

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GALYUM-68 (Ga-68) İŞARETLİ, NANOBOYUTLU, PEG KAPLI, TÜMÖRE
HEDEFLENDİRİLMİŞ, LİPOZOMLAR KULLANILARAK TÜMÖR
GÖRÜNTÜLENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Uzm. Ecz. Gürhan ABUHANOĞLU

Radyofarmasi Programı
DOKTORA TEZİ

ANKARA
2022

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**GALYUM-68 (Ga-68) İŞARETLİ, NANOBOYUTLU, PEG KAPLI, TÜMÖRE
HEDEFLENDİRİLMİŞ, LİPOZOMLAR KULLANILARAK TÜMÖR
GÖRÜNTÜLENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR**

Uzm. Ecz. Gürhan ABUHANOĞLU

Radyofarmasi Programı

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Suna ERDOĞAN

ANKARA

2022

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Galyum-68 (Ga-68) İşaretli, Nanoboyutlu, PEG Kaplı, Tümöre Hedeflendirilmiş,
Lipozomlar Kullanılarak Tümör Görüntülenmesi Üzerine Çalışmalar

Gürhan ABUHANOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Suna ERDOĞAN

Bu tez çalışması 19 Ocak 2022 tarihinde jürimiz tarafından "Radyofarmasi Programı"
nda doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

- Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Murat TUNCEL*
(Hacettepe Üniversitesi, Nükleer Tıp Anabilimdalı)
- Üye:** *Prof. Dr. Nuri ARSLAN*
(Yakın Doğu Üniversitesi, Nükleer Tıp Anabilimdalı)
- Üye:** *Doç. Dr. Derya İLEM ÖZDEMİR*
(Ege Üniversitesi, Radyofarmasi Anabilimdalı)
- Üye:** *Doç. Dr. Evren ATLIHAN GÜNDOĞDU*
(Ege Üniversitesi, Radyofarmasi Anabilimdalı)
- Üye:** *Dr. Öğretim Üyesi Mine SİLİNDİR GÜNAY*
(Hacettepe Üniversitesi, Radyofarmasi Anabilimdalı)

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

15 Şubat 2022

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN
Enstitü Müdürü

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.

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

19 /01 /2022

GÜRHAN ABUHANNOĞLU

“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 danışmanının 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 danışmanının 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 danışmanının 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, Prof. Dr. Suna Erdoğan danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Uzm. Ecz. Gürhan ABUHANOĞLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca heyecanıma ortak olan, değerli bilgileriyle bana yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Suna ERDOĞAN' a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bana yol gösteren Yüksek Lisans tez danışmanım ve önceki dönem Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. A. Yekta ÖZER' e,

Dr. Öğretim Üyesi Mine SİLİNDİR GÜNAY, Dr. Ecz. Merve KARPUZ ve Ecz. Esra GÜNDOĞAN başta olmak üzere, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma,

Radyoaktif işaretleme ve görüntüleme çalışmalarımındaki katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Nükleer Tıp ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Murat TUNCEL' e,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Nükleer Tıp ABD öğretim üyesi Doç. Dr. Çiğdem SOYSAL' a, Tahsin PEHLİVAN' a,

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Okan EKİM' e, Ga-68 temini ve kalite kontrolündeki katkılarından dolayı MOLTEK A.Ş ve Moltek Aplikasyon Görevlileri Bilal KAYA ve Damla ÖZKAYNAK' a,

Kütle spektrofotometresi çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Fizikokimya ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Bekir SALİH ve Araştırma Görevlisi Ülkü GÜLER' e,

Hücre kültür çalışmalarındaki katkılarından dolayı Prof. Dr. İmran Vural, Araş. Gör. Naile Öztürk ve Dr. Ecz. Adem ŞAHİN' e, Dr. Öğr. Üyesi Selin Seda TİMUR' a,

Biyodağılım deneylerindeki katkılarından dolayı Hacettepe Üniversitesi, Kanseri Enstitüsü, Temel Onkoloji ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Güneş ESENDAĞLI ve Dr. Öğr. Üyesi Süleyman Can ÖZTÜRK' e,

Antalya Akdeniz Üniversitesi Nükleer Tıp ABD öğretim üyeleri ve personeline, Tez çalışmalarım boyunca desteklerinden ötürü, eski eşim Ferah Baykara ve oğlum Alp' e, Tezimin tamamlanması süresince verdiği destek ve yardımlarından dolayı arkadaşım Nadira Kozueva' ya, çok teşekkür ederim.

ÖZET

Abuhanoglu, A., Galyum-68 (Ga-68) İşaretli, Nanoboyutlu, PEG Kaplı, Tümöre Hedeflendirilmiş Lipozomlar Kullanılarak Tümör Görüntülenmesi Üzerine Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Radyofarmasi Programı Doktora Tezi, Ankara, 2022. Tümörün henüz hücresel değişiklikler başlamadan önce ve moleküler düzeyde değişiklikler oluşmaya başladığı anda teşhisi kanserin yayılmadan önce tedaviye başlanmasını, dolayısıyla da kanserin tedavisinde başarı oranının önemli ölçüde artmasını sağlamaktadır. Bu yüzden, günümüzde, moleküler görüntüleme giderek artan bir önem kazanmış durumdadır. Kanser teşhisi ve görüntülemesinde kullanılan yöntemlerden biri olan PET, günümüzde kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve kliniklerde kullanımı da buna bağlı olarak hızla artan bir radyonüklidik görüntüleme yöntemidir. Galyum-68 (Ga-68), PET' de yaygın olarak kullanılan pozitron yayan radyonüklidler arasından seçilmiştir. İlaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılan lipozomlar, hem pasif hem de aktif hedefleme yöntemleri ile doku/organa ilaç ve/veya görüntüleme bileşimini ulaştırabilmektedir. Bu çalışmada, Ga-68 işaretli, tümöre özgü, nano boyutta, yüzeyi PEG ile kaplı lipozomal taşıyıcı sistemler geliştirilmeye çalışılmıştır. In vitro hücre kültür çalışmalarında, yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozomların, modifiye edilmemiş lipozomlara göre hem HeLa hem de HT-29 tümör hücresinde daha fazla tutulum gösterdiği bulunmuştur. Radyoaktif işaretleme çalışmalarında, Ga-68 ile işaretleme için radyokimyasal saflık %85 civarında bulunmuştur. Biyodağılım sonuçlarında tümör dokusundaki tutulumun yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozomlarda, yüzeyi modifiye edilmemiş lipozomlara göre 30. dk.' da 2 kat 60. dk.' da 2,5 kat daha yüksek olduğu bulunmuştur. Ancak, PET görüntüleme çalışmalarında; tümörün belirgin olarak görüntülenmesi sağlanamamıştır. Hem işaretleme veriminin artırılması hem de PET görüntülerinin iyileştirilmesi için ileriki çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Moleküler Görüntüleme, PET, Tümör, Lipozom, Folat Hedeflendirme, Galyum-68.

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK-SBAG (Proje No: TUBİTAK 115S416).

ABSTRACT

Abuhanoglu, A., Studies on Tumor Imaging by Gallium-68 Labeled, Nanosized, PEG Coated, Tumor Targeted Liposomes, Hacettepe University Graduate School Health Sciences, Radiopharmacy Ph.D. Thesis, Ankara, 2022. Diagnosis of the tumor before the cellular changes begin and when changes begin to occur at the molecular level ensures that the treatment is started before the cancer spreads, thus increasing the success rate in the treatment of cancer significantly. Therefore, nowadays, molecular imaging; has become increasingly important. PET, which is one of the methods used in cancer diagnosis and imaging, is a radionuclidic imaging method that is becoming increasingly common today and its use in clinics is increasing accordingly. Gallium-68 (Ga-68) was chosen among the positron emitting radionuclides commonly used in PET. Liposomes, which are used as drug delivery systems, can deliver drugs and/or imaging compounds to the tissue/organ with both passive and active targeting methods. In vitro cell culture studies showed that folate-modified liposomes dispersions have higher uptake in both HeLa and HT-29 tumor cells. In radiolabeling studies radiochemical purity was found around 85% for Ga-68 labeling. In the biodistribution results, it was found that tumor uptake of folate modified liposome dispersions was 2 times higher at 30th min and 2,5 times higher at 60th min than that of unmodified liposomes. However, clear visualization of the tumor could not be achieved in PET imaging studies. Further studies are needed both to increase the marking efficiency and to improve the PET images.

Keywords: Molecular Imaging, PET, Tumor, Liposome, Folate Targeting, Gallium-68.

Supported by: TUBITAK-SBAG (Project No: TUBITAK 115S416).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN SAYFASI	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tümör Nedir?	3
2.2. Tümör Teşhis ve Görüntülenmesi, Moleküler Görüntüleme	6
2.2.1. PET Görüntüleme, Avantajları ve SPECT Görüntülemeyle Karşılaştırılması	7
2.2.2. PET Görüntülemede Kullanılan Radyonüklidler ve Özellikleri	10
2.2.3. Galyum-68 (Ga-68)	11
2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Diyagnostik Görüntülemede Kullanımları	15
2.3.1. Lipozomlar	15
2.3.2. Lipozomların Hedeflendirilmesi	18
2.4. Folik Asit, Folik Asit Reseptörü ve Folik Asit Reseptörüne Hedeflendirme	28
2.4.1. Folik Asitle Modifiye Edilmiş Tümöre Hedeflendirilmiş Taşıyıcı Sistemlerle Yapılmış Çalışma Örnekleri	32
2.5. Ga-68 İşaretli İlaç Taşıyıcı Sistemlerle Yapılan Çalışma Örnekleri	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. Kullanılan Alet ve Gereçler	40
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	42
3.3. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde-Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu	44
3.3.1. DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA Sentezi	44

3.3.2. DSPE-PEG2000-DOTA Konjugatının Kütle Spektrofotometresi ile Tanınması	44
3.4. Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	45
3.4.1. Yüzeyi Folat ile Modifiye Edilmemiş, Nanoboyutlu, PEG Kaplı Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	46
3.4.2. Yüzeyi Folat ile Modifiye Edilmiş, Nanoboyutlu, PEG Kaplı Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	46
3.5. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu	47
3.5.1. Fosfolipit Miktar Tayini	47
3.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini	47
3.5.3. Zeta Potansiyel Ölçümü	47
3.5.4. Lipozom Dispersiyonlarının Polarizan Mikroskop ile Görüntülenmesi	49
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	49
3.6.1. Hücrelerin Büyütülmesi	49
3.6.2. Rhodamin İşaretli Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	50
3.6.3. Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Tarafından Tutulumunun Floresans Mikroskop ile Görüntülenmesi	50
3.7. Radyoaktif İşaretleme Çalışmaları	51
3.7.1. DTPA-PE İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	52
3.7.2. Lipozom Dispersiyonlarının Ga-68 ile Radyoaktif İşaretlenmesi	53
3.7.3. Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m ile Radyoaktif İşaretlenmesi	54
3.8. İn Vivo Çalışmalar	54
3.8.1. Hücrelerin Büyütülmesi	55
3.8.2. İn Vivo Tümör Modelinin Oluşturulması	55
3.8.3. Biyodağılım Çalışmaları	56
3.8.4. PET Görüntüleme Çalışmaları	56
3.9. İstatistiksel Analiz	57
4. BULGULAR	58
4.1. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde-Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular	58
4.2. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	60
4.2.1. Lipozomal Fosfolipit Miktar Tayini Sonuçları	60
4.2.2. Lipozomlarda Partikül Büyüklüğü Tayini Sonuçları	62

4.2.3. Lipozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları	63
4.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Polarizan Mikroskop Görüntüleri	63
4.3. Hücre Kültür Çalışmasına Ait Bulgular	64
4.3.1. Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Tarafından Tutulumunun Fluoresans Mikroskop ile Görüntülenmesi Bulguları	64
4.4. Radyoaktif İşaretleme Çalışmalarına Ait Bulgular	66
4.4.1. Ga-68 ile İşaretleme ve İşaretlemenin Kalite Kontrolü Bulguları	66
4.4.2. Teknesyum-99m (Tc-99m) ile İn Vitro İşaretleme Çalışmaları Bulguları	70
4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular	71
4.5.1. İn Vivo Tümör Modelinin Oluşturulması Bulguları	72
4.5.2. Biyodağılım Çalışmaları Bulguları	72
4.5.3. PET Görüntüleme Çalışmaları Bulguları	74
5. TARTIŞMA	77
5.1. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde-Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu Çalışmalarının Değerlendirilmesi	77
5.2. Hazırlanan Lipozom Formülasyonlarından Uygun Lipozom Formülasyonlarının Tesbiti ve Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi	77
5.3. Taşıyıcı Sistem, Fosfolipitlerin Seçilmesi, Kolesterol Eklenmesi, Şelat Yapıcı Madde Seçimi, PEG Eklenmesi ve Ligand Seçiminin Değerlendirilmesi	80
5.4. Hücre Kültür Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi	83
5.5. Radyoaktif İşaretleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi	84
5.6. İn Vivo Çalışmalarda Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi	85
5.6.1. Biyodağılım Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi	85
5.6.2. PET Görüntüleme Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	88
7. KAYNAKLAR	90
8. EKLER	
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
9. ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

BT	Bilgisayarlı Tomografi
CHOL	Kolesterol
DHB	2,5-Dihidroksibenzoik asit
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DOPE	Dioloil- <i>sn</i> -glisero-fosfatidiletanolamin
DOTA	[1,4,7,10-tetraazasiklododekan- 1,4,7,10-tetraasetik asit]
DOTANOC	[1,4,7,10-tetraazasiklododekan- 1,4,7,10-tetraasetik asit] -1-Nal3
DOTA-TATE	1,4,7,10-tetraazasiklododekan-N ^I , N ^{II} , N ^{III} , N ^{IV} -tetraasetik asit D-Phe ¹ , Tyr ³
DOTATOC	1,4,7,10-tetraazasiklododekan-N ^I , N ^{II} , N ^{III} , N ^{IV} -tetraasetik asit (D)-Phe ¹ -thy ³
DSPC	1,2-Distearoil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfatidilkolin
DTPA	Dietilen triamin pentaasetikasit
DTPA-PE	Dietilen triamin penta asetik asit-fosfatidiletanolamin
DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA	1,2-distearoil- <i>sn</i> -glisero-3- fosfatidiletanolamin -N-[amino (polietilen glikol)-2000]- [1,4,7,10-tetraazasiklododekan- 1,4,7,10-tetraasetik asit]
DSPE-PEG₂₀₀₀-Folat	1,2-distearoil- <i>sn</i> - glisero- 3- fosfatidiletanolamin- N- [folat (polietilen glikol) -2000]
DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂	1,2-distearoil- <i>sn</i> - glisero- 3- fosfatidiletanolamin- N- [(polietilen glikol) -2000] (amonyum tuzu)
EPR	Artmış Geçirgenlik ve Tutulum Etkisi
FA	Folik Asit
Ga-68	Galyum-68
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
ITLC	İnce Tabaka Kromatografisi
PC	Fosfatidil Kolin

PEG	Polietilen Glikol
PET	Pozitron Emisyon Tomografisi
RES	Retiküloendotelyal Sistem
Rh-PE	1,2-dipalmitoil- <i>sn</i> -glisero-3-fosfatidiletanolamin-N-(lisamin rodamin B sulfoil) (Amonyum tuzu)
SPECT	Tek Foton Emisyon Bilgisayarlı Tomografi
Tc-99m	Teknesyum-99m

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. 2000-2015 yılları arasında düşük/orta ve yüksek/çok yüksek İnsani Gelişme Endeksi (İGE)'ne sahip ülkelerin 30–69 yaşlarında kanserden ölme riskindeki değişim.	4
2.2 a-b. Erkeklerde (a) ve kadınlarda (b) en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları.	5
2.3. PET görüntüleme yöntemi şematik gösterimi ve PET görüntüleme cihazı.	8
2.4. Galyum-68' in elektron yakalama ve pozitron dikeyi ile bozunumu.	12
2.5. DOTATOC ([DOTA0, Tyr3]octreotide), DOTANOC [DOTA0, 1-Nal3]octreotide ve DOTA-TATE ([DOTA0, Tyr3, Thr8]octreotide)' in kimyasal yapıları.	13
2.6. Lipozom yapısının şematik gösterimi.	16
2.7. Tümöre nanotaşıyıcılar aracılığıyla ilaç taşınmasında pasif ve aktif hedeflemenin şematik gösterimi.	19
2.8. Konvansiyonel lipozomlar (A), dolaşımda uzun süre kalan hidrofilik polimer (i) ile kaplı lipozomlar (B) ve aktif hedeflendirme için hidrofilik polimerin ucuna antikor (ii) bağlanmış lipozomlar (C).	24
2.9 Folat bağlı bileşiklerin reseptör aracılıklı endositozunun şematik gösterimi.	31
3.1. Lipozomların fosfolipit miktar tayin yöntemi şematik gösterimi.	48
4.1. DSPE-PEG2000-DOTA örneğine ait DHB'ye karşı kütle spektrofotometrisi (reflektron iyon modu).	58
4.2 DSPE-PEG2000-DOTA örneğine ait DHB'ye karşı kütle spektrofotometrisi (pozitif lineer mod).	59
4.3 DTPA-PE no'lu örneğe ait DHB'ye karşı kütle spektrofotometrisi (reflektron iyon modu).	59
4.4. DTPA-PE no'lu örneğe ait DHB'ye karşı kütle spektrofotometrisi (pozitif lineer mod).	60

4.5.	Lipozomal fosfolipit tayini için kullanılan kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.	61
4.6.	Lipozom formülasyonlarının polarizan mikroskop görüntüleri ($\times 40$).	63
4.7.	Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh (A) ve PC-Rh (B) ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA (C) ve PC-Rh-FA (D) lipozomlarının HeLa hücrelerindeki tutulumları ($\times 40$).	64
4.8.	Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh (A) ve PC-Rh (B) ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA (C) ve PC-Rh-FA (D) lipozomlarının HT-29 hücrelerindeki tutulumları ($\times 40$).	65
4.9.	Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh (A) ve PC-Rh (B) ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA (C) ve PC-Rh-FA (D) lipozomlarının L929 hücrelerindeki tutulumları ($\times 40$).	65
4.10.	Jenaratörden sağılan, işaretlemede kullanılan Ga-68'in HPLC çıktısı.	66
4.11.	90 C° ısı uygulanmış DSPC _L -DOTA lipozomlarının ve PC _L -DOTA lipozomlarının polarizan mikroskop görüntüsü ($\times 40$).	70
4.12.	Ksenograft tümör modeli görüntüsü.	72
4.13.	Ga-68 işaretli DSPC _L -DOTA lipozomunun enjeksiyonundan 60 dk. sonra çekilen PET görüntüleri.	75
4.14.	Ga-68 işaretli DSPC _L -FA-DOTA lipozomunun enjeksiyonundan 60 dk. sonra çekilen PET görüntüleri.	76

TABLOLAR

Tablo		Sayfa
2.1.	En yaygın kullanılan PET radyoizotopları ve fiziksel özellikleri.	11
2.2.	Kliniklerde kullanılan veya araştırma aşamasında olan Ga-68 işaretli radyofarmasötikler.	14
2.3.	Aktif hedeflendirmede kullanılan ligandlara örnekler.	25
3.1.	Çalışmalarda kullanılan lipozom dispersiyonları ve lipid molar bileşimleri.	46
3.2.	Rhodamin işaretli lipozom dispersiyonları ve lipid-molar bileşimleri.	50
3.3.	İşaretleme çalışmalarında kullanılan lipozom dispersiyonları, molar bileşimleri ve kodları.	51
3.4.	İn vivo çalışmalarda kullanılan lipozom dispersiyonları, molar bileşimleri ve kodları.	55
4.1.	Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion öncesi ve sonrası lipozomal fosfolipid miktarları.	61
4.2.	Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion öncesi ve sonrası ortalama partikül büyüklükleri ve dağılımları.	62
4.3.	Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion sonrası zeta potansiyelleri.	63
4.4.	Şelat yapıcı madde olarak DOTA-PEG ₂₀₀₀ -DSPE ve DTPA-PE içeren lipozom formülasyonlarının Ga-68 ile işaretleme sonrası farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen işaretleme verimi (%) sonuçları.	67
4.5.	Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 4 ve 25 °C sıcaklık).	68
4.6.	Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 7 ve 25 °C sıcaklık).	68
4.7.	Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 4 ve 50 °C sıcaklık).	69
4.8.	Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 7 ve 50 °C sıcaklık).	69

4.9.	Lipozom dispersiyonlarının Tc-99m ile farklı inkübasyon süreleri sonrası işaretleme verimi (%) sonuçları.	71
4.10.	İn vivo çalışmalarda kullanılan Ga-68 işaretli lipozomların işaretleme koşulları ve işaretleme verimleri (%).	72
4.11.	Ga-68 ile işaretlenmiş, yüzeyi folat ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş lipozom formülasyonlarının % enjekte edilen doz/g doku olarak biyodağılım sonuçları.	73
4.12.	Lipozom formülasyonlarının farklı zaman dilimlerindeki tümör/kas tutulum oranları.	74

1. GİRİŞ

Herhangi bir canlının vücudundaki hücrelerin aşırı bölünmesiyle belirli bir bölgede bulunan dokuların, anormal olarak büyümesi sonucu oluşan kitlelere “tümör” adı verilir. İyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign ya da habis) olmak üzere sınıflandırılırlar. Kötü huylu (malign) tümörlerde; hücreler, normal hücre yapısında değildir ve kontrolsüz bölünerek, düzensiz çoğalırlar. Kötü huylu tümörler; normal dokulara sızarak oradaki yapıyı bozabilirler. Genellikle kötü huylu tümörler “kanser” olarak adlandırılırlar. Oluştukları tümörden ayrılan kanser hücreleri, kan veya lenf dolaşımına katılarak, vücudun diğer bölgelerine kolaylıkla taşınabilirler ve bu metastaz olarak adlandırılır.

Kanser alanında son yıllarda gerek teşhis yöntemleri, gerekse tedavi alanında büyük gelişmeler olmasına rağmen; tümörler halen belli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra veya metastaz yaptıktan sonra, teşhis edilebilmektedirler. Bu yüzden tümörün henüz hücresel değişiklikler başlamadan önce ve moleküler düzeyde değişiklikler oluşmaya başladığı anda teşhisi; kanserin yayılmadan önce tedaviye başlanmasını, dolayısıyla da kanserin tedavisinde başarı oranının önemli ölçüde artmasını sağlamaktadır. Bu yüzden, günümüzde, moleküler görüntüleme; giderek artan bir önem kazanmış durumdadır.

Kanser teşhisi ve görüntülemesinde kullanılan yöntemlerden biri olan Pozitron Emisyon Tomografi (PET); günümüzde kullanımı gittikçe yaygınlaşan ve kliniklerde kullanımı da buna bağlı olarak hızla artan bir radyonüklidik görüntüleme yöntemidir. PET görüntülemede ise; organizmaların temel yapılarında yer alan, Karbon(C), Oksijen (O), Azot (N) ve Flor (F) atomlarının, pozitron ışınımı yapan radyoaktif izotopları (sırasıyla, C-11, O-15, N-13, F-18) ile Galyum 68 (Ga-68) kullanılmaktadır. Bu radyonüklitlerin en önemli özellikleri ise; kısa fiziksel yarı ömre (2-110 dak.) sahip olmalarıdır. Araştırma amaçlı olarak daha uzun yarı ömürlü Bakır-64 (Cu-64), İtiryum-86 (Y-86) ve Zirkonyum-89 (Zr-89) gibi pozitron yayan radyonüklidler de kullanılmaktadır.

Bu radyonüklidlerden F-18 ve Ga-68, rutin klinik kullanıma girmiştir. Son yıllarda, Ga-68 işaretli peptidler (Ga-68 işaretli octreotide analogları; DOTATOC, DOTANOC ve DOTA-TATE) ve Galyum (Ga-68) sitrat nükleer tıp pratiklerinde sırasıyla tümör ve enflamasyon görüntülemeye kullanılmaya başlanmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır.

Günümüzde klinikte kullanılan medikal görüntüleme yöntemleri çalışma prensipleri, enerji kaynakları, özellikleri bakımından farklılık göstermekle birlikte, hepsi için ortak özellik; görüntülenmek istenen organ/dokunun, çevresindeki organ/dokudan ayırt edilebilmesi için, ilgilenilen organ/dokudan gelen yeterli sinyal yoğunluğuna gerek duyulmasıdır. Bunun içinde ilgili dokudaki radyonüklid/kontrast madde miktarının artırılması gerekmektedir. Bu amaçla, sıklıkla, ilaç taşıyıcı sistemler kullanılır. Çünkü ilaç taşıyıcı sistem kullanımının, en önemli avantajlarından biri ise; istenilen doku/organa hedeflendirilebilmeleridir. Çalışmamızda hedeflendirilebilir ilaç taşıyıcı sistem olarak ise, taşıdığı avantajlar nedeniyle lipozomlar seçilmiştir. Farklı içerik ve orandaki formülasyonlar hazırlanması ve hedeflendirme molekülü kullanılarak hazırlanan formülasyonların hedef organ/dokuda spesifik tutulum ve birikiminin en iyi düzeyde gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışma kapsamında öncelikle DOTA-PE' nin sentezlenerek lipozom yapısına katılması ve bu sayede Ga-68 ile lipozomların stabil bir şekilde işaretlenmesi planlanmıştır. Lipozomların PEG kaplı ve nanoboyutta hazırlanmasıyla hem dolaşımda uzun süre kalmaları hem de EPR etkisi ile tümör dokusuna pasif olarak hedeflendirilmesi amaçlanmıştır. Yüzeyine tümöre spesifik bir hedeflendirme molekülü takılarak hazırlanan lipozomların, spesifik olarak tümör dokusuna yönlendirilmesi ve bu sayede hem artan radyonüklid konsantrasyonu nedeniyle; hedef dokudan daha fazla sinyal alınması, hem de spesifik olarak tümör dokusunun görüntülenmesi, yani görüntü kalitesinin artırılması düşünülmüştür. Bu amaçla çalışması planlanan hedeflendirme molekülü; folik asittir ve hazırlanan immunolipozomların folat reseptörüne hedeflendirilmesi planlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

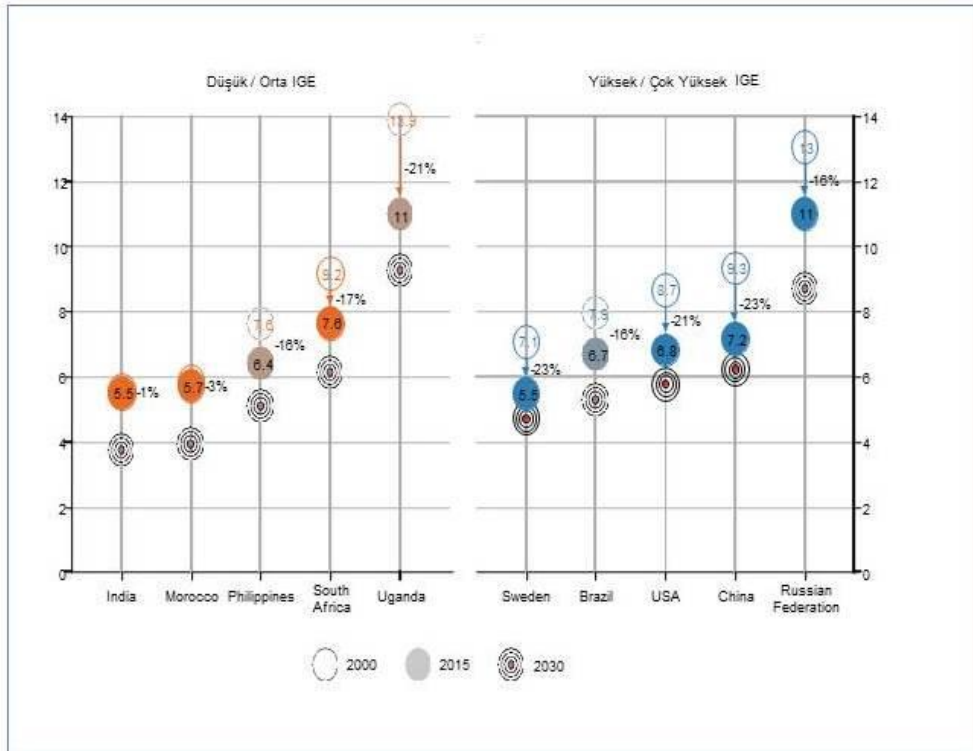
2.1. Tümör Nedir?

Tümör; herhangi bir hücre ya da hücre grubunun, organizmanın kontrol mekanizmalarının etkisinden çıkması sonucunda, hızlı ve anormal bir çoğalma ile oluşan kitlelere verilen bir genel addır. Latince de ise tümör; "ur", "şişlik" le aynı anlamda kullanılır. İyi ve kötü huylu olarak sınıflandırılan tümörlerin, kötü huylusuna ise; "kanser" adı verilmektedir.

İyi huylu tümörler kanser olarak adlandırılmazlar, sıklıkla alınarak temizlenirler ve çoğu zamanda tekrar oluşmazlar. Bu tümörleri oluşturan hücreler; vücudun diğer bölgelerine yayılmazlar ve yaşamı ender olarak tehdit ederler. Bunun tam tersine; kötü huylu tümörleri oluşturan hücreler normal yapıda değildirler. Kontrolsüz, düzensiz bir bölünme gösterirler. Sonrasında normal dokuların alanlarına sızarak onlara zarar verip, yok edebilirler. Bu kanser hücreleri, meydana geldikleri tümörden ayrılarak, kan ya da lenf dolaşımı yoluyla vücudun diğer bölgelerine geçebilirler. Geçtikleri yerlerde ise; tümör kümeleri oluşturarak bu bölgelerde büyümeye devam edebilirler. Kanser hücrelerinin, bu gibi yollarla vücudun diğer bölgelerine geçerek yayılması olayına ise "metastaz" adı verilir **(1)**.

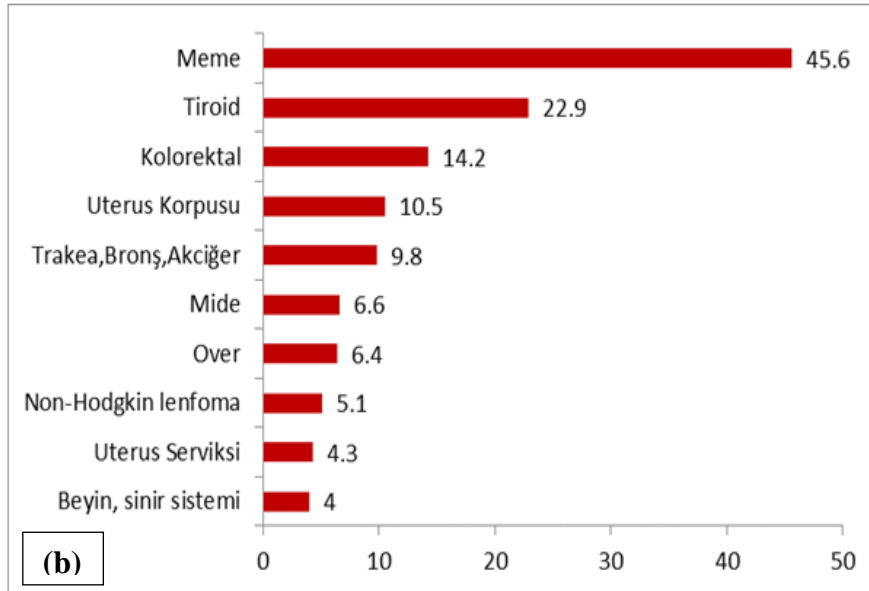
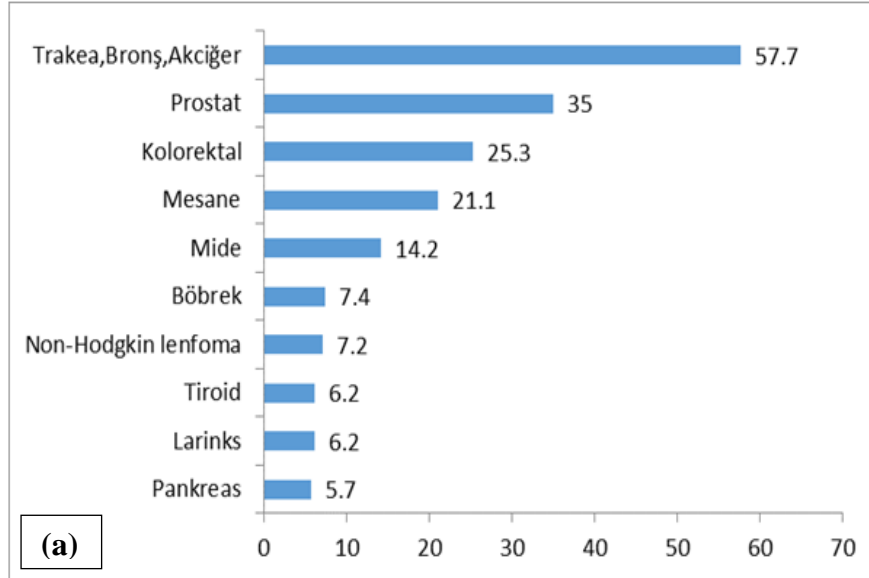
Uluslararası Kanser Ajansı'nın Dünyada kanser vakalarını düzenli olarak kaydeden 184 ülkede, en sık görülen 28 kanser türü ile ilgili yayınladığı verilerde; "dünyanın tamamında yeni tanı konulan hasta sayısı ile kanser kaynaklı ölümlerin; önceki yılın rakamlarına göre artış gösterdiğini, Dünya genelinde 2012 yılında toplam 14,1 milyon yeni kanser vakası oluştuğunu ve 8,2 milyon kişide kansere bağlı ölüm gerçekleştiği" bildirilmiştir. 2018 yılında yayınlanan raporda ise; "Dünya genelinde 18,1 milyon yeni kanser vakası oluştuğunu ve 9,6 milyon kişide ise kansere bağlı ölüm gerçekleştiği" rapor edilmiştir. Ayrıca bu raporda "her 8 erkekten 1'i ve her 10 kadından 1'inin yaşamları boyunca bu hastalığa yakalanma olasılığının yüksek olduğu" bildirilmiştir **(2)**.

Akciğer (%13,0), meme (%11,9) ve kolon (%9,7) kanserleri; Dünya’da en çok tanı konulan kanser türleri iken; kanserden ölümlerin ise; en çok akciğer (%19,4), karaciğer (%9,1) ve mide kanserlerinden (%8,8) gerçekleştiği belirtilmiştir. Dünya nüfusundaki artış ve nüfustaki yaşlanmaya bağlı olarak kanser artış hızının bu şekilde devamı durumunda ise; 2025 yılında toplam 19,3 milyon yeni kanser vakası olacağı tahmin edilmektedir. Kanser vakalarının (%56,8), gerekse de kanserden kaynaklanan ölümlerin (%64,9) yarısından çoğunun, az gelişmiş ülkelerde olduğu belirtilmiştir. 2015 yılı dört aşamalı İnsani Gelişim Raporu verileri ile hazırlanan, gelişmiş ve az gelişmiş ülkelerdeki, 30-69 yaş arası, 2000-2015 ve 2030 yılına kadar ki kanser vakalarının, ülkelerin gelişmişlik indeksiyle kanserden ölme oranları arasındaki değişim Şekil 2.1’ de verilmiştir.



Şekil 2.1: 2000-2015 yılları arasında düşük/orta ve yüksek/çok yüksek İnsani Gelişim Endeksi (İGE)’ne sahip ülkelerin 30–69 yaşlarında kanserden ölme riskindeki değişim (2).

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı'na bağlı Kanser Daire Başkanlığı tarafından 2016 yılına kadar olan veriler incelenmiş ve erkeklerde en sık akciğer, kadınlarda ise meme kanserinin görüldüğü rapor edilmiştir (Şekil 2.2 a-b) **(3)**.



Şekil 2.2 a-b: Erkeklerde (a) ve kadınlarda (b) en sık görülen 10 kanserin yaşa göre standardize edilmiş hızları (Dünya Standart Nüfusu, 100.000 Kişide) **(3)**.

2.2. Tümör Teşhis ve Görüntülenmesi, Moleküler Görüntüleme

Kanser, genellikle gelişimi uzun süren bir hastalıktır. Kanser alanında son yıllarda gerek teşhis yöntemleri gerekse tedavi alanında büyük gelişmeler olmasına rağmen tümörler halen belli bir büyüklüğe ulaştıktan sonra veya metastaz yaptıktan sonra teşhis edilebilmektedirler. Oysaki tümörün erken safhada, moleküler düzeyde değişiklikler olduğu anda, henüz hücresel değişiklikler başlamadan teşhis edilebilmesi; yayılmasına fırsat tanımadan tedaviye başlanabilmesini, dolayısıyla da; tedavi başarı oranının önemli ölçüde artmasını sağlamaktadır.

Moleküler görüntüleme; kanser hakkında işlevsel bir bilgi toplama yöntemi olarak, kanser hücrelerindeki metabolizma hızındaki değişimin, yüzey moleküllerinin hedeflenmesi aracılığıyla tespit edilmesine dayanır. Bu amaçla görüntüleme bileşikleri ile işaretlenen, hedeflenen metabolizma yoluna özgü bazı kimyasal biyomoleküller, organizmaya verildikten sonra, bu biyomoleküllerin organizmadaki dağılımı, tutulum modeli ve derecesi görüntülenir. Bu görüntüler ise; bize hedeflenen metabolik yolda, tümöre bağlı gelişen değişikliklerle ilgili, kullanılabilir bilgiler verir. İşaretlemede kullanılan görüntüleme bileşiklerinden biri de radyoizotoplardır. Moleküler görüntülemede kullanılan radyoaktif işaretleyiciler, hedeflenen metabolik yollara, doğal olarak giren moleküllerin içinden belirlenir. Genellikle, bu metabolik yollarda bulunan enzimlerin substratı veya hedef olarak seçilen yüzey reseptörlerinin ligandlarıdır. Moleküler görüntülemede kullanılan radyoaktif işaretleyiciler ise; radyoloji uygulamalarında kullanılan kontrast ajanlarından farklı olarak çok az miktarda verilirler. Bunun sonucunda kendileri hedeflenen metabolik yollar ile etkileşime girmez ve işleyişini değiştirmezler. Çok az miktarda kullanıldıkları için toksisiteye neden olmazlar. Sadece kanser hücrelerinde meydana gelen ilgili metabolik yoldaki patolojik değişiklikleri gösterirler. Bu nedenle günümüzde, özellikle, radyonüklid görüntüleme yöntemleri ile moleküler görüntüleme, giderek artan bir önem kazanmış durumdadır.

Başlıca moleküler görüntüleme yöntemleri;

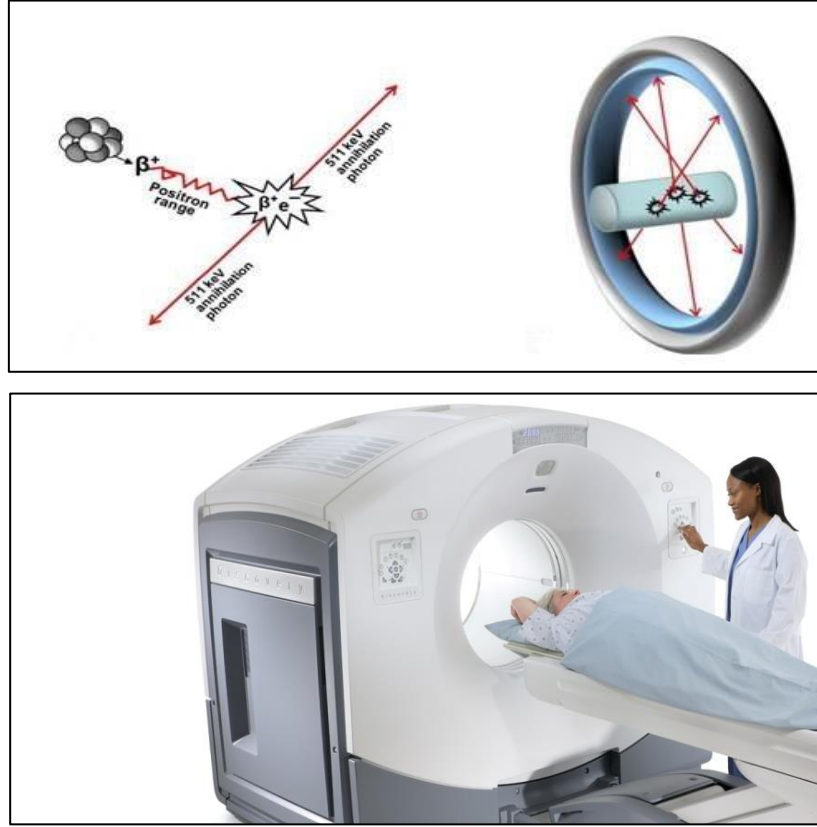
- Pozitron Emisyon Tomografisi (Positron Emission Tomography = PET)
- Tek Foton Emisyon Tomografisi (Single Photon Emitting Tomography =SPECT)
- Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR)
- Bilgisayarlı Tomografi (BT)
- Ultrasonografi (US)

ve bunların birlikte kullanıldıkları PET/BT, SPECT/BT gibi Hibrid Görüntüleme yöntemleridir.

Moleküler görüntüleme yöntemleri arasında, PET görüntüleme; Bölüm 2.2.1' de anlatılan avantajları nedeniyle daha tercih edilir durumdadır. Bu kısımda tezin konusu olan PET görüntüleme yöntemi ile ilgili ayrıntılı bilgi verilmiş olup, diğer yöntemler ayrıntılı olarak anlatılmamıştır.

2.2.1 PET Görüntüleme, Avantajları ve SPECT Görüntülemeyle Karşılaştırılması

PET görüntüleme; canlıların vücudunda oluşan biyolojik değişiklikleri belirlemek için, vücuda verildikten sonra radyoaktif çekirdeklerden etrafa yayılan düşük dozdaki gama ışınlarını saptayıp, dağılımlarını belirleyen ve bunu üç boyutlu görüntülere dönüştürebilen, gelişmiş, ileri bir nükleer tıp moleküler görüntüleme yöntemidir. PET görüntülemede daha çok pozitron yayan radyonüklidler kullanılır. Bu radyonüklidlerin radyoaktif çekirdekleri kararlı duruma geçmek için bozunur; proton, nötron ve pozitif yüklü elektrona dönüşür ve çekirdekten pozitron fırlatılır. Ortamda ilerleyen bu pozitronun, başka bir atomun elektronuna çarpması sonucunda; iki kütle de yok olur ve birbirine zıt yönde 511 keV' luk enerjiye sahip iki gama ışını oluşmuş olur (Şekil 2.3). Bu olaya, "annihilasyon", "pozitron yok olması" veya "çift oluşumu", oluşan fotonlara da "annihilasyon fotonları" adı verilir.



Şekil 2.3: PET görüntüleme yöntemi şematik gösterimi (4) ve PET görüntüleme cihazı (5).

PET'in temel görüntüleme prensibi; bu fotonların eş zamanlı olarak belirlenmesidir. Dairesel olarak dizilmiş dedektörler aracılığıyla, vücuttan gelen ışınları saptayarak, bilgisayar aracılığıyla dokuların üç boyutlu kontrastlı bir görüntüsünü oluşturur (Şekil 2.4). Birbirine 180° zıt yönde yerleştirilmiş detektörlere ulaşan fotonların, aynı yok olma olayından kaynaklandığının, doğru tespit edilmesi ise en önemli husustur. PET görüntüleme; "pozitron emisyonu" tekniğine dayanan bir görüntüleme yöntemidir.

SPECT ise, bir gama kamera tarafından farklı açılardan taranan iki boyutlu görüntüleri, bilgisayar yardımıyla üç boyutlu tomografik görüntülere dönüştürebilen bir moleküler görüntüleme yöntemidir. Çalışma prensibi olarak gama kameradan hiçbir farkı olmamasına rağmen, SPECT dedektörleri genellikle $180-360$ derece dönebilecek şekilde tasarlanır ve bir ya da iki adet dedektör bulunur. Dedektörler vücudun geniş bir bölgesinden gelen gama ışınlarını belirleyerek, izlenebilir

görüntüler oluşturur. Elde edilen bu görüntüler ise; bize çekim anında çekim yapılan bölgenin fizyolojisi hakkında bilgi verir.

PET görüntüleme yönteminin diğer görüntüleme yöntemlerinden farkı ve en önemli özelliği ise; hastalığın erken evrelerinde, vücutta meydana gelen, fonksiyonel ve metabolik değişiklikleri belirleyebilmesidir. PET, görüntüyü oluştururken, radyoaktif özellikteki maddenin; dokuda hangi kimyasallarla reaksiyonlara girdiğini, hangi vücut bölümlerine gittiği, hangi dokularda parçalandığı gibi fizyolojik dokuya ait önemli bilgileri verebilmektedir. Vücuttaki metabolik değişikliklerin, her zaman gözle görülebilir değişikliklerden önce oluşması ve PET çalışmalarının da bu metabolik değişiklikleri belirleyebilmesinden dolayı; PET, hedef dokudaki durumla ilgili, diğer görüntüleme yöntemlerine kıyasla daha erken bilgi verebilmektedir. Bu sebeple de; kanser dokularının görüntülenmesinde kullanılan görüntüleme yöntemlerinden, PET' in, halen mevcut en duyarlı yöntem olduğu bilinmektedir (6).

PET görüntüleme ile SPECT görüntülemenin farkı olarak; PET cihazı, geniş vücut bölgelerinin yerine, dar bir vücut bölgesinin görüntüsünü oluşturur. Fakat bu görüntü, SPECT cihazıyla elde edilen çözünürlük ve hassasiyetten çok daha yüksektir. PET, incelenen dokunun kesitler halinde görüntülenebilmesine imkan sağlaması sebebiyle, radyoizotop verildikten sonraki süreçte, bir organın neredeyse tamamının davranışını görüntüleyebilme yeteneğine sahiptir. SPECT sisteminin bu yeteneği bulunmaz. SPECT sisteminin bu konudaki dezavantajına rağmen, modern tıpta görüntüleme yaygın kullanımının en büyük nedeni; vücudun tamamı veya büyük bir kısmının görüntüsünü elde etmede, PET' den daha yüksek bir başarı oranına sahip olmasıdır. SPECT yöntemi ile elde edilen görüntüler; BT görüntüleriyle birleştirildiğinde daha doğru lokalizasyon elde edilebilir. Sonuçta; PET ile SPECT görüntüleme sistemleri; sadece dokuların anatomisi hakkında bilgi veren görüntüler olmanın dışında; hastalığın aktif mi, pasif mi olduğunu veya hangi aşamada bulunduğunu, dokuların fizyolojisi hakkında bilgi alarak öğrenebileceğimiz sistemlerdir (6). Bu yüzden nükleer tıp ve kliniklerde görüntüleme ve teşhis amaçlı sıklıkla kullanılan görüntüleme yöntemleridir.

Temel görüntüleme prensipleri PET ve SPECT için benzerdir. Hem PET cihazlarının, hem de gama kamera cihazlarının, hastadan yayılan gama ışınlarını görüntü haline getirmek, temel prensipleridir. Ancak, her iki görüntüleme cihazı için kullanılan radyofarmasötikler, birbirlerinden belirgin farklılıklar içerirler.

2.2.2. PET Görüntülemeye Kullanılan Radyonüklidler ve Özellikleri

PET görüntülemesinde kullanılan radyonüklidler, pozitron bozulumu yaparlar. Kararlı hale gelmek için, çekirdeklerinden pozitif yüklü elektron (pozitron) fırlatarak çevredeki negatif yüklü bir elektrona çarpması neticesinde annihilasyon (yok olma) olayına yol açarlar. Bu çarpışan pozitron ve negatif elektronun kütleleri enerjiye dönüşerek ve her biri 511 kiloelektron volt (keV)'luk enerjide, birbirine 180° aksi yönde hareket eden, iki adet, gama ışını oluşmasına yol açarlar. Dedektörler, hastadan yayılan bu 511 keV' luk gama ışınlarını, algılayarak görüntü haline getirirler. Pozitron yayan radyonüklidler, yapay radyoaktif maddeler olup, genellikle siklotrondan veya jeneratörden elde edilirler. F-18 ve Ga-68 hariç bu radyoaktif maddeler çok kısa yarı ömürlere sahiptirler. Bu yüzden de üretildikleri siklotronların, PET merkezlerinin içerisinde veya yakınında bulunması gerekmektedir.

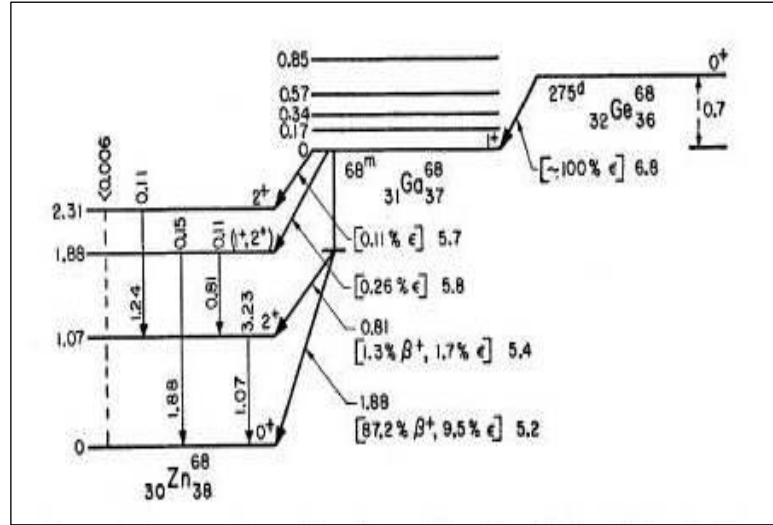
PET görüntülemeye, C-11, O-15, N-13, F-18 ve Galyum-68 (Ga-68) kullanılmaktadır. Bu radyonüklidlerin en önemli özelliği; çok kısa fiziksel yarı ömre (2-110 dk) sahip olmalarıdır. F18-FDG (Florodeoksiglukoz) onkolojik görüntüleme amaçlı sıklıkla kullanılan radyofarmasötiklerden birisidir. Araştırma amaçlı olarak, daha uzun yarı ömürlü Cu-64, Y-86, and Zr-89 gibi pozitron yayan radyonüklidler de kullanılmaktadır. Tablo 2.1' de en yaygın kullanılan PET radyoizotopları ve fiziksel özellikleri verilmiştir.

Tablo 2.1: En yaygın kullanılan PET radyoizotopları ve fiziksel özellikleri (7).

Radyonüklid	Kaynak	Yarı-Ömrü (dakika)	En Yüksek ve Ortalama Pozitron Enerjileri (keV)
C-11	Siklotron	20.4	970 (390)
N-13	Siklotron	9.96	1190 (490)
O-15	Siklotron	2.07	1720 (740)
F-18	Siklotron	110	635 (250)
Ga-68	Jeneratör	68	1899 (836)
Rb-82	Jeneratör	1.25	3356 (1532)

2.2.3. Galyum-68 (Ga-68)

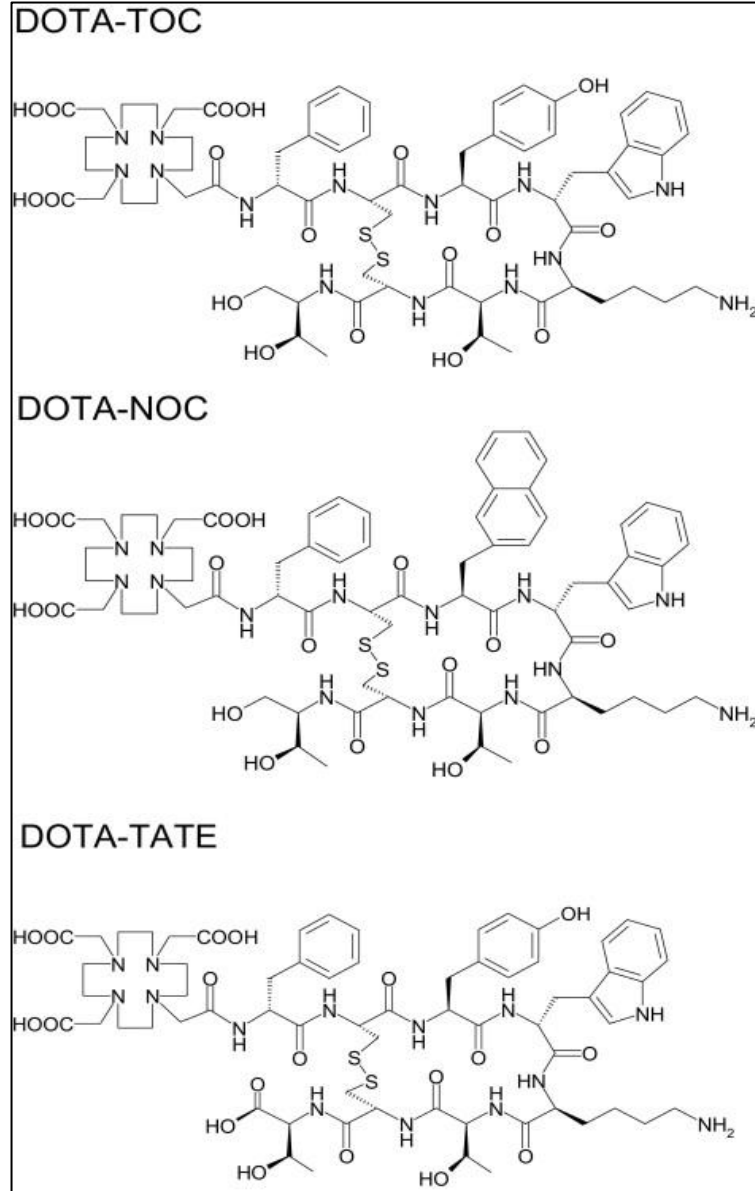
Ga-68; kuvvetli asit metal grubunda olup, sulu solüsyonunda +3 oksidasyon durumuna sahiptir. Yarı-ömrü 68,3 dakikadır. %89' u 1.92 MeV enerjide pozitron emisyonu, %11' i elektron yakalama ile bozunur (Şekil 2.4). Ga-68'in ana nüklid olan Germanyum-68 (Ge-68), akselatörde Ga₂O₃ hedefinde (p,2n) reaksiyonu ile üretilir. Ge-68 yarı ömrü, 270,8 gün olup, uygun uzun yarılanma ömrü nedeniyle, jeneratörde kullanıma uygundur. Ge-68/Ga-68 jeneratör sistemlerinden elde edilen Ga-68, nükleer tıp uygulamalarında PET ve PET/BT görüntülemeye kullanılmaktadır (8). Ana izotop Germanyum-68 ile yüklendiğinde bu jeneratörler; iyon kromatografisine benzer bir işlem kullanan, Tc-99m Jeneratörlerine benzer bir şekilde çalışır. Sabit faz; germanyum-68 adsorbe ettirilmiş alüminyum oksit (Al₂O₃), titanyum oksit (TiO₂) veya kalay oksit (SnO₂), mobil faz ise; elektron yakalama ile üretilen Galyum-68 (III) (⁶⁸Ga³⁺)' i ayrıştırabilen bir çözücüdür.



Şekil 2.4: Galyum-68'in elektron yakalama ve pozitron dikeyi ile bozunumu (8).

Ga-68 işaretli peptidler, Ga-68 işaretli octreotide analogları (örneğin DOTATOC, DOTANOC ve DOTA-TATE) (Şekil 2.5) ve galyum sitrat son zamanlarda nükleer tıp pratiklerinde sırasıyla tümör ve enflamasyon görüntülemeye kullanılmaya başlanmış ve oldukça başarılı sonuçlar alınmıştır (9-12).

Özellikle Ge-68/Ga-68 jeneratöründen elde edilen eluatın saflaştırılması ve konsantre hale getirilmesi ve kompleks ligand kimyası ile ilgili bilgilerin zaman içinde artması ile birlikte; Ga-68 ve Ga-68 işaretli radyofarmasötiklerin klinikteki kullanım oranlarının daha da artacağı düşünülmektedir. Ga-68 radyofarmasötiklerinin, günümüzde kullanılan Tc-99m radyofarmasötiklerinin yerini alma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Yine Ga-68 işaretli radyofarmasötiklerin kullanımlarının; Avrupa İlaç Ajansı' nın (European Medicines Agency=EMA) ve Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration=FDA)' nin radyofarmasötik olarak onaylarından sonraki süreçte, daha da artacağı düşünülmektedir (13).



Şekil 2.5: DOTATOC ([DOTA⁰, Tyr3]octreotide), DOTANOC [DOTA⁰, 1-Nal3] octreotide ve DOTA-TATE ([DOTA⁰, Tyr3, Thr8]octreotide) 'in kimyasal yapıları (13).

Ga-68 işaretli bileşiklerin bir kısmı; klinik olarak, sadece teşhis amaçlı olarak, Ga-68'in çeşitli moleküllerle bağlanmasıyla, uygun hedef doku ve organların PET görüntüleme yöntemleriyle izlenmesi ve görüntülenmesi için kullanılırken; bazı bileşikler ise, hem Ga-68, hem de uygun tedavi radyonüklidleri ile bağlanarak, teşhis ve tedavi amaçlı olarak kullanılmaktadır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Klinikte kullanılan veya araştırma aşamasında olan Ga-68 işaretli radyofarmasötikler (14).

Radyofarmasötik	İlk Kullanım (Ay/Yıl)	Prensibi	Klinik Endikasyonu
⁶⁸ Ga-DOTANOC	07/2004	SSTR (Somatostatin Reseptörleri) hedeflendirme (Agonist)	Nöroendokrin Tümörler (NET)
⁶⁸ Ga-Gastrin	12/2006	Gastrin reseptör hedeflendirme	Tiroidin Medullar Karsinoması
⁶⁸ Ga-AMBA	08/2006	Bombesin analogu-GRP (Gastrin Salan Peptit) ve NMB(Nöromedin B) reseptör hedeflendirme	Göğüs, prostat ve kolon kanserleri
⁶⁸ Ga-Tyrosine	08/2008	Tümör hücrelerince aminoasit alımı	Beyin Tümörler (Gliomalar)
⁶⁸ Ga-BPAMD	02/2009	Kemiğin hidroksiapatit yapısına bağlanma	Skeletal Metastazlar
⁶⁸ Ga-MAA	09/2008	MAA'e kapiller yatakta mekanik bağlanma	Pulmoner Tromboembolizm, Selektif intraarteryal tedavi öncesi perfüzyona bağlı damarlanma
⁶⁸ Ga-Glukoz	05/2009	Tümör hipermetabolizması	Tümörlerde F18-FDG kullanımına benzer kullanım
⁶⁸ Ga-Demobesin	07/2009	GRP reseptör antagonisti	Meme, prostat ve kolon Kanserleri
⁶⁸ Ga-JR10	05/2009	SSTR hedeflendirme (Antagonist)	NET'ler
⁶⁸ Ga-Alpha-MSH	05/2010	Melanositlerin hücre yüzeyindeki reseptörlere hedeflendirilmesi	Melanoma
⁶⁸ Ga-Sarabesin-6	08/2011	GRP reseptör antagonisti	Meme, prostat ve kolon Kanserleri
⁶⁸ Ga-RGD	09/2011	İntegrin-alpha-v beta-3 hedeflendirme -antagonist-	Meme, prostat ve kolon gibi kanserlerin neoangiogenesisinin görüntülenmesi
⁶⁸ Ga-HER-2 affibody	12/2005	HER-2 hedeflendirme	Meme kanserinde prognostikasyon (Herceptin tedavisinden önce HER-2 durumunun araştırılması)
⁶⁸ Ga-SHAL	05/2010	B-Hücreli lenfoma için yüksek selektif ligand afinitesi	B-Hücreli Lenfoma
⁶⁸ Ga-PSMA	2012	İnternal transmembran glikoprotein (Prostat kanseri metastazlarının PSMA ekspresyonu göstermesi)	Prostat Karsinomları

2.3. İlaç Taşıyıcı Sistemler ve Diyagnostik Görüntüleme Kullanımları

Günümüzde klinikte kullanılan medikal görüntüleme yöntemleri; çalışma prensipleri, enerji kaynakları, özellikleri bakımından farklılık göstermekle birlikte; hepsi için ortak özellik; görüntülenmek istenen organ/dokunun, çevresindeki organ/dokudan ayırt edilebilmesi için, ilgilenilen organ/dokudan gelen yeterli sinyal yoğunluğuna gerek duyulmasıdır. Bunun içinde, ilgili dokudaki radyonüklid/ kontrast madde miktarının artırılması gerekmektedir. Bu amaçla uzun yıllardır ilaç taşıyıcı sistemler kullanılmaktadır. Çünkü bu sistemlerin en önemli avantajlarından biri istenilen doku/organa hedeflendirilebilmeleridir.

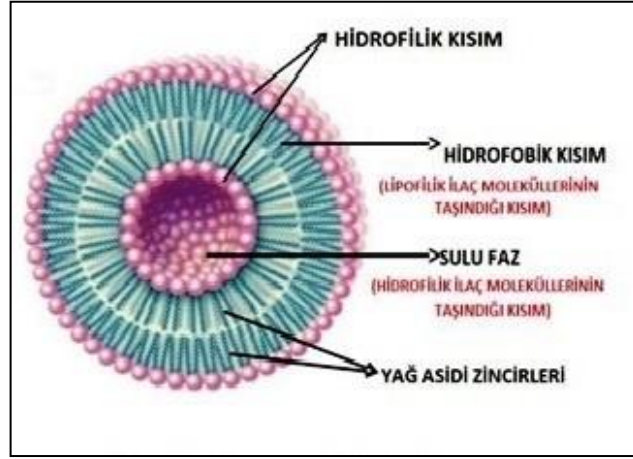
İlaç taşıyıcı sistemler içinde üzerinde en çok araştırma yapılan sistemlerin başında lipozomlar gelmektedir.

2.3.1. Lipozomlar

Lipozomlar veya fosfolipid vezikülleri; kendiliğinden bir araya gelen, doğal olarak oluşan ya da yapay olarak hazırlanan, kolloidal partiküllerdir. Fosfolipidler; sulu fazda dağıldıkları zaman, lipidin polar baş grubunun hidrasyonu, heterojen bir yapı karışımı oluştururlar ve oluşan yapı "vezikül" adını alır. Veziküllerin çoğu; iç içe ve çok tabakalı lipid tabakalardan oluşan halkalardır.

Lipozomlar, büyüklüklerine ve çift katmanlı sayılarına göre iki kategoride sınıflandırılabilir: 1- Çok katmanlı veziküller (MLV) ve 2- Tek katmanlı veziküller. Tek katmanlı veziküller ayrıca iki kategoriye ayrılabilir: a- Büyük tek katmanlı veziküller (LUV) ve b- Küçük tek katmanlı veziküller (SUV). Tek katmanlı lipozomlarda vezikül, sulu çözeltiyi çevreleyen çift katmanlı tek bir fosfolipid tabakaya sahiptir. Çok katmanlı lipozomlarda, veziküller, soğan gibi çok tabakalı bir vezikül yapıya sahiptir. Boyutları; 25 nm – 2.5 µm arasında değişmektedir. Vezikül boyutu, lipozomların sirkülasyon yarı ömrünün belirlenmesinde akut bir parametredir ve hem boyut hem de çift tabaka sayısı, lipozomlardaki ilaç kapsülleme miktarını etkileyen önemli parametrelerdir. Yapılarında genellikle; fosfolipidler, kolesterol ve

yük verici maddeler bulunur (15). Hidrofobik ve hidrofilik kısımdan oluşurlar (Şekil 2.6).



Şekil 2.6: Lipozom yapısının şematik gösterimi (16).

Lipozom özellikleri; lipid bileşimi, yüzey yükü, boyut ve hazırlama yöntemi ile önemli ölçüde farklılık gösterir. Ayrıca, çift katmanlı bileşenlerin seçimi, çift katmanın sertliğini veya akışkanlığını ve yükünü belirler. Örneğin, doğal kaynaklardan (yumurta veya soya fasulyesi fosfatidilkolin) elde edilen doymamış fosfatidilkolin türleri çok daha geçirgen ve daha az kararlı çift katmanlar verirken, uzun asil zincirli doymuş fosfolipidler (örneğin dipalmitoil fosfatidilkolin) katı, oldukça geçirimsiz bir çift katmanlı yapı oluşturur. Kullanım amacı ve lipozomdan istenilen özellikler doğrultusunda değişik hazırlama yöntemleri ile hazırlanabilirler. Biyouyumlulukları yanında; boyutları ve hidrofobik ve hidrofilik karakterleri nedeniyle lipozomlar, ilaç dağıtımı için, umut verici sistemlerdir (15).

Diyagnostik ve/veya terapötik amaçla kullanılan lipozomların avantajları aşağıda özetlenmiştir (17-20).

- Lipozomlar; hem lipofilik hem de hidrofilik ilaçların taşınmasında kullanılabilen, biyouyumlu sistemlerdir. Lipozomlar; vücudun temel yapı taşı olan fosfolipidlerden oluştukları için, biyoparçalanabilirler, bu nedenle immünojenik ve toksik etki göstermezler.

- Farklı fizikokimyasal özellikteki diyagnostik bileşik ve/veya ilaçları, hapsedebilme kapasitesine sahiptirler. İlacın, lipozomun hangi kısmında tutulacağı, ilacın fizikokimyasal özelliklerine ve lipidin bileşimine bağlıdır. Hidrofilik ilaç molekülleri, genel olarak lipozomun içteki sulu kısmında, hidrofobik ilaç molekülleri ise lipid tabakasında tutulur.
- Oldukça farklı boyutlarda ve kimyasal bileşimlerde hazırlanabilirler.
- Düşük dozlarda bile terapötik etki gösterebilirler ve etkin maddenin plazma seviyesini, istenilen süre boyunca, terapötik değerde tutabilme, yeteneği taşırlar.
- İlaçların yarılanma ömürlerini uzatırlarken; yan ve toksik etkileri azaltır veya ortadan kaldırırlar. Dozlama aralığını da uzatırlar.
- Etkin maddeyi, vücutta enzimatik etkileşimlerden korurlar. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyarak, ilaç hedeflendirmesi yapabilirler.
- Diyagnostik bileşikler, geniş spektrumlu kemoterapötikler, antijenler, immunomodülatörler, şelasyon yapan bileşikler, hemoglobin ve kofaktörler, lipidler ve genetik materyal gibi geniş yelpazedeki ilaçların taşınmasını sağlarlar.
- Lipozomlar, ilaç deposu olarak davranırlar ve hapsedilen ilaç zaman içerisinde yavaşça salınır. Uzatılmış salım profili ile; dolaşımda veya lokal uygulama yerinde, etkin terapötik ancak nontoksik kan seviyelerini sürdürülebilmektedirler.

Lipozomların görüntüleme ve tedavi amaçlı kullanım alanlarından en önemlilerinden biri de tümör görüntüleme ve kanser tedavisinde kullanımındır **(21-28)**.

İlaç taşıyıcı sistemlerden lipozomlar; tümör ve odaklarına hedeflendirme ve etken madde taşınımı, ya da bu dokunun görüntülenmesinde kullanılabilecek ilaç taşıyıcı sistem olarak; literatürde yer alan avantajları, kullanım uygulamaları, çok yönlü kullanımları ve tümöre spesifik hedeflendirmede önemleri, ligand

taşınımındaki uygunlukları nedeniyle bu çalışmamızda tercih edilerek kullanılmıştır (29-37).

2.3.2. Lipozomların Hedeflendirilmesi

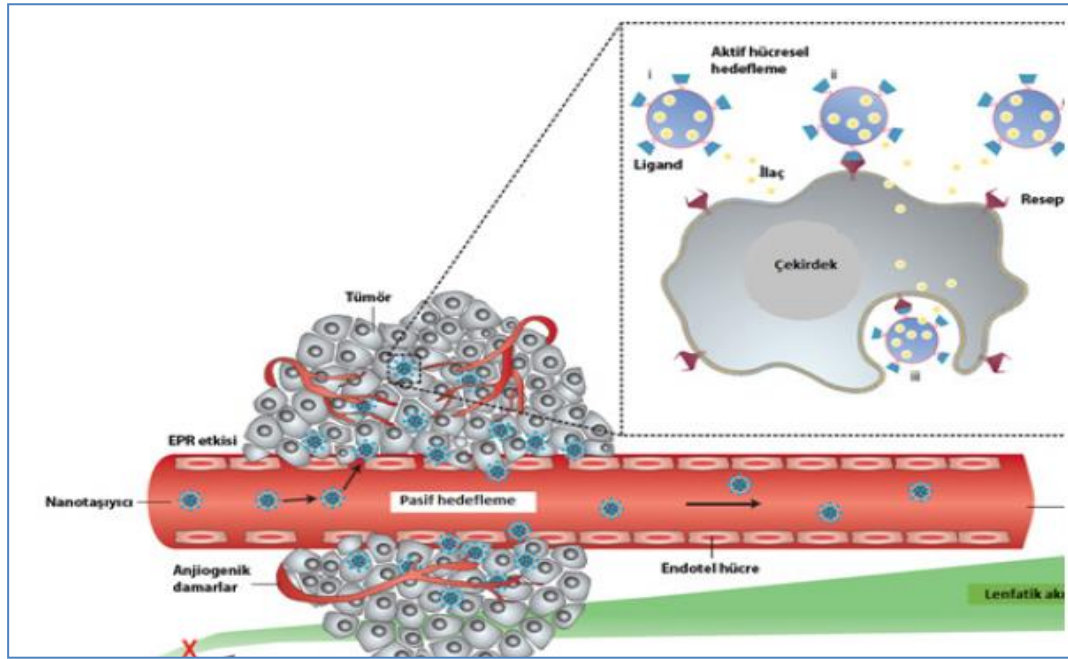
Hedeflendirme; etkin maddenin, istediğimiz bölgeye, seçici olarak yönlendirilmesiyle, diğer bölgelere göre artırılması olarak kısaca tanımlanabilir. Bu amaçla birçok ilaç taşıyıcı sistem kullanılabilir. Lipozomlar, karbon nanotüpler, polimerik nanopartiküller, kuantum noktacıkları (QDs), polimerik konjugatlar, polimerik miseller, polimerzomlar, altın nanopartiküller, dendrimerler, sifingozomlar, mikroküreler, mikrobaloncuklar, niozomlar, süpermanyetik partiküler taşıyıcı sistemler en yaygın kullanılan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Özellikle kanser gibi spesifik hedeflendirme gereken durumlarda, ilaç toksisitesini azaltmak, çoklu ilaç direncini engellemek amaçlarıyla, nanotaşıyıcılar ve sıklıkla da yukarıda belirtilen avantajları nedeniyle lipozomlar, aktif ve pasif hedeflendirme için tercih edilen ilaç taşıyıcı sistemlerdir.

Lipozomlar genellikle küresel şekilli, bir veya birden fazla tabakadan oluşan vezikül yapılarıyla, kan dolaşımına girdikten sonra plazma proteinleriyle etkileşirler ve Retikulo Endotelial Sistem (RES) tarafından hemen uzaklaştırılırlar. Bu durum; RES organlarına hedeflendirme açısından avantaj iken diğer bölge ve sistemlere ilaç taşınımı açısından ise bir dezavantajdır.

Kansere karşı aktif madde içeren nanotaşıyıcıların ve lipozomların hedeflenmesi sonucunda; daha yüksek seçicilikte, tedavi seçenekleri ortaya çıkmıştır. Kanserde hedefleme yapmak için ise; tümöre etkin şekilde ulaşmak ve tümör biyolojisinin bilinmesi oldukça önem taşır. Tümör bölgesindeki, tümör hücrelerinin yüzey reseptörlerindeki ve damarlanmasındaki farklılıklarda, bu bölgeye ilaç taşınımı için, diğer önemli parametrelerdir. Bunun sonucunda; **pasif hedefleme** ve **aktif hedefleme** adı verilen kavramlar ortaya çıkar. Lipozomun büyüklüğü, yüzey yükü vb. özellikler ile tümör bölgesinde fiziki birikimi sağlanırken pasif hedefleme yapılmış olur. Moleküler hedeflerin eklendiği bazı hedefleyici

ajanların da nanotaşıyıcılara bağlanmasıyla; tümörü yokedici moleküllerin, seçimli olarak, hedef bölgeye daha yoğun bir şekilde ulaştırılması sonucu aktif olarak bir hedeflendirme sağlanmış olur (38).

Tümöre nanotaşıyıcılar ile ilaç taşınmasında pasif ve aktif hedeflemenin şematik gösterimi ise Şekil 2.7'de verilmiştir.



Şekil 2.7: Tümöre nanotaşıyıcılar aracılığıyla ilaç taşınmasında pasif ve aktif hedeflemenin şematik gösterimi (39).

Diagnostik bileşiklerin/ilâçların sistemik yolla uygulanmasında karşılaşılan en büyük sorunlardan bir diğeri ise; diagnostik bileşiklerin/ilâcın tüm vücutta dağılması yani geniş dağılım hacmine sahip olmasıdır. Bu nedenle; teşhis veya tedavi amacıyla kullanılan ilâcın, istenen dokuda yeterli ilâç konsantrasyonuna ulaşabilmesi için; ilâcın yüksek dozda veya tekrarlanan uygulamalarla sık olarak hastaya uygulanması gerekmektedir. Bu da beraberinde toksisite riskini getirmektedir. Bu sorunun üstesinden gelmede; ilâç taşıyıcı sistemler ve lipozomlar son derece önemli avantajlar sağlamaktadır. Çünkü bu sistemler pasif veya aktif yolla hedeflendirilebilmektedirler.

2.3.2.1. Pasif Hedeflendirme

İlaç taşıyıcı sistemlerin, canlılara uygulandıktan sonra, doğal şekilde, hücre, doku ya da organa yerleşmesine pasif hedeflendirme adı verilir. Ya da bir başka tanımla; doğal fizyolojik uygulamalar sonucunda ya da bazı pasif faktörler sayesinde partiküllerin belirli bölgelere ulaştırılmasıdır. Bu hedeflendirme yönteminde; ilaç taşıyıcı sistemlerin partikül boyutu, yüzey özelliği, uygulanma yolu gibi farklı özelliklerinin değiştirilmesi sayesinde hedeflendirme sağlanılır. Tümör dokularının lipozomlar tarafından pasif olarak hedeflenmesinin temeli, esas olarak, normal kılcal damarlarda bulunan "daha sıkı" yapılara kıyasla, tümör mikrovaskülerindeki endotel hücreleri arasındaki farklı gözenek boyutlarıdır. Bu nedenle, normal dokularda taşıyıcıların kılcal damarlardan çıkmasını engellerken, tümör dokularında ekstrasvazyon yapmalarına izin verecek büyüklükte lipozomlar hazırlanırsa ideal bir hedefleme hedefine ulaşılmış olur. Örneğin, poli (etilen glikol) (PEG) ile kaplanmış lipozomal doksorubisin (Doxil), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan anti-kanser etkileri olan ilk lipozomdur **(38)**.

Etken madde içeren ilaç taşıyıcı sistemlerin, makrofajlarla pasif hedeflendirilmesinde, Retikülo endotelial sistem (RES)' in yabancı partikülleri kandan uzaklaştırma özelliğinden faydalandığı çalışmalar vardır **(40)**. Örneğin; Zaru M. ve arkadaşları, alveolar makrofajları pasif olarak hedefleyen, Rifampisin yüklü lipozomlarla bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada tüberküloz dışı enfeksiyonun en sıklıkla nedenlerinden biri olan (MAC)=Mikobakteri Avium Kompleksi' e Rifampisin içeren, aerosol olarak vermeye uygun, nebulize lipozom vezikülleri hazırlanarak, karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Soya fosfatidil kolini Phospholipon 90'ın kolesterol içeren ve içermeyen iki formülasyonu ile Soya lesitini (SL) ile hazırlanan formülasyonlar karşılaştırılmıştır. Sıçanlarda aerosol inhalasyonunu takiben lipozomlara enkapsülasyonun akciğerlerdeki Rifampisin seviyeleri üzerindeki etkisi belirlenmiştir. Sonuçlar, düşük faz geçiş sıcaklığına sahip fosfolipidler SL ve P90 ile hazırlanan tüm formülasyonların nebulizasyon özelliklerinin ve viskozitesinin vezikül bileşiminden etkilendiğini göstermiştir. Bununla birlikte, tüm formülasyonların,

nebulizasyon sırasında iyi bir stabilite gösterdikleri ve başlangıçta eklenen ilacın %65' inden fazlasını tutabildikleri de belirtilmiştir. Sonuç olarak; hazırlanan lipozomların, enfekte makrofajlarda, MAC büyümesini engelleyebildiğini ve sıçanlarda alt solunum yollarına ulaşabildiğini göstermişlerdir **(41)**.

Yine lipozomların pasif hedeflendirilmesinden faydalanılarak yeni bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve bu çalışmada pasif hedefleme özelliklerine sahip lipozomal ilaç ürününün in vitro salım testi için, iki aşamalı ters diyaliz yöntemi kullanılmıştır. İki farklı membran difüzyon tekniği, diyaliz ve ters diyaliz yöntemi karşılaştırıldığında, ters diyaliz yönteminin önemli ölçüde daha düşük varyasyon gösterdiği ve bu nedenle tercih edilen yöntem olarak kullanılabilceği bulunmuştur. Geliştirilen in vitro salım testi yöntemi için; çeşitli bileşimlere sahip pasif hedeflendirilmiş lipozomların kalite kontrol testi için için yeni bir test metodu olarak; formülasyonları ayırt etmeye yardımcıdır ve biyoloji ile ilgili salım testi yöntemlerinin geliştirilmesi içinde katkı sağlamaktadır sonucuna ulaşmışlardır **(42)**.

Artmış Geçirgenlik ve Tutulum Etkisi

Artmış geçirgenlik ve tutulum etkisi (EPR = *Enhanced Permeability and Retention Effect*); değişik büyüklüğe sahip molekül veya ilaç taşıyıcı sistemlerin tümör dokusunda, normal dokularda görülmeyen bir şekilde birikmeleri şeklinde sonuçlanan etkiye verilen isimdir. İlaç taşınımı, "pasif hedefleme" olarak da isimlendirilir. EPR etkisi ise; ilk olarak 1986 yılında Matsumura ve Maeda tarafından yapılan yayında tanımlanmıştır **(43)**. Tümör damarlarının artmış besin ve oksijen ihtiyacı nedeniyle makromoleküler bileşiklere karşı oldukça geçirgen olduğu gözlemlenmiştir. Normal damarlarda, 2 nm' den daha büyük moleküller; endotel hücrelerin arasından geçemezler. Bu bölgeler, tümörlü dokularda bozulduğundan dolayı, büyüklüğü 10-500 nm arası makromoleküller dokulara geçebilir ve tümör dokularında birikebilir. Tümör dokusuna girdikten sonra, bu makromoleküler bileşikler, uzun bir süre boyunca tümör dokusu içinde tutulurlar. Tümör bölgelerindeki lenfatik boşaltımın bozukluğu, burada biriken moleküllerin, bölge

dışına çıkmasını dahada zorlaştırır. Tümör bölgelerindeki damarsal yapıların taşıdığı bu özelliklerinden faydalanılarak, pasif hedeflendirme yapılabilir. Bu yolla hedeflendirmede; tümöre spesifik ilaç tedavisi uygulanmasında ve kansere karşı ilaçların geliştirilmesinde oldukça faydalıdır **(44)**.

Deneyisel küçük hayvan tümör modellerinde, EPR etkisinin, insan tümörlerine göre daha önemli olduğu düşünülmektedir. İlaç taşıyıcı nanopartiküler sistemlerin, insan tümör dokusuna ilacı ulaştırma oranı, hayvan tümör modellerine kıyasla çok düşüktür. Nanopartiküllerin tümörlere ekstrasvazyon mekanizması, sadece tümör damar yapısındaki endotelial hücreler arasındaki boşluklar yoluyla değil, aynı zamanda vezikülo-vakuolar organeller (VVO'lar) tarafından transsellüler yollar yoluyla da olur. Bu nedenle, ilaç geliştirme ve klinik uygulamada bu kavramı daha iyi kullanmak için; EPR etkilerinin, patofizyolojik mekanizmasının, tuzaklarının ve stratejilerinin önemini anlamak oldukça önemlidir. İlk kez 1980' li yılların ortalarında pasif hedefleme yoluyla etki gösteren ilaç taşıyıcı sistemler-klinik aşamaya ulaşmıştır. Lipozom ve polimer-protein konjugatı halindeki ilk ilaç taşıyıcı ürünler ise; 1990' lı yılların ortalarında ticarileşmiştir (Örneğin Doxil/Caelyx, Doksorubisin taşıyan PEG-lipozom) **(45)**.

Son yıllarda lipozomlar üzerinde yapılan bir çalışmada; kanser tedavisi için, ilaç taşıyıcı sistemlere umut verici bir alternatif olarak F127 kodlu triblok kopolimerleri ile kaplanmış DPPC lipozomları kullanılmıştır. Lipozomlar, yeterli boyutları, yüksek stabiliteleriyle EPR etkisinden kaynaklanan pasif hedefleme göstermişlerdir. Hem pasif hem de aktif hedefleme elde etmek için ilginç bir strateji olarak, birbirine kovalent bağlı F127 ve Biotin birarada kullanılmıştır. Sonuçlar, DPPC lipozomlarının, tek basit bir bağlanma ve düşük maliyetli hazırlama ile yeterli fiziksel özellikler sergilediğini ve F127 veya F127 Biotin ile de olumlu sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Eritrosin-desil ester (ERYDEC) içeren lipozomların ototoksisite çalışmaları; ERYDEC/lipozomların kanser hücrelerini inhibe edebildiğini göstermiştir. Bununla birlikte, F127 Biotin içeren lipozomların etkinliği, F127 içerene göre çok daha yüksek olarak bulunmuştur. Ayrıca ERYDEC'in floresan özelliklerine dayanan

hücrel alım çalışmaları, hücre tarafından alım için iki saatlik bir inkübasyon süresinin yeterli olduğunu göstermiştir (46).

2.3.2.2. Aktif Hedeflendirme

Sıklıkla kullanılan hedeflendirme yöntemlerinden biri olan aktif hedeflendirme; etkin madde ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin, değişik moleküller eklenmesiyle, hedeflenen hücre, doku ya da organlara taşınmasıdır. Aktif hedefe yönelik olarak hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemler temel olarak; vücuttaki belirli organ içindeki, hedeflenen hastalıklı alana, belirli miktarda terapötik veya tanısal ajanın ya da her ikisinin birden verilmesi yöntemine dayanmaktadır (47).

Aktif hedeflendirme, genellikle hedeflendirilmesi düşünülen bölgenin özellikleri gözönünde bulundurularak gerçekleştirilir. İlaç taşıyıcı bu sistemlerin hedeflendirilmesinde; kimyasal (pH, reaktif oksijen türleri, proteazlar) ve fiziksel (ısı, magnetik alan, ultrason) gibi faktörler ile hücreye spesifik bağlanma ile hedefleme gibi hedefleme stratejileri sıklıkla kullanılır. Aktif hedeflendirmeyi etkileyen faktörler ise; ligandın yoğunluğu, nanotaşıyıcının büyüklüğü ve şekli, yüzey yükü ve hidrofobisitesi ile ligandın yüküdür.

Aktif Hedeflendirme; Uyarılma ile Aktive Olma ve Ligand Aracılığıyla olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilebilmektedir (48).

Uyarılma ile Aktive Olarak Hedeflendirme:

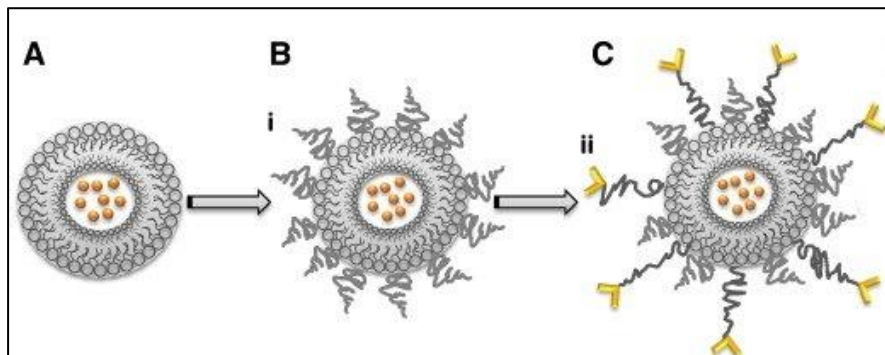
Bu hedeflendirme de uyarılma internal olarak (pH ve enzim aracılığıyla) gerçekleşebilmektedir. RES gibi sistemlere yakalanmadan tümöre ulaşan ilaç taşıyıcı sistemler, hücrelerarası ortamın özelliklerine bağlı olarak ve belirli bir hedefle etkileştikten sonra ilaç salınımını gerçekleştirirler. Tümör bölgesi pH'ının asidik olmasından faydalanarak dahedeflendirme yapılabilmektedir. Bundan dolayı bu tür pH ile ilaç salınımı gerçekleştiren lipozomlara; "pH hassas" lipozomlar tabiri kullanılmaktadır (49).

pH' ya duyarlı bir bağlayıcı kullanılmasıyla yürütülen bir çalışmada; lipozomların hücreyle etkileşebileceği yapıya dönüşümü hedeflenen etki yerinde sağlanmıştır. Bu sistem hazırlanırken; lipozom yüzeyine hidrazon bağlayıcı ile tutturulmuş, pH 5-6 'da kopan, bir PEG tabakası eklenmiştir. Lipozomun yüzeyindeki pH 7.4'de PEG'le korunan transkripsiyonel aktivatör protein (TAT), pH 5-6'da PEG TAT' ı salıverirken; hidrazon bağlayıcı da hidrolize uğrar ve lipozomlar hücrelere girer. Bu sistemin tümöral hücre dışı pH değerinden, daha düşük bir pH değerinde, duyarlılığına rağmen; daha gerçekçi pH değerlerinde de aktive olabilen ilaç taşıyıcı sistemlerin hazırlanabileceği bulunmuştur (50).

Ligand Aracılığıyla Hedeflendirme:

Aktif hedeflendirmede sıklıkla ligand aracılıklı hedeflendirme kullanılmaktadır. Taşıyıcı sistem üzerine, hedefe özgü bir hedeflendirme molekülü bağlanarak; taşıyıcı sistem, dolayısıyla, içinde hapsettiği ilaç ve/veya üzerinde bulunan görüntüleme bileşiği, hedefe spesifik olarak taşınmakta ve bu sayede ilgili dokuda, daha yüksek ilaç konsantrasyonları sağlanabilmektedir.

Lipozomlarda aktif hedeflendirmeye yönelik şematik bir gösterim Şekil 2.8' de verilmiştir.



Şekil 2.8: Konvansiyonel lipozomlar (A), dolaşımda uzun süre kalan hidrofilik polimer (i) ile kaplı lipozomlar (B) ve aktif hedeflendirme için hidrofilik polimerin ucuna antikör (ii) bağlanmış lipozomlar (C) (51).

Aktif Hedeflendirmede kullanılan ligantlara örnekler; albümin, monoklonal antikolar, aptamerler, viral proteinler, vitaminler, monoklonal antikor-enzim konjugatları, folat (folik asit), yüksek derecede reseptör afiniteli lektinler, hyaluronik asit, sitokinler, transferrin, biyotin, küçük moleküller ve şekerler olarak sayılabilir.

İlaç ve/veya ilaç taşıyıcı sistemlerin aktif hedeflendirmesi için kullanılan hedeflendirme molekülleri Tablo 2.3' de özetlenmiştir.

Tablo 2.3: Aktif hedeflendirmede kullanılan ligantlara örnekler (52).

Ligand Türü	Ligand	Hedef
Antikor	Anti-HER2 (insan epidermal büyüme faktörü)	HER2 reseptörü
	Anti-CD19	B cell lenfomada aşırı eksprese olan CD19
	Nükleozom-spesifik 2C5 mAb	Kanser hücresi yüzeyine bağlı nükleozomlar
Protein	Transferrin	Transferrin reseptörü
	Interleukin 13 (IL-13)	IL-13 reseptörü
Peptid	Octreotide	Somatostatin reseptör tip-2
	LHRH (luteinleştirici hormon salan hormon)-türevi peptidler	LHRH reseptörü
	Arg-Gly-Asp (RGD)	Endotelial tümör hücrelerinde aşırı eksprese olan $\alpha\beta3$
Küçük Molekül	Folat	Folat reseptörü
	Estrone	Östrojen reseptörü
	Anisamide	Sigma reseptörü
Şeker	Mannoz	Dendritik hücreler ve makrofajlar
	Laktoz	Asialoglikoprotein reseptörü

Prostat kanserinde Trastuzumab ile yüklenmiş katyonik lipozomlar kullanılarak yapılan bir çalışmada; Prostat kanserinde TCTP proteininin aşırı ekspresyonunun, kastrasyon direncinde önemli bir rol oynadığı belirtilerek, son on yılda, antisens teknolojisinin onkolojide yükselen bir strateji olarak ortaya çıktığı

üzerinde durulmuştur. TCTP proteinini susturmak için antisens oligonükleotidin (ASO) kullanılması umut verici bir terapötik seçenek olarak belirtilmiş ancak ASO'nun farmakokinetiğinin her zaman tümör bölgesine uygun dağıtım gereksinimlerini karşılamadığı da eklenmiştir. Bu bağlamda, ilaç dağıtım sistemleri geliştirmenin, TCTP'ye yönelik, ASO'nun etkinliğini artırmak için, çekici bir strateji olduğu belirtilmiştir. Lipozomun, etkili olabilmesi için ASO'nun hücre içine korunarak taşınması gerektiği belirtilmiştir. Ayrıca prostat kanseri hücreleri Her2' yi eksprese ettiğinden, bir anti-Her2 hedefleme antikorunun kullanılmasının, lipozomun hücre için afinitesini artıracak ve ASO'nun intratümöral penetrasyonunu optimize edeceği ve böylece etkinliği artıracak vurgulanmıştır. PEG' lenmiş ve Her-2 hedefli lipozomlar tasarlanarak geliştirilmiştir. Lipozomların ortalama çaplarının 200 nm' nin altında tasarlanmasıyla, uygun bir EPR etkisinin sağlandığı da vurgulanmıştır. Bu pilot çalışma ile; ASO' yu lipozomlara kapsüllemenin ve prostat kanserine karşı antiproliferatif etkinlik sağlamanın mümkün olduğu sonucuna ulaşılmıştır **(53)**.

Somatostatin reseptörü-2 (SSTR2) meme kanseri hücrelerinde aşırı eksprese edilir. Bu bilgi doğrultusunda yapılan çalışmada; SSTR2 hedefleme ajanı olarak sentetik bir somatostatin analogu (SST) ve terapötik molekül olarak da Diacerein kullanılmıştır. Diacerein yüklü lipozomlar (DNL) hazırlanmış ve ayrıca sentetik ve stabil somatostatin analogu (SST-DNL) eklenmiştir. Üretilen lipozomlar nano boyutta ve biyoyumlu bulunmuştur. SST-DNL, meme kanseri modellerinde serbest Diacerein (DN) ve DNL' ye kıyasla önemli ölçüde daha iyi anti-tümör etkinlik göstermiştir. Ek olarak, SST-DNL, anjiyogenezi ve kanser hücresi istilasını etkili bir şekilde bastırmıştır. Bir MDA-MB-231 fare ksenograft modelinde in vivo tümör büyümesi, SST-DNL uygulamasının ardından önemli ölçüde bastırılmıştır. Ksenograft modelinde, Ki-67 ve CD-31'in immünohistokimyası, SST-DNL' nin Diacerein'in anti-proliferatif ve anti-anjiyojenik etkilerini iyileştirdiğini göstermiştir. Sıçanlarda yapılan in vivo farmakokinetik çalışmalar, serbest DN ile karşılaştırıldığında DNL veya SST-DNL ile tedavi edilen gruplarda etken maddenin kanda dolaşım süresinin arttığını göstermiştir. Tüm bu bulgular göz önüne alındığında, SST-DNL'nin meme kanseri

tedavisi için daha iyi etkinliğe sahip yeni bir strateji sağladığı sonucuna varılmıştır **(54)**.

Bir başka çalışmada; Paklitaksel etkin maddesinin kromofor bazlı formülasyonlarının yan etkileri ve pasif hedeflendirmenin sınırlamalarından dolayı, tümöre spesifik hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistem olarak hyaluronik asit kaplı lipozomları hazırlanmıştır. Hyaluronik asit elektrostatik olarak lipozomların yüzeyine bağlanmıştır. Lipozomlar üzerinde gerekli kalite kontrolleri yapılarak, enkapsülasyon etkinliği ve salım profili incelenmiştir. Tampondaki lipozomların salınım profili, 40 saat boyunca Paklitaksel'in %95' inin salındığını göstermiştir. 4T1 ve T47D hücreleri üzerindeki yapılan sitotoksikite çalışmaları, serbest paklitaksel ile karşılaştırıldığında lipozomal paklitakselin sitotoksik etisinin daha fazla olduğunu göstermiştir. Hücre döngüsü analizi, hücrelerin lipozomlarla 48 saatlik tedaviden sonra esas olarak G2/M fazlarında bloke edildiğini göstermiştir. 4T1 tümör taşıyan fareler üzerinde in vivo gerçek zamanlı görüntüleme, lipozomal formülasyonun esas olarak tümör alanında biriktiğini ortaya çıkarmıştır. Ayrıca kromofor bazlı formülasyonlar ile karşılaştırıldığında, lipozomal paklitakselin daha iyi antitümör etkinliğe sahip olduğu ve hyaluronik asit hedefli paklitaksel lipozomlarının gelecekteki kanser kemoterapisi için, umut verici hedeflendirilmiş paklitaksel formülasyonları olabileceği rapor edilmiştir **(55)**.

Epidermal büyüme faktörü reseptörü varyantı III (EGFRvIII), birçok insan tümöründe EGF reseptörünün en yaygın varyantıdır. Bu varyant, tümöre özgüdür ve yüksek oranda immünojeniktir, bu nedenle tümör hücrelerine yönelik hedefli ilaç dağıtımı için bir hedef olarak kullanılabilir. Bu konuda yapılan bir çalışmada; Doksorubisin (Dox) yüklü nanoyapılı lipid taşıyıcılara (NLC) konjuge anti-EGFRvIII monoklonal antikorunu (MAb) ile, EGFRvIII aracılı bir ilaç dağıtım sistemi geliştirmek amaçlanmıştır. Anti-EGFRvIII MAb' yi Dox-NLC' ye konjuge etmek için DSPE-PEG2000-NHS (1,2-distearoilfosfatidiletanolamin-polietilen glikol 2000-NHS) bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Sonuç olarak, anti-EGFRvIII MAb hedefli NLC, hedeflenen ilaç dağıtımı için etkili bir nanotaşıyıcı olarak düşünülebilir sonucuna ulaşılmıştır. HC2 20d2/c hücreleri tarafından hedeflenen NLC'nin hücresel alım

yüzdesinin, NIH-3T3 hücrelerininkinden daha yüksek olması; EGFRvIII' in spesifik olarak HC2 20d2/c hücrelerini hedefleyebileceğini göstermiş ve anti-EGFRvIII MAb hedefli NLC, hedeflenen ilaç dağıtımı için etkili bir nanotaşıyıcı olarak bulunmuştur (56).

2.3.2.3. Dolaşımda Uzun Süreli Kalabilen Lipozomlar

Lipozomlar intravenöz (i.v) verilmeyi takiben, RES tarafından tutulurlar. Bunu önlemek ve sirkülasyonda daha uzun süre kalmalarını sağlamak için; lipozomun yapısına Poli Etilen Glikol (PEG) gibi bazı maddeler ilave edilir. Bu şekilde kaplanmış lipozomlar; Dolaşımda Uzun Süre Sirküle olan (*Long Circulating*), Stealth®, "Sterik Olarak Stabilize Edilmiş (*Sterically Stabilized*)" veya PEG ile kaplanmışsa "PEGlenmiş (PEGylated)" olarak isimlendirilirler. Zira lipozom yüzeyindeki uzun PEG zincirleri, güçlü bir sterik engel oluşturarak, lipozomun dolaşımdan hemen uzaklaştırılmasını engeller. Ancak PEG' in sterik engel oluşturma gücünün; zincir uzunluğuna ve konsantrasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir (57-59). Ayrıca GM1 (Gangliosid) ilave edilmiş lipozomların da sirkülasyonda uzun süre kaldığı ve kan-beyin engelini aşabildiği saptanmıştır (60).

2.4. Folik Asit, Folik Asit Reseptörü ve Folik Asit Reseptörüne Hedeflendirme

Bu çalışma kapsamında aktif hedeflendirme bileşiği olarak folat kullanılmıştır. Folik asit; (C₁₉H₁₉N₇O₆) B grubu vitaminlerden suda eriyen bir vitamindir (Vitamin B9). Folat, folasin, vitamin M olarak da adlandırılır. Yeşil yapraklarda yaygın olarak bulunduğu için bu ad verilmiştir. Folik asit, canlı vücudunda hücreler tarafından, üç farklı tipteki folat reseptörü tarafından hücre içine alınır. Bunlardan en önemlisi Folat reseptörü alfa1' dir. Folat reseptör beta ve gama reseptörleri de diğer iki reseptör çeşididir (61).

Folik asidin, vücuttaki çeşitli indirgenmiş türevlerine, genel olarak, “folat” adı verilir ve metabolik olarak aktif olan formlar da, folat formlarıdır. Folatlar; nükleik asitlerin ve amino asitlerin metabolik reaksiyonlarında tek karbonlu birimlerin taşınmasında ve aktarılmasında rol oynarlar.

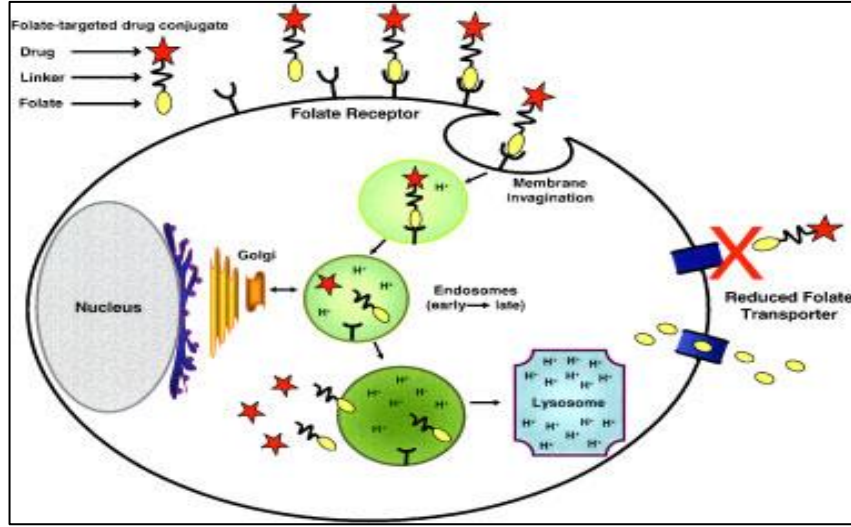
Folik asidin; düşük molekül ağırlığına sahip (MA: 441), suda kolay çözünür olması, değişik çözücü, pH ve sıcaklıklardaki stabilitesi, terapötik ve görüntüleme kullanılan ilaçlara kolay bağlanması, kimyasal reaksiyonlarda kolaylıkla kullanılabilmesi, hedeflemede ligand olarak kullanılan hormonlar, sitokinler, aptamerlere göre daha ucuz olması, antikörlerin tersine immunojenite özelliği göstermemesi ve folat reseptörlerine gösterdiği yüksek bağlanma, folik asitin hedeflendirmede uygun bir ligand olarak sıklıkla kullanılmasının nedenleri arasında yer almaktadır. Çoğu folat konjugatı, organik solvanlarda, asit ve bazda stabil kalabilmekte ve hedeflendirilmiş ilaç kolaylıkla saflaştırılabilmektedir. Yüzeysel folik asit ile modifiye edilmiş nanotaşıyıcılar yüzeysel peptid-protein veya antikörle modifiye edilmiş nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında; daha küçük olduklarından daha iyi doku penetrasyonu gösterirler ve folat reseptörü taşımayan dokulardan daha hızlı bir şekilde uzaklaştırılırlar. Folat bağlı ilaçlar kolaylıkla hücrelere ulaşabilmekte, folik asit hücrelerin esansiyel ihtiyacı olduğu için non-immunojenik özellik göstermekte ve tümörlerde kolaylıkla birikim göstermektedir. Bu nedenle de; “folik asit/folat” hedeflendirme bileşeni olarak sıklıkla kullanılan bileşiklerdendir **(62)**.

Folatların hücre içine alımı, vücutta tüm hücrelerde bulunan, düşük afiniteli indirgenmiş folat taşıyıcılar ya da çok sınırlı miktarda bulunan, “folat reseptörleri”, aracılığıyla olmaktadır. İndirgenmiş folat taşıyıcıları, folik asitin indirgenmiş formlarını, spesifik olarak taşıırken, folat reseptörleri; hem folik asiti hem de folik asite bağlı kemoterapötik, görüntüleme bileşiği, protein, lipozom, nanopartikül gibi yapıları da hücre içine taşımaktadır. Folat reseptörleri, normal hücrelerde düşük miktarda bulunurken; meme, kolon, akciğer, prostat, burun, boğaz ve beyin kanserleri gibi pek çok kanser türünde, tümör hücrelerinde yüksek miktarda

bulunurlar. Bunun yanında; folat reseptörünün miktarıyla, tümörün hangi evrede olduğu ve derecesi arasında, sıkı bir ilişki olduğu bulunmuştur.

Folat reseptörü; özellikle tümör hücresine ilaç hedeflendirmesinde, yaygın kullanılan moleküler hedefler arasında yer almaktadır. Bugüne kadar tümöre selektif ilaç taşınımı için folik asitle bağlanan ilaçlar olarak; proteinler, toksinler, kemoterapotik maddeler, gen terapi vektörleri, oligonükleotidler, radyoaktif görüntüleme ve tedavi ajanları, manyetik rezonans görüntüleme kontrast maddeleri, hapsedilmiş ilaçlarla ilaç taşıyıcı sistemler, immunoterapotik ajanlar ve önilaç tedavisi için enzim bileşenleri sayılabilir. Folat bağlı ilaçlarla yapılan klinik deneyler; folat reseptör hedeflendirmenin kanser tedavisinde kullanılan birçok ilacın toksisitesini azaltırken; etkinliğin artırılmasında, oldukça umut verici olduğunu göstermiştir. Folat konjüğe ilaçların onkoloji alanındaki geliştirilmesi sürecinde; folat reseptörlerinin, dinlenme ya da hareketsiz olmayan makrofajların aktivasyonunda da etkili olduğu görülmüştür. Bu gelişme, makrofajların aktivasyonuna neden olan; romatoid artrit, Crohn's hastalığı, ateroskleroz, lupus, iltihaplı osteoartrit, diyabet, iskemi-perfüzyon hasarı, glomerülonefrit, sarkoidoz, sedef hastalığı, Sjogren's hastalığı ve vaskülit gibi hastalıklarda, folat konjüğe tedavi ve görüntüleme ilaçları geliştirme amaçlı çalışmaları başlatmış, çok kısa zaman içerisinde birçok enflamatuar ve otoimmün hastalıkların tedavileri için klinik adayların belirlenmesinde de kullanılmıştır **(63)**.

Folat konjugatı, hücre yüzeyinde bulunan folat reseptörlerine bağlandıktan sonra, folik asit ve ona bağlı ilaç/taşıyıcı sistemler; reseptör aracılıklı endositoz aracılığıyla, hücre içine alınırlar (Şekil 2.9).



Şekil 2.9: Folat bağlı bileşiklerin reseptör aracılıklı endositozunun şematik gösterimi (64).

Kanser tedavisinde folat reseptörlerine hedeflendirme yapılmaktadır. Folat reseptörleri, folik asit ve metil tetrahidrofolata yüksek afinitesi olan, folat bağlayıcı protein olarak da bilinen, glikopeptit yapısındaki reseptörlerdir (65,66). Folat reseptörleri normal hücrelere göre kanserli hücrelerde daha yoğunlaşmıştır. Kanserli hücrelerde hızlı ve kontrolsüz şekilde proliferasyon, protein ve DNA sentezi olduğu için, folik asit ihtiyacı fazlaşmaktadır. Folat reseptör sayısı da normal hücreye göre daha fazladır. Normal hücreler, folatı, hücre membranından geçirirken, folat konjugatlarını geçirmemektedirler, malign hücreler ise folat reseptör aracılığı ile folat konjugatlarını da geçirmektedir (64,65). Hedeflendirme amacıyla kullanılan ligantların çoğu lizozomlarda yıkıma uğrarken, folik asit hücre için esansiyel olduğundan yıkıma uğramamakta ve taşıyıcı görevini yerine getirmektedir (64-67). Ovaryum kanseri ve akciğer kanseri gibi birçok kanser türünde, folik asit reseptörü, aşırı çoğalmaya sebep olan bir protein olarak bulunmuştur (68-70). Bu reseptörün, normal bir dokuya göre, tümörlü dokularda, yaklaşık 100–300 kat daha fazla çoğalabildiğinin de gözlemlendiği bildirilmiştir (69).

2.4.1. Folik Asitle Modifiye Edilmiş, Tümöre Hedeflendirilmiş Taşıyıcı Sistemlerle Yapılmış Çalışma Örnekleri

Folik asit reseptörünü yönelik, doksorubusin içeren misellerle yapılan in vivo çalışmalarda; hedeflenmiş misellerin, hedeflenmemiş olanlara göre, tümör büyüme hızını, iki kat azalttığı bulunmuştur **(71)**.

Diğer bir çalışmada ise; poliamidoamin dendritik polimerleri ile hazırlanan 5 nm çapındaki nanopartiküllere hedeflendirici ajan olarak folik asit konjuge edilmiş, ayrıca antikanser etkili etkin madde ve floresan madde bağlanmıştır. Farelere iv uygulamadan 4 gün sonra nanopartiküllerin tümör ve çevresinde yoğun şekilde tutulduğu görülmüştür. Böylece, etkin madde olan metotreksatin serbest haline göre; antitümör aktivitesinde artış ve toksisitesinde azalma sağlanmıştır **(72)**.

Manyetik karbon nanotüpler (MNT) kullanılması ile; manyetik lenfatik hedeflendirme yapılan bir çalışmada; antikanserojen etkin maddelerden 5-flurourasil ve siplatin, iç yüzeyinde Fe₃O₄ gibi manyetik partiküller taşıyan nanotüplerin gözeneklerine eklenmiştir. PEG, folik asit, fosfolipitler MNT'lere bağlanarak ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmiştir. Hazırlanan ilaç taşıyıcı sistemleri bölgesel olarak lenf düğümlerine hedeflendirmek için dışarıdan bir mıknatis kullanılmıştır. Böylece birkaç gün süresince hedeflendirildiği lenf sistemlerinde tutulan ilaç taşıyıcı sistem, etkin maddeleri sürekli olarak serbest bırakabilmiştir. Bununla birlikte MNT'lerin lenf hücreleri tarafından kolayca alınması sonucunda; kanser hücrelerini selektif olarak yok ettikleri gösterilmiştir. Ayrıca, lenf düğümlerindeki, folat reseptörlerini (FR'ler) aşırı eksprese eden tümör hücrelerinin, seçici olarak öldürülmesi, FR'nin, geniş bir insan tümörleri yelpazesinde de aşırı eksprese edilmesi sebebiyle, kullanılabilceği sonucunu da beraberinde getirmiştir. Sonuçta; yüzey modifikasyonu yapılan MNT'lerin, kansere lenfatik hedeflendirme için uygun taşıyıcı sistemler olduğu sonucuna ulaşılmıştır **(73)**.

Tomasina ve arkadaşlarının 2013 yılında nanopartiküllerle yaptıkları bir çalışmada, yumurtalık kanserinde, hedeflendirilmiş antitümör ajan tripentonun etkisi incelenmiştir. Aktif hedefleme için nanopartiküller folat ile

fonksiyonlandırılmış, suda çok az çözünen tripton, nanopartiküllere hapsedilerek yumurtalık kanseri hücrelerine hedeflendirilmiştir ve karakterizasyonu yapılmıştır. Hücre içine alımı incelenmiş ve folat- reseptör endositoz yoluyla hücre içine alındığı tespit edilmiştir. Sonuç olarak; bu çalışmaya ek olarak in vivo çalışmalara da gereksinim duyulmakta olduğu belirtilmiştir **(74)**.

Bir başka çalışmada ise, 5-florourasil içeren nanopartiküller folat ile fonksiyonlandırılarak, 5-florourasilin nanopartiküllerden in vitro salım çalışmaları yapılmış; nanopartiküllerin karakterizasyonu, salım profili ve tümör üzerindeki inhibisyon oranı incelenmiştir. İn vitro salım çalışması sonucu; 5- florourasil yüklü nanopartikülün salım yarı ömrü, 5-florourasilin yarı ömründen 26,4 kez daha uzun çıkmıştır. İn vitro hedef testi yapılmış ve bunun sonucunda da folatla konjuge 5-florourasil yüklü nanopartikülün tümör inhibisyonu, saf 5- florourasilden ve 5-florourasil yüklü nanopartiküllerinkinden çok daha yüksek çıkmıştır **(75)**.

Ga-68 kullanılarak yapılan bir çalışmada; Folat reseptör pozitif kanserleri tespit etmek için uygun biyokimyasal özelliklere sahip yeni folat radyo-görüntüleyiciler geliştirme girişiminde, Ga-68-NOTA (1,4,7-triazasiklononan-triasetik asit) ve Ga-68-NOTAM (1,4,7-Triazasiklononan-N, N'-diasetamid)-folat konjugatları basit ve tek adımlı basit bir reaksiyon kullanarak sentezlenmiştir. İnsan epidermal karsinom (KB) hücre ksenografları taşıyan çıplak farelerde yapılan biyo dağılım çalışmaları sonucunda; Ga-68-NOTA-folat, Ga68-NOTAM-folat konjugatına göre; daha yüksek tümör tutulumu ve daha uygun biyolojik dağılım profili göstermiştir. Tümörlerdeki alım, aşırı folik asit enjeksiyonu ile bloke edilmiş, bu da reseptör aracılı bir süreci düşündürmüştür. Bu sonuçlar, Ga-68-NOTA-folat konjugatının, yumurtalık kanseri ve bunların metastazları gibi folat reseptör-pozitif kanserlerin saptanması ve evrelendirilmesi için moleküler bir prob olarak faydalı olabileceğini ve ayrıca tedavide, tümör yanıtını izlemeye imkan sağladığını göstermiştir **(76)**.

Enfeksiyon ve inflamasyon görüntülenmesi amacıyla kullanılan ajanların gelişimine Ga-68 radyonüklidinin katkısıyla ilgili bir derlemede ; folik asit içeren Ga68-DOTA-PEG-FA (Ga-68-1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetik asit - Polietilen glikol - Folik Asit), model olarak deri altına implante edilmiş , polilaktik asit

ve poli (N-izopropilakrilamid) partikülleri içeren tıbbi implantlar kullanılarak, inflamatuvar yanıtın saptanması ve ölçülmesi için fareler kullanılarak araştırıldığı bir çalışma; [68Ga] Ga-DOTA-folatın, inflamatuvar bir sıçan modelinde başarıyla test edildiği ikinci bir çalışma ve Tc-99m ile işaretlenmiş bir folat analogunun romatoid artritli hastada iltihaplı el ve ayak eklemlerinde belirgin birikimi gözlenirken, artrit olmayan bir hastanın ellerinde ve ayaklarında tutulum tespit edilmemiş olduğu bildiren üçüncü bir çalışma daha bildirilmiştir **(77)**.

F-18 içeren bir radyofarmasötik geliştirilme çalışmasında; yeni geliştirilen F-18-OEG (oligoetilenglikol)-folat daha önce geliştirilmiş [F-18] floro-deoksi-glikoz folat ile karşılaştırıldığında, daha iyi görüntüleme özellikleri göstermiştir. Öte yandan, [F-18] floro-deoksi-glukoz folatdan, üç kat daha yüksek tümör alımı, önemli ölçüde artan kontrast değerleri göstermesiyle çok daha iyi bir tümör görüntülenmesine imkan sağlamıştır. Bununla birlikte, yeni F-18-OEG-folata yapısal benzerlikleri olan, F-18-PEG-folat, inflamatuvar hastalıklarda aktive makrofajların görüntülenmesinde umut verici sonuçlar vermiştir. Bu çalışma, bu tür PEG' lenmiş 18 F-folatların, folat reseptör (FR) pozitif dokunun, in vivo PET görüntülenmesi için, uygunluğunu ve geniş potansiyellerini doğrulamıştır. Özetle, yeni geliştirilen F-18 ile işaretli radyofolat, mükemmel radyokimyasal kullanılabilirliğe sahiptir ve folat reseptörüne yüksek ve spesifik bir afinite sergilemiştir **(78)**.

Bu çalışmada da kullandığımız taşıyıcı sistem olan lipozomların özelliklerinin geliştirilmesi (PEG ile kaplama, yüzey yükünün değiştirilmesi, partikül büyüklüğünün ayarlanması vb) çalışmalarıyla beraber yürütülen folat hedefli taşıma çalışmalarının sayısı son zamanlarda büyük bir hızla artmaktadır. Lipozomların özelliklerinin geliştirilmesiyle; oral insülin taşınımı, kozmetik olarak dışarıdan patch şeklinde folik asit beslenmesi, C vitamini taşıyan antioksidan, kemik ve meme kanserine karşı çifte hedefli, inhale edilebilir toz formunda akciğer kanserine karşı ve değişik türdeki tümörlere karşı tedavi özelliklerinin iyileştirilmesi gibi çok geniş amaçlarla folat hedefli lipozom çalışmaları yapılmaktadır **(79-90)**.

2.5. Ga-68 İşaretli İlaç Taşıyıcı Sistemlerle Yapılan Çalışma Örnekleri

Literatürde, tümör hücrelerine spesifik olarak hedeflendirilmiş, değişik görüntüleme yöntemleri için, farklı diyagnostik bileşik taşıyan lipozomlarla yapılmış çok sayıda çalışma olmasına rağmen; Ga-68 işaretli ve konvansiyonel veya hedeflendirilmiş lipozom/ilaç taşıyıcı sistemlerle ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Ga-68 ile çalışmalar daha çok, Ga-68 işaretli peptidlerle ve bu işaretli peptidlerin tümör hücrelerine spesifik olarak hedeflendirilmesi üzerine yapılmış çalışmalardır. Ancak Ga-68'in özellikle son yıllarda klinik kullanımının artmasıyla birlikte, yakın gelecekte, Ga-68 ile işaretli ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılan çalışmalarının artacağı düşünülmektedir.

Değişik lipozom formülasyonları kullanılarak yapılan patentli bir çalışmada; lipozomlar şelatör olarak DOTA kullanılarak, indium-111 (In-111), lutesyum-177 (Lu-117), galyum-67 (Ga-67), galyum-68 (Ga-68), bakır-64 (Cu-64) ve itrium-90 (Y-90) ile işaretlenerek kitleri hazırlanmıştır. Hazırlanan işaretli lipozom dispersiyonlarından; In-111-Lipozom ve In-111-DOTA lipozom dispersiyonlarının in vitro stabiliteleri incelenmiş ve daha sonra in vivo çalışmalar kapsamında bu işaretli dispersiyonlar insan bağırsak kanseri hücreleri (LS174T) ile tümör modeli oluşturulmuş tüysüz farelere i.v yolla uygulanmış ve enjeksiyondan sonraki 8, 24, 48 ve 72. saatte MicroSPECT / CT görüntüleri alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki radyoaktif işaretli lipozom dispersiyonununda, tümörlü hayvan modelinde, iyi bir tümör tutulumu gösterdiği ve en yüksek tutulumun 48. saat' de gözleendiği bildirilmiştir (91).

Ga-68 işaretli taşıyıcı sistemlerle ilk yapılan çalışmalardan birinde Wagner ve arkadaşları, Ga-68 işaretli albümin ve albümin mikroküreleri hazırlamışlardır. Çalışmada insan serum albümini model protein olarak kullanılmış ve protein ile DTPA, amid bağı ile bağlanmıştır. DTPA- HSA' nın saflaştırılmasından sonra, Ga-68' in DTPA işaretli protein ile şelasyonu yoluyla, Ga-68 işaretli albümin yüksek verimde işaretlenmiş, in vitro ve in vivo stabilite çalışmaları, işaretlenmiş proteinin birkaç saatlik bir süre boyunca stabil olduğunu göstermiştir. Daha sonra aynı bifonksiyonel

şelat yapıcı madde, yani DTPA, albümin mikrokürelerinin işaretlenmesi için kullanılmıştır. Ga-68'i HSA mikrokürelere bağlamak için aynı tip iki işlevli şelat kullanılmıştır **(92)**.

Bir diğer çalışmada ise; Manyetik Rezonans Görüntüleme (MR), PET görüntüleme ve floresans görüntüleme de kullanılmak üzere aminosilan kaplı multimodal superparamanyetik nanopartiküller hazırlanmıştır. PET görüntüleme için hazırlanan nanopartiküller, Ga-68 ile işaretlenirken, floresans görüntüleme için, nanopartiküllerin yapısına, floresein isotiyosiyanat katılmıştır. Hazırlanan nanopartiküller, sıçanlara i.v yolla uygulanmış ve PET/MR görüntüleri alınmıştır. PET/MR görüntüleri, partiküllerin 24 saat süresince karaciğer ve dalakta tutulduğunu göstermiştir. İnsan hepatom hücreleri (HuH7) ile yapılan in vitro toksisite testlerinde, partiküllerin intrasellüler tutulumunun hızlı olduğu ve toksisite göstermediği bulunmuştur. Sonuç olarak modifiye superparamanyetik nanopartiküllerin; hem in vitro hem in vivo koşullarda stabil olduğu ve multimodal görüntüleme ve hücre işaretleme çalışmalarında kullanılabilecekleri rapor edilmiştir **(93)**.

Tc-99m işaretli radyofarmasötikler ventilasyon / perfüzyon (V/P) tek foton emisyon tomografisi kullanan pulmoner görüntüleme, klinik olarak şüpheli pulmoner emboli (PE) için köklü bir tanı aracı olarak kullanılırken, bu çalışmada; Ga-68 aerosol (Galligas) ve Ga-68 etiketli makro agregat albümin (MAA), pozitron emisyon tomografisi (PET) akciğer V/P görüntüleme için potansiyel izleyicilerdir ve duyarlılık ve özgüllük açısından geleneksel V/P taramalarına göre bir avantaj gösterebilmiştir. Radyokimyasal ve hayvan çalışmalarından sonra, klinik PE şüphesi olan hastalarda Ga-68 aerosol (Galligas) ve Ga-68 etiketli MAA' nin klinik uygulanabilirliği araştırılmıştır. PET taramaları, 16 kesitli Gemini TF pozitron emisyon tomografisi / bilgisayarlı tomografi (PET/BT) tarayıcısı kullanılarak elde edilmiştir. Ek olarak, in vitro deneylerle, çeşitli ortamlarda Ga-68 MAA' nin stabilitesi gösterilmiştir. Beklendiği gibi, Ga-68 etiketli insan serum albümin mikrokürelere (HSAM), hayvanların akciğerlerinde tamamen tutulmuştur. Klinik kullanımda, Ga-68 aerosol (Galligas) ve Ga-68 etiketli MAA kullanılarak PET akciğer ventilasyonu ve

perfüzyon görüntülemesi, tüm vakalarda başarılı olmuştur. Böylece klinik olarak şüphelenilen bir PE tespit edilebilmiş ve doğrulanabilmiştir. Ga-68 aerosol (Galligas) ve Ga-68 etiketli MAA' nın uygulanan aktivitesi %50' den fazla azaltılabilmiş ve bu da geleneksel V/P taramalarına benzer radyasyona maruz kalmaya neden olmuştur. Sonuç olarak, Ga-68 aerosol (Galligas) ve Ga-68 etiketli MAA, klinik kullanım için, Mo-99 azlığında, PET/CT tarayıcılarının ve Ga-68 jeneratörlerinin yaygın kullanımı açısından önemli bulunmuştur **(94)**.

Diğer bir çalışmada ise; insan serum albumini mikroküreleri (DOTA-HSAM) Ga-68, Y-90 ve Lu-177 ile işaretlenerek stabiliteleri karşılaştırılmıştır. Denatüre insan serum albümininden (DOTA-türetilmiş insan serum albümin mikroküreleri veya DOTA-HSAM) türetilen mikropartiküller, hem terapötik hem de tanısal amaçlar için çekici radyonüklid taşıyıcılarıdır ve Ga-68 ve Lu-177 durumunda % 95'e varan işaretleme verimleri elde edilmiştir. Ga-68 işaretli DOTA-HSAM, yüksek in vitro ve in vivo stabilite göstermiştir. Lu-177 DOTA-HSAM' ın partiküle bağlı radyoaktivite miktarı, 13 gün sonra doğrusal bir şekilde yavaş yavaş yaklaşık %2' ye düşmüştür. Y-90 için, artan radyoaktivite seviyesi ile işaretleme verimi azalmıştır. Bu bulguların nedeni olarak radyoliz düşünülmüştür. DOTA-HSAM'ın farklı radyonüklitlerle işaretlenmesi kolaydır ve in vivo kısa yarı ömrü (3,7 gün) ile birlikte, işaretli şelatörün radyasyonla uyarılan parçalanması, DOTA-HSAM'ın terapötik uygulamalarını engellemiştir. Öte yandan, Ga-68 DOTA-HSAM'ın yüksek stabilitesi, onları PET ile bölgesel perfüzyon ölçümü için çekici bir aday haline getirmiştir **(95)**.

Ga-68 işaretli poli (laktik-koglikolik asit) (PLGA) nanopartikülleri kullanılarak nöroendokrin tümörlerde yapılan bir çalışmada; Nöroendokrin tümörlerin (NET'ler) tedavisi için kullanılan peptid reseptör radyonüklid terapisi (PRRT), NET'ler üzerinde Somatostatin Reseptörlerinin (SSTR'ler) aşırı ekspresyonuna dayanmakla birlikte, böbreklerde radyoaktif olarak işaretlenmiş peptidin yüksek tutulumu sözkonusudur ve bu da böbreklerin gereksiz radyasyona maruz kalmasına ve dolayısıyla nefrotoksisiteye neden olur düşüncesinden hareketle PRRT ilaçlarını spesifik olarak tümöre iletmek için bir nanotaşıyıcı kullanmak, ilişkili nefrotoksisiteyi azaltabilir düşüncesiyle NET' ler için potansiyel bir terapötik model olarak ¹⁷⁷ Lu-DOTATATE

yüklü PLGA nanopartikülleri (NP'ler) formüle edilmiştir. DOTATATE, Lutetium-177 (Lu-177) ile etiketlenmiştir (etiketleme etkinliği %98; R(f)~0.8). Polietilen Glikol (PEG) kaplı ¹⁷⁷Lu-DOTATATE-PLGA NP'ler (50:50 ve 75:25) formüle edilmiş, ortalama boyutları 304,5 ± 80,8 ve 733,4 ± 101,3 nm (kaplamasız) ve 303,8 ± 67,2 ve 494,3 ± PLGA (50:50) ve PLGA (75:25) için sırasıyla 71,8 nm (kaplanmış)' dir. PLGA' nın kaplanmamış ve kaplanmış NP' leri (50:50 ve 75:25) için kapsülleme verimliliği (EE) ve in-vitro salım kinetiği değerlendirilmiş ve karşılaştırılmıştır. İn-vivo çalışmalar, enjeksiyondan 24 saat sonra, farklı zaman noktalarında, görüntüleme ve organ sayımı yoluyla, ¹⁷⁷Lu-DOTATATE ve ¹⁷⁷Lu-DOTATATE-NP (kaplanmamış ve PEG kaplı) enjekte edilmiş sıçanlarda yapılmıştır. PLGA 50:50 NP'ler; ¹⁷⁷Lu-DOTATATE için, daha yüksek EE ve daha yavaş salım hızı nedeniyle, PLGA 75:25'ten, daha uygun bir dağıtım aracı olarak bulunmuştur. ¹⁷⁷Lu-DOTATATE' in azaltılmış renal retansiyonu ve azaltılmış opsonizasyonu, ¹⁷⁷Lu-DOTATATE-PLGA-PEG NP'lerin, PRRT'de böbreklerdeki radyasyon dozunu azaltma potansiyelini kuvvetle savunmuştur **(96)**.

Ga-68 işaretli altın glikonopartikülleri kullanılarak yapılan bir diğer çalışmada neuropeptit konjügasyonu ile, beyin alımının geliştirilmesi, yönünde bir çalışma yapılmıştır. Beyin görüntülenmesini iyileştirmek ve kan-beyin bariyeri (KBB) boyunca ilaç geçirgenliğini artırmak için yeni araçlar ve teknikler kritik olarak gereklidir ve Pozitron emisyon tomografisi (PET), normal ve hastalık durumu koşullarında KBB geçirgenliğinin değerlendirilmesine olanak tanıyan, oldukça hassas, invazif olmayan bir tekniktir düşüncesiyle yapılan bu çalışmada, KBB geçirgen nöropeptidler taşıyan suda çözünür ve biyoyumlu glikoz kaplı altın nanopartiküllerin (GNP'ler) sentezi yapılmıştır ve in vivo izleme ile biyodağılımı için PET ajanı olarak pozitron yayıcı ⁶⁸Ga'nın şelatörü kullanılmıştır. Küçük GNP'ler (2 nm) stabilize edilmiş ve bir glikoz konjugatı ile çözündürülmüştür. Bir NOTA ligandı, ⁶⁸Ga için şelatör ajan olarak kullanılmıştır. GSMH' lerin radyoaktif işaretlemesi, 30 dakikada 70 ° C' de tamamlanmış ve ardından santrifüjlü filtrasyon yoluyla saflaştırma yapılmıştır. Farklı ⁶⁸Ga-GNP için, sıçanlarda bir biyodağılım çalışması yapılmıştır. İntravenöz uygulamadan sonra biyodağılım; tüm vücut PET görüntüleme ve seçilen organların gama sayacı ölçümleri ile tesbit edilmiştir. ⁶⁸Ga-

GNP' lerin biyolojik dağılımı ligandlara bağlı olarak değişmiş, aynı altın çekirdek boyutuna sahip GSMH' ler farklı dağılım profilleri göstermişlerdir. Hedeflenen ⁶⁸Ga-GNP' lerden birisi, diseksiyon ve doku sayımı ile ölçüldüğü üzere; hedeflenmemiş GNP'lere (0.0073 ± 0.0024% ID / g) kıyasla, BBB geçişini 3 kata yakın (0.020 ± 0.0050% ID / g) iyileştirmiştir **(97)**.

Diğer bir çalışmada, Zr-89 ile Ga-68 işaretli sideroküreler in-vitro ve in-vivo olarak karşılaştırılmıştır. Radyoaktif işaretleme, HEPES veya sodyum asetat tampon sistemlerinde gerçekleştirilmiştir. İşaretli siderokürelerin radyokimyasal saflığı, kromatografi kullanılarak belirlenmiştir. Partisyon katsayıları, in vitro stabilite ve protein bağlanma afiniteleri araştırılmıştır. İn vivo biyolojik dağılım ve hayvan görüntüleme kontrolleri farelerde yapılmıştır. İşaretleme verimliliği incelenen sideroküreler arasında, belirli farklılıklar gözlenmiştir. Protein bağlama ve stabilite testleri; Ga-68 ve [⁸⁹Zr] triasetilfusarin C (T AFC) için, en yüksek stabilite ve en düşük protein bağlanma afinitelerini göstermiştir. Çalışılan tüm Ga-68 ve [⁸⁹Zr] sideroküreleri, [⁸⁹Zr] ferrioksamin E (FOX E) haricinde farelerde benzer bir biyo dağılım ve farmakokinetik sergilemiştir. Zr-89 ve [⁶⁸Ga] sideroküreleri benzer in vitro ve in vivo davranış göstermiştir. Test edilmiş [⁸⁹Zr] sideroküreleri, longitudinal pozitron emisyon tomografisi (PET) çalışmaları ve özellikle T AFC; yeni biyokonjugatların geliştirilmesi için uygulanabilir bulunmuştur **(98)**.

Literatürde Ga-68 in değişik nanopartiküllerle çifte peptit-peptit konjüge ve değişik bileşiklerle mesela; insülin salgılanmasını destekleyen glukagon benzeri peptit (GLP) reseptörünün bir peptit agonisti Exendin-4 ile işaretleme yönelik çalışmalar vardır **(99-103)**. Ga-68'in folat hedeflendirme ile birlikte kullanıldığı çalışmalarda bulunmaktadır **(91,104-109)**.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Alet ve Gereçler

Dikey Akımlı Hava Kabini	HeraSafe Thermo Electr. Corp. Almanya
Doz Kalibratörü	Capintec CRC 1278, ABD
FT-IR Spektrometre	Perkin Elmer, ABD
Gama Sayıcı	Berthold LB 2111, Almanya
Ge 67/Ga 68 Jeneratörü	ITG, Almanya (Moltek)
Hassas Terazi	Mettler Toledo, İsviçre
Hücre Kültürü İnkübatörü	Heraeus Inst. Cytoperm 2, Almanya
Hücre Sayım Cihazı	Beckman Coulter CH 750 Analyzer, ABD
Isı Bloğu	Nüve BH 250, Türkiye
Isıtmalı Ektrüsyon Ünitesi	Lipex, Biomembrans, Kanada
Liyofilizatör	Labconco Freezone 4,5 Plus, ABD
MALDI-MS / MALDI-TOF-MS	Voyager De PRO, Applied Biosys, ABD
Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001, Almanya
Mikropipet	Eppendorf Research Plus, Almanya
Mo-99/Tc-99m Jeneratörü	Monrol, Türkiye
Partikül Boyutu Tayin Cihazı	Malvern Nanosizer, İngiltere
PET/CT Kamera	SEDECAL- SuperArgus 2r, ABD
pH Metre	Inolab WTW Ph Meter, Almanya
Polarizan Mikroskop	Leica DM EP- Leica Microsys., Almanya
Rotavapor	Buchi, İsviçre

U.V Spektrofotometre	Optima SP3000 Plus, Japonya
Vakumlu Etüv	Shel Lab, ABD
Vorteks	Heidolph Reax Top, Almanya
Zeta Potansiyel Tayin Cihazı	Malvern Zetasizer, İngiltere

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

1,2 - dioktadekanoil- <i>sn</i> – glisero - 3- fosfokolin (DSPC)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2 - dioleil - <i>sn</i>-glisero-3-fosfoetanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2 - distearoil- <i>sn</i> – glisero – 3 - fosfoetanolamin- N- [folat (polietilenglikol) -2000] (DSPE-PEG 2000-Folat)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2- distearoil - <i>sn</i> – glisero – 3 - fosfoetanolamin – N - [(polietilen glikol)-2000] (DSPE-PEG 2000-NH₂(Amonyum Tuzu)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2 - dipalmitoil – <i>sn</i> - glisero- 3 - fosfoetanolamin - N - (lisamin rodamin B sulfoil (Rhodamin-PE Amonyum tuzu)	Avanti Polar Lipids, ABD
4 - (2-Hidroksietil) piperazin - 1- etansülfonik asit (HEPES) Tamponu	Merck, Almanya
Amonyum Molibdat	Merck, Almanya
Aseton	Merck, Almanya
Asetonitril (HPLC Saflığında)	Merck, Almanya
Askorbik asit	Merck, Almanya
Azot Gazı	Lider Gaz, Türkiye
Diethyenetriamine pentaacetic acid anhydride (DTPA)	Sigma, ABD
Dimetilformamid (DMF)	Sigma, ABD
Dimethyl Sülfokside (DMSO)	Sigma, ABD
Diyaliz Membranı (M.A:3500)	Spectrum Labs, ABD
Fetal Sığır Serumu (%10)	Biological Industries,İsrail
Fosfatidil Kolin (PC)	Avanti Polar Lipids, ABD
Hidroklorik Asit (HCl)	Merck, Almanya
Kalay Klorür (SnCl₂.2H₂O)	Merck, Almanya
Kloroform	Sigma, ABD
Kolesterol	Sigma, ABD
Kromotografi Kağıdı (ITLC-SG)	Gelman Sciences, ABD
Penisilin-Streptomisin (%10)	Biological Industries,İsrail

Perklorik Asit (%70)	Riedel De Haen, Almanya
Polikarbonat Membran Filtreler (0.4, 0.5, 0.22 µm)	Millipore, ABD
RPMI-1640 Besi Yeri	Biological Industries, İsrail
Sodyum Asetat.3H₂O	Merck, Almanya
Sodyum Dihidrojen Fosfat (NaH₂PO₄.2H₂O)	Merck, Almanya
Sodyum Dodesil Sülfat	Sigma, ABD
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck, Almanya
Sodyum Sitrat	Merck, Almanya
Tetrazasiklododekan - 1,4,7,10 - tetraasetikasit mono - N- hidrosüksinimid esteri (DOTA-NHS Ester)	Macrocyclics, ABD
Tetrahidrofuran (THF)	Sigma, ABD
Trietilamin (TEA)	Sigma, ABD
Trifloroasetik Asit (HPLC Saflığında)	Sigma, ABD

3.3. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde-Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu

Çalışmamızda Ga-68 ile işaretleme için ve bu şelat yapıcı maddenin lipozom bileşimine kolaylıkla katılması için 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoethanolamin -N-(polietilen glikol)-DOTA (DSPE -PEG₂₀₀₀-DOTA) konjugatı sentezlenmiştir. Bu bölümde, çalışmada kullanılan bu şelat yapıcı madde-fosfolipid konjugatının sentezi ve karakterizasyonunun bahsedilmiştir.

3.3.1. DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA Sentezi

DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA sentezi Hsu ve arkadaşlarının (91) yöntemine göre yapılmıştır. Kısaca, Tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetikasit mono-N-hidroksüksinimid esteri (DOTA-NHS ester) ve 1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N-[amino(polietilenglikol)2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂) (2,5/1 molar oranda) dimetilformamid (DMF)' de ayrı ayrı çözüldükten DSPE-PEG₂₀₀₀-NH₂ /DMF üzerine sonra 10 kat molar oranda Trietilamin (TEA) eklenerek bir saat manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Bu karışıma DOTA-NHS ester/DMF çözeltisi yavaşça eklenerek manyetik karıştırıcıda 24 saat karıştırılmış, süre sonunda DMF evaporator kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Elde edilen katı çözelti balon jodeden su ile miseller formatında alınarak; 3500 daltonluk diyaliz membranla oda ısısında 24 saat diyalize tabi tutulmuştur. Elde edilen karışım liyofilize edilerek, -20 °C' de, kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

3.3.2. DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA Konjugatının Kütle Spektrometresi ile Tanınması

Sentezlenen konjugat, kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. Bunun için konjugat çözünürlüğü kontrol edilerek Tetrahidrofuran (THF) içinde çözülmüş (1mg/mL), hazırlanan numune MALDI-MS için > %99 (HPLC) 2,5-Dihidroksibenzoik

asit (DHB) matriksi ile karıştırılmış örnek matriks: 1:5; v / v) ve MALDI-TOF-MS cihazı ile analiz edilmiştir.

3.4. Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

Çalışmada iki farklı lipit bileşimine sahip, şelat yapıcı madde içeren, yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş lipozom dispersiyonları hazırlanmıştır.

Lipozom dispersiyonlarında;

Fosfolipit olarak; 1,2-Distearoil-sn-glisero-3-fosfoatidilkolin (DSPC; jel state fosfolipit) veya soya fosfatidil kolin (PC; sıvı kristal fosfolipit),

Stabilize edici madde olarak; kolesterol (Chol),

Şelat yapıcı madde olarak; Distearoilfosfoetanolamin-polietilen glikol₂₀₀₀-DOTA (DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA)

Hedeflendirici bileşik olarak; 1,2-distearoil-sn-glisero- 3-fosfoetanolamin- N-[folat (polietilen glikol)-2000] (amonyum tuzu) (DSPE-PEG₂₀₀₀-Folate) kullanılmıştır.

Ayrıca hücre kültür çalışmalarında kullanılacak lipozom dispersiyonlarını floresans işaretlemek için lipid tabakaya işaretleyici olarak, 1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin-N- (lisamin rodamin B sulfoil) (Amonyum tuzu) (Rh-PE) eklenmiştir.

Çalışmalarımız sırasında öncelikle uygun lipozom dispersiyonu bileşimine karar vermek için farklı lipit bileşimine ve molar oranlarına sahip lipozom dispersiyonları hazırlanmış ve karakterizasyon çalışmaları (partikül büyüklüğü, fosfolipit verimi vb.) yapılmıştır (sonuçlar burada verilmemiştir). Hazırlanan bu lipozom dispersiyonlarından uygun bileşime sahip olan formülasyon ileriki çalışmalar için seçilmiştir.

Tablo 3.1' de çalışmalarda kullanılan lipozom dispersiyonları ve lipid molar bileşimleri verilmiştir.

Tablo 3.1: Çalışmalarda kullanılan lipozom dispersiyonları ve lipid molar bileşimleri.

Kodlar	Lipid bileşimi	Molar oranı
DSPC-DOTA	DSPC:CHOL: DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA	3/2/0.3/0.24
PC-DOTA	PC:CHOL: DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA	3/2/0.3/0.24
DSPC-DOTA-FA	DSPC:CHOL: DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG-FA:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA	3/2/0.2/0.1/0.24
PC-DOTA-FA	PC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ : DSPE-PEG ₂₀₀₀ -FA:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA	3/2/0.2/0.1/0.24

(*) Tüm formülasyonlar için başlangıç fosfolipit konsantrasyonu 70 mikromol'dür.

3.4.1. Yüzeyi Folat ile Modifiye Edilmemiş, Nanoboyutlu, PEG Kaplı

Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

Lipozom dispersiyonları Bangham ve arkadaşlarının (110) film metoduna göre hazırlanmıştır. Kısaca, molar oranlara göre uygun miktarda tartılan maddeler 250 mL'lik yuvarlak altlı balonda yaklaşık 30 mL kloroformda çözülmüş ve kloroform 20 mbar ve 30 °C'de uçurulmuştur. Elde edilen film tabakası bir gece vakumlu etüvde bekletilerek, ertesi gün film tabakası HEPES tamponu (20 mM HEPES-135 mM NaCl-pH 7.4) ile faz geçiş sıcaklığının üstündeki sıcaklıkta (DSPC için 65 °C; PC için 30 °C) sulandırılmıştır. Elde edilen lipozom dispersiyonları nano boyuta indirmek için azot basıncı altında sırasıyla 0.4 (1 kez), 0.22 µm (10 kez) polikarbonat membran filtrelerden geçirilmiştir.

3.4.2. Yüzeyi Folat ile Modifiye Edilmiş, Nanoboyutlu, PEG Kaplı Lipozom

Dispersiyonlarının Hazırlanması

Bölüm 3.4.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Tek fark olarak hedeflendirme bileşiği olan DSPE -PEG₂₀₀₀- FA Tablo 3.1'de verilen oranlarda lipit tabaka bileşimine eklenmiştir.

3.5. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu

3.5.1. Fosfolipit Miktar Tayini

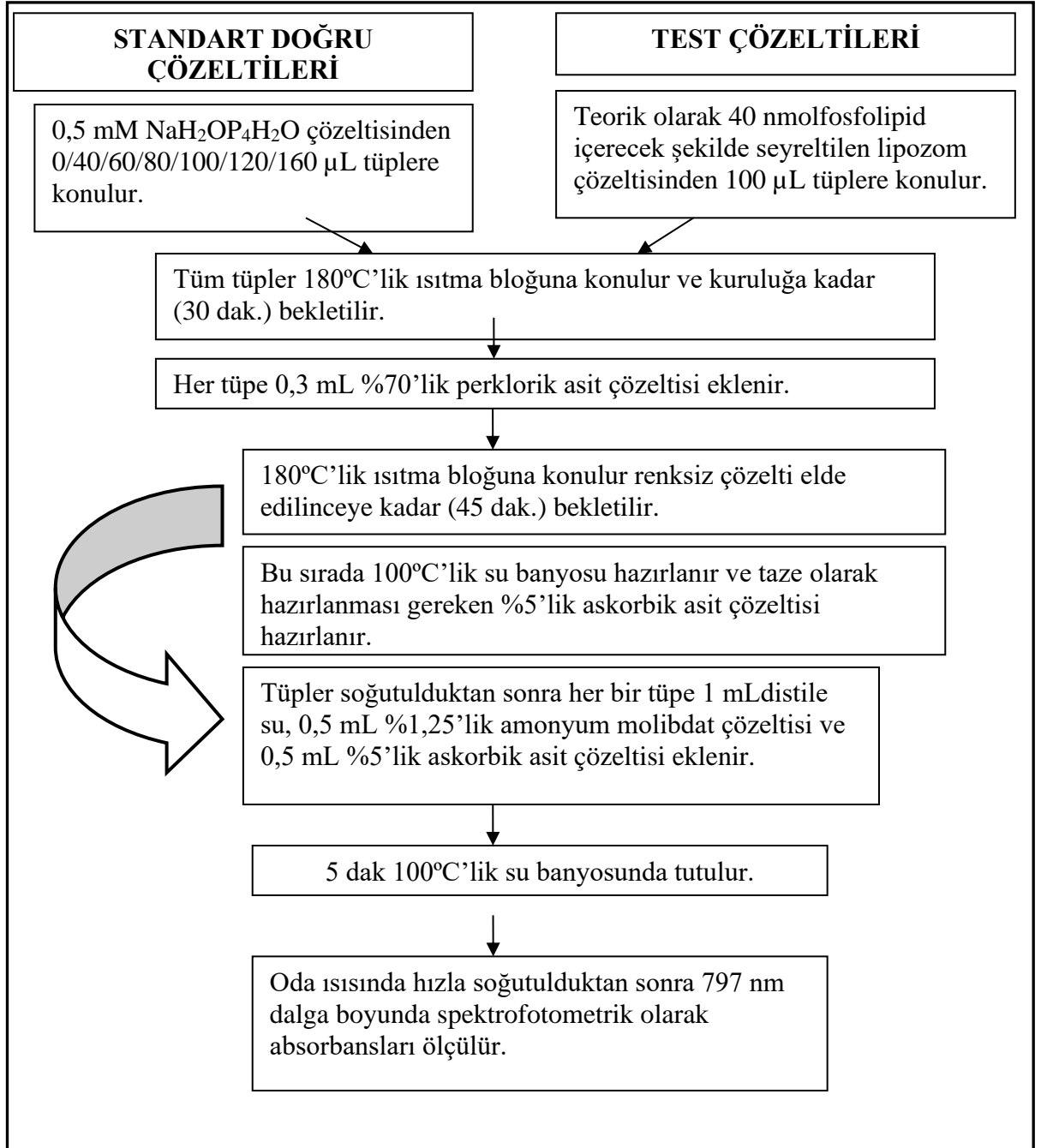
Lipozomal fosfolipit miktar tayini için Rouser ve arkadaşlarının **(111)** yöntemi kullanılmıştır. Yöntem kısaca, fosfolipidlerin perklorik asitle 180 °C' de parçalanmasını takiben amonyum molibdat çözeltisi ile oluşturduğu rengin 797 nm' de kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem Şekil 3.1.'de verilmiştir.

3.5.2. Partikül Büyüklüğü Tayini

Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının, ekstrusion işlemi öncesi ve sonrası, ortalama partikül büyüklükleri ve dağılımları Malvern Nanosizer cihazda ölçülmüştür. Tüm ölçümlerde, 0.3 ml lipozom dispersiyonu 2 ml Heps Tamponu ile 2 mL'ye seyreltilerek oda ısısında partikül büyüklüğü ölçüm işlemleri gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Zeta Potansiyel Ölçümü

Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının ekstrusion işlemi sonrası zeta potansiyelleri ölçümü Malvern Malvern Zetasizer cihazı kullanılarak, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Zeta potansiyeler ölçümlerinde de partikül büyüklüğü ölçümlerindeki gibi, 0.3 ml lipozom dispersiyonu 2 ml Heps Tamponu ile 2 mL'ye seyreltilerek, ölçüm işlemleri gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1: Lipozomların fosfolipit miktar tayin yöntemi şematik gösterimi (112).

3.5.4. Lipozom Dispersiyonlarının Polarizan Mikroskop ile Görüntülenmesi

Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion öncesi ve sonrası polarizan mikroskop görüntüleri alınmıştır. Hazırlanan tüm lipozom dispersiyonları vezikül oluşumunu doğrulamak için polarizan mikroskopla incelenmiştir.

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1. Hücrelerin Büyütülmesi

Lipozom dispersiyonlarının tümör hücreleri tarafından tutulumları farklı folat reseptör düzeyine sahip hücrelerde incelenmiştir. Bu çalışmalar için; yüksek düzeyde folat reseptörü içeren HeLa (overkarsinoma) hücreleri, düşük düzeyde folat reseptörü içeren HT-29 (kolorektal adeno karsinoma) hücreleri ve folat negatif L-929 (normal insan fibroblast) hücreleri kullanılmıştır.

HT29 insan kolon kanser hücreleri şu şekilde hazırlanmıştır; %10 fetal dana serumu (FCS), 200 mM Lglutamin, 100U/ml penisilin, 200 µg/ml streptomisin içeren Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) besiyerinde %5 CO₂ içeren nemlendirilmiş ortamda 37 °C'deki ortam koşullarında büyütülmüştür. Üç günde bir ise kültür besiyeri tazelenmiştir.

HeLa hücrelerinin hazırlanması ise; %10 FBS, %1 penisilin/streptomisin içeren L-glutamin ve HEPES'li RPMI-1640 besiyerinde, 25 cm² lik flasklarda, %5 CO₂ ve 37 °C' deki ortam koşullarında büyütülerek gerçekleştirilmiştir.

L929 fare fibroblast hücre hattı ise; Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) içerisine penisilin-streptomycin, L-glutamin ve Fetal bovine serum (FBS) besiyerinde, 25 cm² lik flasklarda, %5 CO₂ ve 37 °C' deki ortam koşullarında büyütülerek hazırlanmıştır.

3.6.2. Rhodamin İşaretli Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

Lipozom dispersiyonlarının tümör hücreleri tarafından tutulumunun floresans mikroskop ile görüntülenmesi için floresans işaretli lipozom dispersiyonları hazırlanmıştır, bunun için lipozom lipid çifte tabakasına Rh-PE ilave edilmiştir. Tablo 3.2' de bileşimleri verilen lipozom dipersiyonları Bölüm 3.4.1 ve 3.4.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır.

Tablo 3.2: Rhodamin işaretli lipozom dispersiyonları ve lipid-molar bileşimleri.

Kodlar	Lipid bileşimi	Molar oranı
DSPC-Rh	DSPC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :Rh-PE	3/2/0.3/0.1
PC-Rh	PC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :Rh-PE	3/2/0.3/0.1
DSPC-Rh-FA	DSPC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -FA:Rh-PE	3/2/0.2/0.1/0.1
PC-Rh-FA	PC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG ₂₀₀₀ -FA:Rh-PE	3/2/0.2/0.1/0.1

3.6.3. Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Tarafından Tutulumunun Floresans Mikroskop ile Görüntülenmesi

Folat pozitif kanser hücreleri HeLa, HT-29 ve folat negatif L929 hücreleri her bir kuyuda 2×10^5 hücre olacak şekilde, floresans mikroskopu ile görüntülemeye kullanılan, özel (chamberslide) 6 kuyulu plaklara ekilmiştir. Hücreler plak yüzeyine yapışması için 1 gece bekletilmiştir. Plaklar folik asit-içermeyen besiyeri ile 2 kez yıkandıktan sonra $0.1 \mu\text{M}$ Rhodamine-PE içeren yüzeyi folat ile modifiye edilmiş (folatlı) ve yüzeyi modifiye edilmemiş (folatsız) (kontrol grubu) lipozom dispersiyonları kuyulara eklenerek 37°C ' de 2 saat süreyle inkübe edilmiştir. Daha sonra plaklar 3 kez fosfat tamponu ile yıkanarak bağlanmayan lipozom dispersiyonu uzaklaştırılmıştır. Daha sonra her bir hücre hattı; lipozom dispersiyonlarının tümör hücreleri tarafından tutulumunun incelenmesi için; floresans mikroskopta

tutulmaları incelenerek görüntüleri alınmıştır. Alınan görüntüler lipozom dispersiyonlarının tutulmaları açısından değerlendirilmiştir.

3.7. Radyoaktif İşaretleme Çalışmaları

Çalışmamızın amacı Ga-68 ile işaretleme çalışmasıdır ve Ga-68 ile işaretleme için DOTA şelat yapıcı bileşik seçilmiştir. Ancak radyoaktif işaretleme çalışmalarında kontrol amaçlı olarak; farklı şelat yapıcı bileşik olarak Dietilen triamin pentaasetikasit-fosfatidil etanolamin (DTPA-PE) de denenmiş ve ayrıca yine kontrol amaçlı olarak Tc-99m ile de işaretleme yapılmıştır.

Bu amaçla, şelat yapıcı madde-fosfolipid konjugatı olarak kullanılmak üzere, DTPA-PE sentezlenmiş ve DTPA-PE içeren lipozomlar hazırlanmıştır. Radyoaktif işaretleme çalışmaları öncesi DTPA-PE konjugatının sentezi ve bu konjugatı içeren lipozom dispersiyonlarının hazırlanmasından bahsedilmiştir. Radyoaktif işaretleme çalışmalarında da kullanılan lipozom dispersiyonları, bileşimleri ve kodları Tablo 3.3' de verilmiştir.

Tablo 3.3: İşaretleme çalışmalarında kullanılan lipozom dispersiyonları, molar bileşimleri ve kodları.

Kod	Formülasyon	Molar Bileşim
PC _L -DOTA	PC:CHOL:DSPE- PEG ₂₀₀₀ :DSPE-DOTA-PEG ₂₀₀₀	3/2/0.3/0.24*
DSPC _L -DOTA	DSPC:CHOL:DSPE PEG ₂₀₀₀ :DSPE-DOTA-PEG ₂₀₀₀	3/2/0.3/0.24*
PC _L -DTPA	PC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DTPA-PE	3/2/0.3/0.24*
DSPC _L -DTPA	DSPC:CHOL:DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DTPA-PE	3/2/0.3/0.24*

* Tüm formülasyonlar için başlangıç fosfolipit konsantrasyonu 70 mikromol'dür.

İşaretleme çalışmalarında ilk olarak yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş lipozom dispersiyonları ile çalışılmış, işaretleme ile ilgili tüm parametreler optimize edildikten sonra in vivo çalışmalarda; yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozomlar işaretlenerek in vivo çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

Ön işaretleme çalışmaları ve literatür araştırmaları sonucunda optimum pH, sıcaklık ve inkübasyon sürelerine karar verilmiş ve Ge-68/Ga-68 jeneratöründen sağılarak elde edilen Ga-68, DOTA ve DTPA içeren lipozom dispersiyonlarına (~0.3 ml); 0.3mCi (~0.1 ml) aktivitede eklenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme için optimum işaretleme koşulları olarak; 1 M HEPES (pH 4,8) tamponu, 90 °C sıcaklık ve 5 dk. inkübasyon süresi seçilmiştir.

3.7.1. DTPA-PE İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

3.7.1.1. DTPA-PE Sentezi ve Karakterizasyonu

DTPA-PE sentezi, Grant ve arkadaşlarının **(113)** yöntemine göre yapılmıştır. Kısaca, 0,1 mM Dioleoil-sn-glisero-fosfoetanolamin (DOPE), 4 ml kloroformda çözülerek üzerine 30 µl trietilamin (TA) eklenmiştir. Başka bir kaptaki 1 mM DTPA anhidr, 20 ml dimetilsülfoksit (DMSO)'da çözülmüştür. DOPE'li karışımın üzerine DTPA içeren karışım damla damla eklenmiştir. Karışım oda ısısında (25 °C) 3 saat azot gazı altında manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası karışım 3500 Dalton molekül ağırlığına sahip diyaliz torbaları kullanılarak 4 °C'de 48 saat diyalize tabi tutulmuştur. Diyaliz sonucu elde edilen karışım liyofilize edilerek, -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklanmıştır.

Sentezlenen konjugatın kütle spektrometresi ile analizi Bölüm 3.3.2' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.7.1.2. DTPA-PE İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

DTPA-PE içeren lipozom dispersiyonları Bölüm 3.2.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Farklı olarak; DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA yerine, aynı molar oranda, DTPA-PE kullanılmıştır.

3.7.2. Lipozom Dispersiyonlarının Ga-68 ile Radyoaktif İşaretlenmesi

Ga-68 ile işaretleme için farklı inkübasyon süreleri, farklı pH ve farklı sıcaklıklar denenerek bu parametrelerin işaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Ga-68 işaretli lipozom dispersiyonları pH 4 ve pH 7 'de 25 ve 50 °C sıcaklıklarda 10, 20, 30, 60 ve 120 dk. bekletildikten sonra, çözeltilerden örnek alınarak Bölüm 3.7.2.1'de anlatıldığı şekilde radyokimyasal saflığı (diğer bir deyişle işaretleme verimi) kontrol edilmiştir.

3.7.2.1. Ga-68 ile İşaretlemenin Kalite Kontrolü

Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretlenmesi sonrası, radyokimyasal saflık kontrolü, yöntem olarak Ani İnce Tabaka Kromatografisi (Instant Thin Layer Chromatography = ITLC) kullanılmış ve bunun için sabit faz olarak; ITLC-silika gel (ITLC-SG) kağıtları ve hareketli faz olarak 0.2 N sodyum sitrat çözeltisi kullanılmıştır.

1x10cm boyutlarında kesilen plakların başlangıç noktasına, Ga-68 işaretli lipozom dispersiyonları 0.1 ml hacimde tatbik edildikten sonra, plaklar 0.2 N sodyum sitrat çözeltisi içeren ve önceden doyurulmuş mini tanklarda sürüklenmeye bırakılmıştır. Tanklardan çıkarılan plaklar oda ısısında kurutulduktan sonra tam ortadan ikiye ayrılarak, her iki parça ayrı ayrı olarak, gama sayıcıda sayılmıştır ve aşağıdaki eşitlik (Eşitlik 3.1) kullanılarak % işaretleme verimi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ işaretleme verimi} = \frac{\text{İşaretli lipozom aktivitesi}}{\text{İşaretli lipozom aktivitesi} + \text{Serbest radyoizotop aktivitesi}} \times 100 \quad (3.1)$$

3.7.3. Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m ile Radyoaktif İşaretlenmesi

Kontrol amacıyla, hazırlanan lipozom dispersiyonları Ga-68 ile benzer özellik gösteren Teknesyum-99m (Tc-99m) ile de radyoaktif işaretlenmiştir. Bu amaçla, lipozom dispersiyonlarına 0,5 mL SnCl₂.2H₂O (1mg.mL⁻¹) ve Mo-99/Tc-99m jeneratöründen sağılarak elde edilen 0.3mCi Tc-99m eklenmiş, oda sıcaklığında 15 ve 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır.

3.7.3.1. Tc-99m ile İşaretlemenin Kalite Kontrolü

Lipozom dispersiyonlarının Tc-99m ile işaretlenmesi sonrası, radyokimyasal saflık kontrolü Bölüm 3.7.2.1' de anlatıldığı şekilde ITLC kullanılarak tayin edilmiştir. Sabit faz olarak, ITLC-silika gel (ITLC-SG) kağıtları ve mobil faz olarak da Tc-99m ile işaretleme çalışmalarında, serum fizyolojik ve aseton kullanılmıştır.

3.8. İn Vivo Çalışmalar

Deneyel kısım içinde yapılan hayvan deneyleri Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun **03.02.2015 tarihli** ve **2015/19-18** karar numarası ile almış olduğu hayvan deneyleri yerel etik kurul kararına uygun şekilde gerçekleştirilmiştir (**Ek-1**).

Lipozom dispersiyonlarının karakterizasyonu, radyoaktif işaretleme çalışmaları ve kalite kontrol çalışmaları sonucunda elde edilen sonuçlar değerlendirilerek, en uygun sonuç veren yüzeyi folat ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş (DSPCL-FA-DOTA, DSPCL-DOTA kodlu) lipozom dispersiyonları in vivo çalışmalar için kullanılmıştır.

Tablo 3.4: İn vivo çalışmalarda kullanılan lipozom dispersiyonları, molar bileşimleri ve kodları.

Kod	Formülasyon	Molar Bileşim
DSPC_L-DOTA	DSPC:CHOL:DSPE PEG ₂₀₀₀ :DSPE-DOTA-PEG ₂₀₀₀	3/2/0.3/0.24
DSPC_L-FA-DOTA	DSPC:CHOL: DSPE-PEG ₂₀₀₀ :DSPE-PEG-FA:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -DOTA	3/2/0.2/0.1/0.24

* Tüm formülasyonlar için başlangıç fosfolipit konsantrasyonu 70 mikromol'dür.

Tümör modeli oluşturmak için folat pozitif hücre hattı olarak 4T1 fare meme karsinom hücreleri kullanılmıştır.

3.8.1. Hücrelerin Büyütülmesi

4T1 fare meme karsinom hücreleri, %10 FBS ve %1 antibiyotik-antimiyotik ile desteklenmiş RPMI 1640 besiyerinde, 37 °C, %5 CO₂ içinde her 2-3 günde bir 1: 5 veya 1:10 bölünerek büyütülmüştür.

3.8.2. İn Vivo Tümör Modelinin Oluşturulması

In vivo deneyler için 6-8 haftalık 22-24 gr ağırlığı arasındaki BALB/c fareler kullanılmıştır. Hayvanlara ksenograft tümör modeli oluşturulmuştur. Ksenograft tümör modeli için, 4T1 hücreleri, sol meme yağ altı dokusuna subkutan enjeksiyonla, 100 mikrolitre hacimde 5×10^5 hücre olacak şekilde uygulanmıştır.

Farelere, sınırsız yiyecek ve su verilerek 23 ± 2 °C sıcaklıktaki hayvan odasında temiz talaş ve kafeslerde bakımı devam ettirilmiş ve tümör büyüklükleri ile sağlık durumları gözlemlenmiştir. Subkutan enjeksiyonlarda; yaklaşık olarak 14. günde tümör hacimleri 0.5 mm³ olarak ölçülmüş ve in vivo deneyleri için kullanılmıştır.

Intravenöz enjeksiyon yapılan hayvanlarda 14. günde hayvanların sağlık durumları kontrol edilerek metastaz modelinin oluştuğuna karar verilmiştir.

3.8.3. Biyodağılım Çalışmaları

Bölüm 3.8.2' de belirtildiği şekilde ksenograft tümör modeli oluşturulmuş 12 fare biyodağılım çalışması için 2 gruba ayrılmış, Grup-I' e Ga-68 ile işaretlenmiş, yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozom dispersiyonları, Grup-II' ye ise Ga-68 ile işaretlenmiş, yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş DSPC lipozom dispersiyonları, farelerin kuyruk venlerinden 50 $\mu\text{Ci}/0.1$ mL dozda enjekte edilmiştir. Hayvanlar 30, 60, 90 ve 120. dk.' larda öldürülmüş ve organları [kan, karaciğer, dalak, böbrek, kalp, akciğer, tümör, kas dokusu (kontrol)] çıkarılarak her bir organın ağırlığı tartılmış daha sonra, organ ve doku aktiviteleri gama sayıcıda sayılmıştır. % enjekte edilen doz / gram organ tutulumları hesaplanmıştır.

3.8.4. PET Görüntüleme Çalışmaları

Bölüm 3.8.2'de anlatıldığı şekilde ksenograft tümör modeli, oluşturulmuş deneklere Ga-68 ile işaretlenmiş yüzeyi folatla modifiye edilmiş ve edilmemiş DSPC lipozom dispersiyonları, DSPC_L-DOTA ve DSPC_L-FA-DOTA; 150 $\mu\text{Ci}/0.1$ mL doz olacak şekilde kuyruk venlerinden i.v enjeksiyonla uygulanmış ve 60. dakikada PET/BT görüntüleri çekilmiştir. Enjeksiyondan sonra, görüntüleme işlemine başlanılmasını takiben PET kullanılarak kontrol görüntüsü alındıktan sonra; 60. dakikada PET-BT ile her bir deneğin görüntüsü alınmıştır.

Her bir deneğe aynı aktivite dozu verilmesi için enjeksiyon işlemi öncesi ve sonrası enjektör aktiviteleri ölçülmüştür. PET ve PET-BT çekim sürecinde zaman çakışmalarını en aza indirmek için görüntülemelerde bazı hayvanların ikili olarak görüntüleri alınmıştır. Daha sonra elde edilen görüntüler üzerinde tümör oluşturulan bölge ve diğer ilgilenen dokular işaretlenerek görüntüler analiz

edilmiştir. Çekim ve rekonstrüksiyon için MMWKS Programı, görüntü işleme için AMIDE Programı kullanılmıştır.

BT Görüntüleme Protokolü:

V (Tüp Gerilimi) = 40 kV

A (Tüp Akımı) = 140 mA

Standart çözünürlük

514x514x566 piksel

Piksel boyutu = 120 um

3.9. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan fark olup olmadığını değerlendirmek için istatistiksel analizler yapılmıştır. Bunun için istatistiksel test seçim kılavuzu doğrultusunda hangi testin yapılacağına karar verilmiştir **(114)**.

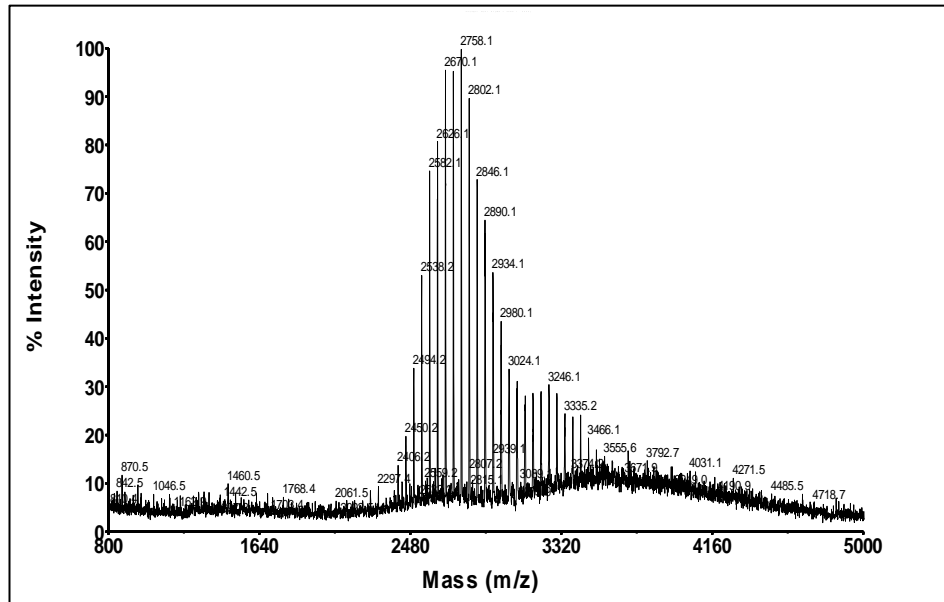
Deneylerden elde edilen veri sayıları 30'dan az olduğu için, değerlendirmelerde parametrik olmayan test yöntemleri uygulanmıştır. Karşılaştırılan grup sayısına bağlı olarak, iki grubun istatistiksel analizi için; Mann Whitney U testi, üç veya daha fazla grubun istatistiksel analizi için ise Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır.

4. BULGULAR

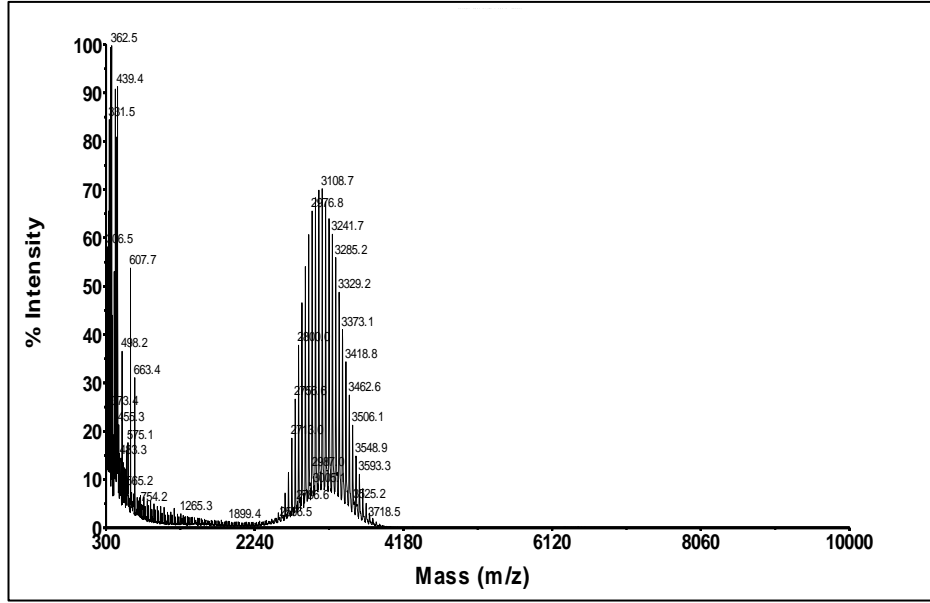
4.1. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde- Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonuna Ait Bulgular

Lipozom dispersiyonlarının lipid çifte tabakasında kullanılan DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA ve DTPA-PE sırasıyla Bölüm 3.3.1. ve Bölüm 3.7.1.1.'de anlatıldığı şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenen konjugatların karakterizasyonları kütle spektrometresi ile Bölüm 3.3.2' de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA ve DTPA-PE' nin kütle spektrometre spektrumları refletron iyon ve pozitif lineer mod olarak Şekil 4.1-Şekil 4.4' de verilmiştir.

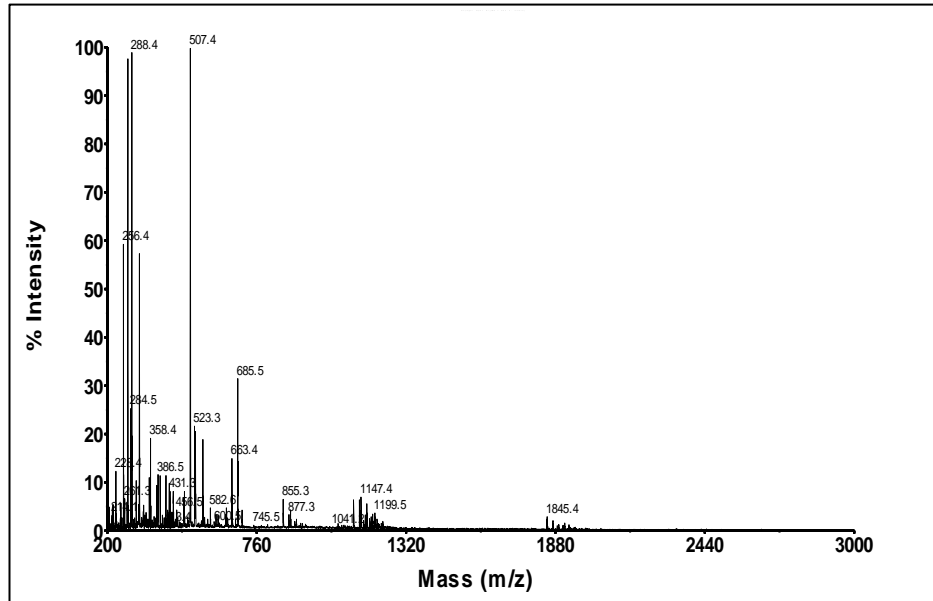
DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA'nın kütle spektrumu literatür ile karşılaştırılmış ve sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur **(91)**. DTPA-PE'ye ait spektrum literatürde bulunmadığı için böyle bir karşılaştırma yapılamamıştır.



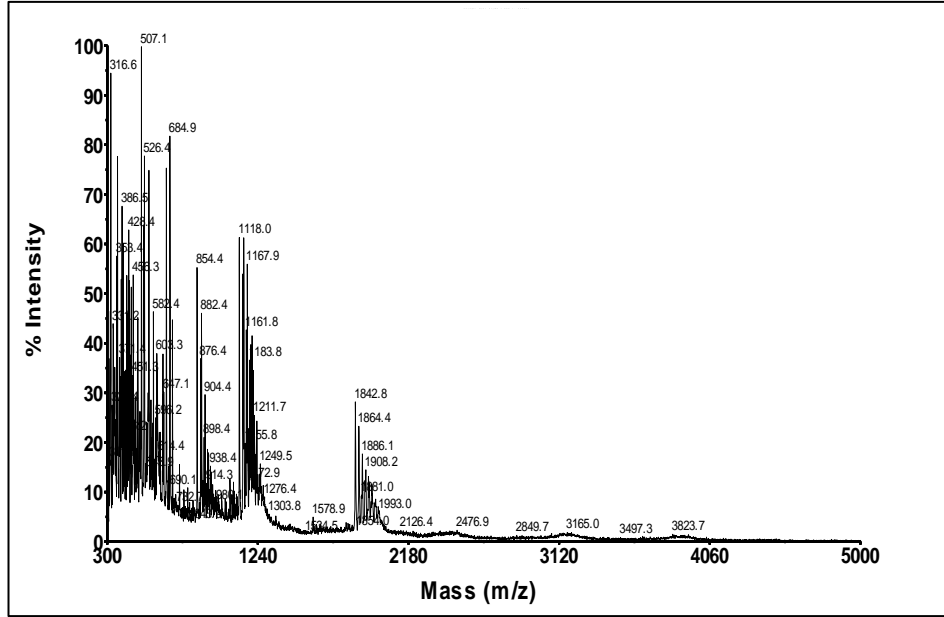
Şekil 4.1: DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA örneğine ait DHB'ye karşı kütle spektrometresi (refletron iyon modu).



Şekil 4.2: DSPE-PEG2000-DOTA örneğine ait DHB'ye karşı kütle spektrometrisi (pozitif lineer mod).



Şekil 4.3: DTPA-PE no'lu örneğe ait DHB'ye karşı kütle spektrometrisi (reflektron iyon mod).



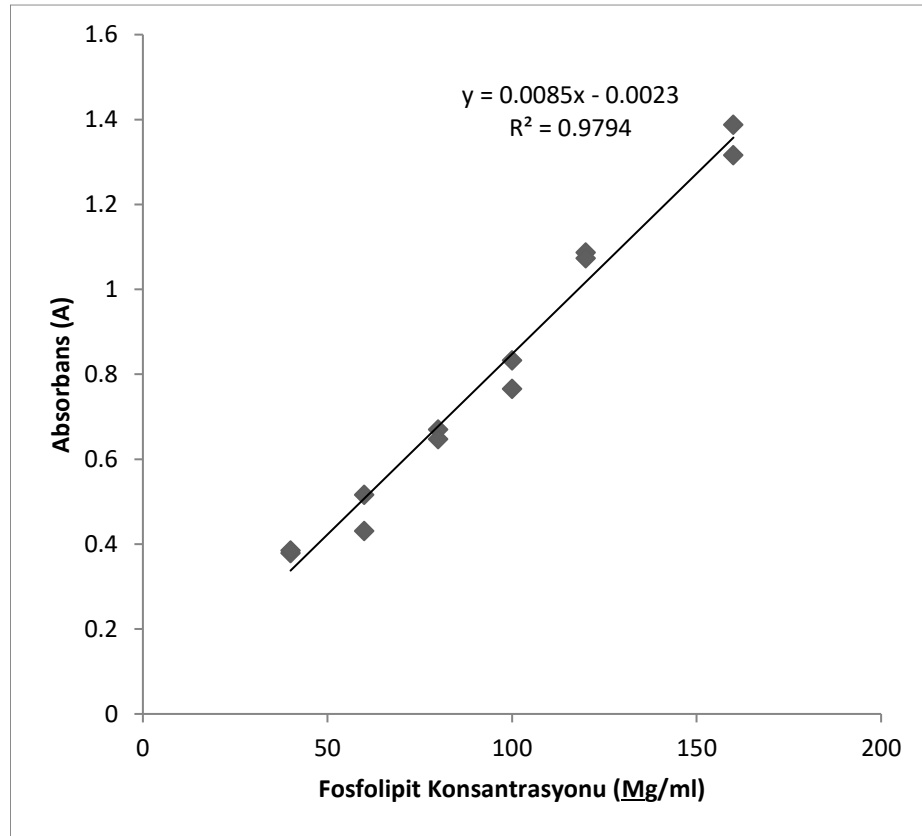
Şekil 4.4: DTPA-PE no'lu örneğe ait DHB'ye karşı kütle spektrometrisi (pozitif lineer mod).

4.2. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

4.2.1. Lipozomal Fosfolipit Miktar Tayini Sonuçları

Lipozomların fosfolipit miktar tayinleri Bölüm 3.5.1' de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Şekil 4.5' de lipozomal fosfolipit miktar tayininde kullanılmak üzere standart fosfolipit çözeltilerinden elde edilen kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi verilmiştir.

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının, ekstrüzyon işlemi öncesi ve sonrasında lipozomal fosfolipit miktarları Bölüm 3.5.1'de belirtildiği şekilde hesaplanmış ve sonuçlar ise Tablo 4.1' de aşağıda verilmiştir.



Şekil 4.5: Lipozomal fosfolipit tayini için kullanılan kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi.

Tablo 4.1: Lipozom dispersiyonlarının ekstrüzyon öncesi ve sonrası lipozomal fosfolipid miktarları (n=3).

	DSPC _L -DOTA		PC _L -DOTA	
	Fosfolipit Miktarı ($\mu\text{mol/mL}$)	Fosfolipit Miktarı (%)	Fosfolipit Miktarı ($\mu\text{mol/mL}$)	Fosfolipit Miktarı (%)
Ekstrüzyon öncesi	36,98 \pm 0,20	92,44 \pm 0,51	32,66 \pm 3,03	81,66 \pm 7,58
Ekstrüzyon sonrası	35,88 \pm 0,45	89,70 \pm 1,11	29,72 \pm 0,88	74,30 \pm 2,21

Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion işlemi öncesi ve sonrası lipozomal fosfolipit miktarları arasındaki farklılık, istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Yine DSPC ve PC fosfolipitleri için ekstrusion işlemi sonrası lipozomal fosfolipit miktarları arasındaki farklılık da istatistiksel açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.2.2. Lipozomlarda Partikül Büyüklüğü Tayini Sonuçları

Lipozom dispersiyonlarının ortalama partikül büyüklükleri ve dağılımları Bölüm 3.5.2' de belirtildiği gibi ölçülmüştür ve sonuçlar ise Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.2: Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion öncesi ve sonrası ortalama partikül büyüklükleri ve dağılımları (n= 3).

	DSPC _L -DOTA		PC _L -DOTA	
	Ort. Partikül Büyüklüğü (nm)	PI*	Ort. Partikül Büyüklüğü (nm)	PI*
Ekstruksiyon öncesi	721,4± 78,07	0,71±0,08	1129,66±31,56	0,4±0,36
Ekstruksiyon sonrası	126,27±34,42	0,23±0,02	162,07±5,25	0,40±0,02

* PI: Polidispersite indeksi

Tüm lipozom formülasyonlarının, partikül büyüklükleri açısından, ekstrusion öncesi ve sonrası olmak üzere aralarındaki fark, istatistiksel açıdan değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Yine tüm formülasyonların, polidispersite indeksleri ekstrusion öncesi ve sonrası olmak üzere incelendiğinde aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

4.2.3. Lipozom Formülasyonlarının Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion sonrası zeta potansiyelleri Bölüm 3.5.3' de açıklandığı şekilde ölçülmüş ve sonuçlar ise Tablo 4.3' de verilmiştir.

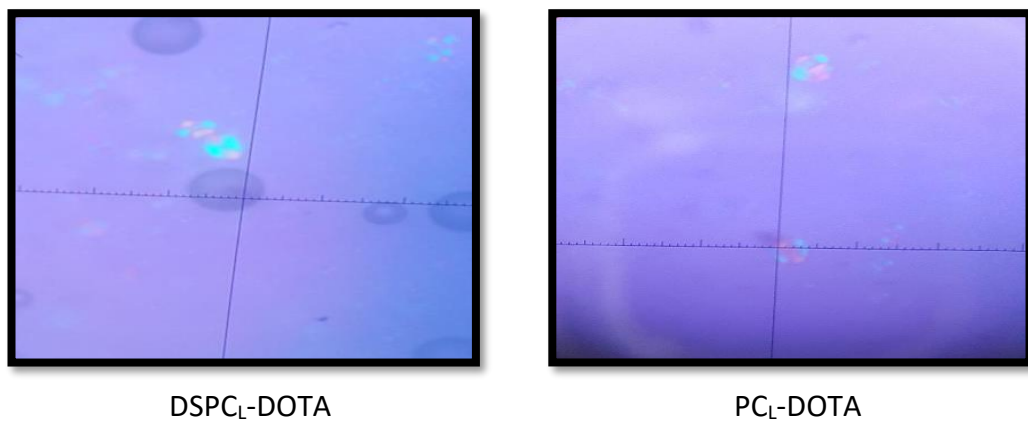
Tablo 4.3: Lipozom dispersiyonlarının ekstrusion sonrası zeta potansiyelleri (n=3).

FORMÜLASYONLAR	Zeta Potansiyel (meV)
DSPC _L -DOTA	-19,47 ±0,31
PC _L -DOTA	-17,73 ± 0,51

DSPC ve PC içeren formülasyonlar, zeta potansiyel ölçüm sonuçları açısından karşılaştırıldıklarında aralarındaki fark, istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (p> 0.05).

4.2.4. Lipozom Formülasyonlarının Polarizan Mikroskop Görüntüleri

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının ekstrusion işlemi sonrasında oda ısısında elde edilen polarizan mikroskop görüntüleri Şekil 4.6' da verilmiştir.



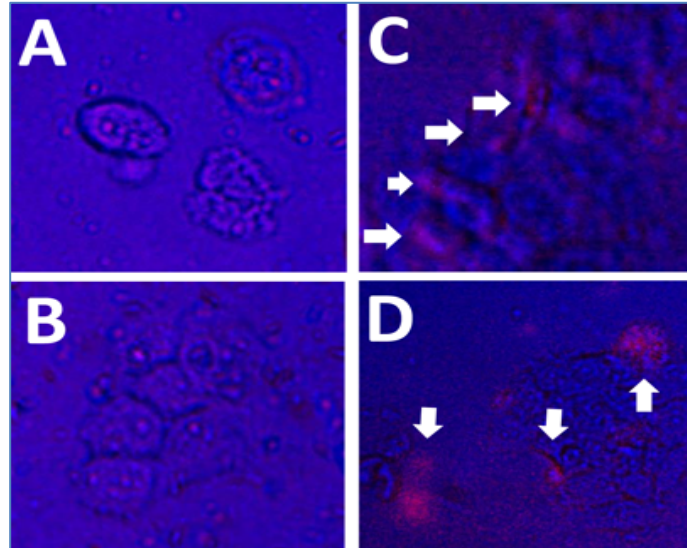
Şekil 4.6: Lipozom formülasyonlarının polarizan mikroskop görüntüleri (×40).

4.3. Hücre Kültür Çalışmasına Ait Bulgular

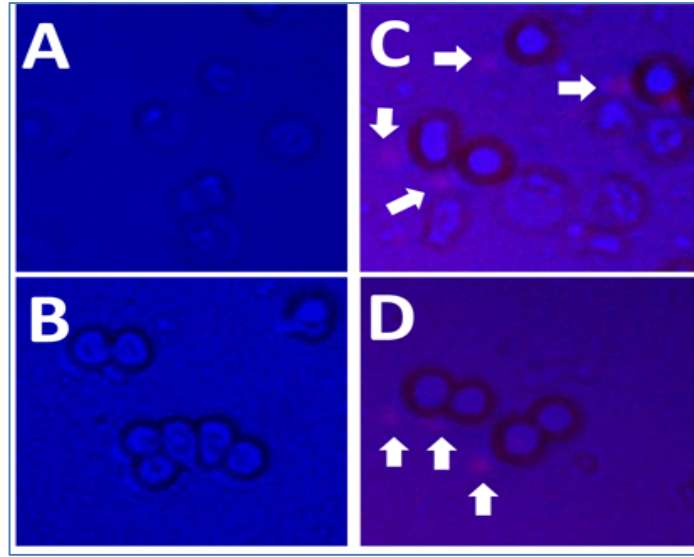
4.3.1. Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Tarafından Tutulumunun Floresans Mikroskop ile Görüntülenmesi Bulguları

Yüzeyi folatla modifiye edilmemiş ve folatla modifiye edilmiş lipozom dispersiyonlarının farklı düzeyde folat reseptörü içeren ve folat reseptörü içermeyen tümör hücreleri tarafından tutulumları, Rhodamin ile floresans işaretlenmiş lipozomlar kullanılarak, floresans mikroskop ile, Bölüm 3.5.4' de anlatıldığı şekilde görüntülenmiştir. Sonuçlar Şekil 4.7 – 4.9 arasında verilmiştir.

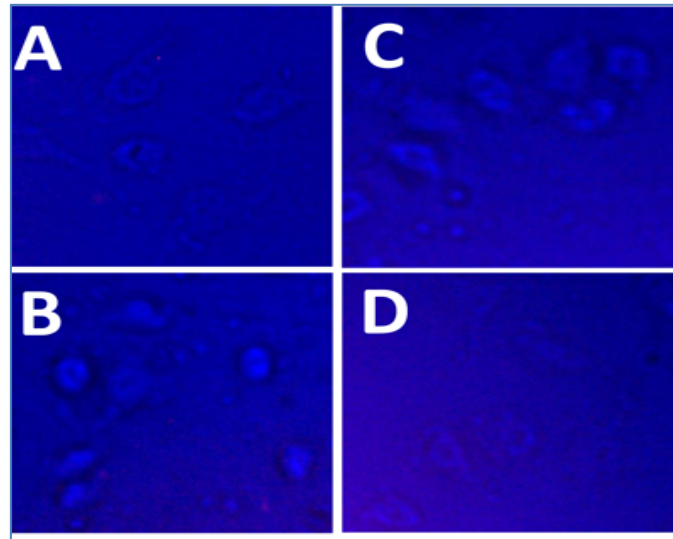
Şekillerden de görüldüğü üzere folat reseptörü içermeyen hücrelerde tüm formülasyonlarda bir bağlanma görülmemiştir. Folat reseptörü içeren hücreler için yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş lipozomlarda floresans sinyal görülmezken yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş lipozomların tümör hücrelerine bağlandığı görülmüştür. Bu da hazırlanan dispersiyonların folat reseptörüne spesifik bağlandığını göstermektedir.



Şekil 4.7: Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh (A) ve PC-Rh (B) ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA (C) ve PC-Rh-FA(D) lipozomlarının HeLa hücrelerindeki tutulumları (×40).



Şekil 4.8: Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh **(A)** ve PC-Rh **(B)** lipozomları ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA **(C)** ve PC-Rh-FA **(D)** lipozomlarının HT-29 hücrelerindeki tutulumları (×40).

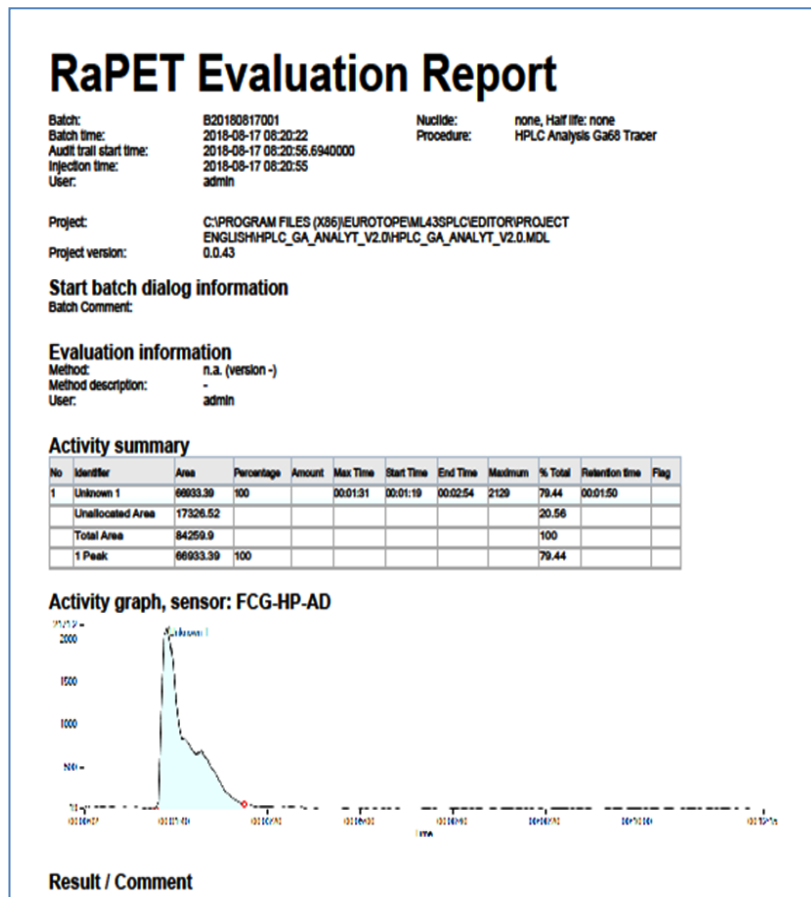


Şekil 4.9: Yüzeyi folik asitle modifiye edilmemiş DSPC-Rh **(A)** ve PC-Rh **(B)** ile yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş DSPC-Rh-FA **(C)** ve PC-Rh-FA **(D)** lipozomlarının L929 hücrelerindeki tutulumları (×40).

4.4. Radyoaktif İşaretleme Çalışmalarına Ait Bulgular

4.4.1. Ga-68 ile İşaretleme ve İşaretlemenin Kalite Kontrolü Bulguları

İşaretleme için kullanılan Ga-68, Ge-68/Ga-68 jeneratöründen elde edilmiştir. Jeneratörden elde edilen Ga-68' in saflığı göstermek için örnek bir HPLC kromatogramı Şekil 4.10' da verilmiştir. İşaretleme çalışmalarında farklı inkübasyon süreleri, farklı pH ve farklı sıcaklıklar denenerek bunların işaretleme verimi üzerindeki etkisi Bölüm 3.7.2.1'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir.



Şekil 4.10: Jeneratörden sağılan, işaretlemede kullanılan Ga-68'in HPLC çıktısı.

Farklı inkübasyon sürelerinin işaretleme verimi üzerindeki etkisini incelemek için 5., 30., 45. ve 60. dakikalarda Ga-68 işaretli lipozom çözeltisinden örnekler alınarak işaretleme verimi hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.4' de verilmiştir.

Tablo 4.4: Şelat yapıcı madde olarak DOTA-PEG₂₀₀₀-DSPE ve DTPA-PE içeren lipozom formülasyonlarının Ga-68 ile işaretleme sonrası farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen işaretleme verimi (%) sonuçları (n=3).

FORMÜLASYON	İnkübasyon zamanı (dk)			
	5	30	45	60
PC _L -DOTA	54.67±0,2	50.05±0,25	56.54±0,26	52.58±0,28
DSPC _L -DOTA	79.12±0,54	74.18±0,22	77.37±0,14	79.25±0,17
PC _L -DTPA	56.33±0,37	57.38±0,28	54.76±0,35	51.27±0,29
DSPC _L -DTPA	67.28±0,22	67.96±0,24	66.81±0,29	65.81±0,32

PC ve DSPC içeren formülasyonların Ga-68 ile işaretleme verimleri, karşılaştırıldığında; aralarındaki fark, istatistiksel değerlendirildiğinde anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$) olmasına karşılık, her bir formülasyon için 5.,30.,45. ve 60. dakikada işaretleme verimleri kendi içinde karşılaştırıldığında, zamana bağlı aralarındaki işaretleme farkı, istatistiksel bakımdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

Farklı pH ve farklı sıcaklıklarda işaretleme işlemi yapılmış ve radyokimyasal saflık kontrolü ve bu işaretleme sürecinin stabilitesi incelenmiştir. Sonuçlar Tablo 4.5 - 4.8 arasında verilmiştir.

Tablo 4.5: Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 4 ve 25 °C).

Formülasyon	İşaretleme verimi (%)				
	10.dk	20.dk	30.dk	60.dk	120.dk
PC _L -DOTA	9,02	9,87	12,88	14,12	11,91
DSPC _L -DOTA	8,14	9,43	9,18	7,82	9,38
PC _L -DTPA	42,79	43,67	52,53	51,28	41,66
DSPC _L -DTPA	50,39	56,30	54,37	55,97	59,80

Tablo 4.6: Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme verimi (%) sonuçları (pH 7 ve 25 °C).

Formülasyon	İşaretleme Verimi (%)				
	10.dk	20.dk	30.dk	60.dk	120.dk
PC _L -DOTA	11,79	15,50	16,77	15,74	16,02
DSPC _L -DOTA	12,72	11,03	8,03	10,23	15,48
PC _L -DTPA	42,49	40,30	55,49	43,12	41,84
DSPC _L -DTPA	52,26	58,46	60,68	60,36	59,20

Tablo 4.7: Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme verimi (%) sonuçları
(pH 4 ve 50 °C).

Formülasyon	İşaretleme Verimi (%)				
	10dk	20dk	30dk	60dk	120dk
PC _L -DOTA	21,01	25,03	29,62	21,61	22,10
DSPC _L -DOTA	32,27	31,05	32,63	32,45	66,15
PC _L -DTPA	42,19	42,22	47,30	44,97	45,17
DSPC _L -DTPA	73,79	65,36	65,10	67,61	35,17

Tablo 4.8: Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme sonuçları
(pH 7 ve 50 °C).

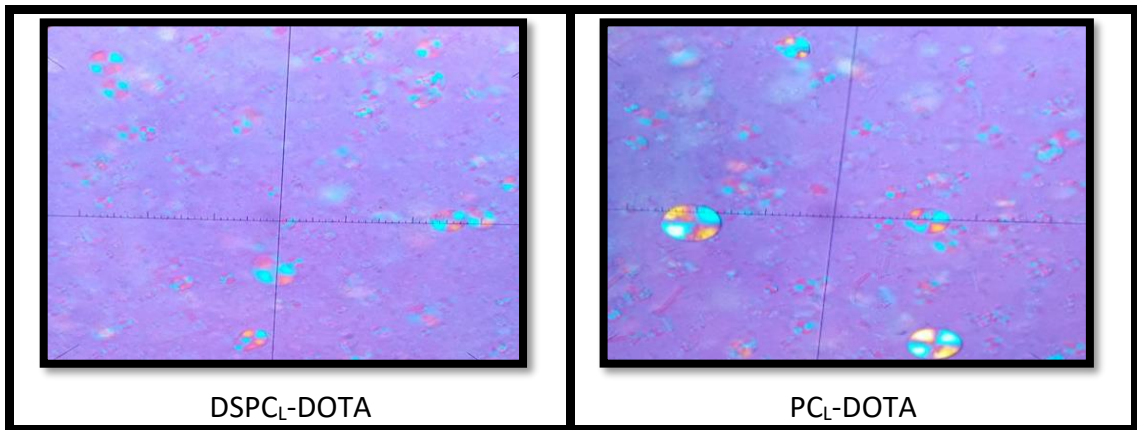
Formülasyon	İşaretleme Verimi (%)				
	10dk	20dk	30dk	60dk	120dk
PC _L -DOTA	21,51	23,14	20,90	21,85	23,20
DSPC _L -DOTA	30,17	30,43	31,28	33,53	33,83
PC _L -DTPA	41,98	40,06	43,61	45,82	43,25
DSPC _L -DTPA	67,93	74,11	68,99	69,31	69,31

Formülasyonların Ga-68 ile işaretlenmesinde dört farklı koşul kendi aralarında karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış ($p > 0.05$), her bir formülasyon için kendi arasında 10.,20.,30., 60. ve 120. dakikada işaretleme verimleri karşılaştırıldığında; DSPC_L-DOTA için pH:4 ve ve

50°C sıcaklıkta 10. ve 120. dakikalar arasındaki fark ile DSPC_L-DTPA için yine 10. ve 120. dakikalar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p< 0.05).

Sonuç olarak pH'nın ve sıcaklığın işaretleme üzerinde etkisi olduğu görülmüştür. Literatür incelemesi de yapıldığında Ga-68 ile işaretleme için 90-95 °C sıcaklıkların tercih edildiği görülmüş olup nihai aşamada lipozomların Ga-68 ile işaretleme için; 1 M HEPES (pH 4,8) tamponu, 90 °C sıcaklık ve 5 dakika inkübasyon süresi parametrelerinin uygulanmasına karar verilmiştir.

Ga-68 ile işaretlemede lipozomlara 90 °C ısı uygulandığı için, bu sıcaklıkta lipozomların veziküler yapısında değişiklik olup olmadığı polarizan mikroskop ile incelenmiştir. Lipozomların bu sıcaklıkta 5 dk inkübe edildiğinde vezikül yapısını koruduğu gösterilmiştir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11: 90 C° ısı uygulanmış DSPC_L-DOTA lipozomlarının ve PC_L-DOTA lipozomlarının polarizan mikroskop görüntüsü (×40).

4.4.2. Teknesyum-99m (Tc-99m) ile İn Vitro İşaretleme Çalışmaları Bulguları

Hazırlanan lipozom dispersiyonları Bölüm 3.7.3'de anlatıldığı şekilde Tc-99m ile işaretleştir ve işaretlemenin kalite kontrolü ise Bölüm 3.7.3.1' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Tc-99m ile işaretleme sonuçları ise Tablo 4.9' da verilmiştir.

Tablo 4.9: Lipozom dispersiyonlarının Tc-99m ile farklı inkübasyon süreleri sonrası işaretleme verimi (%) sonuçları.

Formülasyon	15 dk. İnkübasyon Sonrası İşaretleme Verimi (%)	30 dk. İnkübasyon Sonrası İşaretleme Verimi (%)
PC _L -DOTA	91,87±0.29	93,99±0,23
DSPC _L -DOTA	96,93±0,37	97,22±0,29
PC _L -DTPA	83,91±0.27	85,88±0,21
DSPC _L -DTPA	98,75±0,49	98,99±0,36

Formülasyonlarımızın Tc-99m ile işaretleme verimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında, aralarındaki fark 15. ve 30. dakika için istatistiki açıdan anlamlı bulunmamış ($p > 0.05$, $n=3$), her bir formülasyon için 15. ve 30 dakikadaki işaretleme verimleri kendi aralarında karşılaştırıldığında zamana bağlı aralarındaki işaretleme farkı da; istatistiki açıdan anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$, $n=3$).

4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

In vitro çalışmalardan ve radyoaktif işaretleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar doğrultusunda in vivo çalışmalarda DSPC lipozomlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Yüzeyi folatla modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş (DSPC_L-FA-DOTA ve DSPC_L-DOTA kodlu) lipozom dispersiyonları in vivo çalışmalar için kullanılmıştır.

Tablo 4.10' da in vivo çalışmalarda kullanılacak lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme verimi (%) sonuçları verilmiştir.

Tablo 4.10: İn vivo çalışmalarda kullanılan Ga-68 işaretli lipozomların işaretleme koşulları ve işaretleme verimleri (%) (n=3).

FORMÜLASYON	Tampon	Sıcaklık	İnkübasyon Süresi	İşaretleme Verimi (%)
DSPC _L -DOTA	1 M HEPES (pH 4,8)	90 °C	5 dak.	83±0,17
DSPC _L -FA-DOTA	1 M HEPES (pH 4,8)	90 °C	5 dak.	85±0,29

4.5.1. İn Vivo Tümör Modelinin Oluşturulması Bulguları

Ksenograft tümör modeli oluşturulan farelerde tümör hücrelerinin s.c enjeksiyonundan yaklaşık 14 gün sonra, tümör elle palpe edilecek boyuta (yaklaşık 0.5 mm³) ulaştıktan sonra, hayvanlar in vivo çalışmalara alınmıştır (Şekil 4.12).



Şekil 4.12: Ksenograft tümör modeli görüntüsü.

4.5.2. Biyodağılım Çalışmaları Bulguları

Bölüm 3.8.3' de anlatıldığı şekilde biyodağılım çalışmaları gerçekleştirilmiş ve elde edilen biyodağılım deneyleri sonuçları Tablo 4.11' de verilmiştir.

Tablo 4.11: Ga-68 ile işaretlenmiş, yüzeyi folat ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmemiş lipozom formülasyonlarının % enjekte edilen doz/g doku olarak biyodağılım sonuçları.

ORGAN VE DOKULAR	DSPCL-DOTA				DSPCL-FA-DOTA			
	30 dk	60. dk	90. dk	120.dk	30 dk	60. dk	90. dk	120.dk
Kan	25,30±6,45	33,54±4,76	28,29±9,41	38,83±7,22	34,02±11,25	24,99±8,66	36,41±4,49	40,43±12,06
Karaciğer	8,89±0,85	9,375±1,70	9,37±3,94	15,65±3,9	9,74±0,89	8,05±4,16	9,38±1,17	12,55±3,13
Tümör	9,48±2,94	10,41±0,72	14,28±9,00	16,75±5,36	19,57±1,07	25,06±10,5	10,11±4,22	12,25±2,94
Kalp	18,56±1,80	21,47±2,60	21,10±4,12	24,98±6,75	23,37±7,31	22,12±6,19	25,91±3,15	23,69±1,12
Kas	9,47±2,83	17,93±8,34	12,91±6,02	13,68±3,74	8,93±0,74	8,67±2,46	10,90±0,19	12,78±9,43
Akciğer	18,43±2,99	27,41±6,59	24,76±7,93	34,17±15,06	32,51±4,25	20,08±8,08	21,96±3,35	28,10±3,01
Böbrek	10,57±3,53	12,10±1,37	10,77±3,77	17,17±6,27	19,68±3,93	11,17±3,93	11,49±2,02	16,49±4,00
Dalak	10,35±0,53	10,68±4,09	11,61±2,54	14,11±2,29	13,65±2,74	10,81±1,06	13,33±3,87	11,27±0,21

Yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş ve modifiye edilmiş DSPC lipozomlarının biyodağılım sonuçları her bir zaman aralığında kendi aralarında karşılaştırıldığında; organlar aralarındaki biyodağılım farkı 30. ve 60. dakika tümör dışında istatistiki olarak anlamlı bulunmamış ($p > 0.05$), her bir formülasyon için 30, 60, 90 ve 120. dakikada kendi içlerindeki organlardaki tutulum zamana karşı karşılaştırıldığında zamana bağlı aralarındaki işaretleme farkı anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$).

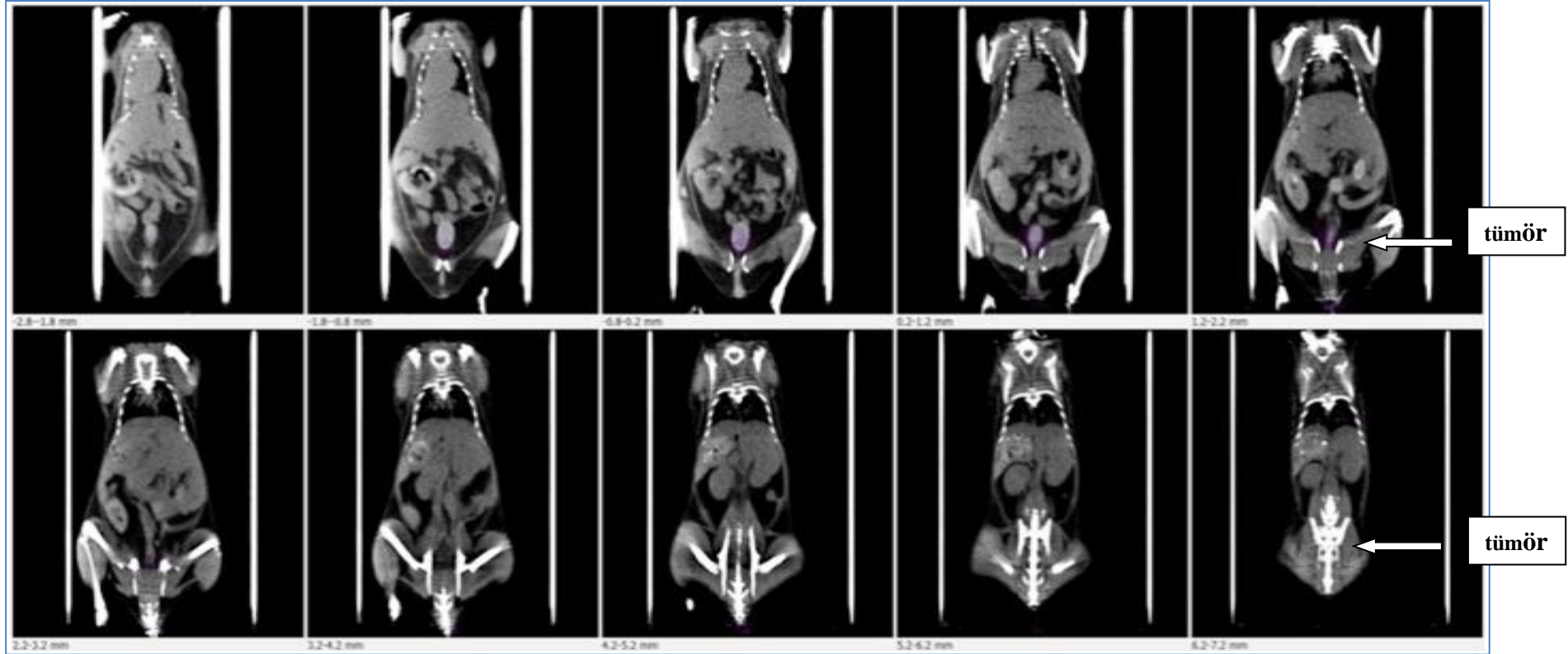
30. ve 60. dakika tümör tutulumları incelendiğinde yüzeyi folat ile modifiye edilmiş DSPC_L-FA_DOTA formülasyon ile yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş DSPC_L-DOTA formülasyona göre, 30. dakikada iki kat, 60. dakikada ise 2, 5 kat daha yüksek bir tümör tutulumu gözlenmiştir. Tümör / kas (T/K) oranları incelendiğinde ise yine 30. dakikada iki kat, 60. dakikada beş kata yakın bir tümör/kas oranı gözlenmiştir.

Tablo 4.12: Lipozom formülasyonlarının farklı zaman dilimlerindeki tümör/kas tutulum oranları (n=3).

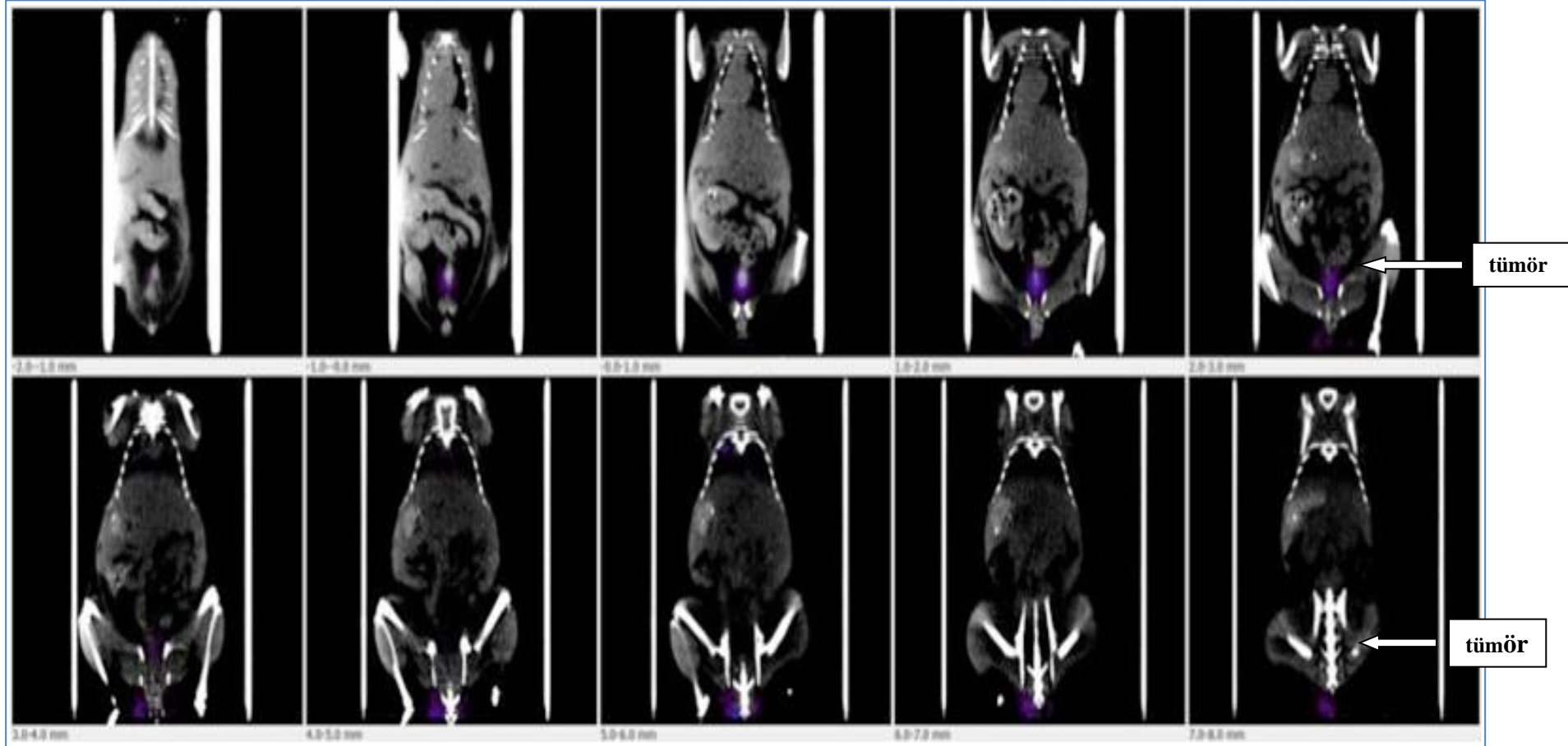
Formülasyon	Zaman (dakika)			
	30	60	90	120
DSPC _L -DOTA	1,00±0.02	0,58±0.01	1,11±0.02	1,22±0.02
DSPC _L -FA-DOTA	2,19±0.01	2,89±0.01	0,93±0.02	0,96±0.03

4.5.3. PET Görüntüleme Çalışmaları Bulguları

Bölüm 3.8.2' de anlatıldığı gibi in vivo tümör modeli oluşturulmuş farelerde, Bölüm 3.8.4' de anlatıldığı şekilde PET görüntüleme çalışmaları yapılmıştır. PET görüntüleri Şekil 4.13 ve 4.14' de verilmiştir.



Şekil 4.13: Ga-68 işaretli DSPC_L-DOTA lipozomunun enjeksiyonundan 60 dakika sonra çekilen PET görüntüleri.



Şekil 4.14: Ga-68 DSPC_L-FA-DOTA lipozomunun enjeksiyonundan 60 dakika sonra çekilen PET görüntüleri.

5. TARTIŞMA

5.1. Lipozom Dispersiyonlarında Kullanılan Şelat Yapıcı Madde-Fosfolipid Konjugatlarının Sentezi ve Karakterizasyonu Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Lipozom formülasyonlarının yapısında kullanılan şelat yapıcı maddelerden biri olan **DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA**; Hsu ve arkadaşlarının yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir (**91**). Sentezlenen DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA'nın kontrolü MALDI-MS ve MALDI-TOF- MS kütle spektrometri yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların literatürde verilen kütle spektrumuna uygunluğu neticesinde formülasyonlara eklenmiştir (**91**).

Lipozom dispersiyonlarında şelat yapıcı madde olarak kullanılan **DTPA-PE**; literatürde verilen yöntemle göre sentezlenmiştir (**113**). Sentezlenen **DTPA-PE**'nin kontrolü, MALDI-MS ve MALDI-TOF-MS kütle spektrometri yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Literatürde DTPA-PE'ye ait herhangi bir kütle spektrumu bulunmamakla birlikte; bazı çalışmalarda aynı yöntemle sentezinin gerçekleştirildiği ve çalışmalarda kullanıldığı belirlenmiştir (**27, 115-117**).

5.2. Hazırlanan Lipozom Formülasyonlarından Uygun Lipozom Formülasyonlarının Tespiti ve Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonuna Ait Bulguların Değerlendirilmesi

In vitro çalışmalarda kullanılacak lipozom formülasyonları literatürde yer alan değişik madde molar oranları denenmiş (sonuçlar verilmemiştir) ve partikül boyutu, fosfolipit verimleri dikkate alınarak, en iyi sonuç veren molar oranla çalışmalara devam edilmiştir (**Bakınız Tablo 3.1**).

Hazırlanan lipozom formülasyonları üzerinde fosfolipit miktar tayini, ekstrusion işlemi öncesi ve sonrası partikül büyüklükleri tayini, zeta potansiyel tayini, lipozomların yapı ve görüntülerinin polarizan mikroskop ile kontrolü gerçekleştirilerek formülasyonların uygunluğu tespit edilmiştir.

Hazırlanan lipozomlar için stabilite açısından önemli faktörlerden biri olarak; nötr yüklü doğal fosfolipid; PC ve sentetik fosfolipid; DSPC fosfolipidleri kullanılmıştır. Zeta potansiyel değerleri literatürle uyumlu olarak bulunmuştur **(118-119)**.

Hazırlanan lipozom formülasyonları, partikül büyüklüklerini küçültmek için en etkili yöntemlerden biri olan ekstrusion yöntemi uygulanmıştır. Her formülasyondan üç örnek alınarak yapılan ölçümler sonucunda partikül büyüklükleri 721-1129 nm gibi değerlerden, ekstrusion sonrası 126-162 nm gibi değerlere düşmüştür. Tümöre hedeflendirilecek olan nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemlerin membranlardan geçebilmesi için partikül büyüklüğünün 100 nm civarında olması gerektiği belirtilmiştir **(120-121)**. Yapılan ekstrusion işlemi neticesinde lipozom formülasyonlarının partikül büyüklükleri 100 nm civarına yaklaştırılmıştır. Ayrıca; tümör dokusunda bulunan endotel hücreler arasındaki boşluk 100–600 nm arasında değişebilmektedir **(122)**. Tüm bu etkenler tümör kapillerlerinden geçişi artırmakla birlikte; özellikle nanoboyutlu makromoleküler ilaçların, tümörlü dokulara, seçici olarak iletilmesini mümkün kılar **(123-124)**.

Partikül büyüklüğü ve partikül yükü beraber lipozomun klirens kinetiğinde etkilidir. Negatif yüklü lipozomlar, nötral ve pozitif yüklü lipozomlara göre engelleri daha hızlı aşma yeteneğine sahiptirler **(125-126)**. Negatif yüklü lipozomlar böylece yüksüz ve pozitif yüklülerden daha hızlı elimine edilirler **(127)**. Pozitif yüklü lipozomların, RES korunmalı lipozomların aksi şekilde hücre zarına ilgileri çok fazladır ve genellikle bu sebeple genetik maddeleri (RNA, oligonükleotidler gibi) hücre içine taşımak için kullanılırlar. Hücre zarı ile füzyon yaparak birleşirler **(128-129)**. İntravenöz (iv) enjeksiyonun ardından, anyonik veya katyonik, yüksek yüzey yük yoğunluğuna sahip nanopartiküller, retikülo-endotelyal sistemin (RES) özel hücreleri tarafından hızla dolaşımdan temizlenir (99) Yüksek nanoparçacık yüzey yük yoğunluğunun, serum protein bağlanması üzerinde niteliksel ve niceliksel bir etkisi vardır **(130-135)**. Bu durum dolaşımdaki nanopartiküllerin opsonizasyonunu ve ardından RES tarafından tanınma ve temizlenmesini sağlar **(136-138)**. Bu konuyla

ilgili yapılan bir çalışmada; vücuttaki yüklü nanoparçacıkların olumsuz farmakokinetiği göz önüne alındığında, klinik olarak onaylanmış çoğu nanopartiküler ilaç formülasyonlarının, dolaşımında kalış sürelerini uzatmak ve vücuttaki hedef dokularda ilaca maruz kalmayı en üst düzeye çıkarmak için; (yakın) bir nötr yüzey yüküne sahip olmaları gerektiği bildirilmiştir (139). Yine embriyonik zebra balıklarında (*Danio rerio*) yapılan bir çalışmada; nötr yüzey yüküne sahip ve optimal olarak 100 nm boyutunda i.v uygulanan lipozomlar, serbestçe dolaşma eğiliminde bulunmuşlardır (140). Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamız için nötr lipozomlar; lipozomlarımızın kanda kalış sürelerini uzatarak tümör dokusunda daha yoğun bir şekilde birikebilmelerini sağlamak amacıyla seçilmişlerdir.

Hazırlanan lipozom formülasyonlarının homojenliğinin bir göstergesi olan polidispersite indeksine bakıldığında bu değer 0-1 arasında olması istenirken, 0.71 olan bu değer özellikle ekstrüzyon işlemi sonrası daha da düşerek 0.23 değerinde olduğu görülmüştür. Bu sebeplerle hazırladığımız lipozom formülasyonlarının partikül büyüklükleri ve dağılımıyla, polidispersite indekslerinin uygun olmasından dolayı, hazırlanan lipozomların homojen partikül büyüklüğü dağılımına sahip olduğu söylenebilir.

Lipozom formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemin, hazırlama verimine etkisi; fosfolipit miktar tayini yöntemi ile belirlenebilmektedir. Fosfolipit miktarındaki azalma; "Onion Peeling Effect" adı verilen; ekstrüzyon işlemi sırasında görülen, etkiyle açıklanmaktadır (17, 141). Çok sayıda ve art arda uygulanan ekstrüzyon işlemi sonucu çifte tabakanın dış yüzeyindeki lipid tabaka uzaklaşacağı için lipid kaybı olacak, dolayısıyla çapları azalacaktır. Ekstrüzyon sonrası fosfolipit miktarı azalmıştır. DSPC için $36,98 \pm 0,20'$ den $35,88 \pm 0,45$ mikromol/mL'ye PC için ise $32,66 \pm 3,03'$ mikromol/mL den, $29,72 \pm 0,88$ mikromol/mL' ye düşmüştür (Bakınız Tablo 4.1).

5.3. Taşıyıcı Sistem, Fosfolipitlerin Seçilmesi, Kolesterol Eklenmesi, Şelat Yapıcı Madde Seçimi, PEG Eklenmesi ve Ligand Seçiminin Değerlendirilmesi

Çalışmada taşıyıcı sistem olarak çok tabakalı lipozom taşıyıcı sistem olarak seçilmiştir. Bu sistemlerin avantajları Genel Bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Lipozomların yüzeylerinin uygun molekül ya da bileşiklerle modifiye edilmesi ile lipozom içerisindeki etken maddenin hücreye ve hücrel kompartmanlara taşınması sağlanabilir. Yine lipozomlar özellikleri (membran özellikleri, partikül büyüklükleri gibi), yüzey özellikleri veya yükleri değiştirilerek tümör gibi istenilen doku ya da organa hedeflendirilebilirler **(142-143)**.

Lipozom bileşiminde fosfolipit olarak; PC ve DSPC kullanılmıştır. Yükleri nötrdür. Faz geçiş sıcaklıkları göz önüne alınarak PC' li formülasyonlar 30 °C' de, DSPC' li formülasyonlar 60 °C' de hazırlanmışlardır. Lipozomlarımız için bu fosfolipitlerin ve bu hazırlanma sıcaklıklarının seçimi ile; taşıdığı fizikokimyasal özellikler olarak, uygun partikül büyüklüklerindeki, uygun lipozom yapısındaki, uygun yük ve zeta potansiyele sahip uygun stabilitedeki lipozomların hazırlanması amaçlanmıştır. Jel yapıdan sıvı-kristal yapıya geçişin göstergesi olan faz geçiş sıcaklığında lipozomlar çift katman düzenli diziliminin çoğunu hidrokarbon zincirlerinin erimesi sonucunda kaybeder **(144-145)**.

Formülasyonlara kolesterol ise; çifte tabakanın geçirgenliğini optimize etmek için, yani sıvı tipteki fosfolipit çifte tabakanın geçirgenliğini azaltıp, dayanıklılığını artırmak için eklenmiştir. PC/kolesterol lipozomlarının sadece PC ile hazırlanan lipozomlara kıyasla içeriklerini değişen sıcaklıklarda daha az sızdırdığı gözlenmiştir **(144)**. Bunun in vivo stabilitenin artmasına da katkısı olmaktadır. Kolesterol eklenmesi ile oluşturulan lipozomlarda, kolesterol miktarı arttıkça taşıyıcı sistemin stabilitesinde ve faz geçiş sıcaklığında da bir yükselme görülmektedir. Dönüşüm basamaklarındaki bu azalma ve faz geçiş sıcaklığındaki artış lipozomların depolama sırasındaki stabilitesini olumlu etkilemektedir **(146)**. Lipozom yapısındaki fosfatidilkolin ile birleşen plazma lipoproteinleri, membran yapısını ve lipozom bütünlüğünü bozar. Lipozomun içerdiği kolesterolün oranı bu açıdan oldukça önem

taşır. Örneğin; kolesterol içeriği %33 oranında olan lipozomlarda, faz geçişi tamamen ortadan kalkmaktadır **(17,18)**. Bu sebeple ve bu avantajları nedeniyle tüm in vitro ve in vivo hazırlanan formülasyonlarımıza kolesterol ilave edilmiştir.

Çalışma sonucunda elde edilen fosfolipit miktar tayini, partikül büyüklüğü ile tümör hücrelerinde in vitro tutulum sonuçları da fosfolipit seçiminin ve kolesterol eklemenin uygunluğunu desteklemiştir. DSPC içeren formülasyonların, gerek fizikokimyasal ve gerekse stabilite ve in vitro tutulum sonuçları daha uygun olduklarını göstermekle beraber; in vivo çalışmalar için uygun fosfolipit olarak, bu formülasyonlar kullanılmıştır.

Çalışmada kullanılan lipozomların Ga-68 radyonüklidi ile stabil şekilde işaretlenmesi şelat yapıcı madde olarak DOTA ve DTPA (kontrol grubu) kullanılmıştır. Bu şelatörlerin lipozom lipid çift tabakasına dahil edilebilmesi için öncelikle fosfolipidlerle konjugasyonu gerçekleştirilmiş ve DSPE-PEG₂₀₀₀-DOTA ve DTPA-PE sentezlenmiştir **(91)**.

Lipozomların stabilitelerini artırarak, dolaşımda uzun süre kalmalarını sağlamanın bir yolu da hidrofilik polimerlerden biri olan PEG ile kaplamadır. Lipozomların yüzeyinin PEG ile kaplanması hidrofilitede ve yüzey yükünde artışa neden olarak; lipozom ile kan bileşenleri arasında artan bir itme etkisine neden olur. RES sistemi bileşenleri tarafından, lipozomun, opsonizasyonla dolaşımdan hızla uzaklaştırılması önlenir. Bu etkiye "Sterik stabilizasyon" denilir. Bu özellikleri nedeniyle günümüzde en çok tercih edilen polimer "PEG" 'dir **(142, 143)**.

Anjiogenesis ile damarlanmanın arttığı ve damar bütünlüğünün bozulmuş olduğu tümör dokusunda PEG ile kaplama sayesinde, EPR etkisi dolayısıyla, yüksek oranda bir lipozom tutulumu görülmektedir **(20-147-149)**. Bu lipozomlara "stealth lipozomlar" ya da "sterik olarak stabilize olmuş" denilmekle birlikte; RES sistem tutulumları önlenmesiyle dolaşımda daha uzun süre kalmaları sağlanmaktadır **(150-151)**. Romatoid artrit tedavisinde deksametazonun antiinflamatuvar etkinliğini artırmak için; DSPE-PEG₂₀₀₀ kullanılarak polimerle kaplanmasıyla, polimerize stealth lipozomların dolaşımda daha uzun süre kalarak tedavideki etkinliği arttırdıkları gösterilmiştir **(152)**.

Klinik olarak kansere karşı hazırlanan lipozomal ilaç taşıyıcı sistemlerle, pegilasyon işlemi sonucunda, olumlu sonuçlar alınmaktadır. Örneğin; PEG kaplı lipozomal doksurubisin ile standart doksurubisinin katı tümörlere karşı kullanımı karşılaştırılmış, etkinlikte artışla beraber, yan etkilerde de azalma gözlemlenmiştir **(153)**. PEG kaplı lipozomal doksurubisin (Caelyx™, Doxil®), azaltılmış kardiyotoksisite ve gelişmiş bir farmakokinetik profil özellikleri ile; geleneksel doksurubisinin geliştirilmiş bir lipozomal formülasyonu olarak; metastatik meme kanseri, ilerleyici yumurtalık kanseri, nükseden veya dirençli multipl miyelom ve AIDS ile ilişkili Kaposi sarkomunda diğer antikanserojen tedavilere göre daha yararlı bir seçenek olarak bulunmuştur **(154)**. Beyin Glioma tedavisinde DSPE-PEG 2000-transferrin ile modifiye edilmiş vinkristin + tetrandrin lipozomları umut verici sonuçlar sunmuştur **(155)**. Yine literatürde metotreksat etken maddesinin glutatyonla beraber PEG kaplı lipozomları kullanılarak, beyne hedefleme için uygun lipozomlar geliştirilmeye çalışılmıştır. Sonuçta glutatyonla beraber verilen PEG kaplı lipozom formülasyonunun, beyne ilaç taşınımı için umut verici bir taşıyıcı olduğu belirtilmiştir **(156)**.

Bu çalışmada, tüm formülasyonlar PEG₂₀₀₀-DSPE kullanarak yüzey kaplaması sağlanmıştır. Bu kaplama ile lipozomların RES hücreleri tarafından hızlı opsonizasyonu önlenerek, dolaşımda kalış sürelerinin uzatılması ve tümör dokusundaki EPR etkisi ile de tümöre pasif olarak hedeflendirilmesi yanında folik asit reseptörleri hedef alınarak da folik asit ilavesi ile aktif hedeflendirilmeleri düşünülmüştür. DSPE ise burada; PEG₂₀₀₀' inin lipozom membranına konjügasyonunu sağlamaktadır.

Lipozomal nanotaşıyıcıları hedeflendirmede sıklıkla kullanılan ligandlar arasından folik asit (folat) seçilmiştir. Ligandların küçük moleküller grubuna giren folat; son zamanlarda ligand aracılı hedeflendirmede sıklıkla kullanılmaya başlanılan bir molekül olarak karşımıza çıkar. Temininin kolay, ucuz olması, küçük bir molekül olması ve birçok reseptör taşınımında fonksiyonlarının olması önemli avantajlarındandır. Isıya dayanıklılığı da işaretleme çalışmalarında yüksek dereceler

uygulamamız nedeni ile önem kazanmıştır. İşaretleme çalışmalarımızda işaretleme verimini artırmak için yüksek sıcaklıklara (90 °C gibi) çıkılmasına rağmen folik asidin 180 °C ye kadar stabilitesini koruduğu ve 2 saat 100 °C tutulumu sonrasında bile % 75-92 arasında stabilitesini koruduğu rapor edilmiştir **(157)**.

Literatüre bakıldığında son zamanlarda kanser ve tümör tedavi ve görüntüleme çalışmalarında; aktif madde içeren lipozomların kansere karşı çoklu ilaç rezistansında folik asitle konjügasyonu **(158)**, stealth lipozomlar hazırlanmasında PEG 2000 ile beraber kullanımı **(159)**, glioma da folat reseptörüne hedeflendirilmiş aktif madde doksurubisin içeren PEG kaplı lipozomların kullanımı **(160)** ile kanser hücrelerinde peptid ve folat resptörlerine nanopartikül hedeflendirmeyle karşılaştırılması **(161)** gibi konularda yayınlar yapılmıştır. Ayrıca beyin tümörü ve gliomalarda in vitro olarak lipozomal doksurubisinin kontrollü hedeflendirilmesine yönelik KB ve C6 hücre kültürleri ile ligand sayısının fazlalığının önemine dair **(162)** bir çalışmayla birlikte meme kanseri hayvan modelinde Tc-99m ile işaretli, folat kaplı, uzun dolaşimli, pH'ya duyarlı doksurubisin lipozomları kullanılarak antitümör etkinin artırılmasına yönelik bir diğer çalışma da yapılmıştır **(163)**.

5.4. Hücre Kültür Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi

Folat pozitif kanser hücreleri HT-29 (colorectaladenokarsinoma) (düşük düzeyde folat reseptörü içeren), Hela (overkarsinoma) (yüksek düzeyde folat reseptörü içeren) ve Folat negatif normal insan fibroblast hücreleri yüzeyi folik asit ile modifiye edilememiş ve modifiye edilmiş lipozom dispersiyonları ile inkübe edilerek lipozomların tümör hücrelerine bağlanması floresans mikroskobu ile görüntülenmiştir **(Bkz Şekil 4.7-4.9)**.

Şekillerde de görüldüğü üzere folat reseptörü içermeyen hücrelerde tüm formülasyonlarda bir bağlanma görülmemiştir. Folat reseptörü içeren hücreler için yüzeyi folik asit ile modifiye edilmemiş lipozomlarda floresans sinyal görülmezken iken yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozomların tümör hücrelerine bağlandığı

görülmüştür. Bu da hazırlanan dispersiyonların folat reseptörüne spesifik bağlandığını göstermektedir.

5.5. Radyoaktif İşaretleme Çalışmalarının Değerlendirilmesi

İn vitro işaretleme çalışmalarında Ga-68 ve Tc-99m (kontrol) radyonüklidleri ile işaretleme işlemleri gerçekleştirilmiştir. Bu radyonüklidlerden Tc-99m tümör görüntüleme çalışmalarında sıklıkla kullanılan bir radyonüklid olmakla birlikte; Ga-68 ile literatürdeki çalışmaların azlığı, nükleer tıp uygulamalarında giderek yaygınlaşan sıklıkla kullanılan bir radyonüklid olması ve PET görüntüleme için kullanılan radyonüklid olması gibi nedenlerle çalışmada Ga-68 tercih edilmiştir.

Lipozom formülasyonlarının 0.2 N Sodyum sitrat tamponu kullanılarak elde edilen ITLC-SG işaretleme kalite kontrol sonuçları (**Bknz Tablo 4.4**)'de verilmiştir. 5., 30, 45. ve 60. dakikada aseton ve 0,2 N sodyum sitrat tamponundaki elde edilen sonuçlar; daha önce %77 olan Ga-68'in bağlanma oranının (DSPCL-DOTA) kodlu lipozom formülasyonumuz için %85' lere çıktığını göstermiştir (**Bknz Tablo 4.10**). Ga-68 ile farklı pH ve sıcaklıklarda yapılan işaretleme ve işaretleme stabilitesi sonuçları pH ve sıcaklığın işaretleme verimi üzerine etkisi olduğunu göstermiştir. (**Bknz Tablo 4.5-4.8**). Lipozom dispersiyonlarının Ga-68 ile işaretleme oranının artırılması düşüncesiyle literatür bilgileri ile de desteklenerek işaretleme için seçilen 90 °C sıcaklıkta hazırlanan lipozom dispersiyonlarının lipozom yapılarını korudukları ve herhangi bir yapısal bozulma göstermedikleri de polarizan mikroskopla kontrol edilmiş ve bozulmadıkları görülmüştür (**Bknz Şekil 4.11**). Böylece pH, sıcaklık ve işaretleme koşullarındaki değişikliklerle formülasyonlarımıza bağlanma oranında artış sağlanmış oldu.

Ayrıca işaretleme de kullanılan Ga-68 in ise her işaretleme çalışması öncesi HPLC ile kalite kontrol işlemi jeneratörden alınır alınmaz gerçekleştirilmiş ve pikin uygunluğu değerlendirilmiştir (**Bknz Şekil 4.10**).

Tc-99m ile yapılan işaretlemenin kalite kontrolü; literatürde yer alan Tc-99m bileşiklerinin kalite kontrol prosedürlerine uygun olarak işaretleme işlemi sonrası 15. ve 30. dakika ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir **(164)**. Tc-99m ile yapılan işaretleme çalışmalarında şelat yapıcı madde olarak hem DOTA-PEG₂₀₀₀-DSPE hem de DTPA-PE kullanılan ve lipit bileşimi hem PC hem de DSPC olan lipozom formülasyonlarında işaretleme verimi %95' lerin üzerinde bulunmuştur **(Bknz Tablo 4.9)**.

5.6. İn Vivo Çalışmalarda Elde Edilen Bulguların Değerlendirilmesi

5.6.1. Biyodağılım Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi

Yapılan in vitro çalışmalar, radyoaktif işaretleme ve kalite kontroller çalışmaları neticesinde; işaretleme verimi en yüksek olan DSPC içeren formülasyon en uygun bulunarak in vivo çalışmalara geçilmiş; folat içeren ve içermeyen lipozomları hazırlanmıştır.

Biyodağılım çalışmaları neticesinde elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde tüm zaman aralıklarında ve tüm deneklerde tümör tutulumu belirlenmiş olup, tümör dokusundaki tutulum; normal kas dokusu ile karşılaştırıldığında özellikle yüzey folat ile modifiye edilmiş lipozom formülasyonlarında 30. ve 60 dakikalarda sırasıyla yaklaşık 2 ve 3 kat daha yüksek bulunmuştur **(Bknz Tablo 4.12)**. Yine tüm deneklerde kandaki tutulum oranı ise % 25-40 arasında değişen oranlarda bulunmuştur. 60. dakikada folatlı formülasyonda diğer organlara göre en yüksek tümörde tutulum gözlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda görüntüleme çalışmalarına geçilmesi ve görüntüleme çalışmaları için görüntüleme zamanlarının burada elde edilen tutulum süreleri dikkate alınarak belirlenmesi yapılmıştır. İstatistiksel olarak yapılan değerlendirmede; tümördeki tutulum açısından yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş ve yüzeyi folat ile modifiye edilmiş formülasyonlar arasındaki fark 30. ve 60. dakikalarda anlamlı ($p < 0.05$, $n=3$), diğer organlarda ise

anlamsız ($p > 0.05$, $n=3$) olarak bulunmuştur. Yani tümördeki tutulum açısından folatlı ve folatsız formülasyonlar açısından farklılık bulunmuş ve bu farklılık yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozomların daha çok tümör tutulumu gösterdiği sonucuna ulaşmamızı sağlamıştır. Literatürdeki çalışmalarla uyumlu bir sonuç elde edilmiştir. Nanopartiküllerle yapılan folat hedeflendirme çalışmasında, yumurtalık kanseri peritoneal metastazında, folat içeren nanopartiküllerin folat hedeflendirilmemiş yani folat içermeyenlere göre daha etkili oldukları gösterilmiştir **(165)**. Yine benzer başka çalışmalarda da folik asit (folat)'ın değişik etken madde ve nanopartiküllerle kullanımı ile olumlu sonuçlar alınmıştır **(166-169)**.

Nanopartikül formundaki ilaçlar, büyük miktarlarda modifiye edilmemiş ilacın aynı partikül içinde verilmesine izin verme avantajını sunar. Bununla birlikte, kanser hücreleri tarafından nanopartikül alımı, partikülün büyük boyutu ve hidrofiliği nedeniyle tehlikeye atılabilir. Hücre penetrasyon problemlerini aşmak ve aynı zamanda tümör spesifikliğini iyileştirmek için; nanopartikül formundaki ilaçlar, habis hücre yüzeylerine bağlanan ve reseptör aracılı endositoz yoluyla hücrelere giren hedeflenen ligandlara bağlanmıştır **(170)**. Bu çalışmada kullanılan ligand olan folat; reseptör aracılı endositoz yoluyla kanser hücrelerine nanopartikülleri iletmek için iyi bir yol olarak bulunmuştur.

5.6.2. PET Görüntüleme Çalışmaları Bulgularının Değerlendirilmesi

Biyodağılım çalışmaları sonucunda özellikle yüzeyi folat ile modifiye edilmiş lipozom formülasyonlarında folatsız lipozomlara göre gözlenen 30. dakikada iki kat ve 60 dakikada beş kata yakın, normal kas dokusuna göre daha fazla tümör tutulumunun elde edildiği sonuçlardan sonra; kesenograft tümör modeli oluşturulmuş farelere folatlı ve folatsız işaretli lipozomların enjeksiyon yapıldıktan sonra 30. dakikada kontrol PET görüntüleri ve 60 dakikada ise PET+BT görüntüleri alınmıştır. Her bir hayvana enjeksiyon işlemleri 10 'ar dakika aralıklarla gerçekleştirilmiştir.

Folatsız ve folatlı lipozom formülasyonları için elde edilen görüntüler her iki grup tümör oluşturulmuş deneklerde incelendiğinde tümör net olarak görüntülenememiştir, yüksek oranda mesane tutulumu gözlenmiştir.

Tümör görüntüleme çalışmaları sonucunda; PET görüntülerinin alındığı 60. dakikada, tümörde görüntü vermesi biyodağılım çalışmaları sonucunda düşünülen lipozomların bu durumu göstermemelerine neden olarak; belirlenen görüntüleme zamandan önce daha yoğun bir tümör birikimi gösterme olasılıkları ile çeşitli nedenlerle Ga-68'in bu sürede serbest formunun idrar kesesinden uzaklaştırılmasının etken olabileceği düşünülmüştür.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

İlaç taşıyıcı sistem olarak hazırlanılan lipozomlar üzerinde gerçekleştirilen kontroller sonucunda; hazırlanılan tüm formülasyonların in vivo (biyodağılım ve görüntüleme) çalışmaları öncesinde lipozomlardan istenilen karakterizasyon özelliklerini gösterdikleri belirlenmiştir. Çalışmalarımız sonucunda elde edilen fosfolipit miktar tayini, partikül büyüklüğü ile tümör hücrelerinde in vitro tutulum sonuçları da fosfolipit seçimimizin ve kolesterol eklememizin uygunluğunu desteklemiştir.

Ga-68 ile optimum işaretleme koşulları belirlenmiş ve işaretleme için 1 M HEPES (pH 4,8) tamponu, 90 °C sıcaklık ve 5 dakika inkübasyon süresinin uygulandığında %85 civarında bir işaretleme verimi elde edilmiştir. Radyofarmasötikler için ideal olarak istenen %90'nın üzerinde bir işaretleme verimi olmakla birlikte bazı durumlarda daha düşük işaretleme verimi ile de biyodağılım ve görüntüleme çalışmaları yapılabilmektedir. İşaretleme çalışmalarından elde edilen sonuçlar değerlendirilecek olursa her iki formülasyonda ve tüm işaretleme koşullarında zamana bağlı olarak radyokimyasal saflık miktarında önemli bir değişiklik gözlenmemiştir, işaretleme stabildir.

DSPC içeren formülasyonların, gerek fizikokimyasal ve gerekse stabilite ve in vitro hücre tutulum sonuçları daha uygun olduklarını gösterdiği için in vivo çalışmalar için DSPC içeren formülasyonlar kullanılmıştır.

Biyodağılım çalışmaları sonucunda; 30. ve 60. dakika tümör tutulumları incelendiğinde yüzeyi folat ile modifiye edilmiş DSPCL-FA_DOTA formülasyon ile yüzeyi folat ile modifiye edilmemiş DSPCL-DOTA formülasyona göre, daha yüksek bir tümör tutulumu gözlenmiştir. 30. dakikada yaklaşık iki kat, 60. dakikada ise yaklaşık 2, 5 kat daha yüksek bir tümör tutulumu gözlenmiştir. 60. dakikada folatlı formülasyonda diğer organlara göre en yüksek tümörde tutulum gözlenmiştir.

Tümör / Kas (T/K) tutulum oranları incelendiğinde ise yine 30. dakikada iki kat, 60. dakikada yaklaşık beş kata yakın bir tümör/kas tutulum oranı gözlenmiştir.

Ga-68 radyonüklidi kullanılarak ve folat reseptörüne hedeflendirme yapılan biyodağılım çalışmaları sonucunda; folat içeren lipozom formülasyonumuzda, folat içermeyen lipozom formülasyonuna göre daha yüksek bir tümör tutulumu gözlenmiştir.

Görüntüleme çalışmalarında ise; belirlenen görüntü alma zamanlarında tümörlerde lipozomların birikimi sonucu elde edilmesi düşünülen belirgin bir tümör görüntülenmesi elde edilememiştir.

İlaç taşıyıcı sistem olarak lipozom, hedeflendirme molekülü olarak folat ve işaretleme maddesi olarak Ga-68 kullanılarak yapılan çalışmamızda diğer bir kontrol işaretleme maddesi olarak Tc-99m kullanılmış ve işaretleme çalışmalarında olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Bu durum Ga-68 ile işaretleme çalışmalarında verimi artırmak için yeni yolların denenmesi gerektiğini bize düşündürmüştür.

Ayrıca çalışmamızda lipozomlarda etken madde hapsedilmemiştir, etken madde ilavesiyle ileriye dönük olarak teranöstik amaçlı yeni çalışmaların yapılmasına katkı sağlayabilir.

Biyodağılım çalışmaları sonrası yapılan PET görüntüleme çalışmalarında, ksenograft olarak oluşturulmuş tümörde görüntü elde edilememesi nedeniyle; daha erken ya da geç zaman aralıkları kullanılarak görüntü alma aralıklarının genişletilmesi suretiyle görüntüleme çalışmaları geliştirilebilir. Bu sayede çalışmamızda belirlenen 60. dakikadan daha erken ve daha geç oluşabilecek bir tümör tutulumunun tesbitinin gerçekleştirilmesi mümkün olabilir. İn vivo görüntüleme çalışmalarının daha ileriki çalışmalarla irdelenmesine ihtiyaç vardır.

Bu çalışma, literatürde tümöre spesifik hedeflendirilmiş lipozomların Ga-68 ile işaretlenmesine yönelik ilk çalışmadır ve diğer çalışmalara öncülük edecektir.

7. KAYNAKLAR

1. Kanser Nedir, THSK Kurum İçi Rehber, [Erişim Tarihi Aralık 2017]. Erişim Adresi: <http://www.kanser.gov.tr/kanser/kanser-nedir/4-kanser-nedir.html>
2. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2020. <http://publications.iarc.fr/586>.
3. Türkiye Kanser İstatistikleri -2016, T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Ankara, 2021, [Erişim Tarihi Ocak 2021]. Erişim Adresi: [https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye Kanser Istatistikleri 2016.pdf](https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/kanserdb/istatistik/Turkiye_Kanser_Istatistikleri_2016.pdf)
4. Velikyan I. Prospective of ⁶⁸Ga-radiopharmaceutical development. Theranostics. 2014; 4(1): 47-80.
5. PET Görüntüleme Cihazı, [Erişim Tarihi Aralık 2017]. Erişim Adresi: www.hamamatsu.com
6. Tıpta Kullanılan Görüntüleme Teknikleri-Duygu Ünal, [Erişim Tarihi Eylül 2021]. Erişim Adresi: <https://www.yumpu.com/tr/document/read/10016994/tpta-kullanilan-goruntuleme-teknikleri-gazi-universitesi>
7. Quality Assurance for PET and PET/CT Systems. IAEA Human Health Series No:1, IAEA, Vienna, (2009).
8. Horen DJ. Decay of the Radioisotopes Ge-68 and Ga-68. Physical Review. 1959; 113(2): 572-78.
9. Shukla J, Mittal BR. Ga-68: A Versatile PET Imaging Radionuclide. J Postgrad Med Edu Res. 2013; 47(1): 74-76.
10. Banerjee SR, Pomper MG. Clinical Applications of Gallium-68. App Rad Isot. 2013; 76: 2-13.
11. Laverman P, Sosabowski JK, Boerman OC, Oyen WJG. Radiolabelled Peptides for Oncological Diagnosis. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2012; 39(1): 78-92.
12. Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F. Processing of Generator-Produced Ga-68 for Medical Applications. J Nucl Med. 2007; 48: 1741-48.
13. Breeman WA, de Blois E, Sze Chan H, Konijnenberg M, Kwekkeboom DJ, Krenning EP. ⁶⁸Ga-labeled DOTA-peptides and ⁶⁸Ga-labeled radiopharmaceuticals for positron emission tomography: current status of research, clinical applications, and future perspectives. Semin Nucl Med. 2011; 41(4): 314-21.

14. Baum RP, Kulkarni HR. THERANOSTICS: From molecular imaging using Ga-68 labeled tracers and PET/CT to personalized radionuclide therapy-the bad berka experience. *Theranostics*. 2012; 2(5): 437-47.
15. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. Alavi M, Hamidi M. [Erişim Tarihi Eylül 2021]. Erişim Adresi: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/dmpt-2018-0032/html>
16. Ecz. Gaye Karaata, Ecz. Gülce Erişmiş, Modern Majistralde Yeni Dünya-2, Eczacının Sesi Web Sitesi, [Erişim Tarihi Ocak 2021]. Erişim Adresi: <http://eczacininsesi.com/v3/haber-detay.php?id=1352>
17. Weiner N, Martin F, Riaz M. Liposomes as a Drug Delivery System. *Drug Dev and Industrial Pharmacy*. 1989; 15(10): 1523-54.
18. Cromelin DJA, Storm G. Liposomes as drug delivery systems in therapy: their potential and limitations. *Int Pharmacy Journal*. 1987; 1(5): 179-81.
19. Allen TM. Liposomes: Opportunities in drug delivery. *Drugs*. 1997; 54(4): 8-14.
20. Storm G, Crommelin DJA. Liposomes: qua vadis? *PSTT*. 1998; 1(1): 19-31.
21. Kostarelos K, Emfletzoglou D, Stamatelou M. Liposome- Mediated Delivery of Radionuclides to Tumor Models for Cancer Radiotherapy: A Quantitative Analysis. *J Lip Res*. 1999; 9(3): 407-24.
22. Kacoli S, Mahitosh M. Second Generation Liposomal Cancer Therapeutics: Transition from Laboratory to Clinic. In *J Pharm*. 2013; 448: 28-43.
23. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors. *Pharmacological Reviews*. 1999; 51(4): 691-723.
24. Erdoğan S, Aruna R, Sawant R, Hurley J, Torchilin VP. Gadolinium-loaded polychelating polymer-containing cancer cell-specific immunoliposomes. *J Lip Res*. 2006; 16(1); 45-55.
25. Erdoğan S, Aruna R, Torchilin VP. Enhanced Tumor Visualization by Gamma Scintigraphy with ¹¹¹In-Labeled Polychelating Polymer-Containing Immunoliposomes. *Mol Pharm*. 2006; 3(5): 525-30.
26. Erdoğan S, Medarova ZO, Aruna R, Moore A, Torchilin VP. Enhanced tumor magnetic resonance imaging with gadolinium-loaded tumor-targeted liposomes. *J Magnetic Resonance Imag*. 2008; 27(3): 574-80.
27. Silindir M, Erdoğan S, Özer AY, Doğan AL, Tuncel M, Uğur Ö, Torchilin VP. Nanosized multifunctional liposomes for tumor diagnosis and molecular imaging by SPECT/CT. *J Lip Res*. 2013; 23(1): 20-27.
28. Liko F, Erdoğan S, Özer AY, Vural I. In vitro studies on 5-florouracil-loaded DTPA-PE containing nanosized pegylated liposomes for diagnosis and treatment of tumor. *J Lip Res*. 2013; 23(1): 61-69.

29. Yurdakul A, Atav R. Lipozomların Yapısı ve sınıflandırılması. *Tekstil ve Konfeksiyon*. 2007; 4: 243-47.
30. Bozkır A, Koçyiğit S. Lipozomların Fiziksel ve Kimyasal Stabilitelerinin İncelenmesi. *Ankara Ecz Fak Der.* 1995; 24(1): 43-51. <https://doi.org/10.1155/2013/705265>
31. Tripathi G, Chaurasiya K, Katare P. Liposomal Current Status, Evaluation and Recent Advances. *Int Jour of Current Pharm Res.* 2013; 5(3): 4-14.
32. Nag OK, Awasthi V. Surface Engineering of Liposomes for Stealth Behavior. *Pharmaceutics.* 2013; 5: 542-69.
33. Swami A, Shi JJ, Gadde S, Votruba AR, Kolishetti N, Farokhzad O C. Nanoparticles for Targeted and Temporally Controlled Drug Delivery (Chapter 2), *Multifunctional Nanoparticles for Drug Delivery Applications, Imaging, Targeting and Delivery.* Eds: Svenson S, Prudhomme RK, Hardcover, 2012.
34. Torchilin VP. Recent advances with Liposomes as Pharmaceutical Carriers. *Nature Reviews, Drug Discovery.* 2005; 4: 145-60.
35. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D. Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors, *Pharmacological Reviews.* 1999; 51(4): 691-743.
36. Deshpande PP, Biswas S, Torchilin VP. Current Trends in the Use of Liposomes for Tumor Targeting. *Nanomedicine.* 2013; 8(9): 1509-1528.
37. Van der Geest T, Laverman P, Metselaar JM, Storm G, Boerman OC. Radionuclide imaging of liposomal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery.* 2016; 13(9): 1231-42.
38. Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme. Sayiner Ö, Çomoğlu T. [Erişim Tarihi Eylül 2021]. Erişim Adresi: https://www.researchgate.net/publication/320801546_Nanotasiyici_sistemlerde_hedeflendirme
39. Peer D, Karp, MJ, Hong S, Farokhzad O, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an Emerging Platform for Cancer Therapy. *Nature Nanotechnology.* 2007; 2:751-60.
40. Doç. Dr. Müge Kılıçarslan. İlaçların Hedeflendirilmesi, *Farmasötik Teknoloji III-Ders Notları,* [Erişim Tarihi Ocak 2021]. Erişim Adresi: https://acikders.ankara.edu.tr/pluginfile.php/69375/mod_resource/content/0/10.Hafta_%C4%B0la%C3%A7%20Hedeflendirme%20ve%20Hedeflendirme%20Mekanizmalar%C4%B1.pdf
41. Zaru M, Sinico C, De Logu A, Caddeo C, Lai F, Manca ML, Fadda AM. Rifampicin-loaded liposomes for the passive targeting to alveolar macrophages: in vitro and in vivo evaluation. *J Lip Res.* 2009; 19(1):68-76. <https://doi.org/10.1080/08982100802610835>

42. Xu X, Khan MA, Burgess DJ. A two-stage reverse dialysis in vitro dissolution testing method for passive targeted liposomes. *Int Jour of Pharmaceutics*. 2012;426(1-2): 211-18.
43. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Pt 1Cancer Res*. 1986;46: 6387–92.
44. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*. 2000; 65 (1-2): 271-84.
45. Barenholz Y. Doxil ®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. *J Control Release*. 2012; 160(2): 117-34.
46. Freitas CF, Montanha MC, Pellosi DS, Kimura E, Caetano W, Hioka N. Biotin-targeted mixed liposomes: A smart strategy for selective release of a photosensitizer agent in cancer cells. *Materials Science and Engineering: C*. 2019, (104):109923. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109923>
47. Anarjan FS. Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands. *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2019, 19: 100370. <https://doi.org/10.1016/j.nanoso.2019.100370>
48. Sayiner Ö, Çomoğlu T. Nanotaşıyıcı sistemlerde hedeflendirme. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2016;40(3):62-79.
49. Gullotti E, Yeo Y. Extracellularly Activated Nanocarriers: A New Paradigm of Tumor Targeted Drug Delivery. *Mol. Pharmaceutics*. 2009; 6(4): 1041–51. <https://doi.org/10.1021/mp900090z>
50. Sawant RM, Hurley JP, Salmaso S, Kale A, Tolcheva E, Levchenko TS, Torchilin VP. “SMART” drug delivery systems: Double-targeted pH-responsive pharmaceutical nanocarriers. *Bioconjugate Chemistry*. 2006;17(4):943–49.
51. Perche F, Torchilin VP. Recent trends in multifunctional liposomal nanocarriers for enhanced tumor targeting. *J Drug Del*, Hindawi Publishing Corporation, Article ID 705265, p 32, 2013.
52. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Adv Drug Deliver Rev* 2008; 60: 1615–26.
53. Sicard, G, Paris C, Giacometti S, Rodallec A, Ciccolini J, Rocchi P, Fanciullino C. Enhanced Antisense Oligonucleotide Delivery Using Cationic Liposomes Grafted with Trastuzumab: A Proof-of-Concept Study in Prostate Cancer. *Pharmaceutics* 2020, 12(12): 1166. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121166>

54. Bharti R, Dey G, Banerjee I, Dey KK, Parida S, Kumar BNP, et al. Somatostatin receptor targeted liposomes with Diacerein inhibit IL-6 for breast cancer therapy. *Cancer Lett* 2017; 388: 292–302. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.12.021>
55. Ravar F, Saadat E, Gholami M, Delghankelishadi P, Mahdavi M, Azami S, Dorkoosh FA. Hyaluronic acid-coated liposomes for targeted delivery of paclitaxel, in-vitro characterization and in-vivo evaluation. *J Contr Release*, 2016; 229: 10-22. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.03.012>
56. Abdolapour S, Toliyat T, Omidfar K, Modjtahedi H, Wong AJ, Rasaei MJ, et al. Targeted delivery of doxorubicin into tumor cells by nanostructured lipid carriers conjugated to anti-EGFRvIII monoclonal antibody. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018; 46: 89–94. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1296847>
57. Koshkaryev A, Sawant R, Deshpande M, Torchilin V. Immunoconjugates and long circulating systems: origins, current state of the art and future directions. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013; 65: 24-35. doi:[10.1016/j.addr.2012.08.009](https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.08.009)
58. Gürsoy AZ. "Lipozomlar (Bölüm 5)", Ed.: Gürsoy A.Z. *Kontrollü Salım Sistemleri*, İstanbul, sayfa 103-20, 2002.
59. Liu D, Huang L. "Immunoliposomes targeting to pulmonary endothelium" *Liposome in Drug Delivery*, Eds.: G. Gregoriadis, A. T. Florence, H. M. Patel, Harwood Academic Publishers, Great Britain, p. 111-24, 1993.
60. Fresta M, Wehrli E, Puglisi G. Enhanced Therapeutic Effect of Cytidine-5'-Difosphate Choline when Associated with GM1 Containing Small Liposomes as Demonstrated In Rat Ischemia Model. *Pharmaceutical Research*. 1995; 12: 1769-74.
61. Folik Asit Yapısı ve Özellikleri, [[Erişim Tarihi Aralık 2017](https://tr.wikipedia.org/wiki/Folik_asit)]. Erişim Adresi: https://tr.wikipedia.org/wiki/Folik_asit
62. Low PS, Henne WA, Doorneweerd DD. Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases. *Acc. Chem. Res.*, 2008; 41 (1): 120–29. Doi:[10.1021/ar7000815](https://doi.org/10.1021/ar7000815)
63. Hilgenbrink A R, Low PS. Folate receptor-mediated drug targeting: From therapeutics to diagnostics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2005; 94 (10): 2135-46.
64. Low PC, Antony AC. Folate receptor-targeted drugs for cancer and inflammatory diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004; 56 (8): 1055–58.

65. Byrne JD, Betancourt T, Brannon-Peppas L. Active targeting schemes for nanoparticle systems in cancer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008; 60: 1615–26.
66. Lee RJ, Low PSE. Folate-mediated tumor cell targeting of liposome-entrapped doxorubicin in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995; 2: 134–44.
67. Turek JJ, Leamon CP, Low PS. Endocytosis of folate – protein conjugates: ultrastructural localization in KB cells. *Journal of Cell Science*. 1993; 106: 423–30.
68. Goren D, Horowitz AT, Tzemach D, Tarshish M, Zalipsky S, Gabizon A. Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump. *Clinical Cancer Research*. 2000; 6 (5): 1949–57.
69. Ross JF, Chaudhuri PK, Ratnam M. Differential regulation of folate receptor isoforms in normal and malignant tissues in vivo and in established cell lines. Physiologic and clinical implications. *Cancer*. 1994; 73 (9): 2432–43.
70. Weitman SD, Weinberg AG, Coney LR, Zurawski VR, Jennings DS, Kamen BA. Cellular localization of the folate receptor: potential role in drug toxicity and folate homeostasis. *Cancer Research*. 1992; 52 (23): 6708–11.
71. Yoo HS, Park TG. Folate-receptor-targeted delivery of doxorubicin nano-aggregates stabilized by doxorubicin-PEG-folate conjugate. *Journal of Controlled Release*. 2004; 100 (2): 247–56.
72. Kukowska-Latallo JF, Candido KA, Cao Z, Nigavekar SS, Majoros IJ, Thomas TP ve arkadaşları. Nanoparticle targeting of anticancer drug improves therapeutic response in animal model of human epithelial cancer. *Cancer Research*. 2005; 65 (12): 5317–24.
73. Yang F, Liang Fu D, Long J, Xing Ni Q. Magnetic lymphatic targeting drug delivery system using carbon nanotubes. *Medical Hypotheses*. 2008;70(4):765-67. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.07.045>
74. Tomasina J, Poulain L, Abeilard E, Giffard F, Brotin E, Cardune L, Carreiras F, Gauduchon P, Rault S, Malzert-Fréon A. Rapid and soft formulation of folate-functionalized nanoparticles for the targeted delivery of triptentone in ovarian carcinoma. *International Journal of Pharmaceutics*. 2013; 458: 197–207. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.09.025>
75. Zhang Y, Li J, Lang M, Li L, Shen X. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery, *Journal of Colloid and Interface Science*. 2011; 354: 202–209.
76. Aljammaz İ, Al-Otaibi B, Al-Hokbany N, Amer S, Okarvi S. Development and Preclinical Evaluation of New ⁶⁸Ga-NOTA-folate Conjugates for PET Imaging of Folate Receptor-Positive Tumors. *Anticancer Research*. 2014; 34(11): 6547-56.

77. Velikyan I. In Vivo Imaging of Inflammation and Infection, *Contrast Media & Molecular Imaging* / Review Article, Article ID 9713691, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/9713691>
78. Schieferstein H, Betzel T, Fischer CR, Ross TL. F18 click labeling and preclinical evaluation of a new F18-folate for PET imaging. *EJNMMI Res.* 2013; 3: 68. <https://doi.org/10.1186/2191-219X-3-68>
79. Yazdi JR, Tafaghodi M, Sadri K, Masgrehi M, Nikpoor AR, Sahlabadi SN, Chamani J, Vakili R, Moosavian SA, Jaafari MR. Folate targeted PEGylated liposomes for the oral delivery of insulin: In vitro and in vivo studies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 2020; 194: 111203. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111203>
80. Kapoor MS, D'Souza A, Aibani N, Nair SS, Sanbhor P, Kumari D, Banerjee R. Stable liposome in Cosmetic Platforms for Transdermal Folic Acid Delivery for fortification and treatment of micronutrient deficiencies. *Scientific Reports.* 2018; 8: 16122. doi: 10.1038/s41598-018-34205-0
81. Jiao Z, Wang X, Yin Y, Xia J. Preparation and evaluation of vitamin C and folic-acid coloaded antioxidant liposomes. *Particulate Science and Technology.* 2019;37(4):453-59. <https://doi.org/10.1080/02726351.2017.1391907>
82. Yang Y, Zhao Z, Xie C, Zhao Y. Dual-targeting liposome modified by glutamic hexapeptide and folic acid for bone metastatic breast cancer. *Chemistry and Physics of Lipids.* 2020; 228: 104882. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2020.104882>
83. Zhu X, Kong Y, Liu Q, Lu Y, Xing H, Lu X, Yang Y, Xu J, Li N, Zhao D, Chen X, Lu Y. Inhalable dry powder prepared from folic acid-conjugated docetaxel liposomes alters pharmacodynamic and pharmacokinetic properties relevant to lung cancer chemotherapy. *Pulmonary Pharmacology-Therapeutics.* 2019; 55:50-61. <https://doi.org/10.1016/j.pupt.2019.02.001>
84. Kumar P, Huo P, Liu B. Formulation strategies for folate-targeted liposomes and their biomedical applications. *Pharmaceutics.* 2019; 11(8): 381. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11080381>
85. Wang H, Ding T, Guan J, Liu X, Wang J, Jin P, Hou S, Lu W, Qian J, Wang W, Zhan C. Interrogation of folic acid-functionalized Nanomedicines: The regulatory roles of plasma proteins reexamined. *ACS Nano.* 2020; 14(11): 14779-89. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02821>
86. Singh A, Kim BK, Mackeyev Y, Rohani P, Mahajan SD, Swihart MT, Krishnan S, Prasad PN. Boron-Nanoparticle-loaded folic acid functionalized liposomes to achieve optimum Boron concentration for Boron Neutron Capture Therapy of Cancer. *Journal of Biomedical Nanotechnology.* 2019; 15(8): 1714-23. <https://doi.org/10.1166/jbn.2019.2800>

87. Unnam S, Panduragaiah VM, Sidramappa MA, Muddana E, Bhanoji R. Gemcitabine-loaded Folic acid tagged liposomes: Improved Pharmacokinetics and Biodistribution Profile. *Current Drug Delivery*. 2019; 16(2): 111-22. <https://doi.org/10.2174/1567201815666181024112252>
88. Moghimipour E, Rezaei M, Ramezani Z, Kouchak M, Amini M, Angali KA, Dorkoosh FA, Handali S. Folic-acid-modified liposomal drug delivery strategy for tumor targeting of 5- fluorouracil. *Eur Jour Pharm Sci*. 2018; 114: 166-74. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.12.011>
89. Ran R, Wang H, Liu Y, Hui Y, Güneş Q, Seth A, Wibowo D, Chen D, Zhao CX. Microfluidic self-assembly of a combinatorial library of single- and dual-ligand liposomes for in vitro and in vivo tumor targeting. *Eur Jour Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2018; 130: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.017>
90. Gao W. Preparation and Evaluation of Folate Receptor Mediated Targeting Liposomes. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*. 2021; Lu WL., Qi XR. (eds) *Liposome-Based Drug Delivery Systems*. Biomaterial Engineering. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-49320-5_12
91. Hsu WC, Lee TYW, Chiu SP, Tsai YT, Ting G. Kit for preparing a radiolabeled liposome and a method using the same. US Patent 20120107232 A1. 3 May 2012, [Erişim Tarihi Aralık 2017]. Erişim Adresi: <http://www.google.com/patents/US20120107232>
92. Wagner SC, Welch MJ. Gallium-68 Labeling of Albumin and Albumin Microspheres. *J Nucl Med*. 1979; 20(5): 428-33.
93. Stelter L, Pinkernelle JG, Michel R, Schwartländer R, Raschzok N, Morgul MH, Koch M, Denecke T, Ruf J, Bäuml H, Jordan A, Hamm B, Sauer IM, Teichgräber U. Modification of Aminosilanized Superparamagnetic Nanoparticles: Feasibility of Multimodal Detection Using 3T MRI, Small Animal PET and Fluorescence Imaging, *Mol Imag and Biology*. 2010; 12(1): 25-34. <https://doi.org/10.1002/cmml.1681>
94. Ament SJ, Maus S, Reber H, Buchholz HG, Bausbacher N, Brochhausen C, Graf F, Miederer M, Schreckenberger M. PET lung ventilation/perfusion imaging using ⁶⁸Ga aerosol (Galligas) and ⁶⁸Ga-labeled macroaggregated albumin. *Recent Results Cancer Res*. 2013; 194: 395-423.
95. Wunderlich G, Schiller E, Bergmann R, Pietzsch HJ. Comparison of the stability of Y-90-, Lu-177- and Ga-68- labeled human serum albumin microspheres (DOTA-HSAM). *Nuclear Medicine and Biology*. 2011; 37(8): 861-67. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.05.004>
96. Arora G, Shukla J, Ghosh S, Maulik SK, Malhotra A, Bandopadhyaya G. PLGA nanoparticles for peptide receptor radionuclide therapy of neuroendocrine tumors: A novel approach towards reduction of renal radiation dose. *PLoS*

- ONE. 2012; 7 (3): 1-11. <https://doi.org/10.1371/annotation/dc9631a7-e933-4d79-9324-6e7e0f41f8a8>
97. Frigell J, García I, Gómez-Vallejo V, Llop J, Penadés S. ⁶⁸Ga-labeled gold glyconanoparticles for exploring blood–brain barrier permeability: Preparation, biodistribution studies, and improved brain uptake via neuropeptide conjugation. *J. Am. Chem. Soc.* 2014; 136: 449–57. <https://doi.org/10.1021/ja411096m>
 98. Petrik M, Zhai C, Novy Z, Urbanek L, Haas H, Decristoforo C. In vitro and in vivo comparison of selected Ga-68 and Zr-89 labelled siderophores. *Mol Imaging Biol.* 2016; 18: 344-52. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11307-015-0897-6>
 99. Helbok A, Decristoforo C, Dobrozemsky G, Rangger C, Diederer E, Stark B, Prassl R, Von Guggenberg E. Radiolabelling of lipid-based nanoparticles for diagnostics and therapeutic applications: a comparison using different radiometals. *Journal of Liposome Research.* 2010; 20(3): 219-27.
 100. Ragger C, Helbok A, Sosabowski J, Kremser C, Koehler G, Prassl R, Andrea F, Virgolini IJ, Von Guggenberg E, Decristoforo C. Tumor targeting and imaging with dual-peptide conjugated multifunctional liposomal nanoparticles. *International journal of Nanomedicine.* 2013; 8: 4659-71.
 101. Helbok A, Rangger C, Von Guggenberg E, Saba-Lepek M, Radolf T, Thurner G, Andrea F, Prassl R, Decristoforo C. Targeting properties of peptide-modified radiolabeled liposomal nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology Biology and Medicine.* 2012; 8: 112-18.
 102. Gabizon A, Horowitz AT, Goren D, Tzemach D, Shmeeda H, Zalipsky S. In vivo fate of folate-targeted polyethylene-glycol liposomes in tumor-bearing mice. *Clinical Cancer Research.* 2003; 9: 6551-59.
 103. Brom M, Franssen GM, Joosten L, Gotthard M, Boerman OC. The effect of purification of Ga-68 labeled exendin on in vivo distribution. *EJNMMI Research.* 2016; 6(65): 2-8.
 104. Mathias CJ, Lewis MR, Reichert DE, Laforest R, Sharp TL, Lewis JS, Yang ZF, Waters DJ, Synder PW, Low PS, Welch MJ, Green MA. Preparation of ⁶⁶Ga- and ⁶⁸Ga-labeled Ga(III)-deferoxamine-folate as potential folate-receptor-targeted PET radiopharmaceuticals. *Nucl Med Biol.* 2003; 30(7): 725-31. [doi: 10.1016/s0969-8051\(03\)00080-5](https://doi.org/10.1016/s0969-8051(03)00080-5)
 105. Fani M, Wang X, Nicolas G, Medine C, Raynal I, Port M, Maecke HR. Development of new folate-based PET radiotracers: preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-DOTA-folate conjugates. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2011; 38(1): 108-19. [doi: 10.1007/s00259-010-1597-8](https://doi.org/10.1007/s00259-010-1597-8)
 106. Fani M, Tamma ML, Nicolas GP, Lasri E, Medina C, Raynal I, Port M, Weber WA, Maecke HR. In Vivo Imaging of Folate Receptor Positive Tumor Xenografts Using Novel ⁶⁸Ga-NODAGA-Folate Conjugates. *Mol Pharmaceutics.* 2012; 9(5): 1136–45. <https://doi.org/10.1021/mp200418f>

107. Vergote I, Leamon CP. Vintafolide: a novel targeted therapy for the treatment of folate receptor expressing tumors. *Ther Adv Med Oncol*. 2015; 7(4): 206-18. doi: [10.1177/1758834015584763](https://doi.org/10.1177/1758834015584763)
108. Müller C. Folate-Based Radiotracers for PET Imaging—Update and Perspectives. *Molecules*. 2013; 18(5), 5005-31; <https://doi.org/10.3390/molecules18055005>
109. Brand C, Longo VA, Groaning M, Weber WA, Reiner T. Development of a new folate derived Ga-68 based PET imaging agent. *Molecular Imaging and Biology*. 2017; 19: 754-61.
110. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*. 1965; 13: 238-52.
111. Rouser G, Fleischer S, Yamamoto A. Two dimensional thin layer chromatographic separation of polar lipids and determination of phospholipids by phosphorus analysis of spots. *Lipids*. 1970; 5(5): 494-96.
112. Erdoğan S. Derin ven trombuslarının teşhisi ve sintigrafik görüntülenmesi amacıyla geliştirilen ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde in vitro ve in vivo çalışmalar, [Doktora Tezi], Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 2001.
113. Grant CW, Stephen K, Florio E. A Liposomal MRI Contrast Agent: Phosphatidylethanolamine-DTPA. *Magn Reson Med*. 1989; 11: 236-43.
114. İstatistiksel Test Seçim Kılavuzu, [Erişim Tarihi Kasım 2020]. Erişim Adresi: <http://www.p005.net/istatistik-test-secimi-nasil-yapilir>
115. Sherry DA, Cacheris WP, Kuan KT. Stability Constants for Gd³⁺ Binding to Model DTPA-Conjugates and DTPA-Proteins: Implications for Their Use as Magnetic Resonance Contrast Agents, *Magn Reson Med*. 1988, 8: 180-90.
116. Trubetskoy VS, Cannillo JA, Milshtein A, Wolf GL, Torchilin VP. Controlled Delivery Of Gd-Containing Liposomes To Lymph Nodes: Surface Modification May Enhance MRI Contrast Properties, *Magnetic Resonance Imaging*. 1995, 13(1): 31-37.
117. Silindir M. Spect/BT Yöntemi İle Tümör Teşhis ve Görüntülenmesinde Kullanılacak Nanoboyutlu Lipozom Formülasyonlarının Geliştirilmesi, [Yüksek Lisans Tezi], Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 2009.
118. Smith MC, Crist RM, Clogston JD, Mcneil SE. Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes. *Anal Bioanal Chem*. 2017; 49(24): 5779-87. doi: [10.1007/s00216-017-0527-z](https://doi.org/10.1007/s00216-017-0527-z)
119. Malvern Instruments- Application Note. Size and zeta potential characterisation of anionic and cationic liposomes on the Zetasizer Nano. 4 sayfa.

120. Mamalis AG. Recent advances in nanotechnology. *Journal of Material Procsssing Technology*. 2007; 181(1-3): 52-8.
121. Park K. Nanotechnology: What it can do for drug delivery. *Journal of Controlled Release*. 2007; 120(1-2): 1-3.
122. Gregoriadis G. *Drug Carriers in Biology and Medicine*. Gregoriadis, G. (ed.), London: Academic Press, 1979; p. 287-341.
123. Alkan H. Lipozomlar-II. İlaç Taşıyıcısı Olarak Hazırlanmaları. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1983; 8: 197-222.
124. Allen TM. Liposomes: Opportunities in Drug Delievery. *Drugs*. 1997; 54(4): 14-24.
125. Talsma H. Preparation, Charecterization and Stabilization of Liposomes, [PhD Thesis], Utrecht Üniversitesi, Uthrect; 1991.
126. Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, Okuda A, Matsumoto O, Taga T ve arkadaşları. Effects of Dna/ Liposome Mixing Ratio On The Physicochemical Characteristics, Cellular Uptake And İntracellular Trafficking of Plasmid Dna/Cationic Liposome Complexes and Subsequent Gene Expression. *Journal of Controlled Release*. 2000; 66: 255-69.
127. Sharma A, Sharma US. Liposomes in drug delievery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*. 1997; 154: 123-140.
128. Erdoğan S. Radyokontrast Etken Madde Taşıyan Lipozom ve NISV Taşıyıcı Sistemler Üzerinde Çalışmalar, [Yüksek Lisans Tezi], Hacettepe Üniversitesi, Ankara; 1996.
129. Metselaar JM, Mastrobattista E, Storm G. Liposomes for Intravenous Drug Targeting: Design and Applications. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* 2002; 2: 319. <https://doi.org/10.2174/1389557023405873>
130. Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Müller RH. Functional groups on polystyrene model nanoparticles: influence on protein adsorption. *J Biomed Mater Res*. 2003; 65: 319-26.
131. Gessner A, Lieske A, Paulke BR, Müller, RH. Influence of surface charge density on protein adsorption on polymeric nanoparticles: analysis by two-dimensional electrophoresis. *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2002; 54: 165-70.
132. Devine DV, Wong K, Serrano K, Chonn A, Cullis PR. Liposome-complement interactions in rat serum: implications for liposome survival studies. *Biochem. Biophys. Acta*. 1994; 1191: 43–51.
133. Lundqvist M. Stigler J, Elia G, Lynch I Cedervall T, Dawson KA. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008; 105: 14265-70.


134. Walkey CD, Chan WCW. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment. *Chem Soc Rev.* 2012; 41: 2780-99.
135. Lazarovits J, Chen YY, Sykes EA, Chan WCW. Nanoparticle-blood interactions: the implications on solid tumour targeting. *Chem Commun* 2015; 51: 2756–67.
136. Aggarwal P, Hall JB, McLeland CB, Dobrovolskaia MA, McNeil SE. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2009; 61: 428–37.
137. Alexi, F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Mol. Pharm.* 2008; 5: 505–15.
138. Semple SC, Chonn A, Cullis PR. Interactions of liposomes and lipid-based carrier systems with blood proteins: relation to clearance behaviour in vivo. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 32: 3–17.
139. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. *Pharm. Res.* 2016; 33: 2373–87.
140. Campbell F. et al. Directing nanoparticle biodistribution through evasion and exploitation of Stab2-dependent nanoparticle uptake. *ACS Nano.* 2018; 12: 2138–50.
141. Torchilin VP. Drug targeting. *Eur Jour Pharm Sci.* 2000; 11(2): 81-91.
142. Kwon GS, 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 copolymers-adriamycin conjugates. *Jour Cont Release.* 1994; 29: 17-23.
143. Maruyama K. PEG-Immünoliposomes. *Bioscience Reports.* 2002; 22(2): 251-66.
144. Taylor TM, Davidson PM, Bruce BD, Weiss J. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2005; 45(7-8): 587-605.
145. Koynova R, Caffrey M. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Biomembranes.* 1998; 1376(1): 91-145.
146. Taylor KMG, Morris RM. Thermal analysis of phase-transition behavior in liposomes. *Thermochimica Acta.* 1995; 248: 289-301
147. Torchilin VP. Multifunctional nanocarriers. *Adv Drug Del Rev.* 2006; 58(14): 1532-55.

148. Wu NZ, Da D, Rudoll TL, Needham D, Whorton AR, Dewhirst MW. Increased microvascular permeability contributes to preferential accumulation of stealth liposomes in tumor tissue. *Cancer Research*. 1993; 53(16): 3765-70.
149. Song S, Liu D, Peng J, Deng H, Guo Y, Xu LX, Miller AD, Xu Y. Novel peptide ligand directs liposomes toward EGF-R high-expressing cancer cells in vitro and in vivo. *The Jaseb Journal*. 2009; 23: 1-9.
150. Bayındır ZS, Yüksel N. Pegilasyon: PEG Konjugatlarının Hazırlanması ve Uygulamaları. *Ankara Ecz. Fak. Derg.* 2007;36(4):249-66.
151. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth Liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomedicine*. 2006;1(3): 297-315.
152. Wang Q, He L, Fan D, Liang W, Fang J. Improving the anti-inflammatory efficacy of dexamethasone in the treatment of rheumatoid arthritis with polymerized stealth liposomes as a delivery vehicle. *Journal of Materials Chemistry B*; 2020; 8: 1841-51. <https://doi.org/10.1039/C9TB02538C>
153. Gabizon A, Martin F. Polyethylene Glycol-Coated (Pegylated) Liposomal Doxorubicin. *Drugs*. 1997; 54: 15-21.
154. Duggan ST, KeatingGM. Pegylated liposomal doxorubicin. *Drugs*. 2011; 71: 2531-58.
155. Song X, Liu S, Jiang Y, Gu L, Xiao Y, Wang X, Cheng L, Li X. Targeting vincristine plus tetrandrine liposomes modified with DSPE-PEG2000-transferrin in treatment of brain glioma. *Eur J Pharmaceutical Sci*. 2017; 96: 129-40.
156. Hu Y, Gaillard PJ, De Lange ECM, Udenaes MH. Targeted brain delivery of methotrexate by glutathione PEGylated liposomes: How can the formulation make a difference? *Eur Jour Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2019; 139: 197-204. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2019.04.004>
157. Gazzali AM, Lobry M, Colembeau L, Acherar S, Azis H, Mordon S, Arnaux P, Baros F, Vanderesse R, Frochot C. Stability of folic acid under several parameters. *Eur J Pharm Sci*. 2016; 93: 419-30.
158. Wang C, Feng L, Yang X, Wang F, Lu W. Folic acid-conjugated liposomal vincristine for multidrug resistant cancer therapy. *Asian Jour Pharm Sci*. 2013; 8: 118-27.
159. Hood RR, Shao C, Omiattek DM, Vreeland WN, DeVoe DL. Microfluidic synthesis of PEG-and Folate-conjugated liposomes for one-step formation of targeted stealth nanocarriers. *Pharm Res*. 2013; 30: 1597-1607.
160. Mcneeley KM, Annapragada A, Bellamkonda RV. Decreased circulation time offsets increased efficacy of PEGylated nanocarriers targeting folate receptors of glioma. *Nanotechnology*. 2007; 18(38): 385101. [doi: 10.1088/0957-4484/18/38/385101](https://doi.org/10.1088/0957-4484/18/38/385101)

161. Franzen SA. Comparison of peptide and folate receptor targeting of cancer cells: from single agent to nanoparticle. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011; 8(3): 281-98.
162. Saul JM, Annapragada A, Natarajan JV, Bellamkonda RV. Controlled targeting of liposomal doxorubicin via the folate receptor in vitro. *Journal of Controlled Release.* 2003; 92: 49-67.
163. Silva JO, Fernandes RS, Oda CMR, Ferreira TH, Botelho AFM ve arkadaşları. Folate-coated, long-circulating and pH-sensitive liposomes enhance doxorubicin antitumor effect in a breast cancer animal model. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2019; 118: 109323. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109323>)
164. Taşçı C, Ülker Ö, Ertay T. Radyofarmasötikler için kalite kontrol yöntemleri kılavuzu. *Turkish Journal of Nuclear Medicine.* 2003; 12: 137-148.
165. Werner ME, Karve S, Sukumar R, Cummings ND, Copp JA, Chen RC, Zhang T, Wang AZ. Folate-targeted nanoparticle delivery of chemo- and radiotherapeutics for the treatment of ovarian cancer peritoneal metastasis. *Biometaterials.* 2011; 32(33): 8548-54. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.07.067>
166. Mansouri S, Cuie Y, Winnik Françoise, Shi Q, Lavigne P, Benderdour M, Beaumont E, Fernandes JC. Characterization of folate-chitosan-DNA nanoparticles for gene therapy. *Biometaterials.* 2006; 27(9): 2060-65. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.09.020>.
167. Sonvico F, Mornet S, Vasseur S, Dubernet C, Jaillard D, Degrouard J, Hoebeke J, Duguet E, Colombo P, Couvreur P. Folate-Conjugated Iron Oxide Nanoparticles for Solid Tumor Targeting as Potential Specific Magnetic Hyperthermia Mediators: Synthesis, Physicochemical Characterization, and in Vitro Experiments. *Bioconjugate Chem.* 2005; 16(5): 1181–1188. <https://doi.org/10.1021/bc050050z>
168. Zhang Y, Li J, Lang M, Tang X, Lei L, Shen X. Folate-functionalized nanoparticles for controlled 5-Fluorouracil delivery. *Journal of Colloid and Interface Science.* 2011; 354(1): 202-9. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2010.10.054>
169. Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaele D, Hoebeke J, Renoir M, D'Angelo J, Cattel L, Couvreur P. Design of Folic Acid-Conjugated Nanoparticles for Drug Targeting. *Journal Of Pharmaceutical Sciences.* 2000; 89(11): 1452-64. [https://doi.org/10.1002/1520-6017\(200011\)89:11%3C1452::AID-JPS8%3E3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/1520-6017(200011)89:11%3C1452::AID-JPS8%3E3.0.CO;2-P)
170. Kularatne SA, Low PS. Targeting of Nanoparticles: Folate Receptor. *Cancer Nanotechnology;* Humana Press; pp 249-65, 2010. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-609-2_17.

8.EKLER

EK 1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzinleri

	HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU	06100 Sıhhiye-Ankara Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580 www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php
<div style="background-color: black; width: 150px; height: 15px; margin: 0 auto;"></div> Sayı: 52338575 -19		
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI		
TOPLANTI TARİHİ TOPLANTI SAYISI DOSYA KAYIT NUMARASI KARAR NUMARASI ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 03.02.2015 (SALI) : 2015/01 : 2015/19 : 2015/19-18 Doç.Dr. Suna ERDOĞAN Doç.Dr. Suna ERDOĞAN ve Uzm.Ecz. Gürhan ABUHANOĞLU : Doç.Dr. Murat TUNCEL : 45 adet (CB57BL/6) fare	
Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Suna ERDOĞAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2015/19 kayıt numaralı " Galyum-68 (Ga-68) İşaretli Nanoboyutlu Tümöre Hedeflendirilmiş Lipozomlar Kullanılarak PET Yöntemi ile Tümör Görüntülenmesi Üzerine Çalışmalar " isimli çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliği ile onaylanmasına karar verilmiştir.		
Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür		
Prof. Dr. Sema ÇALIŞ Etik Kurul Başkanı		

EK 2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu



Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen: Gürhan Abuhanoglu
Ödev başlığı: Doktora Tezi
Gönderi Başlığı: GALYUM-68 (Ga-68) İŞARETLİ, NANOBOYUTLU, PEG KAPLI, TÜ...
Dosya adı: turn_t_n3-pdf.pdf
Dosya boyutu: 2.33M
Sayfa sayısı: 90
Word count: 17,578
Karakter sayısı: 120,351
Gönderim Tarihi: 15-Şub-2022 11:56ÖÖ (UTC+0300)
Gönderim Numarası: 1762861171



GALYUM-68 (Ga-68) İŞARETLİ, NANOBOYUTLU, PEG KAPLI, TÜRÖRE HEDEFLENDİRİLMİŞ, LİPOZOMLAR KULLANILARAK TÜRÖR GÖRÜNTÜLENMESİ ÜZERİNE ÇALIŞMALAR

ORJİNALLİK RAPORU

%**9**

BENZERLİK ENDEKSİ

%**8**

İNTERNET KAYNAKLARI

%**1**

YAYINLAR

%**2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

docplayer.biz.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

2

openaccess.hacettepe.edu.tr:8080

İnternet Kaynağı

%**1**

3

earsiv.anadolu.edu.tr

İnternet Kaynağı

%**1**

4

www.researchgate.net

İnternet Kaynağı

%**1**

5

Submitted to Hacettepe University

Öğrenci Ödevi

<%**1**

6

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

<%**1**

7

github.com

İnternet Kaynağı

<%**1**

8

Submitted to TechKnowledge Turkey

Öğrenci Ödevi

<%**1**

toad.halileksi.net

9. ÖZGEÇMİŞ