

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMANIN GÖRÜNTÜLEME VE FOTODİNAMİK
TEDAVİSİ İÇİN MULTİFONKSİYONEL,
HEDEFLENDİRİLMİŞ, TERANOSTİK LİPOZOMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO* İNCELENMESİ**

Ecz. Fidan Gülçin ONARAL

**Radyofarmasi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ANKARA

2022

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**GLİOBLASTOMANIN GÖRÜNTÜLEME VE FOTODİNAMİK
TEDAVİSİ İÇİN MULTIFONKSİYONEL,
HEDEFLENDİRİLMİŞ, TERANOSTİK LİPOZOMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN *IN VITRO*
İNCELENMESİ**

Ecz. Fidan Gülçin ONARAL

**Radyofarmasi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mine SİLİNDİR-GÜNAY**

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GLİOBLASTOMANIN GÖRÜNTÜLEME VE FOTODİNAMİK TEDAVİSİ
İÇİN MULTİFONKSİYONEL, HEDEFLENDİRİLMİŞ, TERANOSTİK
LİPOZOMLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN *İN VİTRO*
İNCELENMESİ

Öğrenci: Fidan Gülçin ONARAL

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mine SİLİNDİR-GÜNAY

Bu tez çalışması 22.09.2022 tarihinde jürimiz tarafından "Radyofarmasi A.B.D. Tezli Yüksek Lisans Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: **Prof. Dr. Suna ERDOĞAN**
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Radyofarmasi Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: **Dr. Öğr. Üyesi Mine SİLİNDİR-GÜNAY**
Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Radyofarmasi Anabilim Dalı.

Üye: **Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI**
Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi
Temel Onkoloji Anabilim Dalı

Üye: **Doç. Dr. Evren ATLIHAN GÜNDOĞDU**
Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi
Radyofarmasi Anabilim Dalı

Üye: **Doç. Dr. Derya İLEM ÖZDEMİR**
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Radyofarmasi Anabilim Dalı

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

28 Eylül 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

4.

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. ⁽¹⁾
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 6 ay ertelenmiştir. ⁽²⁾
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. ⁽³⁾

22/09/2022

Ecz. Fidan Gülçin ONARAL

¹“*Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge*”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Dr. Öğr. Üyesi Mine SİLİNDİR-GÜNAY danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. Fidan Gülçin ONARAL

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her adımda sabırla yol gösterici olan, destek ve yardımını esirgemeyen danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Sn. Mine SİLİNDİR-GÜNAY'a,

Lisansüstü eğitimim süresince değerli bilgi ve görüşleri ile bana katkıda bulunan hocalarım Prof. Dr. Sn. Suna ERDOĞAN ve Prof. Dr. Sn. A. Yekta ÖZER'e,

Hücre kültürü ve *in vitro* çalışmalarda yardımları için H.Ü. Kanser Enstitüsü Temel Onkoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Sn. Güneş ESENDAĞLI'ya, doktora öğrencisi Biyomühendis Sn. Sıla ULUTÜRK'e, Öğr. Gör. Dr. Sn. Süleyman Can ÖZTÜRK'e,

Kütle spektrum profili alma çalışmalarında yardımcı olan H.Ü. Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Sn. Emirhan NEMUTLU'ya,

Deneyler için gerekli aletleri kullanmamda verdikleri destek için H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji ABD önceki dönem ve mevcut başkanları Prof. Dr. Sn. Levent ÖNER ve Prof. Dr. Sn. Erem BİLENSOY'a ve aletleri kullanmam esnasında yardımlarını esirgemeyen Öğr. Gör. Dr. Kim. Sn. Cem VARAN'a ve Araş. Gör. Ecz. Sn. Nihan İZAT'a,

Çalışmada kullanılan radyoaktif madde olan ⁶⁸Ga temininde yardımcı olan H.Ü. Nükleer Tıp ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Sn. Murat TUNCEL'e ve Moltek Sağlık Hizmetleri Üretim ve Pazarlama A.Ş. görevlisi Kim. Sn. Damla ÖZKAYNAK'a,

Çalışmamız için gerekli olan malzeme ve gereçlerin sağlanması konusunda araştırmamızı 219S986 numaralı proje kapsamında destekleyen TÜBİTAK'a,

Hoşgörü ve anlayışlarıyla yanımda olan arkadaşlarım İ.K.Ç.Ü. Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi ABD öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Sn. Merve KARPUZ'a, H.Ü. Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi ABD Araş. Gör.'leri Ecz. Sn. Elif Tuğçe SARCAN-BOZKIR ve Ecz. Sn. Hümeysra BATTAL ile doktora öğrencisi Ecz. Sn. Asuman TAŞ'a,

Hoşgörü ve anlayışları ile yanımda olan Ankara Sosyal Güvenlik İl Müdürlüğü Kavaklıdere Sağlık Sosyal Güvenlik Merkezi'ndeki mesai arkadaşlarıma,

Hayatta attığım her adımda ve aldığım her kararda bana inanıp destek olan canım aileme,

İlgisini ve desteğini esirgemedi her zaman yanımda olan eşime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Onaral F.G., Glioblastomannın Görüntüleme ve Fotodinamik Tedavisi İçin Multifonksiyonel, Hedeflendirilmiş, Teranostik Lipozomların Geliştirilmesi ve Etkinliğinin *In Vitro* İncelenmesi, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Radyofarmasi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2022. Beyin tümörlerinin en yüksek insidans ve en düşük sağkalıma sahip türlerinden olan glioblastomannın (GBM) etkili teşhis ve tedavisinde halen istenilen başarı sağlanamamış ve etkili ve spesifik teşhis ve tedavi ajanları üzerine çalışmalar artmıştır. Tez çalışmasında GBM teşhis ve tedavisi için GLUT1'e hedeflemek amacıyla N-asetil glukozamin (NAG) ile modifiye edilmiş; PET/BT görüntüleme için ⁶⁸Ga ile işaretlenmiş, fotodinamik/fototermal tedavi (PDT/PTT) ve NIR görüntüleme amacıyla IR780 hapsedilmiş, PEG kaplı, nanoboyutlu nötral ve pozitif yüklü teranostik lipozomlar geliştirilmiş, karakterizasyon, *in vitro* salım profilleri ile stabilite çalışmaları ve işaretleme verimi, işaretlemenin stabilitesi çalışmaları yapılmıştır. Hücre tutulumları RG2 ve U87, NIR ve floresans mikroskop görüntüleri RG2 hücre hattında alınmış ve PDT/PTT etkinlikleri NIR ışığında (808 nm, 0.8-1 W/cm²) değerlendirilmiştir. Sitotoksiteleri RG2, U87 ve L929 hücre hatlarında incelenmiştir. Optimum ortalama partikül boyutuna (181-193 nm), enkapsülasyon etkinliğine (%79-84) ve zeta potansiyele (-5 - -7 mV) sahip lipozomlar Langenbucher kinetiğine uygun salım göstermiştir. pH:3,5, 80°C'de ve 5 dk. inkübasyon süresinde ⁶⁸Ga ile maksimum işaretleme verimi saptanmıştır. 4°C'de 30 gün stabil kaldıkları ve hedeflendirilmiş formülasyonların hedeflendirilmemişlere, pozitif yüklülerin ise nötral formülasyonlara göre hücre içine alınımının daha fazla olduğu saptanmıştır. Formülasyonlar NIR ışığı (808 nm, 0.8-1 W/cm²) altında PDT/PTT etkinliği göstermiş ve L929 hücre hattında RG2 ve U87'ye göre daha düşük sitotoksite göstermiştir. Hedeflendirilmiş lipozomlar GBM'nin *in vitro* olarak PDT/PTT ile tedavi ve PET/BT ve NIR görüntüleme etkili potansiyel teranostik ajanlar olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: IR780, teranostikler, glioblastoma, PDT, PTT, Ga-68 işaretleme, PET görüntüleme, NIR görüntüleme

Destekleyen Kurum: TUBİTAK-SBAG (Proje No: 219S986).

ABSTRACT

Onaral F.G., The Development and *In Vitro* Evaluation of Multifunctional Targeted Theranostic Liposomes for Imaging and Photodynamic Treatment of Glioblastoma, Hacettepe University, Graduate School of Health Sciences, Radiopharmacy Program, Master of Science Thesis, Ankara, 2022. The desired success in the effective diagnosis and treatment of glioblastoma (GBM), which is one of the types with the highest incidence and lowest survival of brain tumors, has not yet been achieved and studies on effective and specific diagnostic and treatment agents have increased. Within the context of the thesis study, it was modified with N-acetyl glucosamine (NAG) to target GLUT1 for the diagnosis and treatment of GBM; ⁶⁸Ga-labeled for PET/CT imaging, IR780-encapsulated for photodynamic/photothermal therapy (PDT/PTT) and NIR imaging, PEG-coated, nanosized neutral and positively charged theranostic liposomes have been developed and characterization, labeling efficiency, labeling stability, in vitro release profile and stability studies have been carried out. Cell uptake in RG2 and U87 cell line, NIR and fluorescence microscope images were taken in RG2 cell line and PDT/PTT activities were evaluated in NIR light (808 nm, 0.8-1 W/cm²). Their cytotoxicity was studied in RG2, U87, and L929 cell lines. Liposomes with optimum mean particle size (181-193 nm), encapsulation efficiency (79-84%), and zeta potential (-5 - -7 mV) showed release in accordance with Langenbucher kinetics. At pH: 3,5, 80°C and 5 min. maximum labeling efficiency was determined with ⁶⁸Ga during the incubation period. It was determined that they remained stable for 30 days at 4°C and the intracellular uptake of targeted formulations was higher than non-targeted and positively charged formulations compared to neutral formulations. The formulations showed PDT/PTT activity under NIR light (808 nm, 0.8-1 W/cm²) and showed lower cytotoxicity in the L929 cell line than RG2 and U87. Targeted liposomes have been evaluated as potential theranostic agents for the treatment of GBM with PDT/PTT and PET/CT and NIR imaging in vitro.

Keywords: IR780, theranostics, glioblastoma, PDT, PTT, Ga-68 labeling, PET imaging, NIR imaging.

Supported by: TUBITAK-SBAG (Project No: 219S986).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
ŞEKİLLER	xx
TABLolar	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. Glioma ve Alt Tipleri	6
2.2. Klinikte Gliomanın Teşhis ve Görüntülenmesi	8
2.2.1. Glioma Görüntülenmesinde MRG	11
2.2.2. Glioma Görüntülenmesinde BT	11
2.2.3. Glioma Görüntülenmesinde PET	12
2.2.4. Glioma Görüntülenmesinde SPECT	15
2.2.5. Glioma Görüntülenmesinde Optik Görüntüleme	18
2.3. Klinikte Gliomanın Tedavisi	19
2.3.1. Gliomada Cerrahi	20
2.3.2. Gliomada Radyoterapi	20
2.3.3. Gliomada Kemoterapi	20
2.3.4. Gliomada Fotodinamik ve Fototermal Tedavi	21
2.4. İlaç Hedeflemede İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Lipozomların Yeri	22
2.4.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Avantajları	22
2.4.2. Lipozomlar ve Glioma Teşhis ve Tedavisindeki Yeri	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM	30
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	30
3.2. Kullanılan Aletler ve Gereçler	32

3.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Yapısına Giren Hammaddeler Üzerinde Yapılan Kontroller	33
3.3.1. DOTA-Bn-DSPE Sentezi ve Üzerinde Yapılan Kontroller	33
3.3.2. NAG	34
3.3.3. IR780 İyodür	34
3.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması	35
3.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	35
3.4.2. Lipozomal Formülasyonların Hazırlanması	35
3.5. NAG ile Hedeflendirilmiş Ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Teranostik Lipozomların Karakterizasyonu	39
3.5.1. Görünüş ve Tip Tayini	39
3.5.2. Ortalama Partikül Boyutu ve Dağılımı (PDI) ile Zeta Potansiyel Değerleri	39
3.5.3. Enkapsülasyon Etkinliği (%EE)	39
3.6. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların <i>In</i> <i>Vitro</i> Salım Profillerinin İncelenmesi	40
3.7. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga-68 ile İşaretlenmesi	40
3.7.1. Lipozomal Formülasyonların ⁶⁸ Ga ile İşaretlenmesi	40
3.7.2. Radyoaktif İşaretleme Verimi	41
3.7.3. İşaretlemenin <i>In Vitro</i> Stabilitesi	41
3.8. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Stabilite Çalışması	42
3.9. Lipozomal Formülasyonların <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	42

3.9.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının NIR Görüntüleme ile İncelenmesi	42
3.9.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi	43
3.9.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi	43
3.9.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi	44
3.9.5. Sitotoksikite Çalışması	44
3.10. İstatistiksel Analizler	45
4. BULGULAR	46
4.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Yapısına Giren Hammaddeler Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular	46
4.1.1. DOTA-Bn-DSPE Sentezi ve Üzerinde Yapılan Kontroller	47
4.1.2. NAG	48
4.1.3. IR780 için UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi	48
4.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması	51
4.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları	51
4.2.2. Lipozomal Formülasyonların Hazırlanması	54
4.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Karakterizasyonu	54

4.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların <i>In Vitro</i> Salım Profillerinin İncelenmesi	56
4.5. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga-68 ile İşaretlenmesi	58
4.5.1. Lipozomal Formülasyonların ⁶⁸ Ga ile İşaretlenmesi	58
4.5.2. Radyoaktif İşaretleme Verimi	59
4.5.3. İşaretlemenin <i>In Vitro</i> Stabilitesi	60
4.6. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Stabilite Çalışması	60
4.7. Lipozomal Formülasyonların <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	63
4.7.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların NIR Görüntüleme ile İncelenmesi	63
4.7.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi	66
4.7.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi	67
4.7.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi	67
4.7.5. Sitotoksosite Çalışması	69
5. TARTIŞMA	73
5.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomlardaki Etkin Madde ve Diğer Bileşenlerin Seçimi	73
5.1.1. Etkin Madde	73

5.1.2. İlaç Taşıyıcı Sistem	74
5.1.3. Diğer Hammaddelerin Seçimi	75
5.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması	78
5.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Karakterizasyonu	78
5.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların <i>In</i> <i>Vitro</i> Salım Profillerinin İncelenmesi	80
5.5. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga- 68 ile İşaretlenmesi	81
5.6. NAG ile hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş, IR780 hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE içeren, PEGlenmiş, nötral ve pozitif yüklü Lipozomların Stabilite Çalışması	83
5.7. Lipozomal Formülasyonların <i>In Vitro</i> Hücre Kültürü Çalışmaları	84
5.7.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının NIR Görüntüleme ile İncelenmesi	85
5.7.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi	86
5.7.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi	87
5.7.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi	87
5.7.5. Sitotoksosite Çalışması	89

6. SONUÇLAR	91
7. KAYNAKLAR	94
8. EKLER	
EK 1. Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK 2. Dijital Makbuz	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Anoplastik astrositoma
5-ALA	5-amino-laevulinik asit
AMT	Adsorptif aracılı transsitoz
ATRX	Alfa-talasemi/mental retardasyon, X'e bağlı
BCSFB	Kan-BOS bariyeri
BLI	Biyoluminesans görüntüleme
BLMB	Kan-leptomeningeal bariyeri
BOS	Beyin omurilik sıvısı
⁷⁶Br	Brom-76
BT	Bilgisayarlı tomografi
¹¹C	Karbon-11
C6	Sıçan glioma hücre hattı
¹¹C-CHO	¹¹ C-Kolin
Ce6	Klorin 6
Chol	Kolesterol
⁶⁴Cu	Bakır-64
DAPI	4,6,6-diamidino-2-fenilindol
DMEM	Dulbecco's yüksek glukoz besiyeri
DMF	Dimetil formamid
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DOTA	Dodekan tetraasetik asit
DOTA-Bn-DSPE	DOTA-Benzil-DSPE
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilkolin
DSÖ=WHO	Dünya Sağlık Örgütü
DSPE	1,2-Distearoil-sn-glisero-3-fosforiletanolamin
DTPA	Dietilen triamin penta asetik asit
ECD	^{99m} Tc-etil sistein dimer
EE	Enkapsülasyon etkinliği
EPR	Artmış geçirgenlik ve tutulum etkisi

FAZA	¹⁸ F-Florodeoksi-arabinofuranozil-nitroimidazol
FBS	Fetal dana serumu
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FDG	¹⁸ F-florodeoksiglukoz
FDOPA	¹⁸ F-3,4-dihidroksifenilalanin
FET	O-(2- ¹⁸ F-Floroetil)-1-Tirozin
¹⁸F	Flor-18
FLT	¹⁸ F-florotimidin
FMISO	¹⁸ F-floromisonidazol
⁶⁸Ga	Galyum-68
⁶⁸GaCl₃	Galyum-68 klorür
GBM	Glioblastoma
⁶⁸Ge	Germanyum-68
¹⁵⁹Gd	Gadolinyum-159
GLUT	Glukoz taşıyıcı
Gy	Gray
H3F3A	Replikasyondan bağımsız histon H3 varyantı
HCl	Hidroklorik asit
HIST1H3B	Kanonik histon H3.1
HMPAO	^{99m} Tc- heksametilpropilen amin oksim
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HUVEC	İnsan umbilikal damar endotel hücreleri
¹²³I, ¹²⁴I	İyot-123, İyot-124
IC₅₀	Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
ICG	İndosiyanin yeşili
IDH	İzositrat dehidrojenaz
IMT	¹²³ I-alfa-metil-L-tirozin
¹¹¹In	İndium-111
IR780	IR780 iyodür
IVIS	<i>İn vivo</i> görüntüleme sistemi
İTK, ITLC	İnce tabaka kromatografisi
KBB	Kan beyin bariyeri

kDa	Kilo dalton
KPS	Karnofsky performans skoru
L929	Fare fibroblast hücre hattı
MCF-7/ADR	İnsan meme adenokarsinom hücreleri
MET	¹¹ C-metiyonin
MeV	Mega elektron volt
MFI	Ortalama floresan yoğunluğu
MIBI	^{99m} Tc- metoksiizobütilizonitril
⁵²Mn	Manganez-52
MRG	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür
m-THPC	Mezo-tetra hidroksifenilklorin
m/z	Kütle/yük
¹³N	Azot-11
NAG	N-asetil glukozamin
NaOH	Sodyum hidroksit
NIR	Yakın kızılötesi (Near-infrared)
NIRF	Yakın kızılötesi floresan
¹⁵O	Oksijen-15
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCV	Prokarbazin-Lomustin-Vinkristin kemoterapi rejimi
PDI	Polidispersite indeksi
PDT	Fotodinamik tedavi
PEG	Polietilen glikol
PET	Pozitron emisyon tomografisi
pH	Potansiyel hidrojen
PL 90G	Fosfolipon 90G
ppm	Milyonda bir birim
p-SCN-Bn-DOTA	S-2-(4-İzotiyosiyanatobenzil)-1,4,7,10-tetrazasiklododekan tetraasetik asit
PTT	Fototermal tedavi

R	Korelasyon katsayısı
R²	Determinasyon katsayısı
⁸²Rb	Rubidyum-82
rCBF	Relatif serebral kan akışı
RES	Retiküloendotelyal sistem
Rf	Alıkonma faktörü
RG2	Rat glioblastoma hücre hattı
RMT	Reseptör aracılı transsitoz
ROS	Reaktif oksijen türleri
RPBEC	Primer beyin mikrovasküler endotel hücreleri
rpm	Dakikadaki devir sayısı
RT2	Mürin glioblastoma hücre hattı
SA	Stearil amin
SD	Standart sapma
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SnO₂	Kalay oksit
SPECT	Tek-foton emisyon tomografisi
SSR	Somatostatin reseptörü
SW987	İnsan sinovial fibroblast hücre hattı
^{99m}Tc	Teknesyum-99m
TERT	Telomeraz ters transkriptaz
TF	^{99m} Tc-tetrofosmin
Tf	Transferrin
TfR	Transferrin reseptörleri
²⁰¹Tl	Talyum-201
TiO₂	Titanyum dioksit
TMZ	Temolozomid
TOS	D- α -tokoferil süksinat
TP53	Tümör protein 53
TPGS	D- α -tokoferil polietilen glikol süksinat
U87	İnsan glioblastoma hücre hattı
U87MG	Uppsala 87 Malignant Glioma

US	Ultrason
UV	Ultraviyole
v/v	Hacim/hacim
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
⁸⁶Y	Yttrium-86
⁸⁹Zr	Zirkonyum-89

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1.	MSS tümörlerinin sınıflandırılması (DSÖ 2016). 7
2.2.	MSS bariyerleri. 9
2.3.	KBB geçiş mekanizmaları. 10
2.4.	PDT ve PTT çalışma prensibi. 21
2.5.	Lipozomun şematik yapısı. 26
3.1.	DOTA-Bn-DSPE sentez reaksiyonu. 34
3.2.	Lipozomal formülasyonların hazırlanması (BioRender ile çizilmiştir). 38
4.1.	DOTA-Bn-DSPE sentezinin kütle spektrum profili. 47
4.2.	DOTA-Bn-DSPE sentez reaksiyonunun ITK'da izlenmesi. 48
4.3.	IR780'in etanoldeki UV spektrumu. 49
4.4.	IR780'in etanol içinde hazırlanan çözeltisinin standart doğru ve doğru denklemi (n=6). 49
4.5.	IR780'in 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4)/%2 (v/v) DMSO'daki UV spektrumu. 50
4.6.	IR780'in 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) /%2 (v/v) DMSO içinde hazırlanan çözeltisinin standart doğrusu ve doğru denklemi (n=6). 50
4.7.	Lipozom formülasyonlarına ait 40x büyütme oranında mikroskop görüntüleri. 55
4.8.	IR780'in lipozom formülasyonlarından salım grafiği. 57
4.9.	Lipozom formülasyonlarının 15 dk. 80°C'de muamele edilmesi sonrasında veziküllerin polarize mikroskop görüntüleri (x40 büyütme oranı). 58
4.10.	+4°C ve 25°C'de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların ortalama partikül boyutu değişimleri. 61
4.11.	+4°C ve 25°C'de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların zeta potansiyel değişimleri. 62
4.12.	+4°C ve 25°C'de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (%EE) değişimleri. 62
4.13.	U87 hücre hattında serbest IR780 ve formülasyonların IVIS görüntüleri. 63
4.14.	RG2 hücre hattında serbest IR780 ve formülasyonların IVIS görüntüleri. 64
4.15.	U87 hücre hattında IR780 içeren formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisi ve zamana bağlı hücre içi yoğunlukları. 64

- 4.16.** RG2 hücre hattında IR780 içeren formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisi ve zamana bağlı hücre içi yoğunlukları. 65
- 4.17.** Formülasyonların RG2 hücre hattındaki floresans görüntüleri. 66
- 4.18.** NIR ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan serbest IR780 çözeltisi ve formülasyonların U87 hücre hattındaki hücre canlılığı yüzdeleri. 68
- 4.19.** NIR ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan serbest IR780 çözeltisi ve formülasyonların RG2 hücre hattındaki hücre canlılığı yüzdeleri. 68
- 4.20.** NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin RG2 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim. 70
- 4.21.** NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin U87 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim. 70
- 4.22.** NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin L929 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim. 71

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	Beyin tümörü ve gliomaları görüntülemeye kullanılan PET radyofarmasötikleri ve mekanizmaları.	14
2.2.	Beyin tümörü ve gliomaları görüntülemeye kullanılan SPECT radyofarmasötikleri ve mekanizmaları.	17
2.3.	İlaç taşıyıcı sistemler, özellikleri ve avantajları.	23
3.1.	Lipozom formülasyonlarının içerikleri, molar bileşim yüzdeleri ve kodları.	36
4.1.	Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan lipozom formülasyonları.	52
4.2.	Lipozom formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=6) (Ort ± SD).	55
4.3.	IR780 içeren lipozom formülasyonlarının 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) içindeki salım kinetiklerinin değerlendirilmesi.	57
4.4.	80°C'de 15 dk. bekletilen lipozom formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=6) (Ort±SD).	59
4.5.	Lipozom formülasyonlarının ⁶⁸ Ga ile işaretleme verimleri sonuçları (n=6) (Ort±SD).	59
4.6.	IR780 içeren formülasyonların U87, RG2 ve L929 hücre hatlarındaki IC ₅₀ değerleri.	69

1. GİRİŞ

2018 yılı verilerine göre ülkemizde kansere bağlı ölümlerin oranı %20 olup, kalp ve damar hastalıklarından sonra gelen ikinci ölüm sebebidir (1). Astrositik kökenli malign gliomalar, merkezi sinir sistemi (MSS) malign tümörlerinin hemen hemen yarısını oluşturmaktadır (2). Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) sınıflamasına göre, yüksek dereceli gliomalar, anaplastik astrositoma (AA) ve GBM'u kapsamaktadır (grade III ve IV) (3). GBM ve AA, primer MSS gliomalarının %80'ini oluştururlar (4).

GBM erişkinlerde en sık rastlanan, en hızlı seyirli ve ölümcül beyin tümörlerindedir (5). Teşhis konulduktan sonraki ortalama sağkalım çoğunlukla bir yıldan azdır ve en iyi koşullarda bile hastaların büyük kısmı iki yıl içinde kaybedilmektedir. Bununla birlikte, hastaların %5-10'u iki yıl kadar yaşamaktadır (5-7).

GBM tedavisinde klasik tedavi rejimi sırasıyla, cerrahi yöntem, radyasyon tedavisi ve kemoterapidir. GBM'ın konumu sebebiyle cerrahi yöntemle tümöral dokunun tamamı uzaklaştırılamadığından tedavi sonrası kanserin nüks etme olasılığı ortaya çıkmaktadır. Öte yandan kemoterapi süresince kanser hücreleri çoklu ilaç direnci kazandığından tekrarlayan GBM'ların tedavisi oldukça zorlaşmaktadır (8).

MSS dolaşım sıvısı olan beyin omurilik sıvısı (BOS), koroid pleksus tarafından üretimi ve MSS içindeki dolaşımı nedeniyle MSS'nin bir parçası olarak kabul edilir. Periferik kan ve MSS arasındaki hücresel ve moleküler trafiği düzenleyen üç ana fizyolojik engel vardır. İlk ikisi olan KBB ve kan-leptomeningeal bariyeri (BLMB), dolaşımdaki kanı MSS çevresinden doğrudan ayırır. Üçüncüsü, kan-BOS bariyeri (BCSFB), dolaşımdaki kanla doğrudan temas halinde değildir, bunun yerine koroid pleksusun yüksek oranda vaskülarize stroması ile beyin ventriküllerinde ürettiği BOS arasındaki molekül ve hücre alışverişini düzenler. Bu engellerin doğal, indüklenen ve/veya ikincil işlev bozukluklarının genellikle tümörler, Alzheimer hastalığı ve multipl skleroz dahil olmak üzere nöropatolojik durumlarla ilişkili olduğu tanımlanmaktadır (9).

Beyne ilaç taşınmasındaki en etkili bariyerlerden birisi KBB'dir. KBB'ndeki kılcal damarlarda hücre içine madde geçişinin iki tip kontrol mekanizması mevcuttur. Birincisi, endotelial interselüler bağlantı moleküllerinin oluşturduğu fiziksel bariyer

veya geçirgenliktir. Hücreler arasında madde geçişi, bu moleküllerin izin verdiği ölçüde gerçekleşir. İkincisi, endotelial hücrelerin hücre zarına yerleşmiş olan taşıyıcı proteinlerin veya enzimatik pompaların aktivite derecesiyle kontrol edilir (10).KBB'nin bu moleküller mekanizmaları ile ilaçların beyin dokularına geçişi sınırlanır, bariyeri geçen ilacın beyin hücrelerine etkin dozda ulaşması yavaşlar veya engellenir.

GBM'larda kemoterapötik ajanlar, tümörün odak noktasına etkin dozda ulaşabilirken, tümörün çevresine eşit olarak dağılmamaktadır. Ameliyatla uzaklaştırılan ana kitlenin bulunduğu bölgedeki hücreler tedaviye iyi cevap verirken, invaze olmuş GBM hücrelerine yeterince ilaç ulaşmamakta ve dolayısıyla cerrahi sonrası kemoterapide direnç problemiyle karşılaşmaktadır. 2006 yılında yapılan bir çalışmada, GBM hastalarının beyin dokusundaki paklitaksel düzeyleri ölçülmüş ve normal beyin hücrelerinde GBM hücrelerine oranla 10 kat daha fazla ilaç birikimi olduğu bulunmuştur (11). Dolayısıyla, GBM'da tedaviye doğal direncin önemli sebeplerinden biri KBB ve tümörün beyindeki lokalizasyonudur denilebilir (12). Bu nedenle, tümöre hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemlerinin geliştirilmesi ilaçların toksik etkisini azaltmak ve çoklu ilaç direncinin önüne geçmek adına büyük önem arz etmektedir (13).

Lipozomlar, ilaçların taşınması amacıyla fosfolipid, kolesterol ve su fazından oluşan kolloidal nanoboyutlu veziküllerdir. Lipozomların taşıyıcı sistemler olarak en önemli avantajları; biyoyararlanımı artırma, non-toksik, non-immunojenik olma, ilaç moleküllerinin KBB geçiş özelliklerini iyileştirme, ilacın beyinde istenilen bölgedeki salım hızını kontrol etme ve toksisitelerini azaltmalarıdır (14). Bu hedefleme potansiyeline aracılık etmek ve beyinde ilaç biyoyararlanımını artırmak için çeşitli stratejiler önerilmiştir. Polietilen glikol (PEG) lipozomların retikuloendotelial sistemi (RES) tarafından taşınmasını engellemek için yaygın olarak kullanılan ve dolayısıyla kanda kalış süresini uzatan bir polimer olarak sıklıkla tercih edilmektedir (15, 16). Lipozomların bir endotel hedefe spesifik olarak yönlendirilmesi veziküller yüzeyin belirli ligandlarla (reseptör agonistleri, antagonistleri veya antikörleri v.b.) modifiye edilmesiyle gerçekleştirilebilir (17). Lipozomların glikolipidlerle işlevselleştirilmesi, GLUT1-GLUT7 gibi üyelerden oluşan KBB glikoz taşıyıcılarına (GLUT) karşı

spesifik olarak hedeflendirilebileceğini göstermektedir (18). GLUT1, beyindeki glikoz taşıma aktivitesinin çoğuna aracılık etmektedir (19).

Kanser hücrelerinde glukoz gereksinim seviyesine göre glukoz taşıyıcılarının farklı derecelerde artmış ekspresyonu gözlenmektedir (20). Bu yüksek glukoz kullanım ve taşıma kapasitesi nedeniyle, glukoz transporter (GLUT1) hedefleyen araçların lipozomal taşıyıcı sistemlere modifikasyonu ile spesifik hedefleme sağlanabilmektedir. Lipozomal veziküllerin glukoz yapılarıyla ile yüzey modifikasyonu bu amaç için bir yaklaşım olarak araştırılmıştır (17, 21). Qin ve arkadaşları, floresan probu olarak Coumarin-6'yı beyne taşımak için GLUT1 ligandı olan NAG ile modifiye etmişlerdir (22). Ayrıca, Xie ve arkadaşları NAG ile modifiye edilmiş, PEGlenmiş-glikosile lipozomların daha fazla hücre penetrasyonuna sebep olduğunu göstermiştir (23).

İngilizce'de "Theranostic" olarak geçen Teranostik ifadesi "Therapeutic" ve "Diagnostic" kelimelerinin birleşmesi ile meydana gelmekle birlikte aynı taşıyıcı sistem içerisinde tedavi edici (terapötik) ve görüntüleme (diagnostik) etkinliğini içeren ajanlara denilmektedir (24). Bu sistemler terapötik yanıt için verilen ilacın etkinliğinin verilen diyagnostik ajan ile görüntülenmesine ve aynı anda tedavi etkinliğinin izlenmesine olanak vermekle birlikte, terapötik ve diyagnostik ajanın biyodağılımında meydana gelen istenmeyen özelliklerin üstesinden gelebilme ve *in vivo* koşullarda yapılan hedeflemenin izlenebilmesine olanak sağlama şeklinde sıralanabilir (25, 26). Literatürde, lipozomal sistemler başta olmak üzere, teranostik nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler özellikle tümörde ilaç tutulumunu artırmak ve hücrel fenotip ile tümör heterojenitesini anlamak için kullanılmıştır (25). Sahip oldukları iç kora, lipit çift tabakaya veya lipit çift tabaka yüzeylerinin arasına farklı özelliklere sahip ilaçları hapsedebilmeleri ve kor kısmına uygun bir görüntüleme ajanının hapsedilmesi ya da yüzeye özel bir şelatör ligandın bağlanması ile radyoaktif ya da radyokontrast işaretleme sağlanabilmesi lipozomları teranostik yaklaşım için ideal taşıyıcı sistemler haline getirmektedir (26, 27).

Bilgisayarlı tomografi (BT), manyetik rezonans görüntüleme (MRG), tek foton emisyon tomografisi (SPECT), pozitron emisyon tomografisi (PET), ultrason (US), near-infrared (yakın kızıl ötesi) (NIR) görüntüleme gibi non-invaziv görüntüleme

yöntemlerinde kullanılan radyoaktif/kontrast ajanlar kombine veya tek başlarına lipozomal sistemler olarak formüle edilebilmektedir (28).

NIR floresan (NIRF) ajanlar ile hedefe özgü görüntüleme, görüntülerin renk yansımaları ve floresan emisyonundan elde edilen veriler sayesinde gerçekleştirilir (29). Bu moleküllerin soğurma ve floresans yaptıkları bölge, NIR spektroskopisinin moleküler görüntülemelerdeki seçici alanı olarak tanımlanır (650-850 nm). NIRF ajanlar çoğunlukla NIR görüntüleme çalışmalarında kullanılsa da günümüzde PDT ve PTT çalışmalarında da rastlanmaktadır (29).

Fotodinamik tedavi (PDT), ışığa duyarlı (fotoduyarlaştırıcı) bir ajanın verilmesi ve lokal olarak tümör dokusunda birikmesi sonrasında ajanın absorpsiyon yapacağı dalga boyunda bir ışık kaynağı ile uyarılması esasına dayanır. Serbest oksijen varlığında dokuda hücre ölümü meydana gelir. PDT ile gerçekleştirilen etki fotokimyasaldır (30).

Heptametin siyanin boyaları, tümör dokularında birikir ve bu nedenle son zamanlarda hem görüntüleme hem de tedavide kullanımına yönelik çalışmalar yaygınlaşmıştır (31). Heptametin siyanin boyalardan olan IR780 iyodür, 780 nm'de pik emisyonu olan lipofilik bir boyadır ve NIRF görüntüleme sistemi tarafından kolayca tespit edilebilir (32). Ayrıca, IR780 iyodürün PDT/PTT için kullanılabilir 808 nm dalga boyu ışığı altında singlet oksijen oluşumu ve sıcaklık artışı kabiliyetine sahip olduğu rapor edilmiştir (33).

Başka bir çalışmada, NIR boya IR780, D- α - tokoferil polietilen glikol süksinat (TPGS) ve D- α - tokoferil süksinat (TOS) bazlı amfifilik misellerin içine yüklenerek kanser görüntüleme ve tedavi için araştırılmıştır. IR780 enkapsüle edilmiş misellerin floresans özelliği ve tedavi etkinliği, kontrol grubundan önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (34).

Başka bir çalışmada, beyne hedeflendirilmiş IR780 nanopartikülleri beyin tümörlerini görüntülemek için özel olarak geliştirilmiştir. IR780 nanopartiküllere hapsedilerek, sırasıyla 95 nm ve 26 nm boyutlarındaki lipozomlar ve fosfolipid miseller hazırlanmıştır. Glioma hücrelerinde hücre alım değerlendirilmiş ve mitokondriyal alım profilinin hem nanopartiküller hem de serbest boya için oldukça umut vaat edici olduğu bulunmuştur. U87MG glioma ortotopik tümörlerdeki *in vivo* görüntülemelerde IR780 lipozomlarına kıyasla IR780 fosfolipid misellerin tutulumunun

belirgin olarak fazla olduğu gösterilmiştir. IR780 fosfolipit misellerinin beyin tümörü hedefleme etkisine sahip olduğu ve gelecekteki klinik çalışmalarda kullanılabileceği rapor edilmiştir (35).

Örneklerden de anlaşılacağı üzere, bu konuda yapılmış pek çok çalışma bulunmasına karşılık halen glioma teşhis ve tedavi etkinliğinde eksiklikler gözlenmektedir. Bununla birlikte multifonksiyonel tedavi ve görüntüleme ajanı olarak az sayıda çalışma olduğu tespit edilmiştir. Bu doğrultuda tez kapsamında, glioblastomanın etkin teşhis ve tedavisi için beyindeki tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan GLUT1'e aktif olarak hedeflendirilmesi amacıyla NAG ile modifiye edilmiş; PET/BT görüntüleme amacıyla ⁶⁸Ga ile işaretlenmiş, PDT/PTT ve NIR görüntüleme amacıyla fotoduyarlaştırıcı IR780 enkapsüle edilmiş, PEGlenmiş, nanoboyutlu nötral ve pozitif yüklü multifonksiyonel, teranostik lipozomlar formüle edilmiş ve optimizasyonu sağlanmıştır. Multifonksiyonel lipozomların hücre tutulumları RG2 ve U87 glioblastoma hücre hattında optik görüntüleme (In Vivo Imaging System=IVIS), floresans mikroskop görüntüleri ve NIR görüntülerinin alınması ile tayin edilmiş ve sitotoksitesisi incelenmiştir. Ayrıca, IR780 hapsedilmiş hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nötral ve pozitif yüklü lipozomların PDT/PTT etkinlikleri *in vitro* olarak uygun NIR ışığı altında incelenmiştir. Çalışma, glioblastomanın etkili teşhis ve tedavisi amacıyla geliştirilen teranostik lipozomların NIR görüntüleme ve PDT/PTT tedavi etkinliğinde potansiyel olarak bulunmuş ve ileride *in vivo* glioblastoma modellerinde yapılacak görüntüleme ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi çalışmalarına yol gösterici potansiyelindedir.

2. GENEL BİLGİLER

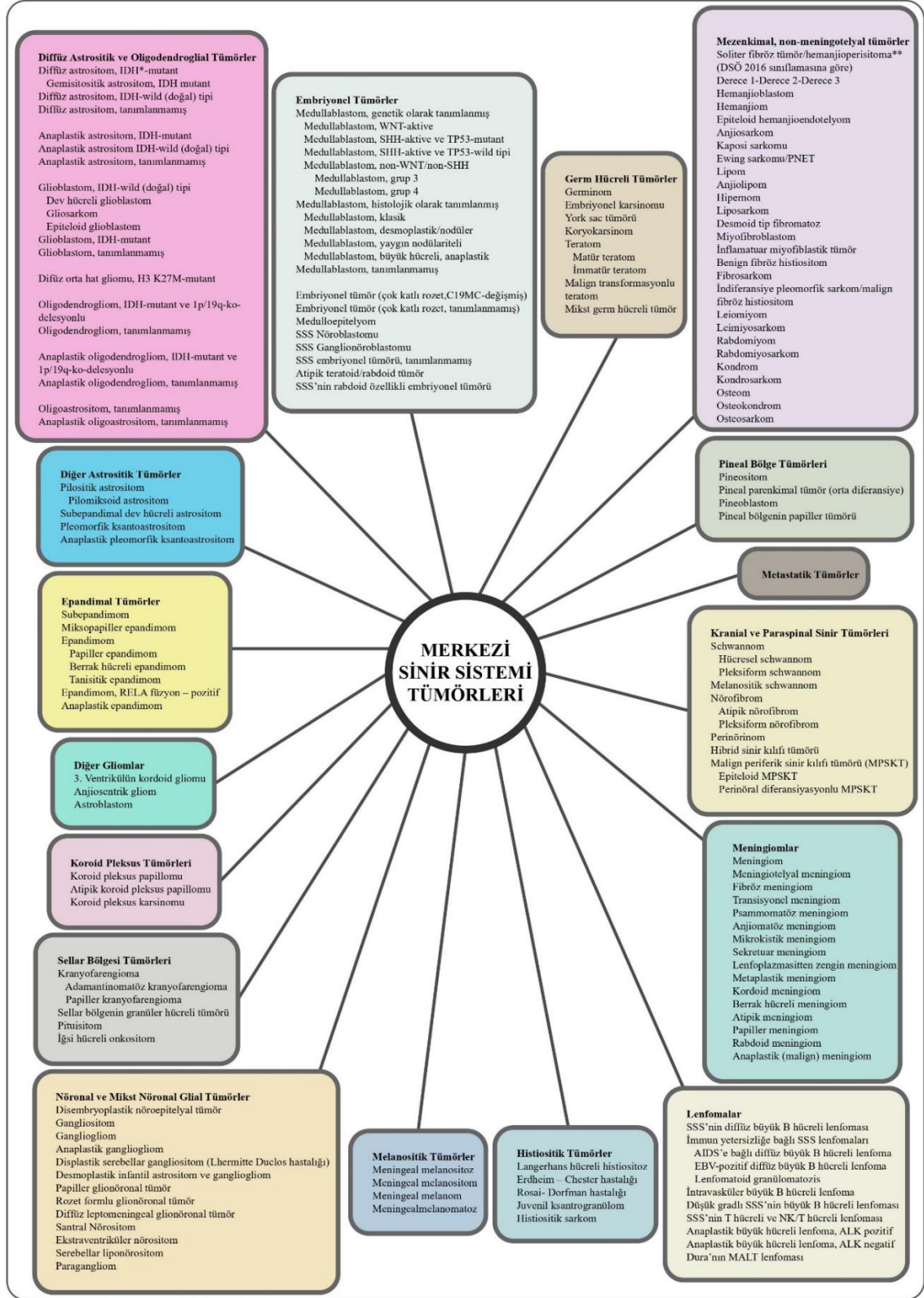
2.1. Glioma ve Alt Tipleri

Gliomalar, beyin ve omuriliğin en sık görülen primer tümörleridir. Histolojik olarak normal glial hücrelerin özelliklerini paylaşırlar ve genellikle bu benzerliklere göre isimlendirilirler (36). Yetişkinlerde yaşa göre ayarlanmış insidans oranı 100.000'de 28 olan gliomalar, tüm beyin ve diğer MSS tümörlerinin yaklaşık %27,2'sini ve tüm malign tümörlerin yaklaşık %81,3'ünü oluşturur (37). Gliomalar, tüm beyin tümörlerinin %45'ini ve tüm beyin malignitelerinin %90'ını 100.000 insanda 6-8 vakalık bir sıklıkla oluşturur. Gliomalar, 20 yaşın üzerinde en sık görülen primer beyin maligniteleridir.

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ=WHO), beyin tümörlerini benign (iyi huylu) ve malign (kötü huylu) olarak sınıflandırır ve kötü huylu tümörler histolojik agresifliğe dayalı olarak 4 sınıfa ayrılır (38).

Hem intra hem de ekstra-aksiyel kütleler hücre orijini, histoloji, immünofenotip ve moleküler/sitogenetik profile göre kategorize edilir (38).

Son moleküler genetik buluşlar, tanısal tanımların ve kriterlerin yeniden değerlendirilmesi durumunu gerektirmiştir. Klasik histopatoloji ve immünohistokimya teşhisini tamamlayan genetik profillemeye, moleküler parametreleri içeren 2016 DSÖ tümörleri sınıflandırması sınıflandırma ve derecelendirme sistemine katkıda bulunmuştur (39). DSÖ'nün 2016 yılında tekrar düzenlediği sınıflamaya göre gliomalar; diffüz astrositik-oligodendriogial tümörler, diğer astrositik tümörler ve ependimal tümörler olarak üç temel gruba ayrılmıştır (39). Şekil 2.1.'de, diğer MSS tümörlerinin yanı sıra gliomaların fenotipik ve genotipik özelliklerini entegre eden bu yeni sınıflandırma gliomaların tiplerini ve alt tiplerini özetlemektedir (39).



Şekil 2.1. MSS tümörlerinin sınıflandırılması (DSÖ 2016) (39).

Gliomaların derecelendirilmesi/evrelendirilmesi histopatolojik olarak kontrolsüz büyümeyi gösteren mitotik aktivite, nekroz ve infiltrasyonun varlığı, tümörün vaskülaritesi göz önünde alınarak yapılır.

Tümörün derecesi malignite derecesini göstermekte olup, sağkalım ve prognoz ile alakalıdır (40).

Derece I ve II, uzun süreli klinik seyri olan düşük dereceli tümörler olarak kabul edilir. Derece III ve IV tümörler, tedavi edilmediğinde hızla ölüme yol açan yüksek dereceli lezyonlar olarak kabul edilir (39).

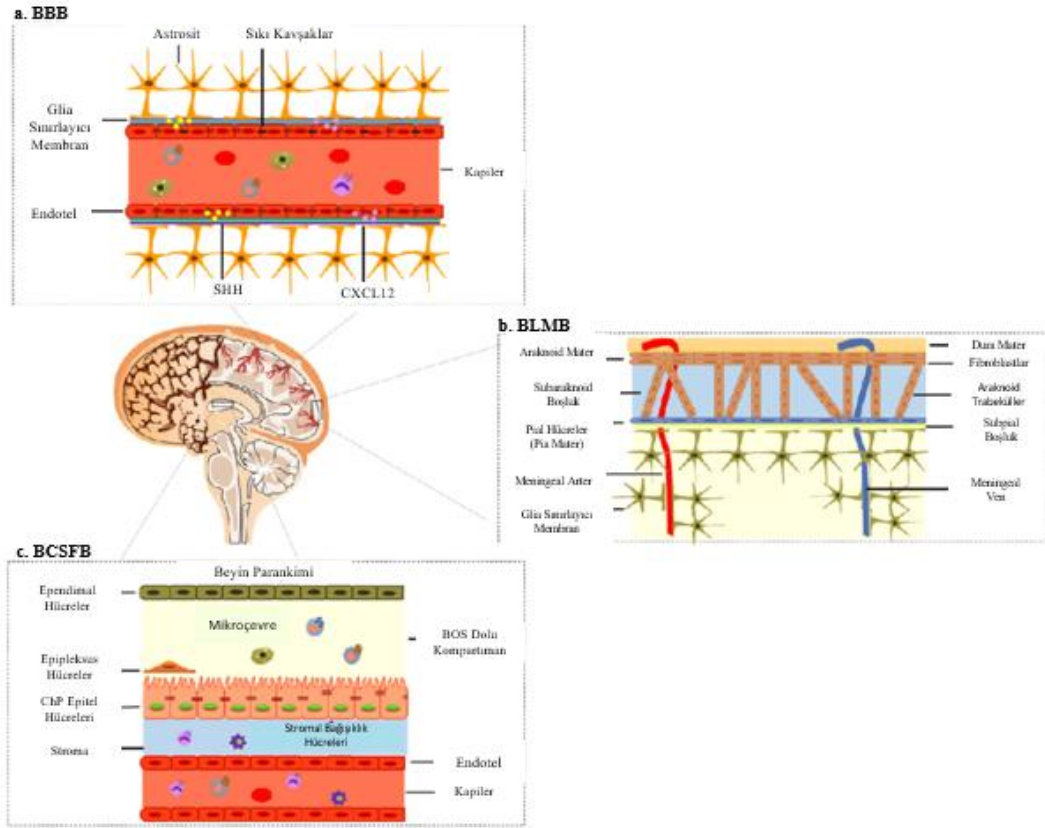
Glioblastoma multiforme (GBM) veya glioblastoma, malign beyin kanserinin hem en yaygın hem de en agresif şeklidir. Mevcut tedaviler yalnızca minimum düzeyde etkilidir ve beş yıllık sağkalım oranı %7'dir (41). GBM, beynin glial hücrelerinden kaynaklanır ve DSÖ tarafından derece IV astrositom olarak sınıflandırılır (39).

Son yıllarda yapılan klinik çalışmalarda nöbetler, baş ağrısı, mide bulantısı, motor bozukluklar, duyuşsal ve görsel problemler, kafa karışıklığı, hafıza problemleri, bilinçte değişiklik, dil veya konuşma ile ilgili sorunlar ve kişilikte değişiklik gliomalarda en sık bildirilen semptomlar olmuştur (42).

2.2. Klinikte Gliomannın Teşhis ve Görüntülenmesi

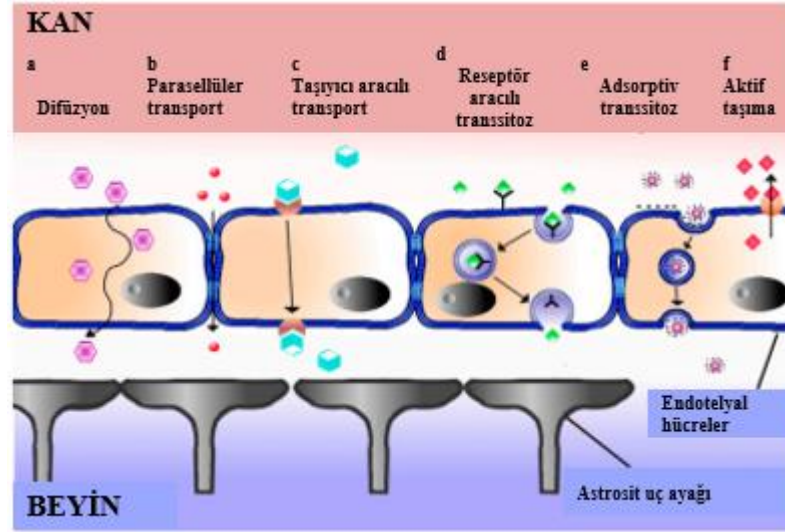
Multimodal tedavi stratejilerine rağmen, gliomalı hastalar için prognoz kötüdür. Bu nedenle, doğru tümör teşhis ve derecelendirilmesi, uygun tedavi stratejisi ve uzun vadeli sonuçları iyileştirmek için çok önemlidir (43).

Glioma ve ileri evre glioblastomaların tedavisindeki en büyük engel beyindeki bariyerlerdir; KBB ve BLMB ve BCSFB (Şekil 2.2.) (9). En yaygın olarak tanınanı, parankimal mikrodamarlar seviyesinde yer alan ve yüksek dirençli sıkı bağlantılar ile karakterize edilen ve glia sınırlayıcıları tarafından desteklenen tek bir özel endotel hücre tabakasından oluşan KBB'dir (44). BCSFB, kanla taşınan elementleri BOS'tan ayıran koroid pleksusun (beyin ventriküllerinde lokalize) epitel hücrelerinden oluşur (45). Üçüncü tip bir MSS bariyeri olan BLMB, pia mater (beyin zarı) ve onu örten subaraknoid boşluk içinden geçen mikrodamarların endotel hücrelerinin tek tabakasından oluşur ve başka bir BCSFB tipi olarak kabul edilebilmektedir (46).



Şekil 2.2. MSS bariyerleri (47).

KBB sıkı bağlantılar vasıtasıyla birbirine sıkıca bağlı ve astrositlerle sıralanmış polarize bir damar endotel hücresi tabakasından oluşur. Şekil 2.3.'de görüldüğü üzere çeşitli transselüler taşıma mekanizmaları mevcuttur. Küçük hidrofobik molekülleri içeren bir konsantrasyon gradyanı tarafından yönlendirilen difüzyon, mevcut terapötiklerin beyne ana giriş yolunu temsil eder. Paraselüler taşıma küçük suda çözünür moleküllerle sınırlıdır. Glukoz, amino asitler, nükleositler ve vinka alkaloidleri, azidotimidin vb. gibi terapötikler için olduğu gibi taşıyıcı aracılı taşıma ve peptidik sinyal ve düzenleyici moleküller (insülin, leptin, interlökinler), besinler (demir, LDL) için reseptör aracılı transsitoz mevcuttur. Pozitif yüklerin spesifik olmayan bir şekilde taşınmasına dayanan adsorptif transsitoz ve proton pompalı akış taşıyıcıları ile de KBB'den geçiş mekanizmaları gerçekleşmektedir (48).



Şekil 2.3. KBB geçiş mekanizmaları (48).

Gliomalara anatomik konumları sebebiyle erişim zordur. Genellikle yüksek riskli cerrahi prosedürler ve stereotaktik biyopsiler gerektirebilir. Ayrıca, tümörlerin boyutu sebebiyle doğru tanı konulması zordur, patolojik tanıyı netleştirmek için birden fazla cerrahi örnekleme gerekebilir. Moleküler tanıyı kolaylaştırmak için DSÖ histoloji ve genetik analizlerin entegrasyonunu önermiştir. Diffüz gliomalar, IDH mutasyonlarının varlığı ile alt gruplara ayrılabilir ve IDH-mutant gliomaların alt grubu içinde, 1p/19q kromozom kollarının kodelasyonlarının yanı sıra TERT gen promotörü ATRX ve/veya TP53 mutasyonlarının varlığı, yaygın astrositomları ve oligodendrogliomları ayırt edebilmektedir. Ayrıca diffüz orta hat gliomaları H3F3A ve HIST1H3B genlerindeki mutasyonlarla karakterizedir (49).

İnvazif olmayan görüntüleme yöntemleri, karmaşık ve yüksek riskli cerrahi prosedürleri en aza indirerek yaygın gliomaların yönetimine büyük ölçüde yardımcı olabilmektedir. Glioma görüntülemeye BT veya MRG anatomik bilgi sağlanmasında ve rutin uygulamada sıklıkla kullanılan görüntüleme yöntemleridir. MRG'nin BT'ye üstünlüğü daha iyi yumuşak doku kontrastı, gelişmiş doku karakterizasyonu, lokalizasyon ve kapsam değerlendirmesi sağlayabilmesidir (50).

Nükleer tıp görüntüleme yöntemleri içerisinde tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) ve pozitron emisyon tomografisi (PET), gliomalarda fizyolojik bilgi sağlayabilmede önem taşır. Ayrıca SPECT/BT, PET/BT, PET/MRG gibi hibrid görüntüleme yöntemleri hem anatomik hem de fonksiyonel bilgi sağlayan görüntülerin

elde edilmesinde ve gliomanın doğru teşhisinde moleküler, fonksiyonel ve anatomik bilgi elde etmede de önemli rol üstlenmektedir. Nükleer görüntüleme tekniklerinden olan PET ve SPECT görüntüleme, biyolojik moleküllere kolayca dahil edilebilen ve böylece dokuların sadece anatomik tanımını sağlamak yerine fonksiyonel parametrelerin (fizyolojik ve/veya farmakolojik etkileşimler) ölçülmesine izin veren pozitron ve gama yayan radyoizotopları kullanır (38, 51).

2.2.1. Glioma Görüntülenmesinde MRG

T1 ağırlıklı, T2 ağırlıklı ve gadolinyum ile güçlendirilmiş dizileri kullanan MRG, gliomaların teşhisi, karakterizasyonu, gözetimi ve tedavisinin izlenmesinde önemli bir klinik rol oynar. Bu tür geleneksel MRG protokolleri, BT ile karşılaştırıldığında yüksek çözünürlüklü, çok düzlemlili anatomik bilgi ve geliştirilmiş doku karakterizasyonu sağlamaktadır (52).

MRG, beyin tümörlerinin konum, kitle etkisi ve kontrast artışı gibi morfolojik özelliklerini değerlendirmek için altın standart bir görüntüleme yöntemi olmasına karşın bazı sınırlamaları mevcuttur. Gliomaların neoplastik olmayan lezyonlardan ayırım yeteneğinin zayıf olması ve kontrast artışının her zaman tümör derecesi ile paralellik göstermemesi ve fonksiyonel bilgi sağlamaması gibi dezavantajlar nedeniyle MRG gliomaların derecelenmesi için kısıtlı bulunmuştur (37).

2.2.2. Glioma Görüntülenmesinde BT

Gliomalar hem çocuklarda hem de yetişkinlerde herhangi bir bölgede ortaya çıkabilir. Ancak optik kiazma ve beyin sapı gliomaları, sırasıyla 1-6 yaş ve 1-4 yaş arasında en yüksek insidansa sahiptir. Serebellar astrositom çocuklarda da yaygındır ve en yüksek insidans 5-10 yıl arasındadır. Erişkinlerde, en sık etkilenen yaş grubu 30-65'tir. BT, bunları diğer intrakraniyal boşluk kaplayan lezyonlardan ayırt etmede rol oynar ve intrakraniyal yer kaplayan lezyonların değerlendirilmesinde ilk tercih edilen modalite olmaya devam etmektedir (53).

Çoğu durumda, klinik öykü ile birlikte BT görüntülemesinde glioma tanısı konulabilir. Artan deneyim ve uzmanlık, tedaviden önce ve sonra BT'de bir dizi model olduğunu gösterir; bu, tümörün derecelendirilmesinin değerlendirilmesine olanak tanır. MRG, çok düzlemlili yeteneği ve lezyonun çeşitli sekanslarda daha iyi

karakterizasyonu nedeniyle tümörleri tespit etme ve lokalizasyonunda BT'den daha üstün kabul edilmektedir. Ancak beyin tümörlerinin ayırıcı tanısında tanısal öneme sahip olan kalsifikasyonun saptanmasında BT'nin gerisinde kalmaktadır. Akut intratümöral kanamayı tespit etmede BT, MRG'den üstün kabul edilir (53). Yine de gliomaların neoplastik olmayan lezyonlardan ayırım yeteneğinin zayıf olması ve kontrast artışının her zaman tümör derecesi ile paralellik göstermemesi ve fonksiyonel bilgi sağlamaması gibi dezavantajlar nedeniyle BT de gliomaların derecelenmesi için kısıtlı bulunmuştur (37).

2.2.3. Glioma Görüntülenmesinde PET

PET, gliomaların invazif olmayan fonksiyonel görüntülenmesi, derecelenme, ayırıcı tanı, tümör kapsamının belirlenmesi, cerrahi ve radyoterapinin planlanması, tedavi sonrası izleme ve prognozu amacıyla kullanılabilir (54). Ayrıca tümör nüksünün ameliyat veya radyoterapi sonrası nekroz gibi değişikliklerden ayırt edilmesi, beyin görüntüleme çalışmalarında spesifik radyofarmasötiklerin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (37).

PET dedektörler, sintilasyon kristallerinden ve fotoçoklayıcı tüplerinden oluşur ve dedektör halkaları halinde düzenlenir (55). PET'in hassasiyeti ve uzaysal çözünürlüğü SPECT'ten daha yüksektir. Pozitron yayan izotoplar vücutta doğal olarak oluşan ya da bulunan atom veya moleküllerin yerini kolaylıkla alabilir. Bu nedenle PET, moleküler olayın görüntülenmesi ve ilgili fonksiyonel bilginin alınabilmesi için daha iyi bir tekniktir. SPECT ile karşılaştırıldığında PET'in yüksek duyarlılığı ve çözünürlüğü daha etkili karakterizasyon ile sonuçlanır. Daha yüksek verimli PET tarayıcı teknolojisi geliştirildikçe PET'in daha yaygın kabul görmeye devam etmesi muhtemeldir (56).

PET, 5 mm'ye kadar uzaysal çözünürlüğü ile normal ve patolojik doku fonksiyonunun farklı yönlerini gösteren farklı radyofarmasötik yelpazesi ile gelişmiş görüntüleme tekniklerindenir (57).

Son yıllarda, PET ile moleküler görüntüleme, artan tümör büyüme aktivitesi alanlarının tanımlanmasında giderek artan bir önem kazanmıştır. Metabolik düzensizlik ve replikatif immortalite gibi kanserlerin ayırt edici özelliklerini kullanarak tümörleri görselleştirmek için çeşitli PET izleyiciler geliştirilmiştir. ¹⁸F-

florodeoksiglukoz (FDG), glikoz metabolizmasını görselleştirirken radyoişaretli amino asitler örn., ^{11}C -metiyonin (MET), ^{18}F -3,4-dihidroksifenilalanin (FDOPA) ve O-(2- ^{18}F -Floroetil)-1-Tirozini (FET) protein sentezini ve ^{18}F -florotimidin (FLT) DNA replikasyonlarını izlemede kullanılabilir (Tablo 2.1.). PET/BT ile bu şekilde altta yatan tümör tipleri arasında primer tespit ve farklılaşma, tümör dereceleme ve risk sınıflandırması, tedavi planlaması, biyopsi yeri seçimi, yanıt değerlendirme ve nüks tespiti ile ilgili klinik olarak oldukça önemli bilgiler elde edilebilir (37).

Tablo 2.1. Beyin tümörü ve gliomaları görüntülemeye kullanılan PET radyofarmasötikleri ve mekanizmaları.

PET İZLEYİCİLER		MEKANİZMA
GLİKOLİZ İZLEYİCİLERİ	¹⁸F-FDG	-KBB boyunca aktif olarak taşınır ve aerobik glikoz metabolizmasının arttığı bölgelerde birikir (38). -Glikoz taşıyıcıları (GLUT1 ve GLUT3) ile kanser hücrelerine taşınır ve glikoz gibi, ¹⁸ F-florodeoksiglukoz-6-fosfat oluşturmak için heksokinaz yoluyla fosforile edilir. Bununla birlikte, glukoz-6-fosfatın tersine, ¹⁸ F-florodeoksiglukoz-6-fosfat çok yavaş metabolize olur ve bu nedenle kanser hücresinde etkin bir şekilde hapsolür (58).
PROTEİN SENTEZİ İZLEYİCİLERİ:	Aminoasit İzleyici ¹¹C-MET ve ¹⁸F-FET	- ¹¹ C-MET ve ¹⁸ F-FET hücre yüzeyinde bulunan sodyumdan bağımsız L-taşıyıcı sistemi ile hücreye alınır. - ¹¹ C-MET hücre içine alındıktan sonra protein sentezine ya da adenzillenerek DNA sentezine katılır. -FET sadece artmış aminoasit transportunu gösterirken ¹¹ C-MET protein sentezindeki artışı da gösterir (59).
	Aminoasit Analoğu İzleyici ¹⁸F-DOPA	-Tirozinin metaboliti olan dihidroksifenilalanin (DOPA) aromatik aminoasit dekarboksilaz enzimi ile dopamine çevrilir. ¹⁸ F işaretli ¹⁸ F-DOPA ise aynı enzim ile ¹⁸ F-florodopamine dönüştürülür. -Nörolojide presinaptik dopaminerjik yolağın bütünlüğü ile ilgili bilgi sağlayan bir aminoasit izleyicisi olan ¹⁸ F-DOPA nöroendokrin tümörlerde tutulur. - ¹⁸ F-DOPA glial tümörlerde sodyum bağımlı aminoasit taşıyıcı sistemler aracılığı ile hücreye alınır (60).
DNA SENTEZİ İZLEYİCİLERİ	¹⁸F-FLT	-Timidin hücre içerisine alındıktan sonra hücre sitozolünde yer alan timidin kinaz-1 tarafından fosfatlanır ve timidin 3 fosfat DNA yapısına eklenir. -Timidin kinaz-1'in substratı olan timidin ¹⁸ F ile işaretlenmesi ile oluşan yapı 3'hidroksil grubu içermediği için DNA sentezine dahil edilemez ancak fosfatlandıktan sonra hücre içerisinde hapsedilir. - ¹⁸ F-FLT tutulumu timidin kinaz-1 aktivitesini gösterir (59).
HİPOKSİ İZLEYİCİLERİ	¹⁸F-Floromisonidazol (FMISO)	- ¹⁸ F-FMISO tümör anjiyogenezinin bir primer başlatıcısı olan hipoksi izleyicisidir. KBB ve perfüzyondan bağımsız olarak dokularda hızla dengeye gelir ve yüksek derecede hipoksik bir ortamda bulunan canlı hücrelerde hapsolür. -Tümör hipoksisi, GBM gibi yüksek dereceli tümörlerin yüksek proliferasyon oranı ve dengesiz kan beslemesinden kaynaklanır (38).
	¹⁸F-Florodeoksi-arabinofuranozil-nitroimidazol (FAZA)	- ¹⁸ F-FAZA, diğer bir hipoksi izleyicisidir. Daha az lipofilik özellik ve daha fazla klerens nedeniyle daha iyi bir sinyal-ses oranı sergiler. -Ayrıca, hipometabolik nekrotik alanlarda sınırlı küçük hipoksik tümör alanlarının belirlenmesine yardımcı olabilir (60).
HÜCRE ZARI SENTEZİ İZLEYİCİLERİ	¹¹C-Kolin (¹¹C-CHO)	- ¹¹ C-kolin, kötü huylu tümörlerde artan fosfolipid sentezinin bir belirteçidir. -Normal beyinde ¹¹ C-kolin, alımı ihmal edilebilir düzeyde birikir. - ¹¹ C-kolin, beyin tümörü konturlarının iyi bir şekilde tanımlanmasına ve tümör nüksü teşhisine olanak sağlar (61).

PET görüntülemesinde kullanılan radyonüklitler 20 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{11}C , 10 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{13}N , 2 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{15}O , 110 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{18}F , 1,3 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{82}Rb , 12,7 sa.lık yarılanma ömrüyle ^{64}Cu , 14,7 sa.lık yarılanma ömrüyle ^{86}Y , 16 sa.lık yarılanma ömrüyle ^{76}Br , 68 dk.lık yarılanma ömrüyle ^{68}Ga ve 4,2 günlük yarılanma ömrüyle ^{124}I ' dür (62). ^{18}F en sık kullanılan PET radyonüklidi olmasına karşın, jeneratör tarafından üretilen ^{68}Ga , ana Germanyum-68'in 271 günlük yarılanma ömrü, jeneratörlerin yaklaşık 1 yıl boyunca kullanılabilmesi anlamına geldiğinden, PET görüntüleme için çekici bir izotoptur. ^{68}Ga jeneratörü, alümina, SnO_2 veya TiO_2 kolonları üzerinde emilmiş ^{68}Ge içerir. Bozunma ürünü ^{68}Ga 'i kolondan ayırtmak için seyreltik HCl çözeltileri kullanılır (63).

^{68}Ga , peptitler, oligonükleotitler veya afibodiler gibi birçok düşük veya ortalama moleküler ağırlıklı radyofarmasötik biyokinetik ve biyolojik yarı ömürleriyle uyumlu, 68 dakikalık çok uygun bir yarı ömre sahiptir (64).

$^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ jeneratör tasarımındaki son gelişmeler ve ticarileştirilmesi, ^{68}Ga işaretli PET izleyicilerine olan ilgiyi artırmıştır. ^{68}Ga , PET görüntüleme için ^{18}F 'e bir alternatif oluşturan jeneratörden kolaylıkla elde edilebilen bir radyonüklittir ve 1.899 MeV'lik yüksek pozitron emisyonuna sahiptir (65). ^{68}Ga , galyumun +3 oksidasyon durumunda bulunduğu kompleksler oluşturur. DOTA, ^{68}Ga -DOTA kompleksi olarak en yaygın olarak kullanılan şelatlayıcı ajandır (63).

2.2.4. Glioma Görüntülenmesinde SPECT

SPECT hastaya enjekte edilen izleyici/radyofarmasötikten gelen gama emisyonlarını kaydederek hastanın etrafındaki çoklu projeksiyonlarda fotoçoğaltıcı tüpler aracılığıyla görüntülerin elde edilmesini sağlar (38).

SPECT vücuttaki radyoaktivite dağılımının tomografik görüntülerini sağlayan bir nükleer görüntüleme tekniğidir. Bu amaçla, radyoaktif atomlarla işaretlenmiş izleyiciler kullanılmaktadır. Bir izleyicinin lokal alımı ve tutulması hem izleyicinin hem de dokunun fizyolojik ve biyokimyasal özelliklerine bağlıdır. Radyasyonun radyoaktif atom tarafından yayılması, izleyicinin SPECT kamera tarafından vücudun dışından invazif olmayan bir şekilde tespit edilmesine ve hastalıkların teşhisine olanak sağlar (66).

SPECT izleyicileri, PET izleyicilerine kıyasla kolay temin edilebilmeleri ve daha ucuz olmaları gibi avantajlara sahip iken SPECT'in uzaysal çözünürlüğünün kısmen düşük olması dezavantajdır (67, 68).

Gliomada görüntülemeye kullanılan tüm izleyiciler gibi Tablo 2.2.'de verilen SPECT ve SPECT/BT'de kullanılan radyofarmasötiklerin sahip olması gereken bazı özellikler bulunmaktadır. Bunların en önemlilerinden bir tanesi radyofarmasötiklerin KBB'yi aşarak beyin dokusunda istenilen bölgede lokalize olabilmesidir (55).

Tablo 2.2. Beyin tümörü ve gliomaları görüntülemeye kullanılan SPECT radyofarmasötikleri ve mekanizmaları.

SPECT İZLEYİCİLERİ	MEKANİZMA
^{99m} Tc-Metoksiizobutilizonitril (MIBI)	- ^{99m} Tc-MIBI, KBB'yi geçebilmek ve mitokondride konsantre olabilmek için aktif difüzyonu kullanan sentetik, lipofilik katyon kompleksidir. - ^{99m} Tc-MIBI alımı, perfüzyon ve hücrel aktiviteyi yansıtır ve cansız hücrelerde birikmez (38).
¹²³ I-Alfa-Metil-Tirozin (IMT)	-IMT, KBB'yi bir amino asit taşıyıcı sistemi aracılığıyla geçen amino asit işaretli bir izleyicidir. -IMT, normal beyin parankimasında çok az tutulum gösteren ya da hiç tutulum göstermeyen gliomalarda önemli miktarda tutulumla sahiptir; böylelikle canlı tümörü radyasyon nekrozundan ayırt etmeye yardımcı olur. -IMT-SPECT beyin tümör hacmini tanımlayabilmekte ve radyasyon planlamasına yardımcı olabilmektedir (38).
²⁰¹ Tl (201-Talyum)	- ²⁰¹ Tl, sodyum potasyum adenozin trifosfat hücre membran pompası aracılığıyla canlı hücrelere aktif olarak taşınan potasyum analogu olan tek değerlikli bir izleyicidir. -İzleyicinin tutulumu için bu pompa hücre canlılığını gerektirmektedir (38).
^{99m} Tc-Etil Sistein Dimer (ECD) ve ^{99m} Tc-Hekzametilpropilen Amin Oksim (HMPAO)	-Relatif serebral kan akışının (rCBF) değerlendirilmesi için en popüler iki beyin SPECT bileşiği ^{99m} Tc-HMPAO ve ^{99m} Tc-ECD'dir. -Bu bileşiklerin her ikisi de lipofiliktir, bozulmamış KBB'yi kolayca geçerler ve içeride KBB'yi kolayca geçemeyen hidrofilik bileşiklere dönüştürülürler. -rCBF bileşikler beyin tümörlerinin değerlendirilmesinde rutin olarak kullanılmamaktadır. Ancak bu bileşikler, kötü huylu beyin lezyonlarının iyi huylu tümörlerden ayrıştırılmasının yanı sıra radyasyon sonrası değişikliklerden tümörün nüksünü ayırt etmek için ²⁰¹ Tl ile kombinasyon halinde kullanılmıştır (69, 70).
^{99m} Tc-Tetrofosmin (TF)	-Sentetik lipofilik katyonik komplekstir. -Aktif difüzyon kullanan ^{99m} Tc-TF alımı membran potansiyellerine bağlıdır. Alım bölgesel kan akışıyla orantılıdır ve izleyici yalnızca canlı tümör hücrelerinde lokalize olur (38).
¹¹¹ In-Pentetreotid	-Bazal ganglionlarda, limbik sistemde ve kortekste bol miktarda bulunan somatostatin reseptörlerine (SSR) bağlanır. -Bu izleyici KBB'yi geçemediği için KBB bozulmadığı zaman intraaksiyal tümörler için kullanımı sınırlıdır. -SSR'leri ifade eden intrakraniyal tümörler arasında hipofiz adenomları, menenjiyomlar, oligodendrogliomalar ve medulloblastomlar bulunur (71).

2.2.5. Glioma Görüntülenmesinde Optik Görüntüleme

Optik görüntüleme teknikleri doku ile ışık etkileşiminin farklı fiziksel parametrelerini kullanmış ve bir dizi farklı optik görüntüleme yaklaşımı tanımlanmıştır. Bu teknikler, kontrast kaynağı olarak floresan, absorpsiyon, yansıma veya biyoluminesansa dayanır. Son zamanlarda kullanılan optik görüntüleme teknikleri arasında NIRF görüntüleme ve biyoluminesans görüntüleme bulunmaktadır. Bu optik teknikler moleküler özgüllük potansiyeline sahiptir (72).

Glioma Görüntülenmesinde Biyoluminesans Görüntüleme

Glioma progresyonunun keşfedilmesi ve glioma müdahalesinde yeni ajanların değerlendirilmesine yönelik çalışmalar biyoluminesans görüntüleme (BLI) kullanımıyla desteklenmektedir. BLI, kimyasal enerjinin foton enerjisine dönüştürülmesi ile üretilen ışık emisyonunun saptanması ve nicelleştirilmesine dayanmaktadır. Bu, canlı hücreler ve doku içindeki lusiferaz enzimi tarafından D-lusiferin substratının oksitlenmesi yoluyla gerçekleşir (73).

BLI günümüzde yaygın olarak medulloblastom, oligodendroglioma, atipik teratoid rabdoid tümörler, yaygın intrinsik pontin glioma ve beyin dışındaki diğer dokulardan beyne metastaz dahil olmak üzere bir dizi beyin tümörü tipindeki potansiyel terapötikleri incelemek için kullanılmaktadır (73).

Glioma Görüntülenmesinde NIR Görüntüleme

Nanoparçacıklarla floresan görüntüleme, in vivo izleme için başka bir invaziv olmayan görüntüleme yöntemidir. Avantajları, mikroskopi kullanımıyla hücre altı düzeyde yüksek hassasiyet ve çözünürlüktür, ancak dokularda sınırlı bir penetrasyon derinliğine sahiptir. NIRF görüntüleme daha iyi penetrasyon derinliğine sahiptir ve daha spesifik sinyaller sağlar. NIR görüntüleme, minimum arka plan müdahalesi ile dokulara daha derin penetrasyona izin veren teşhis için hassas ve invaziv olmayan bir tekniktir (74, 75).

NIRF ajanlarla hedefe özgü teşhis ve görüntüleme olanağı, görüntülerin renk yansıması ve floresan emisyonundan elde edilen verilerle sağlanır ve derin yüzeyde bulunan dokuların görüntülenmesinde önem arz eder. Bu moleküllerin soğurma ve floresans yaptıkları bölge NIR spektroskopisinin moleküler görüntülemelerdeki seçici

alanı olarak tanımlanır (650-850 nm). Bu teknik, hücrelerdeki çeşitli patofizyolojik durumların tespitinin yanı sıra ilgili bilgileri elde etmek için gerçek zamanlı izleme sağlar (29, 76).

NIRF ajanlar günümüzde fotodinamik tedavi çalışmalarında da yer almaktadır. Klinik öncesi araştırmalarda, ftalosiyanın, klorin, porfirin, bakterioklorin, siyanin, alexfluore ve çeşitli bodipy serileri vb. NIRF boyalar/ajanlar kullanılmaktadır. Diğer ajanlarla kıyaslandığında ftalosiyanınleri ileri fotofiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptirler. NIR ajanların kullanımının mevcut ve potansiyel avantajlarının yanı sıra toksisite sorunları klinikte kullanılmasını kısıtlamaktadır. Klinikte kullanılan FDA onaylı tek boya indosiyanın yeşilidir (ICG) ve doku kromoforları tarafından düşük absorpsiyon ile NIR bölgesinde 780 ve 830 nm civarında absorpsiyon ve emisyon maksimumlarına sahip bir trikarbosiyanin NIR boyasıdır. İhmal edilebilir yan etkileriyle, kardiyak fonksiyonların kontrolü, karaciğer çıktıları ve retinal anjiyografi gibi klinik alanlarda kullanılmaktadır (29, 77).

ICG'nin terapötik kullanımını sudaki zayıf *in vitro* stabilitesi, konsantrasyona bağlı agregasyon davranışı, kısa dolaşım yarı ömrü ve hedef dışı etkiler gibi çeşitli faktörler kısıtlamaktadır. IR780, ICG'den daha kararlı ve yakın zamanda geliştirilmiş bir NIR boyası/ajanıdır. IR780, ICG'den daha yüksek floresan yoğunluğuna sahip bir lipofilik katyonik heptametin boyadır. IR780'in, PDT için kullanılabilen 808 nm dalga boyunda ışınlama altında singlet oksijen üretme kabiliyetine sahip olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, IR780, NIR ışığı veya lazer ışığı ile ısı üretimi nedeniyle bir PTT ajanı olarak da kullanılabilir (77).

2.3. Klinikte Gliomanın Tedavisi

Gliomalar beyin cerrahisi, nükleer tıp, radyoloji, patoloji, radyasyon onkolojisi ve nöro-onkoloji uzmanları dahil olmak üzere multidisipliner bir ekip yaklaşımıyla tedavi edilmektedir. En başarılı merkezler, bu multidisipliner yaklaşımı vurgulayan ve klinik araştırmaların tasarımı ve uygulanması yoluyla yeni tedavilerin translaşyonel araştırma ve değerlendirmesine odaklanan merkezlerdir (78).

2.3.1. Gliomada Cerrahi

Cerrahi, yaygın olarak, tümör kitlesini azaltmak ve tanı için doku elde etmek için ilk terapötik yaklaşımdır. Primer tedavi yaklaşımıdır. Tümör rezeksiyonu prognostik değere sahiptir; nörolojik fonksiyonun rezeksiyonun kapsamı tarafından tehlikeye atılmaması koşuluyla, maksimum tümör rezeksiyonu girişiminde bulunmak faydalı olabilir (79).

Yapılan bir çalışmada, ameliyat mavi ışık altında 5-amino-laevulinik asit (5-ALA) ile tümörün floresan işaretlemesi kullanılarak yapıldığında tam rezeksiyon oranında artış ve progresyonsuz sağkalımda iyileşme gösterilmiştir (80).

Mikrocerrahi rezeksiyon güvenli bir şekilde mümkün olmadığında (örn. tümörün konumu veya hastanın klinik durumunun bozulması nedeniyle) biyopsi yapılmalıdır (81).

2.3.2. Gliomada Radyoterapi

Radyoterapinin amacı, nörotoksisiteyi indüklemeden lokal kontrolü iyileştirmektir. Radyoterapi, yürütülen birkaç erken klinik çalışmada nörolojik bozulmayı geciktirmiş ve sağkalımı artırmıştır (82, 83).

Radyoterapinin zamanlaması, dozu ve planlaması, yaş, Karnofsky Performans Skoru (KPS) ve rezidüel tümör hacmi dahil olmak üzere hastalık alt tipi ve prognostik faktörler tarafından belirlenir. Radyoterapi genellikle ameliyattan sonra 3–5 hafta içinde başlar ve 50–60 Gy'de 1.8–2 Gy günlük fraksiyonlarda uygulanır(84, 85).

2.3.3. Gliomada Kemoterapi

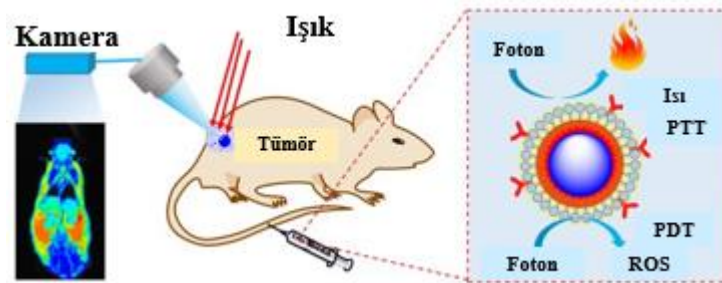
Gliomalı çoğu hasta, hastalık seyriinin bir noktasında alkilleyici ajanlarla kemoterapi alır. KBB'yi geçebilen bir oral DNA alkilleyici ajan olan temozolomid (TMZ), glioma tedavisinde en sık kullanılan ilaçtır. Bu ajan, başlıca doz sınırlayıcı toksisitesi olarak miyelosupresan, özellikle trombositopeni gösterirken kullanımında uygun bir güvenlik profiline de sahiptir. TMZ alan hastalarda karaciğer fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesi gerekir. TMZ'in aksine, lomustin, karmustin, nimustin veya fotemustin gibi nitrozoüre sınıfından alkilleyici ajanlar erken (2-3 hafta) yerine gecikmiş (4-6 hafta) ve daha sıklıkla kümülatif lökopeni ve

trombositopeniye neden olur. Özellikle, fotemustin tedaviye ara verilmesini, dozun azaltılmasını ve hatta kesilmesini ve alternatif tedavilerin değerlendirilmesini gerektirebilir. Pulmoner fibrozis esas olarak karmustin ile gözlenmiştir ve lomustin ile nadirdir (86). Lomustin, Prokarbazin-Lomustin-Vinkristin (PCV) olarak adlandırılan bir rejimde sıklıkla prokarbazin ve vinkristin ile birleştirilir. Ameliyat sonrası boşluğa implante edilen karmustin, yeni teşhis edilen derece III veya IV glioma veya tekrarlayan GBM'lı hastalarda yaşam süresi sağlamıştır (87, 88).

Bir anti-VEGF antikoru olan Bevacizumab, tekrarlayan GBM tedavisi için onaylanmıştır, ancak kullanımında herhangi bir sağkalım yararı gözlenmemiştir (89-91).

2.3.4. Gliomada Fotodinamik ve Fototermal Tedavi

PDT, neoplastik hücrelere uygulanan seçici olarak bir fotoduyarlaştırıcı molekülün foto-aktivasyonunu içerir. Foto-ışınlamada enerji duyarlaştırıcıya transfer edilerek moleküler oksijenin bir singlet veya triplet duruma uyarılması sağlanır. Singlet durumda, enerji ısıya dönüştürülür veya ışık olarak yayılır. Üçlü durumda, enerji, hücre ölümünü indüklemek için gerekli olan reaktif oksijen türlerini (ROS) üretir. ROS, proteinler, doymamış yağ asitleri ve kolesteroler dahil olmak üzere doymamış çift bağlar içeren makromoleküllerle hızla reaksiyona girer. Bu reaksiyonlar mitokondri, lizozomlar ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi organellerin zarlarına zarar verir. Sonuç olarak nekroz, apoptoz, lokal iskemi ve ardından immünolojik reaksiyonlar tetiklenir (92, 93).



Şekil 2.4. PDT ve PTT çalışma prensibi (94).

Tümör hücrelerine hedeflendirilen fotoduyarlaştırıcı ajanlar ışık ile indüklendiğinde sitotoksosite yoluyla PDT özelliği göstermektedir. Bu nedenle PDT, beyin tümörlerinin tedavisinde uygulanabilir bir tedavi seçeneği olarak görülmektedir (95).

PTT, tümörü lokal veya interstisyel olarak (bir optik fiber aracılığıyla) ışınlamak için harici bir NIR/lazer ışığı ve tümör bölgesinde birikebilen bir fotoduyarlaştırıcının kullanılmasını gerektiren invazif olmayan bir tedavidir. Lazer ışığı/NIR ışığı uygulaması sonrasında, fotoduyarlaştırıcı ışık enerjisini toplar, ısıya dönüştürür ve serbest bırakır, kısmi veya tam tümör ablasyonuna yol açan lokalize hipertermiyi indükler (96, 97).

PTT/PDT, glioma heterojenite kısıtlamalarını, geleneksel ilaç direnç mekanizmalarını ve periferik sağlıklı dokular üzerindeki yan etkileri ortadan kaldırarak tümörün yok edilmesine izin verdiği için, glioma tedavisi için umut verici yeni stratejiler olarak değerlendirilmektedir (98).

2.4. İlaç Hedeflemede İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Lipozomların Yeri

2.4.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Avantajları

Birçok parametreyi kontrol etmek için geliştirilen stratejilerden olan ilaç taşıyıcı sistemleri kullanmanın temel amacı, biyolojik olarak aktif bir bileşiği kontrollü bir şekilde (süre ve salım hızı) vermek ve aynı zamanda vücuttaki ilaç seviyesini terapötik pencere içinde tutmaktır. Ayrıca, ilaç belirli bir organ veya dokuya yönlendirilebilir (hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler) (99, 100).

İlaç taşıyıcı sistemler arasında katı lipit nanopartiküller (nanoküreler, nanokapsüller), nanoemülsiyonlar, nanosüspanسیونlar, nanojeller, nanokristaller, karbon nanotüpler, lipozomlar, niozomlar, miseller, dendrimerler, siklodekstrinler, koloidal altın, sfingozomlar, mikrobaloncuklar, mikroküreler, süpermagnetik oksit ve fulleren sayılabilmektedir (101, 102). Tablo 2.3.'de önemli ilaç taşıyıcı sistemlerin özellikleri ve avantajları verilmiştir.

Tablo 2.3. İlaç taşıyıcı sistemler, özellikleri ve avantajları.

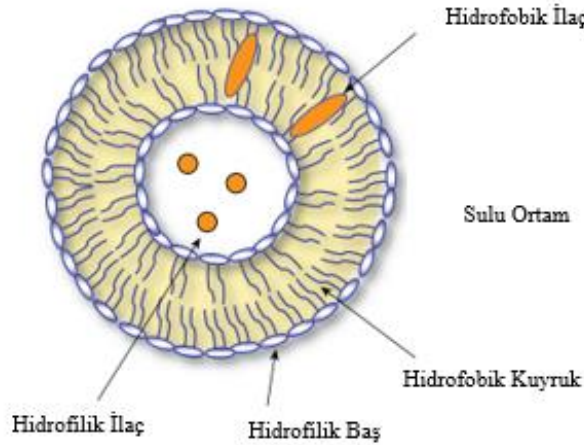
İLAC TAŞIYICI SİSTEM	ÖZELLİKLERİ	AVANTAJLARI
Katı lipid nanopartiküller (Nanoküreler ve nanokapsüller)	<ul style="list-style-type: none"> -10-1000 nm arasında değişen partikül boyutuna sahiptirler. -İçeriği katı lipitler, yüzey aktif maddeler ve sudur. -Su içinde yağ emülsiyonlarında, yağ yerine katı lipit kullanımıyla hazırlanırlar. -Vücut sıcaklığında katı olan bir matristen oluşmaktadır. -Hazırlanma yöntemine göre “nanoküreler” ve “nanokapsüller” olarak ikiye ayrılırlar. -Nanoküreler, etkin maddenin polimerik matris yapı içinde çözündüğü, disperse olduğu ya da kısmen adsorbe edildiği sistemlerdir. -Nanokapsüller, etkin maddenin polimerik bir membran tarafından çevrelenmiş sulu veya yağlı bir çekirdek içinde bulunduğu veziküler sistemlerdir (101, 103). 	<ul style="list-style-type: none"> -Az çözünen etkin maddelerin biyoyararlanımını artırırlar. -Üretimlerinde organik çözücü kullanılmaz. -Lipofilik ve hidrofilik etkin maddelerin yapısına katılırlar. -Enkapsüle ettikleri etkin maddeleri fiziksel ve kimyasal degradasyondan korumaktadırlar. -Etkin madde salımı kontrol edilebilir ve hedeflendirilebilirler. -Yüzey özellikleri çeşitli ajanlarla kaplanarak RES makrofajları tarafından tanınması engellenir. -Diğer kolloidal taşıyıcı sistemlere kıyasla biyolojik sıvılarda daha yüksek stabilite gösterirler (101, 103).
Nanoemülsiyonlar	<ul style="list-style-type: none"> -Bir emülsifiye edici ajan, yağ ve sulu bir faz kullanılarak sentezlenen kolloidal partikül sistemlerdir. Su içinde yağ veya yağ içinde su emülsiyonlarıdır. -Sentezlenmeleri için yüzey aktif madde kullanılarak tek bir faz oluşturmak üzere iki karışmaz sıvı karıştırılır (104). -Seyreltme, pH ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmezler (101). 	<ul style="list-style-type: none"> -Düşük yüzey gerilimleri nedeniyle temas ettikleri yüzeyi ıslatma ve yüzeye yayılma özellikleri mevcuttur. -Suda çözünürlüğü az olan etkin maddelerin suda çözünebilir duruma gelmesini sağlarlar. -Termodinamik olarak stabil değildirlir (101).
Nanosüspansiyonlar	<ul style="list-style-type: none"> -Yüzey aktif maddelerce stabilize edilmiş nano boyutlu ilaç partiküllerinin (<1000 nm, genellikle 200-600 nm) submikron kolloidal dağılımlarıdır (105). -Dispersiyon içinde süspansiyon halinde herhangi bir matris malzemesi kullanılmaksızın suda az çözünen etkin maddelerin çözünürlüklerini artırmak ve biyoyararlanımlarını artırmak için uygun hazırlama yöntemleri kullanılarak elde edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir (106). 	<ul style="list-style-type: none"> -İlaçların çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını artırır. -Daha yüksek ilaç kapsülasyonu elde edilebilir. -Doz azaltma mümkündür. -İlaçların fiziksel ve kimyasal stabilitesini artırır. -Pasif bir ilaç hedeflemesi sağlar (107).
Nanojeller	<ul style="list-style-type: none"> -Hidrofilik polimer özellikteki hidrojel yapıda spesifik polianyonlarla katyonik polimerlerin bağlanması ya da polimerlerin çapraz bağlanması ile oluşan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. -Ağsı yapıdadırlar ve iyonik güç, pH, sıcaklık gibi etmenlerden etkilenen şişme özellikleri mevcuttur. -İlaç enkapsülasyon kapasiteleri yüksek ve stabiliteleri çok iyidir (101). 	<ul style="list-style-type: none"> -Daha az erken sızıntı gösterir. -Nanoboyutları yüksek geçirgenlik sağlamaktadır ve KBB geçiş yeteneği mevcuttur. -Hidrofilik ve hidrofobik ilaçlara uygulanabilir. -Yüksek biyoyoumluluk gösterir ve nispeten biyolojik olarak parçalanabilir.

		<ul style="list-style-type: none"> -Parenteral ve mukozal taşınma kolaydır. -Uyaranlara duyarlı hedefli taşınma mümkündür (108).
Nanokristaller	<ul style="list-style-type: none"> -Partikül boyutları nano düzeye indirgenmiş, kristal yapıdaki ilaç etkin maddeleridir. -Diğer ilaç taşıyıcı sistemlere kıyasla en belirgin özelliği nanokristallerin tamamına yakınının etkin maddeden oluşmasıdır (101). 	<ul style="list-style-type: none"> -Oral biyoyararlanımı artırıp hızlı etki gösterirler. -Doz azaltma mümkündür. -Üretimlerinde organik çözücü kullanılmaz. -Suda çözünme problemi olan ilaçlar hazırlanabilir (101).
Karbon nanotüpler	<ul style="list-style-type: none"> -Karbon atomlarının biraraya gelmesiyle oluşan silindirik, boru şeklinde, 2-100 nm çapında, 5-550 nm boyunda yapılardır. -Kimyasal ve mekanik olarak kararlı yapılardır. -Sitotoksik değildirler. -Kimyasal modifikasyona uygun oldukları için aşı taşıyıcı sistemlerde olduğu gibi ilaç taşıyıcı sistem olarak da tercih edilebilirler (101, 109). 	<ul style="list-style-type: none"> -İlaç yüklenmesi ve salımı kolaydır, dış duvarları hedeflendirme için kimyasal olarak modifiye edilebilir. -Geniş ve spesifik yüzey alanına sahiptirler ve iyi adsorbsiyon özellikleri mevcuttur (101).
Lipozomlar	<p>Bir veya birden fazla fosfolipit çift tabakadan oluşan orta iç kısmında ve tabakalar arasında sulu faz bulunduran boyutları 400 nm'den 2.5 µm'ye kadar değişebilen ilaç moleküllerinin hapsedildiği küresel veziküllerdir (110).</p> <ul style="list-style-type: none"> -Vezikül boyutu, lipozomların dolaşım süresinin belirlenmesinde önemli bir rol oynar ve çift tabakaların hem boyutu hem de sayısı, enkapsülasyonu etkiler. -İki tabakanın boyutuna ve sayısına bağlı olarak, lipozomlar iki geniş gruba ayrılır: <ol style="list-style-type: none"> 1. Çok katmanlı veziküller (MLV) 2. Tek katmanlı veziküller (ULV) Tek katmanlı veziküller ayrıca büyük tek katmanlı veziküller ve küçük katmanlı veziküller olarak sınıflandırılır (111). 	<ul style="list-style-type: none"> -Artan etkinlik ve terapötik indeks sağlarlar. -Enkapsülasyon ile stabilize armaktadır. -Toksik değildir, esnek, biyolojik olarak uyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir. -Enkapsülasyon yoluyla etkin maddenin toksisitesi azalır. -Hem hidrofobik hem de hidrofilik bileşikleri barındırabilir (112). -Lipozomlar dolaşıma girdiğinde plazma proteinleriyle etkileşir ve RES tarafından uzaklaştırılırlar. RES organlarına hedeflendirme etkin madde lokalize olacağından avantajlıdır, ancak diğer sistemlere ulaşamaması dezavantajıdır (101).
Niozomlar	<p>Alkil veya dialkil poligliserol eter sınıfının non-iyonik yüzey aktif maddesinin ve kolesterolün, sulu ortamda hidrasyon ile karıştırılmasıyla elde edilen mikroskobik katmanlı yapılardır (113).</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Yapısı gereği hidrofilik, lipofilik ve amfifilik ilaç grupları için kullanılabilirler. -Yapısal özelliklerinde esneklik gösterir ve istenilen duruma göre tasarlanabilir. -İlacın klirensini azaltır. -İlacı yavaşça salmak için bir depo görevi görür ve kontrollü salım sunar. -İlaçların oral biyoyararlanımını artırabilirler.

		<ul style="list-style-type: none"> -Ozmotik olarak aktif ve kararlıdır. -Enkapsüle edilen ilacın stabilitesini arttırırlar. -Yüzey aktif maddeler biyolojik olarak parçalanabilir, biyolojik olarak uyumludur ve immünojenik değildir (114).
Miseller	<ul style="list-style-type: none"> -Küresel bir çekirdek ve dış kabuktan oluşan makromoleküler yapılardır. -Amfifilik, tek polimer zincirinden oluşurlar ve bu zincirlere “unimer” adı verilir. -Amfifilik diblok (hidrofilik polimer-hidrofobik polimer) ve triblok (hidrofilik polimer-hidrofobik polimer-hidrofilik polimer) ko-polimerler ve graft polimerler kullanılır. Diblok polimerlerden oluşan misellerde çekirdek hidrofobik, kabuk hidrofilik olmaktadır (115). 	<ul style="list-style-type: none"> -Küçük partikül boyutu (10-200 nm), daha uzun kan dolaşım süresine yardımcı olur. -Yüksek yapısal kararlılık gösterirler. -Dış kısma hidrofilik, çekirdeğe hidrofobik etkin maddeler yüklenebilir. -Düşük toksisiteye neden olurlar (115, 116).
Dendrimerler	<ul style="list-style-type: none"> -Birbirlerini tekrarlayan monomerlerin basamaklar halinde merkezden yüzeye büyütülmesiyle sentezlenen hücresel makromoleküllerdir. -Çekirdek, dallar ve reaktif fonksiyonlu gruplar olmak üzere kısımları mevcuttur (115). 	<ul style="list-style-type: none"> -Etkin madde yükleme kapasitesi yüksektir. -Kolay sentezlenebilirler. -Stabilirler. -Kısımları değiştirilerek çözünürlük, termal stabilite, değişik özelliklerdeki maddelerin konjugasyonu gibi özellikler elde edilebilir, boyutları kontrol edilebilir. -Aktif hedeflendirmede etkin makromoleküllerdir (115).
Mikroküreler	<ul style="list-style-type: none"> -Mikroküreler, biyolojik olarak parçalanabilen ve ideal olarak 1-1000 um arasında partikül boyutuna sahip proteinler veya sentetik polimerlerden oluşur. Mikrokürelere mikropartiküller de denir (117). 	<ul style="list-style-type: none"> -Uzun süreli ve sürekli terapötik etki sağlar. -Dozlama sıklığını azaltır ve bu nedenle hasta uyumunu iyileştirir. -İlacın kontrollü, sürekli ve hedefe yönelik verilmesini sağlar. -İlaçların kısa yarı ömürleri için mikroküre durumunda daha iyi terapötik etki elde edilebilir. -Küçük ve küresel boyutları nedeniyle vücuda kolayca enjekte edilebilir. -Biyolojik yarılanma ömrünü arttırır ve ayrıca biyoyararlanımı iyileştirir. -Gastrointestinal tahriş ihtimalini azaltır (118).

2.4.2. Lipozomlar ve Glioma Teşhis ve Tedavisindeki Yeri

Lipozomlar, sulu bir çekirdeği çevreleyen fosfolipid ve kolesterolden oluşan çift katmanlı veziküler yapılardır. Şekil 2.5.'te şematik yapısı gösterilen lipozomlar, tek katmanlı veya çok katmanlı olabilirler ve benzersiz özelliklerinden dolayı hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları hapsedebilirler (119).



Şekil 2.5. Lipozomun şematik yapısı (120).

Biyolojik olarak bozunabilir olmaları, biyouyumlu doğası gereği immünojenik olmayan hale getirilebilmeleri hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları enkapsüle ederek bunların kontrollü bir şekilde salımını sağlamaları lipozomları taşıyıcı sistemler arasında çekici kılmaktadır (121, 122). Lipozomlar, ilaç taşınması, gen tedavisi, aşı taşınması ve moleküler görüntülemeye potansiyel uygulamalara sahiptir (123).

Nanoboyutlu lipozomlar, genellikle hidrofilik çekirdekte çeşitli suda çözünür ilacı ve/veya hidrofobik zardaki çözünmeyen ilacı hapsedebilen fosfolipidlerden ve bunların arasında veziküler stabiliteyi artıran kolesterolden oluşur. Böylece daha az dozda ilaç kullanımı ile artmış etkinlik, yan etki görülme olasılığı minimize edilmiş olur (124).

Geleneksel lipozomların en büyük dezavantajları, kararsızlık, yetersiz ilaç yüklenmesi ve kısa dolaşım süresidir. Lipozomlar istenen dokulara aktif ve pasif hedefleme stratejileri ile hedeflendirilebilmektedir. Lipozomların bağışıklık sisteminin makrofajları tarafından hızlı eliminasyonunu önlemek için PEG gibi

polimerler ile kaplama günümüzde farmasötik uygulamalardaki gelişmiş teknolojilerden biri haline gelmiştir. Lipozom yüzeyine kaplanmış uzun PEG zinciri, plazma proteininin lipozom yüzeyine adsorpsiyonunu önlemekte ve bunun sonucunda plazmada lipozom agregasyonunu etkili bir şekilde azaltmaktadır. PEG ile kaplama lipozomların bağışıklık sistemi tarafından hızla tanınmasını ve ortadan kaldırılmasını engellemekte ve böylece lipozomların dolaşımında kalış sürelerini uzatabilmektedir (124).

Tümör dokusunun lipozomlarla pasif olarak hedeflenmesinin temeli, normal kılcal damarlarda bulunan "daha sıkı" yapılara kıyasla, tümör mikrovaskülatürünün endotel hücreleri arasındaki daha büyük gözenek boyutlarıdır. Bu nedenle, normal dokularda taşıyıcıların kılcal damarlardan çıkması engellenirken tümör dokularında ekstrasvazyon yapmalarına izin verecek boyutta lipozomlar hazırlanması ile pasif hedefleme sağlanabilmektedir (125-127). Artmış geçirgenliğe ek olarak, tümör bölgelerinde yaygın olarak artmış geçirgenlik ve tutulum etkisi (EPR) olarak bilinen bir etki vardır. Bu durum, sıvıların lenfatik dolaşıma çok daha az dönüşü ve etkilenen dokularda artmış kılcal geçirgenlik ile karakterizedir. Bu şekilde lipozomlarda (400 nm'ye kadar) hapsedilen ilaçlar, tümör bölgelerinde verimli bir şekilde birikebilir. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi bazı düzenleyici anjiyogenez faktörlerinin aşırı ekspresyonu da gözlenmektedir (128).

Aktif olarak hedeflenen lipozomal sistemler, küçük moleküllü ligandlar, peptitler ve monoklonal antikorlar gibi ligandların lipozomal yüzey üzerine konjuge edilmesiyle hazırlanır. Örneğin, folat ve transferrin (Tf) reseptörleri (TfR) gibi belirli reseptörler birçok kanser hücresinde oldukça fazla eksprese edilir ve lipozomları tümör hücresine hedeflemek için bu ligandlardan faydalanılabilmektedir. Tümör mikroçevresinde biriken lipozomlar, daha sonra spesifik hücre yüzeyi reseptörleri ile etkileşime girerek hücrelere endositoz yoluyla girebilir. Lipozomları kanser hücrelerine verimli bir şekilde hedeflemek için hedefleme ligandlarını aktif bölgelerini kapatmadan bağlamak gerekmektedir (129).

Lipozomların yüzeyine fonksiyonel gruplar eklenerek bu sistemler kanda uzun kalış süresi, tümörün spesifik olarak hedeflenmesi, yüksek sıcaklık, düşük pH değerleri, ısı gibi harici uyarılara yanıt vermek, ilaç ya da teşhis/görüntüleme için

kullanılan probun istenilen hedefe taşınmasını desteklemek ve lipozomların farmakokinetik profili ve birikimlerini gösterecek şekilde formüle edilebilirler (129).

Son zamanlarda beyne hedeflenerek beyin tümörü veya nörolojik hastalıkların teşhis veya tedavisi için lipozomlar formüle edilmiştir. Lipozomlar KBB'yi reseptör aracılı transsitoz (RMT) veya adsorptif aracılı transsitoz (AMT) yoluyla geçerek çeşitli beyin tümörlerini tedavi etmek için potansiyel olarak geliştirilmişlerdir. KBB ve diğer bariyerleri geçtiklerinde, lipozomlar tercihen tümör bölgesinde birikir; böylece, spesifik olmayan hedefleme ve terapötiklerin buna bağlı yan etkileri büyük ölçüde azaltılabilir ve bu da ilaç güvenlik profilini geliştirir. Lipozomların glioblastoma teşhis ve tedavisindeki potansiyelleri transferrin, laktoferrin ve peptitler gibi spesifik ligandlarla işlevsel hale getirilerek arttırılmaktadır. Birkaç klinik öncesi çalışma, endojen ligandların veya monoklonal antikorların lipozom yüzeyine modifikasyonu ile elde edilen sistemlerin pasif olarak hedeflenen nanotaşıyıcılara kıyasla glioblastomaya tedavi etkinliğini arttırdığını göstermiştir (130).

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerin diyagnostik amaçla kullanımları da uzun yıllardır çalışılmaktadır. Nükleer tıp, tanı amaçlı SPECT ve PET görüntüleme teknikleri için spesifik radyofarmasötikler kullanır. SPECT görüntüleme için araştırılan yeni radyofarmasötikler olarak lipozomlar, 100 ile 500 keV (^{99m}Tc , ^{111}In , ^{67}Ga) arasında enerjiye sahip gama yayan radyonüklitlerle işaretlenirken, PET'te kullanılanlar, maksimum enerjileri birkaç yüz keV ve MeV arasında değişen pozitron yayan radyonüklidlerle ile işaretlenir (^{123}I , ^{18}F , ^{68}Ga , ^{64}Cu , ^{52}Mn , ^{89}Zr) (131). Lipozomlar, lipidleri hidrate etmek için kullanılan sulu ortama tercih edilen radyonüklidin eklenmesiyle işaretlenebilir (132). Bu yaklaşım ile lipozomlar özellikle ^{99m}Tc ile işaretlenmiştir (133, 134). Ancak, bu yöntemle radyonüklidin sadece küçük bir kısmı iç sulu faza dahil edilebilir ve sonuç olarak işaretleme verimliliği düşüktür. Bu nedenle, önceden hazırlanan lipozomları yüksek verimle radyoaktif olarak işaretlemek için yeni stratejiler geliştirilmiştir. Lipozomların fizikokimyasal özellikleri (diğerlerinin yanı sıra boyut, lipit bileşimi, yüzey yükü ve çift katmanlı akışkanlık), teşhis ve tedavide kullanılacak radyofarmasötiklerin hazırlanması için farklı radyonüklit işaretleme yöntemlerinin geliştirilmesine olanak sağlamıştır. Genellikle, lipozomlar, radyonüklidin ya doğrudan yüzeye ya da bir şelatör yoluyla lipid çift tabakasına bağlanmasıyla işaretlenebilir ya da radyonüklitin lipozomun iç

sulu fazında hapsedilebilir (132, 135). Bu amaçla glioblastoma tanı ve tedavisinde de yapılmış çalışmalar mevcuttur. Örneğin, yapılan bir çalışmada GBM teşhis ve görüntülemesi için Gd içeren lipozomal formülasyonları geliştirilmiş ve RT2 (mürin glioblastoma hücre hattı) hücrelerine karşı *in vitro* sitotoksitesi değerlendirilmiştir (136). Yine bir klinik çalışmada, GBM ve metastatik beyin tümörlü hastalarda görüntüleme için ^{99m}Tc-DTPA işaretli doksorubisin hapsedilmiş PEGlenmiş lipozomlar formüle edilmiştir (137).

NIR görüntüleme, biyolojik örneklerin *in vivo* görüntülemesi ve takibi için yaygın olarak kullanılmaktadır. İyi doku penetrasyonu, minimum otofloresans ve biyolojik örneklerle ve dokuya göz ardı edilebilir foto-hasar nedeniyle, NIR boyalar, invaziv olmayan görüntüleme için umut verici kontrast ajanlar olarak kabul edilmiştir. Bu boyalar ilaç taşıyıcı sistemlere modifiye veya konjuge edilerek terapötik hale getirilebilmektedirler (138). Yapılan bir çalışmada lipozomal olarak formüle edilmiş bir fosfolipid-konjuge ICG nanoparçacığı geliştirilmiş ve ortotopik sıçan GBM modelinde NIR ışını uygulamasından sonra tümör büyümesini anlamlı derecede baskıladığı gözlenmiştir (139). Başka bir çalışmada, IR780 içeren lipozomal bir formülasyon hazırlanmış ve glioma tedavisinde etkinliği önemli ölçüde arttığı gözlenmiştir (140).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Absolut etanol	Merck (Almanya)
Aseton	Merck (Almanya)
4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, ABD)
Dimetilformamid (DMF)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Merck (Almanya)
3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolyum bromür (MTT)	Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Almanya)
Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, ABD)
1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-(lisamin rodamin B sulfonil) (amonyum tuzu) (Rodamin)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, ABD)
1,2-Distearoil-sn-glisero-3-fosforiletanolamin (DSPE)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
1,2-distearil-sn-gliseero-3-fosfoetanolamin-N[methoksi (polietilenglikol)-2000] (amonyum tuzu) (PEG2000-DSPE)	Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama, ABD)
Dulbecco's MEM (DMEM) (Yüksek Glukoz) Besiyeri	Biochrom AG (İngiltere)
Fetal Bovine Serum (FBS)	Biochrom AG (İngiltere)
Fosfotidilkolin (Fosfolipon 90G) (PL 90G)	Natterman Phospholipids GmbH (Almanya)
Hidroklorik asit (%36-38)	J.T. Baker (Hollanda)
IR780 iyodür (2-[2-[2-Kloro-3-[(1,3-dihidro-3,3-dimetil-1-propil-2H-indol-2-	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)

iliden)etiliden]-1-sikloheksen-il]etenil] - 3,3-dimetil-1-propilindolyum iyodür)	
S-2-(4-İzotiyosiyanatobenzil)-1,4,7,10- tetraazasiklododekan tetraasetik asit (p- SCN-Bn-DOTA)	Macrocyclics, Inc. (Plano, Teksas, ABD)
Kloroform	Merck (Almanya)
Kolesterol (Chol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
L929 (ATCC® CCL-1™)	American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Rockville, MD, ABD)
Metanol	Merck (Almanya)
N-asetil-glukozamin (NAG)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Penisilin-Streptomisin	Biological Industries (İsrail)
Potasyum dihidrojen fosfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
RG2 (ATCC® CRL-2433™)	American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Rockville, MD, ABD)
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Sodyum hidroksit	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Stearil amin (SA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Trietilamin (min %99)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)
Tripsin-EDTA %0,25 (w/v)	Biological Industries (İsrail)
U87 (ATCC® HTB-14™)	American Type Culture Collection (ATCC, LGC Promochem, Rockville, MD, ABD)
⁶⁸ GaCl ₃	⁶⁸ Ge- ⁶⁸ Ga Eckert Ziegler Modular Lab Eazy Jeneratörü

3.2. Kullanılan Aletler ve Gereçler

CO ₂ inkübatör (Heracell 150i)	Thermoscientific (ABD)
Çalkalayıcılı su banyosu	Labnet International (ABD)
Dikey akımlı hava kabini	HeraSafe Thermo Electron Corp. (Almanya)
Diyaliz selüloz membran	Sigma-Aldrich (Almanya)
Ekstrüzyon ünitesi	Lipex, Biomembranes (Kanada)
Epifloresan mikroskop	Olympus BX51 (Japonya)
⁶⁷ Ge/ ⁶⁸ Ga Modular Lab Eazy Jeneratör	Eckert Ziegler (Almanya)
Hücre kültürü inkübatörü	Heraeus Instruments Cytoperm 2 (Almanya)
In vivo görüntüleme sistemi (IVIS)	Newton 7.0, Vilber (Fransa)
Liyofilizatör (Heto Power Dry PL 3000)	Thermo Fisher Scientific (ABD)
Manyetik karıştırıcı	Heidolph Reax Top (Almanya)
Mikropipet	Eppendorf Research Plus, Almanya
Mikroplaka spektrofotometre	Spectra Max Molecular Devices (ABD)
pH-metre	Inolab pH-metre (Türkiye)
Polarize ışık mikroskobu	Leica DM EP (Houston, TX, ABD)
Polikarbonat membran filtre	Whatman (ABD)
Rotavapor	BUCHI (İsviçre)
Terazi	Mettler Toledo AB104-S (İsviçre)
UV Spektrofotometre	Shimadzu UV-1280 (Japonya)
Vorteks	Heidolph Reax Top (Almanya)
Zeta sizer	Malvern Instruments (İngiltere)

3.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötr ve Pozitif Yüklü Lipozomların Yapısına Giren Hammaddeler Üzerinde Yapılan Kontroller

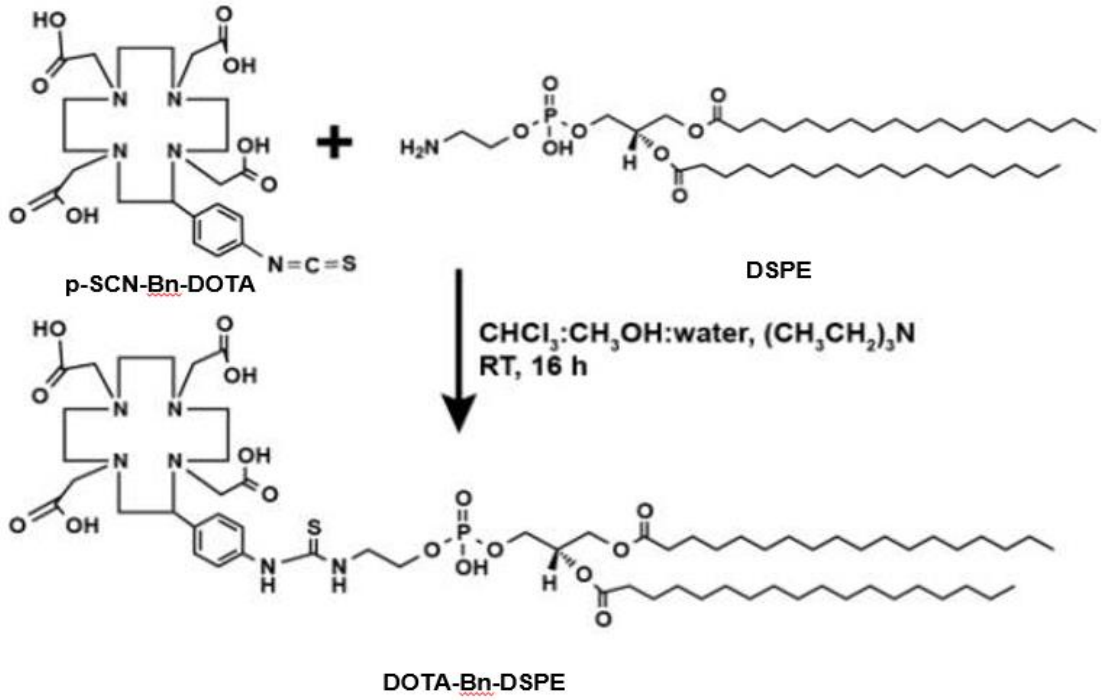
Lipozom formülasyonlarının yapısına giren temel bileşenlerden olan PL 90G ve DPPC fosfolipidleri, kolesterol, yük verici madde olan stearyl amin Avanti Polar Lipids, Sigma Aldrich ve Natterman Phospholipids firmalarından sertifikalı olarak temin edildiği ve daha önceki çalışma ve tezlerde kullanıldığı için üzerinde tekrar kontroller yapılmamıştır (141-149).

3.3.1. DOTA-Bn-DSPE Sentezi ve Üzerinde Yapılan Kontroller

DOTA-Bn-DSPE maddesi ⁶⁸Ga ile radyoaktif olarak işaretlemek için sentezlenecek olan şelatör bir maddedir. Bunun için, 12 µmol p-SCN-Bn-DOTA, 1 mL kloroform-metanol-su (65:35:8 v/v) karışımı içerisinde çözülmüş ve eş zamanlı 22 µmol DSPE, 1 mL kloroform-metanol-su karışımı içerisinde çözüldürülmüştür. İki çözelti karıştırıldıktan sonra, 48 µmol trietilamin ilave edilmiştir. Karışım 40°C'de 2 saat ve ardından oda sıcaklığında 16 saat karıştırılmıştır. Ürün oluşumu İTK ve kütle spektrumu ile doğrulanmıştır (150).

Reaksiyonun ilerlemesi silika jel kaplı İTK plakları kullanılarak izlenmiştir. 0,25 mm kalınlıkta Silikajel 60 F254 ile kaplanmış 5x10 cm plaklar 110°C etüvde 60 dk. aktive edilmiştir. p-SCN-Bn-DOTA, DSPE ve DOTA-Bn-DSPE'nin 20 µg.mL⁻¹'lik çözeltileri, bir kılcal yardımıyla bu plaklara tatbik edilmiştir. Kloroform:metanol:su (65:35:8 v/v) çözücü sisteminde plak sürüklendikten sonra kurutulup iyot buharı ile doyurulmuş tanka konmuş ve lekeler UV lambası altında 254 nm'de incelenmiştir.

Kütle spektrum profili alınırken hareketli faz olarak; %0.1 Formik Asit: %0.1 Asetonitril (1:1, v/v) kolonsuz enjeksiyon, akış hızı: 0,3 mL/dk. olarak uygulanmıştır.



Şekil 3.1. DOTA-Bn-DSPE sentez reaksiyonu (150).

3.3.2. NAG

Çalışmalarımızda hedefleyici madde olarak kullandığımız NAG için analiz sertifikası firmadan sağlanmıştır.

3.3.3. IR780 İyodür

IR780 iyodür formülasyonlara etkin madde olarak PDT/PTT ve NIR görüntüleme amacıyla fotoduyarlaştırıcı olarak enkapsüle edilmiştir.

IR780 için UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

Lipozomlara hapsedilen IR780 miktarını tayin etmek ve *in vitro* salım profillerini incelenmek amacıyla IR780'in farklı konsantrasyonlarda çözeltilerinin maksimum pik verdiği dalga boylarında absorbansları ölçülerek çizilmiştir.

IR780'in Etanoldeki UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusu

IR780'in etanol içindeki çözeltisinin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunu saptamak için 200-900 nm aralığında spektrumu çekilmiştir. Ardından 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,25 ve 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda etanol içerisinde 6 seri çözeltisi hazırlanmış ve bunların absorbansı spektrofotometre ile 783,5 nm dalga boyunda ölçülerek standart doğrusu çizilmiş, doğru denklemi, "R" (korelasyon) ve "R²" (determinasyon) katsayıları hesaplanmıştır.

IR780'in 20 mM Fosfat Tamponu (pH:7.4) / %2 (v/v) DMSO'daki UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusu

IR780 iyodür'ün 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4)/%2 (v/v) DMSO'daki çözeltisinin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunu saptamak için 200-900 nm aralığında spektrumu çekilmiştir. Sonrasında 1, 2, 3, 4, 5, 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonlarda 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4)/%2 (v/v) DMSO içerisinde 6 seri çözeltisi hazırlanmış ve absorbansları spektrofotometre ile 775 nm dalga boyunda ölçülerek standart doğrusu çizilmiş, doğru denklemi, "R" ve "R²" katsayıları hesaplanmıştır.

3.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780

Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması

IR780 hapsedilmiş nötral, pozitif yüklü hedeflendirilmemiş ve hedeflendirilmiş lipozomal formülasyonları hazırlamadan önce ön formülasyon çalışmaları yapılarak optimum lipozomal formülasyonlar saptanmıştır.

3.4.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmalarında farklı oran ve konsantrasyonda lipit bileşimi ve IR780 miktarı kullanılarak farklı lipozom formülasyonları hazırlanmış ve bu şekilde optimum lipozomal formülasyonlar elde edilmeye çalışılmıştır.

Ayrıca tez önerisinde kullanılması planlanan jel yapısındaki DPPC ile hazırlanan IR780 içeren lipozomal formülasyonlar ile istenilen optimum partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimi elde edilemediği için sıvı kristal

yapısındaki PL 90G fosfolipidi kullanılarak lipozomal formülasyonlar hazırlanmış ve bundan sonraki çalışmalara DPPC yerine PL 90G fosfolipidi ile devam edilmiştir.

3.4.2. Lipozomal Formülasyonların Hazırlanması

Ön formülasyon çalışmaları sonrasında optimum partikül boyutu ve enkapsülasyon hacmine sahip lipozomal formülasyonlar Bangham yöntemiyle (110) 40 mM konsantrasyonda Tablo 3.1.'de verilen bileşim yüzdeleri ile hazırlanmıştır.

Tablo 3.1. Lipozom formülasyonlarının içerikleri, molar bileşim yüzdeleri ve kodları.

FORM. KODU	FORMULASYON İÇERİĞİ	BİLEŞİM YÜZDELERİ (%)
F1	PL90G:Chol:PEG2000-DSPE:IR780:DOTA-Bn-DSPE	50:29,2:5:0,5:0,3
F2	PL90G:Chol:PEG2000-DSPE:NAG:IR780:DOTA-Bn-DSPE	50:29,2:5:10:0,5:0,3
F3	PL90G:Chol:PEG2000-DSPE:SA:IR780:DOTA-Bn-DSPE	50:29,2:5:5:0,5:0,3
F4	PL90G:Chol:PEG2000-DSPE:SA:NAG:IR780:DOTA-Bn-DSPE	50:29,2:5:5:10:0,5:0,3

Lipozomal formülasyonların hazırlanmasının şematik gösterimi Şekil 3.2.'de verilmiştir.

IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren Nötral Teranostik

Lipozomların Hazırlanması

Tablo 3.1.'de belirtilen F1 kodlu lipozom formülasyonu PL 90G, kolesterol, PEG2000-DSPE, IR780 ve DOTA-Bn-DSPE' nin kloroformda çözülüp ardından rotavaporda kloroformun uzaklaştırılıp, oluşan filmin fosfat tamponu (20 mM, pH: 7.4) ile 35°C'de 45 dk. (200 rpm) hidrate edilmesiyle hazırlanmıştır. Partikül boyutunu küçültmek amacıyla elde edilen formülasyon azot gazı altında sırasıyla 0.6, 0.4 ve 0.2 µm por çaplı polikarbonat filtrelerden 2'şer kez geçirilmiştir. Ardından hapsedilmeyen serbest haldeki IR780'i uzaklaştırmak için 3.5 kDa por açıklığına sahip olan membran filtreden oda sıcaklığında 5 L fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.4) 12 saat boyunca diyaliz edilmiştir.

NAG ile Hedeflendirilmiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren Nötral Teranostik Lipozomların Hazırlanması

Tablo 3.1.'de belirtilen F2 kodlu lipozom formülasyonu hazırlanırken PL 90G, kolesterol, PEG2000-DSPE, IR780 ve DOTA-Bn-DSPE kloroformda çözülmüştür. NAG %60/40 (v/v) kloroform/metanol karışımında çözüldükten sonra lipid faza eklenmiştir. Rotavaporda kloroform uzaklaştırılıp, oluşan film fosfat tamponu (20 mM, pH: 7.4) ile 35°C'de 45 dk. (200 rpm) hidrate edilmiştir. Partikül boyutunu küçültmek amacıyla elde edilen formülasyon azot gazı altında sırasıyla 0.6, 0.4 ve 0.2 µm por çaplı polikarbonat filtrelerden 2'şer kez geçirilmiştir. Ardından hapsedilmeyen serbest haldeki IR780'i uzaklaştırmak için 3.5 kDa por açıklığına sahip olan membran filtreden oda sıcaklığında 5 L fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.4) 12 saat boyunca diyaliz edilmiştir.

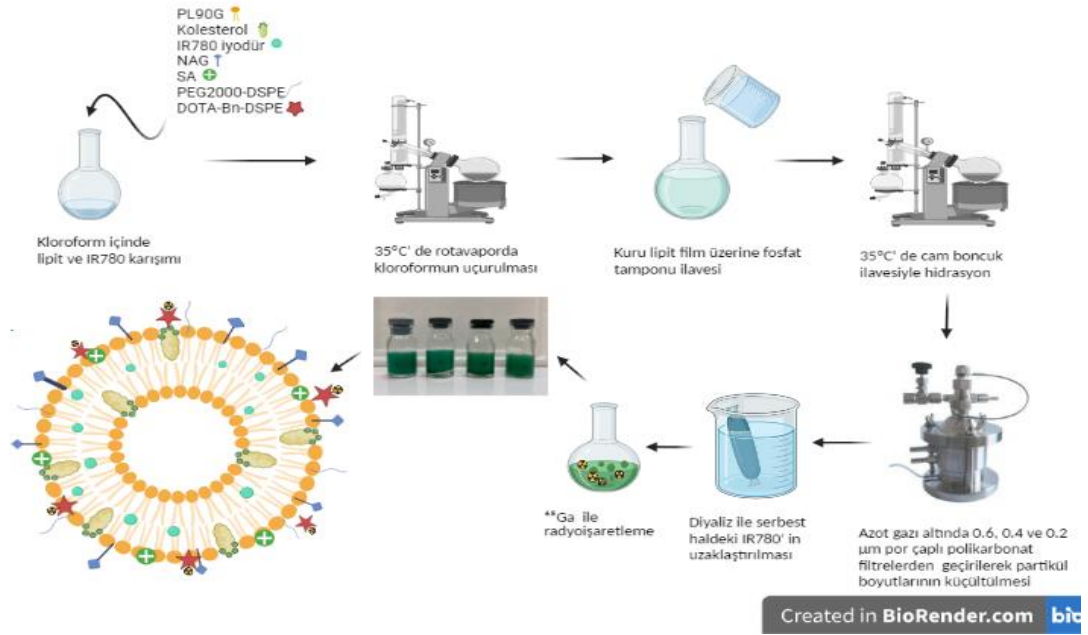
IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren Pozitif Yüklü Teranostik Lipozomların Hazırlanması

Tablo 3.1.'de belirtilen F3 kodlu lipozom formülasyonu PL 90G, kolesterol, PEG2000-DSPE, IR780, DOTA-Bn-DSPE ve yük verici madde SA kloroformda çözümlenip ardından rotavaporda kloroformun uzaklaştırılıp, oluşan filmin fosfat tamponu (20 mM, pH: 7.4) ile 35°C' de 45 dk. (200 rpm) hidrate edilmesiyle hazırlanmıştır. Partikül boyutunu küçültmek amacıyla elde edilen formülasyon azot gazı altında sırasıyla 0.6, 0.4 ve 0.2 µm por çaplı polikarbonat filtrelerden 2'şer kez geçirilmiştir. Ardından hapsedilmeyen serbest haldeki IR780'i uzaklaştırmak için 3.5 kDa por açıklığına sahip olan membran filtreden oda sıcaklığında 5 L fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.4) 12 saat boyunca diyaliz edilmiştir.

NAG ile Hedeflendirilmiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren Pozitif Yüklü Teranostik Lipozomların Hazırlanması

Tablo 3.1.'de belirtilen F4 kodlu lipozom formülasyonu hazırlanırken PL 90G, kolesterol, PEG2000-DSPE, IR780, DOTA-Bn-DSPE ve SA kloroformda çözülmüştür. NAG %60/40 (v/v) kloroform/metanol karışımında çözülmüş ve lipid faza eklenmiştir. Rotavaporda kloroform uzaklaştırılıp, oluşan film fosfat tamponu (20 mM, pH: 7.4) ile 35°C'de 45 dk. (200 rpm) hidrate edilmiştir. Partikül boyutunu

küçültmek amacıyla elde edilen formülasyon azot gazı altında sırasıyla 0.6, 0.4 ve 0.2 µm por çaplı polikarbonat filtrelerden 2'şer kez geçirilmiştir. Ardından hapsedilmeyen serbest haldeki IR780'i uzaklaştırmak için 3.5 kDa por açıklığına sahip olan membran filtre ile oda sıcaklığında 5 L fosfat tamponunda (20 mM, pH: 7.4) 12 saat boyunca diyaliz edilmiştir.



Şekil 3.2. Lipozomal formülasyonların hazırlanması (BioRender ile çizilmiştir).

3.5. NAG ile Hedeflendirilmiş Ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Teranostik Lipozomların Karakterizasyonu

Hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nötral ve pozitif yüklü, IR780 hapsedilmiş multifonksiyonel lipozomların karakterizasyonu görünüş ve tip tayini, ortalama partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği (%EE) ile saptanmıştır.

3.5.1. Görünüş ve Tip Tayini

Hazırlanan formülasyonların makroskopik görünüşü ve rengi incelenmiştir. Ayrıca lipozomal veziküllere ait sarı-mavi çapraz bantlar polarize ışık mikroskobu altında 40x büyütme oranı ile filtrasyon işleminden önce incelenmiştir.

3.5.2. Ortalama Partikül Boyutu ve Dağılımı (PDI) ile Zeta Potansiyel Değerleri

Hazırlanan formülasyonların ortalama partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları (PDI) ile zeta potansiyelleri dinamik ışık saçılımı (Dynamic Light Scattering) yöntemine göre 25°C'de Nano-Zeta Sizer ile ölçülmüştür.

3.5.3. Enkapsülasyon Etkinliği (%EE)

Diyaliz ile serbest IR780 uzaklaştırıldıktan sonra, formülasyonlar etanol içerisinde manyetik karıştırıcı ve vorteks yardımıyla parçalanmıştır. İçte tutulan IR780 miktarı 783,5 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş ve standart doğru denklemi kullanılarak içte tutulan miktarı yüzde olarak hesaplanmıştır. Enkapsülasyon etkinliği yüzdesi aşağıdaki eşitlik ile (Eşitlik 3.1.) hesaplanmıştır.

$$EE\% = \frac{\text{İçte tutulan IR780 iyodür miktarı}}{\text{Hazırlama sırasında ilk ilave edilen IR780 iyodür miktarı}} \times 100$$

3.6. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların *In Vitro* Salım Profillerinin İncelenmesi

IR780'in hazırlanan lipozomlardan *in vitro* ortamda salımlarını incelemek için diyaliz metodundan faydalanılmıştır. 1'er mL lipozom formülasyonları alınarak diyaliz membrana (3.5 kDa MW cutt-off) yerleştirilmiş ve 37 °C'de 10'ar mL fosfat tamponu (20 mM, pH 7.4):%2 DMSO'ya karşı diyaliz işlemi uygulanmıştır. Diyaliz işlemi dakikada 150 gidiş-geliş hareketi yapan su-banyolu çalkalayıcı içinde uygulanmıştır. Belli zaman aralıklarında (15 dk, 30 dk, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 78 sa) salım ortamından 1'er mL örnek alınmış ve alınan bu örneğin yerine hacmi tamamlamak için salım ortamına 1 mL tampon ilave edilmiştir. Salım ortamına geçen IR780 miktarları spektrofotometrik olarak 775 nm'de ölçülmüştür. Lipozomların salım kinetiği, *In Vitro-In Vivo* Kinetics, Sürüm 1.0.40 programı ile hesaplanan denklemlerden elde edilmiş ve bu doğru denklemlerinin eğim, R ve R² katsayılarının saptanması ile belirlenmiştir (141, 151).

3.7. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga-68 ile İşaretlenmesi

3.7.1. Lipozomal Formülasyonların ⁶⁸Ga ile İşaretlenmesi

Eckert Ziegler Modular Lab Eazy Jeneratör sisteminde kolon dolgu maddesi olarak kullanılan TiO₂(titanyum dioksit)'e Germanyum-68 emdirilmiştir. Galyum-68, 0.1 M HCl kullanılarak kolondan elue edilip, fizyolojik pH'da salin ile +3 değerlikli olarak reaksiyon vialine ⁶⁸GaCl₃ alınmıştır. Reaksiyon vialine geçen saf ⁶⁸GaCl₃, bu noktadan sonra lipozomlar ile inkübe edilmiştir.

İşaretleme için lipozomal formülasyonlara ⁶⁸GaCl₃ 0,3 mCi/mL aktivite olacak şekilde eklenmiştir. Optimum işaretleme verimini elde etmek için, lipozomal formülasyonlar ⁶⁸Ga ile farklı pH (3,5 ve 4,5), sıcaklık (60 ve 80°C) ve inkübasyon sürelerinde (5 ve 15 dk.) muamele edilerek işaretlenmiştir. pH ayarlaması 1,14 M sodyum asetat tamponu (pH:3,5), HCl çözeltisi ve NaOH çözeltisi ile sağlanmıştır (152).

Ayrıca, formülasyonlar 80°C’de 15 dk. inkübe edildikten sonra veziküllerin yapısında herhangi bir değişiklik olup olmadığı süzme işlemi öncesinde polarizan mikroskobu görüntüleri (x40 büyütme) ile sonrasında ortalama partikül boyutu, PDI, zeta potansiyel ölçümü ve enkapsülasyon verimi (%EE) hesaplaması ile incelenmiştir.

3.7.2. Radyoaktif İşaretleme Verimi

İşaretleme verimini hesaplamak için ITLC-SG plakları kullanılmıştır. Sıcakta aktive edilen plaklara işaretli lipozom formülasyonları tatbik edilmiş ve hareketli faz olarak 0,1 M sodyum sitrat çözeltisi (pH:5) ve aseton/asetik asit/su çözeltisinde (3/5/1.5 v/v) yürütüldükten sonra kurutulmuştur. İşaretleme verimini hesaplamak için ortadan ikiye kesilen şeritlerin her iki parçasının aktivitesi gama sayıcıda ölçülmesi ile saptanmış ve aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.2.) kullanılarak işaretleme verimi hesaplanmıştır (152).

% İşaretleme Verimi (S)= [İşaretleme ^{68}Ga (radyokolloid ve lipozom) Aktivitesi / (İşaretleme ^{68}Ga (radyokolloid ve lipozom) Aktivitesi + Serbest ^{68}Ga Aktivitesi) x 100]
(0,1 M Sodyum sitrat pH:5 hareketli fazı)

% İşaretleme Verimi (A)=[İşaretleme ^{68}Ga (radyokolloid) Aktivitesi / (İşaretleme ^{68}Ga (lipozom) Aktivitesi + Serbest ^{68}Ga Aktivitesi) x 100] (piridin/asetik asit/su (3/5/1.5) hareketli fazı)

% İşaretleme Verimi = % İşaretleme Verimi (S-A)

3.7.3. İşaretlemenin *In Vitro* Stabilitesi

^{68}Ga işaretli lipozomal formülasyonların hücre kültürü ortamında (phosphate buffer saline (PBS)) *in vitro* stabilitesini değerlendirmek için 10 μL ^{68}Ga -işaretleme formülasyonlar 90 μL PBS pH 7.4 ile oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edilmiştir. *In vitro* stabilitesi 25°C’de 3 farklı zaman noktasında (30, 60, ve 120 dk.) ITLC ile değerlendirilmiştir.

3.8. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Stabilité Çalışması

Hazırlanan lipozom formülasyonlarından 1'er mL'lik örnekler alınarak oda sıcaklığında (25°C'de) ve buzdolabında (+4°C'de) bekletilerek, önceden belirlenen zamanlarda örnekler partikül büyüklüğü, zeta potansiyel ve içte tutulan maddenin kaybı açısından 3 ay süresince belirli zaman dilimlerinde (3., 5., 7., 14., 21., 30., 60. ve 90. günlerde) değerlendirilmiştir.

3.9. Lipozomal Formülasyonların *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının NIR Görüntüleme ile İncelenmesi

Lipozomal sistemlerin ve serbest IR780 çözeltisinin zamana bağlı olarak hücreye giriş yoğunluğunun floresans şiddeti *in vivo* görüntüleme sistemi IVIS'de (Newton 7.0, Vilber, Fransa) görüntülenerek incelenmiştir.

F1, F2, F3 ve F4 lipozomal formülasyonların GBM hücrelerini tanınması ve tutulumları RG2 ve U87 hücre hatlarında *in vitro* olarak incelenmiştir. Bunun için başlangıç olarak hücreler 25.000 U87 hücre/kuyu ve 45.000 RG2 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve %10 FBS içeren DMEM'de 37°C, %5 CO₂'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Hücreler %80-doluluk oranında plaklara tutunduktan sonra serbest IR780 çözeltisi ve lipozomlar (1,5 µg/mL IR780) RG2 ve U87 hücreleri ile 10 dk., 30 dk., 60 dk., 120 dk. ve 240 dk. 37 °C'de inkübe edilmiş ve floresans görüntüleri plaklar bir kez PBS ile yıkandıktan sonra *in vivo* görüntüleme sistemi IVIS ile 740 nm'de tayin edilmiştir (77).

3.9.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi

F1, F2, F3 ve F4 formülasyonlarının glioma hücreleri ile etkileşimini göstermek için Rhodamin-DSPE (Rhod:Total Lipit) (0.1:100 molar oranda) lipozomal formülasyonların hazırlanma aşamasında lipid faza eklenmiş ve bu şekilde Rhodamin işaretli lipozomal formülasyonlar hazırlanmıştır.

25.000 hücre/kuyu olacak şekilde RG2 hücreleri 24 kuyulu plaklarda lameller üzerine ekilip, hücreler %70-80 oranında plaklara tutununca, plaklar 2 kez PBS ile yıkanmış ve %10 FBS içeren DMEM'de 1 saat, 37 °C ve %5 CO₂ içeren ortamda inkübe edilmiştir. Ardından hücreler Rh-PE işaretli 1,5 µg/mL F1, F2, F3 ve F4 lipozom formülasyonu ile 37°C ve %5 CO₂ içeren ortamda 2 saat inkübe edilmiştir. PBS ile yıkanan kuyularda bulunan lameller 1:1000 oranında DAPI mounting medium ile lamaların üzerine kapatılarak 1 gece kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün 100X büyütme ile çekilen fotoğraflar incelenerek analiz edilmiş ayrıca ImageJ uygulaması ile de bakılmıştır.

3.9.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Öncelikle NIR ışığı (808 nm, 0,8-1W/cm²) maruziyeti sonrası lipozomal formülasyonların sıcaklık artışını incelemek ve etkinlik sağlayabilecek optimum NIR ışığı uygulama süresini saptamak amacıyla bir ön çalışma yapılmıştır. Bu amaçla, IR780 içeren tampon çözelti ve IR780 hapsedilmiş lipozomal formülasyonlar üzerine farklı sürelerde (5, 10 ve 15 dk.) NIR ışığı (808 nm, 0,8-1W/cm²) uygulanması sonrasında oluşan sıcaklık değişimleri hassas termometre yardımıyla ölçülmüştür.

3.9.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi

F1, F2, F3 ve F4 formülasyonlarının *in vitro* olarak PDT/PTT etkinliğini değerlendirmek için RG2 (25000 hücre/kuyu) ve U87 (12500 hücre/kuyu) glioblastoma hücreleri 96-kuyulu plaklara ekilmiş ve %10 FBS içeren DMEM'de 37°C'de bir gece boyunca inkübe edilmiştir. Hücreler ardından 0, 0.75 ve 1.5 µg/mL konsantrasyonlarda IR780 hapsedilmiş lipozom formülasyonları ve aynı konsantrasyonlarda serbest IR780 çözeltisi ile inkübe edilmiş ve 4 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Dispersiyon 10 dk. (optimum sıcaklık artış süresi) boyunca NIR ışığına (808 nm, 0.8-1 W/cm²) maruz bırakılmıştır. NIR ışığına maruz bırakılan hücreler ardından 24 saat boyunca CO₂'li inkübatörde tekrar inkübe edilmiştir. Hücre yaşayabilirliği Dimetiltiazol-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ile tayin edilmiştir (153).

3.9.5. Sitotoksisite Çalışması

Sitotoksisite çalışmaları için glioblastoma hücre hattı olarak U87 insan glioblastoma hücre hattı ve RG2 sıçan glioblastoma hücre hattı ile kontrol grubu olarak L929 fare fibroblast hücresi kullanılmıştır. RG2 (25000 hücre/kuyu), U87 (12500 hücre/kuyu) ve L929 fibroblast (kontrol grubu olarak) (15000 hücre/kuyu) hücreleri besi yeri içinde (50 µL/kuyu) 96 kuyucuklu plaklara formülasyonların uygulanmasından 1 gece önce ekilmiş, hücrelerin üzerine 0, 0.75 ve 1.5 µg/mL konsantrasyonlarda F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve etanol-fosfat tamponu (%2 v/v) içerisindeki IR780 ilave edilmiştir. 24 saat boyunca %5 CO₂'li inkübatörde kültürleri gerçekleştirildikten sonra sitotoksik etki kantitatif olarak ölçülmüştür.

Bu amaçla, hücrelerin üzerine 25 µl MTT eklenmiş ve 4 saat inkübasyon sonrası kuyulara 80 µl %45'lik DMF içinde çözülmüş %23 sodyumdodesilsulfat çözeltisi (SDS) (pH 4.7) eklenerek plaklar bir gece etüvde bırakılmıştır. 12-15 saat sonra spektrofotometrik olarak 570 nm'de ekstraksiyon tamponu olan SDS/DMF çözeltisine karşı absorpsiyon değerleri okunmuştur.

3.10. İstatistiksel Analizler

Çalışmada elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan fark olup olmadığını değerlendirmek için istatistiksel analizler yapılmıştır. Tüm testler en az 3 kez tekrarlanmıştır. Deneylerden elde edilen veri sayıları 30'dan az olduğu için, değerlendirmelerde parametrik olmayan test yöntemleri uygulanmıştır. İki grubun karşılaştırılması için Mann Whitney U testi, üç veya daha fazla grubun karşılaştırılması için ise Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Aynı grup içerisindeki farklılıkları ifade etmek için hücre kültürü ve *in vitro* çalışmaların sonuçlarında Ordinary One Way Anova, diğer çalışmaların sonuçlarında ise standart sapma (SD) kullanılmıştır. Gruplar arasındaki farklılıkları karşılaştırırken $p < 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Yapısına Giren Hammaddeler Üzerinde Yapılan Kontrollere Ait Bulgular

Fosfolipitler

Çalışmada kullanılan fosfolipitler proje kapsamında Avanti Polar Lipids ve Natterman Phospholipids firmalarından temin edilmiştir. Ana bilim dalımızda daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre firmalarından elde edilen sertifikalarına göre, DPPC'nin fosfotidilkolin içeriği %99, PL 90G'nin fosfotidilkolin içeriği ise %96,6'dır (141, 142, 148).

DPPC'ye ait kromatogramdan Rf değeri 0.137, PL 90G'ye ait kromatogramdan ise Rf değeri 0.177 olarak bulunmuştur(141, 142, 148).

DPPC ve PL 90G'nin DSC termogramından DPPC'nin faz geçiş sıcaklığının 53°C civarında ve erime derecesinin yaklaşık 75°C olduğu tespit edilmiştir. PL 90G'nin faz geçiş sıcaklığının ise -5°C civarında olduğu saptanmıştır (141, 142, 148).

Kolesterol

Çalışmada kullanılan kolesterol Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre İTK'sı yapılan kolesterolün Rf değeri 0.95 olarak hesaplanmıştır (141, 142, 148). Aynı şekilde ilgili çalışmalarda (141, 142, 148) kolesterolün DSC termogramından faz geçiş sıcaklığının 45°C ve erime sıcaklığının ise 152°C civarında olduğu gözlenmiştir. Kolesterolün erime derecesi tayininde de benzer şekilde erime derecesi 148-149°C olarak bulunmuştur (141, 142, 148).

PEG2000-DSPE

Çalışmada kullanılan PEG2000-DSPE proje kapsamında Avanti Polar Lipids firmasından temin edilmiştir. Ana bilim dalımızda daha önceki çalışmalarda elde

edilen sonuçlara göre PEG2000-DSPE'ye ait Rf değeri 0.75 ve 0.76 olarak hesaplanmıştır (141, 142, 148).

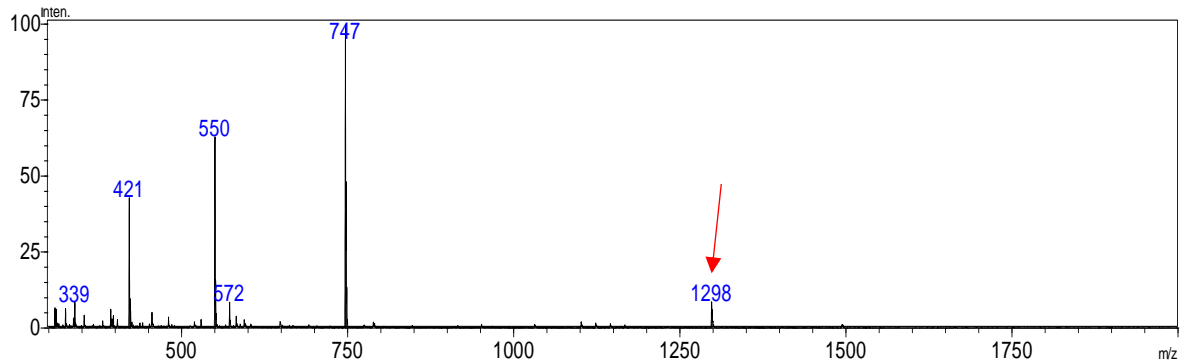
SA

SA Sigma Aldrich firmasından temin edilmiştir. Ana bilim dalımızda daha önceki çalışmalarda elde edilen sonuçlara göre İTK analizi sonrası SA'e ait kromatogramdan Rf değeri 0,62 olarak hesaplanmıştır (141, 145, 148).

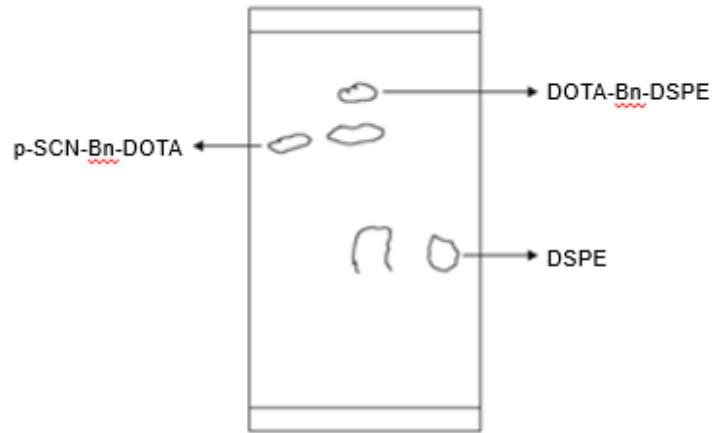
4.1.1. DOTA-Bn-DSPE Sentezi ve Üzerinde Yapılan Kontroller

DOTA-Bn-DSPE şelatör maddesi Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı gibi sentezlenmiş ve oluşan ürün kloroform içinde 1 ppm olacak şekilde çözülerek kütle spektrumunda (Liquid Chromatography-Mass Spectrometer LCMS-8030, Shimadzu) incelenmiş ve 1,298 m/z'de [M + H] pikine karşılık gelen pik ile 747 m/z'de reaksiyona girmemiş DSPE'ye karşılık gelen pikler literatüre uygun olarak gözlenmiştir (150). DOTA-Bn-DSPE sentezinin kütle spektrum profili Şekil 4.1.'de verilmiştir.

Ayrıca reaksiyonun ilerlemesini izlemek için Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı şekilde İTK analizi yapılmıştır. DOTA-Bn-DSPE sentez reaksiyonunun İTK kromatogramı Şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. DOTA-Bn-DSPE sentezinin kütle spektrum profili.



Şekil 4.2. DOTA-Bn-DSPE sentez reaksiyonunun İTK’da izlenmesi.

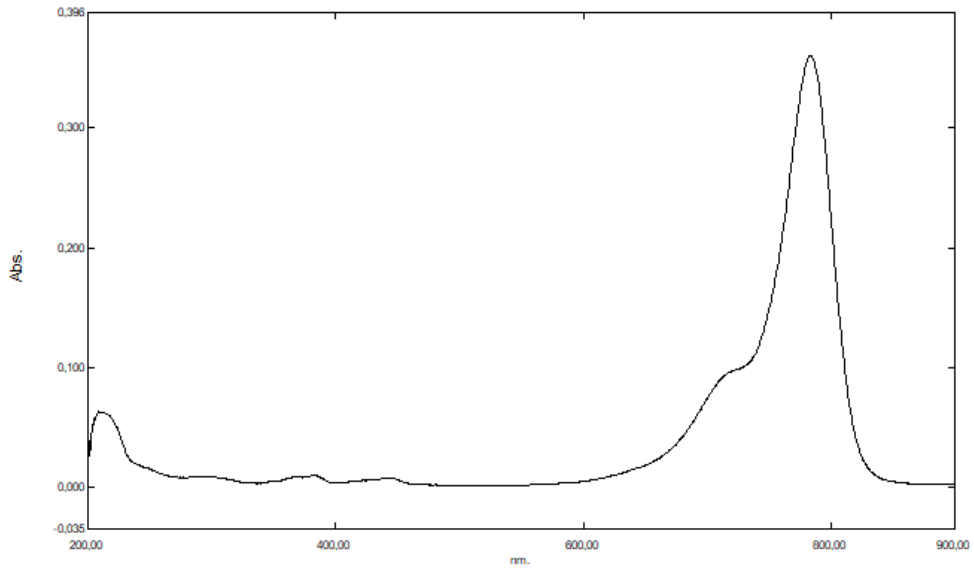
4.1.2. NAG

Hedeflendirme için kullanılan NAG, HPLC’de % ≥ 95 saflıkta verilmiştir.

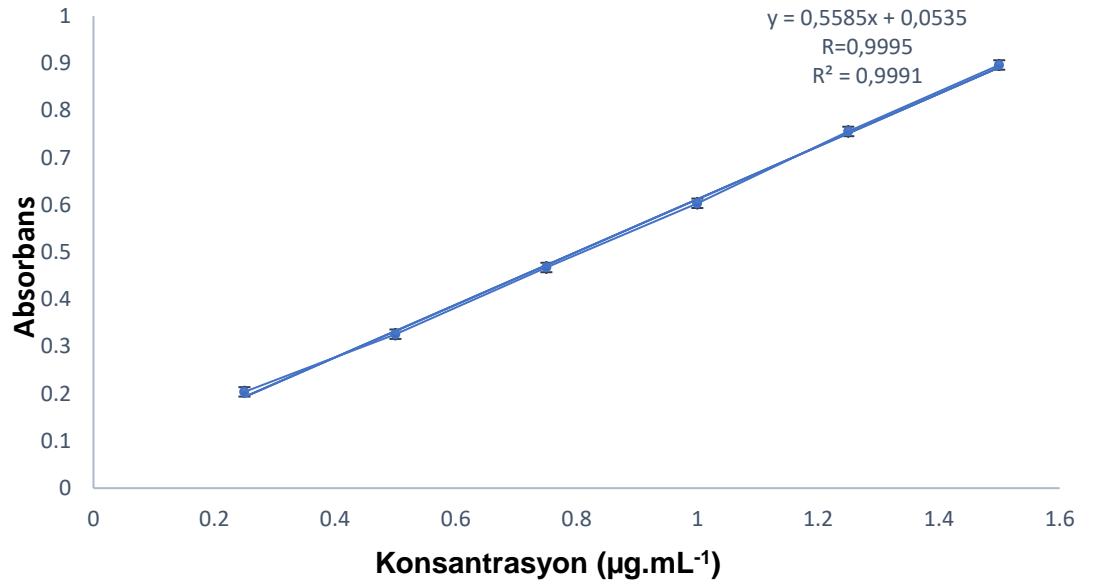
4.1.3. IR780 için UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

IR780’ in Etanoldeki UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusunun Çizilmesi

IR780’in etanol içerisindeki maksimum absorpsiyona sahip olduğu dalga boyunu Şekil 4.3.’te gösterildiği gibi 783,5 nm olarak saptanmıştır. Sonuçlar literatürdeki benzer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (154). 6 serinin ortalaması alınarak Şekil 4.4.’te verildiği gibi kalibrasyon grafiği çizilmiş, standart doğru ve doğru denklemi elde edilmiştir.



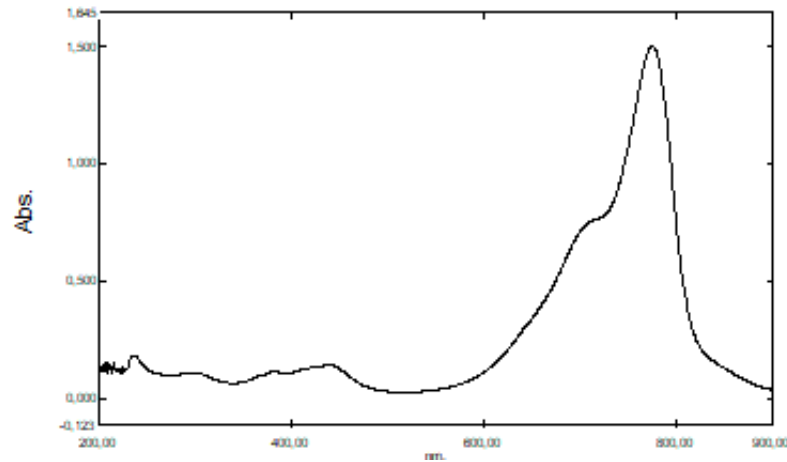
Şekil 4.3. IR780'in etanoldeki UV spektrumu.



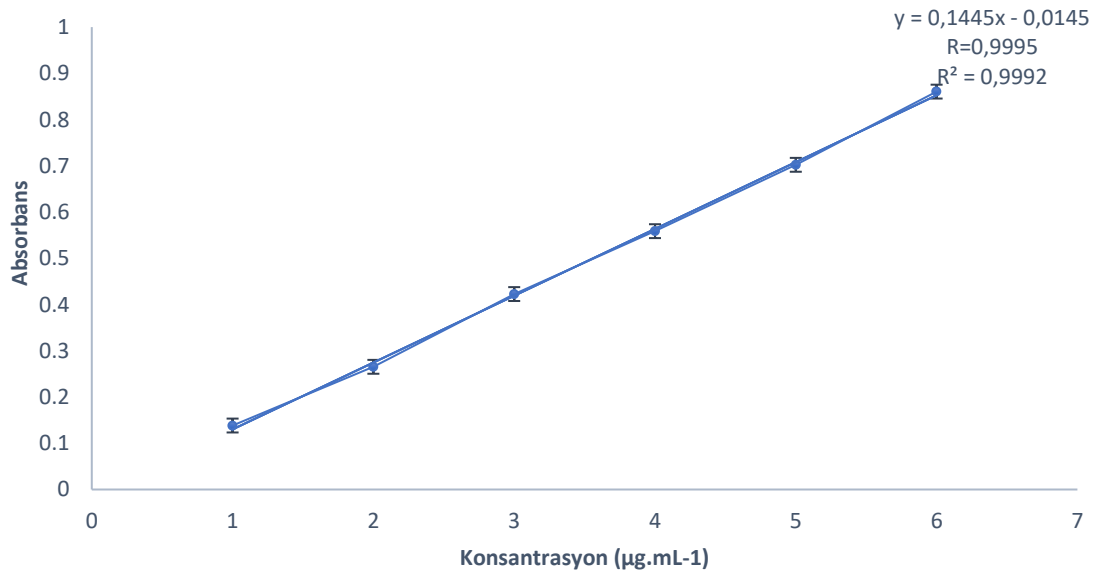
Şekil 4.4. IR780'in etanol içinde hazırlanan çözeltilisinin standart doğru ve doğru denklemini (n=6).

IR780'in 20 mM Fosfat Tamponu (pH:7.4) / %2 (v/v) DMSO İçinde Hazırlanan özeltisinin UV Spektrumu ve Kalibrasyon Doğrusunun izilmesi

IR780'in 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) / %2 (v/v) DMSO içerisindeki maksimum absorpsiyona sahip olduğu dalga boyunun Şekil 4.5.'te gösterildiği gibi 775 nm olduğu saptanmıştır. 6 serinin ortalaması alınarak Şekil 4.6.'da verildiği gibi kalibrasyon grafiği çizilmiş, standart doğru ve doğru denklemi elde edilmiştir.



Şekil 4.5. IR780'in 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4)/%2 (v/v) DMSO'daki UV spektrumu.



Şekil 4.6. IR780'in 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) /%2 (v/v) DMSO içinde hazırlanan çözeltisinin standart doğrusu ve doğru denklemi (n=6).

4.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması

4.2.1. Ön Formülasyon Çalışmaları

Ön formülasyon çalışmaları sırasında farklı fosfolipit, kolesterol ve IR780 bileşimleri ile hazırlanan formülasyonlara ait sonuçlar Tablo 4.1.'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre, düşük ortalama partikül boyutu ve dağılımı ile maksimum ilaç hapsedme etkinliğine sahip optimum formülasyon film metodu (110) ile hazırlanan PL90G:Chol:PEG2000-DSPE:SA:IR780 (50:29,2:5:5:0,5 molar oran) lipit bileşimine sahip lipozomlar geliştirilerek NAG ile hedefli ve DOTA-Bn-DSPE şelatörü ile modifiye edilen lipozomal formülasyonlar seçilmiştir.

Tablo 4.1. Ön formülasyon çalışmalarında hazırlanan lipozom formülasyonları.

LİPOZOM FORMÜLASYONU	LİPİD BİLEŞİMİ	KONSANTRASYOI HAZIRLAMA METODU	PARTİKÜL BOYUTU	PDI	ENKAPSÜLASYON SONUÇ ETKİNLİĞİ	
DPPC:Chol:IR780	50:27,2:0,2	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 1x0,2 µm)	345 nm	0,471	%0,47	Partikül boyutu 345 nm Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,4:1	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 1x0,2 µm)	364 nm	0,375	%3,92	Partikül boyutu 364 nm Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:27,2:0,2	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 1x0,2 µm)	2625 nm	1,00	%9	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,4:1	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 1x0,2 µm)	4567 nm	0,71	%1	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:27,2:0,2	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 2x0,2 µm)	922,9 nm	1,00	%2,44	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,4:1	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (1x0,6, 1x0,4, 2x0,2 µm)	681,93 nm	0,744	%0,88	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:27,2:0,2	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) 7 dk. Banyo tipi sonikatör	2510 nm	0,924	%19	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,4:1	200 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) 7 dk. Banyo tipi sonikatör	2466 nm	1,00	%5	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,4:1	40 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) 7 dk. Banyo tipi sonikatör	1308 nm	0,927	%14	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:IR780	50:26,9:0,5	40 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) 7 dk. Banyo tipi sonikatör	1504 nm	1,00	%15	Partikül boyutu çok yüksek Agregasyon problemi Düşük IR780 enkapsülasyonu
DPPC:Chol:SA:IR780	50:26,4:5:1	40 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	201 nm	0,108	%12,5	Partikül boyutu 201 nm Çok düşük IR780 enkapsülasyonu
PL90G:Chol:IR780	50:26,4:1	40 mmol.mL ⁻¹ Film metodu Polikarbonat filtreden süzme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	184 nm	0,153	-	Partikül boyutu 184 nm IR780 enkapsülasyonu ölçülememiştir.

PL90G:Chol:SA:IR780	50:26,4:5:1	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	175 nm	0,182	% 65	Partikül boyutu 175 nm IR780 enkapsülasyonu % 65 ölçülmüştür.
PL90G:Chol:IR780	50:26,9:0,5	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	232 nm	0,128	% 74	Partikül boyutu 232 nm IR780 enkapsülasyonu % 74 ölçülmüştür.
PL90G:Chol:SA:NAG: PEG:IR780	50:29,2:5:10:5:0,5	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) (2 deneme)	181 nm 169 nm	0,154 0,147	% 75 % 80	Partikül boyutu 181 nm ve 169 nm IR780 enkapsülasyonu % 75 ve % 80 ölçülmüştür.
PL90G:Chol:NAG:PE G:IR780	50:29,2:10:5:0,5	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm) (2 deneme)	179 nm 175 nm	0,178 0,183	% 87 % 85	Partikül boyutu 179 nm ve 175 nm IR780 enkapsülasyonu % 87 ve % 85 ölçülmüştür.
PL90G:Chol:PEG: IR780	50:29,2:5:0,5	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	168 nm	0,115	% 89	Partikül boyutu 168 nm IR780 enkapsülasyonu % 89 ölçülmüştür.
PL90G:Chol:SA:PEG: IR780	50:29,2:5:5:0,5	40 mmol.mL ⁻¹	Film metodu Polikarbonat filtreden sızme (2x0,6, 2x0,4, 2x0,2 µm)	180 nm	0,132	% 80	Partikül boyutu 180 nm IR780 enkapsülasyonu % 80 ölçülmüştür.

Sıvı-kristal yapısındaki PL 90G fosfolipidi kullanılarak lipozomal formülasyonlar hazırlanmış ve istenilen optimum partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimi elde edildiği için bundan sonraki çalışmalara DPPC yerine PL 90G fosfolipidi ile devam edilmiştir.

4.2.2. Lipozomal Formülasyonların Hazırlanması

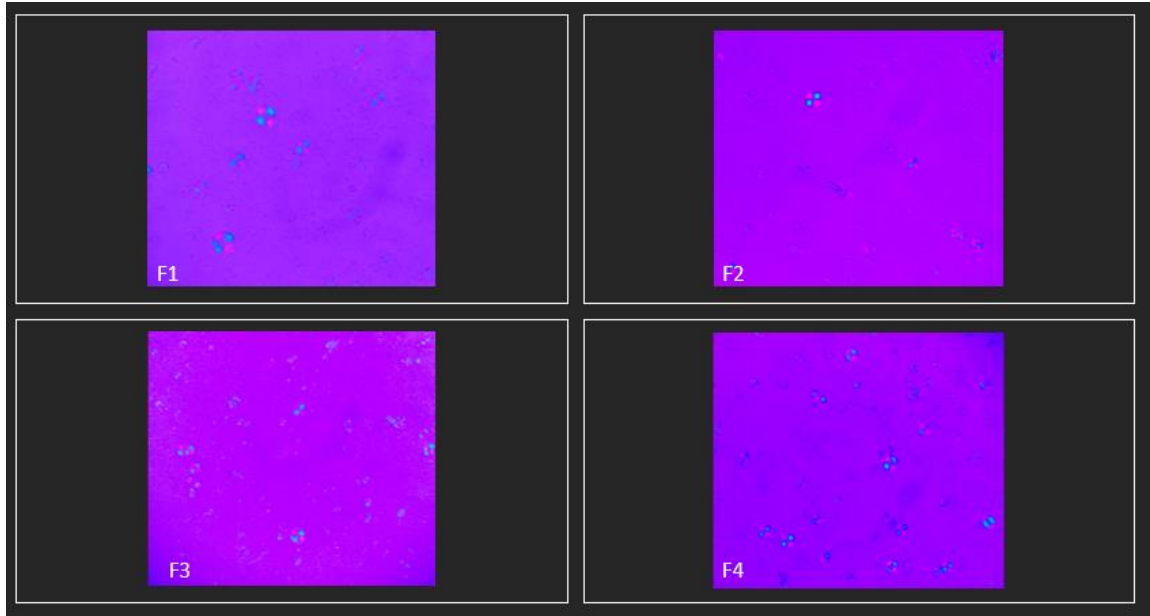
Ön formülasyon çalışmaları sonrasında optimum partikül boyutu ve enkapsülasyon hacmine sahip lipozomal formülasyonlar Bangham yöntemiyle (110) Tablo 3.1.'de verilen bileşim yüzdeleri ile hazırlanmıştır. Bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan lipozom formülasyonlarının kodlanması, lipit miktarları ve molar bileşimler Tablo 3.1.'de verilmiştir.

4.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780

Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Karakterizasyonu

Hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nötral ve pozitif yüklü, IR780 hapsedilmiş multifonksiyonel lipozomların karakterizasyonu görünüş ve tip tayini, ortalama partikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı, zeta potansiyeli ve enkapsülasyon etkinliği (%EE) ile saptanmıştır.

Süzme işlemi öncesinde lipozom formülasyonlarına ait mikroskop görüntüleri Şekil 4.7.'de, ortalama partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliğine (%EE) ait bulgular Tablo 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.7. Lipozom formülasyonlarına ait 40x büyütme oranında mikroskop görüntüleri.

Tablo 4.2. Lipozom formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=6) (Ort ± SD).

FORMÜLASYON	ORTALAMA PARTİKÜL BOYUTU (nm)	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ (PDI)	ZETA POTANSİYELİ (mV)	ENKAPSÜLASYON ETKİNLİĞİ (%)
F1	193,56±0,8	0,180	-7,14±0,2	85 ± 2,8
F2	187,6±1,8	0,176	-7,66±0,7	81 ± 4,7
F3	181,7±2,3	0,159	-5,12±1,1	84 ±5,6
F4	189±1,7	0,166	-5,17±0,9	79 ± 3,9

Hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nötral ve pozitif yüklü lipozomlar için partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri *in vitro* uygulamalar için uygun bulunmuştur. Tüm lipozom formülasyonlarında PDI değerleri 0,1-0,2 arasında bulunmuştur. Hedeflendirilmiş lipozomların partikül boyutu hedeflendirilmemişlere oranla daha büyük bulunurken, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Hedeflendirilmemiş formülasyonların zeta potansiyelinin hedeflendirilmişlere oranla daha yüksek olduğu gözlenmiştir ancak bu fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Pozitif yüklü formülasyonların nötrallere oranla yapısındaki SA nedeniyle daha az negatif olduğu gözlenmiştir ($p<0,05$).

Tüm formülasyonlarda IR780 enkapsülasyon etkinliği lipofilik yapısı sebebiyle oldukça yüksek bulunmuştur (~%80). Hedeflendirilmemiş lipozomlarda enkapsülasyon etkinliğinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).

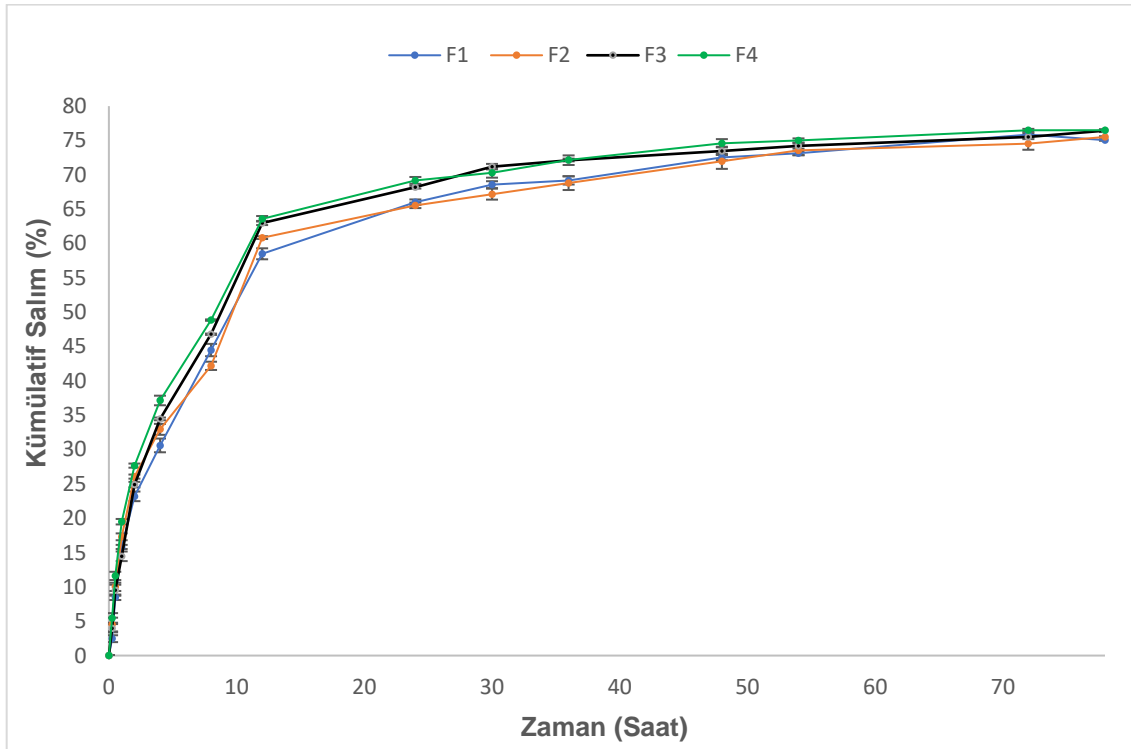
4.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların *In Vitro* Salım Profillerinin İncelenmesi

F1, F2, F3 ve F4 lipozomal formülasyonlarından IR780 salım çalışmaları Bölüm 3.6.'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şekil 4.8.'de IR780 iyodür'ün 78 saatin sonunda F1 formülasyonundan %75,05±0,3, F2 formülasyonundan %75,51±0,2, F3 formülasyonundan %76,42±0,1, F4 formülasyonundan %76,48±0,2'inin salındığı, aktif hedefleme için kullanılan NAG ve yük verici madde olan SA varlığının az da olsa IR780 salımını hızlandırdığı ancak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur.

IR780'in kümülatif salım yüzdelerinin *In Vitro-İn Vivo Kinetics, Version 1.0.40* programına aktarılması ile elde edilen salım kinetiğine ait veriler Tablo 4.3.'te verilmiştir. Elde edilen R^2 değerleri değerlendirildiğinde formülasyonlar Langenbucher salım kinetiği modeline uygun bulunmuştur.

Tablo 4.3. IR780 içeren lipozom formülasyonlarının 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) içindeki salım kinetiklerinin değerlendirilmesi.

FORMÜLASYON	Langenbucher			Higuchi			Sıfıncı Derece			Birinci Derece		
	m	a	R ²	m	a	R ²	m	a	R ²	m	a	R ²
F1	0,0710	-0,2257	0,9712	8,6339	11,9177	0,8785	0,8293	26,9449	0,6938	-0,0173	4,2605	0,8025
F2	0,0687	-0,2101	0,9688	8,3136	13,7950	0,8766	0,7996	28,2365	0,6942	-0,0168	4,2444	0,8013
F3	0,0725	-0,2250	0,9695	8,5856	13,8626	0,8526	0,8160	29,0654	0,6592	-0,0173	4,2181	0,7617
F4	0,0712	-0,2095	0,9763	8,2535	16,6964	0,8517	0,7844	31,2835	0,6585	-0,0172	4,1880	0,7675



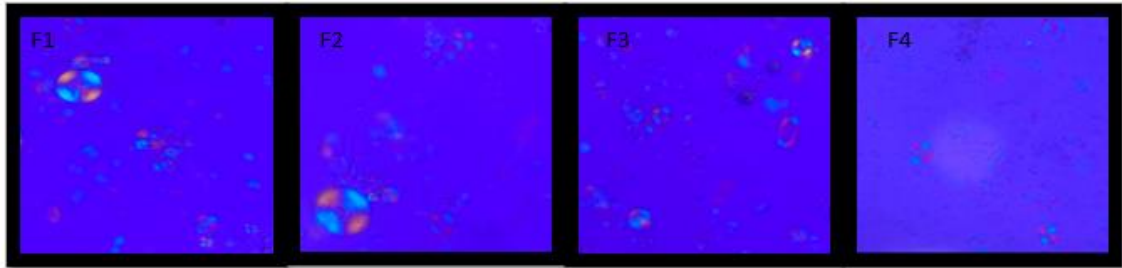
Şekil 4.8. IR780'in lipozom formülasyonlarından salım grafiği.

4.5. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga-68 ile İşaretlenmesi

4.5.1. Lipozomal Formülasyonların ⁶⁸Ga ile İşaretlenmesi

İşaretleme için F1, F2, F3 ve F4 lipozomal formülasyonlara 0,3 mCi/mL aktivite olacak şekilde eklenmiştir. Optimum işaretleme verimini elde etmek için, lipozomal formülasyonlar ⁶⁸Ga ile farklı pH (3,5 ve 4,5), sıcaklık (60 ve 80°C) ve inkübasyon sürelerinde (5 ve 15 dk.) muamele edilerek işaretlenmiştir. pH ayarlaması 1,14 M sodyum asetat tamponu (pH:3,5), HCl çözeltisi ve NaOH çözeltisi ile sağlanmıştır (152).

Ayrıca, süzme işleminden önce formülasyonlar 80°C'de 15 dk. inkübe edildikten sonra veziküler yapısında herhangi bir değişiklik olup olmadığı polarizan mikroskobu ile incelenmiş ve lipozomların yapısını koruduğu ve vezikül yapısında herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. Lipozom formülasyonlarının 15 dk. 80°C'de muamele edilmesi sonrasında veziküllerin polarize mikroskop görüntüleri (x40 büyütme oranı).

Ayrıca süzme işlemi sonrasında lipozomal formülasyonlar 80°C'de 15 dk. bekletildikten sonra yapısında değişiklik olup olmadığı ortalama partikül boyutu, PDI, zeta potansiyel ve %EE ile incelenmiş (Tablo 4.4.) ve lipozomların yapısını koruduğu ve vezikül yapısında anlamlı bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.4. 80°C’de 15 dk. bekletilen lipozom formülasyonlarına ait karakterizasyon sonuçları (n=6) (Ort±SD).

FORMÜLASYON	ORTALAMA PARTİKÜL BOYUTU (nm)	POLİDİSPERSİTE İNDEKSİ (PDI)	ZETA POTANSİYEL (mV)	ENKAPSÜLASYON ETKİNLİĞİ (%)
F1	171,2±1,3	0,161	-8,21 ± 0.7	80±4,2
F2	178,1±1,6	0,153	-8,72 ± 0.4	79±3,8
F3	175,3±1,1	0,185	-6,15± 0.3	78±3,5
F4	172,2±1,5	0,170	-6,57 ± 0.5	74±4,9

4.5.2. Radyoaktif İşaretleme Verimi

İşaretleme verimi Bölüm 3.7.2.’de anlatıldığı gibi hesaplanmıştır. Tablo 4.5.’te görülebileceği gibi 80°C, 3,5 pH ve 5 dk. inkübasyon süresinde tüm formülasyonlar için %45-49 arası işaretleme verimine ulaşılmıştır. Aynı koşullarda farklı formülasyonların işaretleme verimleri arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). İşaretleme işleminde 80°C’de inkübasyon 60°C’de inkübasyona oranla, pH 3,5 4,5’e oranla ve 5 dk. inkübasyon süresinin 15 dk.’ya göre işaretleme veriminin tüm formülasyonlarda artış gösterdiği izlenmiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.5. Lipozom formülasyonlarının ⁶⁸Ga ile işaretleme verimleri sonuçları (n=6) (Ort±SD).

Sıcaklık:60°C	F1			F2			F3			F4		
	Süre	pH		Süre	pH		Süre	pH		Süre	pH	
		3,5	4,5		3,5	4,5		3,5	4,5		3,5	4,5
5 dk.	27,7±2.1	25,11 ±1.81	5 dk.	29,49 ±1.21	22,31± 1.8	5 dk.	23,54 ±1.14	20,11±1.3	5 dk.	25,13±3.72	18,71±2.3	
15dk.	15,26 ±0.6	11,09± 0.86	15dk.	16,93±1.96	14,74±0.86	15dk.	17,05±1.49	14,41±1.6	15dk.	16,06±1.9	10,94±1.2	
Sıcaklık:80°C	F1			F2			F3			F4		
	Süre	pH		Süre	pH		Süre	pH		Süre	pH	
		3,5	4,5		3,5	4,5		3,5	4,5		3,5	4,5
5 dk.	45,38±1.55	33,2±1.78	5 dk.	42,53 ±1.69	28,26±1.98	5 dk.	47,71±1.47	39,35±0.89	5 dk.	49,75±1.57	29,09±1.32	
15dk.	34,74±2.01	16,71±1.57	15dk.	29,84± 1.17	19,03±1.76	15dk.	37,14±1.75	32,76±1.78	15dk.	32,45±1.64	17,52±2.0	

4.5.3. İşaretlemenin *In Vitro* Stabilitesi

⁶⁸Ga ile işaretli lipozomal formülasyonların hücre kültürü ortamında (PBS) *in vitro* stabilitesini değerlendirmek için 10 µL ⁶⁸Ga-işaretli formülasyonlar 90 µL PBS pH 7.4 ile oda sıcaklığında karıştırılarak inkübe edilmiştir. *In vitro* stabilitesi 3 farklı zaman noktasında (30, 60, ve 120 dk.) ITLC ile değerlendirilmiştir. Tüm formülasyonların 2 saat sonunda yaklaşık %40 civarında işaretleme verimi ile işaretlemenin stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.

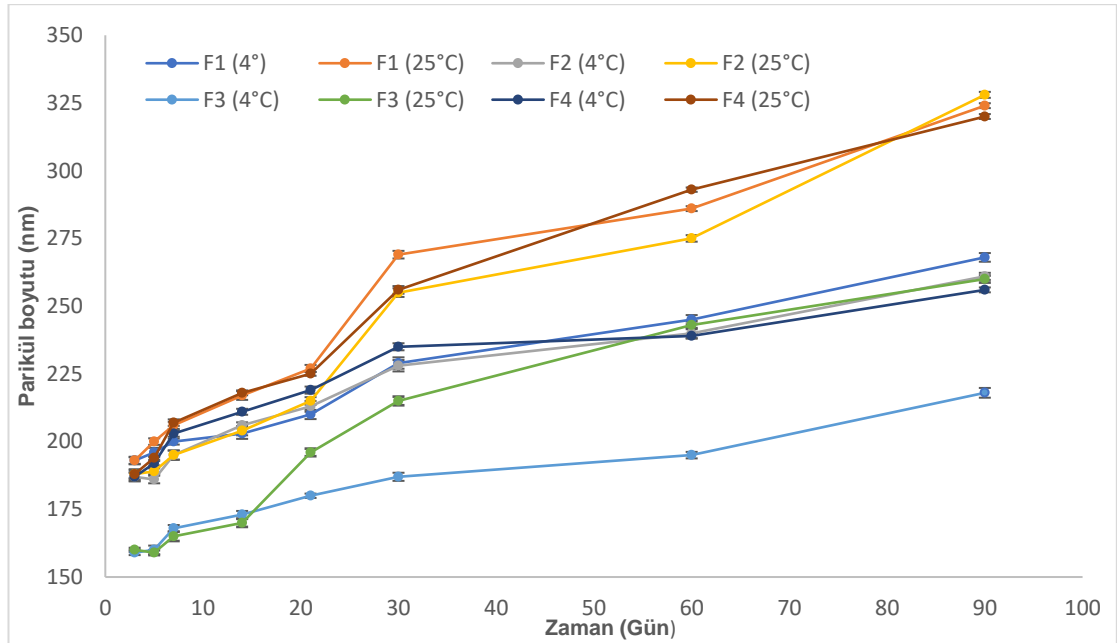
4.6. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Stabilitate Çalışması

IR780 hapsedilmiş lipozom formülasyonlarının 90 günlük stabilite testleri 25°C'de ve +4°C'de bekletilerek Bölüm 3.8.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. IR780 içeren lipozomların stabilite çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de verilmiştir.

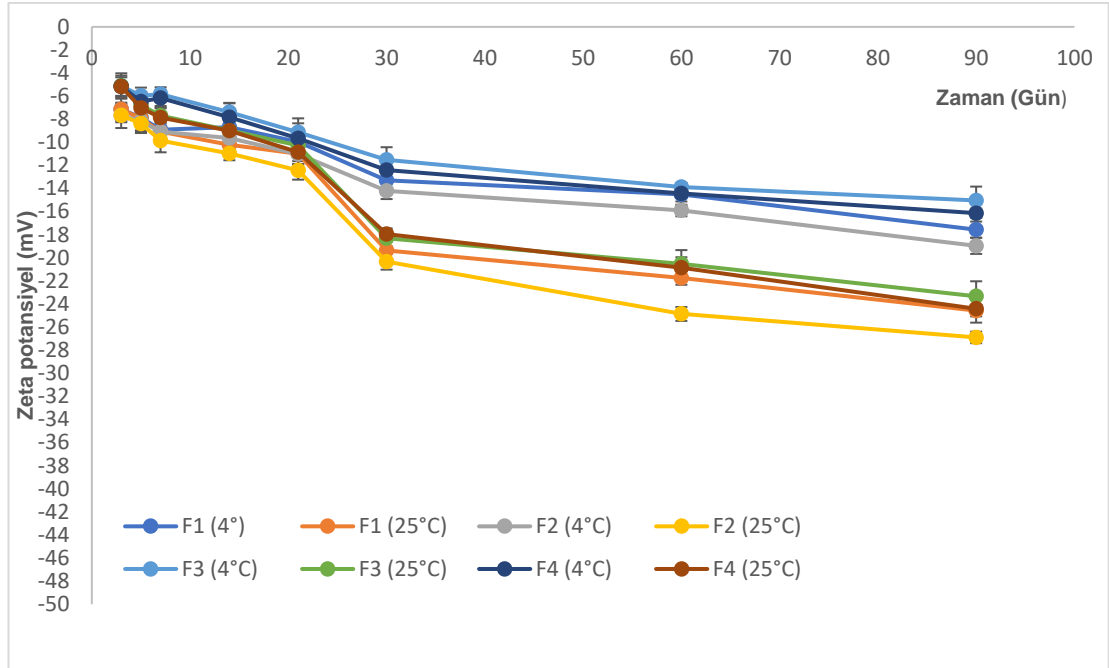
Tüm formülasyonların 30 gün boyunca ortalama partikül boyutu değişiminde anlamlı bir fark olmamıştır. 4°C'de bekletilen formülasyonlarda 25°C'de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha az partikül boyutu artışı gözlenmiştir (p<0,05). Hem 4°C'de hem de 25°C'de bekletilen pozitif yüklü formülasyonlarda nötrallere oranla daha az ortalama partikül boyutu artışı gözlenmiştir (p>0,05). Aynı sıcaklıkta saklanan ve aynı yüke sahip hedeflendirilmiş formülasyonlarda hedeflendirilmemişlere oranla daha fazla partikül boyutu artışı gözlenmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p>0,05).

Tüm formülasyonlar için ilk bir ay boyunca %EE değişiminde anlamlı bir fark izlenmemiştir (p>0,05). 4°C'de bekletilen formülasyonlarda 25°C'de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha az %EE azalışı gözlenmiştir (p<0,05). Hem 4°C'de hem de 25°C'de bekletilen hedeflendirilmiş formülasyonlarda hedeflendirilmemişlere oranla ve pozitif yüklü olanlarda nötral olanlara oranla %EE azalışında 1 ay boyunca anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p>0,05). 4°C'de saklanan nötral formülasyonlarda pozitif yüklü formülasyonlara oranla 1 aydan sonra daha fazla %EE azalışı gözlenmiştir (p<0,05).

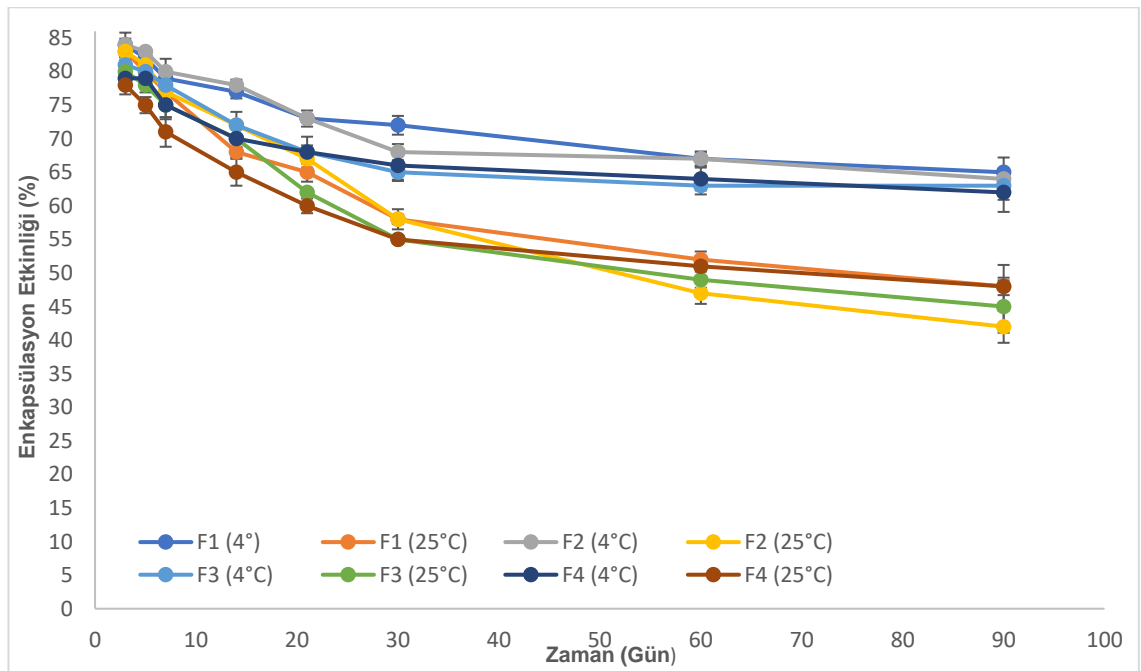
Tüm formülasyonlar için 30 gün boyunca zeta potansiyel değişiminde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). 25°C’de bekletilen formülasyonlarda 4°C’de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha fazla zeta potansiyel değişimi gözlenmiştir ($p<0,05$). 4°C’de bekletilen pozitif yüklü formülasyonlarda nötral formülasyonlara oranla daha az zeta potansiyel değişimi gözlenmiştir ($p<0,05$).



Şekil 4.10. +4°C ve 25°C’de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların ortalama partikül boyutu değişimleri.



Şekil 4.11. +4°C ve 25°C’de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların zeta potansiyel değişimleri.



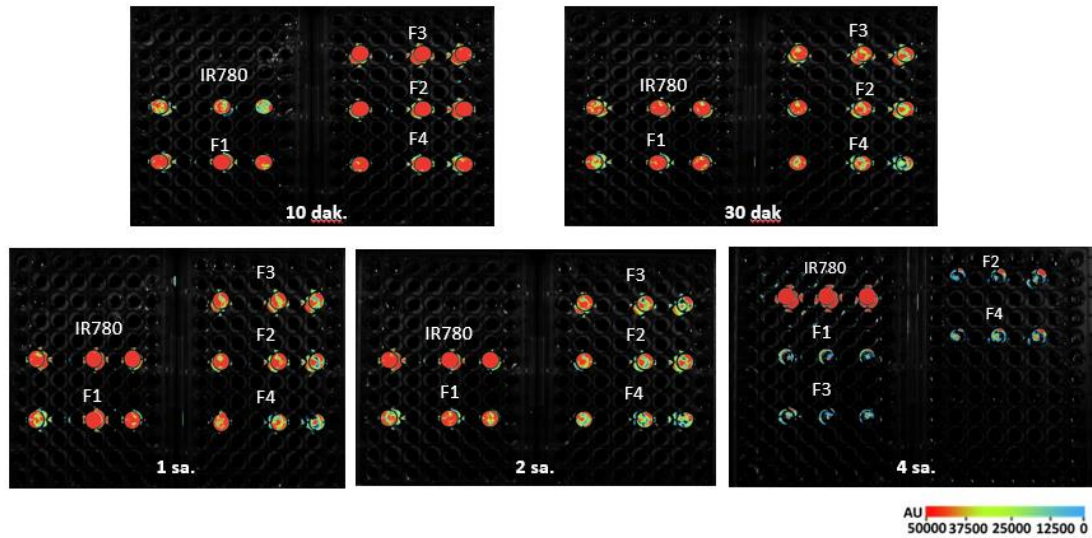
Şekil 4.12. +4°C ve 25°C’de 90 gün bekletilen lipozomal formülasyonların enkapsülasyon etkinliği (%EE) değişimleri.

4.7. Lipozomal Formülasyonların *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

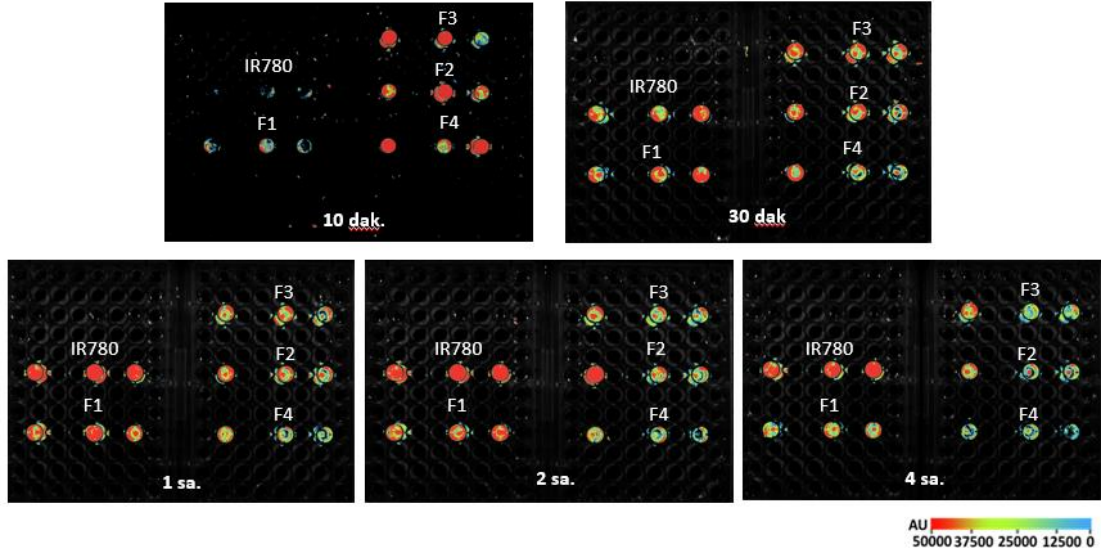
4.7.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların NIR Görüntüleme ile İncelenmesi

F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisinin zamana bağlı olarak hücreye giriş yoğunluğunun floresans şiddeti *in vivo* görüntüleme sistemi IVIS’de görüntülerinin alınması ile Bölüm 3.9.1.’de anlatıldığı şekilde incelenmiştir.

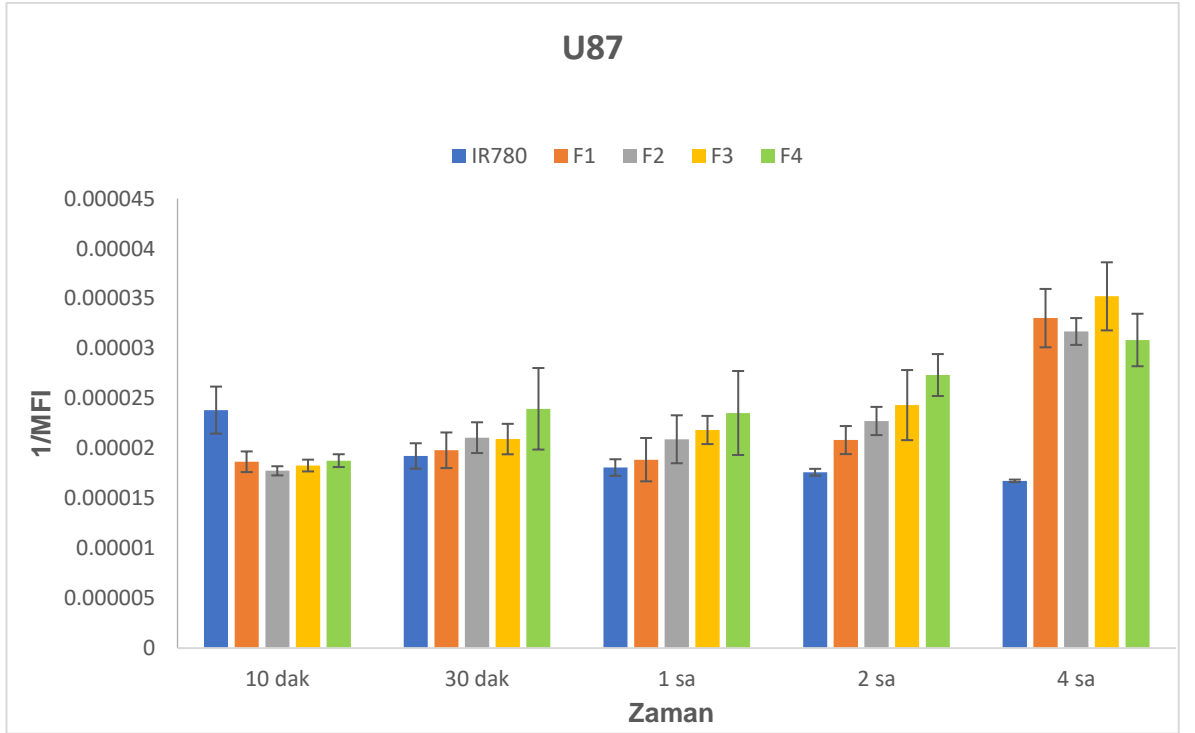
Serbest IR780 ile F1, F2, F3, F4 formülasyonlarının U87 ve RG2 hücre hatlarındaki inkübasyonları sonucunda elde edilen IVIS görüntüleri sırasıyla Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.’te ve aynı hücre hattında zamana bağlı olarak formülasyonların hücreye giriş yoğunluğunun bir göstergesi olarak (1/MFI) değerleri ile sırasıyla Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.’da verilmiştir.



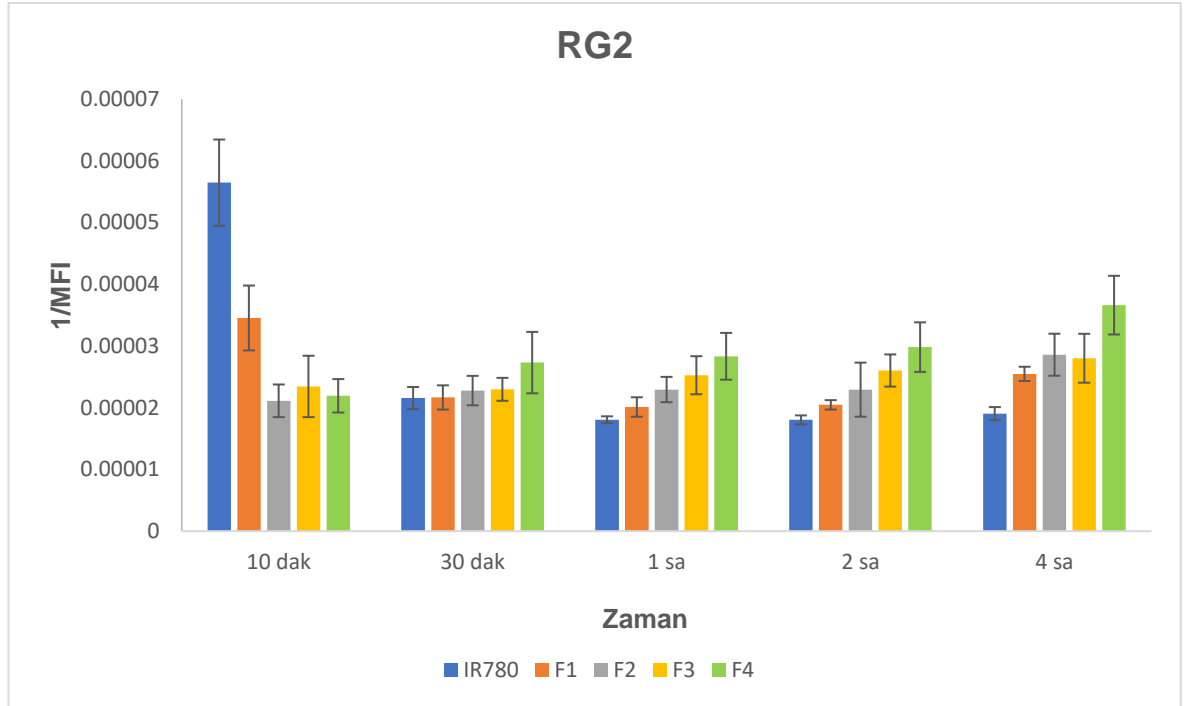
Şekil 4.13. U87 hücre hattında serbest IR780 ve formülasyonların IVIS görüntüleri.



Şekil 4.14. RG2 hücre hattında serbest IR780 ve formülasyonların IVIS görüntüleri.



Şekil 4.15. U87 hücre hattında IR780 içeren formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisi ve zamana bağlı hücre içi yoğunlukları.



Şekil 4.16. RG2 hücre hattında IR780 içeren formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisi ve zamana bağlı hücre içi yoğunlukları.

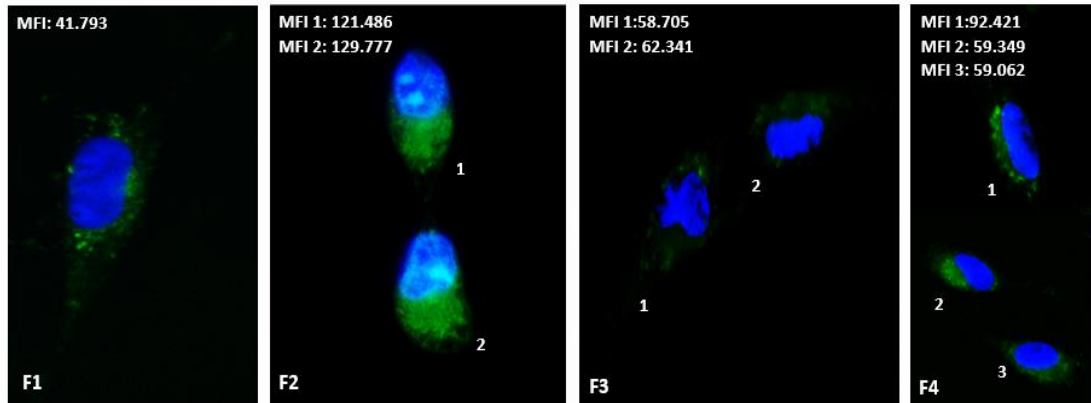
Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.’teki IVIS görüntüleri ve Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.’da verilen grafiklerde de görüldüğü üzere 4 saatlik inkübasyon sonunda bile formülasyonların hücre içinde tutulabildiği görülmüştür.

Hem RG2 hem de U87 hücre hatlarında NAG ile hedeflendirilmiş F2 ve F4 formülasyonlarının 1 ve 2 saatlik inkübasyon sürelerinde hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluğuna ulaştığı gözlenmiştir. Pozitif yüklü F3 ve F4 formülasyonlarının ise nötral F1 ve F2 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluk gösterdiği saptanmıştır ($p < 0.05$).

4 saatlik inkübasyon süresi sonunda RG2 ve U87 hücre hatlarında tüm formülasyonlar için en yüksek hücre içi yoğunluk değerleri izlenmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda U87 hücre hattında F2 ve F4 formülasyonlarının hücre içi yoğunlukları F1 ve F3 formülasyonlara oranla daha düşük bulunmuştur ($p < 0.05$). RG2 hücre hattında F2 ve F4 formülasyonlarının F1 ve F3 formülasyonlardan daha yüksek hücre içi yoğunluğa ulaştığı gözlenmiştir ($p < 0.05$).

4.7.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi

Rhodaminle konjuge IR780 enkapsüle edilmiş F1, F2, F3 ve F4 formülasyonlarının RG2 hücre hattındaki tutulumları floresans mikroskobu ile Bölüm 3.9.2.'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Şekil 4.17.'de 2 saat inkübasyon süresi sonunda hücre tutulumlarının floresans mikroskop görüntüleri ve ImageJ programından elde edilen MFI değerleri verilmiştir. Resimlerde mavi renk (DAPI) hücre çekirdeğini göstermekte olup yeşil renk ise hücreler tarafından tutulan lipozomları göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan rhodamine lipozomal veziküllerin lipid membranına bağlandığı için hücrelere giren lipozom veziküllerini izleme imkanı sunmaktadır.



Şekil 4.17. Formülasyonların RG2 hücre hattındaki floresans görüntüleri.

Floresans mikroskobundan elde edilen görüntülerden anlaşılacağı üzere, IR780 enkapsüle edilmiş hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş lipozomal formülasyonlar göz önüne alındığında yüzey yükünün formülasyonların hücre girişi arasında anlamlı bir farka neden olmadığı gözlenmiştir ($p > 0,05$). NAG ile hedeflendirilmiş IR780 enkapsüle edilmiş F2 ve F4 formülasyonlarının hücre içerisine girişinin hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlarından belirgin şekilde fazla olduğu tespit edilmiştir ($p < 0,05$).

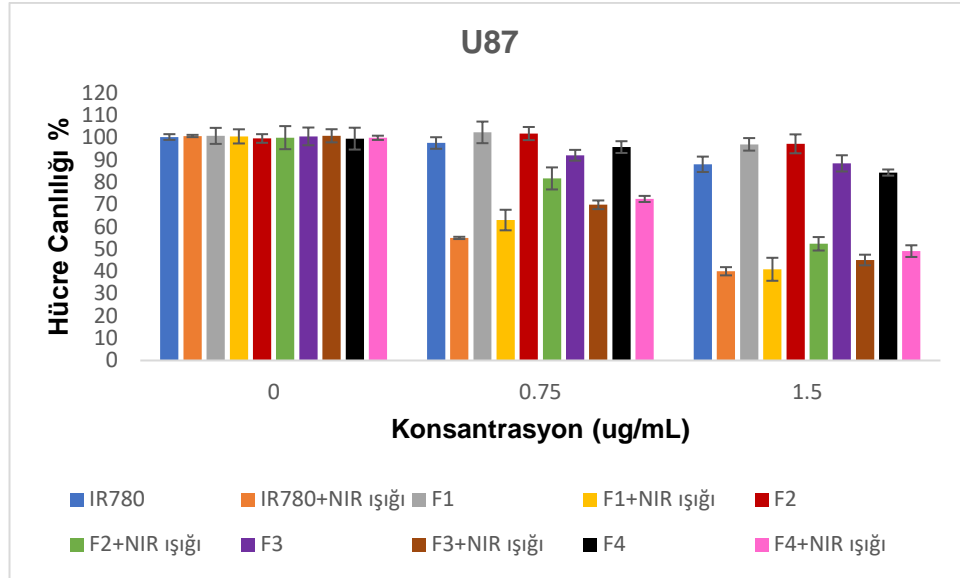
4.7.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Lipozomal formülasyonların termal etkinliğini değerlendirmek için NIR ışığı (808 nm, 0,8-1W/cm²) maruziyeti sonrası IR780 enkapsüle edilen lipozomal formülasyonlarında sıcaklık artışı sağlayabilen optimum NIR ışığı uygulama süresi saptanmıştır. IR780 içeren tampon çözelti ve IR780 hapsedilmiş lipozomal formülasyonlar üzerine 5 dk. NIR ışığı uygulanması sonrasında anlamlı bir sıcaklık değişimi saptanmazken, 10 dk. uygulama sonrasında hem IR780 çözeltisinde hem de IR780 hapsedilmiş formülasyonlarda 7-10°C'lik anlamlı bir sıcaklık artışı gözlenmiştir. 15 dk.'lık uygulama sonrasında ise 10 dk.'lık uygulama sonrasında görülene benzer sıcaklık artışları saptandığı için optimum NIR ışığı uygulama süresi olarak 10 dk. seçilmiştir.

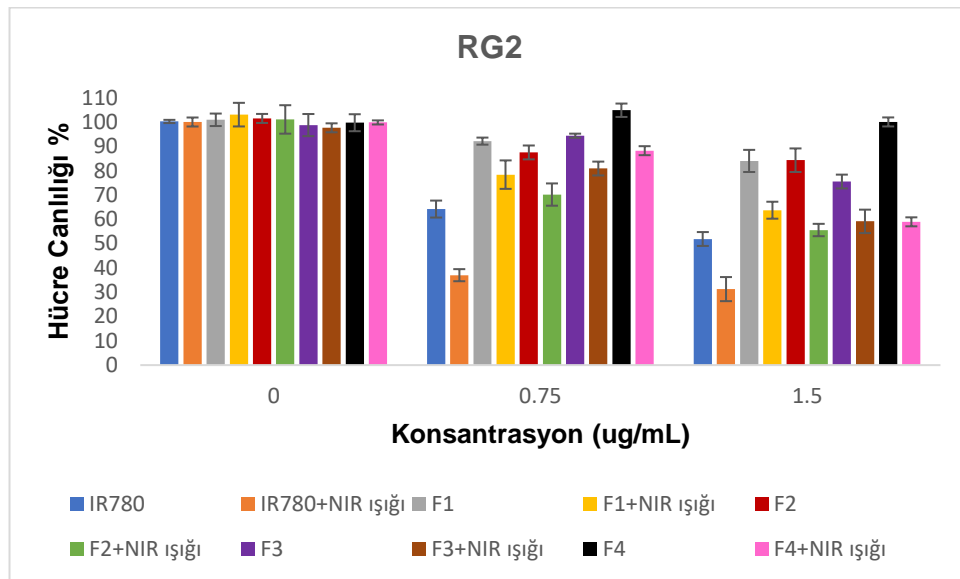
4.7.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi

F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisinin, U87 ve RG2 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesini incelemek amacıyla Bölüm 3.9.4.'te anlatıldığı şekilde MTT analizi yapılmış ve NIR ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan hücrelerin hücre canlılığı IR780 hapsedilmiş formülasyonların PDT/PTT etkisini değerlendirmek amacıyla incelenerek karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'daki grafiklerde görüldüğü üzere RG2 ve U87 hücre hatlarının serbest IR780 ve IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonlar ile inkübe edilmesi sonrasında NIR ışığına (808 nm, 1 W cm⁻²) maruz bırakılanların, NIR ışığına maruz bırakılmayanlara oranla hücre yaşayabilirliği anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.05).



Şekil 4.18. NIR ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan serbest IR780 çözeltisi ve formülasyonların U87 hücre hattındaki hücre canlılığı yüzdeleri.



Şekil 4.19. NIR ışığına maruz bırakılan ve bırakılmayan serbest IR780 çözeltisi ve formülasyonların RG2 hücre hattındaki hücre canlılığı yüzdeleri.

U87 hücre hattında, hücre canlılığı NIR ışığına maruz bırakılan 1,5 µg/mL konsantrasyonda serbest IR780 çözeltisinde %40'ın altına inerken IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonlarda %50'nin üzerinde kalmıştır. RG2 hücre hattında benzer şekilde NIR ışığına maruziyet sonucu serbest IR780 çözeltisinde aynı

konsantrasyonda hücre canlılığı %51'e düşerken IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonlarda bu değerin üzerinde hücre canlılığı tespit edilmiştir.

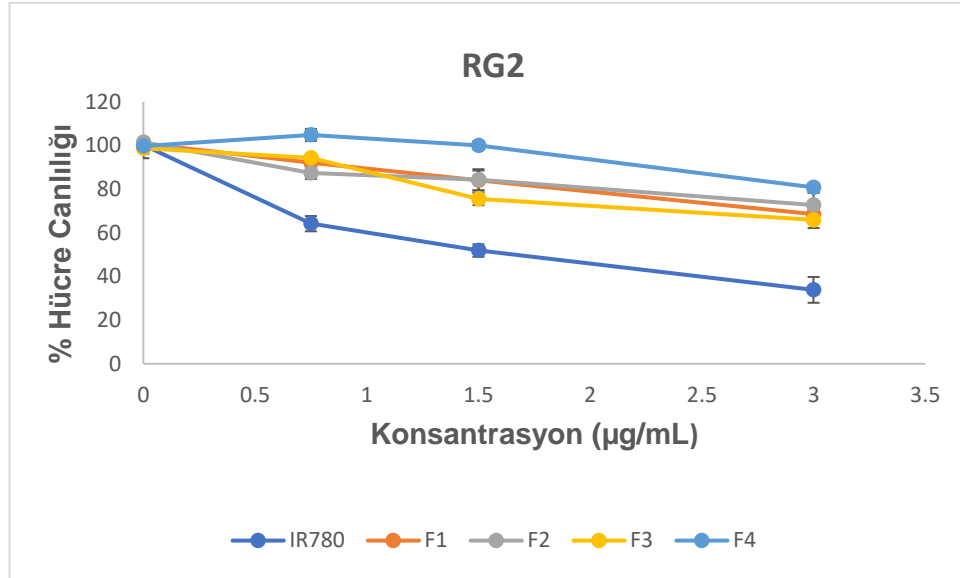
RG2 hücre hattında GLUT1 reseptör aracılı olarak hücre içine alınan F2 ve F4 formülasyonlarının F1 ve F3 formülasyonlarına oranla daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). U87 hücre hattında NIR ışığına maruziyet sonucu 1,5 $\mu\text{g/mL}$ IR780 konsantrasyonunda F2 ve F4 formülasyonlarında F1 ve F3 formülasyonlarına oranla daha az sitotoksikite izlenmiştir ($p>0.05$).

4.7.5. Sitotoksikite Çalışması

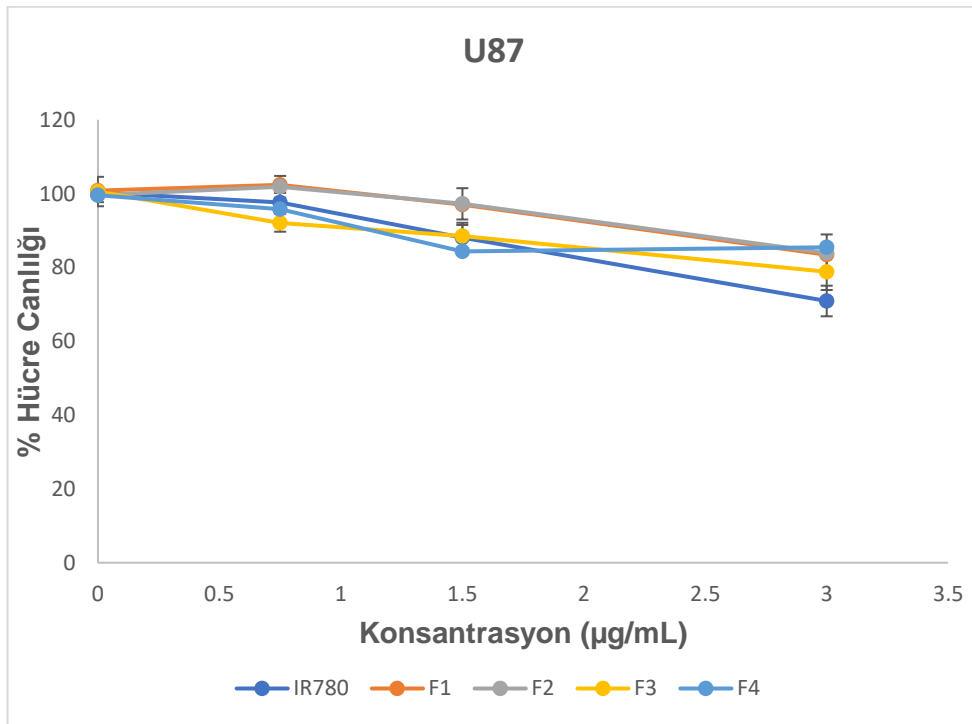
F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisinin U87, RG2 ve L929 hücre hatları üzerinde Bölüm 3.9.5.'te anlatıldığı gibi MTT analizi yapılmış hücre canlılığına etkileri ve hücreler üzerinde sitotoksik etki gösterebilecekleri IC_{50} değerleri hesaplanmıştır. F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisine ait IC_{50} değerleri sırasıyla Tablo 4.6.'da hücre canlılığına etkileri Şekil 4.20., Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.'de verilmiştir.

Tablo 4.6. IR780 içeren formülasyonların U87, RG2 ve L929 hücre hatlarındaki IC_{50} değerleri.

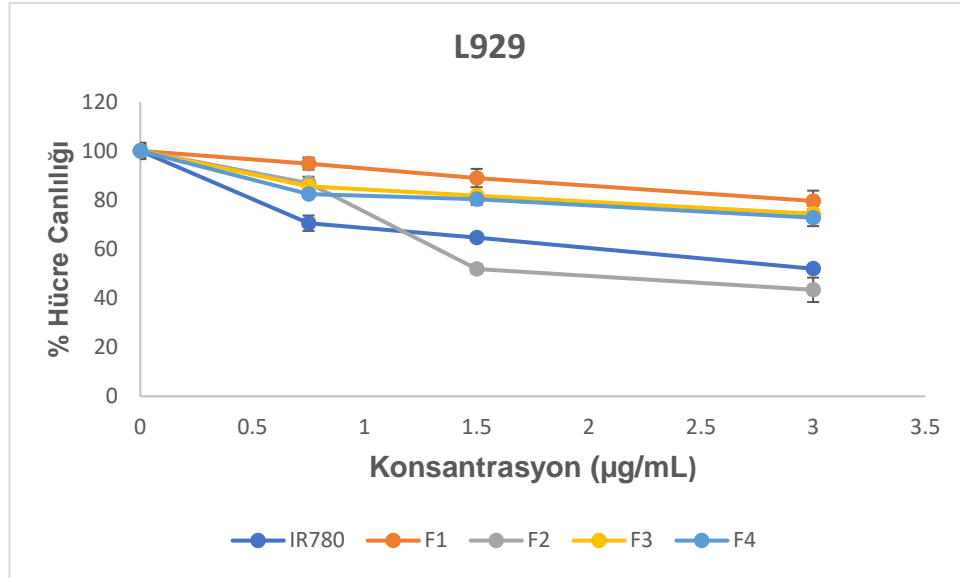
FORMÜLASYON	IC50 (ug/mL)		
	U87	RG2	L929
F1	4,046	3,082	4,57
F2	3,606	3,72	2,26
F3	2,897	1,907	4,056
F4	7,385	4,38	9,06
IR780	3,24	1,204	1,83



Şekil 4.20. NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin RG2 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim.



Şekil 4.21. NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin U87 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim.



Şekil 4.22. NIR ışığına maruz bırakılmayan IR780 enkapsüle edilen formülasyonların ve serbest IR780 çözeltisinin L929 hücre hattında konsantrasyona karşı hücre canlılığı yüzdelerindeki değişim.

Serbest IR780 çözeltisinin RG2 ve L929 hücre hattında IC_{50} değerinin istatistiksel açıdan önemli derecede düşük ($p < 0.05$) bulunması sitotoksitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. IR780 hapsedilmiş formülasyonların ise genel olarak sitotoksitesileri IR780 çözeltisinden daha az bulunmuştur ($p < 0.05$).

Formülasyonların IC_{50} değerlerinin genel olarak kontrol grubu olan L929 hücre hattında RG2 ve U87 hücre hatlarından daha yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Hedeflendirilmiş pozitif yüklü F4 formülasyonunun U87 hücre hattında sitotoksitesinin hedeflendirilmiş nötral F2 formülasyonuna göre anlamlı derecede düşük olması hücre içine kontrollü bir şekilde girişine bağlı olabileceği düşünülmektedir ($p < 0.05$).

Aynı hücre hatlarında GLUT1 reseptörüne hedeflemeden bağımsız olarak pozitif yüklü F3 lipozomlarının IC_{50} değerlerinin nötral olan F1 formülasyonundan daha düşük olması sitotoksitesilerinin anlamlı derecede fazla olduğu anlamına gelmektedir ($p < 0.05$).

RG2 hücre hattında hedeflendirilmiş F2 formülasyonunun IC_{50} değerinin F1 formülasyonundan bir miktar ($p > 0.05$) ve hedeflendirilmiş F4 formülasyonunun F3 formülasyonundan anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$) bulunması hücre içine formülasyonların reseptör aracılı olarak kontrollü bir şekilde girişine bağlı olarak

gözlendiğini düşündürmektedir. Şekil 4.20.-4.22.'den görülebileceği üzere, NIR ışığı uygulanmayan tüm hücre hatlarında lipozomal formülasyonlar serbest IR780'e benzer ancak formülasyonların hücre membranından kontrollü girişine bağlı olarak daha az sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Işıksız ortamda gözlenen bu sitotoksik etki NIR ışığı varlığında gözlenen PDT/PTT etkisine sinerjistik ya da aditif şekilde katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

5. TARTIŞMA

5.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomlardaki Etkin Madde ve Diğer Bileşenlerin Seçimi

5.1.1. Etkin Madde

Geçtiğimiz yıllar içinde NIRF görüntüleme, cerrahlara geleneksel görsel gözlemlerle saptanamayan rezidüel malign hastalıkların saptanması ve rezeksiyonunda yol gösterici yeni bir teknik olarak geliştirilmiştir (155-157). Görüntüleme teknikleri arasında NIR görüntüleme, yüksek kontrast ve hassasiyet, düşük maliyet, kullanım kolaylığı ve güvenlik avantajları sunmaktadır (158, 159).

NIR boyalar, küçük organik moleküllerdir. 700-1000 nm dalga boyu aralığında radyasyonu absorbe eder ve belirli dalga boylarına sahip NIR ışığını absorbe ederek uyarılmış singlet durumuna ulaşırlar (160). NIR boyaları lokalize aralıklarda ısı üretebilir ve PTT ve PDT katkıda bulunan reaktif oksijen türleri (ROS) oluşturabilirler (161).

Bir NIR boyası/ajanı olarak IR780, 780 nm'de spesifik absorpsiyon pikine sahip bir lipofilik katyondur. IR780'in yapısında siklohekzenil halkası ve merkezde yüksek hidrofobikliğine yol açan bir klor atomu vardır (161). Hidrofobikliği nedeniyle lipozomlara kolayca yüklenebildiği bildirilmiştir (31).

IR780'in, 808 nm dalga boyunda NIR ışığına maruziyet sonrası PDT/PTT için kullanılabilen singlet oksijen üretebildiği bildirilmiştir (33). Ayrıca IR780 PTT işlevi ile ışığı etkili bir şekilde ısıya dönüştürebilir ve kanser hücrelerini öldürebilir (162).

Fotoduyarlaştırıcılar arasında suda çözünür FDA onaylı bir NIR ajanı olan ICG ile karşılaştırıldığında, IR780, daha yüksek bir fotostabiliteye sahiptir ve floresan yoğunluk gösterir. IR780'in PDT, PTT ve görüntüleme ajanı potansiyeline rağmen, bu molekülün kanser tedavisi ve/veya teşhisinde doğrudan uygulanması, biyolojik sıvılarda düşük çözünürlüğü, hızlı klerensi, yüksek dozlarda akut toksisitesi ve düşük tümör tutulumu nedeniyle klinik kullanımı kısıtlıdır (163, 164). Bu kısıtlamaların üstesinden gelmek için IR780, nanopartiküller gibi farklı ilaç taşıyıcı sistemlere yüklenmiştir. Bu yaklaşım, IR780'in çözünürlüğünü büyük ölçüde iyileştirir,

dolaşımında kalış süresini uzatır, toksisitesini azaltır ve ayrıca hedeflendirilebilmesi tümör hücrelerinde birikimini artırır (34, 163, 165).

Shihong Li ve arkadaşları, glioma fare modellerinde tümöre özgü NIR görüntüleme özelliğine sahip IR780 içeren miseller ve lipozomlar hazırlamışlardır. Her iki nanopartikülle GBM ektopik ksenograft modelinde başarılı bir NIR görüntüleme elde edilmiştir (35).

Yukarıdaki bilgiler ışığında çalışmamız kapsamında, NIR görüntüleme, PDT ve PTT için kullanılabilme özelliğine sahip lipofilik IR780, tümöre hedeflendirme ve yukarıda bahsedilen kısıtlamaların (biyolojik sıvılarda düşük çözünürlük, hızlı klerens, yüksek dozlarda akut toksisite gibi) üstesinden gelebilmek amacıyla için biyoyumlu, biyoparçalanır ve non-toksik bir ilaç taşıyıcı sistem olan lipozomlara hapsedilerek etkinliği incelenmiştir.

5.1.2. İlaç Taşıyıcı Sistem

Lipozomlar, sulu boşlukları çevreleyen bir veya daha fazla eş merkezli lipid çift katmanından oluşan fosfolipid veziküller olarak tanımlanır. Lipozomal sistemlerin hem lipofilik hem de hidrofilik bileşikleri hapsedebilmesi çeşitli ilaçların bu veziküller tarafından enkapsülasyonunu sağlar. Hidrofobik moleküller çift katmanlı membranda tutulurken, hidrofilik moleküller sulu merkezde tutulabilir (166-169).

Bunun yanı sıra, lipozomal sistemler; ilaç taşınmasında gözlenen artmış biyoyararlanım, enkapsülasyon sonucu ilacın enzimlerin etkisinden korunması, non-toksik, esnek, biyoyumlu, biyolojik olarak parçalanabilir olmaları ve enkapsüle ajanın azalmış toksisitesi sebebiyle avantajlı sistemlerdir (170).

Çalışmamızda; etkili glioma teşhis ve tedavisi amacıyla tek başına düşük tümör tutulumu, akut toksisite, hızlı klerens ve düşük çözünürlük özelliklerine sahip PDT, PTT ve NIR görüntüleme amacıyla kullanılabilen bir fotoduyarlaştırıcı olan IR780 hapsedilmiş teranostik lipozomal sistemler geliştirilmiştir. Lipozomal sistemler tümördeki artmış geçirgenlik ve tutulum (EPR) etkisine bağlı olarak pasif olarak hedeflendirilebilmesi için nanoboyutta, PEG kaplı ve nötral veya pozitif yüklü olarak farklı yüzey yüklerinde üretilmiş, ayrıca beyindeki tümör hücrelerinde yüksek olarak eksprese olan GLUT1'e aktif olarak hedeflendirilebilmesi amacıyla NAG ile modifiye

edilmiş, PET/BT görüntüleme radyonüklidi olan ^{68}Ga ile işaretlenebilmesi için şelat yapıcı ajan olan DOTA ile modifiye edilmiştir.

5.1.3. Diğer Hammaddelerin Seçimi

Fosfolipit

Lipozomlar, insan hücre membranının yapısında bulunan ve fizyolojik olarak uyumlu doğal veya sentetik fosfolipidlerden yapılır (171). Tez öneri formunda lipozomal sistemlerin hazırlanması için kullanılacağı belirtilen DPPC lipozomal sistemlerin hazırlanmasında stabil yapısı nedeniyle tercih edilmiştir. Literatürde de (162, 172, 173) sıklıkla kullanılan bir fosfolipid olmasına karşın, ön formülasyon çalışmalarında IR780 hapsedilmiş DPPC içeren lipozomal sistemler ile istenilen partikül boyutu ve enkapsülasyon etkinliği sağlanmadığı ve süzme sırasında membrana yapışma gözlenmiştir.

Bu nedenle formülasyon çalışmalarına DPPC yerine sıvı kristal yapıda olan PL90G fosfolipidi ile devam edilmiştir. PL90G ile yapılan formülasyon çalışmalarında lipozomal veziküllerin istenilen ortalama partikül boyutu büyüklüğü, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliği gösterdiği izlenmiştir.

Kolesterol

Kolesterol, lipozomal veziküllerinin agregasyonunu önlemek ve stabilitesini iyileştirebilmek için formülasyonda sıklıkla kullanılan bir steroldür (174, 175). Ayrıca, membranlardaki kolesterol içeriği, taşıyıcı sisteme adeta iskelet sistemi gibi sağlamlık verirken, veziküllerden istenmeyen ilaç sızıntısını engeller (176, 177).

Hidrofobik yapıda IR780 hapsedilmiş formülasyonlara literatürle uyumlu olarak uygun miktarda fosfolipid ve kolesterol eklenmiştir (162, 172, 173, 178, 179). Lipozomal formülasyonların karakterizasyonu Tablo 4.2.'de görüldüğü üzere uygun bulunmuştur.

PEG2000-DSPE

Polimerler ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzey özelliklerini değiştirerek stabilitesini ve farmakokinetiğini geliştirmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (180). PEG hidrofilik yapıda bir polimerdir. FDA onaylı ve oldukça güvenilir olduğundan PEG ve

türevleri pekçok ilaç taşıyıcı sistemin yüzeyini modifiye etmek için en sık tercih edilen polimerlerdendir. PEG gibi polimerler ile yapılan modifikasyonlarla ilaç taşıyıcı sistemlerin opsonizasyonu ve RES tarafından uzaklaştırılması büyük oranda azaltılırken, dolaşımında kalış süreleri arttırılabilmektedir. PEG ile ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyleri kaplanarak hidrofilitesinde artış sağlanabilmektedir. Bu da polimer kaplı nanopartikül ile kan bileşenleri arasında sterik stabilizasyon ismi verilen itici etkiye sebebiyet verir. Böylece nanotaşıyıcıların makrofajlar gibi RES bileşenleri tarafından dolaşımdan uzaklaştırılması engellenmiş olur (148, 181, 182).

Ayrıca tümör dokusunda anjiogenesis ile artmış damarlanma ve damar endotel yapısının bozulması nanoboyuttaki ilaç taşıyıcı sistemlerin bu bölgede EPR etkisi ile birikmesine sebebiyet vermektedir. PEG ile kaplanan nanopartiküllerin kan dolaşımında kalış süreleri artacağından küçük partikül boyutuna da bağlı olarak pasif hedeflendirme ile tümör dokusunda daha fazla miktarda tutunması sağlanmaktadır (142, 183). Ticari ismi Doxil® olan doksorubisin yüklü PEGlenmiş lipozomlar güçlü bir farmakolojik etkiye ve düşük toksisiteye sahiptir ve klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (184).

Formülasyonda kullandığımız PEG'in yapısındaki DSPE modifikasyonu, PEG'in lipozom membranına konjugasyonunu sağlamaktadır (185-188).

Çalışmamızda PL 90G fosfolipidi ile hazırlanan bütün formülasyonlarda PEG2000-DSPE ile yüzey kaplanması sağlanmış ve böylece hem formülasyonların RES hücreleri tarafından hızlı opsonizasyonu önlenerek dolaşımında kalış sürelerinin uzatılması ve EPR etkisine bağlı olarak tümöre pasif olarak hedeflendirilmesi hem de sıvı kristal yapıda olan PL 90G ile hazırlanan formülasyonların stabiliteilerinin artırılması amaçlanmıştır.

NAG

KBB endojen taşıyıcı sistemleri Glukoz taşıyıcı (GLUT), Mono Karboksilik Asit taşıyıcı (MCT), Nötr Amino Asit ve Amin taşıyıcı sistemlerinin (SLC) molekülleri taşımak için çeşitli yeteneklere sahip olduğu bulunmuştur (189). GLUT taşıyıcısının taşıma kapasitesi, KBB'de (GLUT>MCT>SLC) bulunan diğer taşıyıcı sistemlerden daha yüksek bulunmuştur (190, 191). GLUT taşıyıcı sisteminin çeşitli homologları arasında GLUT1, GLUT2, GLUT3, GLUT4, GLUT5, GLUT6 ve

GLUT7 bulunur (192, 193). GLUT1 KBB endotelinde yaygın olarak bulunmakta ve tüm GLUT taşıyıcılarının $>90\%$ 'ini oluşturmaktadır (191, 194).

Yapılan bir çalışmada, NAG ile modifiye edilmiş, PEGlenmiş lipozomlar hazırlanmış ve Primer Beyin Mikrovasküler Endotel Hücreleri (RPBEC) hücre hattı üzerinde incelenmiştir. Çalışma, lipozomal formülasyonlarının GLUT taşıyıcısına başarılı bir şekilde hedeflendiğini göstermiştir (179). Qin ve arkadaşları, Coumarin-6'yı beyne GLUT1 ligand olan NAG ile hedeflemişlerdir (22).

Tez çalışması kapsamında, IR780 hapsedilmiş lipozomal sistemlerin GBM hücrelerine NAG ile modifikasyon yoluyla hedeflendirilmesi amaçlanmıştır. Hedefleyici madde olan NAG bileşimini saptamak için literatürden (21, 178) yararlanılmış ve denemeler sonucunda optimum miktar seçilmiştir.

SA

Taşıyıcı sistemlerin yükleri sistemik dolaşımında kalış süresini ve pasif olarak hedeflendirilmesini etkilemektedir. Oktadesilamin olarak da bilinen SA, genellikle lipozomları pozitif yüklemek için kullanılır. Yapılan bazı çalışmalarda, pozitif yüzey yükünün nanopartikülün nötrallere oranla negatif yüklü hücre membranı ile etkileşimi artırdığı, negatif yükün ise nötral ve pozitif yüklü nanopartiküllere oranla daha düşük membran etkileşimi gösterdiği saptanmıştır (162, 195, 196). Fosfatidilkolin-stearilamin lipozomlarının, tümör hücrelerinin dış yüzeyindeki fosfatidilserine güçlü bir afinite gösterdiği ve doğrudan etkileşim yoluyla tümör hücrelerini hedefleyebileceği bildirilmiştir (101, 197).

Bu nedenle çalışma kapsamında, IR780 içeren hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş lipozomal formülasyonlar nötral ve pozitif yüklü olarak hazırlanmış ve karakterizasyonu ile hücre tutulumları arasında bir fark olup olmadığı RG2 ve U87 hücre hatlarında *in vitro* olarak değerlendirilmiştir.

DOTA-Bn-DSPE

Bifonksiyonel şelatörler, radyoizotop ile bir biyomolekül, peptid, protein, antikor, antikor fragmanı ya da taşıyıcı sistem arasında bağlayıcı (linker) görevi gören bileşiklerdir. Temel özellikleri, izotopu hızlı ve stabil bir şekilde bağlama ve hedeflemeden sorumlu biyomoleküllerle kovalent bağlar oluşturma yeteneğidir. DOTA (1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit), bulunabilirliği ve

özellikle pozitron yayan radyonüklidleri bağlayabilmek için iyi bilinen koordinasyon kimyası nedeniyle en sık kullanılan şelatörlerdendir (198).

DOTA ^{68}Ga , ^{64}Cu ve ^{86}Y gibi çeşitli radyonüklitlerle bağ yapabilmektedir. Uygun koşullar altında stabil kompleksler vermekte ve hedef doku, hastalık ya da organlara iletimin invazif olmayan şekilde izlenmesine ve ölçülmesine imkan sağlamaktadır.

DOTA-Bn-DSPE bifonksiyonel şelatör DOTA ile işlevselleştirilmiş DSPE'dir. Tez çalışması kapsamında tarafımızca Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı şekilde sentezlenmiştir. Lipozomal formülasyonların yüzeyinin pozitron yayan ^{68}Ga radyoizotopu ile işaretlenerek ileride PET/BT ile glioma görüntüleme ve tedavi etkinliğini izleme imkanı sağlayabilmek amacıyla yüzeyi DOTA-Bn-DSPE ile modifiye edilmiştir. Bölüm 3.3.1.'de anlatıldığı şekilde sentezlenen DOTA-Bn-DSPE'nin İTK kromatogramı ve kütle spektrum profili literatürle uyumlu bulunmuştur (150).

5.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hazırlanması

Literatürdeki benzer çalışmalar (162, 172, 173, 178, 179) ile Ana Bilim Dalı'mızda yapılmış önceki çalışmalardan (28, 141, 142, 148) faydalanarak çalışmalar sonucunda en yüksek enkapsülasyon etkinliğini, uygun zeta potansiyeli ve en küçük ortalama partikül boyutu ve dağılımına ulaşmayı sağlayan lipid ve bileşen molar oranları ve hazırlama işlemleri seçilerek optimum formülasyonlar hazırlanmıştır.

5.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Karakterizasyonu

Bu kısımda Bölüm 3.5.'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirilen lipozomal formülasyonların ortalama partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyel ve enkapsülasyon etkinliğine ilişkin çalışmalar tartışılmıştır.

Nanopartiküller düzgün dizilmiş endotel hücreleri arasından normal dokulara geçemezken, tümörde endotel yapısının bozulması sonucu EPR etkisine bağlı olarak

tümörlü dokuya penetrasyon sağlanabilmektedir. Bu nedenle ortalama partikül boyutu, dağılımı ve zeta potansiyeli EPR etkisi ile pasif olarak tümörlü dokuya hedeflemede oldukça önemlidir. Partikül büyüklüğü lipozomun biyodağılımını, kanda kalış süresini ve hedef dokuya ulaşma başarısını etkilemektedir.

Bölüm 3.4.2.'de anlatıldığı gibi lipozom formülasyonlarının partikül boyutu ekstrüzyon işlemi uygulanarak küçültülmüştür. F1, F2, F3 ve F4 lipozom formülasyonlarının ortalama partikül boyutlarında anlamlı bir fark olmaksızın 181-193 nm aralığında bulunmuştur (Tablo 4.2.).

Literatürde 50-300 nm partikül boyutuna sahip lipozomal formülasyonların kan dolaşımında uzun süre kalarak ve ilacın biyolojik yarı ömrünü uzatırken, renal klirensini azaltılabildiği belirtilmiştir (199). Partikül boyutu 200 nm'nin altında olan lipozomların RES hücrelerince opsonizasyonlarının azaldığı ve dolaşımında uzun süre kaldıkları belirtilmektedir (200, 201). Bu bilgiler göz önünde bulundurulduğunda hazırlanan lipozom formülasyonlarının tümör dokusuna pasif olarak hedeflemeye uygun partikül boyutuna sahip olduğu düşünülmektedir.

PDI partiküllerin büyüklük dağılımının homojenliği anlamına gelir ve bu değer 0,1 ile 0,25 arasında olması dar bir partikül büyüklüğü dağılımı anlamına gelirken 0,5'i aşması genelde istenen bir durum değildir (202). Hazırlanan formülasyonların PDI değerleri 0.15-0.18 aralığında bulunmuş ve partikül boyutlarının homojen olarak dağıldığı anlaşılmıştır (Tablo 4.2.).

Zeta potansiyel nanopartiküllerin yüzey tabakaları ile ortam arasındaki elektrik potansiyeli farkıdır. Zeta potansiyelin belirli seviyelerde olması partikül/veziküllerin agregasyonunu engelleyerek *in vitro* stabilitesini artırmaktadır. Zeta potansiyel nanopartiküllerin raf ömrünü ve stabiliteleri ile sistemik dolaşımında kalış sürelerini etkilemektedir (202).

Pozitif yük verici madde olarak SA içeren F3 ve F4 formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri -5 mV civarında, yük verici madde içermeyen nötral F1 ve F2 formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri ise -7 mV civarında bulunmuştur (Tablo 4.2.). Bulunan değerler lipozomların kısa sürede agregasyonunu önlemeye yetecek değerdedir. Pozitif yüklü formülasyonların nötrallere oranla yapısındaki SA nedeniyle daha az negatif olduğu gözlenmiştir.

Enkapsülasyon etkinliği IR780 hapsedilmiş lipozom formülasyonlarının glioma teşhis ve tedavi etkinliği açısından önem taşımaktadır. Hidrofobik madde olan IR780'i lipozomlara yüksek verimle enkapsüle edebilmek için IR780 içeren lipozom formülasyonlarıyla ilgili çalışmalar incelenmiştir (162, 172, 173).

Tablo 4.1.'de görüldüğü üzere DPPC ile 200 ve 40 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda çalışılmış ancak ekstrüzyon sırasında membran filtreye yapışma ve IR780 ile çökme görülmüş ve istenilen enkapsülasyon etkinliğine ulaşılamamıştır. Bu nedenle fosfolipid olarak PL 90G seçilmiş ve sonrasında tekrarlanan denemelerle formülasyona eklenecek diğer ham maddelerle birlikte IR780 molar oranı da düşürülerek oldukça yüksek enkapsülasyon etkinliklerine ulaşılmıştır.

Tablo 4.2.'de görüldüğü gibi F1 formülasyonu için %85, F2 formülasyonu için %81, F3 formülasyonu için %84 ve F4 formülasyonu için %79 enkapsülasyon etkinliği saptanmıştır. Lipozomal formülasyonların IR780 hapsedme etkinlikleri arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$).

5.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların *In Vitro* Salım Profillerinin İncelenmesi

F1, F2, F3 ve F4 lipozomal formülasyonlarından IR780 ilaç salımına ilişkin çalışmalar Bölüm 3.6.'da anlatıldığı şekilde yapılmıştır. IR780'in kümülatif salım yüzde sonuçları ve salım kinetiği Şekil 4.8. ve Tablo 4.3.'te verilmiştir.

Lipozomal formülasyonlardan IR780 salım kinetiği sıfıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Langenbucher modellerine uygunluk açısından incelenmiştir. Elde edilen sonuçların salım modeline uyumunun göstergesi olan determinasyon katsayısı (R^2) incelendiğinde, lipozomal formülasyonların 1972 yılında Weibull dağılımının Langenbucher tarafından kullanılması sonucu tanımlanmış Langenbucher modeline (203) uyduğu saptanmıştır. Fick'in difüzyon yasasına dayanan Langenbucher modeli, salım ortamının hacmi sabit kaldığında ve maddenin salım ortamındaki çözünürlüğünün sınırlı olduğu durumlarda gözlenmektedir (204). Lipozom formülasyonlarında yüksek lipofilitesi sebebiyle salım ortamı olan 20 mM fosfat tamponu (pH:7.4) /%2 (v/v) DMSO'da sınırlı miktarda çözünen IR780 bu modele uymaktadır.

Literatürde yapılan bir çalışmada IR780 hapsedilmiş nanosfer ilaç taşıyıcı sistemdeki salım profilleri incelenmiş ve 50 saat içinde yaklaşık %80 IR780 salımı gözlenmiştir (205). Başka bir çalışmada IR780 içeren naopartiküllerin farklı pH'larda salım profilleri incelenmiş ve karşılaştırılmıştır. Farklı pH'lar için anlamlı bir fark bulunmama ile birlikte nanopartiküllerden 48 saat içinde IR780'in yaklaşık %18'inin salındığı bulunmuştur (77).

Çalışmamızda, lipozomal formülasyonlardan 78 saat içinde %76,48 IR780 salımına ulaşılmış olup literatürde bulunan salım grafikleri ile uyumlu bir grafik elde edilmiştir. Zamana bağlı olarak kontrollü ilaç salımı sağlanmaktadır. Aktif hedefleme için kullanılan NAG ve yük verici madde olan SA varlığının az da olsa IR780 salımını hızlandırdığı ancak anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

5.5. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Ga-68 ile İşaretlenmesi

^{68}Ga jeneratörü, alümina, SnO_2 veya TiO_2 kolonları üzerinde emilmiş ^{68}Ge içerir. ^{68}Ga 'i kolondan ayırtırmak için seyreltik HCl çözeltileri kullanılır. ^{68}Ga , galyumun +3 oksidasyon durumunda bulunduğu kompleksler oluşturur (206, 207). ^{68}Ga 'ın birçok pratik ve ekonomik avantajı vardır. ^{68}Ga , pozitron emisyonu (maksimum enerji=1,92 MeV, ortalama=0,89 MeV) yoluyla %89 bozunan, kısa yarı ömürlü (68 dk.) bir radyonükliddir. Ana radyonüklidin uzun fiziksel yarılanma ömrü (270,8 gün), jeneratörün bir yıla kadar kullanılmasına izin vererek, sahada bir siklotron ihtiyacını ortadan kaldırır, maliyet etkinliği ve kolaylık sağlar. Bununla birlikte, ^{68}Ga 'dan yayılan pozitronun enerjisi, potansiyel olarak daha düşük çözünürlüklü görüntü eldesi sağlayan en yaygın kullanılan PET izotopu olan ^{18}F 'den (maksimum enerji = 0.63 MeV, ortalama = 0.25 MeV) daha yüksektir (208).

^{68}Ga -DOTA kompleksinin *in vivo* iyi stabiliteye sahip olması nedeniyle DOTA en yaygın olarak kullanılan şelatördür (207). Ancak ^{68}Ga -DOTA kompleksinin oluşumu $\sim 90^\circ\text{C}$ 'ye kadar ısıtmayı gerektirir ve bu nedenle ısıya duyarlı bileşiklerin işaretlenmesi için uygun değildir (209). Çalışmada hazırlanan lipozomal formülasyonların ^{68}Ga ile işaretlenmesi sırasında sıcaklığın bir sorun teşkil edip etmeyeceğiyle ilgili Bölüm 3.7.1.'de bahsedilen şekilde bir ön çalışma yapılmıştır.

Formülasyonların 80°C’de 15 dk. inkübe edildikten sonra vezikül yapılarında bir değişiklik olup olmadığı süzme işlemi öncesinde polarizan mikroskop görüntüleri (x40 büyütme) ile sonrasında ortalama partikül boyutu, PDI, zeta potansiyel ölçümü ve enkapsülasyon etkinliği (%EE) hesaplaması ile incelenmiş olup Tablo 4.4. ve Şekil 4.9.’da elde edilen sonuçlara göre 80°C’de 15 dk. muamele sonucunda lipozomların vezikül yapısını koruduğu gözlenmiştir.

PET/BT, gliomaların invazif olmayan fonksiyonel görüntülenmesi, dereceleme, ayırıcı tanı, tümör kapsamının belirlenmesi, cerrahi ve radyoterapinin planlanması, tedavi sonrası izleme ve prognozu amacıyla kullanılabilir (54). Ayrıca tümör nüksünün ameliyat veya radyoterapi sonrası nekroz gibi değişikliklerden ayırt edilmesinde beyin görüntüleme çalışmalarında spesifik radyofarmasötiklerin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir (37).

IR780 hapsedilmiş lipozomal sistemlerin ⁶⁸Ga ile optimum bir verimle ve stabil olarak işaretlenmesi etkili bir radyofarmasötüğün geliştirilmesinde ve doğru teşhis, görüntüleme ve tedavinin izlenmesinde önem taşımaktadır. ⁶⁸Ga ile işaretleme sonrası radyokimyasal safsızlık olarak lipozoma bağlanmayan serbest ⁶⁸Ga veya radyokolloidler incelenmelidir. İşaretleme sonrası radyokimyasal safsızlıkların miktarını belirlemek dispersiyondaki aktivitenin ne kadarının lipozoma bağlanmış aktiviteden kaynaklandığını saptamaya yardımcı olmaktadır.

Bölüm 3.7.’de anlatıldığı şekilde işaretlenen F1, F2, F3 ve F4 lipozom formülasyonlarının işaretleme verimlerine dair sonuçlar Bölüm 4.5.’te verilmiştir. Tablo 4.5.’te görüldüğü üzere 80°C, pH 3,5 ve 5 dk. inkübasyon süresinde tüm formülasyonlar için %45-49 arası işaretleme verimine ulaşılmıştır. 80°C’de 60°C’ye göre pH 3,5’da, 4,5’a oranla ve 5 dk. inkübasyon süresinde 15 dk.’ya göre işaretleme veriminin tüm formülasyonlarda artış gösterdiği sonucuna varılmıştır (p<0,05). Literatürde DTPA içeren lipozomların serbest ⁶⁸Ga ve radyokolloidlere ilişkin yüzde miktarlarının İTK analizi ile saptandığı çalışmalar bulunmaktadır (152, 210).

Çalışmamızda son dönemde oldukça popüler olan ve özellikle pozitron yayan radyonüklidlerin işaretlenmesi için kullanılan DOTA şelatör olarak sentez sonrasında lipozomal formülasyonların veziküllerinin yüzeyine modifiye edilmiş ve %45-49 arası işaretleme verimine ulaşılmıştır. Ayrıca lipozomal formülasyonların ⁶⁸Ga ile 120 dk.

boyunca *in vitro* olarak işaretleme stabilitesini koruduğu ve radyokimyasal saflığının yaklaşık %40 civarında olduğu saptanmıştır.

Literatürde Ga-68 ile işaretli nanopartiküler formülasyonlar ile yapılan çalışmalarda (211-214) işaretleme veriminin ve şelatör madde olarak kullanılan DOTA-Bn-DSPE veriminin sentez esnasında beklenenden düşük bulunması nedeniyle lipozomal formülasyonların Ga-68 ile işaretleme verimleri bir miktar düşük bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (211-214).

5.6. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Stabilitate Çalışması

Lipozomal formülasyonların *in vitro* stabilitesinin değerlendirilmesinde ortalama partikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli ve %EE'nin izlenmesi önem taşımaktadır. F1, F2, F3 ve F4 lipozom formülasyonlarının 4°C ve 25°C'deki 90 günlük stabiliteleri Bölüm 3.8.'de anlatıldığı şekilde değerlendirilmiştir. Lipozomların stabilite çalışmalarına ilişkin sonuçlar Şekil 4.10., Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.'de verilmiştir.

Tüm formülasyonların ilk bir ay boyunca ortalama partikül boyutu değişiminde anlamlı bir fark olmamıştır. 4°C'de bekletilen formülasyonlarda 25°C'de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha az partikül boyutu artışı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Hem 4°C'de hem de 25°C'de bekletilen pozitif yüklü formülasyonlarda nötrallere oranla daha az ortalama partikül boyutu artışı gözlenmiştir ($p > 0,05$). Bunun, pozitif yüklü lipozomların yapısındaki yük nedeniyle veziküllerde daha az agregasyon gözlenmesine bağlı olduğu düşünülmektedir. Aynı sıcaklıkta saklanan ve aynı yüke sahip hedeflendirilmiş formülasyonlarda hedeflendirilmemişlere oranla daha fazla partikül boyutu artışı gözlenmiştir ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0,05$).

Tüm formülasyonlar için ilk bir ay boyunca %EE değişiminde anlamlı bir fark izlenmemiştir ($p > 0,05$). 4°C'de bekletilen formülasyonlarda 25°C'de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha az %EE azalışı gözlenmiştir ($p < 0,05$). Hem 4°C'de hem de 25°C'de bekletilen hedeflendirilmiş formülasyonlarda hedeflendirilmemişlere oranla ve pozitif yüklü olanlarda nötral olanlara oranla %EE azalışında 1 ay boyunca anlamlı

bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). 4°C’de saklanan nötral formülasyonlarda pozitif yüklü formülasyonlara oranla 1 aydan sonra daha fazla %EE azalışı gözlenmiştir ($p<0,05$). Bunun, pozitif yüklü lipozomların yapısındaki yük nedeniyle daha az agregasyon gözlenmesi ve böylece veziküllere hapsedilen IR780 sızmasının nötrallere oranla daha az olmasına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Tüm formülasyonlar için ilk bir ay boyunca zeta potansiyel değişiminde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). 25°C’de bekletilen formülasyonlarda 4°C’de bekletilenlere oranla 3 ay boyunca daha fazla zeta potansiyel değişimi gözlenmiştir ($p<0,05$). 4°C’de bekletilen pozitif yüklü formülasyonlarda nötral formülasyonlara oranla daha az zeta potansiyel değişimi gözlenmiştir ($p<0,05$).

Sonuçlar ışığında 25°C’de saklanan lipozomlarda 30. günden sonra agregasyon probleminin ortaya çıkabileceği ve buna bağlı olarak ortalama partikül boyutunda artış, zeta potansiyelde değişim ve sızma nedeniyle %EE’nde azalmanın anlamlı derecede olabileceği ve lipozomal formülasyonların buzdolabında saklanması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

5.7. Lipozomal Formülasyonların *In Vitro* Hücre Kültürü Çalışmaları

In vitro hücre kültürü çalışmalarında, glioblastoma hücrelerinde artmış GLUT1 reseptör ekspresyonu nedeniyle NAG ile aktif hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş nötral ve pozitif yüklü IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonların hücreler üzerindeki etkinliğini izlemek amacıyla glioma hücre hatlarında çalışılmıştır. Literatürde NAG ile hedeflendirmede GLUT-1 ekspresyonunun daha fazla olduğu belirtilen C6 hücre hattında çalışmalar daha çoğunlukla yapılmışken (178, 179), temin edilmesi tez kapsamında yapılan projenin bütçe kısıtlılığından dolayı mümkün olmadığı için onun yerine halihazırda varolan GLUT-1 reseptör ekspresyonu olduğu düşünülen RG2 ve U87 hücre hatları kullanılmıştır. Sitotoksitesite çalışmalarında kontrol olarak yine elimizde varolan ve Amerikan Farmakopesi (USP)’nde kullanılabilir hücre hatları arasında bulunan L929 fare fibroblast hücre hattı tercih edilmiştir.

5.7.1. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının NIR Görüntüleme ile İncelenmesi

Bölüm 3.9.1.'de anlatıldığı şekilde IR780 hapsedilmiş F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisinin zamana bağlı olarak U87 ve RG2 hücre hatlarındaki hücreye giriş yoğunluğunun floresans şiddeti *in vivo* görüntüleme sistemi IVIS'te görüntülerinin alınması ile incelenmiştir. Şekil 4.13. ve Şekil 4.14.'teki IVIS görüntüleri ve Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.'da verilen grafiklerden de anlaşılacağı üzere 4 saatlik inkübasyon sonunda bile formülasyonların hücre içinde tutulabildiği görülmüştür.

U87 ve RG2 hücre hatlarından *in vivo* görüntüleme sistemi IVIS ile alınan görüntüler ile grafiklerden de anlaşılacağı üzere serbest IR780'nin başlangıçta hücrelere çok hızlı bir şekilde girdiği ve yine aynı şekilde çok hızlı bir şekilde hücrelerden çıkışı gözlenirken, IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonların U87 ve RG2 hücre hatlarına zamana bağlı olarak yavaş ve kontrollü bir şekilde giriş gösterdiği ve bu nedenle zamana bağlı olarak hücre içindeki IR780 şiddetinde formülasyonlara bağlı olarak artış gözlemlendiği saptanmıştır. Serbest IR780'in ilk ve hızlı hücreye girişine bağlı olarak floresans parlaklığının arttığı ancak inkübasyon süresi arttıkça hücre girişinin azaldığı saptanmıştır. IR780 içeren lipozomal formülasyonların kontrollü bir şekilde alınımının göstergesi olarak hücre içindeki yoğunluklarının zamana bağlı olarak girişlerinden dolayı arttığı tespit edilmiştir ($p<0.05$).

Hem RG2 hem de U87 hücre hatlarında NAG ile hedeflendirilmiş F2 ve F4 formülasyonlarının 1 ve 2 saatlik inkübasyon sürelerinde hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluğuna ulaştığı gözlenmiştir. Pozitif yüklü F3 ve F4 formülasyonlarının ise nötral F1 ve F2 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluk gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$).

4 saatlik inkübasyon süresi sonunda RG2 ve U87 hücre hatlarında tüm formülasyonlar için en fazla hücre içi yoğunluk değerleri izlenmiştir. 4 saatlik inkübasyon süresi sonunda U87 hücre hattında F2 ve F4 formülasyonlarının hücre içi yoğunlukları F1 ve F3 formülasyonlara oranla daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$). RG2

hücre hattında F2 ve F4 formülasyonlarının F1 ve F3 formülasyonlardan daha fazla hücre içi yoğunluğa ulaştığı gözlenmiştir ($p < 0.05$).

Bu sonuçlar, Bölüm 4.7.2.'de verilen hedeflendirilmiş F2 ve F4 lipozom formülasyonlarının floresans görüntülerinin MFI değerlerinin daha yüksek olması sonucuyla paralellik göstermektedir.

5.7.2. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Hücre Tutulumlarının Floresans Mikroskobu ile Gösterilmesi

Rhodaminle konjuge F1, F2, F3 ve F4 formülasyonlarının RG2 hücre hattındaki tutulumları floresans mikroskobu ile Bölüm 3.9.2.'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Şekil 4.17.'de 2 saat inkübasyon süresi sonunda hücrelerden alınan görüntüler ve ImageJ programından elde edilen IR780 MFI değerleri verilmiştir. Resimlerde mavi renk (DAPI) hücre çekirdeğini göstermekte olup yeşil renk ise hücreler tarafından tutulan lipozomları göstermektedir. Rhodamine lipozomal veziküllerin lipid membranına bağlandığı için hücrelere giren lipozom veziküllerini izleme imkanı sunmaktadır.

Görüntülerden anlaşılacağı üzere, hedeflendirilmiş ve hedeflendirilmemiş lipozomal formülasyonlar göz önüne alındığında nötral ve pozitif yüklü formülasyonların hücre girişi arasında anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p > 0,05$).

Hedeflendirilmiş F2 ve F4 formülasyonlarının hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlarından belirgin şekilde fazla hücre içerisine girdiği tespit edilmiştir ($p < 0,05$). Bu sonuç, Bölüm 4.7.1.'de verilen hedeflendirilmiş F2 ve F4 formülasyonların 1 ve 2 saatlik inkübasyon süresinde U87 ve RG2 hücre hattında ve 4 saatlik inkübasyon süresinde RG2 hücre hattında hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlarına göre daha yüksek hücre içi yoğunluğa ulaştığı sonucuyla paralellik göstermektedir.

5.7.3. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların Termal Etkinliğinin Değerlendirilmesi

NIR ışığı (808 nm, 0,8-1W/cm²) maruziyeti sonrası lipozomal formülasyonların sıcaklık artışını incelemek ve etkinlik sağlayabilecek optimum NIR ışığı uygulama süresini saptamak amacıyla Bölüm 3.9.3.'te anlatıldığı şekilde yapılan çalışma sonrasında optimum süre olarak 10 dk. seçilmiştir.

IR780 içeren nanopartiküllerle yapılan bir çalışmada, IR780 içeren nanopartiküller, kontrol grubu olarak serbest IR780 çözeltisi ve fosfat tamponu 5 dk. boyunca (808nm, 1W/cm²) NIR ışığına maruz bırakılmış ve her 30 sn.de ölçüm alınmıştır. Nanopartiküllerin sıcaklığı 90 sn.de ~ 25°C'den ~ 47°C'ye ulaştığı ve maksimum ulaşılan sıcaklığın ~ 53°C olduğu görülmüştür. IR780'in fototermal aktivitesi doğrulanmış ve literatürle uyumlu bulunmuştur (77).

5.7.4. NAG ile Hedeflendirilmiş ve Hedeflendirilmemiş, IR780 Hapsedilmiş, DOTA-Bn-DSPE İçeren, PEGlenmiş, Nötral ve Pozitif Yüklü Lipozomların PDT/PTT Etkinliğinin Değerlendirilmesi

F1, F2, F3 ve F4 formülasyonları ve serbest IR780 çözeltisinin, U87 ve RG2 hücre hatları üzerindeki sitotoksitesini incelemek amacıyla Bölüm 3.9.4.'te anlatıldığı şekilde MTT analizi yapılmış ve NIR ışığına maruz bırakılan hücrelerin hücre canlılığı ile NIR ışığına maruz bırakılmayan hücrelerin hücre canlılığı IR780 hapsedilmiş formülasyonların PDT/PTT etkisini değerlendirmek amacıyla incelenerek karşılaştırılmıştır.

Şekil 4.18. ve Şekil 4.19.'daki grafiklerde görüldüğü üzere serbest IR780 ve IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonlar ile inkübe edilmiş RG2 ve U87 hücre hatlarının NIR ışığına (808 nm, 1 W cm⁻²) maruz bırakılanlarda, NIR ışığına maruz bırakılmayanlara oranla hücre yaşayabilirliği anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p<0.05).

U87 hücre hattında, hücre canlılığı NIR ışığına maruz bırakılan 1,5 µg/mL konsantrasyonda serbest IR780 çözeltisinde %40'ın altına inerken lipozomal

formülasyonlarda %50'nin üzerinde kalmıştır. RG2 hücre hattında benzer şekilde NIR ışığına maruziyet sonucu serbest IR780 çözeltisinde 1,5 ug/mL konsantrasyonda hücre canlılığı %51'e düşerken lipozomal formülasyonlarda bu değer üzerinde hücre canlılığı tespit edilmiştir. Bunun, lipozomal formülasyonların kontrollü bir şekilde hücre içine alınmasına bağlı olduğu ve zamanla etkisini gösterebilme potansiyeline bağlı olduğu düşünülmektedir.

RG2 hücre hattında GLUT1 reseptör aracılı olarak hücre içine alınan F2 ve F4 formülasyonlarının F1 ve F3 formülasyonlarına oranla daha sitotoksik olduğu tespit edilmiştir ($p>0.05$). U87 hücre hattında NIR ışığına maruziyet sonucu 1,5 ug/mL IR780 konsantrasyonunda F2 ve F4 formülasyonlarında F1 ve F3 formülasyonlarına oranla daha az sitotoksikite izlenmiştir ($p>0.05$). 2016 yılında yapılan bir çalışmada, klorin 6 (Ce6) fotoduyarlaştırıcı ajan ve doksorubisin içeren, NRP-1 reseptörünü hedeflemek için tümör hedefli peptit CGNKRTR (tLyp-1) ile modifiye edilmiş nanopartiküller tasarlamışlardır. Nanopartiküller doksorubisin dirençli meme kanserinin tedavisi için kullanılmış ve bu kombinasyon terapisinde, fotoduyarlaştırıcı birden fazla rol oynamıştır. Bir yandan, PDT ile hücre apoptozunu indüklemiş; öte yandan, ilaca dirençli kanserlerde daha iyi bir tedavi etkinliği için kapsüllenmiş kemo-ilacın doğrudan sitoplazmaya salınması için endolizozom zarlarını bozmuştur. İnsan umbilikal damar endotel hücreleri (HUVEC) ve doksorubisin dirençli insan meme adenokarsinom hücreleri (MCF-7/ADR) üzerinde yapılan *in vitro* çalışmalar, hedeflenmemiş nanopartiküllere (660 nm ışık) kıyasla hedefli nanopartiküllerde hücresel bir alım artışı ve foto-sitotoksikite gelişimi ortaya çıkarmıştır. Ayrıca 660 nm'de 9,8 dk. boyunca ışığa maruz bırakılan hedefli nanopartiküller ile antitümör etkinliğinde bir artış tespit edilmiştir (215). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur.

Bu da NIR ışığı varlığında her iki hücre hattında da IR780 hapsedilmiş lipozomal formülasyonların belirgin PDT/PTT etkinliği olduğunu doğrulamaktadır. Sitotoksik etki tümör tedavisinde NIR ışığı varlığında PDT/PTT etkinliğine aditif etki ile katkı sağlama potansiyelindedir.

5.7.5. Sitotoksisite Çalışması

MTT kolorimetrik deneme, hücre canlılığını gösteren mitokondrinin işlevsel durumunu belirler. Canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrojenaz enzimi, sarı tetrazolyum MTT tuzunu, zarar görmemiş hücrelerde çöktürülen mavi MTT formazan'a indirger. Sonrasında hücre canlılığı spektrofotometrik olarak ölçülür ve uygulama yapılmayan hücrelerin canlılığı %100 kabul edilerek, uygulama yapılan hücrelerin canlılığı bu hücrelere göre yüzde (%) olarak belirlenir (216, 217).

Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon (IC_{50}), bir maddenin belirli bir biyolojik veya biyokimyasal işlevi inhibe etme gücünün bir ölçüsüdür. IC_{50} , belirli bir biyolojik süreci veya biyolojik bileşeni *in vitro* olarak %50 oranında inhibe etmek için belirli bir inhibitör maddenin (örneğin ilaç) ne kadarının gerekli olduğunu gösteren nicel bir ölçüdür (218). Düşük IC_{50} değeri, yüksek sitotoksik etki anlamına gelmektedir.

U87, RG2 ve L929 hücre hatları üzerinde MTT analizi yapılan tüm lipozom formülasyonları ve serbest IR780 çözeltilerine ilişkin sonuçlar Tablo 4.6.'da verilmiştir. Ayrıca yine MTT analizi ile tespit edilen serbest IR780 ve formülasyonların hücre canlılığına etkileri Şekil 4.20., Şekil 4.21. ve Şekil 4.22.'de verilen grafiklerde gösterilmiştir.

Serbest IR780 çözeltisinin RG2 ve L929 hücre hattında IC_{50} değerinin istatistiksel açıdan önemli derecede düşük ($p<0.05$) bulunması sitotoksisitesinin yüksek olduğunu göstermektedir. IR780 hapsedilmiş formülasyonların ise genel olarak sitotoksisitesinin IR780 çözeltisinden daha az olması, formülasyonlardan IR780 salımının zamana bağlı olarak kontrollü şekilde olduğunu göstermektedir.

Formülasyonların IC_{50} değerlerinin genel olarak kontrol grubu olan L929 hücre hattında RG2 ve U87 hücre hatlarından daha yüksek bulunması ($p<0.05$) sitotoksisitenin fibroblast hücre hattında daha düşük olduğunu göstermektedir. Hedeflendirilmiş pozitif yüklü F4 formülasyonunun U87 hücre hattında sitotoksisitesinin hedeflendirilmiş nötral olan F2 formülasyonuna göre anlamlı derecede düşük olması hücre içine kontrollü bir şekilde girişine bağlı olabileceği düşünülmektedir ($p<0.05$).

Aynı hücre hatlarında GLUT-1 reseptörüne hedeflemeden bağımsız olarak pozitif yüklü F3 lipozomlarının IC_{50} değerlerinin nötral olan F1 formülasyonundan

daha düşük olması sitotoksitelerinin anlamlı derecede fazla olduğu anlamına gelmekte olup pozitif yüklü lipozomların nötral lipozomlara göre membran yükleri sebebiyle hücre membranına tutulumunun fazla olmasına bağlı olabileceği düşünülmektedir ($p < 0.05$). Doksorubisin enkapsüle pozitif yüklü lipozomlar ve kontrol grubu olarak nötral lipozomlar hazırlanarak yapılan bir çalışmada pozitif yüklü lipozomların KB hücre hattında tutulumları ve KB ve L1210 hücre hatlarındaki sitotoksiteleri incelenmiş ve pozitif yüklü lipozomların KB hücreleri tarafından tutulumlarının nötral lipozomlara kıyasla floresan mikroskobu ile analizinde oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca pozitif yüklü lipozomların nötral lipozomlara kıyasla her iki hücre hattında da IC_{50} değerlerinin daha düşük bulunması sitotoksitelerinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni olarak pozitif yüklü lipozomların elektrostatik etkileşim yoluyla hücrelerle etkileşime girme, endositoz yoluyla içselleştirmeyi indüklemeye ve endozomal kaçış yoluyla sitozole ilaç salınımını kolaylaştırma yeteneği olabileceği düşünülmüştür (219). Çalışmamızda elde edilen sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur.

RG2 hücre hattında hedeflendirilmiş F2 formülasyonunun IC_{50} değerinin F1 formülasyonundan bir miktar ($p > 0.05$) ve hedeflendirilmiş F4 formülasyonunun F3 formülasyonundan anlamlı derecede yüksek ($p < 0.05$) bulunması hücre içine lipozom formülasyonlarının reseptör aracılı olarak kontrollü bir şekilde girişine bağlı olarak gözlemlendiğini düşündürmektedir. Şekil 4.20-4.22.'de de görülebildiği gibi ışıksız ortamda tüm hücre hatlarında lipozomal formülasyonlar serbest IR780'e benzer ancak formülasyonların hücre membranından kontrollü girişine bağlı olarak daha az sitotoksik etki gösterdiği saptanmıştır. Işıksız ortamda gözlenen bu sitotoksik etki NIR ışığı varlığında gözlenen PDT etkisine sinerjistik ya da aditif şekilde katkı sağlama potansiyeline sahiptir. Bir fotoduyarlayıcı olan mezo-tetra hidroksifenilklorin (m-THPC) ile yapılan çalışmada serbest m-THPC ve nanopartiküle hapsedilmiş m-THPC'nin C6 hücre hattında sitotoksiteleri değerlendirilmiş ve serbest m-THPC'nin sitotoksitesinin daha fazla olduğu saptanmıştır (220). Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇLAR

Tez çalışması kapsamında glioblastomanın teşhis ve tedavisi için beyindeki tümör hücrelerinde yüksek oranda eksprese olan GLUT1'e aktif olarak hedeflendirilmesi amacıyla NAG ile modifiye edilmiş; PET/BT görüntüleme amacıyla ⁶⁸Ga ile işaretlenmiş, PDT/PTT ve NIR görüntüleme amacıyla fotoduyarlastırıcı IR780 enkapsüle edilmiş, PEG kaplı, nanoboyutlu nötral ve pozitif yüklü teranostik lipozomlar başarılı bir şekilde formüle edilmiş ve karakterizasyon, işaretleme verimi, işaretlemenin stabilitesi, *in vitro* salım profilleri, stabilite çalışmaları yapılmıştır. Multifonksiyonel lipozomların hücre tutulumları RG2 ve U87 glioblastoma hücre hattında NIR görüntüleri, RG2 hücre hattında floresans mikroskop görüntüleri alınarak ve PDT/PTT etkinlikleri 808 nm NIR ışığı 10 dk. maruz bırakılarak değerlendirilmiştir. Sitotoksiteleri RG2, U87 ve L929 fibroblast (kontrol olarak) hücrelerinde değerlendirilmiştir. Çalışmalar sonucunda;

- Lipozom formülasyonlarının ortalama partikül boyutu 181-193 nm ve PDI değeri 0,1-0,2 aralığında bulunmuştur.
- Pozitif yüklü F3 ve F4 formülasyonların zeta potansiyel değerleri -5mV civarında, nötral F1 ve F2 formülasyonların zeta potansiyel değerleri -7mV civarında bulunmuştur.
- Tüm formülasyonların enkapsülasyon etkinliği yüzdeleri %79-85 aralığında bulunmuştur.
- IR780 içeren lipozomlar Langenbucher kinetiğine uygun salım göstermiştir.
- Yapısında DOTA-Bn-DSPE şelat yapıcı içeren lipozomlar Ga-68 ile 80°C, pH: 3,5 ve 5 dk. inkübasyon süresinde maksimum işaretleme verimi (%45-49) göstermiş ve 2 saat sonunda yaklaşık %40 civarında işaretleme verimi ile işaretlemenin stabilitesini koruduğu gözlenmiştir.
- Yapılan stabilite çalışmalarında lipozom formülasyonlarının 30 gün boyunca ortalama partikül boyutu, zeta potansiyel ve %EE'de anlamlı bir değişiklik olmadığı tespit edilmiş, 1 aydan sonra 25°C'de saklanan formülasyonlarda anlamlı değişiklikler ortaya çıkmıştır. Bu nedenle lipozomal formülasyonların 4°C'de 30 gün boyunca stabil kaldığı saptanmıştır.

- IR780 enkapsüle edilmiş lipozomal formülasyonların U87 ve RG2 hücre hatlarına zamana bağlı olarak yavaş ve kontrollü bir şekilde giriş gösterdiği ve bu nedenle zamana bağlı olarak hücre içindeki IR780 şiddetinde formülasyonlara bağlı olarak belirgin artış gözlemlendiği saptanmıştır.
- Hem RG2 hem de U87 hücre hatlarında NAG ile hedeflendirilmiş F2 ve F4 formülasyonlarının 1 ve 2 saatlik inkübasyon sürelerinde hedeflendirilmemiş F1 ve F3 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluğuna ulaştığı gözlemlenmiştir. Pozitif yüklü F3 ve F4 formülasyonlarının ise nötral F1 ve F2 formülasyonlara oranla daha yüksek hücre içi yoğunluk gösterdiği saptanmıştır.
- NAG ile hedeflendirilmiş formülasyonların hedeflendirilmemiş formülasyonlara oranla RG2 hücre hattında daha çok tutulduğu floresan görüntüleme ve ImageJ'den alınan MFI değerleri ile doğrulanmıştır.
- Lipozom formülasyonlarına uygulanacak optimum NIR ışığı uygulama süresi 10 dk. olarak saptanmıştır.
- NIR ışığına (808 nm, 0,8-1W/cm²) 10 dk. maruziyet sonrası lipozomal formülasyonlarda PTT etkinliğine katkı sağlayabilecek anlamlı sıcaklık artışı (7-10°C) ve ışığa maruz bırakılan ve bırakılmayan IR780 içeren lipozomal formülasyonların her iki hücre hattında % hücre canlılığında belirgin düşüş gözlemlenmiş ve potansiyel PDT/PTT etkinliği saptanmıştır.
- Sitotoksitesite testinde lipozom formülasyonlarıyla aynı miktarda IR780 içeren çözeltinin IR780 enkapsüle edilmiş formülasyonlardan daha yüksek sitotoksitesite göstermesi lipozomlardan ilaç salımının istenen şekilde kontrollü biçimde olduğunu göstermektedir. L929 hücre hattında formülasyonlar daha güvenilir bulunurken, RG2 ve U87 hücre hatlarında konsantrasyona bağlı olarak kontrol edilebilir sitotoksitesite gösterdikleri sonucuna varılmıştır. Işıksız ortamda gözlenen bu sitotoksik etki NIR ışığı varlığında gözlenen PDT etkisine sinerjistik ya da aditif şekilde katkı sağlama potansiyeline sahiptir.
- Hedeflendirilmiş pozitif yüklü F4 formülasyonunun U87 hücre hattında sitotoksitesitesinin hedeflendirilmiş nötral F2 formülasyonuna göre anlamlı derecede düşük olması hücre içine kontrollü bir şekilde girişine bağlı olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca U87 hücre hattında formülasyonların

genel olarak IC₅₀ değerlerinin RG2 hücre hattındaki formülasyonlara oranla anlamlı derecede yüksek bulunması, lipozomların U87 hücrelerine daha kontrollü girdiğini düşündürmüştür.

- Aynı hücre hatlarında GLUT 1 reseptörüne hedeflemeden bağımsız olarak pozitif yüklü F3 lipozomlarının IC₅₀ değerlerinin nötral olan F1 formülasyonundan daha düşük olması pozitif yüklü lipozomların nötral lipozomlara göre membran yükleri sebebiyle hücre membranına tutulumunun fazla olmasına bağlı olabileceği düşünölmektedir

Çalışmamız sonucunda formüle edilen hedeflendirilmiş, nötral ve pozitif yüklü IR780 hapsedilmiş, Ga-68 ile işaretilenmiş teranostik lipozomlar glioblastomanın *in vitro* olarak PDT/PTT ile etkili tedavisi ve PET/BT ve NIR görüntölemesi için potansiyel olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar tedavisi oldukça zor olan glioblastomanın tedavisinde konvansiyonel kanser ilaçlarından daha az dozda daha yüksek antikanser aktivite sağlayabilme ve aynı zamanda hem hibrid görüntü alımı ile teşhis ve tedavi etkinliğinin izlenmesi konusunda literatüre katkı sağlayabilme potansiyelindedir.

7. KAYNAKLAR

1. Türkiye İstatistik Kurumu. Ölüm Nedeni İstatistikleri 2019 [Available from: <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2018-30626>].
2. Fleury A, Menegoz F, Grosclaude P, Daures JP, Henry-Amar M, Raverdy N, ve ark. Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France. *Cancer*. 1997;79(6):1195-202.
3. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumours. *Brain Pathol*. 1993;3(3):255-68.
4. Levin V, Leibel S, Gutin P. Neoplasms of the central nervous system. *Cancer: Principles and Practice of Oncology* 6th ed Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2001:2100-60.
5. Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, ve ark. Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2004;64(19):6892-9.
6. Buckner JC. Factors influencing survival in high-grade gliomas. *Semin Oncol*. 2003;30(6 Suppl 19):10-4.
7. DeAngelis LM. Brain tumors. *N Engl J Med*. 2001;344(2):114-23.
8. Nagane M, Huang HJ, Cavenee WK. Causes of drug resistance and novel therapeutic opportunities for the treatment of glioblastoma. *Drug Resist Updat*. 1999;2(1):30-7.
9. Charabati M, Rabanel JM, Ramassamy C, Prat A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends Pharmacol Sci*. 2020;41(1):42-54.
10. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(7):640-65.
11. Sevc J, Daxnerová Z, Haňová V, Koval J. Novel observations on the origin of ependymal cells in the ventricular zone of the rat spinal cord. *Acta Histochem*. 2011;113(2):156-62.
12. Pitz MW, Desai A, Grossman SA, Blakeley JO. Tissue concentration of systemically administered antineoplastic agents in human brain tumors. *J Neurooncol*. 2011;104(3):629-38.
13. Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV, Ojima I. Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem*. 2005;13(17):5043-54.
14. Dinda SC, Pattnaik G. Nanobiotechnology-based drug delivery in brain targeting. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(15):1264-74.
15. Fukuta T, Ishii T, Asai T, Nakamura G, Takeuchi Y, Sato A, ve ark. Real-time trafficking of PEGylated liposomes in the rodent focal brain ischemia analyzed by positron emission tomography. *Artif Organs*. 2014;38(8):662-6.

16. Rip J, Chen L, Hartman R, van den Heuvel A, Reijerkerk A, van Kregten J, ve ark. Glutathione PEGylated liposomes: pharmacokinetics and delivery of cargo across the blood-brain barrier in rats. *J Drug Target*. 2014;22(5):460-7.
17. Mauceri A, Borocci S, Galantini L, Giansanti L, Mancini G, Martino A, ve ark. Recognition of concanavalin A by cationic glucosylated liposomes. *Langmuir*. 2014;30(38):11301-6.
18. Shestov AA, Emir UE, Kumar A, Henry PG, Seaquist ER, Öz G. Simultaneous measurement of glucose transport and utilization in the human brain. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(5):E1040-9.
19. Farrell CL, Pardridge WM. Blood-brain barrier glucose transporter is asymmetrically distributed on brain capillary endothelial luminal and abluminal membranes: an electron microscopic immunogold study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(13):5779-83.
20. Cantuaria G, Magalhaes A, Penalver M, Angioli R, Braunschweiger P, Gomez-Marin O, ve ark. Expression of GLUT-1 glucose transporter in borderline and malignant epithelial tumors of the ovary. *Gynecol Oncol*. 2000;79(1):33-7.
21. Kamal N, Cutie AJ, Habib MJ, Zidan AS. QbD approach to investigate product and process variabilities for brain targeting liposomes. *J Liposome Res*. 2015;25(3):175-90.
22. Qin Y, Fan W, Chen H, Yao N, Tang W, Tang J, ve ark. In vitro and in vivo investigation of glucose-mediated brain-targeting liposomes. *J Drug Target*. 2010;18(7):536-49.
23. Xie F, Yao N, Qin Y, Zhang Q, Chen H, Yuan M, ve ark. Investigation of glucose-modified liposomes using polyethylene glycols with different chain lengths as the linkers for brain targeting. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:163-75.
24. Durak H. Onkolojide kişiselleştirilmiş tedavi ve teranostik yaklaşımlar. *Nükleer Tıp Seminerleri*,(2). 2015;80(4).
25. Kelkar SS, Reineke TM. Theranostics: combining imaging and therapy. *Bioconjug Chem*. 2011;22(10):1879-903.
26. Li S, Goins B, Zhang L, Bao A. Novel multifunctional theranostic liposome drug delivery system: construction, characterization, and multimodality MR, near-infrared fluorescent, and nuclear imaging. *Bioconjug Chem*. 2012;23(6):1322-32.
27. Gunay MS, Ozer AY, Chalon S. Drug Delivery Systems for Imaging and Therapy of Parkinson's Disease. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(4):376-91.
28. Erdogan S, Silindir M. Nanoparticulate Contrast Agents for CT, SPECT and PET Imaging. *HANDBOOK OF NANOBIO MEDICAL RESEARCH: Fundamentals, Applications and Recent Developments: Volume 3 Applications in Diagnostics*: World Scientific; 2014. p. 47-76.
29. Erdem S. Near-infrared dyes and their use in medical science. *Clinical and Experimental Health Sciences*. 2016;6(3):140-6.
30. Agostinis P, Berg K, Cengel KA, Foster TH, Girotti AW, Gollnick SO, ve ark. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(4):250-81.

31. Thomas RG, Jeong YY. NIRF Heptamethine Cyanine Dye Nanocomplexes for Multi Modal Theragnosis of Tumors. *Chonnam Med J.* 2017;53(2):83-94.
32. Wang Y, Liu T, Zhang E, Luo S, Tan X, Shi C. Preferential accumulation of the near infrared heptamethine dye IR-780 in the mitochondria of drug-resistant lung cancer cells. *Biomaterials.* 2014;35(13):4116-24.
33. Wilk KA, Zielińska K, Pietkiewicz J, Skołucka N, Choromańska A, Rossowska J, ve ark. Photo-oxidative action in MCF-7 cancer cells induced by hydrophobic cyanines loaded in biodegradable microemulsion-templated nanocapsules. *Int J Oncol.* 2012;41(1):105-16.
34. Pais-Silva C, de Melo-Diogo D, Correia IJ. IR780-loaded TPGS-TOS micelles for breast cancer photodynamic therapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2017;113:108-17.
35. Li S, Johnson J, Peck A, Xie Q. Near infrared fluorescent imaging of brain tumor with IR780 dye incorporated phospholipid nanoparticles. *J Transl Med.* 2017;15(1):18.
36. Modrek AS, Bayin NS, Placantonakis DG. Brain stem cells as the cell of origin in glioma. *World J Stem Cells.* 2014;6(1):43-52.
37. Jung JH, Ahn BC. Current Radiopharmaceuticals for Positron Emission Tomography of Brain Tumors. *Brain Tumor Res Treat.* 2018;6(2):47-53.
38. Zhang J, Traylor KS, Mountz JM. PET and SPECT Imaging of Brain Tumors. *Semin Ultrasound CT MR.* 2020;41(6):530-40.
39. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, ve ark. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
40. Bangiyev L, Rossi Espagnet MC, Young R, Shepherd T, Knopp E, Friedman K, ve ark. Adult brain tumor imaging: state of the art. *Semin Roentgenol.* 2014;49(1):39-52.
41. Ostrom QT, Cioffi G, Gittleman H, Patil N, Waite K, Kruchko C, ve ark. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016. *Neuro Oncol.* 2019;21(Suppl 5):v1-v100.
42. Peeters MCM, Dirven L, Koekkoek JAF, Gortmaker EG, Fritz L, Vos MJ, ve ark. Prediagnostic symptoms and signs of adult glioma: the patients' view. *J Neurooncol.* 2020;146(2):293-301.
43. Dunet V, Pomoni A, Hottinger A, Nicod-Lalonde M, Prior JO. Performance of 18F-FET versus 18F-FDG-PET for the diagnosis and grading of brain tumors: systematic review and meta-analysis. *Neuro Oncol.* 2016;18(3):426-34.
44. Ge S, Pachter JS. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord. *J Neuroimmunol.* 2006;177(1-2):209-14.
45. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, ve ark. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2016;57(10):4393-402.

46. Engelhardt B, Ransohoff RM. Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol.* 2012;33(12):579-89.
47. Ayub M, Jin HK, Bae JS. The blood cerebrospinal fluid barrier orchestrates immunosurveillance, immunoprotection, and immunopathology in the central nervous system. *BMB Rep.* 2021;54(4):196-202.
48. Georgieva JV, Hoekstra D, Zuhorn IS. Smuggling Drugs into the Brain: An Overview of Ligands Targeting Transcytosis for Drug Delivery across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutics.* 2014;6(4):557-83.
49. Martínez-Ricarte F, Mayor R, Martínez-Sáez E, Rubio-Pérez C, Pineda E, Cordero E, ve ark. Molecular Diagnosis of Diffuse Gliomas through Sequencing of Cell-Free Circulating Tumor DNA from Cerebrospinal Fluid. *Clin Cancer Res.* 2018;24(12):2812-9.
50. Heiss WD, Raab P, Lanfermann H. Multimodality assessment of brain tumors and tumor recurrence. *J Nucl Med.* 2011;52(10):1585-600.
51. Theobald A. *Sampson's Textbook of Radiopharmacy.* 4 ed: Pharmaceutical Press; 2010.
52. Upadhyay N, Waldman AD. Conventional MRI evaluation of gliomas. *Br J Radiol.* 2011;84 Spec No 2(Spec Iss 2):S107-11.
53. Singh H, Maurya V, Gill SS. Computerised Tomography Features in Gliomas. *Med J Armed Forces India.* 2002;58(3):221-5.
54. Chen W, Silverman DH. Advances in evaluation of primary brain tumors. *Semin Nucl Med.* 2008;38(4):240-50.
55. E.C. H. SPECT and SPECT/CT in Oncological Brain Imaging. In: Frago Costa P. SA, Vidovič B., editor. *Brain Imaging.* 1 ed. Wien: European Association of Nuclear Medicine; 2015. p. 26-32.
56. Gambhir SS. Molecular imaging of cancer with positron emission tomography. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(9):683-93.
57. Phelps ME. PET: the merging of biology and imaging into molecular imaging. *J Nucl Med.* 2000;41(4):661-81.
58. Spence AM, Muzi M, Graham MM, O'Sullivan F, Krohn KA, Link JM, ve ark. Glucose metabolism in human malignant gliomas measured quantitatively with PET, l-[C-11] glucose and FDG: Analysis of the FDG lumped constant. *Journal of Nuclear Medicine.* 1998;39(3):440-8.
59. Salancı B. İntrakraniyal Tümörlerde Moleküler Görüntüleme. *Türk Radyoloji Seminerleri.* 2016;4(1):59-71.
60. Belloli S, Brioschi A, Politi LS, Ronchetti F, Calderoni S, Raccagni I, ve ark. Characterization of biological features of a rat F98 GBM model: a PET-MRI study with [18F] FAZA and [18F] FDG. *Nuclear medicine and biology.* 2013;40(6):831-40.
61. Hara T, Kosaka N, Shinoura N, Kondo T. PET imaging of brain tumor with [methyl-11C]choline. *J Nucl Med.* 1997;38(6):842-7.

62. Mitterhauser M, Wadsak W. Imaging biomarkers or biomarker imaging? *Pharmaceuticals (Basel)*. 2014;7(7):765-78.
63. Nairne J, Iveson PB, Meijer A. Imaging in drug development. *Progress in Medicinal Chemistry*. 2015;54:231-80.
64. Prata MI. Gallium-68: a new trend in PET radiopharmacy. *Curr Radiopharm*. 2012;5(2):142-9.
65. Iyer AK, He J. Radiolabeled oligonucleotides for antisense imaging. *Curr Org Synth*. 2011;8(4):604-14.
66. P. H. Single-Photon Emission Computed Tomography (SPECT). In: Aminoff M.J. DRB, editor. *Encyclopedia of the Neurological Sciences*. 4. 2 ed. Bethesda,MD2014. p. 173-8.
67. Ancrì D, Basset JY. Diagnosis of cerebral metastases by thallium 201. *Br J Radiol*. 1980;53(629):443-53.
68. Bénard F, Romsa J, Hustinx R. Imaging gliomas with positron emission tomography and single-photon emission computed tomography. *Semin Nucl Med*. 2003;33(2):148-62.
69. Schwartz RB, Carvalho PA, Alexander E, 3rd, Loeffler JS, Folkerth R, Holman BL. Radiation necrosis vs high-grade recurrent glioma: differentiation by using dual-isotope SPECT with ²⁰¹Tl and ^{99m}Tc-HMPAO. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1991;12(6):1187-92.
70. Schwartz RB, Holman BL, Polak JF, Garada BM, Schwartz MS, Folkerth R, ve ark. Dual-isotope single-photon emission computerized tomography scanning in patients with glioblastoma multiforme: association with patient survival and histopathological characteristics of tumor after high-dose radiotherapy. *J Neurosurg*. 1998;89(1):60-8.
71. Lee JD, Kim DI, Lee JT, Chang JW, Park CY. Indium-111-pentetreotide imaging in intra-axial brain tumors: comparison with thallium-201 SPECT and MRI. *J Nucl Med*. 1995;36(4):537-41.
72. Shah K, Weissleder R. Molecular optical imaging: applications leading to the development of present day therapeutics. *NeuroRx*. 2005;2(2):215-25.
73. Luwor RB, Stylli SS, Kaye AH. Using bioluminescence imaging in glioma research. *J Clin Neurosci*. 2015;22(5):779-84.
74. Bossolasco P, Cova L, Levandis G, Diana V, Cerri S, Lambertenghi Delilieri G, ve ark. Noninvasive near-infrared live imaging of human adult mesenchymal stem cells transplanted in a rodent model of Parkinson's disease. *Int J Nanomedicine*. 2012;7:435-47.
75. Ha S, Ahn S, Kim S, Joo Y, Chong YH, Suh YH, ve ark. In vivo imaging of human adipose-derived stem cells in Alzheimer's disease animal model. *J Biomed Opt*. 2014;19(5):051206.
76. Yi X, Wang F, Qin W, Yang X, Yuan J. Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:1347-65.

77. Wang K, Zhang Y, Wang J, Yuan A, Sun M, Wu J, ve ark. Self-assembled IR780-loaded transferrin nanoparticles as an imaging, targeting and PDT/PTT agent for cancer therapy. *Sci Rep.* 2016;6:27421.
78. Bush NA, Chang SM, Berger MS. Current and future strategies for treatment of glioma. *Neurosurg Rev.* 2017;40(1):1-14.
79. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, ve ark. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg.* 2001;95(2):190-8.
80. Stummer W, Pichlmeier U, Meinel T, Wiestler OD, Zanella F, Reulen HJ. Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. *Lancet Oncol.* 2006;7(5):392-401.
81. Weller M, Stupp R, Reifenberger G, Brandes AA, van den Bent MJ, Wick W, ve ark. MGMT promoter methylation in malignant gliomas: ready for personalized medicine? *Nat Rev Neurol.* 2010;6(1):39-51.
82. Keime-Guibert F, Chinot O, Taillandier L, Cartalat-Carel S, Frenay M, Kantor G, ve ark. Radiotherapy for glioblastoma in the elderly. *N Engl J Med.* 2007;356(15):1527-35.
83. Walker MD, Alexander E, Jr., Hunt WE, MacCarty CS, Mahaley MS, Jr., Mealey J, Jr., ve ark. Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. A cooperative clinical trial. *J Neurosurg.* 1978;49(3):333-43.
84. Breen WG, Anderson SK, Carrero XW, Brown PD, Ballman KV, O'Neill BP, ve ark. Final report from Intergroup NCCTG 86-72-51 (Alliance): a phase III randomized clinical trial of high-dose versus low-dose radiation for adult low-grade glioma. *Neuro Oncol.* 2020;22(6):830-7.
85. Press RH, Shafer SL, Jiang R, Buchwald ZS, Abugideiri M, Tian S, ve ark. Optimal timing of chemoradiotherapy after surgical resection of glioblastoma: Stratification by validated prognostic classification. *Cancer.* 2020;126(14):3255-64.
86. Weller M, Le Rhun E. How did lomustine become standard of care in recurrent glioblastoma? *Cancer Treat Rev.* 2020;87:102029.
87. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, ve ark. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet.* 1995;345(8956):1008-12.
88. Westphal M, Hilt DC, Bortey E, Delavault P, Olivares R, Warnke PC, ve ark. A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro Oncol.* 2003;5(2):79-88.
89. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, ve ark. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(28):4733-40.

90. Kreisl TN, Kim L, Moore K, Duic P, Royce C, Stroud I, ve ark. Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol.* 2009;27(5):740-5.
91. Wick W, Gorlia T, Bendszus M, Taphoorn M, Sahm F, Harting I, ve ark. Lomustine and Bevacizumab in Progressive Glioblastoma. *N Engl J Med.* 2017;377(20):1954-63.
92. Hirschberg H, Berg K, Peng Q. Photodynamic therapy mediated immune therapy of brain tumors. *Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2018;5.
93. Kaneko S, Fujimoto S, Yamaguchi H, Yamauchi T, Yoshimoto T, Tokuda K. Photodynamic Therapy of Malignant Gliomas. *Prog Neurol Surg.* 2018;32:1-13.
94. Xu Group. Functional Nanomaterial for Photo-based Theranostics. 2019.
95. Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma--a review Part I--a biological basis. *J Clin Neurosci.* 2006;13(6):615-25.
96. Doughty ACV, Hoover AR, Layton E, Murray CK, Howard EW, Chen WR. Nanomaterial Applications in Photothermal Therapy for Cancer. *Materials (Basel).* 2019;12(5).
97. Liu Y, Bhattarai P, Dai Z, Chen X. Photothermal therapy and photoacoustic imaging via nanotheranostics in fighting cancer. *Chem Soc Rev.* 2019;48(7):2053-108.
98. Bastiancich C, Da Silva A, Estève MA. Photothermal Therapy for the Treatment of Glioblastoma: Potential and Preclinical Challenges. *Front Oncol.* 2020;10:610356.
99. Bajpai AK, Shukla SK, Bhanu S, Kankane S. Responsive polymers in controlled drug delivery. *Progress in Polymer Science.* 2008;33(11):1088-118.
100. Jain KK. Drug delivery systems: Springer; 2008.
101. Sayıner Ö, Çomoğlu T. Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Ecz Fak Derg.* 2016;40(3):62-79.
102. Vural GU, Ozer AY, editors. Drug Delivery Systems and Theranostic use in Nuclear Medicine/Nukleer Tıpta İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Teranostik Kullanımları. *Nuclear Medicine Seminars; 2015: Galenos Yayınevi Tic. Ltd.*
103. Sengel-Türk C, Haşçıçek C. Polimerik nanopartikuler ilaç taşıyıcı sistemlerde yüzey modifikasyonu. 2009.
104. Awasthi R, Bhushan B, Kulkarni GT. Concepts of nanotechnology in nanomedicine: From discovery to applications. *Targeting Chronic Inflammatory Lung Diseases Using Advanced Drug Delivery Systems: Elsevier; 2020. p. 171-209.*
105. Rabinow BE. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(9):785-96.
106. BEKTAŞ AE, UĞUR AB, ÇETİN M. Nanosüspansiyonlar: Hazırlama yöntemleri ve stabilite sorunu. *Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy.* 2018;38(2):85-101.

107. Liversidge GG, Cundy KC. Particle size reduction for improvement of oral bioavailability of hydrophobic drugs: I. Absolute oral bioavailability of nanocrystalline danazol in beagle dogs. *International journal of pharmaceutics*. 1995;125(1):91-7.
108. Mali K. BA, Bothara S., Gavhane Y. Nanogel : A Promising Drug Carrier. *International Journal of Creative Research Thoughts* 2021;9(3):3999-4008.
109. Kecel-Gunduz S, Bicak B, Ozel AE. Drug delivery nanosystems for neural regenerative medicine. *Neural Regenerative Nanomedicine: Elsevier*; 2020. p. 89-122.
110. Bangham AD, Horne R. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *Journal of molecular biology*. 1964;8(5):660-IN10.
111. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International journal of pharmaceutics*. 1997;154(2):123-40.
112. Shehata T, Ogawara K, Higaki K, Kimura T. Prolongation of residence time of liposome by surface-modification with mixture of hydrophilic polymers. *Int J Pharm*. 2008;359(1-2):272-9.
113. Malhotra M, Jain N. Niosomes as drug carriers. *Indian Drugs-Bombay-*. 1994;31:81-.
114. Buckton G. Harwood. *Interfacial phenomena in drug delivery and targeting* academic publishers, Switzerland. 1995:154-5.
115. Nomani S, Govinda J. Nanoliposome: An alternative approach for drug delivery system. *Int J Adv Pharm Med Bioallied Sci*. 2016;2016:1-10.
116. Salimi A, Makhmalzadeh BS, Esfahani G. Polymeric micelle as a new carrier in Oral drug delivery systems. *Asian J Pharm*. 2017;11(4):704-11.
117. Verma R, Verma S, Kumar S. Microsphere-a novel drug delivery system. *Research Chronicle in Health Sciences*. 2019;5(1):5-14.
118. Sharma N, Purwar N, Gupta PC. Microspheres as drug carriers for controlled drug delivery: A review. *International Journal of pharmaceutical sciences and research*. 2015;6(11):4579.
119. Padhi S, Mazumder R, Bisth S. Development and Application of Lipid Nanotechnology on Infectious Diseases of CNS-Current Scenario. *Ind J Pharm Educ Res*. 2019;53(3):355-65.
120. Lembo D, Cavalli R. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antivir Chem Chemother*. 2010;21(2):53-70.
121. Torchilin VP. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(2):145-60.
122. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Current Nanoscience*. 2005;1(1):47-64.
123. Muthu MS, Singh S. Targeted nanomedicines: effective treatment modalities for cancer, AIDS and brain disorders. *Nanomedicine (Lond)*. 2009;4(1):105-18.

124. Muthu MS, Kulkarni SA, Xiong J, Feng SS. Vitamin E TPGS coated liposomes enhanced cellular uptake and cytotoxicity of docetaxel in brain cancer cells. *Int J Pharm.* 2011;421(2):332-40.
125. Ravar F, Saadat E, Gholami M, Dehghankelishadi P, Mahdavi M, Azami S, ve ark. Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *J Control Release.* 2016;229:10-22.
126. Szczepanowicz K, Bzowska M, Kruk T, Karabasz A, Bereta J, Warszynski P. Pegylated polyelectrolyte nanoparticles containing paclitaxel as a promising candidate for drug carriers for passive targeting. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;143:463-71.
127. Zhang L, Jiang Y, Zheng Y, Zeng Y, Yang Z, Huang G, ve ark. Selective killing of Burkitt's lymphoma cells by mBAFF-targeted delivery of PinX1. *Leukemia.* 2011;25(2):331-40.
128. Choi IK, Strauss R, Richter M, Yun CO, Lieber A. Strategies to increase drug penetration in solid tumors. *Front Oncol.* 2013;3:193.
129. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting. *Nanomedicine (Lond).* 2013;8(9):1509-28.
130. Hegde MM, Prabhu S, Mutalik S, Chatterjee A, Goda JS, Rao S. Multifunctional lipidic nanocarriers for effective therapy of glioblastoma: recent advances in stimuli-responsive, receptor and subcellular targeted approaches. *Journal of Pharmaceutical Investigation.* 2021:1-26.
131. Ehlerding EB, Goel S, Cai W. Cancer theranostics with ⁶⁴Cu/¹⁷⁷Lu-loaded liposomes. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging.* 2016;43(5):938-40.
132. Boerman OC, Laverman P, Oyen WJ, Corstens FH, Storm G. Radiolabeled liposomes for scintigraphic imaging. *Prog Lipid Res.* 2000;39(5):461-75.
133. Deliconstantinos G, Ramantanis G, Todorou DK. Interaction of ^{99m}Tc-labeled liposomes with Walker tumour cells in vitro. Liposome-mediated introduction of thaliblastine into resistant Walker tumour cells. *General Pharmacology.* 1983;14(4):407-11.
134. Torchilin VP, Trubetskoy VS. In vivo visualizing of organs and tissues with liposomes. *Journal of Liposome Research.* 1995;5(4):795-812.
135. Aranda-Lara L, Morales-Avila E, Luna-Gutiérrez MA, Olivé-Alvarez E, Isaac-Olivé K. Radiolabeled liposomes and lipoproteins as lipidic nanoparticles for imaging and therapy. *Chem Phys Lipids.* 2020;230:104934.
136. Soares DC, de Oliveira MC, dos Santos RG, Andrade MS, Vilela JM, Cardoso VN, ve ark. Liposomes radiolabeled with ¹⁵⁹Gd-DTPA-BMA: preparation, physicochemical characterization, release profile and in vitro cytotoxic evaluation. *Eur J Pharm Sci.* 2011;42(5):462-9.
137. Koukourakis MI, Koukouraki S, Fezoulidis I, Kelekis N, Kyrias G, Archimandritis S, ve ark. High intratumoural accumulation of stealth liposomal doxorubicin (Caelyx) in glioblastomas and in metastatic brain tumours. *Br J Cancer.* 2000;83(10):1281-6.

138. Kumar P, Van Treuren T, Ranjan A, Vishwanatha JK. Liposomal Chitosan-N-Acetyl Cysteine Nanoparticle for In-Vitro/In-Vivo Near Infrared Fluorescent (NIR) Imaging. 2019.
139. Shibata S, Shinozaki N, Suganami A, Ikegami S, Kinoshita Y, Hasegawa R, ve ark. Photo-immune therapy with liposomally formulated phospholipid-conjugated indocyanine green induces specific antitumor responses with heat shock protein-70 expression in a glioblastoma model. *Oncotarget*. 2019;10(2):175-83.
140. Lu YJ, S AT, Chuang CC, Chen JP. Liposomal IR-780 as a Highly Stable Nanotheranostic Agent for Improved Photothermal/Photodynamic Therapy of Brain Tumors by Convection-Enhanced Delivery. *Cancers (Basel)*. 2021;13(15).
141. Gunay Silindir M. Parkinson Hastalığı'nın Teşhis ve Tedavisi için Kullanılacak Nanoboyutlu Teragnostik İmmünolipozom/İmmünoniozomlar Üzerine İn Vitro İn Vivo Çalışmalar [Doktora Tezi]. Ankara-Tours: Hacettepe Üniversitesi – François Rabelais de Tours University; 2016.
142. Karpuz M. Küçük Hücreli Dışı Akciğer Kanseri Hücrelerine Hedeflendirilmiş Kombine İlaç İçeren Teranostik Lipozomların Etkinliğinin İzlenmesi. 2019.
143. Karpuz M, Silindir-Gunay M, Kursunel MA, Esendagli G, Dogan A, Ozer AY. Design and in vitro evaluation of folate-targeted, co-drug encapsulated theranostic liposomes for non-small cell lung cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2020;57:101707.
144. Karpuz M, Silindir-Gunay M, Ozer AY, Ozturk SC, Yanik H, Tuncel M, ve ark. Diagnostic and therapeutic evaluation of folate-targeted paclitaxel and vinorelbine encapsulating theranostic liposomes for non-small cell lung cancer. *Eur J Pharm Sci*. 2021;156:105576.
145. Liko F. Tümör Teşhis ve Tedavisi İçin Geliştirilen Nanoboyutta Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemler Üzerinde İn Vitro Çalışmalar [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2011.
146. Silindir Gunay M. The Formulation of Methylene Blue Encapsulated, Tc-99m Labeled Multifunctional Liposomes for Sentinel Lymph Node Imaging and Therapy. *Turk J Pharm Sci*. 2020;17(4):381-7.
147. Silindir Gunay M, Ozer AY, Erdogan S, Geuilloteau D, Chalon S. Comparative Evaluation of Pramipexole Encapsulated Theranostic Liposomes And Niosomes For Parkinson s Disease.
148. Silindir M. SPECT/BT Yöntemi ile Tümör Teşhis ve Görüntülenmesinde Kullanılacak Nanoboyutlu Lipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi [Yüksek Lisans Tezi]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi; 2009.
149. Silindir M, Erdoğan S, Özer AY, Doğan AL, Tuncel M, Uğur Ö, ve ark. Nanosized multifunctional liposomes for tumor diagnosis and molecular imaging by SPECT/CT. *J Liposome Res*. 2013;23(1):20-7.
150. Lee SG, Gangangari K, Kalidindi TM, Punzalan B, Larson SM, Pillarsetty NVK. Copper-64 labeled liposomes for imaging bone marrow. *Nucl Med Biol*. 2016;43(12):781-7.

151. Kaul A, Chaturvedi S, Attri A, Kalra M, Mishra A. Targeted theranostic liposomes: rifampicin and ofloxacin loaded pegylated liposomes for theranostic application in mycobacterial infections. *RSC advances*. 2016;6(34):28919-26.
152. Helbok A, Decristoforo C, Dobrozemsky G, Rangger C, Diederer E, Stark B, ve ark. Radiolabeling of lipid-based nanoparticles for diagnostics and therapeutic applications: a comparison using different radiometals. *J Liposome Res*. 2010;20(3):219-27.
153. Tsai YC, Vijayaraghavan P, Chiang WH, Chen HH, Liu TI, Shen MY, ve ark. Targeted Delivery of Functionalized Upconversion Nanoparticles for Externally Triggered Photothermal/Photodynamic Therapies of Brain Glioblastoma. *Theranostics*. 2018;8(5):1435-48.
154. Kumar Das D, Makhal K, Goswami D. Observing ground state vibrational coherence and excited state relaxation dynamics of a cyanine dye in pure solvents. *Phys Chem Chem Phys*. 2018;20(19):13400-11.
155. Cocco E, Shapiro EM, Gasparrini S, Lopez S, Schwab CL, Bellone S, ve ark. Clostridium perfringens enterotoxin C-terminal domain labeled to fluorescent dyes for in vivo visualization of micrometastatic chemotherapy-resistant ovarian cancer. *Int J Cancer*. 2015;137(11):2618-29.
156. Hoogstins CE, Tummers QR, Gaarenstroom KN, de Kroon CD, Trimbos JB, Bosse T, ve ark. A Novel Tumor-Specific Agent for Intraoperative Near-Infrared Fluorescence Imaging: A Translational Study in Healthy Volunteers and Patients with Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*. 2016;22(12):2929-38.
157. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W, ve ark. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor- α targeting: first in-human results. *Nat Med*. 2011;17(10):1315-9.
158. Di Lorenzo G, Ricci G, Severini GM, Romano F, Biffi S. Imaging and therapy of ovarian cancer: clinical application of nanoparticles and future perspectives. *Theranostics*. 2018;8(16):4279-94.
159. Harmsen S, Teraphongphom N, Tweedle MF, Basilion JP, Rosenthal EL. Optical Surgical Navigation for Precision in Tumor Resections. *Mol Imaging Biol*. 2017;19(3):357-62.
160. Yuan A, Wu J, Tang X, Zhao L, Xu F, Hu Y. Application of near-infrared dyes for tumor imaging, photothermal, and photodynamic therapies. *J Pharm Sci*. 2013;102(1):6-28.
161. Zhang C, Wang S, Xiao J, Tan X, Zhu Y, Su Y, ve ark. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. *Biomaterials*. 2010;31(7):1911-7.
162. Yan F, Duan W, Li Y, Wu H, Zhou Y, Pan M, ve ark. NIR-Laser-Controlled Drug Release from DOX/IR-780-Loaded Temperature-Sensitive-Liposomes for Chemo-Photothermal Synergistic Tumor Therapy. *Theranostics*. 2016;6(13):2337-51.
163. Jiang C, Cheng H, Yuan A, Tang X, Wu J, Hu Y. Hydrophobic IR780 encapsulated in biodegradable human serum albumin nanoparticles for photothermal and photodynamic therapy. *Acta Biomater*. 2015;14:61-9.

164. Yuan A, Qiu X, Tang X, Liu W, Wu J, Hu Y. Self-assembled PEG-IR-780-C13 micelle as a targeting, safe and highly-effective photothermal agent for in vivo imaging and cancer therapy. *Biomaterials*. 2015;51:184-93.
165. Peng CL, Shih YH, Lee PC, Hsieh TM, Luo TY, Shieh MJ. Multimodal image-guided photothermal therapy mediated by ¹⁸⁸Re-labeled micelles containing a cyanine-type photosensitizer. *ACS Nano*. 2011;5(7):5594-607.
166. Ding BS, Dziubla T, Shuvaev VV, Muro S, Muzykantov VR. Advanced drug delivery systems that target the vascular endothelium. *Mol Interv*. 2006;6(2):98-112.
167. Hua S, Wu SY. The use of lipid-based nanocarriers for targeted pain therapies. *Front Pharmacol*. 2013;4:143.
168. Koning GA, Storm G. Targeted drug delivery systems for the intracellular delivery of macromolecular drugs. *Drug Discov Today*. 2003;8(11):482-3.
169. Metselaar JM, Storm G. Liposomes in the treatment of inflammatory disorders. *Expert Opin Drug Deliv*. 2005;2(3):465-76.
170. Himanshu A, Sitasharan P, Singhai A. Liposomes as drug carriers. *IJPLS*. 2011;2(7):945-51.
171. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, ve ark. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian journal of pharmaceutical sciences*. 2015;10(2):81-98.
172. Guo F, Yu M, Wang J, Tan F, Li N. Smart IR780 Theranostic Nanocarrier for Tumor-Specific Therapy: Hyperthermia-Mediated Bubble-Generating and Folate-Targeted Liposomes. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(37):20556-67.
173. Yue C, Yang Y, Song J, Alfranca G, Zhang C, Zhang Q, ve ark. Mitochondria-targeting near-infrared light-triggered thermosensitive liposomes for localized photothermal and photodynamic ablation of tumors combined with chemotherapy. *Nanoscale*. 2017;9(31):11103-18.
174. Nakhaei P, Margiana R, Bokov DO, Abdelbasset WK, Jadidi Kouhbanani MA, Varma RS, ve ark. Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Front Bioeng Biotechnol*. 2021;9:705886.
175. Trucillo P, Campardelli R, Reverchon E. Supercritical CO₂ assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading. *Journal of Co₂ utilization*. 2017;18:181-8.
176. Haeri A, Alinaghian B, Daeihamed M, Dadashzadeh S. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iran J Pharm Res*. 2014;13(Suppl):3-14.
177. Tabandeh H, Mortazavi SA. An Investigation into Some Effective Factors on Encapsulation Efficiency of Alpha-Tocopherol in MLVs and the Release Profile from the Corresponding Liposomal Gel. *Iran J Pharm Res*. 2013;12(Suppl):21-30.
178. Harbi I, Aljaeid B, El-Say KM, Zidan AS. Glycosylated Sertraline-Loaded Liposomes for Brain Targeting: QbD Study of Formulation Variabilities and Brain Transport. *AAPS PharmSciTech*. 2016;17(6):1404-20.

179. Kamal NS, Habib MJ, Zidan AS, Karla PK. NAG-PEGylated multilamellar liposomes for BBB-GLUT transporter targeting. *Cogent Med.* 2019;6(1).
180. Harris JM, Martin NE, Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(7):539-51.
181. Kwon G, Suwa S, Yokoyama M, Okano T, Sakurai Y, Kataoka K. Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly (ethylene oxide-aspartate) block copolymer-adriamycin conjugates. *Journal of Controlled Release.* 1994;29(1-2):17-23.
182. Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Biosci Rep.* 2002;22(2):251-66.
183. Silindir M, Erdoğan S, Özer AY, Maia S. Liposomes and their applications in molecular imaging. *J Drug Target.* 2012;20(5):401-15.
184. Gabizon A, Shmeeda H, Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies. *Clin Pharmacokinet.* 2003;42(5):419-36.
185. Litzinger DC, Buiting AM, van Rooijen N, Huang L. Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1190(1):99-107.
186. Litzinger DC, Huang L. Amphipathic poly(ethylene glycol) 5000-stabilized dioleoylphosphatidylethanolamine liposomes accumulate in spleen. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1127(3):249-54.
187. Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Kojima S, Suginaka A, Iwatsuru M. Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). *Biochim Biophys Acta.* 1992;1128(1):44-9.
188. Woodle MC, Matthey KK, Newman MS, Hidayat JE, Collins LR, Redemann C, ve ark. Versatility in lipid compositions showing prolonged circulation with sterically stabilized liposomes. *Biochim Biophys Acta.* 1992;1105(2):193-200.
189. Erdlenbruch B, Alipour M, Fricker G, Miller DS, Kugler W, Eibl H, ve ark. Alkylglycerol opening of the blood-brain barrier to small and large fluorescence markers in normal and C6 glioma-bearing rats and isolated rat brain capillaries. *Br J Pharmacol.* 2003;140(7):1201-10.
190. Begley DJ. ABC transporters and the blood-brain barrier. *Curr Pharm Des.* 2004;10(12):1295-312.
191. Pardridge WM. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev.* 1983;63(4):1481-535.
192. Maher F, Vannucci SJ, Simpson IA. Glucose transporter isoforms in brain: absence of GLUT3 from the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13(2):342-5.
193. Pardridge WM, Boado RJ, Farrell CR. Brain-type glucose transporter (GLUT-1) is selectively localized to the blood-brain barrier. Studies with quantitative western blotting and in situ hybridization. *J Biol Chem.* 1990;265(29):18035-40.

194. Huang DW, Shen SC, Wu JS. Effects of caffeic acid and cinnamic acid on glucose uptake in insulin-resistant mouse hepatocytes. *J Agric Food Chem.* 2009;57(17):7687-92.
195. Wang J, Wu H, Yang Y, Yan R, Zhao Y, Wang Y, ve ark. Bacterial species-identifiable magnetic nanosystems for early sepsis diagnosis and extracorporeal photodynamic blood disinfection. *Nanoscale.* 2017;10(1):132-41.
196. Wijesiri N, Ozkaya-Ahmadov T, Wang P, Zhang J, Tang H, Yu X, ve ark. Photodynamic Inactivation of Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Using Hybrid Photosensitizers Based on Amphiphilic Block Copolymer-Functionalized Gold Nanoparticles. *ACS Omega.* 2017;2(9):5364-9.
197. De M, Ghosh S, Sen T, Shadab M, Banerjee I, Basu S, ve ark. A Novel Therapeutic Strategy for Cancer Using Phosphatidylserine Targeting Stearylamine-Bearing Cationic Liposomes. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2018;10:9-27.
198. Kilian K. (68)Ga-DOTA and analogs: Current status and future perspectives. *Rep Pract Oncol Radiother.* 2014;19(Suppl):S13-s21.
199. Bae YH, Park K. Targeted drug delivery to tumors: myths, reality and possibility. *J Control Release.* 2011;153(3):198-205.
200. Li Y, Pei Y, Zhang X, Gu Z, Zhou Z, Yuan W, ve ark. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J Control Release.* 2001;71(2):203-11.
201. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006;307(1):93-102.
202. Cho EJ, Holback H, Liu KC, Abouelmagd SA, Park J, Yeo Y. Nanoparticle characterization: state of the art, challenges, and emerging technologies. *Mol Pharm.* 2013;10(6):2093-110.
203. Langenbucher F. Linearization of dissolution rate curves by the Weibull distribution. *J Pharm Pharmacol.* 1972;24(12):979-81.
204. Mircioiu C, Voicu V, Anuta V, Tudose A, Celia C, Paolino D, ve ark. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 2019;11(3).
205. Pietkiewicz J, Wilk KA, Bazylińska U. In vitro studies of serum albumin interaction with poly(D,L-lactide) nanospheres loaded by hydrophobic cargo. *J Pharm Biomed Anal.* 2016;117:426-35.
206. Velikyan I. Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. *Theranostics.* 2013;4(1):47-80.
207. Wadas TJ, Wong EH, Weisman GR, Anderson CJ. Coordinating radiometals of copper, gallium, indium, yttrium, and zirconium for PET and SPECT imaging of disease. *Chem Rev.* 2010;110(5):2858-902.
208. Sánchez-Crespo A, Andreo P, Larsson SA. Positron flight in human tissues and its influence on PET image spatial resolution. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;31(1):44-51.

209. Velikyan I, Maecke H, Langstrom B. Convenient preparation of ^{68}Ga -based PET-radiopharmaceuticals at room temperature. *Bioconjug Chem.* 2008;19(2):569-73.
210. Gholipour N, Akhlaghi M, Mokhtari Kheirabadi A, Geramifar P, Beiki D. Development of Ga-68 labeled, biotinylated thiosemicarbazone dextran-coated iron oxide nanoparticles as multimodal PET/MRI probe. *Int J Biol Macromol.* 2020;148:932-41.
211. Evertsson M, Kjellman P, Cinthio M, Andersson R, Tran TA, In't Zandt R, ve ark. Combined Magnetomotive ultrasound, PET/CT, and MR imaging of (^{68}Ga)-labelled superparamagnetic iron oxide nanoparticles in rat sentinel lymph nodes in vivo. *Sci Rep.* 2017;7(1):4824.
212. Gallo J, Alam IS, Jin J, Gu YJ, Aboagye EO, Wong WT, ve ark. PET imaging with multimodal upconversion nanoparticles. *Dalton Trans.* 2014;43(14):5535-45.
213. Karageorgou MA, Vranješ-Djurić S, Radović M, Lyberopoulou A, Antić B, Rouchota M, ve ark. Gallium-68 Labeled Iron Oxide Nanoparticles Coated with 2,3-Dicarboxypropane-1,1-diphosphonic Acid as a Potential PET/MR Imaging Agent: A Proof-of-Concept Study. *Contrast Media Mol Imaging.* 2017;2017:6951240.
214. Locatelli E, Gil L, Israel LL, Passoni L, Naddaka M, Pucci A, ve ark. Biocompatible nanocomposite for PET/MRI hybrid imaging. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:6021-33.
215. Jiang D, Gao X, Kang T, Feng X, Yao J, Yang M, ve ark. Actively targeting D- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate-poly(lactic acid) nanoparticles as vesicles for chemo-photodynamic combination therapy of doxorubicin-resistant breast cancer. *Nanoscale.* 2016;8(5):3100-18.
216. Edmondson JM, Armstrong LS, Martinez AO. A rapid and simple MTT-based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures. *Journal of tissue culture methods.* 1988;11(1):15-7.
217. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018;2018(6).
218. Hoetelmans R. IC50 versus EC50. PDPD relationships for anti-retroviral drugs Amsterdam: slotervaart Hospital Archived from the original on. 2017:05-28.
219. Wu J, Lee A, Lu Y, Lee RJ. Vascular targeting of doxorubicin using cationic liposomes. *Int J Pharm.* 2007;337(1-2):329-35.
220. Bœuf-Muraille G, Rigaux G, Callewaert M, Zambrano N, Van Gulick L, Roullin VG, ve ark. Evaluation of mTHPC-loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on C6 glioma cell line. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2019;25:448-55.

8. EKLER

EK 1. Tez Çalışması Orjinallik Raporu

GLİOBLASTOMANIN GÖRÜNTÜLEME VE FOTODİNAMİK TEDAVİSİ İÇİN MULTİFONKSİYONEL, HEDEFLENDİRİLMİŞ, TERANOSTİK LİPOZOMLARIN GELİŞTİRİLMESİ VE ETKİNLİĞİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ

ORIGINALITY REPORT

16%	16%	2%	4%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	www.openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	7%
2	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	2%
3	openaccess.hacettepe.edu.tr:8080 Internet Source	1%
4	Submitted to Hacettepe University Student Paper	1%
5	www.geneltip.org Internet Source	<1%
6	e-dergi.marmara.edu.tr Internet Source	<1%
7	www.researchgate.net Internet Source	<1%
8	www.turkradyolojiseminerleri.org Internet Source	<1%

EK 2. Dijital Makbuz**Digital Receipt**

This receipt acknowledges that Turnitin received your paper. Below you will find the receipt information regarding your submission.

The first page of your submissions is displayed below.

Submission author: Fidan Gülçin Onaral
Assignment title: Yüksek Lisans Tezi
Submission title: GLİOBLASTOMANIN GÖRÜNTÜLEME VE FOTODİNAMİK TEDA...
File name: 27.09.2022_EN_SON-Ecz._Fidan_G_I_in_Onaral_Tez.docx
File size: 3.15M
Page count: 134
Word count: 27,522
Character count: 193,368
Submission date: 27-Sep-2022 02:14PM (UTC+0300)
Submission ID: 1910306363



9. ÖZGEÇMİŞ