

48810

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RADYOKONTRAST ETKEN MADDE TAŞIYAN
LİPOZOM VE NİSV TAŞIYICI SİSTEMLER
ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

FARMASÖTİK TEKNOLOJİ PROGRAMI
BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

T 48810

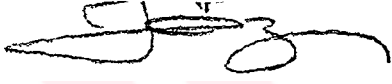
ECZ. SUNA ERDOĞAN

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
PROF. DR. A. YEKTA ÖZER

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

ANKARA, 1996

TEZ SAVUNMA JÜRİSİ



Prof.Dr.A.Yekta Özer
(Tez Danışmanı)



Prof.Dr.Meral T.Ercan



Prof.Dr.Nevin Çelebi

Bu Araştırma Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu Tarafından H.Ü.A.F.
94.013.01.020 Numaralı Proje Olarak Desteklenmiřtir.

TEZDE KULLANILAN KISALTMALAR

ACD	Asit Sitrat Dektroz
CF	Karboksi Fluorescein
CHOL	Kolesterol
CT	Bilgisayarlı Tomografi
DCP	Disetil fosfat
DMPC	Dimiristoil Fosfatidilkolin
DPPC	Dipalmitoil Fosfatidilkolin
DPPG	Dipalmitoil Fosfatidilgliserol
DSC	Diferansiyel Tarama Kalorimetresi
DSPC	Distearil Fosfatidilkolin
DTPA	Dietilen Tetra Pentataik Asit
FFA	Serbest Yağ Asitleri
GHA	Glutasyon
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoproteinler
HLB	Hidrofilik Lipofilik Denge
HMPAO	Hekzametilpropilamin
HSPC	Hidrofene Soya Fosfatidilkolin
HU	Hounsfield Unit
ITK	İnce Tabaka Kromatografisi
ITLC-SG	Instant Thin Layer Kromatografi
IOP	Iopromid
IOPROMID-U	Ultravist
KC	Karaciğer
KM	Kontrast Madde
LPC	Lizofosfatidilkolin
LUV	Büyük Tek Tabakalı Vezikül
MRI	Manyetik Rezonans Görüntüleme
MLV	Büyük Çok Tabakalı Vezikül
NMR	Nükleer Magnetik Rezonans
NISV	Non-İyonik Sürfaktan Vezikül
NTA	Nitrilo Asetik Asit

PA	Fosfatidik Asit
PEG	Poli Etilen Glikol
PG	Fosfatidil Gliserol
PI 100	Fosfolipon 100
RES	Retikulo Endotelyal Sistem
SA	Stearilamin
SPC	Soya Fosfatidilkolin
SUV	Küçük Tek Tabakalı Vezikül
Tc	Faz Geçiş Sıcaklığı
99mTc	Teknesyum 99m
US	Ultrasonla Görüntüleme
UV	Ultraviyole



İÇİNDEKİLER

	GİRİŞ VE AMAÇ	1
I.	GENEL BİLGİLER	3
I.1.	LİPOZOMLAR	3
I.1.1.	LİPOZOMLARIN TANIM VE KARAKTERİSTİKLERİ	3
I.1.1.1.	YAPISI	5
I.1.2.	FAZ DEĞİŞTİRME ÖZELLİĞİ	5
I.1.3.	LİPOZOM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	7
I.1.3.1.	FİLM TEKNİĞİ	8
I.1.4.	LİPOZOMLARIN STABİLİTESİ	9
I.1.4.1.	KİMYASAL DEGRADASYONUN ÖNLENMESİ	11
I.1.4.2.	FİZİKSEL DEGRADASYONUN ÖNLENMESİ	12
I.1.5.	LİPOZOMLARDAN İN VİTRO SALIM	12
I.1.6.	LİPOZOMLARIN VE NISV' LARIN HEDEFLENDİRİLMESİ	13
I.1.6.1.	PASİF HEDEFLENDİRME	14
I.1.6.2.	AKTİF HEDEFLENDİRME	14
I.2.	KONTRAST MADDE VE RADYOPAK LİPOZOMLAR	15
I.2.1.	RADYOPAK LİPOZOMLARIN ÖZELLİKLERİ	18
I.2.2.	RADYOPAK LİPOZOMLARIN AVANTAJLARI	18
I.2.3.	RADYOPAK LİPOZOMLARIN KULLANIMI	19
I.3.	NON-İYONİK SÜRFAKTAN VEZİKÜLLERİ (NISV)	25
I.3.1.	NISV' LARIN HAZIRLAMA METODLARI	25
I.3.2.	RADYOPAK NISV' LAR	26
I.4.	GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ	26
I.4.1.	SİNTİGRAFI	26
I.4.2.	TOMOGRAFİK GÖRÜNTÜLEME	27
I.5.	RADYOAKTİF MADDE İLE İŞARETLEME VE DAĞILIMI	28
I.5.1.	Tc' UN KİMYASI VE ^{99m} Tc İLE İŞARETLEME YÖNTEMLERİ	28

I.5.2.	^{99m} Tc ile İşaretli Radyofarmasötiklerin Kalite Kontrolü	30
I.6.	IOPROMİD	32
I.6.1.	YAPISI	32
I.6.2.	FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	33
I.6.3.	FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ	33
I.6.4.	YAN ETKİLERİ	33
I.6.5.	FARMAKOKİNETİĞİ	34
I.6.6.	KULLANILIŞ ALANLARI	34
I.6.7.	TOKSİSİTESİ	34
II.	DENEYSEL	36
II.1.	ARAÇ VE GEREÇLER	36
II.1.1.	KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	36
II.1.2.	KULLANILAN ALETLER	37
II.2.	YÖNTEMLER VE DENEYLER	38
II.2.1.	IOPROMİD' İN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER	38
II.2.1.1.	IOPROMİD' İN STANDARDİZASYONU	38
II.2.1.1.1.	IR SPEKTRUMU	38
II.2.1.1.2.	IOPROMİD VE IOPROMİD-U' NUN İTK İLE TANINMASI	38
II.2.1.1.3.	UV SPEKTRUMU	39
II.2.1.1.4.	STANDART DOĞRU	39
II.2.1.1.5.	IOPROMİD-U' NUN OSMOTİK BASINCININ ÖLÇÜLMESİ	40
II.2.1.1.6.	IOPROMİD-U' NUN PH' SININ ÖLÇÜLMESİ	40
II.2.1.1.7.	IOPROMİD-U' NUN VİSKOSİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ	40
II.2.1.1.8.	IOPROMİD' İN NMR TEKNİĞİ İLE TANINMASI	41
II.2.1.1.9.	IOPROMİD' İN PARTİSYON KATSAYISININ TAYİNİ	41
II.2.1.1.10.	ERİME DERECEŚİ TAYİNİ	41
II.2.2.	LİPOZOMLAR	41

II.2.2.1.	LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER	41
II.2.2.1.1.	FOSFOLİPİTLER	42
II.2.2.1.1.1.	FOSFOLİPİTLERİN BİLEŞİMİ	42
II.2.2.1.1.2.	ITK İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI	42
II.2.2.1.1.3.	DSC İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI	42
II.2.2.1.1.4.	FOSFOLİPİTLERİN NMR TEKNİĞİ İLE TANINMASI	42
II.2.2.1.2.	YÜK VERİCİ MADDELER	43
II.2.2.1.2.1.	IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	43
II.2.2.1.2.2.	ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	43
II.2.2.1.3.	STABİLİTE ARTIRICI MADDELER	43
II.2.2.1.3.1.	ITK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI	43
II.2.2.1.3.2.	KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ	43
II.2.2.2.	LİPOZOM FORMÜLASYONLARI	43
II.2.3.	NON-İYONİK SÜRFAKTAN VEZİKÜLLERİ (NISV)	44
II.2.3.1.	NISV' YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER	44
II.2.3.1.1.	SÜRFAKTANLAR	44
II.2.3.1.1.1.	SÜRFAKTANLARIN BİLEŞİMİ	44
II.2.3.1.1.2.	SÜRFAKTANLARIN HLB DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI	44
II.2.3.1.1.3.	DSC İLE SÜRFAKTANLARIN TANINMASI	45
II.2.3.1.1.4.	SÜRFAKTANLARIN YÜZEY GERİLİMLERİNİN SAPTANMASI	45
II.2.3.1.2.	YÜK VERİCİ MADDELER	45
II.2.3.1.2.1.	IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	45
II.2.3.1.2.2.	ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	45
II.2.3.1.3.	STABİLİTE ARTIRICI MADDELER	46
II.2.3.1.3.1.	KOLESTEROL' ÜN ITK İLE TANINMASI	46
II.2.3.1.3.2.	KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ	46
II.2.3.2.	NISV FORMÜLASYONLARI	46

II.2.4.	LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI	46
II.2.4.1.	İN VİTRO ÇALIŞMALARDA KULLANILAN LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI	47
II.2.4.2.	İN VİVO ÇALIŞMALARDA KULLANILAN LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI	47
II.2.5.	LİPOZOM VE NISV' LARIN ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ	47
II.2.5.1.	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DAĞILIMLARI	50
II.2.5.2.	LİPOZOM HAZIRLANMASINDA KULLANILAN LİPOZOMAL FOSFOLİPİTLERİN MİKTAR TAYİNİ	50
II.2.5.3.	LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ	51
II.2.5.3.1.	LİPOZOM VE NISV İÇİNDE HAPSEDİLEN IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ	51
II.2.5.3.2.	LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA SERBEST IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ	51
II.2.5.4.	LİPOZOM VE NISV' LARIN TABAKA SAYISI	52
II.2.5.5.	LİPOZOM VE NISV' LARIN ENKAPSÜLASYON HACMİ	52
II.2.5.6.	LİPOZOM VE NISV' LARIN FİZİKSEL STABİLİTESİ ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR	52
II.2.5.6.1.	SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERDEN ETKEN MADDE KAYBEDİLMESİ	52
II.2.5.6.2.	SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERİN PARTİKÜL BÜYÜKLÜKLERİ	53
II.2.5.7.	LİPOZOM VE NISV' LARDA IOPROMİD' İN İN VİTRO SALIMININ İNCELENMESİ	53
II.2.5.7.1.	İN VİTRO SALIM SIRASINDA IOPROMİD' İN STABİLİTESİNİN VE PARÇALANMA ÜRÜNLERİNİN İNCELENMESİ	54
II.2.5.8.	LİPOZOM VE NISV' LARLA YAPILAN İN VİVO ÇALIŞMALAR	54

II.2.5.8.1.	IOPROMİD İÇEREN LİPOZOM VE NISV' LARIN ^{99m} Tc İLE İŞARETLENMESİ	54
II.2.5.8.2.	RADYOAKTİF İŞARETLEMENİN KALİTE KONTROLÜ	54
II.2.5.8.3.	RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN BİYODAĞILIM ÇALIŞMALARI	55
II.2.5.8.4.	RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN RADYOLOJİK ÇALIŞMALAR	55a
III.	BULGULAR	56
III.1.	IOPROMİD' İN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR	56
III.1.1.	IOPROMİD' İN STANDARDİZASYONU	56
III.1.1.1.	IR SPEKTRUMU	56
III.1.1.2.	IOPROMİD VE IOPROMİD-U' NUN İTK İLE TANINMASI	56
III.1.1.3.	UV SPEKTRUMU	58
III.1.1.4.	STANDART DOĞRU	58
III.1.1.5.	IOPROMİD-U' NUN OSMOTİK BASINCINA AİT BULGULAR	58
III.1.1.6.	IOPROMİD-U' NUN pH' SININ ÖLÇÜLMESİ	58
III.1.1.7.	IOPROMİD-U' NUN VİSKOSİTESİNE AİT BULGULAR	58
III.1.1.8.	NMR TEKNİĞİ İLE IOPROMİD' İN TANINMASI	64
III.1.1.9.	IOPROMİD' İN PARTİSYON KATSAYISININ TAYİNİ	64
III.1.1.10.	IOPROMİD' İN ERİME DERECESE TAYİNİ	65
III.2.	LİPOZOMLAR	65
III.2.1.	LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER	65
III.2.1.1.	LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN STANDARDİZASYONU	65
III.2.1.1.1.	FOSFOLİPİTLERİN STANDARDİZASYONU	65

III.2.1.1.1.1	ITK İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI	65
III.2.1.1.1.2	DSC İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI	66
III.2.1.1.1.3	NMR TEKNİĞİ İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI	67
III.2.1.1.2.	YÜK VERİCİ MADDELER	68
III.2.1.1.2.1	IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	68
III.2.1.1.2.2	ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	71
III.2.1.1.3.	STABİLİTE ARTIRICI MADDELER	71
III.2.1.1.3.1	ITK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI	71
III.2.1.1.3.2	KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ	71
III.2.2.	LİPOZOM FORMÜLASYONLARI	72
III.3.	NISV' LAR	73
III.3.1.	NISV' YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNE AİT BULGULAR	73
III.3.1.1.	NISV' YAPISINA GİREN MADDELERİN STANDARDİZASYONU	73
III.3.1.1.1.	SÜRFAKTANLARIN STANDARDİZASYONU	73
III.3.1.1.1.1	SÜRFAKTANLARIN HLB DEĞERLERİNİN SAPTANMASI	73
III.3.1.1.1.2	SÜRFAKTANLARIN DSC İLE TANINMASI	74
III.3.1.1.1.3	SÜRFAKTANLARIN YÜZEY GERİLİMLERİNİN SAPTANMASI	74
III.3.1.1.2.	YÜK VERİCİ MADDELER	74
III.3.1.1.2.1	IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	74
III.3.1.1.2.2	ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI	74
III.3.1.1.3.	STABİLİTE ARTIRICI MADDELER	74
III.3.1.1.3.1	ITK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI	74
III.3.1.1.3.2	KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ	76
III.3.2.	NISV FORMÜLASYONLARI	77
III.4.	HAZIRLANAN LİPOZOM VE NISV' LARIN ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR	77
III.4.1.	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DAĞILIMLARI	77
III.4.2.	LİPOZOMAL FOSFOLİPİT MİKTARI VE VERİMİ	78

III.4.3.	LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA IOPROMİD MİKTARI	80
III.4.3.1.	VEZİKÜL İÇİNDE HAPSEDİLEN IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ	80
III.4.3.2.	LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA SERBEST IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ	80
III.4.4.	LİPOZOM VE NISV' LARIN TABAKA SAYISI	81
III.4.5.	LİPOZOM VE NISV' LARIN ENKAPSÜLASYON HACMİ	81
III.4.6.	LİPOZOM VE NISV' LARIN FİZİKSEL STABİLİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	81
III.4.6.1.	SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERDEN ETKEN MADDE KAYBEDİLMESİ	84
III.4.6.2.	SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERİN PARTİKÜL BÜYÜKLÜKLERİ	85
III.4.7.	LİPOZOM VE NISV' LARDA IOPROMİD' İN İN VİTRO SALIMINA AİT BULGULAR	86
III.4.7.1.	İN VİTRO SALIM SIRASINDA IOPROMİD' İN STABİLİTESİNİN VE PARÇALANMA ÜRÜNLERİNİN İNCELENMESİ	89
III.4.8.	LİPOZOM VE NISV' LARLA YAPILAN İN VİVO ÇALIŞMALAR AİT BULGULAR	89
III.4.8.1.	^{99m} Tc İLE YAPILAN RADYOAKTİF İŞARETLEMENİN KALİTE KONTROL BULGULARI	90
III.4.8.2.	RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN BİYODAĞILIM ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	91
III.4.8.3.	RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN RADYOLOJİK ÇALIŞMALAR AİT BULGULAR	111
IV.	TARTIŞMA	118
IV.1.	ETKEN MADDE SEÇİMİ	118
IV.1.1.	IOPROMİD' İN STABİLİTESİ	119
IV.2.	LİPOZOMLARIN FORMÜLASYONU	119

IV.3.	NİSV' LARIN FORMÜLASYONU	120
IV.4.	TAMPON SEÇİMİ	121
IV.5.	YÜK VERİCİ STEARİLAMİN' İN EKLENMESİ	122
IV.6.	KOLESTEROL' ÜN EKLENMESİ	123
IV.7.	LİPOZOM VE NİSV' LARIN HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ	123
IV.7.1.	PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ VE DAĞILIMI	124
IV.7.2.	HAPSEDİLEN ETKEN MADDE MİKTARI	125
IV.7.3.	SERBEST ETKEN MADDE MİKTARI	126
IV.7.4.	LİPOZOM VE NİSV' LARDA ENKAPSÜLASYON HACMİ	126
IV.7.5.	LİPOZOMAL FOSFOLİPİT MİKTARI	127
IV.7.6.	VEZİKÜLLERİN TABAKA SAYISININ SAPTANMASI	127
IV.8.	STABİLİTE ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	127
IV.8.1.	STABİLİTE ÇALIŞMALARINDA ETKEN MADDE KAYBI	128
IV.8.2.	STABİLİTE ÇALIŞMALARINDA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DEĞİŞİMİ	129
IV.9.	VEZİKÜLLERDEN İN VİTRO SALIMIN DEĞERLENDİRİLMESİ	129
IV.10.	İN VİVO DAĞILIM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	132
IV.11.	BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	136
	ÖZET	139
	SUMMARY	141
	REFERANSLAR	143
	ÖZGEÇMİŞ	150

TEŞEKKÜR

Araştırmam sırasında bana her türlü olanağı sağlayan Ecz. Teknolojisi Bölüm Başkanı Prof.Dr. A. Atilla HINCAL' a teşekkür ederim.

Çalışmalarımın her türlü aşamasında büyük desteğini ve yardımlarını gördüğüm rehber hocam Radyofarmasi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr.A. Yekta ÖZER ' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca H.Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof.Dr. Meral ERCAN' a in vivo çalışmalarım sırasındaki yardımlarından dolayı teşekkür ederim. Sintigrafi çekimlerim sırasında yardımcı olan Sayın Dr. İsmail ÇİFTÇİ ve Sayın Dr. Nedim GÜLALDI' ya çok teşekkür ederim.

Yine in vivo çalışmalarım sırasında bana çok değerli yardımları olan H.Ü. Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Bölümünden Sayın Vet.Hek. Işıl ÜNSAL' a, yine aynı bölümden Sayın Seyhan ÖZER' e ve Sayın Ekrem TETİK' e sonsuz teşekkür ederim.

Radyolojik çalışmalarım sırasında bana çalışma olanakları sağlayan H.Ü. Radyoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç.Dr. Muzaffer ERYILMAZ' a, CT sonuçlarını yorumlamamda yardım eden Sayın Dr. Kubilay AYDIN ve çekimler sırasında yardımcı olan Sayın Ahmet SOYBİLGİN'e ve Radyoloji Bölümü Bilgisayarlı Tomografi Ünitesinde çalışan tüm personele sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Etken maddemizi sağlamamızda yardımcı olan Schering AG' den Dr.W.KRAUSE' a ve Türk Schering A.Ş.'den Sayın Ünal ÖZÖREN'e teşekkür ederim.

Fosfolipitler ve ilgili her türlü teknik bilgiyi ve DSC' lerin bir kısmını sağlayan Nattermann GmbH' a, DSC termogramlarını çeken H.Ü. Kimya Fakültesi'nden Sayın Prof.Dr. Olgun GÜVEN' e, NMR çalışmalarında her türlü yardımı sağlayan Spectral Service GmbH'a ve yine NMR spektrumlarının bir kısmını çeken H.Ü. Eczacılık Fakültesi' nden Sayın Doç.Dr. Hülya AKGÜN' e çok teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarım sırasında büyük desteklerini gördüğüm aileme sonsuz teşekkür ederim.

GİRİŞ VE AMAÇ

1895’ te Wilhem Conrad Röntgen , özelliğini açıklayamadığından X-ışınları adını verdiği yeni bir ışının varlığını ortaya çıkardı. Bu buluş fizik dünyasında önemli bir gelişme sağlarken, tıp alanında da yeni bir tıp dalı olarak “Radyoloji” ‘nin doğuşuna başlangıç olmuştur.

W.C. Röntgen tarafından X-ışınları ortaya çıkarıldıktan bu yana, elektromanyetik ışınlar, morötesi spektrumundan daha yüksek enerji verdiklerinden tıbbi teşhis alanında kullanılmaktadırlar. Organizmada kemik dokusu dışındaki tüm hücrelerin yapı taşlarını oluşturan hafif elementli moleküllerin düşük miktarda absorbe ettiği bu ışınlar, vücudu kolaylıkla katederek, floresan ekranlar üzerinde, sağlam dokulardan daha kontrast veya silik görüntülerin elde edilmesini sağlarlar (1).

Kontrast ortamın önemi X-ışınlarının keşfiyle hemen hemen aynı zamanlarda anlaşılmıştır. Vücuttaki yapıların çoğu X-ışınlarıyla iyi görüntü vermezler ve ancak görüntüleri kontrast madde kullanımıyla artar. Sonuç olarak, kontrast maddeyi daha iyi hale getirmek ve teknikleri geliştirmek için pekçok çalışmalar yapılmıştır. Gayretler, daha iyi tolere edilen kontrast maddeler ve CT (bilgisayarlı tomografi) gibi kontrast rezolüsyonu daha iyi olan teknikler için olmuştur. Bu sayede, vücut dışından çeşitli organ ve dokuların morfolojileri veya fonksiyonlarını saptamak imkanı doğmuştur (2).

Lipozomlar ve NISV (non-iyonik sürfaktan vezikül)’ lar, üzerinde çeşitli araştırmaların yapıldığı yeni ilaç taşıyıcı sistemler olup, ilaçlar, enzimler, radyoaktif izleyici maddeler gibi çeşitli materyalleri hedef organ ya da dokulara taşırlar (3, 4).

Bu veziküler sistemler, X-ışınları kontrast materyallerinin yüklenmesiyle RES (Retikulo Endotelyal Sistem) lezyonlarının CT teşhisinde yararlı olabilirler. Radyokontrast (radyopak) madde olmaksızın, ancak pek az lezyon saptanabilir. Halen mevcut ekstraselüler radyokontrast maddeler ise lezyonların saptanabilmesini belirgin şekilde arttırmaktadırlar. Ancak bu maddeler vasküler sistemden hızla uzaklaşmaktadırlar. Söz konusu soruna çözüm lipozom ve NISV gibi taşıyıcı sistemler içinde radyopak maddelerin hapsedilmesi olabilir.

Çalışmamızda non-iyonik monomer bir radyopak madde olan Iopromid içeren

lipozom ve NISV' lar geliştirilmiştir. Bu kontrast madde ticarete Ultravist® ticari adıyla bulunmaktadır ve CT, anjiyografi ve ürografiye görülen problemlere tolerans gösteren ve etkili bir maddedir (5). Iopromid içeren Ultravist i.v. yolla verildiğinde karaciğer hücrelerine girmez ve böbreklerden glomerüler filtrasyonla atılır.

Lipozom ve NISV' larda hapsedilmesinden sonra, Iopromid' in hidrofilik karakteri maskelenecek ve RES' in makrofaj veya Kupffer hücrelerinde lokalize olacaktır.

Bu çalışmada Iopromid' i Ultravist halde içeren lipozom ve NISV' ların hazırlanması, karakterizasyonu, hayvanlarda biyodağılımı ve CT görüntülemeye kontrast artışı sağlayıp sağlamadığı ve böylece teşhiste konvansiyonel şekle göre avantajlı olup olmadığı araştırılmıştır.



I. GENEL BİLGİLER

I.1 LİPOZOMLAR

I.1.1. LİPOZOMLARIN TANIM VE KARAKTERİSTİKLERİ

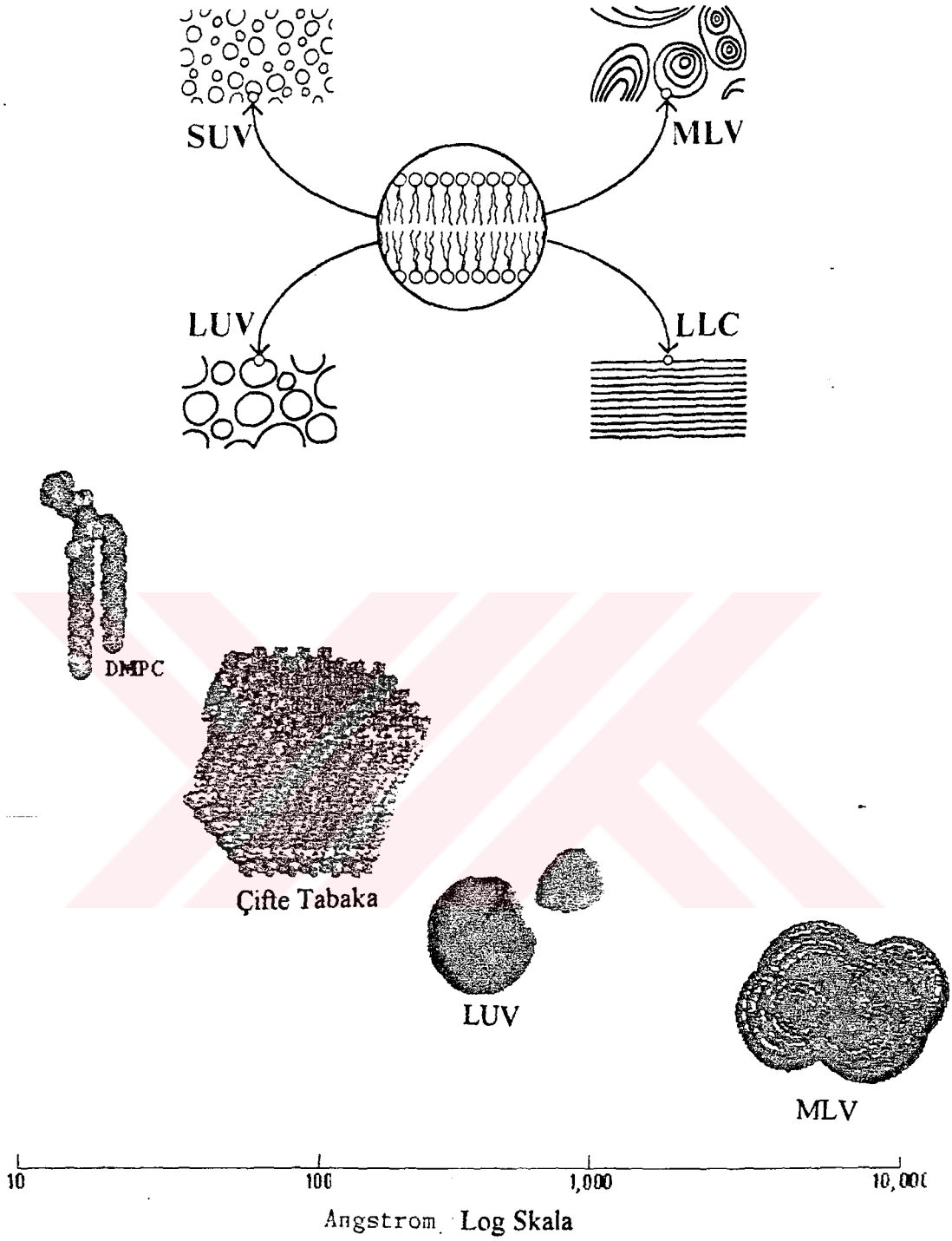
Lipozomlar- lipid vezikülleri- küresel şekilli, lipid tabakalarının orta-iç kısmında çözücüyü hapsedecek şekilde bükülerek oluşan kapalı yapılardır. Bir veya birden çok konsentrik membrandan oluşur ve boyutları 20 nm ile birkaç µm arasında değişir. Membran kalınlığı ise 4 nm civarındadır (3).

Lipozomlar yüzey aktif özellikteki moleküllerin özel bir grubu olan amfifilik moleküllerden yapılmıştır. Bu moleküller suda çözünen hidrofilik kısım ile suda çözünmeyen hidrofobik kısmı aynı molekül içinde taşırlar.

Lipozom oluşturan moleküller (ör:lesitin) hidrofobik ya da nonpolar zincir olarak adlandırılan iki hidrokarbon zinciri ile hidrofilik gruplara atak yapan polar bir baş grubu taşırlar. Bu moleküllerin çoğu suda çözünmezler, kolloidal dispersiyonlar oluştururlar. Hidrofilik kısım suya yönelirken hidrofobik kısım yapının içindeki sudan kaçma eğilimi gösterir. En sık oluşan agregasyon şekli lipid çift tabakadır. Çift tabakanın her iki yüzeyinde hidrokarbon zinciri tabakanın içindeki sudan koruyan polar baş grupları vardır (3). Şekil 1 'de değişik lipozomlar ve boyutları gösterilmiştir.

Bu veziküller, lipid molekülleri sulu ortamda disperse edildiğinde kendiliğinden oluşur. Büyük ya da küçük olabilirler ve bir veya birden çok tabakadan oluşabilirler. Suda çözünen moleküller içte hapsedilir. Amfifilik moleküller çifte tabaka içine yönelir ve hidrofobik moleküller çifte tabakada çözülür. Kompleks moleküller ve proteinler değişik yollar olarak çifte tabaka içine yerleşebilir ya da çifte tabaka üzerine bağlanır veya absorbe olur (Şekil 2).

Bu yapılar çok değişik fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir : osmotik aktivite, membranların geçirgenliği, değişik hidrofilik ve hidrofobik çözeltilerle etkileşimleri, kimyasal bileşim ve membranın yüzey özelliklerine bağlı agregasyonlar gibi (3).



Şekil 1: Değişik Lipozomal Yapılar ve Boyutları (3)

SUV: Küçük Tek Tabakalı Veziküller

LUV: Büyük Tek Tabakalı Veziküller

MLV: Çok Tabakalı Veziküller

I.1.1.1. YAPISI

Lipozomlar, biyolojik membran benzeri lipit tabaka veya tabakalar ile sulu faz olmak üzere iki bölümden oluşur. Sulu faz tek bir tabakadan oluşan lipozomlarda içtedir ya da çok tabakalı lipozomlarda lipit tabakalar arasında devam eder.

Lipit tabakanın başlıca bileşeni fosfolipitlerdir. En çok kullanılan doğal ve sentetik fosfolipitler; soya, beyin ve yumurta fosfatidilkolin, DSPC (distearil fosfatidilkolin), DPPC (dipalmitoil fosfatidilkolin), DMPC (dismiristoil fosfatidil kolin), DLPC (dilaüril fosfatidilkolin), dipalmitoil fosfatidil etanolamin, dipalmitoil fosfatidik asit, DSPG (distearil fosfatidilgliserol) ve sfingomiyelin 'dir.

Lipozomlara, özelliklerinde istenilen yönde bazı değişiklikler yapmak için çeşitli maddeler ilave edilir (6).

❶ Lipozomların küçük molekülü maddelere karşı geçirgenliğini azaltmak için steroller (ör: kolesterol, ergosterol, lanosterol, stigmasterol) katılır. En çok kullanılan sterol ise kolesterol 'dür.

❷ Doymamış yağ asitlerinin bozulmasını önlemek için α - tokoferol eklenir.

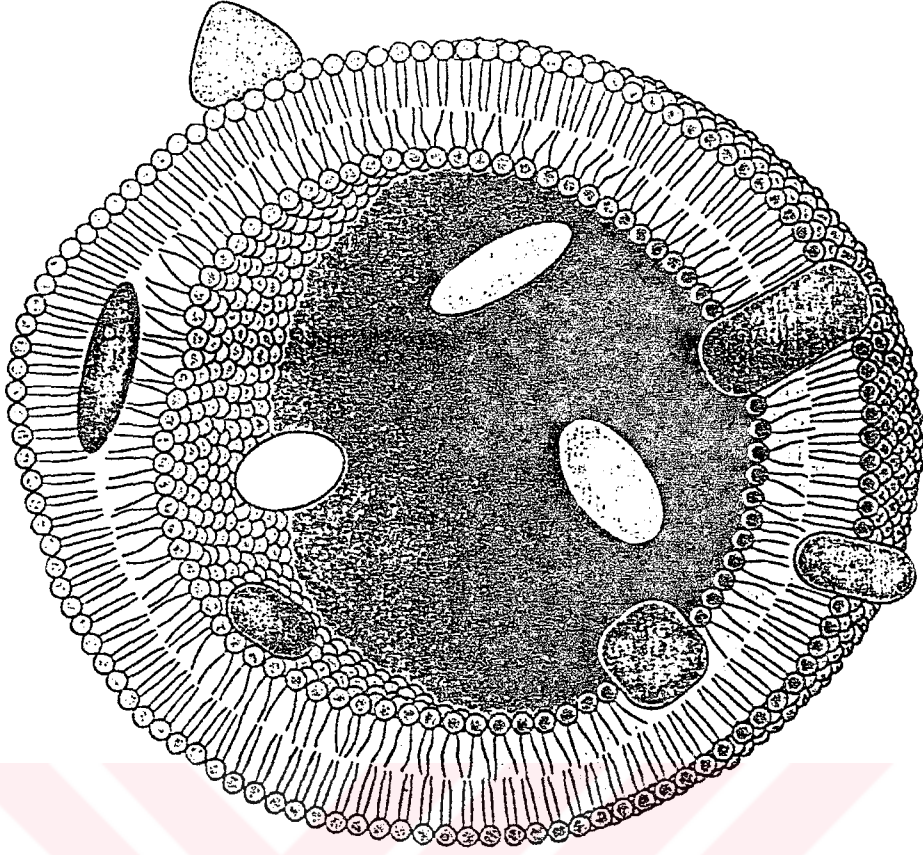
❸ Hedef bölgeye gönderilmesini sağlamak için yapılarına immünoglobülinler, stearylamin, setil fosfat veya glikolipitler katılır.

❹ Yapılarına bazı maddelerin ilavesi ile pozitif, negatif yüklü veya yüksüz olabilirler. Stearylamin ile pozitif (+), disetilfosfat, kolesterol hemisüksinat, fosfatidik asit ve fosfatidilserin ile negatif (-) yüklü ya da yalnızca fosfolipit ve kolesterol ile yüksüz lipozomlar hazırlanabilir (7-11).

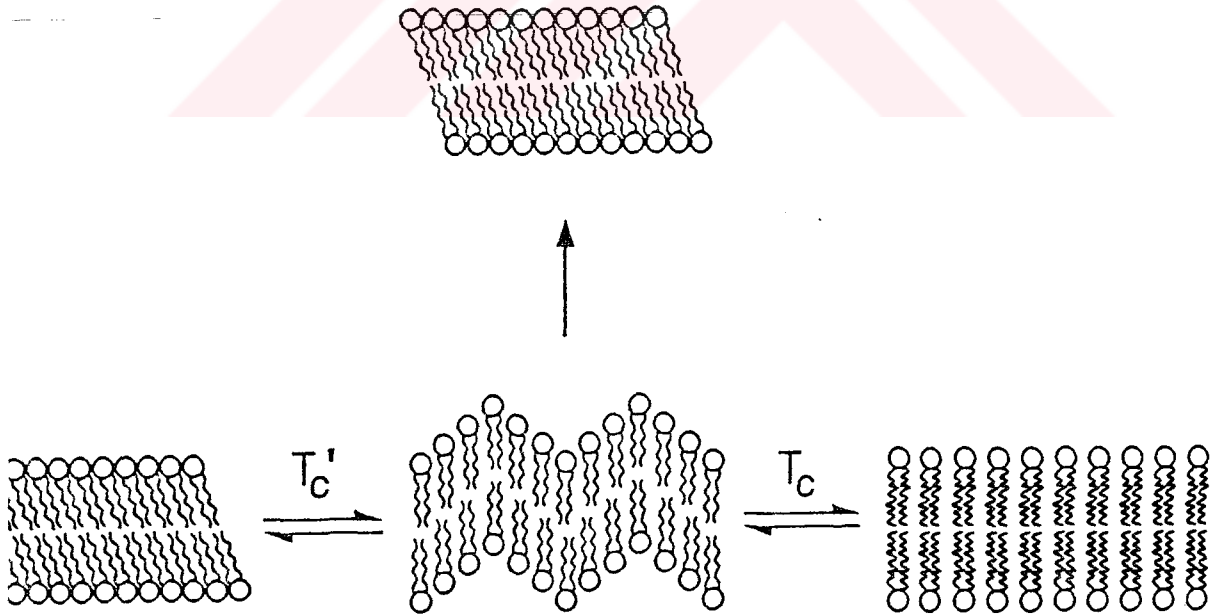
I.1.2. FAZ DEĞİŞTİRME ÖZELLİĞİ

Lipozomlar faz değiştirme özelliğine sahiptir. Jel (katı) veya sıvı kristalin (sıvı) faz halinde bulunur (Şekil 3). Faz değiştirme özelliği hazırlamada, kullanımlarında ve stabilitelerinde önemli rol oynar.

Lipozomların faz değiştirme özelliğini, fosfolipitin yapısı, yapıya ilave edilen maddeler ve sıcaklık belirler.



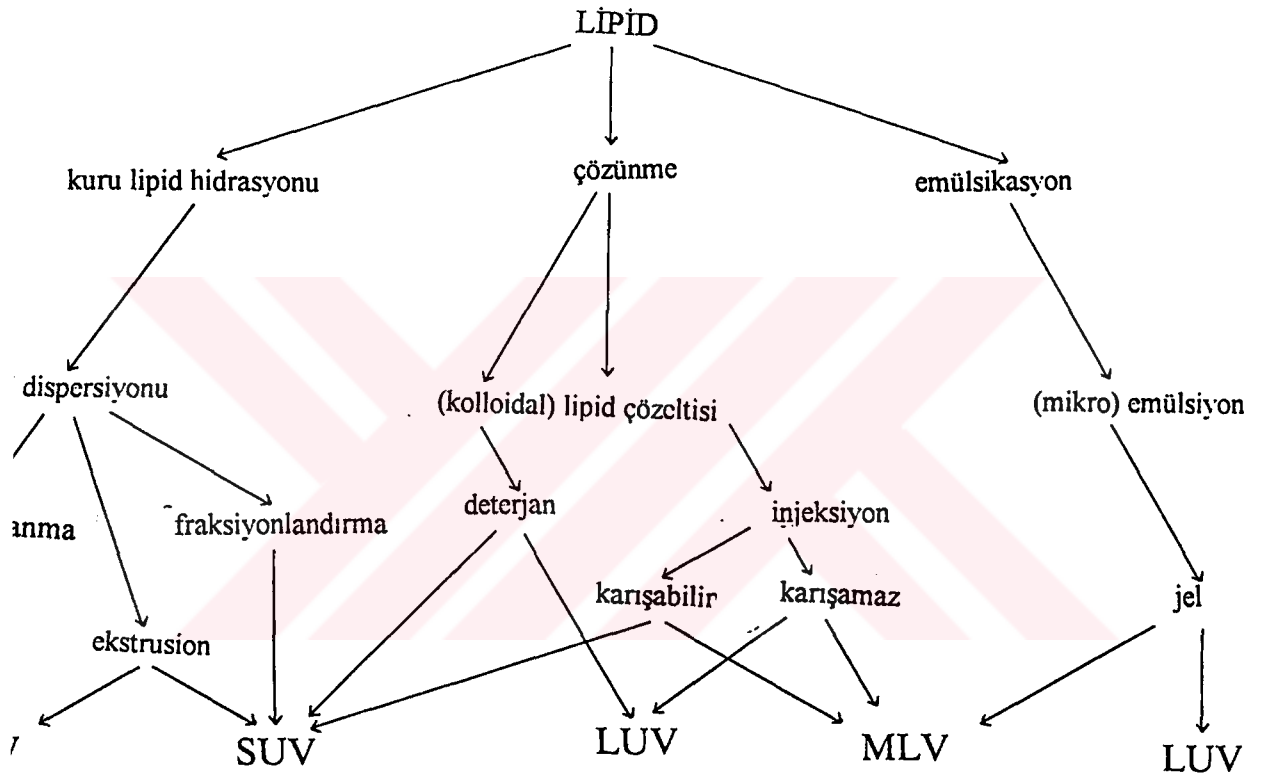
Şekil 2: Değişik Moleküller ile Lipozomların İlişkisi



Şekil 3: Lipozomların Faz Değişirme Özellikleri (3)

I.1.3. LİPOZOM HAZIRLAMA YÖNTEMLERİ

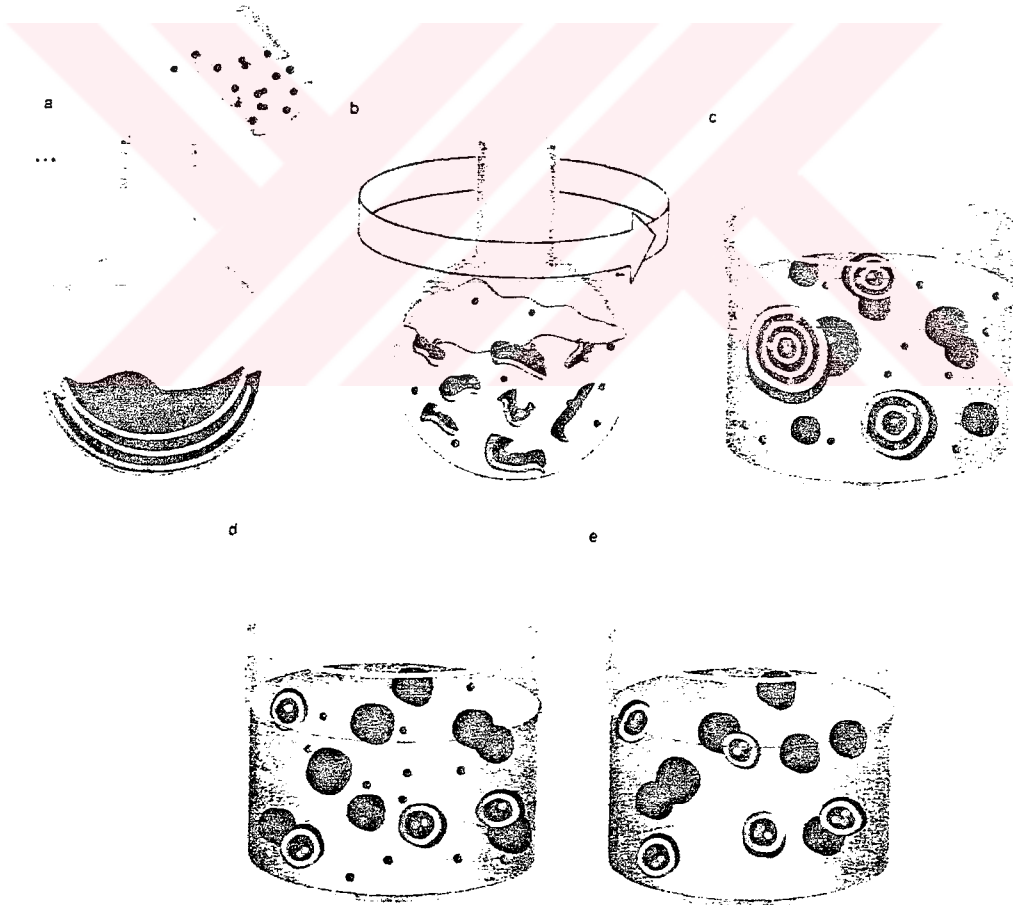
Lipozom hazırlama yöntemleri ve seçilen hazırlama yöntemine göre sonuçta elde edilen lipozom tipleri Şekil 4' de özetlenmiştir.



Şekil 4: Lipozom Hazırlama Yöntemleri (3).

1.1.3.1. FİLM TEKNİĞİ

Çalışmalarımızda kullanılan lipozomlar 1965 yılında Bagham tarafından bildirilen, günümüzde en sık kullanılan yöntemlerden biri olan film metodu ile hazırlanmıştır. Lipitler yuvarlak altlı bir balon içinde, kolesterol ve yük verici madde (eğer varsa) ile kloroform içinde çözülür. Organik solvan rotavaporda alçak basınçta uçurularak balonun alt kısmında ince bir lipit film tabakası elde edilir. Ortama eklenen sulu faz ile kuru lipit film tekrar süspande edilir. Lipozomların oluşması için resüpsansiyon işleminin, faz geçiş sıcaklığının üzerinde yapılması gerekir (12) (Şekil 5).



Şekil 5: Çok Tabakalı Lipozomların Film Tekniği ile Hazırlanması (3).

1.1.4. LİPOZOMLARIN STABİLİTESİ

Lipozomların stabiliteleri aşağıdaki alt başlıklarla incelenmiştir.

①**Fiziksel Stabilité:**Lipozom yapısının ve hapsedme özelliğinin (ör: lipozom büyüklüğünün, şeklinin stabilitesinin ve mebrana bağlı ya da hapsedilmiş maddeler için lipid çift tabakanın bariyer özelliğinin) korunmasını içerir. Büyüklük ve enkapsülasyonun korunması çift tabakanın mekanik ve termodinamik özelliklerine de bağlıdır (3).

②**Kimyasal Stabilité:** Kimyasal ve fiziksel stabilite birbiriyle yakından ilişkilidir. Mekanik olarak dayanıklı ve iyi koordine olmuş çifte tabaka, oksidasyon ve hidrolize neden olan ajanların girişini azaltır. Dolayısıyla çifte tabakanın mekanik özellikleri, füzyon ve büyüklük dağılımındaki değişimler azalır. Önlem olarak çift tabaka hazırlanırken, degradasyon olasılığı en az moleküller seçilebilir, pH kontrol edilir veya antioksidan ilavesi ile uzun kimyasal stabilite sağlanabilir.

Gliserol yapısına eter bağı ile bağlı bir yağ asidi içeren sentetik lipidler daha stabildir (13, 14).

Oksidasyon ve hidroliz, lipozomu oluşturan çifte tabakanın temel bileşeni olan fosfolipitlerde görülen iki temel bozunma olayıdır (13, 15).

Bu bozunma olaylarından oksidasyona doymamış yağ asidi içeren fosfolipitlerde rastlanır. Oksidasyonun önlenmesi için lipozomların hazırlanması ve saklanması sırasında azot veya argon altında saklama, α -tokoferol gibi antioksidan ekleme veya doymuş hidrokarbon zinciri içeren fosfolipitler kullanma yollarından yararlanılır (14-16).

Hidroliz ise diğer kimyasal bozunma şeklidir. Hidroliz reaksiyonuyla önce lizofosfolipitler (LPC) ve serbest yağ asitleri (FFA) oluşur. Hidroliz bu ara basamaktan sonra da devam ederek reaksiyon sonuçta gliserofosfatlar ve yağ asitleri teşekkülüyle tamamlanır (13, 17).

LPC' lerin oluşumu, hidroliz reaksiyonlarının bozunma derecesini tayinde dikkate alınan bir ölçü olmuştur. Lizofosfolipitlerin oluşumuyla lipozomun geçirgenlik, faz ayrımı, hemolitik aktivite gibi özellikleri üzerinde etkilerini açıklayan çalışmalar varsa da FFA' lerle birlikte aynı özelliklerin nasıl değiştiği konusu hala belirsizdir (18).

Lipozomda hapsedilen hidrofilik ilaçların, LPC oluşumu sonucu lipozomal çifte tabakanın geçirgenliğinin artışıyla kaybedilmesi beklenen bir olaydır. Ayrıca, eksojen LPC varlığının bu geçirgenliği artırdığı da bildirilmiştir (13).

Hidrolize olmamış (taze) lipozomlarla ve %15 civarında hidrolize fosfolipit içeren lipozomlarda geçirgenlik aynı bulunmuştur. Bu bulgu FFA' nın, LPC' lerin geçirgenliğini artırdığı ve membran destabilizasyonu bakımından etkisini antagonize ettiğini göstermiştir. Ancak bu in vitro bulguların in vivo çalışmalara korele edilmesinde dikkatli olunması gerektiği rapor edilmiştir (13).

Yapılan son çalışmalarla hidrolizin olması için “Kritik Hidroliz Yüzdesine” diğer bir deyişle % LPC / PC' ne ulaşması gerektiği bildirilmiştir. Kritik Hidroliz Yüzdesi' nin kullanılan lipozomal fosfolipitlerin zincir uzunluğuna ve baş grubuna bağlı olduğu; pH, konsantrasyon ve lipozom büyüklüğünden etkilenmediği anlaşılmıştır (14).

Çalışmalarımızda kullanılan fosfolipitlerde LPC olup olmadığı NMR tekniği ile araştırılmıştır ve çok düşük oranda olduğu saptanmıştır. Bu düşük orandaki LPC 'lerin, hidrofilik bir ilaç olan Iopromid lipozomlarının geçirgenliği üzerinde etkisi olmayacağı anlaşılmıştır. Buna ek olarak, lipozomlar taze olarak hazırlanıp in vitro deneylerde kullanılmıştır. Lipozomların taze hazırlanması halinde geçirgenliğin değişmediği bildirilmiştir (13).

©Biyolojik Stabilité: Lipozomlar test tüpleri içinde stabil olsalar bile biyolojik ortamda instabil olabilirler. Mekanik stabilité, in vitro etkileşimin ve in vivo etken madde kaybının azalmasına yardımcı olabilir fakat parenteral uygulamayı takiben fagositik hücreler tarafından lipozomların organ tutulumunu azaltmazlar.

İnstabilité nedenleri, protein ve immün sistem gibi zararlı ajanlar veya yüksek ısı ve basınç ile fiziksel destabilizasyon, hidrodinamik güç, ısı ya da sürfaktanların etkisi, organik solvanlar veya adsorbanlar sayılabilir (3, 19).

©Raf Ömrü: Raf ömrü stabilitesi en çok lipozomların fiziksel stabilitesini, hapsedilmiş ya da bağlı moleküllerin tutulumunu ve kullanılan bütün kimyasal maddelerin stabilitesini içerir.

Optimal stabilité koşullarını bulmak, lipidlerin ve enkapsüle edilmiş maddelerin değişik fizikokimyasal özellikleri nedeniyle güçtür. Kimyasal ve fiziksel stabilité

yanında endüstriyel olarak üretilen bütün lipozomal ürünlerin büyüklük, şekil, renk yönünden de stabil olması istenir (3, 20).

©**Mekanik Stabilite:** Membran kohesivitesi, geçirgenlikle, osmotik şoka dayanıklılık ile direkt olarak; sürfaktan, protein ve immün sistem içeren değişik ajanların atakları ile indirekt olarak bağıntılıdır.

Lipozomlar minik bir osmometre gibi davranırlar. Kırılmadan önce geniş bir osmotik basınca karşı direnç gösterirler. Örneğin; DSPC /CHOL (kolesterol) (3:2) bileşimi ile hazırlanan lipozomların kırılmadan değişik oranlarda osmotik basınçlara dayanabildiği deneysel olarak gösterilmiştir (3).

Lipozomların stabilite problemlerinin üstesinden gelmek için gerekli metodlar iki grup altında toplanabilir:

1.1.4.1.KİMYASAL DEGREDASYONUN ÖNLENMESİ

Aşağıdaki önlemler alınarak oksidasyon düzeyi minimumda tutulabilir (21).

- * Taze saf lipidler ve yeni distillenmiş solvanlar kullanılmalı
- * Yüksek ısı gerektiren işlemlerden kaçınılmalı
- * Oksijensiz ortamda üretim işlemi gerçekleştirilmeli
- * Tüm lipozom süspansiyonları inert atmosferde saklanmalı
- * Lipit membran bileşeni olarak antioksidan kullanılmalı.

Serbest radikal zinciri reaksiyonunun başlamasını önlemek için formülasyona demir şelat ajanı eklenebilir. Formülasyonlara antioksidan olarak α , β , γ -tokoferol önerilse bile en yaygın kullanılanı α -tokoferol' dür. Çünkü uzun yarı ömre sahiptir ve radikal nötralizasyonunda kolayca tahrip olmaz. Lipidlerin oksidasyon düzeyini azaltmak için bir başka yaklaşım ise, doymamış lipidler yerine doymuş lipitler kullanmaktır. Doğal kaynaklardan elde edilen fosfolipitlerde doymamışlık artar. Doymamış lesitin, katalitik hidrojenasyon işlemi ile doymuş hale getirilebilir. Lipozomlar DMPC, DPPC ve DSPC gibi sentetik doymuş bileşiklerle hazırlanabilir

Ester zincirinin hidrolizi, nötrale yakın pH' larda oluşur. Fakat düşük pH' larda şayet kalan solvan dikkatlice uzaklaştırılırsa hidrolizin minimum olması sağlanabilir (3).

1.1.4.2. FİZİKSEL DEGRADASYONUN ÖNLENMESİ

Üretim sırasında çifte tabakada oluşan defekt sonucu sızma ya da füzyon görülebilir. Özellikle Tc altında hazırlandığı zaman SUV' lerde görülür. Tc üzerinde bile diğer tip veziküllerde de (deterjan diyaliz, dondurarak kurutma) hasarlar görülebilir.

Nötral lipozomların agregasyonuna Van der Walls etkileşimi neden olur ve bu durum büyük vezikülerde çok daha fazla görülür. Bu durumun üstesinden gelmek için basit bir yol, lipid karışımı içine küçük miktar negatif yük (ör: %10 PA ve PG) koymaktır (3).

Küçük tek tabakalı veziküller füzyona meyillidir. Bu özellikle Tc de görüldüğü için lipozom süspansiyonları Tc den uzak sıcaklıklarda uygun şekilde saklanmalıdır. Membran bileşimine yeterli miktarda kolesterol eklenmesi membran içine geçişleri tamamıyla engeller ya da azaltır. Negatif yüklü lipozomlar için yüksek konsantrasyondaki metal iyonundan kaçınılmalıdır.

Membran geçirgenliği lipid bileşimine ve içte hapsedilen maddeye bağlıdır. Polar ve iyonik maddelerin membran içinde kalması düşük molekül ağırlıklı lipofilik bileşiklerden daha fazladır.

Membranın geçirgenliği, Tc sıcaklığında özellikle HDL (yüksek dansiteli lipoproteinler), apolipoprotein, tubülin varlığında artabilir ve bundan istenilen sıcaklıkta lipozomdan salımın artmasını sağlamak için yararlanılabilir (21).

1.1.5. LİPOZOMLARDAN İN VİTRO SALIM

Lipozomlardan etken maddenin salımı çeşitli çalışmalarla incelenmiştir. Lipozomlar genel olarak etken maddeyi Higuchi kinetiğine uygun olarak salarlar. Etken madde lipozomun membran matriksinden difüze olur. Yani lipozomdan etken maddenin çıkışında difüzyon hız kısıtlayıcı parametredir (20, 22).

Niven ve ark. (23) yaptıkları üç ayrı çalışmada etken maddenin lipozomdan salımına lipozom büyüklüğünün, lipid bileşiminin ve çevresel faktörlerin etkisini incelenmişlerdir.

Etken madde salımına lipozom büyüklüğünün etkisini inceledikleri çalışmada, CF (karboksifluorescein) içeren çok tabakalı lipozomlar hazırlamışlar ve 0.2-5 µm por açıklığına sahip polikarbonat filtreden geçirmişlerdir. Salınan etken madde oranının vezikül büyüklüğüne bağlı olarak değiştiğini gözlemişlerdir. 0.2 µm por açıklığına sahip filtreden geçirilen lipozom dispersiyonunda etken madde kaybı $7.9 \pm \%0.4$ iken filtreden geçirilmeyenlerde bu oran $76.8 \pm \%5.9$ olarak bulunmuştur (23).

Lipid bileşiminin etkisini incelemek için yaptıkları diğer çalışmada, CF içeren SPC (soya fosfatidilkolin), HSPC (hidrojene soya fosfatidilkolin) ve DPPG ile değişik bileşimlerde hazırlanmış çok tabakalı lipozomlar kullanmışlardır. 80 dk. sonunda CF salımı en az % 30 mol kolesterol içeren HSPC lipozomunda gözlenirken (% 12.7 ± 3.8) en fazla salım SPC ve % 30 mol DPPG içeren lipozomda görülmüştür ($60.9 \pm \%1.9$) (24).

SPC ve DPPG (9:1 molar bileşim) ile hazırlanan CF içeren çok tabakalı lipozomlar hazırlanarak çevresel faktörlerin, etken madde salımına etkisi incelenmiştir. Çalışılan faktörler hava basıncı, sıcaklık, tampon osmotik basıncı ve pH 'dır.

Hava basıncındaki değişiklikler CF salımında % 1.3 den % 88.2 'ye kadar geniş bir değişikliğe yol açmıştır. Dispersiyonun sıcaklığındaki değişiklikler faz geçiş sıcaklığına ulaşana kadar CF salımında önemli bir artışa neden olmamıştır. Lipozomdan etken madde salımı hipotonik çözeltilerde artmış hipertonic çözeltilerde ise azalmıştır. pH' nın etkisi ise, pH 2.85 deki salım pH 7.2 ve pH 10.75 ile karşılaştırıldığında etken madde salımının % 18 oranında artmış olduğu bulunmuştur (25).

I.1.6. LİPOZOMLARIN VE NİSV' LARIN HEDEFLENDİRİLMESİ

Etken maddelerin belirlenen, organlara hedeflendirilme nedenleri arasında aşağıdaki hususlar sayılabilir (26).

i. Farmasötik Nedenler

- Etken maddenin konvansiyonel formülasyonlardaki dayanıksızlığı
- Çözünürlük sorunları

ii. Biyofarmasötik Nedenler

- Absorpsiyonun düşük olması
 - Membranlara aşırı bağlanması
 - Biyolojik dayanıksızlığı
- iii. Farmakokinetik / Farmakodinamik Nedenler
- Yarılanma ömrünün kısa olması
 - Dağılma hacminin geniş olması
 - Spesifik özelliğinin düşük olması
- iv. Klinik Nedenler
- Terapötik indeksinin düşük olması
 - Vücuttaki anatomik ve hücrel engeller
- v. Ticari nedenler

Lipozomlar / NISV' lar, aktif ya da pasif olarak hedeflendirilebilirler (3).

I.1.6.1. PASİF HEDEFLENDİRME

Lipozom ve NISV' lar, organizmadaki doğal sonlanma modelinden yararlanılarak ve partikül büyüklükleri seçilen hedef organın özelliklerine uygun olarak ayarlanarak “ pasif hedef ”lendirilebilirler. Pasif hedeflendirme ile veziküllerin normal sonlanma yeri olan RES organları yerine farklı organlara yönlendirilebilirler. Bunun için veriliş yolu, partikül boyutu gibi özellikler değiştirilir (27, 28).

I.1.6.2. AKTİF HEDEFLENDİRME

Partiküllerin organizmada izlediği dağılım modeli değiştirilerek, spesifik hücrelere, dokulara veya organlara yönlendirilmedir (3). Bu çeşitli yollarla gerçekleştirilir:

Immünilipozomlar : Lipozomların yüzeyine çeşitli antikor fragmanları bağlanarak (homing device aracılığıyla), ilacı hedef reseptörlere taşırlar (29).

Sıcaklık ve pH 'ya Hassas Lipozomlar: Hedefteki pH' nın değiştirilmesi veya dışarıdan ısı uygulanmasıyla ilaçların lipozomdan hedef organ ya da dokuda açığa

çıkması sağlanır (30).

Lenfotropizm: Lenf nodüllerine ilaç taşınmasında lenfotropizm bir başka yoldur. Cerrahi müdahaleyle tümörlü bölgelerin uzaklaştırılmasından sonra, metastaz oluşumu meydana gelir. Bunu engellemek için lenfatik sisteme ilacı taşıyan lipozomlarla iyi sonuçlar alındığı rapor edilmiştir (28).

Ayrıca **Yere Özel Hedeflendirme** de kullanılır. Ör: Gözün iç tabakaları, nazal, artiküler, akciğerlere, cilde, oral mukozaya uygulanan lipozomal ilaçlarla, o doku ve organlarda yüksek konsantrasyonda etken madde elde edilen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (20, 31-33).

I.2. KONTRAST MADDE VE RADYOPAK LİPOZOMLAR

Kontrast ortamın önemi, X-ışınlarının keşfiyle hemen hemen aynı zamanda anlaşılmıştır. Vücutta X-ışınlarıyla görülemeyen pek çok yapı, kontrast materyal kullanımıyla görünür hale gelir. KC (karaciğer) ve dalak başta olmak üzere birçok organın görüntülenmesinde kullanılan kontrast ajanlar üzerindeki araştırmalar, Thorium Dioksit (Thoratrast) 'ın kullanımından başlayarak son zamanlarda geliştirilen özellikle CT kullanılan ajanların kullanımına kadar uzanmaktadır. CT, ultrason ve MRI (manyetik rezonansla görüntüleme) teknikleri yumuşak dokuların, kan damarlarının gayet net teşhisini sağlamıştır. Bu sayede çeşitli organ ve dokuların fonksiyon bozuklukları ya da morfolojilerini dışardan saptamak mümkün olmaktadır (2).

Röntgen (X-ışınları) filmindeki kontrast, ışınlanmış materyalin X-ışınlarını farklı derecede absorpsiyonuyla oluşmaktadır. Bu absorpsiyon moleküldeki atomların atom numaralarına, moleküllerin konsantrasyonuna ve ışınlama kalınlığına dayanmaktadır.

Göğüsteki organların ve dokuların yapıları farklı olduğu için röntgen filminde yeterli kontrastı yaratırlar. Oysa karındaki organların anatomik yapıları birbirine çok benzer olduğundan bu kontrastı sağlamak güçtür. Bu nedenle kontrast (radyopak) maddelere gereksinim vardır.

Çok düşük dansitedeki maddeler (ör: gazlar) girdikleri organlar ve çevreledikleri dokuların absorpsiyonunu azaltırlar. Bunlara negatif kontrast maddeler denir. Bazı

maddeler ise yüksek atom numarasına sahiptirler (ör: baryum, iyot), bunlar X-ışınları absorpsiyonunu artırır. Bunlara pozitif kontrast maddeler denir. X-ışınları kontrast maddelerin sınıflandırılması Tablo 1’ de verilmiştir.

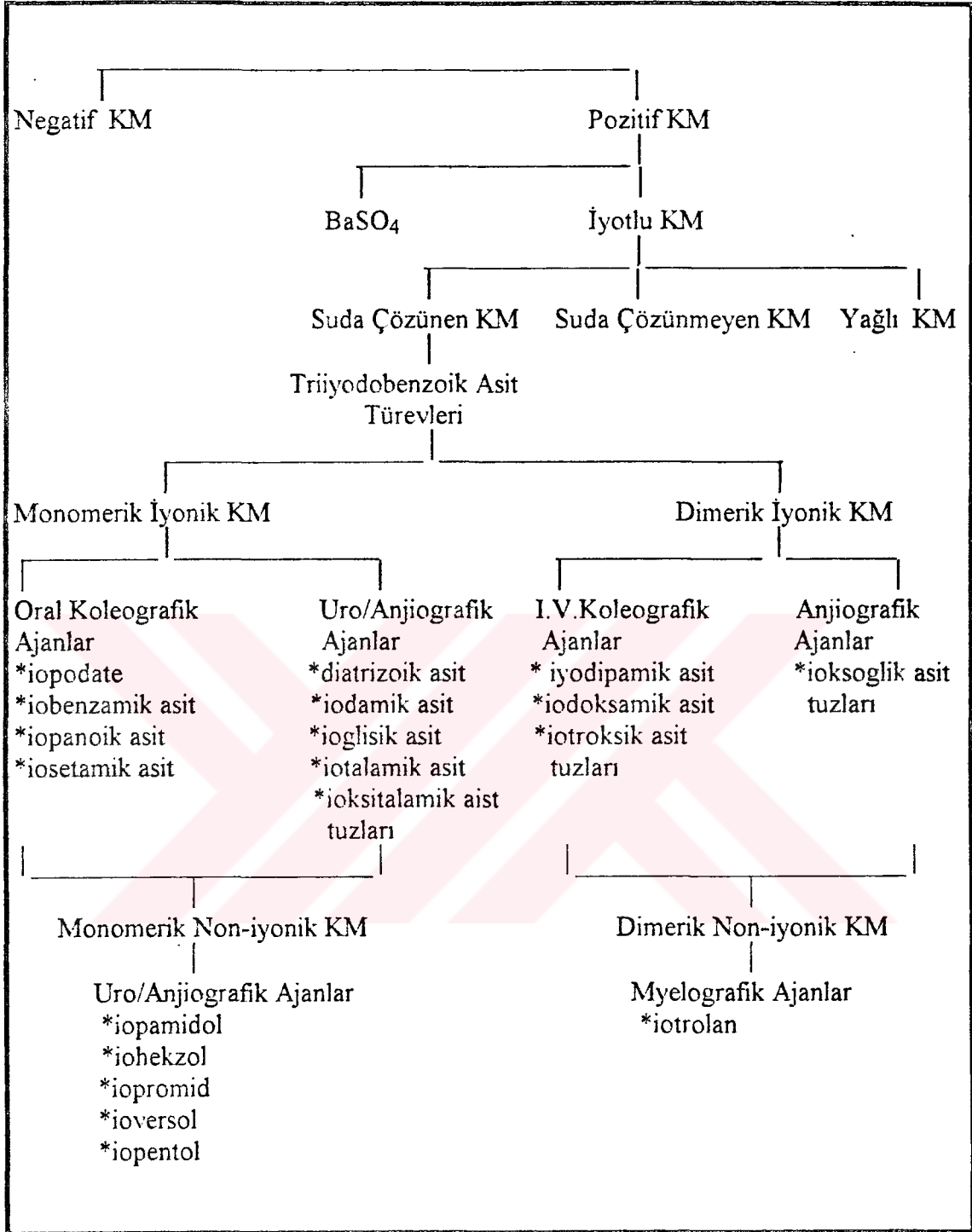
Kontrast oluşturan maddelerin başında baryum sülfat gelmektedir. Ancak GI kanalda perforasyon olması halinde diğer iyotlu kontrast maddeler kullanılır. Çünkü vücut, peritona girmesi halinde baryumu elimine etme yeteneğinde değildir.

Günümüzde i.v. enjeksiyon için kullanılan temel kontrast ajan iyottur. Karbon dioksit alternatif olarak tanıtılmış ama yaygın bir kullanım alanı bulamamıştır. Bütün iyotlu bileşikler triiyodo benzoik asitten sentezlenir. Türevleri daha hidrofiliktir, suda çözünür ve nontoksiktirler (34). Molekülde iyodun bulunuşu yüksek kontrast ve düşük toksisite anlamına gelir (2).

Kontrast ajanları, 4 grup altında toplamak mümkündür. İyonik, noniyonik, monomerik ve dimerik bileşikler. Bu gruplar arasındaki temel farklılık osmolalitedir. İyonik moleküller çok yüksek osmolalite gösterirken (1500 - 2300 mOsm /kg), dimerik bileşikler kan ile isotoniktir (300 mOsm /kg). Osmolalite bu kontrast ajanların tolere edilebilirliği üzerinde etkilidir. Aynı zamanda lipozom içine hapsedilebilirliğine de etki eder (34).

Konvansiyonel (iyonik) radyopak maddelerin yüksek osmolalite nedeniyle ciddi yan etki ortaya çıkardıkları bilinmektedir (35). Oysa yeni geliştirilen noniyonik radyopak maddeler elektrik yükleri olmaması; sodyum, meglumin gibi katyon taşımamaları nedeniyle kusma, bulantı, allerji benzeri veya idiosenktartik reaksiyonlar gibi yan etkilere neden olmazlar. Böylece hastada bulantı, kusma, ürtiker, mukozal şişme ve kardiyovasküler şikayetler azalır ve genel tolerans artar (36).

Lipozomlar, CT, MR, US (ultrason) ve radyonüklidik görüntülemeye, doku seçiciliklerinin olması ve iyi tolere edilir yüksek kapasiteli sistemler olmaları nedeniyle dokuya özgü kontrast madde taşınmasında üstünlük sağlayan sistemlerdir. Diagnostik amaçlı lipozomlar üzerinde 80’ lerden beri araştırmalar yapılmaktadır. Özellikle RES dokularına kontrast ajanların taşınması açısından yararlıdır. Hedef organlar KC ve dalaktır. RES hücreleri bakımından zengin organların patolojik bozukluklarının teşhisinde güvenli ilaç taşıyıcı ve spesifik hedeflendirici olarak kullanılabilirler. Bunun yanında lenfatik sistem de hedef organ olarak düşünülebilir (2, 34).



Tablo 1: X-Işını Kontrast Maddelerin (KM) Sınıflandırılması (2)

1.2.1. RADYOPAK LİPOZOMLARIN ÖZELLİKLERİ

İdeal bir radyopak lipozomal sistemin şu özelliklere sahip olması gerekir (37):

- * Noniyonik bir sulu süspansiyon veya çözelti halinde olmalıdır.
- * Kontrast artış fazı, görüntülemeye izin vermeye yetecek uzunlukta olmalıdır .
- * Küçük hacimde ve kısa uygulama süresinde , değişik yollardan (enteral, intravenöz, subkütan) uygulamaya elverişli olmalıdır.
- * Nontoksik olmalıdır.
- * Metabolize olmalı ve seçici hedeflendirme yapılabilmesi için değişiklikler yapmaya elverişli olmalıdır.

1.2.2. RADYOPAK LİPOZOMLARIN AVANTAJLARI

Radyopak lipozomlar şu üstünlükleri taşırlar:

- * Lipozomlar, kimyasal ve fiziksel özellikleri nedeniyle işaretleme ve radyonüklidik görüntüleme için uygundur (38) ,
- * Radyopak lipidlerden hazırlanan lipozomlar büyük elektron yoğunluğuna sahip atomları taşıyabilir (37) ,
- * Radyopak lipozomlar, KC ve dalakta seçici olarak görüntü artışı sağlayabilirler (39) ,
- * Tek doz i.v. (intravenöz) uygulanan lipozomlar ile görüntü artışı sağlanabilir.
- * Lipozomların tümörde veya diğer hedef organlarda lokalizasyonunu sağlamak için lipozomun özellikleri (membran özellikleri , büyüklükleri) yükleri veya yüzeydeki yükün yoğunluğu değiştirilebilir (8, 40) ,
- * Çok tabakalı lipozomlar , RES tarafından temizlendiği için RES' in çeşitli kısımlarındaki patolojik durumlara karşı yöneltilen ilaçlar için ideal bir taşıyıcı sistem sağlarlar (41) .

1.2.3. RADYOPAK LİPOZOMLARIN KULLANIMI

Radyopak lipozomlar;

- Bilgisayarlı tomografide
- Ultrasonla görüntülemeye
- Manyetik rezonans görüntülemeye
- Radyonüklidik görüntüleme (sintigrafi) de kullanılmaktadırlar.

Bilgisayarlı tomografide, lipozomların suda veya yağda çözünebilen güvenli, standart taşıyıcılar olarak kullanılabilmesi sağlanmıştır (42).

CT görüntüleme; obje içinden geçen X-ışınları foton akımının ölçülmesi ile yapılır. Değişik dokuların X-ışını soğurulma katsayısı bilgisayarlar tarafından hesaplanır.

CT aletleri dokular arası dansite farklılıklarına karşı çok hassastır. Normal ve patolojik dokular kolaylıkla ayırt edilebilir. Bu teknik özellikle KC metastaslarının teşhisinde radyonüklidik görüntüleme ve US' a göre daha iyi sonuç verir. Ancak dansitesi normal dokuya çok yakın olan bazı tümörlerin standart CT ile saptanması zordur (42).

Schuhman-Giampieri ve ark. CT ile yaptıkları bir çalışmada, $0.5 \pm 0.1\mu\text{m}$ vezikül büyüklüğüne sahip, soya fosfatidilkolin:kolesterol:stearik asitten (4:5:1) oluşan ve iopromid taşıyan lipozomlar hazırlamışlardır. Yaklaşık 200 g ağırlığında dişi sıçanlara $100\text{-}500\text{ mg.kg}^{-1}$ iyot dozda, tavşanlara ise $150\text{-}400\text{ mg.kg}^{-1}$ iyot dozda lipozom enjekte edilmiştir. Sonra CT ile bu hayvanların KC' leri incelenmiştir. KC' deki yoğunluk artışının lipozomun enjeksiyonundan hemen sonra başladığı ve izlenen 90 dakikalık periyod boyunca devam ettiği gözlenmiştir. Klinik yönden anlamlı CT değeri olan 30 HU (Hounsfield Unit)' ne sıçanlarda 200 mg.kg^{-1} iyot doz ile, tavşanlarda ise 150 mg.kg^{-1} iyot doz ile ulaşıldığı bildirilmiştir. Araştırmacılar, sıçan ve tavşanlar arasındaki bu farklılığın, hayvanların KC kan akışındaki ya da KC ağırlıklarındaki farklılıktan kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (43).

Seltzer ve ark. yaptıkları bir araştırmada yumurta lesitini:kolesterol:stearilamin (4:1:1) bileşimine sahip diatrizoat içeren veziküller hazırlamışlardır. Bu lipozomların sıçanlara uygulanmasını takiben CT' de kan, KC, dalak, böbrek ve tümör çevresindeki kontrast artışını izlemişlerdir. Aynı zamanda karşılaştırma yapmak amacıyla bir başka sıçan grubuna da serbest Renografin enjekte edilmiştir (39). Lipozomların i.v. uygulamasını takiben kan yoğunluğu hemen başlamış ve gecikmeksizin pik değerine ulaşmıştır. Abdominal aortun maksimal yoğunluğu $122 \pm 25 \Delta HU$ dir. Bu değer kademeli olarak azalmış, 1.saatte $99 \pm 33 \Delta HU$ ' ne ulaşmış ve 24 saatte temel çizgiye ulaşmıştır. Abdominal aortik CT değeri 5dk. içinde maksimum değerine $26 \pm 16 \Delta HU$ ' ni bulmuştur. Kalpteki kanda da benzer kontrast artış görülmüştür. 10. dk. da kalpteki kanda liposomal diatrizoat ile görülen yoğunluk serbest diatrizoat ile elde edilenden 3.9 kez daha fazladır (39). KC ve dalağın kontrast artışı da enjeksiyondan hemen sonra başlamıştır. KC' de maksimum CT değerine ($70 \pm 3 \Delta HU$) 5.dk. da, dalakta ise maksimum CT değerine ($159 \pm 94 \Delta HU$) 30.dk. da ulaşılmıştır. Her iki organda da bu değer kademeli olarak azaldıktan sonra 1-2 gün içersinde temel çizgiye ulaşmıştır. Lipozomal diatrizoat ile elde edilen artış serbest diatrizoat ile elde edilenden hem daha fazla hem de daha uzun sürelidir. Tümör çevresinde de kontrast artışı hemen başlamıştır. 20 dk. içinde max. CT değeri olan $52 \pm 14 \Delta HU$ 'ne ulaşılmıştır. Daha sonra bu değer kademeli olarak azalmıştır. Serbest diatrizoat ile az bir artış görülmüştür (39).

CT ile yapılan bir diğer çalışmada Ryan ve arkadaşları yumurta lesitini : kolesterol (2:1) bileşiminde LUV' ler hazırlamışlardır. Diatrizoat yüklü veziküllerin i.v. enjeksiyonundan sonra abdominal CT ile izlenmiş ve dalak, KC görüntüleri alınmıştır (44). Dalağın görüntüsü enjeksiyonu izleyen 5.dk.' da yüksek artış göstermiş, ilk 15dk. hızlı bir yükselme, takip eden 45 dk. da yavaş bir yükselme gözlenmiştir. Artışın doza bağlı olduğu anlaşılmıştır. Artış $mg.kg^{-1}$ başına $2.27 \pm 0.21 \Delta HU$ olarak bulunmuştur. KC' deki görüntü artışlarında da benzer zaman süreci izlenmiş fakat daha düşük bir maksimum elde edilmiştir. Enjeksiyondan sonra 60. dk. da maksimum bir artış gözlenmiş takip eden saatlerde organ yoğunluğu kademeli olarak azalmış 24 saat sonra temel çizgi elde edilmiştir (44).

Ultrason ile görüntüleme; kontrast ajanlı ya da ajansız US (ultrason)' un, radyoloji alanında kullanımı hızla artmaktadır. Kontrast artırıcı bileşikler 20 yıldan fazla zamandır bilinmesine rağmen ticari olarak kullanılabilenlerin sayısı oldukça azdır. Echovist®, galaktoz mikropartikülleri, piyasadaki ilk kontrast ajandır. US' da kullanılan ajanların istenen etki mekanizması, incelenen organın echogenisitesini değiştiren küçük gaz balonlarının yüzeyinde US' nun saçılmasıdır. Buna göre kullanılan ajan bu geri saçılımın miktarını artırarak ya da azaltarak değiştirmelidir (34). Ancak bu mikro balonların kullanımlarını sınırlayan özellikleri, enjeksiyondan sonraki düşük stabiliteleridir.

Azot hapsedilmiş lipozomlar (Aerosomes) US görüntülemeye vasküler kontrast ajan olarak tanımlanmıştır. Fosfatidilkolin veziküllerinin üç aydan fazla zaman stabil olduğu rapor edilmiştir (34).

MR görüntüleme; güçlü, homojen manyetik alana dokunun yerleştirilmesi ile yapılır. Radyofrekans enerji uygulanır ve doku içinde uyarılmış atomların eski haline dönmesi sırasındaki sinyaller ölçülür. Genel olarak görüntüleme doku içine dağılmış protonların yansıması ile elde edilir (45).

MR kontrast ajanlar lokal manyetik çevreyi, hedef dokunun manyetik alana ve uygulanan radyofrekans pulse'a olan cevabını değiştirirler. MR kontrast ajanların etkinliği; incelenen dokunun MR parametrelerini değiştirebilme yeteneğine bağlıdır. MR parametreleri: “çekirdek spin dansitesi”, “longitudinal” relaksasyon zamanı ve “transvers” relaksasyon zamanıdır (42).

MR kontrast ajanlar; demir içeren bileşikler, paramagnetik elementler (Gd (gadolinium), manganez v.b.), serbest radikaller ya da çiftleşmemiş elektron taşıyan maddelerdir (46, 47).

En çok çalışılan MR ajanları, paramagnetik maddelerin suda çözünen şelatlarıdır. Çünkü özellikle, Gd yedi tane çiftleşmemiş elektrona sahiptir. Bu nedenle MRI da kullanım için çok uygun görülmektedir. Ancak serbest Gd iyonları son derece toksiktir ve bu nedenle kontrast ajan olarak kullanıma uygun değildir. Şelat ajanı ile metal iyonunun toksisitesi azaltılabilir. Bunlardan biri olan Gd-DTPA ile hastalarda çalışılmış ve özellikle beyin görüntülenmesinde güvenli ve etkili bulunmuştur (42).

Aşağıdaki parametreler değiştirilerek lipozom içine hapsedilmiş bu ajanların biyodağılımlarını ve etkilerini değiştirmek mümkündür (34).

- ◆ lipid bileşimi
- ◆ büyüklüğü
- ◆ yüzey yükü
- ◆ lipid miktarı /konsantrasyonu
- ◆ injeksiyon yolu
- ◆ injeksiyon oranı

Trubetskoy ve Torchillin (48) lenf nodüllerinin MR görüntülenmesinde kullanılan paramanyetik iyon içeren lipozomların performansını artırmak için yeni bir yaklaşım olarak değişik polimerlerle lipozom yüzeyinin değiştirilmesini düşünmüşlerdir. Yapılan çalışmada , kaplanmamış, dekstranla ve PEG (polietilen glikol) ile kaplanmış lipozomlar s.c. (subkütan) uygulanmış, bunların lenf nodüllerindeki MR sinyalleri karşılaştırılmıştır. Değişik polimer ile modifiye edilmiş Gd içeren lipozom preparatlarının s.c. uygulanmasından sonra tavşanlarda kürek kemiği altı ve koltuk altı lenf nodüllerindeki MR sinyalleri yoğunluğunun kinetiği incelenmiştir (48). Kaplanmamış lipozomlarla her iki nodülde de sinyal de çok az bir artış görülmüştür. Doku / nodül oranı 80. dakika sonunda 1.5 civarındadır. Dekstran ile kaplanmış lipozomların koltuk altı nodüllerinde birikimi de çok farklı değildir. Fakat kürek kemiği altı nodüllerinde belirgin bir artış görülmüştür. PEG ile kaplanmış Gd içeren lipozomlar ile her iki nodülde de hızlı ve etkili bir MR sinyal artışı görülmüştür. PEG ile kaplanmış Gd içeren lipozomların uygulanmasından sonraki dakikalar içinde lenf nodülleri görünür hale gelmiştir (48).

Radyonüklidik görüntüleme; radyoaktif maddenin doku içinde dağılımına dayanır. Avantajlarından biri dokuya özgü radyoaktif izleyici kullanılabilmesidir (42).

MRI ve radyonüklidik görüntülemede lipozomların kullanılması arasındaki temel fark görüntü için gerekli olan dozdur. MRI' da kg başına μmol hatta mmol miktarda paramagnetik bileşikler gerekirken, radyonüklidik görüntülemede sadece radyoaktif maddenin izleyici miktarı yeterlidir. Radyonüklidik görüntülemede radyoizotoplar ya saf tuz ya da şelat olarak kullanılır. Absolü doz çok düşük olduğu

için serbest metal iyonunun toksisitesi önemsizdir ve bu nedenle kompleks oluşturmak gerekmez. DTPA, EDTA, NTA (nitriloasetik asit), HMPAO (hekzametil propilamin) ve polimerlerle kompleks oluşturulabilir. İzotopun lipozom içine hapsedilmesi yeterlidir. En çok kullanılan izotoplar ve özellikleri Tablo 2 'de verilmiştir (34).

Tablo 2: Radyonüklidik Görüntülemelerde En Yaygın Olarak Kullanılan İzotoplar ve Özellikleri (34).

RADYONUKLİD	YARI ÖMRÜ	ENERJİSİ (MeV)
^{68}Ga	68.3 dakika	0.511
^{111}In	2.8 gün	0.245
^{123}I	13 saat	0.167
$^{99\text{m}}\text{Tc}$	6.0 saat	0.141

Lipozomlar, RES dokularına radyoaktif materyalin pasif olarak taşınmasını sağlarlar ya da RES dışında diğer bölgelerde birikmesini sağlarlar. İzleyicinin ilgisini RES organlardan başka organlara çevirebilirler. Bu, radyoaktif işaretli vezikülün büyüklüğü, yükü, lipid içeriği, dozu yüzey karakteristikleri ve ilave edilen fonksiyonel gruplar değiştirilerek sağlanabilir (42).

Khar ve ark.ları (9) genel olarak böbrek imajlamada tercih edilen bir radyofarmasötik olan $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GHA (glutatyon) içeren değişik yüzey yüklü (nötral, negatif, pozitif) lipozomlar hazırlamışlardır. Lipozomlar deterjan dializ yöntemiyle hazırlanmıştır ve hazırlanan lipozomların formülasyonları ; PC:Chol (7:2) (nötral) PC:Chol:SA (7:2:1) (pozitif), PC:Chol:DCP (7:2:1) (negatif)' tir. Ajanın organ seçiciliği; lipozoma hapsedilmiş ilaç ile serbest ilacın fare ve tavşanlara enjeksiyonuyla incelenmiştir. Bunun için biyodağılım, kan klerensi ve sintigrafi çalışmaları yapılmıştır. Ayrıca ajanın vezikül içine hapsedilmesinin yarı ömür üzerine etkisi araştırılmıştır (9). Biyodağılım çalışmasında; serbest $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -GHA' nun ve nötral, pozitif, negatif yüklü

lipozomlara hapsedilmiş olan $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' nun biyodağılımları farelerde incelenmiştir. 2-3 aylık ağırlıkları 24-30g arasında olan 12 fare 4' erli 3 gruba ayrılmıştır. Hepsine 5 μCi diagnostik ajan enjekte edilmiş ve 3 gruptaki fareler enjeksiyondan sonraki 30.dk., 3. saat ve 18. saatte öldürülmüştür. Farelerin KC, dalak, AC (akciğer), kalp, böbrekleri ve mideleri çıkarılmış, kanları alınmıştır. Her organın radyoaktivitesi % radyoaktivite / g organ olarak hesaplanmıştır.

Serbest $^{99m}\text{Tc-GHA}$ fiziksel, kimyasal özelliklerinden dolayı böbrekte toplanmıştır. 30.dk. da % 37.4' ü böbrekte toplanmış sonra bu değer hızla düşmüş 18. saatte % 5.7' si kalmıştır. Negatif yüklü SUV' e hapsedilmiş $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' nun %20.6' sı 30.dk.da KC' de toplanmıştır. 3.saatte az bir azalma olmuş ve 18.saatte bu değer %13.5' e düşmüştür. Kanda 30.dk. da % 9' ü görülmüştür. 18.saatte % 1.1' i azalmıştır. Diğer organlarda da 30. dk. dan 18. saate kadar sürekli bir azalma görülmüştür. Nötral lipozomlara hapsedilmiş $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' nun % 17.7' si 30.dk.da KC' de görülmüştür. 18.saatte bu değer % 7.7' e düşmüştür. Pozitif lipozomlarla 30. dk da KC' de minimum aktivite (% 15.8) görülmüştür (9).

Biyodağılım çalışmalarının sonuçlarını doğrulamak ve radyodiagnostik ajanın KC ve diğer dokulara hedeflendirilmesinde görsel bir kanıt elde etmek için sintigrafi çalışması yapılmıştır. Bu amaçla gama kamera kullanılmış. Yaklaşık 100 μCi diagnostik ajan tavşanın kulak veninden enjekte edilmiş ve 90 dk sonra görüntüleme yapılmıştır. SUV içine hapsedilmiş ajan KC' de toplanmış iken serbest $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' nun böbreklerde toplandığı görülmüştür (9).

Kan klerensi çalışmaları serbest $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ile negatif yüklü lipozoma hapsedilmiş olan $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ile tavşanlarda yapılmıştır. 5, 15, 30 dk., 1, 2, 3, 4 ve 24. saatlerde 1 ml kan örneği alınmış her örneğin radyoaktivitesi ölçülmüştür. Kan örneklerinde plazma ve KKH (kırmızı kan hücre)' leri ayrılmıştır. $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' nun kan klerensi 30. dk. da % 25' lik bir maksimum değere ulaşmış ve 1. saat sonunda ani bir düşüş gözlenmiştir. Plazma ve KKH aktiviteleri arasında önemli bir fark görülmemiştir.

SUV içine hapsedilmiş $^{99m}\text{Tc-GHA}$ ' un kan klerensinde 30.dk. da % 27.1' lik maksimum değere ulaşmış ve bu değer 24.saatte kademeli olarak % 7.1' e düşmüştür. Yine plazma ve KKH aktiviteleri arasında önemli bir fark görülmemiştir (9).

1.3. NON İYONİK SÜRFAKTAN VEZİKÜLLERİ (NISV)

Lipozomlar, ana bileşenleri fosfolipitler olduğu için hem toksik hem de allerjik değildirler. Ancak bunun yanında fosfolipidlerin düşük kimyasal stabiliteleri gibi bazı dezavantajları da vardır. Yapısında bulunan ester bağları kolayca hidrolize olabilir. Bazı çift zincirli sentetik sürfaktanların non-iyonik polar grupları ile non-iyonik lipozomlar oluşturabileceklerinin anlaşılması üzerine, lipozomlara alternatif olarak bu veziküller, non-iyonik sürfaktanlarla hazırlanmıştır ve NISV ya da niozom olarak adlandırılmıştır. NISV' lerin yapısı lipozomlara benzerdir fakat bazı avantajlara sahiptirler. Non-iyonik sürfaktanlar ana bileşenleridir. Kolayca elde edilebilirler, daha ucuzdurlar (49).

İlk NISV, alkil oksietilengliserol (tek zincirli sürfaktan) ile kolesterol karışımı kullanılarak hazırlanmıştır. En çok kullanılan tek zincirli sürfaktanlar, poligliserol mono alkil eterleri ve onların polioksilat analoglarıdır (3).

Non-iyonik sürfaktanlar genellikle doymuş alkil zincirli sürfaktanlardır. Değişik sentetik lipitler NISV' ler için kullanılır. Handjani-Vila tek zincirli non-iyonik sürfaktanlarla kolesterol kullanılarak bu veziküllerin oluştuğunu bildirmişlerdir (50). Okahata ve ark. polioksietilen eter sürfaktan grubunun kullanılabileceğini rapor etmişlerdir (51).

Eterik sürfaktanlar dialkil zincirli veya monoalkil zincirli olabilir. Dialkil zincirli olanlar diğerinden daha yüksek hapsedme kapasitesine sahiptir. Esterik sürfaktanlar eteriklerden daha az stabildir. Öte yandan daha az toksiktir (49).

1.3.1. NISV' LARIN HAZIRLAMA METODLARI

Hazırlama metodu elde edilen NISV' ların tabaka sayısını, büyüklük ve büyüklük dağılımını, sulu fazın hapsedilme kapasitesini ve membranın geçirgenliğini

değiştirdiği için istenilen amaca göre hazırlama yöntemi seçilir. Çoğunlukla lipozomlarla benzer metodlar ile hazırlanırlar. Değişik homojenizasyon ve mikrofluidizasyon yöntemleri kullanılarak kozmetik ürünler için değişik kalitede dispersiyonlar hazırlanır (3).

Başlıca hazırlama yöntemleri:

- ◆ Eter enjeksiyon metodu (52).
- ◆ Film metodu (52).
- ◆ Sonikasyon (52).
- ◆ Handjani-Vila metodu (50).
- ◆ Ters faz buharlaştırma metodu (53-55).

I.3.2. RADYOPAK NISV' LAR

Kontrast ajan içeren NISV' larla yapılmış çalışmaya literatürde rastlanmamıştır. Bizim yaptığımız çalışma, bu alanda yapılmış ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

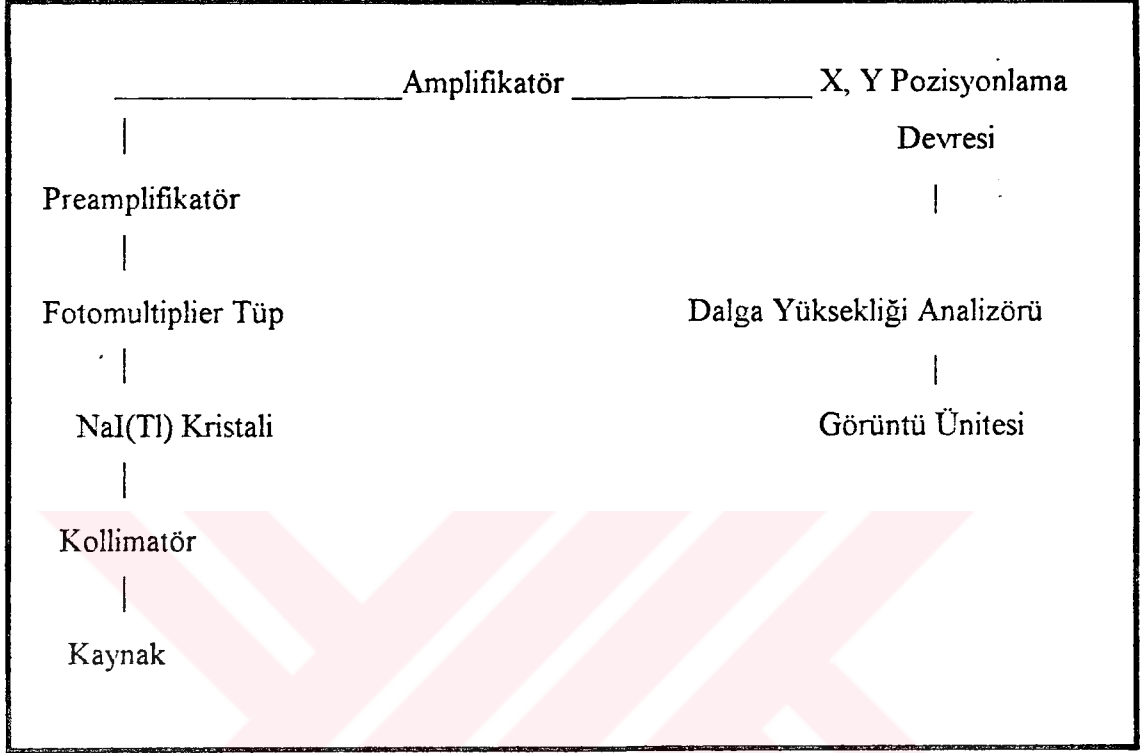
I.4. GÖRÜNTÜLEME YÖNTEMLERİ

Hem nükleer tıp hem de radyoloji alanında değişik görüntüleme yöntemleri kullanılmaktadır (ör: CT, MRI, US, sintigrafi, SPECT). Biz çalışmalarımızda, bu yöntemlerden sintigrafi ve CT görüntülemeyi kullandık.

I.4.1. SİNTİGRAFI

Günümüzde, γ ışını dedeksiyon aletleri ya da sintilasyon kameraları yaygın olarak nükleer tıpta kullanılmaktadır. Bu aletlerin hepsi γ ışını dedeksiyon ünitesi ve bunun yanında kolimatör, NaI(Tl) dedektörü, fotomultiplier tüp, preamplifikatör, amplifikatör, dalga yüksekliği analizörü ve görüntü kaydedici ünitelerden oluşur (Şekil 6). Temel prensibi; kaynaktan gelen γ ışınları NaI(Tl) dedektörü ile etkileşir ve hafif fotonların emilimine dayanır. Fotomultiplier tüpün toplayıcı katoduna vuran ışın bir

puls (cevap) oluşturur. Puls önce preamplifikatör sonra lineer amplifikatör ile yükseltilir. Puls yüksekliği analizörü istenen enerjideki γ ışınını ayırır. Bilgi daha sonra görüntüleme ünitesine ulaşır ve görüntü oluşur (48).



Şekil 6 : Bir Sintilasyon Kamerasını Oluşturan Temel Kısımlar (48).

1.4.2. TOMOGRAFİK GÖRÜNTÜLEME

Sintilasyon kamerasının temel kısıtlaması iki boyutlu görüntüleme ile üç boyutlu dağılan aktivitenin görüntülenmesidir. Bu problemi ortadan kaldırmak için bir yol, hastanın değişik açılardan (anterior, posterior, lateral) görüntüsünü almaktır. Ancak yine de, incelenen organın etrafındaki yapının kompleksliği nedeniyle bu tekniğin başarısı sınırlıdır. İncelenen objenin derinliğini de tasvir etmek için tomografik tarayıcılar geliştirilmiştir. Bunlardan biri olan CT 'ler ayrı ayrı kesitler halinde objeyi inceler ve görüntüyü yeniden oluşturur (48).

I.5. RADYOAKTİF MADDE İLE İŞARETLEME VE DAĞILIM

Yapılan araştırmalarda lipozom ve NISV' lar i.v. uygulama sonrası nerede lokalize olduğunu kolayca takip edebilmek için radyoaktif olarak işaretlenir ve sonrasında biyodağılımları incelenir. Bu çalışmalar sayesinde, bu taşıyıcı veziküllerin etkinlik ve faydasını anlamak mümkün olur.

Bu amaçla ratlara i.v. enjeksiyonla ^{99m}Tc ' la işaretli radyopak lipozom ve NISV' ler uygulanarak ve belli zaman aralıklarında öldürülerek görüntülenmenin ne derece iyi olduğu saptanır (56).

Sözü edilen işaretleme çalışmalarında kullanılmak üzere çok çeşitli radyonüklidler geliştirilmiştir. Nükleer tıpta β -yayıcılarının kullanımı tedaviyle sınırlandırılmıştır. γ -yayıcılar sintigrafik çalışmalarda tercih edilir. Bu radyonüklitler içinde fiziksel yarılanma ömrü (6 st), enerjisi (140 keV), monokromatik γ -yayıcısı oluşu gibi nedenlerle ^{99m}Tc en popüler olanıdır (56).

I.5.1. Tc' UN KİMYASI VE ^{99m}Tc İLE İŞARETLEME YÖNTEMLERİ

^{99m}Tc ' un elde edildiği ana nüklid olan ^{99}Mo yüksek akım reaktöründe nötron bombardımanı sonucu ^{235}U ' un füzyonu ile elde edilir. ^{99}Mo ' den radyoaktif dönüşüm ile nükleer tıpta en çok kullanılan “metastable izotopu” olan ^{99m}Tc (yarı ömrü 6 saat), onun da dönüşümü ile yarı ömrü 2.1×10^5 yıl olan ^{99}Tc elde edilir.

Tc, periyodik cetvelde VIIB grubunda yer alan geçiş elementlerine ait metalik gümüş renkte, erime derecesi 2160°C ve atom numarası 43 olan bir elementtir. Doğada stabil izotopları yoktur.

Tc bileşiklerinin -I den +VII ye kadar oksidasyon kademeleri vardır. Bu kademeler 4d ve 5s orbitallerinden elektron kaybı ya da 4d orbitaline elektron kazanılması ile oluşur. Oksidasyon kademelerinin stabilizasyonu ligandlara ve kimyasal ortama bağlıdır. +VII oksidasyon basamakları en fazla stabil olan şeklidir ve oksit, sülfat ve perteknetat içinde bulunur. -I, +I, +II, +III, +IV ve +V okside şekilleri ligandlar ile

kompleks oluşturarak stabil duruma geçerler (56, 57).

Çok geniş kullanılan bir radyonüklid olan ^{99m}Tc ' un sağladığı avantajlar (58):

* Fiziksel yarılanma ömrünün, radyofarmasötiklerin hazırlanması ve rutinde kullanımında görüntüleme için ihtiyaç duyulan süreye uygun olması,

* Sadece γ radyasyonu olması, partiküler karakterde radyasyonu içermemesi,

* Hastaya verdiği radyasyon dozunun az olması,

* $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ jeneratöründen serum fizyolojik içinde elde edilen $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'ın kullanıma hazır olması,

* -I den +VII ye kadar oksidasyon basamaklarının olması ve değişik koordinasyon geometrisinin olması,

* γ enerjisinin günümüzde kullanılan kameralar için optimum düzeyde olması.

Günümüzde, birçok ^{99m}Tc ile işaretli görüntüleme ajanı yaygın olarak kullanılmaktadır, fakat biyokimyasal ve fizyolojik fonksiyonları izleyebilmek için yeni ^{99m}Tc -radyofarmasötiklerinin geliştirilmesine ihtiyaç vardır.

Radyofarmasötik olarak kullanılacak ^{99m}Tc -komplekslerinin sentezi şu şartlar altında yürütülmelidir.

- Sentez düşük konsantrasyonda yürütülmelidir, genellikle 10^{-8} - 10^{-6}M (işaretlenecek madde)

- Sentez Tc (VII) ile başlamalıdır.

-Verim %95 den fazla olmalıdır.

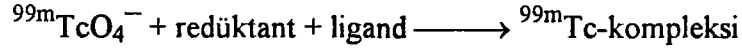
- Steril ve apirojen ortamda yürütülmelidir.

En fazla tercih edilen hazırlama yöntemi serum fizyolojik içindeki $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'ın steril şartlardaki liyofilize madde içeren flakona eklenmesidir (58).

Sentez yolları; indirgenme, ligand değişimi,

İndirgenme; Jeneratörden elde edilen ^{99m}Tc , sodyum perteknetat' dır ($^{99m}\text{Tc NaTcO}_4$). Kimyasal olarak $^{99m}\text{TcO}_4^-$ nonreaktif özelliktedir ve herhangi bir bileşiğe direkt eklenmesi ile işaretlenemez. ^{99m}Tc işaretli çoğu bileşikte, $^{99m}\text{Tc} + \text{VII}$ den daha

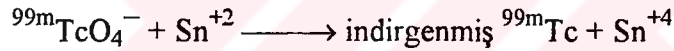
düşük oksidasyon kademesine indirilmelidir. Değişik indirgeme ajanları; SnCl_2 , kalay sitrat, kalay tartarat, konsantre HCl , Na BH_4 ve ferri sülfat. Bunlar içinde SnCl_2 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ işaretli bileşiklerin çoğunda asidik ortamda indirgenme ajanı olarak kullanılır. İndirgenmiş $^{99\text{m}}\text{Tc}$ değişik şelat ajanları ile reaksiyona girer.



Şelat ajanları genel olarak birçift elektron vererek $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile kovalent bağlanır. $-\text{COO}^-$, $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$ ve $-\text{SH}$ kimyasal grupları DTPA, glusesptat ve değişik proteinler gibi bileşiklerdeki elektron vericilerdir.

Reaksiyon şartları yüksek radyokimyasal verim alınacak şekilde ve Tc hidrolizi ve $\text{Tc}(\text{OH})_4$ ya da TcO_2 gibi kolloid oluşumu engellenecek şekilde optimize edilmeli.

Ligand değişimi; Sulu ortamda zayıf bir ligand ile $^{99\text{m}}\text{Tc}$ kompleksi oluşturulur daha sonra daha stabil olan ikinci bir ligand ile reaksiyona sokulur.



Glikonat, tartarat, sitrat ve EDTA zayıf özellikte ligandlardır. İsonitril ve N_2S_2 grupları güçlü ligandlardır.

Tüm sentez yollarında yüksek radyokimyasal verime ulaşmak için redüktant / ligand molar oranı, pH, ısı, reaksiyon zamanı, oksijen ve bütün reaktiflerin konsantrasyonu gibi parametreler optimize edilmelidir (56).

1.5.2. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ İLE İŞARETLİ RADYOFARMASÖTİKLERİN KALİTE KONTROLÜ

Bütün ilaçlarda olduğu gibi radyofarmasötiklerde de insana verilmeden önce birtakım kalite kontrol testlerinin yapılması gerekir. Diğer ilaçlarda yapılanlara ek

olarak radyoaktiviteye bağı bir dizi testler de gereklidir. Fizikokimyasal testler arasında radyokimyasal, radyonüklidik saflık, pH, iyonik güç ve radyoaktivite tayini sayılabilir (59). Biyolojik testler arasında ise sterilite, apirojenite ve toksisite testleri sayılabilir.

Kromatografi:Radyokimyasal saflığı tayinde kullanılan kromatografik yöntemler basit ve hızlı bir kalite kontrol yöntemidir. Kağıt, ITLC (Instant Thin Layer Kromatografi) veya ITK (ince tabaka kromatografisi) kullanılarak % 0.9 NaCl çözeltisi ile orjinde kalan ^{99m}Tc işaretli partiküller, organik solvan (metil alkol, metil etil keton, aseton v.b.) kullanılarak da solvent fronta giden perteknetat varlığı kontrol edilir. Partiküler karakterdeki radyofarmasötiklerde ACD (asit sitrat dektroz) ile hem serbest hem de hidrolize Tc varlığı kontrol edilir. Herikisi de ACD de solvent fronta gider (60).

^{99m}Tc -DTPA preparatında olduğu gibi, preparat fazla miktarda su ya da serum fizyolojik ile dilüe edildikten sonra ^{99m}Tc işaretli küçük moleküller hidrolize ve okside olurlar. Dilüsyondan önce 1 mL %1 insan serum ilavesi ile bu problem çözülebilir. Tc-radyofarmasötiklerinin proteinlere bağlanması dilüsyondan sonra ^{99m}Tc -kompleksinin stabil kalmasını sağlar. ^{99m}Tc işaretli antikor preparatlarındaki perteknetat miktarını kontrol etmek için silikajel ya da kağıtla birlikte trikloro asetik asit çözeltisi kullanılır. Bu test uygulamadan önce her preparat için rutin olarak yapılır (57).

Sterilizasyon ve Sterilite Testi: Suda çözünen ve partiküler yapıda olmayan radyofarmasötiklerin sterilizasyonu membran filtrasyonu ile yapılır. Çoğu ^{99m}Tc bileşikleri, Tc perteknetat ve ^{99m}Tc -sülfid ya da antimon sülfid hariç, sıcakta stabil değildirler ve bu nedenle sterilizasyonu için otoklav kullanılmaz.

Yağda çözünen bazı moleküller selüloz-poliasetat membran filtre tarafından tutulabilir: Bu durumda az miktarda deterjan membrana adsorpsiyonu önlemek için eklenir.

Sterilite testinde bakteri ve mantar varlığı kontrol edilir. FDA' ya göre radyofarmasötiklerin sterilite testi, değişik ortamlarda 30-37 °C de 7-14 gün inkübasyona bırakılarak yapılır. Bu testler birkaç gün sürdüğü için kısa yarı ömürlü radyofarmasötiklere bu test radyoaktif parçalanmadan sonra uygulanır. Aynı zamanda tüm kitler ve reaktifler için de bu test uygulanır (57).

Apirojenite Testi: Pirojenler, gram negatif bakterilerden oluşan lipopolisakaritlerdir ve membran filtrasyonu sırasında suda çözünür bileşik olan ^{99m}Tc -kompleksi ile beraber pirojenin major fraksiyonları da filtre edilir. Tavşan testi hassas bir yöntem olmaması yanında pahalı ve uzun zaman gerektiren bir testir. LAL (limulus amebosit lisatı) ile pirojenite testi ise kolay ve çabuk uygulanan bir testtir. LAL reaktifi steril su ve E.coli endotoksinini içeren kit halinde bulunur.

Yöntem; 0.1 ml örnek, 100 U endotoksin ve LAL çözeltisi 37 °C de inkübe edilir ve 60 dk. sonra tüp ters çevrilerek jel oluşumu kontrol edilir.

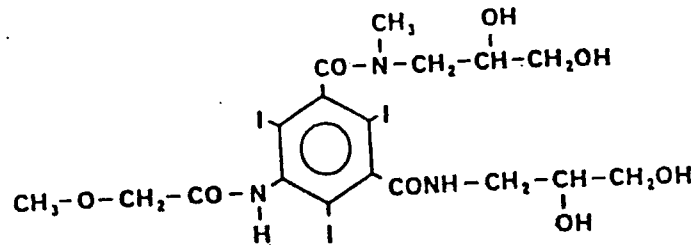
Bazı proteinler yüksek konsantrasyonlarda endotoksin olmaksızın jel oluşturur. Bu durumda, steril ve pirojensiz tampon ya da solvan ile dilue edildikten sonra düşük konsantrasyonda test uygulanmalıdır.

Endotoksin ve LAL lisatı varlığında jel oluşması için Ca iyonu gereklidir. Şelat ajanlarının ve metal şelatlarının apirojenite testi için ekstra Ca iyonuna ihtiyaç vardır. Aksi takdirde hatalı olarak negatif sonuç elde edilir (57).

I.6.IOPROMİD

I.6.1. YAPISI

Iopromid anjiyografi, bilgisayarlı tomografi ve ürografi' de kullanılan triiyodobenzen türevi radyokontrast bir maddedir. Açık formülü aşağıdaki gibidir .



İyot içeriği molekülün % 84 'üdür (2).

I.6.2. FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Molekül ağırlığı 791.1 g /mol 'dür. Beyaz renkte, kokusuzdur. Suda çok iyi çözünür. Erime Derecesi 225-228 °C civarındadır (2).

I.6.3. FARMAKOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Iopromid, non-iyonik, böbrek yolu ile itrah edilen, osmotik basıncı düşük bir röntgen kontrast maddesidir.

- İyonik kontrast maddelerine oranla daha iyi tolere edilmesi
 - İyi nöral tolerans göstermesi
 - Kalp ve dolaşım sistemine etkinliğinin az olması
 - Çok iyi endotel ve intima toleransı
 - Uygulamada ağrının az olması
 - Pıhtılaşma, fibrinoliz ve kompleman endikasyonuna düşük etki göstermesi
 - İdrar yollarında yüksek kontrast oluşumu
- Iopromid 'in başlıca özellikleridir (2, 5).

I.6.4. YAN ETKİLERİ

İyot içeren kontrast maddelerin intravasküler kullanımında ortaya çıkabilen yan etkiler genellikle hafif veya orta derecededir ve manyetik preparatlarda iyoniklere nazaran daha az ortaya çıkar. Çoğu zaman geçici bir şekilde seyretse de zaman zaman ağır ve hayatı tehdit eden reaksiyonlar görülebilir. Bulantı, kusma, deride kızarıklık, genel sıcaklık hissi ve ağrı, intravasküler uygulamada en sık rastlanan reaksiyonlardır.

Allerjik bünyeli hastalarda aşırı duyarlılık reaksiyonları daha sık ortaya çıkar. Acil girişim gerektiren ağır reaksiyonlar dolaşım sistemi ile ilgili meydana gelebilir. Bunlar perifer vazodilatasyon, bunu takip eden kan basıncı düşmesi, refleks taşikardi, nefes darlığı, siyanoz şeklinde kendini gösterir (2).

1.6.5. FARMAKOKİNETİĞİ

İntravasküler uygulamayı takiben, Iopromid hızla ekstraselüler alanda dağılır. Iopromid kan beyin engelini aşamaz ancak plasentadan (tavşan) az miktarda geçebilmektedir. Plazmada ml başına 1.2 mg I konsantrasyonunda plazma proteinlerine bağlanma oranı % 0.9 $\pm$ 0.2 'dir. Yarılanma ömrü 3 dk. olan ilk hızlı dağılımdan sonra eliminasyon, böbrek fonksiyonu normal olan hastalarda uygulanan doza bağlı olmaksızın yaklaşık 2 saatlik bir yarılanma ömrü ile gerçekleşmektedir. Diagnostik amaçlar için tavsiye edilen dozlarda, Iopromid tümüyle glomerüler filtrasyonla itrah edilir. Renal itrah, enjeksiyondan 3 saat sonra yaklaşık %60 ve 24 saat sonra %92 dir. Geçerli klinik dozların uygulaması sonucu insanda Iopromid' in metabolitlerine rastlanmaz (2, 5).

1.6.6. KULLANILIŞ ALANLARI

Bilgisayarlı tomografide kontrastı artırmak amacı ile dijital substraksiyon anjiyografisi, intravenöz urografi, myelografi, ventrikülografi ve sisternografi dışında vücut boşluklarının radyolojik tetkiklerinde kullanılır.

1.6.7. TOKSİSİTESİ

Dawson ve ark. toksisite değerlendirmesi için parametre olarak, proteinlere bağlanma, serum enzim (kolinesteraz) kompleksi inhibisyonu ve kogülasyon üzerindeki yan etkilerini seçmişlerdir (5).

Proteinlere bağlanma; 37 °C de 4 saat PTFE hücreleri kullanılarak insan serumu kontrast madde-tampon karışımına karşı diyaliz edilmiş ve kontrast madde konsantrasyonu spektrofotometrik olarak ölçülmüştür.

Kolinesteraz inhibisyonu; insan serum kolinesteraz (pseudokolin esteraz kompleksi) kullanılarak ölçülmüştür. Substrat olarak propionil tiyokolin iyot kullanılmıştır. Kolinesteraz hidroliz ile propiyoniltiyokolini propiyonik asit ve

tiyokoline; Tiyokolin 'de 5,5-ditiyo bis (2-nitro benzoik asit) ve sarı renkli 2-nitro benzoik asite dönüşür. Oluşan sarı rengin şiddeti 405 nm de ölçülmüş ve kolin esteraz aktivitesi hesaplanmıştır.

Koagülasyon üzerine etkisi de trombin ve reptilaz zamanına etkisi ile ölçülmüştür. Sitrazsız kan 2000 rpm de 10 dk. santrifüjlenmiş ve çökelek bir tüpe alınmıştır. 1 mL plazma üzerine kontrast maddeden 10, 20, 30 mg /mL olacak şekilde eklenmiştir. Tüpler 37 °C de 30 dk. inkübe edilmiş ve trombin ve reptilaz zamanı ölçülmüştür.

Tüm bu deneyler Iopromid, Iopamidol (düşük osmolaliteye sahip non-iyonik kontrast madde), sodyum iothalamat (konvansiyonel kontrast madde), sodyum meglumin ioksogalat (düşük osmolaliteye sahip iyonik kontrast madde) için yapılmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Iopromid ve Iopamidol ile elde edilen sonuçlar birbirine paralel bulunmuştur. Kolinesteraz inhibisyonu, yüksek konsantrasyonlarda sodyum iothalamat, meglumin ioksogalatın, etkisinden önemli derecede az bulunmuştur (5).

II. DENEYSEL

II.1 ARAÇ VE GEREÇLER

II.1.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Amberlit	Merck
1-amino-2-naftol-4 sülfonik asit	Merck
Amonyak	Merck
Amonyum molibdat.4H ₂ O	Merck
Aseton	Merck
Butanon	Merck
n-butanol	Merck
Dialkil poli-(7)-gliserol eter (Süpfaktan I)	L'Oreal
Dioksan	Merck
Disodyum hidrojen fosfat.2H ₂ O	Merck
Distearil fosfatidil kolin (DSPC)	Nattermann GmbH
Fosfatidil kolin (PL100)	Nattermann GmbH
Hekzadesil poli-(3)-gliserol (Süpfaktan II)	L'Oreal
Hidroklorik asit	Merck
Iopromid	Schering
Isoton çözeltisi	Coulter Electronics
Kalay II klorür (SnCl ₂ . 2H ₂ O)	Merck
Kloroform	Merck
Kolesterol	L'Oreal
Metil etil keton	Merck
Perklorik asit	Riedel De Haen AG
Potasyum dihidrojen fosfat	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum piro sülfid	Merck
Sodyum sülfid	Riedel De Haen AG
Stearilamin	Sigma Chemical Co.
Sülfürik asit	Merck
Tris	Merck
Triton X-100	Sigma Chemical Co.
Ultravist-370	Schering

Diğer kimyasal maddeler analitik saflıkta kullanılmıştır.

II.1.2. KULLANILAN ALETLER

Banyo sonikatör
Bilgisayarlı tomografi
Erime derecesi tayin aleti

Extrusion unit
Gama sayacı
Gama sayacı
FT-IR spektrofotometre
Isıtma bloğu
ITLC-SG plakaları
NMR
Osmometre
Partikül büyüklüğü ölçme aleti
pH-metre
Polarizan mikroskop
Polikarbonat filtre
Rotavapor
Silikagel 60 F₂₅₄ plakları
Spektrofotometre
Spektrofotometre
^{99m}Tc/Mo jeneratörü
Ultrasantrifüj
Ultrasantrifüj
UV lamba
Vakumlu etüv
Viskometre
Vorteks
Yüzey gerilim ölçme aleti

Branson 220
Phillips Tomoscan 350
Thomas Hoover Kapillary Melting Point
Apparatus
Milipore
Berthold Model BF 5300
Wallac, Model 1480 Wizard
Perkin Elmer 1720 X
Nüve
Gelman Sci.
Bruker 400 MHz FT-NMR
Halbmikro Knaver
Coulter Multisizer II
Sesa Model 1400
Nikon, Japan
Nucleopore
Buchi 461
Merck
Shimadzu UV 160 A
Hitachi 220S
Amersham
Sorvall
MLW K24
Camag
Gallenkamp
Brookfield
Nüve
Fisher Surface Tensiometer Model 20

II.2. YÖNTEMLER VE DENEYLER

Bu bölümde araştırmamızda kullanılan yöntemler ve deneyler, etken madde (iopromid) ve lipozom ve NISV hazırlamada kullanılan maddelerin kimyasal ve fizikokimyasal özellikleri üzerinde incelemeler, lipozom ve NISV formülasyonları, lipozom ve NISV 'ların hazırlanması ve özelliklerinin tayini, lipozom ve NISV' ların uygulanmasıyla in vivo dağılımları gibi özellikler, ilgili başlıklar altında incelenmiştir.

II.2.1. IOPROMİD' İN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER

II.2.1.1. IOPROMİD' İN STANDARDİZASYONU

Çalışmalarımızda etken madde olarak Iopromid (Iopromid-saf)' in ticari preparatı olan Iopromid-U (Ultravist) kullanılmıştır. Referans alınması gerekli durumlarda (ör: IR spektrumu, İTK) Iopromid kullanılmıştır.

II.2.1.1.1. IR SPEKTRUMU

Iopromid (saf) ve Iopromid-U' nun IR spektrumu 4000-400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında potasyum bromür diskler kullanılarak çekilmiştir.

II.2.1.1.2. IOPROMİD VE İOPROMİD -U 'NUN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ (İTK) İLE TANINMASI

Bir mL Iopromid -U 20 mM Tris (pH7.4) Tamponu ile 10 mL' ye seyreltilerek İTK ile tayini yapılmıştır. Kullanılan 0.25 mm kalınlığında silikagel 60F₂₅₄ ile kaplanmış plaklar etüvde 110 °C de 60 dakika aktive edilmiştir. Kurutulan plaklara çözeltiden yaklaşık 10-15 μ L tatbik edilmiş ve kurutulduktan sonra Dioksan:Su:Amonyak (85:15:4) çözücü sisteminde 10 cm sürüklenmeye bırakılmıştır. Plaklar tekrar kurutulup UV lambasında 254 nm'de lekeler belirlenmiş ve Rf değerleri saptanmıştır. Aynı

işlemler, Iopromid-U ile eşit konsantrasyonda çözeltisi hazırlanarak Iopromid için de yapılmıştır (2).

II.2.1.1.3. UV SPEKTRUMU

Iopromid-U' nun molar çözeltileri hazırlanarak iki değişik çözeltide UV spektrumları alınmıştır.

a) Birinci spektrum, lipozom ve NISV' lerde tutulmayan serbest Iopromid miktarını saptamada kullanılmak üzere 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda 200-500nm aralığında çekilmiştir.

b) Lipozom ve NISV' larda içte tutulan etken madde miktarınının tayininde kullanılmak üzere % 2.5 (a/a) Triton X-100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda 200-400 nm aralığında ikinci spektrum çekilmiştir.

c) Bu iki spektrumdan başka, lipozom ve NISV' ların enkapsülasyon hacmini tayin etmek için fluorescein sodyum' un 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda ve %2.5 (a/a) Triton X-100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda iki ayrı spektrumu çekilmiştir.

d) Ayrıca, lipozomal fosfolipitlerin miktarı ve verimini tayin edebilmek için mL 'sinde 1.2 µg fosfor içeren fosfolipit çözeltisi kullanılarak 700-900 nm aralığında spektrum alınmıştır.

II.2.1.1.4. STANDART DOĞRU

Iopromid-U için 2 ayrı standart doğru hazırlanmıştır.

a) Birinci doğru, lipozom ve NISV' lardaki serbest (tutulmayan) etken madde miktarını hesaplamak için 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ile hazırlanmıştır.

b) İkinci standart doğru, lipozom ve NISV' larda içte hapsedilen etken madde miktarını hesaplamada kullanmak amacıyla % 2.5 (a/a) Triton X-100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ile yapılmıştır.

Bu amaçla; konsantrasyonu belli olan stok çözeltilerden yararlanılarak değişik konsantrasyonda çözeltiler hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltiler birinci standart doğru için $\lambda=243$ nm'de, ikinci standart doğru için $\lambda=298$ nm'de absorbanslar okunmuş ve standart doğrular hesaplanmıştır.

c) Lipozom ve NISV' ların enkapsülasyon hacmini saptamak için fluorescein sodyum' un 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda $\lambda=490$ nm de ve % 2.5 (a/a) Triton X-100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda $\lambda=491$ nm de standart doğrular hazırlanmıştır.

d) Ayrıca lipozomal çifte tabakadaki fosoflipitlerin içerdiği inorganik fosfor tayininde kullanılmak için her ölçümden önce $\lambda=830$ nm'de standart doğru hazırlanmıştır.

II.2.1.1.5. IOPROMİD-U' NUN OSMOTİK BASINCININ ÖLÇÜLMESİ

Ölçümler için Iopromid-U, lipozom ve NISV hazırlarken kullandığımız konsantrasyona (45 mg.mL^{-1}) 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ile seyreltilmiştir. Osmotik basınç osmometre ile ölçülmüştür. Ölçümler 27°C de yapılmıştır.

II.2.1.1.6. IOPROMİD -U' NUN pH' SININ ÖLÇÜLMESİ

Iopromid -U temiz bir beher içine konmuş ve pH-metre ile pH'sı ölçülmüştür.

II.2.1.1.7. IOPROMİD-U' NUN VİZKOSİTESİNİN ÖLÇÜLMESİ

Iopromid-U temiz bir kaba alınarak 20°C de 1 nolu LV spindle kullanılarak 60 rpm' de vizkositesi ölçülmüştür.

II.2.1.1.8. IOPROMİD' İN NÜKLEER MAGNETİK REZONANS (NMR) TEKNİĞİ İLE TANINMASI

¹H-NMR spektrumları için örnekler 5 mL' lik tüplere yerleştirilmiş ve dötöro kloroform (CDCl₃) eklenmiştir. İnternal standart olarak trimetilsilan kullanılmıştır ve spektrumları çekilmiştir.

II.2.1.1.9. IOPROMİD' İN PARTİSYON KATSAYISININ TAYİNİ

Iopromid' in partisyon katsayısı Butanol / Fosfat (pH 7.6) Tamponu sistemi içinde tayin edilmiştir.

Partisyon katsayısı aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$C = \frac{\text{Organik faza geçen miktar}}{\text{Başlangıçtaki (tampondaki) miktar}}$$

II.2.1.1.10. ERİME DERECEİ TAYİNİ

Iopromid kılcal bir tüp içine yerleştirilip erime derecesi tayin aletinde erime noktası tayin edilmiştir.

II.2.2. LİPOZOMLAR

II.2.2.1. LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER

II.2.2.1.1. FOSFOLİPİTLER

Bu bölümde fosfolipitlerin kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinden bahsedilmiştir.

II.2.2.1.1.1. FOSFOLİPİTLERİN BİLEŞİMİ

Çalışmalarımızda kullandığımız fosfolipitlerin analiz sertifikaları firmadan sağlanmıştır. Buna göre fosfolipitlerin fosfotidilkolin içeriği PL100 için %90, DSPC için > % 99 'dur.

II.2.2.1.1.2. ITK İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI

Çalışmalarda kullanılan fosfolipitlerin tanınması için fosfolipitlerin $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 'lik çözeltisi etüvde 110°C de 60 dakika aktive edilmiş 0.25 mm kalınlığında silikajel 60 F_{254} ile kaplanmış plaklara bir kılcal yardımıyla tatbik edilmiştir. Kurutulan plaklar Kloroform:Metanol:Su (80:20:2) çözücü sisteminde sürüklendikten sonra kurutulup iyot buharı ile doyurulmuş tanka konmuş ve lekeler UV lambası altında 254 nm ' de incelenmiştir. Aynı işlemler lizofosfotidilkolin için de yapılmıştır (21).

II.2.2.1.1.3. DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC) İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI

Lipozom formülasyonlarında kullanılan jel tipte DSPC ve sıvı kristalin tipte PL 100 'ün DSC ile termal analiz eğrileri çekilmiş ve faz geçiş sıcaklıkları tayin edilmiştir. Spektrumlar azot atmosferi altında çekilmiştir. Akış hızı 20 ml.dk^{-1} , sıcaklık artışı ise 10°C.dk^{-1} dir.

II.2.2.1.1.4. FOSFOLİPİTLERİN NÜKLEER MAGNETİK REZONANS (NMR) TEKNİĞİ İLE TANINMASI

Bölüm II.2.1.1.8' de anlatılan işlemler uygulanmış ve NMR spektrumları çekilmiştir.

II.2.2.1.2. YÜK VERİCİ MADDELER

II.2.2.1.2.1. IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Stearilamin' in IR spektrumu 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve potasyum bromür diskler kullanılarak çekilmiştir.

II.2.2.1.2.2. ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.1.2.'de anlatıldığı gibi stearilamin' in ITK ile tanınması yapılmıştır (21).

II.2.2.1.3. STABİLİTE ARTIRICI MADDELER

II.2.2.1.3.1. ITK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.1.2.'de anlatıldığı gibi kolesterolün tanınması yapılmıştır. Ancak lekeler %50 sülfürik asit çözeltisi (50mL H₂SO₄ : 50mL metanol) püskürtülüp etüvde 5-10 dakika ısıtıldıktan sonra incelenmiştir (21).

II.2.2.1.3.2. KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ

Kılcal tüp içine yerleştirilen kolesterolün erime noktası, erime derecesi tayin aygıtında tayin edilmiştir.

II.2.2.2. LİPOZOM FORMÜLASYONLARI

Çalışmalarımızda kullandığımız lipozom formülasyonları için biri jel tipte (DSPC) diğeri ise sıvı kristalin tipte (PL 100) iki ayrı fosfolipit, pozitif yük verici madde olarak SA ve stabilite artırıcı madde olarak kolesterol (CHOL) seçilmiştir.

En uygun olarak bulunan ve çalışmalarımızda kullandığımız (7:2:4) molar bileşimli lipozom formülasyonuna, değişik molar bileşimler (20, 40, 43) ve değişik yük verici madde (7-11) kullanılarak hazırlanan bir seri lipozom formülasyonları incelenerek karar verilmiştir.

Hazırlanan tüm formülasyonlar ve gözlenen sonuçlar bulgular kısmında verilmiştir.

II.2.3. NON İYONİK SÜRFAKTAN VEZİKÜLLERİ

II.2.3.1. NISV' LARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER

II.2.3.1.1. SÜRFAKTANLAR

II.2.3.1.1.1. SÜRFAKTANLARIN BİLEŞİMİ

Çalışmalarımızda kullandığımız sürfaktanların analiz sertifikaları firmadan elde edilmiştir. Kullanılan sürfaktanların total gliserol içeriği Sürfaktan I için % 51.6 ve Sürfaktan II için % 51.8 'dir.

II.2.3.1.1.2. SÜRFAKTANLARIN HLB DEĞERLERİNİN HESAPLANMASI

Sürfaktanların HLB (Hidrofilik-Lipofilik Denge) değerleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (61).

$$HLB = \frac{MW (Hidrofilik)}{MW (Total)} \times 20$$

II.2.3.1.1.3. DİFERANSİYEL TARAMA KALORİMETRESİ (DSC) İLE SÜRFİKTANLARIN TANINMASI

Çalışmalarımızda kullanılan (NISV formülasyonu için) jel tipte Sürfaktan I (Hekzadesil poli-(3)-gliserol) ve sıvı kristalin tipte Sürfaktan II (Dialkil poli-(7)-gliserol eter) 'nin DSC termal analiz eğrileri çekilmiş ve faz geçiş sıcakları tespit edilmiştir. Spektrumlar azot atmosferi altında çekilmiştir. Akış hızı 20 ml.dk⁻¹, sıcaklık artışı ise 10 °C.dk⁻¹ dir.

II.2.3.1.1.4. SÜRFİKTANLARIN YÜZEY GERİLİMİNİN SAPTANMASI

Sürfaktanların yüzey geriliminin ölçülmesinde halka koparma yöntemi uygulanmış ve Fisher Surface Tensiyometresi kullanılmıştır. Önce alet 25 ± 0.5 °C distile suyun yüzey gerilimi ölçülerek standardize edilmiştir.

10⁻¹, 10⁻³, 10⁻⁵, 10⁻⁷ ve 10⁻⁹ M konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler bir gece oda sıcaklığında dengeye ulaşması için bekletilmiştir (62). İçinden 37 ± 0.5 °C su geçen çift cidarlı cam kaba konan çözeltilerin aynı sıcaklığa gelmesi beklenmiş ve daha sonra ölçümleri yapılmıştır. Her ölçümden önce platin tel yakılmıştır.

II.2.3.1.2. YÜK VERİCİ MADDELER

II.2.3.1.2.1. IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Stearilamin' in IR spektrumu 4000-400 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında ve potasyum bromür diskler kullanılarak çekilmiştir.

II.2.3.1.2.2. İTK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.1.2.'de anlatıldığı gibi stearilamin' in İTK ile tanınması yapılmıştır (21).

II.2.3.1.3. STABİLİTE ARTIRICI MADDELER

II.2.3.1.3.1. KOLESTEROL' ÜN İTK İLE TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.1.2.'de anlatıldığı gibi kolesterol' ün tanınması yapılmıştır. Ancak lekeler %50 sülfürik asit çözeltisi (50mL H₂SO₄ : 50mL metanol) püskürtülüp etüvde 5-10 dakika ısıtıldıktan sonra incelenmiştir (21).

II.2.3.1.3.2. KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ

Bölüm II.2.2.1.3.2' de anlatıldığı gibi kolesterol' ün erime derecesi tayin edilmiştir.

II.2.3.2. NISV FORMÜLASYONLARI

Sürfaktan :Yük verici madde :Stabilite artırıcı madde olarak tasarlanan ve molar bileşimi (7:2:4) olarak seçilen NISV formülasyonları için biri jel tipte (Sürfaktan I) ve diğeri sıvı kristalin tipte (Sürfaktan II) iki ayrı sürfaktan seçilmiştir. Yük verici madde olarak pozitif yük veren SA ve stabilite artırıcı madde olarak da kolesterol kullanılmıştır.

Hazırlanan NISV formülasyonlarında, lipozom formülasyonlarında uygun sonuç veren (7:2:4) molar bileşim kullanılmış ve NISV formülasyonları için de iyi sonuç verdiği görülmüştür.

Etken madde içeren ve boş NISV' ler aynı molar oranda hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonların bileşimi ve kodları bulgular kısmında verilmiştir.

II.2.4. LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI

Çalışmalarımızda kullandığımız lipozom ve NISV' ların hazırlanmasında film yöntemi ve onu takiben banyo sonikasyonu uygulanmıştır (12).

Jel ve sıvı kristalin tipte lipozom ve NISV' ların hazırlanmasında çalışma sıcaklığı olarak kullanılan fosfolipit ve sürfaktanların faz geçiş sıcaklığının en az 10°C üzerindeki sıcaklıklar seçilmiştir.

Fosfolipitlerin faz geçiş sıcaklıkları PL100 için -7 °C, DSPC için 53.5 °C, çalışma sıcaklığı ise PL100 için 30 °C, DSPC için 65 °C dir.

Süpfaktanların faz geçiş sıcaklığı ise süpfaktan I için 45 °C, süpfaktan II için 11 °C, çalışma sıcaklığı ise her ikisi içinde 60 °C olarak seçilmiştir.

II.2.4.1. İN VİTRO ÇALIŞMALARDA KULLANILAN LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI

Film tekniği ardından banyo sonikasyonu ile hazırlanan lipozom ve NISV' ların elde edilme yöntemine ait basamaklar Şekil 7 verilmiştir.

II.2.4.2. İN VİVO ÇALIŞMALARDA KULLANILAN LİPOZOM VE NISV' LARIN HAZIRLANMASI

İn vivo çalışmalarda işaretili maddenin yüksek bağlanma verimini sağlamak üzere fosfolipit olarak PL100 kullanılan lipozomların hazırlanmasında pH 5 asetat tamponu, DSPC kullanılan lipozomların hazırlanmasında distile su kullanılmıştır.

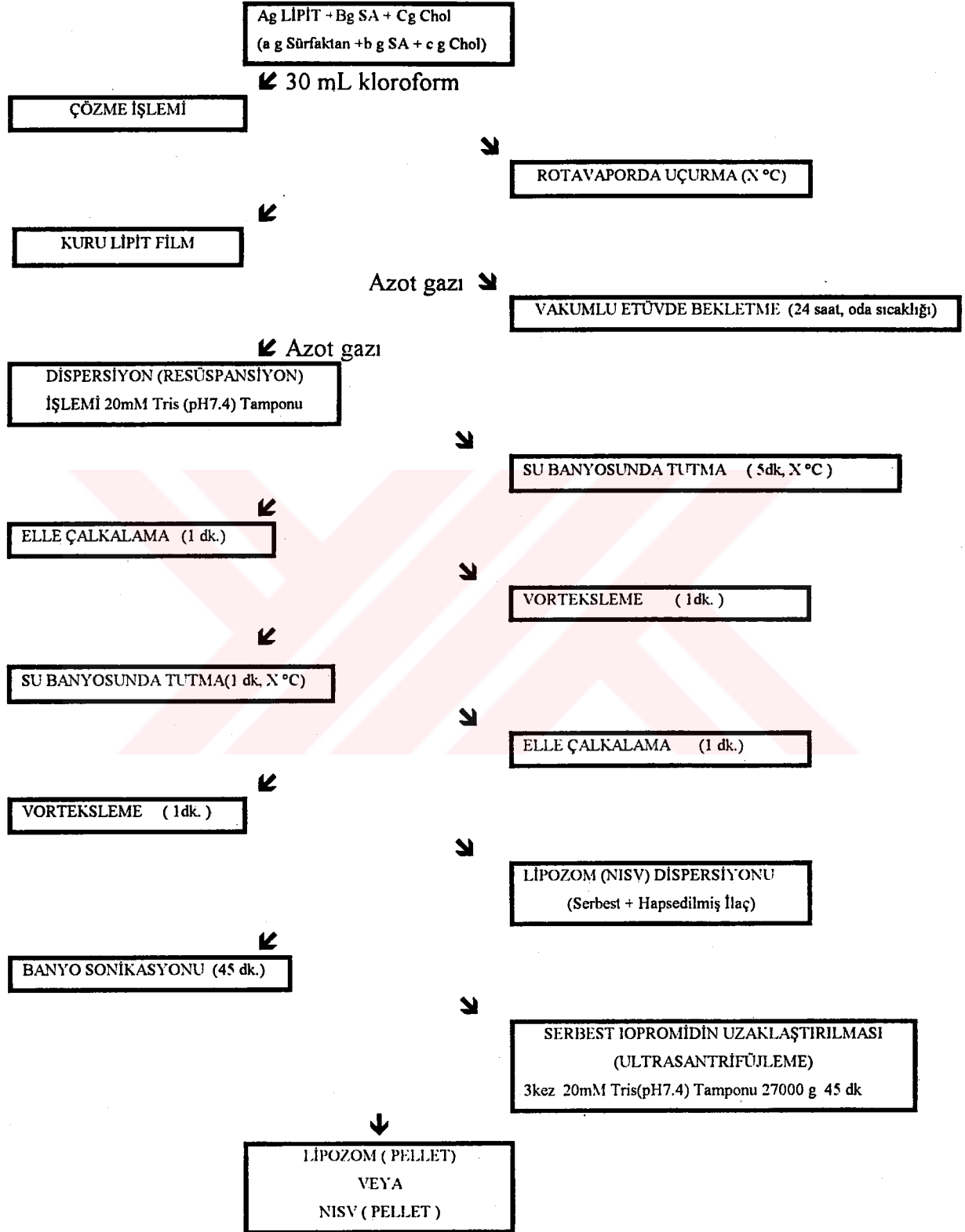
NISV' ların hazırlanmasında ise hem Süpfaktan I hem de Süpfaktan II için distile su kullanılmıştır.

İn vivo çalışmalarımızda lipozom ve NISV 'lerin elde edilme yöntemine ait basamaklar Şekil 8 'de verilmiştir.

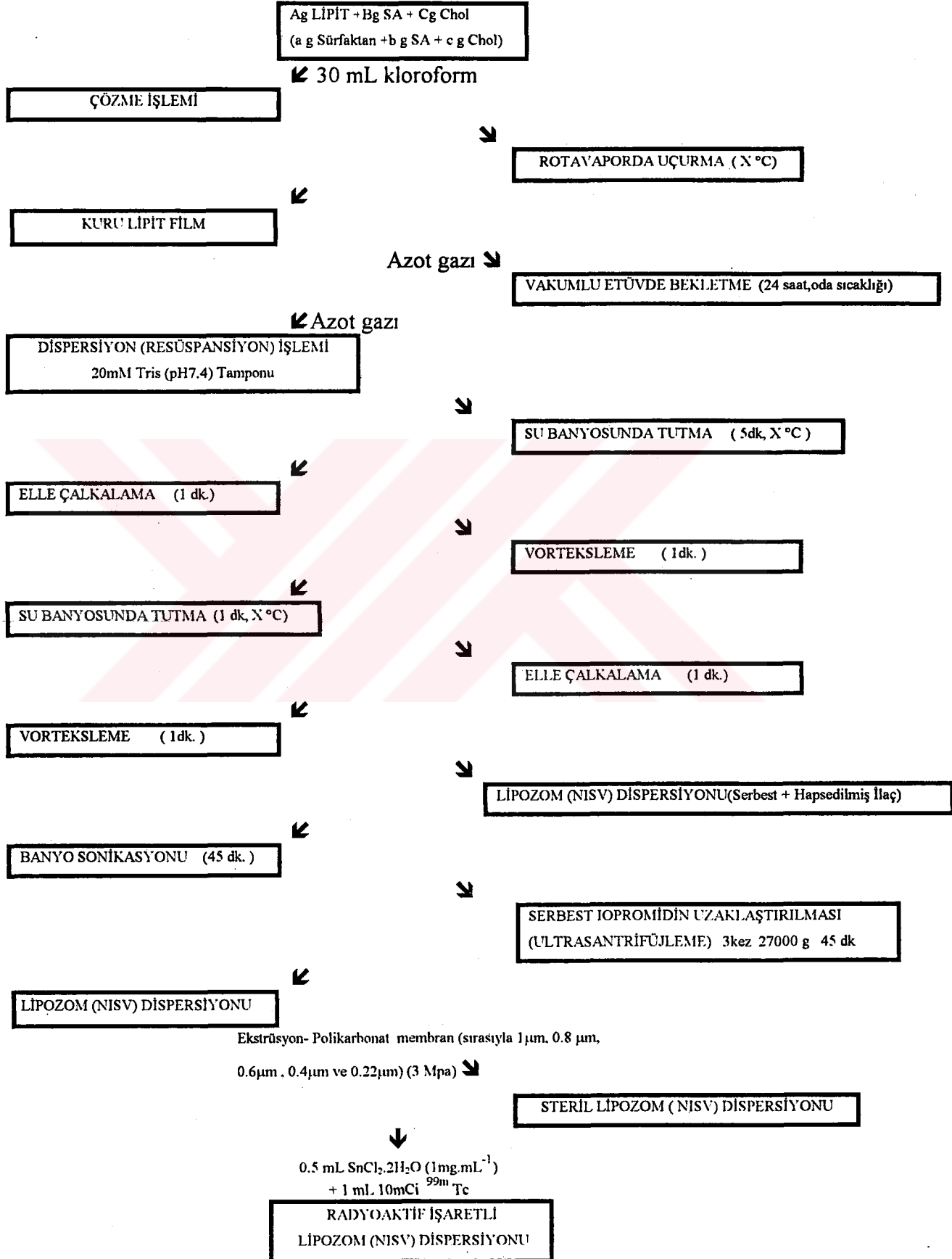
II.2.5.LİPOZOM VE NISV' LARIN ÖZELLİKLERİNİN TAYİNİ

Bu bölümde lipozom ve NISV' ların partikül büyüklüğü dağılımları, lipozom ve NISV formülasyonlarında serbest ve içte tutulan Iopromid'in miktar tayini, lipozom ve NISV 'ların enkapsülasyon hacmi, tabaka sayısı tayini ile lipozomal fosfolipitin miktar tayini metodları verilmiştir.

Şekil 7: İn Vitro Çalışmalarda Kullanılan Lipozom ve NISV 'ların Hazırlanması



Şekil 8: İn Vivo Çalışmalarda Kullanılan Lipozom ve NISV Dispersiyonlarının Hazırlanması



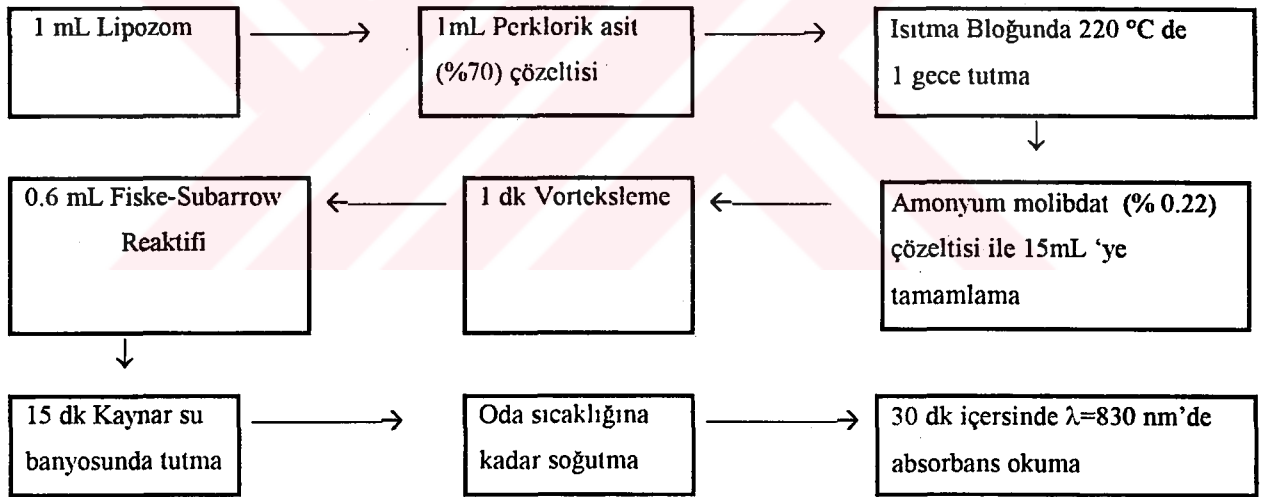
II.2.5.1. PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DAĞILIMLARI

İn vitro ve in vivo deneylerde kullanılan boş ve etken madde içeren jel ve sıvı kristalin tipte lipozom ve NISV 'lerin ortalama partikül büyüklükleri, Isoton çözeltisi yardımıyla incelenmiştir. Ölçümler lipozom ve NISV dispersiyonları hazırlandıktan sonra 1 saat içinde yapılmıştır.

Ortalama partikül büyüklüğü dağılımına ait sonuçlar bulgular kısmında tablo halinde verilmiştir.

II.2.5.2. LİPOZOM HAZIRLANMASINDA KULLANILAN LİPOZOMAL FOSFOLİPİTLERİN MİKTAR TAYİNİ

Hazırlanan lipozomlardaki lipozomal fosfolipit miktarları Fiske-Subarrow yöntemine göre tespit edilmiştir (63).



Şekil 9: Fiske-Subarrow Yöntemiyle Fosfor Miktar Tayininde Uygulanan İşlemler.

Fiske-Subarrow yönteminde kullanılan çözeltiler sırasıyla:

Fiske-Subarrow Reaktifi : 27.4g anhidr sodyum piro sülfid ve 1g sodyum sülfid 200 mL distile suda çözölmüş ve 0.5g 1-amino-2-naftol-4-sölfonik asit eklenmiştir. 40 °C 'de manyetik karıştırıcıda berraklaşınca kadar tutulan çözelti 1 gece karanlıkta bekletilmiş ertesi gün süzgeç kağıdından süzölmüştür.

II.2.5.3. LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ

II.2.5.3.1 LİPOZOM VE NISV İÇİNDE HAPSEDİLEN IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ

Bölüm II.2.4.1' de anlatılan işlemler sonucunda elde edilen pelletler 5 dk. vortekslenerek disperse edilmiştir. Üzerine %2.5 (a/a) Triton-X 100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu eklenerek tekrar 5 dk vortekslenmiştir. Daha sonra 80°C' lik su banyosunda 30 dk. bekletilmiş ve berrak bir çözelti elde edilmiştir. Bu işlemlerle çift tabaka yapısı parçalanarak etken maddenin açığa çıkması sağlanmıştır. Elde edilen çözeltinin absorbansı $\lambda=298$ nm de % 2.5 Triton-X 100 içeren 20 mM Tris Tamponuna (kör çözelti) karşı okunmuştur.

Bulunan absorbans değeri Bölüm II.2.1.2.b' de anlatıldığı şekilde elde edilen standart doğrudan yerine konarak hapsedilen Iopromid miktarı saptanmıştır. Sonuçta tüm lipozom ve NISV formülasyonlarında hapsedilen Iopromid miktarları ve istatistiksel değerlendirmeler ayrı tablolar halinde verilmiştir.

II.2.5.3.2 LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA SERBEST IOPROMİD MİKTAR TAYİNİ

Bölüm II.2.4.1' de anlatılan işlemler sonucunda elde edilen 3 ayrı süpernatant üzerinde serbest etken madde miktar tayini yapılmıştır.

Bu amaçla 3 ayrı süpernatantın $\lambda= 243$ nm de absorbansları okunmuştur. Bulunan absorbans değerleri Bölüm II.2.2.1.2.a' da anlatıldığı şekilde elde edilen standart doğrudan yerine konarak serbest Iopromid' in miktarı saptanmıştır.

II.2.5.4. LİPOZOM VE NISV' LARIN TABAKA SAYISI TAYİNİ

Çalışmalarımızda kullandığımız ve Bölüm II.2.4.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanan lipozom ve NISV dispersiyonlarının tabaka sayısı polarizan mikroskopta incelenmiştir.

II.2.5.5. LİPOZOM VE NISV' LARIN ENKAPSÜLASYON HACMİ

Fluorescein sodyum içeren lipozom ve NISV dispersiyonları Bölüm II.2.4.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozom ve NISV dispersiyonları 3 kez 27000 g de 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ile ultrasantrifülemeye tabii tutulmuş ve 3 süpernatantında absorbansları $\lambda = 490 \text{ nm}$ ' de okunmuştur. Bulunan absorbans değerleri Bölüm II.2.1.2' de elde edilen standart doğrudan yerine konarak serbest fluorescein sodyum miktarı hesaplanmıştır. İçte tutulan fluorescein sodyum miktarını (enkapsülasyon hacmini) hesaplamak için ise ultrasantrifüj sonucunda elde edilen lipozom ve NISV pelletleri üzerine 1 mL 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ilave edilmiş ve 5 dk. vortekslenmiştir. Elde edilen dispersiyondan 100 μL alınıp üzerine %2.5 Triton-X 100 içeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ilave edilip işlem tekrarlanmıştır. Daha sonra 80 °C 'lik su banyosunda 30 dk. bekletilmiş ve berrak bir çözelti elde edilmiştir. Elde edilen çözeltinin absorbansı $\lambda = 491 \text{ nm}$ ' de okunmuştur. Bulunan absorbans değerleri Bölüm II.2.1.1.5c' de elde edilen standart doğrudan yerine konarak içte tutulan fluorescein sodyum miktarı ve enkapsülasyon hacmi hesaplanmıştır.

II.2.5.6. LİPOZOM VE NISV' LARIN FİZİKSEL STABİLİTESİ ÜZERİNDE YAPILAN ÇALIŞMALAR

II.2.5.6.1. SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERDEN ETKEN MADDE KAYBEDİLMESİ

Bölüm II.2.4.' de anlatıldığı şekilde lipozom ve NISV ler hazırlandıktan sonra 3

kez 27000 g de 45 dk. ultrasantrifüj uygulanmıştır. Lipozom ve NISV' lerin serbest etken madde miktarları saptanmıştır. Ultrasantrifüj uygulandıktan sonra elde edilen pelletler üzerine 1 mL 20 mM Tris Tamponu ilave edilmiş, üzerlerinden azot gazı geçirilmiş ve ağızları parafilmle kapatılarak oda sıcaklığında (+25 °C) ve buzdolabında (+4°C) saklanmıştır.

Ön denemelerle tespit edilen zaman aralıklarında; **jel tipte** lipozom ve NISV ler için 1, 3, 5, 7, 2.hafta, 3.hafta, 4.hafta, 5.hafta, 6.hafta, 7.hafta, 8.haftada, **sıvı kristalin tipte** lipozom ve NISV' lar için 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 2.hafta, 3.hafta, 4.hafta, 5.hafta, 6.hafta, 7.hafta, 8.hafta da lipozom ve NISV dispersiyonları 20 mM Tris Tamponu ile 5 mL' ye tamamlanarak vortekslendikten sonra tekrar 45dk. 27000g de ultrasantrifüj uygulanmış ve süpernatant kısmında vezikül dışına geçen etken madde miktarı saptanmıştır.

II.2.5.6.2. SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERİN PARTİKÜL BÜYÜKLÜKLERİ

Bölüm II.2.5.6.1' de anlatıldığı şekilde hazırlanan lipozom ve NISV dispersiyonlarının partikül büyüklükleri, yukarıda belirtilen günlerde isoton çözeltisi yardımı ile ölçülmüştür.

II.2.5.7. LİPOZOM VE NISV' LARDA IOPROMİD' İN İN VİTRO SALIMININ İNCELENMESİ

Lipozom ve NISV' larda etken madde salımı Vemuri ve ark. 'nın (64, 65) uyguladıkları yöntem modifiye edilerek 37 ± 1 °C de 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponunda hafif çalkalamalı inkübasyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir.

Etken madde taşıyan 1 mL lipozom veya NISV dispersiyonu 50 mL 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu olan salım ortamına eklenmiştir. Ortamdan 30. dk., 1.saat, 2.saat, 3.saat, 6.saat ve 24.saat zaman aralıklarında 0.4 µm por açıklığına sahip filtreden süzülerek 1 mL örnek alınmıştır. Örnekler ultrasantrifüjlendikten sonra

süpernatant ve pellet olmak üzere iki kısma ayrılmıştır. Süpernatantın $\lambda=243$ nm' de absorbansları okunmuştur. Pelletler 1 ml 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu ile vorteklenmiş ve salın ortamına eklenmiştir. Okunan absorbanslar ise Bölüm II.2.1.1.5a 'da verilen standart doğruya yerine konarak salınan etken madde miktarı hesaplanmıştır.

II.2.5.7.1. İN VİTRO SALIM SIRASINDA IOPROMİD' İN STABİLİTESİNİN VE PARÇALANMA ÜRÜNLERİNİN İNCELENMESİ

Bölüm II.2.5.6.1 de anlatılan fiziksel stabilite çalışmaları sırasında, ultrasantrifüj işleminden sonra elde edilen süpernatandan yaklaşık 10 μ L örnek alınarak Bölüm II.2.1.1.2' de anlatılan işlemler uygulanmıştır.

II.2.5.8. LİPOZOM VE NISV' LARLA YAPILAN İN VİVO ÇALIŞMALAR

II.2.5.8.1. IOPROMİD İÇEREN LİPOZOM VE NISV' LARIN ^{99m}Tc İLE İŞARETLENMESİ

Etken maddenin hapsedilmesi, tutulmayan etken maddenin uzaklaştırılması ve elde edilen lipozom ve NISV dispersiyonun polikarbonat filtreden ekstrüksiyonu sonrasında radyoaktif olarak işaretleme sonucunda işaretleli lipozom ve NISV' lerin hazırlanması sağlanmıştır.

Bu amaçla, Bölüm II.2.4.2' de anlatıldığı şekilde lipozom ve NISV dispersiyonları hazırlanmıştır. Dispersiyon üzerine 0.5 mL $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1mg.mL^{-1}) eklenmiştir. Karışıma 10 mCi aktiviteye sahip $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (perteknetat halinde) ilave edilmiştir. Ardından radyoaktif bağlanmanın kalite kontrolü yapılmıştır.

II.2.5.8.2. RADYOAKTİF İŞARETLEMENİN KALİTE KONTROLÜ

İşaretlemenin kalite kontrolü, ITLC-SG kromatografi kağıtları kullanarak ITK

ile yapılmıştır. ITLC-SG kağıdına radyoaktif madde ile işaretlenmiş lipozom ve NISV dispersiyonundan tatbik edilerek serum fizyolojik ve ACD içinde sürüklenmeye bırakılmıştır. Yaklaşık 5 dk sürükledikten sonra çıkartılarak kurutulmuş ve Rf 'leri hesaplanmıştır. Kurutulan kağıt 1 cm aralıklarla kesilerek kuyu tipi gama sayıcıda radyoaktivite miktarı tayin edilmiştir. Bağlı ^{99m}Tc ile, serbest ^{99m}Tc 'un radyoaktivite yüzdeleri hesaplanmıştır.

Tc ile yapılan radyoaktivite işaretleme çalışmalarında radyokontaminant olarak $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve indirgenmiş hidrolize olmuş $\text{Tc(H-R } ^{99m}\text{Tc)}$ bulunur. İşaretlemenin kalite kontrolü için her iki kontaminantında işaretlenen maddelerden ayrılması gerekir. Eğer işaretlenen madde suda çözünüyor ve partikül karakterinde değilse farklı çözücülerle her iki kontaminantı da saptamak mümkündür (60).

Perteknetat hem asetonda hem de ACD' da fronta ilerler. H-R ^{99m}Tc asetonda orijinde, ACD' da solvent frontta görülür. Perteknetat miktarı asetonda tayin edilir. Her iki kontaminantın total miktarı da ACD' da bulunur (60).

II.2.5.8.3. RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN BİYODAĞILIM ÇALIŞMALARI

Bölüm II.2.4.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanan radyoaktif işaretli (^{99m}Tc ile) lipozom ve NISV dispersiyonları (boş ve etken madde içeren) yaklaşık 100g ağırlığında dişi ratlara kuyruk veninden i.v. olarak 0.5 mL dozda uygulanmış uygulamadan sonraki 5, 10, 20, 30, 60, 120 ve 180. dakikalarda hayvanlardan 1 mL kan alınmıştır ve hayvanlar öldürülmüştür. Her zaman aralığı için 3 hayvan kullanılmıştır. Öldürülen hayvanların önce sintigrafik görüntüleri alınmış daha sonra pankreas, dalak, böbrek, kalp, beyin, akciğer ve karaciğerleri çıkarılmıştır. Daha sonra bu organları hassas terazide tartılmış ve radyoaktiviteleri kuyu tipi gama sayacında ölçülmüştür. İşaretli lipozom veya NISV dispersiyonunun %1 'lik çözeltisi standart olarak kullanılmış ve organların radyoaktivite değerleri % tutulum / g organ olarak hesaplanmıştır.

II.2.5.8.4. RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN RADYOLOJİK ÇALIŞMALAR

Biyodağılım sonuçlarına göre en yüksek organ tutulumu gösteren PL100: SA: CHOL (7:2:4) lipozom formülasyonu ve Sürfaktan I: SA: CHOL (7:2:4) NISV formülasyonu ile radyolojik çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla ratlara i.m.(intra musküler) olarak xylazine (12mg /kg, Rompun®) ve ketamine (50mg /kg, Ketalar®) enjekte edilmiş ve anestezi ile uyutulmuştur, daha sonra kuyruk veninden birinci rata 0.5 mL lipozom dispersiyonu, ikinci rata 0.5 mL NISV dispersiyonu ve üçüncü rata ise 0.5 mL Iopromid-U verilmiştir. Uygulamadan sonra, biyodağılım sonucuna göre organ tutulumunun maksimum olduğu birinci saat sonunda ratların KC başlangıcından böbreklerin bittiği yere kadar olan alanı 6 mm 'lik kesitlerle taranarak CT 'leri (Phillips Tomoscan 350, Germany; 120 kV, 480 mAs, 6mm kesit kalınlığı, 4.8 s tarama zamanı) çekilmiştir. Organların opasite yoğunlukları Hounsfield Ünit (HU) cinsinden ölçülmüştür.

III. BULGULAR

Bu bölümde etken madde ile lipozom ve NISV hazırlamada kullanılan maddelerin kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi, lipozom ve NISV'lerin özelliklerinin tayini ve lipozom ve NISV'ların fiziksel stabilitesi üzerine yapılan çalışmalara ait bulgular verilmiştir.

III.1. IOPROMİDİN KİMYASAL VE FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR

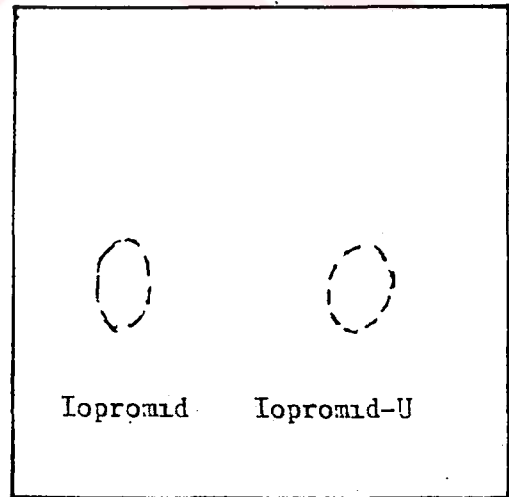
III.1.1. IOPROMİD'İN STANDARDİZASYONU

III.1.1.1. IR SPEKTRUMU

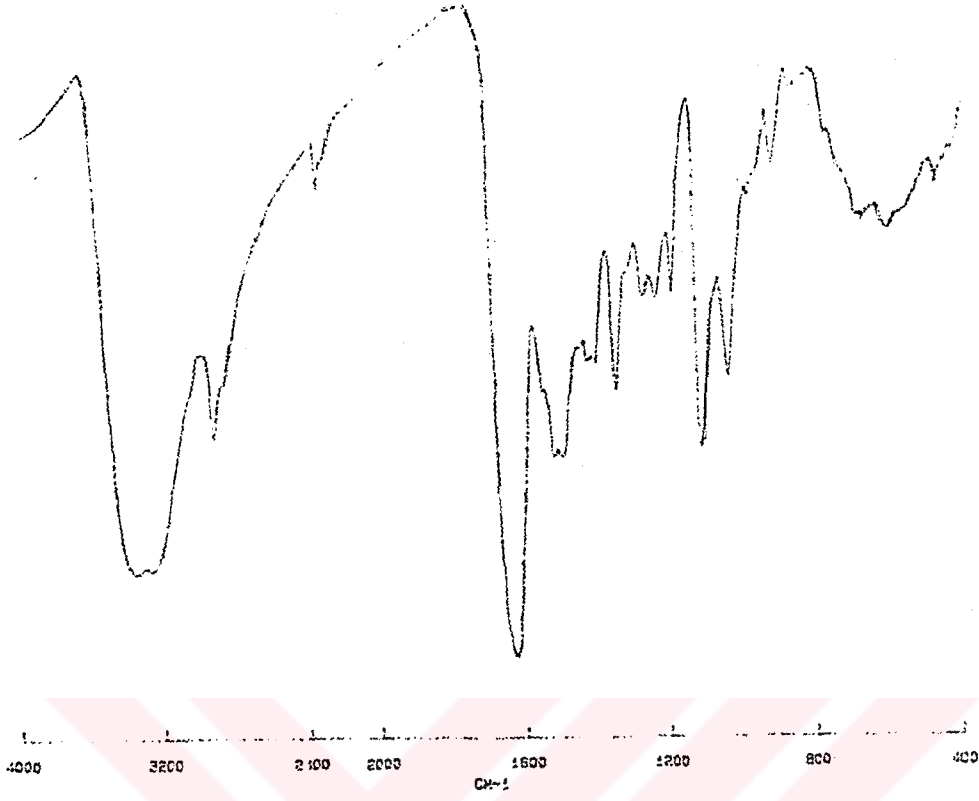
Iopromid-U ve Iopromid' in $4000-400\text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında çekilen IR spektrumu Şekil 10 ve 11' de verilmiştir. $3245, 2927, 1635, 1495, 1112, 917\text{ cm}^{-1}$ de sırasıyla O-H, N-H, CO-NH, N-H, C-O (sekonder), C-O (primer) gruplara ait karakteristik pikler görülmüştür. Bulgular literatürle uyumludur (2).

III.1.1.2. IOPROMİD VE IOPROMİD-U' NUN İTK İLE TANINMASI

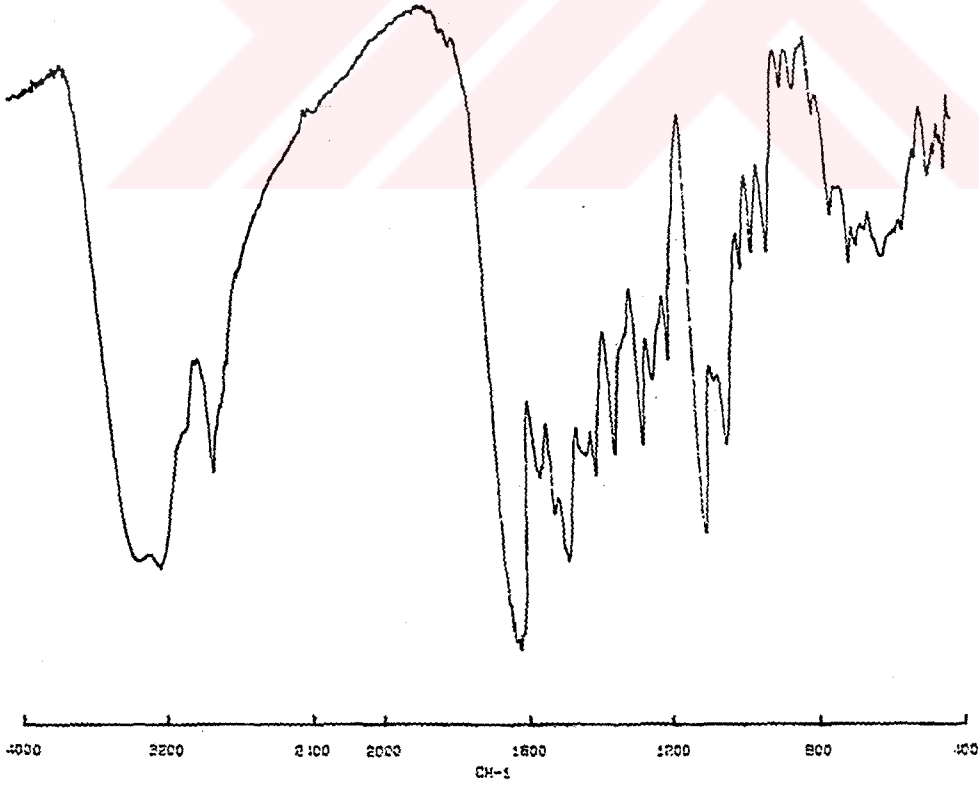
Bölüm II.2.1.1.2' de anlatıldığı şekilde yapılan Iopromid ve Iopromid-U' nun İTK analizi sonucunda sürüklenen maddenin 254 nm ' de UV lambası altında mor renkte leke verdiği bulunmuştur ve R_f değeri her ikisi içinde 0.52 olarak bulunmuş ve literatürle uyumlu olduğu görülmüştür (2), (Şekil 12).



Şekil 12: Iopromid-U ve Iopromid' in İTK Kromatogramları



Şekil 10: Iopromid-U' nun IRspektrumu



Şekil 11: Iopromid' in IR Spektrumu

III.1.1.3. UV SPEKTRUMU

a) Bölüm II.2.1.1.3' de anlatıldığı şekilde Iopromid-U' nun 20 mM Tris Tamponunda UV spektrumu alındığında $\lambda_{\max} = 243$ nm olarak bulunmuştur (Şekil 13).

b) Iopromid -U' nun % 2.5 Triton-X 100 içeren 20 mM Tris Tamponunda spektrumu alındığında $\lambda_{\max} = 298$ nm olarak bulunmuştur (Şekil 14).

c) Fluorescein sodyum' un 20 mM Tris Tamponunda UV spektrumu alındığında $\lambda_{\max} = 490$ nm, % 2.5 Triton-X 100 içeren 20 mM Tris Tamponunda spektrumu alındığında ise $\lambda_{\max} = 491$ nm olarak bulunmuştur (Şekil 15, 16).

d) Ayrıca lipozomal fosfolipit miktarını tayin edebilmek için fosfolipit çözeltileri kullanılarak çekilen spektrumda $\lambda_{\max} = 830$ nm olarak bulunmuştur (Şekil 17).

III.1.1.4. STANDART DOĞRU

Bölüm II.2.1.1.4' de anlatılan işlemler sonucunda Iopromid için sırasıyla $\lambda = 243$ nm $\lambda = 298$ nm ve fluorescein sodyum için sırasıyla $\lambda = 490$ nm de ve $\lambda = 491$ nm' de çizilen doğruların grafikleri Şekil 18-21' de verilmiştir.

III.1.1.5. IOPROMİD -U' NUN OSMOTİK BASINCINA AİT BULGULAR

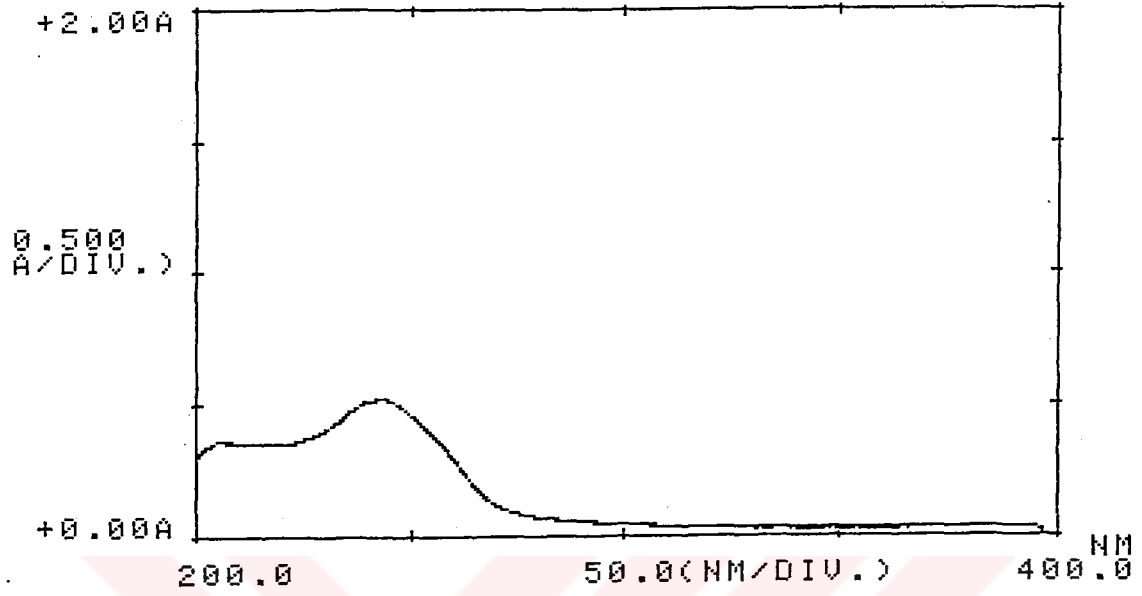
Bölüm II.2.1.1.5' de anlatıldığı şekilde yapılmış ve osmotik basınç 0.56 Osm / kg / H₂O olarak ölçülmüştür. Bu değerin literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (2).

III.1.1.6. IOPROMİD -U' NUN pH' SININ ÖLÇÜLMESİ

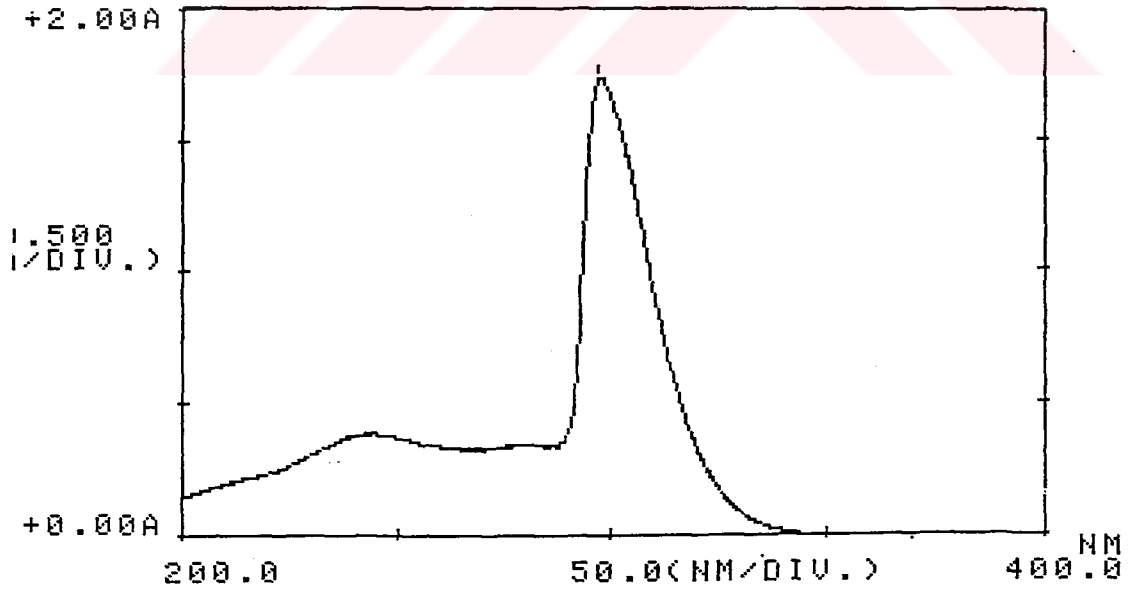
Bölüm II.2.1.1.6' da anlatıldığı şekilde Iopromid -U 'nun pH' sı 7.1 olarak ölçülmüştür. Bulunan değer literatüre uygundur (2).

III.1.1.7. IOPROMİD-U' NUN VİZKOSİTESİNE AİT BULGULAR

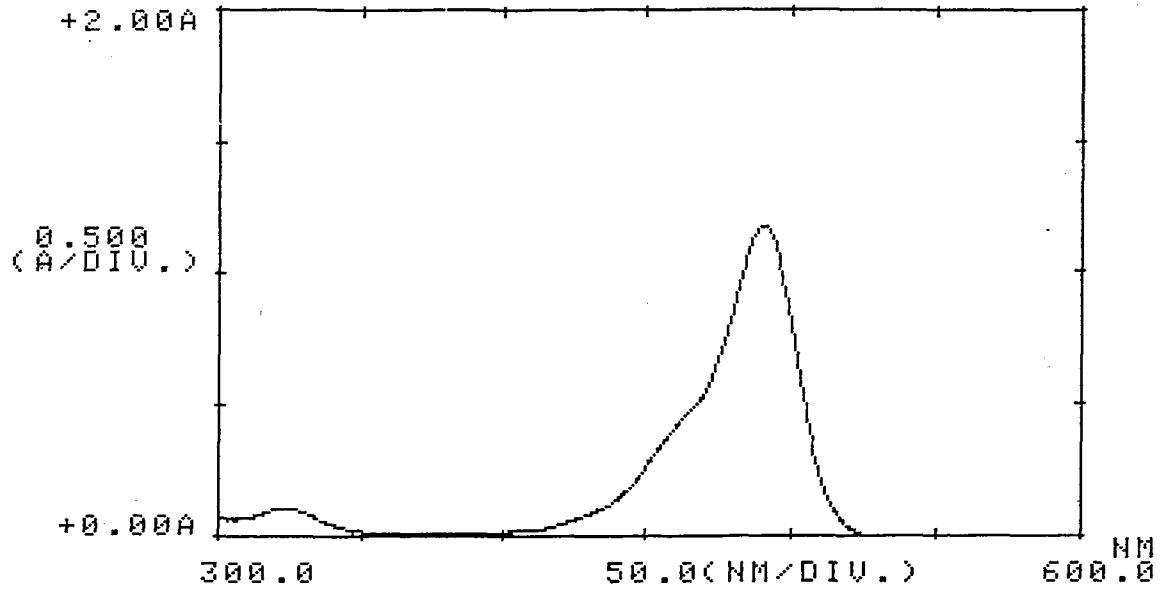
Bölüm II.2.1.7 ' de anlatıldığı şekilde Iopromid-U 'nun vizkositesi ölçülmüş ve 20 °C de vizkositesi 20 mPa.s olarak bulunmuştur. Bu değer literatüre uygundur (2).



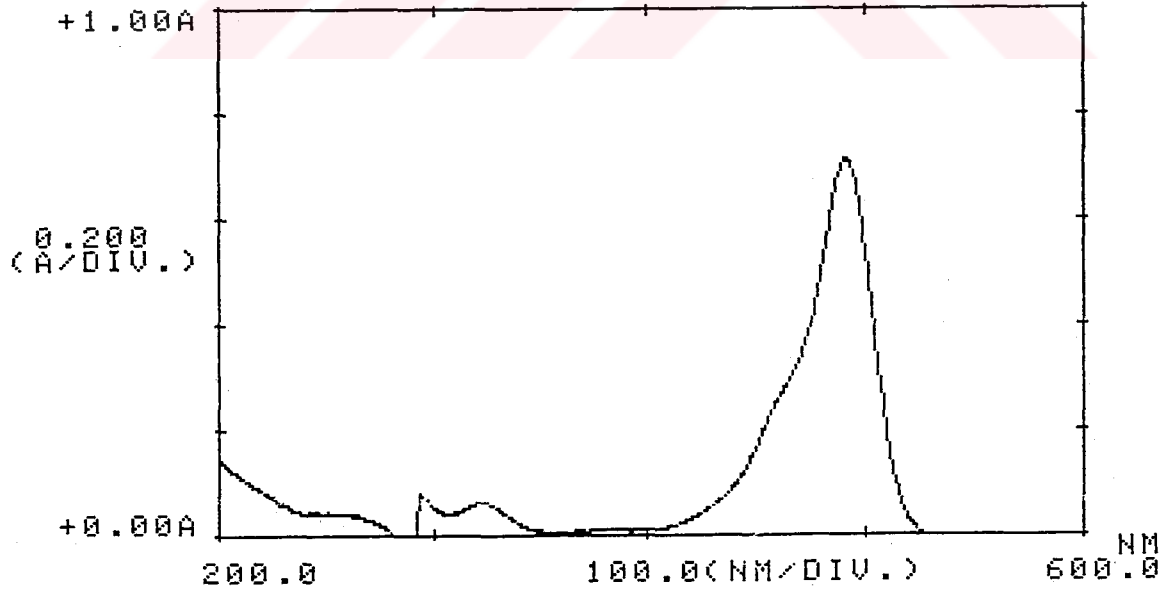
Şekil 13: Iopromid-U' nun 20mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde UV Spektrumu



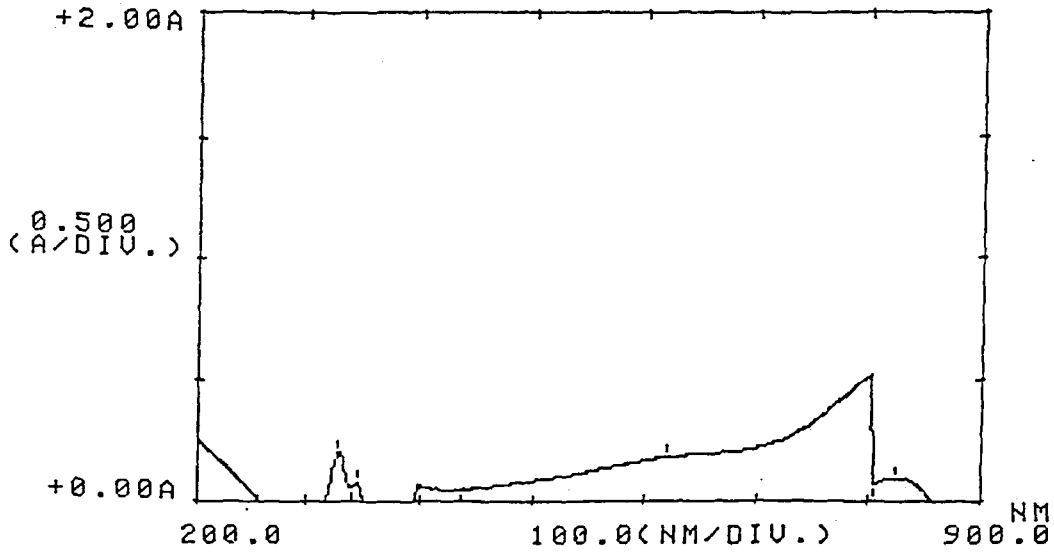
Şekil 14: Iopromid-U' nun % 2.5 (a/a) Triton X-100 İçeren 20mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde UV Spektrumu



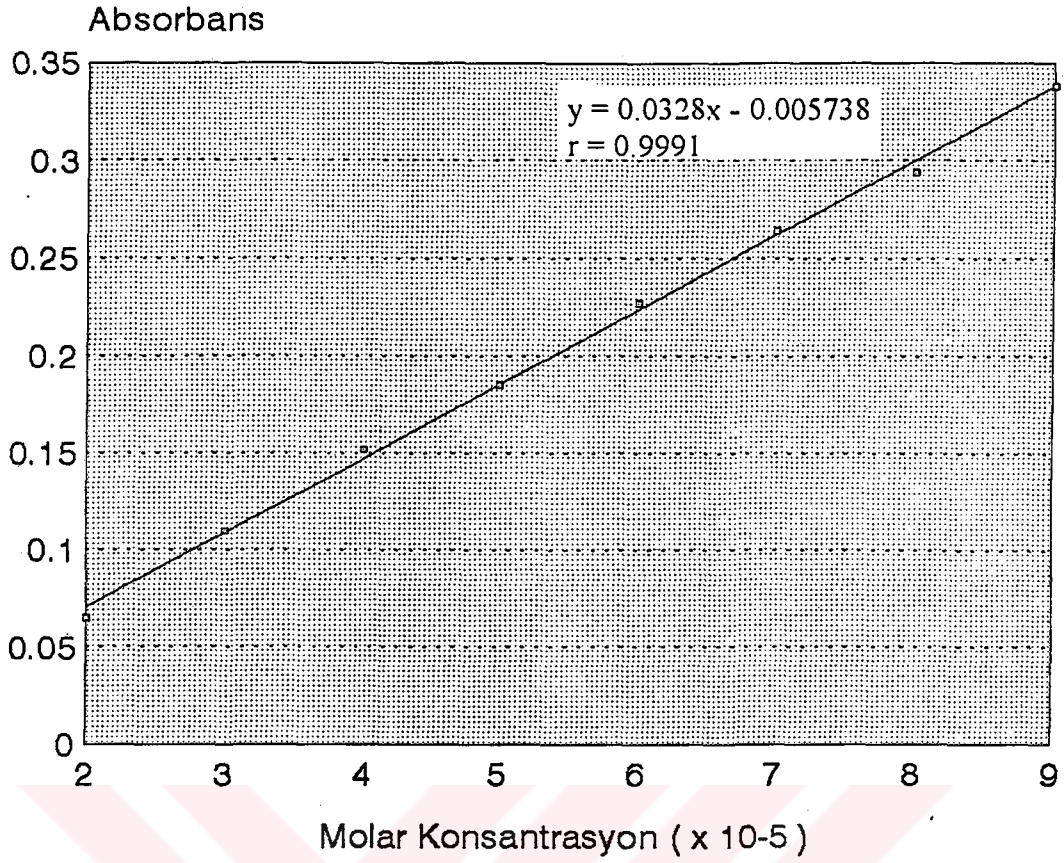
Şekil 15: Fluorescein Sodyum' un 20mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde UV Spektrumu



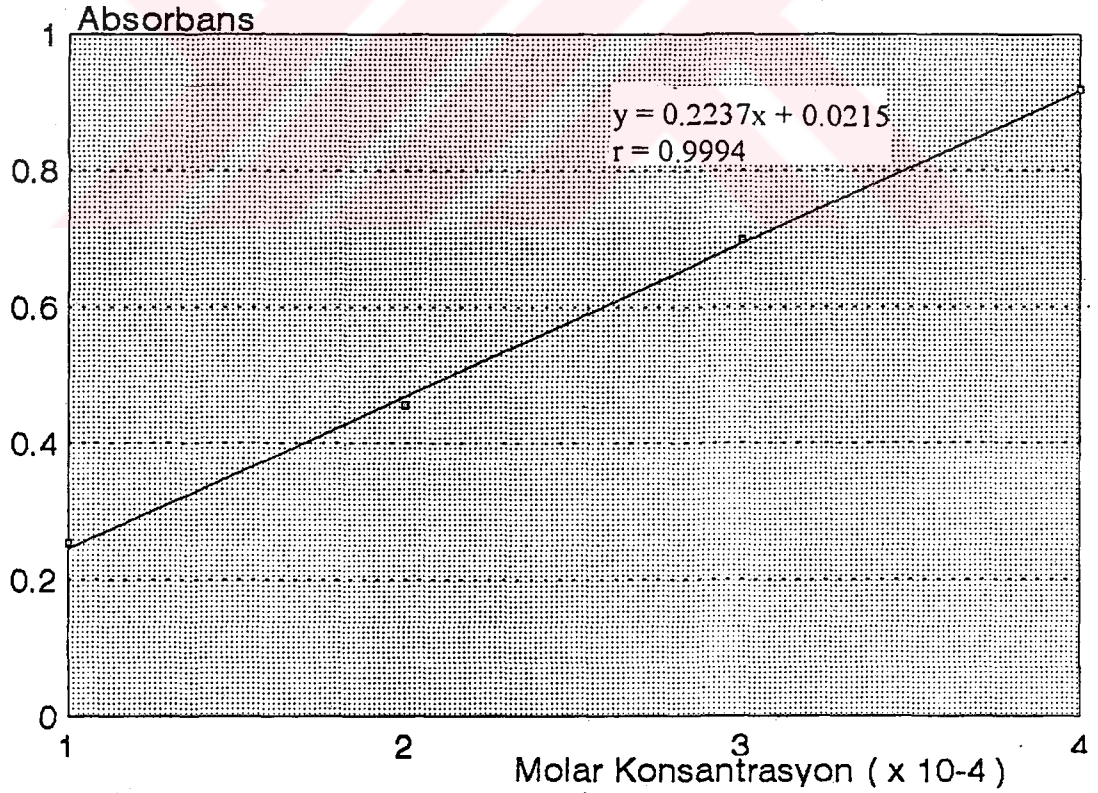
Şekil 16: Fluorescein Sodyum' un % 2.5 (a/a) Triton X-100 İçeren 20mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde UV Spektrumu



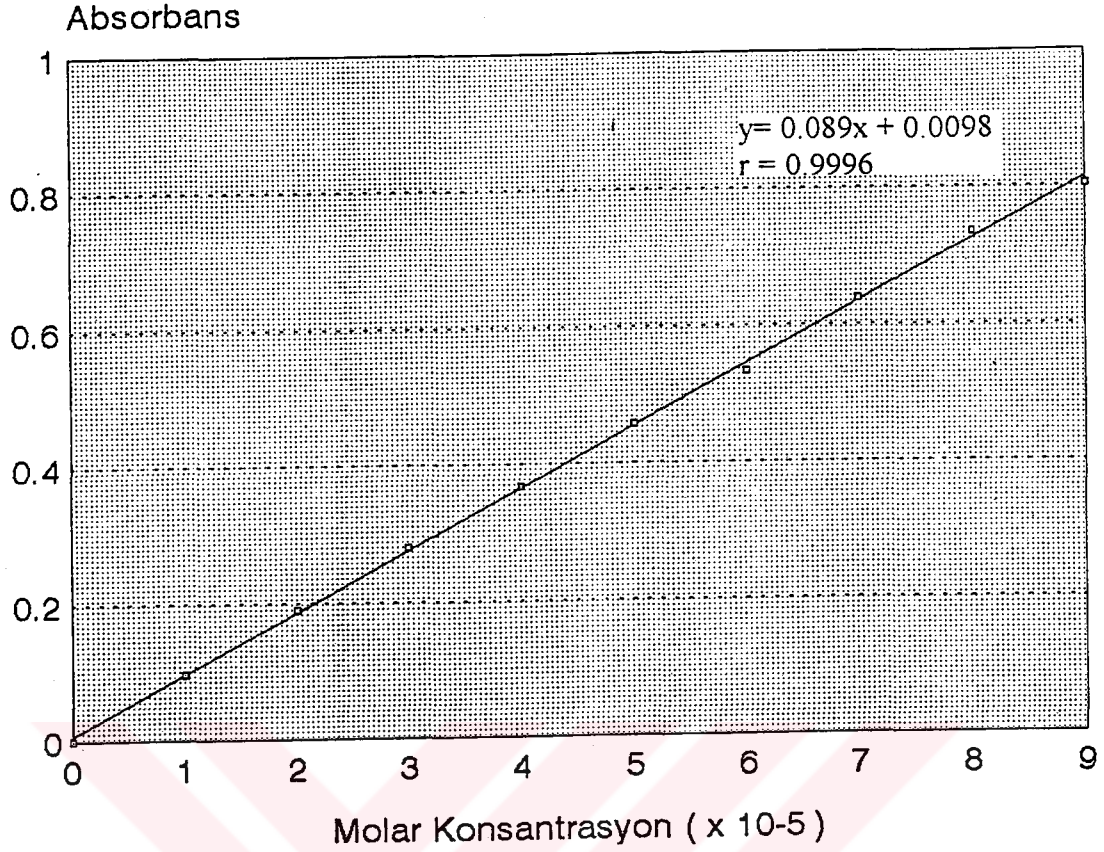
Şekil 17: Fosfolipit Çözeltilerinin UV Spektrumu



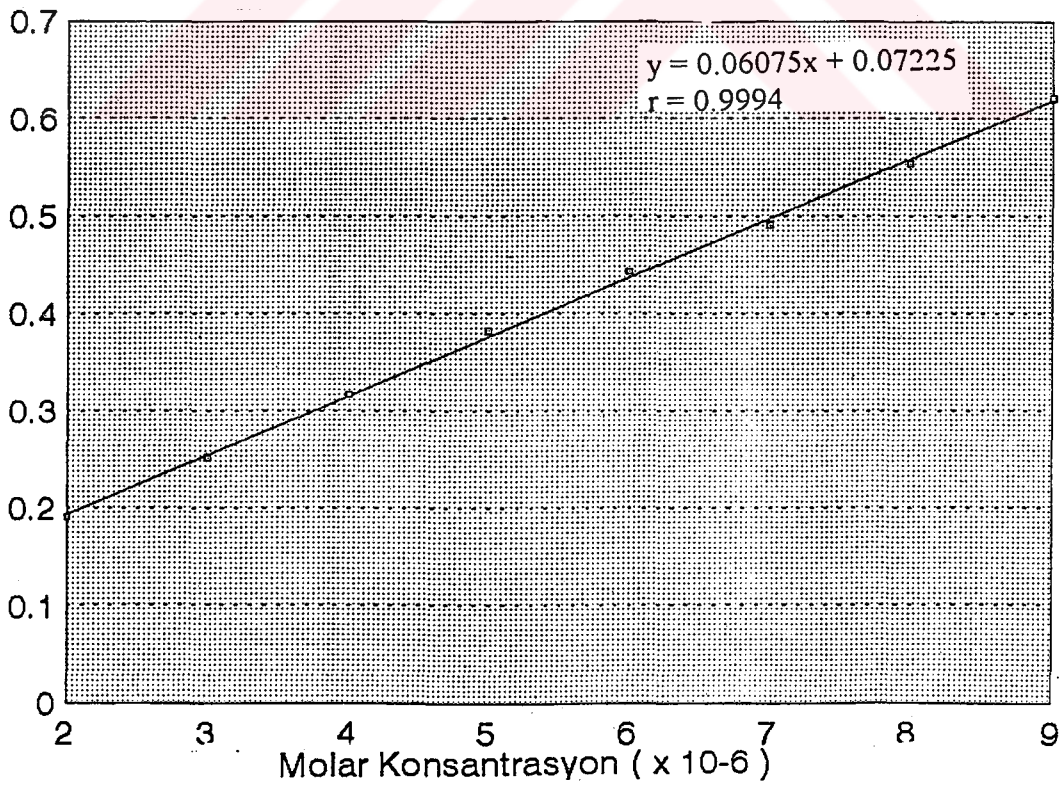
Şekil 18: Iopromid' in 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde Hazırlanan Standart Doğrusu.



Şekil 19: Iopromid' in % 2.5 (a/a) Triton X-100 İçeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde Hazırlanan Standart Doğrusu



Şekil 20: Fluorescein Sodyum' un 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde Hazırlanan Standart Doğrusu

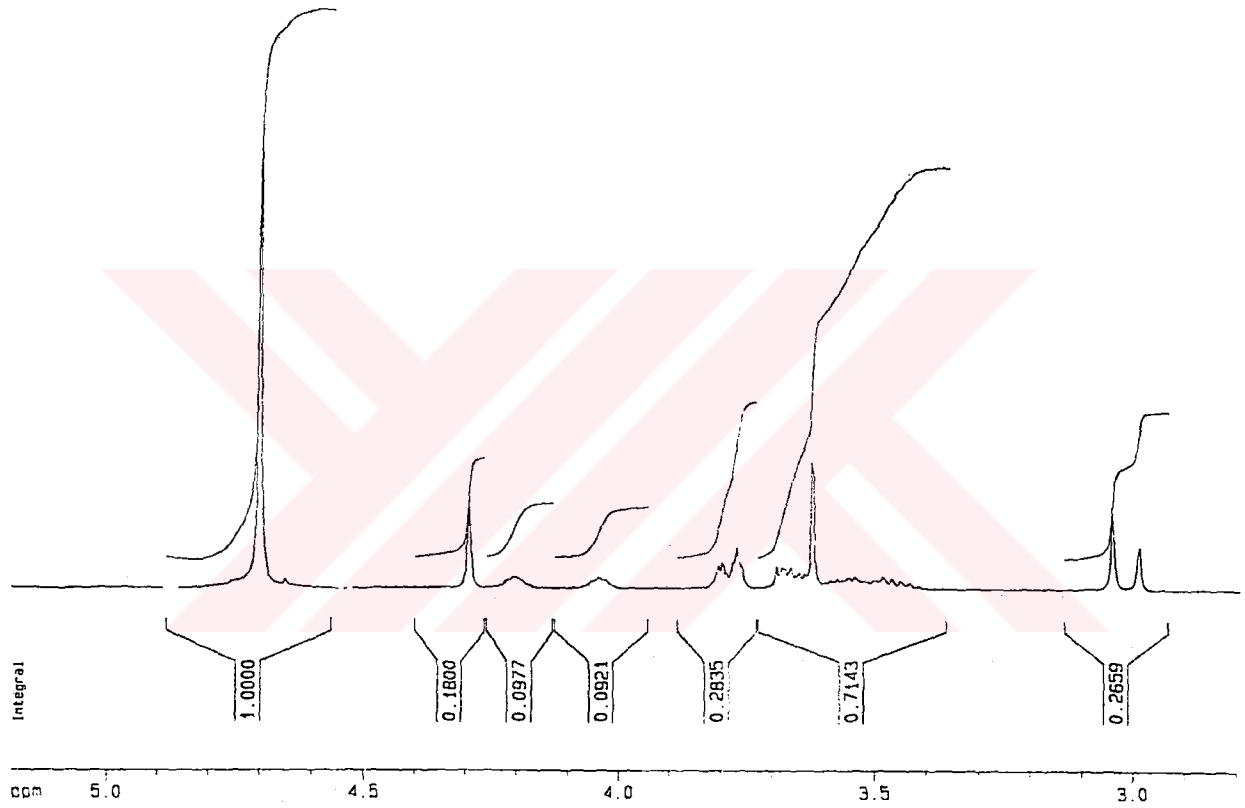


Şekil 21: Fluorescein Sodyum 'un % 2.5 Triton X-100 İçeren 20 mM Tris (pH 7.4) Tamponu İçinde Hazırlanan Standart Doğrusu.

II.1.1.8. NMR TEKNİĞİ İLE IOPROMİD' İN TANINMASI

Bölüm II.2.1.1.8' de anlatılan işlemler uygulanarak çekilen Iopromide ait spektrum Şekil 22' de verilmiştir.

Bu spektruma göre; 4.7, 4.3, 4.2, 4.1, 3.8, 3.7, 3.6, 3.5, 3.0 ppm' de sırasıyla O-H, CH₃-O-CH₂-CO, CH-OH, N-CH₂-CH-OH, OCH₃, N-CH₃, CH₂-OH ve N-CH₂ gruplarına ait karakteristik pikler görülmüştür. Bu bulguların literatürle uyumlu olduğu gözlenmiştir (2).



Şekil 22: Iopromid' in NMR Spektrumu

III.1.1.9. IOPROMİD' İN PARTİSYON KATSAYISININ TAYİNİ

Bölüm II.2.1.1.9' da verildiği gibi Iopromid' in partisyton katsayısı (yağ /su) 0.3 olarak bulunmuştur. Bu değerin literatürle uygun olduğu görülmüştür (2).

III.1.1.10. IOPROMİD' İN ERİME DERECEİ TAYİNİ

Bölüm II.2.1.1.10' da anlatıldığı şekilde yapılmış ve Iopromid' in erime derecesi 225-228 °C arasında bulunmuştur.

III.2. LİPOZOMLAR

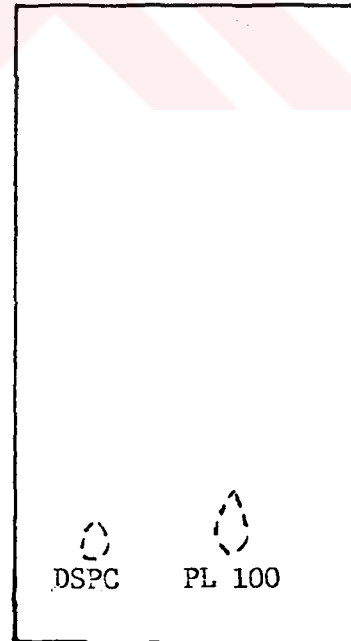
III.2.1. LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE İNCELEMELER

III.2.1.1. LİPOZOMLARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN STANDARDİZASYONU

III.2.1.1.1. FOSFOLİPİTLERİN STANDARDİZASYONU

III.2.1.1.1.1. İTK İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI

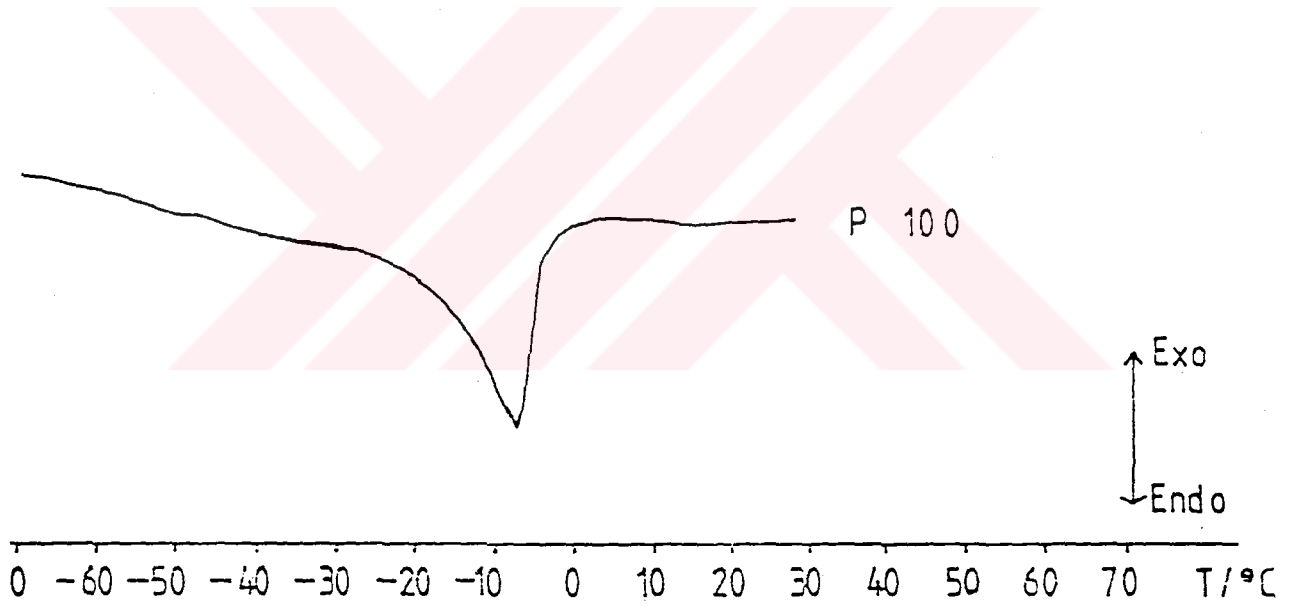
Bölüm II.2.2.1.1.2 'de anlatıldığı şekilde yapılan İTK analizi sonucu plaklar UV lambası altında 254 nm 'de incelenmiş ve sürüklenen madde mor renkte lekeler halinde gözlenmiştir. Şekildeki birinci leke DSPC 'ye aittir ve Rf değeri 0.13 olarak bulunmuştur. İkinci leke ise PL 100 'e aittir Rf değeri 0.15 'dir (Şekil 23).



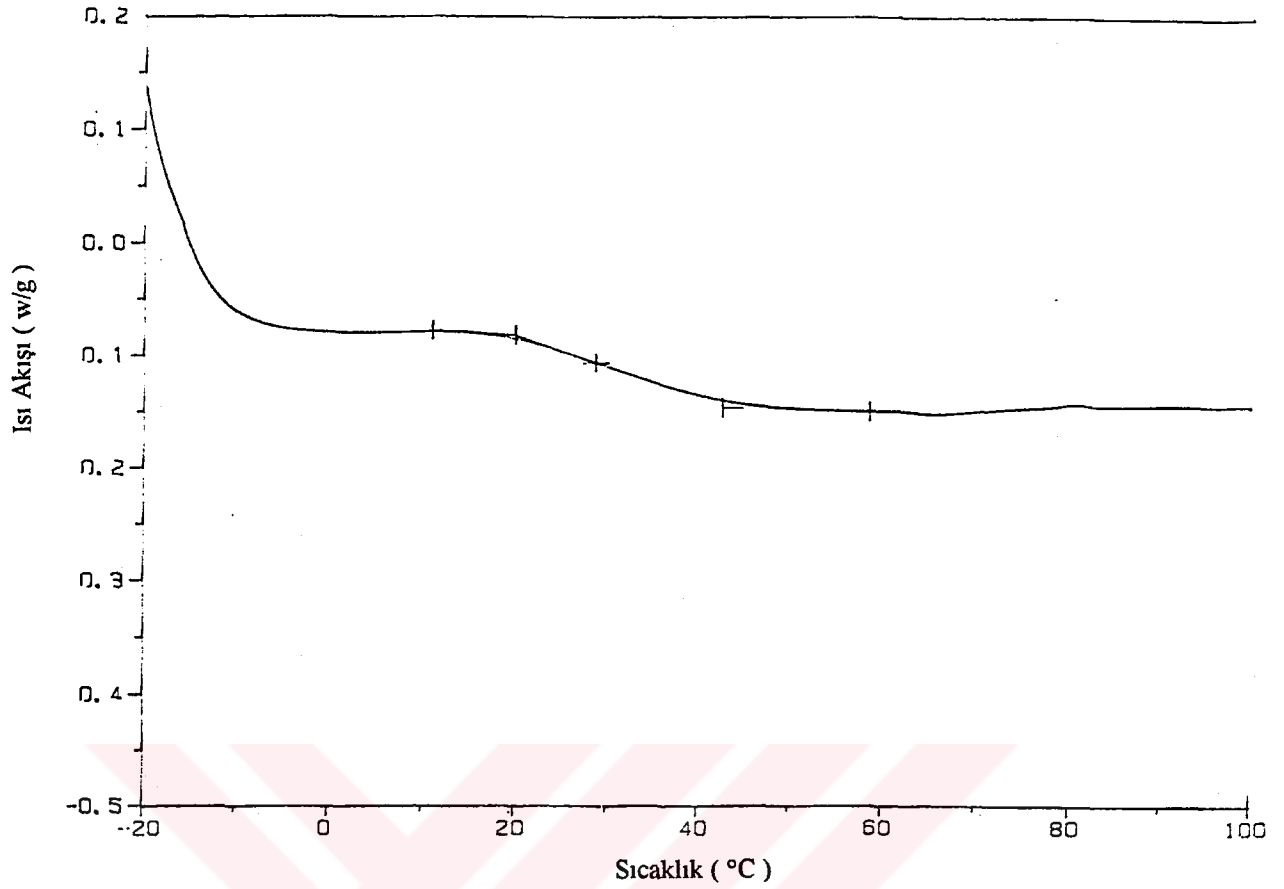
Şekil 23: PL 100 ve DSPC' nin İTK Kromatogramları

III.2.1.1.1.2. DSC İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI

Hazırlanan lipozom formülasyonlarında kullanılan fosfolipitlerin termal analiz eğrileri Bölüm II.2.2.1.1.3' de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Elde edilen termal analiz eğrileri Şekil 24 ve 25' de verilmiştir. Bu analiz eğrilerinden yararlanılarak kullanılan fosfolipitlerin T_c ' leri bulunmuştur. Buna göre jel tipte olan DSPC için $T_c = 42.65^\circ\text{C}$, sıvı kristalin tipte olan PL 100 için $T_c = -8^\circ\text{C}$ olarak bulunmuştur.



Şekil 24: PL 100 (Sıvı-Kristalin)' ün DSC Termogramı

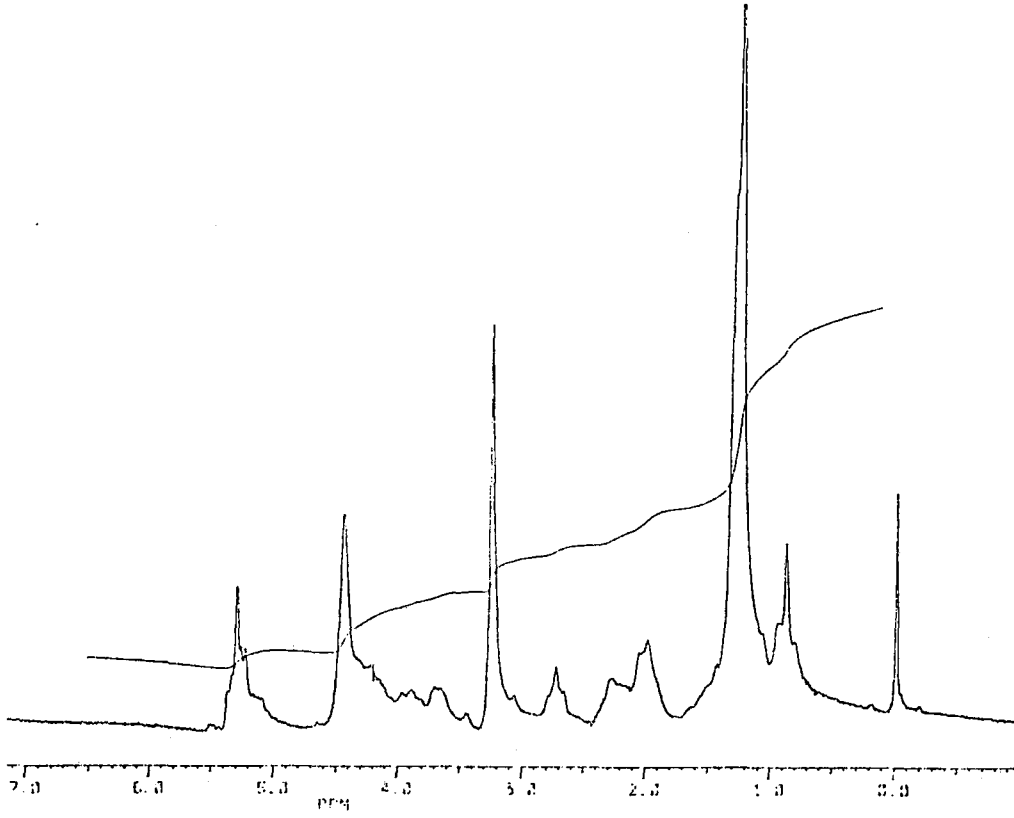


Şekil 25: DSPC (Jel)' nin DSC Termogramı

III.2.1.1.1.3. NMR TEKNİĞİ İLE FOSFOLİPİTLERİN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.1.4' de anlatılan işlemlerle formülasyonlarda kullanılan fosfolipitlere (DSPC, PL 100) ait ^1H -NMR spektrumları Şekil 26 ve 27' de verilmiştir.

Spektrum incelenecek olursa DSPC için 4.4, 4.3, 4.1, 3.9, 3.8, 3.4 ve 3.3 ppm de, PL 100 için 0.1, 0.9, 1.3, 2.0, 2.3, 2.8, 3.2, 3.4, 3.9, 4.0, 4.4, 5.3 ppm' de karakteristik pikler saptanmıştır.



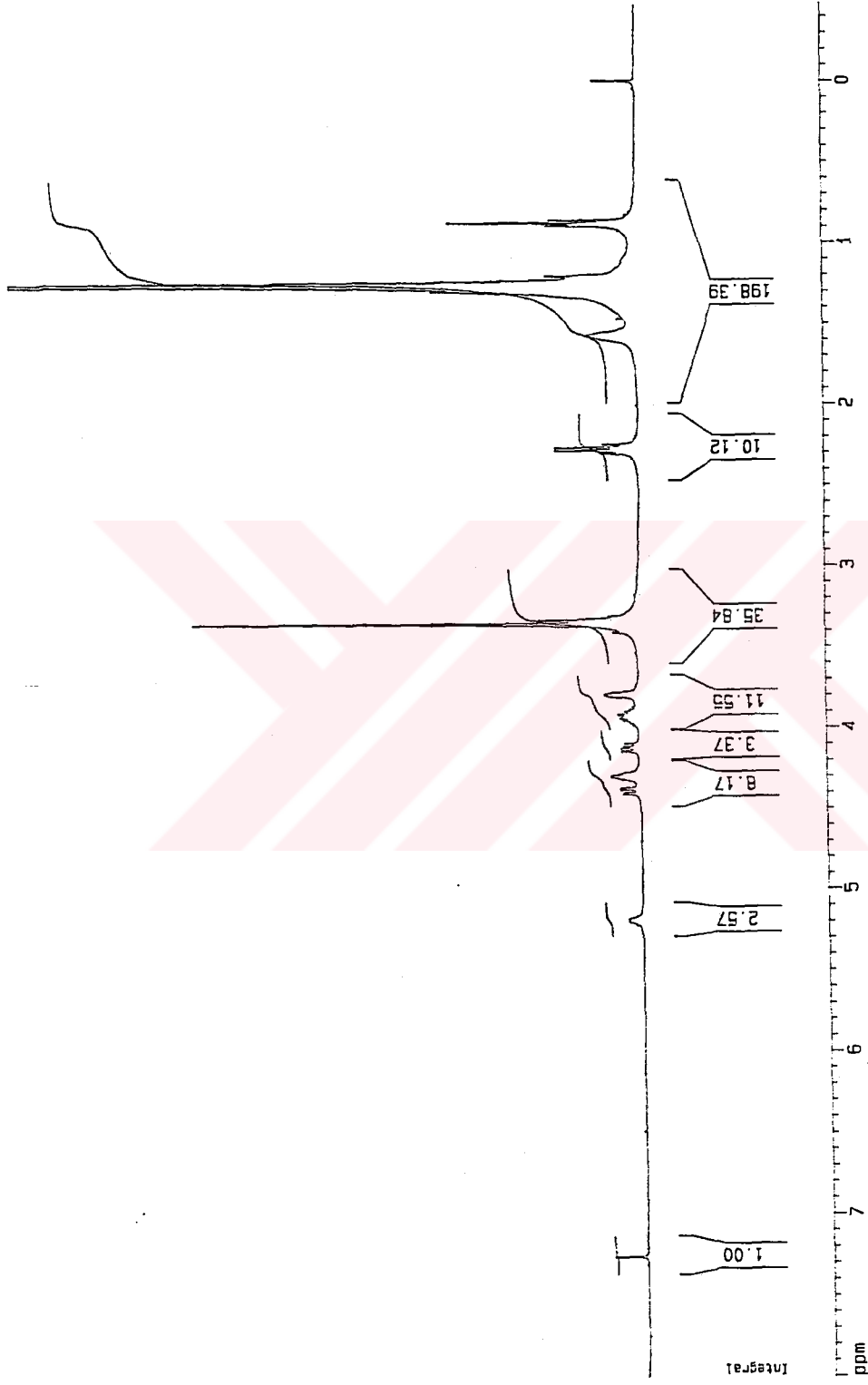
Şekil 26: PL 100' ün NMR Spektrumu

III.2.1.1.2. YÜK VERİCİ MADDELER

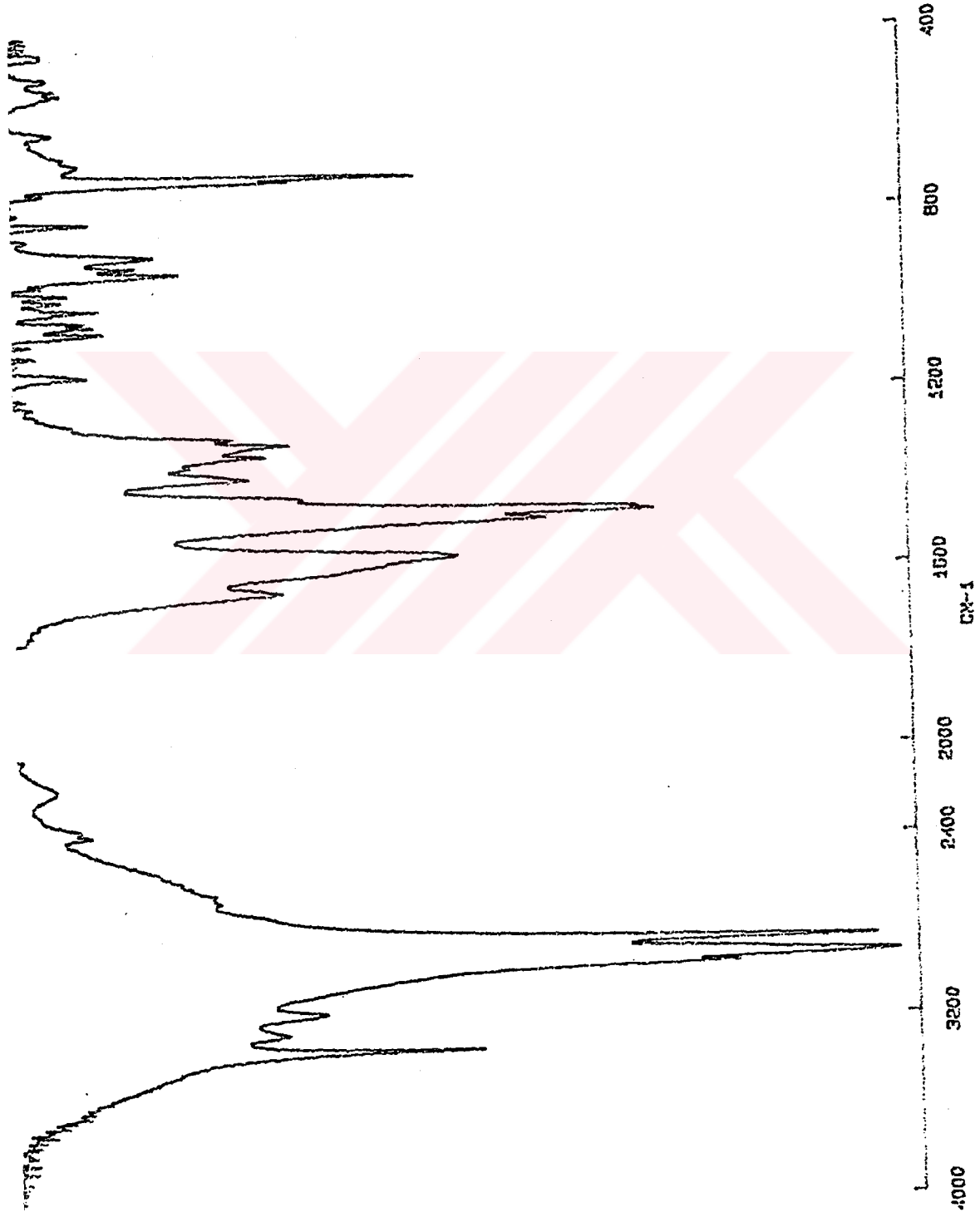
Bu bölümde lipozomların yapısına giren yük verici maddelerin özellikleri ait bulgular verilmiştir.

III.2.1.1.2.1. IR SPEKTRUMU İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

SA' in 4000 - 400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında çekilen IR spekturumunda 720, 893, 933, 1317, 1472, 1569, 1646, 2850, 2917, 3166, 3333 cm^{-1} de karakteristik pikler görülmüştür. Elde edilen spektrum Şekil 28' de verilmiştir.



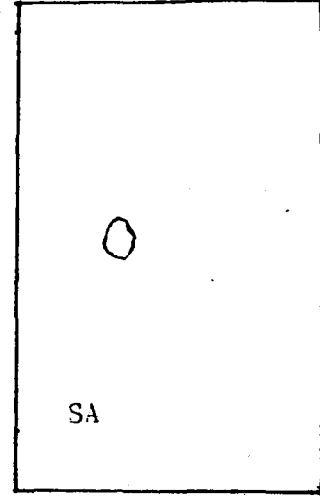
Şekil 27: DSPC' nin NMR Spektrumu



Şekil 28: Stearilamin'in IR Spektrumu

III.2.1.1.2.2. ITK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.2.2' de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Plaklar UV lambasında 254 nm' de incelenmiştir. Sarı renkli elde edilen lekelerin Rf değeri 0.34 olarak bulunmuştur (Şekil 29).



Şekil 29: Stearilamin' nin ITK Kromatogramı

III.2.1.1.3. STABİLİTE ARTIRICI MADDELER

III.2.1.1.3.1. ITK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI

Bölüm II.2.2.1.3.1 'de anlatıldığı gibi hazırlanmış plaklar UV lambasında 254 nm 'de kırmızı - kahverengi tek leke görülmüş ve Rf değeri 0.96 olarak hesaplanmıştır ve bu değer in literatüre uygun olduğu saptanmıştır (11) (Şekil 30).



Şekil 30: Kolesterol' ün ITK Kromatogramı

III.2.1.1.3.2. KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECESEİ TAYİNİ

Bölüm II.2.2.1.3.2' de anlatıldığı gibi kolesterolün erime derecesi 145 °C bulunmuştur. Bu değer in literatüre uygun olduğu gözlenmiştir (62)

III.2.2. LİPOZOM FORMÜLASYONLARI

Bölüm II.2.2.2 de sözü edilen ve denenen lipozom formülasyonları, molar bileşimleri ve gözlenen sonuçlar ise Tablo 3' de, çalışmalarımızda kullandığımız lipozom formülasyonları, molar bileşimleri ve kodları Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 3: Hazırlanan Tüm Formülasyonlar, Molar Bileşimleri ve Gözlenen Sonuçlar

FORMÜLASYON	MOLAR BİLEŞİM	GÖZLENEN SONUÇ
DSPC:SA:CHOL+IOP	10:1:4	Faz ayrımı gözlemlendi. Üstte yoğun bir lipit tabaka altta ise bulanık sıvı tabaka görüldü.
DSPC:SA:CHOL+IOP	7:1:2	Faz ayrımı gözlemlendi. Üstte yoğun bir lipit tabaka altta ise bulanık sıvı tabaka görüldü.
DSPC:SA:CHOL+IOP	4:1:5	Faz ayrımı gözlemlendi. Üstte lipit tabaka altta sıvı tabaka toplandı.
DSPC:DCP:CHOL+IOP	7:1:2	Faz ayrımı gözlemlendi. Üstte lipit tabaka altta sıvı tabaka toplandı.
DSPC:CHOL+IOP	10:4	Lipit ve sıvı fazın tamamen ayrıldığı gözlemlendi.
DSPC:CHOL+IOP	7:2	Lipit ve sıvı fazın tamamen ayrıldığı gözlemlendi.
DSPC:CHEMS:CHOL+IOP	7:1:2	Faz ayrımı gözlemlendi.
DSPC:SA:CHOL+IOP	7:1:4	Faz ayrımı çok az oluştu. Üst kısımda ince bir lipit tabaka oluştu.
DSPC:SA:CHOL+IOP	7:1:6	Faz ayrımı oluşmadı.
DSPC:SA:CHOL+IOP	7:2:4	Faz ayrımı oluşmadı. En iyi sonuç bu molar bileşimle elde edildi.
PL 100:CHOL+IOP	7:2	Tam bir faz ayrımı gözlemlendi.

Tablo 4: Çalışmalarda Kullanılan Lipozom Formülasyonları, Molar Bileşimleri ve Kodları

FORMÜLASYON	MOLAR BİLEŞİM	KODU
DSPC:SA:CHOL+IOP	7:2:4	E ₁
PL 100:SA:CHOL+IOP	7:2:4	E ₂
DSPC:SA:CHOL	7:2:4	E ₃
PL 100:SA:CHOL	7:2:4	E ₄

III.3. NISV' LAR

III.3.1. NISV' LARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ ÜZERİNDE BULGULAR

III.3.1.1. NISV' LARIN YAPISINA GİREN MADDELERİN STANDARDİZASYONU

III.3.1.1.1. SÜRFİKTANLARIN STANDARDİZASYONU

III.3.1.1.1.1. SÜRFİKTANLARIN HLB DEĞERLERİNİN SAPTANMASI

Bölüm II.2.3.1.1.2' de anlatılan formülle sürfaktanların HLB değerleri saptanmıştır.

SÜRFİKTAN I (Hekzadesil poli-(3)-gliserol) : $225 / 464 \times 20 = 9.68$

SÜRFİKTAN II (Dialkil poli-(7)-gliseröeter) : $535 / 472 \times 20 = 11$

olarak bulunmuştur.

HLB' si 8 -18 arasında değişen yüzey aktif maddeler Y /S tipi sürfaktan olup, hidrofilik özelliktedir. Sürfaktan I ve II 'nin HLB değeri bu sınırlar içindedir. Böylece bu sürfaktanların hidrofilik özellikte oldukları saptanmıştır.

III.3.1.1.1.2. SÜRFİKTANLARIN DSC İLE TANINMASI

Çalışılan NISV formülasyonlarında kullanılan jel tipte olan Sürfaktan I ve sıvı kristalin tipte olan Sürfaktan II 'nin termogramları Bölüm II.2.3.1.1.3 de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Elde edilen analiz eğrileri Şekil 31 ve 32' de verilmiştir.

Bu analiz eğrilerine göre Sürfaktan I için $T_c = 47$, Sürfaktan II için ise $T_c = 14.29$ olarak bulunmuştur.

III.3.1.1.1.3. SÜRFİKTANLARIN YÜZEY GERİLİMLERİNİN SAPTANMASI

Bölüm II.2.3.1.1.4' de anlatıldığı şekilde bulunan sürfaktanların yüzey gerilimleri Tablo 5 ve Şekil 33 'de verilmiştir. Referans çözelti olarak kullanılan distile suyun yüzey gerilimi $\gamma = 72.00 \pm 0.59 \text{ dyn.cm}^{-1}$ 'dir.

III.3.1.1.2. YÜK VERİCİ MADDELER

III.3.1.1.2.1. IR SPEKTRUMU İLE SA 'NIN TANINMASI

Bölüm II.2.3.1.2.1 'de anlatılan işlemlerle elde edilen IR spektrumu Şekil 28 de gösterilmiştir.

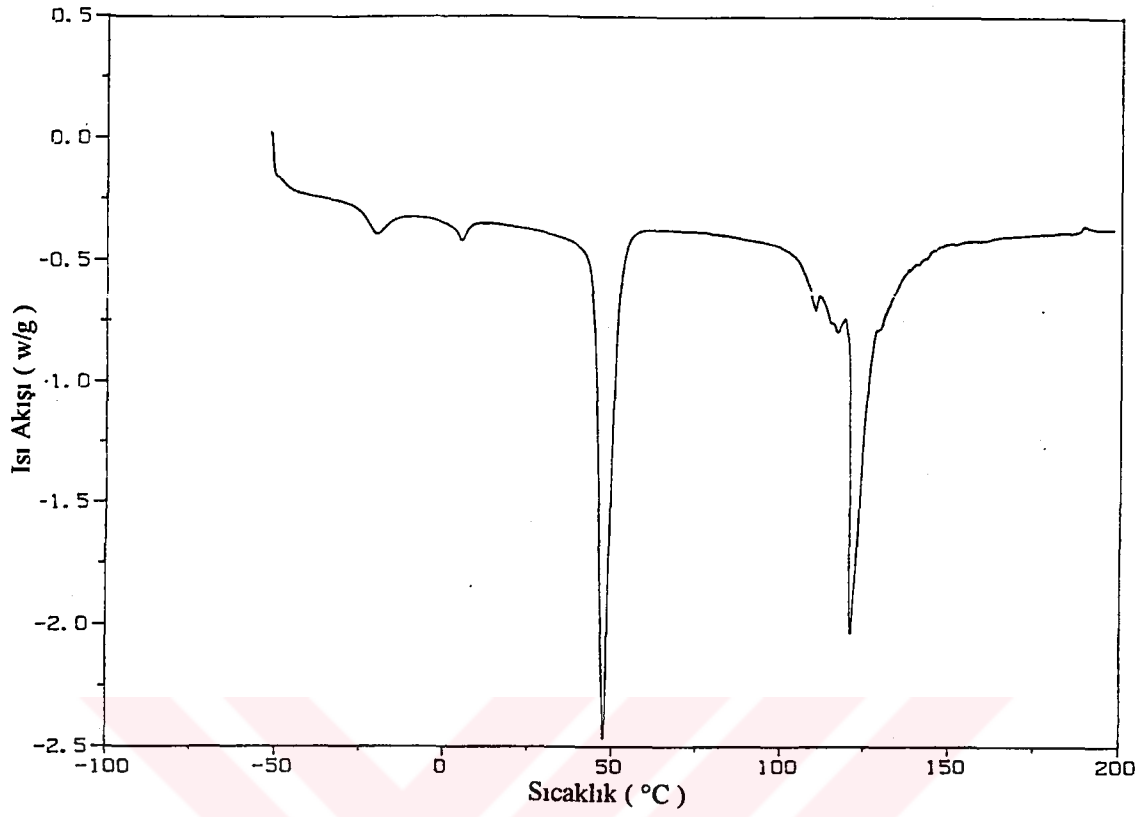
III.3.1.1.2.2. İTK İLE STEARİLAMİN' İN TANINMASI

Bölüm II.2.3.1.2' deki gibi yapılmış ve R_f değeri 0.34 olarak bulunmuştur.

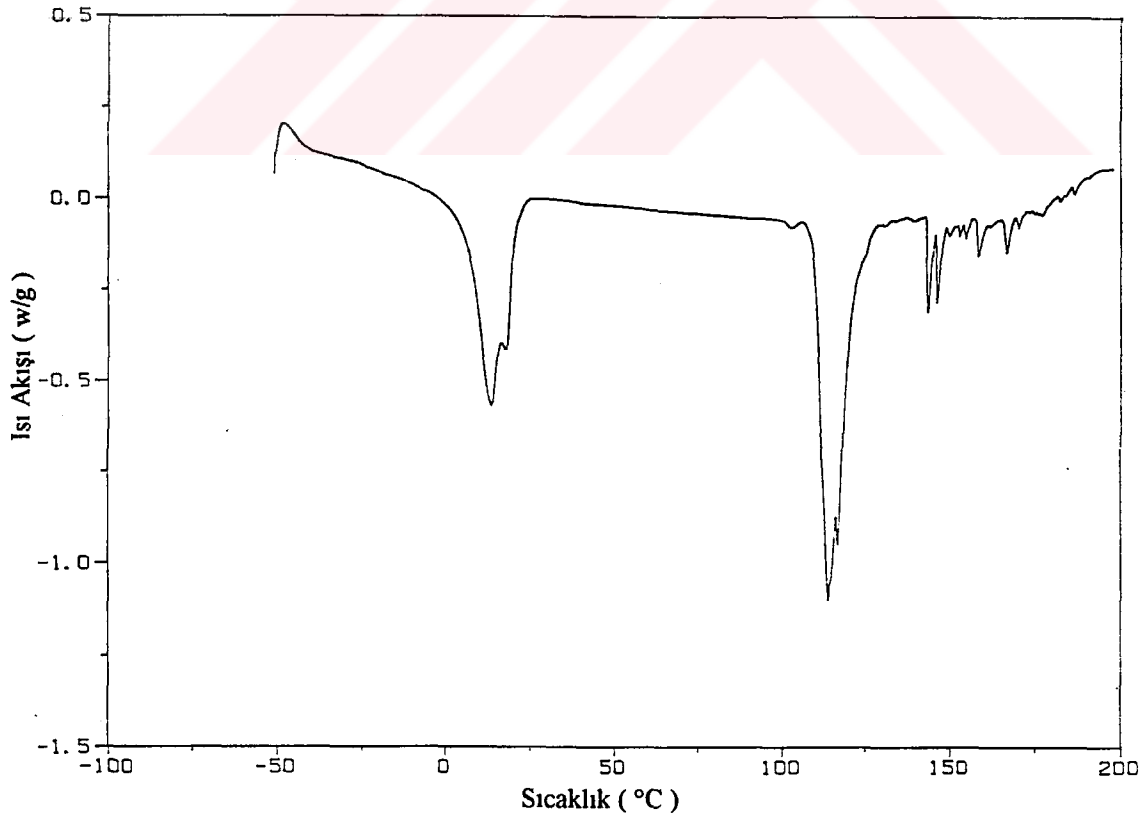
III.3.1.1.3. STABİLİTE ARTIRICI MADDELER

III.3.1.1.3.1. İTK İLE KOLESTEROL' ÜN TANINMASI

Bölüm II.2.3.1.3.1' de anlatılan işlemler sonucu $R_f = 0.96$ elde edilmiştir.



Şekil 31: Sürfaktan I (Jel Tip)' in DSC Termogramı



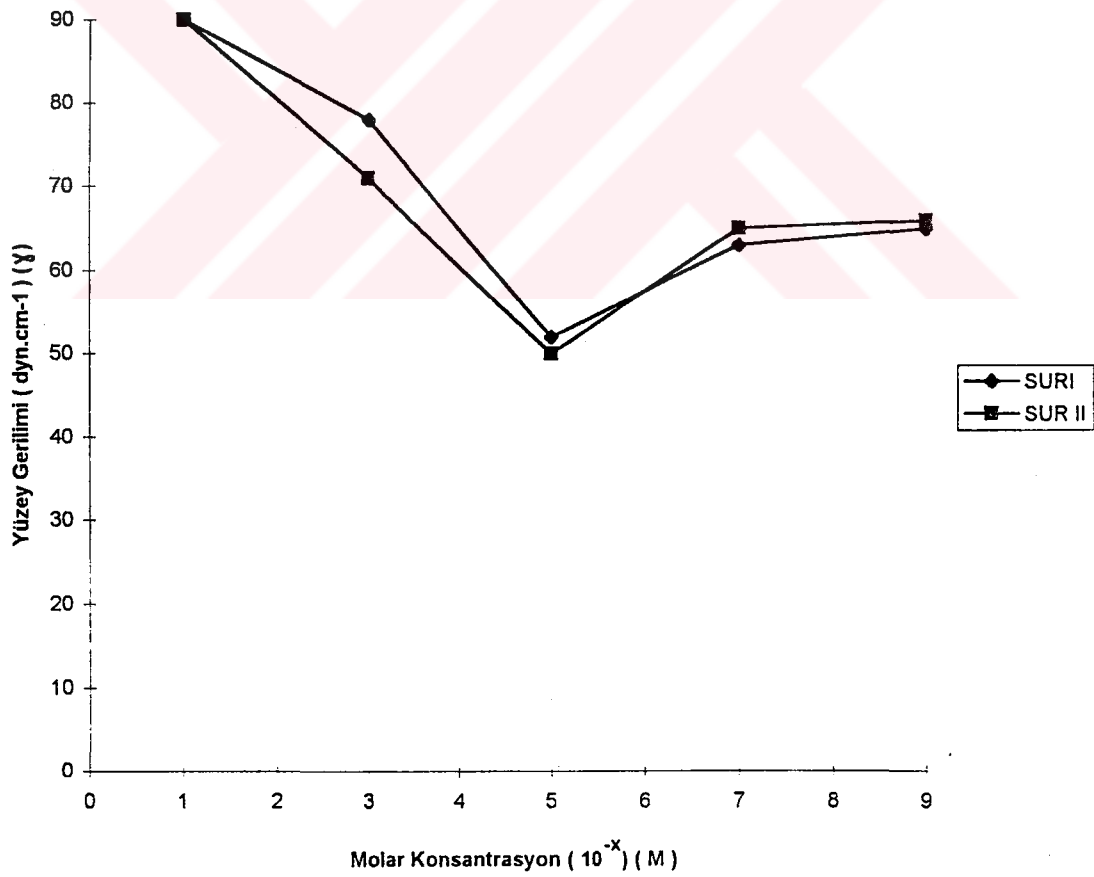
Şekil 32: Sürfaktan II (Sıvı-Kristalin Tip)' in DSC Termogramı

III.3.1.1.3.2. KOLESTEROL' ÜN ERİME DERECEİ TAYİNİ

Bölüm III.2.3.1.3.2' de anlatılan işlemler sonucu aynı değerler elde edilmiştir.

Tablo 5: Sürfaktan I ve Sürfaktan II 'in Yüzey Gerilimlerine İlişkin Bulgular

MOLAR KONSANTRASYON (M)	YÜZEY GERİLİM (dyn / cm ⁻¹) (γ)	
	SÜRFAKTAN I	SÜRFAKTAN II
10^{-1}	$>90 \pm 0.23$	$>90 \pm 0.06$
10^{-3}	78 ± 0.50	71 ± 0.50
10^{-5}	52 ± 0.63	50 ± 0.89
10^{-7}	63 ± 0.44	65 ± 0.95
10^{-9}	65 ± 0.06	66 ± 0.91



Şekil 33: Sürfaktan I ve Sürfaktan II' nin Yüzey Gerilim Grafikleri

III.3.2. NISV FORMÜLASYONLARI

Bölüm II.2.3.2' de söz edilen NISV formülasyonlarının molar bileşimleri ve kodları Tablo 6' da verilmiştir.

Tablo 6: Sıvı Kristalin ve Jel Tipte Iopromid-U İçeren ve Boş NISV Formülasyonlarının Bileşimi ve Kodları

FORMÜLASYON	MOLAR BİLEŞİMİ	KODU
SÜR I SA·CHOL+IOP	7:2:4	S ₁
SÜR II SA·CHOL+IOP	7:2:4	S ₂
SÜR I SA·CHOL	7:2:4	S ₃
SÜR II SA·CHOL	7:2:4	S ₄

III.4. HAZIRLANAN LİPOZOM VE NISV' LARIN ÖZELLİKLERİNE AİT BULGULAR

Bu bölümde hazırlanan lipozom ve NISV' ların partikül büyüklüğü dağılımları, formülasyonlarda serbest ve içte tutulan Iopromid miktarı, enkapsülasyon hacmi ve lipozomal fosfolipit miktarı ve verimine ait bulgular verilmiştir.

III.4.1. PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DAĞILIMLARI

Bölüm II.2.5.1' de anlatıldığı gibi lipozom ve NISV' ların partikül büyüklükleri tayin edilmiştir. Ortalama partikül büyüklüğü sonuçları Tablo 7a ve b 'de gösterilmiştir.

Tablo 7a: Iopromid-U İçeren Lipozom ve NISV Formülasyonlarının Ortalama Partikül Büyüklükleri

FORMÜLASYON SAFHA	ORTALAMA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)			
	E ₁	E ₂	S ₁	S ₂
Hazırladıktan 1 st Sonra	1.98 ± 1.84	1.961 ± 0.98	1.969 ± 0.79	1.874 ± 2.08
Sonikasyon Sonrası (45dk)	1.874 ± 1.51	1.738 ± 1.23	1.645 ± 1.02	1.671 ± 2.02
Ultrasontrifüj Sonrası (27000 g - 45 dk) 3kez	1.692 ± 2.02	1.524 ± 2.11	1.338 ± 1.34	1.592 ± 1.79
Ekstrusion Sonrası (1,0.8,0.6,0.4,0.22 µm)	1.323 ± 1.53	1.204 ± 1.86	1.271 ± 1.54	1.506 ± 0.99

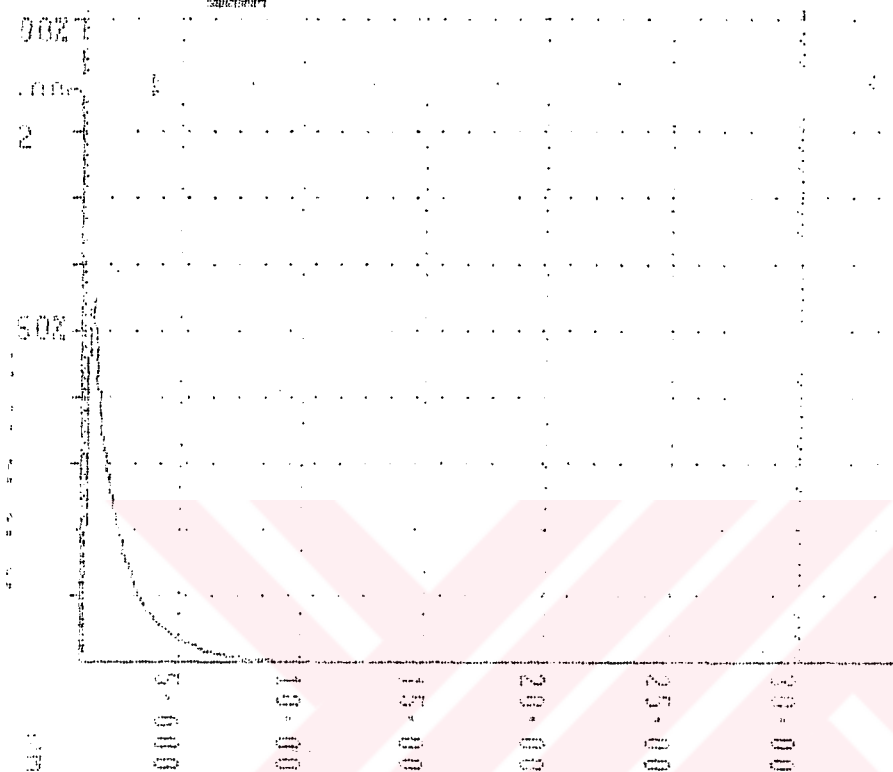
Tablo 7b: Iopromid-U İçermeyen Lipozom ve NISV Formülasyonlarının Ortalama Partikül Büyüklükleri

FORMÜLASYON SAFHA	ORTALAMA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)			
	E ₃	E ₄	S ₃	S ₄
Hazırladıktan 1 st Sonra	1.718 ± 1.2	1.645 ± 1.23	1.784 ± 0.55	1.83 ± 2.04
Sonikasyon Sonrası (45dk)	1.552 ± 0.76	1.576 ± 1.88	1.639 ± 1.87	1.606 ± 1.52
Ekstrusion Sonrası (1,0.8,0.6,0.4,0.22 µm)	1.323 ± 0.66	1.204 ± 1.34	1.338 ± 2.11	1.204 ± 1.04

III.4.2. LİPOZOMAL FOSFOLİPİT MİKTARI VE VERİMİ

Bölüm II.2.5.2 'de anlatılan işlemler uygulandıktan sonra bulunan boş ve etken maddeli sıvı kristalin ve jel tipte lipozomların, lipozomal fosfolipit miktarları ve verimleri Tablo 8 'de gösterilmiştir.

001 256 CHANNEL NARROW RANGE COULTER®
 ACC.LAM): Lin Dia. MULTISIZER II
 DISPLAY): Number Diff 11/03/96
 SUBTRACT: YES



µm 1.070µm 30.24µm
 ΔL=0 Σ=383059 ΔU=0

CUMULATED WITH CHANNELS SPACED LIN. BY DIA.

SIZE-µm	COUNTS	SIZE-µm	COUNTS	SIZE-µm	COUNTS
1.070 -	35682	1.200 -	26159	1.330 -	32786
1.459 -	21157	1.589 -	20569	1.719 -	23075
1.849 -	15607	1.978 -	19942	2.108 -	17226
2.238 -	11257	2.367 -	13860	2.497 -	12911
2.627 -	8467	2.756 -	10229	2.886 -	9235
3.016 -	6241	3.145 -	7561	3.275 -	6842
3.405 -	4657	3.534 -	5877	3.664 -	5114
3.794 -	3740	3.923 -	4399	4.053 -	4035
4.183 -	3004	4.312 -	3389	4.442 -	3184
4.572 -	2228	4.702 -	2619	4.831 -	2446
4.961 -	1900	5.091 -	2079	5.220 -	1989
5.350 -	1496	5.480 -	1666	5.609 -	1597
5.739 -	1151	5.869 -	1387	5.998 -	1228
6.128 -	900	6.258 -	1064	6.387 -	967
6.517 -	689	6.647 -	867	6.776 -	771
6.906 -	576	7.036 -	660	7.165 -	658
7.295 -	445	7.425 -	547	7.555 -	508
7.684 -	347	7.814 -	445	7.944 -	373
8.073 -	284	8.203 -	317	8.333 -	341
8.462 -	240	8.592 -	277	8.722 -	271
8.851 -	215	8.981 -	224	9.111 -	227
9.240 -	174	9.370 -	202	9.500 -	188
9.629 -	125	9.759 -	155	9.889 -	166
10.01 -	31	10.14 -	10	10.27 -	10

6	10.79 -	109	10.92 -	104	11.05 -	80
9	11.18 -	87	11.31 -	82	11.44 -	80
2	11.57 -	77	11.70 -	83	11.83 -	60
5	11.96 -	60	12.09 -	61	12.22 -	58
8	12.35 -	62	12.48 -	35	12.61 -	45
11	12.74 -	52	12.87 -	44	13.00 -	42
14	13.13 -	38	13.26 -	39	13.39 -	43
17	13.52 -	36	13.65 -	28	13.77 -	26
10	13.90 -	26	14.03 -	27	14.16 -	21
13	14.29 -	32	14.42 -	28	14.55 -	23
16	14.68 -	30	14.81 -	18	14.94 -	19
19	15.07 -	25	15.20 -	18	15.33 -	20
2	15.46 -	14	15.59 -	18	15.72 -	17
5	15.85 -	15	15.98 -	15	16.11 -	18
8	16.24 -	13	16.37 -	14	16.50 -	14
11	16.63 -	12	16.76 -	12	16.89 -	16
14	17.02 -	8	17.15 -	13	17.28 -	16
17	17.41 -	7	17.54 -	10	17.67 -	8
10	17.79 -	7	17.92 -	8	18.05 -	8
13	18.18 -	7	18.31 -	10	18.44 -	9
16	18.57 -	8	18.70 -	10	18.83 -	4
19	18.96 -	10	19.09 -	8	19.22 -	5
12	19.35 -	13	19.48 -	4	19.61 -	9
15	19.74 -	5	19.87 -	1	20.00 -	3
18	20.13 -	6	20.26 -	9	20.39 -	6
11	20.52 -	3	20.65 -	3	20.78 -	2
14	20.91 -	5	21.04 -	3	21.17 -	1
17	21.30 -	1	21.43 -	4	21.56 -	4
10	21.69 -	5	21.82 -	3	21.94 -	5
13	22.07 -	2	22.20 -	5	22.33 -	1
16	22.46 -	4	22.59 -	1	22.72 -	1
19	22.85 -	0	22.98 -	3	23.11 -	3
22	23.24 -	2	23.37 -	3	23.50 -	3
25	23.63 -	5	23.76 -	2	23.89 -	4
28	24.02 -	0	24.15 -	0	24.28 -	4
31	24.41 -	2	24.54 -	4	24.67 -	1
34	24.80 -	2	24.93 -	2	25.06 -	0
37	25.19 -	1	25.32 -	0	25.45 -	0
30	25.58 -	0	25.71 -	0	25.84 -	2
33	25.96 -	1	26.09 -	0	26.22 -	0
36	26.35 -	2	26.48 -	0	26.61 -	2
39	26.74 -	1	26.87 -	0	27.00 -	2
32	27.13 -	0	27.26 -	0	27.39 -	2
35	27.52 -	1	27.65 -	2	27.78 -	1
38	27.91 -	0	28.04 -	0	28.17 -	0
11	28.30 -	0	28.43 -	2	28.56 -	0
14	28.69 -	1	28.82 -	0	28.95 -	0
17	29.08 -	1	29.21 -	1	29.34 -	0
20	29.47 -	0	29.60 -	0	29.73 -	0
23	29.86 -	0	29.99 -	1	30.11 -	0
26	30.24 -	0	30.37 -	1	30.50 -	1
29	30.63 -	0	30.76 -	0	30.89 -	0
32	31.02 -	1	31.15 -	0	31.28 -	0
35	31.41 -	0	31.54 -	1	31.67 -	0
38	31.80 -	0	31.93 -	0	32.06 -	1
41	32.19 -	0	32.32 -	0	32.45 -	0
44	32.58 -	0	32.71 -	0	32.84 -	0
47	32.97 -	0	33.10 -	0	33.23 -	0
50	33.36 -	0	33.49 -	0	33.62 -	0
53	33.75 -	0	33.88 -	0	34.01 -	1
56	34.13 -	0				

Tablo 8: E₁, E₂, E₃, E₄ Kodlu Lipozom Formülasyonlarının Fosfolipit Miktarı ve Verimi

SARHA	E ₁		E ₂		E ₃		E ₄	
	Fosfolipit miktarı (mg.mL ⁻¹)	Fosfolipit Verimi (%)	Fosfolipit miktarı (mg.mL ⁻¹)	Fosfolipit Verimi (%)	Fosfolipit miktarı (mg.mL ⁻¹)	Fosfolipit Verimi (%)	Fosfolipit miktarı (mg.mL ⁻¹)	Fosfolipit Verimi (%)
Başlangıçta	23.424	100	26.976	100	23.424	100	26.976	100
Banyo sonikasyonu Sonrası (45dk)	22.752	97.1	25.728	95.4	21.924	93.6	24.386	90.4
Ultrasonitifleme Sonrası (27000g 45 dk)	20.928	89.3	22.080	81.9	20.580	87.6	21.958	81.4
Ekstrüzyon Sonrası (1µm, 0.8µm, 0.6µm, 0.4µm ve 0.22 µm)	18.816	80.3	21.420	79.4	12.203	52.1	11.411	42.3

III.4.3. LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA IOPROMİD MİKTARI

III.4.3.1. VEZİKÜL İÇİNDE HAPSEDİLEN IOPROMİD MİKTARI

Bölüm II.2.5.3.1' de anlatılan işlemler sonucu lipozom ve NISV dispersiyonlarında hapsedilen Iopromid miktarına ait bulgular Tablo 9' da ve istatistiksel karşılaştırmaları Tablo 10' da verilmiştir.

III.4.3.2. LİPOZOM VE NISV FORMÜLASYONLARINDA SERBEST IOPROMİD MİKTARI

Bölüm II.2.5.3.2' de anlatılan işlemler sonucu lipozom ve NISV dispersiyonlarında serbest Iopromid miktarına ait bulgular Tablo 10' da gösterilmiştir.

Tablo 9: (7:2:4) Molar Bileşimine Sahip Sıvı Kristal ve Jel Tipte Lipozom ve NISV Formülasyonlarında Etken Madde Miktarı

	E ₁	E ₂	S ₁	S ₂
Başlangıçtaki miktar (mg.mL ⁻¹)	46.14 ± 0.005	46.14 ± 0.005	46.14 ± 0.005	46.14 ± 0.005
I Supernatant (mg.mL ⁻¹)	27.66 ± 0.01	24.15 ± 0.05	26.28 ± 0.01	28.95 ± 0.04
II Supernatant (mg.mL ⁻¹)	9.22 ± 0.01	10.27 ± 0.01	9.45 ± 0.01	10.46 ± 0.04
III Supernatant (mg.mL ⁻¹)	3.68 ± 0.03	6.16 ± 0.02	4.97 ± 0.02	2.61 ± 0.02
Hapsedilen miktar (mg.mL ⁻¹)	4.7 ± 0.02	4.37 ± 0.02	3.78 ± 0.03	3.96 ± 0.01
Verim (%)	10.2	9.4	8.2	8.6

Tablo 10: (7:2:4) Molar Bileşimli Lipozom ve NISV Formülasyonlarında Hapsedilen Etken Madde Miktar Tayini Sonuçlarının İstatistiksel Değerlendirilmesi

FORMÜLASYON	E ₁	S ₁	E ₁	E ₂
TUTULAN ETKEN MADDE MIKTARI (mg.mL ⁻¹)	4.7	3.78	4.7	4.37
FORMÜLASYON	E ₂	S ₂	S ₁	S ₂
TUTULAN ETKEN MADDE MIKTARI (mg.mL ⁻¹)	4.37	3.96	3.78	3.96
T TESTİ SONUCU	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05

III.4.4. LİPOZOM VE NISV' LARIN TABAKA SAYISI

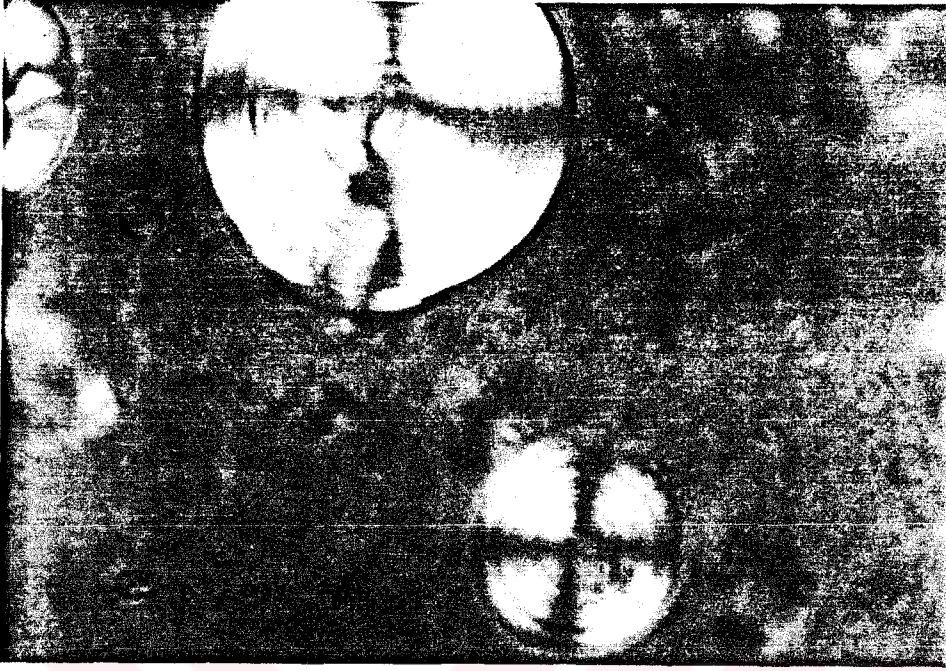
Iopromid-U içeren lipozom ve NISV formülasyonları polarizan mikroskopta incelenmiş ve MLV tipinde olduğu gözlenmiştir (Şekil 34-37)

III.4.5. LİPOZOM VE NISV' LARIN ENKAPSÜLASYON HACMİ

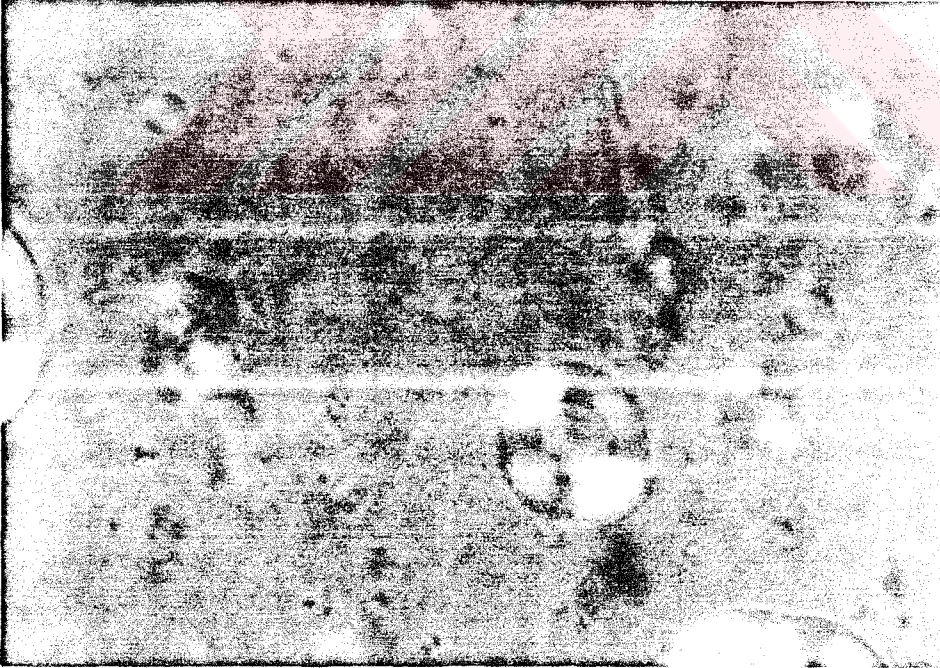
Bölüm II.2.2.5 de anlatıldığı şekilde lipozom ve NISV formülasyonlarının enkapsülasyon hacimleri hesaplanmıştır. Enkapsülasyon hacimleri E₁ için 4.17 µl.mL⁻¹, E₂ için 3.82 µl.mL⁻¹, S₁ için 4.20 µl.mL⁻¹, S₂ için 4.85 µl.mL⁻¹ olarak bulunmuştur.

III.4.6. LİPOZOM VE NISV' LARIN STABİLİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

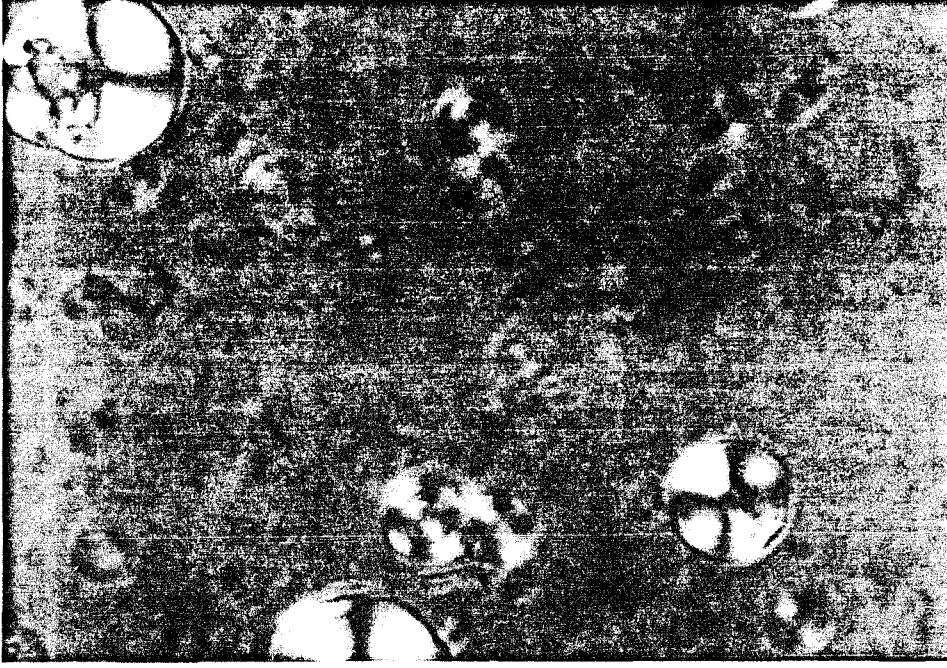
Bu kısımda farklı bekletme şartlarında tutulan lipozom ve NISV' lara ait fiziksel stabilite sonuçlarına ait bulgular verilmiştir.



Şekil 34: Iopromid-U İçeren E₁ Lipozomların Polarizan Mikrografları (x 40X)



Şekil 35: Iopromid -U İçeren E₂ Lipozomlarının Mikrografları (x 40X)



Şekil 36: Iopromid-U İçeren S₁ NISV' larının Polarizan Mikrografları (x 40X)



Şekil 37: Iopromid -U İçeren S₂ NISV' larının Mikrografları (x 40X)

III.4.6.1. SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERDEN ETKEN MADDE KAYBEDİLMESİ

Bölüm II.2.5.6.1’ de anlatılan işlemler sonucunda elde edilen bulgular Tablo 11 ve 12 ‘de gösterilmiştir.

Tablo 11: Değişik Sıcaklıklarda Saklanan Iopromid İçeren Sıvı Kristal ve Jel Tipte Lipozom Formülasyonlarının Fiziksel Stabilitate Bulguları

DURUM		BEKLEMEDE İOPROMİD KAYBI (%)														
		ZAMAN (gün)														
Formülasyon	Saklama Şartları *	1	2	3	4	5	6	7	10	14	21	28	35	42	49	60
E ₁	Oda Sıcaklığı	17	-	28	-	32	-	39	-	42	49	59	71	82	87	91
	Buzdolabı Sıcaklığı	10	-	17	-	24	-	26	-	31	46	52	67	71	77	83
E ₂	Oda Sıcaklığı	21	28	34	37	42	47	52	57	62	67	71	77	84	88	97
	Buzdolabı Sıcaklığı	15	17	21	24	29	32	37	44	47	53	62	65	71	82	95

Tablo 12: Değişik Sıcaklıklarda Saklanan Iopromid İçeren Sıvı Kristal ve Jel Tipte NISV Formülasyonlarının Fiziksel Stabilitate Bulguları

DURUM		BEKLEMEDE İOPROMİD KAYBI (%)														
		ZAMAN (gün)														
Formülasyon	Saklama Şartları *	1	2	3	4	5	6	7	10	14	21	28	35	42	49	60
S ₁	Oda Sıcaklığı	11	-	17	-	21	-	27	-	31	42	49	60	65	71	74
	Buzdolabı Sıcaklığı	6	-	13	-	14	-	23	-	34	38	44	52	54	61	66
S ₂	Oda Sıcaklığı	10	13	15	19	24	29	35	39	43	47	51	56	62	69	74
	Buzdolabı Sıcaklığı	8	10	15	17	20	22	26	28	32	37	46	54	57	63	67

* ODA SICAKLIĞI +21 °C ‘tir.

* BUZDOLABI SICAKLIĞI +4 °C ‘tir.

*** Jel tipte lipozom ve NISV’ lar için ilk hafta 1, 3, 5 ve 7. günlerde, sıvı kristalin tipte lipozom ve NISV’ lar için ise ilk hafta 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. günlerde ölçüm yapılmıştır. Bu nedenle ölçüm yapılmayan günler “ (-) ” ile gösterilmiştir.

III.4.6.2. SAKLAMA SIRASINDA İNCELENEN VEZİKÜLLERİN PARTİKÜL BÜYÜKLÜKLERİ

Bölüm II.2.5.6.2' de anlatılan işlemler sonucunda elde edilen sonuçlar Tablo 13 ve 14' de ve Şekil 38 ve 39' da verilmiştir.

Tablo 13: Jel ve Sıvı-Kristalin Tipte Lipozom Formülasyonlarının Fiziksel Stabilité Çalışmaları Sırasında Gözlenen Ortalama Partikül Büyüklükleri

ZAMAN (gün)	ORTALAMA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)			
	DSPC:SA:CHOL+IOP (7:2:4)		PL 100:SA:CHOL+IOP (7:2:4)	
	Oda Sıcaklığı	Buzdolabı Sıcaklığı	Oda Sıcaklığı	Buzdolabı Sıcaklığı
1	1.410	1.807	1.807	1.412
2	-	1.931	1.931	1.683
3	1.520	1.798	1.798	1.696
4	-	1.918	1.918	1.525
5	1.683	1.718	1.718	1.738
6	-	1.786	1.786	1.591
7	1.414	1.808	1.808	1.844
10	-	1.873	1.873	1.939
14	1.581	1.985	1.985	1.873
21	1.812	1.673	1.673	1.940
28	1.940	1.762	1.762	1.950
35	1.939	1.576	1.576	2.007
42	1.844	1.852	1.852	1.852
49	1.961	1.963	1.963	1.961
60	1.985	2.064	2.064	2.005

Tablo 14: Jel ve Sıvı Kristal Tipte NISV Formülasyonlarının Fiziksel Stabilité Çalışmaları Sırasında Gözlenen Ortalama Partikül Büyüklükleri

ZAMAN (gün)	ORTALAMA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ (µm)			
	SUR I: SA: CHOL +IOP (7:2:4)		SUR II: SA: CHOL +IOP (7:2:4)	
	Oda Sıcaklığı	Buzdolabı Sıcaklığı	Oda Sıcaklığı	Buzdolabı Sıcaklığı
1	1.410	1.457	1.587	1.434
2	-	-	1.568	1.645
3	1.521	1.450	1.645	1.560
4	-	-	1.410	1.798
5	1.504	1.524	1.524	1.450
6	-	-	1.683	1.591
7	1.538	1.504	1.584	1.742
10	-	-	1.852	1.725
14	1.807	1.579	1.738	1.504
21	1.718	1.659	1.786	1.808
28	1.786	1.632	1.673	1.739
35	1.844	1.584	1.808	1.917
42	1.836	1.772	1.940	1.931
49	1.931	1.847	2.001	2.033
60	1.963	1.939	1.961	2.045

* ODA SICAKLIĞI +21 °C ‘tir.

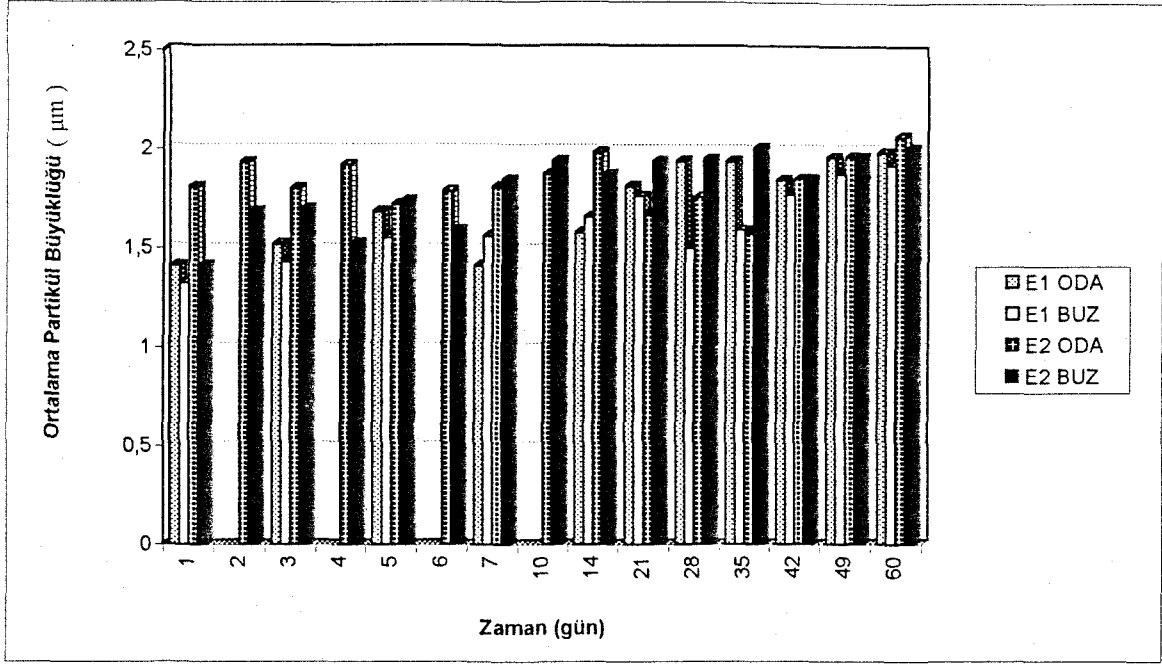
* BUZDOLABI SICAKLIĞI +4 °C ‘tir.

*** Jel tipte lipozom ve NISV’ lar için ilk hafta 1, 3, 5 ve 7. günlerde, sıvı kristalin tipte lipozom ve NISV’ lar için ise ilk hafta 1, 2, 3, 4, 5, 6 ve 7. günlerde ölçüm yapılmıştır. Bu nedenle ölçüm yapılmayan günler “ (-) ” ile gösterilmiştir.

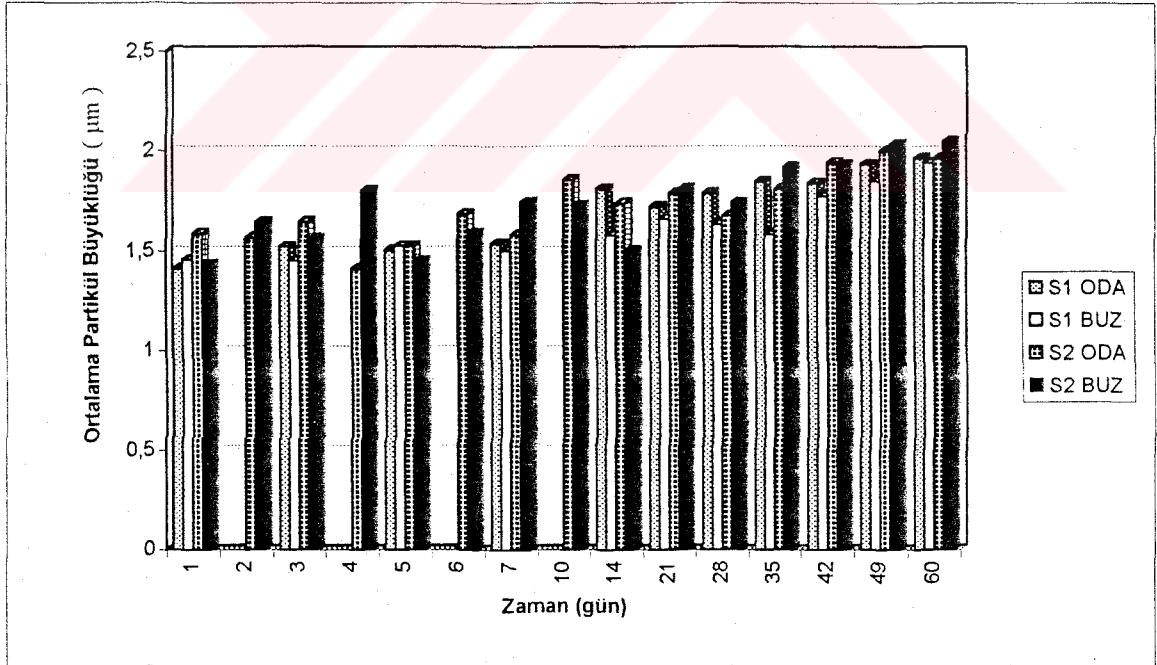
III.4.7. LİPOZOM VE NISV’ LARDA IOPROMİD’ İN İN VİTRO SALIMINA AİT BULGULAR

Bölüm II.2.5.7’ de anlatılan işlemler sonucunda elde edilen in vitro salım bulguları Tablo 15’ ve Şekil 40, 41’ de gösterilmiştir. Elde edilen verilere göre etken maddenin, lipozom ve NISV formülasyonlarından salımının hangi modele uygunluk gösterdiği araştırılmıştır.

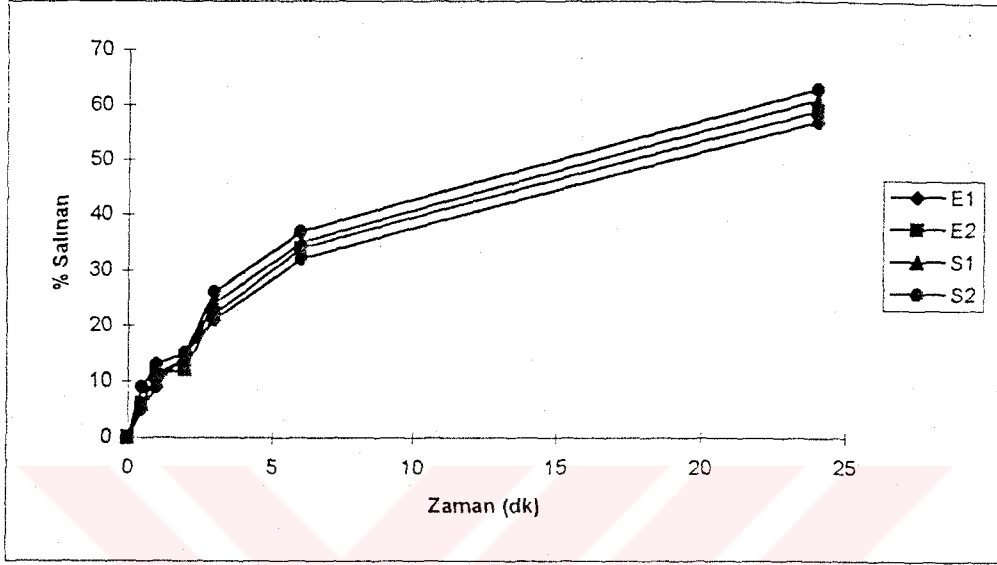
Şekil 38: Değişik Sıcaklıklarda Saklanan E1 ve E2 Formülasyonlarının Ortalama Partikül Büyüklüğü Değişimleri



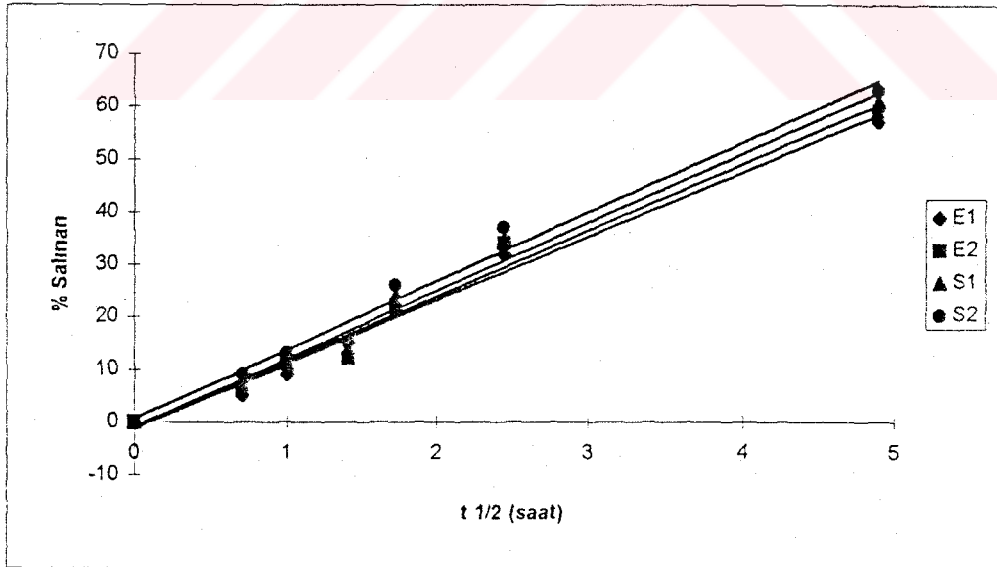
Şekil 39: Değişik Sıcaklıklarda Saklanan S1 ve S2 Formülasyonlarının Ortalama Partikül Büyüklüğü Değişimleri



Şekil 40: Iopromid E1, E2, S1, S2 Formülasyonlarından İn Vitro Salım Çalışmasına Ait Sonuçlar



Şekil 41: Iopromid' in Lipozom ve NISV' lardan İn Vitro Salımının Higuchi Eşitliğine Uygunluğu



III.4.7.1. IN VITRO SALIM SIRASINDA İOPOMİD' İN STABİLİTESİNİN VE PARÇALANMA ÜRÜNLERİNİN İNCELENMESİ

İn vitro salım sırasında parçalanma olup olmadığını incelemek için Bölüm II.2.5.7.1 de anlatıldığı şekilde İTK yapılmış ve salım ortamından alınan Iopromide ait lekenin Rf değeri (0.52) ile standart Iopromid 'in Rf değeri (0.52) karşılaştırılmış ve başka lekeye rastlanmamıştır.

Tablo 15: Iopromid 'in Çeşitli Lipozom ve NISV Formülasyonlarından Salımının Kinetik Modellere Uygunluğu

KINETİK		E ₁	E ₂	S ₁	S ₂
Higuchi	Eğim	-2.079	-2.068	-1.651	0.472
	Kesişim	12.414	12.818	13.187	13.126
	r	0.993	0.988	0.986	0.988
	r ²	0.986	0.976	0.972	0.976
O.Derece	Eğim	2.026	2.097	0.515	2.147
	Kesişim	10.842	11.2376	2.1501	13.632
	r	0.953	0.951	0.949	0.951
	r ²	0.908	0.904	0.900	0.904
I.Derece	Eğim	9.317	9.803	10.466	12.616
	Kesişim	13.693	14.036	14.535	14.386
	r	0.979	0.967	0.975	0.968
	r ²	0.958	0.935	0.951	0.937

III.4.8. LİPOZOM VE NISV' LARLA YAPILAN İN VİVO ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

Bu bölümde lipozom ve NISV' ların radyoaktif işaretlenmesi, işaretlemenin kalite kontrolü ve ratlarda yapılan biyodağılım ve radyolojik çalışmalara ait bulgular üzerinde durulacaktır.

III.4.8.1. ^{99m}Tc İLE YAPILAN RADYOAKTİF İŞARETLEMENİN KALİTE KONTROL BULGULARI

Bölüm II.2.5.8.1' de anlatıldığı şekilde radyoaktif işaretleme yapıldıktan sonra Bölüm II.2.5.8.2 de anlatıldığı şekilde işaretlemenin kalite kontrolü ITLC-SG şeritleri kullanılarak ACD'de yapılmıştır. Sonuçlar Tablo 16 ve 17' de verilmiştir.

Tablo 16: Iopromid-U İçeren Lipozom Formülasyonlarının Radyokimyasal Safılık Sonuçları

RADYOFARMASÖTİK	^{99m}Tc	Rf	RADYOAKTİVİTE (%)
^{99m}Tc ile işaretli E ₁ , E ₂ , E ₃ , E ₄ kodlu lipozomlar	Bağlı	0.0	> 99
	Perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) + Hidrolize İndirgenmiş Tc (H-R ^{99m}Tc)	1.0	<1

Tablo 17: Iopromid-U İçeren NISV Formülasyonlarının Radyokimyasal Safılık Sonuçları

RADYOFARMASÖTİK	^{99m}Tc	Rf	RADYOAKTİVİTE (%)
^{99m}Tc ile işaretli S ₁ , S ₂ , S ₃ , S ₄ kodlu NISV 'ler	Bağlı	0.0	> 99 (97*)
	Perteknetat ($^{99m}\text{TcO}_4^-$) + Hidrolize İndirgenmiş Tc (H-R ^{99m}Tc)	1.0	<1 (3*)

* Parentez içinde verilen değerler S₂ kodlu NISV formülasyonuna aittir.

III.4.8.2.RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN BİYODAĞILIM ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

Iopromid-U içeren ^{99m}Tc ile işaretli lipozom ve NISV dispersiyonları ratlara i.v. uygulanmış böbrek, RES ve diğer organlar Bölüm II.2.5.8.3 de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Bu sonuçlara göre lipozomların karaciğerde, NISV' larinde böbrekte en fazla toplandığı görülmüştür. Öldürdükten sonra çekilen sintigrafi görüntüleri Şekil 50-54' de gösterilmiştir.

Lipozom dispersiyonlarına ait toplu sonuçlar Tablo 18-21 ve Şekil 42-45' de NISV dispersiyonlarına ait toplu sonuçlar ise Tablo 22-25 ve Şekil 46-49' da gösterilmiştir. Ayrıca organ tutumlarının istatistiksel karşılaştırılması da yapılmıştır (Tablo 26-29).

Öldürülen ratların sintigrafi görüntüleri Şekil 50-53' de gösterilmiştir.

Tablo 26: E₁, E₂, E₃, E₄ Formülasyonlarının Organ Dağılımlarının İstatistiksel Karşılaştırması (T Testi)

ORGANLAR	FORMÜLASYONLAR			
	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄
Karaciğer ve Böbrek	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05
Karaciğer ve Dalak	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05
Karaciğer ve Pankreas	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05

Tablo 27: E₁ ve E₂ Formülasyonlarının Karaciğer Dağılımlarının İstatistiksel Karşılaştırması (T Testi)

FORMÜLASYON	T TESTİ
E ₁ ve E ₂	P > 0.05

Tablo 28: S₁, S₂, S₃, S₄ Formülasyonlarının Organ Dağılımlarının İstatistiksel Karşılaştırması (T Testi)

ORGANLAR	FORMÜLASYONLAR			
	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄
Böbrek ve Karaciğer	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
Böbrek ve Dalak	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05
Böbrek ve Pankreas	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05	p < 0.05

Tablo 29: S₁ ve S₂ Formülasyonlarının Böbrek Dağılımlarının İstatistiksel Karşılaştırması (T Testi)

FORMÜLASYON	T TESTİ
S ₁ ve S ₂	P > 0.05

Tablo 18: ^{99m}Tc ile İşaretli E₁ Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)
5	0.8369	0.0325	0.0701	0.0045	0.1643	0.0121	3.7873	0.0032	0.1474	0.0041	0.0237	0.0095	0.3075	0.0357	6.6023	0.0023
10	0.3459	0.0267	0.0288	0.0055	0.1399	0.0011	14.7511	0.0054	0.0381	0.0234	0.0051	0.0121	0.7617	0.0056	6.8839	0.0058
20	0.0022	0.0213	0.0427	0.0468	1.2926	0.0034	16.6582	0.0162	0.0179	0.0033	0.0043	0.0038	1.0533	0.0029	17.3236	0.0087
30	0.4336	0.0045	0.0769	0.0281	1.8716	0.0045	21.2167	0.0002	0.0437	0.0141	0.0037	0.0016	2.5806	0.0111	37.1497	0.0167
60	0.333	0.0021	0.0821	0.0075	1.9466	0.0016	22.0843	0.0049	0.1187	0.0231	0.0249	0.0009	3.1057	0.0056	46.098	0.0423
120	0.1688	0.0141	0.0509	0.0078	1.2604	0.0032	8.4629	0.0078	0.0687	0.0067	0.0365	0.0461	1.7378	0.0054	39.2775	0.0251
180	0.5331	0.0010	0.0493	0.0007	1.2018	0.0465	5.6472	0.0141	0.0511	0.0372	0.0308	0.0137	0.9618	0.0045	37.5519	0.0067
24(st)	0.0678	0.0790	0.0306	0.0567	1.0449	0.0180	3.4124	0.0132	0.0469	0.0161	0.0221	0.0287	0.7439	0.0009	16.5184	0.0078

Tablo 19: ^{99m}Tc ile İşaretli E₂ Formülasyonuna Ait Biyodagılım Sonuçları

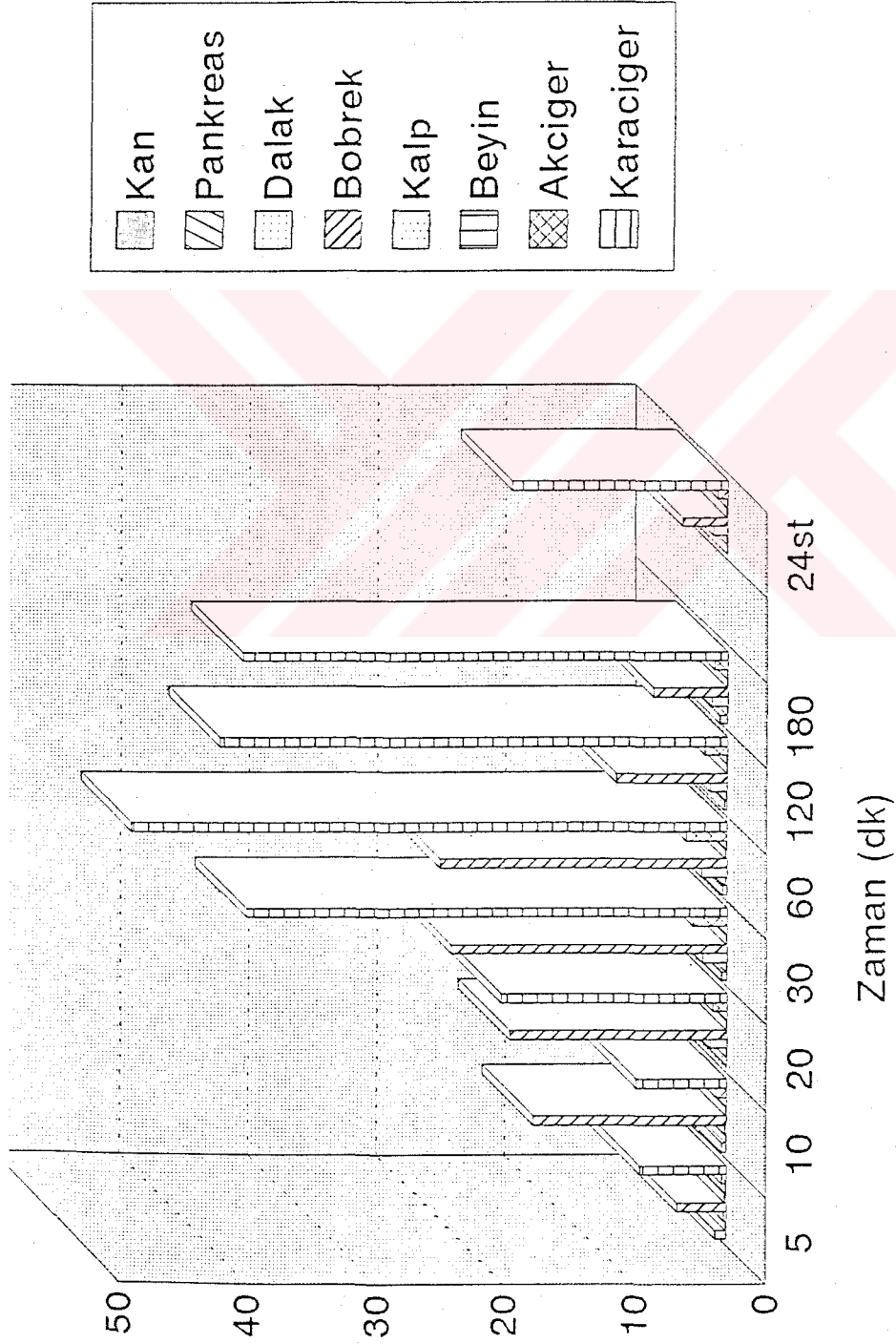
% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)
5	0.0647	0.0092	0.2237	0.0013	0.8057	0.0032	0.2374	0.0056	0.0768	0.0045	0.0471	0.0045	1.3622	0.0075	9.6559	0.0034
10	0.0615	0.0034	0.2641	0.0016	1.015	0.0045	7.3392	0.0187	0.0764	0.0009	0.0481	0.0087	2.525	0.0034	11.1356	0.0078
20	0.0493	0.0531	0.1632	0.0083	2.1752	0.0013	12.6048	0.0178	0.1521	0.0212	0.0318	0.0176	2.9491	0.0007	40.3977	0.0121
30	0.0316	0.0214	0.1855	0.0043	2.2086	0.0047	14.2274	0.0059	0.1114	0.0056	0.0387	0.0435	2.8712	0.0026	45.4593	0.0234
60	0.0089	0.0121	0.2152	0.0019	2.5074	0.0045	24.1542	0.0052	0.1643	0.0089	0.0245	0.0563	3.2007	0.0074	54.2234	0.0111
120	0.0071	0.0123	0.0193	0.0167	1.8163	0.0034	17.9556	0.0004	0.0123	0.0012	0.0031	0.0054	0.2021	0.0008	50.9093	0.0098
180	0.0032	0.0211	0.0169	0.0276	0.2083	0.0065	12.9524	0.0013	0.0358	0.0059	0.0057	0.0780	0.0776	0.0073	46.8569	0.0056
24(st)	0.0016	0.0056	0.0113	0.0321	0.1682	0.0042	7.3641	0.0002	0.0097	0.0007	0.0083	0.0045	0.0464	0.0127	12.4243	0.0056

Tablo 20: ^{99m}Tc ile İşaretli E_3 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

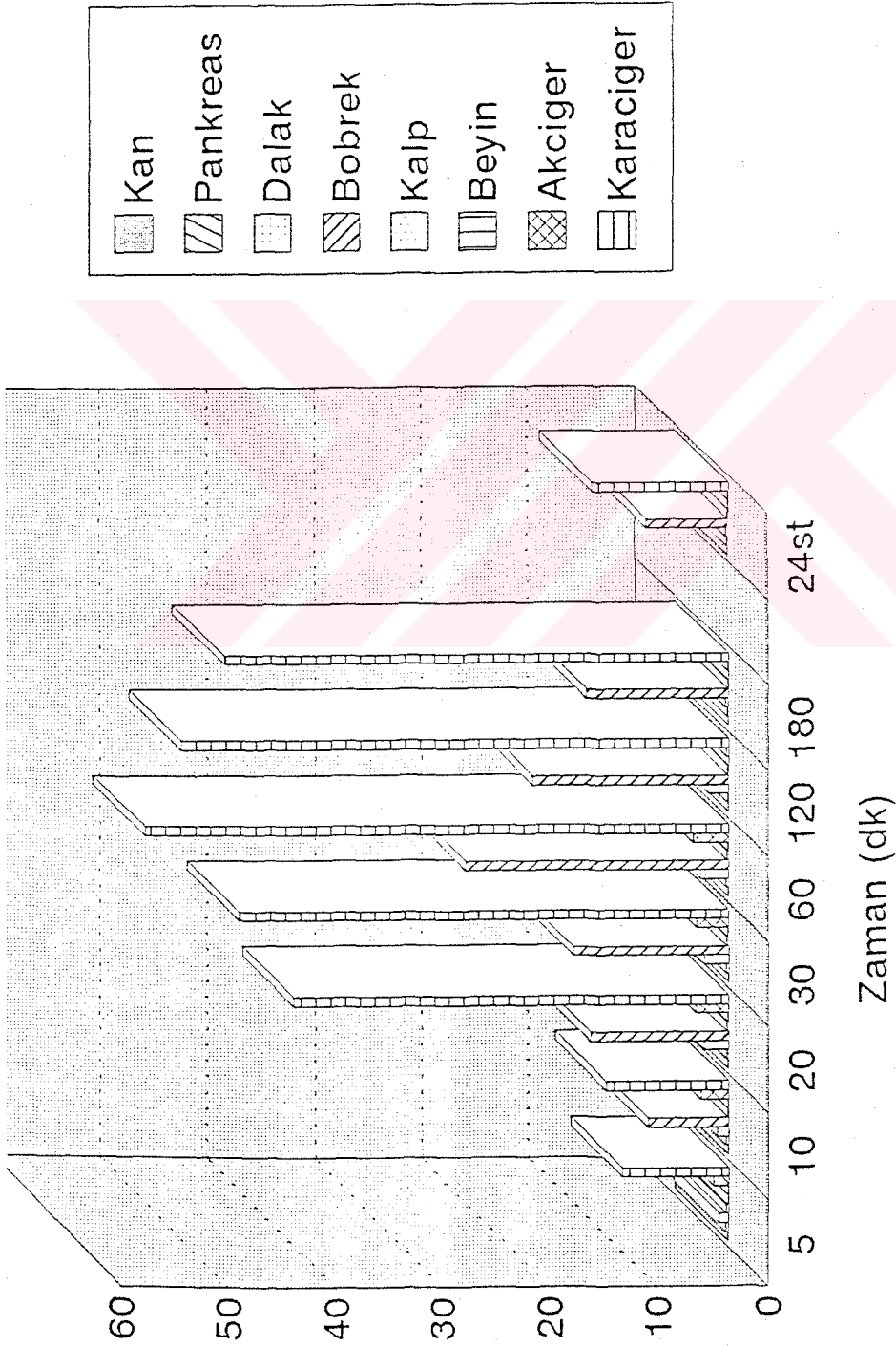
% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)
5	0.0128	0.0043	0.2311	0.0032	1.5841	0.0052	0.9179	0.0045	0.4215	0.0532	0.0391	0.0097	1.4487	0.0128	8.4735	0.0054
10	0.0172	0.0054	0.2806	0.0187	1.8425	0.0092	1.1176	0.0087	0.5245	0.0321	0.0464	0.0101	2.4489	0.0097	13.6851	0.0087
20	0.0125	0.0087	0.2752	0.0059	2.3651	0.0032	1.5665	0.0099	0.4416	0.0056	0.0366	0.0231	2.4618	0.0018	35.3918	0.0236
30	0.0258	0.0321	0.2414	0.0098	3.8953	0.0102	2.1163	0.0011	0.3989	0.0031	0.0311	0.0567	3.2459	0.0028	37.8128	0.0043
60	0.1359	0.0701	0.2009	0.0054	5.2676	0.0231	3.3225	0.0102	0.6905	0.0805	0.0695	0.0732	5.3977	0.0152	50.0801	0.0109
120	0.0616	0.0321	0.1157	0.0087	4.8483	0.0016	2.0337	0.0008	0.2696	0.0105	0.0234	0.0701	3.6387	0.0128	48.3220	0.0102
180	0.0447	0.0081	0.1116	0.0276	4.4051	0.0054	2.8702	0.0011	0.1982	0.0043	0.0261	0.0481	3.8725	0.0108	33.9102	0.0043
24(st)	0.0098	0.0076	0.0956	0.0099	1.0356	0.0098	1.0051	0.0032	0.0058	0.0039	0.0074	0.0312	1.0056	0.0054	9.2381	0.0031

Tablo 21: ^{99m}Tc ile İşaretli E4 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

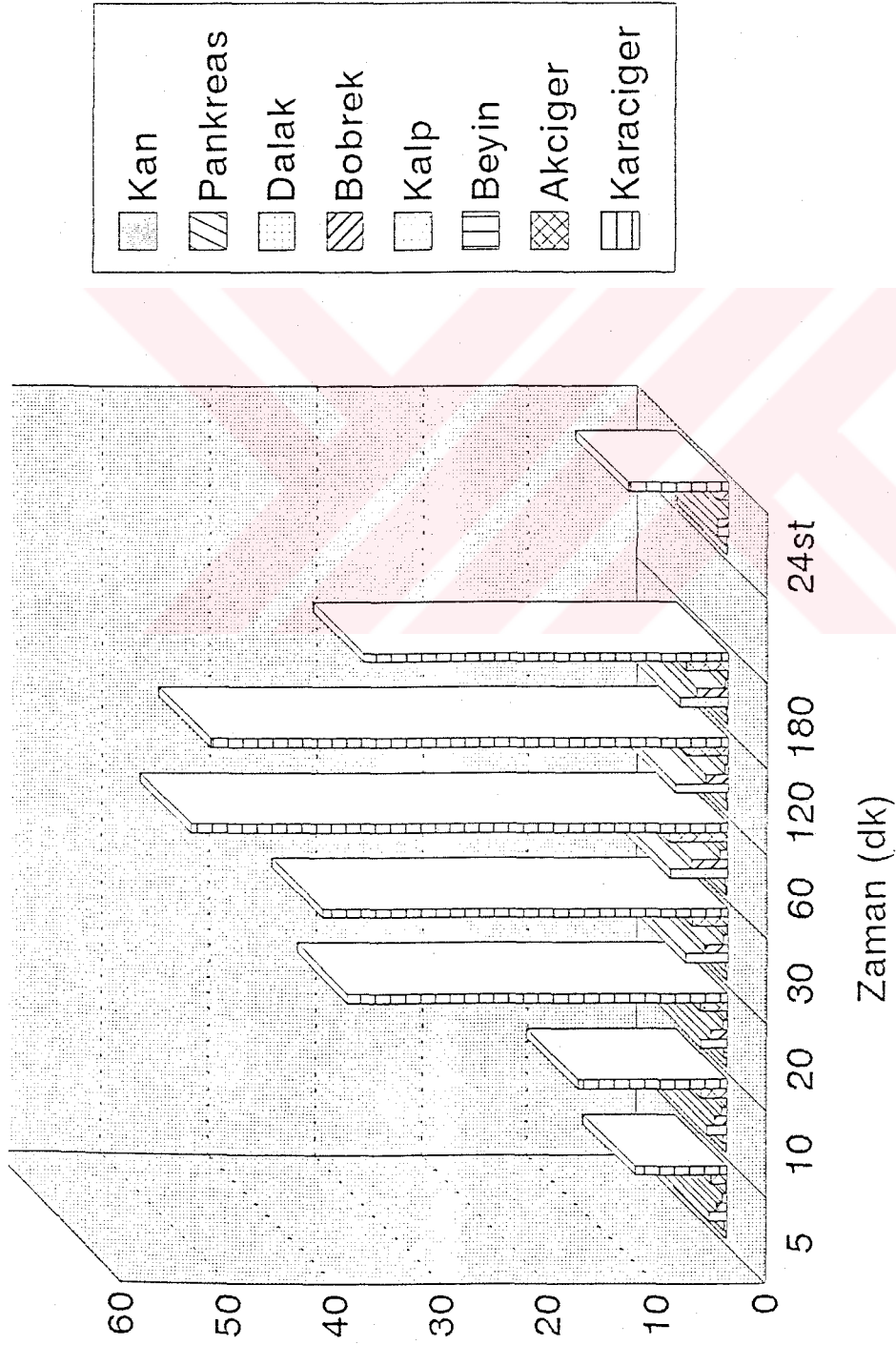
% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)	%	Sx (±)
5	0.0049	0.0003	0.1175	0.0213	0.5305	0.0045	2.7706	0.0491	0.0038	0.0097	0.0041	0.0082	0.0912	0.0092	5.2239	0.0167
10	0.0014	0.0009	0.1633	0.0105	11.7631	0.0067	4.0572	0.0672	0.0106	0.0016	0.0038	0.0006	0.1803	0.0103	4.1135	0.0139
20	0.0152	0.0017	0.9726	0.0204	17.5065	0.0131	3.7907	0.0562	0.0461	0.0045	0.0859	0.0005	1.4577	0.0049	28.24	0.0079
30	0.0057	0.0032	0.9232	0.0078	15.2441	0.0039	4.5135	0.0097	0.0669	0.0039	0.0333	0.0012	4.5876	0.0731	41.0552	0.0259
60	0.0016	0.0031	1.0596	0.0045	23.1864	0.0087	5.5908	0.0136	0.5603	0.0006	0.2763	0.0038	5.1641	0.0905	46.0375	0.0609
120	0.0049	0.0009	0.8229	0.0321	18.9164	0.0059	3.9249	0.0751	0.4931	0.0102	0.2206	0.0027	3.9478	0.0079	39.8838	0.0042
180	0.0083	0.0021	0.6697	0.0217	1.7442	0.0101	1.08153	0.0056	0.3728	0.0123	0.1421	0.0091	2.5835	0.0103	33.8615	0.0731
24(st)	0.0052	0.0031	0.0671	0.0067	0.05310	0.0563	0.9617	0.0327	0.2101	0.0039	0.0326	0.0032	0.1754	0.0131	27.6851	0.0205



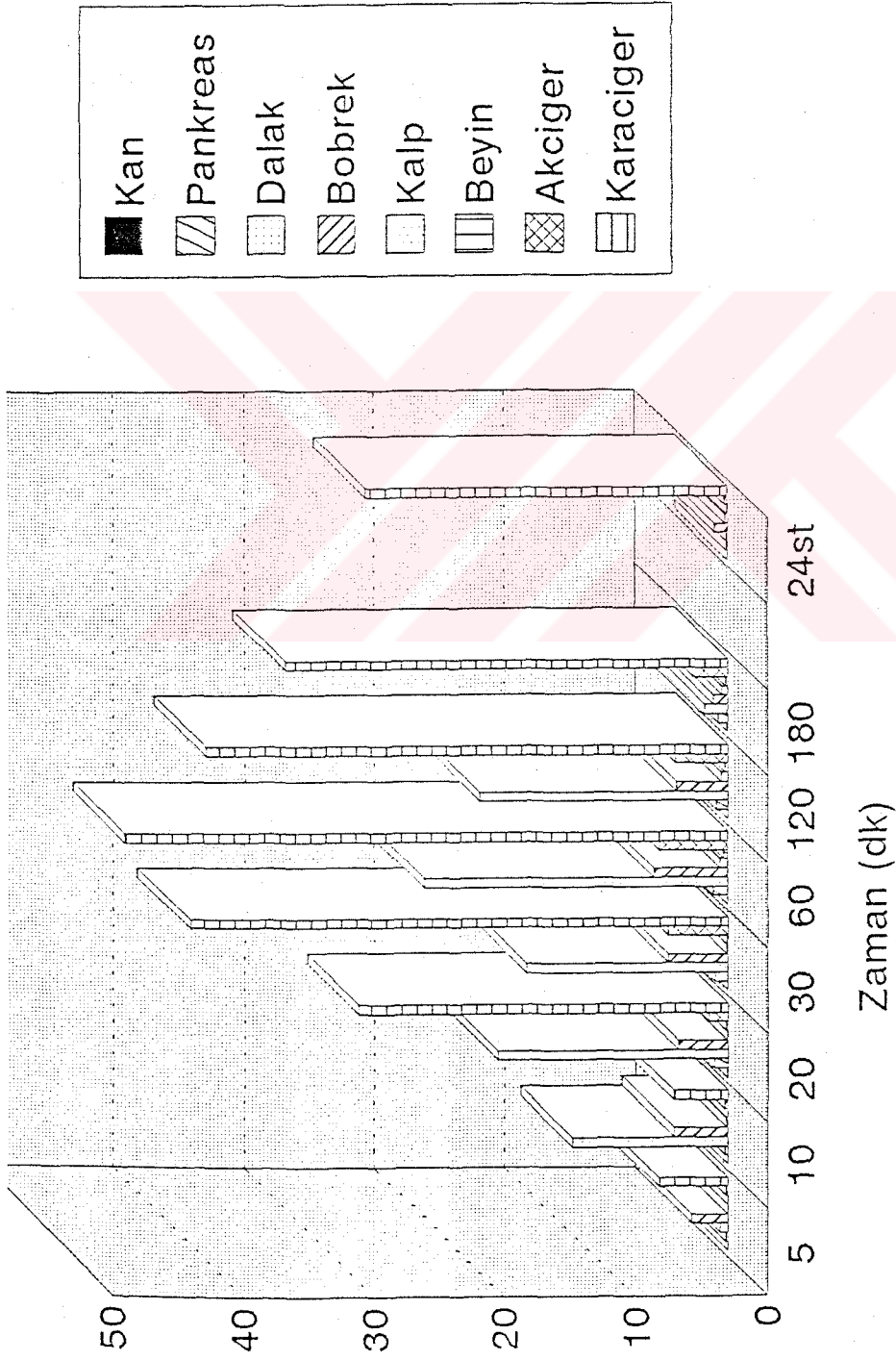
Şekil 42: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli E₁ Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



Şekil 43: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli E_2 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



Şekil 44: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli E_3 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



Şekil 45: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretili E_4 Fomülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

Tablo 22: ^{99m}Tc ile İşaretili S_1 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx(±)	%	Sx (±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)
5	0.1159	0.0436	0.4247	0.0069	0.1999	0.0082	0.3208	0.8625	0.2771	0.1071	0.0184	0.0018	0.4418	0.0356	0.1349	0.0481
10	0.2298	0.0684	0.6021	0.0044	0.2349	0.0059	2.7530	0.4168	0.4764	0.0180	0.0316	0.0055	0.7366	0.0349	0.2148	0.0732
20	0.3135	0.0606	2.3858	0.0059	0.6548	0.0064	3.8666	0.2952	0.5267	0.0118	0.0404	0.0043	0.8936	0.0287	0.4556	0.0004
30	0.8333	0.0661	3.0358	0.0317	0.7461	0.0055	16.4129	0.5646	1.2415	0.0146	0.0447	0.0007	0.9789	0.0352	0.6314	0.1092
60	0.9414	0.0141	3.2796	0.0015	1.0942	0.0096	24.8266	0.5734	1.4143	0.0241	0.2065	0.0376	2.9777	0.0318	2.4463	0.0257
120	0.7702	0.0407	0.8736	0.0101	0.6539	0.0111	48.0548	0.0253	0.7318	0.0124	0.0599	0.0033	1.8672	0.0382	0.5728	0.0584
180	0.9326	0.0110	0.4181	0.0031	0.4534	0.0226	44.0523	0.5220	0.4750	0.0022	0.0486	0.0029	1.3928	0.0131	0.5137	0.1078
360	0.1885	0.0066	0.1475	0.0032	0.3538	0.0008	13.4175	0.5420	0.2631	0.0005	0.0159	0.0016	0.1415	0.0026	0.1283	0.0028
24(st)	0.1340	0.0059	0.1619	0.0068	0.2760	0.0182	5.6680	0.0885	0.0965	0.0081	0.0109	0.0005	0.0820	0.0043	0.1240	0.0461

Tablo 23: ^{99m}Tc ile İşaretli S_2 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

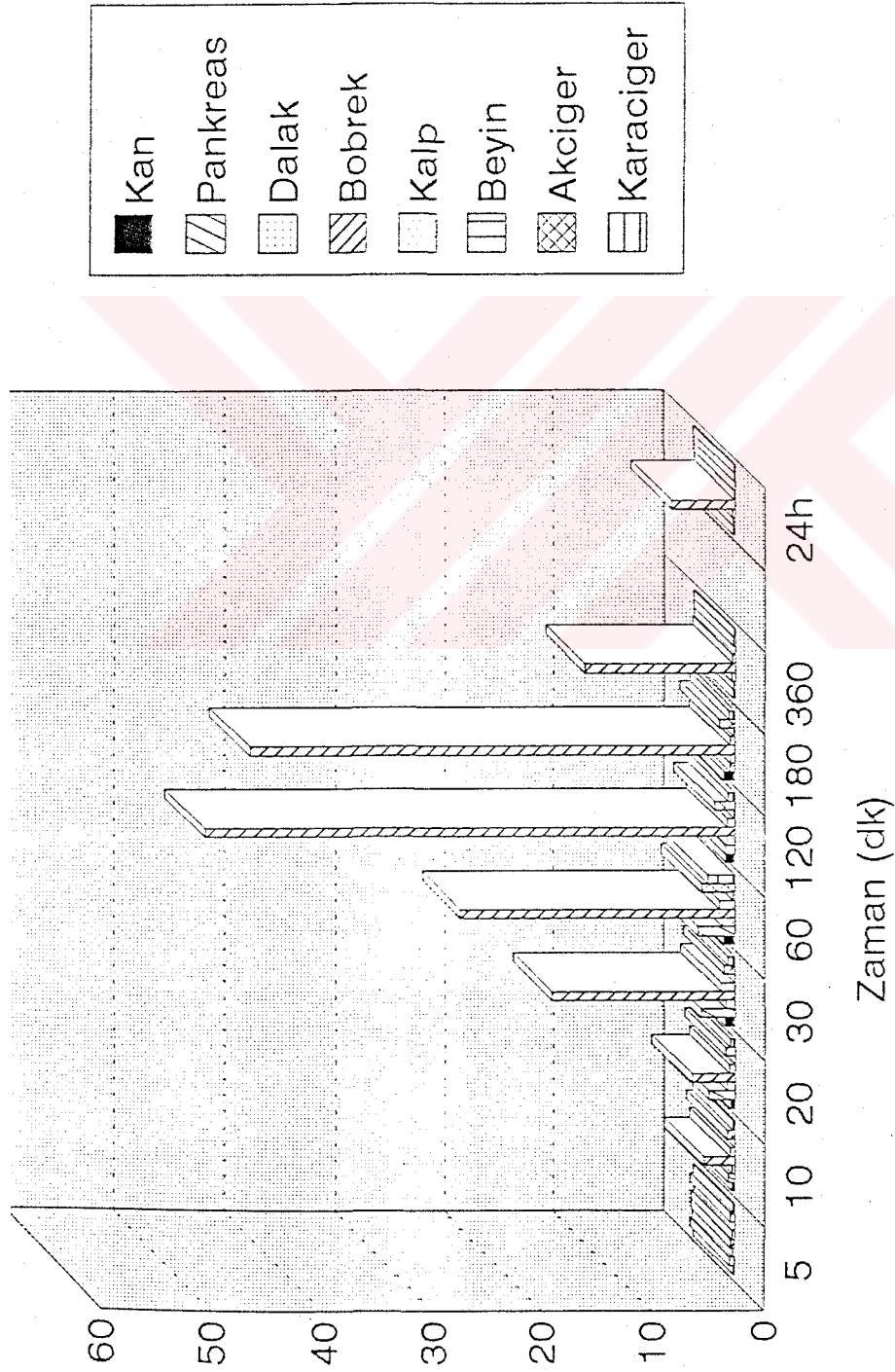
% Tutulum / gram organ									
Zaman (dk.)	Kan % Sx(±)	Pankreas % Sx(±)	Dalak % Sx(±)	Böbrek % Sx(±)	Kalp % Sx(±)	Beyin % Sx(±)	Akciğer % Sx(±)	Karaciğer % Sx(±)	
5	0.1712 0.0012	0.1512 0.0043	0.0525 0.0031	0.4729 0.0056	0.1662 0.0015	0.0083 0.0008	0.1239 0.0057	0.0461 0.0025	
10	0.3222 0.0067	0.1974 0.0037	0.0579 0.0067	2.4428 0.0113	0.1972 0.0027	0.2019 0.0021	0.2375 0.0097	0.1045 0.0085	
20	0.3591 0.0124	0.2190 0.0022	0.1625 0.0112	4.8912 0.0121	0.1970 0.0011	0.0251 0.0011	0.2961 0.0127	0.2367 0.0161	
30	0.4313 0.0131	1.0647 0.0017	0.1691 0.0084	5.54139 0.0119	0.6349 0.0009	0.0321 0.0023	0.2951 0.0115	0.1434 0.0075	
60	0.5772 0.0009	1.1898 0.0036	0.3966 0.0021	7.87285 0.0181	0.8852 0.0034	0.0458 0.0004	0.7576 0.0181	0.3523 0.0124	
120	0.5538 0.0004	0.5549 0.0079	0.3602 0.0031	12.5585 0.0092	0.5098 0.0057	0.0656 0.0011	0.3124 0.0087	0.1837 0.0211	
180	0.5512 0.0114	0.2756 0.0142	0.1646 0.0061	17.4877 0.0088	0.2309 0.0062	0.0213 0.0021	0.0639 0.0054	0.1539 0.0015	
360	0.1410 0.0153	0.0695 0.0027	0.1325 0.0038	3.118 0.3909	0.0885 0.0019	0.0205 0.0005	0.1590 0.0036	0.0445 0.0057	
24(st)	0.0536 0.0133	0.0295 0.0122	0.0335 0.0184	0.7685 0.0557	0.0174 0.0047	0.0013 0.0004	0.0341 0.0375	0.0034 0.0126	

Tablo 24: ^{99m}Tc ile İşaretli S_3 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları

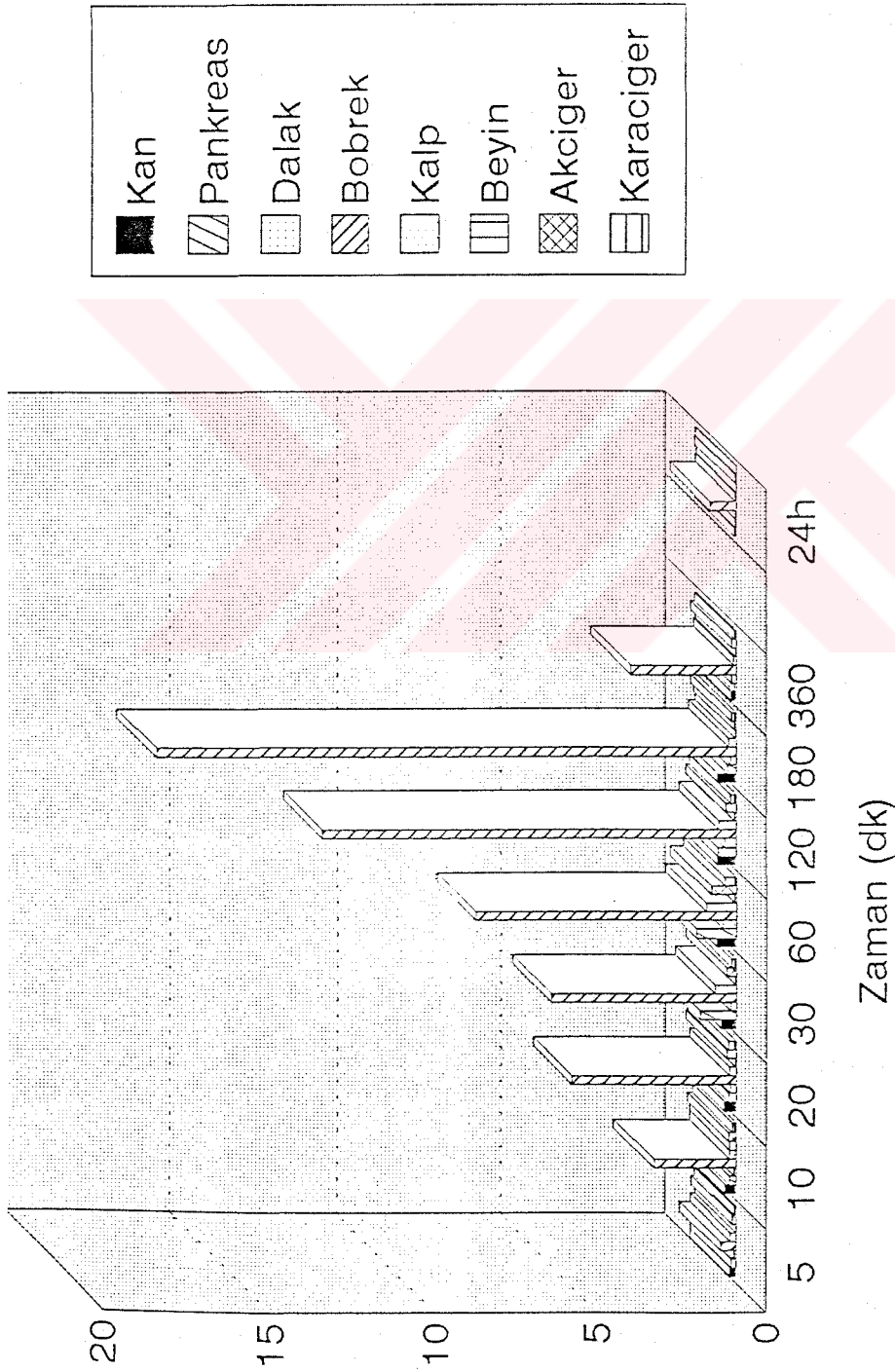
% Tutulum / gram organ																
Time (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)
5	0.0424	0.0031	0.0445	0.0008	0.0414	0.0008	0.6450	0.0736	0.0964	0.0023	0.0143	0.0004	0.1111	0.0063	0.0184	0.0225
10	0.0791	0.0024	0.2987	0.0069	0.1653	0.0055	2.9886	0.0451	0.1708	0.0039	0.0278	0.0010	0.3305	0.0047	0.1029	0.0169
20	0.1106	0.0016	0.4401	0.0041	0.2217	0.0273	14.5320	0.0122	0.2009	0.0293	0.0281	0.0011	0.3779	0.0396	0.1149	0.0400
30	0.2361	0.0025	0.2231	0.0017	0.8413	0.0382	16.0565	0.0253	0.5946	0.0126	0.0724	0.0319	0.6521	0.0397	0.5809	0.0322
60	0.5799	0.0009	0.4733	0.0089	3.5975	0.0004	8.5625	0.0183	0.6939	0.0031	0.2046	0.0007	1.1146	0.0039	0.9201	0.0004
120	0.2542	0.0101	0.2459	0.0022	0.2457	0.0084	10.5393	0.0156	0.2714	0.0029	0.0272	0.0005	0.1786	0.0129	0.1138	0.0974
180	0.1122	0.0052	0.10205	0.0031	0.1446	0.0051	7.8051	0.0025	0.0978	0.0028	0.0237	0.0006	0.1321	0.0010	0.0803	0.0025

Tablo 25: ^{99m}Tc ile İşaretli S₄ Formülasyonuna Ait Biyodagılım Sonuçları

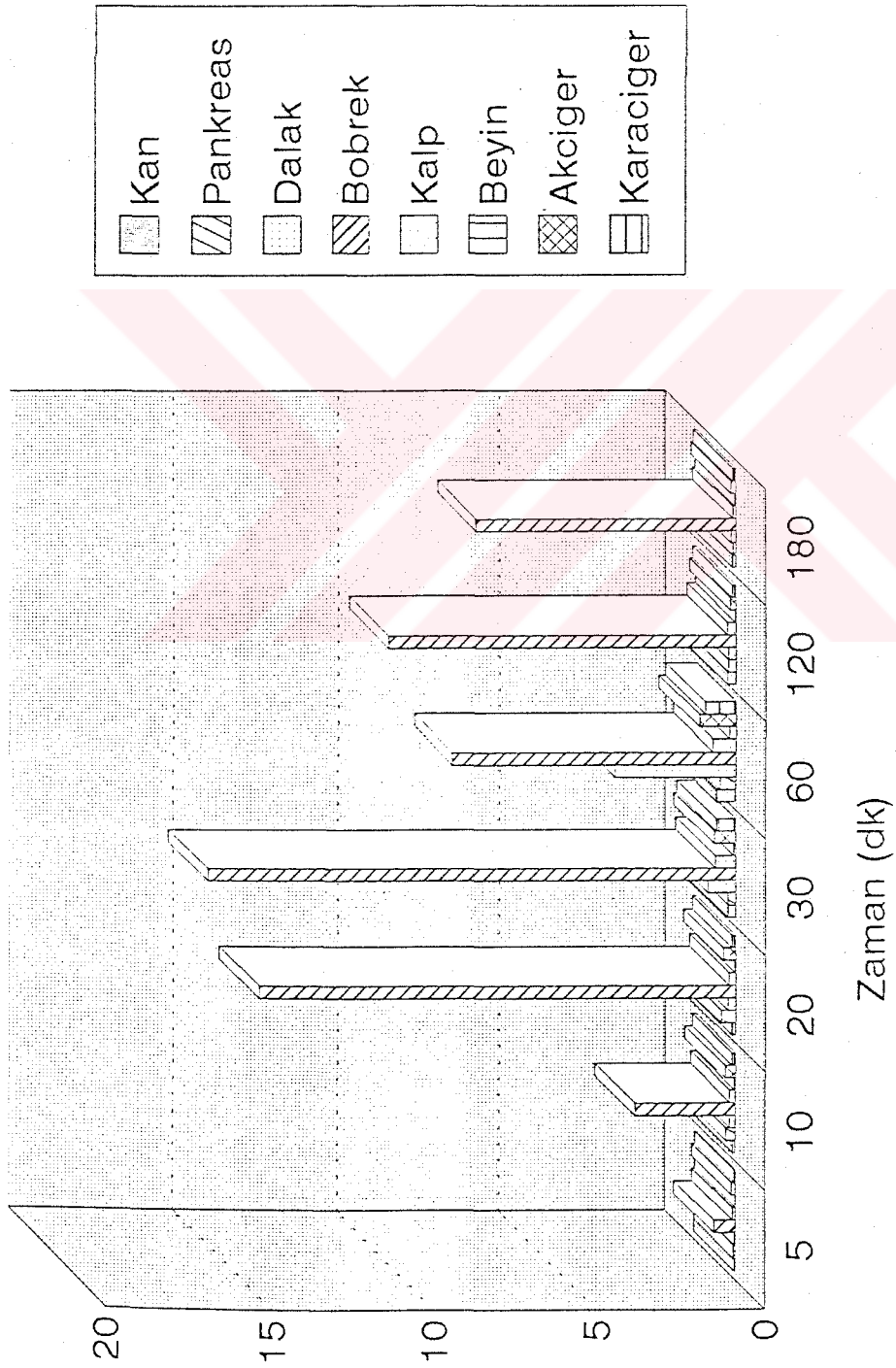
% Tutulum / gram organ																
Zaman (dk.)	Kan		Pankreas		Dalak		Böbrek		Kalp		Beyin		Akciğer		Karaciğer	
	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)	%	Sx(±)
5	0.0499	0.0025	0.2078	0.0023	0.0819	0.0010	1.1741	0.1210	0.1411	0.0045	0.0157	0.0005	0.1906	0.0099	0.0441	0.0176
10	0.1046	0.0016	0.2821	0.0058	0.2325	0.0012	7.7305	0.0661	0.1914	0.0004	0.0329	0.0015	0.3356	0.0189	0.1607	0.0411
20	0.1943	0.0124	0.5598	0.0057	0.3184	0.0071	20.3206	0.0172	0.2611	0.0033	0.0396	0.0031	0.4466	0.0064	0.2817	0.0131
30	0.2300	0.0092	6.7089	0.0092	0.7887	0.0259	21.0287	0.0121	0.6529	0.0026	0.1431	0.0008	0.7595	0.0241	1.1559	0.0014
60	0.4687	0.0043	3.5351	0.0071	2.0989	0.0145	30.8209	0.0111	1.0245	0.0602	0.1509	0.0105	1.4313	0.0232	1.1755	0.0770
120	0.2551	0.0053	0.3336	0.0004	0.4679	0.0001	26.96535	0.0213	0.9852	0.0384	0.0987	0.0112	0.3889	0.0211	0.3505	0.0002
180	0.1503	0.0015	0.2919	0.0202	0.2241	0.0002	14.9465	0.0203	0.3421	0.0042	0.0667	0.0014	0.3039	0.0074	0.1479	0.0174



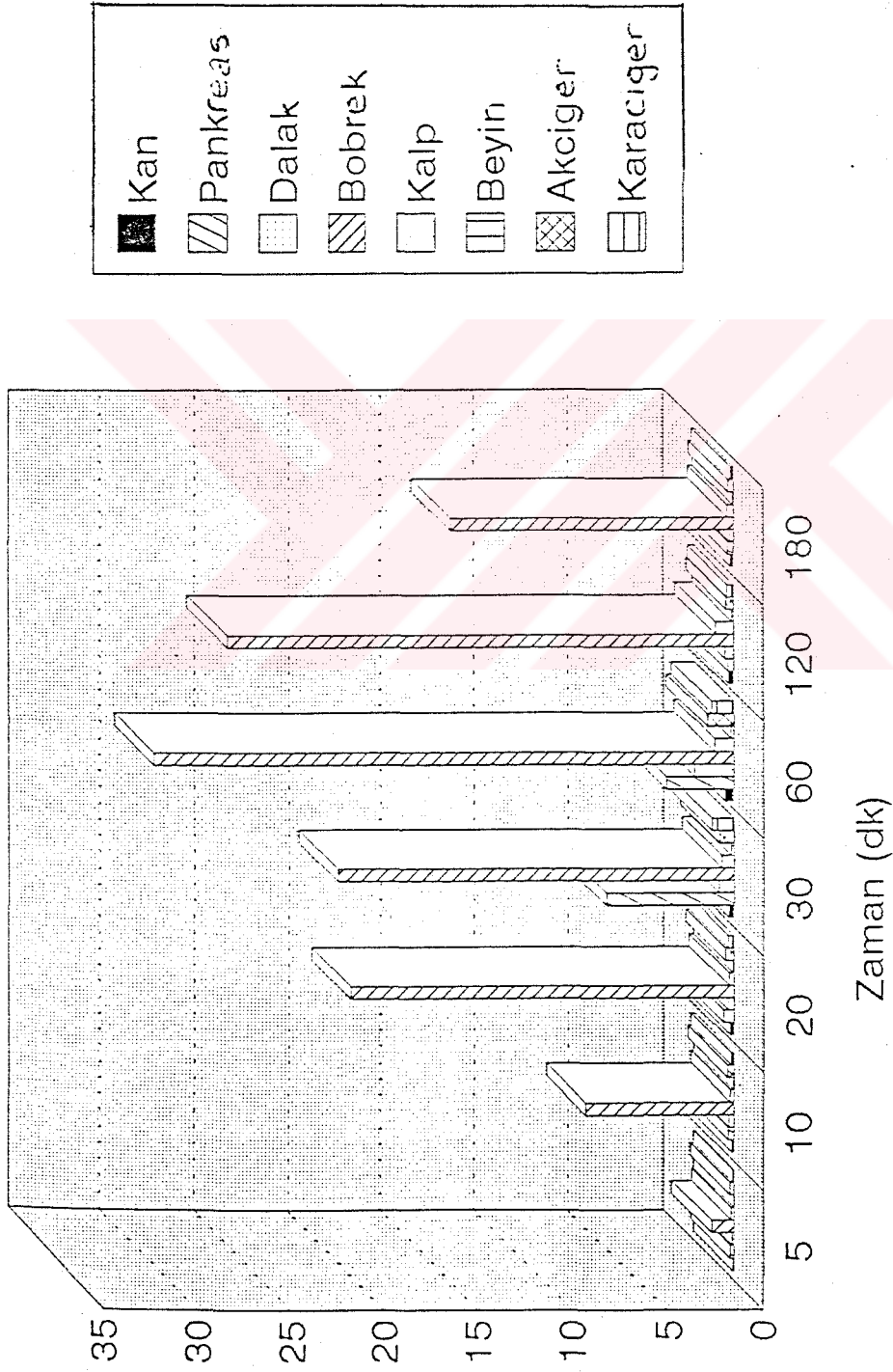
Şekil 46: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli S_1 Formülasyonuna Ait Biyodagılım Sonuçları



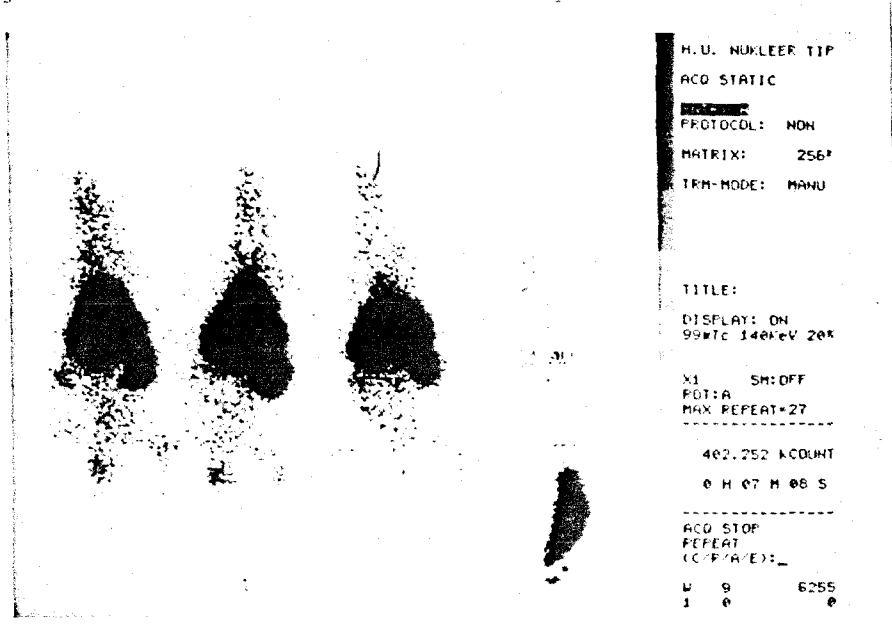
Şekil 47: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli S_2 Fomülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



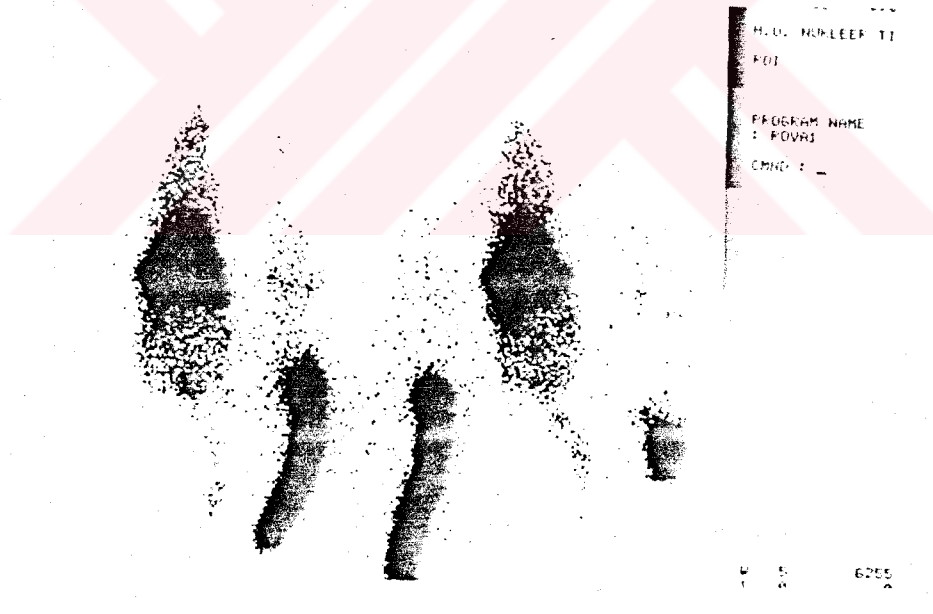
Şekil 48: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli S_3 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



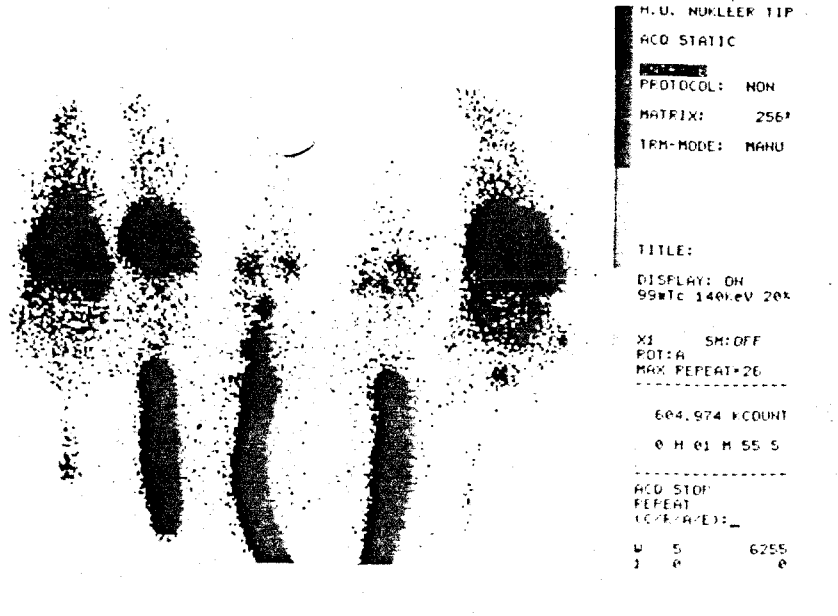
Şekil 49: Ratlarda Yapılan ^{99m}Tc ile İşaretli S_4 Formülasyonuna Ait Biyodağılım Sonuçları



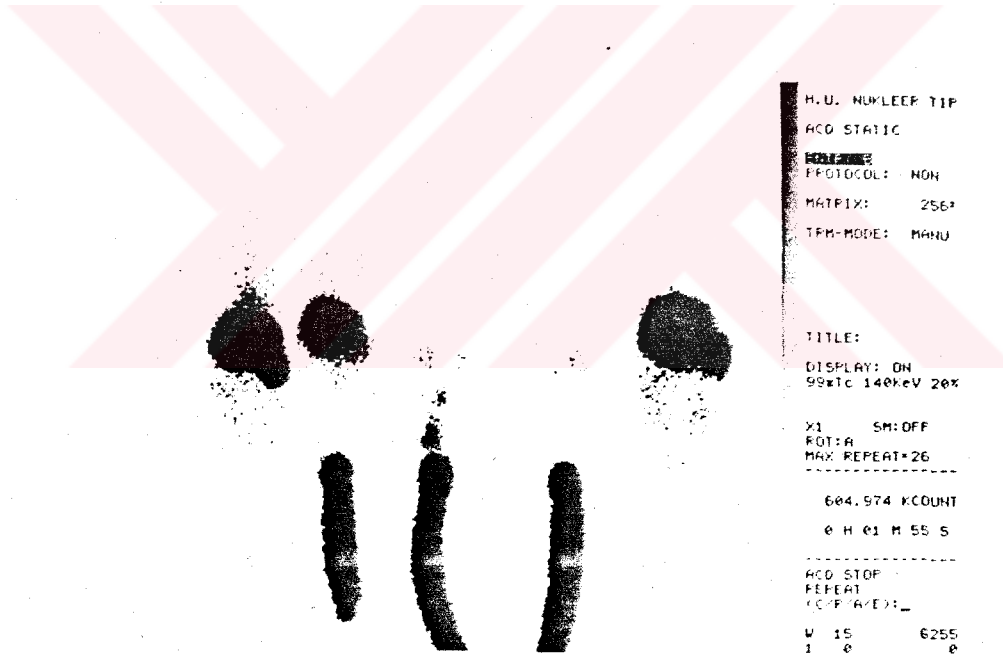
Şekil 50: Iopromid-U İçeren E₁ Lipozomların Sintigrafi Görüntüleri



Şekil 51: Iopromid -U İçeren E₂ Lipozomlarının Sintigrafi Görüntüleri



Şekil 52: Iopromid-U İçeren E₃ Lipozomlarının Sintigrafi Görüntüleri



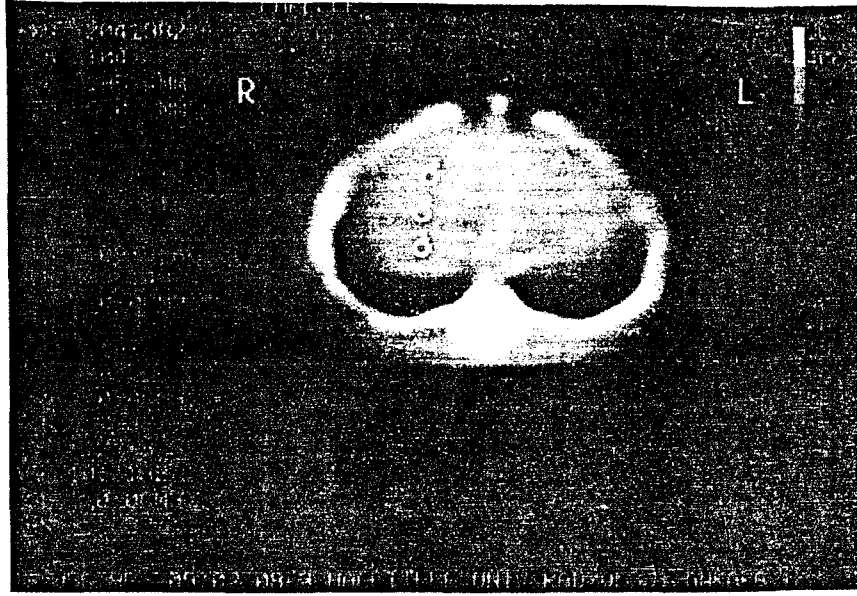
Şekil 53: Iopromid -U İçeren E₄ Lipozomlarının Sintigrafi Görüntüleri

II.4.8.3. RATLAR ÜZERİNDE YAPILAN RADYOLOJİK ÇALIŞMALARA AİT BULGULAR

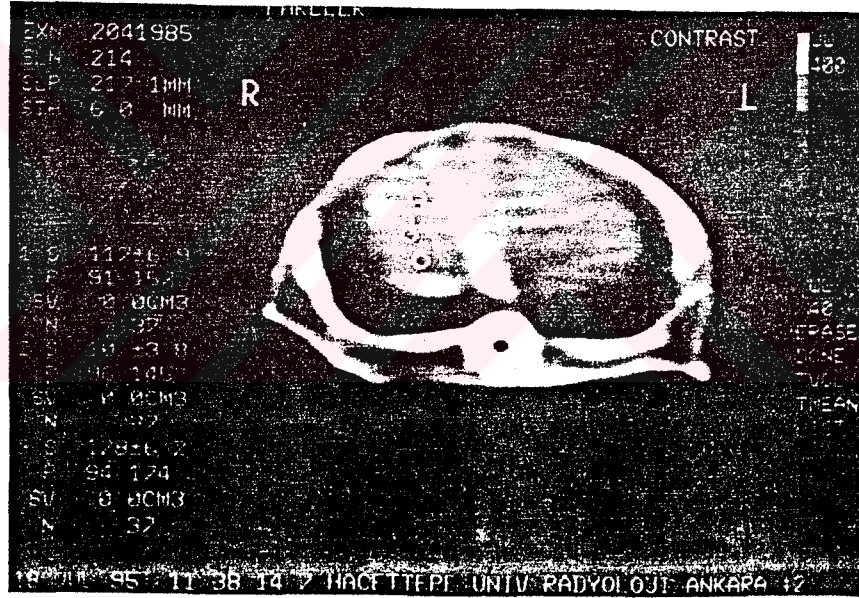
Iopromid-U içeren lipozom, NISV dispersiyonu ve serbest Iopromid-U, ratlara Bölüm II.2.5.8.4' de anlatıldığı şekilde uygulanmış ve CT' leri çekilmiştir. Organ yoğunlukları HU cinsinden ölçülmüştür. Elde edilen görüntüler Şekil 54 a,b-59 a,b' de, HU sonuçları da Tablo 30' da gösterilmiştir.

Tablo 30: Ratlarda Yapılan Radyolojik Çalışma Sonrasında Elde Edilen Kontrast Artış Değerleri

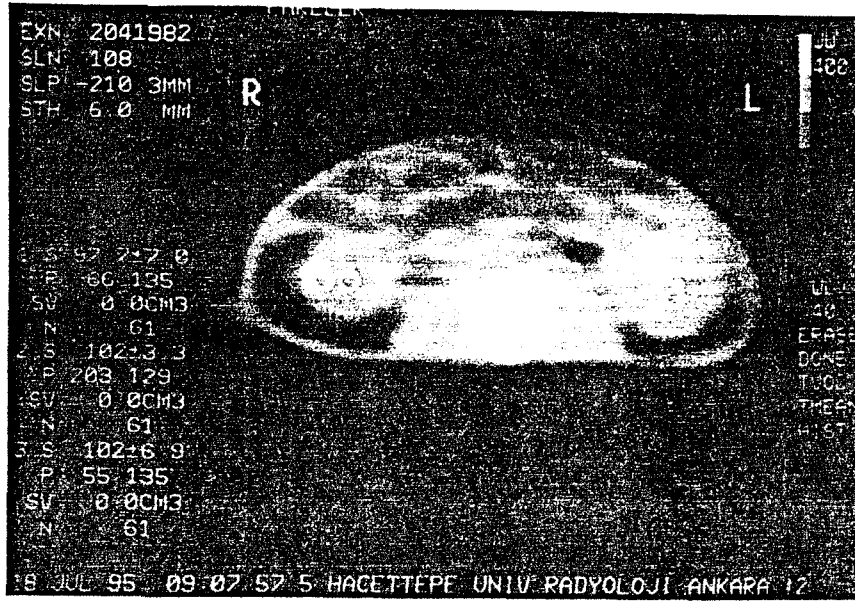
FORMULASYONLAR	KONTRAST ARTIŞI (HU)	
	ORGANLAR	
	KC	BOBREK
Ultravist® Verilmeden Önce	118 ± 4.4	100.6 ± 5.7
Ultravist® Verildikten Sonra	122.5 ± 6.5	114 ± 13.5
S ₁ Formülasyonu Verilmeden Önce	88.4 ± 7.8	90.4 ± 5.4
S ₁ Formülasyonu Verildikten Sonra	101.6 ± 9.2	99.5 ± 13
E ₂ Formülasyonu Verilmeden Önce	105.5 ± 1.4	90.8 ± 1.9
E ₂ Formülasyonu Verildikten Sonra	122 ± 2.6	185.3 ± 9.7



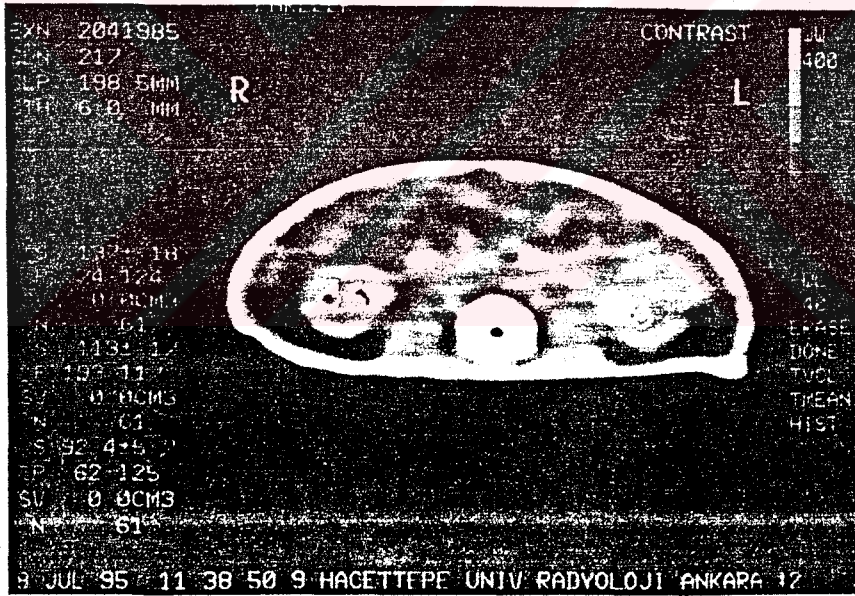
Şekil 54a: Ultravist Enjeksiyonundan Önce KC CT Görüntüsü



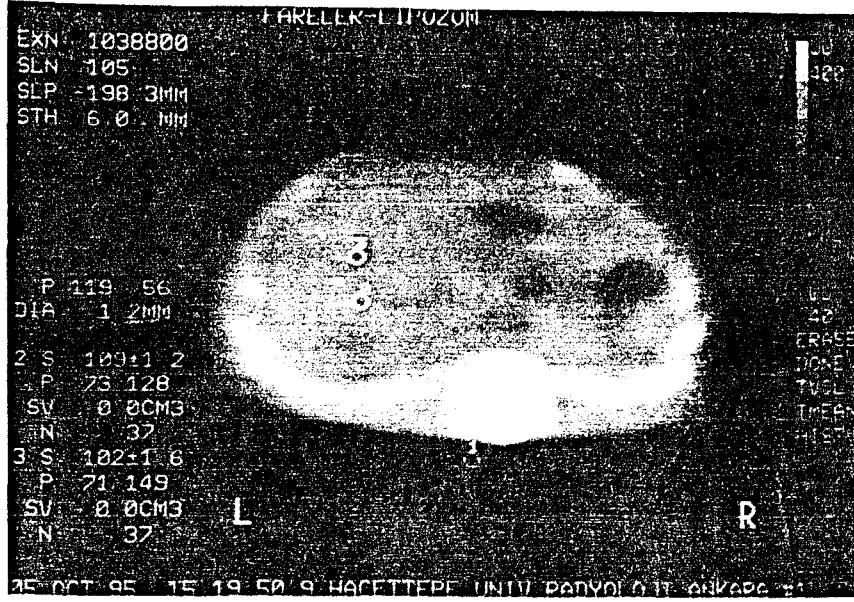
Şekil 54b: Ultravist Enjeksiyonundan Sonra KC CT Görüntüsü



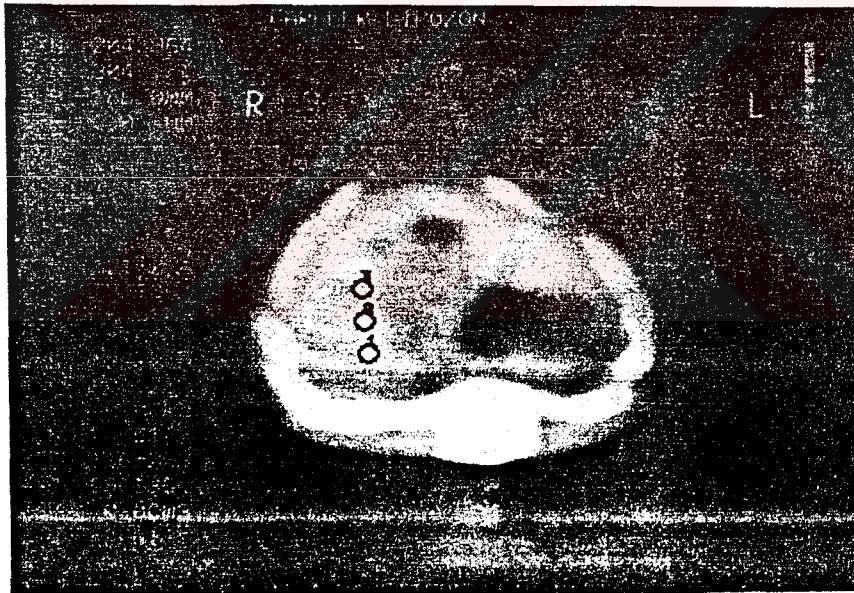
Şekil 55a: Ultravist Enjeksiyonundan Önce Böbrek CT Görüntüsü



Şekil 55b: Ultravist Enjeksiyonundan Sonra Böbrek CT Görüntüsü



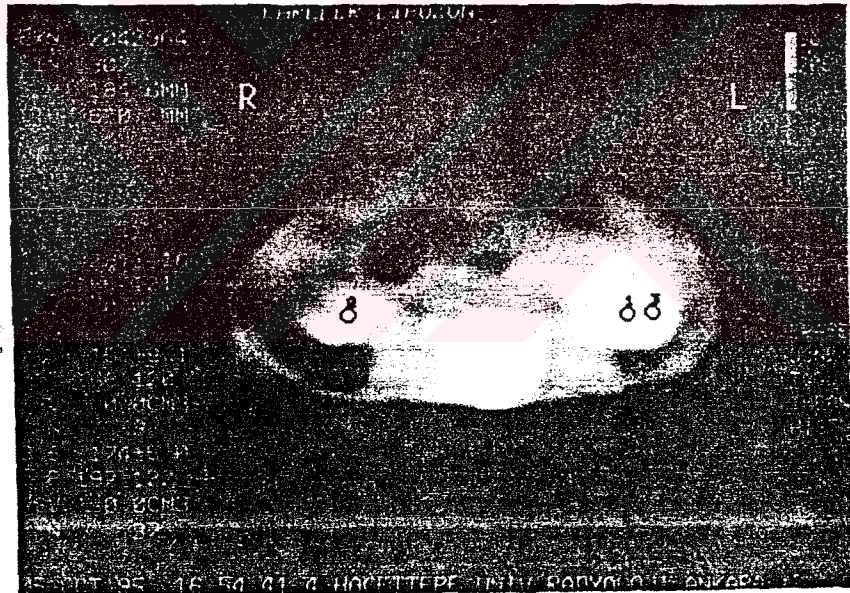
Şekil 56a: E₂ Lipozomunun Enjeksiyonundan Önce KC CT Görüntüsü



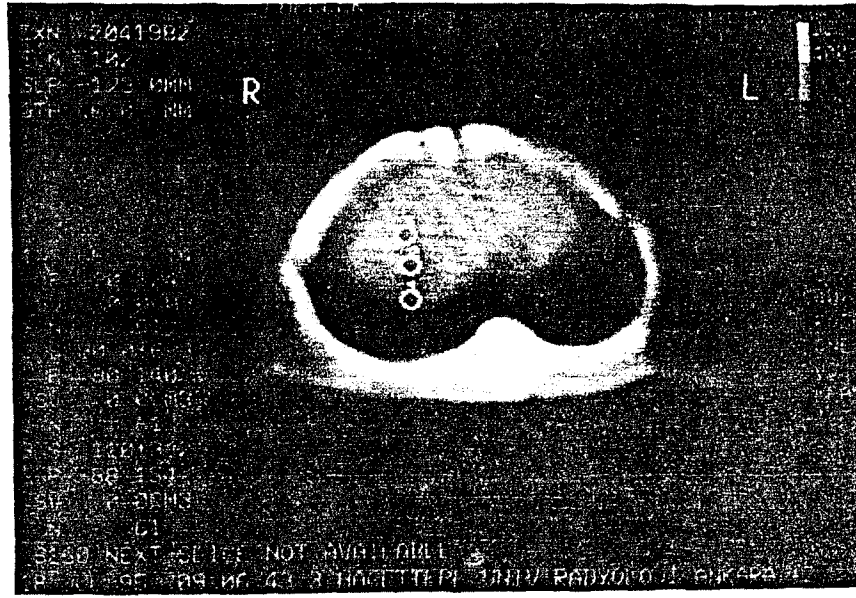
Şekil 56b: E₂ Lipozomunun Enjeksiyonundan Sonra KC CT Görüntüsü



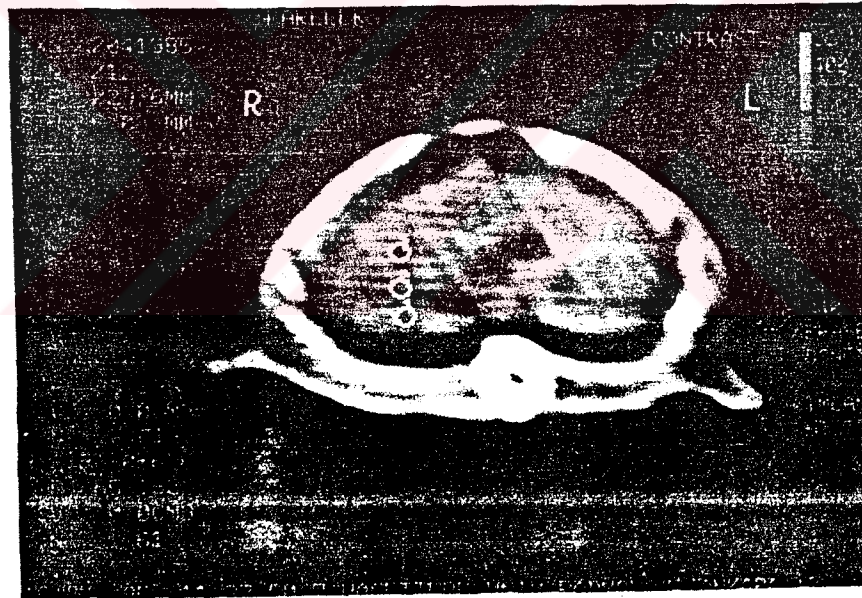
Şekil 57a: E₂ Lipozomunun Enjeksiyonundan Önce Böbrek CT Görüntüsü



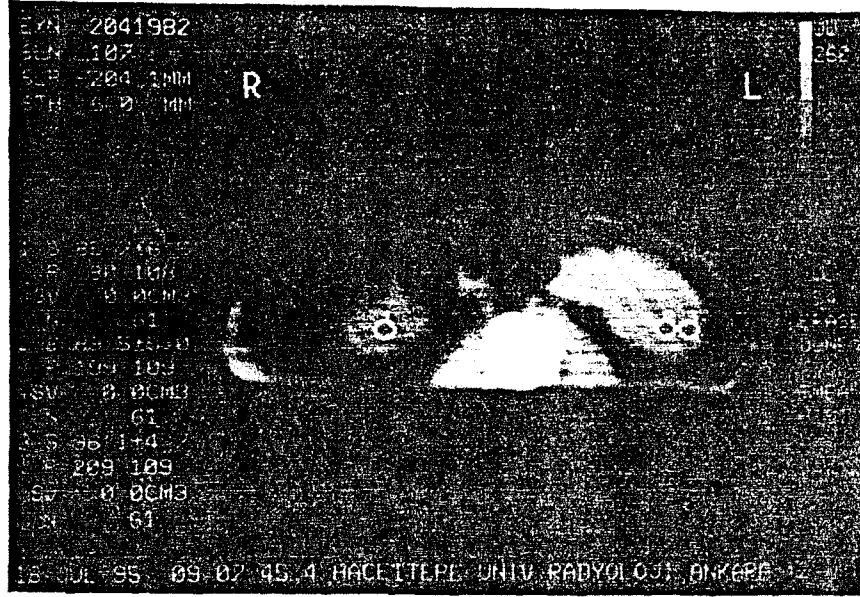
Şekil 57b: E₂ Lipozomunun Enjeksiyonundan Sonra Böbrek CT Görüntüsü



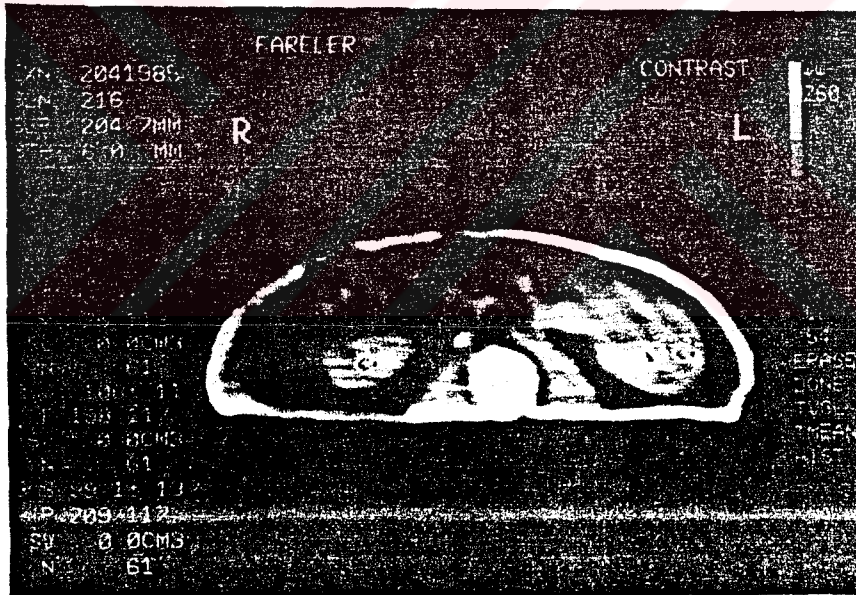
Şekil 58a: S₁ NISV' nun Enjeksiyonundan Önce KC CT Görüntüsü



Şekil 58b: S₁ NISV' nun Enjeksiyonundan Sonra KC CT Görüntüsü



Şekil 59a: S₁ NISV' nun Enjeksiyonundan Önce Böbrek CT Görüntüsü



Şekil 59b: S₁ NISV' nun Enjeksiyonundan Sonra Böbrek CT Görüntüsü

IV. TARTIŞMA

IV.1. ETKEN MADDE SEÇİMİ

Günümüzde görüntülemelerde X-ışınları görüntüleme, MRI, US ve nükleer tıp olmak üzere başlıca 4 görüntüleme yolu kullanılmaktadır ve bu alanda hem teknik yönden hem de kontrast ajanlar yönünden büyük değişiklikler yaşanmaktadır. 20 yıl öncesine kadar sadece radyografi bilinirken zamanımızda CT, MRI ve US tetkikleri belirgin şekilde artmıştır. Halen teşhis yöntemlerinin dörtte üçü X-ışınları görüntülemelerde, beşte biri US 'da ve geri kalanları da eşit olarak CT, MRI ve nükleer tıpta kullanılan yöntemlerdir. Ancak, rutin X-ışınları yöntemleri giderek azalırken diğerlerinin kullanımında artış olmaktadır.

X-ışınları görüntülemelerde kullanılan kontrast ajanların kullanımı X-ışınları keşfinin hemen arkasına rastlamaktadır. Bugün damar içine enjeksiyonlarda en iyi kontrast veren ajan iyottur. Tüm iyotlu kontrast bileşikleri triiyodobenzoik asit yapısı taşırlar.

Halen kullanılan suda çözünen kontrast ajanlar kardiyovasküler ve RES dokuları görüntülemelerde ideal değildirler. Damar içinde kalış süreleri kısadır ve hızla itrah edilirler. Bu nedenle, maksimum doku opaklaştırma süresi kısadır, o yüzden de CT görüntülemelerde önemli olan pik dansitesinde iken çok sayıda görüntü almak zordur.

Ayrıca, standart ajanların çoğu patolojik yapılar ve normal dokuların ekstraselüler alanı tarafından kabulü kolaydır; bunun sonucu da tümör gibi lezyonların tanınması güçleşmektedir. Bu da kontrast alternatif materyallere gereksinim göstermektedir (39).

Yapısında iyot taşıyan ve non-iyonik bir kontrast ajan olan iopromid elektrik yükü taşımaz; sodyum veya meglumin gibi katyon taşımaz ve hidrofilik yan zincirlerle iyi korunmuş bir yapıya sahiptir. Bu özellikler moleküle, proteinlere daha az bağlanma ve daha az enzim inhibisyonu özelliği kazandırmıştır. Hasta açısından ise daha iyi "genel tolerans" anlamına gelir; bulantı, kusma, ürtiker, mukozada şişme, solunum yollarında artan bir rezistans ve kardiyovasküler sistem üzerinde nadiren etki gözlenir (2, 5).

Iopromid, ticarete Ultravist® adıyla bulunmaktadır ve CT, anjiyografi ve urografiye görülen problemlere tolerans gösteren ve etkili bir maddedir. Iopromid içeren Ultravist® i.v. yolla verildiğinde KC hücrelerine girmez ve böbreklerden glomerüler filtrasyonla atılır (43).

Yukarıda belirtilen nedenlerle Iopromid' i kontrast ajan olarak içeren çeşitli lipozom ve NISV formülasyonlarının hazırlanması, in vitro karakterizasyonu ve ratlarda biyodağılımlarının değerlendirilmesi ve CT' de RES organlarındaki kontrast artışı ve fiziksel stabilitenin araştırılması amaçlanmıştır.

IV.1.1. IOPROMİD' İN STABİLİTESİ

Iopromid' in in vitro salım deneyleri sırasında Bölüm II.2.5.7.1' de anlatıldığı gibi İTK ile stabilitesi incelenmiştir.

Standart Iopromid' in Rf değeri in vitro salım sonrası elde edilen Iopromid' in Rf değeri ile aynı bulunmuştur. Çalışmalar boyunca çözelti ve dispersiyonların ısıdan yeterince saklanmış olduğu ve ayrıca lipozom ve NISV' lerde hapsedilen etken maddenin in vitro salım ortamı olan 20 mM Tris (pH 7.4) tamponunda dayanıklı kaldığı anlaşılmıştır.

IV.2. LİPOZOMLARIN FORMÜLASYONU

Araştırmamızda kullanılan fosfolipitlerin seçiminde sıvı kristalin ve jel tipte olmak üzere iki ayrı tip formülasyon tasarlanmıştır. DSPC jel tip ve PL 100 (16:0) sıvı kristalin tip lipozomları oluşturan fosfolipitler olarak seçilmiştir. DSPC doymuş yapıda (18:0) soya lesitinidir, PL 100 ise doymamış tipte soya lesitinidir. Molekül yapılarının ve faz geçiş sıcaklıklarının dolayısıyla hangi tipte çifte tabaka oluşturacağı bilindiğinden adı geçen fosfolipitlerle çalışmaya karar verilmiştir. Ayrıca literatürde DSPC lipozomlarının Kritik Hidroliz Yüzdesinin %21 'in altında olduğu bildirilmiştir. Bu husus da seçimde etkili olmuştur (14).

Lipozom hazırlamada kullanılan fosfolipitler ve hazırlanan lipozomlar N₂ gazı altında ve +4°C de saklanmıştır.

Lipozomların dayanıklı veziküler form halinde elde edilmesi için uygun lipid bileşiminde olmalıdır. Lipozomlarla yapılan çalışmalardan edindiğimiz tecrübeler (10:1:4) (7:1:2) ve (4:1:5) bileşimlerinin en iyi lipid bileşimleri olduğunu göstermiştir (33, 67, 68).

Bu lipid bileşimlerinden bozunmayan, yani faz ayrımına neden olmayan bileşim en uygun formülasyon olarak değerlendirilmiştir (Bölüm III.2.2).

Çalışmamızda Ultravist' in viskoz bir çözelti olması nedeniyle seyreltmesi yapılmış ve denenen (10:1:4) (7:1:2) (4:1:5) (7:1:6) ve (7:2:4) molar bileşimlerinden (7:2:4) (Fosfolipit :Yük Verici :Kolesterol) molar bileşimi ile uygun sonuç alınmıştır (Tablo 3).

Sonuçlarımız literatürle uyumluluk göstermektedir. Hidrofilik bir ilacın lipozomlarda maksimum hapsedilme yüzdesi % 10 'dur (69). Arıca ve ark.ları Primakin difosfat içeren (10:1:4) lipozomları ile etken maddeyi % 11 ve (7:1:2) ile %10 oranında tutarken, Storm ve ark.ları aynı bileşimdeki (10:1:4) lipozomlarının lipofilik olan doksorubisini %32 oranında tuttuğunu bildirmişlerdir (70).

Çalışmalarımızda sıvı kristalin ve jel tipte farklı lipidler kullanılarak, hazırlanan lipozomların özellikleri (etken madde tutulması, in vitro salım v.s.) ve in vivo davranışı değerlendirmek mümkün olmuştur.

Ayrıca lipozomal çifte tabakanın uygun bileşimde seçilmesi (7:2:4) ve yapıya kolesterol eklenmesinin uygun Iopromid lipozomlarının hazırlanmasına olanak verdiği anlaşılmıştır.

IV.3. NISV' LARIN FORMÜLASYONU

NISV' larda ise vezikülün yapısındaki temel bileşen lipozomlardaki fosfolipitler yerine non-iyonik sürfaktanlardır.

Non-iyonik sürfaktanlar diğer sürfaktanlara göre daha az toksisiteye sahiptir (49). NISV 'ların hazırlanmasındaki esas neden sürfaktanların fosfolipitlere göre daha stabil olmalarıdır. Bu şekilde kimyasal stabilite artırılabilir.

Araştırmamızda kullanılan Hekzadesilpoli(3)gliserol (Sürfaktan I) ve Dialkilpoli(7) gliserol eter (Sürfaktan II) eter bağı taşıyan sürfaktan tiplerinden

seçilmiştir. Eterik bağ taşıyan sürfaktanların daha stabil oldukları rapor edilmiştir (71).

Çalışılan sürfaktanların Tc değerlerine dikkat edildiğinde Sürfaktan I 'in Tc 'si 45.17 °C ve Sürfaktan II 'nin Tc 'si 11.88 °C olduğu DSC ile saptanmıştır (Bölüm III.3.1.1.1.2). Böylece Tc 'si daha yüksek olan sürfaktan (Sürfaktan I) jel tipi, düşük olan sürfaktan (Sürfaktan II) sıvı kristalin tip sürfaktan olarak belirlenmiştir.

Literatürde radyopak madde içeren NISV' larla yapılan hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmalarımızda sıvı kristalin ve jel tipte farklı sürfaktanlar kullanılarak hazırlanan NISV 'lerin özellikleri (etken madde tutulması, in vitro salım v.s.) ve in vivo davranışı değerlendirmek mümkün olmuştur.

Literatürde NISV formülasyonlarını hazırlamada (47.5:47.5:5) ve (10:1:4) molar bileşimleri kullanılmıştır (20, 72).

Çalışmalarımızda aynı bileşimli lipozomlarla karşılaştırma olanağı vermesi nedeniyle (7:2:4) molar bileşimli sıvı kristalin ve jel tipte NISV' lar kullanılmıştır. Yapıya kolesterol eklemenin uygun Iopromid NISV' larının hazırlanmasına olanak verdiği anlaşılmıştır.

Böylece hem lipozom hem de NISV tipi veziküllerde (7:2:4) formülasyonu daha yüksek etken madde hapsedmesi nedeniyle en uygun formülasyon olarak değerlendirilmiştir.

IV.4. TAMPON SEÇİMİ

Araştırmamızda hazırlanan tüm lipozom formülasyonlarında Tris (pH 7.4) tamponu kullanılmıştır. Ancak, in vivo çalışmalarda Tris tamponu yerine radyonüklidin bağlanma veriminin yüksek olması nedeniyle E₁ ve E₃ kodlu lipozomlarda distile su E₂ ve E₄ kodlu lipozomlarda asetat (pH 5) tamponundan yararlanılmıştır. Ayrıca tüm NISV formülasyonları (S₁, S₂, S₃, S₄) için distile su kullanılmıştır.

Araştırmamızda Tris tamponunun kullanılma nedeni lipozomlarda lipit peroksidasyonuna karşı koruyucu etkide olduğu ve PC ile hazırlanan lipozomların hidrolizi üzerinde katalitik etkisi araştırılan çeşitli tamponlardan en uygun tampon olarak Tris bulunduğu bildirilmesidir (73).

Ayrıca fosfat tamponu kullanılmış olsaydı fosfolipitlerin yapısında bulunan fosfora bir de tampondan gelen fosfor eklenerek fosfolipitlerin miktar tayini çalışmalarında sonuçları etkilemesi söz konusu olacağından bu olasılık ortadan kaldırılarak hesaplamalar kolaylaştırılmıştır.

Ayrıca, Tris Tamponunun pH' ısı fizyolojik pH olan 7.4 olarak seçilmiştir. Çünkü pH' ının fazla aside kayması halinde etken maddenin noniyonize haldeki miktarının artacağı ve bunun da lipit tabakalarda partisyona uğrayacağı bildirilmiştir (25).

pH 7.4 Tris Tamponu, yapılan çalışmalarla 20 mM ozmotik güçte hazırlanmıştır. Çünkü izotonik veya hipertonic çözeltilerde hazırlanan lipozom dispersiyonları büzülme nedeniyle zarar görmezken; hipotonik ortamlarda etken maddenin kaybına yol açtıkları rapor edilmiştir (25).

IV.5. YÜK VERİCİ STEARİLAMİN' İN EKLENMESİ

Araştırmamızda SA veziküllere pozitif yük verici madde olarak katılmıştır.

İster lipozom ister NISV olsun veziküllerin fiziksel stabilite problemlerini çözmek için yapılarına yük verici maddeler eklenir. Yük verici maddelerin fiziksel stabiliteyi sağlaması veziküller arasında elektrostatik etkileşimler meydana getirmesine dayanır. Bu nedenle yapıya eklenen yük, vezikül yüzeyinde elektrostatik yüzey potansiyeli sağlar. Bunun sonucu itme meydana gelir ve farklı çifte tabakalar arasında itmeyi sağlayarak hidrofilik maddelerin nötral lipozomlara göre daha fazla tutulmasını sağlar (74).

Ayrıca negatif yüklü lipozomların pozitif ve nötral lipozomlara göre etken maddeyi daha fazla miktarda tuttuğu bildirilmiştir (74).

Ancak literatürde bunun aksini bildiren çalışmalarda vardır ve pozitif yüklü sukroz ve Arabinozit-C lipozomlarının negatif yüklülerden daha çok hapsetme kapasitesine sahip olduğu bildirilmiştir (75).

Ayrıca pozitif yüklü sodyum meglumin diatrizoat lipozomlarının toksisitesinin daha az olduğu da rapor edildiğinden (7) çalışmalarımızda pozitif yük veren SA kullanılmıştır.

Daha önceki çalışmalarımızda NISV veziküllerine yük ilavesinin enkapsülasyon hacmini artırdığı saptanmıştır (20, 76).

IV.6. KOLESTEROL' ÜN EKLENMESİ

Kolesterol lipozom ve NISV' ların yapısına fosfolipit ve sürfaktanlar yanında giren diğer bileşenlerden biri olup bir steroldür. Çifte tabakaya kolesterol ilavesi, eğer veziküller jel tipte ise az miktarda akışkanlaştırıcı etki gösterir; sıvı kristalin tipte ise büyük bir düzenleyici etki gösterir. Sıvı kristalin tipteki membranlarda kolesterol' ün etkisi:

- Azalmış akışkanlık
- Rijiditenin artması
- Kondensasyon
- Artmış moleküler düzenleme

gibi terimlerle de anılır. Yukarıda açıklanan etkisi nedeniyle kolesterol sıvı kristalin tipteki fosfolipit çifte tabakalarının geçirgenliğini azaltır (69).

Öte yandan kolesterol içeren veziküllerin tam kan, plazma veya serum verildiğinde in vivo stabilitesi uzundur. Bu nedenle in vivo stabiliteyi artırmak için kolesterol eklenir.

Benita ve ark.ları yaptıkları bir çalışmada kolesterol' ün etkisini radyopak madde içeren lipozomlarda araştırmışlar ve kolesterol miktarı arttıkça tutulan madde miktarının arttığını ve bunun da lipozomların geçirgenliğindeki azalma sonucu olduğunu belirtmişlerdir (74).

Benzer bulgu Baillie ve ark.ları tarafından NISV 'lar için de rapor edilmiştir (52).

Yukarıda belirtilen nedenlere dayanarak hem lipozom hem NISV formülasyonlarına kolesterol eklenmesi uygun bulunmuştur.

IV.7. LİPOZOM VE NISV' LARI HAZIRLAMA YÖNTEMİ

Lipozom ve NISV' ların hazırlanmasında çeşitli yöntemler kullanılır. Ancak bu

yöntemlerin seçilmesi amaca göre yapılmalıdır.

Yöntemler içinde film metodu en sık başvurulana yoldur. Elde edilen lipozomlar MLV tipi lipozomlardır. MLV tipi lipozom elde etmek üzere film metodu seçilmiştir. Çünkü MLV tip veziküllerde daha fazla etken madde tutulur, in vivo şartlara SUV tiplerden daha fazla dayanıklıdır, ayrıca KC' e ulaşma açısından daha uygun olmaları nedeniyle tercih edilmiştir (7, 39, 40, 74, 76).

Baillie ve ark. ları ise eter yöntemi ile film yöntemini karşılaştırdıklarında NISV 'ları hazırlamada ilk yöntemin etken madde tutuma kapasitesinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir (71). Bu nedenle NISV formülasyonlarının hazırlanmasında da MLV tipi vezikül veren film yöntemi kullanılmıştır. Ayrıca hem lipozom hem NISV formülasyonlarının hazırlanmasında aynı yöntemin kullanılışı, yönremi sabit tutarak her iki tip veziküle ait sonuçların karşılaştırılmasına olanak vermiştir.

Çalışmalarımızda basitliği, kolaylığı, yüksek etken madde tutma kapasitesi ve araştırma amacına uygunluğu nedeniyle film yöntemi ve ardından banyo sonikasyonu uygulanmıştır (15).

IV.7.1. PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ VE DAĞILIMI

Hazırlama yöntemi, kullanılan lipidlerin tipi ve konsantrasyonu, formülasyon gibi çeşitli parametreler veziküllerin partikül boyutu üzerine etkilidir. Bu nedenle partikül büyüklüğü ölçümleri hazırladıktan 1 st sonra ve diğer safhaların ardından yapılmış; böylelikle farklı zamanlarda ölçümlerden gelebilecek hatalar standardize edilmiştir.

Araştırmamızda film yöntemi ve ardından sonikasyonla hazırlanan lipozomlar için PL 100 (sıvı kristalin tip) ve DSPC (jel tip) lipidleri kullanılmıştır. Tablo 7a ve b 'de (7:2:4) molar bileşiminde hazırlanan boş ve Iopromid 'li lipozomlara ait karşılaştırmalı partikül büyüklükleri verilmiştir. Görüldüğü gibi tüm veziküller MLV tiptedir.

NISV' larda ise Sürfaktan I ve Sürfaktan II non-iyonik sürfaktan veziküllerinden Iopromid içeren ve içermeyen fomülasyonların karşılaştırmalı partikül büyüklükleri Tablo 7a ve b' de gösterilmiştir.

Boş ve dolu tipteki lipozom ve NISV formülasyonları karşılaştırıldığında, içinde etken madde taşıyan her iki tip vezikülün (E_1, E_2, S_1, S_2) boş veziküllerden (E_3, E_4, S_3, S_4) daha büyük olduğu gözlenmiştir. Iopromid içeren veziküllerin daha büyük olması, içinde etken maddeyi hapsetmesinden kaynaklanmaktadır.

Sıvı kristalin ve jel tipi lipozomların partikül büyüklükleri karşılaştırılırsa jel tipi veziküllerin daha büyük partikül boyutuna sahip olduğu gözlenmiştir. Jel tipi lipozomların daha büyük olması bu tip veziküllerin daha rijit bir yapıya sahip olmasından ve amfilik moleküllerin daha büyük moleküler yapısından kaynaklanmaktadır.

Aynı husus, NISV' lar için incelendiğinde Sürfaktan II içeren (sıvı kristalin) veziküllerin partikül büyüklüğünün Sürfaktan I içeren (jel) veziküllere göre daha büyük olduğu saptanmıştır. Lipozomların daha büyük boyutta olmasında fosfolipitlerin sürfaktanlardan daha büyük moleküler yapıya sahip olması rol oynamaktadır.

Ayrıca lipozom ve NISV' ların partikül boyutları karşılaştırılacak olursa lipozomların daha büyük olduğu bulunmuştur. NISV' larda lipozomların aksine sıvı-kristalin tip vezikül veren Sürfaktan II' nin (molekül ağırlığı =972), Sürfaktan I' den (molekül ağırlığı =473) daha dallanmış yapıda olmasından kaynaklanmış olabilir.

Yukarıda gözlenen tüm bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur (20).

Gözlenen sonuçlar, ister lipozom ister NISV olsun tüm vezikülleri karakterize etmede ortalama partikül büyüklüğünün önemli olduğunu göstermiştir.

IV.7.2. HAPSEDİLEN ETKEN MADDE MİKTARI

Vezikülerde tutulan etken madde miktarı açısından lipozomlar incelendiğinde sıvı kristalin tipteki lipozomların (E_2), jel tipten (E_1) daha az Iopromid tuttuğu gözlenmiştir ($E_2 < E_1$) ($p < 0.05$) (Tablo 10).

Aynı husus NISV formülasyonlarında incelendiğinde tersine durum gözlenmiştir ($S_2 > S_1$) ($p < 0.05$).

Jel tipi lipozom (E_1) ve NISV (S_1) lar karşılaştırıldığında lipozomların daha çok etken madde hapsettiği anlaşılmıştır.

Benzer sonuç sıvı kristalin lipozom ve NISV' lar incelendiği zamanda gözlenmiştir ($E_2 > S_2$) ($p < 0.05$).

Lipozom ve NISV tipi veziküller hapsettikleri etken madde açısından karşılaştırılacak olursa lipozom formülasyonlarının NISV' lardan biraz daha fazla etken madde tuttukları belirlenmiştir. Bulgularımız literatürle uyumlu bulunmuştur (71).

IV.7.3. SERBEST ETKEN MADDE MİKTARI

Her iki tip vezikülü hazırlamada başlangıç konsantrasyonunun tümünü hapsetmek mümkün değildir. Lipozom ve NISV' larda vezikül içinde tutulamayan etken madde serbest etken madde olarak adlandırılır ve süpernatanda kalır.

Jel tipi lipozom ve NISV' larda serbest etken madde miktarları, sıvı-kristalin tipteki lipozom ve NISV' lardaki serbest etken madde miktarlarından daha az bulunmuştur (Tablo 9). Bu bulgu içte hapsedilen etken madde miktarlarıyla uyumludur. Çünkü jel tipi veziküllerde daha çok etken madde hapsedildiğinden, süpernatatlarda daha az madde kalmıştır.

Genel olarak iki tip vezikül değerlendirildiğinde ise lipozomlarda, serbest etken maddenin aynı nedenle daha az bulunduğu gözlenmiştir.

Serbest etken maddenin ilk süpernatatlarla daha çok uzaklaştırıldığı; diğerlerinde bu miktarın daha az olması da doğal bir sonuçtur. Bulgularımız literatürle uyumlu sonuç vermiştir (20).

IV.7.4. LİPOZOM VE NISV' LARDA ENKAPSÜLASYON HACMİ

Hidrofilik karakterdeki Iopromid' in çözündüğü sulu fazın miktarını tespit etmede enkapsülasyon hacminden yararlanılır. Bulgularımız, literatürde MLV tip lipozom ve NISV 'lar için verilen değerlerle uyum göstermektedir (4.17, 3.82, 4.2 ve $4.85 \mu\text{L.mL}^{-1}$) (77).

IV.7.5. LİPOZOMAL FOSFOLİPİT MİKTARI

Lipozom formülasyonlarında kullanılan hazırlama yönteminin lipozom hazırlama verimine etkisi lipozomal fosfolipit miktarının tayini ile saptanmıştır. Araştırmamızda formülasyonların hazırlanmasında film yönteminin ardından sonikasyon uygulanmıştır. Etkin maddenin hidrofilik olması halinde fosfolipit veriminin azalması fazla önemli değilken lipofilik olması halinde önemlidir. Bunun da nedeni lipofilik etken maddenin lipozomal çifte tabakada tutulmasıdır. Hazırlama sırasında fosfolipit kaybı halinde lipozomda etken madde miktarı azalacaktır.

Fosfolipit miktarı açısından etken madde içeren lipozomların boş lipozomlardan hazırlama basamakları sırasında daha az lipit kaybettikleri gözlenmiştir. Ayrıca jel tipi lipozomlarda lipit kaybının sıvı-kristalin tipteki lipozomlardan daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun da nedeni, sıvı-kristalin tipteki lipozomların daha esnek yapıda olmalarından ve “Onion Peeling Effect” ten kaynaklanmaktadır (78).

Bulgularımız, literatürle paralel sonuçlar vermiştir (67).

IV. 7.6. VEZİKÜLLERİN TABAKA SAYISININ SAPTANMASI

Araştırmalarımızda kullanılan lipozom ve NISV’ ların MLV tipi olduğu hazırlama tekniği, ortalama partikül büyüklüğü gibi yollarla belirlenmiştir. Ayrıca polarizan mikroskoptaki incelemelerle de MLV tipi olduğu irdelenmiştir. Lipozom ve NISV’ lardaki fosfolipitler ve non-iyonik sürfaktanlar polarize ışıkla sarı mavi kros verirler. Mikrograflarda bu krosler gözlenmiştir (Şekil 34-37). Ayrıca mikrograflarda görülen çok sayıdaki içiçe halkalar bu veziküllerin çok tabakalı tipte olduğunu göstermektedir.

IV.8. STABİLİTE ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Uygun bir raf ömrü, her farmasötik preparat gibi lipozom ve NISV’ lar için de tedaviye sunmadaki başarı için gereklidir. Bir başka deyişle hastaya ulaşana kadar

geçen zamanda etken madde vezikül dışına kaybedilmemelidir. Fiziksel stabilite; ilacın hidrofilik ya da hidrofobik tabiatından, çifte tabakanın bileşiminden ve saklama şartlarından etkilenir (69).

Çalışmalarımızda a) Bekleme sırasında etken maddenin dışarıya sızması b) bekleme sırasında ortalama vezikül büyüklüğü değişimi olmak üzere iki parametre incelenmiştir.

IV.8.1. STABİLİTE ÇALIŞMALARINDA ETKEN MADDE KAYBI

Lipozomlarda etken maddenin bekleme sırasında, lipozom dışına sızması sıvı-kristalin ve jel tipte oluşuna göre farklılık göstermiştir (Tablo 11) jel tipteki DSPC lipozomlarında Iopromid kaybı daha azdır. Etken madde kaybının jel tipi lipozomlardan daha az olma nedeni, jel tipi fosfolipitlerin daha rijit ve sulu yapı gösterirken sıvı-kristalin tipin daha esnek yapıda olması ve böylece sulu fazda çözünen hidrofilik etken madde kaybının daha kolay olmasıyla açıklanabilir.

NISV' larda ise etken madde kaybı açısından jel ve sıvı-kristalin tipler arasında bir fark gözlenmemiştir (Tablo 12).

Buzdolabı ve oda sıcaklığı olmak üzere farklı sıcaklıkta bekletmenin jel tipi lipozomlarda etkisi gözlenirken, sıvı kristalin tipteki lipozomlarda etkisinin önemli olmadığı anlaşılmıştır.

NISV' larda ise farklı sıcaklıklarda saklamanın hem sıvı-kristalin hem jel tipi veziküllerde etkili olduğu ve buzdolabında saklamanın uygun olduğu gözlenmiştir.

Genel olarak hem lipozom hem NISV' larda, hem jel hem de sıvı-kristalin tip veziküllerin N₂ atmosferinde ve buzdolabı sıcaklığında saklanması uygun olduğu anlaşılmıştır.

Bulgularımız literatürdeki diğer bulgularla da uyumludur. Betageri (79, 80) hidrofilik bir ilaç olan dideoksinozin trifosfatın sıvı-kristalin ve jel tipi lipozomlardaki stabilitesini 4, 25, ve 37 °C sıcaklıklarda 1 ay süreyle izlemiş ve hidrofilik etken madde kaybının buzdolabında ve azot atmosferinde saklamayla, uzun zincirli yağ asitleri kullanma ve kolesterol ilavesiyle minimumda tutulabileceğini bildirmiştir (79, 80).

Bulgularımız Niven ve ark.larının (24) bulgularına da paralellik göstermektedir. Niven ve ark.ları yaptıkları çalışmada % 30 'a kadar kolesterol eklemenin, yük maddesi ilavesinin ve lipit bileşiminin CF içeren lipozomlardan hidrofilik ilacın salımını azalttığını bildirmişlerdir (24)

NISV' larla yapılan çalışma bulgularımızda literatürde bildirilen çalışmalarla benzer sonuçlar vermiştir. Yoshioka ve ark.ları CF içeren NISV' ların hidrofilik etken maddeyi kaybetmesinde sürfaktan tipinin, kolesterol miktarının ve HLB' sinin etkili olduğunu bildirmişlerdir (76).

Ayrıca lipozom ve NISV' lar karşılaştırıldığında lipozomlarda etken madde kaybının NISV' lardan daha fazla olduğu gözlenmiştir. Bunun muhtemel nedenleri arasında çifte tabakayı oluşturan bileşenler arasındaki ve molar bileşenler arasındaki farklılıklar yanında, hapsedilen Iopromid-U içindeki Iopromid' in yanısıra yardımcı maddelerin bulunuşu ve bunların fosfolipit ve sürfaktanlarla farklı derecede etkileşmesi sayılabilir. Bu etkileşme sonucu veziküllerin çifte tabakasının geçirgenliği değişip artarak etken madde vezikül dışına kaybedilir.

Ayrıca, NISV' larda kolesterol ekleme jel fazın hidrokarbon zincirlerinin dizilişini bozarak geçirgenliği artırmaktadır. Tc altında kolesterol, membranı daha düzensiz hale getirirken Tc üstünde membranın düzenli hale geçmesine yol açar. Öte yandan lipozomlarda ise sıvı-kristalin tip fosfolipitlerin zincir uzunluğu azalırken doymamış çifte bağların sayısı artarak vezikül geçirgenliğinde de artışa neden olur.

HLB' nin de etken madde tutulması, vezikül boyutu ve etken madde kaybedilmesinde etkili olduğu literatürde bildirilmiştir (76). HLB azaldıkça vezikül boyutu azalmakta ve etken madde kaybı artmaktadır. Sürfaktan I' in HLB' sinin (9.68), Sürfaktan II' den (11) daha düşük (daha hidrofobik) olduğu düşünülürse sonuçlarımız bu şekilde yorumlanabilir.

IV.8.2. STABİLİTE ÇALIŞMALARINDA PARTİKÜL BÜYÜKLÜĞÜ DEĞİŞİMİ

Uzun süre bekletilen lipozomlarda stabilitenin tek göstergesi lipozom dışına

kaybedilen etken madde değildir. Partikül büyüklüğü değişimi, stabilite değerlendirmesinde iyi bir parametredir.

Çalışmalarda lipozomlar partikül büyüklüğü bakımından incelendiğinde, ister oda sıcaklığı ister buzdolabında saklansın tüm formülasyonlarda hafif bir artış gözlenmiştir. Bu artış buzdolabında saklanan hem jel tipi hem sıvı-kristalin tipteki lipozomlarda oda sıcaklığında saklanan formülasyonlardan daha azdır. Ayrıca partikül büyüklüğündeki artış, jel tipi lipozomlarda daha azdır.

Yukarıda belirtilen durum NISV' lar içinde aynı şekilde gözlenmiştir.

Saklama sırasında partikül büyüklüğü artışı beklenen bir durumdur. Ancak çok büyük boyutlarda değildir ve lateral faz ayrımı gözlenmemektedir.

Bulgularımız literatüre paralellik göstermektedir (81).

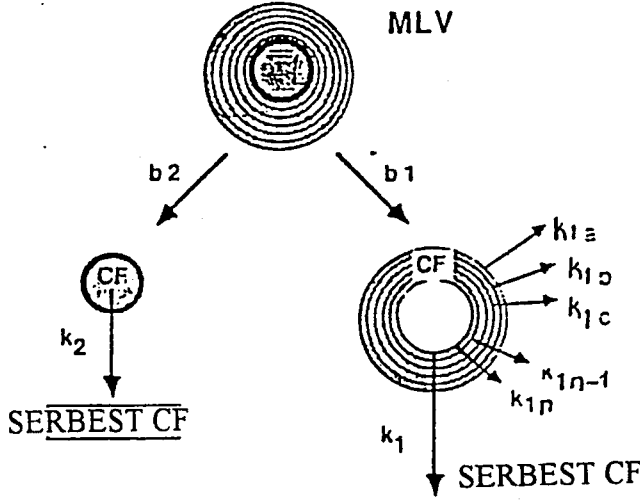
IV. 9. VEZİKÜLLERDEN İN VİTRO SALIMIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Etken maddenin lipozom ve NISV' lardan salımı in vitro şartlar olan 37 °C de, pH 7.4 Tris Tamponunda ve yavaş çalkalamalı su banyosunda inkübasyon yöntemiyle incelenmiştir. İn vitro salımın hangi mekanizmaya uyduğunu belirlemek üzere Higuchi, 1.derece ve 0.derece kinetiklerine uygunluk araştırılmıştır. Bu amaçla, belirtilen üç kinetiğe ait in vitro salım hız sabitleri incelenmiş, korelasyon ve determinasyon katsayıları hesaplanmıştır. Tüm lipozom ve NISV formülasyonlarının Higuchi modeline uygunluk gösterdiği gözlenmiştir.

Higuchi kinetiğine göre % salınan madde $\sqrt{t}$ 'ye karşı grafiğe geçirildiğinde lineer bir doğru elde edilir. Bu durum vezikülün membran matrisinden etken maddenin difüze olduğunu yani difüzyonun salımda hız kısıtlayıcı basamak olduğunu göstermektedir. Bulgularımız literatüre uymaktadır (67).

Niven ve ark.ları ise CF içeren soy PC ve DPPG bileşimli lipozomlardan etken madde salımının zahiri-birinci derece kinetiğine göre olduğunu belirtmişlerdir (19)

Hidrofilik etken maddenin MLV tipi lipozomdan salımı için şu mekanizma önerilmiştir (Şekil 50) :



Şekil 50: Hidrofilik Bir Maddenin MLV Tipi Lipozomdan Salımı (23).

Sulu çekirdek ya yalnız başınadır (b_1) ya da lipozomal çift tabakaların ortasında kalır (b_2). Muhtemelen difüzyon, her bir tabakadan tek tek ve aynı hızda gerçekleşir ($k_{1a} \approx k_{1n}$). Böylece tüm serbestleşme k_1 'le gösterilebilir. İç sulu çekirdekten serbestleşme varsa, çekirdeği çevreleyen birinci veya ilk birkaç çift tabaka dıştakilerden daha sıkı yapı gösterir ve hapsedilen etken madde için hız kısıtlayıcı basamağı oluşturur. Ayrıca dış tabakaların in vivo şartlarda dış ataklara daha çok maruz kaldığı unutulmamalıdır (23).

İdeal bir taşıyıcı sistemden ilaç salımının birinci derece kinetiğe uygun olması beklenir. Ancak lipozomlarla yapılan çalışmalardan birinde salımın bifazik olduğu rapor edilmiştir (23).

Buna göre; muhtemelen yüzeye yakın ilaç moleküllerinin çözünme ortamına kısa sürede geçmesi nedeniyle hızlı salım, ikinci fazda ise yüzeydeki porlardan etken maddenin difüzyonuyla yavaş salım gözlenmiştir. Çalışmalarımızda elde ettiğimiz salım grafiklerinde iki fazlı bir davranış izlenmiştir.

Öte yandan in vitro salım şartlarının in vivo şartları tam taklit etmediği unutulmamalıdır. Çünkü, i.v. uygulanan dispersiyon HDL atağına uğrayacaktır. Ancak in vitro salım için fikir vermektedir.

IV.10. İN VIVO DAĞILIM SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmalarımızda Iopromid-U içeren lipozom ve NISV dispersiyonları ^{99m}Tc ile işaretlendikten sonra hayvan deneylerinde kullanılmıştır. Ayrıca kontrol amacıyla, halen klinikte bilgisayarlı tomografiyle böbrek görüntülemeye kullanılan radyopak ajan olan Ultravist 'in de ^{131}I ile işaretlenmesi planlanmıştır.

Bu amaçla hem lipozom hem NISV' lardan sıvı-kristalin ve jel tipte olanları hazırlanarak ^{99m}Tc ile işaretlenmiş ve hayvan deneylerinde kullanılmıştır.

Ancak konvansiyonel dozaj şekli olan Ultravist çözeltisi ile işaretleme istenen sonucu vermemiştir. Ultravist 'in içindeki Iopromid benzen halkasına bağlı I içerir. Radyoaktif olan ^{131}I ile "Radyoizotop Yerdeğiştirme" tekniği ile radyoaktif olmayan I' un yerdeğiştirmesi yoluyla molekül işaretlenir. Ancak bu yolla işaretleme verimi düşük olmuş ve sintigrafik görüntü alınamamıştır (sonuçlar tezde verilmemiştir). Iopromid-U' nun içinde bulunan sodyum kalsiyum edetat ^{99m}Tc ile şelat oluşturacağı için ^{99m}Tc ile Ultravist' in işaretlemesi yapılamamıştır. Iopromid' in ^{99m}Tc ile işaretlenmesi denenmiş ancak işaretleme verimi çok düşük elde edilmiştir. Bunun da nedeni Iopromid' in yapısında ^{99m}Tc ile bağ oluşturabilecek sadece OH grubu yeralması ve oluşan bu bağda zayıf özellik göstermesi nedeniyle işaretleme verimi düşük olmuştur. Tüm bu nedenlerden dolayı ticari preparatla karşılaştırma yapılamamıştır.

Boş ve etken madde içeren lipozom ve NISV' ların işaretlenmesinde, 6 saat gibi kısa ve uygun fiziksel yarılanma ömrüne sahip ^{99m}Tc tercih edilmiştir. Ayrıca bir geçiş elementi olması nedeniyle, moleküllere kompleks oluşturarak kararlı bir şekilde bağlanmaktadır (82).

Lipozomlar hem sulu hem lipit fazlarından işaretlenebilirler. Herikisini birden işaretlemek de mümkündür. Sulu fazın işaretlenmesi etkili olmakla beraber hapsedilen radyonüklid miktarı %3-30 arasında sınırlıdır ve sonikasyon uygulanırsa miktarın % 5 'e düştüğü bildirilmiştir (83).

Lipozomların lipid fazından da işaretlenmesi izlenen bir diğer yöntemdir ve

basit ve verimi yüksek bir yoldur. İşaretleme veriminin %90 'na kadar vardığı bildirilmiştir (83).

Çalışmalarımızda lipozomal fosfolipitlerin ^{99m}Tc ile işaretleme yolu, yüksek verimi ve hazırlama işlemlerine uygunluğu nedeniyle tercih edilmiştir.

^{99m}Tc ile işaretleme yapılırken kolaylığı ve hassas oluşu nedeniyle kalayla indirgenme metodu kullanılmıştır. İşaretlemenin kalite kontrolü amacıyla ITLC yöntemi kullanılmıştır ve ^{99m}Tc 'un %90 üzerinde veziküllere bağlandığı gözlenmiştir (Tablo 16, 17). Düşük miktardaki serbest ^{99m}Tc 'u uzaklaştırmak için işaretleme sonrası santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Bu işlemler sonucunda bağlanma verimi % 99' a ulaşmıştır.

Çalışmalarımızda etken madde içeren lipozom ve NISV' ların, boş olanlara karşı in vivo olarak dağılımı incelenmiştir. Bu veziküller ratların kuyruğuna i.v.yolla uygulanmış ve çeşitli zaman aralıklarında çeşitli organlarda tutulum incelenmiştir. Bunun için her zaman aralığında ratlar öldürülmüş sintigrafik görüntüleme ile organ dağılımları gözlenmiş, enjekte edilen ilacın organlara dağıldığından emin olunduktan sonra organları çıkarılıp radyoaktiviteleri ölçülmüştür.

Lipozomların i.v. uygulanması sonucu organ dağılımları incelendiğinde tüm formülasyonların KC' de tutuldukları gözlenmiştir. Bu durum lipozomların normalde sonlanma yerlerinin KC olması nedeniyle olağandır. İkinci sırada ise böbrekler, en çok tutulum gösteren organ olarak gözlenmiştir. Bu durum E_1 ve E_2 iopromid içeren lipozom formülasyonlarında, etken maddenin normalde KC' e girmeyip böbreklerden atılmasıyla ve lipozomal çifte tabakanın bileşim ve yüküyle ilgili bulunmuştur. Iopromid 'in böbreklerde birikmesi, lipozomda hapsedilme hernekadar tutulumu, KC' e çevirmiş ise de lipozomun dış tabakalarında hapsedilip ilk açığa çıkan etken maddenin böbreklere gitmesiyle açıklanabilir.

Sıvı-kristalin ve jel tipi boş ve yüklü lipozomlar karşılaştırıldığında sıvı-kristalin tip lipozomların (E_2 , E_4) daha yüksek karaciğer tutulumu gösterdiği anlaşılmıştır. Yüklü olan jel ve sıvı-kristalin tip lipozomlar ise kendi aralarında karşılaştırılınca jel tipi lipozomlarda daha az tutulum ($E_1 > E_2$) gözlenmiştir. Bu da etken maddenin sıvı-kristalin lipozomlardan daha kolay salımına bağlanmıştır.

Tutulum etken maddeli lipozomlarda 1. ve boş lipozomlarda 2.saatin sonunda en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

Ayrıca 24.st' te de karaciğerde etki görülmesi lipozomların sürekli salım sağladığını da göstermektedir.

NISV' larda veziküllerin en çok böbreklerde tutulduğu saptanmıştır. Lipozomların aksine RES organları dışında bir organ olan böbreklerde lokalize olurken RES organlarında ise en çok dalakta tutulma olmuştur. Boş NISV' larla elde edilen bu sonuçların etken madde yüklü NISV' larda da aynı olduğu gözlenmiştir (Tablo 22-25).

Jel tipi NISV' ların tüm organlarda sıvı-kristalin NISV' lardan daha fazla etken madde tutulumu sağladığı görülmüştür ($S_1 > S_2$), (Tablo 22-25).

Tutulum, en yüksek seviyesine 1-2st sonunda ulaşmıştır.

Ayrıca 24.st' te de hala böbreklerde etken maddenin bulunduğu gözlenmiştir. Bu durum NISV' larında sürekli salım sağladığını göstermektedir.

Görüldüğü gibi hem lipozom hem NISV' larda etki süresiuzamıştır. Oysa Iopromid-U halinde uygulanan Iopromid'in vücutta enjeksiyon sonrası 1-2dk.içinde dağılıma uğradığı ve uygulamadan sonra 3-5 dk.' da böbrek parenkimasında ve 8-15 dk.' da üreterlerde maksimuma ulaşarak CT kontrastı sağladığı bilinmektedir. Bulgularımız ise bu çok kısa görüntüleme süresinin lipozomal veya NISV' al Iopromid-U ile çok daha fazla uzatılabileceğini ve radyologlara daha rahat çekim imkanı sağlayacağını göstermektedir. Bu durum özellikle çocuk ve gençhastalarda (fizik aktivitenin ve metabolizasyonun hızlı olduğu) önem kazanmaktadır.

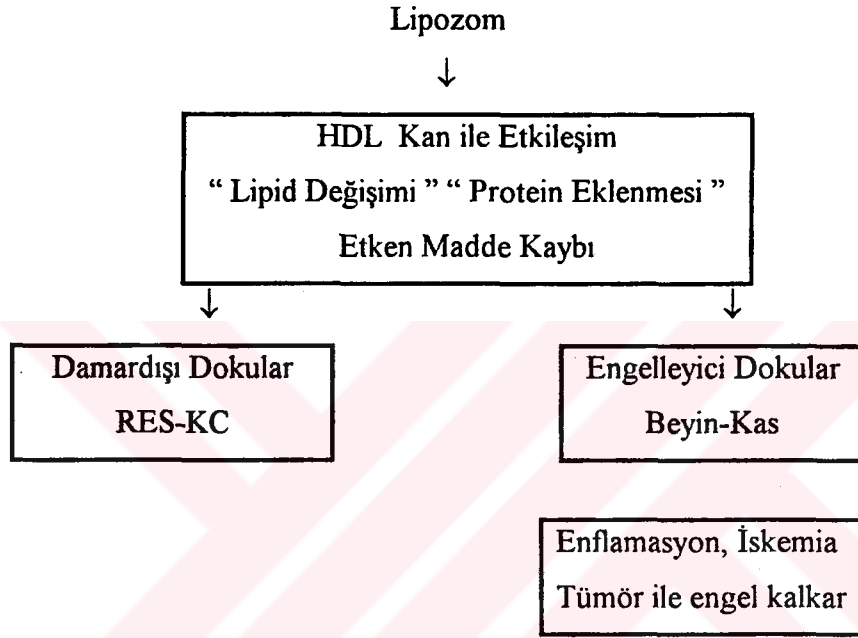
NISV' ların RES organları dışında böbreklerde en fazla tutulmasının nedenleri üzerinde durulacak olursa:

Boş NISV' ların da etken maddelerle aynı biyodağılımı göstermesi böbreklerde birikmenin NISV' ların yapısındaki sürfaktanların molar bileşimleri, cinsleri ve yük verici maddenin yük cinsi ve ve kendisiyle ilgili bir özellik olarak düşünülmüştür.

Aynı zamanda Iopromid, Ultravist® halinde i.v. yolla uygulandığında böbrekler yoluyla glomerüler filtrasyonla atılır ve KC hücrelerine girmez (84).

Veziküllerin biyokinetiği incelenirse, veziküller intravasküler (i.v.) kompartmandan iki diğer kompartmandan birine geçer : a) Damardışı dokulara b) Engelleyici dokulara. Veziküllerin bunlardan hangisine geçeceğini damardışı alan yani "kapiller yatak" tayin eder. Engelleyici dokular, devamlı kapillerden oluşur ve endotel

hücreler çok küçük açıklığı olan (fenestration) kapiller ve “tight junction” lar ile örülmüş olup bu kapillerler devamlılık gösteren bir membrana sahiptir. Oysa damardışı dokular, açıklıkları büyük olan sinüsoidal kapillerlere sahiptir ve buradaki membran ya yoktur ya da tam ve devamlı değildir. Bu sayede de büyük moleküllerin kapiller lümenine girişine izin vererek fagositik hücrelere yöneltir (Şekil 51).



Şekil 51: Lipozomların Biyokinetiği (83).

Öte taraftan glomerüler membran geçirgenliği çok fazla olan bir yapıdır (damardışı dokulardandır) ve yapısındaki proteoglikanlar nedeniyle negatif elektrik yüküne sahiptirler (85). Araştırmamızda kullanılan NISV’ lar ise pozitif yüklüdür. Böylece, hem geçirgenliğinin kolay oluşu hem de zıt yükler nedeniyle NISV ‘ların böbreklerde daha çok tutulması gerçekleşmiş olabilir.

Çalışma sonuçlarına göre en yüksek tutulumu lipozomlarda sıvı-kristalin tip E₂ ve NISV’ larda jel tipi S₁ formülasyonu ile sağlanmıştır.

IV.11. BİLGİSAYARLI TOMOGRAFİ ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hastalıkların tedavisinde gelişmiş radyolojik yöntemlerden biri olan CT ile görüntüleme çalışmaları hem lipozom hem de NISV' ların etken maddeyle yüklü olanlarıyla sürdürülmüş ve konvansiyonel şekil olan Ultravist' e göre opasite artışı açısından değerlendirilmiştir.

CT ile yapılan görüntüleme çalışmaları, in vivo çalışmalarda en iyi sonuç veren lipozom ve NISV formüllerinin ve biyodağılım çalışmalarıyla en çok tutulumun olduğu zamanda (ortalama 60. dk.) rat' lara uygulanmasıyla sürdürülmüştür. Bu nedenle E₂ lipozomları ve S₁ NISV' ları kullanılmıştır.

CT çalışmalarında Ultravist, lipozom ve NISV formüllerinin kontrastlı ve kontrastsız görüntüleri alınmıştır.

Kontrastlı ve kontrastsız görüntüleri alınan organlardan KC ve böbrek incelenmiştir. Bilindiği gibi Ultravist 'in kontrastlı CT' lerinde heM KC hem de böbrekler için artış görülmüştür. Bu artış böbreklerde daha anlamlıdır (p<0.05).

Öte taraftan kontrast artışı NISV' larda S₁ formülasyonunda hem KC (13 ΔHU) hem böbrekte (9 ΔHU) görülmekle beraber; asıl artış E₂ lipozom formülasyonu ile hem KC (17 ΔHU) hem böbrekte (95 ΔHU) çok belirgindir (p<0.05).

Görüldüğü gibi hidrofilik bir radyokontrast ilaç olan Iopromid' in lipozomlar içinde hapsedilmesiyle hem KC hem böbreklerde daha fazla kontrast artışı sağlanmıştır. Çünkü her üç formülasyon (Ultravist, S₁, E₂) sabit miktarda (0.5mL) hayvanlara uygulanmıştır. Dolayısıyla bu doz içinde 370 mg.mL⁻¹ I varken, S₁ içinde 30.3 mg.mL⁻¹ I ve E₂ formülasyonunda 34.8 mg.mL⁻¹ I bulunmaktadır. Literatürde iyi bir CT görüntüsü elde edilebilmesi için 30 ΔHU 'luk bir kontrast artışı gerektiği ve bu kontrast artışın minimum 1 mg I /g doku ile sağlanabildiği bildirilmiştir (30). Aynı literatür sadece radyografi tekniği kullanılması halinde 1-2 cm kalınlıktaki doku görüntülemesi için bu miktarı 10 mgI /g olarak bildirmiştir.

Bu açıdan formülasyonlar incelendiğinde en iyi opasite artışı E₂ lipozom formülasyonu ile sağlanmıştır.

Öte yandan görüntüleme için gerekli opasite artışı çalışmaları sadece tek doz ile yapılmıştır. Oysa literatürde doz arttıkça, bir başka deyişle I miktarı arttıkça opasite de artmaktadır (68). Çalışma bu açıdan daha sonra yapılacak çalışmalarla araştırılabilir.

Çalışmalarımız literatürdeki (68) 4:5:1 (PC/CHOL/SS) molar bileşimli, etanol evaporasyonu ile elde edilen Iopromid lipozomlarından daha iyi sonuç vermiştir. Çünkü bu lipozomlarda kontrast artışı 40 ΔHU iken araştırmamızda 95 ΔHU olarak E₂ lipozom formülasyonu ile elde edilmiştir. Bu farklılığın farklı lipid kullanımı, farklı molar bileşim, farklı elde ediliş yöntemi ve farklı uygulama dozlarından kaynaklanmış olması düşünülmektedir.

NISV' larla bu konuda literatürde yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Sonuç olarak yapılan çalışmalarda E₂ lipozom formülasyonu olan (PL100 :SA :CHOL) (7:2:4) molar bileşimli Iopromid formülasyonunun CT ile yapılan görüntüleme çalışmalarında ümit verici bir formülasyon olduğu sonucuna varılmıştır. Öte yandan kimyasal stabilitesinin dikkate alınması halinde S₁ NISV formülasyonu olan (SUR I:SA:CHOL) (7:2:4) molar bileşimli Iopromid formülasyonunun da gözden uzak tutulmaması gerektiği anlaşılmıştır.

Tüm araştırma dikkate alındığında Iopromid-U içeren lipozom ve NISV' larla MLV tipi, ortalama partikül büyüklüğü 1.9 µm civarında olan veziküller elde edilmiştir. Bu veziküllerin karakterizasyonu yapılmış ve etken madde tutulumu en çok lipozomlarda E₁ formülasyonu ile, NISV' larda S₂ formülasyonu ile sağlanmıştır.

Higuchi kinetiğine uygun in vitro salım, etken maddenin difüzyonla ve sürekli salındığını göstermiştir. KC ve RES organlarında da 24. saatte hala ilaç bulunması bunu doğrulamaktadır.

Stabilite çalışmaları sonucunda lipozomlarda etken madde kaybı ve partikül büyüklüğü değişimi incelenmiştir. Sıcaklığın etken madde kaybı üzerinde lipozomlarda önemsiz, NISV' larda önemli olduğu anlaşılmıştır. Partikül büyüklüğü ise her iki tip vezikülde de sıcaklığa bağlı olmaksızın hafif bir artış göstermiştir.

Lipozom veya NISV' larda hapsedilmiş Iopromid-U' nun biyodağılımları farklılık göstermiştir. Lipozomlarda (boş ve etken maddeli) en fazla tutulum KC iken; NISV' larda böbrekler olmuştur. Sıvı-kristalin ve jel tipi lipozomlardan en fazla ilki (E₂) organ tutulumu sağlarken, NISV' larda jel tipi (S₁) bu sonucu vermiştir.

CT ile görüntüleme çalışmalarında da biyodağılım çalışmalarına benzer sonuçlar elde edilmiş ve KC ve böbrekte opasite artışı gözlenmiştir. Bu bakımdan lipozomlarda en fazla opasite artışı sağlayan formülasyon E₂ olarak gözlenmiştir.



ÖZET

Bu araştırmanın amacı Iopromid-U içeren lipozom ve NISV formülasyonlarını geliştirmek, in vitro salım ve in vivo dağılım üzerinde çalışmalar yapmak, fiziksel stabilitesini incelemek, ilacın KC veya böbreklerin CT ile görüntülenmesinde fizibilitesini araştırmaktır.

Çalışmada lipozom ve NISV' ları hazırlanan iopromid, triiyodobenzen türevi radyokontrast bir maddedir. Hidrofilik özellikteki bu madde non-iyonik bir ajandır. Diğerlerine göre daha az olmakla beraber bulantı, kusma, deride kızarıklık, ateş basması, taşikardi, kan basıncı düşmesi gibi yan etkiler görülür.

Iopromid-U içeren lipozom ve NISV' ları hazırlamada film tekniği ardından sonikasyon yöntemi kullanılmıştır.

Sıvı-kristalin ve jel tipte olmak üzere iki tip lipozom ve NISV hazırlanmıştır. Lipozom çifte tabakasını oluşturmada sıvı-kristalin (PL 100) ve jel tipte (DSPC) fosfolipitler kullanılmıştır. NISV çifte tabakasını oluşturmada ise sıvı-kristalin (Sümfaktan II) ve jel tipte (Sümfaktan I) sümfaktanlar kullanılmıştır. Pozitif yük verici madde olarak SA ve geçirgenliği azaltmak üzere CHOL eklenmiştir. Sıvı-kristalin ve jel tipteki lipozomlar ve NISV' lar için (7:2:4) molar bileşimi kullanılmıştır.

Hazırlanan lipozom ve NISV dispersiyonları üzerinde serbest ve tutulan etken madde miktarı, lipozomal fosfolipit miktarı, veziküllerin partikül büyüklüğü ve tabaka sayısı tayini yapılmıştır.

Özellikleri tanımlanan lipozom ve NISV dispersiyonlarına in vitro salım deneyleri uygulanmış ve farklı salım profilleri elde edilmiştir. In vitro salım bulguları kinetik olarak değerlendirilmiş ve en iyi uyumu Higuchi kinetiğinin sağladığı saptanmıştır.

Ratlar üzerinde yapılan in vivo dağılım deneylerinde ise işaretli lipozom ve NISV formülasyonlarının boş ve etken maddeli olarak biyodağılımları incelenmiştir.

In vitro ve hayvanlardaki in vivo sonuçlar dikkate alındığında en iyi Iopromid-U içeren lipozom formülasyonunun E₂ (7:2:4) ve en iyi Iopromid-U içeren NISV formülasyonunun S₁ (7:2:4) olduğu gözlenmiştir. Bu formülasyonların ticari Ultravist® ile karşılaştırılması, ¹³¹I ile işaretleme metodu optimize edilemediği için yapılamamıştır.

Hayvanlarda yapılan CT görüntüleme çalışmalarında boş ve etken madde içeren lipozom ve NISV formülasyonları ratlarda denenmiş ve sıvı kristalin tipteki E₂ (7:2:4) ve NISV' larda S₁ (7:2:4) formülleri ile en iyi CT görüntülemesi sağlanmıştır.

Sıvı-kristalin ve jel tipteki Iopromid-U lipozom ve NISV formülasyonlarının fiziksel stabiliteleri incelenmiş ve NISV' ların daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. Sıvı-kristalin ve jel tipteki NISV' lar arasında önemli bir fark gözlenmemiştir.

Sonuçta in vitro, hayvanlardaki biyodağılım ve CT görüntüleme çalışmaları dikkate alınırse lipozomlardan E₂ formülasyonunun (7:2:4 bileşimli, sıvı-kristalin tip) ve NISV 'larda S₁ formülasyonunun (7:2:4 bileşimli, jel tip) en uygun olduğu ancak kimyasal stabilite dikkate alındığında S₁ (7:2:4 Sürfaktan I:SA:CHOL) formülasyonunun daha iyi olduğu sonucuna varılmıştır.



SUMMARY

The aim of this investigation is to formulate liposomes and NISVs containing Iopromid-U, to study the in vitro release and in vivo distribution of the active substance, to determine the physical stability of using the vesicles, to investigate the feasibility of Iopromid-U as contrast agent in the CT imaging of liver and kidney.

Iopromid, a triiodobenzene derivate, is a hydrophilic radiocontrast media and non-ionic agent. Although less than the others, it has mild side effects such as nausea, vomiting, flushing, tachycardia and hypotension.

Film method followed by sonication is used for the preparation of Iopromid containing liposomes and NISVs.

Gel and liquid-crystalline state liposomes and NISVs are prepared. PL 100 for the liquid-crystalline state and DSPC for gel state liposomes are used as phospholipids. Surfactant II for liquid-crystalline state and Surfactant I for gel state are used for NISV preparation. SA and cholesterol are incorporated into bilayers, both, as positive charge inducer and bilayer condenser. Bilayer molar compositions of (7:2:4) for liquid-crystalline and gel state liposomes and NISVs are used.

The amounts free of and entrapped drug, liposomal phospholipid content, particle size and number of bilayers are determined for all types of vesicles.

After characterization of liposomes and NISVs in vitro release of drug from vesicles are investigated and results are evaluated kinetically. Higuchi kinetics is found as the best fitting kinetic for drug release.

In vivo experiments are carried on rats and biodistribution of radiolabelled empty and loaded liposomes and NISVs are investigated.

When the in vitro and in vivo (rats) results are taken into consideration, E₂ (7:2:4) for Iopromid-U liposomes and S₁ (7:2:4) for Iopromid-U NISVs are evaluated as the best radiopaque formulations among the others. The comparison of these formulations with commercial Ultravist® can not be done due to the low labeling efficiency.

Empty and loaded liposomes and NISVs are used for CT imaging in rats and the best results are obtained with E₂ (7:2:4) for liposomes and S₁ (7:2:4) for NISVs .

Physical stability of liposomes and NISVs are investigated and NISVs are found to be more stable than liposomes. There is no significant difference between liquid-crystalline and gel state NISVs from stability point of view.

Briefly, as far as the in vitro and in vivo biodistribution and animal CT imaging studies results are concerned, formulation E₂ Iopromid-U liposomes (7:2:4 molar ratio, liquid-crystalline type) and S₁ Iopromid-U NISVs (7:2:4 molar ratio, gel state) are found as the most convenient formulation. However, formulation S₁ Iopromid-U (7:2:4 Surfactant I :SA :CHOL) NISV is evaluated as the best radiopaque formulation when chemical stability is taken into consideration in addition to the results of in vivo studies.

REFERANSLAR

1. Akin A, Temel Nükleer Tıp, A.Ü.Tıp Fak. Yayın, No:417, Ankara 1981.
2. Speck U, Contrast Media-Overview, Use and Pharmaceutical Aspects, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong, Barcelona, Budapest, pp: 27-40, 1993.
3. Lasic DD, Liposomes from Physics to Application, Lasic DD (ed), Part I: General Introduction to Liposomes, Elsevier, Amsterdam-London-New York-Tokyo, 1993.
4. Gregoriadis G, Liposomes as Drug Carriers-Recent Trends and Progress, John Wiley & Sons, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, pp: 509-525, 1988.
5. Dawson P, Bradshaw A, Hill C, Iopromide-A New Non-Ionic Contrast Medium, Acta Radiol Diagnosis, 25, 253-256, 1984.
6. Gürsoy A, Lipozomlar, in Gürsoy A, Pişkin E, Dortunç B, Peppas AN (eds), Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler, İstanbul, Tekno Grafik & Ada Ofset, pp. 173, 1989.
7. Havron A, Seltzer SE, Davis MA, Shulkin MS, Radiopaque Liposomes: A Promising New Contrast Material for Computed Tomography of the Spleen, Radiology 140, 507-511, 1981.
8. Caride VJ, Taylor W, Cramer JA, Gottschalk A, Evaluation of Liposome-Entrapped Radioactive Tracers as Scanning Agents. Part 1: Organ Distribution of Liposome (^{99m}Tc -DTPA) in Mice, J Nucl Med, 17, 1067-1072, 1976.
9. Khar RK, Jaggi M, Liposomes for Liver Scintigraphy, J Lip Res., 4, 939-957, 1994.
10. Richardson VJ, Ryman BE, Jewkes RF, Jeyasingh K, Tattersall MNH., Newlands ES, Kaye SB, Tissue Distribution and Tumour Localization of ^{99m}Tc -Labelled Liposomes in Cancer Patients, J Cancer 40, 35-43, 1979.
11. Al-Muhammad C, Deksametazon Sodyum Fosfat Lipozomlarının Formülasyonu, In vitro Saliverilmesi ve İn Vivo Dağılımı Üzerinde Çalışmalar, Farmasötik Teknoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, 1992.
12. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC, Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids, J Mol Biol, 13, 238-252, 1965.

13. Grit M, Stability of Liposomes. Analytical, Chemical and Physical Aspects. Ph.D. Thesis, Univ. Utrecht, Holland, 37-43, 1991.
14. Zuidam NJ, Stability of-Chemical and Physical Characterization of Liposomes upon Autoclaving, Gamma-Irradiation and Storage, Ph.D. Thesis, Utrecht University, Utrecht, Holland, 1994.
15. Szoka F, Paphadjopoulos D, Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles -Liposomes, *Ann Rev Biophys Bioeng*, 9, 467-508, 1980.
16. Hunt C.A., Tsang , α -Tocopherol Retards Autooxidation and Prolongs the Shelf-Life of Liposomes, *Int J Pharm*, 8, 101-110, 1981.
17. Ho RJY, Schetz M, Deamer DW, Nonenzymatic Hydrolysis of Phosphotidyl choline Prepared as Liposomes and Mixed Micelles, *Lipids*, 22, 156-158, 1987.
18. Grit M, Zuidam NJ, Crommelin DJA, Analysis and Hydrolysis Kinetic of Phospholipids in Aqueous Liposomes Dispersions, in: *Liposome Technology*, Gregoriadis G.(ed), Vol 1, Second Edition, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida USA, 455-487, 1993.
19. Kronberg B, Dolhman A, Carlfors J, Karlsson J, Artursson P, Preparation and Evaluation of Sterically Stabilized Liposomes. Colloidal Stability, Serum Stability, Macrophage Uptake and Toxicity,
20. Mazda F, Üre Üçeren Kozmetik Amaçlı Lipozom ve Non-İyonik Sürfaktan Vezikül Formülasyonları Üzerinde Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, H.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1993.
21. New RRC, Characterization of Liposomes, in: *Liposomes A Practical Approach*, New RRC (ed), Oxford University Press, New York, Chapter 3, pp: 105-161, 1990.
22. Arıca B, Primakin Difosfat Lipozomlarının Formülasyonu, İn Vitro Salıverilmesi ve İn Vivo Dağılımı Üzerinde Çalışmalar, Farmasötik Teknoloji Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, 1992.
23. Niven RW, Speer M, Schreier H, Nebulazation of Liposomes. II. The Effects of Size and Modelling of Solute Release Profiles, *Pharm Res*, 8, 217-221, 1991.
24. Niven RW, Schreier H, Nebulazation of Liposomes. I. Effects of Lipid Composition, *Pharm Res*, 7, 1127-1133, 1990.

25. Niven RW, Carvajal MT, Schreier H, Nebulization of Liposomes. III. The Effects of Operating Conditions and Local Environment, *Pharm Res*, 9, 515-520, 1992.
26. Tomlinson E, Site-Specific Delivery Using Particulate Systems. In: *Modern Pharmaceutics*, Banker GS, Rhodes CT (eds), Marcel Dekker Inc, New York, 672-692, 1990.
27. Schwendener RA, Lagocki PA, Rahman YE, The Effects of Charge and Size on the Interaction of Unilamellar Liposomes with Macrophages, *Biophys Biochim Acta*, 772, 93-101, 1984.
28. McDougall JR, Dunnick JC, Goris ML, Kriss JP, In Vivo Distribution of Vesicles Loaded with Radiopharmaceuticals: A Study of Different Routes of Administration, *J Nucl Med*, 16, 488-491, 1975.
29. Nassander UK, Steerenberg A, Poppe H, Storm G, Poels G, Dejong W, Crommelin DJA, In Vivo Targeting of OV-TL 3 Immunoliposomes to Ascitic Ovarian Carcinoma Cells in Athymic Nude Mice, *Can Res*, 52, 646-653, 1992.
30. Iga K, Hamaguchi N, Igari Y, Ogawa U, Gotok K, Ootsu K, Toguchi H, Shimamoto T, Enhanced Antitumor Activity in Mice After Administration of Thermosensitive Liposome Encapsulating Cisplatin with Hyperthermia, *J Pharm Exp Therap*, 257, 1203-1207, 1991.
31. Sah HK, Kin HP, Lee HJ, Byun SM, Liposomes with Anti-Inflammatory Steroid Prednisolone Palmitate, *Drug Dev Ind Pharm*, 14, 765-777, 1988.
32. Farshi FS, Özer AY, Ercan MT, Hıncal AA, In Vivo Studies in the Treatment of Oral Ulcers with Liposomal Dexamethasone Sodium Phosphate, (Yayın Kabul Edildi, *J Microencap*).
33. Al-Muhammad J, Özer AY, Ercan MT, Hıncal AA, In Vivo Studies on Dexamethasone Sodium Phosphate Liposomes (Yayın Kabul Edildi, *J Microencap*).
34. Krause W, Klopp R, Leike J, Sachse A, Schuhmann-Giamperi G, Liposomes in Diagnostic Imaging, *J Lip Res*, 4, 239-253, 1994.
35. Alman T, Contrast Agent Design. Some Aspects on the Synthesis of Water Soluble Contrast Agents of Low Osmolality, *J Theor Biol*, 24, 216-226, 1969.
36. Wolf G, Arenson R, Cross A, A Prospective Trial of Ionic Versus Nonionic Contrast Agent in Routine Clinical Practice: Comparison of Adverse Effect, *A J R*,

- 15, 939-944, 1989.
37. Barratt GM, Tüzel NS, Ryman BE, Methodological Considerations for the Use of Liposome in Diagnostic Imaging, in Gregoriadis G (ed) Liposome Technology, Boca Rota, Florida, CRC Press, pp.107-124, 1984.
38. Richardson VJ, Ryman BE, Jewkes RF, Jeyasingh K, Tattersall MHN, Newlands ES, Kaye SB, Tissue Distribution and Tumour Localization of Tc-99m- Labelled Liposomes in Cancer Patients , J Cancer , 40, 35-43, 1979.
39. Seltzer SE, Davis MA, Adams FD, Shulkin PM, LandisWJ, Havron A, Liposomes Carrying Diatrizoate Characterization of Biophysical Properties and Imaging Applications , Invest Radiol, 19, 142-151, 1984.
40. Richardson VJ, Jeyasingh K, Jewkes RF, Ryman BE, Tattersall MHN, Possible Tumor Localization of Tc-99m-Labelled Liposomes: Effects of Lipid Composition, Charge and Liposome Size, J Nucl Med , 19, 1049-1054, 1978.
41. Berestein GL, Kasi L, Rosenblum MG, Haynie T, Jahns M, Glenn H, Mehta R, Mavligit MG, Hersh EM, Clinical Pharmacology of 99m-Tc-Labeled Liposomes in Patients with Cancer, Cancer Research, 44, 375-378, 1984.
42. Seltzer SE, Liposomes in Diagnostic Imaging, in Gregoriadis G (ed), Liposomes as Drug Carriers, Chichester-New York-Brisbane-Toronto-Singapore, John Wiley & Sons, pp. 509, 1988.
43. Schuhmann-Giamperi G, Leike J, Sachse A, KrauseW, Characterization of Iopromide-Carrying Liposomes, J Lip Res, 4, 239-253, 1994.
44. Ryan PJ, Davis MA, DeGaeta LR, Wodo B, Melchior DL, Liposomes Loaded with Contrast Material for Image Enhancement in Computed Tomography, Radiology, 152, 759-762, 1984.
45. Crooks LE, Kaufman L, Basic Physical Principles, in Margulis AR, Higgins CB, Kaufman L, Crooks LE, (eds), Clinical Magnetic Resonance Imaging, San Francisco, Radiology Research and Education Foundation, pp.13-24, 1983
46. Brasch RC, Methods of Contrast Enhancement for NMR Imaging and Potential Applications, Radiology, 147, 781-788, 1983.
47. Longmaid HE, Adams DF, Neirinckx R, Harrison C, Brunner P, Seltzer SE, Davis M, Neuringer L, Geyer R, In Vivo ¹⁹F-NMR Imaging of Liver, Tumor and Abscess in Rats : Preliminary Results, Invest Radiol, 20, 141-145, 1985.

48. Trubetskoy VS, Torchillin VP, New Approaches in the Chemical Design of Gd-Containing Liposomes for Use in Magnetic Resonance Imaging of Lymph Nodes, *J Lip Res*, 4, 961-980, 1994.
49. Özer AY, Hıncal AA, Bouwstra JA, A Novel Drug Delivery System: Non-Ionic Surfactant Vesicles, *Eur J Pharm Biopharm*, 37, 75-79, 1991.
50. Handjani-Vila RM, Ribier A, Rondot B, Venlerberghe G, Dispersions of Lamellar Phases of Non-Ionic Lipids in Cosmetics Products, *Int J Cosm Sci*, 1, 303, 1979.
51. Okahata Y, Tanamachi S, Nagai M, Kunitake T J, Synthetic Bilayer Membranes Prepared from Dialkyl Amphiphiles with Non-Ionic and Zwitterionic head Groups, *J Colloid Interface Sci*, 82, 401-417, 1981.
52. Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson A, The Effect of Cholesterol on Single Chain Non-Ionic Surfactant Vesicles, *J Pharm Pharmacol*, 36, Suppl. 48P, 1984.
53. Kiwada H, Niimura H, Fujisaki Y, Yamada S, Kato Y, Application of Synthetic Alkyl Glycoside Vesicles as Drug Carriers. I. Preparation and Physical Properties, *Chem Pharm Bull*, 33, 753-759, 1985.
54. Kiwada H, Niimura H, Kato Y, Tissue Distribution and Pharmacokinetic Evaluation of the Targeting Efficiency of Synthetic Alkyl Glycoside Vesicles, *Chem Pharm Bull*, 33, 2475-2482, 1985.
55. Kiwada H, Nakajima I, Matsuura H, Tsuji M, Kato Y, Application of Synthetic Alkyl Glycoside Vesicles as Drug Carriers. III. Plasma Components Affecting Stability of the Vesicles, *Chem Pharm Bull*, 36, 1841-1846, 1988.
56. Saha GP, Fundamentals in Nuclear Pharmacy, Springer-Verlag, New York-Berlin-Heidelberg-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, 1992.
57. Dewanjee MK, The Chemistry of ^{99m}Tc Labeled Radiopharmaceuticals, *Seminars in Nuclear Medicine*, Vol XX, No (1), January, pp:5-27, 1990.
58. Neves M, Tc Chemistry, IAEA-Regional Training Course on Hospital Radiopharmacy, Kurs Notları, Sacavem-Portekiz, 11-21 Eylül 1995.
59. Ercan MT, Teknesyum- 99m Radyofarmasötikleri, Hacettepe Üniv Ecz Fak Dergisi, 9, 69-84, 1989.
60. Ercan MT, Rapid Determination of Hydrolyzed Reduced Technetium- 99m in Particulate Radiopharmaceuticals, *Appl Radiat Isot*, 43, 1175-1177, 1992.

61. Griffin WC, Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants, *Am Parfumer Essent Oil Rev*, 65, 26-29, 1955.
62. Wan SCL, Lee PFS, CMC of Polysorbates, *J Pharm Sci*, 63, 136, 1974.
63. Fiske CH, Subarrow Y, Colorimetric Determination of Phosphorus, *J Biological Chem*, 2, 375-401, 1925.
64. Vemuri S, Yu CD, Groot JS, Roosdorp N, In Vitro Interaction on Sized and Unsized Liposomes Vesicles with High Density Lipoprotein, *Drug Dev Ind Pharm*, 16, 1579-1584, 1990.
65. Vemuri S, Yu CD, Pushpolo S, Roosdorp N, Drug Release Rate Method for Liposomes Preparation, *Drug Dev Ind Pharm*, 17, 183-192, 1991.
66. Clark's Isolation And Identification of Drugs, London, Pharmaceutical Press, pp:1058, 1986.
67. Arica B, Özer AY, Ercan MT, Hincal AA, Characterization, In Vitro and In Vivo Studies on Primaquine Diphosphate Liposomes, *J.Microencap*, 12, 469-485, 1995.
68. Sachse A, Leike JU, Georg LR, Wagner SE, Krause W, Preparation and Evaluation of Lyophilized Iopromide-Carrying Liposomes for Liver Tumor Detection, *Invest Radiol*, 9, 838-844, 1993.
69. Weiner N, Martin F, Riaz M, Liposomes as Drug Delivery System, *Drug Dev Ind Pharm*, 15, 1523-1554, 1989.
70. Storm G, Bloois Van L, Brouwer M, Crommelin DJA, The Interaction of Cytostatic Drugs with Adsorbents in Aqueous Media. The Potential Implication for Liposome Preparation, *Biochim Biophys Acta*, 818, 343-351, 1985.
71. Baillie AJ, Florence AT, Hume LR, Muirhead GT, Rogerson A, The Preparation and Properties of Niosomes Non-Ionic Surfactant Vesicles, *J Pharm Pharmacol*, 37, 863-868, 1985.
72. Reddy DN, Udupa N, Formulation and Evaluation of Oral and Transdermal Preparations of Flubiprofen and Proxicam Incorporated with Different Carriers, *Drug Dev Ind Pharm.*, 19, 843-852, 1993.
73. Grit M, de Smidt JH, Struijke A, Crommelin DJA, Hydrolysis of Natural Soybean Phosphatidylcholine in Aqueous Liposome Dispersions, *Int J Pharm*, 50, 1-6, 1989.

74. Benita S, Poly PA, Puisieux F, Delattre J, Radiopaque Liposomes: Effect of Formulation Conditions on Encapsulation Efficiency, *J Pharm Sci*, 73, 1751-1755, 1984.
75. Szoka F, Papahadjopoulos D, Produce for Preparation of Liposomes with Large Internal Aqueous Space and High Capture by Reverse-Phase Evaporation, *Proc Natl Acad Sci USA*, 75, 4194-4198, 1978.
76. Yoshioka T, Steerenberg B, Florence AT, Preparation and Properties of Vesicles (Niosomes) of Sorbitan Monoesters (Span 20, 40, 60, 80) and A Sorbitan Triesters (Span 95), *Int J Pharm*, 105, 1-6, 1994.
77. Alkan H, Lipozomlar I: Özellikleri ve Hazırlama yöntemleri, *FABAD J Pharm Sci*, 8, 181-196, 1983.
78. Talsma H, Preparation, Characterization and Stabilization of Liposomes, Ph.D.Thesis, Utrecht Univ., The Netherlands, 1991.
79. Betageri GV, Liposomal Encapsulation and Stability of Dideoxynosine Triphosphate, *Drug Dev Ind Pharm.*, 19, 531-539, 1993.
80. Caselles-Hernandez T, Villalain J, Gomez-Fernandez JC, Stability of Liposomes on Long-Term Storage, *J Pharm Pharmacol*, 42, 397-400, 1989.
81. Crommelin DJA, Bloois LV, Preparation and Characterization of Doxorubicin-Containing Liposomes. II. Loading Capacity, Long-Term Stability and Doxorubicin-Bilayer Interaction Mechanism, *Int.Pharm.*, 17, 135-144, 1983.
82. Steigmen J, Richards P, Chemistry of Technetium 99m, *Seminars in Nuclear Medicine*, 4, 269-279, 1974.
83. Caride VJ, Technical and Biological Considerations on the Use of Radiolabelled Liposomes for Diagnostic Imaging, *Nucl Med Biol*, 17, 35-39, 1990.
84. Hartwiz P, Mutzel W, Taenzer V, Pharmacokinetics of Iohexol, Iopamidol and Iosimide Compared with Meglumine Diatrizoate. In: *Recent Developments in Non-Ionic Contrast Media*, Taenzer V, Wende S(eds), Georg Thieme, Verlag, Stuttgart, pp:220, 1989.
85. Guyton AC, *Textbook of Medicinal Physiology*, W.B.Saunders Company, London-Montreal-Sydney-Tokyo, Chapter 20, pp:286-297, 1991.

ÖZGEÇMİŞ

25.05.1971 yılında Erzincan 'da doğdum. İlkokulu Cudibey İlkokulu, ortaokulu Kanuni Ortaokulu ve liseyi Trabzon Lisesinde bitirdim. 1988 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesine girdim ve 1992 yılında Mezun oldum. Aynı yıl Hacettepe Üniversitesi Eczacılık fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı 'nda master sınavını kazandım. 1 yıl İngilizce eğitimi aldım. 1994 yılında Radyofarmasi Anabilim Dalı 'nda araştırma görevlisi oldum. Halen bu bölümde araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

