AcOH)		ITLC 2 (İzo/BuOH/NH ₄ OH)	
$^{131}\text{I}^-$	$^{131}\text{IDZ} + ^{131}\text{I}_2$	$^{131}\text{I}_2 + ^{131}\text{I}^-$	^{131}IDZ
0.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	36 ± 1.0	64 ± 1.0

İodogen yöntemine göre heriki ortamda yapılan deneylerin sonuçları karşılaştırılacak olursa; % 50 HCl ortamındaki diazepam kullanılarak yapılan deneydeki işaretlenme verimi % 84.0 ± 1.0 olmasına karşın ampul ortamındaki ise % 64.0 ± 1.0 dir. İşaretlenme verimindeki bu fark işaretlenen diazepam'ın bulunduğu ortamın pH'ından kaynaklanmaktadır. İodogen ortamında elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu ile diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi gerçekleşmiştir. Ayrıca işaretli bileşiğin hiç yürümemesi yani uygulama noktasında kalmasındanda bileşiğin nötral olduğu görülmektedir.

İşaretlenme süresinin % işaretlenme verimine etkisi incelenmiş olup 30, 60 dakikalık reaksiyon sürelerinin işaretlenmenin hızlı olması nedeniyle işaretlenme verimini değiştirmediği görülmüştür. Ayrıca iodogenli tüp sayısının da işaretlenme verimine etkisi incelenmiş fakat işaretlenme veriminde artış gözlenmemiştir.



Şekil 4.1 Diazepam'ın IR spektrumu.



Şekil 4.2 Ampul ortamında iyododiazepam'ın IR spektrumu.

Çizelge 4.10 IR Spektrum Sonuçları.

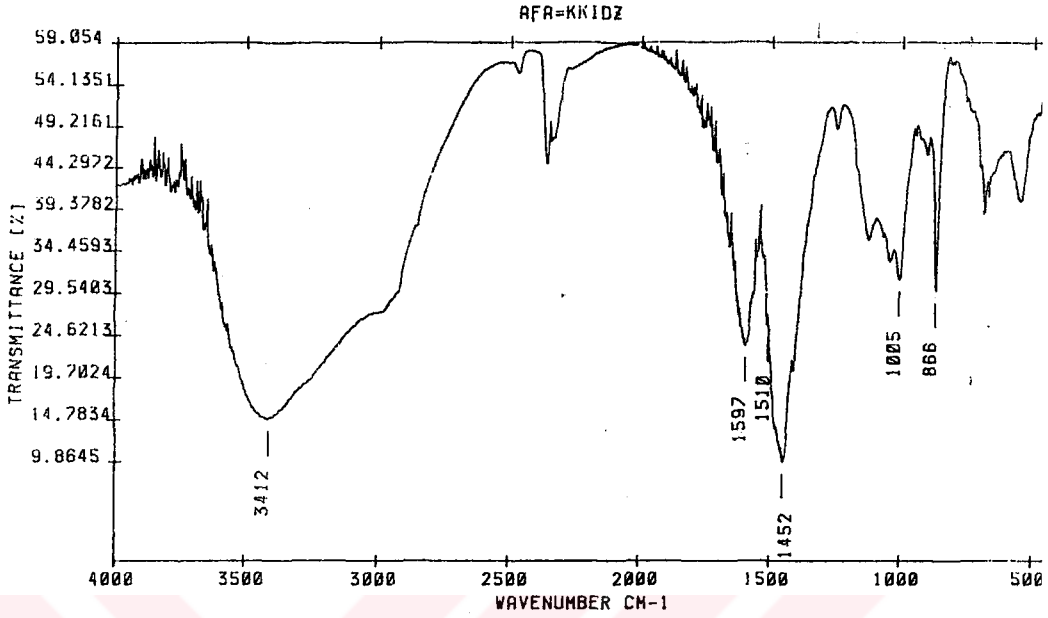
Dalga Boyu (cm^{-1})	Gruplar
708-866	Ph-Cl
1597-1688	C=O
1327-1410	N-CH ₃
600	Ph-I
3383-3412	C-OH

Diazepam'ın IR spektrumunda görüldüğü gibi 709 cm^{-1} 'de Ph-Cl piki, 1625 cm^{-1} 'de C=O piki, 1340 cm^{-1} 'de de N-CH₃ pikleri ve 3383 cm^{-1} 'de dalga boyunda ise nemden kaynaklanan OH piki görülmektedir.

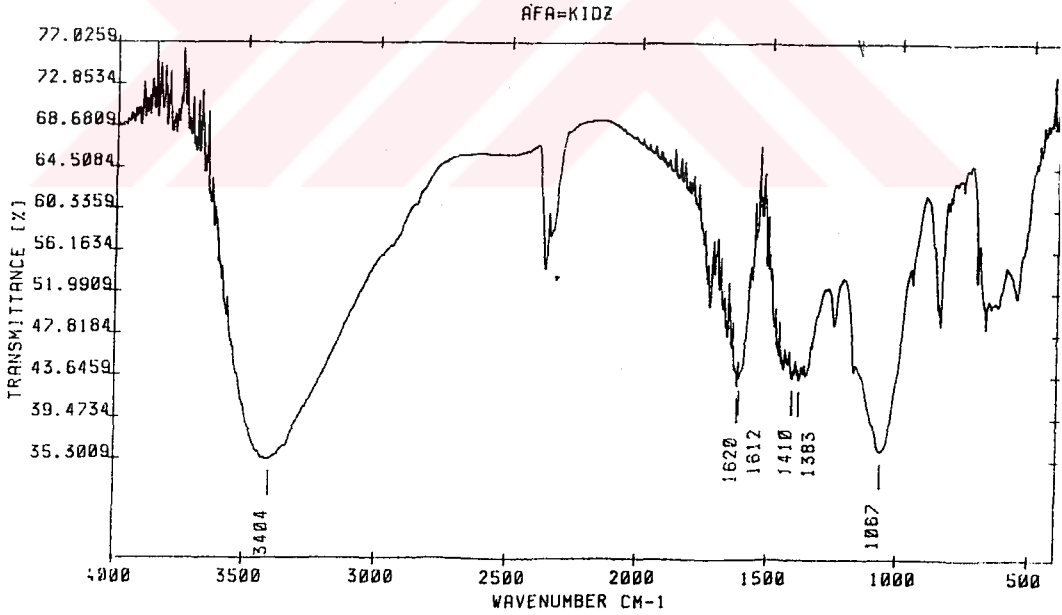
Spektrumdan da görüldüğü gibi dalga boyu 708 cm^{-1} 'de Ph-Cl piki, 1688 cm^{-1} 'de C=O piki, 1327 cm^{-1} 'de de N-CH₃ pikleri ve Ph-I piki ise 600 cm^{-1} dalga boyunda görülmektedir.

Asidik ortamda bulunan diazepam ile iodogenli ve kontrol ortamları için iki inaktif bileşik sentezlenmiş olup spektrumları Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de verilmiştir. Bu spektrumlarda da ampul ortamına ait IR spektrumunda görülen pikler görülmektedir. Fakat Şekil 4.2'de 1688 cm^{-1} dalga boyunda görülen C=O piki asidik ortamda yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen IR spektrumlarında görülmemektedir. Bunun yanı sıra dalga boyu 3412 cm^{-1} 'de -COOH piki görülmektedir. Heriki spektrumda da $\lambda = 600 \text{ cm}^{-1}$ 'de C-I piki yer almaktadır.

Asidik ortamda yapılan sentezlerde IR spektrumlarında görüldüğü gibi yapının hidrolizlendiği COOH bağının oluştuğu düşünülmektedir. Bu sonucu destekleyen sonuçlar I-131 ile işaretlenme deneylerinde de görülmektedir. Çünkü asidik ortamdaki bekletilmiş diazepam'ın I-131 ile işaretlenme deney sonuçlarında (Şekil 3.12, Şekil 3. 13) iki pik görülmektedir, bunun nedeni oluşan iki üründe işaretlenerek iki farklı işaretli bileşiğin oluşmasıdır.



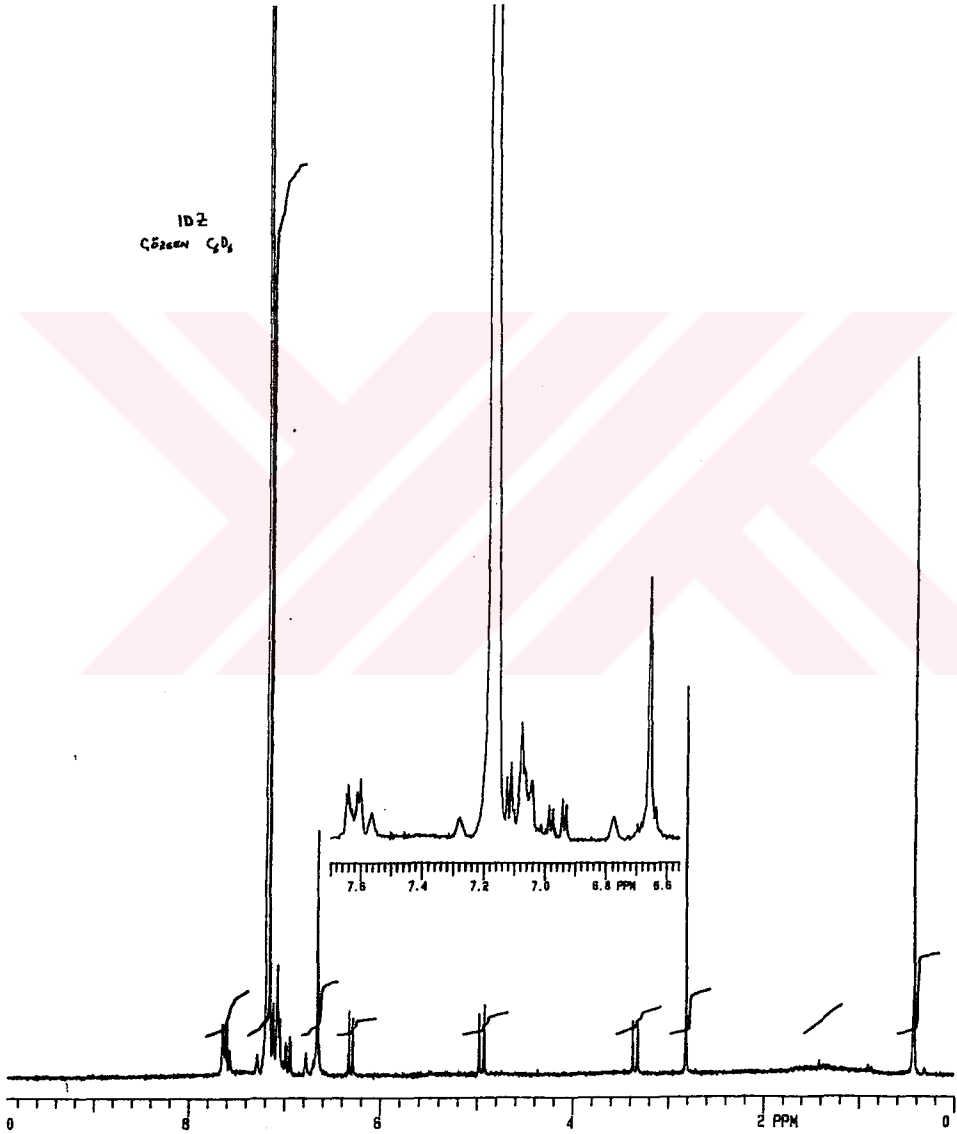
Şekil 4.3 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın (kontrol) IR spektrumu.



Şekil 4.4 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın IR spektrumu.

4.5.2 ^1H NMR Spektrumları

Radyoaktif iyodinasyon ile aynı şartlarda idogenli ortamda ampuldeki diazepam'ın sentezlenmesi sonucunda elde edilen bileşiğin ^1H NMR spektrumu Şekil 4.5'de görülmektedir.



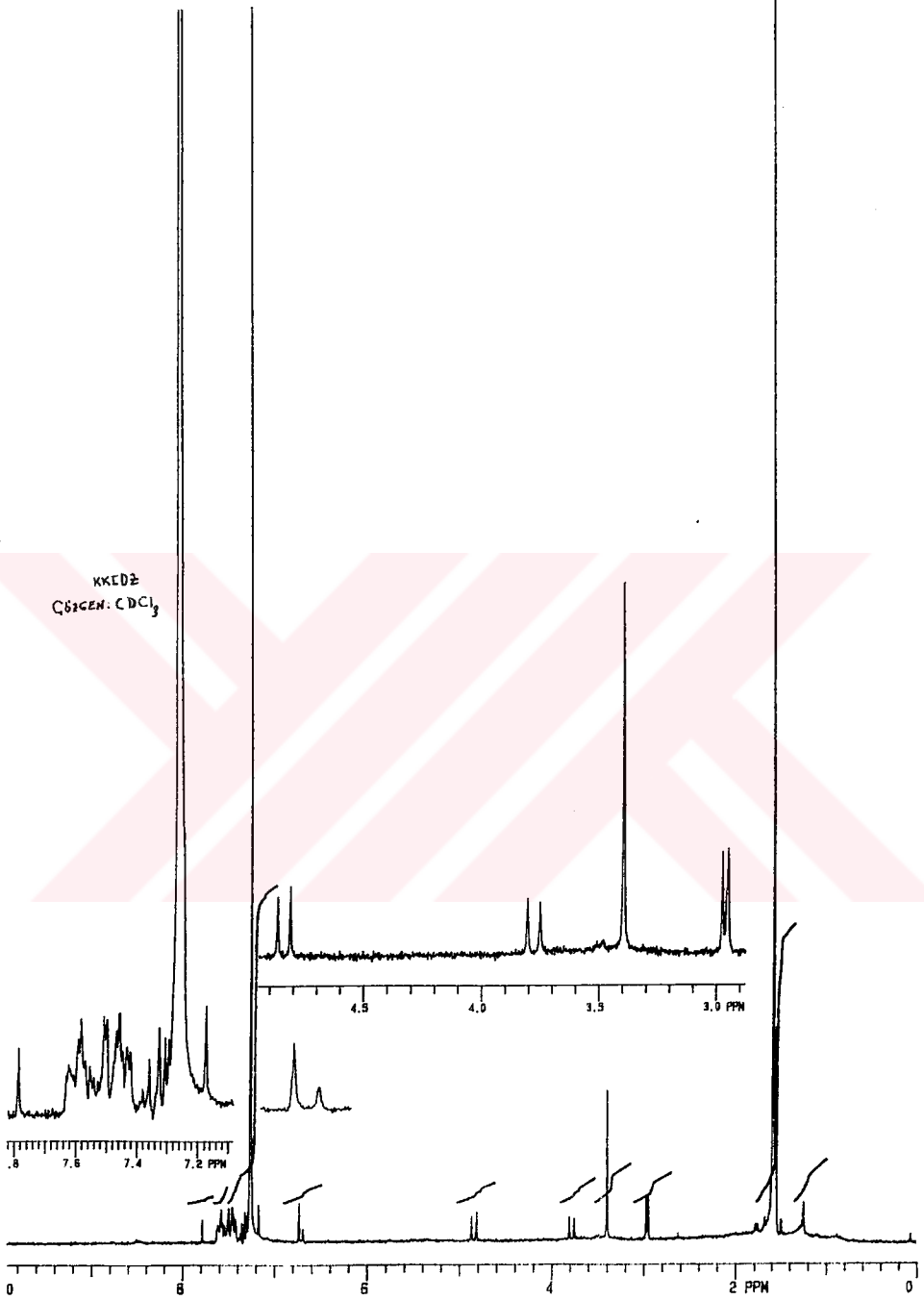
Şekil 4.5 Ampul ortamında iyododiazepam'ın ^1H NMR spektrumu.

Çizelge 4.11 ^1H NMR Spektrumlarından Elde Edilen Veriler.

ppm	Açıklamalar
2.80	1- N-CH ₃
4.97	3- C-H dublet
3.37	3- C-H dublet
6.32-7.10	Fenil C-H

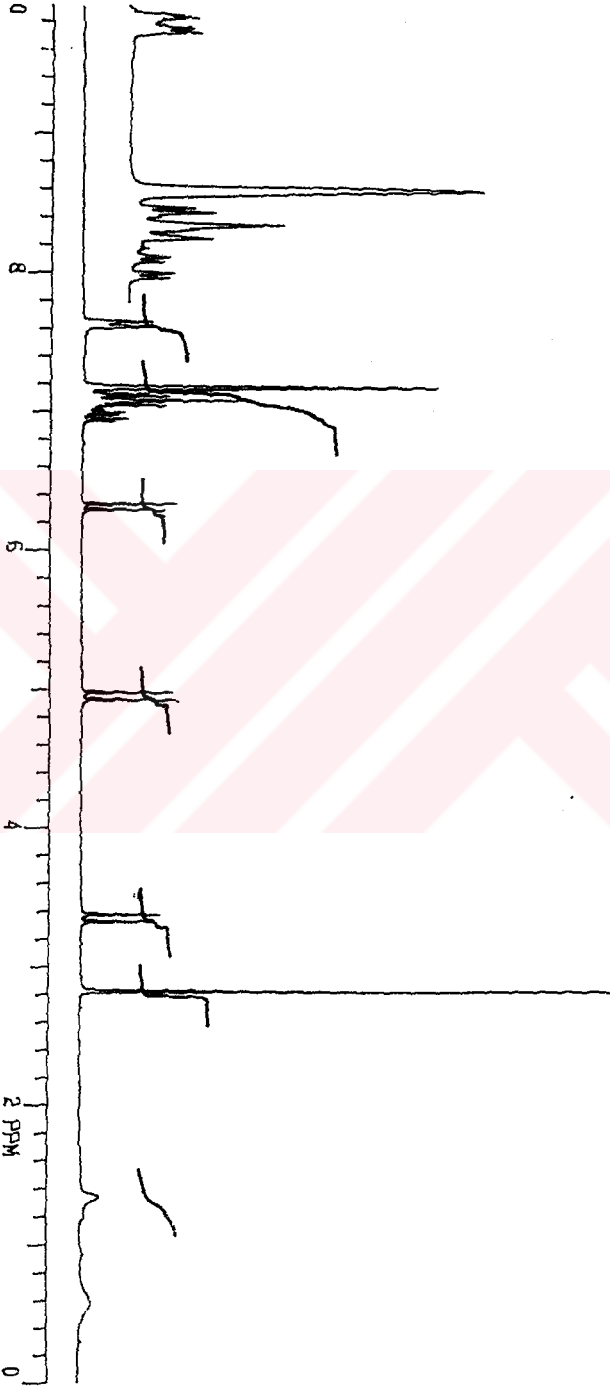
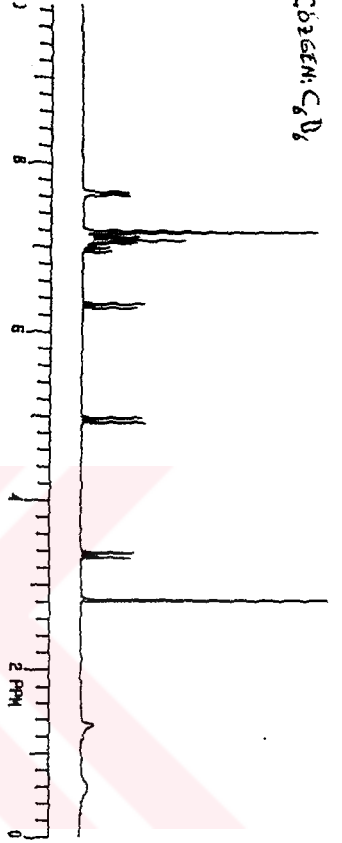
Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi 2.80 ppm'de 1 pozisyonundaki N-CH₃, 4.97 ppm ve 3.37 ppm'de iki tane dublet 3 pozisyonundaki alifatik C-H protonlarına aittir. 6.32-7.10 ppm arasındaki 3 dublet ile bir triplet pik fenil halkasının protonlarına aittir. Bu durumda iyot atomunun fenil halkası üzerine bağlanmış olması mümkündür.

Asidik ortamda hem iodojenli hem de kontrol ortamında yapılan sentezler sonucunda elde edilen bileşiklerin ^1H NMR spektrumları Şekil 4.6 ve 4.7'de verilmektedir.



Şekil 4.6 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın (kontrol) ^1H NMR spektrumu.

$\text{C}_6\text{H}_5\text{N}_3$

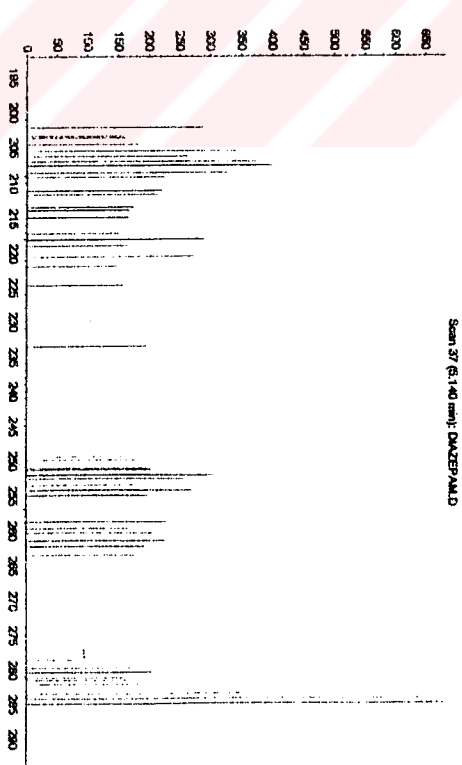
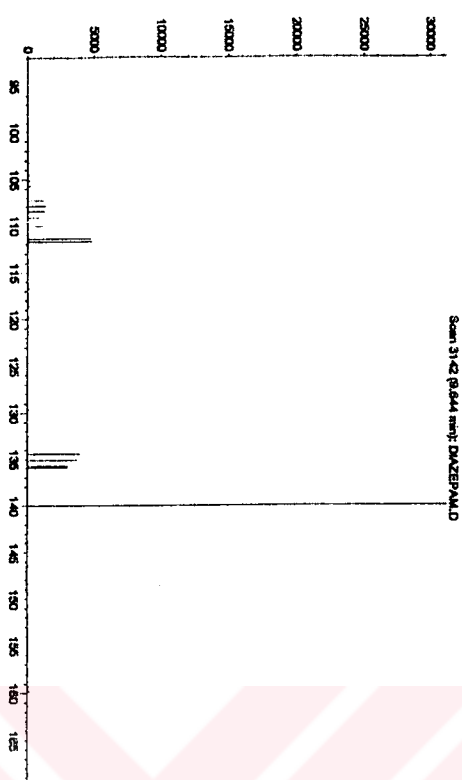
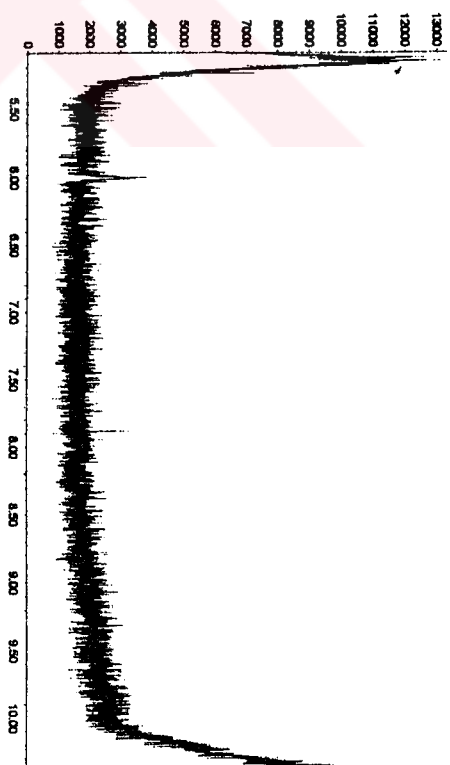
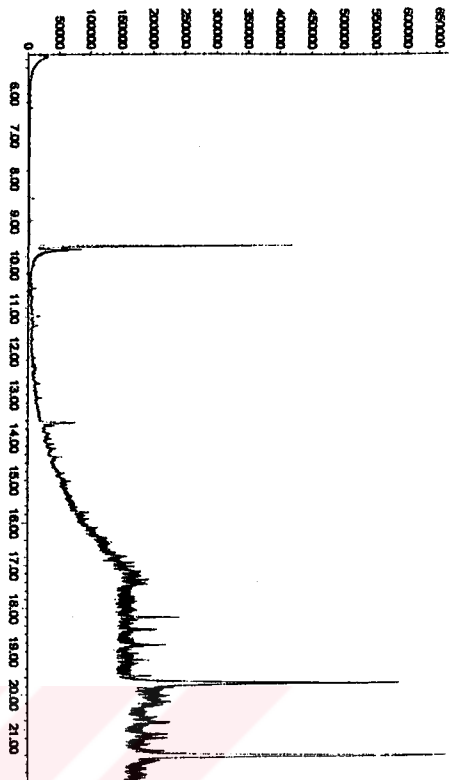


Şekil 4.7 % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın ^1H NMR spektrumu.

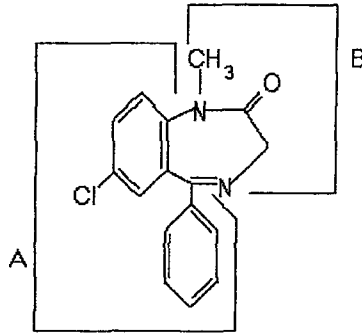
Asidik ortamda yapılan deneyler de elde edilen bileşiklerin ^1H NMR spektrumlarına bakıldığında ampul ortamındakinden farklı olarak 1.4 ppm'de 1 pik daha görülmektedir. Bu pikin $\text{C}=\text{O}$ grubunun hidrolizlenmesi sonucunda oluşan COOH protonuna ait olduğu düşünülmektedir.

4.5.3 Kütle Spektrumları (GC-MS)

Katı diazepam'ın EI (electron impact) ile yapılan kütle spektrumu Şekil 4.8'de görülmektedir. Bu spektrum sonuçlarına göre aşağıda görülen A bölünmesi (Şekil 4.9) sonucunda oluşan iyon grupları ve diazepam'dan bazı grupların ayrılması sonucu oluşan iyonlar Çizelge 4.12 verilmektedir.



4.8 Diazepam'in GC-MS spektrumu.



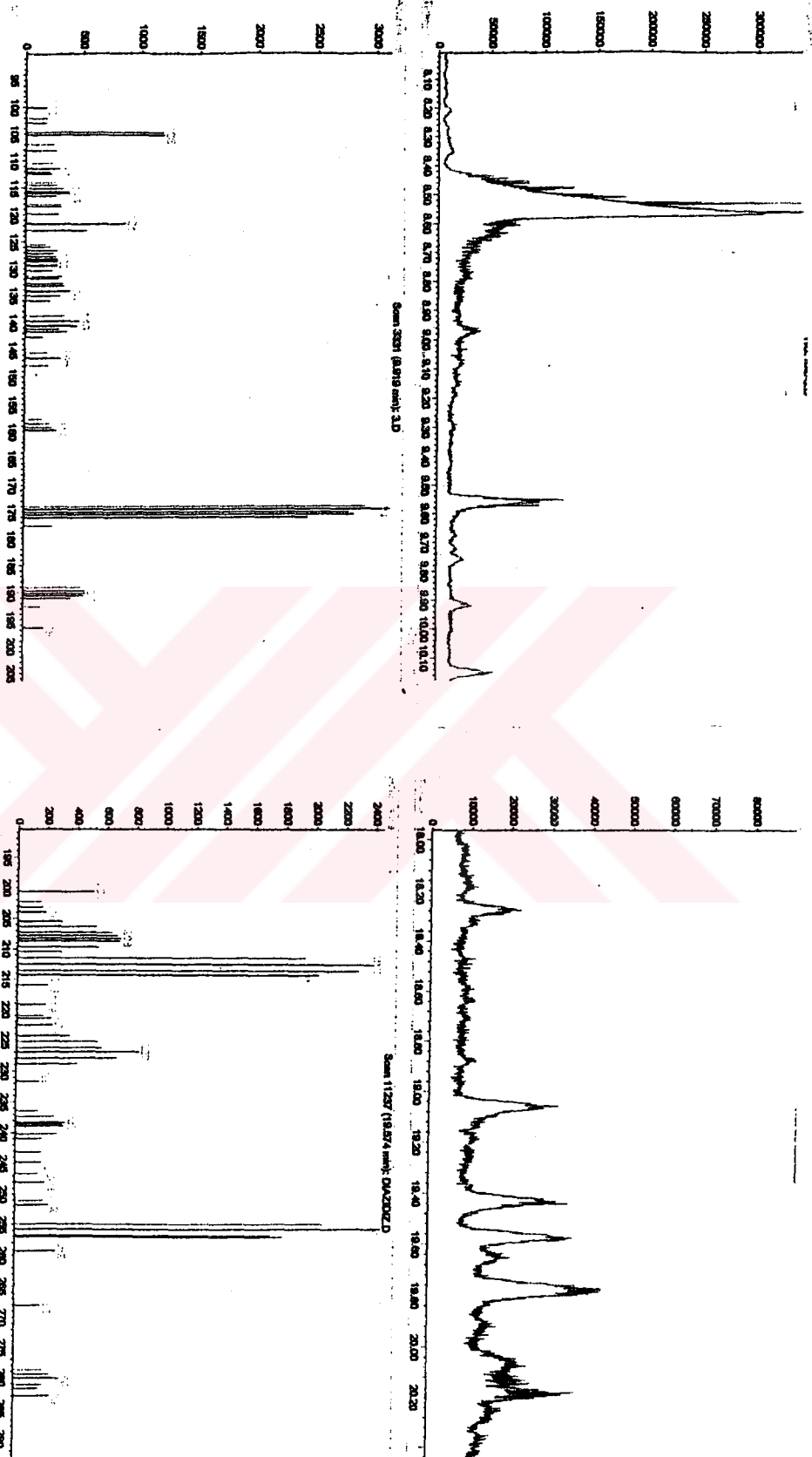
Şekil 4.9 Diazepam'ın A bölünmesi.

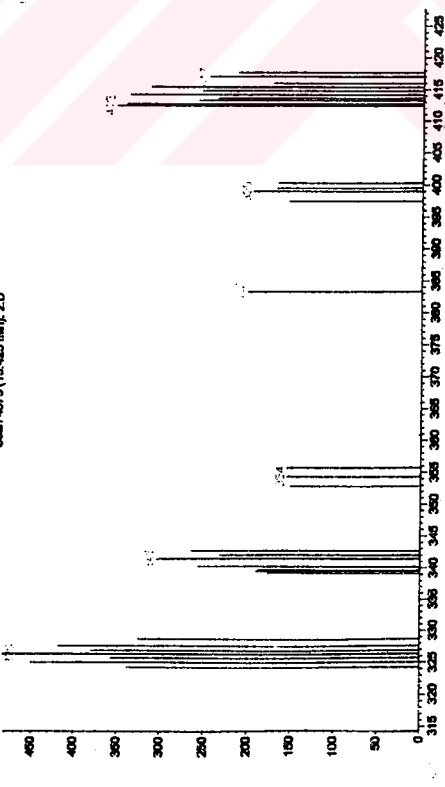
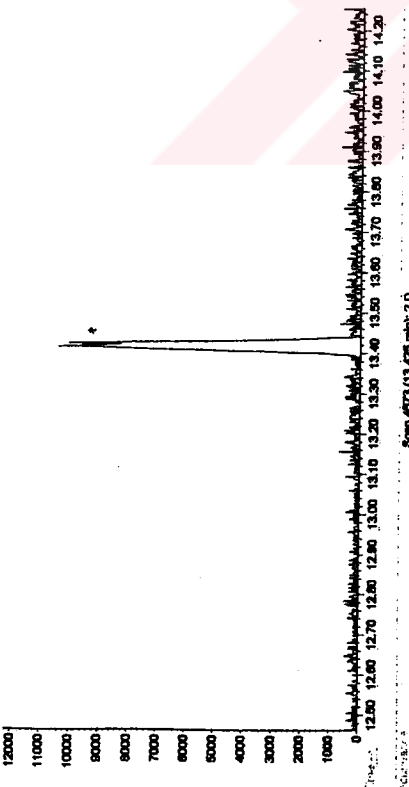
Çizelge 4.12 Diazepam'ın Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.

Gruplar	İyon (m/z)
$M + H^+$	285
$(M + H^+) - Cl$	250
$A^+ + H^+$	200
$A^+ + CH_3$	215
$A + Cl$	205
$B + Cl$	124
$B + Cl + OH$	140

Radyoaktif iyodinasyon ile aynı şartlarda iodogenli ortamda ampuldeki diazepam'ın sentezlenmesi sonucunda elde edilen bileşiğin kütle spektrumu Şekil 4.10 a ve b'de asidik ortamda sentezlenen(kontrol) iyododiazepam'ın ve iyododiazepam'ın kütle spektrumları ise Şekil 4.11 a ve b, Şekil 4.12 a ve b'de görülmektedir.

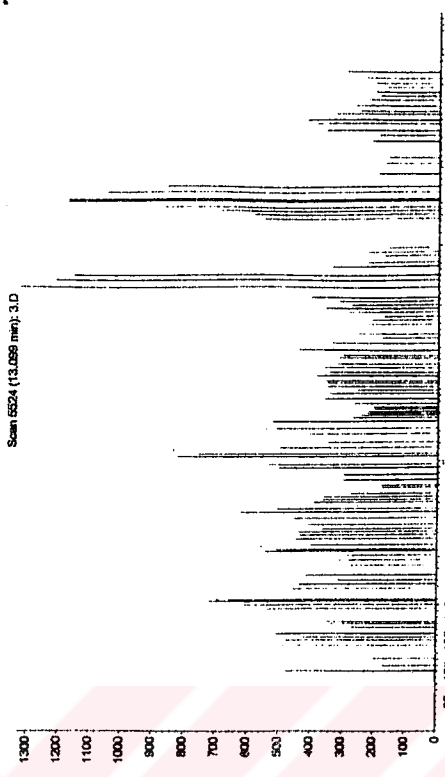
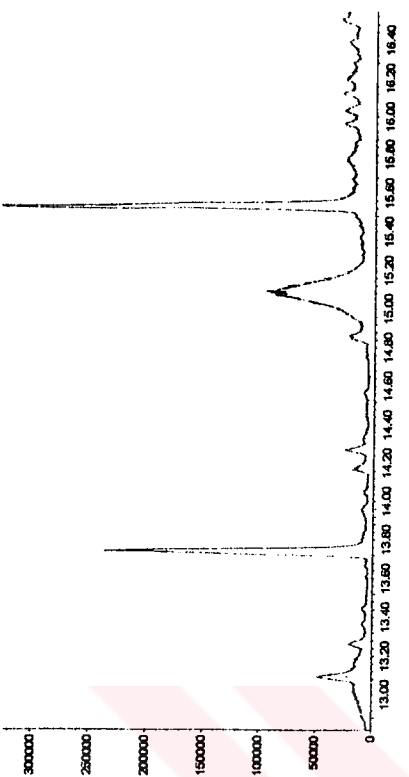
Şekil 4.10 a Ampul ortamında iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.





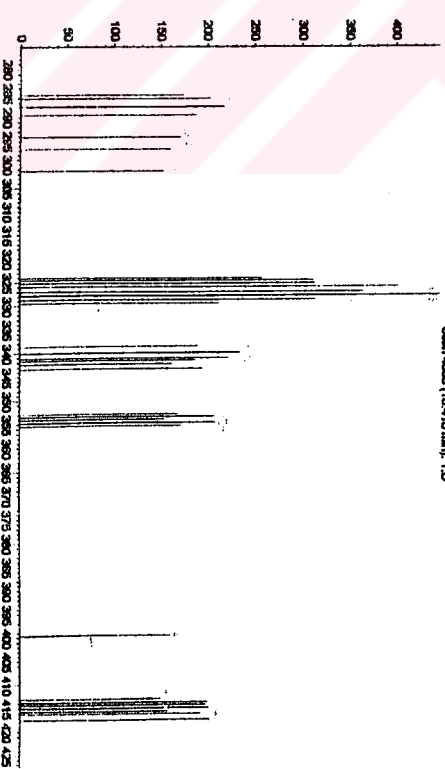
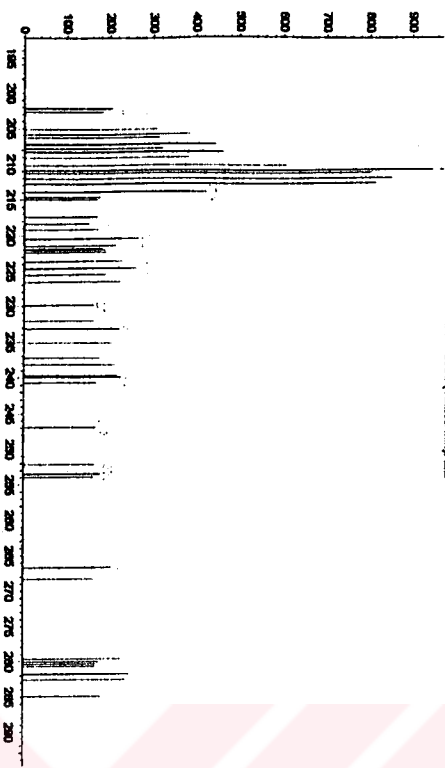
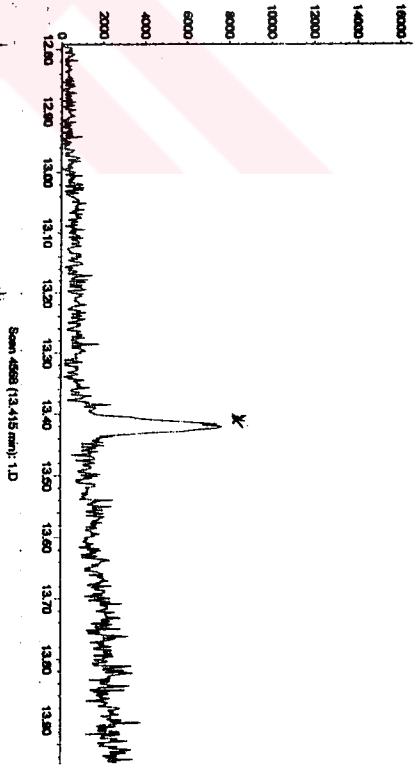
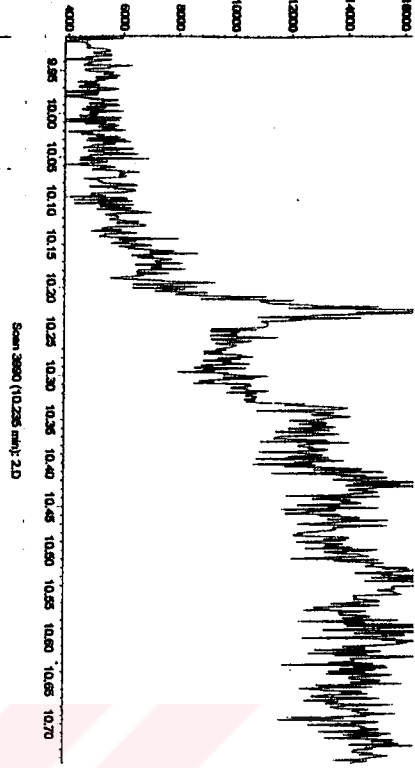
Şekil 4.10 b Ampul ortamında iyododiazepam'ın

GC-MS spektrumu.



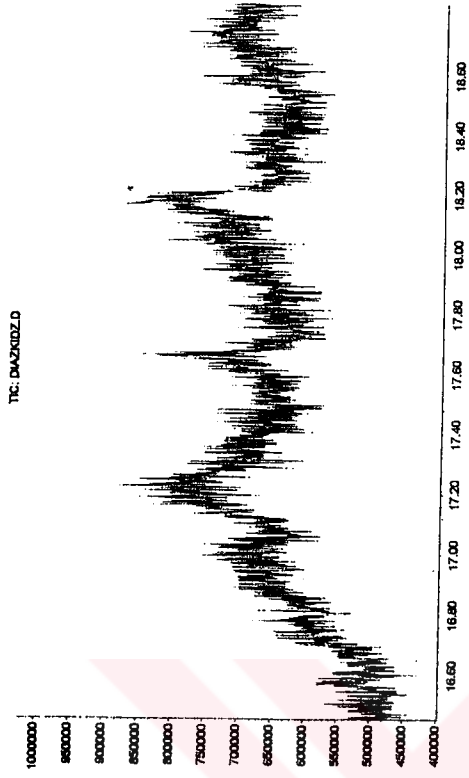
Şekil 4.11 a % 50 HCl ortamındaki (kontrol)

iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.

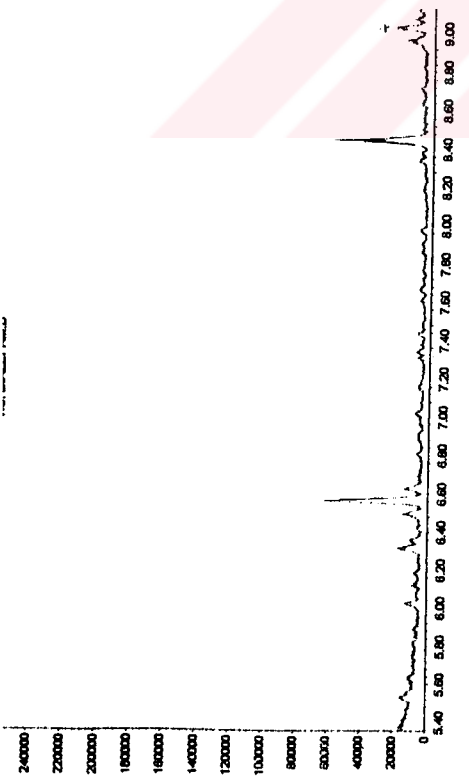
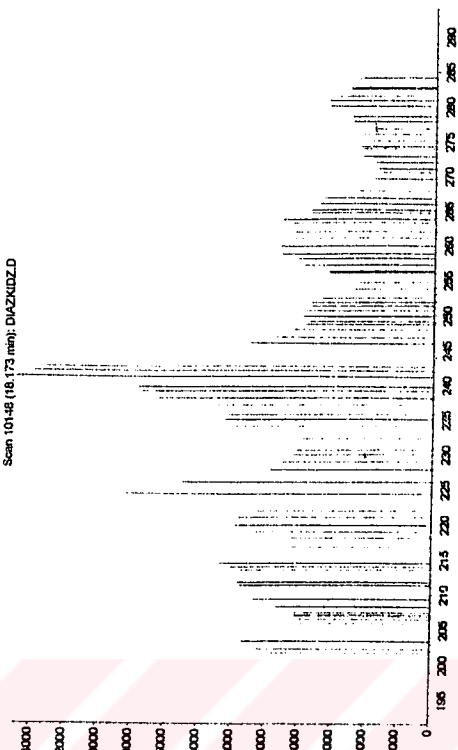


Şekil 4.11 b % 50 HCl ortamındaki (kontrol) iyododiazepam'ın GC-MS spektrogramı.

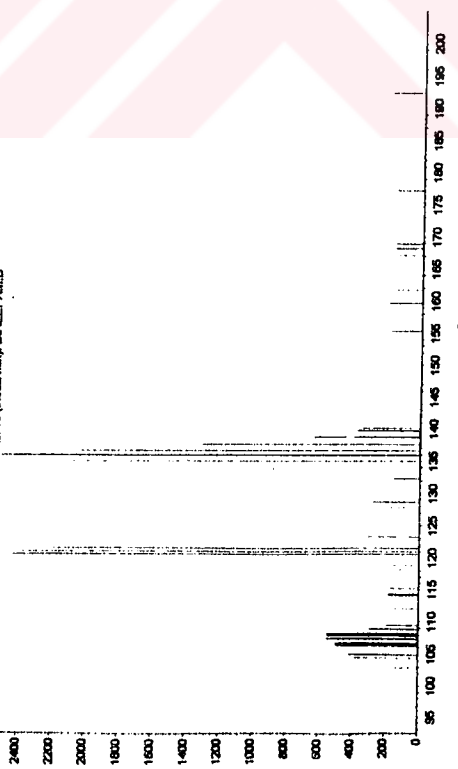
TIC: DIAZKIDZ.D



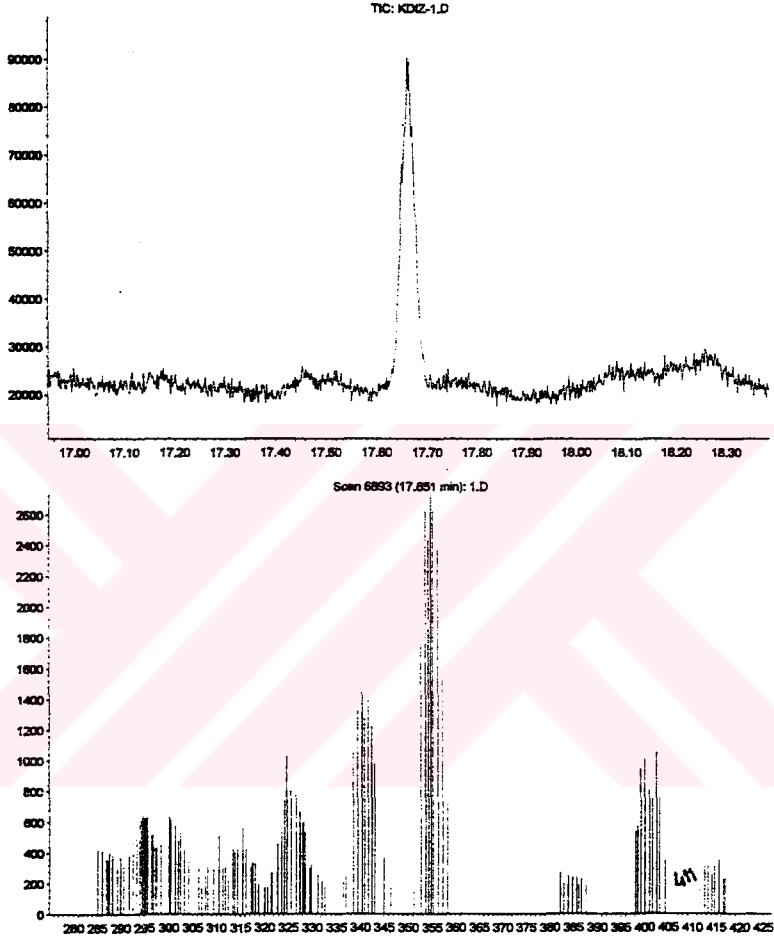
Scan 10146 (18.173 min): DIAZKIDZ.D



Scan 2718 (6.822 min): DIAZEPAM.D



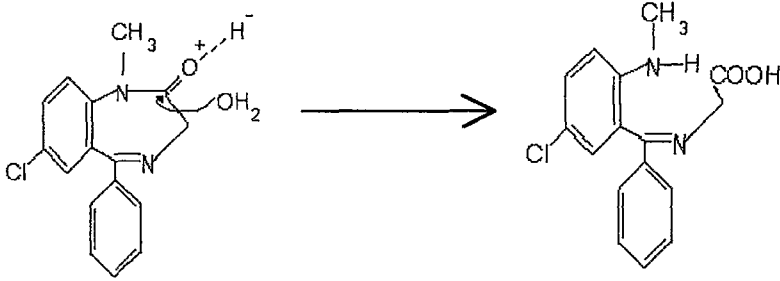
Şekil 4.12 a % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.



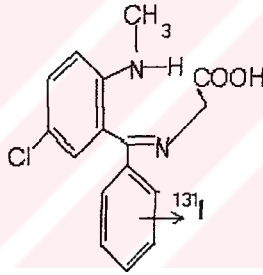
Şekil 4.12 b % 50 HCl ortamındaki iyododiazepam'ın GC-MS spektrumu.

Asidik ortamda diazepam'ın bir kısmı aşağıdaki reaksiyona göre hidrolizlenmektedir. Bunun sonucunda hidrolizlenen ürün ve diazepam işaretlenerek iki farklı ürün olduğu düşünülmektedir. Öngörülen

diazepam'ın hidroliz ürünün iyot ile işaretli formülü (Şekil 4.13) aşağıda verilmektedir.

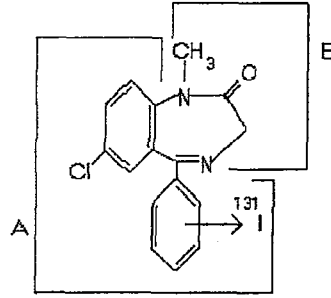


Diazepam'ın Hidroliz Reaksiyonu.



Şekil 4.13 ^{131}IHD 'ün öngörülen yapısal formülü.

İnaktif olarak sentezlenen iyododiazepam komplekslerinin GC-MS ile EI (electron impact) modunda kütle spektrumlarına göre iyododiazepam'ın aşağıda gösterildiği gibi A bölünmesi (Şekil 4.14) sonucunda oluşan A ve B grupları üzerinden meydana gelen iyonlar ve bunun dışında oluşan iyonlara ait m/z değerleri Çizelge 4.13'de verilmektedir.



Şekil 4. 14 ¹³¹IDZ'nin A bölünmesi.

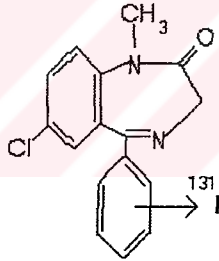
Çizelge 4.13 İyododiazepam'ın Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.

Gruplar	İyon (m/z)
$M^+ + H^+$	412
$(M^+ + H^+) - CH_3$	396
$M^+ - C=O$	383
A grubu($C_{13} H_8 Cl I$)	326
$A^+ + C=O$	354
$A^+ + CH_3$	341
$A^+ - Cl$	291

$M^+ + H^+$ 'ın $m/z = 412$ dir. Bu pik diazepam'ın iyodlandığını göstermektedir. İyododiazepam'ın diazepam'dan farklı olarak molekülünden ayrılan iyonlar Çizelge 4.13 görüldüğü gibidir. Diğer iyonlar diazepam'ın kütle spektrumunda gözlenenler ile aynı m/z değerlerine sahiptirler.

İyot atomunun diazepam molekülü üzerinde bağlı olduğu karbonun H^+ NMR sonuçlarına göre alifatik karbonlar olmadığına göre fenil halkası üzerinde olması gerekmektedir. Iıda ve arkadaşları (1994) tarafından yapılmış olan çalışmada 1,4 Benzodiazepin molekülünde 5 fenilin 2' pozisyonunda halojen gibi elektron verici grupların girişim yaptığı ve 2'IDZ'nin diazepam'dan daha fazla bir reseptör ilgisine sahip olduğu tesbit edilmiştir (Iıda et al., 1994).

İnaktif olarak sentezlenen iyododiazepam'ın spektrofotometrik (IR, UV; NMR; MS) analiz sonuçlarından elde ettiğimiz bileşiğin fenil halkası üzerine iyot atomunun bağlandığı anlaşılmaktadır. Ancak elde edilen sonuçlardan iyot atomunun 2' pozisyonuna bağlandığı konusu kesin değildir. Bu bir karışım da olabilir. Buna göre öngörülen yapı formülü aşağıdaki gibidir (Şekil 4.5).



Şekil 4.15 ^{131}I IDZ'in öngörülen yapısal formülü.

Buna bağlı olarak % 50 HCl ortamında bulunan diazepam kullanılarak yapılan kontrol deneylerinde I-131 ile işaretleme sonucunda 2 pik elde edilmektedir (Şekil 3.12, 3.13). Kontrol ortamında (ortamın asidikliğinden dolayı) inaktif olarak sentezlenme sırasında bir kısmının

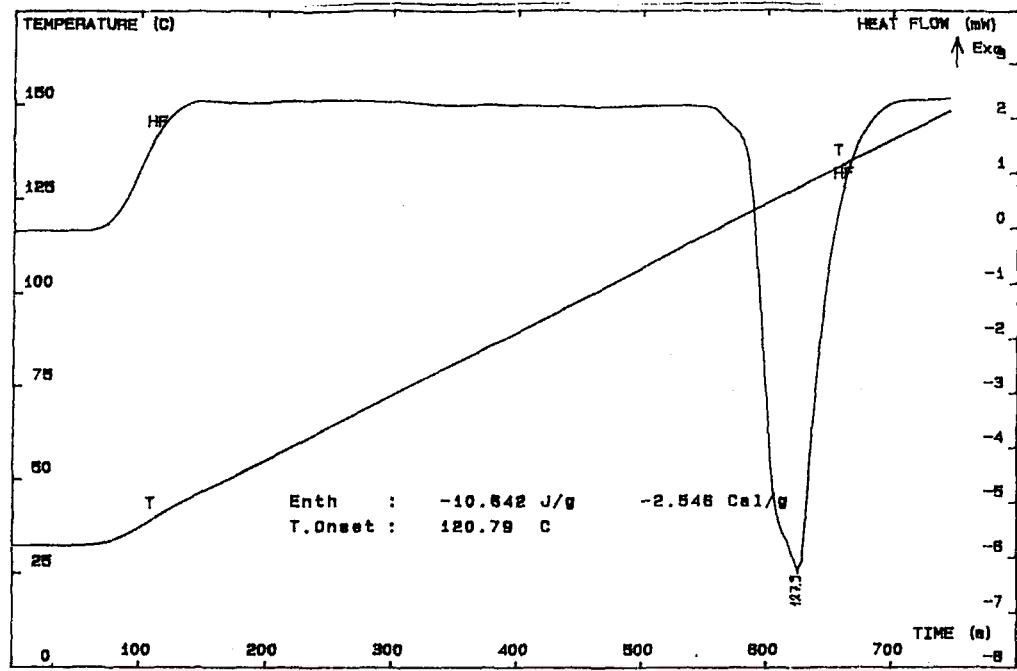
yukarıdaki reaksiyon gereği hidrolizlenebileceği ileri sürülmektedir (Nudelman and De Waisbaum., 1994).

$m/z = 301$ olan pik asidik ortamda kontrol deneyi sonucunda elde edilen iyododiazepam'ın kütle spektrumunda net olarak görülmektedir. Fakat iyodlanmış olan bileşiğin $m/z = 429$ olmasına karşın $m/z = 420$ 'e kadar taratıldığı için bu pik tesbit edilememiştir. Bu ortamdaki diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi sonucunda 2 pikin varlığı hidroliz ürününe işaretlenmesi nedeniyle R_f değerleri farklı iki ürün elde edildiği düşünülmektedir. Bu öngörülen bileşik formülleri Şekil 4.13 ve Şekil 4.15'de görüldüğü gibidir.

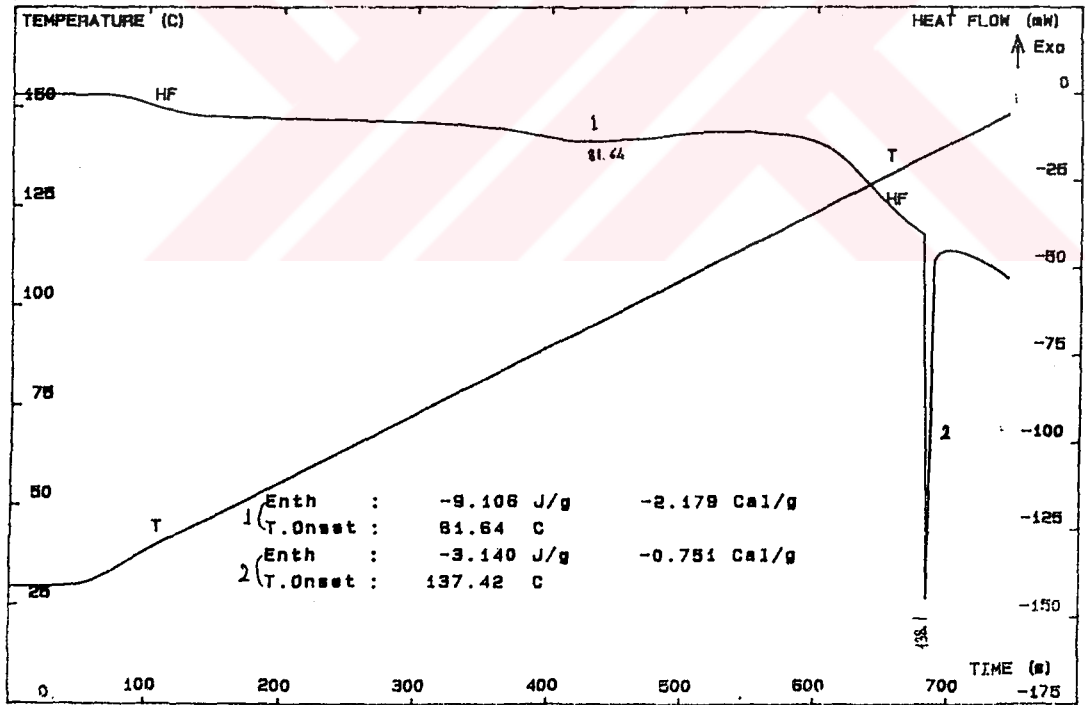
İodogenli tüpte yapılan çalışmalarda reaksiyonun hızlı olması ve iyodun yükseltgenmesi nedeniyle elektrofilik süstitüsyon söz konusudur. Asidik ortamda $C=O$ grubunun hidrolizlenmesi sonucu $COOH$ grubu oluşur, asidik ortamın sağlamış olduğu yükseltgenme sonucunda sonucu oluşan I^+ 'un fenil halkasına bağlanması ile farklı bir bileşik oluşmaktadır. Asidik ortamda kontrol şartlarında sentezlenen bileşikte bu iki yapının da mevcut olduğu görülmektedir (Şekil 3.12 ve Şekil 3.13).

4.5.4 Erime Noktası Tayini

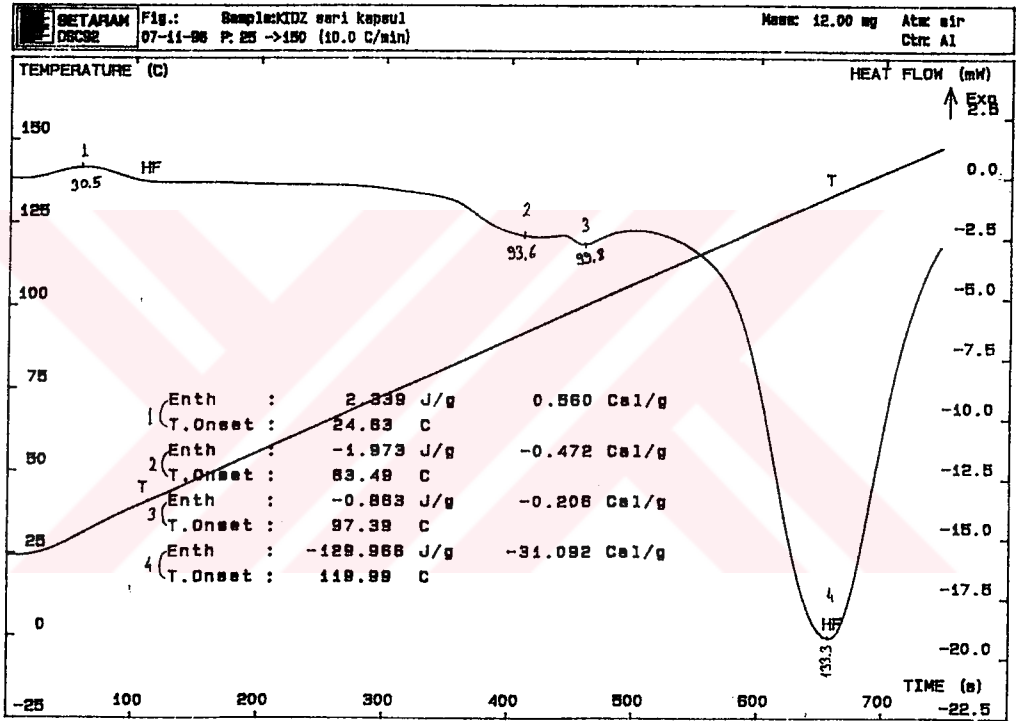
İnaktif olarak sentezlenmiş olan diazepam bileşiklerinin erime noktaları DSC'de (Differential Scanning Calorimetry) saptandı. Elde edilen erime noktası grafikleri Şekil 4.16 a, Şekil 4.16 b ve 4.16 c'de verilmiştir. Ampul ortamında hazırlanan iyododiazepam (IDZ) bileşiğin erime noktası $127.9\text{ }^{\circ}C$, asidik ortamda kontrol deneyi sonucunda elde edilen iyododiazepam'ın (KKIDZ) $138.2\text{ }^{\circ}C$ ve asidik ve iodogenli ortamda hazırlanan iyododiazepam'ın (KIDZ) erime noktası ise $133.7\text{ }^{\circ}C$ olarak saptanmıştır. Buna göre sentezlenen iyododiazepam bileşiklerinin erime noktaları diazepam'inkinden farklı bulunmuştur.



Şekil 4.16 a IDZ'ın erime noktası grafiği.



Şekil 4.16 b KKIDZ'ın erime noktası grafiği.



Şekil 4.16 c KIDZ'in erime noktası grafiği.

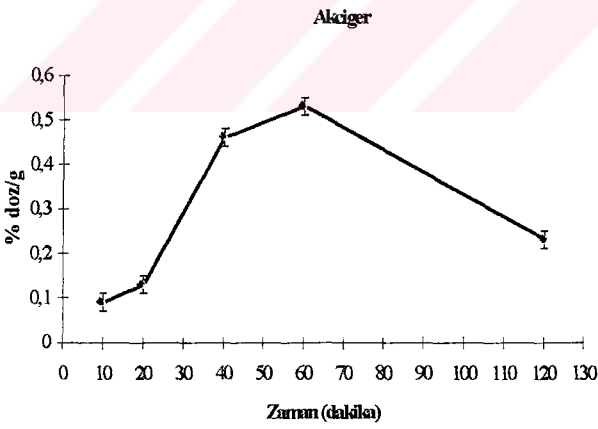
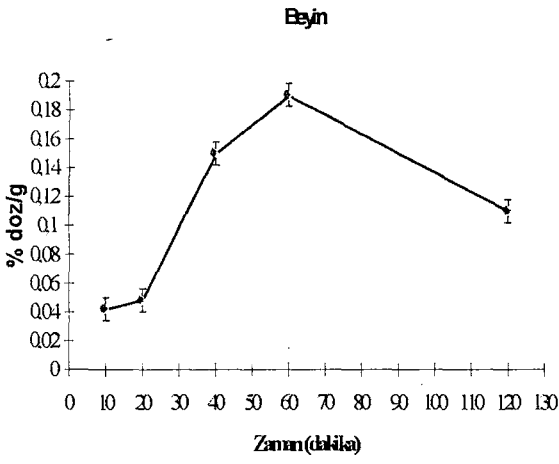
4.6 İN VİVO ÇALIŞMALARIN SONUÇLARI

4.6.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmalarının Sonuçları

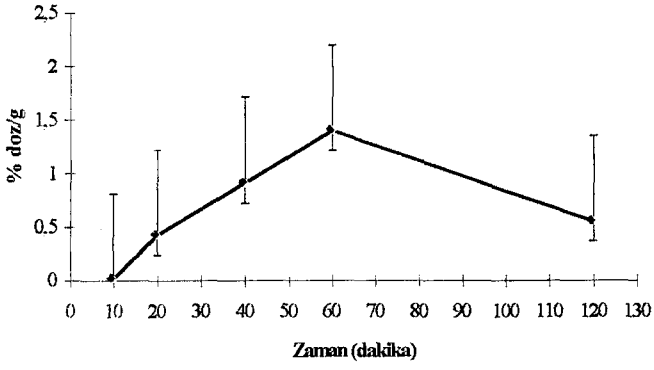
Yapılan in vivo çalışmalarda ^{131}IDZ 'ın biyolojik dağılımı incelenmesi deneylerinde herbir deney sonucunun elde edilmesi için 3 sıçan kullanılmış ve sonuçlar bu 3 deneyin ortalaması olarak verilmiştir. Enjeksiyon interiperitoneal olarak yapılmıştır. Herbir organ tartıldıktan sonra aktivitesi NaI (TI) sintilasyon dedektöründe sayılmıştır. Organlardaki ^{131}IDZ 'ın dağılımının süreye bağlı olarak değişimi izlenmiştir. Enjekte edilen radyofarmasötüğün aktivitesi relatif olarak 100 kabul edilmiş ve buna göre organlardaki % aktivite hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.14'de verilmiştir. Şekil 4.17'de organların % aktivite dağılımının zamana göre değişim grafikleri görülmektedir.

Çizelge 4.14 Zamana Bağlı Olarak Organlardaki % Aktivite/g Değişimi.

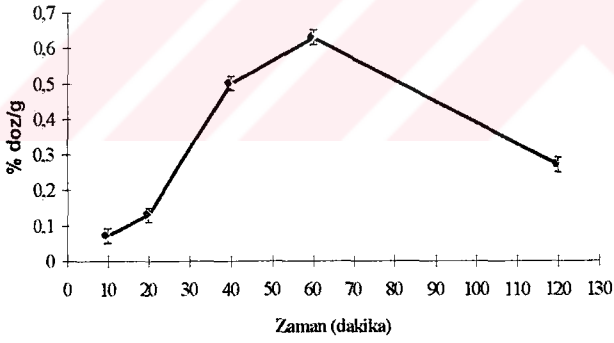
Süre(dak.)	Beyin	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Kan	Beyin/Kan
10	0.04 ±0.01	0.07±0.02	0.09±0.03	0.12±0.08	0.07±0.07	0.12±0.05	0.32±0.04
20	0.06±0.01	0.13±0.01	0.13±0.01	0.42±0.14	0.11±0.01	0.16±0.01	0.36±0.01
40	0.15 ±0.01	0.50±0.09	0.46±0.02	0.91±0.06	0.68±0.16	0.41±0.07	0.37±0.07
60	0.19±0.06	0.63±0.10	0.53±0.12	1.40±0.26	0.40±0.08	0.45±0.01	0.42±0.12
120	0.11±0.01	0.27±0.06	0.23±0.10	0.55±0.19	0.46±0.35	0.24±0.10	0.55±0.24

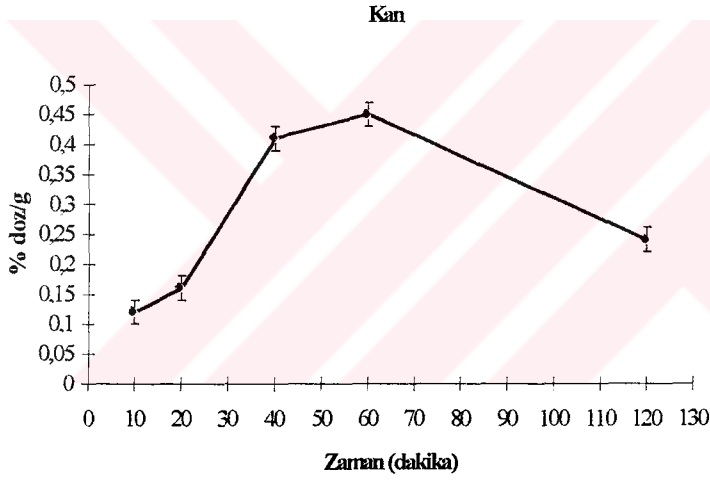
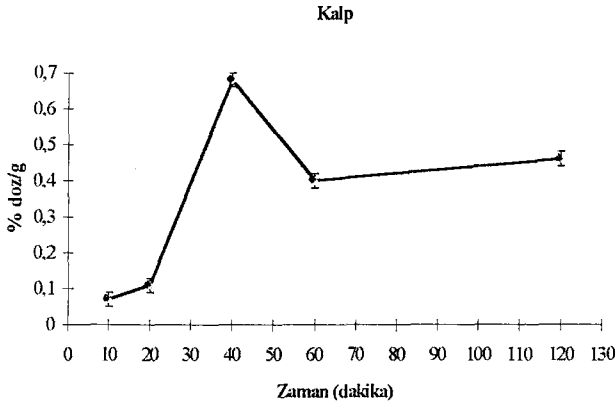


Böbrek



Karaciğer





Şekil 4.17 Organların % aktivite/g oranlarının zamana göre değişimi.

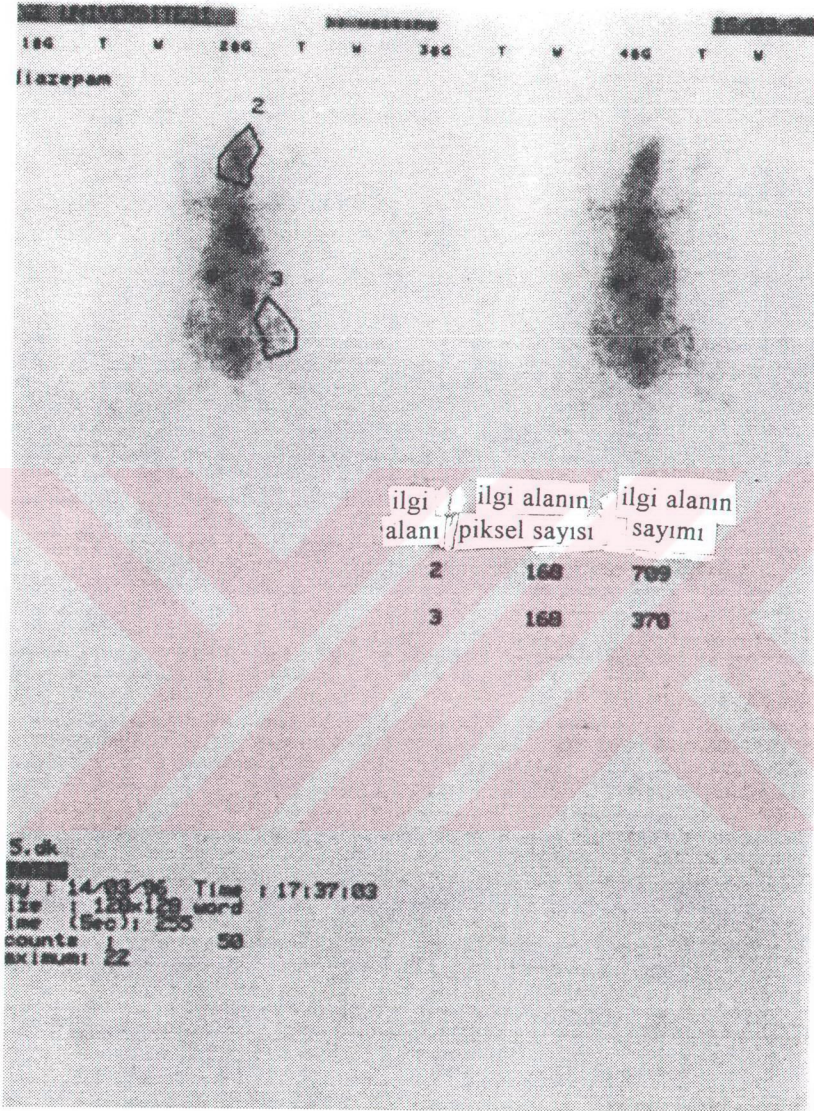
Ayrıca organ başına zamana bağlı % aktivite dağılımı süreye bağlı olarak Çizelge 4.15'de görüldüğü gibidir.

Çizelge 4.15 Organların % Aktivite Dağılımlarının Zamana Bağlı Değişimi.

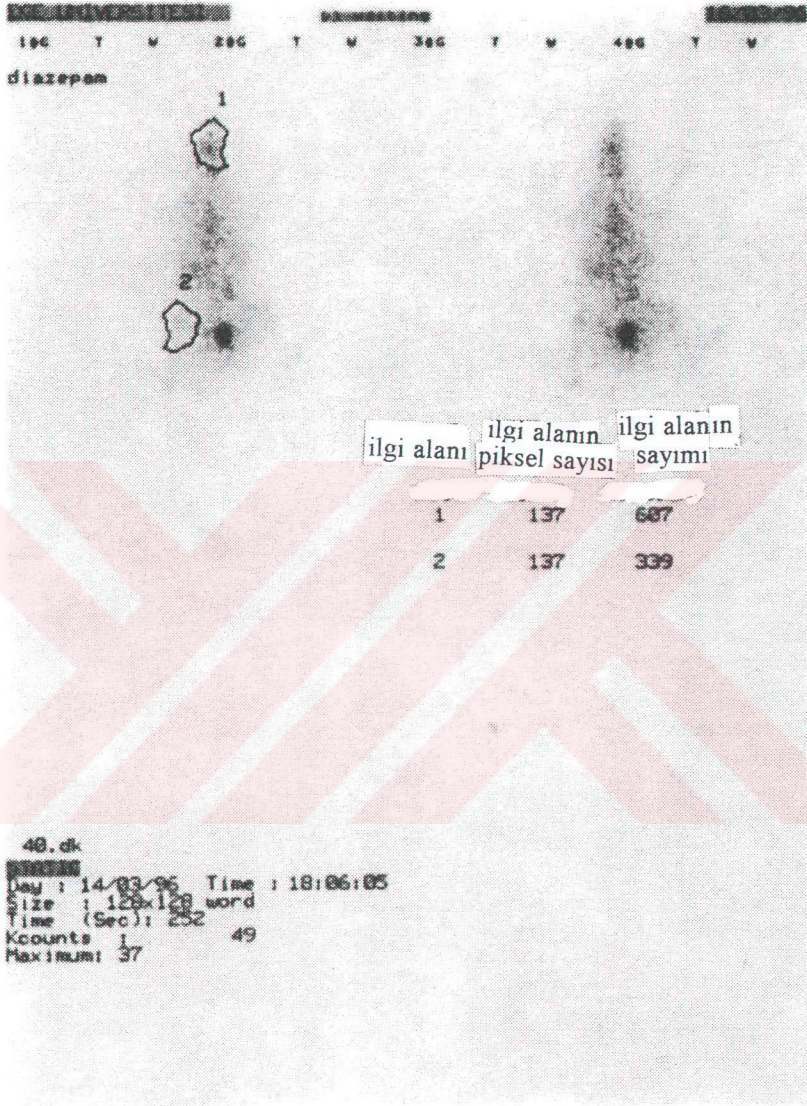
Süre (dak)	Beyin	Karaciğer	Akciğer	Böbrek	Kalp	Kan
10	0.90	0.64	0.23	0.17	0.08	0.13
20	1.25	1.08	0.23	0.30	0.13	0.20
40	2.94	3.49	0.93	0.51	0.34	0.72
60	3.60	5.18	3.07	0.85	0.29	0.50
120	2.68	2.60	0.58	0.50	0.29	0.40

4.6.2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

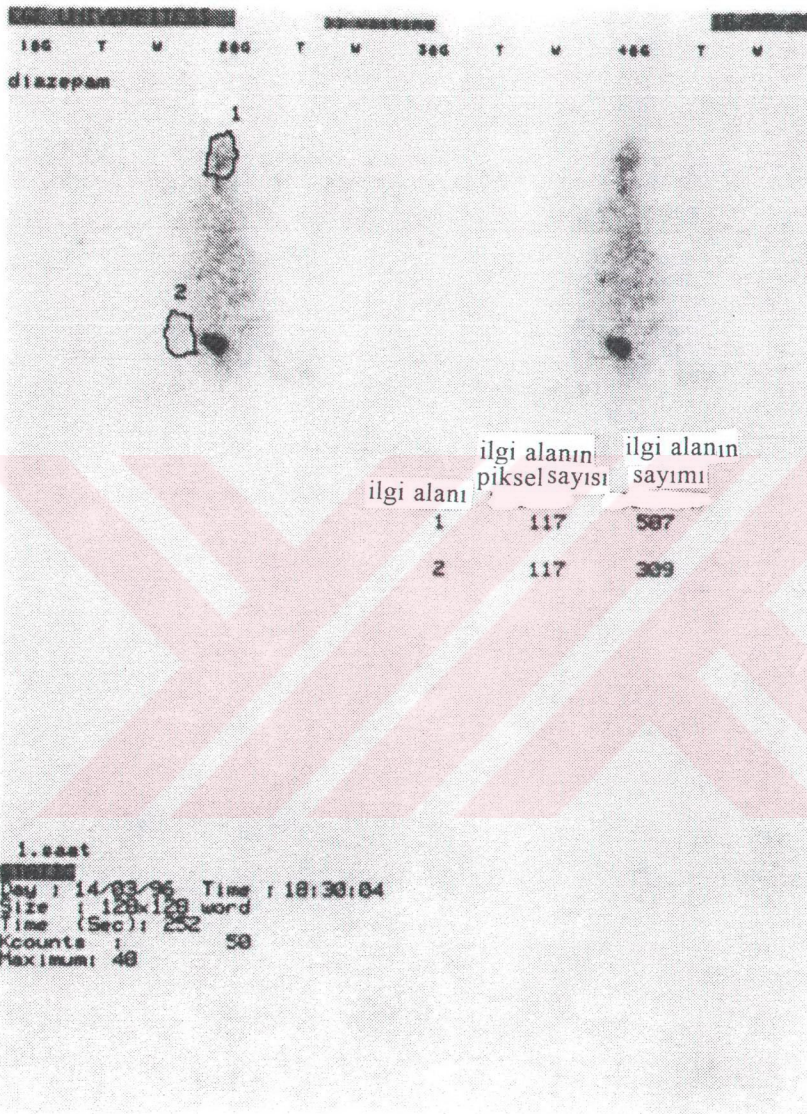
Sophy DX (64x64) gama kamera ile yapılan sintigrafik çalışmalarda tavşan kullanılmıştır, enjeksiyondan sonra belirli zaman aralıklarında görüntüleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda elde edilen sintigramlar Şekil 4.18, 4.19 ve 20 a, 20 b'de verilmiştir. Bu sintigramlardan yararlanılarak başın işaretli bölgesinden elde edilen piksel başına ortalama sayım ile background oranı bulunmuştur (Çizelge 4.16). Bu çizelgeden de görüldüğü gibi intravenöz enjeksiyondan 5 dakika sonra başdaki piksel başına ortalama sayım /background oranı 1.9, daha sonra da bu değer 1.9 sabit olarak kalmıştır.



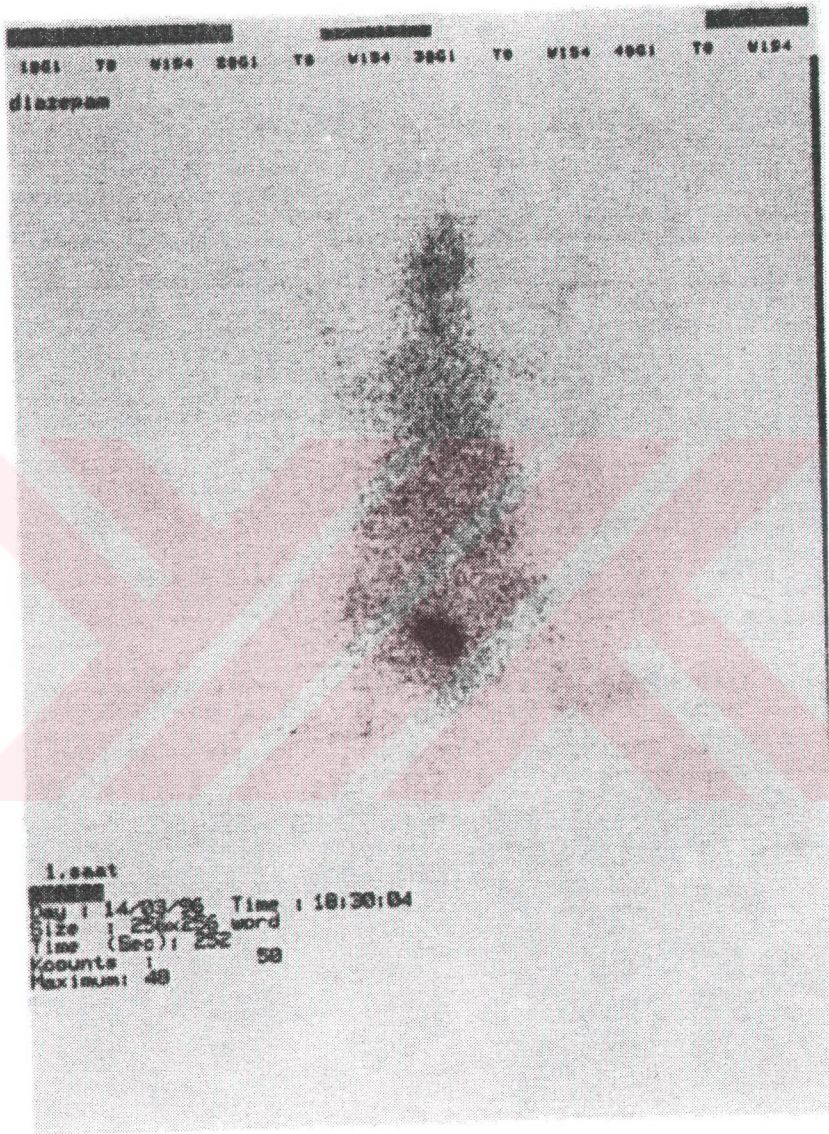
Şekil 4.18 ^{131}I IDZ'ın tavşana enjeksiyonundan 5 dakika sonra gama kamera ile elde edilen posterior pozisyonda vücut sintigrafisi.



Şekil 4.19 ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 40 dakika sonra gama kamera ile elde edilen posterior pozisyonda vücut sintigrafisi.



Şekil 4.20 a ^{131}I IDZ'ın tavşana enjeksiyonundan 60 dakika sonra gama kamera ile elde edilen posterior pozisyonda vücut sintigrafisi.



Şekil 4.20 b ^{131}IDZ 'ın tavşana enjeksiyonundan 60 dakika sonra gama kamera ile elde edilen tüm vücut sintigrafisi.

Sintgrafide bulunan işaretli bölgeler; 1. baş, 2. background (arka sol uyruk) ilgi alanı (roi), ilgi alanlarının sayımı (roicount) altta sayısal olarak verilmiştir. Orta kolon ilgi alanlarının (point) piksel sayısını göstermektedir. 2 numaralı alanın sağında görülen yoğun aktivite alanı mesane dir.

Çizelge 4.16 ^{131}IDZ 'ın Uygulanmadan Sonra Başdaki Piksel Başına Sayım Ortalaması/ Background Oranının Zamana Göre Değişimi.

Süre (dakika)	Piksel Başına Sayım Ortalaması/Background
5	1.9
40	1.8
60	1.9

Enjeksiyondan 10 dakika sonra kalp ve akciğerdeki tutulma beyninkinden yüksektir. Bunun yanısıra diğer organlardaki tutulmanın da yüksek olduğu göze çarpmaktadır (Çizelge 4.14). Bu durum İda Y. ve arkadaşları (1994) tarafından yapılan çalışmada da gözlenmektedir.

Çizelge 4.14'de maksimum beyin tutulumuna enjeksiyondan 60 dakika sonra ulaşıldığı görülmektedir. Innis ve arkadaşları (1991) tarafından $[^{123}\text{I}]\text{Ro 16-0154}$ ile yapılan çalışmada ise maymunlarda maksimum beyin tutulumuna 70 dakikada ulaşılmıştır (Innis et al., 1991). Sıçanlarla yapılan diğer bir çalışmada ise $[^{123}\text{I}]\text{Ro16-0154}$ intravenöz olarak enjekte edildiğinde enjeksiyondan 10 dakika sonra beyindeki tutulma maksimuma ulaşmıştır (Beer et al., 1990). İntravenöz uygulamada kısa bir sürede maksimuma ulaşmasının nedeni radyofarmasötüğün direk olarak kan yolu ile taşınmasıdır. Bizim sıçanlar

üzerinde yapmış olduğumuz çalışmada interiperitonal yol kullanıldığı için dağılım daha yavaş olmaktadır.

Bu radyofarmasötiğin temizlenme hızına bakılırsa; 1 saat sonra böbreklerdeki doz oranı 1.4 iken 2 saatte ise bu oran 0.55'e düşmüştür. Görülüyor ki 1 saat sonra radyofarmasötiğin $\sim 2/3$ 'ü böbreklerden temizlenmektedir. Bu oran akciğerlerde $\sim 1/2$ 'dir. Böbreklerdeki temizlenme oranı akciğere göre daha fazladır. Diğer organlarda temizlenme hızı çok yüksek ($<1/2$) değildir. Bir bileşiğin dağılımı eğer kan perfizyonuna bağlı ise yüksek tutulma gösteren organların çok hızla temizlenmesi gerekir ^{11}C -2>IDZ ile yapılan çalışmada da tutulmanın yalnız kan perfizyona bağlı olmadığı görülmüştür (İda et al., 1994). Bu çalışmada görüldüğü gibi temizlenme hızı çok yüksek olmamaktadır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar İda ve arkadaşlarının (1994) elde etmiş oldukları sonuçlara benzerdir. Bu nedenle dağılımın sadece kan perfizyonuna bağlı olmadığı görülmektedir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre kandaki radyoaktivitenin azalması beyninkinden hızlıdır. Fried Beer ve arkadaşları tarafından bulunan sonuçlarla uyum içersindedir (Fried Beer et al.; 1990). 1 saat sonunda böbreklerden sonra en yüksek aktivite oranı karaciğerde 0.63'dir ve 2 saatte bu oran 0.27'e düşmektedir. Diazepam karaciğerde kısmen demetilasyona uğramaktadır ve eliminasyonu yavaştır. Karaciğerde metabolize olması nedeniyle radyofarmasötiğin azalma oranı düşüktür.

Organ başına toplam dozun zamana bağlı olarak değişimini veren Çizelge 4.15'e bakıldığında 1 saatte görüldüğü gibi karaciğerde 5.18 iken beyinde 3.6'dır. Beyindeki birikim 2 saat sonunda maksimuma ulaşırken diğer organlarda ki tutulmanın düştüğü gözlenmektedir. Beyinde iyi bir tutulma görülmesi bu radyofarmasötiğin Benzodiazapin reseptörlerinin SPECT ile görüntülenmesinde kullanılmasının mümkün olduğunu gösterir. Beyin/kan oranının zamana göre artışı ^{131}I IDZ'ın kandan hızla temizlendiğini ve beyinde tutulmanın yüksek olduğunu gösterir. Saji ve

arkadaşları (1993), İda ve arkadaşları (1994) de yaptıkları biyolojik dağılım çalışmalarında kanda temizlenmenin beyine göre daha hızlı olduğunu ve beyindeki birikimin daha yavaş temizlediğini rapor etmişlerdir (Saji et al., 1993; İda et al., 1994).

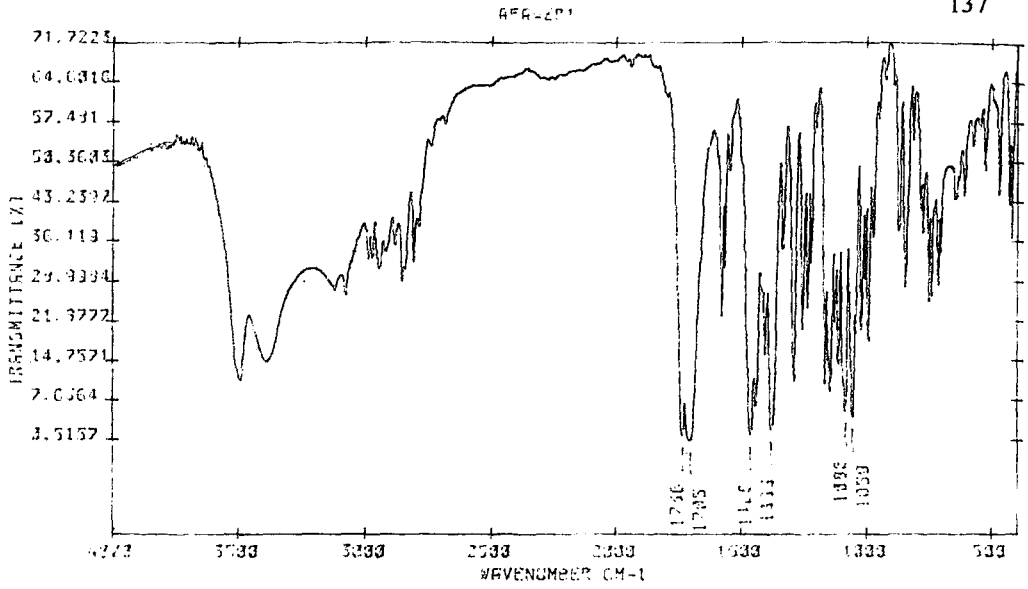
Sıçanlar ile yapılan bu çalışmalardan sonra tavşanlar üzerinde de sintigrafik çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda elde edilen sintigramlardan zamana göre ^{131}IDZ 'ın baş/background oranı hesaplanmıştır. Çizelge 4.16'dan da görüldüğü gibi baştaki tutulma uzun süre kalabilmekte ve temizlenme yavaş olmaktadır.

^{131}IDZ için lipofilite değeri saptanmış ve $P=1.9$ bulunmuştur. Oktanol-su oranının yüksekliğine bağlı olarak beyindeki tutulmanın hızlı ve yüksek olması gerekir (Saji et al., 1993). Ayrıca Kung ve arkadaşları (1984) tarafından yapılan çalışmada kanda lipid-çözünür ve nötral olan bileşiklerin kan-beyin-engelini geçerek serbest bir şekilde difüze olması gerektiği ileri sürülmektedir (Kung et al., 1984). Bizim elde etmiş olduğumuz oktanol/su oranının $P=1.9$ olması biyolojik dağılım çalışmaları ile uyum sağlamaktadır.

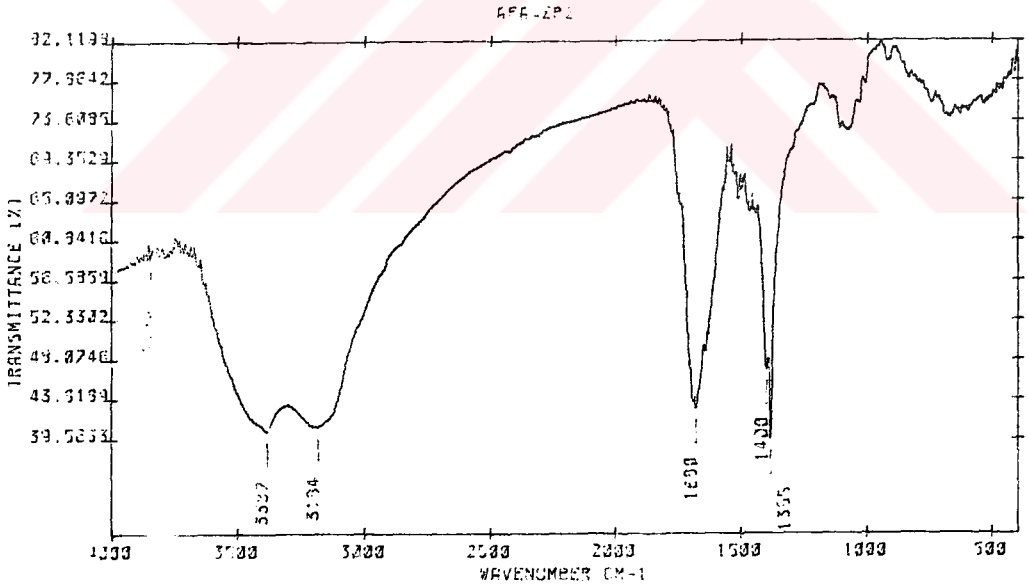
4.7 ZOPICLONE'NUN İODOGEN YÖNTEMİNE GÖRE I-131 İLE İŞARETLENMESİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

Propilen glikol içinde tam olarak çözünmeyen zopiclone üzerine 8 M HCl çözeltisi ilave edilerek çözünmesi sağlanmıştır. Şekil 3.33'den de görüldüğü gibi $R_f = 0.92-1.00$ arasında % 100 verime sahip bir pik gözlenmektedir. Fakat bu pikin işaretli bileşik veya ^{131}I 'e ait olduğunu karar vermek için Dowex 1 anyon değiştirici kolondan geçirilmiştir. Dowex 1 anyon değiştirici kolondan I-131'in % 2'si geçmiştir. Kolonda adsorbe edilen I-131 propilen glikol ile kolonun elüsyonu sonucunda % 20'si elüe edilmiş geri kalanı kolonda kalmıştır. Kolonda kalan bu fraksiyon $^{131}\text{I}^-$ olduğundan zopiclone'nun ^{131}I ile iodogen yöntemi ile işaretlenmediği anlaşılmıştır.

İodogen yöntemine göre direk olarak işaretlenmesi gerçekleşmediği için zopiclone'nun metabolik ürünü olan N-demetilzopiclone üzerinden işaretlenme yapılması planlanmıştır. Hidroliz sonucu elde edilen maddenin ve karşılaştırmak amacıyla zopiclone'nun IR spektrumları alınmıştır (Şekil 4.21, Şekil 4.22). IR spektrum sonuçları ise Çizelge 4.17'de verilmektedir.



Şekil 4.21 Zopiclone'nun IR spektrumu.



Şekil 4.22 Zopiclone'nun hidroliz ürününün IR spektrumu.

Çizelge 4.17 IR Spektrum Sonuçları.

Dalga Boyu (cm ⁻¹)	Gruplar
665-610	O-C=O
760-505	C-Cl
815- 725	2,5 disübs.pridin
1615-1575	Pridin (C=N)
1465-1500	Pyrazin
1650-1700	COOH
1255-1210	R-O-CO-NHR
3104-3397	C-OH

Zopiclone'nun IR spektrumunda dalga boyu 1257 cm⁻¹'de ester bağına ait (C-N) piki ve 600-665 cm⁻¹'de COO⁻ grubu piki, 1579 cm⁻¹'de piridin halkasında bulunan C=N grubuna ait kuvvetli bir piki görülmektedir. 1465 cm⁻¹ dalga boyundaki pik ise pirazin halkasına aittir. 1738 cm⁻¹'de siklik halkaya ait C=O-NH piki ve ~ 3400 cm⁻¹ civarında da nemden kaynaklandığı düşünülen OH piki görülmektedir.

Demetilzopiclone'nun sentezi için yapılan deney sonucunda elde edilen bileşiğin IR spektrumuna bakıldığında zopiclone'nun IR spektrumuna benzer pikler gözlenmiştir. Fakat zopiclone'nun IR spektrumunda görülen 600-665 cm⁻¹ civarında COO⁻ piki görülmemekte ve 3397 cm⁻¹'de ise C-OH pikinin gözlenmesi ester bağının koparak dekarboksilasyon olayı gerçekleştiği görülmektedir.

4.8 ZOPİCLONE'NUN ERİME NOKTASINDA HALOJEN YER DEĞİŞTİRME YÖNTEMİNE GÖRE I-131 İLE İŞARETLENMESİNE İLİŞKİN SONUÇLAR

4.8.1 Erime Noktasında Halojen Yer Değişirme Yöntemine Göre İşaretlenmesine Etki Eden Etmenler

% 50 HCl içinde çözünen zopiclone'nun halojen yer değiştirme yöntemine göre I-131 ile işaretlenme işlemi iyi bir verimle gerçekleştiği için, en uygun koşulların belirlenmesi amacıyla bu yöntemde etkili olan sıcaklık, reaksiyon süresi gibi parametreler incelenmiştir.

4.8.1.1 Sıcaklığın Etkisine İlişkin Sonuçlar

Bu çalışma için 190-200, 140-150, 90-100, 45-50 °C sıcaklık aralıklarında deneyler yapılarak işaretlenme verimine etkisi incelenmiştir. Bu sıcaklıklarda yapılan deneyler sonucunda ITLC ve elektroforez yöntemlerine göre radyokimyasal saflık analizleri sonucunda elde edilen işaretlenme verimleri Çizelge 4.18'de verilmektedir. Ayrıca elde edilen elektroforez diagramlarından bileşiğin nötral olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.18 Sıcaklığın İşaretlenme Verimine Etkisi.

Sıcaklık (°C)	¹³¹ IZP'nun İşaretlenme Verimi (%)
40-50	34.3±1.0
70-80	96.8±0.8
90-100	91.0±4.0
140-150	91.0±5.0
190-200	90.3±8.0

4.8.1.2 Reaksiyon Süresinin Etkisi

Optimum sıcaklık 70-80 °C olarak belirlendi ve bu sıcaklıkta reaksiyon süresinin etkisi incelendi. 15, 30, 45, 60 dakikalık reaksiyon sürelerinde silikon yağ banyosunda ısıtılan bileşiğin işaretlenme verimleri ITLC ve elektroforez yöntemlerine göre saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19'da görülmektedir.

Çizelge 4.19 Reaksiyon Süresinin İşaretlenme Verimine Etkisi.

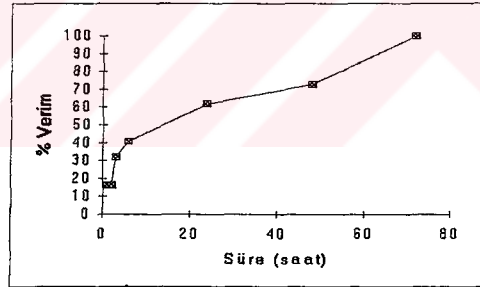
Zaman (dakika)	¹³¹ IZP'nun İşaretlenme Verimi (%)
15	36.0±4.0
30	84.4±2.5
45	85.3±4.0
60	96.8±0.8

Çizelge 4.20 Halojen Yer Değiştirme Yöntemi Ait Optimum Koşullar.

Madde Miktarı	1 mg
Reaksiyon Sıcaklığı	70-80 °C
Reaksiyon Süresi	1 saat
Çözgen pH'ı	<0

4.9 Oda Sıcaklığında Zopiclone'nun I-131 ile İşaretlenmesine İlişkin Sonuçlar

Oda sıcaklığında vakumda çözgen uçurulmadan yapılan bu deneylerde zamanla bir miktar işaretlenme olduğu Şekil 3.50'deki ITLC 1 kromatogramlarından da görülmektedir. Bu grafiklere göre hesaplanan işaretlenme verimlerinin zamana göre değişimi Şekil 4.23'de verilmiştir.



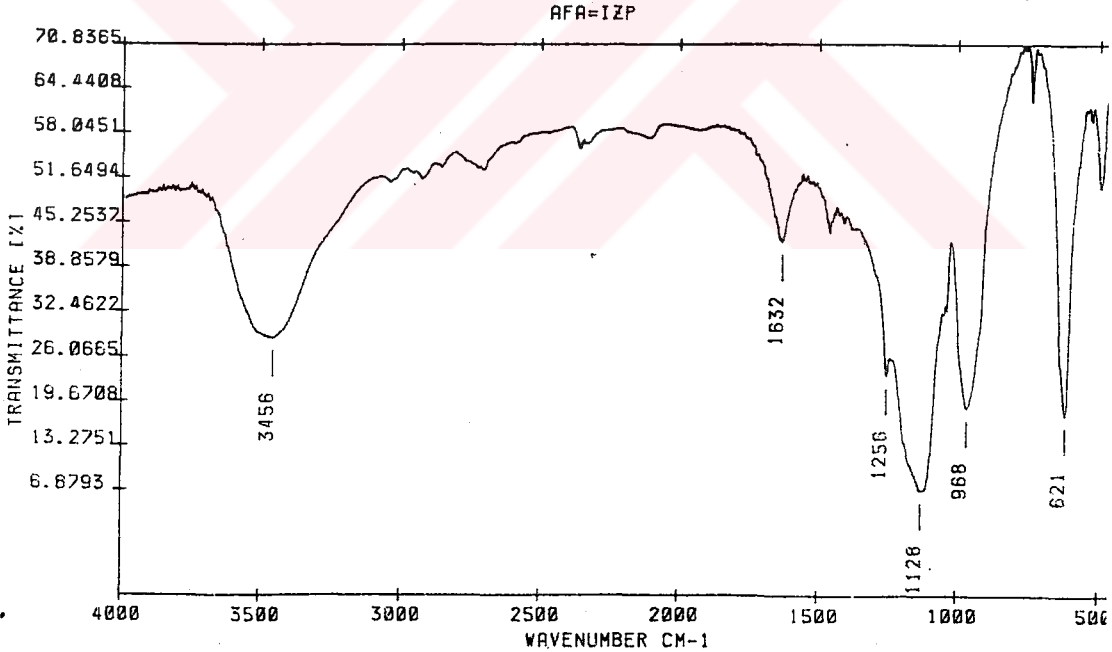
Şekil 4.23 Oda sıcaklığında ^{131}I -ZP'nun işaretlenme veriminin zamana göre değişimi.

4.10 İŞARETLİ BİLEŞİĞİN KİMYASAL YAPISININ AYDINLATILMASI

İşaretili bileşiğin kimyasal yapısının açıklanabilmesi için zopiclone ve iyodozopiclone'nun IR ve kütle spektrumları alınmıştır.

4.10.1 IR Spektrumları

Cyclopyrrolone türevi olan zopiclone'nun IR spektrumu Şekil 4.21'de ve inaktif olarak iyotlanan iyodozopiclone'nun IR spektrumları Şekil 4.24'de görülmektedir.



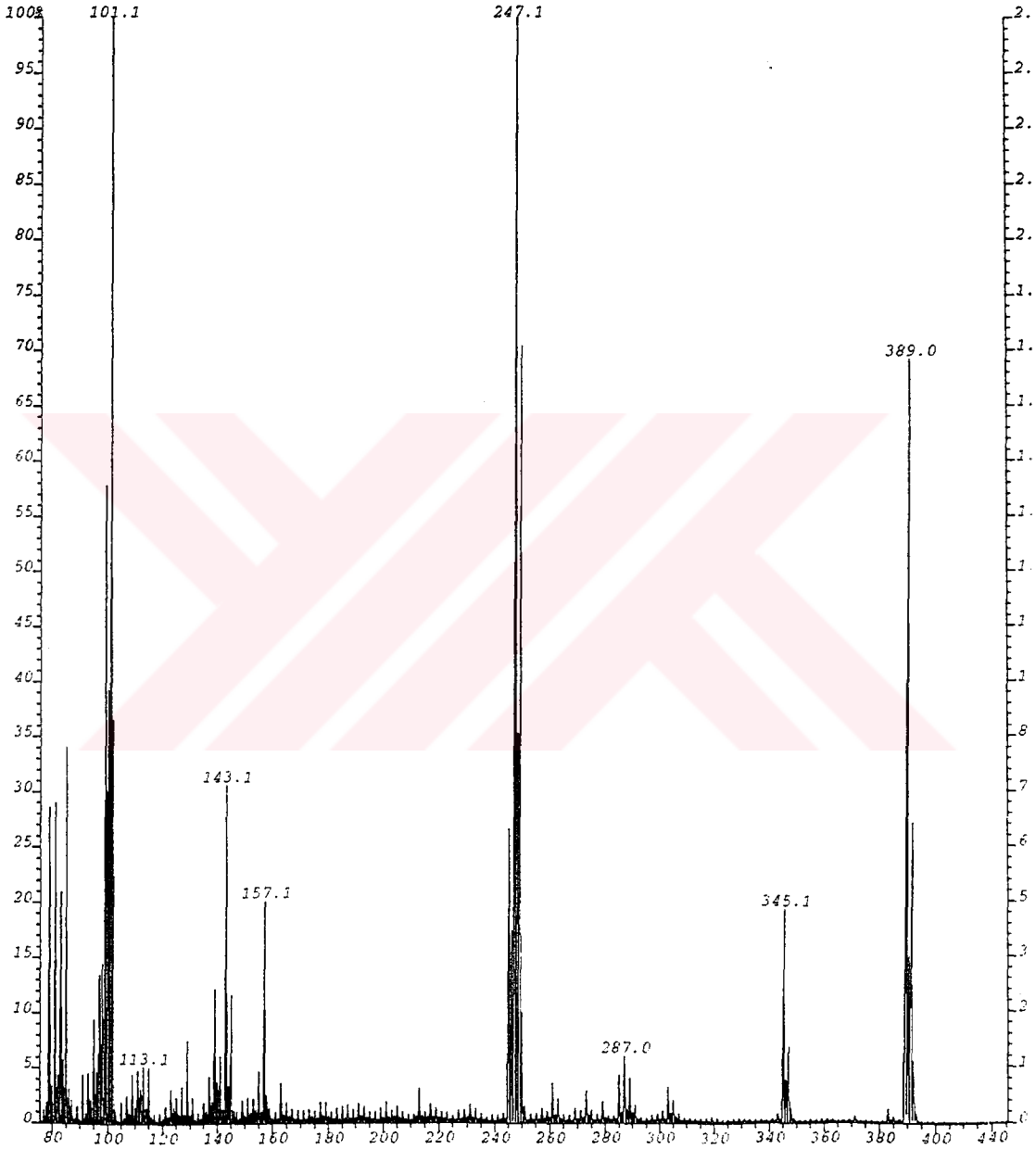
Şekil 4.24 İyodozopiclone'nun IR Spektrumu.

İyodozopiclone'nun IR spektrumuna bakıldığında 1255 cm^{-1} dalga boyunda C-N piki gözlenmesine karşın 621 cm^{-1} 'de de kuvvetli bir pik gözlenmektedir. Bu pikin COO^- ve C-I bağlarına ait oldukları ve bunların çakıştığı düşünülmektedir. Ayrıca burada hidrolizlenme ürününe ait 3456 cm^{-1} 'de OH piki ve 1632 cm^{-1} civarında da COOH grubunun C=O piki görülmektedir. Ester ve C-I bağlarına ait piklerin gözlenmesi iyodozopiclone'nun oluştuğunu gösterirken diğer bilgiler doğrultusunda da bir kısmının hidrolizlendiği anlaşılmaktadır.

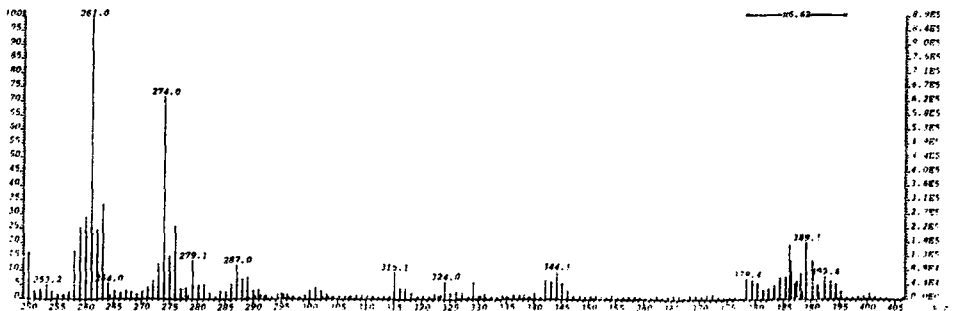
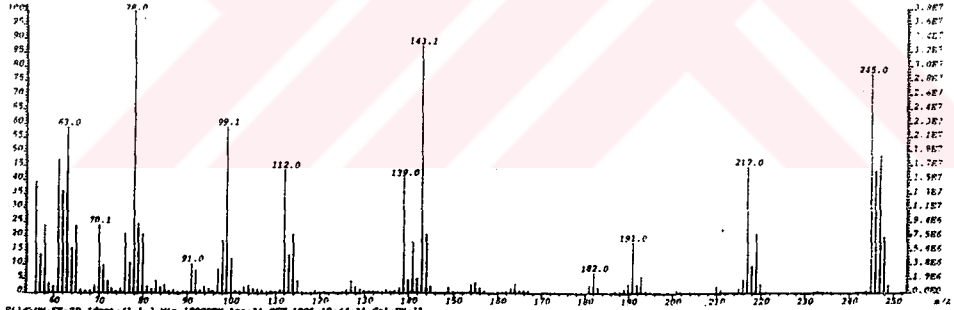
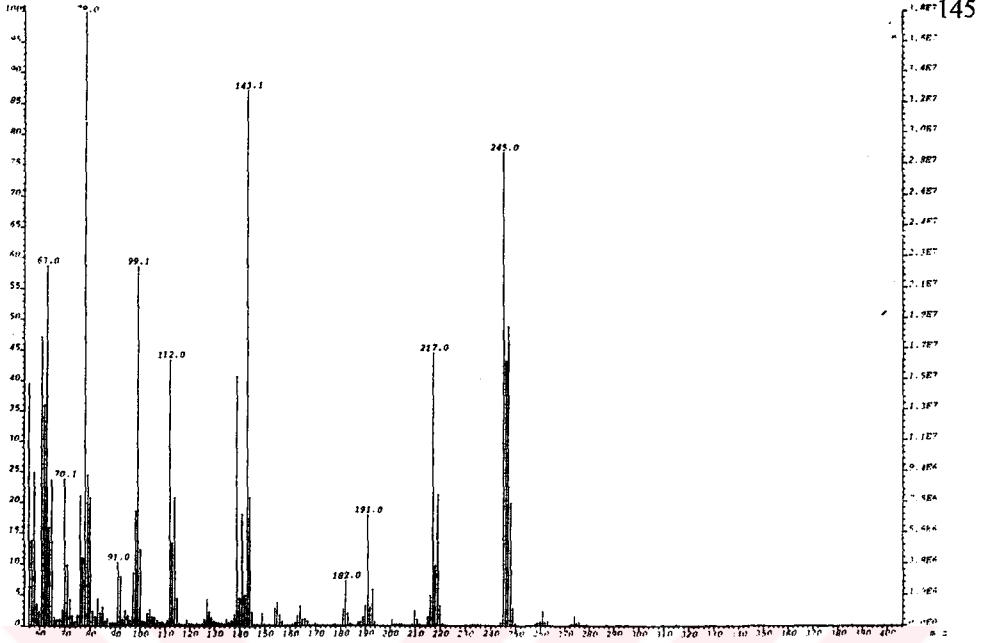
4.10.2 Kütle Spektrumları

Yapının aydınlatılması amacıyla zopiclone ve iyodozopiclone'nun CI (Chemical Ionization) ve EI (Electron Impact) kütle spektrumları alınmıştır. Zopiclone'nun CI ve EI spektrumları Şekil 4.25 a ve 4.25 b'de görülmektedir.

File:UN-K-ZP-CI Ident:13 Acq: 9-NOV-1995 11:01:17 +1:06 Cal:K-9-
ZabSpec CI+ Magnet BpI:2555865 TIC:617752128

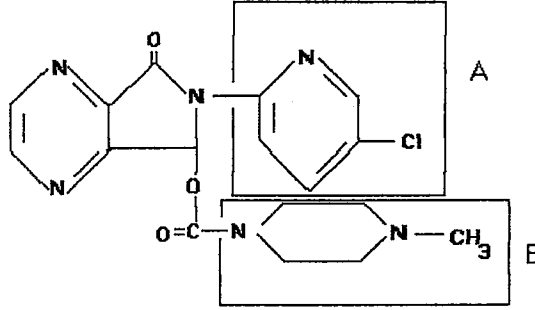


Şekil 4.25 a Zopiclone'nun CI kütle spektrumu.



Şekil 4.25 b Zopiclone'nun EI kütle spektrumu.

Zopiclone molekülünün aşağıda görüldüğü gibi A bölünmesi (Şekil 4.26) sonucunda oluşan A ve B iyonları ve bu iyonların m/z değerleri Çizelge 4.21'de verilmektedir.



Şekil 4.26 Zopiclone'nun A bölünmesi.

Çizelge 4. 21 Zopiclone'nun Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.

Gruplar	İyon (m/z)
M	389
M-A	276
M-B	287
(M -B) -COO ⁻	247
(M -B) -COO ⁻ + OH	262
B + H ⁺	101
(B + H ⁺) + COO ⁻	143
(B + H ⁺) + COO ⁻ + OH	157
A + H ⁺	113
(A + H ⁺) - Cl	78

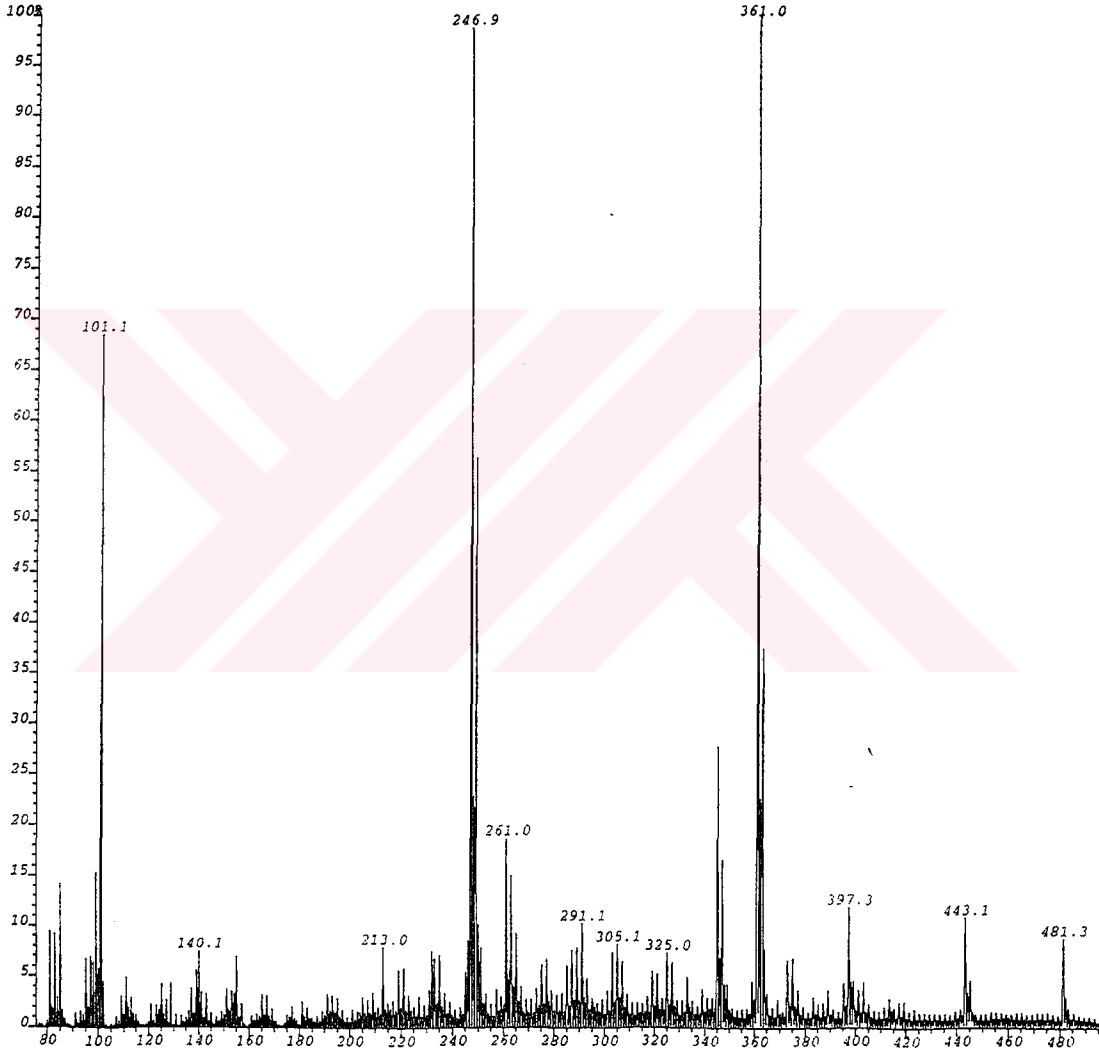
Zopiclone'nun Cl kütle spektrumunda $m/z=247$ olan bir pik gözlenmektedir. Gaillard ve arkadaşlarına (1993) göre bu pik zopiclone'nun GC (Gas Chromotagraphy) analizi termal koşulları altında bozunarak, küçük bozunma ürünleri vermesindendir. Aynı yazara göre kütle spektrofotometrik iki esas pikten 2. piki zopiclone, pik 1'in ise $m/z=247$ olan bileşiğe aittir (Gaillard et al., 1993).

Şekil 4. 25 a'da görülen Cl kütle spektrumunda $m/z=247$ olan pik görülmektedir. Bu bize COO^- karboksil bağının zayıflığını göstermektedir. Termal koşullar altında zopiclone'nun bozunduğu görülmektedir.

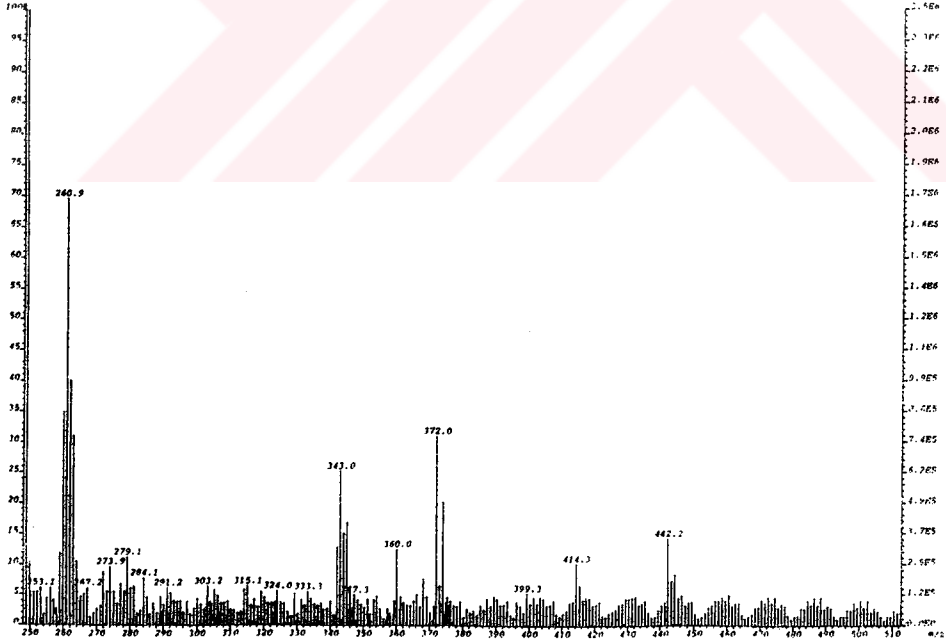
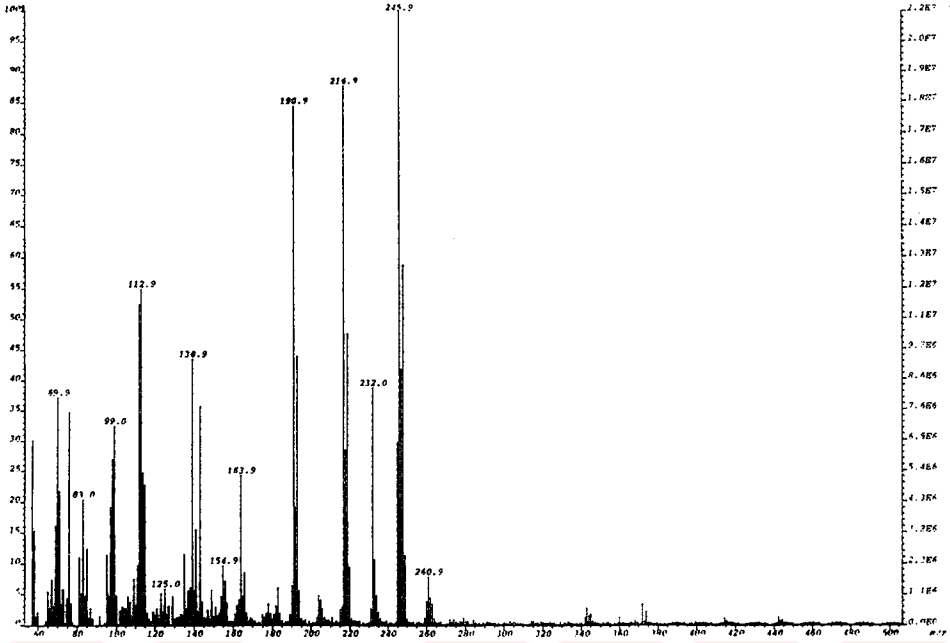
Zopiclone'nun esas pikleri $m/z=143$, $m/z=245$ ve 247 de iyonların pik şiddetlerinin oranları 3.1 olduğu ifade edilmiştir (Boniface et al., 1992). Bizim çalışmamızda elde edilen zopiclone'nun EI spektrumunda $m/z=143$, $m/z=245$ ve $m/z=247$ pikleri gözlenmektedir ve bu değerler literatür değerleri ile uyum sağlamaktadır. Bunun yanı sıra Kintz ve arkadaşları (1991) EI spektrumunda $m/z=149$, 167 ve 207 iyonlarına ait piklerin görülmesi gerektiğini belirtmişlerdir (Kintz et al., 1991). Fakat bu piklerin zopiclone'na ait olmadığı Gaillard ve arkadaşları tarafından ifade edilmiştir. Bizim çalışmalarımızda zopiclone'nun EI spektrumunda bu m/z değerlerindeki pikler görülmemektedir.

İyodozopiclone'nun kütle spektrum (Şekil 4.27 a ve 4.27 b) sonuçlarına göre oluşan iyon grupları ve m/z değerleri Çizelge 4.22'de verilmektedir. İyodozopiclone'nun bir A bölünmesi (Şekil 4.28) sonucunda oluşan iyonlar da bu listede yer almaktadır. Bunun dışında gözlenen pikler zopiclone'nunkine benzer olması nedeniyle listede yer almamaktadır.

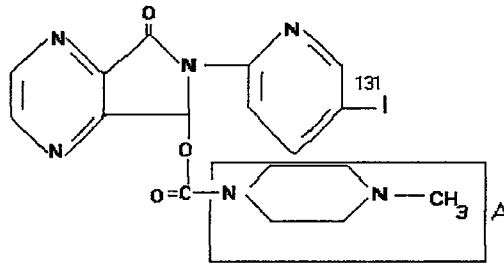
File:UN-K-ZPI-CI Ident:11-12_14 Acq: 9-NOV-1995 11:19:01 +1:13 Cal:K-9-
ZabSpec CI+ Magnet Bp1:2546087 TIC:702758720



Şekil 4.27 a İyodozopiclone'nun CI kütle spektrumu.



Şekil 4.27 b İyodozopiclone'nun EI kütle spektrumu.

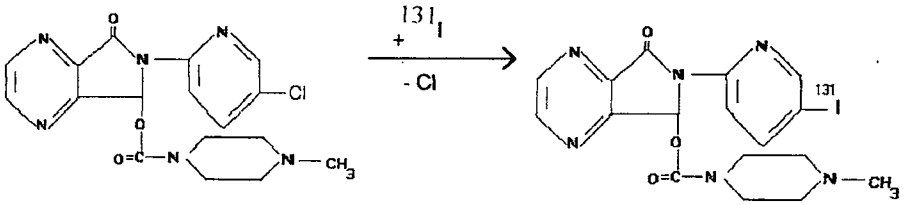


Şekil 4.28 İyodozopiclone'nun A bölünmesi.

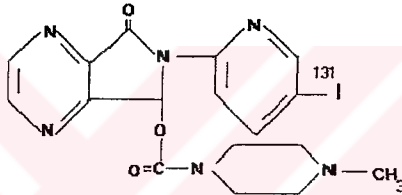
Çizelge 4.22 İyodozopiclone'nun Kütle Spektrumundan Elde Edilen Veriler.

Gruplar	İyon (m/z)
(M - Cl) + I	481
(M - B) + Cl	414
(M - B) + Cl + CO	443

Zopiclone'nun Cl spektrumunda m/z=481 pikinin varlığı zopiclone molekülündeki klor atomu ile iyot atomu arasında gerçekleşen yer değiştirme reaksiyonu ile iyodozopiclone'nun oluştuğunu göstermektedir. İyodinasyon yöntemlerinden olan erime noktasında yer değiştirme yöntemi ile iyotlama işleminin gerçekleştirilmiş olduğu kütle spektrumlarından da görülmektedir. Reaksiyon denklemi aşağıda ifade edilmektedir. İyodozopiclone'nun öngörülen yapısal formülü ise Şekil 4.29'da verilmektedir.



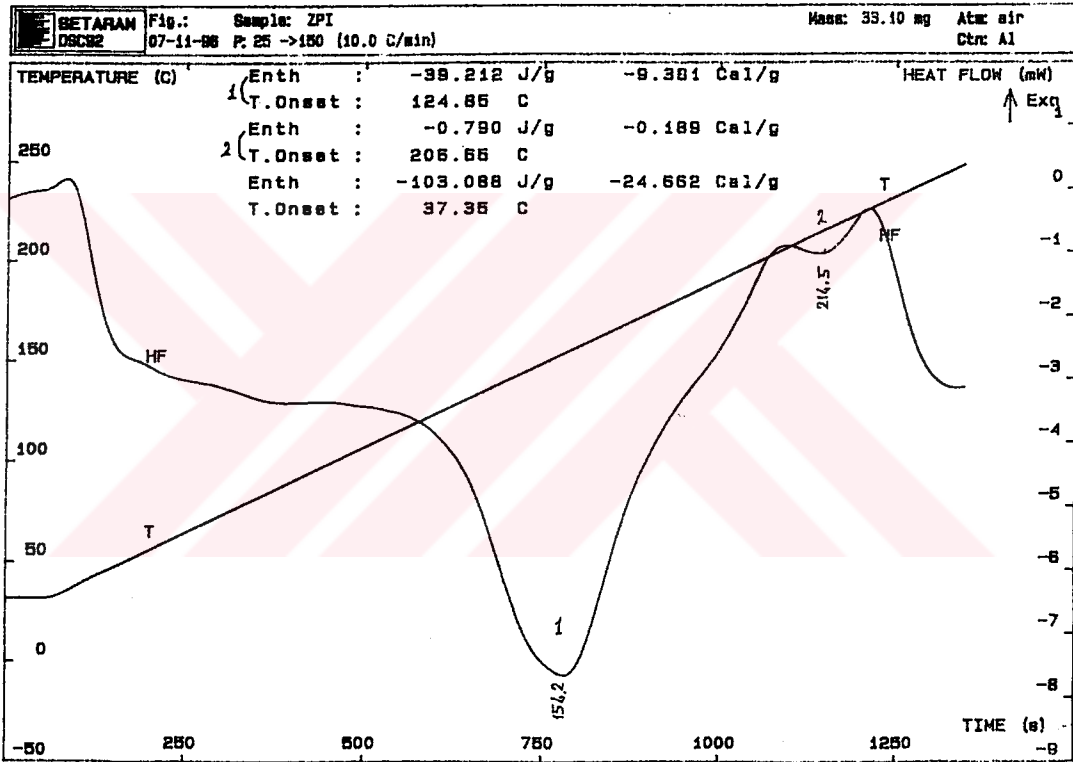
Halojen Yer Değiştirme Reaksiyon Denklemi.



Şekil 4.29 ^{131}I ZP'nun öngörülen yapısal formülü.

4.10.3 Erime Noktasının Tayini

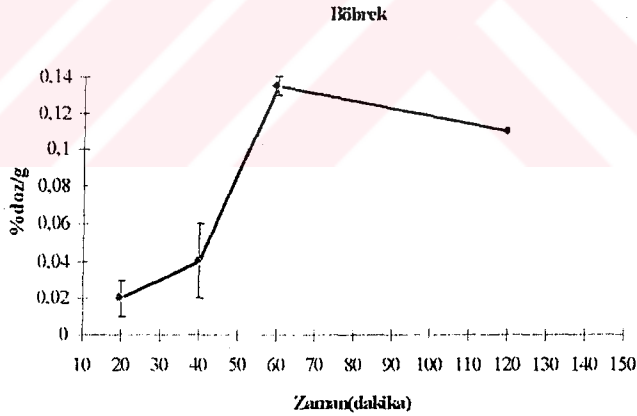
İnaktif olarak sentezlenmiş olan iyodozopiclone'nun erime noktası DSC'de (Differential Scanning Calorimetry) saptanmıştır. İyodozopiclone'nun erime noktası tayini grafiği Şekil 4.30'da verilmektedir. Bu grafikte görüldüğü gibi erime noktası $154.7\text{ }^{\circ}\text{C}$ olarak saptanmıştır. Zopiclone'nun ($173\text{ }^{\circ}\text{C}$) erime noktasından farklı olduğu görülmüştür.



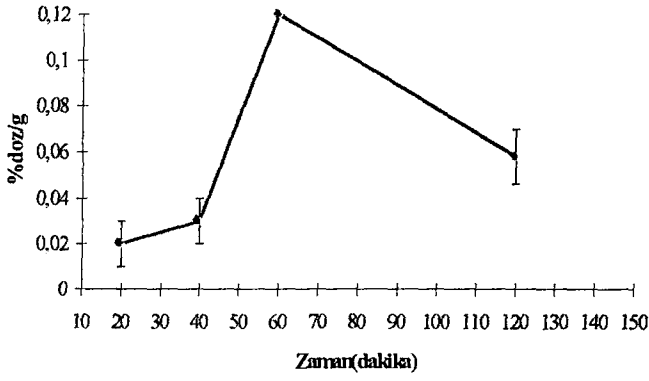
Şekil 4.30 İyodozopiclone'nun erime noktası grafiği.

4.11.1 Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyolojik Dağılım Çalışmalarının Sonuçları

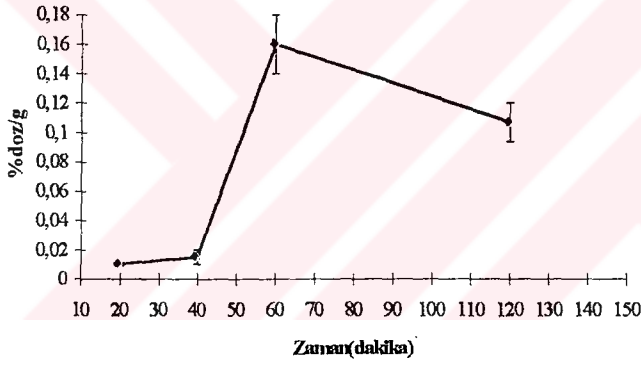
^{131}I ZP'nun biyolojik dağılımının incelenmesi amacıyla, ^{131}I ZP intraperitoneal olarak sıçanlara verilmiş ve hayvanlar çeşitli zamanlarda eterle bayıldıktan sonra kesilerek ve tartılan organlar NaI(Tl) sintilasyon dedektöründe sayılmıştır. Organlardaki aktivite dağılımının zamana bağlı olarak değişimi izlenmiştir. Deneyle ilgili herbir verinin elde edilmesi için 3 sıçan kullanılmış ve sonuçlar bu değerlerin ortalaması olarak verilmiştir. Çizelge 4.23'de zamana bağlı olarak organdaki % aktivite/g değişim oranları verilmiştir. Enjekte edilen radyofarmasötüğün aktivitesi relatif olarak 100 kabul edilmiştir. Buna göre herbir organ için zamana bağlı % aktivite/g grafikleri Şekil 4.31'de görülmektedir.



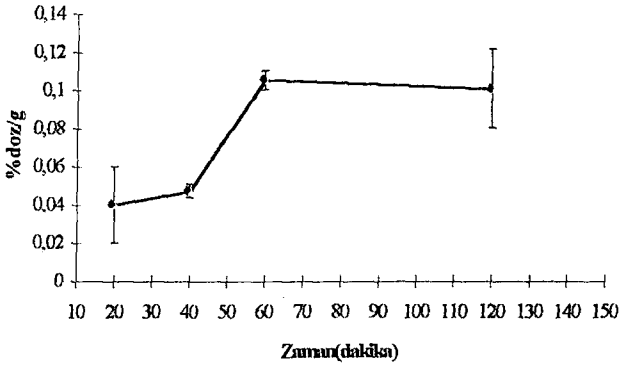
Kalp



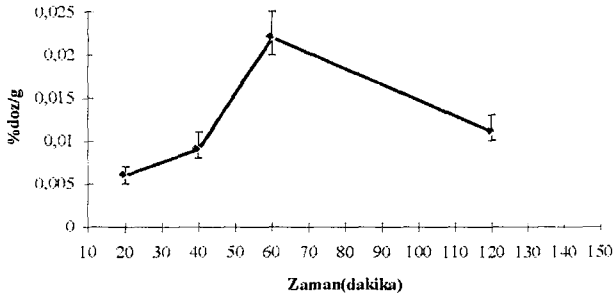
Kamçiger



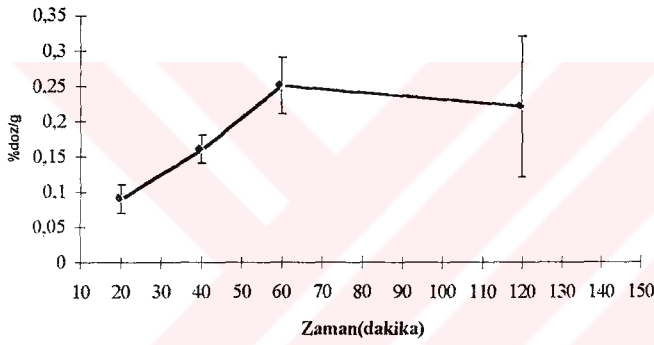
Yag Dolusu



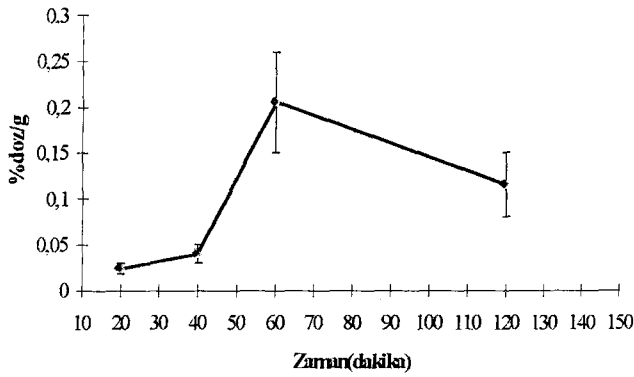
Beyin

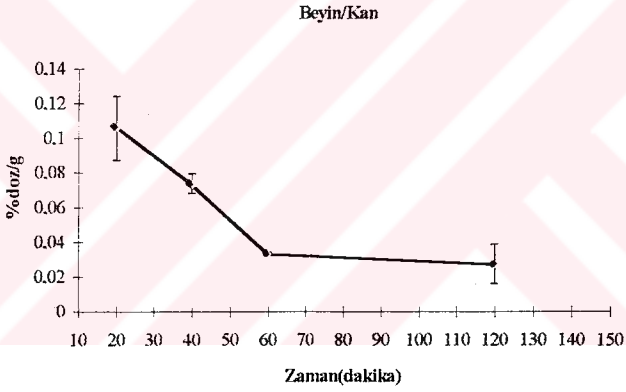
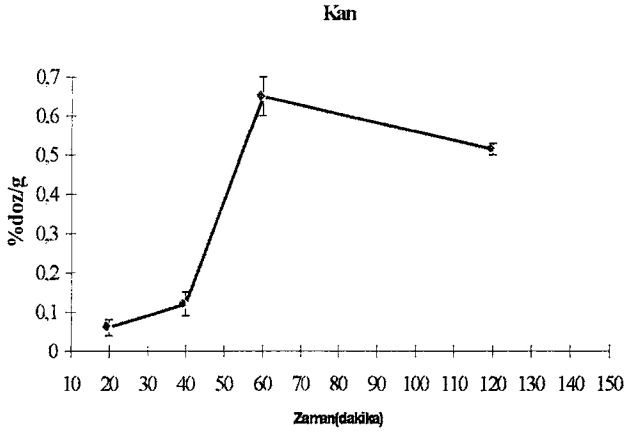


Kas



Akciğer





Şekil 4.31 Organların % aktivite/g oranlarının zamana göre değişimi.

Organ başına ortalama % aktivite miktarı Çizelge 4.24'de verilmektedir.

Çizelge 4.23 Zamana Bağlı Olarak Organlardaki % Aktivite/g Değişimi.

Zaman (Dak.)	Dalak	Yağ Dokusu	Beyin	Kas	Karaciğer	Böbrek	Kalp	Akciğer	Kan	Beyin/ Kan
20	0.04±0.02	0.04±0.02	0.01±0.01	0.09±0.02	0.01±0.03	0.02±0.01	0.02±0.02	0.02±0.02	0.06±0.03	0.11±0.03
40	0.05±0.01	0.05±0.01	0.01±0.01	0.16±0.03	0.02±0.01	0.04±0.03	0.03±0.01	0.04±0.01	0.12±0.04	0.08±0.01
60	0.40±0.04	0.11±0.01	0.02±0.01	0.25±0.06	0.16±0.03	0.14±0.01	0.12±0.01	0.21±0.01	0.65±0.08	0.03±0.01
120	0.18±0.04	0.10±0.02	0.01±0.01	0.22±0.14	0.11±0.02	0.11±0.01	0.06±0.02	0.12±0.05	0.52±0.39	0.03±0.02

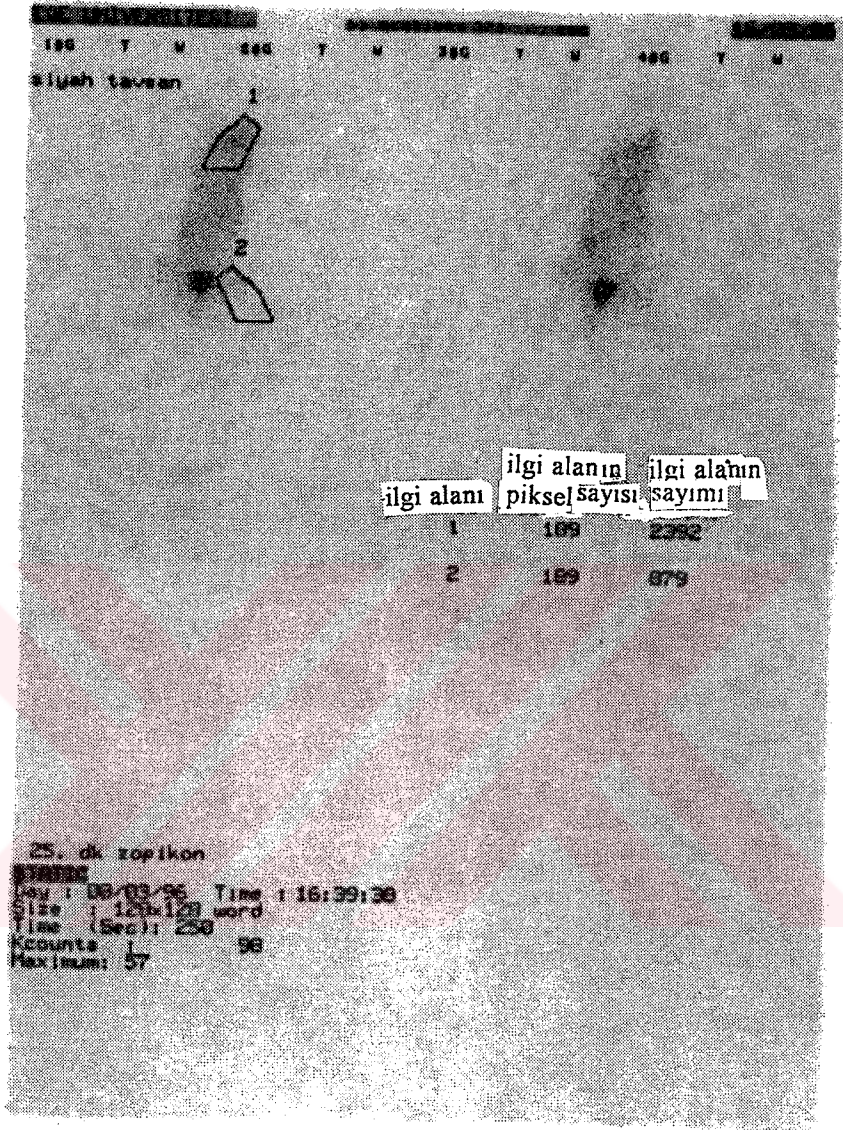
Çizelge 4.24 Organların % Aktivite Dağılımlarının Zamana Bağlı Olarak Değişimi.

Zaman (Dak.)	Dalak	Yağ Dokusu	Beyin	Kas	Karaciğer	Böbrek	Kalp	Akciğer	Kan
20	0.275	0.025	0.02	0.02	0.625	0.145	0.117	0.394	0.334
40	0.018	0.017	0.014	0.012	0.14	0.067	0.034	0.05	0.215
60	0.18	0.053	0.034	0.032	1.525	0.235	0.094	0.300	0.665
120	0.08	0.027	0.016	0.028	0.975	0.23	0.078	0.195	0.420

4.11.2 Tavşanlar ile Yapılan Sintigrafik Çalışmalardan Elde Edilen Sonuçlar

4.23 GBq/mmol (114 mCi/mmol) spesifik aktivitede hazırlanan ^{131}I ZP tavşana intravenöz olarak enjekte edildikten sonra belirli zaman aralıklarında Sophy DX (64x64) gama kamera ile görüntüleme yapılmıştır. Bu görüntülemelerden elde edilen sintigramlar Şekil 4.32.a, 4.32.b ve 4.33.a, 4.33.b'de verilmiştir. Bu sintigramlardan yararlanılarak baş kısmının işaretli bölgesinden elde edilen piksel başına ortalama sayım ile background oranları tesbit edilmiştir. İntravenöz enjeksiyondan sonra 25 dakikada elde edilen baştaki piksel başına ortalama sayım/background sayım oranı 2.72 iken 90 dakika sonra bu değer 1.77'ye düşmüştür.

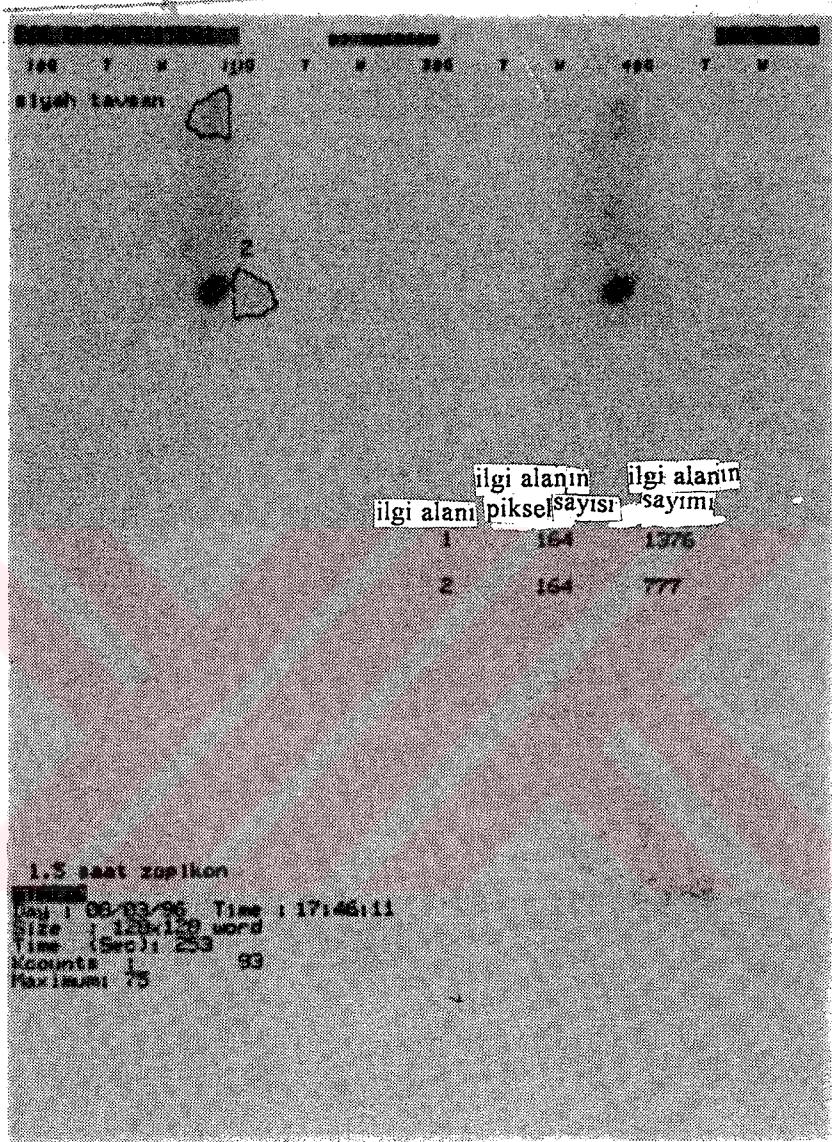
Sintigrafide bulunan işaretli bölgeler 1: baş, 2: background (arka sağ uyruk) ilgi alanı (roi), ilgi alanından elde edilen sayımlar (roicount) altta sayısal olarak verilmiştir. Orta kolon (points) ilgi alanlarından piksel sayısını göstermektedir. 2 numaralı alanın solunda görülen yoğun aktivite alanı mesanedir.



Şekil 4.32.a ^{131}I ZP'nun tavşana enjeksiyonundan 25 dakika sonra gama kamera ile elde edilen posterior pozisyonda vücut sintigrafisi.



Şekil 4.32.b ^{131}I ZP'nun tavşana enjeksiyonundan 25 dakika sonra gama kamera ile elde edilen genel vücut sintigrafisi.



Şekil 4.33.a ^{131}I ZP'nun tavşana enjeksiyonundan 90 dakika sonra gama kamera ile elde edilen posterior pozisyonda vücut sintigrafisi.

Biyolojik dağılım çalışmalarından elde edilen sonuçlara göre (Çizelge 4.23) enjeksiyondan sonra ilk 20 dakikadaki kasın % aktivite/g oranı 0.09 olarak maksimum bir değere sahip iken bunu yağ dokusu ve dalaktaki aktivite miktarı izlemektedir. Beyindeki 20 dakika sonundaki % aktivite/g oranı düşük olmasına karşın maksimum değere 60 dakikada ulaşılmaktadır. Beyinde eliminasyon yavaş olduğu için 1 saat sonunda organ gram başına % aktivite 0.11'e ulaşır. Kan örneklerinde % aktivite/g yine 1 saatte maksimuma ulaşması dolayısıyla kana paralel olarak bütün organlarda maksimum aktiviteye 1 saatte ulaşılmıştır. 1 saat sonucunda kandaki % aktivite/g 0.65 iken bunu sırası ile dalak, kas ve akciğer, karaciğer, yağ dokusu, böbrekler izlemektedir. 2 saat sonucunda kas ve yağ dokusundaki aktivite miktarının düşüşünün diğer organlara göre daha az olduğu ve sapma değerleri içinde kaldığı görülmektedir. Bu nedenle zopiclone'nun kas ve yağ dokusunda lokalize olabileceği öne sürülebilir. Pounder ve arkadaşları (1994) tarafından yapılmış olan çalışmada da dalak, yağ dokusu, beyin ve akciğerdeki zopiclone konsantrasyonlarının diğer organlara göre daha fazla olduğu yani bu organlarda lokalizasyon olduğu ileri sürülmektedir (Pounder et al., 1994). Bizim yapmış olduğumuz biyolojik dağılım deneyleri sonuçları bu çalışma sonuçları ile uyum içerisindedir.

Bir saat içinde tüm organlarda aktivite dağılımının maksimum olduğu görülmektedir. Literatüre göre oral uygulamalarda zopiclone'nun % 95'den fazlasının 1 saatten sonra adsorblandığı görülmektedir (Goa and Heel, 1986). Buna göre zopiclone'nun vücut dokularına hızlı bir şekilde dağıldığı ifade edilmektedir. İntravenöz uygulamalarda bu olayın oral ve intreparitonal uygulamalara göre daha hızlı olduğu bilinmektedir. Gama kamera ile yapılan çalışmada 25 dakikada tutulmanın maksimuma ulaşması bunu doğrulamaktadır. Bunun nedeni intravenöz uygulamalarda radyofarmasötikğin kan yolu ile daha hızlı bir şekilde taşınmasıdır.

Gama kamera ile elde edilen sintigrafik sonuçlar ile sıçanlar üzerinde yapılan biyolojik dağılım çalışma sonuçları karşılaştırılacak olursa gama kamera ile elde edilen sintigramlara göre 25 dakikada baştaki piksel başına ortalama sayım/background oranı 2.72 olması radyofarmasötiğin beyin için iyi bir potansiyele sahip olduğunu gösterir. Fakat yapılan biyolojik dağılım çalışmalarında beyinde alınının o kadar fazla olmadığı görülmektedir. Bu sonuca bağlı olarak ^{131}I ZP'nun beyin dışında baş kısmında bulunan dokularda da toplanabildiği gama kamera sonuçlarını doğrulamaktadır.

Biyolojik dağılım çalışmaları sırasında uygulamadan sonra 20 dakika bekletilerek kesilen sıçanın tiroidi çıkarılarak aktivitesi NaI(TI) sintilasyon dedektöründe sayılmış ve sayım değerinin background düzeyinde olduğu görülmüştür. Bu önceden kalite kontrolü yapılmış olan ^{131}I ZP'nun biyolojik olarak deiyodinasyona uğramadığını ve radyofarmasötiğin bozunmadığının bir kanıtıdır.

Beyin/kan oranı 40 dakikada maksimum değere ulaşmıştır, Şekil 4.31'den de görüldüğü gibi 1 saatten sonra bu değer sabit kalmıştır. Bu sonuca göre radyofarmasötiğin beyin ve kandaki temizlenmesinin paralel yürüdüğü söylenebilir.

^{131}I ZP için lipofilite değeri (P) saptanmıştır. P değerinin yüksek olması nedeniyle kan-beyin-engelini geçeceği beklenmektedir. Biyolojik deneyler için izotonik olarak hazırlamış olduğumuz radyofarmasötiğin oktanol/su oranının $P=1.6$ olması radyofarmasötiğin kan-beyin-engelini aşabileceğini göstermektedir. Yapmış olduğumuz çalışma sonuçları bunu doğrular niteliktedir.

Akciğer yoluyla metabolize olan zopiclone N-oksit ve N-demetil türevleri bozunarak idrarla atılır. Fakat böbreklerden atılım yavaştır (Gaillot et al., 1983). Zopiclone'nun temizlenme yolundan biri akciğerlerdir. Bu nedenle akciğerlerde 1 saatte aktivite yüksek bulunmuştur. Diğer temizlenme yollarının akciğer ve böbrekler olması

nedeniyle 1 saatte en yüksek % aktivite/g oranına ulaşılmıştır. Böbreklerde ulaşılan maksimum % aktivite/g oranı 2 saatte fazla değişmemesi böbreklerden atılımın yavaş olduğunu göstermektedir.

1 saat sonra tüm organlardaki aktivite miktarı düşmektedir. Bunun yanı sıra beyin/kan oranı sabitleşmeye başlamıştır.

Elde edilen bu sonuçlar ^{131}I ZP'nun beyin radyofarmasötiği olarak görüntülemeye kullanılabileceğini göstermektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesinde çözgen olarak iki farklı ortam (% 50 HCl ve ampul) kullanılmıştır. İşaretleme CAT ve iodojen yöntemleri ile yapılmış ve heriki yöntemle de iyi verimler elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre diazepam elektrofilik süstitüsyon şartlarında I-131 ile işaretlenebilmektedir. Hem kuvvetli asidik ortamda (kontrol deneyleri), hemde iodojen yöntemi ile yapılan işaretlemelelerde elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu görülmektedir. Ancak biyolojik uygulamalarda asidik şartlarında yapılan işaretleme aşağıdaki nedenlerden dolayı tercih edilmemiştir.

- 1) Kuvvetli asidik şartlarda diazepam hidroliz olmaktadır.
- 2) Çözünürlüğün az olması nedeniyle seyrelme çok olmakta ve bu da spesifik aktivitenin istenildiği kadar yüksek olmamasına sebep olmaktadır.

Sonuç olarak radyofarmasötüğün hazırlanması için en uygun işaretleme ortamı diazepam'ın ampul çözeltisi kullanılarak iodojen yöntemiyle elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu ile işaretlenmesidir. Bu yöntem ile elde edilen radyofarmasötüğün biyolojik uygulamaları sırasında radyofarmasötüğün spesifik aktivitesinin düşmesine neden olacağı için saflandırma işlemi yapılmamıştır.

CAT yöntemi ile de diazepam'ın I-131 ile işaretlenmesi yapılabilmesine rağmen işaretlenme veriminin daha iyi olması ve CAT'tan gelen safsızlıkların olması nedeniyle biyolojik deneylerde iodojen yöntemi ile işaretlenen radyofarmasötik tercih edilmiştir. Bu yöntem için, diazepam miktarı, 1-5 mg/ml, iodojen miktarı 1 mg/ml, reaksiyon süresi 15-20 dakika ve reaksiyon sıcaklığı ise oda sıcaklığı optimum koşullar olarak belirlenmiştir. İn vivo çalışmalar optimum koşullar dahilinde elde edilen radyofarmasötik ile yapılmıştır.

İşaretli bileşiğin yapısının aydınlatılması için yapılan çalışma sonuçları diazepam'ın asidik şartlarda (kontrol) hidroliz olduğunu ve bu hidroliz ürününde ^{131}I ile işaretlendiğini göstermektedir. Bu nedenle asidik şartlarda yapılan işaretlemede iki farklı ürün görülmektedir.

^{131}I IDZ'da ^{131}I 'in fenil halkasına bağlandığı elde edilen spektrumlardan (IR, NMR, MS) anlaşılmaktadır. Ancak iyodun bağlandığı pozisyon ile ilgili kesin bir bilgi elde edilememiştir. İda ve arkadaşları ise direk kimyasal sentez ile elde ettikleri ^{125}I IDZ'ın iyodun 2' pozisyonuna bağlı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu araştırmacıların bu radyofarmasötici kullanarak elde etmiş oldukları biyolojik dağılım sonuçları ise bizim sonuçlarımız ile uyum içersindedir.

Bir cyclopyrrolone türevi olan zopiclone'nun iodogen yöntemi gibi elektrofilik süstitüsyon reaksiyonu ile işaretlenemediği görülmüştür. Bu nedenle erime noktasında halojen yer değiştirme yöntemi denenmiş ve zopiclone'nun toluen gibi hidrofobik çözenler ile çözümesi halinde verim düşük olmuştur. HCl gibi polar çözenlerde ise % 96'e kadar varan iyi bir verim elde edilmiştir. Zopiclone'nun ^{131}I ile yer değiştirme yöntemi ile işaretlendiğini spektroskopik sonuçlar ortaya koymaktadır. Bu sonuçlardan zopiclone molekülündeki -Cl atomu ile ^{131}I ile yer değiştirdiği kütle spektrumundan anlaşılmaktadır. Bu durumda ortamın asitliği (% 50 HCl ortamı) yer değiştirme reaksiyonunu hızlandırıcı katalitik bir rol oynamaktadır. Yöntemde asidik şartlar da zopiclone'nun bir miktarının hidrolizlenerek ester bağının kopmasına sebep olması bir dezavantajdır. Radyofarmasötigin hazırlanması sırasında hidroliz olayını önlemek için deney basamaklarının (çözenin uçurulması ve işaretleme) hızlı bir şekilde yapılması gerekmektedir. Bu şartları gerçekleştirmiş olmamız nedeniyle ITLC ve elektroforez sonuçlarında tek bir pik gözlenmiştir. Sonuçlar ayrıca hidrolizin önemli bir miktarda olmadığını göstermektedir. ^{131}I ZP'nun işaretlenmesi için zopiclone miktarı 1 mg, reaksiyon sıcaklığı 70-80 °C ve reaksiyon süresi 60 dakika optimum

koşullar olarak belirlenmiş olup bu optimum koşullarda hazırlanan radyofarmasötikler in vivo çalışmalar için kullanılmıştır.

İdeal bir beyin radyofarmasötiğinin özellikleri:

- 1) Ligand bir amin veya amin analogu olmalı.
- 2) Oluşturulan kompleks nötral olmalı.
- 3) Lipofilik olmalı.
- 4) Moleküler ağırlık < 500 dalton olmalı.
- 5) Kan-beyin-bariyerini geçebilmeli.
- 6) Ajan relatif olarak stabil olmalı.
- 7) Beyindeki birikme hızı kandan yüksek olmalı ve görüntü alacak kadar süre beyinde kalabilmeli.
- 8) Hazırlanması kolay ve pratik olmalı.
- 9) Pahalı olmamalıdır.

^{131}I ZP'nun da ^{131}I DZ gibi lipofilitesi, molekül büyüklüğü, nötral olması, kan-beyin engelini geçebilmesi gibi özellikleri taşıması ideal bir beyin radyofarmasötiğinde istenen özelliklerine uymaktadır.

Yapılan in vivo çalışmalar sonucunda her iki radyofarmasötik için de beyindeki tutulma benzer sürelerde olurken, ^{131}I DZ'ın beyinde kalma süresi daha uzun olmaktadır. Literatürde her iki farmasötiğin de GABA reseptörlerine bağlandığı ifade edilmektedir. Zopiclone'nun beyindeki benzodiazepin reseptörleri için ilgilerinin diazepam'inkine benzer olduğu görülmüştür (Doble et al., 1992).

Zopiclone yan etkileri az olan iyi bir uyku ilacı olarak belirtilmektedir. Ertesi günkü gecikmiş yan etkilerin diazepam'dan çok daha az olduğu ileri sürülmektedir. Bizim yapmış olduğumuz deneyde zopiclone'nun beyinde kalma süresinin daha kısa olması bu sonuçları doğrulamaktadır.

Diğer bir radyoaktif iyot izotopu olan ^{123}I SPECT için uygun olan 159 keV'lik γ -ışını enerjisine sahip olması, ayrıca daha kısa yarıömürlü olması nedenleriyle radyofarmasötik elde etme amacıyla yapılan

işaretlemelelerde ^{131}I ve ^{125}I e göre üstünlüklere sahiptir. Ancak kısa yarıömrü üretim yeri siklotron veya siklotrona ulaşımı çok yakın olan yerlerde kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Bizim ^{131}I IDZ için uygun işaretleme yöntemimiz olan iodojen yöntemi, hızlı bir işaretleme yöntemi olduğu için bu radyonüklidin temin edilebilmesi halinde ^{123}I ile işaretleme için de uygundur. ^{131}I ZP'nu hazırladığımız halojen yer değiştirme yöntemi de yeterli vakum şartlarının temin edilebilmesi halinde ^{123}I ile işaretleme için uygun bir yöntem olabilir.



6. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Bastos, M. L. A., 1990, HPLC Analysis of Diazepam and its biotransformation products in edible tissues of bulls (1), Ann. Fals. Exp. Chim., 83-No. 890: 277-292.
- Beer, H. F., Blauenstein, P. A., Hasler, P. H., Delaloye, B., Riccabona, G., Bangerl, I., Hunkeler, W., Bonetti, E. P., Pieri, L., Richards, J. G. and Schubiger, P. A., 1990, In vitro and in vivo evaluation of iodine-123-Ro 16-0154: A new imaging agent for SPECT investigations of benzodiazepine receptor, J. Nucl. Med., 31: 1007-1014.
- Boniface, P. J., Martin, I. C., Nolan, S. L. and Tan, S. T., 1992, Development of a method for the determination of Zopiclone in whole blood, J. Chrom., 584: 199-206.
- Brun, J. P., 1988, Zopiclone, a cyclopyrrolone hypnotic: review of properties, Pharmacology Biochemistry & Behavior, U.S.A., 29: 831-832.
- Doble A., Canton T., Piot O., Zundel J. L., Stutzmann J. M., Cotrel C., Blanchard J. C., 1992, The pharmacology of cyclopyrrolone derivatives acting at the GABA_A/Benzodiazepine receptor, GABAergic synaptic transmission, 407- 418.
- Duriez R., Barthelemy C., Rives H., Counjaret J., Gregoire J., 1979, Traitement des troubles du sommeil par la Zopiclone, Therapie, 34: 317- 325.

- El-Shabour G. and Farah K., 1991, Recent study on radioiodination of [4-¹²⁷I] iodoantipyrine via isotope- exchange in dry-states up-to melt; Appl. Radiat. Isot., 42: No 11, 1091- 1093.
- Feinberg J. G. and Smith I., 1962, Chromatography and Electrophoresis on Paper, London N.W. 10 Engalnd, 70-79.
- Gaillard Y., Gay-Montchamp J. P., Ollagnier M., 1993, Gas chromatographic determination of Zopiclone in plasma after solid-phase extraction, J. Chromatography, 619: 310-314.
- Gaillot, J., Heusse, D., Houghton, G.W., Marc Aurele, J. and Dreyfus, J. F., 1983, Pharmacokinetics and metabolism of Zopiclone, Pharmacology, 27: 76-91.
- Gladtko E. et al., 1979, Farmokinetik, New York, 119-123.
- Goa, K. L. and Heel, R. C., 1986, Zopiclone a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a hypnotic, Drugs, 32: 48-65.
- Greenblatt, D. J. and Shader, R. I., 1974, Medical intelligence drug therapy-Benzodiazepines (First of Two parts), The New England Journal of Medicine, 1011-1015.
- Iida, Y., Saji, H., Magata, Y., Konishi, J., Nakatsuka, I., Yoshitake, A. and Yokoyama, A., 1994, ¹¹C-Labeled 2' iododiazepam for PET studies of benzodiazepine receptors: Synthesis and comparison of biodistribution with its radioiodinated compound, Annals of Nuclear Medicine, 8- No.1: 17-22.

- Innis, R., Zoghbi, S., Johson, E., Woods, S., Al-Tikriti, M., Baldwin, R., Seibly, J., Malison, R., Zubal, G., Charney, D., Heninger, G. and Hoffer, P., 1991, SPECT imaging of the benzodiazepine receptor in Non-Human primate brain with [^{123}I] Ro-16-0154, *European Journal of Pharmacology*, 193: 249-252.
- Johnson, E. W., Woods, S. W., Zoghbi, S., McBride, B. J., Baldwin, R. M. Innis, R. B., 1990, Receptor binding characterization of the benzodiazepine radioligand ^{125}I -Ro16-0154: potential probe for SPECT brain imaging, *Life Sciences*, U.S.A., 47: 1535-1546.
- Julou, L., Blanchard, J. C. and Dreyfus, J. F., 1985, Pharmacological and clinical studies of cyclopyrrolones: Zopiclone and Suriclone, *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, U.S.A., 23: 653-659.
- Kowalsky, R. J. and Perry, J. P., 1987, *Radiopharmaceuticals in Nuclear Medicine Practice*, USA, 13-15, 123-147.
- Kung H. F., Molnar M., Billings J., Wicks R., Blau M., 1984, Synthesis and biodistribution of neutral lipid-soluble Tc-99m complexes that cross the blood-brain barrier, *J. Nuclear Medicine*, 25: 326-332.
- Kintz P., Tracqui A., Mangin P., 1991, Mass spectrometric profile of Zopiclone, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339: 62-63.
- Kayaalp O., 1982, Trankilizan ilaçlar, Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Ankara, 2: 1543-1547, 1349, 1607.
- Le Liboux, A., Frydman, A. and Gaillot, J., 1987, Simultaneous determination of Zopiclone and its two major metabolites (N-oxide

and N-desmethyl) in human biological fluids by reversed-phase High-Performance Liquid Chromatography, *J. of Chromatography*, The Netherlands, 417: 151-158.

March, J. G., Amartei, J. K., Wolf, W., 1989, Ligand exchange and solvolytic reactions of $^{99m}\text{TcBr}_6^{2-}$ in non-aqueous media, *J. Radioanalytical and Nuc. Chem., Articles*, 132, No. 2: 293-303.

Martindale the Extra Pharmacopoeia, Anxiolytic sedatives hypnotics and neuroleptics, 1989, 718-723.

Maziere, M., Godot, J. M., Berger, G., Prenant CH., Comar, D., 1980, High specific activity carbon-11 labelling of Benzodiazepines: Diazepam and Flunitrazepam, *J. Radioanalytical Chem.*, 56, No.1-2: 229-235.

Mc Bride, B. J., Baldwin, R. M., Kerr, J. M. and Wu, J. L., 1991, A simple method for the preparation of ^{123}I and ^{125}I labeled iodobenzodiazepines, *Appl. Radiat. Isot.*, Great Britain, 42, No. 2: 173-175.

Nudelman N. S. and De Waisbaum R. G., 1994, Isolation and structure elucidation of novel products of the acidic degradation of Diazepam, *J. Pharm. Scienc.*, 84: No 2, 208-211.

Pounder D. J., Davies J. I., 1994, Zopiclone poisoning: Tissue distribution and potential for postmortem diffusion, *Forensic Science International*, 65: 177-183.

- Saji, H., Iida, Y., Ariyoshi, K., Nakatsuka, I., Kataoka, M., Yoshitake, A. and Yokoyama, A., 1993, An approach for assaying benzodiazepine receptor binding with radioiodinated ligand: ^{125}I - Labeled Diazepam Derivative, *Biol. Phram. Bull.*, 16(5): 513-515.
- Saji, H., Iida, Y., Ariyoshi, K., Nakatsuka, I., Kataoka, M., Ariyoshi, K., Magata, Y., Yoshitake, A. and Yokoyama, A., 1993, Radioiodinated 2'-Iododiazepam: A potential imaging agent for SPECT investigations of Benzodiazepine receptor, *J. Nucl. Medicine*, 34 No. 6: 932-937.
- Seevers, H. and Counsell, R. E., 1982, Radioiodination techniques for small organic molecules, *Chem. Rev.*, 82: 575-590.
- Saha, G. B., *Fundamentals of Nuclear Pharmacy*, 1992, Springer- Verlag New York, Inc.pp; 88-90, 143- 167.
- Tallman, J. F., Gallager, D. W., Mallorga, P., Thomas, J. W., Strittmatter, W., Hirata, F. and Axelrod, J., 1980, *Studies on Benzodiazepine Receptors, Receptors for Neurotransmitters and Peptide Hormones*, New York, 277-283.
- Theobald A., 1989, *Radiopharmaceuticals Using Radioactive Compounds in Pharmaceutics and Medicine*, Great Britain; 30-34, 83-103.
- Toth, L. M., Pannell, K. D., Kirkland, O. L., 1984, *The Aqueous Chemistry of Iodine*, Proceeding American Nuclear Socieity Meeting on Behaviour and Source Term Research, July 15-19, Snowbird, Utah, U.S.A.

USP XXII NFXVII, The United States Pharmacopeia The National Formulary, 1990: 414-417.

Vire, J. C., Zhang, H., Quarin, G., Patriarche, G. J., Şentürk, Z., Christian, G. D., 1993, Electrochemical Behavior of Zopiclone, *Talanta*, Great Britain, 40: 313-323.

Wickstrom E., Barbo S. E., Dreyfus J. F., Jerko D., Kleiven R., et. al., 1983, A comparative study of Zopiclone and Flunitrazepam in Insomniacs seen by general practitioners, *Pharmacology* 27 (Suppl. 2): 165-172.

Zoghbi, S. S., Baldwin, R. M., Seibyl, J. P., Al-Tikriti, M. S., Zea-Ponce, Y., Laruelle, M., Sybirska, E. H., Woods, S. W., Goddard, A. W., Malison, R. T., Zimmerman, R., Charney, D. S., Smith, E. O., Hoffer, P. B. and Innis R. B., 1992, Pharmacokinetics of the SPECT benzodiazepine receptor radioligand [^{123}I] Iomazenil in human and non-human primates, *Nucl. Med. Biol.*, 19, No: 8: 881-888.

ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı: Fatma YURT

Doğum Yeri : İzmir

Doğum Yılı : 17-02-1964

Öğrenim Durumu:

Lisans 1982-1987 Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü

Yüksek Lisans 1987-1990 Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

Doktora 1991- Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü

Mesleki Durumu:

1988-1990 Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Araştırma
Görevlisi

1990-1991 M.E.B. Susurluk Lisesi Kimya Öğretmenliği

1991-1994 M.E.B. Çimentaş Lisesi Kimya Öğretmenliği

1994- Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü
Araştırma Görevlisi