



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE Lu-177 İLE
RADYOİŞARETLENECEK YENİ BİR RADYOFARMASÖTİK KİTİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Doktora Tezi

Emre ÖZGENÇ

Radyofarmasi Anabilim Dalı

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**MEME KANSERİ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE LU-177 İLE
RADYOİŞARETLENECEK YENİ BİR RADYOFARMASÖTİK KİTİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Emre ÖZGENÇ

Danışman(lar)
Doç. Dr. Evren ATLIHAN GÜNDOĞDU

Radyofarmasi Anabilim Dalı
Radyofarmasi Doktora Programı

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç. Dr. Evren Atlıhan Gündoğdu

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Zeynep Burak

Üye : Prof. Dr. Suna Erdoğan

Üye : Doç. Dr. Emel Öykü Çetin Uyanıkgil

Üye : Doç. Dr. Derya İlem Özdemir

Üye : Dr. Öğretim Üyesi Mine Silindir Günay

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:

Önsöz

Lisanüstü eğitimi ve akademik hayatı kolaylaştıran, mesleğe devam edebilme umudu ve motivasyonu hala dinamik tutmayı sağlayan danışman hocam sayın Doç. Dr. Evren Atlıhan Gündoğdu ile çalışmak benim için büyük bir şans olmuştur. Sayın Doç. Dr. Evren Atlıhan Gündoğdu hocamın bu doktora tezimin ortaya çıkması ve bitmesinde yazdığı proje sayesinde desteklendiğinden dolayı hem maddi hem de manevi desteği çok fazladır. Doktora tez konusu olarak hep farklı bir konu çalışmayı hayal etmiştim. Tezimin bana göre farklı olması, yenilikçi olması ve bilimsel olması benim için çok önemliydi. İzmir depreminden sonra şehir değişikliği ve mesleği bırakma kararımın vazgeçme sebeplerimden bir tanesi de doktora tezimi de kapsayan projemizin çıkması benim için önemli bir adım ve meslek kariyerim için de bir basamak oluşturmıştır. Fiziksel ve duygusal olarak çok çalışsak da tez dönemi benim için güzel, kolay ve rahat geçmiştir. Belki bu durumda ailemin de payı büyüktür. Tez dönemindeyken bir kızım oldu ve bu dönemde hem doktora tezimi hem de kızımı büyütmek benim için güzel bir tesadüf olmuştur.

İzmir, 1.09.2021

Emre ÖZGENÇ

Özet

Meme Kanseri Tedavisinde Kullanılmak Üzere Lu-177 ile Radyoişaretlenecek Yeni Bir Radyofarmasötik Kitinin Geliştirilmesi

Kanser tedavisinde son yıllardaki gelişmeler; kanser hastalarının hayatta kalması ve yaşam kalitesini önemli ölçüde artırmaktadır. Günümüzde kansere yönelik en önemli tedavi yöntemleri kemoterapi, cerrahi müdahale ve radyoterapidir. Son yıllarda radyoimmunoterapi üzerine olan birçok çalışmalar yapılmaktadır. Sürekli olarak yeni ilaçlar ve tedavi stratejileri araştırılmakta ve hedefe yönelik kanser tedavisi diğer yöntemlere göre en yüksek etkinlik ve en az yan etkiye sahip tedavi yöntemidir. Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. İnsan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) meme kanseri vakalarının % 20-30'unda aşırı ekprese edilmektedir. HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanserli hastalar, önemli ölçüde kısa süreli hayatta kalma süresine sahip agresif bir hastalık formuna sahiptir. HER2'nin amplifikasyonunun, bu kanserlerin patogeneğinde doğrudan bir rolü olduğu bildirilmektedir. TRZ HER2 proteinini hedefleyen rekombinant DNA kökenli bir humanize monoklonal antikorudur. Radyoimmunoterapi, immünoterapi ve radyasyon tedavisinin kombinasyonudur. Radyoimmunoterapi, geleneksel monoklonal antikorların etkinliğini artırma potansiyeline sahip olan hedefe yönelik bir tedavidir. Trastuzumab taşıyıcı olarak kullanılacağından dolayı tedavi dozuna göre daha az miktarlarda kullanılacaktır. Böylelikle hem yan etkileri hem de maliyeti azaltılacaktır. Radyasyon tedavisi için beta yayıcı radyonüklitler kullanılmaktadır. Lu-177 hem beta partikülü hem de gama fotonu yayan bir radyonüklittir. Lu-177'nin sitotoksik radyasyonun göreceli olarak küçük alanlarda lokalize edilmesinde etkili olduğu ve çevresindeki normal dokuya daha az zarar veren ve küçük tümörlerin yanı sıra metastatik lezyonları (tipik olarak 3 mm'den az) yok etme konusunda da yetkin olduğu bildirilmiştir. Lu-177 ayrıca dozların değerlendirilmesi ve görüntüleme için uygun gama ışınları yaymaktadır (113 ve 208 keV). Hedeflenen tümör hücrelerine bu radyonüklitleri taşımak için belirli monoklonal antikorlarla radyoişaretleme yapılır. Monoklonal antikorlar laboratuvar koşullarında üretilen, kanser hücrelerinin yüzeyini tanımak ve bağlamak için tasarlanmış moleküllerdir. Beta partikülü yayan radyonüklitler monoklonal antikorlar ile sağlıklı hücrelere zarar vermeden büyük bir oranda tümör dokularına hedeflendirilir. Hem monoklonal antikorun etkisiyle hem de

beta partikülünün etkisiyle tümör hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmaktadır. Doktora tezi kapsamında meme kanseri tümörlerine hedeflenen immunoterapide kullanılan Trastuzumab (TRZ) etkin maddesinin Lu-177 ile radyoışaretlenerek meme kanseri tedavisinde kullanılacak yeni teranostik radyofarmasötikler geliştirmektir amaçlanmıştır. Bu amaçla radyonüklid – monoklonal antikör radyoışaretlenmesi, kalite kontrolü, in vitro stabilite çalışmaları, hücre kültürü çalışmaları ve in vivo görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Anahtar Kelimeler; Lu-177, Radyoışaretleme, Radyoimmünoterapi, Meme Kanseri, Trastuzumab



Abstract

Development of a New Radiopharmaceutical Kit to be Radiolabelled with Lu-177 for Use in Breast Cancer Treatment

Recent developments in cancer treatment; It significantly improves the survival and quality of life of cancer patients. Today, the most important treatment methods for cancer are chemotherapy, surgical intervention and radiotherapy. In recent years, many studies on radioimmunotherapy have been carried out. New drugs and treatment strategies are constantly being researched, and targeted cancer therapy is the treatment method with the highest efficacy and least side effects compared to other methods. Breast cancer is the most common type of cancer in women. Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) is overexpressed in 20-30% of breast cancer cases. Patients with breast cancer overexpressing HER2 have an aggressive form of the disease with significantly short survival time. Amplification of HER2 is reported to have a direct role in the pathogenesis of these cancers. TRZ is a recombinant DNA-based humanized monoclonal antibody targeting the HER2 protein. Radioimmunotherapy is a combination of immunotherapy and radiation therapy. Radioimmunotherapy is a targeted therapy that has the potential to increase the effectiveness of conventional monoclonal antibodies. Since trastuzumab will be used as a carrier, it will be used in lesser amounts than the treatment dose. Thus, both side effects and cost will be reduced. Beta emitting radionuclides are used for radiation therapy. Lu-177 is a radionuclide that emits both beta particles and gamma photons. Lu-177 has been reported to be effective at localizing cytotoxic radiation in relatively small areas, with less damage to surrounding normal tissue, and competent at destroying metastatic lesions (typically less than 3 mm) as well as small tumors. The Lu-177 also emits gamma rays (113 and 208 keV) suitable for dose evaluation and imaging. To deliver these radionuclides to the targeted tumor cells, they are radiolabelled with certain monoclonal antibodies. Monoclonal antibodies are molecules produced under laboratory conditions, designed to recognize and bind to the surface of cancer cells. Radionuclides emitting beta particles are largely targeted to tumor tissues without harming healthy cells with monoclonal antibodies. It is aimed to destroy tumor cells both by the effect of the monoclonal antibody and the effect of the beta particle. Within the scope of the doctoral thesis, it is aimed to develop new theranostic

radiopharmaceuticals to be used in breast cancer treatment by radiolabeling the active substance of Trastuzumab (TRZ) used in immunotherapy targeted to breast cancer tumors with Lu-177. For this purpose, radionuclide – monoclonal antibody radiolabeling, quality control, in vitro stability studies, cell culture studies and in vivo imaging studies were performed.

Keywords; Lu-177, Radiolabeling, Radioimmunotherapy, Breast Cancer, Trastuzumab



İçindekiler

Önsöz	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler	VII
Tablolar Dizini.....	XIII
Şekiller Dizini	XVI
Kısaltma Listesi	XX
Giriş	1
Genel Bilgiler	3
1.1. Radyofarmasötik.....	3
1.1.1. Nükleer Tıpta Kullanılan Radyofarmasötikler	5
1.1.1.1. Tedavide Kullanılan Radyofarmasötikler	6
1.1.1.2. Teranostikler	9
1.1.1.3. Radyoimmunoterapi	11
1.1.1.4. Lu-177-Radyonüklidi.....	13
1.2. Trastuzumab.....	17
1.3. Şelat Ajanları.....	19
Gereç ve Yöntem	21
2.1. Gereç.....	21
2.1.1. Kullanılan Sarf ve Kimyasal Maddeler	21
2.1.2. Kullanılan Gereçler.....	23
2.2. Yöntemler.....	24
2.2.1. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışmaları	24
2.2.2. Etkin Maddenin Özelliklerinin İncelenmesi.....	24
2.2.2.1. Fourier Transform Infra-Red Spektrum Analizi	24
2.2.2.2. UV Spektrum Analizi.....	24
2.2.2.3. UV Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi	24
2.2.2.4. TRZ'nin UV spektrumu ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu ...	25
2.2.3. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi.....	26

2.2.3.1. FTIR spektrumu	26
2.2.4. Çözelti Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması.....	26
2.2.4.1. Çözelti Halinde TRZ:EDTA Kompleksinin Hazırlanması	26
2.2.4.2. Çözelti Halinde TRZ:DOTA Kompleksinin Hazırlanması.....	27
2.2.4.3. Çözelti Halinde TRZ:DTPA Kompleksinin Hazırlanması.....	28
2.2.4.4. Çözelti Halinde TRZ:MAG3 Kompleksinin Hazırlanması.....	29
2.2.5. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	29
2.2.5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	29
2.2.5.2. pH Ölçümleri	30
2.2.5.3. İzotoni Testi	30
2.2.5.4. TRZ Miktar Tayini	30
2.2.6. Stabilite	30
2.2.7. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması ..	31
2.2.7.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi Hesaplanması.....	31
2.2.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	32
2.2.8.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	32
2.2.8.2. Fourier Transform Infra-Red Spektrumu	33
2.2.8.3. Nem Tayini Testi	33
2.2.8.4. pH Ölçümleri	33
2.2.8.5. İzotoni Testi	33
2.2.8.6. TRZ Miktar Tayini	33
2.2.8.7. Çözünme zamanı tayini	34
2.2.8.8. Stabilite	34
2.2.9. Hücre Kültürü çalışmaları	34
2.2.9.1. Formülasyonların Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi.....	36
2.2.10. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi	37
2.2.11. Mikrobiyolojik Çalışmalar	37
2.2.11.1. Sterilite Testi.....	37
2.2.11.2. Pirojenite Testi	38
2.2.12. Radyoışaretleme Çalışmaları	38

2.2.12.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları	40
2.2.12.1.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	40
2.2.12.1.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	41
2.2.12.1.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	42
2.2.12.2. Stabilitate Çalışmaları.....	44
2.2.12.3. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı.....	44
2.2.12.4. Doz kalibratörü ile İşaretleme Veriminin Hesaplanması.....	45
2.2.12.5. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları	47
2.2.12.5.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	47
2.2.12.5.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	48
2.2.12.5.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	50
2.2.12.6. Stabilitate Çalışmaları.....	50
2.2.12.7. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı.....	51
2.2.12.8. Doz Kalibratörü ile İşaretleme Veriminin Hesaplanması.....	51
2.2.12.9. Radyoaktif-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile İşaretleme Veriminin Hesaplanması	52
2.2.13. İn Vivo Çalışmalar	52
2.2.14. İstatistiksel Değerlendirme.....	53
Bulgular.....	54
3.1.1. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışma bulguları.....	54
3.1.1.1. DTPA-TRZ (4HJG (Fc)) sonuçları.....	54
3.1.1.2. DTPA-TRZ (6N9T(Fab)) sonuçları.....	55
3.1.1.3. DOTA-TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları	57
3.1.1.4. DOTA-TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları.....	59
3.1.1.5. EDTA- TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları.....	60
3.1.1.6. EDTA- TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları	62
3.1.1.7. MAG3-TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları	64
3.1.1.8. MAG3-TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları	66
3.1.2. Etkin Maddenin Özelliklerinin İncelenmesi.....	67
3.1.2.1. FTIR Spektrum Analizi.....	67
3.1.2.2. UV Spektrum Analizi.....	68
3.1.2.3. Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi....	69
3.1.2.4. TRZ'nin UV spektrumu ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu ..	69

3.1.3. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi.....	71
3.1.3.1. FTIR spektrumu	71
3.1.4. Çözelti Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması.....	74
3.1.5. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları.....	74
3.1.5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları.....	74
3.1.5.2. pH Ölçüm Sonuçları	74
3.1.5.3. İzotoni Testi	74
3.1.5.4. TRZ Miktar Tayini Sonuçları.....	74
3.1.6. Stabilite Sonuçları	76
3.1.7. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması ..	83
3.1.7.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi Sonuçları	83
3.1.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları.....	83
3.1.8.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları.....	83
3.1.8.2. Fourier Transform Infra-Red Spektrumu	84
3.1.8.3. Nem Tayini Testi Sonuçları.....	91
3.1.8.4. pH Ölçüm Sonuçları	91
3.1.8.5. İzotoni Testi Sonuçları.....	93
3.1.8.6. TRZ Miktar Tayini Sonuçları.....	93
3.1.8.7. Çözünme Zamanı Tayini Sonuçları.....	93
3.1.8.8. Stabilite Sonuçları	93
3.1.9. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları.....	97
3.1.10. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi	97
3.1.11. Mikrobiyolojik Çalışmaların Sonuçları	108
3.1.11.1. Sterilite Testi Sonuçları	108
3.1.11.2. Pirojenite Testi	108
3.1.12. Radyoişaretleme Çalışmaları.....	109
3.1.12.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmalarının Sonuçları	112
3.1.12.1.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	112
3.1.12.1.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	114
3.1.12.1.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	122

3.1.12.2. Stabilite Çalışmaları Sonuçları	124
3.1.12.3. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı	125
3.1.12.4. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları Sonuçları	127
3.1.12.4.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	127
3.1.12.4.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	128
3.1.12.4.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	137
3.1.12.5. Stabilite Çalışmaları Sonuçları	139
3.1.12.6. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı	140
3.1.13. İn Vivo Çalışmaların Sonuçları	142
Tartışma	145
3.2. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışmaları.....	146
3.3. TRZ'nin Özelliklerinin İncelenmesi.....	147
3.4. UV Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu ...	148
3.5. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi	148
3.6. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	149
3.6.1. Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	149
3.6.2. pH Ölçümleri	149
3.6.3. İzotoni Testi	149
3.6.4. TRZ Miktar Tayini	150
3.7. Stabilite Çalışmaları.....	150
3.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması ...	151
3.8.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi	151
3.8.2. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları	151
3.8.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri.....	151
3.8.2.2. FTIR Spektrumları	151
3.8.2.3. Nem Tayini Testi	152
3.8.2.4. pH Ölçümleri	152
3.8.2.5. İzotoni Testi	152
3.8.2.6. TRZ Miktar Tayini	152
3.8.2.7. Stabilite Çalışmaları	152

3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları	153
3.9.1. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi	153
3.10. Mikrobiyolojik Çalışmalar	154
3.10.1. Sterilite Testi.....	154
3.10.2. Pirojenite	154
3.11. Radyoışaretleme Çalışmaları	154
3.11.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoışaretleme Çalışmaları	155
3.11.1.1.4. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	155
3.11.1.1.5. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	155
3.11.1.1.6. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	157
3.11.1.2. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı.....	157
3.11.1.3. Stabilite Çalışmaları.....	158
3.11.2. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoışaretleme Çalışmaları	158
3.11.2.3.7. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	158
3.11.2.3.8. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi	159
3.11.2.3.9. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi.....	160
3.11.2.4. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı.....	160
3.11.2.5. Stabilite Çalışmaları.....	160
3.12. İn Vivo Çalışmalar	161
Sonuç ve Öneriler	163
Kaynaklar	164
Ekler	190
Teşekkür	193
Özgeçmiş	195

Tablolar Dizini

Tablo 1. Farklı molar oranda TRZ: EDTA komplekslerinin içerikleri.....	27
Tablo 2. Farklı molar oranda TRZ: DOTA komplekslerinin içerikleri	28
Tablo 3. Farklı molar oranda TRZ: DTPA komplekslerinin içerikleri.....	28
Tablo 4. Farklı molar oranda TRZ: MAG3 komplekslerinin içerikleri	29
Tablo 5. Liyofilize kit halindeki farklı molar konsantrasyonlardaki TRZ: Şelat ajanı komplekslerinin içerikleri.....	32
Tablo 6. Sterilite testi için hazırlanan besiyeri içeriği.....	38
Tablo 7. Farklı inkübasyon zamanlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).	41
Tablo 8. Farklı pH değerlerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).....	42
Tablo 9. Radyoaktivite miktarlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).	43
Tablo 10. Farklı inkübasyon zamanlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).	48
Tablo 11. Farklı pH değerlerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).....	49
Tablo 12. Radyoaktivite miktarlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).	50
Tablo 13. İn vivo çalışmada kullanılan formüllasyonlar ve hayvan sayıları.....	53
Tablo 14. TRZ için hesaplanan % doğruluk değerleri (p>0,05)	70
Tablo 15. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait derişim değerleri (p>0,05).....	70
Tablo 16. 2,5 µg/mL derişim için kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testinin sonuçları (p>0.05).....	71
Tablo 17. 10 µg/mL derişim için kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testinin sonuçları (p>0.05).....	71
Tablo 18. Çözelti halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarının partikül boyutu, zeta potansiyel, PDI, pH, osmatik basınç ve TRZ miktar tayini değerleri ...	75
Tablo 19. 5 ± 3 °C de saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri	77
Tablo 20. 25 ± 5°C %60± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri	78

Tablo 21. $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	79
Tablo 22. $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	80
Tablo 23. $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ $\%60 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	81
Tablo 24. $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	82
Tablo 25. Liyofilize kit halindeki formülasyonlarının liyofilizasyon sonrası hazırlama verimleri	83
Tablo 26. Liyofilize kit halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarının partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri	84
Tablo 27. Liyofilize kit halindeki formülasyonlardaki ağırlık değişimi (%), pH, osmotik basınç, TRZ miktar tayini ve çözünme zamanı sonuçları	92
Tablo 28. $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri	94
Tablo 29. $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ $\%60 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri	95
Tablo 30. $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri.....	96
Tablo 31. $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ de saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	98
Tablo 32. $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ $\%60 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	99
Tablo 33. $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları	100
Tablo 34. Radyoişaretlemenden sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda Lu-177-TRZ: şelat ajanı formülasyonlarının radyoişaretleme verimi yüzdeleri ve içerdiği serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri	113
Tablo 35. pH 7'de hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	115
Tablo 36. pH 5'te hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	119

Tablo 37. pH 9’da hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	120
Tablo 38. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların içerdiği Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %	123
Tablo 39. Radyoişaretlenmiş fomülasyonlarda tespit edilen metal miktarları (ng/ml) ve standart sapmaları.....	125
Tablo 40. 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C’de %75± 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş çözelti halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimleri	126
Tablo 41. Radyoişaretlemekten sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda Lu-177-TRZ: şelat ajanı formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve içerdiği serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 miktarı	127
Tablo 42. pH 7’de hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	130
Tablo 43. pH 5’te hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	134
Tablo 44. pH 9’da hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri.....	135
Tablo 45. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların içerdiği Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %	138
Tablo 46. Radyoişaretlenmiş fomülasyonlarda tespit edilen metal miktarları (ng/ml) ve standart sapmaları.....	140
Tablo 47. 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C’de %75± 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş liyofilize halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimleri	141
Tablo 48. Lu-177 çözeltisi ve Lu-177 ile işaretlenmiş L5 ve L11 için meme kanserli bölgede elde edilen ROI değerleri.....	144

Şekiller Dizini

Şekil 1. Hücre sayımında kullanılan hemasitometre.....	36
Şekil 2. Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş. temin edilen Lu-177 radyonüklidi	39
Şekil 3. Otomatik sentez ünitesinin bilgisayar ekranındaki şematik görüntüsü	44
Şekil 4. Otomatik sentez ünitesi	44
Şekil 5. Radyoişaretlenmiş formülasyonun tatbik edilme (A) ve doz kalibratöründe ölçme göreseli (B).....	46
Şekil 6. Radyoişaretlenmiş formülasyonların işaretleme verimlerini RP-HPLC cihazı ile ölçüm görseli.....	47
Şekil 7. Meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude fare.....	53
Şekil 8. DTPA şelat ajanının TRZ etkin maddesine (4HJG) bağlandığı bölge	54
Şekil 9. DTPA-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçları	55
Şekil 10. DTPA-TRZ (4HJG)'ye ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	55
Şekil 11. DTPA molekülünün TRZ etkin maddesine (6N9T) üzerinde bağlandığı bölge	56
Şekil 12. DTPA ve TRZ (6N9T)'ye ait Moleküler yerleştirme sonuçları	56
Şekil 13. DTPA-TRZ (6N9T)'ye ait 9 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	57
Şekil 14. DOTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (4HJG) üzerinde yerleştiği bölge	58
Şekil 15. DOTA-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları	58
Şekil 16. DOTA-TRZ (4HJG) ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	59
Şekil 17. DOTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge	59
Şekil 18. DOTA-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları	60
Şekil 19. DOTA-TRZ (6N9T) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	60
Şekil 20. EDTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (4HJG) üzerinde yerleştiği bölge	61
Şekil 21. EDTA-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları.....	61

Şekil 22. EDTA-TRZ (4HJG) ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	62
Şekil 23. EDTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge	62
Şekil 24. EDTA-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları.....	63
Şekil 25. EDTA-TRZ (6N9T) ait 5 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	64
Şekil 26. MAG3 molekülünün 4HJG üzerinde yerleştiği bölge	64
Şekil 27. MAG3-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları	65
Şekil 28. MAG3-TRZ (4HJG) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	65
Şekil 29. MAG3 molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge	66
Şekil 30. MAG3-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları	66
Şekil 31. MAG3-TRZ (6N9T) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları	67
Şekil 32. TRZ'nin FTIR spektrumu.....	68
Şekil 33. TRZ'nin UV spektrumu.....	69
Şekil 34. TRZ'ye ait kalibrasyon eğrisi	69
Şekil 35. DTPA'nin FTIR spektrumu.....	72
Şekil 36. EDTA'nin FTIR spektrumu.....	72
Şekil 37. DOTA'nin FTIR spektrumu	73
Şekil 38. MAG3'ün FTIR spektrumu	73
Şekil 39. L1 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	85
Şekil 40. L2 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	85
Şekil 41. L3 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	86
Şekil 42. L4 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	86
Şekil 43. L5 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	87
Şekil 44. L6 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	87
Şekil 45. L7 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	88
Şekil 46. L8 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	88
Şekil 47. L9 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	89
Şekil 48. L10 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	90

Şekil 49. L11 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	90
Şekil 50. L12 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu	91
Şekil 51. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı.....	101
Şekil 52. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı.....	101
Şekil 53. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı.....	102
Şekil 54. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı.....	103
Şekil 55. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı.....	103
Şekil 56. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı.....	104
Şekil 57. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı.....	104
Şekil 58. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı.....	105
Şekil 59. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı.....	105
Şekil 60. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı.....	106
Şekil 61. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı.....	106
Şekil 62. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı.....	107
Şekil 63. Lu-177'ye ait gama spektrumu	109
Şekil 64. Lu-177'e ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu.....	110
Şekil 65. Lu-177-DTPA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu.....	110
Şekil 66. Lu-177-EDTA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu.....	111
Şekil 67. Lu-177-DOTA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu	111
Şekil 68. Lu-177-MAG3'e ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu	111

Şekil 69. Farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen Lu-177-TRZ: şelat ajan radyoişaretleme verimi yüzdeleri.....	112
Şekil 70. pH 7’de hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	117
Şekil 71. pH 5’te hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	118
Şekil 72. pH 9’da hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	122
Şekil 73. 5 ve 50 mCi radyoaktiviteye sahip çözelti halindeki formülasyonların RP-HPLC’ye ait kromatogramlar ve analiz sonuçları.....	124
Şekil 74. Farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen Lu-177-TRZ: şelat ajan % leri	128
Şekil 75. pH 7’de hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	132
Şekil 76. pH 5’te hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	133
Şekil 77. pH 9’da hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	137
Şekil 78. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları.....	139
Şekil 79. Lu-177 çözeltisinin meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü.....	142
Şekil 80. Lu-177-L5 radyofarmasötiğinin meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü.....	142
Şekil 81. Lu-177-L11 radyofarmasötiğinin meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü.....	143

Kısaltma Listesi

At-211	: Astatin-211
Bi-213	: Bizmut-213
Ci	: Curie
Cr-51	: Krom-51
CT	: Bilgisayarlı Tomografi
Cu-67	: Bakır-67
DOTA	: 1,4,7,10-Tetraazasiklolododekan-1,4,7,10-tetraasetikasit
DTPA	: Dietilentriaminpentaasetik asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
EDTMP	: Etilen diamin tetrametilen fosfonik asit
EGFR	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü
F	: Flor
F-18-FDG	: Flor-18-Florodeoksiglikoz
FDA	: Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FTIR	: Fourier Transform Infra-Red
Ga-68	: Galyum-68
Gbq	: Gigabecquerel
Ge-68	: Germanyum-68
HER2	: Epidermal büyüme faktörü reseptörü 2
Hf-177	: Hafnium-177
HVL	: Half-value layer
I-131	: İyot-131
In-111	: İndiyum-111
LET	: Lineer enerji transferi

Lu-177	:	Lutesyum-177
MAA	:	Makroagregat albumin
MAG3	:	Merkaptoasetil triglisin
Mo-99	:	Molibden-99
MR	:	Manyetik Rezonans
MTD	:	Maksimum tolere edilen doz
N	:	Azot
Na ₂ CO ₃	:	Sodyum karbonat
O	:	Oksijen
PET	:	Pozitron Emisyon Tomografisi
Ra-223	:	Radyum-223
SPECT	:	Tek Foton Emisyon Tomografisi
Sr-90	:	Stronsiyum-90
Tc-99m	:	Teknesyum-99m
TRZ	:	Trastuzumab
TVT	:	Tenth-value thickness
UV	:	Ultra Viyole
Xe-133	:	Ksenon-133
Y-90	:	İtriyum-90
Yb-176	:	İterbiyum-176
α	:	Alfa
B	:	Beta
β^+	:	Pozitron
γ	:	Gama

Giriş

Meme kanseri kadınlarda en sık görülen kanser türüdür. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2020 sonu verilerine göre dünyada en yaygın görülen kanser türü olduğu belirtilmiştir (*Breast Cancer*, 2008). Meme kanseri hücreleri son derece hızlı metastaz yapmaları ve geleneksel ilaçlara direnç mekanizması geliştirme yeteneği, meme kanseri hastalarının tedavilerini zorlaştırmaktadır. Dünya genelinde kadınların meme kanseri olarak geçirdiği yaşam yılı süresi diğer tüm kanser türlerinden daha fazladır. Meme kanseri vakalarının %20-30'unda HER2 reseptörünü aşırı eksprese edilmektedir (Hicks & Kulkarni, 2008). HER2 reseptörünü aşırı eksprese eden meme kanserli hastalar, daha kısa hayatta kalma süresine ve agresif bir hastalık formuna sahiptir. TRZ, HER2'ye hedefli monoklonal antikordur ve meme kanseri hastalarında kullanım açısından Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onay verilmiştir (Shepard et al., 2008). Klinik uygulamalar sonucunda bazı hastalarda bu ilaca karşı direnç geliştiği ve vücutta yan etkilere neden olduğu bildirilmiştir. Kanser tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaçlar tedavi sırasında kanserli hücreleri öldürürken vücuttaki diğer sağlıklı hücrelere de zarar vermektedirler (Durak, 2015). Bazı durumlarda bu nedenden dolayı tedaviye ara verilmesi gerekmektedir. Tedaviye ara verildiğinde sağlıklı hücreler yenilenirken kanserli hücreler daha hızlı çoğalmaktadır ayrıca yeni oluşan kanser hücreleri de ilaca karşı direnç mekanizmaları geliştirebilmektedir (Kelkar & Reineke, 2011). Son yıllarda sadece tümör dokularına etki eden, sağlıklı hücrelere zarar vermeyen, toksik etkisi olmayan, hedefe yönelik kanser tedavi yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bunun için kullanılmaya başlayan radyoimmunoterapide beklenen başarının sağlanabilmesi için hedef olmayan normal, sağlıklı dokulardan kanserli dokuları ayıracak spesifik antijenik yapılar tanımlanmalıdır. Bu çalışmalar kapsamında; meme kanseri tümörlerine hedeflenen immunoterapide kullanılan TRZ etkin maddesinin Lutesyum-177 (Lu-177) radyonüklidi ile radyoişaretlenerek meme kanseri tedavisinde kullanılacak yeni teranositik radyofarmasötikler geliştirilmesi amaçlanmıştır. TRZ etkin maddesinin tümör hücrelerine sitotoksik etkiyle değil, antijen-antikor ilişkisiyle etki göstermektedir ve radyasyon ile kombine şeklinde kanser tedavisinde kullanılmaya uygundur. Radyoimmunoterapi, immünoterapi ve radyasyonun kombine şeklinde kanser tedavisinde kullanılabilmesidir. Radyoimmünoterapi, geleneksel monoklonal antikorların etkinliğini artırma potansiyeline sahip olan hedefe yönelik bir tedavi

şeklidir (Larson et al., 2015). Bu tedavi yönteminde tümöre özgü bir hedef ajan oluşturmak için bir monoklonal antikora bir radyoizotop bağlanmaktadır (Cheson, 2003). TRZ hedefe yönelik monoklonal antikor olarak kullanacağından dolayı tedavi dozuna göre daha az miktarda kullanılması amaçlanmıştır. Böylelikle TRZ etkin maddesinin neden olacağı yan etki ve üretim maliyeti azalacaktır. Radyasyon tedavisi için beta ve alfa yayıcı radyonüklitler kullanılmaktadır. Çalışmada kullanılan Lu-177 hem gama ışını hem de beta partikülü yayan teranostik özelliğe sahip bir radyonüklittir. Bu radyonüklit mikrometastatik hastalık yüzeyine yakın tümör hücreleri dahil olmak üzere küçük hacimdeki tümör hücrelerine beta partikül enerjisi taşımak için idealdir (Guleria et al., 2021). Lu-177'nin sitotoksik radyasyonun göreceli olarak küçük alanlarda lokalize edilmesinde etkili olduğu ve çevresindeki normal dokuya daha az zarar veren ve küçük tümörlerin yanı sıra metastatik lezyonları (tipik olarak 3 mm'den az) yok etme konusunda da yetkin olduğu bildirilmiştir (Dash, Pillai, et al., 2015). Lu-177 tedavi ve görüntüleme için uygun beta ve gama ışınları yaymaktadır. Düşük enerjili gama fotonları, biyolojik dağılım ve atılım kinetiğinin, tedavi için kullanılan aynı radyoişaretleme bileşik ile görüntülenmesini sağlar ve tedavi öncesinde ve sırasında dozimetrenin yapılmasına izin vermektedir. Lu-177 radyonüklidinin 6.65 günlük yarı ömrü bulunmaktadır (Frost et al., 2015). Bu yarı ömür Lu-177 ile farmasötik kısımları radyoişaretleme ve saflaştırılması için karmaşık prosedürlerin kullanılması, kalite kontrolü ve uygulanması için gerekli süreyi sağlamaktadır. Lu-177 gibi uzun yarı ömürlü terapötik radyonüklidlerin kullanımı, yavaş hedefleme kinetiğine sahip antikorların radyoişaretlenmesi için özellikle uygundur (Iaea, 2006). Bu çalışma kapsamında HER2 reseptörüne sahip meme kanseri hücrelerine Lu-177 radyonüklidini taşımak için TRZ monoklonal antikorlu ile radyoişaretleme çalışmaları yapılmıştır. Beta partikülü yayan Lu-177 radyonüklidi monoklonal antikor ile sağlıklı hücrelere zarar vermeden büyük bir oran tümör hücrelerine hedeflenmesi amaçlanmıştır. Hem TRZ'nin hem de beta partikülünün etkisiyle tümör hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmıştır. Hazırladığımız radyofarmasötiğin farmasötik kısmı kit haline getirilerek formülasyonların daha uzun süre stabil kalması hedeflenmiştir. Ayrıca farmasötik kısmın kit haline getirilmesi radyofarmasötiğin dağıtımını, saklanması ve hastaya uygulamadan önce hazırlanmasında da kolaylık sağlayacaktır.

Genel Bilgiler

1.1. Radyofarmasötik

İnsanlarda teşhis ve tedavi için kullanılan, yapısında radyonüklit ve genellikle hastadaki biyolojik lokasyonu belirleyen farmasötik kısımdan oluşan ilaçlardır. Nükleer tıpta radyofarmasötikler genellikle teşhis amacıyla kullanılmaktadır ancak son yıllarda tedavide kullanılan radyofarmasötiklerin sayısı artmaktadır. Ayrıca tedavide kullanılan radyofarmasötiklerle yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır. Tanı amacıyla kullanılan radyofarmasötiklerde farmasötik kısım izleyici miktarda kullanılmaktadır ve genellikle farmakolojik etkiye sahip değildirler. Bu nedenden dolayı radyofarmasötiklerin farmakolojik kısımları herhangi bir doz-cevap ilişkisi göstermezler (Asikoglu, M., İlem Ozdemir, D., Atlihan Gundogdu, 2017). Tanı amacıyla kullanılan radyofarmasötikler hastalıklı doku ve organ yapısı ve işlevi hakkında invaziv olmayan görüntüleme teknikleriyle bilgi sağlayarak hastalığın teşhisini kolaylaştırmaktadır (Ferro-Flores et al., 2012). Radyonüklitler parçacık emisyonu (alfa ve beta) ve/veya elektromanyetik radyasyon (pozitron, gama ışınları vb.) yoluyla yarı ömürlerine göre bozunma yaparlar. Radyonüklitler daha kararlı hale gelmek için yaydığı bu emisyonlar hastalıkların görüntülenmesi veya tedavisi için kullanılmaktadır. Farklı hedefleme mekanizmalarına ve farklı formlara sahip çok çeşitli radyofarmasötikler bulunmaktadır. Ayrıca basit tuz formunda veya daha karmaşık moleküllere eklenerek kullanılan radyofarmasötiklerde bulunmaktadır. Radyofarmasötikler en çok parenteral ve oral yolla hastalara verilmektedir (Pauwels et al., 1998). Radyofarmasötikler dört kategoriye ayrılmaktadır:

- Kullanıma hazır radyofarmasötikler: İyot-131(I-131)
- Yarı hazır/ kitlerle hazırlana radyofarmasötikler: Teknesyum-99m (Tc-99m)
- Kullanılmadan hemen önce hazırlanan radyofarmasötikler: Flor-18-Florodeoksiglikoz (F-18-FDG)
- Otolog radyofarmasötikler; prekürsörler: Krom-51 (Cr-51) –Eritrosit (Alsharef et al., 2020).

Radyofarmasötikler nükleer reaktörlerde, siklotronlarda ve jeneratörlerde üretilmektedir. Nükleer reaktörlerde atom numarası yüksek radyonüklitler üretilmektedir. En yaygın reaksiyon, nükleer reaktör içindeki nötronlar tarafından Uranyum-235'in fisyonudur. Bu yöntemle hazırlanan diğer radyonüklitler ise İyot-131

(I-131) ve Ksenon-133 (Xe-133)'tür. Siklotronlarda ise, yüklü parçacıklar bir elektromanyetik alan ile vakum altında, iki tane D şeklinde içi boş metalik elektrot içinde dairesel yollarda hızlandırılmaktadır. Yüklü parçacıklar, pozitif iyonlar (örn., proton, döteron, α parçacığı) veya negatif iyonlar (örn., negatif yüklü hidrojen atomu, H^-) olabilir. Nükleer tıpta medikal siklotronlar kullanılmaktadır. Tıbbi siklotronlar, öncelikle PET görüntüleme için kullanılan kısa ömürlü, pozitron yayan radyonüklidler üretmek için kullanılan kompakt siklotronlardır. Klinik olarak yararlı pozitron yayıcıların çoğu, düşük enerjili parçacıklar ve dolayısıyla kompakt siklotronlar ile nükleer reaksiyonlar tarafından oluşturulmaktadır. Bunlar ticari olarak temin edilebilir ve nispeten küçük bir alana kurulabilir. Ayrıca, tıbbi siklotronlarda, negatif hidrojen iyonları (H^-) yaygın olarak hızlandırılır, çünkü pozitif iyon siklotronların aksine, siklotronun muhafazası negatif iyon siklotronlarda radyoaktif hale gelmez. Siklotronlarda kısa yarı ömürlü radyonüklitler üretilmektedir (C-11, N-13). Jeneratörlerde ise kız radyonüklidin (kısa yarılanma ömrü) ana radyonüklidden (uzun yarılanma ömrü) fiziksel veya kimyasal yollarla ayrılarak kısa yarı ömre sahip radyonüklidlerin hazırlanması için kullanılmaktadır. Jeneratörler, kullanım yerinde radyoizotop üretimi için uygun bir yöntemdir ve hızlı ve düzenli klinik kullanım için kısa ömürlü radyonüklidler üretmek için siklotronlara bir alternatif sağlamaktadır. Kullanılan en yaygın jeneratör, birçok nükleer tıp bölümünün omurgasını oluşturan Molibden-99 (Mo-99)-Tc-99m jeneratörüdür. Jeneratör sistemi, ebeveyn ve kız çocuğu arasında ulaşılan bir geçici denge durumuna dayanır; bu durum kısa yarı ömürlü kız radyonüklidin, uzun yarı ömürlü anne radyonüklit hızında bozulması sağlayarak ömrünü uzatmaktadır. (Willowson, 2019).

Hastalarda tanı ve tedavisi için kullanılan radyofarmasötiklerin sağlık sistemine birçok katkısı vardır; hastalarda ağrıların çabuk geçmesini sağlayabilir, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır, aynı anda birden fazla hastalık bölgesini tedavi edebilir, tümörü doğrudan tedavi eder, özellikle kemik metastazı için oldukça faydalıdır, bazı hastalarda tek doz etkilidir, çocuklara nükleer tıp testleri yapılabilir. Ancak radyofarmasötiklerin bazı dezavantajları da vardır. Doğmamış bebeklerin radyasyona karşı duyarlılığı çocuklara veya yetişkinlere göre daha fazla olduğundan, hamile kadınlar için nükleer tıp testleri ve radyofarmasi uygulamaları önerilmemektedir. Kemoterapi öncesi miyelosupresyon oluşabilir. Bazı alerjik reaksiyonlara neden olabilir. Radyofarmasötik uygulanan hastalarda radyasyon riski

oluşmaktadır. Birden fazla fraksiyon verildiğinde, hastalar için uzun süreli olumsuzluklar oluşabilmektedir (Nadugopal et al., 2017).

1.1.1. Nükleer Tıpta Kullanılan Radyofarmasötikler

Nükleer tıpta kullanılan radyonüklitlerin hepsi kararlı radyoaktif atomların aktifleştirilmesiyle yapay olarak üretilmektedir. Radyonüklitler nükleer reaktörler, siklotronlar ve radyonüklit jeneratörler olmak üzere üç farklı şekilde üretilmektedir (Kar, 2019). Nükleer tıpta kullanılan radyonüklitlerin çoğu nükleer reaktörde veya siklotronlarda üretilmektedir. Nötron sayısı bakımından zengin olan radyonüklitler nükleer fisyon ile reaktörlerde üretilmektedir. Nötron sayısı bakımından fakir olan radyonüklitler ise siklotronlardan üretilmektedir (Payolla et al., 2019). Ancak bazı radyonüklitler ana radyonüklidin bir reaktör veya bir siklotrondan üretildiği ve bu radyonüklitlerin jeneratörlerden ayrıştırılmasıyla oluşturulmaktadır. Jeneratörler uzun yarı ömürlü radyonüklidin bozunmasıyla oluşan daha kısa yarı ömürlü radyonüklitleri kullanıma hazır hale getiren sistemlerdir. Nükleer tıpta en sık kullanılan jeneratörler Mo-99 / Tc-99m ve Germanyum-68 (Ge-68) / Galyum-68 (Ga-68) jeneratörleridir (Asikoglu, M., Ilem Ozdemir, D., Atlihan Gundogdu, 2017; Saleh, 2011).

Nükleer tıpta kullanılan radyonüklitler kararlı elementlerine göre farklı fiziksel ancak aynı kimyasal özelliklere sahiptir (Mankoff, 2019). Pozitron ve gama ışınlarının penetrasyon özellikleri çok yüksektir ve bu yüzden vücuttan kolayca geçmektedir. Bu sayede görüntüleme teknikleriyle tespit edilmesine ve ölçülmesine olanak sağlamaktadır. Bundan dolayı pozitron ve gama ışını yayan radyofarmasötikler hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Nükleer tıpta teşhis amacıyla hastaya verilen radyofarmasötiklerden yayılan ışınlar Tek Foton Emisyon Tomografisi (SPECT), Pozitron Emisyon Tomografisi (PET) veya hibrid sistemler (SPECT/CT, PET/ (Bilgisayarlı tomografi (CT)) ile görünür hale getirilir ve hastalıklar teşhis edilmektedir. Bu radyofarmasötikler vücutta fizyolojik yollara katıldıklarından dolayı görüntüleme yöntemleri anatomik değişiklik olmadan önce fizyolojik farklılıklara dayandığı için tümörün varlığını ve yayılım hızının erken tanısına imkan vermektedir (Gundogdu et al., 2018). Radyonüklitlerden yayılan fotonlar x ışını ve gama ışını olmak üzere iki farklı şekildedir. X ışınları yörüngedeki elektron geçişleriyle açığa çıkan enerjiden meydana gelmektedir ve enerji bakımından gama ışınlarından daha düşüktür. Gama ışınları ise radyonüklitlerin çekirdeğinde meydana gelen tepkimeler sonucunda oluşmaktadır. 100 ile 200 keV aralığındaki foton emisyon

enerjileri nükleer tıpta kullanılan görüntüleme cihazları (SPECT) için idealdir. PET kameraları için ise 511 keV foton emisyon enerjisine sahip radyonüklitler kullanılmaktadır (Sgouros et al., 2020). Terapötik radyofarmasötikler ise hedeflenen doku ve organda enerji biriktiren partikül radyasyon yaymaktadır. Radyofarmasötiklerle yapılan tedaviye nükleer radyoterapi veya radyonüklid tedavisi adı verilmektedir. Radyonüklid tedavisi kemoterapi gibi radyoaktif olmayan ilaçlara yapılan geleneksel sistemik tedaviye ve harici ışın tedavisine göre önemli avantajlar sunmaktadır. Bu tedavi yöntemlerinin aksine radyofarmasötikler, ilacın sadece hedef bölgedeki biyokimyasal etkisiyle sınırlı değildir (Yuliya S Jhanwar & Chaitanya Divgi, 2005). Radyofarmasötikler düşük moleküler dozlarda uygulanmaktadır ve bu nedenlerden dolayı daha yüksek kemoterapötik dozlarda görülebilen yan etki ve advers etkiler görülmemektedir. Harici ışın tedavisiyle karşılaştırıldığında, moleküler hedefli radyofarmasötikler hedeflenen bölgeye daha spesifik radyasyon enerjisi verebilmektedir (Mankoff, 2019; Parker et al., 2013).

Farklı hedefleme mekanizmalarına ve farklı formlara sahip çok çeşitli radyofarmasötikler vardır. Bu radyofarmasötikler basit tuz formunda veya daha kompleks moleküllere bağlanarak farklı uygulama yollarıyla hastalara verilmektedir (Alsharef et al., 2020).

1.1.1.1. Tedavide Kullanılan Radyofarmasötikler

Belirli bir hastalığın tedavisi için bir radyofarmasötik tasarlarken, uygun bir radyonüklidin seçimi birincil belirleyicidir. Tedavide kullanım için bir radyonüklit seçimi için ana kriterler radyonüklidik yarılanma ömrü, partikül radyasyonun tipi, enerjisi ve varsa foton miktarı ve enerjisini içermektedir. Radyonüklidin fiziksel yarı ömrünün, kullanılan taşıyıcı molekülün biyolojik yarı ömrüyle eşleşmesi önemlidir. Radyonüklitler için ayrıca taşıyıcı moleküle stabil olarak ve yüksek verimde bağlanması spesifik aktivitesi, radyonüklidik ve kimyasal saflığı, üretim fizibilitesi ve maliyeti de önemlidir (Dash et al., 2014; Qaim, 2001). Radyofarmasötikler tedavide ilk olarak Graves hastalığı ve hipertiroidizmde kullanılmıştır. Bu tedavide I-131 radyofarmasötiği kullanılmıştır ve cerrahi gibi daha riskli veya antitiroid ilaçlar gibi daha toksik ve yan etkiye sahip alternatiflere göre güvenli ve oldukça etkili bir tedavi seçeneği sağlamıştır (Biersack & Hotze, 1991; Smith J. Terry & Hegedüs Laszlo, 2016). Nükleer tıpta tedavi için radyofarmasötikler vücuda ya bölgesel olarak ya da sistemik olarak verilmektedir ve hedeflenen bölgeye metabolik taşıyıcılar ile

yönlendirilmektedir. Hedeflenen doku ve organda bu radyofarmasötiklerin yaydığı partiküler radyasyon ile hastalıklı hücreler yok edilmektedir. Nükleer tıpta radyonüklit tedavisi hipertiroidi ve eklem hastalıkları dışında çoğunlukla kanser tedavileri için kullanılmaktadır. Bu tedavi yönteminde amaç hedeflenen hücrelerde radyasyon ile hücre ölümüne neden olurken, hedef hücrelerin çevrelerindeki sağlıklı hücrelere zararı en az seviyede tutmaktır (Türkmen, 2012). Radyonüklit tedavileri, kanser tedavisi için var olan tedavi yöntemlerine göre çeşitli avantajlar sağlamaktadır. Radyoterapiden farklı olarak radyasyon vücut dışından uygulanmaz, sistemik olarak istenilen bölgeye hedeflenmektedir. Böylelikle daha az radyasyon dozuyla istenilen tedavi dozu sağlanabilir ve sağlık hücrelere radyoterapiye göre daha az zarar vermektedir (Sgouros et al., 2020). Tedavide kullanılan radyofarmasötiklerin ideal özellikleri; hedef dokuda yüksek tutulum göstermesi, kandaki aktivitesinin az olması, hedef olmayan doku ve organda tutulumun olmaması ve böbrek yoluyla atılmasıdır (Alsharif et al., 2020). Radyonüklit tedavide iyonlaştırıcı radyasyon, hastalığa neden olan hücrelerin DNA'larında çift sarmallı kırılmalara neden olarak geri dönüşü olmayan hasara yol açarlar ve böylece bu hücrelerin daha fazla çoğalmaları engellenmiş olur. Tedavide kullanılan radyofarmasötiklerin biyolojik etkileri yapısındaki radyonüklitlerin yaydığı radyasyondan emilen enerji ile oluşmaktadır. Bu yüzden hedefli tedavilerde penetasyonu kısa, lineer enerji transferi (LET) yüksek olan radyonüklitler kullanılmalıdır. Böylelikle çevredeki hedef olmayan dokuları korumak için radyasyon enerjisini hastalıklı hücrelere bırakmalıdır (Knapp & Dash, 2016). Radyonüklit tedavinin başarılı olması için; radyofarmasötiklerin hedefe özgüllüğü yüksek, hedef olmayan organ ve dokularda tutulum minimum olmalı, hedef bölgeye tutunmamış radyofarmasötiğin vücuttan hızlıca atılması gerekir, hem radyofarmasötik hem de metabolitleri hedef bölgede tutulum göstermeli, tedavi için yeterli dozda radyofarmasötik hastaya verilmelidir ve sitotoksiste en az düzeyde olmalıdır (M. R. A. Pillai, 2010).

Tedavide alfa (α), beta (β) partikülü veya auger elektronu yayan radyonüklitler kullanılmaktadır. Tedavi için kullanılan her bir partikül emisyon türü, yumuşak dokuda farklı LET değerlerine ve farklı aralıklara sahiptir. LET, bir iyonlaştırıcı radyasyonun içinden geçerken ortama aktarılan enerjinin ölçüsüdür ve iyonlaştırıcı radyasyonun biyolojik bir numune gibi ortam üzerindeki etkisini ölçmek için kullanılmaktadır. LET değerleri hem radyasyonun doğasına hem de partikül

radasyonunun içinden geçtiği malzemeye bağlıdır. α ve β^- partikülleri yüksek LET değerine sahipken, γ ve X ışınları düşük LET değerine sahiptir. Partiküllerin vücutta penetrasyon mesafeleri ile LET değerleri ters orantılıdır. Yüksek LET biyolojik sistemlerde daha yüksek radyasyon hasarına neden olmaktadır ve ‘göreceli biyolojik etki’ terimiyle ölçülmektedir. Göreceli biyolojik etki aynı miktarda absorbe edilen enerji verildiğinde, bir tür iyonlaştırıcı radyasyonun değerine göre biyolojik etkinliğinin oranıdır. α partikülün LET değeri beta partikülüne göre daha fazladır. Bu yüzden alfa partikülü yayan radyonüklitler mikrometastaz yapmış kanser hastalarında tercih edilirken beta yayan radyonüklitler daha büyük çapta tümörler için tercih edilir. Beta partikülü yayan radyonüklitlerin bir avantajı ise ‘çapraz ateş’ etkisidir. Yalnızca doğrudan hedeflenen hücreleri yok etmeye yönelik olan ilaçların ve kemoterapötiklerin aksine beta emisyonu yapan radyonüklitler çapraz ateş etkisi uygulayarak potansiyel olan komşu hücreleri de yok etmektedirler. Bu bölgelerdeki tümör hücreleri radyofarmasötik tarafından hedeflenmemiş olsalar bile yok edilebilmektedir. α yayan radyonüklitlerin menzili çok kısa olduğundan dolayı çapraz ateş etkisi sınırlı kalmaktadır. Sistemik olarak uygulanan hedefe yönelik bir radyofarmasötik birincil tümör bölgelerinin yanı sıra metastazları ve görüntüleme teknikleriyle tespit edilemeyen tümör hücrelerini yok etme potansiyeline sahiptir (Knapp & Dash, 2016). Ayrıca α partikülü yayan radyonüklitler, vasküler sistemdeki lösemi kanser hücrelerinin tedavisi için Bizmut-213 (Bi-213) kullanımı gibi, sadece birkaç hücre çapı aralığında partiküler radyasyon kullanımının avantajlı olduğu durumlarda etkilidir (Rosenblat et al., 2010). Auger elektronu ise, sadece farmasötik kısım hücre zarını geçip nükleusa ulaşabilirse etkili olabilmektedir (örn. İndiyum-111 (In-111) oktreotit). Bazı durumlarda hem gama ışını hem de beta partikülü yayan radyonüklitler (örn. Lu-177, I-131) tedavide kullanılabilir.

Radyofarmasötiklerin tek bir kombinasyon ile hem tanıda hem de tedavi de kullanılması teranostik olarak adlandırılmaktadır. Teranostik radyofarmasötiklerle tümör hücrelerinde bulunan reseptörlerin hedeflendirilmesi için PET veya SPECT taraması yapılmaktadır. Reseptörler tespit edilirse radyoaktif ilaç kullanılmaktadır. Bu durum diğer uygulamalara göre gereksiz ilaç kullanımını engeller, ekonomiktir ve zamandan tasarruf sağlamaktadır (Deep Kaur et al., 2021).

1.1.1.2. Teranostikler

Teranostik terimi ilk olarak 2002 yılında Funkhouser tarafından tanımlanan hem tedavide hem de tanı da kullanılan anlamına gelen ve ingilizceden ‘Therapy’ ve ‘Diagnostik’ kelimelerinden türetilmiştir (Asikoglu, M., Ilem Ozdemir, D., Atlihan Gundogdu, 2017). Teranostik kavramı belirli hastalıkların tedavisi için en uygun tedavi ajanının seçimine ve uygulanmasına yardımcı olan bir tanı aracının birlikte kullanımını tanımlamak için bulunmuştur (Banerjee et al., 2015). Teranostik, özellikle nanoteknoloji alanında giderek artan sayıda bilimsel disiplini içermesine rağmen, bu yenilikçi tıbbi yaklaşım nükleer tıp ile derinden bağlantılıdır. Radyonüklid görüntüleme, görüntüleme için uygun radyasyonlar yayan radyonüklitlerle radyoişaretlenmiş belirli bir radyofarmasötiğin kullanımı yoluyla belirli bir tümör biyobelirtecinin ekspresyonunu saptamak ve ölçmek için eşsiz bir fırsat sunmaktadır. Daha sonra aynı radyofarmasötik, tümör hücrelerini yok edici özelliği bulunan alfa veya beta partikülleri yayan bir radyonüklit ile hazırlanarak tedavide de kullanılmaktadır (Filippi et al., 2020). Teranostik teriminin kullanılması yeni olsada tiroid hastalığının tanı ve tedavisi için I-131 kullanımıyla nükleer tıbbın ilk günlerine kadar dayanmaktadır. Teranostik ilaçların hem tanı da hem de tedavide kullanılmasının bazı avantajları bulunmaktadır. Tedavi sırasında görüntüleme yapılabilmesi, benzer kimyasal özelliklere sahip potansiyel tedavi ajanlarının lokalizasyonunu belirlemek, tedavi ajanlarının hedef dışı etkilerinin tahmini olarak biyodağılımını incelemek, tümör bölgesinde ölçülen dozlara dayalı olarak uygulanacak optimal terapötik dozun belirlenmesine yardımcı olması ve tedaviye verilen yanıtların izlenmesi tedavi başarısı için büyük avantaj ve kolaylık sağlamaktadır (Ballinger, 2018; Del Vecchio et al., 2007). Bu şekilde elde edilen bilgiler, maksimum tolere edilen dozun (MTD) tanımlanması için kullanılmaktadır. Görüntüleme sonuçlarıyla desteklenerek, genellikle aynı radyofarmasötiğin daha yüksek bir dozunu kullanarak hedefe yönelik moleküler tedaviyi sağlamaktadır. Ayrıca görüntüleme çalışmalarıyla birlikte doz ayarlaması yapılarak güvenli ve uygun kabul edilir bir tedavi sağlamaktadır. Bu faktörler, aynı hastada aynı radyofarmasötik ile bireyselleştirilmiş görüntüleme ve tedavi yapılabilmesi için özellikle önemlidir (Silberstein, 2012). Radyonüklit tedavi veya moleküler radyoterapi kanser tedavisi için oldukça etkili olmasına rağmen bazı riskleri bulunmaktadır. Bu yüzden radyofarmasötiğin uygulanmasında en fazla yarar görecekt, tedavi etkinliği yüksek

olacak hastaların seçilmeleri önemlidir. Teranostik bir platform için yerine getirilmesi gereken önemli kriterler, görüntüleme verilerinin terapötik prosedürle ilgili kritik kararlar vermek için kullanılabilecek anlamlı bilgiler sağlaması gerektiğidir. Ön hedefleme tedavisinde, ilk bileşen tipik olarak hedefi belirlemek ve tümörün konumunu ve boyutu (belki de tümör evresi) gibi bilgileri elde etmek için kullanılmaktadır. Ön hedefleme bileşeni sitotoksik olmadığından, uzun dolaşımı (ve olası zayıf spesifik olmayan bağlanması) yan etkiler oluşturmaz ve tümör bölgelerinde daha iyi dağılım sağlamaktadır. Hedef bölge belirlendikten sonra, terapötik dozda radyofarmasötikler uygulanabilmektedir (Hapuarachchige & Artemov, 2020). Teranostik için kullanılan çok çeşitli görüntüleme yöntemleri arasında optik (floresan veya biyoluminesans), nükleer (PET veya SPECT), ultrason, fotoakustik, manyetik parçacık ve manyetik rezonans (MR) görüntüleme teknikleri bulunmaktadır (Penet et al., 2012; Yordanova et al., 2017). Reseptör ekspresyonu, primer tümör ve uzak metastatik bölgeler arasında değişken olabilmektedir ve biyopsi ile kolayca erişilemez. Bu nedenle, ön hedefleme bileşeninden gelen görüntüler, reseptör ekspresyonunun pozitif onayını ve sitotoksik ilaç taşıyıcısının uygulanması için bir "git" sinyali sağlamaktadır. Bu görüntüleme sonuçları, ilacın hedef bölgeye taşınması ve tedavi sonuçlarını ilişkilendirmek ve yanıtın görüntüleme belirteçleri olarak kullanımlarını desteklemek için de kullanılabilmektedir (De Grand et al., 2006). Hastada radyofarmasötüğün hedefleneceği reseptörün veya peptidin bulunmaması veya ilacın yeterli miktarda hedefe ulaşmaması o radyofarmasötüğün tedavide başarısız olmasına neden olmaktadır (Strigari et al., 2014). Teranostik sistemlerin tek bir platformda birleştirilmesi, görüntüleme molekülleri ve terapötik ilaçların biyodağılımı ve özelliklerindeki sıkıntı yaratacak farklılıkların üstesinden gelinmesine yardımcı olmaktadır. Konvansiyonel ilaçlarla yapılan tedavilerde sadece tümör hücreleri etkilenmeyebilir, sağlıklı hücrelerde kemoterapötiklerden etkilenir ve çeşitli yan etkilere sebep olabilir. Ayrıca konvansiyonel tedavilerde mutasyonal olaylar sebebiyle hücrelerde çoklu ilaç rezistansı, tümör dokularına zayıf ilaç penetrasyonu ve sağlıklı hücrelerde çeşitli hasarlar gelişebilmektedir. Teranostik tedavilerle gereksiz tedavilerden kaynaklı sağlık harcamaların da azalması amaçlanmaktadır (Baptista et al., 2015). Teranostikler, prensipte kanser için kişileştirilmiş ilaç elde etmek için gerekli moleküler teşhis, hedefli terapi ve eşzamanlı izleme ve tedaviye olanak sağlar. Kişiselleştirilmiş tedavi, tedavinin istenmeyen yan etkilerini azaltabilir ve potansiyel

olarak daha iyi sonuçlar verebilir. Bu çoklu fonksiyonelliğe erişmek için, dört tipik bileşen konseptte dahil edilmelidir;

1. Nano taşıyıcı sistem
2. Tanısal görüntüleme alanı
3. Ligand veya ligand hedefleyici molekül
4. Terapötik

Böylece, verimli teranostik partiküllerin geliştirilmesi aşamasında daha sensitif tanısal görüntüleme, liganda daha spesifik bağlanma ve kontrollü ilaç salınımına ihtiyaç duyulmaktadır (Park & Kim, 2013). İdeal teranostikler kimyasal ve biyolojik olarak aynı özellikte olmalıdırlar. Ancak çok az radyofarmasötik bu özellikleri taşımaktadır. İtiryum-90 (Y-90) ve Lu-177 radyonüklitlerinin tanı ajanı olarak sırasıyla Indiyum-111 (In-111) ve Galyum-68 (Ga-68) kullanılmaktadır. Bu radyonüklitler aynı şelat ajanları ile farmasötik kısma bağlanabilen üç değerlikli metaller olmasına rağmen kimyasal yapılarında biyolojik özelliklerini etkileyebilen çok küçük farklılıklar vardır (Maurin et al., 2015). Nöroendokrin tümörlerde kullanılan Lu-177-DOTATATE (Lutathera) radyofarmasötiği için bazı ülkelerde Ga-68-DOTATATE ile PET görüntülemenin hasta seçimi ve yanıtın izlenmesi için kullanılması zorunlu hale getirilmiştir (Strosberg et al., 2017). I-131-MIBG ve In-111-Oktreotid gibi radyofarmasötikler hem görüntüleme hem de tedavi ajanı olarak kullanılmaktadır ve bu teranostik ajanlar tanı ve tedavi molekülü aynı olan teranostik grubuna örnektir. Ga-68-DOTA ile PET görüntülenmesi ve Lu-177-DOTA ile tedavi ise tanısal molekül ve tedavi molekülü benzer grubu için örnektir. Bazı teranostikler ise tanı ve tedavi molekülü farklıdır ancak süreç benzerdir. Bu grup için en iyi örnek ise Tc-99m-Makroagregat albumin (MAA) ile görüntüleme yapıp, Y-90 mikroküreler ile yapılan tedavidir.

1.1.1.3. Radyoimmünoterapi

Radyoimünoterapide, radyoaktivitenin kanser hücrelerine taşınması için farmasötik kısım olarak büyük makromoleküler monoklonal antikorları kullanılmaktadır. Radyoişaretli antikorlar, anjiyojenez sırasında oluşan tümör hücreleri veya kan damarları üzerinde aşırı eksprese edilen çeşitli antijenlere hedeflenmektedir. Radyoimünoterapi, hem radyasyonun hem de immünoterapinin sinerjik etkileriyle

tümör hücrelerini yok etmeye dayanan bir tedavi yöntemidir (Larson et al., 2015). Radyoimmünoterapide radyonüklitler monoklonal antikor ile doğrudan tümöre tanınır ve radyasyon enerjisine bağlı çift sarmallı DNA kırıkları ile hücre ölümüne neden olmaktadır (Zaheer et al., 2019). Günümüzde ticari olarak FDA tarafından onaylanmış iki radyoimmunoterapi radyofarmasötiği bulunmaktadır. Y-90-ibritumomab tiuxetan (Zevalin) 2002 yılında ve I-131-Tositumomab (Bexxar) ise 2003 yılında Hodgking dışı lenfoma tedavisinde kullanılmak üzere onay almıştır (Medicine, 2007). Ancak katı tümörler için radyoimmünoterapi; tümör heterojenliği, tümör damarlarının anormal yapıları, tümör içinde çok fazla interstisyel sıvı basıncı gibi tümör mikro ortamlarının yarattığı bariyerler nedeniyle klinikte çok az uygulaması vardır (Thurber et al., 2008). Radyoimmunoterapide farklı radyonüklitler kullanılmaktadır. Büyük ve hacimli tümörler için I-131 ve Y-90 gibi uzun menzile sahip beta partikülü yayan radyonüklitler kullanılırken, küçük boyutlu ve/veya metastaz yapmış tümörler için Radium-223 (Ra-223) ve Astatin-211 (At-211) gibi alfa parçacığı veya Lu-177 ve Bakır-67 (Cu-67) gibi kısa menzilli beta partikülü yayan radyonüklitler kullanılmaktadır (Frost et al., 2013; J. S. Kim, 2016). I-131 ve Y-90 radyoişaretli monoklonal antikorların kullanıldığı radyoimmunoterapi, belirli bir süredir önemli bir terapötik model olmuştur. Ancak I-131'in yüksek enerjili gama ışınlarına fazla miktarda sahip olması, I-131'in radyoimmunoterapi için ideal bir radyonüklit olmadığını göstermektedir. Y-90 ise 64 saatlik kısa yarıömre sahiptir ve Stronsiyum-90 (Sr-90) içermeyen Y-90'nın bulunabilirliğinin yaygın değildir. Ayrıca Y-90'nın gama ışını yaymaması, hedefleme değerlendirmesini ve doz dağıtımının tahminini engellemektedir. Lu-177 radyoişaretli monoklonal antikorların kullanımı, küçük tümörler ve mikrometastazların tedavisi için gelişmiş lojistik ve terapötik etkinlik sunmaktadır (A. Pillai & (Russ) Knapp, 2015). Radyoimmunoterapide monoklonal antikor seçimi çok önemlidir. Terapötik monoklonal antikorlar spesifik hücre yüzeyi reseptörlerini hedefleyerek ve kanser hücrelerini çeşitli mekanizmalarla yok ederek etki ederler. Kanser hücreleri, hayatta kalma ve proliferasyon için epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) ve HER2 gibi onkojen protein sinyallemesini kullanmaktadır. Terapötik monoklonal antikorlar EGFR ve HER2 gibi tümöre özgü antijen veya onkojen proteinlerine bağlanmak üzere tasarlanmıştır. TRZ'nin HER2 reseptörüne afinitesi vardır ve doğrudan bağlanmaktadır, tirozin kinaz sinyalini inhibe

ederek etki göstermektedir. Bu mekanizma tümörün büyümesini, çoğalmasını ve hücrenin hayatta kalmasını azaltmaktadır (Hudis, 2007).

1.1.1.4. Lu-177-Radyonüklidi

Lu-177'nin ilk klinik kullanımı 1960 yılında Anderson ve arkadaşları tarafından miyoloma hastalığının tedavisi için kullanılmıştır (Anderson et al., 1960). Lu-177 radyonüklidine ilgi ve araştırmalar Lu-177-(1,4,7,10-tetraazasiklododekan-1,4,7,10-tetraasetikasit tirozin-3-oktreotat (DOTATATE) radyofarmasötığının nöroendokrin tümörlerin tedavisi için kullanılmaya başlanmasıyla yaygınlaşmıştır (Banerjee et al., 2015). Lu-177'ye olan ilginin hızlı artışı fiziksel ve kimyasal özelliklerinin radyonüklidik tedavi için uygun olmasıdır. Ayrıca Lu-177, dünyada birçok mevcut nükleer reaktörlerde yüksek spesifik aktivite ile üretim kolaylığına sahiptir. Lutesyum lantanit serisinin son üyesidir ve kimyasal reaksiyon sırasında lutesyum atomları en dıştaki iki elektronu ve tek 5d elektronu kaybederek +3 metal katyonik durumunda bulunmaktadır. Lutesyum tuzları ve bunların sulu çözeltileri renksizdir ve kuruduktan sonra beyaz kristalli katı halde bulunmaktadır. Nitrat, sülfat ve asetat tuzları suda çözünmektedir (Patnaik, 2003). Lutesyum metalik haldeyken standart koşullarda kararsız bir yapıdadır, su ve karbondioksidi absorbe ettiğinden dolayı Lutesyum oksit oluşturarak 150°C'de yanmaktadır. Bu nedenden dolayı Lutesyum kapalı sistemlerden su ve karbondioksit buharlarını uzaklaştırmak için de kullanılabilir (Krebs, 2006). Lu-177, 6.64 günlük yarı ömre sahiptir ve 498.3 keV (%79,3), 385.4 keV (%9,1) ve 177.0 keV (%11,64) E_{max} enerjisine sahip beta (β) partikülü yaymaktadır. Lu-177'in β parçacıklarının maksimum doku penetrasyonu <3 mm çapındadır. Bu özelliği sayesinde küçük lezyonlarda bile radyasyon enerjinin verimli bir şekilde birikmektedir. Lu-177'in yaydığı β enerjisi hedef olmayan dokuları "çapraz ateş" etkisiyle zarar vermeyecek kadar düşüktür seviyededir. Lu-177, tümör hücreleri içinde yer alan biyomoleküllerle birlikte kullanıldığında çok etkilidir. Lu-177, kemik yüzeyinde biriken bisfosfonat ligandlarıyla birlikte kullanıldığında hedef dokularda tutulum oranı çok yüksektir ayrıca kemik ağrısının hafifletilmesi için kullanılan diğer yüksek enerjili beta yayıcılara göre kemik iliği hasarı Lu-177'de daha azdır. Lu-177, radyofarmasötığının in vivo görüntülenmesi ve ölçümü için uygun olan enerji düzeyine sahip gama fotonları (112.95 keV, %6.22, 208.37 keV, %10.55) yaymaktadır. Gama görüntüleme, dozimetri çalışmalarının yanı sıra hedefteki radyofarmasötığının birikimini değerlendirmek için önemli bir fırsat da sağlamaktadır. Lu-177 aynı ürünün

farklı radyoaktivite seviyelerinde uygulanarak hem teşhis hem de tedavi amaçlı olarak teranostik radyonüklid olarak kullanılma imkânı sunmaktadır. Lu-177'nin nispeten uzun fiziksel yarı ömrü, üretim tesisinden uzak yerlere taşınmasının yanı sıra hedeflenen bölgeye uzun süreli doz birikimi sağlaması da avantajdır (A. Pillai & (Russ) Knapp, 2015).

Spesifik aktivite bir molekülün birim ağırlık başına düşen radyoaktivite miktarı olarak tanımlanmaktadır. Molekülün kütlesi radyoaktif olan ve olmayan izotopların hepsini kapsamaktadır. Spesifik aktivite birimleri, Curie (Ci) /g, Ci/mol veya Gigabecquerel (G bq) /mol olarak tanımlanmaktadır. Spesifik aktivite radyofarmasötiğin hedef dokudaki tutulum miktarının bir ölçüsüdür. Spesifik aktivite özellikle reseptör veya antijen ile hedefleme yapılan tedavi radyofarmasötiklerinin etkinliği için çok önemli bir parametredir. Tümör bölgesinde sınırlı miktarda reseptör ve antijen bağlanma bölgeleri bulunmaktadır. Bu nedenden dolayı tedavide kullanılan peptit ve antikörlerin hedef bölgedeki miktarları da sınırlı olmaktadır. Bu yüzden ya taşıyıcı eklenmemiş ya da taşıyıcı eklenmiş çok yüksek spesifik aktiviteye sahip radyonüklitlerin tedavide kullanılması gerekmektedir. Lu-177'nin hem taşıyıcı içermeyen hem de taşıyıcı içeren çok yüksek spesifik aktiviteye sahip taşıyıcı içeren üretim yolları bulunmaktadır. Taşıyıcı içermeyen Lu-177'nin teorik spesifik aktivite miktarı yaklaşık olarak 111.11 Ci/mg'dır (Iaea, 2006). Lu-177 siklotronda üretimi de yapılabilmesine rağmen büyük ölçekli üretimi için nükleer reaktörlerde üretim tercih edilmektedir (Manenti et al., 2014). Lu-177 nükleer reaktörlerde doğrudan yöntemle zenginleştirilmiş Lu-176'nın nötron aktivasyonu ile veya dolaylı yöntemle; zenginleştirilmiş İterbiyum-176'nın (Yb-176) nötron aktivasyonu ve sonrasında Yb-177'nin β^- bozunmasıyla üretilmektedir.

Doğrudan yöntem

Lu-176(n, γ) (nötron yakalama reaksiyonu) $\longrightarrow$ Lu-177

Dolaylı yöntem

Yb-176(n, γ) (nötron yakalama reaksiyonu) Yb-177 $\xrightarrow{\beta^-}$ Lu-177

Doğrudan yöntemle üretim gerçekleşirken taşıyıcı içeren Lu-177 elde edilirken, dolaylı yöntem ile taşıyıcı içermeyen Lu-177 elde edilmektedir (Dash, Chakravarty, et al., 2015; Mirzadeh et al., 2002). Lu-176'nın nötron aktivasyonu ile doğrudan yöntemle üretimi, çok yüksek nükleer reaksiyon sonucu olmaktadır. Bu durum da Lu-177'nin çok yüksek verimle üretilmesini sağlamaktadır ve klinik uygulamalarda kabul

edilebilir seviyede yüksek spesifik aktiviteye sahip Lu-177 üretimi gerçekleştirilmektedir. Doğrudan üretim yolunun en büyük avantajı dünya çapında araştırma reaktörlerinde Lu-177 çok yüksek parti üretim verimine sahip ve kolayca üretilebilmesidir. Termal nötron reaksiyon üretiminin enine kesiti (cross section) terapötik radyonüklitler için ölçülen en yüksek kesit olarak bilinmektedir. Enine kesit bir nükleer reaksiyonun meydana gelme olasılığını tanımlamak için kullanılmaktadır. Nükleer enine kesit kavramı, daha büyük bir alanın daha büyük bir etkileşim olasılığı anlamına geldiği 'karakteristik alan' terimiyle fiziksel olarak ölçülebilmektedir. Doğal lutesyumda Lu-176'nın izotop varlığı %2,1 kadardır ancak uygun maliyetle Lu-176 zenginleştirilerek bu oran %90'a kadar artırılmaktadır. Dolaylı yöntemle üretimde zenginleştirilmiş Yb-176 yüksek akışlı araştırma reaktörlerinde ısıtılarak Yb-177 oluşur ve Yb-177 ise β emisyonu yaparak taşıyıcı içermeyen Lu-177'yi oluşturmaktadır (Balasubramanian, 1994). Bu yolla üretilen Lu-177 taşıyıcı içermez 'carrier free' olarak adlandırılır ve spesifik aktivitesi 111.11 Ci/mg olan teorik spesifik aktiviteye çok yakındır ve eşdeğer olarak kabul edilmektedir. Dolaylı yöntemle üretilen taşıyıcı içermeyen Lu-177 uzun yarı ömürlü Lu-177m safsızlığı içermez. Lu-177m doğrudan yöntemle düşük aktivite seviyelerinde üretilen Lu-177'de bulunmaktadır. Lu-177m miktarı ısınlama süresi ve soğutma periyodu olmak üzere iki temel faktöre bağlıdır. Lu-177m 160,1 günlük yarı ömre sahiptir. Bu nedenden dolayı Lu-177m safsızlığı içeren radyonüklitler için radyasyondan korunma ve atık sorunları oluşmaktadır. Dolaylı yöntemle üretim tarzının dezavantajı ise Yb-176 (n, γ), Yb-177 nükleer reaksiyonun enine kesitinin düşük olmasıdır ve bu durumda daha düşük üretim verimleriyle sonuçlanmaktadır. Yüksek akışlı bir araştırma reaktöründe 20 Ci taşıyıcı içermeyen Lu-177 üretmek için bir gram yüksek oranda zenginleştirilmiş Yb-176'a ihtiyaç duyulmaktadır (Dvorakova, 2007).

Lu-177 düşük enerjili gama ışını emisyonu yapmaktadır ve gama ışını yayan diğer terapötik radyonüklitlerin aksine düşük miktarda gama emisyonuna ve gama enerjisine sahiptir. Lu-177'nin yarı tabaka kalınlığı (half-value layer (HVL) 0.6 mm'dir ve onuncu değer kalınlığı (tenth-value thickness (TVT) 2.1 mm kurşundur. 0.135 cm pleksiglas siperlerin ve göğüs zırhları kullanılması Lu-177'den korunmak için yeterlidir. Lu-177'nin düşük enerji seviyesine sahip β ve gama ışınlarına sahip olması radyoişaretleme operatörünün, dozu uygulayan hastane personelinin ve hasta yakınlarının daha düşük radyasyon dozuna maruz kalmasını sağlamaktadır. Hastalara

uygulanan Lu-177-DOTATATE ve Lu-177- etilen diamin tetrametilen fosfonik asit (EDTMP) gibi Lu-177 radyofarmasötiklerinde bağlanmamış Lu-177 radyonüklidi uygulamadan birkaç saat sonra renal yoldan vücuttan temizlenmektedir. Bu nedenle, Lu-177 için hastaneye yatış ve izolasyon gereksinimleri minimum düzeydedir ve bu da I-131 ve Y-90 gibi birçok terapötik radyonüklit kullanımına kıyasla tedavi maliyetlerini önemli ölçüde düşürmeye yardımcı olmaktadır. Lu-177 ile tedavi prosedürlerinin çoğu ya ayaktan tedavi şeklinde ya da sadece bir gün hastanede yatış şeklinde gerçekleştirilmektedir (Agarwal et al., 2015).

Lu-177, çok çeşitli terapötik radyofarmasötikler geliştirme olasılığını sunan, doğrudan veya bifonksiyonel şelatlama ajanlarının kullanımı yoluyla birçok biyomolekülle radyoişaretlenebilir. Radyofarmasötikler için kullanılan bifonksiyonel şelat ajanları bir ucunda şelatlayıcı kısma sahip diğer ucunda ise aromatik izotiyosiyanat veya aktifleştirilmiş bir ester molekülüne sahip fonksiyonel kısım bulunan organik bir molekülden oluşmaktadır. Sentetik olarak çok yönlü aktifleştirilmiş gruplar, -NH₂, -COOH gibi fonksiyonel gruplarla veya hedefe spesifik biyomoleküllerde bulunan diğer uygun kısımlarla konjugasyonu kolaylaştırmaktadır (Banerjee et al., 2015). Konjugenin farmakokinetik özelliklerini etkilemek için şelatör ve hedefleme vektörü arasına bir bağlayıcı kısım da dahil edilebilir. Genellikle hidrokarbon zincirleri (CH₂)_n, polietilen glikol veya polipeptit bağlayıcıları olan bu bağlayıcı gruplar, genel yükü ve hidrofilikliyi, yani bir ilaç olarak kullanılması amaçlanan ortaya çıkan türlerin çözünürlüğünü değiştirerek farmakokinetiği ve biyolojik dağılımı değiştirebilir (De León-Rodríguez & Kovacs, 2008; Z. B. Li et al., 2007). Lu-177'nin en kararlı oksidasyon durumu +3 olduğundan, çözeltideki bu tür sert, üç değerlikli katyonların kimyası, Oksijen (O), Flor (F)- ve Azot (N) gibi sert verici atomlarla kompleksler oluşturmaya yönelik güçlü eğilimi bulunmaktadır.

Lu-177'in 1,4,7,10-Tetraazasiklodekan-1,4,7,10-tetraasetikasit (DOTA) Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve dietilentriaminpentaasetik asit (DTPA) gibi konjugatlarla radyoişaretlenmesi ve kompleksleştirilmesi, antikorlara, peptitlere ve diğer küçük moleküllerle Lu-177 radyoişaretli radyofarmasötiklerin hazırlanabilmesini sağlamaktadır. Tüm kompleksleşme reaksiyonlarında olduğu gibi, pH, sıcaklık, ligand-metal oranı ve tampon seçimi gibi çeşitli parametreler, Lu⁺³-177 ile kararlı kompleksler elde etmek için dikkatli optimizasyon gerektiren önemli niteliklerdir. Çok yüksek stabilite sabitlerine rağmen, şelatlayıcı ajanlarla Lu⁺³-177

komplekslerinin oluşum hızı, özellikle radyofarmasötik formülasyonlarda kullanılan Lu-177 ve şelat ajanlarının düşük konsantrasyonlarında oldukça yavaştır. Radyoişaretleme prosedürleri genellikle radyonüklide göre birkaç kat daha fazla şelat ajanı fazlalığı ile gerçekleştirilir. Bu yüzden, şelat ajanlarının mevcut bağlanma bölgelerinin sadece küçük bir kısmı radyoişaretlenir ve büyük miktarda şelat ajanı, ara komplekslerin hızlı oluşumu nedeniyle çözünmeyen metal-hidroksi türlerinin oluşumunu engellemektedir (Liu et al., 2001). Radyoişaretleli komplekslerin yüksek spesifik aktivitesi, özellikle spesifik reseptörlere bağlanan terapötik ajanlar için önemlidir. Özellikle radyofarmasötiklerin bağlanması için hedef bölgelerin ve bu bölgelerin yoğunluğu genellikle sınırlı olduğundan, terapötik radyofarmasötiklerin tasarımı için spesifik aktivite birincil öneme sahiptir. Radyonüklitlerdeki radyonüklidik safsızlıklar, konjugattaki bifonksiyonel şelat ajanları kompleksleştirmek için Lu^{+3} ile rekabet ederek hedefe özgü radyofarmasötiklerin spesifik aktivitesini olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle, kullanılan tüm çözücüler ve reaktifler çok yüksek saflıkta olmalıdır. Radyonüklid bulunduğu formülasyonlarda, Lu-177'in bozunma ürünü olarak önemli miktarda Hafnium-177 (Hf-177) metal iyonu bulunmaktadır. Ancak Hf^{+4} 'ün DOTA gibi bazı şelat ajanlarına karşı afinitesi düşüktür ve bu nedenle Lu-177'nin bu şelat ajanlarıyla şelasyonunu etkilememektedir (Stimmel & Kull, 1998). Terapötik radyofarmasötikler çok yüksek radyoaktif konsantrasyona sahiptir ve bu nedenle ürünün radyolitik bozunması sıklıkla görülmektedir. Askorbik asit veya gentisik asit genellikle formülasyona eklenebilir. Formülasyondaki serbest radikaller süpürücü olarak hareket ederler ve ürünler için daha iyi stabilite sağlamaktadır (Liu & Edwards, 2001).

1.2. Trastuzumab

TRZ FDA tarafından 1998'de onay alan ilk insan antikorlarından oluşturulmuş monoklonal antikordur. TRZ tümör hücreleri HER2 proteinini aşırı eksprese eden ve bir veya daha fazla kemoterapi almış metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde kullanılmaktadır. Ayrıca TRZ, HER2 eksprese eden metastatik meme kanseri olan ve metastazlar için kemoterapi almamış hastaların tedavisinde paklitaksel ile kombinasyon halinde kullanım için de onaylanmıştır (Milenic et al., 2010). Transmembran reseptör tirozin kinaz olan HER2, meme kanserlerinin %25-30'unda aşırı miktarda eksprese edilmektedir. Hastalardaki HER2 ekspresyonunu veya HER2

geninin amplifikasyonunu belirleyen immünohistokimyasal boyama veya floresan in situ hibridizasyon kullanılarak TRZ tedavisi seçilmektedir. İmmünohistokimyasal boyama tekniği kullanılarak, hastanın tümör HER2 ekspresyonu belirli bir puan almalıdır. +2 veya +3 puan tedavi için uygun olmaktadır. Tek ajan olarak TRZ alan hastalarda tedavi yanıtı sadece %12-35 kadardır ancak paklitaksel ile kombine edildiğinde bu yanıt oranları %40-60'a kadar çıkmaktadır (Press et al., 1993; Shepard et al., 2008). TRZ tedavisine başlangıçta yanıt veren hastaların çoğunluğunun, tedavinin başlamasından sonraki 1 yıl içinde hastalıklarında ilerleme yaşadığı bildirilmiştir. Hastalar TRZ'ye karşı direnç geliştirmeye başlamıştır (Pohlmann et al., 2009). Radyoişaretli monoklonal antikörlerin tümör hücrelerine etki etmesi için hücrelerin hedef antijeni ekprese etmesi gereklidir; ancak bu antijeni yüksek miktarda ekspresyonu gerekli değildir. RİT'de partikül bozunması çok yönlü olmaktadır. TRZ ile radyoişaretli radyofarmasötikler, HER2 ekspresyonundan bağımsız olarak bitişik hücrelerde birikim göstererek de tümör hücrelerine etki etmektedirler. Kullanılan radyonüklidin yaydığı ışınların penetrasyon özelliklerine göre de komşu hücrelerin de ısınlanmasıyla tutulum göstermese dahi radyofarmasötiğin etkisini göstermektedir. Bu özelliği sayesinde tümör hücreleri içerisindeki antijen ekspresyonunun heterojenliğinin üstesinden de gelinmektedir ve ayrıca hücrelere erişebilirliği de kolaylaştırmaktadır (Azzam et al., 2005; Prise et al., 2003). HER2 ekspresyonu sadece meme kanserine spesifik değildir aynı zamanda yumurtalık (%25-30), pankreas (%35-45) ve kolorektal (% 90) gibi kanser türlerinde de ekprese edilmektedir. Teorik olarak +1 alan hastalar, α ve β partikül yayan radyonüklitlerle radyoişaretlenmiş TRZ ile tedavi potansiyeli olduğu bildirilmiştir (Ballangrud et al., 2004; Crow et al., 2005; Lub-De Hooge et al., 2004). γ ve pozitron (β^+) yayan radyonüklitlerle radyoişaretlenen TRZ, HER2 hedefini invazif olmayan bir yöntemle gösterilmesini ve nicelleştirilmesini sağlamaktadır. Radyoişaretli TRZ radyofarmasötiği nükleer tıpta; hastaların tedavi yanıtlarını izlemek, direncin ortaya çıkışını ve dolayısıyla tedavi başarısızlığını belirlemek, radyoimmunoterapi için dozimetrik hesaplamalar ve tahminler yapmak, distal veya metastatik hastalığı saptamak, bir hastanın hastalığını yeniden evrelemek, hedefe yönelik tedavi için hastaların belirlenmesini sağlamak ve son olarak risk altındaki hastaların kardiyak toksisitesini belirlemek amacıyla kullanılabilir (de Korte et al., 2007; Palm et al., 2003; Y. Tang et al., 2005).

1.3. Şelat Ajanları

Metalik radyonüklidlerin kullanımı, genişleyen bir araştırma alanı olmaya devam etmektedir. Küçük moleküller, peptitler, proteinler ve nanopartiküllerin metalik radyonüklitler ile radyoişaretlenmesi, hem tanısal hem de terapötik uygulamalar için aktif araştırma alanlarıdır (Brechtel, 2008). Tüm bu kompleks moleküller için amaçlanan uygulama alanlarında metalik radyonüklidin yeterli sekestrasyonu için uygun şelasyon kimyası ihtiyacı olan ortak bir değişken gerektirmektedir. Metalik radyonüklidlerin kullanımı, bu radyonüklitlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini biyolojik yapılar için uygun koşullara getirmek için şelat ajanlarının geliştirilmesini gerektirmiştir (Milenic et al., 2004). Bu şelatlama ajanları, bir parçası metal bağlayıcı bir fonksiyonuna sahip oldukları ve ikinci parçası da kimyasal olarak reaktif bir fonksiyonel gruba sahip oldukları için “iki fonksiyonlu kenetleme ajanları” (bifonksiyonel şelat ajanı) olarak adlandırılmıştır (Norenberg et al., 2006). Bu tür uygulamalar için bifonksiyonel şelatlama maddelerinin tasarımında karşılanması gereken bir dizi temel kriter bulunmaktadır. Bu kriterlerin en önemlisi, metal kompleksinin kararlılığıdır. Bu kompleks yapılarda radyonüklit kaybı veya ayrışmasının sonuçları, terapötikler durumunda toksisite ve teşhis için zayıf görüntü kalitesi ile ilişkili olmaktadır (Chinn et al., 2003; L. Li et al., 2004). Yük, radyonüklidin iyonik yarıçapı ile şelatlama maddesinin kavite boyutunun eşleşmesi, uygun şelat yapısı veya donör bağlama gruplarının sayısı ve uygun kimyasal karakterde donör bağlama gruplarının sağlanması gibi temel koordinasyon kimyası kriterleri bifonksiyonel şelat ajanlarının tasarımında kilit unsurlardır. Metal kompleksinin oluşma hızı ve ayrışma hızı gibi iki ek özelliğin de dikkate alınması önemlidir. Bu kriterlerin hepsi birbiriyle ilişkilidir (L. Li et al., 2004). Şelat ajanlarındaki kavite boyutu, radyonüklidin iyonik yarıçapı ile uyumlu olmalıdır, böylece gerekli tüm donör grupları, iyonu yeterince kapsülleyecek ve böylece yüksek stabilite ve sınırlayıcı ayrışma sağlayacak şekilde metal iyonuna optimal bağlanma için uygun şekilde hizalanabilir. Uygun radyometaller, özellikleri ve koordinasyon kimyası bakımından çeşitlidir, bu nedenle, tüm radyonüklidler için uygun iki işlevli şelatlama maddesi yoktur. Bifonksiyonel şelat ajanları oluşturulduktan sonra, biyolojik uygulamalar için uygunluğunun doğrulanması gerekmektedir. Yeni bir bifonksiyonel şelat ajanının kabul edilebilirliğini doğrulamak için termodinamik stabilite sabitleri, transşelasyon çalışmaları, asit katalizli ayrışma sabitleri, ve serum

stabilite çalışmaları gibi özelliklerin incelenmesi gerekmektedir. Bu özelliklerin tümü, potansiyel in vivo uygunluğu belirlemek için araştırmacılara bilgiler sağlamaktadır. Serum stabilite çalışmaları, in vivo uygulamalar için uygun olmayan bifonksiyonel şelat ajanlarını belirlemek için kullanılan bir araç ve model oluşturmaktadır (Park & Kim, 2013). Ancak bu özelliklerin veya modellerin hiçbirisi metal kompleksinin gerçek in vivo stabilitesini öngörmemektedir. Metal kompleksinin gerçek in vivo stabilitesini değerlendirmek için uygun bir hayvan modelinde değerlendirme gereklidir. Uygun bir hayvan modelinin tanımı değişkendir, ancak nihai amaçlanan biyolojik uygulamayı gerçekten çok yakından yansıtmalıdır. Tüm bu bilgilere rağmen, bifonksiyonel şelat ajanlarının gelişimi, tamamı poliaminokarboksilat ligandları olarak koordinasyon sayısı 6'ya kadar değişen, metal iyonunu kapsüllemek için asiklik ve makrosiklik seçenekler sunan ve inorganik kimyası iyi bir şekilde tanımlanmış şelatlama ajanlarından, EDTA, DTPA ve DOTA'dan türevler yapılmasına dayanmaktadır (Brechtel, 2008). Doktora tezi kapsamında bu üç şelat ajanı dışında şelatlama ajanı olarak merkapt asetil triglisin (MAG3) molekülü de kullanılmıştır. MAG3 şelat ajanı bir N3S çekirdeğine sahip küçük bir peptittir ve in vivo koşullara uyum sağlayan bir bifonksiyonel şelat ajanıdır. MAG3 şelatj ajanının en bilinen kullanım alanı FDA tarafından onaylanmış, ^{99m}Tc-MAG3 (Technescan), radyofarmasötikidir. Bu radyofarmasötik böbrek fonksiyonunun görüntülenmesi ve diğer araştırma amaçları için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (C. Tang et al., 2009). Ancak Lu-177 radyonüklidiyle MAG3 şelat ajanının birlikte kullanıldığı bir çalışma literatürlerde bulunamamıştır.

Gereç ve Yöntem

2.1. Gereç

2.1.1. Kullanılan Sarf ve Kimyasal Maddeler

TRZ	Sigma MSQC22
EDTA	Sigma E9884
DOTA	TCI T1875
MAG3	Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş.
DTPA	Sigma 791268P
Serum fizyolojik	İ.E. Ulagay İlaç Sanayi, Türkiye
Na ₂ CO ₃	Sigma S0560
HEPES	Merk 7167
NaOH	Merk 567530
MCF-7	ATCC HTB-22
CRL-10762	ATCC Kel Fib
L-Glutamin	Biological industries Cat.No: 03-020-1B
Penisilin	Biologic industries Cat.No: 03-031-1B
Streptomisin	Biologic industries Cat.No: 03-031-1B
Fetal bovin serum	Biological industries Cat.No: 04-127-1A
DMEM	Biological industries Cat.No: 01-104-1A
Filtreli kapaklı flask	Corning Cat.No: 430639
Tripan mavisi boyası	Biological industries Cat.No: 03-102-1B
WST-1	Roche, Cat.No: 11644807001
Pepton kazein	Merk 107213
D (+) glukoz	Merk 108337
L-sistein	Merk 102838

Sodyum Klorür	Merk 106404
Sodyum tiyoglikolat	Merk 106691
LAL kiti	Capecod
Lu-177	Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş.
Hidroklorik asit	Sigma 320331
ITLC-SG plak	Agilent
Whatman no:3	Agilent
Aseton	179124
Amonyum asetat	Merck 73594
Metanol	Merck 322415
Trifloroasetik asit	Sigma 302031
Distile su	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi FABAL Türkiye
Asetonitril	Sigma 34851
Ultrasantrifuj Filtrasyon	Amicon UFC9030

2.1.2. Kullanılan Gereçler

FTIR	Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR
UV Spektrum Cihazı	Beckman Coulter DU® 730 Life Science UV/Vis Spectrofotometre
Manyetik Karıştırıcı	Scilogex MS-H-S10
Ultra Santrifuj	Beckman Coulter Optima MAX-TL
Malvern Zetasizer	Malvern Nano ZS 90
pH metre	Mettler Toledo
Osmometre	Mikro osmometre 5400 model
Ultrasonik banyo	Velp Scientifica
Stabilite Kabini	Nüve
Liyofilizatör	Labconco
Inverted mikroskop	Olympus-CKX41
Işık Mikroskobu	Olympus-CH30
Laminar akım kabin	ESCO Class II, Biological Safety Cabinets
Doz kalibratörü	Biodex Atomlab
RP-HPLC	Schimidzu
Mini SPECT/CT	nanoScan SPECT/CT 4R (Mediso, Macaristan)

2.2. Yöntemler

2.2.1. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışmaları

Moleküler yerleştirme yapılmasının amacı TRZ-Şelat arasındaki bağlanma afinitesini görmektir. Moleküler yerleştirme sayesinde ilaç keşfinde ve uygulamalarında kolaylık sağlanmıştır. Moleküler yerleştirme, bir molekülün herhangi başka bir molekülle kompleks oluştururken olası bağlanma noktasını bilgisayar ortamında çeşitli programlar yardımıyla tahmin etmek için kullanılan bir yöntemdir.

Çalışmada uygun şelat ajanları PubChem web adresinden SMILES kodu alınarak Chimera üzerinde oluşturulmuştur. TRZ, Protein Bilgi Bankası (PDB) üzerinden 6N9T (Fc) ve 4HJG (Fab) olarak alınmıştır ve bu noktalara moleküler yerleştirme işlemi uygulanmıştır. PubChem web sitesinden alınan şelat ajanı ve PDB'den alınan 4HJG ve 6N9T etkin maddesine Dock Prep uygulanmıştır (Karabacak Atay et al., 2019; Morris & Lim-Wilby, 2008).

2.2.2. Etkin Maddenin Özelliklerinin İncelenmesi

Etkin madde olarak TRZ kullanılmıştır. Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla Fourier Transform Infra-Red (FTIR), ve Ultra Viyole (UV) spektrum taraması analizleri yapılmıştır. Alınan sonuçlar incelenerek literatüre uygun olup olmadığına bakılmıştır.

2.2.2.1. Fourier Transform Infra-Red Spektrum Analizi

TRZ'nin 600-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında FTIR spektrumu çekilmiştir.

2.2.2.2. UV Spektrum Analizi

UV spektrum analizi için TRZ'nin distile su içerisinde 1 mg/mL olacak şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. 190-400 nm dalga boyu arasında analiz gerçekleştirilmiştir.

2.2.2.3. UV Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

TRZ'nin distile su içerisinde 50 $\mu\text{g/mL}$ derişimde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden hareketle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan seyreltik çözeltilerin UV spektrumları Beckman Coulter DU® 730 Life Science UV/Vis Spektrofotometre cihazı ile 200-400 nm dalga boyu aralığında çekildi. Maksimum absorbansın elde edildiği dalga boyu (λ_{max}) tespit edildi. Bu stok çözeltiden serum fizyolojik ile uygun

seyreltmeler yapılarak, farklı derişimlerde bir seri çözelti (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 ug/mL) hazırlanmıştır ve her bir konsantrasyon için 6'şar adet olacak şekilde standart çözeltiler hazırlanarak λ max'da absorbansları okundu. Her bir konsantrasyon ve bu konsantrasyona karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek regresyon analizi yardımıyla kalibrasyon doğrusu ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere kalibrasyon eğrisi çizilmiş, doğru denklemi oluşturulmuştur.

2.2.2.4. TRZ'nin UV spektrumu ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Analizi yapılacak olan TRZ'nin miktar tayinine yönelik olarak, kullanılan yöntemin amaçlanan uygulama bakımından güvenilirliğini göstermek amacıyla analitik yöntemin validasyonu gerçekleştirilmiştir. Validasyon parametreleri olarak doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrarlanabilirlik) ve dayanıklılık (stabilite) belirlenmiştir.

Doğrusallık

Kullanılan analitik yöntemin doğrusallığını göstermek amacıyla, kalibrasyon doğrusu **Yöntem 2.2.2.3**'de açıklandığı gibi tayin edilmiştir. Hazırlanan stok çözeltilerden serum fizyolojik ile seyreltmeler yapılarak (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 ug/mL) derişimlerinde çözeltiler hazırlanmış ve hazırlanan çözeltilerin UV/Vis Spektrofotometre cihazında absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerleri yardımıyla doğru denklemi ve r^2 değeri hesaplanmıştır.

Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, bilinen derişimlerde (2 ve 12,5 μ g/mL) hazırlanan TRZ miktarından hareketle, UV analizi sonucunda bulunan değerler ile gerçek değerler karşılaştırılıp doğruluk değeri % olarak belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirlik

TRZ'nin mobil faz ortamındaki 6 μ g/mL'lik derişimlerdeki çözeltisi hazırlanarak arka arkaya 6 defa ölçümler yapıp, elde edilen alan değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır.

Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı

Farklı iki derişimde (2,5 ve 10 µg/mL’lik derişimlerdeki) TRZ içeren standart çözeltileri hazırlanmıştır ve oda sıcaklığında UV’de analiz edilip, başlangıç anında ve 12. saatte enjeksiyonlar tekrarlanmıştır.

2.2.3. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Şelat ajanı olarak EDTA, DOTA, MAG3 ve DTPA kullanılmıştır. Etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerinin incelenmesi amacıyla FTIR spektrum taraması analizleri yapılmıştır. Alınan sonuçlar incelenerek literatüre uygun olup olmadığına bakılmıştır.

2.2.3.1. FTIR spektrumu

Şelat yapıcı ajanların 600-4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında FTIR spektrumları çekilmiştir.

2.2.4. Çözelti Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması

TRZ-şelat ajan komplekslerinin hazırlanması aşamasında, EDTA, DOTA, DTPA ve MAG3 gibi farklı şelat ajanlar kullanarak formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu amaçla birbirinden farklı terkiplerde formülasyonlar hazırlanmıştır.

2.2.4.1. Çözelti Halinde TRZ:EDTA Kompleksinin Hazırlanması

1:1, 1:10, 1:100 nmol oranında olacak şekilde TRZ: EDTA kompleksleri hazırlanmıştır. **Tablo 1**’de belirtilen miktarlardaki TRZ’nin serum fizyolojik (SF) içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır. **Tablo 1**’de belirtilen EDTA 0.2 M pH 9 sodyum karbonat çözeltisi (Na₂CO₃) içinde çözündürülmüştür. Her iki çözelti 250 rpm’de 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılıp, +4°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3800 rpm’de 15 dakika boyunca 9 siklus olacak şekilde 0.2 M HEPES tamponu kullanarak 30 kDa filtre ile ultrasantrifüj filtrasyona tabi tutulmuştur.

0.2 M pH 9 sodyum karbonat çözeltisi hazırlanışı: 212 mg Na₂CO₃ 10 mL distile suda çözündürüldü. pH’sı 0.1 M NaOH çözeltisi ile 9’a ayarlanmıştır.

Tablo 1. Farklı molar oranda TRZ: EDTA komplekslerinin içerikleri

Formülasyon numarası	Formulasyondaki TRZ: EDTA oranı (mol)	Etkin madde 1 mg/mL	Şelat ajanı 1 mg/mL	İnkübasyon koşulları
Ç1	1:1	1 mg TRZ	2 µg EDTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç2	1:10	1 mg TRZ	20 µg EDTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç3	1:100	1 mg TRZ	200 µg EDTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C

2.2.4.2. Çözelti Halinde TRZ:DOTA Kompleksinin Hazırlanması

1:1, 1:10, 1:100 nmol oranında olacak şekilde TRZ: DOTA kompleksleri hazırlanmıştır. **Tablo 2**'de belirtilen miktarlardaki TRZ'nin SF içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır. **Tablo 2**'de belirtilen DOTA 0.2 M Na₂CO₃ çözeltisi içinde çözündürülmüştür. Her iki çözelti 250 rpm'de 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılıp, +4°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3800 rpm'de 15 dakika boyunca 9 siklus olacak şekilde 0.2 M HEPES tamponu kullanarak 30 kDa filtre ultrasantrifüj filtrasyona tabi tutulmuştur.

Tablo 2. Farklı molar oranda TRZ: DOTA komplekslerinin içerikleri

Formülasyon numarası	Formulasyondaki TRZ: DOTA oranı (mol)	Etkin madde 1 mg/mL	Şelat ajanı 1 mg/mL	İnkübasyon koşulları
Ç4	1:1	1 mg TRZ	2,7 µg DOTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç5	1:10	1 mg TRZ	27 µg DOTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç6	1:100	1 mg TRZ	270 µg DOTA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C

2.2.4.3. Çözelti Halinde TRZ:DTPA Kompleksinin Hazırlanması

1:1, 1:10, 1:100 nmol oranında olacak şekilde TRZ: DTPA kompleksleri hazırlanmıştır.

Tablo 3’de belirtilen miktarlardaki TRZ’nin SF içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır.

Formülasyon numarası	Formulasyondaki TRZ: DTPA oranı (mol)	Etkin madde 1 mg/mL	Şelat ajanı 1 mg/mL	İnkübasyon koşulları
Ç7	1:1	1 mg TRZ	2,7 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç8	1:10	1 mg TRZ	27 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç8	1:10	1 mg TRZ	27 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç9	1:100	1 mg TRZ	270 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç9	1:100	1 mg TRZ	270 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
				2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C

Tablo 3’de belirtilen DTPA 0.2 M Na₂CO₃ çözeltisi içinde çözündürülmüştür. Her iki çözelti 250 rpm’de 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılıp, +4°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3800 rpm’de 15 dakika boyunca 9 siklus olacak şekilde 0.2 M HEPES tamponu kullanarak 30 kDa filtre ultrasantrifüj filtrasyona tabii tutulmuştur.

Tablo 3. Farklı molar oranda TRZ: DTPA komplekslerinin içerikleri

Formülasyon numarası	Formulasyondaki TRZ: DTPA oranı (mol)	Etkin madde 1 mg/mL	Şelat ajanı 1 mg/mL	İnkübasyon koşulları
Ç7	1:1	1 mg TRZ	2,7 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç8	1:10	1 mg TRZ	27 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç9	1:100	1 mg TRZ	270 µg DTPA	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C

2.2.4.4. Çözelti Halinde TRZ:MAG3 Kompleksinin Hazırlanması

1:1, 1:10, 1:100 nmol oranında olacak şekilde TRZ: MAG3 kompleksleri hazırlanmıştır. **Tablo 4'**de belirtilen miktarlardaki TRZ'nin SF içerisinde çözeltisi hazırlanmıştır. **Tablo 4'**de belirtilen MAG3 0.2 M Na₂CO₃ çözeltisi içinde çözündürülmüştür. Her iki çözelti 250 rpm'de 2 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılıp, +4°C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 3800 rpm'de 15 dakika boyunca 9 siklus olacak şekilde 0.2 M HEPES tamponu kullanarak 30 kDa filtre ultrasantrifüj filtrasyona tabii tutulmuştur.

Tablo 4. Farklı molar oranda TRZ: MAG3 komplekslerinin içerikleri

Formülasyon numarası	Formulasyondaki TRZ: MAG3 oranı (mol)	Etkin madde 1 mg/mL	Şelat ajanı 1 mg/mL	İnkübasyon koşulları
Ç10	1:1	1 mg TRZ	2,9 µg MAG3	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç11	1:10	1 mg TRZ	29 µg MAG3	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C
Ç12	1:100	1 mg TRZ	290 µg MAG3	2 saat oda sıcaklığında 250 rpm ve 24 saat 4 °C

2.2.5. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Hazırlanan formülasyonlar, agregat oluşumu, partikül büyüklüğü ve polidisperslik indisi (PDI) açısından Malvern Zetasizer (Malvern Nano ZS 90) ile 3-1000 nm partikül boyut aralığında, oda sıcaklığında, 173°'lik açı ile değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler 3 paralel çalışmanın sonucudur.

Formülasyonlar, 25°C'de, 78.5 dielektrik sabitinde, 5 mS/cm iletkenlikte, DTS 1060C zeta küveti kullanılarak, 40 V/cm olacak şekilde bir alan gücünde Malvern Zetasizer (Malvern Nano ZS 90) ile değerlendirilmiştir. Tüm ölçümler 3 paralel çalışmanın sonucudur.

2.2.5.2. pH Ölçümleri

Yöntem 2.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan formülasyonların pH'sı pH metre (Mettler Toledo) yardımı ile ölçülmüştür.

2.2.5.3. İzotoni Testi

İzotoni testi osmometre kullanılarak yapılmıştır. **Yöntem 2.2.4**'de anlatıldığı gibi hazırlanan örneklerin osmotik basıncı, kalibrasyon çözeltisi ile kalibre edilen cihazda (Mikro osmometre 5400 model) analiz edilmiştir.

2.2.5.4. TRZ Miktar Tayini

Yöntem 2.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan TRZ: şelat ajanı kompleks formülasyonları 0.2 M Na₂CO₃ çözeltisi içerisinde dağıtıldıktan sonra 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilerek formülasyonların içindeki TRZ'nin açığa çıkması sağlanmıştır.

Alınan örneklerdeki TRZ miktarı seyreltmeler yapıldıktan sonra UV spektrofotometrik yöntemi ile analiz edilmiştir.

% TRZ içeriği **Denklem 1** kullanılarak hesaplanmıştır.

Denklem 1: % Miktar = $(M_{TRZ} / M_{madde}) \times 100$ (Damen et al., 2008)

M_{TRZ} : Deneyel olarak elde edilen TRZ miktarı

M_{madde} : Formülasyondaki teorik madde miktarı

2.2.6. Stabilite

Yöntem 2.2.4'de anlatıldığı gibi hazırlanan formülasyonların stabilitesini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar stabilite rehberi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. 5 ± 3 °C (buzdolabında) ve 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nemde ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nemde yapılmıştır. Stabilite çalışmasında numuneler 6 ay süreyle t=0 yani başlangıç anında, 3. ve 6. aylar olmak fiziksel görünüşü, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, PDI, pH ve TRZ miktarı açısından kontrol edilmiştir.

2.2.7. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması

TRZ-şelat ajan komplekslerinin liyofilize kit halinde hazırlanması aşamasında, EDTA, DOTA, DTPA ve MAG3 gibi farklı şelat ajanlar kullanarak formülasyonlar geliştirilmiştir. Bu amaçla birbirinden farklı terkiplerde formülasyonlar hazırlanmıştır. Liyofilize kit halinde TRZ-Şelat ajanı kompleksleri hazırlamak için öncelikle **Başlık**

2.2.4’de belirtildiği gibi çözelti halinde formülasyonlar hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonlar liyofilizasyon için flakonlara konulmuştur. Formülasyonların içerikleri **Tablo 5**’de gösterilmiştir. Flakonların ağzı herhangi bir sıçrama, madde kaybı, bulaşma riskini önlemek amacı ile parafilm ile kapatılmış ve liyofilizasyon işleminin gerçekleşebilmesi için film tabakası üzerine iğne yardımı ile delikler açılmıştır. Formülasyonlar 24 saat dondurulmuştur. Daha sonra 48 saat, -45°C’de, 0,07 mbar basınç altında Christ Alpha 1-2 LD Freeze Dryer cihazı ile liyofilize edilmiştir.

2.2.7.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi Hesaplanması

Formülasyonlar **Başlık 2.2.7**’de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Liyofilizasyon sonrası terkibe giren toplam madde miktarı ile elde edilen liyofilize toz miktarı aşağıdaki eşitlik yardımıyla kıyaslanmıştır.

$$\%HV = 100 - ([(MT - ML) / MT] \times 100)$$

HV: Hazırlama verimi

MT: Terkibe giren katı madde miktarı

ML: Elde edilen liyofilize toz miktarı

Tablo 5. Liyofilize kit halindeki farklı molar konsantrasyonlardaki TRZ: Şelat ajanı komplekslerinin içerikleri

Formülasyon numarası	TRZ: Şelat ajanı oranı (mol)	Etkin madde (1 mg/mL)	Şelat ajanı (1 mg/mL)
L1	1:1	1 mg TRZ	2 µg EDTA
L 2	1:10	1 mg TRZ	20 µg EDTA
L 3	1:100	1 mg TRZ	200 µg EDTA
L4	1:1	1 mg TRZ	2,7 µg DOTA
L5	1:10	1 mg TRZ	27 µg DOTA
L6	1:100	1 mg TRZ	270 µg DOTA
L7	1:1	1 mg TRZ	2,7 µg DTPA
L8	1:10	1 mg TRZ	27 µg DTPA
L9	1:100	1 mg TRZ	270 µg DTPA
L10	1:1	1 mg TRZ	2,9 µg MAG3
L11	1:10	1 mg TRZ	29 µg MAG3
L12	1:100	1 mg TRZ	290 µg MAG3

2.2.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

2.2.8.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Hazırlanan formülasyonlar, agregat oluşumu, partikül büyüklüğü ve PDI açısından Malvern Zetasizer (Malvern Nano ZS 90) ile 3-1000 nm partikül boyut aralığında, oda sıcaklığında, 173°'lik açı ile değerlendirilmiştir. Örnekler 1:400 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Tüm ölçümler 3 paralel çalışmanın sonucudur.

Formülasyonlar, 25°C'de, 78.5 dielektrik sabitinde, 5 mS/cm iletkenlikte, DTS 1060C zeta küveti kullanılarak, 40 V/cm olacak şekilde bir alan gücünde Malvern Zetasizer

(Malvern Nano ZS 90) ile değerlendirilmiştir. Örnekler 1:400 oranında distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Tüm ölçümler 3 paralel çalışmanın sonucudur.

2.2.8.2. Fourier Transform Infra-Red Spektrumu

TRZ: şelat ajanı komplekslerini içeren liyofilize kitlerin FTIR spektrumları 600-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında çekilerek, spektrumlar karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

2.2.8.3. Nem Tayini Testi

Hazırlanan liyofilize kitlerdeki nem miktarı Termo Gravimetrik Analiz (TGA) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Cihazın haznesinin darası alındı, kitten alınan yaklaşık 1,5-2 mg örnek hazneye yerleştirildikten sonra aşağıda detayları verilen program ile çalışma gerçekleştirilmiştir:

Başlangıç Sıcaklığı: 30 °C

Bitiş Sıcaklığı: 115 °C

Sıcaklık Artışı: 10 °C/dak

2.2.8.4. pH Ölçümleri

Kit halindeki formülasyonlardan 1-1.25 mg örnek tartılıp 0,5 mL SF içinde çözündürülmüştür. Çözünmüş haldeki formülasyonların pH'sı pH metre yardımı ile ölçülmüştür.

2.2.8.5. İzotoni Testi

İzotoni testi osmometre kullanılarak yapılmıştır. pH ölçümü için hazırlanan örneklerin osmotik basıncı, kalibrasyon çözeltisi ile kalibre edilen cihazda analiz edilmiştir.

2.2.8.6. TRZ Miktar Tayini

Liyofilize kit halündeki 1-1,5 mg TRZ: şelat ajanı kompleks formülasyonları 1 mL 0.2 M Na_2CO_3 çözeltisi içerisinde 30 dakika boyunca ultrasonik banyoda bekletilerek formülasyonların içindeki TRZ'nin açığa çıkması sağlanmıştır.

Alınan örneklerdeki TRZ miktarı seyreltmeler yapıldıktan sonra UV spektrofotometrik yöntemi ile analiz edilmiştir.

% TRZ içeriği aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\% \text{ Miktar} = (M_{\text{TRZ}} / M_{\text{madde}}) \times 100 \quad (\text{Damen et al., 2008})$$

M_{TRZ} : Deneysel olarak elde edilen TRZ miktarı

M_{madde} : Formülasyondaki teorik madde miktarı

2.2.8.7. Çözünme zamanı tayini

Kit halindeki formülasyonlardan 1 mg örnek tartılıp 0,5 mL SF içinde çözündürülmüştür. Çözünme boyunca geçen zaman kronometre ile belirlenmiştir.

2.2.8.8. Stabilite

Geliştirilen formülasyonların stabilitesini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar stabilite rehberi doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. $5 \pm 3^\circ\text{C}$ (buzdolabında) ve $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60± 5 bağıl nemde ve $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75± 5 bağıl nemde yapılmıştır. Stabilite çalışmasında numuneler 6 ay süreyle $t=0$ yani başlangıç anında, 3. ve 6. aylar olmak fiziksel görünüşü, partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, pH ve TRZ miktarı açısından kontrol edilmiştir.

2.2.9. Hücre Kültürü çalışmaları

Tez kapsamında meme kanseri hücresi olarak kullanılan MCF-7 hücre hattı ve kontrol hücresi olarak kullanılan sağlıklı meme dokusundan oluşan CRL-10762 hücre hattı Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonundan (ATCC) temin edilmiştir.

-86°C 'de ya da sıvı azot içerisinde muhafaza edilen hücrelerin deneyde kullanılabilir hale getirilmesi için hücrelere çözme işlemi uygulanmıştır. Çözülecek olan hücreleri içeren kriyotüpler buz üzerine alınmış, 15 ml'lik santrifüj tüplerine taze besiyeri eklenmiştir. Cam pipet aracılığıyla besiyeri yavaş yavaş kriyotüplere eklenerek, donmuş hücrelerin yavaş olarak çözülmesi sağlanmıştır. Çözülen hücreler yine cam pipet aracılığıyla içinde taze besiyeri bulunan 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti tekrar süspanse edilerek üzerine taze besiyeri eklenmiş ve aynı koşullarda bir santrifüj işlemi daha gerçekleştirilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak pellet tekrar süspanse edilmiş ve üzerine taze besiyeri eklenerek flasklara ekim işlemi uygulanmıştır.

Hücrelerin kültür ortamında *in vitro* olarak yaşatılması ve çoğaltılması için gereken maddeleri içeren uygun besiyerleri ticari olarak temin edilmiştir. MCF-7 ve CRL-10762 hücre hatları için 2 mM L-Glutamin, %1 penisilin-streptomisin içeren, %10 fetal bovin serum (FBS) ile desteklenmiş olan L-Glutamin içeren DMEM besiyeri kullanılmıştır. Süspanse yapıdaki hücreler dikey konumdaki 25 cm²'lik filtreli kapaklı flasklar içinde kültüre edilmiştir. Yapılacak çalışmaların gerektirdiği doğrultuda uygun sayıda çoğalana kadar hücreler %95 nem ve %5 CO₂ içeren etüvde 37°C sabit sıcaklıkta inkübe edilmiştir.

Hücrelerin canlılık ve proliferasyonlarının düzenli olarak takibi ve kontrolü için inverted ve ışık mikroskopları kullanılmıştır. Hücrelerin ortam değişimi, pasaj, dondurma ve çözme işlemleri laminar akım kabini içinde gerçekleştirilerek çalışmaların kontaminasyondan uzak, steril olması sağlanmıştır.

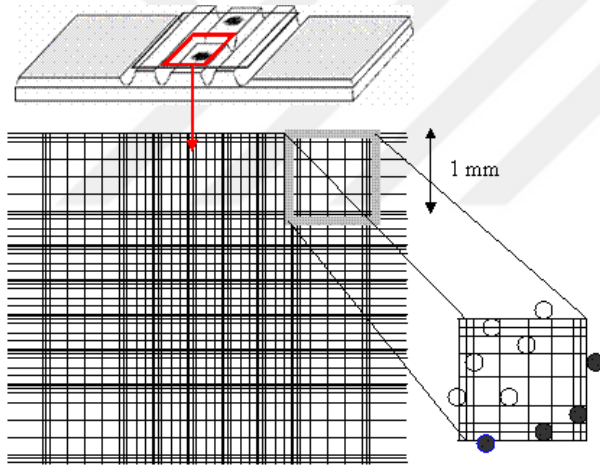
Hücreler mililitredeki hücre sayısı 10⁵- 10⁶ aralığında sabit tutulacak şekilde çoğalma hızına bağlı olarak pasajlanmıştır. Ayrıca iki günde bir düzenli olarak ortam değişimleri gerçekleştirilmiştir.

Pasajlama ya da ortam değiştirme işlemi uygulanacak olan hücreler 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjde santrifüjlenmiştir. Santrifüj işleminin ardından süpernatant uzaklaştırılmış, hücre pelleti tekrar süspanse edilerek üzerine taze besiyeri eklenmiştir. Hücre sayısına bağlı olarak besiyeri eklenen hücreler uygun sayıda flaska ekilmiştir.

Kültüre edilen hücrelerinin canlılık yüzdesinin ve sayısının kontrol edilmesi Tripan mavisi boyası testi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Testin temel prensibi ışık mikroskobu ile bakıldığında ölü hücrelerin boyayı içlerine alarak mavi renkte, boyayı almayan canlı hücrelerin ise parlak şeffaf renkte görülmesidir. Kontrol edilecek olan hücrelerden 50 µl alınarak 50 µl tripan mavisi boyası ile karıştırılmış uygun miktarda karışım Neubauer lamına aktarılmıştır. Işık mikroskobu altında lamın 4x4'lük karelerden oluşan 4 adet alanında bulunan hücreler sayılarak ortalamaları alınmış, canlı hücre sayısı toplam hücre sayısına oranlanarak hücrelerin canlılık yüzdesi hesaplanmıştır. Canlı hücre sayısı dilüsyon faktörü ile 2x10⁴ ile çarpılarak mililitredeki canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

Canlı hücre sayısı hesaplandıktan sonra hücre ekimine geçilmiştir. Laminar hava akımlı kabin altında açılan erlenden hücre kültürü süspansiyonu erlen tabanına değmeden dikkatlice tek kullanımlık pipet yardımıyla uzaklaştırılmıştır. Tripsin-

EDTA çözeltisi ilave edilmiştir. Erlen inkübatörde 3-4 dakika bekletilerek flask yüzeyine tutunmuş haldeki hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlanmıştır. Her hücre kültür kabı için 10 mL hücre kültürü çalışma besiyeri ilave edilmiştir. Sonra bu hücre süspansiyonunun hepsi alınıp santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 3000 rpm’de 3 dakika santrifüjlenip, çalışma kabini altında üstteki toplanan sıvı atılıp, 10 mL besiyeri ortamı ile tekrar süspande edilmiştir. Elde edilen hücre süspansiyonundan küçük cam pipetler ile hücreler alınmış ve Neubauer lamı ile hücre sayımı yapılmıştır. Lam üzerine lamel yerleştirilmiş (**Şekil 1**) ve kenarlarından yaklaşık 5–10 µL hücre süspansiyonu kapiller etkisiyle küçük pipetler ile yardımıyla doldurulmuştur. Işık mikroskobu altında, hücre sayıcı lamı oluşturan dört karenin kenar çizgileri hariç tutularak üzerlerindeki hücreler sayılmıştır. Hücre sayısı hesabı yapıldıktan sonra, hücre süspansiyonu 10^4 hücre/kuyucuk yoğunluğunda, hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere 96 kuyucuklu plakalara ekilmiştir.



Şekil 1. Hücre sayımında kullanılan hemasitometre (Vembadi et al., 2019)

2.2.9.1. Formülasyonların Kullanıma Hazır Hale Getirilmesi

Tez kapsamında geliştirilen çözelti (Ç1-Ç12 arasındaki tüm formülasyonlar) ve liyofilize kit halindeki (L1-L12 arasındaki tüm formülasyonlar) TRZ: şelat ajanı kompleks formülasyonlarının sitotoksikite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. 1 mg/mL TRZ içeren çözelti halindeki formülasyonlardan 10 µL alınıp MCF-7 ve CRL-10762 hücrelerine uygulanmıştır. Liyofilize kit halindeki formülasyonlardan 1 mg alınıp 1 mL besiyeri ortamında çözündürüldükten sonra, 10 µL alınıp hücrelere uygulanmıştır.

Çalışmalar herhangi bir dozun uygulanmadığı kontrol gruplarına paralel olarak yürütülmüştür.

2.2.10. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi

Geliştirilen formülasyonların hücreler üzerine etkisi MCF-7 ve CRL-10762 hücreleri ile değerlendirilmiştir. Çalışma WST-1 (Water soluble Tetrazolium salt-suda çözünebilir tetrazolyum tuzu) testi ile spektrofotometrik olarak tayin gerçekleştirilmiştir. WST-1 testi her hücre için üç gün ve üç tekrarlı olacak şekilde kurulmuştur. Çözelti ve liyofilize kit halindeki formülasyonlar hücreler üzerine eklenmiştir. Formülasyonun uygulanmadığı son yatay sıradaki hücre grubu kontrol olarak alınmıştır. Ardından hücreler 24 saat 37°C deki %5 CO₂ içeren inkübatörde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda hücreler üzerine her kuyucuğa 10 µl WST-1 solüsyonu eklenerek inkübatörde 1 saat daha inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda oluşması beklenen formazan ürünlerinin 420-600 nm dalga boyları arasında referans dalga boyu 570 nm olacak şekilde mikropate ELISA okuyucu kullanılarak absorbansları ölçülmüştür. Hücre canlılığı **Denklem 2** ile hesaplanmıştır:

Denklem 2. Hücre Canlılığı (%) = (T/R) x 100 (Abel & Baird, 2018)

T: Test edilen örneklerinden okunan absorbans değeri

R: Kontrol grubundan okunan absorbans değeri

2.2.11. Mikrobiyolojik Çalışmalar

Sitotoksosite ve stabilite çalışmaları sonucunda sonraki çalışmalar **1:10 oranında TRZ: şelat yapıcı ajan içeren çözelti ve kit halindeki formülasyonlar** (Ç2, Ç5, Ç8, Ç11, L2, L5, L8 ve L11) ile devam edilmiştir

2.2.11.1. Sterilite Testi

Ç2, Ç5, Ç8, Ç11, L2, L5, L8 ve L11 formülasyonlarının sterilite testi gerçekleştirilmiştir. Sterilite testi için sodyum tiyokolat besiyeri (**Tablo 6**) hazırlanmıştır. Her bir formülasyondan 1 mL alınıp, steril tüpler içindeki 1 mL sodyum tiyokolat besiyerine ilave edilmiştir. Tüpler 14 gün süreyle 37 ±1°C’de inkübe edilmiştir. Bu süre boyunca herhangi bir mikroorganizma olup olmadığı kontrol edilmiştir.

Tablo 6. Sterilite testi için hazırlanan besiyeri içeriği

İçindekiler	g/L
Pepton kazein	15
Maya özü	5
D (+) glukoz	5,5
L-sitin	0,5
Sodyum klorür	2,5
Sodyum tiyoglikolat	0,5

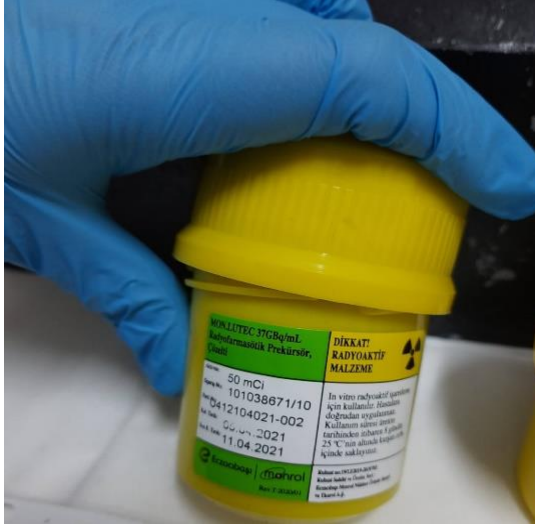
Tablo 6'da belirtilen terkip distile suda eritilmiştir. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Soğuduktan sonra pH'sı 7'ye ayarlanmış ve aseptik şartlarda steril tüplere dağıtılmıştır. Kullanılincaya kadar 4°C'de saklanmıştır.

2.2.11.2. Pirojenite Testi

Ç2, Ç5, Ç8, Ç11, L2, L5, L8 ve L11 formülasyonlarının pirojenite testi LAL testi kitleri kullanılarak yapılmıştır. Örnek ve kontrol tüpleri 37°C'de 1 saat inkübe edildikten sonra tüpler 180 derece çevrilerek jel oluşumuna göre değerlendirme yapılmıştır. Örnek tüpleri hazırlanan formülasyonları içerirken, kontrol tüpleri formülasyon içermemektedir.

2.2.12. Radyoişaretleme Çalışmaları

Çözelti ve liyofilize kit halindeki formülasyonları işaretleme için, Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş. temin edilen taşıyıcı içermeyen Lu-177 radyonüklidi kullanılmıştır (**Şekil 2**). Çalışmalarda kullanılan taşıyıcı içermeyen Lu-177 çözeltisinin gama spektrumu NaI (TI) sintilasyon detektörü içeren çok kanallı analizöre (MCA) sahip gama ışını spektroskopisi ile alınmıştır. Ayrıca radyoaktif yüksek tabakalı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) ile kromatografik değerlendirilmesi yapılmıştır.



Şekil 2. Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş. temin edilen Lu-177 radyonüklidi

Lu-177-şelat ajanı kompleksleri, Lu-177 ve Lu-177 ile radyoişaretli TRZ: şelat ajanları arasındaki kromatografik değişiklikleri RP-HPLC analiziyle değerlendirebilmek için hazırlanmıştır. Bunun için Lu-177-DOTA, Lu-177-DTPA, Lu-177-EDTA ve Lu-177-MAG3 hazırlanmıştır.

Lu-177-DOTA hazırlanışı: 1 mg DOTA, 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp flakonlara alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmış, RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları değerlendirilmiştir.

Lu-177-DTPA hazırlanışı: 1 mg DTPA, 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp flakonlara alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmış, RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları değerlendirilmiştir.

Lu-177-EDTA hazırlanışı: 1 mg EDTA, 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp flakonlara alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmış, RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları değerlendirilmiştir.

Lu-177-MAG3 hazırlanışı: 1 mg MAG3, 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp flakonlara alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Daha sonra oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmış, RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları değerlendirilmiştir.

2.2.12.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları

Çözelti halindeki Ç2, Ç5, Ç8, Ç11 formülasyonları ile radyoişaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların radyoişaretlenmesi sırasında uygulanan genel yöntem şu şekildedir:

- Formülasyonlar hazırlanmıştır.
- Farklı inkübasyon zamanlarında radyoişaretleme çalışmaları yapılmıştır (Guleria et al., 2021).
- Farklı pH değerlerinde çalışılmıştır (Carpanese et al., 2020; Guleria et al., 2021; Hermanto et al., 2016; Matthias et al., 2014).
- Farklı radyoaktivite miktarlarındaki Lu-177 ile çalışılmıştır.
- Radyoişaretleme verimi doz kalibratörü ve Radyoaktif-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (RP-RHPLC) ile tayin edilmiştir.

2.2.12.1.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

1mg/mL TRZ: şelat yapıcı ajan içeren formülasyonlar (Ç2, Ç5, Ç8, Ç11) hazırlanıp, her bir formülasyondan 0,5 mL ayrı flakona alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0,5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Hazırlanan radyofarmasötiklerin pH'sı turnusol kâğıdı ile değerlendirilmiş ve pH 7 bulunmuştur. Daha sonra bu formülasyonlar oda sıcaklığında 15, 30 ve 60 dakika beklemeye bırakılmış ve radyoişaretleme verimi doz kalibratörlerinde sayım yapılarak hesaplanmıştır. İnkübasyon zamanının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 7'**de gösterilmiştir.

Tablo 7. Farklı inkübasyon zamanlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	Ç2	15	7	5
	Ç2	30	7	5
	Ç2	60	7	5
2	Ç5	15	7	5
	Ç5	30	7	5
	Ç5	60	7	5
3	Ç8	15	7	5
	Ç8	30	7	5
	Ç8	60	7	5
4	Ç11	15	7	5
	Ç11	30	7	5
	Ç11	60	7	5

Yöntem 2.2.12.1.1'de anlatıldığı gibi farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen formülasyonların radyokimyasal saflıkları doz kalibratöründe radyoaktivite sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2.12.1.2. pH'ın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem 2.2.4.1-2.2.4.4 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen formülasyonlar kullanılarak pH değişiminin Lu-177 ile radyoişaretlenmiş çözelti halindeki TRZ: şelat yapıcı ajan komplekslerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. 4 grup oluşturulmuştur. Bu amaçla TRZ: şelat yapıcı ajan çözeltileri (Ç2, Ç5, Ç8, Ç11) hazırlanıp, her bir formülasyon ayrı flakona alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında uygun inkübasyon süresinde (60 dakika) bekleme bırakılan çözeltilerin radyoişaretleme verimi doz kalibratöründe sayım yapılarak ve RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir. Hazırlanan radyofarmasötiklerin pH değeri 7 bulunmuştur. pH 5 ve pH 9'da

çalışılmıştır. pH 5 için 1 M hidroklorür çözeltisi kullanılırken; pH 9 için 1 M sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 8**'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Farklı pH değerlerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	Ç2	60	7	5
	Ç2	60	5	5
	Ç2	60	9	5
2	Ç5	60	7	5
	Ç5	60	5	5
	Ç5	60	9	5
3	Ç8	60	7	5
	Ç8	60	5	5
	Ç8	60	9	5
4	Ç11	60	7	5
	Ç11	60	5	5
	Ç11	60	9	5

Hazırlanan formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örnekler doz kalibratöründe sayım yapılarak radyokimyasal saflıkları belirlenmiştir. Radyoaktivite sayımları yanı sıra kalite kontrolde alınan örneklerin 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve geliştirilen radyofarmasötiklerin kromatogramları da değerlendirilmiştir.

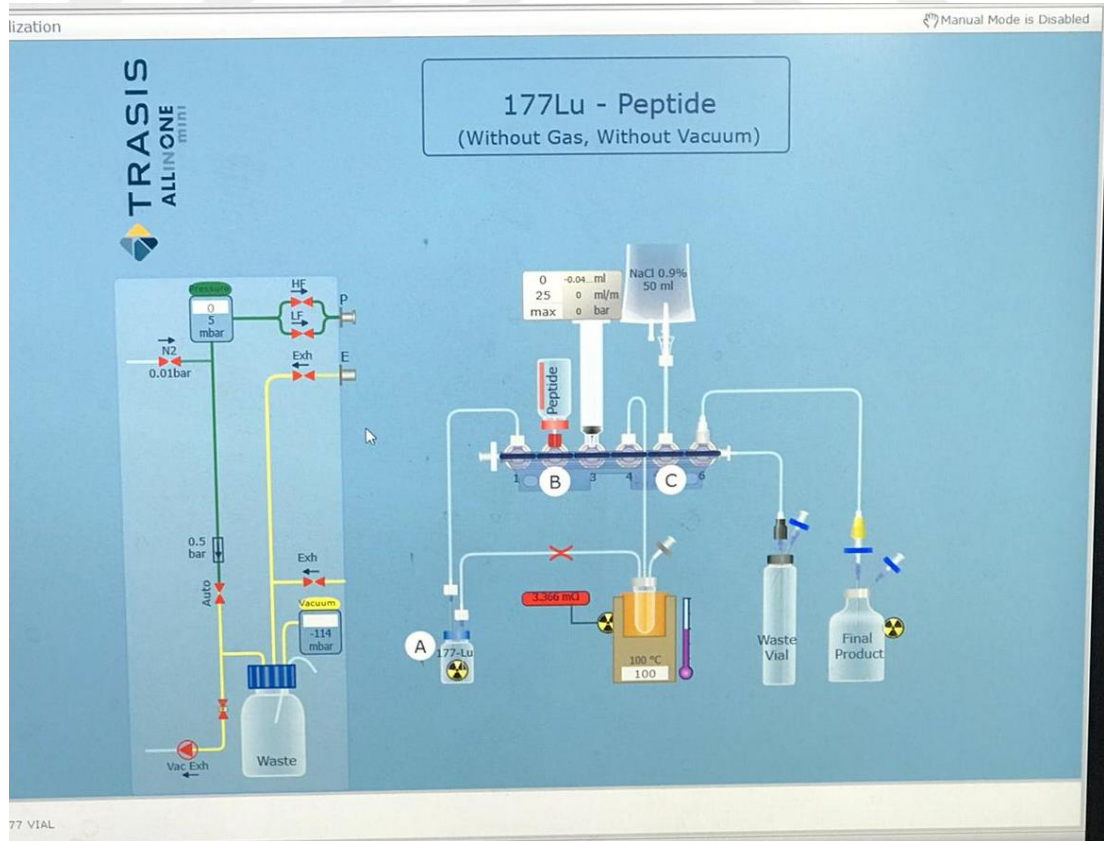
2.2.12.1.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem 2.2.4.1-2.2.4.4 arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen formülasyonlar kullanılarak radyoaktivite miktarının Lu-177 ile radyoişaretlenmiş çözelti halindeki TRZ: şelat yapıcı ajan komplekslerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1 mL Ç5 ve Ç11 formülasyonları ayrı flakona alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0,5 mL

Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılan çözeltilerin radyoışaretleme verimi 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örneklerin doz kalibratöründe sayım yapılarak; 0. ve 7. günlerde RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir. 50 mCi Lu-177 radyoışaretleme çalışmaları aynı koşullarda **Şekil 3** ve **Şekil 4**'de gösterilen otomatik sentez ünitesinde yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 9**'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Radyoaktivite miktarlarının radyoışaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	Ç5	60	7	5
	Ç5	60	7	50
2	Ç11	60	7	5
	Ç11	60	7	50



Şekil 3. Otomatik sentez ünitesinin bilgisayar ekranındaki şematik görüntüsü



Şekil 4. Otomatik sentez ünitesi

2.2.12.2. Stabilite Çalışmaları

Yapılan radyoişaretleme çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun inkübasyon süresi (60 dakika) ve pH değeri (pH 7) kullanılarak radyoişaretlenmiş formülasyonların *in vitro* stabilitesi araştırılmıştır.

Bu amaçla 3 ve 6 ay, 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C’de %75± 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş 1 mg/mL TRZ: şelat yapıcı ajan çözeltileri (Ç5 ve Ç11) alınıp flakonlara aktarılmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0,1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Formülasyonlar oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bekleme süresi sonunda radyoişaretlenmiş formülasyonlardan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayım yapılarak tayin edilmiştir.

2.2.12.3. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Yöntem 2.2.12.1’de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen radyoişaretlenmiş formülasyonlar hazırlandıktan sonra laminar hava akımlı (LAF) kabin içerisinde 0,5

ml örnek çözeltiler alınarak 1'er ml steril serum fizyolojik içeren steril şişelere konmuştur. Hazırlanan çözeltilerden alınan 0,5 ml lik örnekler Eczacıbaşı Monrol Kurumu tarafından "İndüktif olarak eşleştirilmiş optik emisyon kromatografisi (ICP-OES)" yapılarak, formülasyonlardaki bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe) ve kurşun (Pb) metallerinin analizi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar ppb (ng.ml^{-1}) olarak hesaplanmıştır.

2.2.12.4. Doz kalibratörü ile İşaretleme Veriminin Hesaplanması

Radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi farklı sabit fazlar (silikajel plak, whatman no:3, hızlı ince tabaka kromatografisi- silikajel-ITLC-SG plak) ve mobil fazlar (serum fizyolojik, aseton, 50:50 v/v amonyum asetat: metanol çözeltisi, 10 mM DTPA çözeltisi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Radyoişaretlenmiş formülasyonlar kılcal enjektör yardımıyla sabit faz olarak kullanılan plaklarının 1 cm yukarısına uygulanmış ve hazırlanan mobil fazların içerisine dikey olarak konmuştur. Mobil faz orjinden ön kısma (plakların üst kısmından 1 cm aşağısına) ulaşıncaya plaklar mobil fazdan çıkarılmış, uygulama bölgesi ve formülasyonun yürüdüğü üst kısım kesilmiştir (

Şekil 5 A). Doz kalibratörü yardımı ile radyoaktivite dağılımı belirlenmiştir. İşaretleli bileşikte bulunabilecek % safsızlıklar (serbest Lu-177, kolloidal Lu-177) ve radyoişaretleme verimi iki farklı sistem kullanılarak hesaplanmıştır (**Şekil 5 B**).

Sistem 1 (serbest Lu-177):

Mobil faz: 50:50 v/v amonyum asetat çözeltisi: metanol karışımı (pH:6)

Sabit Faz: ITLC-SG kağıtları (Thakral et al., 2014)

Serbest Lu-177 ve radyoişaretlenmiş formülasyonların RF değerlerini belirlemek için kromatografi kağıtları 1'er cm boyutunda kesildi ve doz kalibratöründe radyoaktivite miktarı ölçülmüştür.

Amonyum asetat çözeltisi hazırlanışı: 154 mg amonyum asetatтан tartılıp, distile suda çözündürülüp 20 ml'ye tamamlanmıştır.

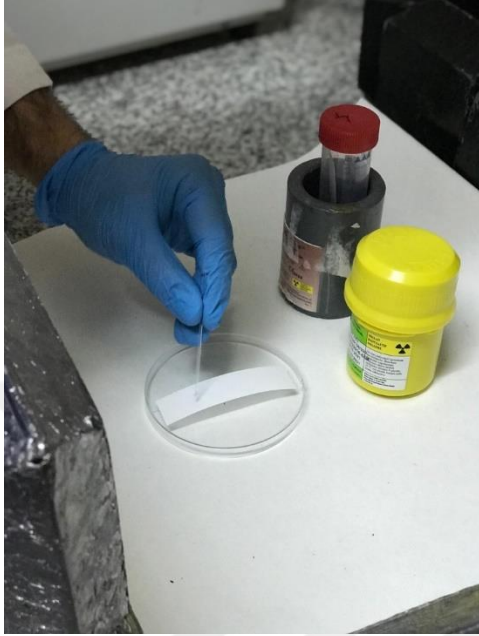
Sistem 2 (kolloidal Lu-177):

Mobil faz: 10 mM DTPA çözeltisi

Sabit Faz: ITLC-SG kağıtları (Thakral et al., 2014)

10 mM DTPA çözeltisi hazırlanışı: 43,1 mg DTPA tartılıp 10 mL amonyum asetat çözeltisinde çözündürülmüştür.

% Radyoişaretleme verimi= 100- %(A+B)



A



B

Şekil 5. Radyoişaretlenmiş formülasyonun tatbik edilme (A) ve doz kalibratöründe ölçme göreseli (B)

Radyoişaretlenmiş formülasyonların kalite kontrolleri manuel enjeksiyon, UV ve radyometrik dedeksiyon sağlayan “RP-RHPLC” sistemi ile gerçekleştirilmiştir (**Şekil 6**). Analizler sırasında kullanılan analitik kolon, mobil faz ve analizler için geliştirilen gradiyent yöntem hakkındaki bilgiler aşağıda verilmiştir.

Analitik Kolon: 150x3mm boyutlarında, C18 kolon (Inertsil ODS-3 GL Science)

Mobil Faz: %0,1 Trifloroasetik asit+bidistile su ve Asetonitril (ACN)

Gradiyent: 0-9 dak %18-60 %0,1 Trifloroasetik asit+bidistile su, 9-12 dak %60 ACN

Akış Hızı: 0,6 ml.dak-1

Kullanılan bu yöntemin validasyonu Eczacıbaşı Monrol Nükleer İlaç ve Sanayi tarafından gerçekleştirilmiştir.



Şekil 6. Radyoişaretlenmiş formülasyonların işaretleme verimlerini RP-HPLC cihazı ile ölçüm görseli

2.2.12.5. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları

Liyofilize Kit halindeki L2, L5, L8, L11 formülasyonları ile radyoişaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu formülasyonların radyoişaretlenmesi sırasında uygulanan genel yöntem şu şekildedir:

- Formülasyonlar hazırlanmıştır.
- Farklı inkübasyon zamanlarında radyoişaretleme çalışmaları yapılmıştır (Guleria et al., 2021; Mukherjee et al., 2015).
- Farklı pH değerlerinde çalışılmıştır (Guleria et al., 2021; Mukherjee et al., 2015).
- Farklı radyoaktivite miktarlarındaki Lu-177 ile çalışılmıştır.
- Radyoişaretleme verimi doz kalibratörü ve RP-RHPLC ile tayin edilmiştir.

2.2.12.5.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

1mg TRZ: şelat yapıcı ajan içeren formülasyonlar (L2, L5, L8, L11), 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp flakonlara alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır.

Hazırlanan radyofarmasötiklerin pH'sı turnusol kâğıdı ile değerlendirilmiş ve pH 7 bulunmuştur. Daha sonra bu formülasyonlar oda sıcaklığında 15, 30 ve 60 dakika beklemeye bırakılmış ve radyoişaretleme verimi doz kalibratöründe sayım yapılarak hesaplanmıştır. İnkübasyon zamanının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 10**'da gösterilmiştir. **Yöntem 2.2.12.5.1**'de anlatıldığı gibi farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen formülasyonların analizi doz kalibratörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 10. Farklı inkübasyon zamanlarının radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	L2	15	7	5
	L2	30	7	5
	L2	60	7	5
2	L5	15	7	5
	L5	30	7	5
	L5	60	7	5
3	L8	15	7	5
	L8	30	7	5
	L8	60	7	5
4	L11	15	7	5
	L11	30	7	5
	L11	60	7	5

2.2.12.5.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.-Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı. arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen formülasyonlar kullanılarak pH değişiminin Lu-177 ile radyoişaretlenmiş liyofilize kit halindeki TRZ: şelat yapıcı ajan komplekslerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. 4 grup oluşturulmuştur. Bu amaçla 1 mg TRZ: şelat yapıcı ajan kitler (L2, L5, L8, L11) hazırlanıp, 1 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp her

bir formülasyon ayrı flakona alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0,1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında uygun inkübasyon süresinde (60 dakika) beklemeye bırakılan çözeltilerin radyoişaretleme verimi doz kalibratöründe sayım yapılarak ve RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir. Hazırlanan radyofarmasötiklerin pH değeri 7 bulunmuştur. pH 5 ve pH 9’da radyoişaretleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. pH 5 için 1 M hidroklorür çözeltisi kullanılırken; pH 9 için 1 M sodyum hidroksit çözeltisi kullanılmıştır. Hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 11**’de gösterilmiştir.

Tablo 11. Farklı pH değerlerinin radyoişaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	L2	60	7	5
	L2	60	5	5
	L2	60	9	5
2	L5	60	7	5
	L5	60	5	5
	L5	60	9	5
3	L8	60	7	5
	L8	60	5	5
	L8	60	9	5
4	L11	60	7	5
	L11	60	5	5
	L11	60	9	5

Hazırlanan formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örnekler doz kalibratöründe sayım yapılarak radyoişaretleme verimleri yüzde olarak hesaplanmıştır. Radyoaktivite sayımları yanı sıra kalite kontrolde alınan örneklerin 0. ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve geliştirilen radyofarmasötiklerin kromatogramları da değerlendirilmiştir.

2.2.12.5.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.-Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı. arasında yapılan formülasyon çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen formülasyonlar kullanılarak radyoaktivite miktarının Lu-177-TRZ: şelat yapıcı ajan içeren liyofilize kitlerin radyoışaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 1 mg L5 ve L11 formülasyonları tartılıp, 0,5 ml 0,2 M HEPES içinde çözündürülüp ayrı flakona alınmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0,5 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılan çözeltilerin radyoışaretleme verimi 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örneklerin doz kalibratöründe sayım yapılarak; 0. ve 7. günlerde RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir. 50 mCi Lu-177 radyoışaretleme çalışmaları aynı koşullarda **Şekil 3** ve **Şekil 4**'de gösterilen otomatik sentez ünitesinde yapılmıştır. Hazırlanan formülasyonların içerikleri **Tablo 12**'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Radyoaktivite miktarlarının radyoışaretleme verimi üzerine etkisini incelemek için hazırlanan formülasyonlar (n=6).

Grup No	Formülasyon	İnkübasyon zamanı (dakika)	pH	Lu-177 (mCi)
1	L5	60	7	5
	L5	60	7	50
2	L11	60	7	5
	L11	60	7	50

2.2.12.6. Stabilite Çalışmaları

Yapılan radyoışaretleme çalışmalarından elde edilen sonuçlara dayanılarak belirlenen en uygun inkübasyon süresi (60 dakika) ve pH değeri (pH 7) kullanılarak radyoışaretleme formülasyonlarının *in vitro* stabilitesi araştırılmıştır.

Bu amaçla 3 ve 6 ay, 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş 1 mg/mL

TRZ: şelat yapıcı ajan çözeltileri (**L5** ve **L11**) alınıp flakonlara aktarılmıştır. Bu flakonlara 5 mCi aktiviteye sahip 0.1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Formülasyonlar oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bekleme süresi sonunda radyoişaretlemiş formülasyonlardan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayımlarla tayin edilmiştir.

2.2.12.7. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Yöntem 2.2.7’de anlatıldığı gibi çalışılarak elde edilen radyoişaretlenmiş formülasyonlar hazırlandıktan sonra LAF kabin içerisinde 0,5 ml örnek çözeltiler alınarak 1’er ml steril serum fizyolojik içeren steril şişelere kondu. Hazırlanan çözeltilerden alınan 0,5 ml lik örnekler Eczacıbaşı Monrol Kurumu tarafından “İndüktif olarak eşleştirilmiş optik emisyon kromatografisi (ICP-OES)” yapılarak, formülasyonlardaki bakır (Cu), çinko (Zn), demir (Fe) ve kurşun (Pb) metallerinin analizi gerçekleştirildi. Sonuçlar ppb (ng.ml^{-1}) olarak hesaplanmıştır.

2.2.12.8. Doz Kalibratörü ile İşaretleme Veriminin Hesaplanması

Radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi farklı sabit fazlar (silikajel plak, whatman no:3, hızlı ince tabaka kromatografisi- silikajel-ITLC-SG plak) ve mobil fazlar (serum fizyolojik, aseton, 50:50 v/v amonyum asetat: metanol çözeltisi, 10 mM DTPA çözeltisi) kullanılarak değerlendirilmiştir.

Radyoişaretlenmiş formülasyonlar kılcal enjektör yardımıyla sabit faz olarak kullanılan plakların 1 cm yukarısına uygulandı ve hazırlanan mobil fazların içerisine dikey olarak konmuştur. Mobil faz orjinden ön kısma (plakların üst kısmından 1 cm aşağısına) ulaşınca plaklar mobil fazdan çıkarılıp, uygulama bölgesi ve formülasyonun yürüdüğü üst kısım kesilmiştir. Doz kalibratörü yardımı ile radyoaktivite dağılımı belirlenmiştir. İşaretleme bileşiklerinde bulunabilecek % safsızlıklar (serbest Lu-177, koloidal Lu-177) ve radyoişaretleme verimi iki farklı sistem kullanılarak hesaplanmıştır.

Sistem 1 (Serbest Lu-177):

Mobil faz: 50:50 v/v amonyum asetat çözeltisi: metanol karışımı (pH:6)

Sabit Faz: ITLC-SG kağıtları

Amonyum asetat çözeltisi hazırlanışı: 154 mg amonyum asetat tartılıp, distile suda çözündürülüp 20 ml’ye tamamlanmıştır.

Sistem 2 (Kolloidal Lu-177):

Mobil faz: 10 mM DTPA çözeltisi

Sabit Faz: ITLC-SG kağıtları

10 mM DTPA çözeltisi hazırlanışı: 43,1 mg DTPA tartılıp 10 mL amonyum asetat çözeltisinde çözündürülmüştür.

% Radyoişaretleme verimi= $100 - \%(A+B)$

2.2.12.9. Radyoaktif-Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi ile İşaretleme

Veriminin Hesaplanması

Radyoişaretlenmiş formülasyonların kalite kontrolleri manuel enjeksiyon, UV ve radyometrik dedeksiyon (Shimadzu SCL-10A, Japonya) sağlayan “RP-RHPLC” sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizler sırasında kullanılan analitik kolon, mobil faz ve analizler için geliştirilen gradiyent yöntem hakkındaki bilgiler aşağıda verilmiştir.

Analitik Kolon: 150x3mm boyutlarında, C18 kolon (Inertsil ODS-3 GL Science)

Mobil Faz: %0,1 Trifloroasetik asit + bidistile su ve ACN

Gradiyent: 0-9 dak %18-60 %0,1 Trifloroasetik asit + bidistile su, 9-12 dak %60 ACN

Akış Hızı: 0,6 ml.dak-1

2.2.13. İn Vivo Çalışmalar

İn vivo çalışmalar, Semmelweis University Tıp Fakültesi Biyofizik ve Radyasyon Biyolojisi ve Radyofarmasi Bölümünün görüntüleme laboratuvarında 9 adet meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude fareler ile gerçekleştirilmiştir. Fareler, çalışma boyunca tesisin “small animal imaging” laboratuvarına ait deney hayvanları laboratuvarında 22–25°C’ de, %50–60 nem koşullarında bakılmıştır. Tüm deneysel işlemler Helsinki Deklerasyonu’nda belirtilen önerilere uygun olarak gerçekleştirilmiştir (La Vaque & Rossiter, 2001). Farelerde meme kanseri oluşturulması MCF-7 (meme kanseri hücreleri) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 50 mL fetal sıgır serumu ile 450 mL 4,5 g/L glutamin içeren DMEM içerisinde bulunan 1×10^8 yoğunluğundaki MCF-7 hücre süspansiyonu hayvanların sağ koltuk altından, intraperitoneal olarak enjekte edilmiştir (Şekil 7). Tüm hücre süspansiyon enjeksiyon hacimleri 0,5 mL olacak şekilde ayarlanmıştır ve enjeksiyonlar bir gün arayla

uygulanmıştır. Tümör oluşumu beş hafta sürede tamamlanmıştır. İn vivo çalışmada kullanılan formülasyonlar ve hayvan sayıları

Tablo 13'de gösterilmiştir. Meme kanseri modeli oluşturulmuş hayvanlarda Lu-177

Uygulanan formülasyonlar	Lu-177 çözeltisi	Lu-177-L5	Lu-177-L11
Hayvan sayısı	3	3	3

çözeltisi, Lu-177 ile radyoışaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonları uygulandıktan sonra, görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Fareler, çalışmalara başlamadan önce 0,1 mL ketamin ve 0,1 mL ksilazin karışımının kas içi enjeksiyonu ile anestezi altına alınmıştır. Çalışmalar boyunca fareler anestezi altında tutulmuştur. Farelerin kuyruk venine Lu-177 çözeltisi, Lu-177 ile radyoışaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonları (radyoaktivite miktarları: $50 \pm 0,1$ mCi/mL) uygulanmıştır. Uygulama sonrası nanoScan SPECT/CT 4R (Mediso) kamera kullanılarak 4. ve 96. saatlerde tüm vücut görüntüleri alınmıştır.



Şekil 7. Meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude fare

Tablo 13. İn vivo çalışmada kullanılan formüllasyonlar ve hayvan sayıları

Uygulanan formülasyonlar	Lu-177 çözeltisi	Lu-177-L5	Lu-177-L11
Hayvan sayısı	3	3	3

2.2.14. İstatiksel Değerlendirme

Doktora tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları GraphPad Prism 8.0 programı ile istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

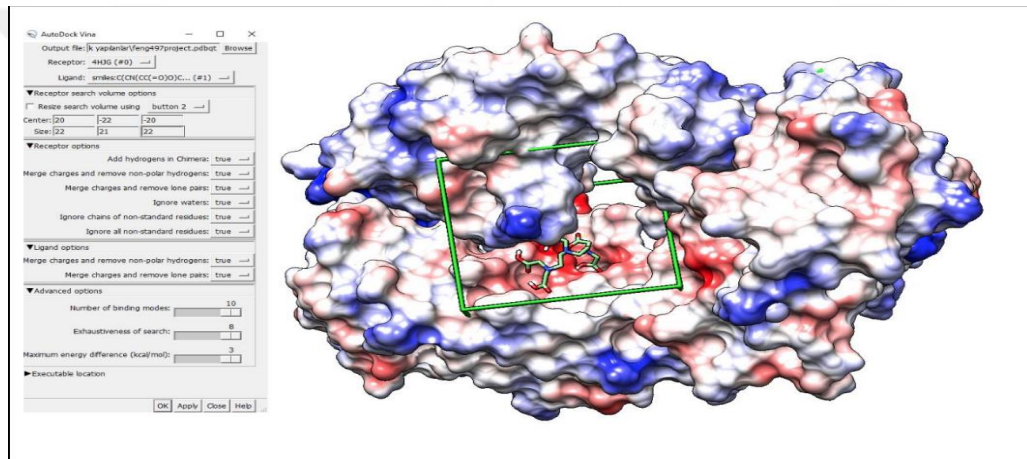


Bulgular

3.1.1. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışma bulguları

3.1.1.1. DTPA-TRZ (4HJG (Fc)) sonuçları

DTPA molekülünün 4HJG (Fc) üzerinde yerleştiği yer **Şekil 8** üzerinde gösterilmiştir. Moleküler yerleştirme alanı yeşil kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde (20,-22,-20/22,21,22) şeklinde belirlenerek bu alana Moleküler yerleştirme yapılmıştır. 4HJGnin elektrostatik yüzeyi kırmızı -10 kcal ve mavi +10 kcal arasında temsil edilmektedir.



Şekil 8. DTPA şelat ajanının TRZ etkin maddesine (4HJG) bağlandığı bölge

Moleküler Yerleştirme sonuçlarına göre RMSD (ortalama karakök mesafesi) 0 ve en optimum skor (gibbs serbest enerjisi) -6,5 değerinde bulunmuştur (**Şekil 9**).

4 adet hidrojen bağı **Şekil 10**'da hangi aminoasit ile DTPA arasında gerçekleştiği gösterilmiştir. Bu bağlar Asparajin (2 bağ), Glutamin ve Aspartik asit ile DTPA arasında gerçekleşmiştir. **Şekil 10**'da gösterildiği gibi 1,936 angström sonuç değerine sahip hidrojen bağı DTPA'nın HN1 atomuyla 4HJG'nin A zinciri 85. Sırada yer alan Asparajin arasında gerçekleşmiştir. 2,539 angström sonuç değerine sahip 4HJG'nin A zinciri Aspartik asit ile DTPA'nın A zinciri 1. sırada yer alan atom arasında gerçekleşmiştir. 2,077 angström sonuç değerine sahip hidrojen bağı DTPA'nın HN atomuyla 4HJG'nin A zinciri 85. Sırada yer alan Asparajin arasında gerçekleşmiştir.

(2. Bağ). 2,808 angström sonuç değerine sahip hidrojen bağı DTPA'nın H7 atomuyla 4HJG'nin A zinciri 38. Sırada yer alan Glutamin arasında gerçekleşmiştir.

ViewDock - C:\Users\altan\Desktop\27.01.2021 Molecular Docking sonuçları\4HJ...

File Compounds Column Selection Chimera HBonds Movie

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	-6.5	0.0	0.0	4	4	3
V	-6.0	1.72	2.39	5	5	3
V	-6.0	4.21	7.497	6	6	5
V	-5.9	4.449	8.353	2	2	2
V	-5.9	4.106	8.039	5	5	5
V	-5.9	2.45	5.02	3	3	3
V	-5.9	1.691	2.058	2	2	1
V	-5.8	4.338	8.442	3	3	3
V	-5.7	4.293	7.178	4	4	4

Chimera Model #3.1

REMARK VINA RESULT: -6.5 0.000 0.000

REMARK 21 active torsions:

REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)

REMARK 1 A between atoms: C1_1 and N2_12

REMARK 2 A between atoms: C1_1 and C2_2

REMARK 3 A between atoms: C2_2 and N1_3

REMARK 4 A between atoms: C3_4 and N1_3

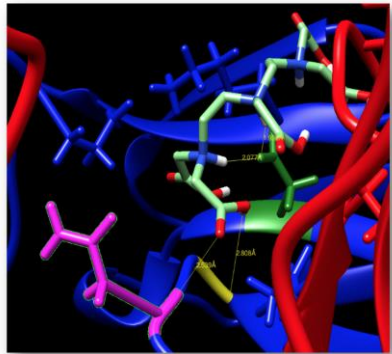
REMARK 5 A between atoms: C5_8 and N1_3

Change Compound State

☒ Viable ☐ Deleted ☐ Purged

Hide Quit Help

Şekil 9. DTPA-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçları



#Konum 1 - # Konum 2	Sonuçlar
#3.1 DTPA 1.A HN1 - #0.1 ASP 85.A OD2	1.936 Å
#0.1 ASN 41.A H - #3.1 DTPA 1.A O1	2.539 Å
#3.1 DTPA 1.A HN - #0.1 ASP 85.A OD2	2.077 Å
# 3.1 DTPA 1.A H7 - #0.1 GLN 38.A O	2.808 Å

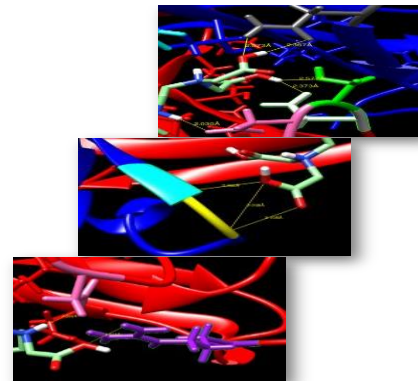
Şekil 10. DTPA-TRZ (4HJG)'ye ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.2. DTPA-TRZ (6N9T(Fab)) sonuçları

DTPA molekülünün 6N9T üzerinde yerleştiği yer Şekil 11 üzerinde gösterilmiştir. Moleküler Yerleştirme alanı yeşil kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde (-14,13,160/45,38,27) şeklinde belirlenerek bu alana Moleküler yerleştirme yapılmıştır.

oluşmuştur. Mor renkli hidrojen bağı; DTPA'nın O10 atomuyla B zincirinde 315. sırada bulunan Arjininin H atomuyla hidrojen bağı 2,318 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Mavi renkli Hidrojen bağı; DTPA'nın O4 atomuyla A zincirinde 126. sırada bulunan Glutaminin H atomuyla hidrojen bağı 2,402 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Sarı renkli Hidrojen bağı; DTPA'nın O4 atomuyla A zincirinde 125. sırada bulunan Asparajinin H atomuyla hidrojen bağı 2,208 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Yine sarı renkli hidrojen bağı; DTPA'nın O3 atomuyla A zincirinde 125. sırada bulunan Asparajinin H atomuyla hidrojen bağı 2,367 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Siyah renkli hidrojen bağı; DTPA'nın O6 atomuyla A zincirinde 154. sırada bulunan Asparajinin HD21 atomuyla hidrojen bağı 2,073 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Yine siyah renkli hidrojen bağı; DTPA'nın H17 atomuyla A zincirinde 154. sırada bulunan Asparajin ile hidrojen bağı 2,367 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Yeşil renkli hidrojen bağı; DTPA'nın H20 atomuyla B zincirinde 371. sırada bulunan Serin ile hidrojen bağı 2,577 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur. Beyaz renkli hidrojen bağı; DTPA'nın H20 atomuyla B zincirinde 370. sırada bulunan Aspartik Asit ile hidrojen bağı 2,373 angström uzaklık değeriyle oluşmuştur.

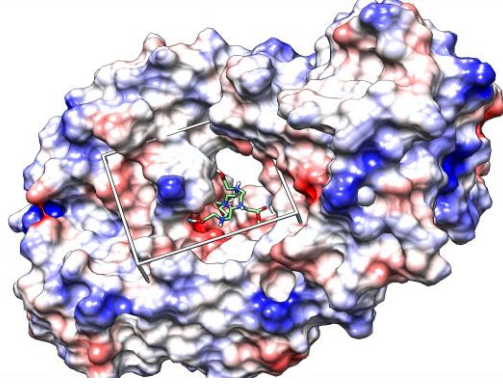
#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 DTPA 1.A HN1 #0.2 ASP 372.B OD2 (OH)	2.030 Å
#0.2 ARG 315.B HH11 #3.1 DTPA 1.A O10	2.318 Å
#0.1 GLN 126.A H #3.1 DTPA 1.A O4	2.402 Å
#0.1 ASN 125.A H #3.1 DTPA 1.A O4	2.208 Å
#0.1 ASN 125.A H #3.1 DTPA 1.A O3	2.108 Å
#0.1 ASN 154.A HD21- #3.1 DTPA 1.A O6	2.073 Å
#3.1 DTPA 1.A H17 # 0.1 ASN 154.A OD1	2.367 Å
#3.1 DTPA 1.A H20 #0.2 SER 371.B OG	2.577 Å
#3.1 DTPA 1.A H20 #0.2 ASP 370.B OD1	2.373 Å



Şekil 13. DTPA-TRZ (6N9T)'ye ait 9 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.3. DOTA-TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları

DOTA molekülünün 4HJG üzerinde yerleştiği yer **Şekil 14** üzerinde gösterilmiştir. Moleküler Yerleştirme alanı beyaz kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde DTPA ile aynı değerler (20,-22,-20/22,21,22) şeklinde belirlenerek bu alana Moleküler yerleştirme yapılmıştır.



Şekil 14. DOTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (4HJG) üzerinde yerleştiği bölge

Moleküler Yerleştirme sonuçları **Şekil 15**'da gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde RMSD (ortalama karakök mesafesi) 0 ve optimum skor (gibbs serbest enerjisi) -6,5 değerinde bulunmuştur.

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Aton
V	-6.5	0.0	0.0	4		4
V	-6.4	5.027	8.123	2		2
V	-6.4	1.63	6.123	2		2
V	-6.4	1.033	6.69	3		3
V	-6.1	2.791	6.613	1		1
V	-6.0	2.734	4.898	4		4
V	-5.8	2.249	6.479	2		2

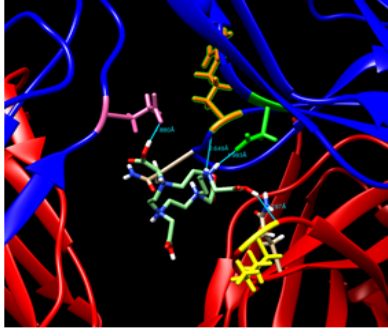
Chimera Model #3.1			
REMARK	VINA RESULT:	-6.5	0.000
REMARK	12 active torsions:		0.000
REMARK	status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)		
REMARK	1 A between atoms: C15_25 and N1_3		
REMARK	2 A between atoms: C13_21 and N2_6		
REMARK	3 A between atoms: C11_17 and N3_9		
REMARK	4 A between atoms: C9_13 and N4_12		
REMARK	5 A between atoms: C10_14 and C9_13		
REMARK	6 A between atoms: C10_14 and O2_16		

Change Compound State

☒ Viable ☐ Deleted ☐ Purged

Şekil 15. DOTA-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Şekil 16 incelendiğinde 4 hidrojen bağı farklı renklerle gösterilmiştir. Bu renkler, diğer fotoğrafla bağlantılıdır. Pembe renkte; Dota'nın H 19 atomuyla, A zincirde bulunan 165. sıradaki Glutamin arasında 1,880 angström uzaklık değeri vardır. Turuncu renkte; Dota'nın H 25 atomuyla, A zincirde bulunan 39. sıradaki Arjinin arasında 2,649 angström uzaklık değeri vardır. Yeşil renkte; Dota'nın HN 2 atomuyla, A zincirde bulunan 85. sıradaki Aspartik Asit arasında 1,993 angström uzaklık değeri vardır. Sarı renkte ise; Dota'nın H 22 atomuyla, B zincirde bulunan 257. sıradaki Lizin arasında 2,197 angström uzaklık değeri vardır.

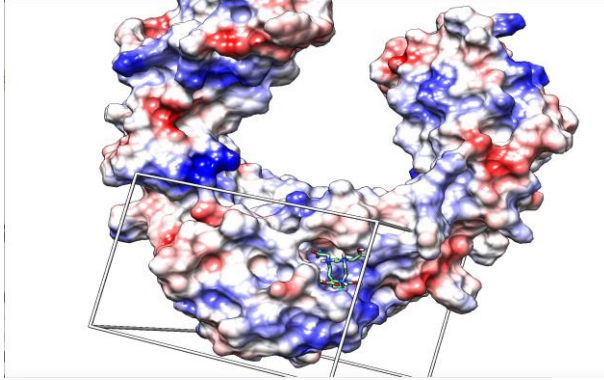


#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 DOT 1.A H-19 - #0 GLU 165.A OE1	1.880 Å
#3.1 DOT 1.A H-25 - #0 ARG 39.A O	2.649 Å
#3.1 DOT 1.A HN2 - #0 ASP 85.A OD2	1.993 Å
#3.1 DOT 1.A H22 - #0 LYS 257.B O	2.197 Å

Şekil 16. DOTA-TRZ (4HJG) ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.4. DOTA-TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları

DOTA molekülünün 6N9T üzerinde yerleştiği yer **Şekil 17** üzerinde gösterilmiştir. Moleküler Yerleştirme alanı beyaz kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde DTPA-6N9T ile aynı değerler (-14,13,160/45,38,27) şeklinde belirlenerek bu alana moleküler yerleştirme yapılmıştır.



Şekil 17. DOTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge

DOTA-6N9T sonuçlarının gösterildiği **Şekil 18** incelendiğinde -5,9 ve RMSD 0 değerinde 3 hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Bu hidrojen bağları Lizin, Aspartik Asit ve Asparajin ile DOTA arasında gerçekleşmiştir.

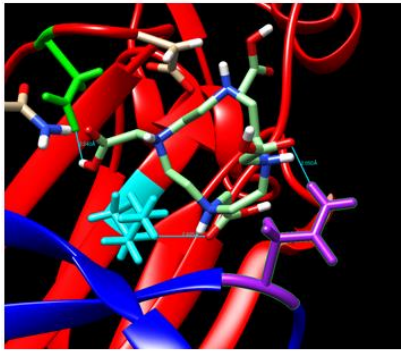
File	Compounds	Column	Selection	Chimera	HBonds	Movie
S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Aton
V	-5.9	0.0	0.0	3	3	3
V	-5.7	31.784	35.449	4	4	4
V	-5.4	24.156	27.172	6	5	5
V	-5.4	31.509	35.517	1	1	1
V	-5.4	1.87	5.44	4	4	4
V	-5.3	1.319	5.961	3	3	3
V	-5.2	31.454	35.383	4	4	4
..	..	..	..	..	..	..

Chimera Model #3.1			
REMARK	VINA RESULT:	-5.9	0.000 0.000
REMARK	12 active torsions:		
REMARK	status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)		
REMARK	1 A between atoms: C15_25 and N1_3		
REMARK	2 A between atoms: C13_21 and N2_6		
REMARK	3 A between atoms: C11_17 and N3_9		
REMARK	4 A between atoms: C9_13 and N4_12		
REMARK	5 A between atoms: C10_14 and C9_13		
REMARK	6 A between atoms: C10_14 and O2_16		

Change Compound State		
☒ Viable	☐ Deleted	☐ Purged

Şekil 18. DOTA-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Şekil 19 incelendiğinde 3 hidrojen bağı farklı renklerle gösterilmiştir. Bu renkler, sonuçların gösterildiği diğer fotoğrafla bağlantılıdır. Yeşil renkli hidrojen bağı; DOTA'nın H 25 atomuyla, B zincirde bulunan 370. sıradaki Aspartik Asit arasında 2.240 angström uzaklık değeri vardır. Mavi renkteki hidrojen bağı; DOTA'nın O 7 atomuyla, B zincirde bulunan 341. sıradaki Lizin arasında 2,495 angström uzaklık değeri vardır. Pembe renkteki hidrojen bağı ise; DOTA'nın O 1 atomuyla, A zincirde bulunan 125. sıradaki Asparajin arasında 2,050 angström uzaklık değeri vardır.

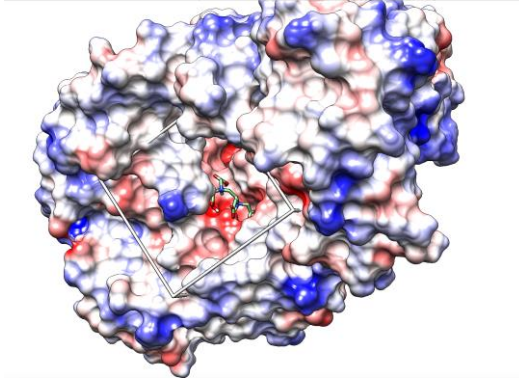


#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 DOT 1.A H25 -#0 ASP 370.B OD2	2.240 Å
#3.1 DOT 1.A O7 -#0 LYS 341.B HZ3	2.495 Å
#3.1 DOT 1.A O1 -#0 ASN 125.A HD21	2.050 Å

Şekil 19. DOTA-TRZ (6N9T) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.5. EDTA- TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları

EDTA molekülünün 4HJG üzerinde yerleştiği yer **Şekil 20** üzerinde gösterilmiştir. Moleküler yerleştirme alanı beyaz kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde (20,-22,-20/22,21,22) şeklinde belirlenerek bu alana Moleküler yerleştirme yapılmıştır.



Şekil 20. EDTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (4HJG) üzerinde yerleştiği bölge

Moleküler Yerleştirme sonuçları incelendiğinde RMSD (ortalama karakök mesafesi) 0 ve optimum skor (gibbs serbest enerjisi) -6,1 değerinde bulunmuştur (Şekil 21).

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Aton
V	-6.1	0.0	0.0	4	4	4
V	-6.0	1.988	3.194	1	1	1
V	-5.9	2.159	6.309	2	2	2
V	-5.9	3.663	7.41	1	1	1
V	-5.8	2.233	6.123	1	1	1
V	-5.5	2.044	4.151	3	3	3
V	-5.5	2.954	4.96	2	2	2

Chimera Model #3.1			
REMARK VINA RESULT:	-6.1	0.000	0.000
REMARK 15 active torsions:			
REMARK status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)			
REMARK 1 A between atoms: C1_1 and N2_12			
REMARK 2 A between atoms: C1_1 and C2_2			
REMARK 3 A between atoms: C2_2 and N1_3			
REMARK 4 A between atoms: C3_4 and N1_3			
REMARK 5 A between atoms: C5_8 and N1_3			
REMARK 6 A between atoms: C3_4 and C4_5			

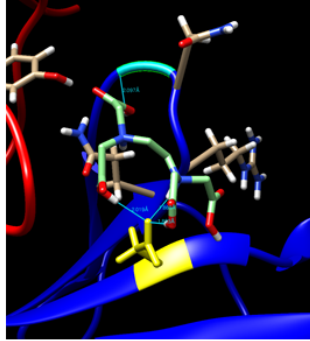
Change Compound State

☒ Viable ☐ Deleted ☐ Purged

Şekil 21. EDTA-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Hidrojen bağlarını gösteren Şekil 22 incelendiğinde, renkler iki resim ile uyumludur.. Toplamda 4 hidrojen bağı 2 farklı aminoasitle hidrojen bağı yapmıştır. Mavi hidrojen bağı noktası incelendiğinde; EDTA'nın H16 atomuyla A zincirde bulunan 42. sıradaki Glisin'in O atomuyla 2,097 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Sarı hidrojen bağı noktası incelendiğinde; EDTA'nın H13 atomuyla A zincirde bulunan 85. sıradaki Aspartik Asit'in O atomuyla 2,019 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. İkinci sıradaki sarı hidrojen bağı noktası incelendiğinde; EDTA'nın HN atomuyla A zincirde bulunan 85. sıradaki Aspartik Asit'in O atomuyla 1,869 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Üçüncü sıradaki sarı hidrojen bağı noktası incelendiğinde; EDTA'nın H10 atomuyla A zincirde bulunan

85. sıradaki Aspartik Asit'in O atomuyla 1,853 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür.

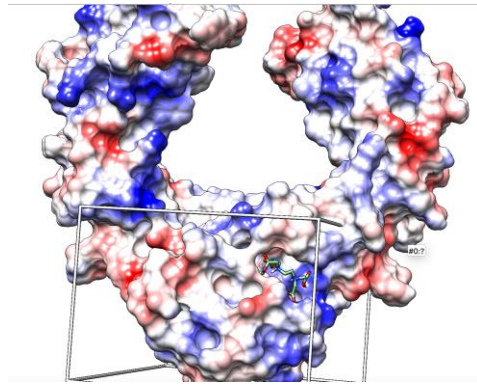


#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 EDT 1.A H16 -#0 GLY 42.A O	2.097 Å
#3.1 EDT 1.A H13 -#0 ASP 85.A OD2	2.019 Å
#3.1 EDT 1.A HN -#0 ASP 85.A OD2	1.869 Å
#3.1 EDT 1.A H10 -#0 ASP 85.A OD2	1.853 Å

Şekil 22. EDTA-TRZ (4HJG) ait 4 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.6. EDTA- TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları

EDTA molekülünün 6N9T üzerinde yerleştiği yer **Şekil 23**'de gösterilmiştir. Moleküler Yerleştirme alanı beyaz kutu içinde gösterilmiştir. Grid Size Autodock Vina üzerinde DTPA-6N9T ile aynı değerler (-14,13,160/45,38,27) şeklinde belirlenerek bu alana Moleküler yerleştirme yapılmıştır. Yüzey daha önceki çalışmalarda olduğu gibi elektrostatik potansiyele göre(-10 (kırmızı) ve +10 (mavi)) renklendirilmiştir.



Şekil 23. EDTA molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge

EDTA-6N9T sonuçlarının gösterildiği **Şekil 24**'e bakıldığında -6,0 değerinde 5 hidrojen bağı bulunmuştur. İlk sıradaki bu -6,0 değerinde moleküler yerleştirme sonucunun RMSD'si 0 dır.

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Aton
V	-6.0	0.0	0.0	5		5
V	-6.0	0.129	6.491	4		4
V	-5.4	18.443	20.728	4		3
V	-5.4	18.949	21.119	4		3
V	-5.2	22.13	23.654	6		6
V	-5.1	18.321	21.244	3		3
V	-5.0	19.188	21.841	3		3

Chimera Model #3.1			
REMARK	5	A	between atoms: C5_8 and N1_3
REMARK	6	A	between atoms: C3_4 and C4_5
REMARK	7	A	between atoms: C4_5 and O2_7
REMARK	8	A	between atoms: C5_8 and C6_9
REMARK	9	A	between atoms: C6_9 and O4_11
REMARK	10	A	between atoms: C7_13 and N2_12
REMARK	11	A	between atoms: C9_17 and N2_12
REMARK	12	A	between atoms: C7_13 and C8_14
REMARK	13	A	between atoms: C8_14 and O6_16

Change Compound State

☒ Viable ☐ Deleted ☐ Purged

Şekil 24. EDTA-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Hidrojen bağları **Şekil 25**'de gösterilmiştir. 5 hidrojen bağının 4 farklı aminoasit ile bağ yaptığı görülmektedir. Bu bağ noktaları renklendirilerek gösterilmiştir ve iki resim arasında renkler birbiriyle uyumludur. Turuncu renkle gösterilen hidrojen bağı verisi incelendiğinde EDTA'nın O2 atomuyla B zincirde bulunan 361. sıradaki Asparajin'in HD22 atomuyla 2,057 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Pembe renkle gösterilen hidrojen bağı verisi incelendiğinde EDTA'nın H10 atomuyla A zincirde bulunan 163. sıradaki Aspartik Asit'in OD2 atomuyla 2,362 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Yeşil renkle gösterilen hidrojen bağı verisi incelendiğinde EDTA'nın O7 atomuyla B zincirde bulunan 333. sıradaki Glutamin'in H atomuyla 2,025 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Sarı renkle gösterilen birinci sıradaki hidrojen bağı verisi incelendiğinde EDTA'nın O5 atomuyla A zincirde bulunan 111. sıradaki Glutamin'in HE22 atomuyla 2,144 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. Sarı renkle gösterilen ikinci sıradaki hidrojen bağı verisi incelendiğinde EDTA'nın H13 atomuyla A zincirde bulunan 111. sıradaki Histidin'in HE22 atomuyla 1,823 angström değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmüştür.

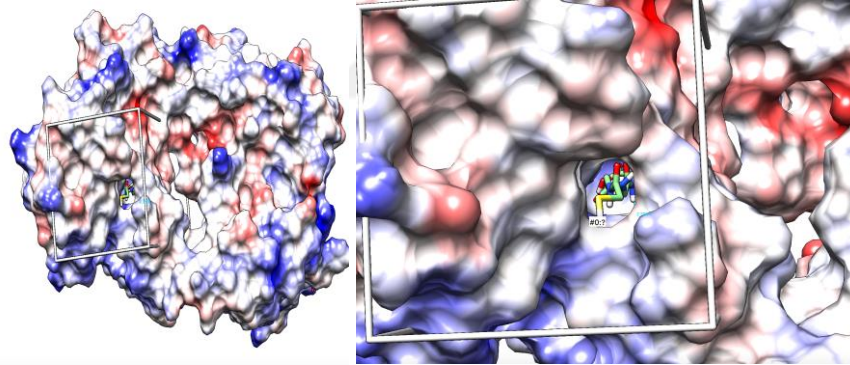


#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 EDT 1.A O2 -#0 ASN 361.B HD22	2.057 Å
#3.1 EDT 1.A H10 -#0 ASP 163.A OD2	2.362 Å
#3.1 EDT 1.A O7 -#0 GLN 333.B H	2.026 Å
#3.1 EDT 1.A O5 -#0 GLN 111.A HE22	2.144 Å
#3.1 EDT 1.A H13 -#0 HLN 111.A HE22	1.823 Å

Şekil 25. EDTA-TRZ (6N9T) ait 5 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.7. MAG3-TRZ (4HJG (Fc)) Sonuçları

Moleküler yerleştirme işlemi sonucunda MAG3 molekülünün en uygun yerleştiği yer **Şekil 26**'da gösterilmiştir. Grid Size (beyaz çerçeveli moleküler yerleştirme çalışma alanı) önceki çalışmalardan farklı olarak (25,-20,-40/50,20,20) olarak girilmiştir.



Şekil 26. MAG3 molekülünün 4HJG üzerinde yerleştiği bölge

MAG3-4HJG sonuçları **Şekil 27**'de gösterilmiştir. -6,8 değerinde 3 hidrojen bağı bulunmuştur. İlk sıradaki bu -6,8 skor değerinde moleküler yerleştirme sonucunun RMSD'si 0 dır.

S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Aton
V	-6.8	0.0	0.0	3	3	
V	-6.8	4.338	8.279	4	4	
V	-6.3	2.839	3.699	3	3	
V	-5.9	1.632	1.742	2	2	
V	-5.8	4.262	6.174	5	5	
V	-5.7	1.962	2.968	3	3	
V	-5.5	4.734	8.471	4	4	

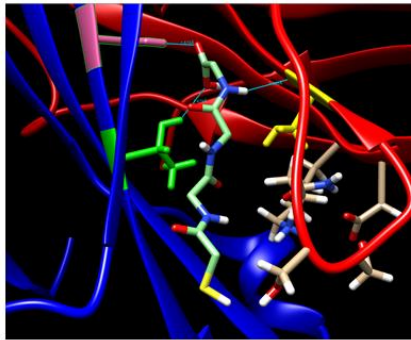
Chimera Model #3.1			
REMARK	VINA RESULT:	-6.8	0.000 0.000
REMARK	9 active torsions:		
REMARK	status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)		
REMARK	1 A between atoms: C1_1 and N2_9		
REMARK	2 A between atoms: C1_1 and C2_2		
REMARK	I between atoms: C2_2 and N1_4		
REMARK	3 A between atoms: C3_5 and N1_4		
REMARK	4 A between atoms: C3_5 and C4_6		
REMARK	5 A between atoms: C4_6 and O3_8		

Change Compound State

☒ Viable ☐ Deleted ☐ Purged

Şekil 27. MAG3-TRZ (4HJG)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Şekil 28'de renkler ve 3 boyutlu görseldeki renkler aminoasitleri temsil etmektedir. İki resim arasında renkler birbiriyle uyumludur. MAG3 3 farklı aminoasit ile 3 hidrojen bağı yapmıştır. Pembe renk Serin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 2. O atomuyla A zincirinde 176. sırada bulunan Serin aminoasitinin HG atomuyla 1,876 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Yeşil renk Threonin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 3. O atomuyla A zincirinde 178. sırada bulunan Threonin aminoasitinin HG1 atomuyla 2,479 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Sarı renk Serin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 3. H atomuyla B zincirinde 398. sırada bulunan Serin aminoasitinin O atomuyla 2,388 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir.

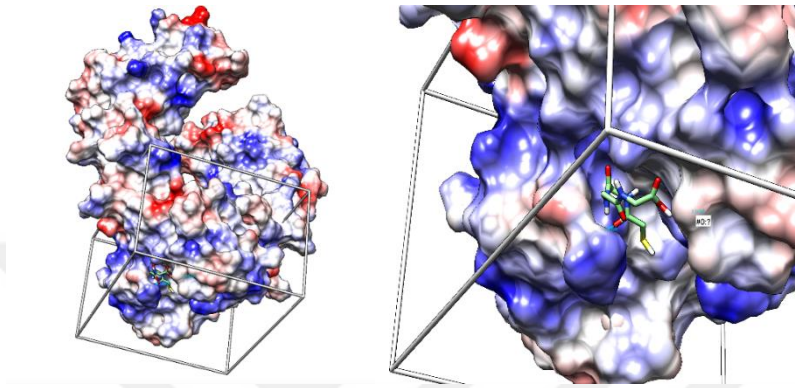


#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 MAG3 1.A O2 - #0 SER 176.A HG	1.876 Å
#3.1 MAG3 1.A O3 - #0 THR 178.A HG1	2.479 Å
#3.1 MAG3 1.A H3 - #0 SER 398.B O	2.388 Å

Şekil 28. MAG3-TRZ (4HJG) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.1.8. MAG3-TRZ (6N9T (Fab)) Sonuçları

Moleküler yerleştirme işlemi sonucunda MAG3 molekülünün en uygun yerleştiği yer **Şekil 29**'da gösterilmiştir. Grid Size (beyaz çerçeveli moleküler yerleştirme çalışma alanı) önceki 6N9T çalışmalarıyla aynı değerlerde olmasına rağmen farklı bir noktaya bağlandığı görülmüştür.



Şekil 29. MAG3 molekülünün TRZ etkin maddesinin (6N9T) üzerinde yerleştiği bölge

MAG3-6N9T sonuçlarının gösterildiği **Şekil 30**'a bakıldığında -5,5 skor değerinde 3 hidrojen bağı bulunmuştur. İlk sıradaki bu -5,5 skor değerinde moleküler yerleştirme sonucunun RMSD'si 0 dır.

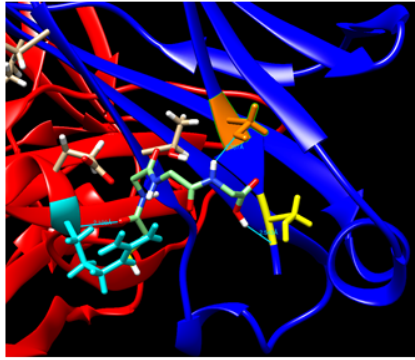
File	Compounds	Column	Selection	Chimera	HBonds	Movie
S	Score	RMSD l.b.	RMSD u.b.	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	-5.5	0.0	0.0	3	3	
V	-5.3	1.799	2.089	4	3	
V	-5.2	2.368	3.336	2	2	
V	-5.2	18.415	20.621	6	5	
V	-5.0	3.168	4.693	3	3	
V	-4.9	2.834	5.134	4	4	
V	-4.9	2.804	5.709	6	5	

Chimera Model #3.1			
REMARK	VINA RESULT:	-5.5	0.000 0.000
REMARK	9 active torsions:		
REMARK	status: ('A' for Active; 'I' for Inactive)		
REMARK	1 A	between atoms:	C1_1 and N2_9
REMARK	2 A	between atoms:	C1_1 and C2_2
REMARK	I	between atoms:	C2_2 and N1_4
REMARK	3 A	between atoms:	C3_5 and N1_4
REMARK	4 A	between atoms:	C3_5 and C4_6
REMARK	5 A	between atoms:	C4_6 and O3_8

Change Compound State	
☒ Viable	☐ Deleted
☐ Purged	

Şekil 30. MAG3-TRZ (6N9T)'ye ait moleküler yerleştirme sonuçları

Şekil 31'de renkler ve 3 boyutlu görseldeki renkler aminoasitleri temsil etmektedir. **Şekil 31** incelendiğinde MAG3 3 farklı aminoasit ile 3 hidrojen bağı yapmıştır. Mavi satır Arginin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 5. O atomuyla B zincirinde 326. sırada bulunan Arginin aminoasitinin H atomuyla 2,109 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Turuncu satır Serin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 3. H atomuyla A zincirinde 204. sırada bulunan Serin aminoasitinin OG atomuyla 2,367 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir. Sarı satır Serin'i temsil etmektedir. MAG3 molekülünün 6. H atomuyla A zincirinde 206. sırada bulunan Serin aminoasitinin O atomuyla 2,543 angström uzaklık değeriyle hidrojen bağı yaptığı görülmektedir.



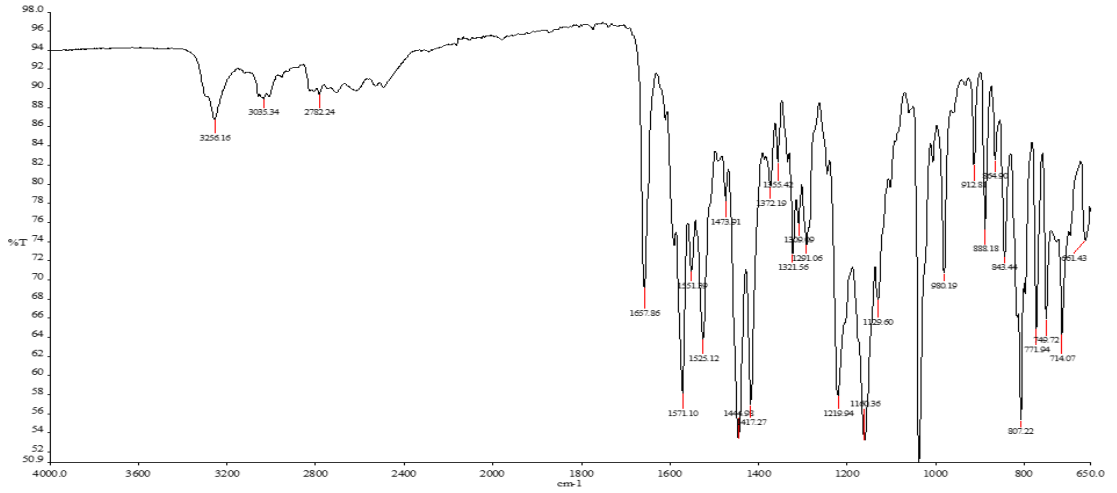
#Konum 1 - #Konum 2	Sonuçlar
#3.1 MAG3 1.A O5 -#0 ARG 326.B H	2.109 Å
#3.1 MAG3 1.A H3 -#0 SER 204.A OG	2.367 Å
#3.1 MAG3 1.A H6 -#0 SER 206.A O	2.543 Å

Şekil 31. MAG3-TRZ (6N9T) ait 3 adet hidrojen bağları ve bağlantı yerlerinin sonuçları

3.1.2. Etkin Maddenin Özelliklerinin İncelenmesi

3.1.2.1. FTIR Spektrum Analizi

TRZ'nin 600-4000 cm^{-1} dalga sayıları arasında FTIR spektrumu çekildi. **Şekil 32**'de elde edilen FTIR spektrumu verilmiştir. Bulunan pikler literatürle uygunluk göstermiştir (Chan et al., 2020).

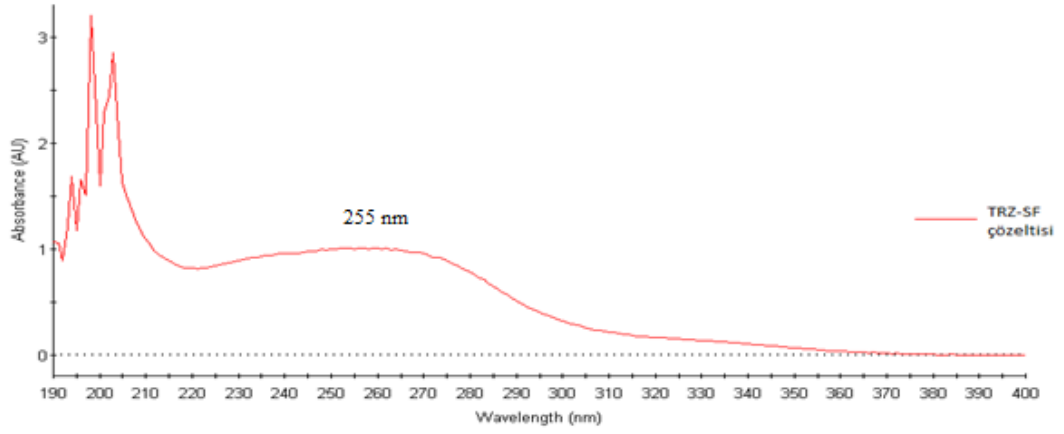


Şekil 32. TRZ'nin FTIR spektrumu

TRZ'nin FTIR spektrumunda amit bantları denilen protein-spesifik sinyaller görülmektedir. Bu pikler çoğunlukla protein ikincil yapıları (örn. sarmal yapı, β -yaprak) ve aminoasit yan zincirlerinden kaynaklanmaktadır. En önemli protein sinyalleri şu şekildedir: 1657 cm^{-1} (amit I bölgesi): TRZ proteinin omurgasındaki (backbone) C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1571 cm^{-1} (amide II bölgesi): TRZ proteinin N-H eğilme titreşimleri ile aminoasit yan zincirlerindeki (örn. Aspartik asit, Glutamin) COO- antisimetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1551 cm^{-1} (amit II bölgesi): TRZ proteinin C-N gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1525 cm^{-1} : Tirozin C-C ring gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. 1417 cm^{-1} : TRZ proteinin aminoasit yan zincirlerindeki COO- antisimetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. $2800\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$ arası çoklu pikler: C-H gerilme titreşimlerine ve 1473 cm^{-1} ve 1372 cm^{-1} : C-H eğilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.

3.1.2.2. UV Spektrum Analizi

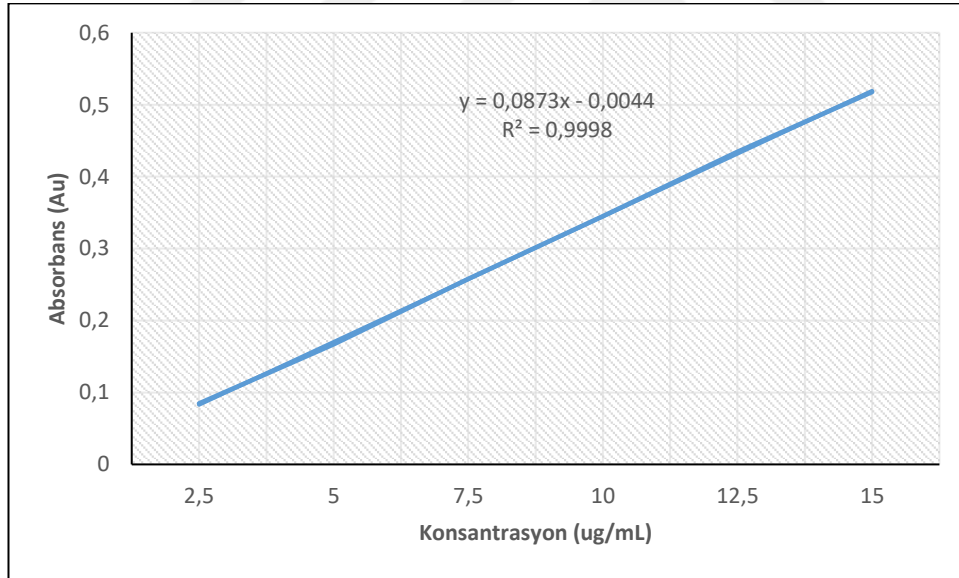
UV spektrum analizi için TRZ'nin distile su içerisinde 1 mg/mL olacak şekilde çözeltisi hazırlanmıştır. $190\text{-}400\text{ nm}$ dalga boyu arasında analiz gerçekleştirilmiş olup, TRZ'nin 255 nm 'de pik verdiği gözlenmiştir (Şekil 33). Elde edilen sonuç literatür ile uyumlu bulunmuştur (Haque et al., 2016).



Şekil 33. TRZ'nin UV spektrumu

3.1.2.3. Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yönteminin Geliştirilmesi

TRZ miktar tayini yöntemi geliştirmek amacıyla tüm analizlerde kullanılmak üzere kalibrasyon eğrisi çizilmiştir, doğru denklemi **Şekil 34**'de gösterilmiştir.



Şekil 34. TRZ'ye ait kalibrasyon eğrisi

3.1.2.4. TRZ'nin UV spektrumu ile Miktar Tayini Yönteminin Validasyonu

Doğruluk

Kullanılan analitik yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla, bilinen derişimlerde (2,5 ve 12,5 µg/mL) hazırlanan TRZ miktarından hareketle, UV analizi sonucunda

bulunan değerler ile gerçek değerler karşılaştırılıp doğruluk değeri % olarak **Tablo 14**'de verilmiştir.

Tablo 14. TRZ için hesaplanan % doğruluk değerleri ($p>0,05$)

Derişim Değerleri($\mu\text{g/mL}$)		
Örnek No	2,5 $\mu\text{g/mL}$	12,5 $\mu\text{g/mL}$
1	2,5	12
2	2,5	12,4
3	2,5	12,5
Ort	2,5	12,46
% doğruluk	100	99,73

Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen alan değerlerine karşılık gelen derişimlerin ortalaması ve standart sapması **Tablo 15**'de gösterilmiştir.

Tablo 15. Tekrarlanabilirlik çalışmasına ait derişim değerleri ($p>0,05$)

Örnek No	10 $\mu\text{g/mL}$ için alan değerleri	10 $\mu\text{g/mL}$ için derişim değerleri ($\mu\text{g/mL}$)
1	0,602	10
2	0,604	10,2
3	0,602	10
4	0,603	10,1
5	0,602	10
Ort	0,603	10,06
SS	0,000894	0,089443

Kısa Süreli Oda Sıcaklığı Kararlılığı

Farklı iki derişimde (2,5 ve 10 $\mu\text{g/mL}$ 'lik derişimlerdeki) TRZ içeren standart çözeltileri ile hazırlanan ve oda sıcaklığında UV'de analiz edilip, başlangıç anında ve 12. saatte enjeksiyonlar yapılan örneklerin derişimleri **Tablo 16** ve **Tablo 17**'de gösterilmiştir.

Tablo 16. 2,5 µg/mL derişim için kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testinin sonuçları (p>0.05)

Örnek No	0. saat (derişim)	12. saat (derişim)
1	2,5	2,4
2	2,5	2,5
3	2,4	2,5
Ort	2,47	2,47
SS	0,057	0,057

Tablo 17. 10 µg/mL derişim için kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testinin sonuçları (p>0.05)

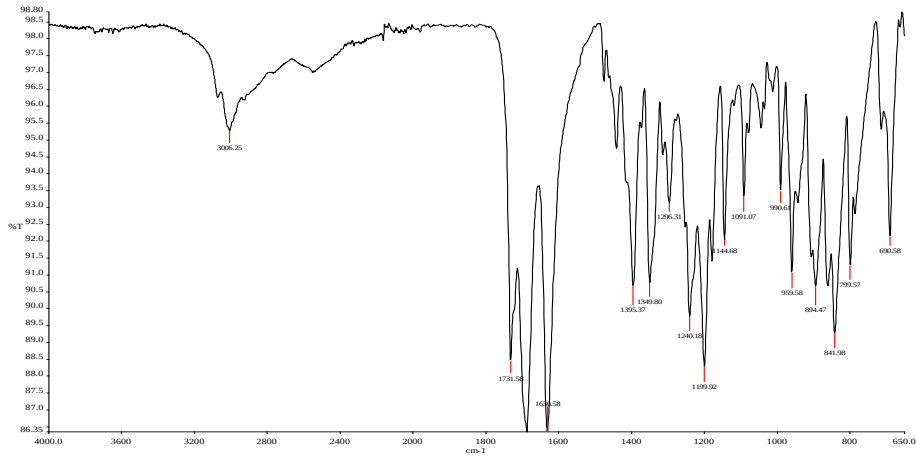
Örnek No	0. saat (derişim)	12. saat (derişim)
1	10	9,8
2	9,9	10
3	9,9	9,9
Ort	9,93	9,9
SS	0,057	0,1

3.1.3. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

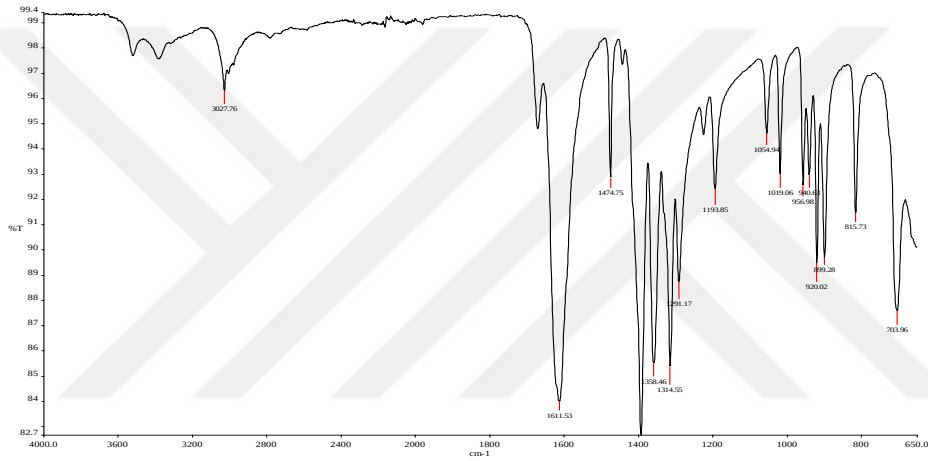
3.1.3.1. FTIR spektrumu

Şelat yapıcı ajanların 600-4000 cm⁻¹ dalga sayıları arasında FTIR spektrumu çekildi. **Şekil 35-Şekil 38** arasında elde edilen FTIR spektrumu sonuçları verilmiştir.

DTPA'ya ait FTIR spektrumundaki en önemli sinyaller şu şekildedir: 3100-2800 cm⁻¹ arasındaki pikler: C-H gerilme titreşimlerine, 1731 cm⁻¹: Karbonil grup C=O gerilme titreşimlerine, 1640 cm⁻¹: O-H eğilme titreşimleri ile C=O gerilme titreşimlerine, 1630 cm⁻¹: C-C gerilme titreşimlerine, 1345 – 1470 aralığı: CH eğilme titreşimlerine, 1296 cm⁻¹: C-N gerilme titreşimlerine, 1240 ve 1150 cm⁻¹ pikleri: C-O gerilme titreşimlerine ve 1144 cm⁻¹: COH gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 35. DTPA'nin FTIR spektrumu

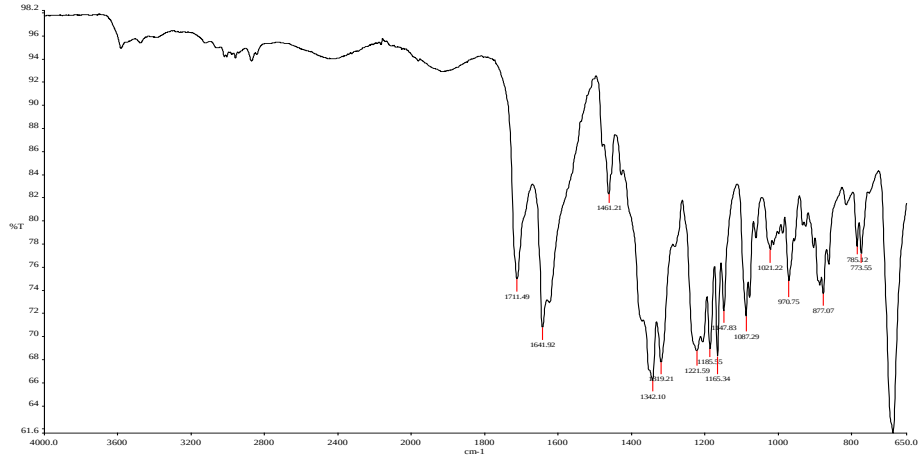


Şekil 36. EDTA'nin FTIR spektrumu

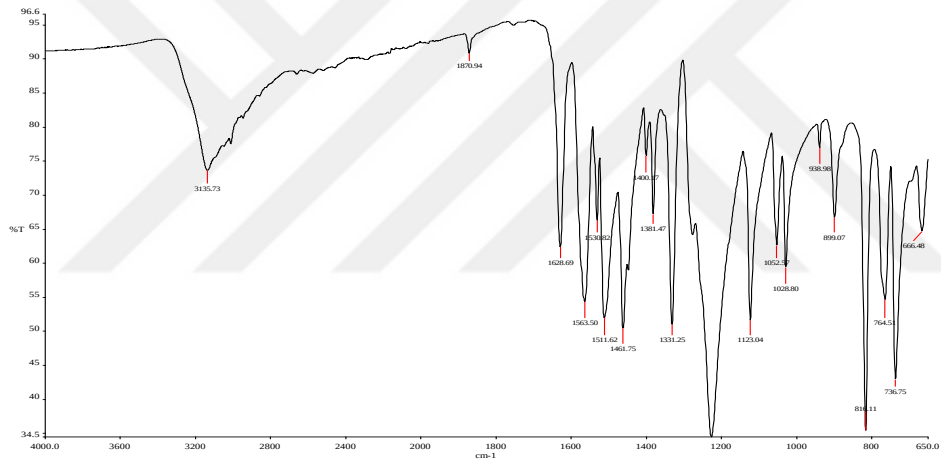
EDTA'ya ait FTIR spektrumundaki en önemli sinyaller şu şekildedir: 3600-3200 cm^{-1} arasındaki pikler: O-H gerilme titreşimlerine, 3100-2800 cm^{-1} arasındaki pikler: C-H gerilme titreşimlerine, 1690 cm^{-1} : karbonil grup C=O gerilme titreşimlerine, 1611 cm^{-1} : C-C gerilme titreşimlerine, 1350 – 1474 cm^{-1} arasındaki pikler : CH eğilme titreşimlerine, 1291 cm^{-1} : C-N gerilme titreşimlerine, 1240 ve 1190 cm^{-1} pikleri: C-O gerilme titreşimlerine ve 1054 cm^{-1} : COH gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.

DOTA'ya ait FTIR spektrumundaki en önemli sinyaller şu şekildedir: 3600-3200 cm^{-1} arasındaki pikler: O-H gerilme titreşimlerine, 3100-2800 cm^{-1} arasındaki pikler: C-H gerilme titreşimlerine, 1711 cm^{-1} : karbonil grup C=O gerilme titreşimlerine, 1640 cm^{-1} C=O ve 1600 cm^{-1} C-C gerilme titreşimlerine, 1350 – 1474 cm^{-1} arasındaki pikler : CH eğilme titreşimlerine, 1335 ve 1250 cm^{-1} pikleri: C-N gerilme titreşimlerine, 1240

ve 1165 cm^{-1} pikleri: C-O gerilme titreşimlerine ve 1147 cm^{-1} : COH gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.



Şekil 37. DOTA'nin FTIR spektrumu



Şekil 38. MAG3'ün FTIR spektrumu

MAG3'e ait FTIR spektrumundaki en önemli sinyaller şu şekildedir: 3135 cm^{-1} : N-H ve O-H gerilme titreşimlerine, 3100-2800 cm^{-1} arasındaki pikler: C-H gerilme titreşimlerine, 2600-2550 cm^{-1} : S-H gerilme titreşimlerine, 1628 cm^{-1} : C=O gerilme titreşimlerine, 1563 cm^{-1} : N-H eğilme titreşimlerine, 1511 cm^{-1} : C-C gerilme titreşimlerine, 1461, 1381 cm^{-1} : C-H eğilme titreşimlerine ve 1250 cm^{-1} : C-N gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir.

3.1.4. Çözelti Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması

3.1.5. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

3.1.5.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Çözelti halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyelleri **Yöntem 2.2.5.1**'de anlatıldığı gibi ölçülmüştür ve sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir.

Tüm formülasyonların partikül boyutları $560,4 \pm 123,9$ nm ve $1732 \pm 52,27$ nm arasında, zeta potansiyelleri $-5,61 \pm 2,06$ ve $-13,9 \pm 1,63$ mV arasında, PDI değerleri $0,337 \pm 0,068$ ve $0,497 \pm 0,179$ arasında bulunmuştur.

3.1.5.2. pH Ölçüm Sonuçları

Yöntem 2.2.5.2'de anlatıldığı gibi pH ölçümü yapılan çözelti halindeki TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların pH ölçüm sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların pH değerleri $7.65 \pm 1,03$ ve $8,3 \pm 1,2$ arasında bulunmuştur.

3.1.5.3. İzotoni Testi

Yöntem 2.2.5.3'de anlatıldığı gibi çözelti halindeki formülasyonların izotoni testleri yapılmıştır. Çözelti halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların osmotik basınç sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların osmotik basınç değerleri $309 \pm 6,67$ ve $325 \pm 6,4$ arasında bulunmuştur.

3.1.5.4. TRZ Miktar Tayini Sonuçları

Çözelti halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarındaki TRZ miktar tayinleri **Yöntem 2.2.5.4**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır ve sonuçları **Tablo 18**'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır. Pratik olarak bakıldığında formülasyonların içerik miktarları **Tablo 18**'de gösterildiği gibi $893,45 \pm 11,2$ µg ile $990,12 \pm 5,67$ µg arasında bulunmuştur. Formülasyonların içindeki TRZ miktarının teorik olan ilave edilen miktara uygun olduğu görülmüştür.

Tablo 18. Çözelti halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarının partikül boyutu, zeta potansiyel, PDI, pH, osmatik basınç ve TRZ miktar tayini değerleri

Formülasyon numarası	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	pH	Osmotik basınç (mOsmol/kg)	TRZ miktarı (µg/mL)
Ç1	560,4±123,9	0,463±0,080	-5,61±2,06	8,3±1,2	312±9,23	893,45±11,2
Ç2	817,9±129,9	0,337±0,068	-3,30±1,48	8,2±0,99	321±8,8	990,12±5,67
Ç3	1126±124,5	0,497±0,179	-11,7±0,723	8,01±0,67	315±8,4	900,89±22,31
Ç4	834,2±17,01	0,459±0,345	-6,80±1,67	7.65 ±1,03	310±7,65	910,56±10,34
Ç5	908,3±49,02	0,374±0,117	-13,9±1,63	7.73±1,2	309±6,67	993,45±8,76
Ç6	1732±52,27	0,366±0,186	5,58±0,437	7.91±0,78	318±5,5	889,23±23,1
Ç7	568,3±72,74	0,440±0,465	-6,29±0,609	8,2±0,45	322±6,2	914,56±12,5
Ç8	863,3±143,3	0,428±0,281	-5,87±2,41	8,3±0,78	320±7,5	987,23±7,89
Ç9	1011±142,3	0,408±0,180	-10,1±1,13	8,4±0,56	317±7,6	899,44±9,12
Ç10	783,3±163,4	0,396±0,354	-7,41±1,45	7,88±0,78	312±5,67	903,65±7,89
Ç11	934,2±153,9	0,463±0,410	-10,6±0,856	7,9±0,67	325±6,4	970,87±9,67
Ç12	1386±280,4	0,415±0,264	-2,33±0,577	8,1±1,1	320±3,4	995,12±11,12

3.1.6. Stabilit  Sonuçları

Formülasyonların stabilit   alışmaları **Yöntem 2.2.6'**da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Formülasyonların fiziksel görünüşleri incelendiğinde gözle görülür herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri **Tablo 19-Tablo 21** arasında gösterilmiştir. Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında ölçülen partikül boyutları başlangıçta ölçülen partikül boyutları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun partikül boyutunun stabilit  çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği g r lm ştir ($p>0,05$). Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında ölçülen zeta potansiyelleri başlangıçta ölçülen zeta potansiyelleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun zeta potansiyelinin stabilit  çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği g r lm ştir ($p>0,05$). Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında  l  len PDI değerleri başlangıçta  l  len PDI değerleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun PDI değerlerinin stabilit  çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği g r lm ştir ($p>0,05$).

Stabilit  çalışmalarında ölçülen ve hesaplanan pH ve TRZ miktarları **Tablo 22-Tablo 24'**de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır. 6 aylık stabilit  sonuçlarına bakıldığında 5 ± 3  C, 25 ± 5  C %60 $\pm$ 5 ve 40 ± 5  C'de %75 $\pm$ 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların içerik miktarları 855  g'ın üzerinde, pH değerleri de 7'nin üzerinde bulunmuştur (**Tablo 22-Tablo 24**).

Tablo 19. 5 ± 3 °C de saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV±SS)	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV±SS)
Ç1	560,4 ±23,9	0,463 ±0,080	-5,61 ±2,06	586,4± 5,52	0,47± 0,11	-5,58± 1,51	683,13± 5,92	0,22± 0,15	-8,04± 3,81
Ç2	817,9 ±129,9	0,337 ±0,068	-3,30 ±1,48	896,45± 5,64	0,47± 0,08	-3,62± 0,61	894,9± 3,90	0,35± 0,22	-3,78± 5,4
Ç3	1126 ±124,5	0,497 ±0,179	-11,7 ±0,723	1108,82± 8,68	0,27± 0,07	-9,15± 1,37	1194,8 ±4,77	0,37± 0,26	-5,52± 2,43
Ç4	834,2 ±17,01	0,459 ±0,345	-6,80 ±1,67	810,24± 10,43	0,19± 0,04	-9,07± 1,17	814,52± 17,62	0,25± 0,10	-8,98± 2,01
Ç5	908,3 ±49,02	0,374 ±0,117	-13,9 ±1,63	984,71± 12,82	0,26± 0,18	-18,64± 4,04	900,82± 11,92	0,37± 0,15	-15,19± 5,28
Ç6	1732 ±52,27	0,366 ±0,186	-5,58 ±0,437	1699,9± 9,77	0,35± 0,07	-8,59± 2,64	1702,59± 26,04	0,29± 0,18	-8,16± 2,75
Ç7	568,3 ±72,74	0,440 ±0,465	-6,29 ±0,609	585,02± 4,84	0,35± 0,1	-4,63± 1,91	592,41± 6,90	0,20± 0,12	-5,56± 2,22
Ç8	863,3 ±143,3	0,428 ±0,281	-5,87 ±2,41	895,18± 4,59	0,21± 0,05	-9,05± 3,71	889,31± 8,36	0,46± 0,38	-6,28± 4,58
Ç9	1011 ±142,3	0,408 ±0,180	-10,1 ±1,13	1154,41± 13,23	0,38± 0,14	-12,85± 2,06	1163,12± 7,28	0,58± 0,08	-17,04± 3,29
Ç10	783,3 ±163,4	0,396 ±0,354	-7,41 ±1,45	754,08± 21,18	0,35± 0,03	-7,47± 3,95	765,2± 21,75	0,41± 0,09	-9,26± 1,38
Ç11	934,2 ±153,9	0,463 ±0,410	-10,6 ±0,856	981,56± 10,49	0,26± 0,1	-8,77± 2,59	977,92± 6,79	0,27± 0,07	-8,78± 3,12
Ç12	1386 ±280,4	0,415 ±0,26	-2,33 ±0,577	1290,97± 5,57	0,33± 0,21	-2,3± 0,73	1088,08± 6,5	0,22± 0,04	-3,35± 0,94

Tablo 20. $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60 $\pm$ 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)
Ç1	560,4 $\pm$ 23,9	0,463 $\pm$ 0,080	-5,61 $\pm$ 2,06	577,59 $\pm$ 21,33	0,36 $\pm$ 0,21	-3,41 $\pm$ 1,80	583,04 $\pm$ 5,18	0,37 $\pm$ 0,23	-6,48 $\pm$ 2,55
Ç2	817,9 $\pm$ 129,9	0,337 $\pm$ 0,068	-3,30 $\pm$ 1,48	790,79 $\pm$ 2,4	0,38 $\pm$ 0,22	-2,34 $\pm$ 2,45	794,79 $\pm$ 5,04	0,38 $\pm$ 0,20	-2,23 $\pm$ 1,18
Ç3	1126 $\pm$ 124,5	0,497 $\pm$ 0,179	-11,7 $\pm$ 0,723	1102,86 $\pm$ 2,14	0,28 $\pm$ 0,07	-11,02 $\pm$ 1,56	1103,14 $\pm$ 6,55	0,33 $\pm$ 0,31	-13,92 $\pm$ 3,96
Ç4	834,2 $\pm$ 17,01	0,459 $\pm$ 0,345	-6,80 $\pm$ 1,67	906,83 $\pm$ 0,63	0,34 $\pm$ 0,11	-9,81 $\pm$ 0,63	812,59 $\pm$ 10,95	0,41 $\pm$ 0,23	-7,15 $\pm$ 1,79
Ç5	908,3 $\pm$ 49,02	0,374 $\pm$ 0,117	-13,9 $\pm$ 1,63	994,93 $\pm$ 1,70	0,3 $\pm$ 0,12	-9,12 $\pm$ 3,19	907,23 $\pm$ 13,81	0,37 $\pm$ 0,15	-11,44 $\pm$ 0,68
Ç6	1732 $\pm$ 52,27	0,366 $\pm$ 0,186	-5,58 $\pm$ 0,437	16104,22 $\pm$ 3,99	0,37 $\pm$ 0,20	-7,89 $\pm$ 4,0	1716,6 $\pm$ 5,29	0,32 $\pm$ 0,14	-6,94 $\pm$ 3,76
Ç7	568,3 $\pm$ 72,74	0,440 $\pm$ 0,465	-6,29 $\pm$ 0,609	584,04 $\pm$ 3,48	0,36 $\pm$ 0,11	-7,89 $\pm$ 4,08	587,7 $\pm$ 4,0	0,38 $\pm$ 0,27	-8,52 $\pm$ 2,14
Ç8	863,3 $\pm$ 143,3	0,428 $\pm$ 0,281	-5,87 $\pm$ 2,41	895,86 $\pm$ 2,2	0,21 $\pm$ 0,05	-3,38 $\pm$ 2,72	793,01 $\pm$ 6,21	0,41 $\pm$ 0,43	-3,21 $\pm$ 2,94
Ç9	1011 $\pm$ 142,3	0,408 $\pm$ 0,180	-10,1 $\pm$ 1,13	1151,12 $\pm$ 9,61	0,34 $\pm$ 0,08	-11,93 $\pm$ 4,25	1160,26 $\pm$ 8,63	0,33 $\pm$ 0,20	-20,41 $\pm$ 3,46
Ç10	783,3 $\pm$ 163,4	0,396 $\pm$ 0,354	-7,41 $\pm$ 1,45	766,12 $\pm$ 2,46	0,33 $\pm$ 0,21	-8,17 $\pm$ 2,46	761,79 $\pm$ 16,11	0,43 $\pm$ 0,12	-9,35 $\pm$ 1,85
Ç11	934,2 $\pm$ 153,9	0,463 $\pm$ 0,410	-10,6 $\pm$ 0,856	976,04 $\pm$ 5,21	0,39 $\pm$ 0,15	-10,14 $\pm$ 1,99	913,92 $\pm$ 6,96	0,32 $\pm$ 0,14	-9,11 $\pm$ 2,12
Ç12	1386 $\pm$ 280,4	0,415 $\pm$ 0,26	-2,33 $\pm$ 0,577	1289,12 $\pm$ 3,51	0,34 $\pm$ 0,22	-3,99 $\pm$ 3,51	1291,49 $\pm$ 1,52	0,35 $\pm$ 0,28	-2,4 $\pm$ 5,46

Tablo 21. $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)
Ç1	560,4 $\pm$ 23,9	0,463 $\pm$ 0,080	-5,61 $\pm$ 2,06	581,17 $\pm$ 13,67	0,25 $\pm$ 0,18	-7,08 $\pm$ 2,02	576,07 $\pm$ 5,21	0,37 $\pm$ 0,04	-5,88 $\pm$ 4,72
Ç2	817,9 $\pm$ 129,9	0,337 $\pm$ 0,068	-3,3 $\pm$ 1,48	798,23 $\pm$ 9,80	0,37 $\pm$ 0,12	-2,88 $\pm$ 5,80	903,23 $\pm$ 15,90	0,25 $\pm$ 0,17	-4,00 $\pm$ 3,61
Ç3	1126 $\pm$ 124,5	0,497 $\pm$ 0,179	-11,7 $\pm$ 0,723	1117,78 $\pm$ 14,53	0,28 $\pm$ 0,06	-14,45 $\pm$ 3,16	995,56 $\pm$ 4,84	0,34 $\pm$ 0,29	-10,31 $\pm$ 2,86
Ç4	834,2 $\pm$ 17,01	0,459 $\pm$ 0,345	-6,80 $\pm$ 1,67	911,34 $\pm$ 29,80	0,38 $\pm$ 0,17	-6,73 $\pm$ 5,51	909,89 $\pm$ 18,13	0,37 $\pm$ 0,14	-6,56 $\pm$ 1,72
Ç5	908,3 $\pm$ 49,02	0,374 $\pm$ 0,117	-13,9 $\pm$ 1,63	887,63 $\pm$ 3,67	0,29 $\pm$ 0,13	-12,12 $\pm$ 3,19	896,22 $\pm$ 5,37	0,26 $\pm$ 0,29	-12,29 $\pm$ 2,64
Ç6	1732 $\pm$ 52,27	0,366 $\pm$ 0,186	-5,58 $\pm$ 0,437	1696,66 $\pm$ 7,79	0,37 $\pm$ 0,19	-6,75 $\pm$ 3,28	1596,71 $\pm$ 5,61	0,32 $\pm$ 0,06	-5,45 $\pm$ 1,46
Ç7	568,3 $\pm$ 72,74	0,440 $\pm$ 0,465	-6,29 $\pm$ 0,609	589,01 $\pm$ 1,17	0,48 $\pm$ 0,19	-5,88 $\pm$ 2,37	583,41 $\pm$ 6,1	0,25 $\pm$ 0,28	-7,45 $\pm$ 1,25
Ç8	863,3 $\pm$ 143,3	0,428 $\pm$ 0,281	-5,87 $\pm$ 2,41	896,95 $\pm$ 11,79	0,33 $\pm$ 0,21	-8,67 $\pm$ 4,08	893,52 $\pm$ 15,33	0,23 $\pm$ 0,1	-8,48 $\pm$ 2,36
Ç9	1011 $\pm$ 142,3	0,408 $\pm$ 0,18	-10,1 $\pm$ 1,13	1150,08 $\pm$ 13,65	0,28 $\pm$ 0,16	-11,93 $\pm$ 4,24	1055,67 $\pm$ 15	0,25 $\pm$ 0,17	-13,07 $\pm$ 2,05
Ç10	783,3 $\pm$ 163,4	0,396 $\pm$ 0,35	-7,41 $\pm$ 1,45	764,08 $\pm$ 12,83	0,27 $\pm$ 0,25	-6,28 $\pm$ 2,60	761,81 $\pm$ 8,03	0,21 $\pm$ 0,10	-8,67 $\pm$ 2,63
Ç11	934,2 $\pm$ 153,9	0,463 $\pm$ 0,41	-10,6 $\pm$ 0,856	983,23 $\pm$ 11,26	0,37 $\pm$ 0,17	-8,96 $\pm$ 5,00	985,48 $\pm$ 6,48	0,36 $\pm$ 0,14	-9,11 $\pm$ 2,12
Ç12	1386 $\pm$ 280,4	0,415 $\pm$ 0,26	-2,33 $\pm$ 0,577	1290,36 $\pm$ 9,87	0,33 $\pm$ 0,11	-2,22 $\pm$ 5,60	1286,96 $\pm$ 5,35	0,15 $\pm$ 0,03	-2,11 $\pm$ 6,30

Tablo 22. 5 ± 3 °C de saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı(µg/mL)	pH	TRZ miktarı(µg/mL)	pH	TRZ miktarı(µg/mL)
Ç1	8,3±1,2	893,45±11,2	8,6 ± 1,8	851,74 ± 3,36	8,71± 1,97	856,04± 4,79
Ç2	8,2±0,99	990,12±5,67	8,19 ± 0,85	972,96 ± 2,48	8,26± 1,81	929,55± 4,08
Ç3	8,01±0,67	900,89±22,31	7,5 ± 1,46	917,07 ±11,67	7,53± 2,95	908,81± 7,19
Ç4	7.65 ±1,03	910,56±10,34	7,31 ± 1,08	901,59± 4,73	7,2± 1,51	900,04± 17,40
Ç5	7.73±1,2	993,45±8,76	7,76 ± 1,17	961,19 ± 5,66	7,91± 0,83	992,23± 3,15
Ç6	7.91±0,78	889,23±23,1	7,42 ± 1,48	862,49 ± 25,48	7,41± 0,90	881,29± 16,24
Ç7	8,2±0,45	914,56±12,5	8,51± 1,60	913,26± 5,02	8,67± 2,50	929,78± 26,13
Ç8	8,3±0,78	987,23±7,89	8,86± 0,91	980,39± 15,49	8,59± 1,67	988,44± 12,59
Ç9	8,4±0,56	899,44±9,12	8,12± 1,10	855,23± 8,75	8,6± 1,28	893,71± 8,38
Ç10	7,88±0,78	903,65±7,89	7,63± 1,62	904,27± 17,52	7,26± 0,36	906,82± 25,10
Ç11	7,9±0,67	970,87±9,67	7,26± 1,05	956,56± 5,41	7,97± 0,69	962,22± 7,31
Ç12	8,1±1,1	995,12±11,12	8,69± 0,17	972,26± 10,24	8,66± 0,62	987,9± 17,97

Tablo 23. $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60 $\pm$ 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)
Ç1	8,3 $\pm$ 1,2	893,45 $\pm$ 11,2	8,96 $\pm$ 1,8	851,74 $\pm$ 3,36	8,4 $\pm$ 0,16	852,19 $\pm$ 7,32
Ç2	8,2 $\pm$ 0,99	990,12 $\pm$ 5,67	8,19 $\pm$ 0,85	982,96 $\pm$ 2,48	8,41 $\pm$ 0,91	980,29 $\pm$ 10,02
Ç3	8,01 $\pm$ 0,67	900,89 $\pm$ 22,31	8,49 $\pm$ 1,46	907,07 $\pm$ 11,67	7,64 $\pm$ 1,31	909,83 $\pm$ 17,50
Ç4	7.65 $\pm$ 1,03	910,56 $\pm$ 10,34	7,31 $\pm$ 2,08	891,59 $\pm$ 4,73	7,39 $\pm$ 0,72	908,98 $\pm$ 19,09
Ç5	7.73 $\pm$ 1,2	993,45 $\pm$ 8,76	7,76 $\pm$ 1,17	981,19 $\pm$ 5,66	7,09 $\pm$ 0,95	968,56 $\pm$ 1,64
Ç6	7.91 $\pm$ 0,78	889,23 $\pm$ 23,1	7,42 $\pm$ 1,48	872,49 $\pm$ 25,48	7,37 $\pm$ 0,88	879,09 $\pm$ 14,37
Ç7	8,2 $\pm$ 0,45	914,56 $\pm$ 12,5	8,52 $\pm$ 1,41	910,23 $\pm$ 1,16	7,3 $\pm$ 0,16	902,19 $\pm$ 7,32
Ç8	8,3 $\pm$ 0,78	987,23 $\pm$ 7,89	8,88 $\pm$ 0,58	979,46 $\pm$ 8,09	8,21 $\pm$ 1,91	970,29 $\pm$ 10,02
Ç9	8,4 $\pm$ 0,56	899,44 $\pm$ 9,12	8,2 $\pm$ 1,69	958,49 $\pm$ 7,70	8,64 $\pm$ 1,31	891,83 $\pm$ 17,50
Ç10	7,88 $\pm$ 0,78	903,65 $\pm$ 7,89	7,17 $\pm$ 1,01	885,74 $\pm$ 18,53	7,39 $\pm$ 0,72	908,98 $\pm$ 19,09
Ç11	7,9 $\pm$ 0,67	970,87 $\pm$ 9,67	7,86 $\pm$ 1,63	965,41 $\pm$ 4,93	8,09 $\pm$ 1,95	966,56 $\pm$ 1,64
Ç12	8,1 $\pm$ 1,1	995,12 $\pm$ 11,12	7,93 $\pm$ 0,63	966,47 $\pm$ 18,38	7,37 $\pm$ 0,88	987,09 $\pm$ 14,37

Tablo 24. $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)	pH	TRZ miktarı($\mu\text{g/mL}$)
Ç1	$8,3 \pm 1,2$	$893,45 \pm 11,2$	$8,3 \pm 1,8$	$851,74 \pm 3,36$	$8,55 \pm 0,75$	$890,15 \pm 6,78$
Ç2	$8,2 \pm 0,99$	$990,12 \pm 5,67$	$8,19 \pm 0,85$	$992,96 \pm 2,48$	$8,24 \pm 1,13$	$984,98 \pm 26,20$
Ç3	$8,01 \pm 0,67$	$900,89 \pm 22,31$	$8,2 \pm 1,46$	$907,07 \pm 11,67$	$8,07 \pm 0,54$	$913,78 \pm 1,56$
Ç4	$7,65 \pm 1,03$	$910,56 \pm 10,34$	$7,31 \pm 1,08$	$901,59 \pm 4,73$	$8,01 \pm 1,41$	$915,07 \pm 13,32$
Ç5	$7,73 \pm 1,2$	$993,45 \pm 8,76$	$7,76 \pm 1,17$	$981,19 \pm 5,66$	$7,47 \pm 1,02$	$949,58 \pm 79,30$
Ç6	$7,91 \pm 0,78$	$889,23 \pm 23,1$	$7,42 \pm 1,48$	$862,49 \pm 25,48$	$8,15 \pm 0,64$	$853,23 \pm 13,99$
Ç7	$8,2 \pm 0,45$	$914,56 \pm 12,5$	$8,82 \pm 1,19$	$915,25 \pm 17,15$	$7,89 \pm 0,76$	$914,52 \pm 30,90$
Ç8	$8,3 \pm 0,78$	$987,23 \pm 7,89$	$8,8 \pm 0,28$	$981,036 \pm 5,47$	$8,18 \pm 1,96$	$972,52 \pm 7,56$
Ç9	$8,4 \pm 0,56$	$899,44 \pm 9,12$	$8,11 \pm 1,60$	$898,52 \pm 10,29$	$8,71 \pm 0,64$	$847,76 \pm 27,28$
Ç10	$7,88 \pm 0,78$	$903,65 \pm 7,89$	$8,07 \pm 0,46$	$908,48 \pm 39,22$	$7,87 \pm 0,68$	$895,15 \pm 30,93$
Ç11	$7,9 \pm 0,67$	$970,87 \pm 9,67$	$8,95 \pm 0,33$	$959,25 \pm 8,57$	$7,85 \pm 1,41$	$971,63 \pm 8,72$
Ç12	$8,1 \pm 1,1$	$995,12 \pm 11,12$	$8,23 \pm 1,25$	$989,89 \pm 13,79$	$8,23 \pm 0,54$	$989,66 \pm 21,58$

3.1.7. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması

3.1.7.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi Sonuçları

Yöntem 2.2.7.1'de anlatıldığı gibi yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen hazırlama verimleri **Tablo 25**'de belirtilmiştir. Liyofilize kit halindeki her bir formülasyonun hazırlama veriminin %90'ın üzerinde olduğu bulunmuştur.

Tablo 25. Liyofilize kit halindeki formülasyonlarının liyofilizasyon sonrası hazırlama verimleri

Formülasyon numarası	Hazırlama verimi (%)
L 1	90,83
L 2	93,32
L 3	91,16
L 4	90,31
L 5	92,12
L 6	93,12
L 7	91,34
L 8	92,03
L 9	90,89
L 10	91,22
L 11	93,24
L 12	90,66

3.1.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları Sonuçları

3.1.8.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçüm Sonuçları

Liyofilize kit halinde hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyelleri **Yöntem 2.2.8.1**'de anlatıldığı gibi ölçülmüştür ve sonuçlar **Tablo 26**'da verilmiştir. Tüm formülasyonların partikül boyutları $457,5 \pm 22,15$ nm ve $904,4 \pm 8,12$ nm arasında, zeta potansiyelleri $-1,76 \pm 0,405$ ve $-11,9 \pm 0,757$ mV arasında, PDI değerleri $0,201 \pm 0,081$ ve $0,446 \pm 0,134$ arasında bulunmuştur.

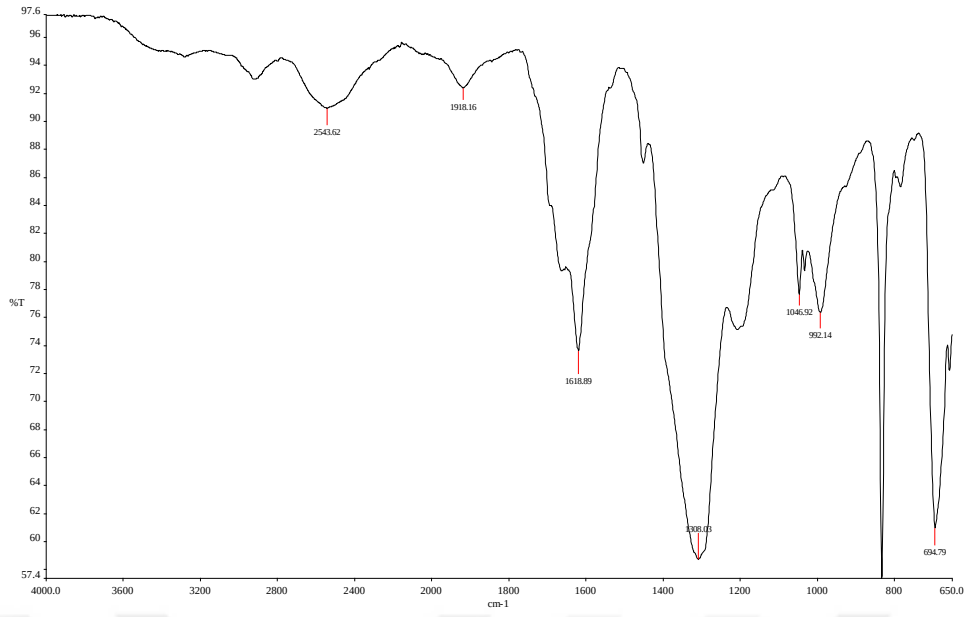
Tablo 26. Liyofilize kit halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarının partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri

Formülasyon numarası	Partikül boyutu (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
L 1	758,4±7,06	0,446±0,134	-9,40±1,25
L 2	787,4±17,1	0,353±0,053	-9,50±4,03
L 3	904,4±8,12	0,372±0,305	-11,76±3,05
L 4	545,0±31,5	0,285±0,124	-6,35±0,221
L 5	604,7±38,54	0,279±0,117	-8,48±1,59
L 6	693,1±19,22	0,200±0,080	-12,9±2,69
L 7	457,5±22,15	0,169±0,296	-1,42±0,471
L 8	863,1±14,8	0,114±0,178	-1,2±1,86
L 9	966,8±11,9	0,201±0,081	-1,76±0,405
L 10	479,6±18,47	0,322±0,069	-11,3±1,31
L 11	537,5±20,76	0,383±0,262	-10,8±0,529
L 12	692,0±11,9	0,334±0,235	-11,9±0,757

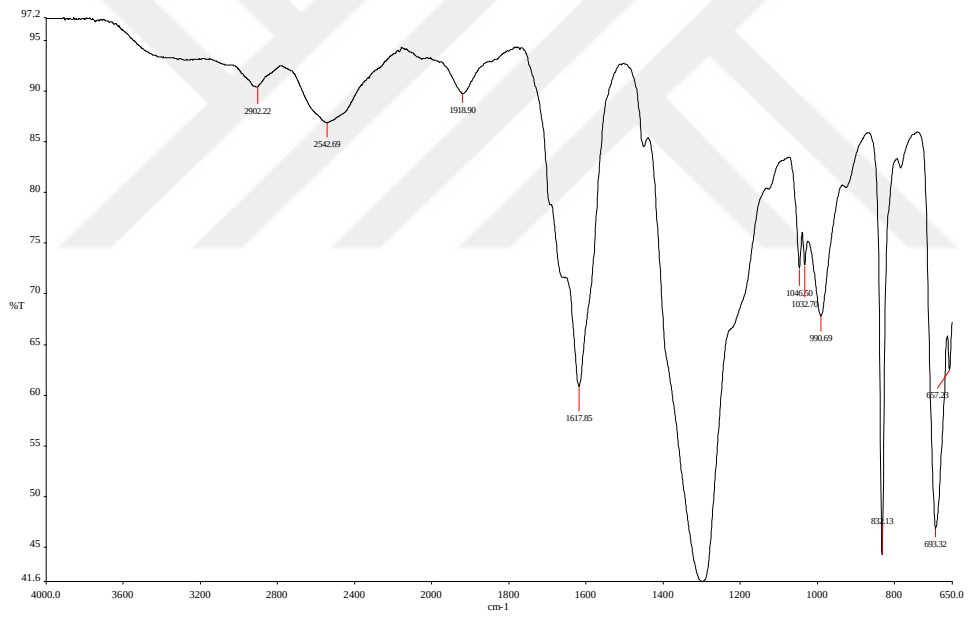
3.1.8.2. Fourier Transform Infra-Red Spektrumu

TRZ:şelat ajanı komplekslerini içeren liyofilize kitlerin FTIR spektrumları **Yöntem 2.2.8.2'**de anlatıldığı ölçülmüştür ve sonuçlar **Şekil 39-Şekil 50** arasında gösterilmiştir.

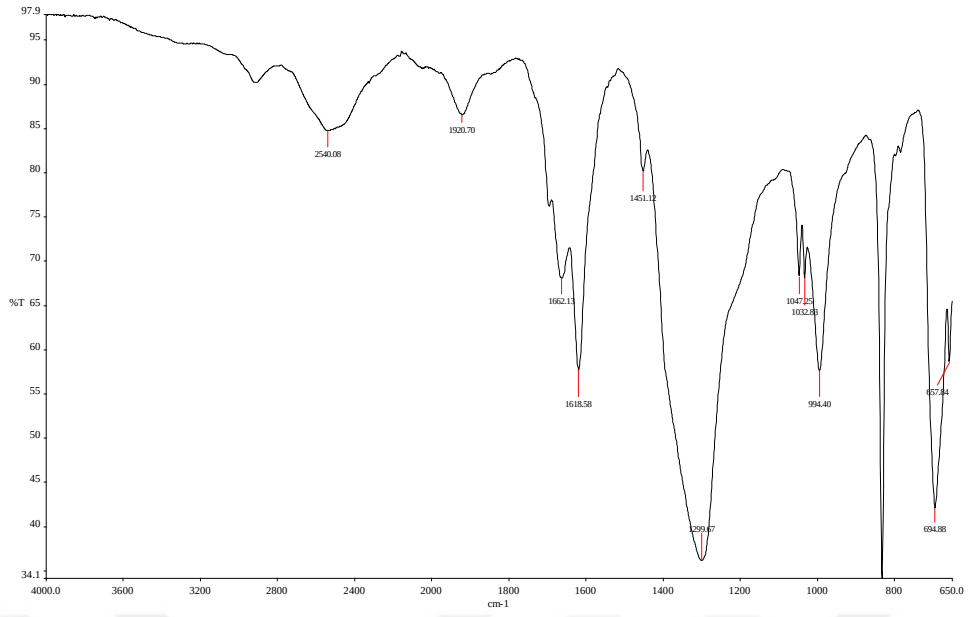
L1, L2 ve L3 nolu formülasyonlara ait FTIR spektrumlarına ait sonuçlarda (**Şekil 39-Şekil 41**); 1662 cm⁻¹: TRZ proteinin amit I omurgasındaki C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir ve bu pik hazırlanan formülasyonlarda 1657 cm⁻¹'den 1662 cm⁻¹'e kaymıştır. 1618 cm⁻¹: EDTA'nın C-C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. EDTA miktarı artıkça bu sinyal de artmaktadır ve bu pik hazırlanan formülasyonlarda 1611 cm⁻¹'den 1618 cm⁻¹'e kaymıştır.



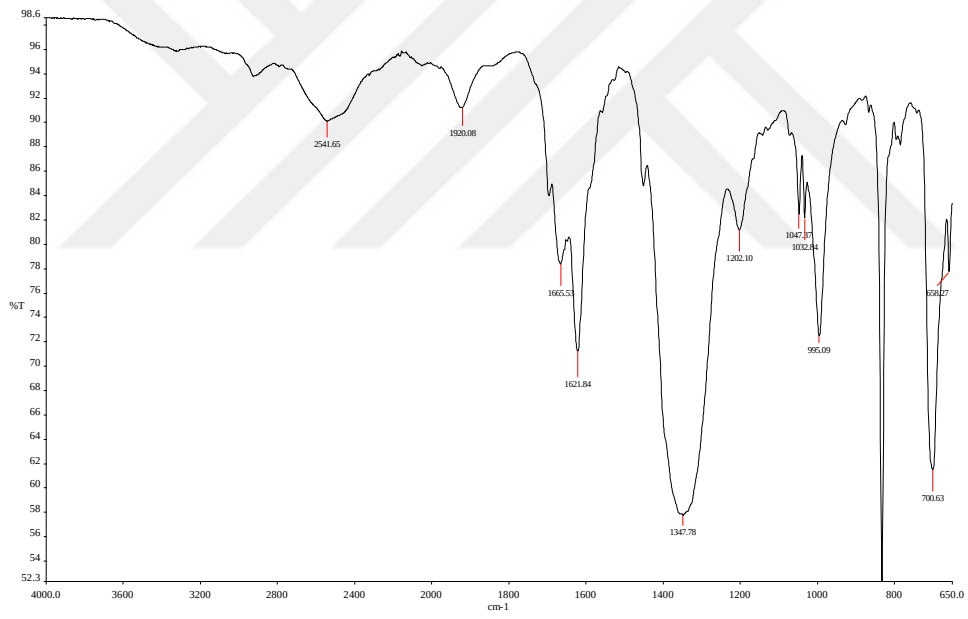
Şekil 39. L1 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



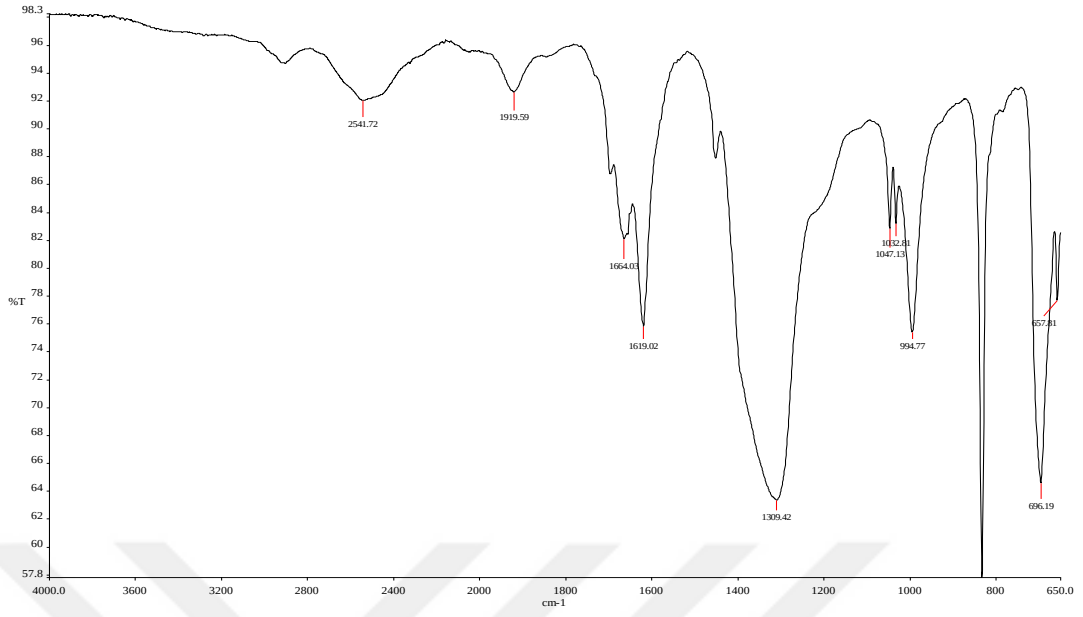
Şekil 40. L2 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



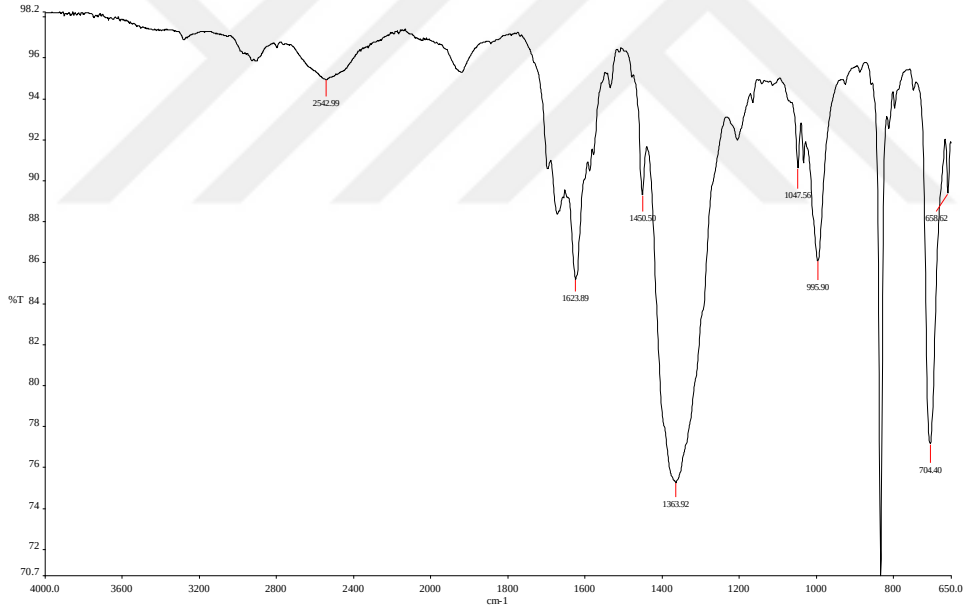
Şekil 41. L3 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



Şekil 42. L4 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu

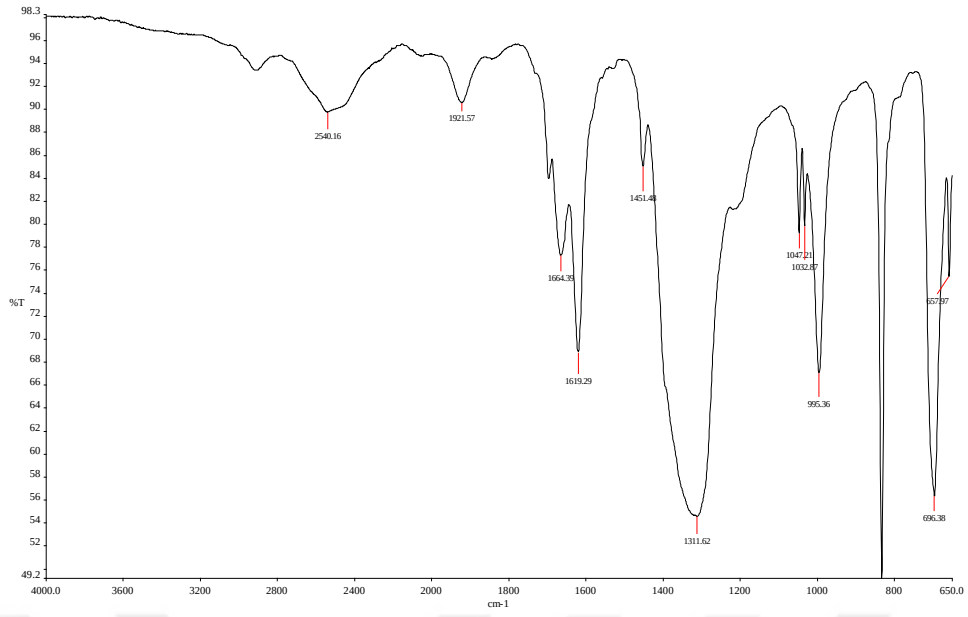


Şekil 43. L5 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu

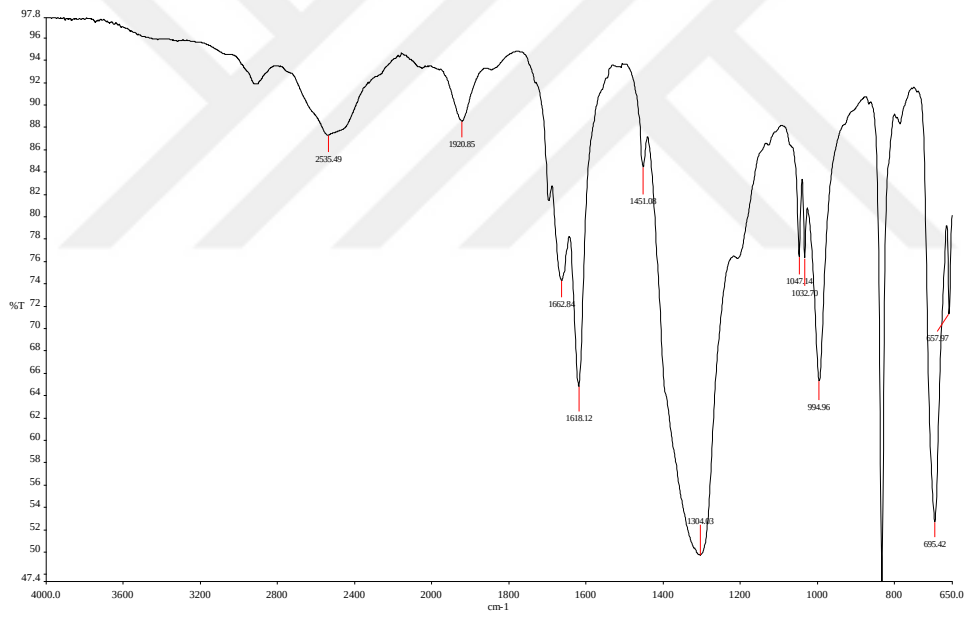


Şekil 44. L6 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu

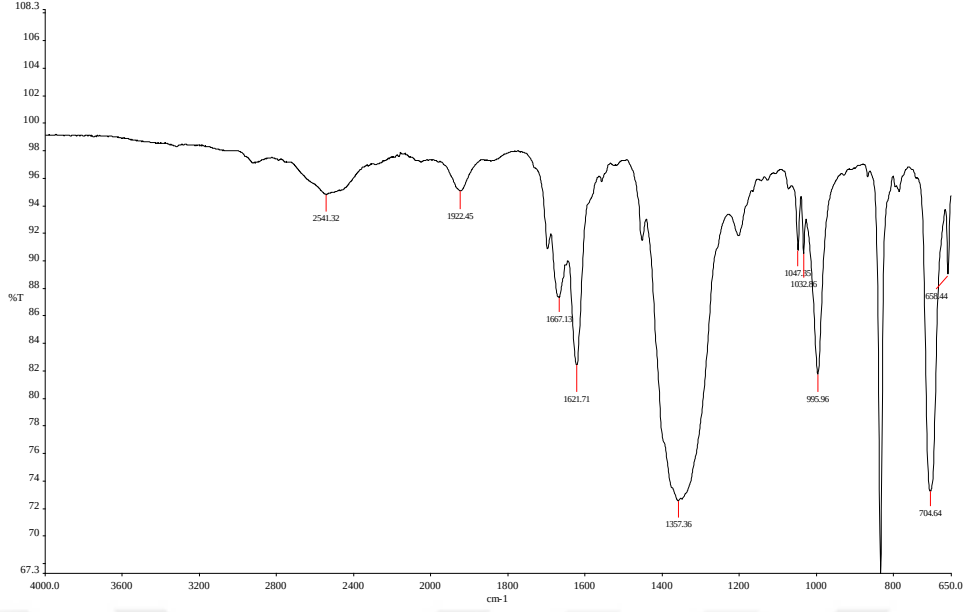
L4, L5 ve L6 nolu formülasyonlara ait FTIR spektrumlarına ait sonuçlarda (**Şekil 42-Şekil 44**); 1665 cm^{-1} : TRZ proteinin amit I omurgasındaki C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik 1657 cm^{-1} 'den 1665 cm^{-1} 'e kaymıştır. 1621 cm^{-1} : DOTA'nın C-C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik 1600 cm^{-1} 'den 1621 cm^{-1} 'e kaymıştır.



Şekil 45. L7 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



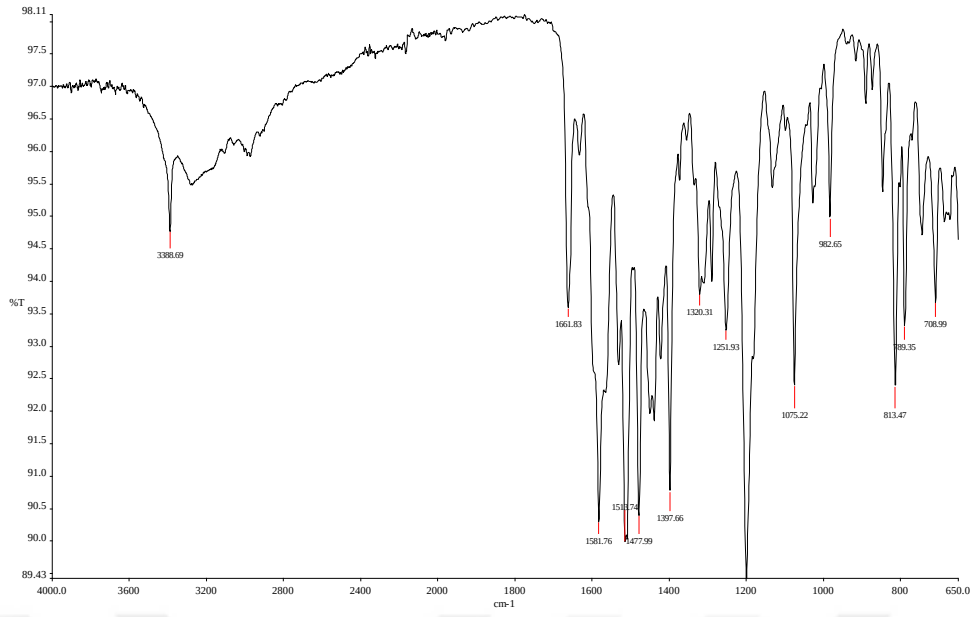
Şekil 46. L8 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



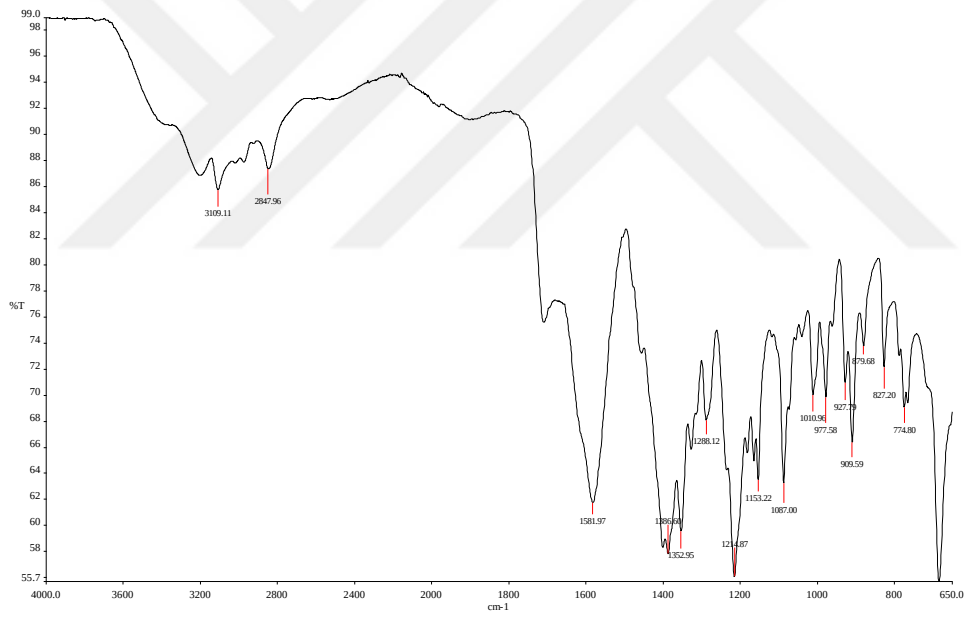
Şekil 47. L9 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu

L7, L8 ve L9 nolu formülasyonlara ait FTIR spektrumlarına ait sonuçlarda (**Şekil 45-Şekil 47**); 1664 cm^{-1} : TRZ proteinin amit I omurgasında C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik 1657 cm^{-1} 'den 1664 cm^{-1} 'e kaymıştır. 1619 cm^{-1} : DTPA'nın C-C gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik 1630 cm^{-1} 'den 1619 cm^{-1} 'e kaymıştır.

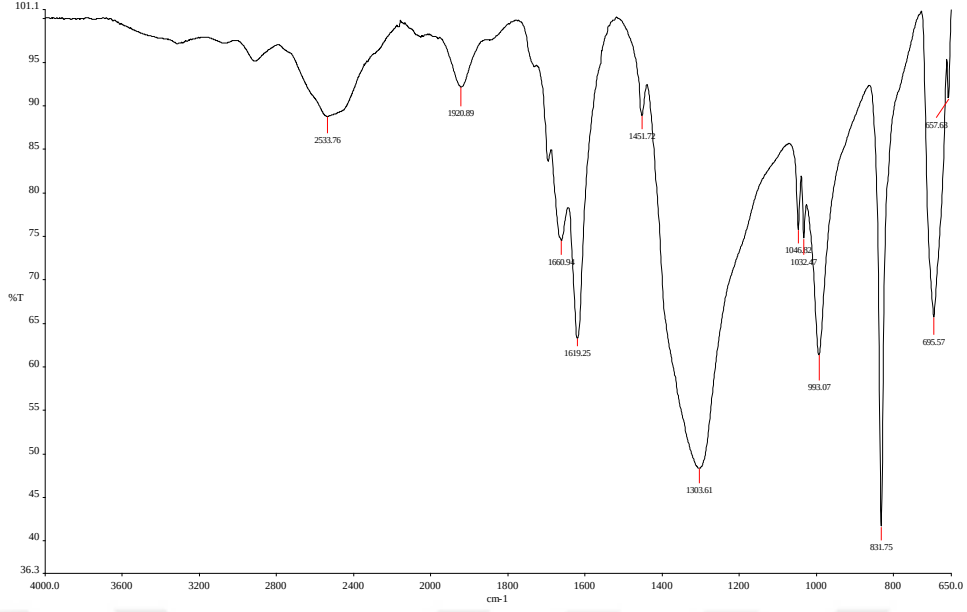
L10, L11 ve L12 nolu formülasyonlara ait FTIR spektrumlarına ait sonuçlarda (**Şekil 48-Şekil 50**); 1662 cm^{-1} : TRZ proteinin amit I omurgasında C=O gerilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik 1657 cm^{-1} 'den 1662 cm^{-1} 'e kaymıştır. 1582 cm^{-1} : N-H eğilme titreşimlerine karşılık gelmektedir. Hazırlanan formülasyonlarda bu pik MAG3 için 1563 cm^{-1} 'den 1582 cm^{-1} 'ye kaymış, TRZ protein için 1571 cm^{-1} 'den 1582 cm^{-1} 'ye kaymıştır.



Şekil 48. L10 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



Şekil 49. L11 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu



Şekil 50. L12 nolu formülasyona ait FTIR spektrumu

3.1.8.3. Nem Tayini Testi Sonuçları

Hazırlanan liyofilize kitlerdeki nem miktarı testi **Yöntem 2.2.8.3**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Yapılan nem tayini testi sonuçlarına göre liyofilize kitlerin içerdiği nem miktarı $0,1 \pm 0,03$ ve $0,92 \pm 0,11$ arasında bulunmuştur (**Tablo 27**), bu değerler izin verilen nem miktarı olan %3'ün altında bulunmuştur.

3.1.8.4. pH Ölçüm Sonuçları

Kit halindeki formülasyonların pH ölçümleri **Yöntem 2.2.8.4**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Kit halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların pH ölçüm sonuçları **Tablo 27**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların pH değerleri $7,9 \pm 0,54$ ve $8,2 \pm 0,54$ arasında bulunmuştur.

Tablo 27. Liyofilize kit halindeki formülasyonlardaki ağırlık değişimi (%), pH, osmatik basınç, TRZ miktar tayini ve çözünme zamanı sonuçları

Formülasyon numarası	Ağırlık değişimi %	pH	Osmotik basınç (mOsmol/kg)	TRZ miktarı (µg/mL)	Çözünme zamanı (saniye)
L 1	0,1±0,03	8,1±1,1	305±11,1	885,98±8,79	55
L 2	0,3±0,09	7,9±0,54	311±10,8	956,78±11,23	58
L 3	0,92±0,11	8,2±0,54	309±9,13	903,45±8,33	57
L 4	0,86±0,02	8,1 ±0,33	312±8,97	905,99±9,83	60
L 5	0,65±0,08	7,99±1,1	308±8,84	990,83±12,03	55
L 6	0,71±0,12	8,1±0,65	321±7,98	900,65±7,45	60
L 7	0,23±0,03	7,9±1,2	320±8,34	910,45±8,56	55
L 8	0,34±0,05	8,1±1,1	318±10,8	990,11±3,12	56
L 9	0,28±0,07	7,94±1,31	315±9,4	900,14±6,5	58
L 10	0,44±0,21	8,1±0,92	307±8,77	901,67±5,4	56
L 11	0,32±0,09	8,2±0,43	322±7,89	964,56±5,09	57
L 12	0,51±0,05	7,98±1,67	317±6,5	982,34±1,13	55

3.1.8.5. İzotoni Testi Sonuçları

Kit halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların osmotik basınçları **Yöntem 2.2.8.5'**de anlatıldığı gibi ölçülmüştür ve sonuçları **Tablo 27'**de verilmiştir. Tüm formülasyonların osmotik basınç değerleri $305 \pm 11,1$ ve $322 \pm 7,89$ arasında bulunmuştur.

3.1.8.6. TRZ Miktar Tayini Sonuçları

Kit halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarındaki TRZ miktarları spektrofotometrik olarak **Yöntem 2.2.8.6'**da anlatıldığı ölçülmüştür ve sonuçları **Tablo 27'**de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır. Pratik olarak bakıldığında formülasyonların içerik miktarları **Tablo 27'**de gösterildiği gibi $885,98 \pm 8,79$ µg ile $990,83 \pm 12,03$ µg arasında bulunmuştur.

3.1.8.7. Çözünme Zamanı Tayini Sonuçları

Yöntem 2.2.8.7'de anlatıldığı gibi çözünme zamanı testi yapılan liyofilize kit halindeki TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların değerlendirme sonuçları **Tablo 27'**de verilmiştir. Tüm formülasyonların çözünme zamanları 55-60 saniye arasında bulunmuştur.

3.1.8.8. Stabilité Sonuçları

Geliştirilen formülasyonların stabilitesini incelemek amacıyla yapılan çalışmalar **Yöntem 2.2.8.8'**de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Formülasyonların fiziksel görünüşleri incelendiğinde gözle görülür herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri **Tablo 28-Tablo 30** arasında gösterilmiştir.

Tablo 28. 5 ± 3 °C de saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansi yel (mV±S S)	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansi yel (mV±S S)	Partikül boyutu (nm±SS)	PDI	Zeta Potansi yel (mV±S S)
L 1	758,4±7,06	0,446±0,13	-9,40±1,25	774,1±28,78	0,13±0,08	-7,2±3,40	728,13±0,76	0,080±0,06	-8,56±6,16
L 2	787,4±17,1	0,353±0,05	-9,50±4,03	699,30±40,90	0,398±0,04	-8,5±2,85	765,1±6,76	0,19±0,03	-7,60±1,19
L 3	904,4±8,12	0,372±0,31	-11,76±3,05	919,01±7,89	0,345±0,02	-10,1±2,78	902,86±0,76	0,15±0,01	-10,43±2,41
L 4	545,0±31,5	0,285±0,124	-6,35±0,221	531,01±9,28	0,365±0,114	-5,4±2,11	495,25±2,77	0,102±0,023	-3,30±0,68
L 5	604,7±38,54	0,279±0,117	-8,48±1,59	681,7±5,48	0,357±0,029	-7,2±1,50	622,5±2,17	0,11±0,046	-7,56±1,2
L 6	693,1±19,22	0,200±0,080	-12,9±2,69	697,6±5,10	0,331±0,050	-12,0±0,265	648,28±83,25	0,23±0,02	-10,13±0,42
L 7	457,5±22,15	0,169±0,296	-1,42±0,471	477,4±11,38	0,219±0,107	-2,1±2,05	483,32±1,92	0,43±0,04	-3,9±0,64
L 8	863,1±14,8	0,114±0,178	-1,2±1,86	872,8±9,35	0,400±0,091	-3,1±0,416	849,4±2,95	0,13±0,035	-3,98±0,21
L 9	966,8±11,9	0,201±0,081	-1,76±0,405	975,2±2,50	0,408±0,106	-3,7±1,18	978,28±0,99	0,32±0,013	-3,1±0,38
L 10	479,6±18,47	0,322±0,069	-11,3±1,31	478,2±14,56	0,428±0,062	-8,1±1,46	424,31±31,91	0,22±0,04	-5,76±3,51
L 11	537,5±20,76	0,383±0,262	-10,8±0,529	529,33±4,37	0,436±0,05	-13,56±3,52	553,1±0,15	0,12±0,03	-12,6±5,06
L 12	692,0±11,9	0,334±0,235	-11,9±0,757	659,75±1,13	0,224±0,037	-10,56±0,72	651,1±3,91	0,15±0,05	-8,0±0,55

Tablo 29. $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ %60 $\pm$ 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)
L 1	758,4 $\pm$ 7,06	0,446 $\pm$ 0,13	-9,40 $\pm$ 1,25	765,12 $\pm$ 8,45	0,11 $\pm$ 0,04	-8,6 $\pm$ 1,2	745,12 $\pm$ 11,2	0,43 $\pm$ 0,13	-9,01 $\pm$ 2,31
L 2	787,4 $\pm$ 17,1	0,353 $\pm$ 0,05	-9,50 $\pm$ 4,03	734,23 $\pm$ 18,08	0,34 $\pm$ 0,2	-7,6 $\pm$ 2,85	765,1 $\pm$ 34,12	0,22 $\pm$ 0,1	-8,11 $\pm$ 2,1
L 3	904,4 $\pm$ 8,12	0,372 $\pm$ 0,30	-11,76 $\pm$ 3,05	869,2 $\pm$ 19,63	0,21 $\pm$ 0,1	-12,1 $\pm$ 1,3	919,03 $\pm$ 21,1	0,15 $\pm$ 0,1	-9,23 $\pm$ 1,12
L 4	545,0 $\pm$ 31,5	0,285 $\pm$ 0,12	-6,35 $\pm$ 0,221	540,23 $\pm$ 10,12	0,24 $\pm$ 0,1	-6,7 $\pm$ 1,3	515,78 $\pm$ 12,34	0,12 $\pm$ 0,1	-7,06 $\pm$ 1,2
L 5	604,7 $\pm$ 38,54	0,279 $\pm$ 0,11	-8,48 $\pm$ 1,59	613,45 $\pm$ 4,65	0,24 $\pm$ 0,1	-8,03 $\pm$ 2,1	630,44 $\pm$ 10,12	0,34 $\pm$ 0,3	-8,13 $\pm$ 0,92
L 6	693,1 $\pm$ 19,22	0,20 $\pm$ 0,08	-12,9 $\pm$ 2,69	680,12 $\pm$ 11,33	0,22 $\pm$ 0,1	-11,8 $\pm$ 1,1	673,77 $\pm$ 22,2	0,45 $\pm$ 0,2	-10,98 $\pm$ 0,88
L 7	457,5 $\pm$ 22,15	0,169 $\pm$ 0,29	-1,42 $\pm$ 0,471	430,14 $\pm$ 20,13	0,44 $\pm$ 0,1	-1,76 $\pm$ 0,15	470,99 $\pm$ 20,11	0,34 $\pm$ 0,1	-2,89 $\pm$ 1,1
L 8	863,1 $\pm$ 14,8	0,114 $\pm$ 0,17	-1,2 $\pm$ 1,86	855,98 $\pm$ 11,13	0,45 $\pm$ 0,1	-2,2 $\pm$ 0,55	870,13 $\pm$ 11,78	0,15 $\pm$ 0,1	-1,23 $\pm$ 0,43
L 9	966,8 $\pm$ 11,9	0,201 $\pm$ 0,08	-1,76 $\pm$ 0,405	970,15 $\pm$ 20,13	0,33 $\pm$ 0,1	-1,67 $\pm$ 0,18	970,45 $\pm$ 12,21	0,28 $\pm$ 0,1	-2,34 $\pm$ 1,1
L 10	479,6 $\pm$ 18,47	0,322 $\pm$ 0,06	-11,3 $\pm$ 1,31	480,54 $\pm$ 11,34	0,29 $\pm$ 0,1	-10,56 $\pm$ 2,3	489,23 $\pm$ 20,9	0,26 $\pm$ 0,1	-10,13 $\pm$ 2,98
L 11	537,5 $\pm$ 20,76	0,383 $\pm$ 0,26	-10,8 $\pm$ 0,529	540,07 $\pm$ 13,45	0,26 $\pm$ 0,1	-10,8 $\pm$ 4,1	560,23 $\pm$ 23,45	0,44 $\pm$ 0,1	-11,8 $\pm$ 2,34
L 12	692,0 $\pm$ 11,9	0,334 $\pm$ 0,235	-11,9 $\pm$ 0,757	649,98 $\pm$ 11,89	0,35 $\pm$ 0,1	-12,34 $\pm$ 0,86	700,12 $\pm$ 20,93	0,45 $\pm$ 0,1	-11,56 $\pm$ 0,34

Tablo 30. $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların başlangıç, 3. ve 6. aya ait partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri

Formülasyonlar	Başlangıç			3.ay			6. ay		
	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)	Partikül boyutu (nm $\pm$ SS)	PDI	Zeta Potansiyel (mV $\pm$ SS)
L 1	758,4 $\pm$ 7,06	0,446 $\pm$ 0,13	-9,40 $\pm$ 1,25	753,23 $\pm$ 24,53	0,424 $\pm$ 0,038	-8,67 $\pm$ 0,303	745,34 $\pm$ 0,76	0,436 $\pm$ 0,039	-8,60 $\pm$ 0,263
L 2	787,4 $\pm$ 17,1	0,353 $\pm$ 0,05	-9,50 $\pm$ 4,03	770,45 $\pm$ 20,12	0,354 $\pm$ 0,058	-7,95 $\pm$ 1,3	780,11 $\pm$ 20,13	0,35 $\pm$ 0,02	-9,12 $\pm$ 2,1
L 3	904,4 $\pm$ 8,12	0,372 $\pm$ 0,31	-11,76 $\pm$ 3,05	915,45 $\pm$ 11,12	0,455 $\pm$ 0,013	-9,89 $\pm$ 2,78	923,34 $\pm$ 16,87	0,475 $\pm$ 0,029	-11,23 $\pm$ 1,03
L 4	545,0 $\pm$ 31,5	0,285 $\pm$ 0,12	-6,35 $\pm$ 0,221	552,34 $\pm$ 11,27	0,23 $\pm$ 0,018	-6,23 $\pm$ 1,76	550,76 $\pm$ 12,87	0,21 $\pm$ 0,044	-7,45 $\pm$ 0,74
L 5	604,7 $\pm$ 38,54	0,279 $\pm$ 0,11	-8,48 $\pm$ 1,59	621,34 $\pm$ 11,21	0,15 $\pm$ 0,045	-8,2 $\pm$ 1,67	612,98 $\pm$ 10,67	0,27 $\pm$ 0,14	-8,12 $\pm$ 0,85
L 6	693,1 $\pm$ 19,22	0,200 $\pm$ 0,08	-12,9 $\pm$ 2,69	680,56 $\pm$ 21,34	0,26 $\pm$ 0,11	-11,9 $\pm$ 1,1	680,34 $\pm$ 12,3	0,43 $\pm$ 0,055	-10,12 $\pm$ 0,45
L 7	457,5 $\pm$ 22,15	0,169 $\pm$ 0,29	-1,42 $\pm$ 0,471	440,99 $\pm$ 34,56	0,33 $\pm$ 0,12	-1,56 $\pm$ 0,15	467,33 $\pm$ 11,9	0,31 $\pm$ 0,03	-2,3 $\pm$ 0,55
L 8	863,1 $\pm$ 14,8	0,114 $\pm$ 0,17	-1,2 $\pm$ 1,86	855,67 $\pm$ 15,87	0,39 $\pm$ 0,033	-2,6 $\pm$ 0,45	860,45 $\pm$ 11,56	0,22 $\pm$ 0,021	-1,23 $\pm$ 0,05
L 9	966,8 $\pm$ 11,9	0,201 $\pm$ 0,081	-1,76 $\pm$ 0,405	980,45 $\pm$ 24,35	0,45 $\pm$ 0,12	-1,98 $\pm$ 0,78	974,56 $\pm$ 34,23	0,28 $\pm$ 0,014	-2,1 $\pm$ 0,43
L 10	479,6 $\pm$ 18,47	0,322 $\pm$ 0,069	-11,3 $\pm$ 1,31	482,34 $\pm$ 21,54	0,34 $\pm$ 0,031	-10,12 $\pm$ 1,23	467,99 $\pm$ 33,45	0,31 $\pm$ 0,05	-10,12 $\pm$ 2,34
L 11	537,5 $\pm$ 20,76	0,383 $\pm$ 0,262	-10,8 $\pm$ 0,52	546,77 $\pm$ 11,23	0,234 $\pm$ 0,05	-11,23 $\pm$ 2,98	529,89 $\pm$ 34,98	0,18 $\pm$ 0,04	-10,84 $\pm$ 3,1
L 12	692,0 $\pm$ 11,9	0,334 $\pm$ 0,235	-11,9 $\pm$ 0,757	701,23 $\pm$ 2,1	0,15 $\pm$ 0,04	-10,88 $\pm$ 2,3	680,56 $\pm$ 22,34	0,24 $\pm$ 0,03	-10,2 $\pm$ 0,24

Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında ölçülen partikül boyutları başlangıçta ölçülen partikül boyutları ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun partikül boyutunun stabilite çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği görülmüştür ($p>0,05$). Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında ölçülen zeta potansiyelleri başlangıçta ölçülen zeta potansiyelleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun zeta potansiyelinin stabilite çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği görülmüştür ($p>0,05$). Tüm formülasyonların saklama süresi ve koşullarında ölçülen PDI değerleri başlangıçta ölçülen PDI değerleri ile istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Her bir formülasyonun PDI değerlerinin stabilite çalışmaları boyunca anlamlı fark göstermediği görülmüştür ($p>0,05$).

Stabilite çalışmalarında ölçülen ve hesaplanan pH ve TRZ miktarları **Tablo 31-Tablo 33**'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır.

6 aylık stabilite sonuçlarına bakıldığında 5 ± 3 °C, 25 ± 5 °C %60± 5 ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların içerik miktarları 883 µg'ın üzerinde, pH değerleri de 7'nin üzerinde bulunmuştur (**Tablo 31-Tablo 33**).

3.1.9. Hücre Kültürü Çalışmaları Sonuçları

3.1.10. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi

Geliştirilen formülasyonların hücreler üzerine etkisi ve uygun doz belirlemesi **Yöntem** Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çözelti halindeki formülasyonların sağlıklı meme hücrelerini taklit eden CRL-10762 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) 24. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 51**'de gösterilmiştir.

Tablo 31. 5 ± 3 °C de saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

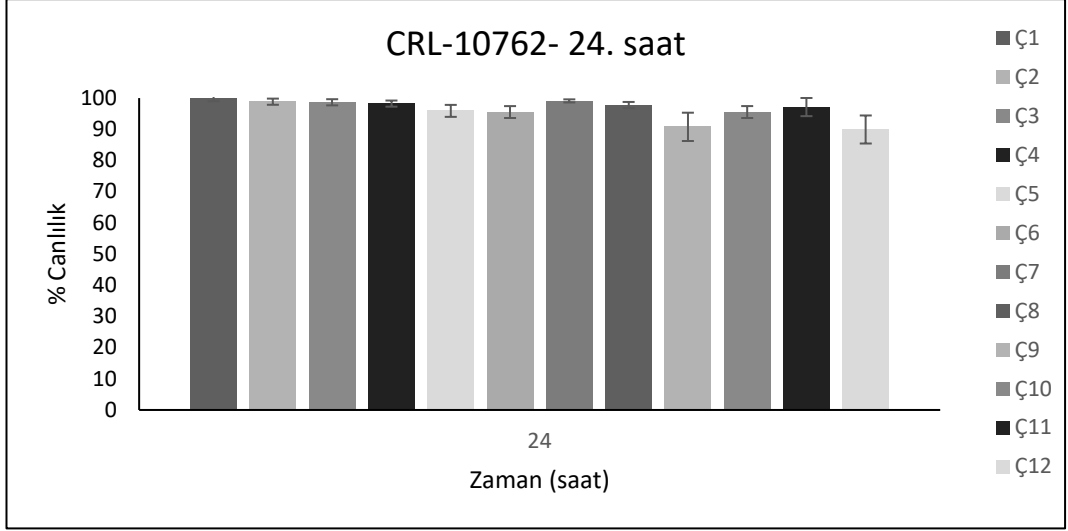
Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı
L 1	8,1±1,1	885,98±8,79	8,2±0,9	870,45 ± 9,89	8,1± 2,3	875,98± 11,12
L 2	7,9±0,54	956,78±11,23	8,1±1,03	960,56 ± 11,23	7,85± 0,5	967,45± 12,34
L 3	8,2±0,54	903,45±8,33	8,1±0,31	904,56 ±10,67	8,2± 0,33	910,45± 9,89
L 4	8,1 ±0,33	905,99±9,83	8,2±0,67	911,23± 11,23	7,99± 1,25	909,23± 21,54
L 5	7,99±1,1	990,83±12,03	8,01±0,41	986,87 ±11,23	7,88± 1,1	984,54± 23,32
L 6	8,1±0,65	900,65±7,45	8,03±1,01	895,45 ± 12,32	8,2± 0,54	880,56± 11,13
L 7	7,9±1,2	910,45±8,56	8,2±0,31	899,42± 11,02	7,9± 0,5	920,78± 9,89
L 8	8,1±1,1	990,11±3,12	7,9±0,65	980,12± 9,89	8,2± 0,3	980,78± 8,9
L 9	7,94±1,31	900,14±6,5	7,89±2,1	895,67± 10,45	8,1± 1,2	905,67± 12,34
L 10	8,1±0,92	901,67±5,4	8,11±0,67	908,48± 39,22	7,87± 0,68	895,15± 30,93
L 11	8,2±0,43	964,56±5,09	7,9±0,55	961,25± 11,3	7,85± 0,1	970,63± 7,9
L 12	7,98±1,67	982,34±1,13	8,1±0,13	980,23± 21,8	8,2± 0,5	990,16± 10,28

Tablo 32. $25 \pm 5^{\circ}\text{C}$ $\%60 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı
L 1	8,1 $\pm$ 1,1	885,98 $\pm$ 8,79	8,2 $\pm$ 0,55	875,65 $\pm$ 5,61	8,4 $\pm$ 0,16	852,19 $\pm$ 7,32
L 2	7,9 $\pm$ 0,54	956,78 $\pm$ 11,23	8,2 $\pm$ 0,3	967,76 $\pm$ 10,45	8,41 $\pm$ 0,91	980,29 $\pm$ 10,02
L 3	8,2 $\pm$ 0,54	903,45 $\pm$ 8,33	8,1 $\pm$ 0,65	895,87 $\pm$ 9,78	7,64 $\pm$ 1,31	909,83 $\pm$ 17,50
L 4	8,1 $\pm$ 0,33	905,99 $\pm$ 9,83	8,2 $\pm$ 0,45	903,45 $\pm$ 11,2	7,39 $\pm$ 0,72	908,98 $\pm$ 19,09
L 5	7,99 $\pm$ 1,1	990,83 $\pm$ 12,03	7,8 $\pm$ 1,1	990,78 $\pm$ 10,54	7,09 $\pm$ 0,95	968,56 $\pm$ 1,64
L 6	8,1 $\pm$ 0,65	900,65 $\pm$ 7,45	8,1 $\pm$ 1,2	895,45 $\pm$ 12,33	8,2 $\pm$ 1,1	901,23 $\pm$ 16,32
L 7	7,9 $\pm$ 1,2	910,45 $\pm$ 8,56	8,1 $\pm$ 1,2	900,33 $\pm$ 9,34	8,2 $\pm$ 0,21	912,34 $\pm$ 6,9
L 8	8,1 $\pm$ 1,1	990,11 $\pm$ 3,12	8,2 $\pm$ 0,24	989,46 $\pm$ 11,09	8,1 $\pm$ 1,1	980,26 $\pm$ 10,65
L 9	7,94 $\pm$ 1,31	900,14 $\pm$ 6,5	7,95 $\pm$ 1,2	904,56 $\pm$ 11,2	7,9 $\pm$ 1,3	891,45 $\pm$ 10,20
L 10	8,1 $\pm$ 0,92	901,67 $\pm$ 5,4	8,2 $\pm$ 0,76	895,65 $\pm$ 6,4	8,1 $\pm$ 0,65	903,98 $\pm$ 12,11
L 11	8,2 $\pm$ 0,43	964,56 $\pm$ 5,09	8,1 $\pm$ 0,45	960,61 $\pm$ 7,8	8,1 $\pm$ 1,2	970,07 $\pm$ 10,64
L 12	7,98 $\pm$ 1,67	982,34 $\pm$ 1,13	7,93 $\pm$ 0,43	978,56 $\pm$ 10,67	7,9 $\pm$ 0,8	981,45 $\pm$ 9,89

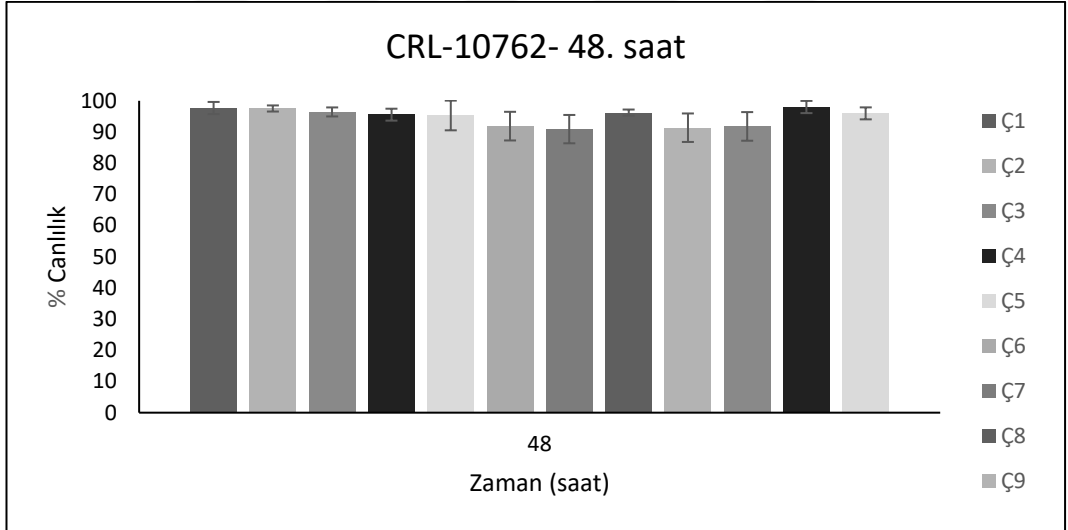
Tablo 33. $40 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 'de $\%75 \pm 5$ bağıl nemde saklanan formülasyonların pH, TRZ miktarları ve standart sapmaları

Formülasyonlar	Başlangıç		3.ay		6.ay	
	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı	pH	TRZ miktarı
L 1	$8,1 \pm 1,1$	$885,98 \pm 8,79$	$8,1 \pm 1,2$	$890,45 \pm 9,12$	$8,2 \pm 1,1$	$883,45 \pm 11,2$
L 2	$7,9 \pm 0,54$	$956,78 \pm 11,23$	$7,9 \pm 0,83$	$964,54 \pm 10,32$	$7,9 \pm 0,67$	$970,23 \pm 9,86$
L 3	$8,2 \pm 0,54$	$903,45 \pm 8,33$	$8,1 \pm 1,1$	$897,45 \pm 8,45$	$8,1 \pm 1,1$	$900,34 \pm 8,34$
L 4	$8,1 \pm 0,33$	$905,99 \pm 9,83$	$8,21 \pm 0,13$	$912,98 \pm 10,03$	$8,2 \pm 0,45$	$910,56 \pm 8,56$
L 5	$7,99 \pm 1,1$	$990,83 \pm 12,03$	$7,89 \pm 1,03$	$987,45 \pm 11,04$	$8,03 \pm 0,89$	$980,66 \pm 22,34$
L 6	$8,1 \pm 0,65$	$900,65 \pm 7,45$	$8,2 \pm 1,02$	$905,67 \pm 7,89$	$8,2 \pm 0,76$	$895,45 \pm 10,81$
L 7	$7,9 \pm 1,2$	$910,45 \pm 8,56$	$7,8 \pm 1,1$	$900,56 \pm 9,19$	$7,9 \pm 0,8$	$908,22 \pm 11,45$
L 8	$8,1 \pm 1,1$	$990,11 \pm 3,12$	$8,2 \pm 0,78$	$987,45 \pm 8,12$	$8,2 \pm 0,56$	$993,21 \pm 10,01$
L 9	$7,94 \pm 1,31$	$900,14 \pm 6,5$	$7,98 \pm 1,43$	$903,45 \pm 8,79$	$8,1 \pm 0,55$	$910,45 \pm 8,04$
L 10	$8,1 \pm 0,92$	$901,67 \pm 5,4$	$8,2 \pm 0,55$	$899,93 \pm 4,51$	$8,2 \pm 0,5$	$895,56 \pm 12,4$
L 11	$8,2 \pm 0,43$	$964,56 \pm 5,09$	$8,1 \pm 0,45$	$960,44 \pm 9,45$	$8,1 \pm 0,41$	$965,56 \pm 6,7$
L 12	$7,98 \pm 1,67$	$982,34 \pm 1,13$	$7,95 \pm 1,31$	$990,23 \pm 5,89$	$8,05 \pm 0,76$	$985,76 \pm 11,2$



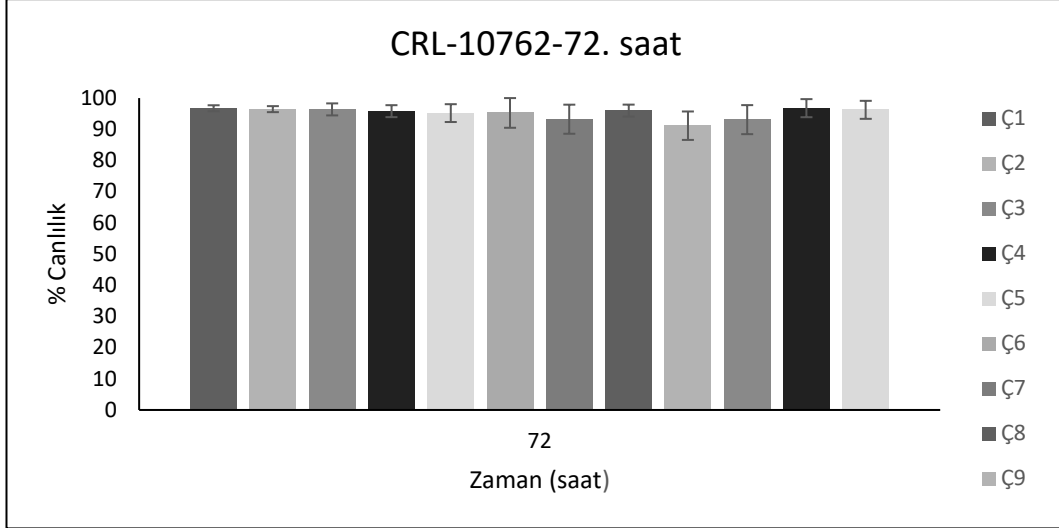
Şekil 51. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı

Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) 48. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 52**'de gösterilmiştir.



Şekil 52. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı

Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) 72. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 53**'de gösterilmiştir.



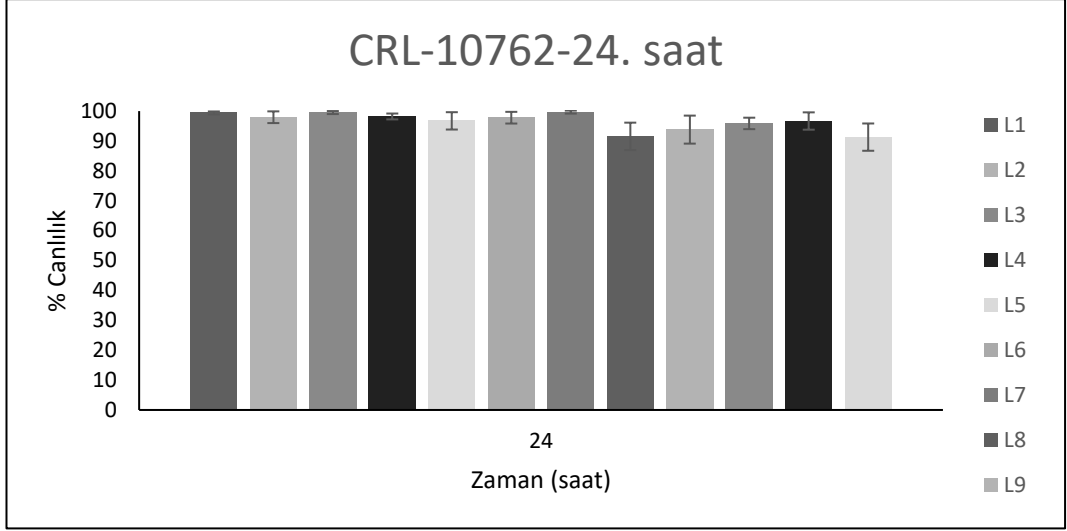
Şekil 53. Çözelti halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı

Liyofilize kit halindeki formülasyonların sağlıklı meme hücrelerini taklit eden CRL-10762 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Liyofilize kit halinde geliştirilen formülasyonların (L1-L12) 24. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 54'**de gösterilmiştir.

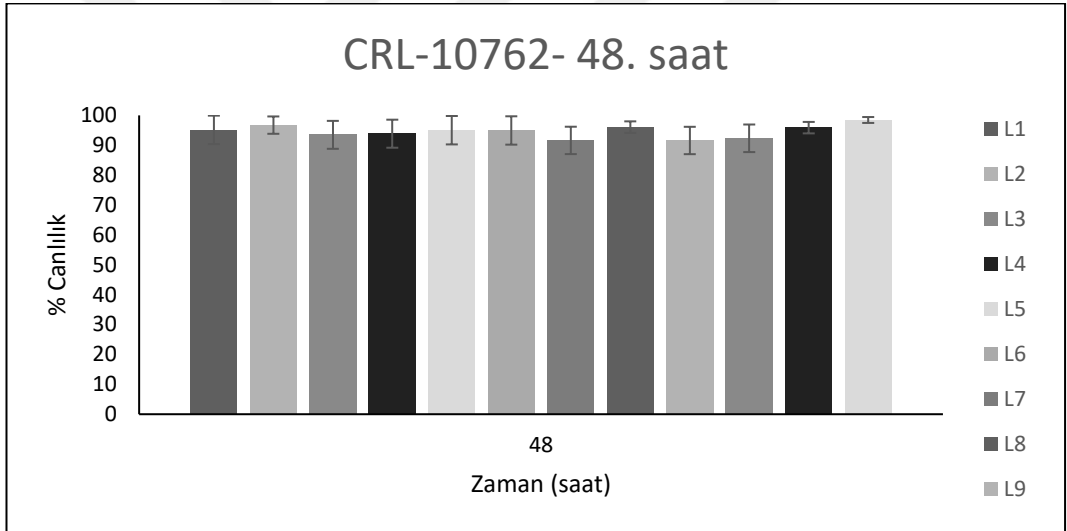
Liyofilize kit halinde geliştirilen formülasyonların (L1-L12) 48. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 55'**de gösterilmiştir.

Liyofilize kit halinde geliştirilen formülasyonların (L1-L12) 72. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 56'**de gösterilmiştir.

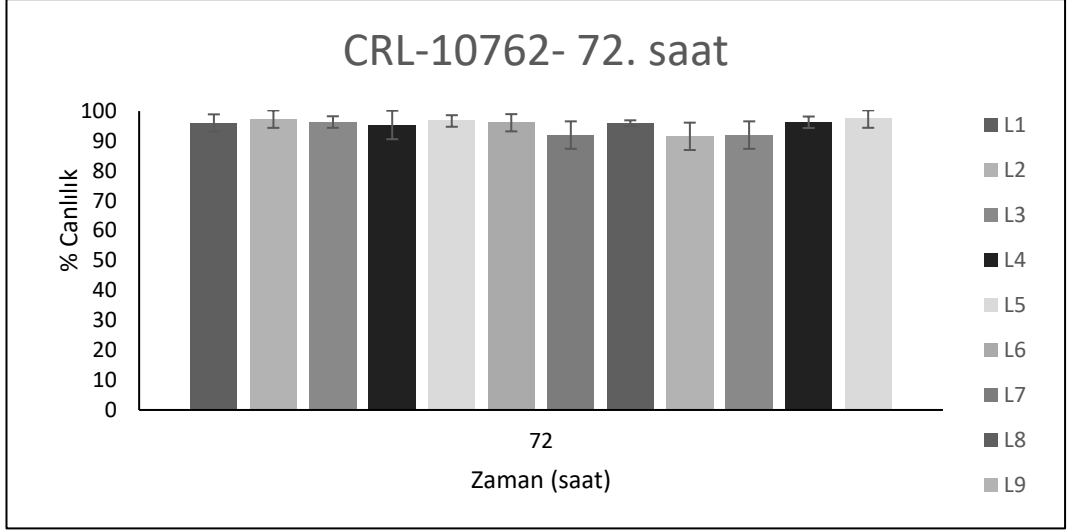
Çözelti halindeki formülasyonların meme kanseri hücrelerini taklit eden MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) 24. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 57'**de gösterilmiştir.



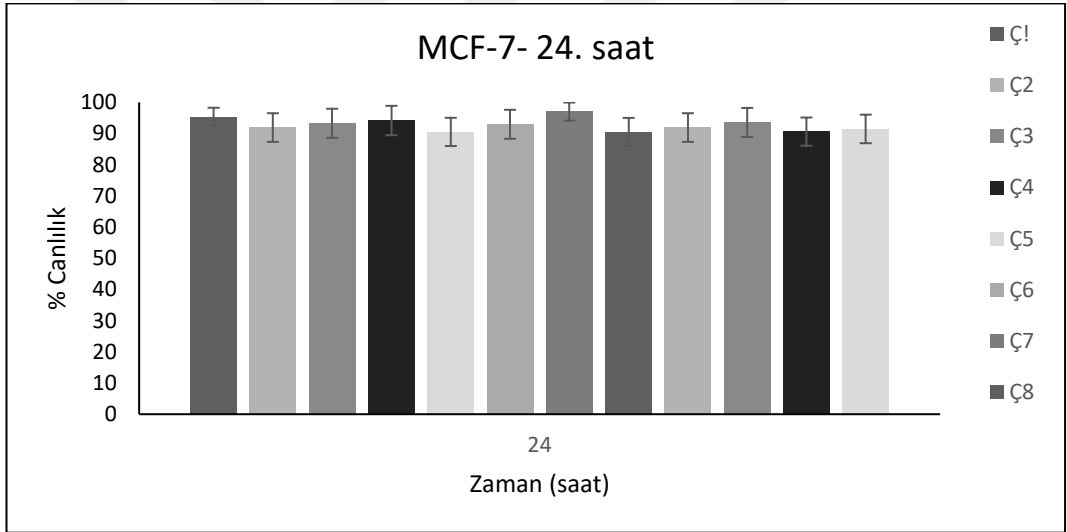
Şekil 54. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı



Şekil 55. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı

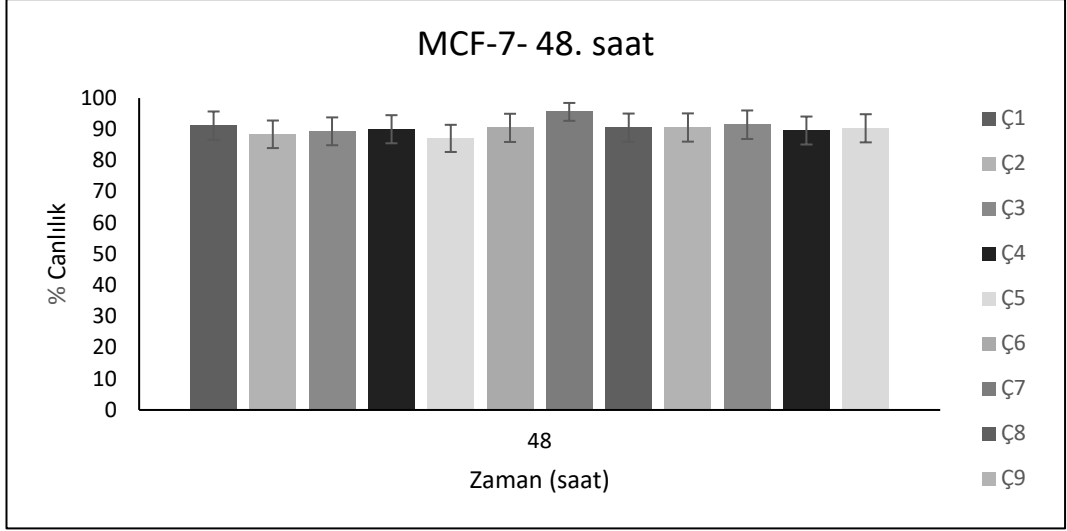


Şekil 56. Liyofilize kit halindeki formülasyonların CRL-10762 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı



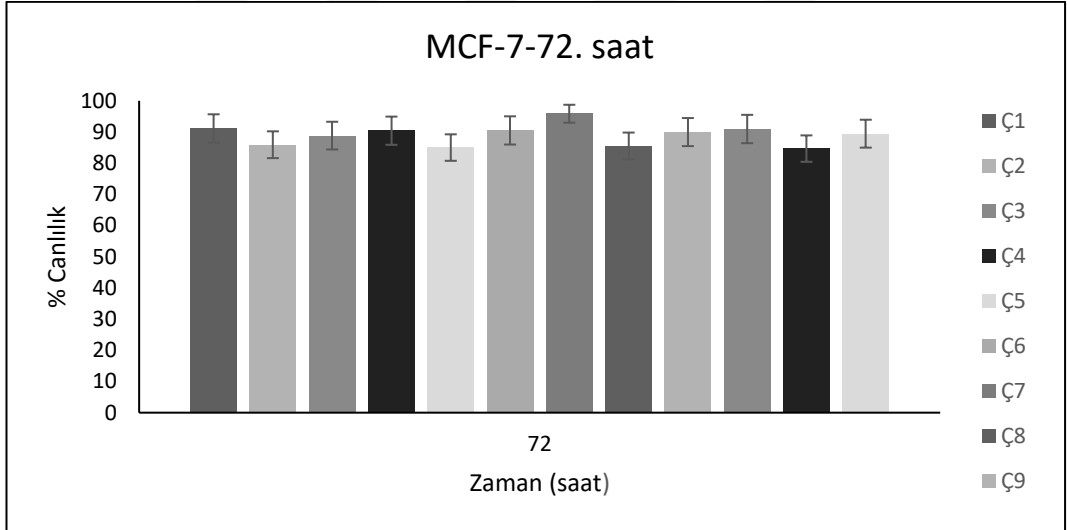
Şekil 57. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı

Çözelti halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların 48. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 58**'da gösterilmiştir.



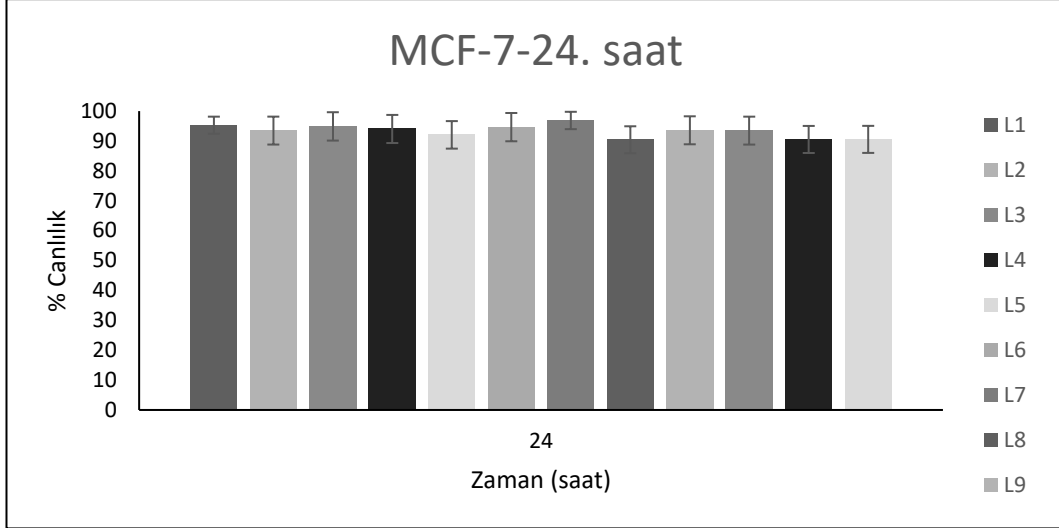
Şekil 58. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı

Çözelti halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların 72. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 59**'da gösterilmiştir.



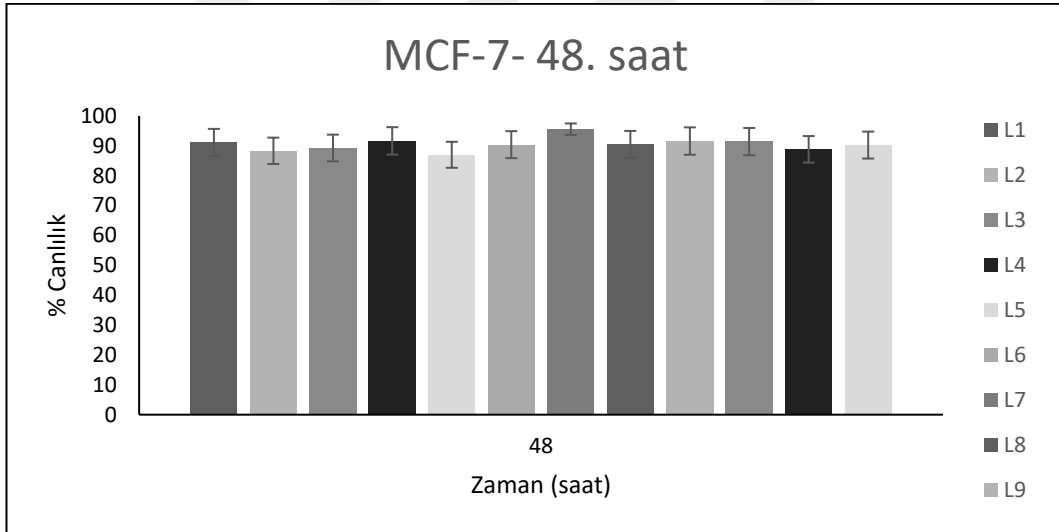
Şekil 59. Çözelti halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı

Liyofilize kit halindeki formülasyonların meme kanseri hücrelerini taklit eden MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Liyofilize kit halinde geliştirilen formülasyonların (L1-L12) 24. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 60**'de gösterilmiştir.



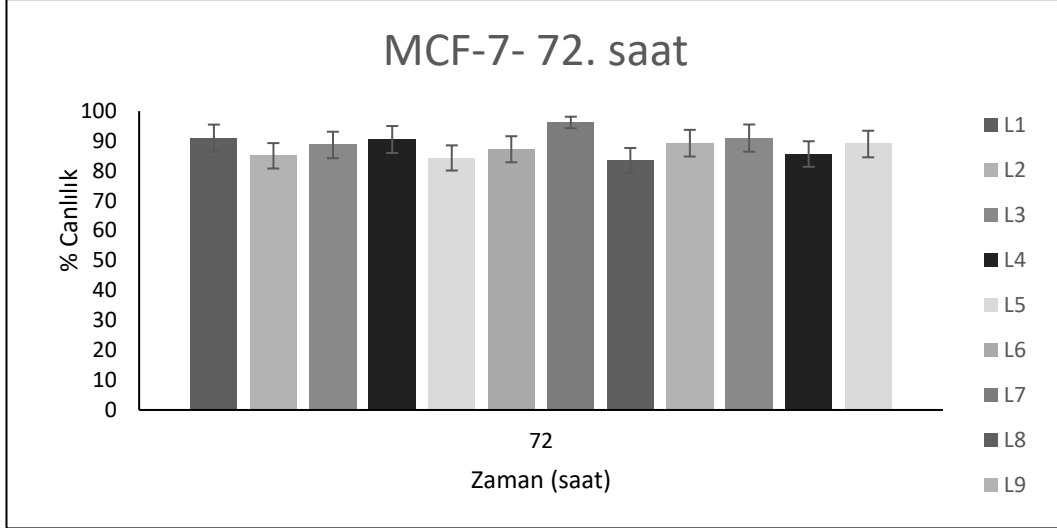
Şekil 60. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 24. saatteki hücre canlılığı

Liyofilize kit halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların 48. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 61**'de gösterilmiştir.



Şekil 61. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatteki hücre canlılığı

Liyofilize kit halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların 72. saatte hücre canlılığı sonuçları **Şekil 62**'de gösterilmiştir.



Şekil 62. Liyofilize kit halindeki formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatteki hücre canlılığı

Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) CRL-10762 hücreleri üzerinde 24., 48. ve 72. saatlerde %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 51-Şekil 53). Liyofilize kit halindeki formülasyonların (L1-L12) CRL-10762 hücreleri üzerinde 24., 48. ve 72. saatlerde %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 54-Şekil 56). 1:10 TRZ: şelat ajanı içeren çözelti (Ç2, Ç5, Ç8, Ç11) ve liyofilize kit halindeki formülasyonların (L2, L5, L8, L11) 72 saat boyunca CRL-10762 hücrelerinde %95'in üzerinde hücre canlılık oranına sahip olduğu görülmüştür.

Çözelti halindeki formülasyonların meme kanseri hücrelerini taklit eden MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri araştırılmıştır. Çözelti halinde geliştirilen formülasyonların (Ç1-Ç12) 24. saatte %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 57). Çözelti halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren Ç2, Ç5, Ç8 ve Ç11 nolu formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatte %85-89 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (Şekil 58). Diğer formülasyonların (Ç1, Ç3, Ç4, Ç6, Ç7, Ç9, Ç10 ve Ç12) 48. saatte %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (Şekil 58). Çözelti halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren Ç2, Ç5, Ç8 ve Ç11 nolu

formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatte %84-85 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (**Şekil 59**). Diğer formülasyonların (Ç1, Ç3, Ç4, Ç6, Ç7, Ç9, Ç10 ve Ç12) 72. saatte %88-91 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (**Şekil 59**).

Liyofilize kit halinde geliştirilen formülasyonların (L1-L12) MCF-7 hücrelerinde 24. saatte %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (**Şekil 60**). Liyofilize kit halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren **L2, L5, L8 ve L11** nolu formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 48. saatte %86-89 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (**Şekil 61**). Diğer formülasyonların (L1, L3, L4, L6, L7, L9, L10 ve L12) 48. saatte %90'nın üzerinde hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında herhangi bir azalmaya neden olmadığı belirlenmiştir (**Şekil 61**). Liyofilize kit halinde geliştirilen 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren **L2, L5, L8 ve L11** nolu formülasyonların MCF-7 hücrelerinde 72. saatte %83-85 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (**Şekil 62**). Diğer formülasyonların (L1, L3, L4, L6, L7, L9, Ç10 ve Ç12) 72. saatte %87-91 hücre canlılığı oranına sahip olduğu ve hücre canlılığında bir azalmaya neden olduğu belirlenmiştir (**Şekil 62**).

3.1.11. Mikrobiyolojik Çalışmaların Sonuçları

3.1.11.1. Sterilite Testi Sonuçları

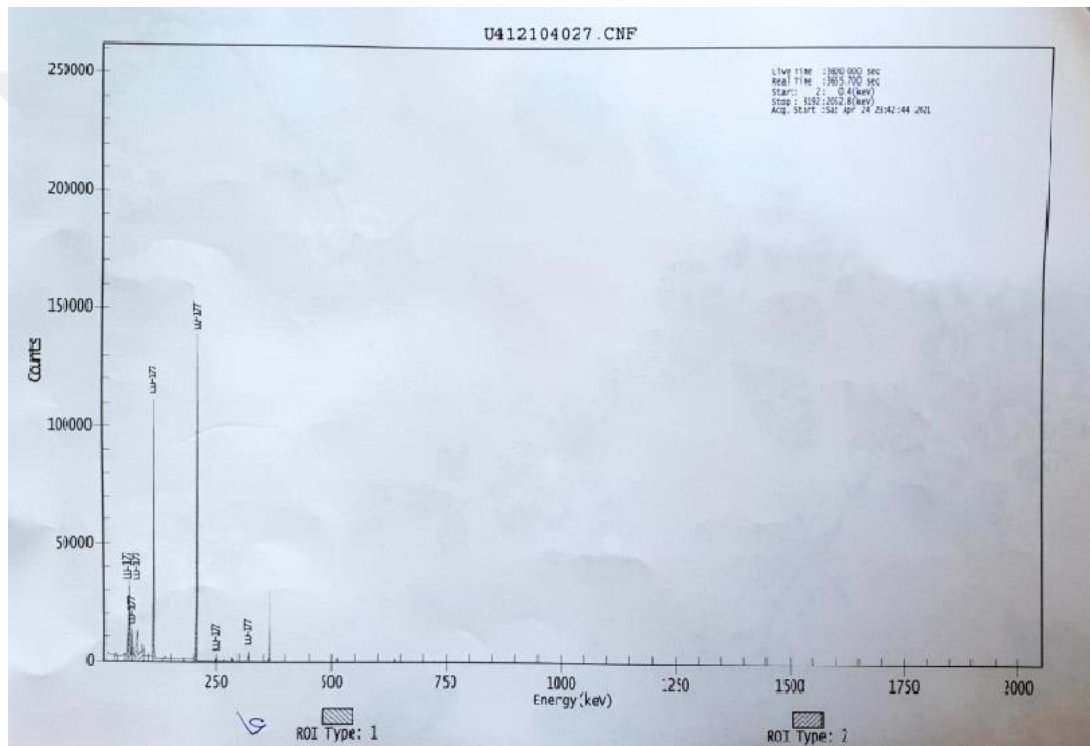
Yöntem 2.2.11.1'de anlatıldığı gibi yapılan sterilite testlerinde, bekleme süresi sonunda besi yerlerinde herhangi bir mikroorganizma üremesinin olmadığı görülmüş ve hazırlanan formülasyonların steril olduğuna karar verilmiştir.

3.1.11.2. Pirojenite Testi

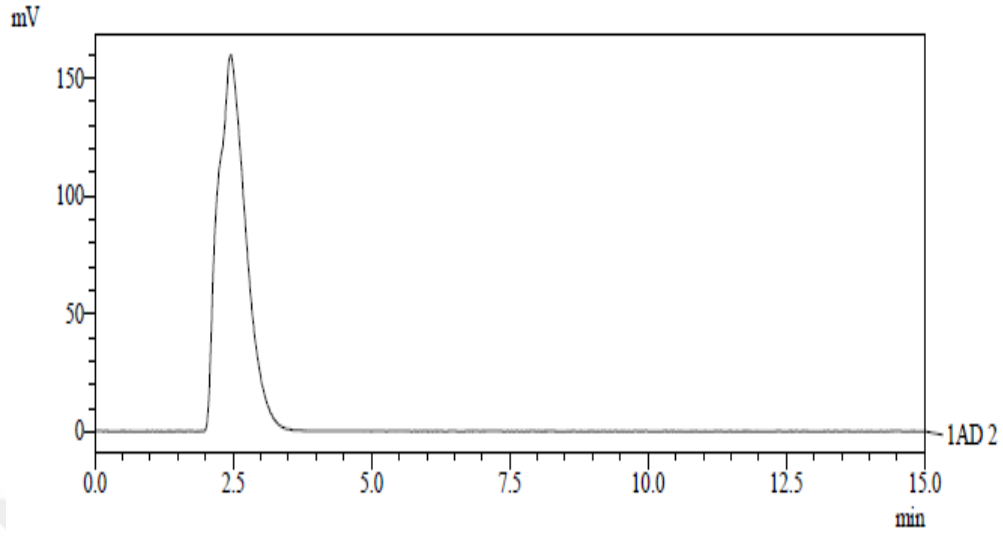
Yöntem 2.2.11.2'de anlatıldığı gibi yapılan pirojenite testleri sonucunda kontrol tüplerinde ve örnek tüplerinde jel oluşmadığı gözlenmiştir.

3.1.12. Radyoişaretleme Çalışmaları

Radyoişaretleme çalışmaları **Yöntem 2.2.12**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan taşıyıcı içermeyen Lu-177 çözeltisinin gama spektrumu NaI (Tl) sintilasyon detektörü içeren çok kanallı analizöre sahip gama ışını spektroskopisi ile alınmıştır. Lu-177'ye ait gama spektrumu **Şekil 63**'de gösterilmiştir. Ayrıca Lu-177'ye ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonuçları **Şekil 64**'de gösterilmiştir. **Yöntem 2.2.12**'de belirtildiği gibi hazırlanan Lu-177-DTPA, Lu-177-EDTA, Lu-177-DOTA ve Lu-177-MAG3'e ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonuçları **Şekil 65-Şekil 68**'de gösterilmiştir.

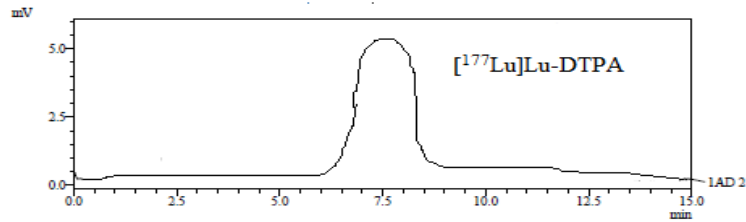


Şekil 63. Lu-177'ye ait gama spektrumu



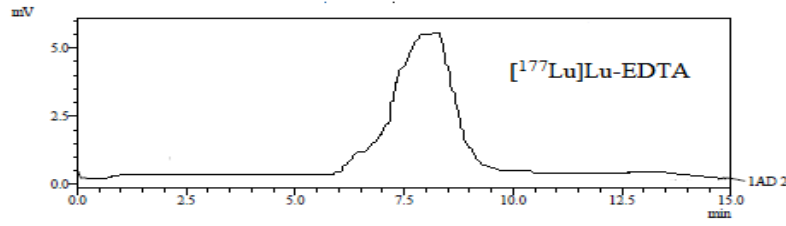
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %
1	Serbest Lu ⁺³	2,38	4560301	100
Total	-	-	4560301	100

Şekil 64. Lu-177'e ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu



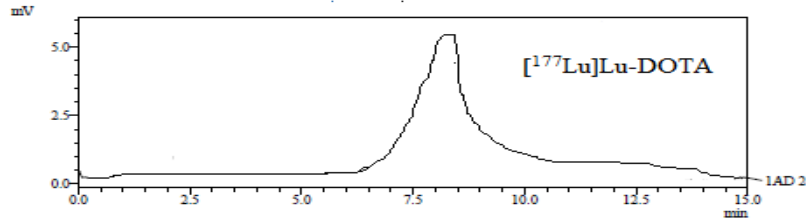
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %
1	[¹⁷⁷ Lu]Lu-DTPA	7,08	456709	100
Total	-	-	456709	100

Şekil 65. Lu-177-DTPA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu



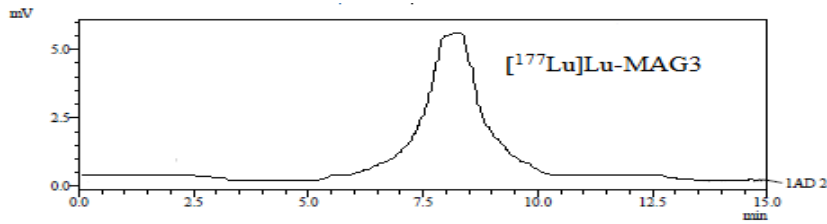
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %
1	[¹⁷⁷ Lu]Lu-EDTA	8,01	435099	100
Total	-	-	435099	100

Şekil 66. Lu-177-EDTA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu



Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %
1	[¹⁷⁷ Lu]Lu-DOTA	7,98	442087	100
Total	-	-	442087	100

Şekil 67. Lu-177-DOTA'ya ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu



Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %
1	[¹⁷⁷ Lu]Lu-MAG3	8,52	430781	100
Total	-	-	430781	100

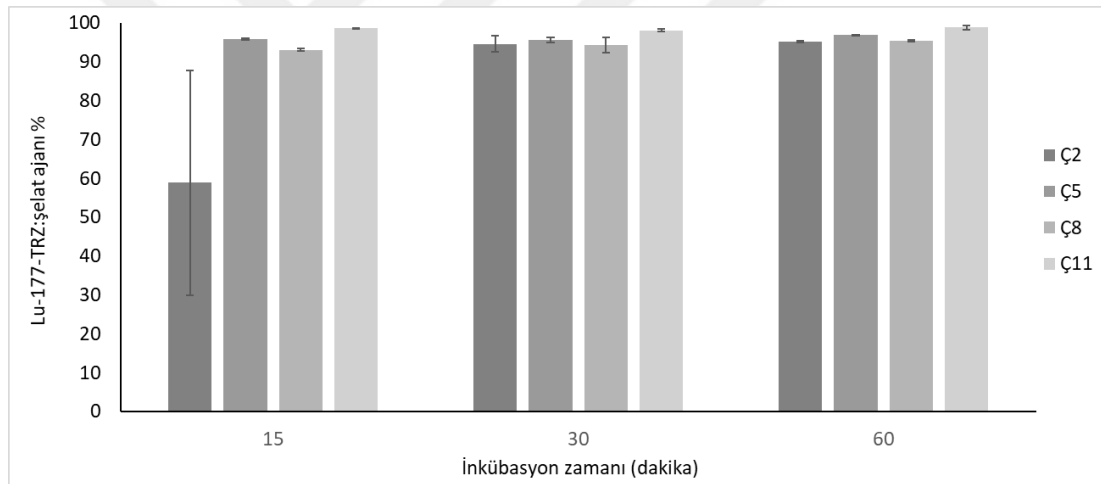
Şekil 68. Lu-177-MAG3'e ait RP-HPLC kromatogramı ve analiz sonucu

Lu-177 ile radyoişaretlenmiş şelat yapıcı ajanların kromatogramları, Lu-177 kromatogramından farklılık göstermektedir. Lu-177, 2,38 dakikada pik verirken; Lu-177 ile radyoişaretlenmiş şelat yapıcı ajanlar 7. dakikadan itibaren pik vermeye başlamıştır.

3.1.12.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmalarının Sonuçları

3.1.12.1.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem 2.2.12.1.1’de anlatıldığı gibi farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen formülasyonların radyoişaretleme verimi doz kalibratöründe radyoaktivite sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretleme sonuçları **Tablo 34** ve **Şekil 69**’de belirtilmiştir.



Şekil 69. Farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen Lu-177-TRZ: şelat ajan radyoişaretleme verimi yüzdeleri

Tablo 34. Radyoişaretlemeden sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda Lu-177-TRZ: şelat ajanı formülasyonlarının radyoişaretleme verimi yüzdeleri ve içerdiği serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

Formülasyon		15	30	60
Ç2	Radyoişaretleme Verimi (%)	58,86±28,99	94,58±2,05	95,24±0,16
	Serbest Lu-177 (%)	35,22±32,19	0,53±0,26	0,33±0,071
	Kolloidal Lu-177 (%)	5,91±3,55	4,89±1,99	4,44±0,20
Ç5	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,87±0,26 9	95,61±0,63	96,92±0,095
	Serbest Lu-177 (%)	1,77±0,048	1,45±0,25	0,47±0,05
	Kolloidal Lu-177 (%)	2,36±0,29	2,93±0,62	2,61±0,09
Ç8	Radyoişaretleme Verimi (%)	93,09±0,36	94,26±1,95	95,39±0,13
	Serbest Lu-177 (%)	1,81±0,64	1,53±0,057	0,89±0,11
	Kolloidal Lu-177 (%)	5,09±0,32	4,21±1,94	3,72±0,03
Ç11	Radyoişaretleme Verimi (%)	98,66±0,08	98,11±0,28	98,82±0,55
	Serbest Lu-177 (%)	0,954±0,071	0,90±0,36	0,55±0,23
	Kolloidal Lu-177 (%)	0,39±0,015	0,99±0,08	0,62±0,33

15 dakika inkübasyona bırakılan Ç2 formülasyonun radyoişaretleme verimi %58,86 oranıyla en düşük değer olarak bulunmuştur. 60 dakika inkübasyona bırakılan tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95'in üzerinde bulunmuştur.

3.1.12.1.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

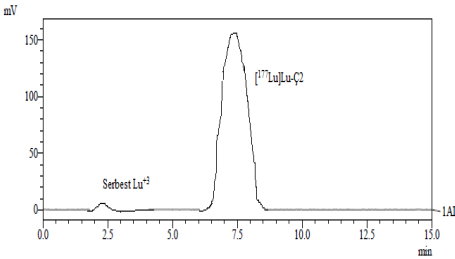
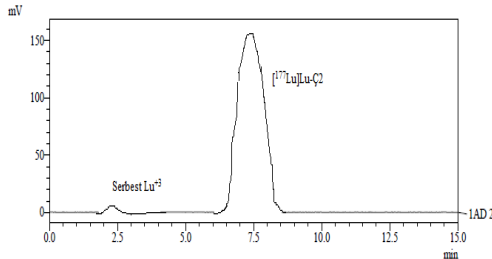
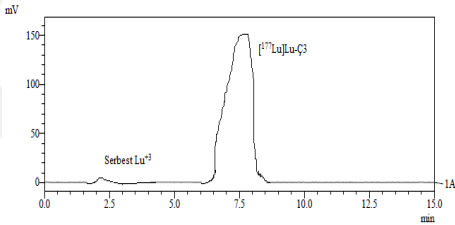
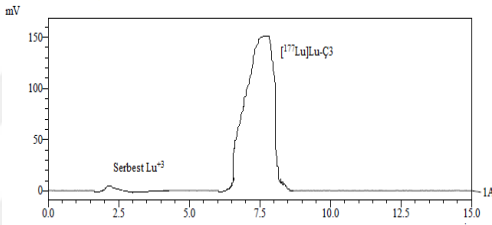
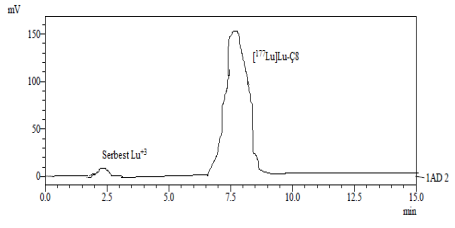
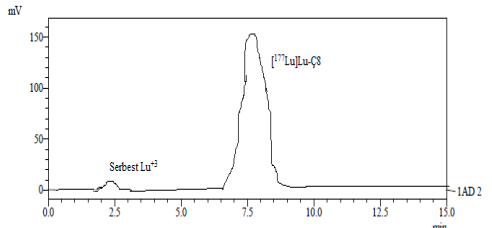
Yöntem 2.2.12.1.2'de anlatıldığı gibi yapılan işaretleme çalışmalarında pH'nın işaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örnekler doz kalibratöründe sayım yapılarak radyoişaretleme verimleri hesaplanmıştır. Radyoaktivite sayımları yanı sıra kalite kontrolde alınan örneklerin 0. ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve geliştirilen radyofarmasötiklerin kromatogramları da değerlendirilmiştir. pH 7 için yapılan çalışmaların sonuçları **Tablo 35** ve RP-HPLC sonuçları **Şekil 70**'de; pH 5 için yapılan çalışmaların sonuçları **Tablo 36** ve RP-HPLC sonuçları **Şekil 71**'de; pH 9 için yapılan çalışmaların sonuçları **Tablo 37** ve RP-HPLC sonuçları **Şekil 72**'de gösterilmiştir.

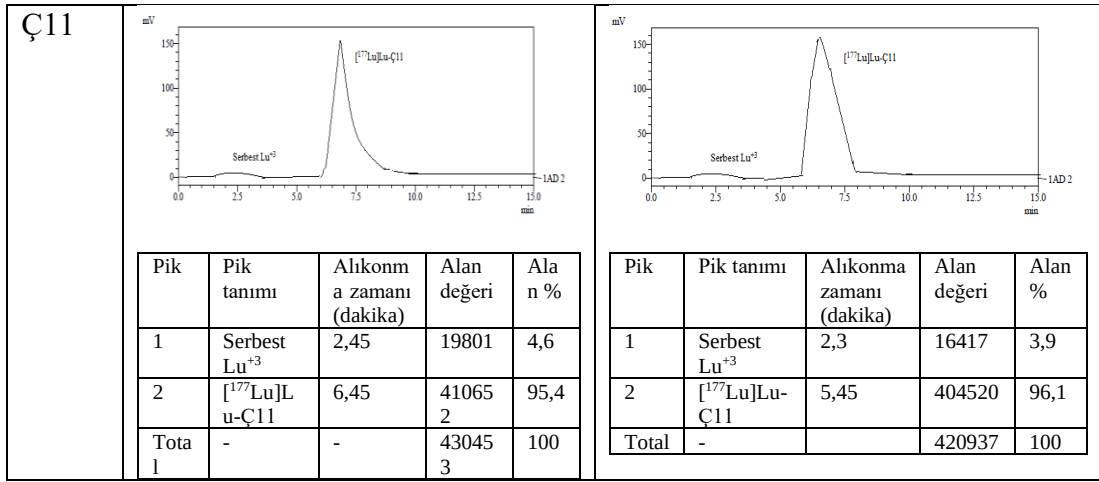
Doz kalibratöründe yapılan ölçümler sonucunda pH 7'de hazırlanan Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 7 gün boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur (**Tablo 35**). Ç2 ve Ç8 formülasyonları başlangıçta ve 1. günün sonunda %95 üzerinde 3, 5 ve 7. günlerde ise radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. RP-HPLC sonuçlarına göre ise başlangıçta tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. 7. günde yapılan analizlere göre Ç2 formülasyonunun radyoişaretleme verimi %90'nın üzerinde bulunurken, diğer formülasyonların radyoişaretleme veriminin %95'in üzerinde olduğu bulunmuştur (**Şekil 70**).

Doz kalibratöründe yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlara göre; pH 5'de hazırlanan formülasyonlardan en düşük radyoişaretleme verimi %50 civarında Ç8 formülasyonunda bulunmuştur. Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri %70 ve üzerinde bulunurken; en yüksek radyoişaretleme verimi Ç11 formülasyonunun başlangıç zamanında elde edilmiştir (%81,51) (**Tablo 36**). Elde edilen RP-HPLC sonuçları doz kalibratöründe hesaplanan radyoişaretleme verim değerleriyle benzerlik göstermiştir (**Şekil 71**).

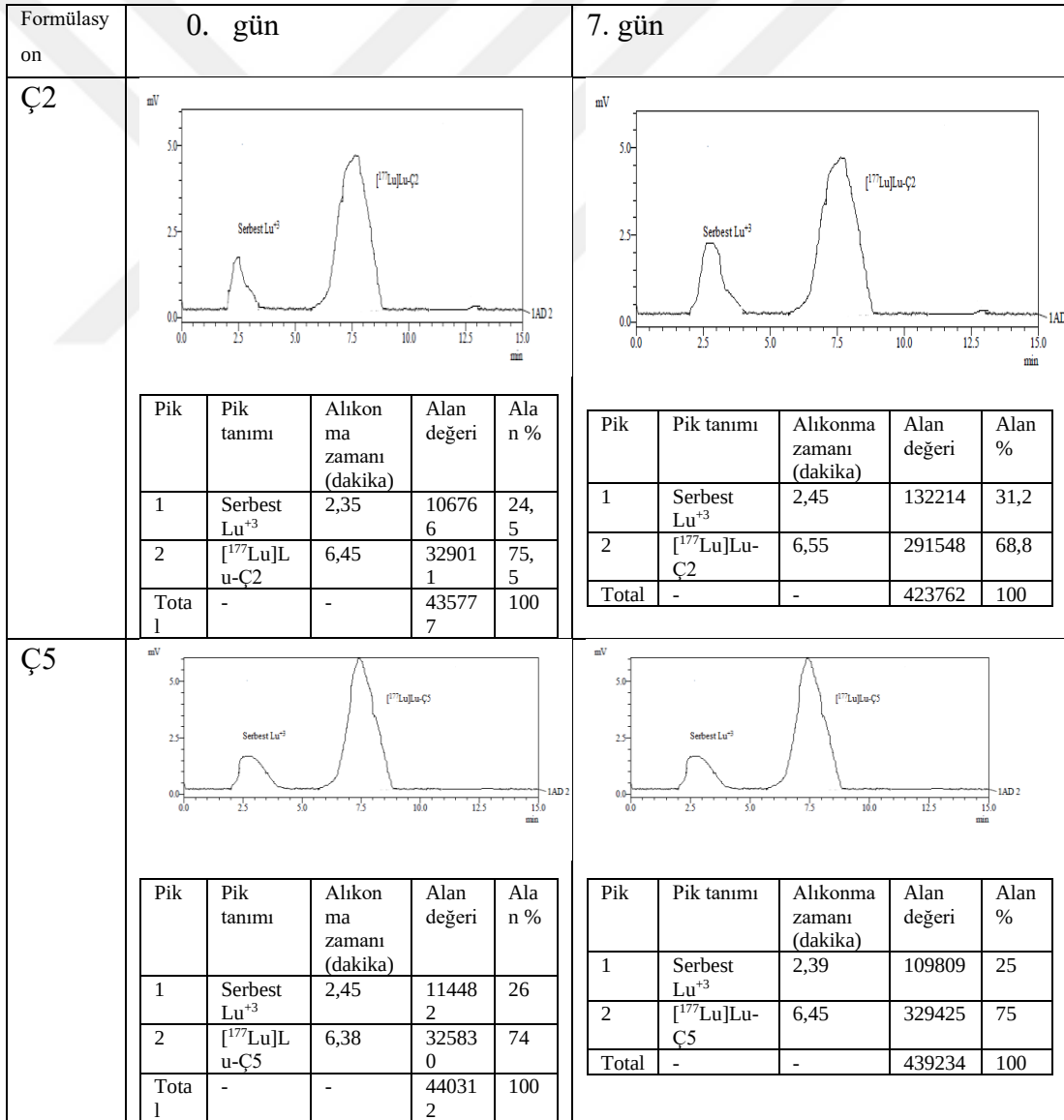
Tablo 35. pH 7’de hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

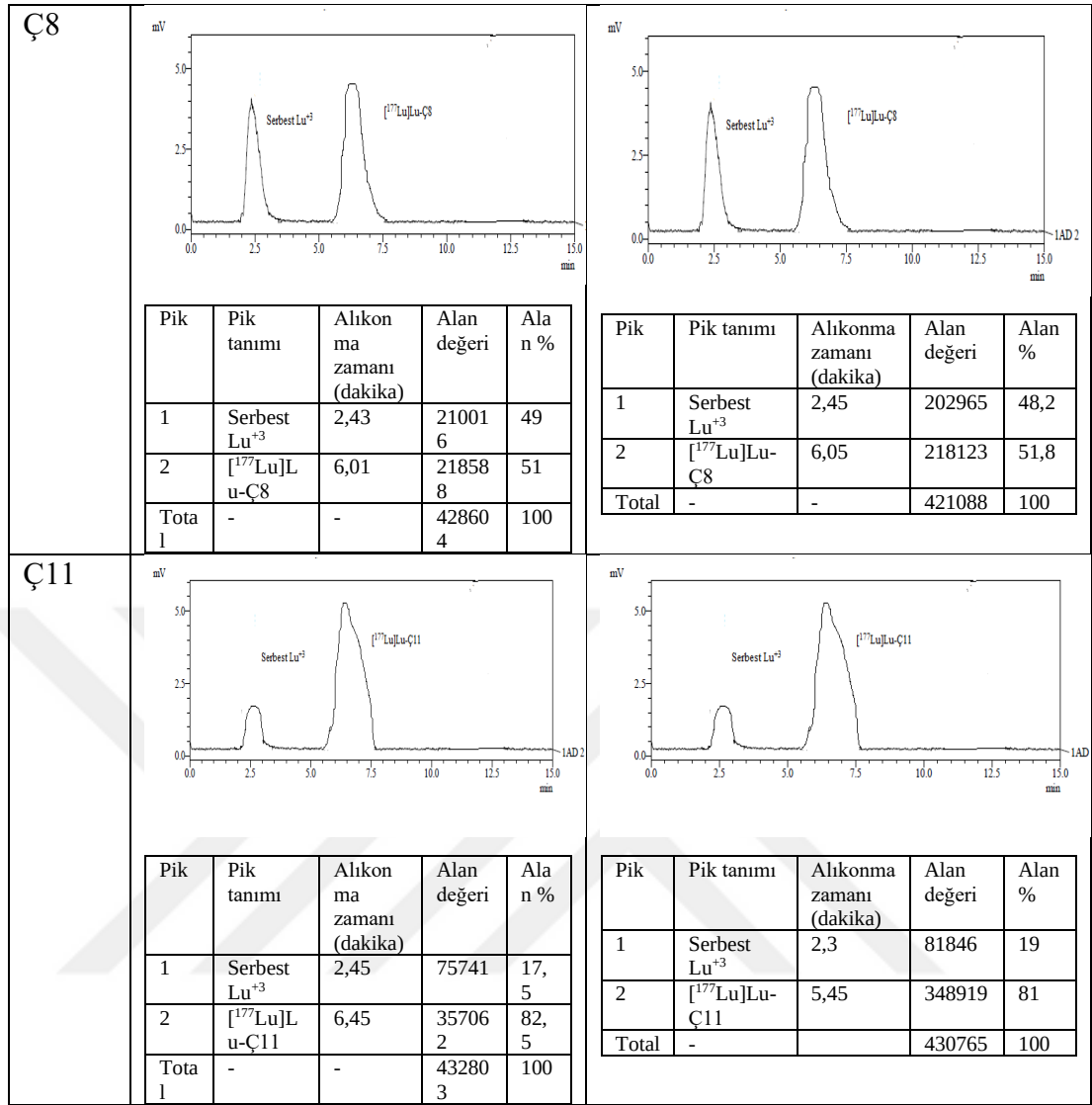
Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Ç2	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,18±0,14	95,31±0,03	94,63±0,31	93,71±0,16	93,69±0,79
	Serbest Lu-177 (%)	0,38±0,17	0,41±0,098	0,51±0,130	0,52±0,089	0,55±0,076
	Kolloidal Lu-177 (%)	4,44±0,20	4,28±0,12	4,86±0,44	5,77±0,23	5,76±0,78
Ç5	Radyoişaretleme Verimi (%)	96,92±0,09	97,08±0,11	97,23±0,25	97,38±0,25	97,04±0,40
	Serbest Lu-177 (%)	0,46±0,054	0,42±0,052	0,46±0,09	0,51±0,11	0,56±0,07
	Kolloidal Lu-177 (%)	2,61±0,09	2,50±0,06	2,30±0,17	2,11±0,15	2,39±0,34
Ç8	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,40±0,13	95,59±0,23	94,26±0,86	93,60±0,29	93,23±0,42
	Serbest Lu-177 (%)	0,88±0,11	0,82±0,12	1,19±0,25	1,41±0,13	1,51±0,26
	Kolloidal Lu-177 (%)	3,72±0,03	3,59±0,12	4,54±0,79	4,99±0,33	5,26±0,66
Ç11	Radyoişaretleme Verimi (%)	98,82±0,56	98,83±0,53	98,99±0,36	98,95±0,50	98,73±0,16
	Serbest Lu-177 (%)	0,55±0,23	0,57±0,21	0,50±0,17	0,49±0,29	0,66±0,22
	Kolloidal Lu-177 (%)	0,62±0,33	0,60±0,31	0,51±0,20	0,55±0,20	0,60±0,23

Formülasyon	0. gün	7. gün																																								
Ç2	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,38</td><td>20228</td><td>4,9</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç2</td><td>6,58</td><td>392590</td><td>95,1</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>412818</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,38	20228	4,9	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,58	392590	95,1	Total	-	-	412818	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,42</td><td>23291</td><td>5,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç2</td><td>6,54</td><td>400165</td><td>94,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>423456</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,42	23291	5,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,54	400165	94,5	Total	-	-	423456	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,38	20228	4,9																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,58	392590	95,1																																						
Total	-	-	412818	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,42	23291	5,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,54	400165	94,5																																						
Total	-	-	423456	100																																						
Ç5	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,4</td><td>16111</td><td>3,7</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,45</td><td>419310</td><td>96,3</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435421</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3	Total	-	-	435421	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>20208</td><td>4,8</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,55</td><td>400779</td><td>95,2</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420987</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2	Total	-	-	420987	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3																																						
Total	-	-	435421	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2																																						
Total	-	-	420987	100																																						
Ç8	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,4</td><td>16111</td><td>3,7</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç8</td><td>6,45</td><td>419310</td><td>96,3</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435421</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,45	419310	96,3	Total	-	-	435421	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,41</td><td>18715</td><td>4,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç8</td><td>6,47</td><td>397167</td><td>95,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>415882</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,41	18715	4,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,47	397167	95,5	Total	-	-	415882	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,45	419310	96,3																																						
Total	-	-	435421	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,41	18715	4,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,47	397167	95,5																																						
Total	-	-	415882	100																																						



Şekil 70. pH 7’de hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları





Şekil 71. pH 5'te hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları

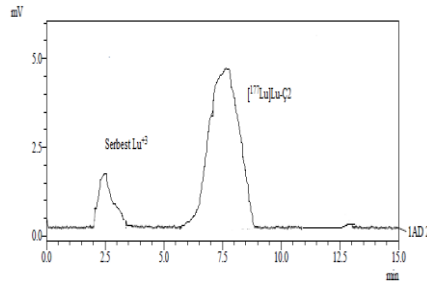
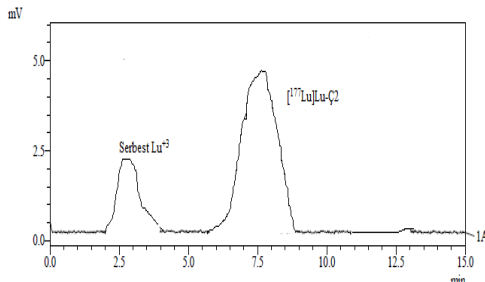
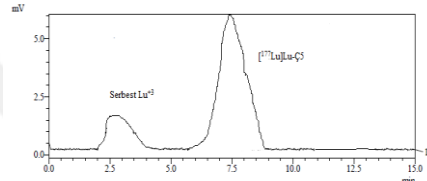
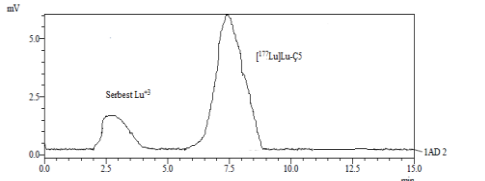
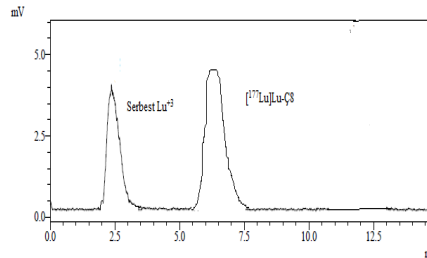
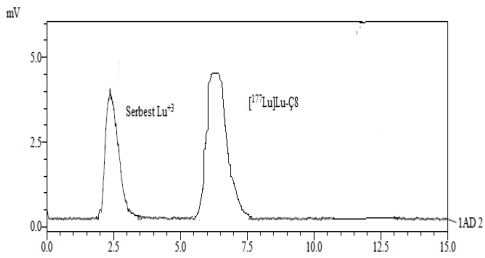
Doz kalibratöründen elde edilen sonuçlara göre pH 9'da en düşük radyoişaretleme verimi Ç8 formülasyonunda bulunmuştur. Diğer formülasyonların radyoişaretleme verimi %70'in üzerinde bulunmuştur (**Tablo 37**). RP-HPLC analizinden elde edilen tüm sonuçların doz kalibratöründen elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür (**Şekil 72**).

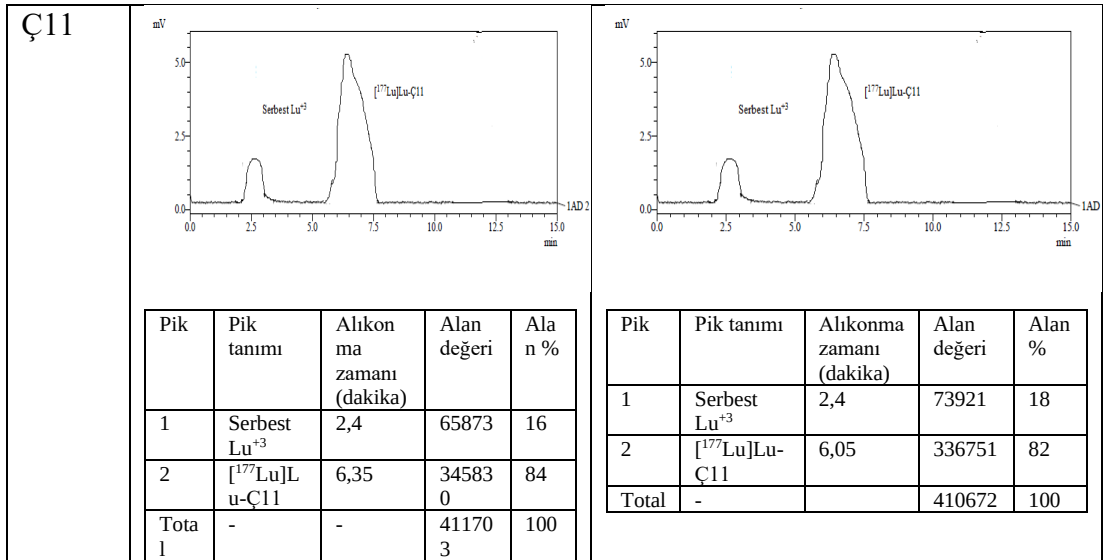
Tablo 36. pH 5’te hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Ç2	Radyoişaretleme Verimi (%)	75,78±4,96	71,62±2,19	71,34±1,44	70,85±0,76	69,32±2,26
	Serbest Lu-177 (%)	11,11±2,29	12,60±0,20	12,45±0,39	12,79±0,35	12,97±0,23
	Kolloidal Lu-177 (%)	13,11±2,69	15,79±2,38	16,22±1,43	16,36±1,11	17,71±2,33
Ç5	Radyoişaretleme Verimi (%)	73,03±0,83	73,40±0,11	72,89±0,23	73,06±0,25	72,72±0,40
	Serbest Lu-177 (%)	11,56±0,78	11,30±0,05	12,00±0,06	12,04±0,11	12,09±0,07
	Kolloidal Lu-177 (%)	15,41±0,09	15,30±0,06	15,10±0,17	14,91±0,15	15,19±0,34
Ç8	Radyoişaretleme Verimi (%)	51,34±0,13	52,69±0,23	50,98±0,98	51,09±0,80	50,33±0,42
	Serbest Lu-177 (%)	21,75±0,11	20,53±0,12	21,29±0,43	21,12±0,14	21,22±0,27
	Kolloidal Lu-177 (%)	26,91±0,03	26,78±0,12	27,73±0,79	27,79±0,70	28,44±0,66
Ç11	Radyoişaretleme Verimi (%)	81,51±10,30	78,58±3,63	78,12±3,88	78,39±4,56	77,76±3,71
	Serbest Lu-177 (%)	11,73±10,10	14,69±3,43	15,25±3,79	14,93±4,46	15,41±3,66
	Kolloidal Lu-177 (%)	6,75±0,33	6,73±0,31	6,64±0,20	6,68±0,20	6,83±0,05

Tablo 37. pH 9’da hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
Ç2	Radyoişaretleme Verimi (%)	86,82±0,72	83,56±2,59	84,46±2,32	80,46±0,16	78,85±1,68
	Serbest Lu-177 (%)	3,17±0,74	4,79±0,16	4,79±0,28	4,94±0,09	5,08±0,13
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,01±0,03	11,65±2,43	10,76±2,59	14,61±0,23	16,07±1,78
Ç5	Radyoişaretleme Verimi (%)	79,00±0,09	77,88±0,11	77,39±0,25	77,54±0,25	77,20±0,40
	Serbest Lu-177 (%)	5,59±0,05	6,82±0,05	7,50±0,09	7,56±0,11	7,61±0,07
	Kolloidal Lu-177 (%)	15,41±0,09	15,30±0,06	15,10±0,17	14,91±0,15	15,19±0,34
Ç8	Radyoişaretleme Verimi (%)	62,93±0,13	59,64±0,23	57,94±0,98	57,27±0,95	57,29±0,42
	Serbest Lu-177 (%)	10,16±0,11	13,57±0,12	14,33±0,43	14,94±0,57	14,26±0,27
	Kolloidal Lu-177 (%)	26,91±0,03	26,78±0,12	27,73±0,79	27,79±0,70	28,44±0,66
Ç11	Radyoişaretleme Verimi (%)	87,79±4,87	82,34±0,53	81,88±0,70	82,15±1,36	81,21±0,79
	Serbest Lu-177 (%)	5,46±4,67	10,92±0,22	11,48±0,55	11,17±1,22	11,96±0,74
	Kolloidal Lu-177 (%)	6,75±0,33	6,73±0,31	6,64±0,20	6,68±0,20	6,83±0,05

Formülasyon	0. gün	7. gün																																								
Ç2	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,35</td><td>65252</td><td>15</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç2</td><td>6,45</td><td>369756</td><td>85</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435008</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,35	65252	15	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,45	369756	85	Total	-	-	435008	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>86111</td><td>20</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç2</td><td>6,55</td><td>344442</td><td>80</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>430553</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	86111	20	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,55	344442	80	Total	-	-	430553	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,35	65252	15																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,45	369756	85																																						
Total	-	-	435008	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	86111	20																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç2	6,55	344442	80																																						
Total	-	-	430553	100																																						
Ç5	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>108903</td><td>25</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,38</td><td>326706</td><td>75</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435609</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	108903	25	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,38	326706	75	Total	-	-	435609	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>111879</td><td>26</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,45</td><td>318424</td><td>74</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>430303</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	111879	26	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	318424	74	Total	-	-	430303	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	108903	25																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,38	326706	75																																						
Total	-	-	435609	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	111879	26																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	318424	74																																						
Total	-	-	430303	100																																						
Ç8	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,43</td><td>188373</td><td>45</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç8</td><td>6,01</td><td>230233</td><td>55</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>418606</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,43	188373	45	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,01	230233	55	Total	-	-	418606	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>193293</td><td>46</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç8</td><td>6,05</td><td>226908</td><td>54</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420201</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	193293	46	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,05	226908	54	Total	-	-	420201	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,43	188373	45																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,01	230233	55																																						
Total	-	-	418606	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	193293	46																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç8	6,05	226908	54																																						
Total	-	-	420201	100																																						



Şekil 72. pH 9'da hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları

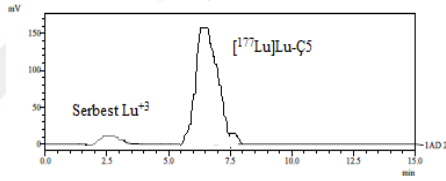
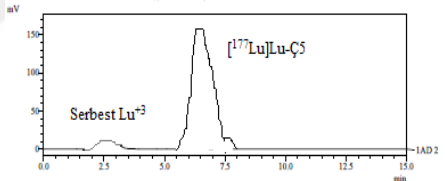
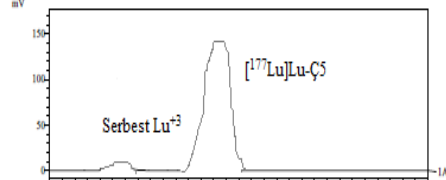
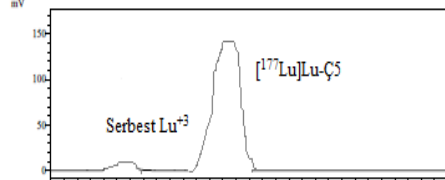
3.1.12.1.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

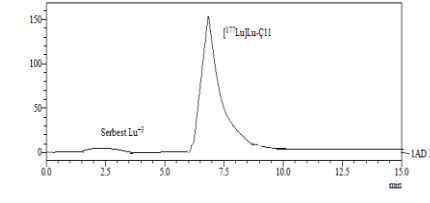
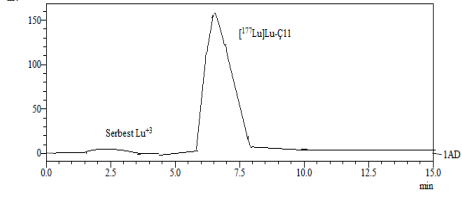
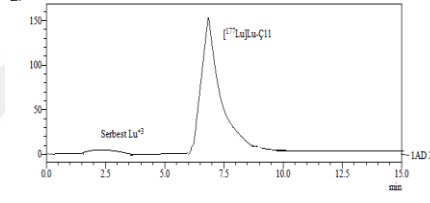
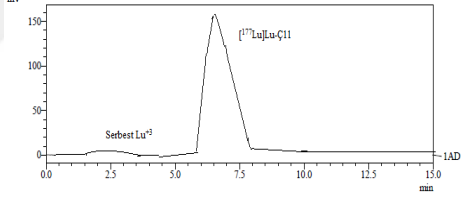
Radyoaktivite miktarının radyoışaretleme verimi üzerine etkisi **Yöntem 2.2.12.5.3'**de anlatıldığı gibi gerçekleştirilmiştir. Oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılan çözeltilerin radyoışaretleme verimi 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örneklerin doz kalibratöründe sayımı yapılarak; 0 ve 7. günlerde RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir. Sonuçlar **Tablo 38** ve **Şekil 73'**de belirtilmiştir.

5 ve 50 mCi ile yapılan radyoışaretleme çalışmalarına ait radyoışaretleme verimleri değerlendirildiğinde; 50 mCi ile yapılan radyoışaretleme veriminin azaldığı ama %90'nın üzerinde olduğu görülmüştür **Tablo 38**. Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir ($p > 0.05$). RP-HPLC analizinden elde edilen sonuçların da doz kalibratöründen elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür (**Tablo 38** ve **Şekil 73**).

Tablo 38. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların içerdiği Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %

	Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %			
	5 mCi		50 mCi	
	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11
0	96,92±0,09	98,82±0,56	97,14±0,13	96,47±0,28
1	97,08±0,11	98,83±0,53	97,18±0,34	95,26±0,23
3	97,23±0,25	98,99±0,36	92,07±1,05	91,85±0,85
5	97,38±0,25	98,95±0,50	92,17±0,85	92,3±1,38
7	97,04±0,40	98,73±0,16	91,54±1,3	91,59±0,64

Formülasyon	0. gün	7. gün																																								
Ç5-5 mCi	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,4</td><td>16111</td><td>3,7</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,45</td><td>419310</td><td>96,3</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435421</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3	Total	-	-	435421	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>20208</td><td>4,8</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,55</td><td>400779</td><td>95,2</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420987</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2	Total	-	-	420987	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3																																						
Total	-	-	435421	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2																																						
Total	-	-	420987	100																																						
Ç5-50 mCi	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,4</td><td>16111</td><td>3,7</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,45</td><td>419310</td><td>96,3</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>435421</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3	Total	-	-	435421	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>20208</td><td>4,8</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-Ç5</td><td>6,55</td><td>400779</td><td>95,2</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420987</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2	Total	-	-	420987	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,4	16111	3,7																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,45	419310	96,3																																						
Total	-	-	435421	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-Ç5	6,55	400779	95,2																																						
Total	-	-	420987	100																																						

	1	Serbest Lu ⁺³	2,41	21000	5	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	22308	5,2
	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç5	5,93	40913 7	95	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç5	6,04	40670 0	94,8
	Tota l	-	-	43067 1	100	Tota l	-	-	42900 8	100
Ç11-5 mCi										
	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %
	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	19801	4,6	1	Serbest Lu ⁺³	2,3	16417	3,9
	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç11	6,45	41065 2	95,4	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç11	5,45	40452 0	96,1
	Tota l	-	-	43045 3	100	Tota l	-	-	42093 7	100
Ç11-50 mCi										
	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %
	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	19801	4,6	1	Serbest Lu ⁺³	2,3	16417	3,9
	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç11	6,45	41065 2	95,4	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu -Ç11	5,45	40452 0	96,1
	Tota l	-	-	43045 3	100	Tota l	-	-	42093 7	100

Şekil 73. 5 ve 50 mCi radyoaktiviteye sahip çözelti halindeki formülasyonların RP-HPLC'ye ait kromatogramlar ve analiz sonuçları

3.1.12.2. Stabilité Çalışmaları Sonuçları

Stabilite çalışmaları **Yöntem 2.2.12.6**'da belirtildiği gibi yapılmıştır. Stabilite kabininde bekletilen formülasyonlar (Ç5 ve Ç11) 5 mCi aktiviteye sahip 0.1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Formülasyonlar oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmıştır. Radyoişaretlemiş formülasyonlardan

0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayım yapılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar **Tablo 40**'da gösterilmiştir.

5 ± 3 °C' saklama sıcaklığında bekletilen Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 6 ay boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur (**Tablo 40**). 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nemde bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %85'in üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde en ideal saklama koşulunun 5 ± 3 °C olduğu tespit edilmiştir (**Tablo 40**).

3.1.12.3. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Yöntem 2.2.12.3'de anlatıldığı gibi hazırlanan formülasyonlardaki metal miktarları ICP-OES ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar **Tablo 39**'da gösterildi ve sonuçların Avrupa Farmakopesi 10.0'da (European Pharmacopoeia, 2017) belirtilen metal miktarlarından daha düşük olduğu bulunmuştur.

Tablo 39. Radyoişaretlenmiş fomülasyonlarda tespit edilen metal miktarları (ng/ml) ve standart sapmaları

Metal miktarları	Ç2	Ç5	Ç8	Ç11
Cu (ng/ml)	20± 0,1	17± 0,2	24± 0,5	16,54± 0,65
Zn (ng/ml)	24± 0,4	14,6± 0,11	20,33± 0,23	17,78± 0,89
Fe (ng/ml)	20,3± 0,2	12,5± 0,3	21,67± 0,45	10,78± 0,41
Pb (ng/ml)	22,7± 0,11	16,7± 0,23	18,9± 0,35	11,78± 0,76

Tablo 40. 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60 $\pm$ 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C’de %75 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş çözelti halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimleri

Saklama sıcaklığı	25° C		5° C				25° C				40° C			
Zaman	Başlangıç		3 ay		6 ay		3 ay		6 ay		3 ay		6 ay	
	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11	Ç5	Ç11
0 gün	96,9 $\pm$ 0,09	98,8 $\pm$ 0,56	95,0 $\pm$ 0,84	95,2 $\pm$ 1,33	95,3 $\pm$ 0,37	95,3 $\pm$ 0,77	92,8 $\pm$ 0,87	90,1 $\pm$ 0,55	93,2 $\pm$ 0,43	90,0 $\pm$ 0,54	86,5 $\pm$ 0,38	88,6 $\pm$ 3,18	86,2 $\pm$ 0,51	86,5 $\pm$ 3,41
1 gün	97,1 $\pm$ 0,11	98,8 $\pm$ 0,53	95,0 $\pm$ 0,91	95,5 $\pm$ 1,25	95,1 $\pm$ 0,75	95,3 $\pm$ 1,8	92,4 $\pm$ 0,44	90,9 $\pm$ 2,09	92,4 $\pm$ 0,34	89,2 $\pm$ 0,33	86,8 $\pm$ 3,15	87,6 $\pm$ 1,95	86,86 $\pm$ 3,15	87,1 $\pm$ 2,77
3 gün	97,2 $\pm$ 0,25	98,9 $\pm$ 0,36	95,1 $\pm$ 1,79	95,5 $\pm$ 1,95	95,0 $\pm$ 1,55	95,6 $\pm$ 1,47	93,1 $\pm$ 0,27	90,6 $\pm$ 2,81	92,8 $\pm$ 1,01	90,6 $\pm$ 2,81	86,8 $\pm$ 6,79	88,2 $\pm$ 6,57	86,8 $\pm$ 6,79	88,2 $\pm$ 6,56
5 gün	97,4 $\pm$ 0,25	98,9 $\pm$ 0,50	95,0 $\pm$ 0,05	95,4 $\pm$ 2,17	95,1 $\pm$ 0,02	95,3 $\pm$ 2,07	92,6 $\pm$ 0,38	91,3 $\pm$ 0,31	92,6 $\pm$ 0,38	91,4 $\pm$ 0,28	87,3 $\pm$ 8,31	88,8 $\pm$ 2,72	87,6 $\pm$ 6,13	88,7 $\pm$ 2,82
7 gün	97,0 $\pm$ 0,40	98,7 $\pm$ 0,16	95,3 $\pm$ 1,84	95,2 $\pm$ 1,57	95,1 $\pm$ 1,1	95,5 $\pm$ 0,69	92,7 $\pm$ 1,4	90,2 $\pm$ 0,94	92,9 $\pm$ 1,39	90,1 $\pm$ 1,03	87,1 $\pm$ 6,71	88,1 $\pm$ 0,06	87,6 $\pm$ 4,22	86,5 $\pm$ 1,99

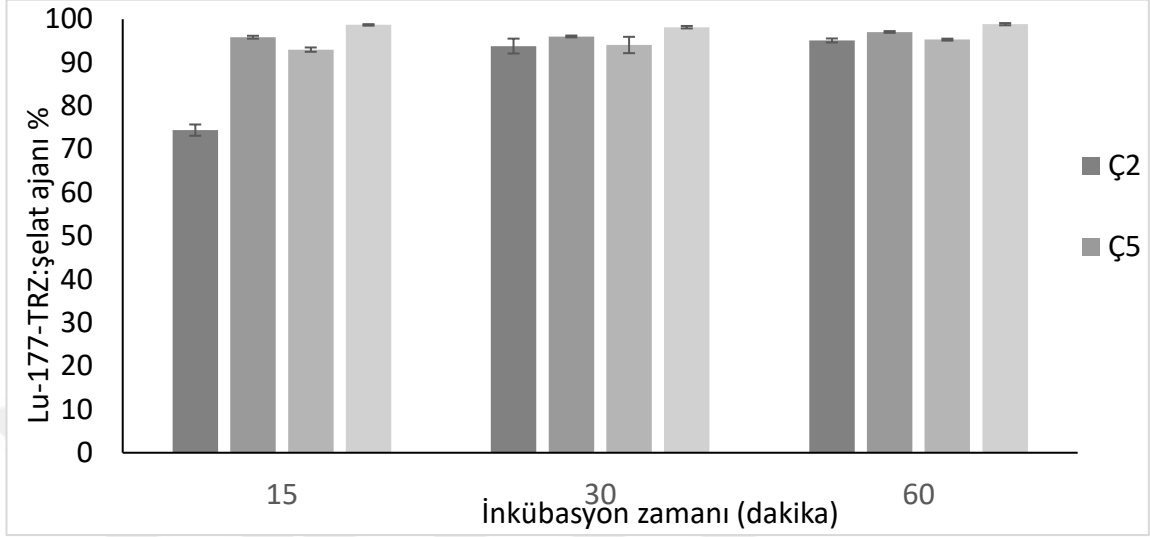
3.1.12.4. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları Sonuçları

3.1.12.4.1. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem 2.2.12.5.1’de anlatıldığı gibi farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen formülasyonların analizi doz kalibratörü kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve sonuçlar **Tablo 41** ve **Şekil 74**’de belirtilmiştir.

Tablo 41. Radyoişaretlemeden sonra 15, 30 ve 60. dakikalarda Lu-177-TRZ: şelat ajanı formülasyonlarının radyokimyasal saflığı ve içerdiği serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 miktarı

Formülasyon		15	30	60
L2	Radyoişaretleme Verimi (%)	74,41±1,303	93,80±1,72	95,094±0,47
	Serbest Lu-177 (%)	38,28±37,51	0,62±0,11	0,31±0,096
	Kolloidal Lu-177 (%)	6,71±3,35	5,57±1,72	4,45±0,19
L5	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,842±0,33	96,02±0,21	97,05±0,20
	Serbest Lu-177 (%)	1,77±0,065	1,37±0,29	0,46±0,06
	Kolloidal Lu-177 (%)	2,38±0,30	2,61±0,48	2,49±0,26
L8	Radyoişaretleme Verimi (%)	92,98±0,49	94,05±1,89	95,29±0,22
	Serbest Lu-177 (%)	1,87±0,06	1,62±0,07	0,885±0,11
	Kolloidal Lu-177 (%)	5,15±0,46	4,33±1,95	3,83±0,16
L11	Radyoişaretleme Verimi (%)	98,68±0,17	98,16±0,28	98,85±0,26
	Serbest Lu-177 (%)	0,96±0,17	0,88±0,32	0,55±0,23
	Kolloidal Lu-177 (%)	0,35±0,015	0,97±0,08	0,60±0,31



Şekil 74. Farklı inkübasyon zamanlarında elde edilen Lu-177-TRZ: şelat ajan % leri

15 dakika inkübasyon süresinde L2 formülasyonun radyoişaretleme verimi %70 üzerinde bulunmuştur. L5, L8 ve L11 formülasyonlarının radyoişaretleme verimi ise %90'ın üzerinde bulunmuştur. 30 dakika inkübasyon süresinde tüm formülasyonların radyoişaretleme verimi %90 üzerinde bulunmuştur. Ancak en yüksek radyoişaretleme verimi 60 dakika inkübasyon süresinde bekletilen formülasyonlarda gözlenmiştir ve tüm formülasyonların radyoişaretleme verimi %95 üzerindedir. Bu yüzden çözelti halindeki formülasyonlarda olduğu gibi kit formundaki formülasyonlarda da optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir (**Tablo 41** ve **Şekil 74**).

3.1.12.4.2. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Yöntem 2.2.12.5.2'de anlatıldığı gibi yapılan işaretleme çalışmalarında pH'ın işaretleme verimi üzerine etkisi incelenmiştir. Hazırlanan formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örnekler doz kalibratöründe sayım yapılarak radyoişaretleme verimleri yüzde olarak hesaplanmıştır. Radyoaktivite sayımları yanı sıra kalite kontrolde alınan örneklerin 0. ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak radyoişaretleme verimleri ve geliştirilen radyofarmasötiklerin kromatogramları da değerlendirilmiştir. pH 7 için yapılan çalışmaların sonuçları **Tablo 42 Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.** ve RP-HPLC sonuçları **Şekil 75**'de; pH 5 için yapılan

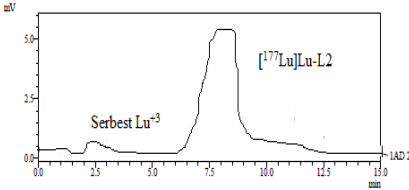
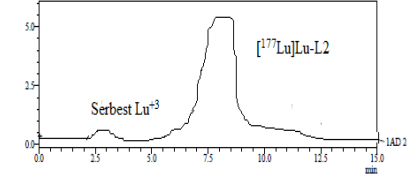
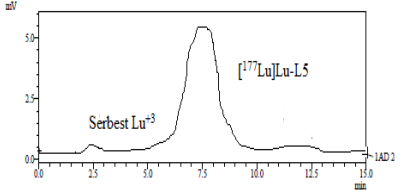
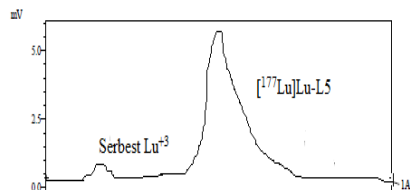
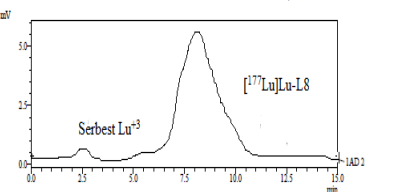
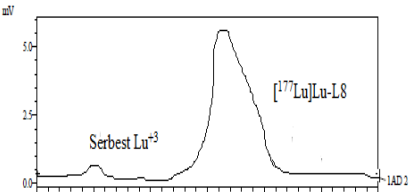
alışmaların sonuları **Tablo 43** ve RP-HPLC sonuları **Hata! Başvuru kaynağı bulunamadı.**'da pH 9 iin yapılan alışmaların sonuları **Tablo 44** ve RP-HPLC sonuçları **şekil 77**'de verilmiştir.

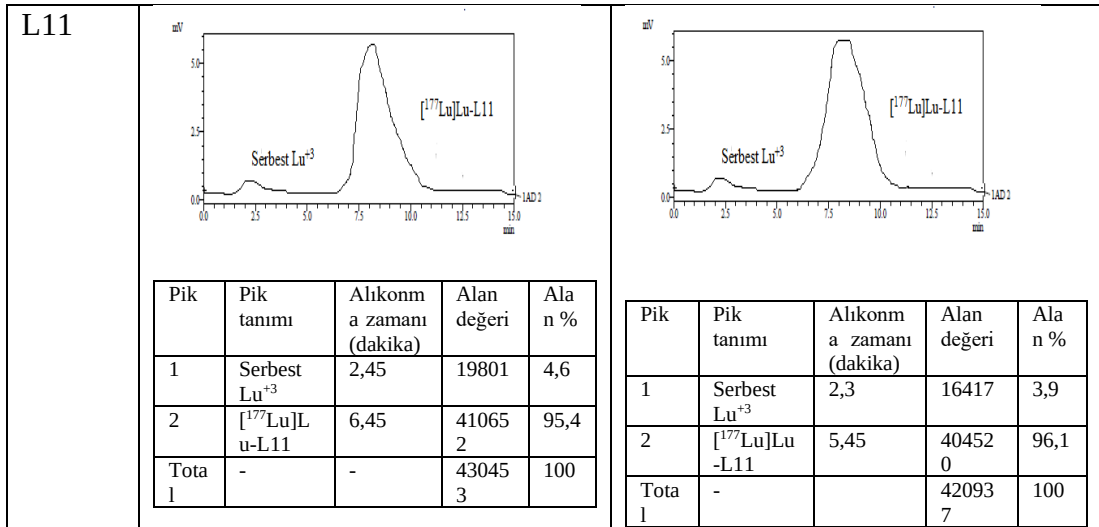
Doz kalibratöründen elde edilen sonuçlara göre pH 7'de hazırlanan L5 ve L11 formülasyonlarının 7 gün boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. L2 ve L8 formülasyonları başlangıç ve 1. günün sonunda %95 üzerinde 3, 5 ve 7. günlerde ise radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur (**Tablo 42**). RP-HPLC sonuçlarına göre başlangıçta tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. 7. günde yapılan analizlere göre ise sadece L2 ve L8 formülasyonunun radyoişaretleme verimi %93 üzerinde L5 ve L11 formülasyonları ise %95 üzerinde bulunmuştur (**şekil 75**).

pH 5 değeri için en yüksek radyoişaretleme verimi %76,24-79,79 değerleri arasında L11 formülasyonunda bulunmuştur. L8 formülasyonu pH'dan en çok etkilenen formülasyon olmuştur ve radyoişaretleme verimi %50'lere düşmüştür (**Tablo 43**). RP-HPLC sonuçları doz kalibratöründen elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur. Kromatogramlardan elde edilen radyoişaretleme verimleri en yüksek L11 formülasyonunda bulunurken, en düşük radyoişaretleme verimi L8 formülasyonu için bulunmuştur (**şekil 76**).

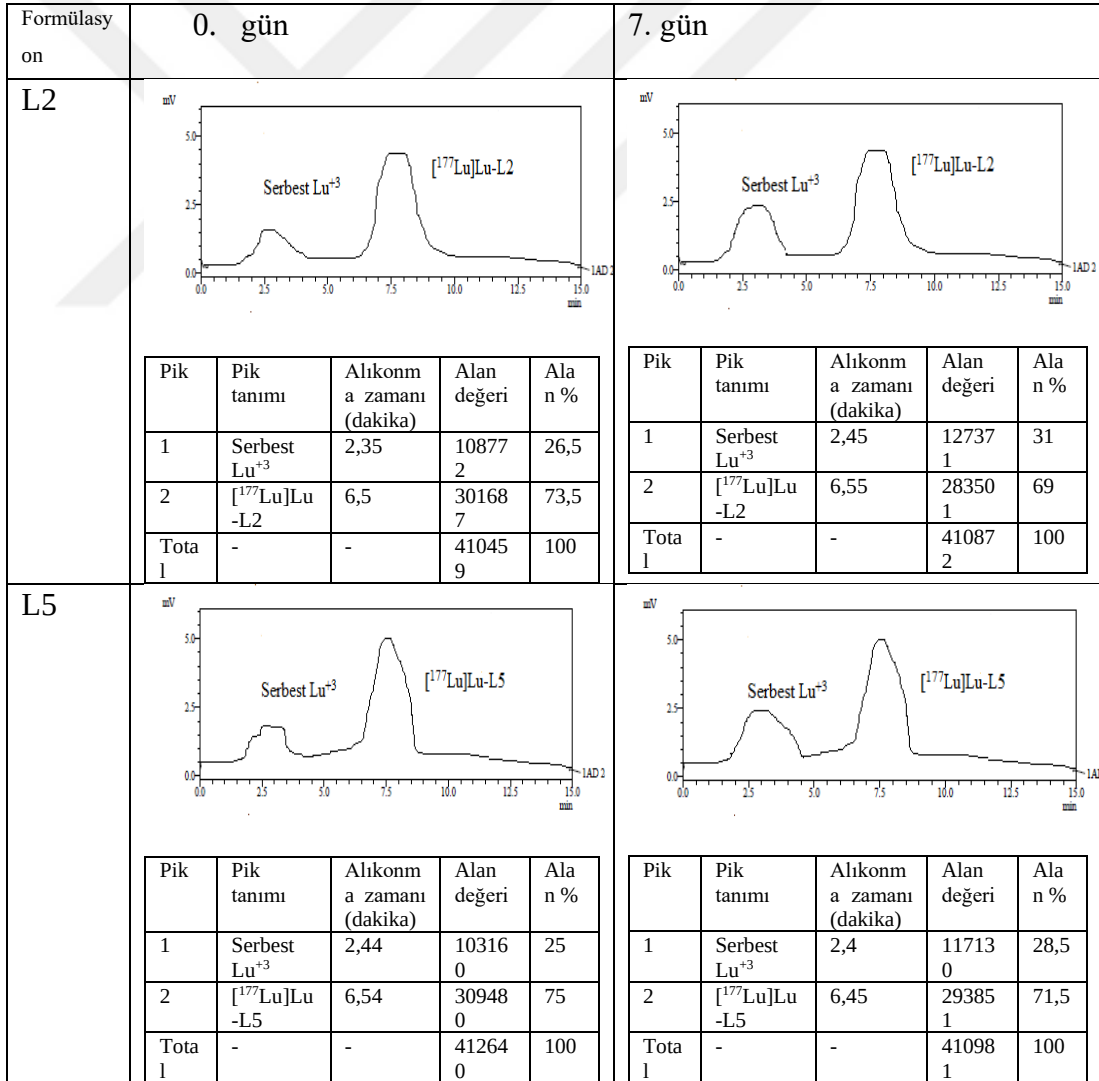
Tablo 42. pH 7’de hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

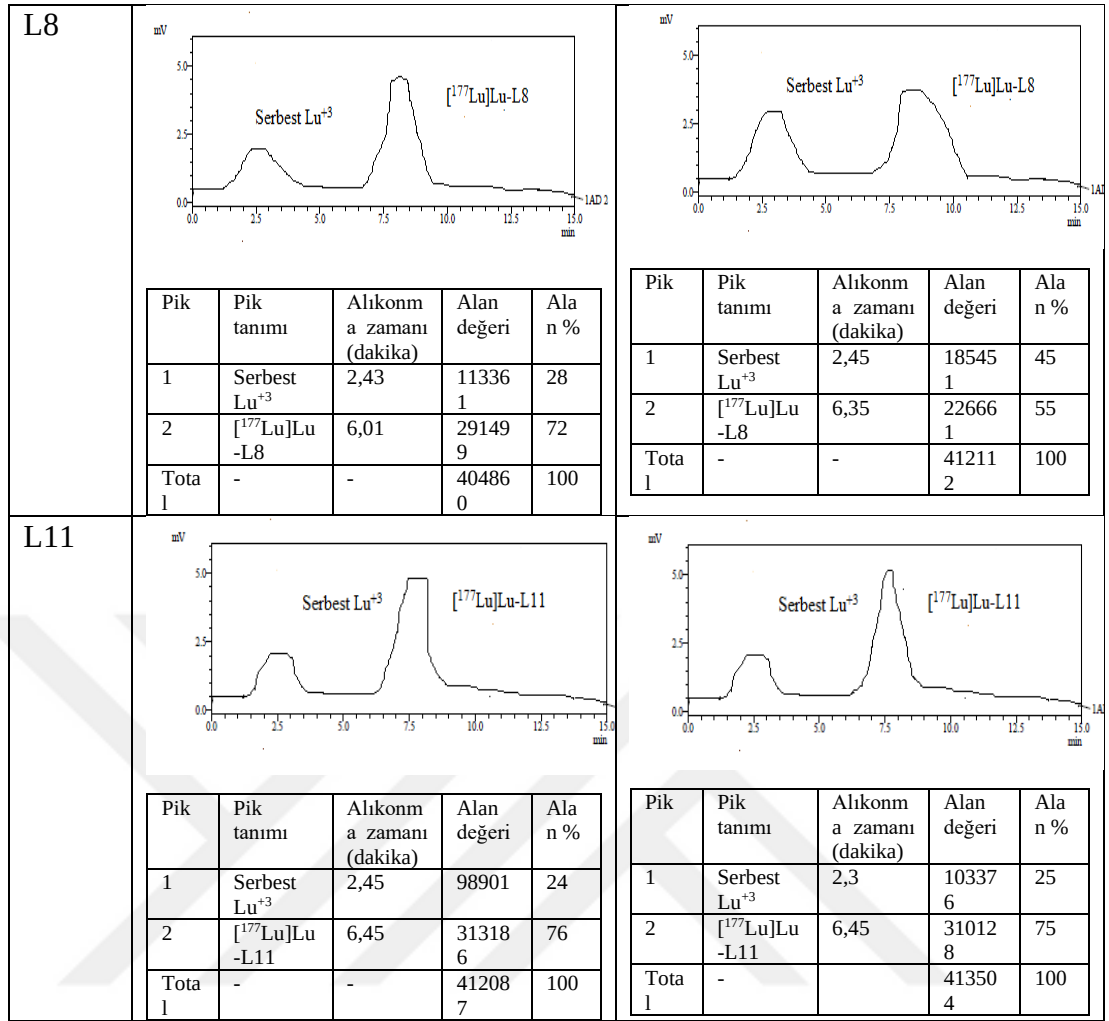
Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
L2	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,16±0,18	95,24±0,36	94,40±0,30	93,50±0,42	93,32±0,21
	Serbest Lu-177 (%)	0,40±0,15	0,41±0,10	0,54±0,09	0,58±0,04	0,61±0,06
	Kolloidal Lu-177 (%)	4,44±0,20	4,35±0,46	5,06±0,22	5,93±0,47	6,07±0,24
L5	Radyoişaretleme Verimi (%)	96,93±0,09	97,30±0,24	97,23±0,25	97,39±0,26	96,98±0,16
	Serbest Lu-177 (%)	0,46±0,04	0,42±0,05	0,46±0,09	0,50±0,12	0,57±0,07
	Kolloidal Lu-177 (%)	2,61±0,09	2,28±0,20	2,30±0,17	2,11±0,14	2,46±0,22
L8	Radyoişaretleme Verimi (%)	95,35±0,20	95,49±0,14	94,23±0,85	93,57±0,34	92,65±0,93
	Serbest Lu-177 (%)	0,93±0,18	0,95±0,19	1,23±0,19	1,44±0,15	1,69±0,23
	Kolloidal Lu-177 (%)	3,72±0,03	3,56±0,07	4,54±0,79	4,99±0,33	5,65±1,15
L11	Radyoişaretleme Verimi (%)	98,85±0,52	98,85±0,50	98,94±0,17	98,98±0,44	98,67±0,27
	Serbest Lu-177 (%)	0,53±0,19	0,55±0,19	0,56±0,06	0,46±0,24	0,73±0,27
	Kolloidal Lu-177 (%)	0,62±0,33	0,60±0,31	0,51±0,20	0,55±0,20	0,60±0,23

Formülasyo n	0. gün	7. gün																																								
L2	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,4</td><td>20336</td><td>4,9</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L2</td><td>6,6</td><td>394672</td><td>95,1</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>415008</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,4	20336	4,9	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,6	394672	95,1	Total	-	-	415008	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,41</td><td>26851</td><td>6,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L2</td><td>6,59</td><td>386234</td><td>93,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>413085</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,41	26851	6,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,59	386234	93,5	Total	-	-	413085	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,4	20336	4,9																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,6	394672	95,1																																						
Total	-	-	415008	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,41	26851	6,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,59	386234	93,5																																						
Total	-	-	413085	100																																						
L5	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>16407</td><td>3,9</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>5,98</td><td>404264</td><td>96,1</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420671</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	16407	3,9	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	5,98	404264	96,1	Total	-	-	420671	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>20208</td><td>4,8</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>6,55</td><td>400779</td><td>95,2</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420987</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,55	400779	95,2	Total	-	-	420987	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	16407	3,9																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	5,98	404264	96,1																																						
Total	-	-	420671	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,55	400779	95,2																																						
Total	-	-	420987	100																																						
L8	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,41</td><td>18715</td><td>4,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L8</td><td>6,47</td><td>397167</td><td>95,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>415882</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,41	18715	4,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,47	397167	95,5	Total	-	-	415882	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonm a zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Ala n %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,42</td><td>23291</td><td>5,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L8</td><td>6,54</td><td>400165</td><td>94,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>423456</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %	1	Serbest Lu ⁺³	2,42	23291	5,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,54	400165	94,5	Total	-	-	423456	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,41	18715	4,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,47	397167	95,5																																						
Total	-	-	415882	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonm a zamanı (dakika)	Alan değeri	Ala n %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,42	23291	5,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,54	400165	94,5																																						
Total	-	-	423456	100																																						



Şekil 75. pH 7’de hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları





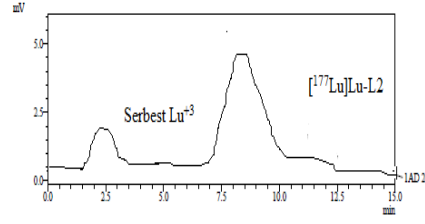
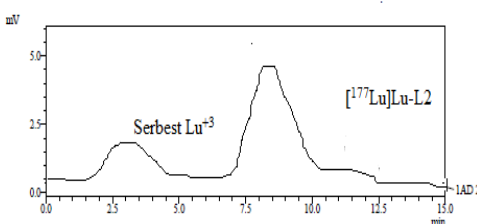
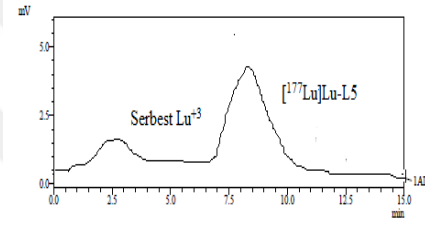
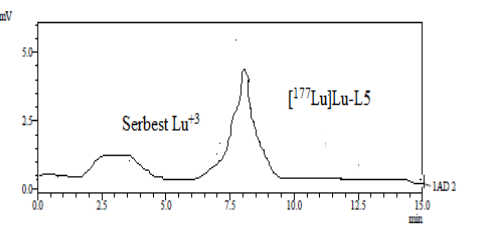
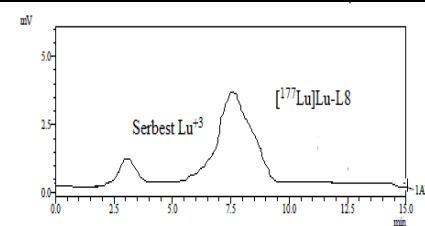
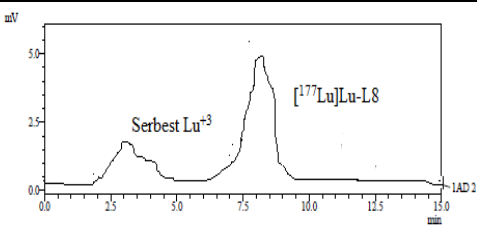
Şekil 76. pH 5'te hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları

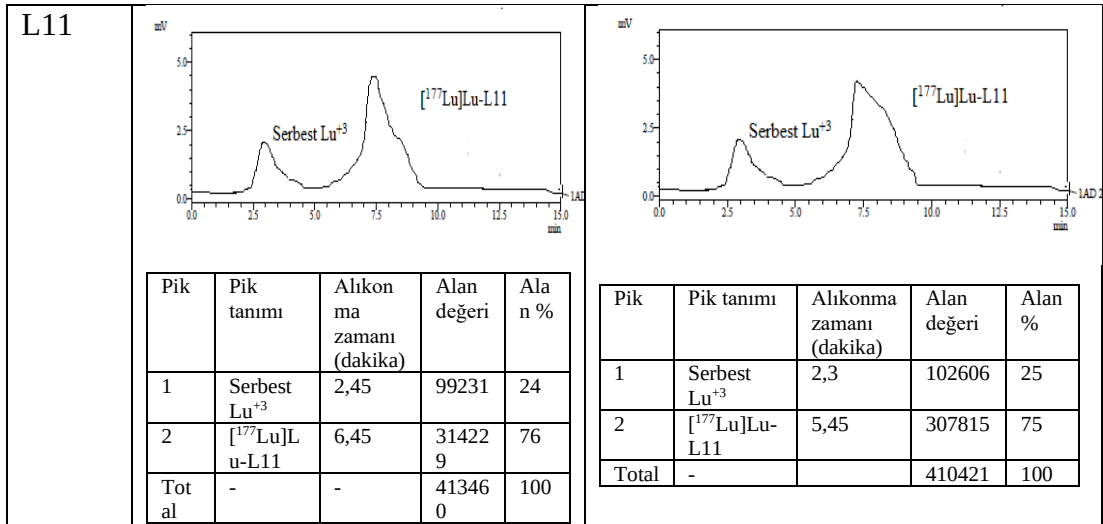
Tablo 43. pH 5’te hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
L2	Radyoişaretleme Verimi (%)	73,27±3,86	69,52±7,37	71,58±1,35	71,03±5,22	69,53±2,24
	Serbest Lu-177 (%)	12,53±4,50	12,57±0,25	12,20±0,98	12,61±0,34	12,77±0,52
	Kolloidal Lu-177 (%)	14,19±0,84	17,91±7,14	16,22±1,43	16,36±5,53	17,71±2,33
L5	Radyoişaretleme Verimi (%)	77,49±4,47	72,75±11,34	72,83±6,31	73,40±0,28	72,50±0,57
	Serbest Lu-177 (%)	11,67±0,26	11,31±0,19	11,85±0,30	11,69±0,40	11,88±0,30
	Kolloidal Lu-177 (%)	11,83±4,90	15,94±11,44	15,32±6,08	14,91±0,15	15,61±0,40
L8	Radyoişaretleme Verimi (%)	70,05±6,53	52,62±15,83	51,75±11,96	53,56±14,48	50,07±11,86
	Serbest Lu-177 (%)	18,94±5,13	18,28±3,69	21,29±0,43	21,74±0,53	21,54±0,37
	Kolloidal Lu-177 (%)	11,89±4,95	29,10±12,18	26,96±11,99	24,70±14,11	28,39±11,91
L11	Radyoişaretleme Verimi (%)	76,24±6,84	78,32±1,99	79,79±3,75	79,11±0,87	78,65±3,56
	Serbest Lu-177 (%)	14,92±2,30	14,95±2,30	13,57±3,55	13,19±0,98	12,68±2,10
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,85±4,45	6,73±0,31	6,64±0,20	7,70±1,66	8,67±2,08

Tablo 44. pH 9’da hazırlanan radyoişaretlenmiş formülasyonların radyoişaretleme verimi, serbest Lu-177 ve kolloidal Lu-177 yüzdeleri

Formülasyon		0. Gün	1. Gün	3. Gün	5. Gün	7. Gün
L2	Radyoişaretleme Verimi (%)	72,65±8,61	73,11±7,93	70,83±12,70	71,93±14,63	68,48±15,41
	Serbest Lu-177 (%)	17,34±8,61	10,83±10,56	15,47±9,62	11,57±11,57	13,08±12,05
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,01±0,03	16,07±2,62	13,70±3,98	16,50±3,06	18,44±3,55
L5	Radyoişaretleme Verimi (%)	83,62±0,65	80,01±7,45	77,39±0,25	77,54±0,25	70,80±17,15
	Serbest Lu-177 (%)	5,74±0,70	6,82±0,05	7,50±0,09	7,56±0,11	7,61±0,07
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,21±0,33	13,17±7,44	15,10±0,17	14,91±0,15	21,59±17,13
L8	Radyoişaretleme Verimi (%)	73,05±8,29	42,64±29,29	57,94±11,65	53,41±7,64	53,43±7,10
	Serbest Lu-177 (%)	11,53±1,28	13,57±0,12	14,33±0,43	14,94±0,57	14,26±0,27
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,41±0,34	43,79±29,35	27,73±11,29	31,66±7,30	32,31±7,29
L11	Radyoişaretleme Verimi (%)	81,81±0,71	81,32±2,29	80,86±2,40	80,11±4,66	79,16±4,21
	Serbest Lu-177 (%)	8,28±0,28	10,92±0,55	11,48±0,22	11,17±1,22	11,96±0,74
	Kolloidal Lu-177 (%)	10,64±0,06	7,75±2,08	7,66±1,97	8,72±3,74	8,87±3,58

Formülasyon	0. gün	7. gün																																								
L2	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,35</td><td>101065</td><td>24,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L2</td><td>6,45</td><td>311444</td><td>75,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>412509</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,35	101065	24,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,45	311444	75,5	Total	-	-	412509	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>121836</td><td>29,5</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L2</td><td>6,55</td><td>291166</td><td>70,5</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>413002</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	121836	29,5	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,55	291166	70,5	Total	-	-	413002	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,35	101065	24,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,45	311444	75,5																																						
Total	-	-	412509	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	121836	29,5																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L2	6,55	291166	70,5																																						
Total	-	-	413002	100																																						
L5	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,34</td><td>107649</td><td>26</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>6,54</td><td>306382</td><td>74</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>414031</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,34	107649	26	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,54	306382	74	Total	-	-	414031	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>123988</td><td>30</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>6,45</td><td>289304</td><td>70</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>413292</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	123988	30	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,45	289304	70	Total	-	-	413292	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,34	107649	26																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,54	306382	74																																						
Total	-	-	414031	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	123988	30																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,45	289304	70																																						
Total	-	-	413292	100																																						
L8	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,43</td><td>113361</td><td>28</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L8</td><td>6,01</td><td>291499</td><td>72</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>404860</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,43	113361	28	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,01	291499	72	Total	-	-	404860	100	 <table><tr><th>Pik</th><th>Pik tanımı</th><th>Alıkonma zamanı (dakika)</th><th>Alan değeri</th><th>Alan %</th></tr><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>144340</td><td>35</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L8</td><td>6,05</td><td>267872</td><td>65</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>412112</td><td>100</td></tr></table>	Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	144340	35	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,05	267872	65	Total	-	-	412112	100
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,43	113361	28																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,01	291499	72																																						
Total	-	-	404860	100																																						
Pik	Pik tanımı	Alıkonma zamanı (dakika)	Alan değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	144340	35																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L8	6,05	267872	65																																						
Total	-	-	412112	100																																						



Şekil 77. pH 9’da hazırlanan formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları

Doz kalibratöründen elde edilen sonuçlara göre pH 9’da en düşük radyoişaretleme verimi L8 formülasyonunda bulunmuştur (**Tablo 44**). Radyoişaretleme verimi %42,64’e kadar düşmüştür. L2, L5 ve L11 formülasyonlarının radyoişaretleme verimi pH 5’te hazırlanan formülasyonlarla benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sonuç olarak pH 9’da hazırlanan formülasyonların %90’nın altında radyoişaretleme verimine sahip olduğu görülmüştür (**Şekil 77**).

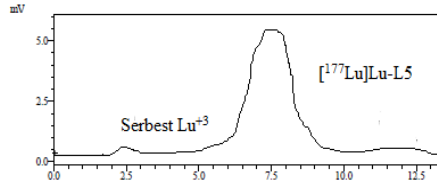
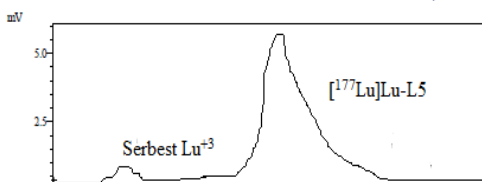
3.1.12.4.3. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

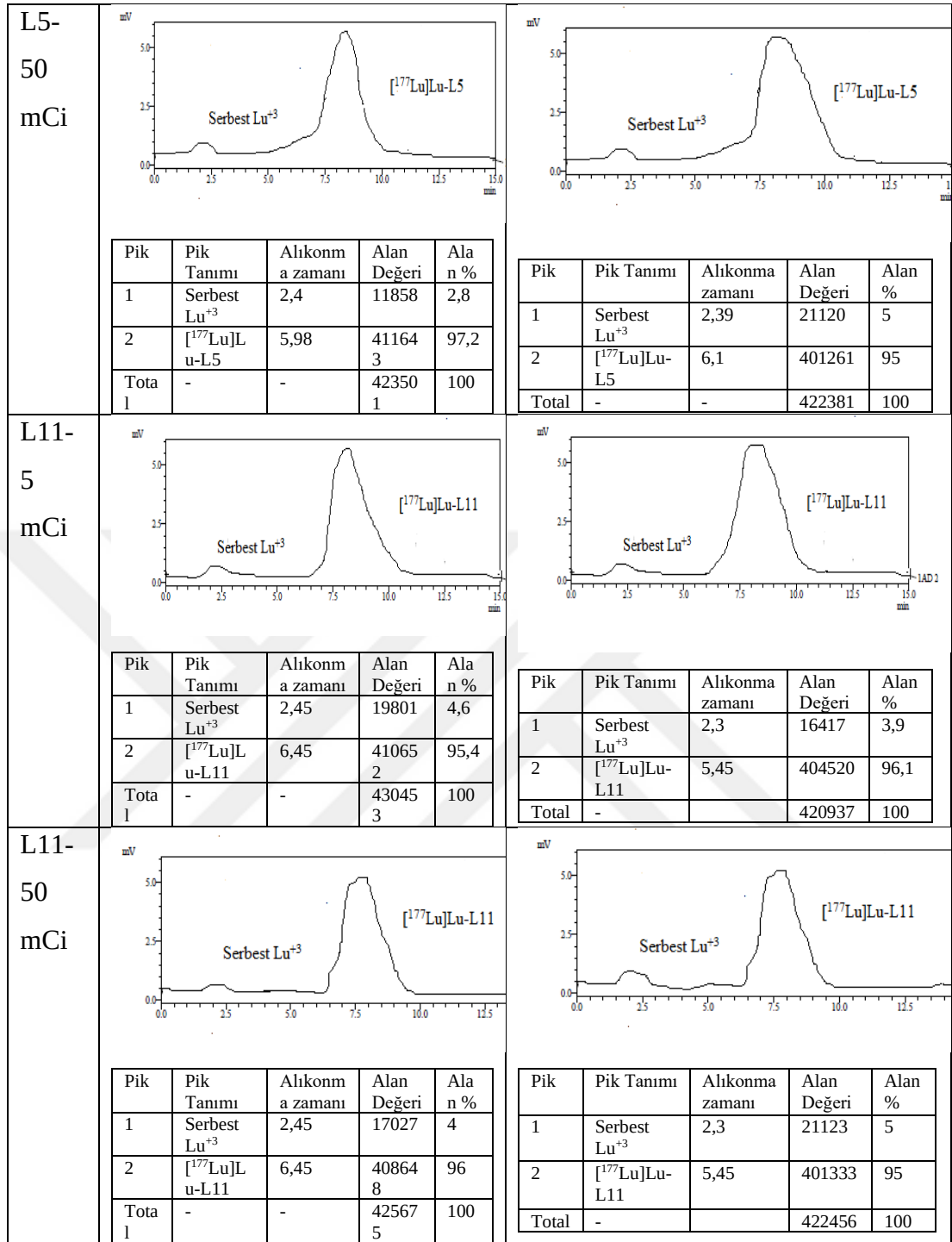
Radyoaktivite miktarının Lu-177-TRZ:şelat yapıcı ajan içeren liyofilize kitlerin radyoişaretleme verimi üzerine etkisi **Yöntem 2.2.12.5.3**’de anlatıldığı gibi incelenmiştir. Oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılan çözeltilerin radyoişaretleme verimi 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde alınan örneklerin doz kalibratöründe sayımı yapılarak; 0. ve 7. günlerde RP-RHPLC enjeksiyonu yapılarak incelenmiştir ve sonuçlar **Tablo 45**’de belirtilmiştir.

5 ve 50 mCi ile yapılan radyoişaretleme çalışmalarına ait radyoişaretleme verimleri değerlendirildiğinde; 50 mCi ile yapılan radyoişaretleme veriminin azaldığı ama %90’nın üzerinde olduğu görülmüştür (**Tablo 45**). Bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği belirlenmiştir ($p > 0.05$). RP-HPLC analizinden elde edilen sonuçların da doz kalibratöründen elde edilen sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmüştür (**Tablo 45** ve **Şekil 78**).

Tablo 45. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların içerdiği Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %

Örnek zamanı (gün)	Lu-177-TRZ: şelat ajan çözeltisi %			
	5 mCi		50 mCi	
	L5	L11	L5	L11
0	96,93±0,09	98,85±0,52	97,14±0,13	96,69±1,05
1	97,30±0,24	98,85±0,50	96,47±0,28	93,26±0,85
3	97,23±0,25	98,94±0,17	95,17±1,59	94,98±1,10
5	97,39±0,26	98,98±0,44	93,54±1,30	95,30±1,38
7	96,98±0,16	98,67±0,27	94,59±0,64	96,06±1,10

Formülasyon	0. gün	7. gün																																								
L5-5 mCi	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik Tanımı</th><th>Alınma zamanı</th><th>Alan Değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,45</td><td>16407</td><td>3,9</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>5,98</td><td>404264</td><td>96,1</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420671</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik Tanımı	Alınma zamanı	Alan Değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,45	16407	3,9	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	5,98	404264	96,1	Total	-	-	420671	100	<table><thead><tr><th>Pik</th><th>Pik Tanımı</th><th>Alınma zamanı</th><th>Alan Değeri</th><th>Alan %</th></tr></thead><tbody><tr><td>1</td><td>Serbest Lu⁺³</td><td>2,39</td><td>20208</td><td>4,8</td></tr><tr><td>2</td><td>[¹⁷⁷Lu]Lu-L5</td><td>6,55</td><td>400779</td><td>95,2</td></tr><tr><td>Total</td><td>-</td><td>-</td><td>420987</td><td>100</td></tr></tbody></table>	Pik	Pik Tanımı	Alınma zamanı	Alan Değeri	Alan %	1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8	2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,55	400779	95,2	Total	-	-	420987	100
Pik	Pik Tanımı	Alınma zamanı	Alan Değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,45	16407	3,9																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	5,98	404264	96,1																																						
Total	-	-	420671	100																																						
Pik	Pik Tanımı	Alınma zamanı	Alan Değeri	Alan %																																						
1	Serbest Lu ⁺³	2,39	20208	4,8																																						
2	[¹⁷⁷ Lu]Lu-L5	6,55	400779	95,2																																						
Total	-	-	420987	100																																						



Şekil 78. 5 ve 50 mCi radyoaktivitelere sahip formülasyonların 0 ve 7. günlerde yapılan RP-HPLC sonuçları

3.1.12.5. Stabilite Çalışmaları Sonuçları

Liyofilize kitlerin stabilite çalışmaları **Yöntem 2.2.12.6'** de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Stabilite kabinlerinde bekletilmiş liyofilize kitle (L5 ve L11) 5 mCi aktiviteye sahip 0.1 mL Lu-177 eklenerek, vorteks tipi karıştırıcıda 1 dakika karıştırılmıştır. Formülasyonlar oda sıcaklığında 60 dakika beklemeye bırakılmıştır. Bekleme süresi

sonunda radyoişaretlemiş formülasyonlardan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayım yapılarak tayin edilmiştir ve sonuçlar **Tablo 47**'de gösterilmiştir.

5 ± 3 °C' saklama sıcaklığında bekletilen Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 6 ay boyunca radyoişaretleme verimleri %90 üzerinde bulunmuştur. 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nemde bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %80'in üzerinde bulunmuştur. 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. Liyofilize kitlerde çözelti formundaki formülasyonlara göre 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında stabilitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde liyofilize kitlerde en ideal saklama koşulunun 5 ± 3 °C olduğu tespit edilmiştir (**Tablo 47**).

3.1.12.6. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Yöntem 2.2.12.7'de anlatıldığı gibi hazırlanan formülasyonlardaki metal miktarları ICP-OES ile ölçülmüştür. Elde edilen sonuçlar Avrupa Farmakopesi 10.0'da (European Pharmacopoeia, 2017) belirtilen metal miktarlarından daha düşük olduğu bulundu ve sonuçlar **Tablo 46**'da gösterilmiştir.

Tablo 46. Radyoişaretlenmiş fomülasyonlarda tespit edilen metal miktarları (ng/ml) ve standart sapmaları

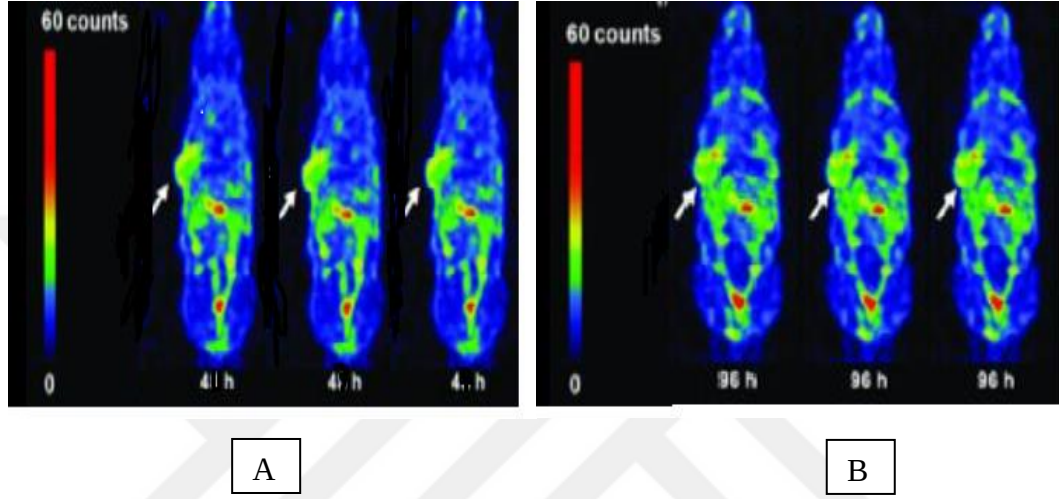
Metal miktarları	L2	L5	L8	L11
Cu (ng/ml)	23,2± 0,23	16,78± 0,2	23,45± 0,76	18,04± 1,23
Zn (ng/ml)	22,6± 0,55	12,34± 0,11	24,56± 0,45	15,56± 0,67
Fe (ng/ml)	24,12± 0,33	13,45± 0,59	20-34± 2,2	11,45± 0,78
Pb (ng/ml)	23,78± 0,55	14,89± 0,61	23,05±0,22	12,09± 0,21

Tablo 47. 5 ± 3 °C (buzdolabında), 25 ± 5 °C %60 $\pm$ 5 bağıl nem ve 40 ± 5 °C’de %75 $\pm$ 5 bağıl nem koşullarına sahip stabilite kabinlerinde bekletilmiş liyofilize halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimleri

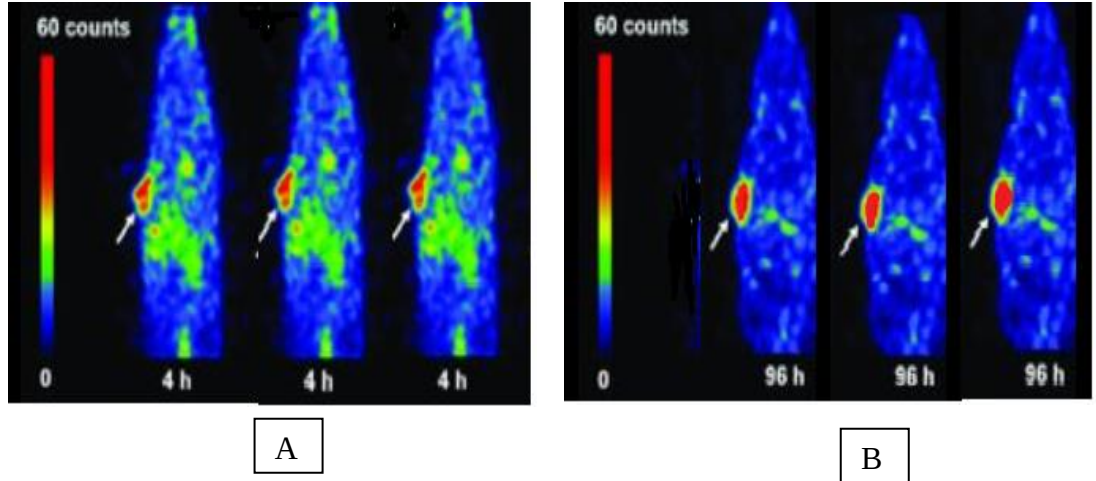
Saklama sıcaklığı	25° C		5° C				25° C				40° C			
Zaman	Başlangıç		3 ay		6 ay		3 ay		6 ay		3 ay		6 ay	
	L5	L11	L5	L11	L5	L11	L5	L11	L5	L11	L5	L11	L5	L11
0 gün	96,9 $\pm$ 0,09	98,8 $\pm$ 0,52	96,2 $\pm$ 0,49	95,7 $\pm$ 1,08	93,5 $\pm$ 1,01	91,8 $\pm$ 0,34	88,9 $\pm$ 1,67	91,4 $\pm$ 0,59	96,9 $\pm$ 0,09	98,8 $\pm$ 0,52	96,2 $\pm$ 0,49	95,8 $\pm$ 1,08	93,5 $\pm$ 1,01	91,8 $\pm$ 0,34
1 gün	97,3 $\pm$ 0,24	98,8 $\pm$ 0,50	95,4 $\pm$ 0,81	97,7 $\pm$ 1,55	92,1 $\pm$ 1,87	91,5 $\pm$ 1,62	89,8 $\pm$ 1,99	90,0 $\pm$ 1,31	97,3 $\pm$ 0,24	98,8 $\pm$ 0,50	95,4 $\pm$ 0,81	97,7 $\pm$ 1,55	92,1 $\pm$ 1,87	91,5 $\pm$ 1,62
3 gün	97,2 $\pm$ 0,25	98,9 $\pm$ 0,17	96,1 $\pm$ 0,44	95,7 $\pm$ 1,74	93,8 $\pm$ 0,56	92,8 $\pm$ 1,33	89,4 $\pm$ 4,83	90,7 $\pm$ 3,54	97,2 $\pm$ 0,25	98,9 $\pm$ 0,17	96,1 $\pm$ 0,44	95,7 $\pm$ 1,74	93,8 $\pm$ 0,56	92,8 $\pm$ 1,33
5 gün	97,3 $\pm$ 0,26	98,9 $\pm$ 0,44	95,4 $\pm$ 0,69	95,7 $\pm$ 2,06	93,1 $\pm$ 0,23	93,2 $\pm$ 0,08	89,1 $\pm$ 8,4	90,5 $\pm$ 2,25	97,3 $\pm$ 0,26	98,9 $\pm$ 0,44	95,4 $\pm$ 0,69	95,7 $\pm$ 2,06	93,1 $\pm$ 0,23	93,25 $\pm$ 0,082
7 gün	96,9 $\pm$ 0,16	98,6 $\pm$ 0,27	95,6 $\pm$ 1,62	95,9 $\pm$ 1,79	93,3 $\pm$ 0,63	91,5 $\pm$ 2,51	89,1 $\pm$ 6,36	91,1 $\pm$ 1,79	96,9 $\pm$ 0,16	98,6 $\pm$ 0,27	95,6 $\pm$ 1,62	95,9 $\pm$ 1,79	93,3 $\pm$ 0,63	91,58 $\pm$ 2,51

3.1.13. İn Vivo Çalışmaların Sonuçları

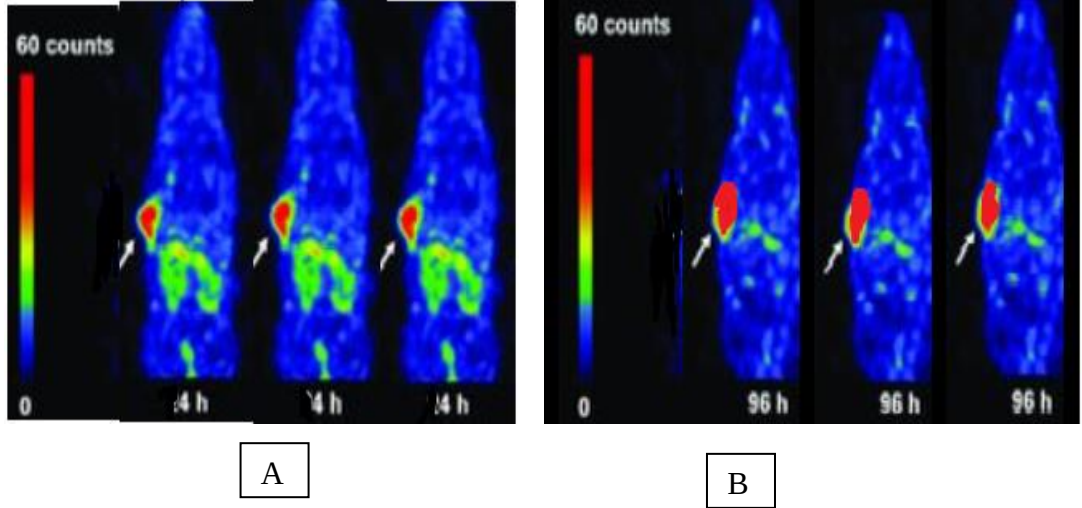
Lu-177 çözeltisi, Lu-177 ile radyoışaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonların meme kanseri oluşturulmuş farelerde yapılan görüntüleme çalışmaları **Yöntem 2.2.13'**de belirtildiği gibi yapılmıştır. Görüntüleme çalışmaları sonucu elde edilen 4. ve 96. saatlerdeki görüntüler **Şekil 79-Şekil 81'**de gösterilmiştir.



Şekil 79. Lu-177 çözeltisinin meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü



Şekil 80. Lu-177-L5 radyofarmasötığının meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü



Şekil 81. Lu-177-L11 radyofarmasötığının meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farede 4. saatte (A) ve 96. saatte (B) alınan tüm vücut görüntüsü

SPECT görüntülerde koyu maviden kırmızıya kadar değişen renk skalası mevcuttur. Koyu maviden kırmızıya doğru gidildikçe ilgili organdaki radyoaktivite değeri artış göstermektedir. Bu veriye göre Lu-177 ile radyoişaretlenmiş L5 ve L11 radyofarmasötiklerinin uygulanmasını takiben 4. ve 96. saatlerde kanserli bölgede radyoaktivite miktarının Lu-177 çözeltisine göre daha yoğun olduğu görülmektedir (Şekil 79-Şekil 81).

Uygulanan formülasyonların kanserli bölgedeki tutulumunu sayısal olarak belirlemek için, bilgisayar ortamında tümör odakları çizilmiş ve piksel başına düşen radyoaktivite miktarları ilgili alan değerleri (ROI değerleri) bilgisayar yardımıyla bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar **Tablo 48**'de gösterilmiştir.

Tablo 48. Lu-177 çözültisi ve Lu-177 ile işaretlenmiş L5 ve L11 için meme kanserli bölgede elde edilen ROI değerleri

Formülasyonlar	Zaman (saat)	
	4. saat	96. saat
Lu-177 çözültisi için meme kanserli bölgede ROI değeri	42,33±14,57	123,67±11,93
Lu-177 ile işaretlenmiş L5 için meme kanserli bölgede ROI değeri	232,67±67,55	480,67±26,69
Lu-177 ile işaretlenmiş L11 için meme kanserli bölgede ROI değeri	288,67±87,50	583,67±18,77

Lu-177 ile radyoışaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonlarının meme kanserli bölgedeki radyoaktivite miktarı Lu-177 çözültisine göre daha yüksektir. Lu-177 ile radyoışaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonları, Lu-177 çözültisine göre meme kanserli bölgede daha yüksek miktarda tutulduğu belirlenmiştir. Ayrıca Lu-177-L11 radyofarmasötiği meme kanserli tümör bölgesinde Lu-177-L5 radyofarmasötiğine göre daha yüksek oranda tutulum göstermiştir.

Tartışma

Doktora tezi kapsamında; meme kanseri tümörlerine hedeflenen immunoterapide kullanılan TRZ etkin maddesinin Lu-177 radyonüklidi ile radyoişaretlenerek meme kanseri tedavisinde kullanılacak yeni teranostik etkili radyofarmasötikler geliştirilmesi amaçlanmıştır. Meme kanseri vakalarının %20-30'unda HER2 aşırı eksprese edilmektedir. HER2'yi aşırı eksprese eden meme kanserli hastalar, daha kısa hayatta kalma süresine ve agresif bir hastalık formuna sahiptir. TRZ HER2'ye hedefli monoklonal antikordur ve meme kanseri hastalarında kullanım açısından FDA tarafından onay verilmiştir. Bu nedenden dolayı tez kapsamında hazırlanan radyofarmasötikler için etkin madde olarak TRZ seçilmiştir. TRZ etkin maddesinin tümör hücrelerine olası sitotoksik ve antijen-antikor ilişkisiyle etki göstermesinden dolayı da radyaaktif madde ile kombine şeklinde kanser tedavisinde kullanılması tedavide etkinliğini arttıracığı düşünülmektedir.

Radyoimmunoterapi, immünoterapi ve radyasyonun kombine şeklinde kanser tedavisinde kullanılabilmesidir. Radyoimmünoterapi, geleneksel monoklonal antikorların etkinliğini artırma potansiyeline sahip olan hedefe yönelik bir tedavi şeklidir (Larson et al., 2015). Bu tedavi yönteminde tümöre özgü bir hedef ajan oluşturmak için monoklonal antikora bir radyoizotop bağlanmaktadır. Nükleer tıpta, radyasyonla tedavi için beta radyasyon yayıcı radyonüklitler kullanılmaktadır. Lu-177 hem gama ışını hem de beta partikülü yayan teranostik özelliğe sahip bir radyonüklittir. Bu radyonüklit mikrometastatik hastalık ve boşlukların yüzeyine yakın tümör hücreleri dahil olmak üzere küçük hacimdeki tümör hücrelerine beta partikül enerjisi taşımak için idealdir (Guleria et al., 2021). Lu-177'nin sitotoksik radyasyonun göreceli olarak küçük alanlarda lokalize edilmesinde etkili olduğu ve çevresindeki normal dokuya daha az zarar veren ve küçük tümörlerin yanı sıra metastatik lezyonları (tipik olarak 3 mm'den az) yok etme konusunda da yetkin olduğu bildirilmiştir (Dash, Pillai, et al., 2015). Lu-177 ayrıca dozların değerlendirilmesi ve görüntüleme için uygun gama ışınları da yaymaktadır (113 ve 208 keV). Düşük enerjili gama fotonları, biyolojik dağılım ve atılım kinetiğinin, tedavi için kullanılan aynı radyoişaretili bileşik ile görüntülenmesini sağlar ve tedavi öncesinde ve sırasında dozimetrenin yapılmasına da izin vermektedir. Lu-177 radyonüklidi hem teranostik olarak hem de hastalar için kişiselleştirilmiş tedavi seçeneği açısından çok uygun bir radyonüklittir. Son yıllarda nükleer tıpta tedavi ajanı olarak çok sık kullanılmaya başlanmıştır. Tedavi oranı ve

hasta memnuniyeti açısından da önemli radyonüklitlerden biri olmuştur. Bu özellikler kapsamında çözelti ve liyofilize kit halindeki TRZ: şelat ajan komplekslerinin radyoişaretlenmesinde radyonüklit olarak Lu-177 ile çalışılmıştır.

Doktora tezi kapsamında deneylere başlamadan önce hazırlanacak TRZ-şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesini belirlemek amacıyla moleküler yerleştirme çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda şelat ajanları ile TRZ'nin kompleks oluşturup oluşturamayacağı belirlenip, TRZ: şelat ajanı içeren kompleksler hazırlanmıştır. Bu komplekslerin karakterizasyonu ve sitotoksitesi değerlendirilmiştir. Daha sonra bu komplekslerin Lu-177 ile radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen teranostik etkili radyofarmasötiklerin meme kanserindeki tutulumu in vivo çalışmalarla değerlendirilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmaların sonuçları literatürler eşliğinde yorumlanmıştır.

3.2. TRZ-Şelat ajanı arasındaki bağlanma afinitesi çalışmaları

TRZ-şelat ajanları kompleksleri hazırlama çalışmaları başlamadan önce moleküler yerleştirme çalışmaları **Yöntem 2.2.1**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. **Şekil 9**'da gösterilen DTPA-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum skor (gibbs serbest enerjisi) olan -6,5 değerinin sonuç olarak uygun olduğu bulunmuştur. Ayrıca -6,5 skor değerinde 4 adet hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. **Şekil 12**'de gösterilen DTPA ve TRZ (6N9T) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum serbest gibbs enerjisi (en negatif) olan -5,7 değerinin sonuç olarak uygun olduğu bulunmuştur. Ayrıca -5,7 skor değerinde 9 adet hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. **Şekil 12**'de diğer skor ve RMSD değerlerine sahip moleküler yerleştirme sonuçları DTPA'nın diğer yerleşme seçeneklerini temsil etmektedir. Ancak, RMSD değerleri ve skorları çalışma için kullanılmasına uygun görülmemiştir. **Şekil 15**'da gösterilen DOTA-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum serbest gibbs enerjisi (en negatif) olan -6.5 değerinin sonuç olarak uygun olduğu bulunmuştur. Ayrıca -6.5 skor değerinde 4 adet Hidrojen bağı yaptığı görülmüştür. **Şekil 18**'da gösterilen DOTA-TRZ (6N9T) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum serbest gibbs enerjisi (en negatif) olan -5.9 değerinde 3 hidrojen bağı yaptığı görülmüştür sonuç olarak uygun olduğu bulunmuştur. Bu hidrojen bağları Lizin, Aspartik Asit ve Asparajin ile DOTA arasında gerçekleşmiştir. Diğer yerleştirme seçeneklerinde hidrojen bağı

yüksek olsada skor düşük ve RMSD yüksek olduğu için tercih edilmemiştir. **Şekil 21**'de gösterilen EDTA-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum serbest gibbs enerjisi (en negatif) -6.1 değerinin sonuç olarak uygun olduğu görülmüştür. **Şekil 24**'de gösterilen EDTA-TRZ (6N9T) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre RMSD 0 ve en optimum serbest gibbs enerjisi (en negatif) -6.0 değerinin sonuç olarak uygun olduğu görülmüştür. **Şekil 29**'da gösterilen MAG3-TRZ (4HJG) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre -6.8 değerinde 3 hidrojen bağı bulunmuştur. İlk sıradaki bu -6.8 skor değerinde moleküler yerleştirme sonucunun RMSD'si 0'dır. Bu sonuçlar çalışma için uygun bulunmuştur. **Şekil 30**'de gösterilen MAG3-TRZ (6N9T) moleküler yerleştirme sonuçlarına göre -5.5 değerinde 3 hidrojen bağı bulunmuştur. İlk sıradaki bu -5.5 skor değerinde moleküler yerleştirme sonucunun RMSD'si 0 dır. Bu sonuçlar çalışma için uygun bulunmuştur.

Sonuçları elde etmek için her bir şelat ve TRZ bölgesi için 20 defadan fazla moleküler yerleştirme denemesi gerçekleştirilmiştir. Sonuç olarak, DOTA (DOTA-4HJG ve DOTA-6N9T) 20 denemenin tamamında aynı değeri verdiği görülmüştür. Dolayısıyla, DTPA ve EDTA ya göre daha stabil olduğu düşünülmektedir. DTPA ve EDTA verileri ele alınırken 20 denemedeki en optimum skor değeri (Gibbs Serbest Enerjisinin en negatif olduğu değer) sonuç olarak kabul edilmiştir. Yerleştirme aşamalarının tamamında EDTA, DOTA ve DTPA çok benzer noktalara yerleşmişlerdir. Ancak, MAG3 molekülünün farklı noktaya yerleştiği moleküler yerleştirme işleminin sonucunda görülmüştür. MAG3 molekülünün farklı noktaya yerleşmesinin sebebi yapısındaki düz sıralanmış atomlar olabilir. Ayrıca, tüm sonuçlar incelendiğinde 4HJG (TRZ Fab bölgesi) üzerinde yapılan moleküler yerleştirme sonuçlarının Gibbs Serbest Enerjisi açısından 6N9T (TRZ Fc bölgesi) çalışmasına göre daha negatif olduğu görülmüştür. Dolayısıyla, moleküllerin TRZ'nin Fab kısmına bağlanma isteği ve stabilitesi Fc kısmına göre daha yüksek yorumu yapılabilmektedir.

3.3. TRZ'nin Özelliklerinin İncelenmesi

Etkin madde-şelat ajanı kompleksleri geliştirme çalışmalarımıza başlamadan önce, TRZ etkin maddesinin fizikokimyasal özellikleri incelenmiştir. TRZ'nin FTIR analizi **Yöntem 2.2.2.1**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. TRZ'nin FTIR spektrumunda kimyasal yapıya bağlı olan karakteristik pik, maddenin saf olduğunu göstermektedir (**Şekil 32**). Bulunan pikler literatürle uygunluk göstermiştir (Chan et al., 2020).

TRZ'nin UV analizi **Yöntem 2.2.2.2**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. TRZ'nin 190-400 nm dalga boyu arasında UV analiz gerçekleştirilmiş olup, TRZ'nin 255 nm'de pik verdiği gözlenmiştir (**Şekil 33**). Maksimum dalga boyu olarak saptanan bu değer, literatürde bu maddeler için belirtilen dalga boyuna uygunluk göstermektedir (Haque et al., 2016).

3.4. UV Spektrofotometre ile TRZ Miktar Tayini Yöntemi ve Validasyonu

Doktora tez çalışmasında TRZ'nin miktar tayini UV spektrofotometre yöntemi kullanılarak yapılmıştır. **Yöntem 2.2.2.3**'de anlatıldığı şekilde kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve yapılan tüm analizlerde kullanılmak üzere doğru denklemi (**Şekil 34**) ve r^2 katsayısı elde edilmiştir. Miktar tayininde kullanılan spektrofotometre yönteminin güvenilirliğinin belirlenebilmesi ve geçerliliğinin kanıtlanması için **Yöntem 2.2.2.4**'de anlatıldığı şekilde validasyon çalışmaları yapılmıştır. Doğruluk çalışmalarında, çalışılan derişim aralığında derişim-eğri altı alan ilişkisinin doğrusal olduğu görülmüştür. Bu doğrusallığın göstergesi olan r^2 değeri 0.9998 olarak bulunmuştur. FDA tarafından yapılan validasyon çalışmalarında beklenen doğruluk değeri ise %80'den büyük olmasıdır (FDA et al., 2015). Doğruluk çalışmamız bu kriterleri karşılamıştır (**Tablo 14**). Yöntem validasyonunun tekrarlanabilirlik çalışmasında 10 µg/mL derişimde çalışılmış ve elde edilen sonuçlar istatistiksel analize tabi tutulmuş ve anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (**Tablo 15**). Validasyon çalışmalarında kısa süreli oda sıcaklığı kararlılığı testi için 2 ve 10 µg/mL olmak üzere iki farklı derişimde çalışılmıştır. Ayrıca 0 ve 12. saatlerde yapılan enjeksiyonlardan elde edilen derişimler istatistiksel analize tabii tutulmuş ve aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$) (**Tablo 16**,

Tablo 17).

3.5. Şelat Ajanlarının Fizikokimyasal Özelliklerinin İncelenmesi

Şelat ajanlarının FTIR analizi **Yöntem 2.2.3.1**'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Şelat ajanlarının FTIR spektrumunda kimyasal yapıya bağlı olan karakteristik pik, maddelerin saf olduğunu göstermektedir (**Şekil 35-Şekil 38**). Bulunan pikler literatürle uygunluk göstermiştir (Devi et al., 2012).

3.6. Çözelti Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

3.6.1. Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Çözelti halinde hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların partikül boyutları $560,4 \pm 123,9$ nm ve $1732 \pm 52,27$ nm arasında, zeta potansiyelleri $-5,61 \pm 2,06$ ve $-13,9 \pm 1,63$ mV arasında bulunmuştur. TRZ etkin maddesi büyük bir moleküldür yaklaşık 145 kDa molekül ağırlığına sahiptir. Partikül boyutunun büyük olması beklenen bir sonuçtur. PDI değeri formülasyonun partikül boyutu açısından homojen bir yapıya sahip olup olmadığını gösteren bir parametredir. Homojen dağılım gösteren formülasyonlarda bu değerin 0,5 ve altında olması istenmektedir (Özge Alaş & Genç, 2016). Formülasyonların PDI değerleri $0,337 \pm 0,068$ ve $0,497 \pm 0,179$ arasında bulunmuştur.

3.6.2. pH Ölçümleri

Tüm formülasyonların pH ölçüm sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların pH değerleri $7,65 \pm 1,03$ ve $8,3 \pm 1,2$ arasında bulunmuştur. Şelat ajanların çeşidi ve oranları formülasyonların pH'sını önemli derece etkilememiştir ($p > 0,05$).

3.6.3. İzotoni Testi

Çözelti halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların osmotik basınç sonuçları **Tablo 18**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların osmotik basınç değerleri $309 \pm 6,67$ ve $325 \pm 6,4$ mOsmol/kg arasında bulunmuştur. Tüm formülasyonlar hipertoniktir.

3.6.4. TRZ Miktar Tayini

Çözelti halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarındaki TRZ miktar tayinleri sonuçları **Tablo 18**'de gösterilmiştir. Pratik olarak bakıldığında formülasyonların içerik miktarları **Tablo 18**'de gösterildiği gibi $893,45 \pm 11,2 \mu\text{g}$ ile $990,12 \pm 5,67 \mu\text{g}$ arasında bulunmuştur. Formülasyonların içindeki TRZ miktarının teorik olan ilave edilen miktara (1 mg) uygun olduğu görülmüştür.

3.7. Stabilité Çalışmaları

Formülasyonların stabilite çalışmaları **Yöntem 2.2.6**'da anlatıldığı gibi yapılmıştır. Formülasyonların fiziksel görünüşleri incelendiğinde gözle görülür herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri **Tablo 19-Tablo 21** arasında gösterilmiştir. İstatiksel olarak $5 \pm 3^\circ\text{C}$ ve $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60± 5, $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların sahip olduğu partikül boyutları kendi içlerinde saklama koşullarına bağlı olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). İlaç taşıyıcı sistemlerde PDI değerinin 0,5'in altında olması istenir, bu değer formülasyonun homojen bir şekilde hazırlanıp hazırlanmadığı hakkında bilgi vermektedir (Özge Alaş & Genç, 2016). Formülasyonların PDI değerlerine bakıldığında, $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60± 5 ve $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların 0,5'in altında PDI değerine sahip olduğu görülmüştür (**Tablo 19-Tablo 21**).

6 aylık stabilite çalışmaları sonucunda $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60± 5 ve $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonlar, zeta potansiyel değerleri açısından kendi içinde zamana bağlı olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (**Tablo 19-Tablo 21**). 6 aylık stabilite çalışmaları sonunda belirtilen saklama koşullarında partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri açısından çözelti halindeki formülasyonların stabil olduğu gözlenmiştir.

Stabilite çalışmalarında ölçülen ve hesaplanan pH ve TRZ miktarları **Tablo 22-Tablo 24**'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır. 6 aylık stabilite sonuçlarına bakıldığında $5 \pm 3^\circ\text{C}$, $25 \pm 5^\circ\text{C}$ %60± 5 ve $40 \pm 5^\circ\text{C}$ 'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların içerik miktarları $855 \mu\text{g}$ 'ın üzerinde, pH değerleri de 7'nin üzerinde bulunmuştur (**Tablo 22-Tablo 24**). 6 ay sonunda her bir formülasyon için elde edilen TRZ miktarı ve pH değerleri istatistiksel

olarak başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

3.8. Liyofilize Kit Halinde TRZ-Şelat Ajan Komplekslerinin Hazırlanması

3.8.1. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Hazırlama Verimi

Doktora tezi kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen hazırlama verimleri **Tablo 25**'de belirtilmiştir. Liyofilize kit halindeki her bir formülasyonun hazırlama veriminin %90'ın üzerinde olduğu bulunmuştur.

Liyofilizasyon işlemi sonrasında kitlerin fizikokimyasal özellikleri incelenerek kullanım açısından uygunlukları değerlendirilmiştir.

3.8.2. Liyofilize Kit Halinde TRZ: Şelat Ajanı Kompleks Formülasyonlarının Karakterizasyon Çalışmaları

3.8.2.1. Partikül Boyutu ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Liyofilize kit halinde hazırlanan formülasyonların partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyelleri **Yöntem 2.2.8.1**'de anlatıldığı gibi ölçülmüştür ve sonuçlar **Tablo 26**'da verilmiştir. Tüm formülasyonların partikül boyutları $457,5\pm 22,15$ nm ve $904,4\pm 8,12$ nm arasında, zeta potansiyelleri $-1,76\pm 0,405$ ve $-11,9\pm 0,757$ mV arasında, PDI değerleri $0,201\pm 0,081$ ve $0,446\pm 0,134$ arasında bulunmuştur. Liyofilize haldeki formülasyonların partikül boyutlarının çözelti halindeki formülasyonlara göre farklılık gösterdiği ve daha düşük olduğu tespit edilmiştir ($p<0,05$).

3.8.2.2. FTIR Spektrumları

Liyofilize kit halinde hazırlanan formülasyonların FTIR spektrumları **Yöntem 2.2.8.2**'de anlatıldığı ölçülmüştür ve sonuçlar **Şekil 39-Şekil 50** arasında gösterilmiştir. Formülasyonlara ait FTIR spektrumları saf TRZ ve şelat ajanlarına ait FTIR spektrumlarıyla karşılaştırıldığında farklı gerilme titreşimlerine ait piklerde kaymalar tespit edilmiştir. Gerilme titreşimlerine ait piklerde kaymalar **Şekil 39-Şekil 50**'de gösterilmiştir. Piklerdeki bu kaymalar TRZ ile etkin madde arasında kompleks oluştuğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir.

3.8.2.3. Nem Tayini Testi

Yapılan nem tayini testi sonuçlarına göre liyofilize kitlerin içerdiği nem miktarı $0,1\pm0,03$ ve $0,92\pm0,11$ arasında bulunmuştur (**Tablo 27**), bu değerler izin verilen nem miktarı olan %3'ün altında olduğu için liyofilizasyon koşullarımız uygun bulunmuştur (Malik et al., 2010).

3.8.2.4. pH Ölçümleri

Kit halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların pH ölçüm sonuçları **Tablo 27**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların pH değerleri $7,9\pm0,54$ ve $8,2\pm0,54$ arasında bulunmuştur. Liyofilize kitlere ait pH değerleri çözelti halindeki formülasyonların pH değerleriyle karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

3.8.2.5. İzotoni Testi

Kit halinde hazırlanan farklı oranlarda TRZ: şelat ajanı içeren formülasyonların çözücü ile çözündürüldükten sonraki osmotik basınç ölçüm sonuçları **Tablo 27**'de verilmiştir. Tüm formülasyonların osmotik basınç değerleri $305\pm11,1$ ve $322\pm7,89$ mOsmol/kg arasında bulunmuştur. Tüm kitler hipertonik bulunmuştur.

3.8.2.6. TRZ Miktar Tayini

Kit halindeki TRZ: şelat ajan kompleks formülasyonlarındaki TRZ miktarları spektrofotometrik olarak **Yöntem 2.2.8.6**'da anlatıldığı ölçülmüştür ve sonuçları **Tablo 27**'de gösterilmiştir. Pratik olarak bakıldığında formülasyonların içerik miktarları **Tablo 27**'de gösterildiği gibi $885,98\pm8,79$ µg ile $990,83\pm12,03$ µg arasında bulunmuştur. Liyofilize kitlerin içindeki TRZ miktarının teorik olan ilave edilen miktara (1 mg) uygun olduğu görülmüştür.

3.8.2.7. Stabilité Çalışmaları

Formülasyonların fiziksel görünüşleri incelendiğinde gözle görülür herhangi bir değişime rastlanmamıştır. Elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerleri **Tablo 28-Tablo 30** arasında gösterilmiştir. İstatistiksel olarak 5 ± 3 °C ve 25 ± 5 °C %60±5, 40 ± 5 °C'de %75±5 bağıl nemde saklanan formülasyonların sahip olduğu partikül boyutları kendi içlerinde saklama koşullarına bağlı olarak değerlendirildiğinde anlamlı

bir fark gözlenmemiştir ($p>0,05$). İlaç taşıyıcı sistemlerde PDI değerinin 0,5'in altında olması istenir, bu değer formülasyonun homojen bir şekilde hazırlanıp hazırlanmadığı hakkında bilgi vermektedir (Özge Alaş & Genç, 2016). Formülasyonların PDI değerlerine bakıldığında, 5 ± 3 °C, 25 ± 5 °C %60± 5 ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların 0,5'in altında PDI değerine sahip olduğu görülmüştür (**Tablo 28-Tablo 30**). 6 aylık stabilite çalışmaları sonucunda 5 ± 3 °C, 25 ± 5 °C %60± 5 ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonlar, zeta potansiyel değerleri açısından kendi içinde zamana bağlı olarak anlamlı bir fark göstermemiştir ($p>0,05$) (**Tablo 28-Tablo 30**). 6 aylık stabilite çalışmaları sonunda belirtilen saklama koşullarında partikül boyutu, zeta potansiyel ve PDI değerleri açısından kit halindeki formülasyonların stabil olduğu gözlenmiştir.

Stabilite çalışmalarında ölçülen ve hesaplanan pH ve TRZ miktarları **Tablo 31-Tablo 33**'de gösterilmiştir. Tüm formülasyonlar teorik olarak 1 mg TRZ içerecek şekilde hazırlanmıştır. 6 aylık stabilite sonuçlarına bakıldığında 5 ± 3 °C, 25 ± 5 °C %60± 5 ve 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nemde saklanan formülasyonların içerik miktarları 875 µg'ın üzerinde, pH değerleri de 7'nin üzerinde bulunmuştur (**Tablo 31-Tablo 33**). 6 ay sonunda her bir formülasyon için elde edilen TRZ miktarı ve pH değerleri istatistiksel olarak başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında anlamlı fark olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

3.9. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.9.1. Formülasyonların Hücreler Üzerine Etkisi

Bulut ve arkadaşları (Bulut et al., 2019), TRZ'nin HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinde tek başına ve AT-101 polifenolik bileşikle beraber uygulaması sonucu sitotoksik etkisini değerlendirmişlerdir. HER2 pozitif meme kanseri hücresi olarak MCF-7 hücrelerini kullanmışlardır. TRZ'nin HER2 pozitif meme kanseri hücrelerinde tek başına kullanıldığında sitotoksik etki oluşturduğunu belirlemişlerdir. Çalışmamızda da buna paralel olarak 24, 48 ve 72 saat sürelerle uygulanan farklı şelat yapıcı ajanlar kullanılarak hazırlanmış TRZ kompleks çözelti ve liyofilize kit halindeki formülasyonların sağlıklı CRL-10762 ve kanserli MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri değerlendirilmiştir.

Hücre çalışmaları sonucunda;

-1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren çözelti (**Ç2, Ç5, Ç8 ve Ç11**) ve liyofilize (**L2, L5, L8 ve L11**) kit halindeki formülasyonların 72 saat boyunca sağlıklı meme dokusunu taklit eden CRL-10762 hücrelerinde %95'in üzerinde hücre canlılık oranına sahip olması ve hücre canlılığında bir azalmaya neden olmadığından,

-1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren çözelti (**Ç2, Ç5, Ç8 ve Ç11**) ve liyofilize (**L2, L5, L8 ve L11**) kit halindeki formülasyonların 72 saat sonunda MCF-7 hücrelerinde %83-85 hücre canlılığı oranına sahip olması ve hücre canlılığında azalmaya neden olmasından dolayı

1:10 oranında TRZ: şelat ajanı içeren çözelti ve liyofilize kit formülasyonlarıyla radyoişaretleme çalışmalarına geçilmiştir. Radyoişaretleme çalışmalarında kullanılacak formülasyonlar **Ç2, Ç5, Ç8, Ç11, L2, L5, L8 ve L11** olarak belirlenmiştir.

3.10. Mikrobiyolojik Çalışmalar

3.10.1. Sterilite Testi

Formülasyonlarda yapılan sterilite testi sonucunda, herhangi bir mikroorganizma üremesinin olmadığı, steril olduğu tespit edilmiştir.

3.10.2. Pirojenite

Formülasyonlarda yapılan pirojenite testleri sonucunda kontrol tüplerinde ve örnek tüplerinde jel oluşmadığı gözlenmiştir. Formülasyonların pirojenite açısından uygun olduğu sonucuna varılmıştır (Fukumori et al., 2007).

3.11. Radyoişaretleme Çalışmaları

Çalışmalarda kullanılan taşıyıcı içermeyen Lu-177 çözeltisinin gama spektrumu NaI (TI) sintilasyon detektörü içeren çok kanallı analizöre sahip gama ışını spektroskopisi ile alınmıştır. Lu-177'ye ait gama spektrumu **Şekil 63**'de gösterilmiştir. Elde edilen spektrumun farmakopelerde verilen spektrum pikleri ile aynı piklere sahip olduğu gözlenmiştir (European Pharmacopoeia, 2017).

3.11.1. Çözelti Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları

3.11.1.1.4. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme verimi doz kalibratöründe radyoaktivite sayımları yapılarak gerçekleştirilmiştir. Radyoişaretleme sonuçları **Tablo 34** ve **Şekil 69**'da belirtilmiştir. 15 dakika inkübasyona bırakılan Ç2 formülasyonun radyoişaretleme verimi en düşük (%58,86) bulunmuştur. 60 dakika inkübasyona bırakılan tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95'in üzerinde bulunmuştur. Bhusari ve arkadaşları (Bhusari et al., 2015) tarafından yapılan Lu-177-TRZ radyoişaretleme çalışmalarında TRZ içeren ticari formülasyonun DOTA ile kompleksi hazırlanmış, farklı pH larda ve inkübasyon sürelerinde Lu-177 ile radyoişaretlenmesi gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon süresi olarak 30 dakika – 3 saat aralığı denenmiştir. 2 saatlik inkübasyon süresi sonunda en yüksek radyoişaretleme verimini (%91) elde etmişlerdir. Tez kapsamında yapılan çalışmalarda 1 saatlik inkübasyon süresi sonunda çözelti ve liyofilize kit halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimi değerleri %90 üzerinde bulunurken; özellikle bazı formülasyonlar (Ç5, Ç11, L5 ve L11) için radyoişaretleme verimi %95'in üzerinde bulunmuştur.

3.11.1.1.5. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

pH değişimi radyofarmasötiklerin stabilitelerini etkileyen önemli bir faktördür. Bu nedenle hazırlanan radyofarmasötiklerin radyokimyasal saflığı ve *in vitro* stabilitesi asit veya alkali ilavesi ile farklı pH aralıklarında incelenmelidir. Bir radyofarmasötik için ideal pH değeri 7,4'tür. Ancak radyofarmasötikler küçük hacimlerde uygulanan ilaçlar olduğundan kanın yüksek tampon kapasitesi nedeniyle stabil oldukları pH değerlerinde hazırlanabilirler (Banerjee et al., 2015).

Doktora tez kapsamında üç farklı pH'da (pH 5, 7, 9) çalışılmıştır. pH 7'de hazırlanan çözelti halindeki formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 35**'de gösterilmiştir. Bu formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 70**'de gösterilmiştir. pH 7'de hazırlanan Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 7 gün boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. Ç2 ve Ç8 formülasyonları başlangıçta ve 1. günün sonunda %95 üzerinde 3, 5 ve 7. günlerde ise radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. RP-HPLC sonuçlarına göre ise başlangıçta

tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. 7. günde yapılan analizlere göre ise sadece Ç2 formülasyonunun radyoişaretleme verimi %90 üzerinde diğer sonuçlar %95 üzerinde bulunmuştur.

pH 5'te hazırlanan çözelti halindeki formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 36**'da gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 71**'de gösterilmiştir. En düşük radyoişaretleme verimi %50 civarında Ç8 formülasyonunda bulunmuştur. Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri %70 ve üzerinde bulunmuştur ancak en yüksek radyoişaretleme verimi Ç11 formülasyonunun başlangıç zamanında elde edilmiştir (%81,51). RP-HPLC sonuçları doz kalibratöründe hesaplanan radyoişaretleme verimleriyle benzerlik göstermektedir. Ç11 formülasyonunun 0 ve 7. günlerde radyoişaretleme verimleri %80 üzerinde bulunmuştur. pH 5'te hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme verimleri pH 7'ye göre daha düşük bulunmuştur ve istenilen radyoişaretleme verimine sahip olmadığına karar verilmiştir.

pH 9'da hazırlanan çözelti halindeki formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 37**'de gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 72**'de gösterilmiştir. pH 9'da en düşük radyoişaretleme verimi Ç8 formülasyonunda bulunmuştur. Ancak pH 5'e göre daha yüksektir. Ç11 formülasyonunun 7 gün boyunca radyoişaretleme verimi %80 üzerinde bulunmuştur. Ayrıca pH 5'e göre daha yüksek radyoişaretleme verimine sahiptir. Ç2 ve Ç5 formülasyonlarının radyoişaretleme verimleri de pH 5'e göre daha yüksektir. Ancak pH 9'da hazırlanan formülasyonlarının hiçbirisi istenilen radyoişaretleme verimine sahip değildir. Bu formülasyonlarda pH 5'e göre daha yüksek radyoişaretleme verimi elde edilirken, pH 7'ye göre radyoişaretleme verimleri daha düşük olduğu görülmüştür.

Guleria ve arkadaşları (Guleria et al., 2021) TRZ'nin DOTA ile kompleksini hazırlamış ve Lu-177 ile ideal radyoişaretleme koşullarını belirlemiştir. Bu çalışmada radyoişaretleme için optimum pH 6,5 olarak belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada pH 5 ve pH 7 ile de çalışılmış, çalışılan bu pH'larda hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme verimleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Doktora tez kapsamında bu çalışmadan farklı olarak asidik (pH 5) ve bazik ortamda (pH 9)

hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme veriminin pH'dan etkilendiği gözlenmiştir. Asidik ve bazik ortamda elde edilen radyoişaretleme verimleri pH 7'de elde edilen radyoişaretleme verimlerine göre daha düşük bulunmuştur. Sonuç olarak doktora tez çalışmasında hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme için ideal pH değeri 7 olarak belirlenmiştir.

3.11.1.1.6. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Radyoişaretleme çalışmaları, yüksek dozda radyasyonun olumsuz etkilerinden personel ve çevreyi korumak amacı ile düşük dozda (5 mCi) yapılmıştır. Nükleer Tıp Bölümlerinde kullanılan Lu-177 dozları daha yüksek doz radyoaktivite ile işaretlendiğinden, radyoişaretleme çalışmaları yüksek doz radyoaktivite ile yapılarak formülasyonun radyoişaretleme verimi ve stabilitesi incelenmiştir. Bu amaçla çözelti halindeki formülasyonlar 50 mCi aktiviteye sahip Lu-177 ile radyoişaretlenip, radyoişaretleme verimi açısından incelendiğinde; 5 ve 50 mCi aktiviteye sahip Lu-177 ile işaretlenen, çözelti halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimlerinde anlamlı fark olmadığı ($p>0.05$) tespit edilmiştir (**Tablo 38** ve **Şekil 73**). 50 mCi aktiviteye sahip Lu-177 ile işaretleme çalışmaları otomatik sentez ünitesinde gerçekleştirilmiştir. Otomatik sentez ünitesi ile radyoişaretlemenin gerçekleştirilmesi radyasyona maruziyeti azalttığı gibi işaretleme prosedürünü de kolaylaştırmıştır. Kameswaran ve arkadaşları (Kameswaran et al., 2019) DTPA şelat ajanını 'CHX-A'-DTPA-NCS' şeklinde modifiye ederek TRZ ile kompleksini hazırlamışlar, 40 ve 50 mCi aktiviteye sahip Lu-177 ile radyoişaretlemişlerdir. Radyoişaretleme verimini %95'in üzerinde bulmuşlardır. 40 ve 50 mCi ile yapılan radyoişaretleme çalışmaları sonucunda radyoişaretleme verimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulmamışlardır. Doktora tez çalışması kapsamında 5 ve 50 mCi aktivitedeki Lu-177 ile çalışıldı. 5 mCi ile yapılan radyoişaretleme verimleri 7 gün boyunca %95 ve üzerinde bulunmuştur. 50 mCi yapılan radyoişaretleme çalışmalarında radyoişaretleme verimi 0 ve 1. günde %95 üzerinde 3, 5 ve 7. günlerde %90 üzerinde bulunmuştur. Radyoişaretleme çalışmalarında çözelti halindeki formülasyonlar için kullanılan 5 mCi ve 50 mCi radyoaktivite dozlarının uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.11.1.2. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonlardaki metal miktarları ICP-OES ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar **Tablo 39**'da gösterilmiştir ve sonuçların farmakopelerde

izin verilerin metal miktarlarından daha düşük olduğu bulunmuştur (European Pharmacopoeia, 2017).

3.11.1.3. Stabilité Çalışmaları

Nükleer Tıpta hazırlanan radyofarmasötiklerin gün boyunca hastalara uygulanabilmeleri için stabilite çalışmalarının yapılması gereklidir. Bunun yanı sıra Nükleer tıp uygulamalarında tümörlere özgü reseptörlere spesifik olan tanı ve tedavi amaçlı radyoişaretli peptitlerin geliştirilmesi için yapılan çalışmalar artmaya devam etmektedir (K. Kim & Kim, 2018; Sulieman et al., 2020). Radyoişaretli peptitler, genel olarak etkilerini uygulandıkları vücut dokusunda göstermektedir. Dolayısı ile etki göstermesi beklenen bölgeye kadar uygun *in vitro* stabiliteye sahip olmaları da istenmektedir.

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonların başlangıç, 3 ve 6. aylarda stabilite çalışmaları yapılmıştır. Radyoişaretlemiş formülasyonlardan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayım yapılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar **Tablo 40**'da belirtilmiştir. 5 ± 3 °C' saklama sıcaklığında bekletilen Ç5 ve Ç11 formülasyonlarının 6 ay boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nemde bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında bekletilen formülasyonlar ise 6 aylık radyoişaretleme verimleri %85'in üzerinde bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde en ideal saklama koşulunun 5 ± 3 °C olduğu tespit edilmiştir.

3.11.2. Liyofilize Kit Halindeki Formülasyonların Radyoişaretleme Çalışmaları

3.11.2.1.7. İnkübasyon Zamanının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Hazırlanan radyofarmasötiğin radyoişaretleme verimi üzerine inkübasyon süresinin etkisi bulunmaktadır. İnkübasyon süresi; kullanılan radyonüklidik kısım ve farmasötik kısmın özelliklerine göre belirlenir (Ocak et al., 2011).

Doktora tez kapsamında farklı inkübasyon sürelerinde bekletilen formülasyonların radyoişaretleme verimi sonuçları **Tablo 41** ve **Şekil 74**'de belirtilmiştir. 15 dakika inkübasyon süresinde L2 formülasyonun radyoişaretleme verimi en düşük değer olarak %70 civarında bulunmuştur. L5, L8 ve L11 formülasyonlarının radyoişaretleme verimi ise %90'ın üzerinde bulunmuştur. 30 dakika inkübasyon süresinde tüm

formülasyonların radyoişaretleme verimi %90 üzerinde bulunmuştur. En yüksek radyoişaretleme verimi 60 dakika inkübasyon süresinde bekletilen formülasyonlarda gözlenmiştir ve tüm formülasyonların radyoişaretleme verimi %95 üzerindedir. Bu yüzden çözelti halindeki formülasyonlarda olduğu gibi liyofilize kit halindeki formülasyonlarda da optimum inkübasyon süresi 60 dakika olarak belirlenmiştir.

3.11.2.1.8. pH'nın İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Doktora tez kapsamında pH 7 olarak hazırlanan formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 42**'de gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 75**'de gösterilmiştir. pH 7'de hazırlanan L5 ve L11 formülasyonlarının 7 gün boyunca radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. L2 ve L8 formülasyonları başlangıç ve 1. günün sonunda %95 üzerinde 3, 5 ve 7. günlerde ise radyoişaretleme verimleri %90'ın üzerinde bulunmuştur. RP-HPLC sonuçlarına göre ise başlangıçta tüm formülasyonların radyoişaretleme verimleri %95 üzerinde bulunmuştur. 7. günde yapılan analizlere göre ise sadece L2 ve L8 formülasyonunun radyoişaretleme verimi %93 üzerinde L5 ve L11 formülasyonları ise %95 üzerinde bulunmuştur.

pH 5'te hazırlanan liyofilize kit halindeki formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 43**'de gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 76**'da gösterilmiştir. En yüksek radyoişaretleme verimi %76,24-79,79 değerleri arasında L11 formülasyonunda bulunmuştur. L8 formülasyonu pH'dan en çok etkilenen formülasyon olmuştur ve radyoişaretleme verimi %50'lere düşmüştür. pH 5'te hazırlanan formülasyonların radyoişaretleme verimleri pH 7'ye göre daha düşük bulunmuştur ve istenilen saflıkta olmadığına karar verilmiştir.

pH 9'da hazırlanan liyofilize kit halindeki formülasyonların 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerdeki radyoişaretleme verimleri **Tablo 44**'de gösterilmiştir. Ayrıca formülasyonların 0 ve 7. günlerde RP-HPLC enjeksiyonu yapılarak elde edilen radyoişaretleme verimleri ve kromatogramları **Şekil 77**'de gösterilmiştir. pH 9'da en düşük radyoişaretleme verimi L8 formülasyonunda bulunmuştur. Radyoişaretleme verimi bu formülasyonda %42,64'e kadar düşmüştür. pH 9'da hazırlanan radyoişaretleli formülasyonların

istenilen radyoişaretleme verimine sahip olmadığı görülmüştür. Yapılan çalışmalar sonucunda, farklı pH'ların liyofilize kit halindeki formülasyonların radyoişaretleme verimi üzerine etkili olduğu görülmüştür. Özellikle pH 7'de hazırlanan formülasyonlarda %95'in üzerinde radyoişaretleme verimi elde edilmiştir ve sonraki çalışmalar pH 7'de hazırlanan formülasyonlarla gerçekleştirilmiştir.

3.11.2.1.9. Radyoaktivite Miktarının İşaretleme Verimi Üzerine Etkisi

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonların 5 mCi ve 50 mCi Lu-177 ile radyoişaretleme sonuçları **Tablo 45**'de belirtilmiştir. 5 mCi ile yapılan radyoişaretleme verimleri 7 gün boyunca %95 ve üzerinde bulunmuştur. 50 mCi yapılan radyoişaretleme çalışmalarında radyoişaretleme verimi başlangıçta %95 üzerinde 1, 3, 5 ve 7. günlerde %90 üzerinde bulunmuştur. Radyoişaretleme çalışmalarında liyofilize kit halindeki formülasyonlar için 5 mCi ve 50 mCi radyoaktivite dozlarının uygun olduğuna karar verilmiştir.

3.11.2.4. Metal (Cu, Zn, Fe, Pb) Miktarı

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonlardaki metal miktarları ICP-OES ile ölçüldü. Elde edilen sonuçlar **Tablo 46**'da gösterilmiştir ve sonuçların farmakopelerde izin verilerin metal miktarlarından daha düşük olduğu bulunmuştur (European Pharmacopoeia, 2017).

3.11.2.5. Stabilité Çalışmaları

Doktora tez kapsamında hazırlanan formülasyonların başlangıç ve 3. aylarda stabilité çalışmaları yapılmıştır. Radyoişaretlemiş formülasyonlardan 0, 1, 3, 5 ve 7. günlerde örnekler alınarak stabilitesi doz kalibratöründe sayım yapılarak tayin edilmiştir. Sonuçlar **Tablo 47**'de belirtilmiştir. 5 ± 3 °C' saklama sıcaklığında bekletilen L5 ve L11 formülasyonlarının 3 ay sonunda radyoişaretleme verimleri %90 üzerinde bulunmuştur. 25 ± 5 °C %60± 5 bağıl nemde bekletilen formülasyonların 3 ay sonunda radyoişaretleme verimleri %80'nin üzerinde bulunmuştur. 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında bekletilen formülasyonların 3 ay sonunda radyoişaretleme verimleri %90'nın üzerinde bulunmuştur. Liyofilize kitlerde çözelti halindeki formülasyonlara göre 40 ± 5 °C'de %75± 5 bağıl nem koşullarında stabilitesi daha yüksek bulunmuştur. Bu sonuçlar incelendiğinde liyofilize kitlerde en ideal saklama koşulunun 5 ± 3 °C olduğu tespit edilmiştir. Tüm formülasyon hazırlama ve radyoişaretleme çalışma

sonuçları değerlendirilmiş olup; **L5** ve **L11** formülasyonlarının ideal olduğuna karar verilmiş ve in vivo çalışmalara geçilmiştir.

3.12. İn Vivo Çalışmalar

Meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farelere Lu-177 çözeltisi, Lu-177 ile radyoişaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonların uygulandıktan sonra mini SPECT/CT cihazı ile görüntüleme çalışmaları (n=3) ön deneme olarak yapılmıştır. Bilgisayar ortamında ilgi alanların ROI'leri çizilerek radyofarmasötiklerin kanserli bölgedeki tutulumları incelenmiştir.

SPECT görüntülerde koyu maviden kırmızıya kadar değişen renk skalası mevcuttur. Koyu maviden kırmızıya doğru gidildikçe ilgili organdaki radyoaktivite değeri artış göstermektedir. Bu veriye göre Lu-177 ile radyoişaretlenmiş L5 ve L11 radyofarmasötiklerinin uygulanmasını takiben 4. ve 96. saatlerde kanserli bölgede radyoaktivite miktarının Lu-177 çözeltisine göre daha yoğun olduğu görülmektedir (**Şekil 79-Şekil 81**).

Uygulanan her iki formülasyonun kanserli bölgedeki tutulumunu sayısal olarak belirlemek için, ROI değerleri bilgisayar yardımıyla bulunmuştur ve sonuçlar **Tablo 48**'da gösterilmiştir. Lu-177 ile radyoişaretlenmiş L5 ve L11 formülasyonlarının meme kanserli bölgedeki radyoaktivite miktarı Lu-177 çözeltisine göre daha yüksektir. Ayrıca Lu-177-L11 radyofarmasötiği meme kanserli bölgede Lu-177-L5 radyofarmasötiğine göre daha yüksek oranda tutulum göstermiştir. Görüntüler görsel olarak değerlendirildiğinde hem Lu-177-L5 hem de Lu-177-L11 formülasyonlarının tümör odağında yoğun bir şekilde tutulduğu ve fizyolojik tutulum odaklarından belirgin yüksek aktiviteye sahip oldukları görülmektedir. Aktivite tutulumu açısından L11 formülasyonunun daha avantajlı olduğu görülmektedir. Bu durum klinik pratikte patolojik tümör odaklarının görsel değerlendirme ile semikantitatif değerlendirmeye gerek kalmaksızın kolaylıkla saptanabilmesine yol açacaktır. Rasaneh ve arkadaşları (Rasaneh et al., 2012) Lu-177-DOTA-TRZ radyofarmasötiği hazırlamışlar ve in vivo çalışmalar için 7,4 MBq Lu-177-DOTA-TRZ ve 5,5 MBq Lu-177-DOTA-TRZ aktiviteye sahip kompleksleri denemişlerdir. Rasaneh ve arkadaşları tarafından yapılan in vivo çalışmalar sonucunda elde edilen görüntülerle, tümördeki radyofarmasötiğin tutulumunu göstermişlerdir. Doktora tez çalışmasında kullanılan kamera sisteminin deney hayvanlarına spesifik olması sayesinde çalışmalarda 4 ve 96. saatlerde alınan

görüntüler ve elde edilen ROI değerleri tümördeki tutulumu Rasaneh ve arkadaşlarının elde ettiği görüntülere göre daha net bir şekilde gösterilmiştir. Beckford (Beckford Vera et al., 2012) ve arkadaşları Lu-177 ile radyoişaretlemek için etkin madde olarak Nimotuzumab'ı kullanmışlardır. Sağlıklı ve hastalıklı hayvanlarda yaptıkları biyodağılım çalışmalarında 150-250 kBq aktiviteye sahip Lu-177 ile çalışmışlardır. Bu çalışmada biyodağılım ve dozimetri çalışmaları yapılarak hazırlanan radyofarmasötüğün EGFR eksprese eden kanserli hücrelerdeki (meme ve over kanseri) etkinliğinin değerlendirilmesi yapılmıştır. Doktora tez kapsamında yaptığımız in vivo görüntüleme çalışmaları bu konuda yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir. Ön deneme olarak yaptığımız görüntüleme çalışmalarında beklenen sonuçlar elde edilmiştir. Meme kanseri oluşturulmuş Balb-C-Nude farelerdeki tümördeki tutulum ve elde ettiğimiz ROI değerleri, hazırladığımız radyofarmasötüklerin yakın zamanda klinikte kullanılabilmesi açısından umut verici olabileceğine işaret etmektedir.

Sonuç ve Öneriler

Sonuç olarak; meme kanseri tedavisinde kullanılan TRZ'nin farklı şelat yapıcı ajanlarla kompleksleri hazırlanmış, Lu-177 ile radyoişaretlenmesi sağlanmıştır. Radyoişaretleme çalışmalarında ideal koşullar için 1:10 oranında TRZ: şelat ajanı kompleksleri içeren çözelti (Ç5 ve Ç11) ve liyofilize kit formülasyonların (L5 ve L11) kullanımının uygun olduğu, inkübasyon zamanının 60 dakika ve pH 7 olduğu bulunmuştur. Meme kanserinin teşhis ve tedavisi için geliştirilen liyofilize kit halindeki radyofarmasötiklerin (Lu-177-L5 ve Lu-177-L11) in vivo görüntüleme çalışmaları gerçekleştirilmiş olup, meme kanseri hücrelerinde Lu-177'ye göre daha yüksek tutulum gösterdiği bulunmuştur.

Kanser araştırmaları bilimin üzerinde en fazla çalıştığı konulardan biri olmuştur. Doktora tez kapsamında hipotez meme kanseri tedavisi için kullanılabilecek teranostik etkili yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesi üzerine kurulmuştur. Lu-177, Nükleer Tıp'ta tanı ve tedavide kullanılan ve umut veren radyonüklit olarak karşımıza çıkmaktadır. Lu-177'nin viskoz bir yapıda olması ve pahalı olması bu alanda çalışacak bilim insanları için zorluk oluştursa da, mikrometastatik tümörlerin tedavisindeki başarısı ve sahip olduğu gama ışını sayesinde görüntü alınabilmesi hasta ve hekimler için çok büyük avantajlar sunmaktadır. Ayrıca yarı ömrünün uzun olması sayesinde kullanıma hazır bir şekilde başka ülkelere dahi taşınması mümkün olmaktadır. Radyoimmunoterapi kapsamında çalışılan monoklonal antikorlar günümüzde ve gelecekte kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarında daha da önem kazanacaktır. Doktora tezi kapsamında "Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere Lu-177 ile radyoişaretlenmiş yeni radyofarmasötik kitinin geliştirilmesi" ileride yapılabilecek klinik çalışmalara olumlu bir katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

Daha sağlıklı bir dünya için kamusal, bilimsel ve sektörel organizasyonların iş birliği şarttır. Bu çalışmada kullanılan hazırlama ve kalite kontrol yöntemlerinin ilaç endüstrisi açısından da uygulanabilir olması, etkin ve güvenilir yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesine imkân verebileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abel, S. D. A., & Baird, S. K. (2018). Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food Chemistry*, 241, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.083>
- Agarwal, K. K., Singla, S., Arora, G., & Bal, C. (2015). ¹⁷⁷Lu-EDTMP for palliation of pain from bone metastases in patients with prostate and breast cancer: a phase II study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 42(1), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2862-z>
- Alsharif, S., Alanazi, M., Alharthi, F., Qandil, D., & Qushawy, M. (2020). Review about radiopharmaceuticals: Preparation, radioactivity, and applications. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12(3), 8–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020v12i3.37150>
- Anderson, J., Farmer, F. T., Haggith, J. W., & Hill, M. (1960). The treatment of myelomatosis with lutecium 177. *The British Journal of Radiology*, 33, 374–378. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-33-390-374>
- Asikoglu, M., Ilem Ozdemir, D., Atlihan Gundogdu, E. (2017). *Radyofarmasi*. Ege Üniversitesi Yayınları.
- Azzam, E., de Toledo, S., & Little, J. (2005). Stress Signaling from Irradiated to Non-Irradiated Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 4(1), 53–64. <https://doi.org/10.2174/1568009043481641>
- Balasubramanian, P. S. (1994). Separation of carrier-free lutetium-177 from neutron irradiated natural ytterbium target. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles*, 185(2), 305–310. <https://doi.org/10.1007/BF02041303>
- Ballangrud, Å. M., Yang, W. H., Palm, S., Enmon, R., Borchardt, P. E., Pellegrini, V. A., McDevitt, M. R., Scheinberg, D. A., & Sgouros, G. (2004). Alpha-particle emitting atomic generator (actinium-225)-labeled trastuzumab (Herceptin) targeting of breast cancer spheroids: Efficacy versus HER2/neu expression. *Clinical Cancer Research*, 10(13), 4489–4497. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0800>
- Ballinger, J. R. (2018). Theranostic radiopharmaceuticals: Established agents in current use. In *British Journal of Radiology* (Vol. 91, Issue 1091). British Institute of Radiology. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170969>

- Banerjee, S., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical Reviews*, 115(8), 2934–2974. <https://doi.org/10.1021/cr500171e>
- Baptista, P., Fernandes, A., Figueiredo, S., Vinhas, R., Cordeiro, M., Carlos, F., & Mendo, S. (2015). Gold nanoparticle-based theranostics: disease diagnostics and treatment using a single nanomaterial. *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*, 4, 11. <https://doi.org/10.2147/ndd.s60285>
- Beckford Vera, D. R., Eigner, S., Henke, K. E., Lebeda, O., Melichar, F., & Beran, M. (2012). Preparation and preclinical evaluation of ¹⁷⁷Lu-nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.07.001>
- Bhusari, P., Vatsa, R., Singh, G., Dhawan, D. K., Shukla, J., & Mittal, B. R. (2015). Development and characterization of DTPA-trastuzumab conjugates for radiolabeling with Tc-99m: A radiopharmaceutical for HER2/neu breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.014>
- Biersack, H. J., & Hotze, A. (1991). The clinician and the thyroid. In *European Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 18, Issue 9, pp. 761–778). Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/BF00956719>
- Breast cancer. (n.d.). Retrieved April 29, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>
- Brechbiel, M. W. (2008). Bifunctional chelates for metal nuclides. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 52(2), 166–173. [/pmc/articles/PMC2693392/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1663392/)
- Bulut, G., Atmaca, H., & Karaca, B. (2019). Trastuzumab in combination with AT-101 induces cytotoxicity and apoptosis in Her2 positive breast cancer cells. *Future Oncology*, 16(3), 4485–4495. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0521>
- Carpanese, D., Ferro-Flores, G., Ocampo-Garcia, B., Santos-Cuevas, C., Salvarese, N., Figini, M., Fracasso, G., Nardo, L. De, Bolzati, C., Rosato, A., & Meléndez-Alafort, L. (2020). Development of ¹⁷⁷Lu-scFvD2B as a Potential Immunotheranostic Agent for Tumors Overexpressing the Prostate Specific Membrane Antigen. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–10.

<https://doi.org/10.1038/s41598-020-66285-2>

- Chan, C., Seki, J. T., Kwong, R., & Reilly, R. M. (2020). The pharmaceutical stability of trastuzumab after short-term storage at room temperature assessed by analytical techniques and tumour imaging by microSPECT/CT. *International Journal of Pharmaceutics*, 588, 119786. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119786>
- Cheson, B. D. (2003). Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. In *Blood* (Vol. 101, Issue 2, pp. 391–398). American Society of Hematology. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1793>
- Chinn, P., Braslawsky, G., White, C., & Hanna, N. (2003). Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52(5), 257–280. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0347-6>
- Crow, D. M., Williams, L., Colcher, D., Wong, J. Y. C., Raubitschek, A., & Shively, J. E. (2005). Combined radioimmunotherapy and chemotherapy of breast tumors with Y-90-labeled anti-Her2 and anti-CEA antibodies with taxol. *Bioconjugate Chemistry*, 16(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1021/bc0500948>
- Damen, C. W. N., Rosing, H., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2008). Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(3), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.002>
- Dash, A., Chakravarty, R., (Russ) Knapp, F., & Pillai, A. (2015). Indirect Production of No Carrier Added (NCA) ^{177}Lu from Irradiation of Enriched ^{176}Yb : Options for Ytterbium/Lutetium Separation. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 107–118. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150312161942>
- Dash, A., Knapp, F. F., & Pillai, M. (2014). Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Current Radiopharmaceuticals*, 6(3), 152–180. <https://doi.org/10.2174/18744710113066660023>
- Dash, A., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(2), 85–107. <https://doi.org/10.1007/s13139-014-0315-z>
- De Grand, A. M., Lomnes, S. J., Lee, D. S., Pietrzykowski, M., Ohnishi, S., Morgan, T. G., Gogbashian, A., Laurence, R. G., & Frangioni, J. V. (2006). Tissue-like

- phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1), 014007. <https://doi.org/10.1117/1.2170579>
- de Korte, M. A., de Vries, E. G. E., Lub-de Hooge, M. N., Jager, P. L., Gietema, J. A., van der Graaf, W. T. A., Sluiter, W. J., van Veldhuisen, D. J., Suter, T. M., Sleijfer, D. T., & Perik, P. J. (2007). ¹¹¹Indium-trastuzumab visualises myocardial human epidermal growth factor receptor 2 expression shortly after anthracycline treatment but not during heart failure: A clue to uncover the mechanisms of trastuzumab-related cardiotoxicity. *European Journal of Cancer*, 43(14), 2046–2051. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.06.024>
- De León-Rodríguez, L. M., & Kovacs, Z. (2008). The synthesis and chelation chemistry of DOTA - Peptide conjugates. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 19, Issue 2, pp. 391–402). Bioconjug Chem. <https://doi.org/10.1021/bc700328s>
- Deep Kaur, C., Kumar Mishra, K., Sahu, A., Panik, R., Kashyap, P., Prasad Mishra, S., & Kumar, A. (2021). Theranostics: New Era in Nuclear Medicine and Radiopharmaceuticals. In Naqvi Syed Ali Raza & Imrani Muhammad Babar (Eds.), *Medical Isotopes* (Intechopen). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91868>
- Del Vecchio, S., Zannetti, A., Fonti, R., Pace, L., & Salvatore, M. (2007). Nuclear imaging in cancer theranostics. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 51(2), 152–163.
- Devi, N., Hadi, M., Piriya, V., & Babu, L. (2012). Design and Characterization of Floating Controlled Release Tablets of Imatinib Mesylate for Site Specific Drug Delivery. *Int Research J of Pharmacy*, 3((9)).
- Durak, H. (2015). Personalized Therapy and Theranostic Approaches in Oncology. *Nuclear Medicine Seminars*, 1(2), 80–84. <https://doi.org/10.4274/nts.2015.014>
- Dvorakova, Z. (2007). *Production and chemical processing of ¹⁷⁷Lu for nuclear medicine at the Munich research reactor FRM-II*. Technical University of Munich.
- European Pharmacopoeia. (2017). *Lutetium (Lu-177) Solution for radiolabelling*.
- Fda, Cder, Beers, & Donald. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*. <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceCo>

mpplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm

- Ferro-Flores, G., E. Ocampo-Garcia, B., & Melendez-Alafort, L. (2012). Development of Specific Radiopharmaceuticals for Infection Imaging by Targeting Infectious Micro-organisms. *Current Pharmaceutical Design*, 18(8), 1098–1106. <https://doi.org/10.2174/138161212799315821>
- Filippi, L., Chiaravalloti, A., Schillaci, O., Cianni, R., & Bagni, O. (2020). Theranostic approaches in nuclear medicine: current status and future prospects. In *Expert Review of Medical Devices* (Vol. 17, Issue 4, pp. 331–343). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17434440.2020.1741348>
- Frost, S. H. L., Bäck, T., Chouin, N., Hultborn, R., Jacobsson, L., Elgqvist, J., Jensen, H., Albertsson, P., & Lindegren, S. (2013). Comparison of 211At-PRIT and 211At-RIT of ovarian microtumors in a nude mouse model. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(2), 108–114. <https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1281>
- Frost, S. H. L., Frayo, S. L., Miller, B. W., Orozco, J. J., Booth, G. C., Hyilarides, M. D., Lin, Y., Green, D. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Bäck, T. A., Fisher, D. R., & Press, O. W. (2015). Comparative efficacy of 177Lu and 90Y for anti-CD20 pretargeted radioimmunotherapy in murine lymphoma xenograft models. *PLoS ONE*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120561>
- Fukumori, N. T. O., Fernandes, A. V., De Campos, D. G., Gomes, A. C., Da Silva, N. G., De Pereira, N. P. S., Da Silva, C. P. G., & Matsuda, M. M. N. (2007). *A Challenge for the Validation of the Gel Clot Test in Radiopharmaceuticals Produced in the Radiopharmacy Center*.
- Guleria, M., Sharma, R., Amirdhanayagam, J., Sarma, H. D., Rangarajan, V., Dash, A., & Das, T. (2021). Formulation and clinical translation of [177 Lu]Lu-trastuzumab for radioimmunotheranostics of metastatic breast cancer . *RSC Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/d0md00319k>
- Gundogdu, E., Ozgenc, E., Ekinci, M., İlem, D., & Asikoglu, M. (2018). Radiopharmaceuticals Used in Imaging and Treatment in Nuclear Medicine. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(1), 24–34. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2017-56434>
- Hapuarachchige, S., & Artemov, D. (2020). Theranostic Pretargeting Drug Delivery and Imaging Platforms in Cancer Precision Medicine. In *Frontiers in Oncology*

- (Vol. 10, p. 1131). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01131>
- Haque, M. A., Bakhshi, V., Surekha, D., Gouthami, B., Hari, C., Reddy, P., & Yakamma, B. (2016). All rights reserved. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 4(2), 1130–1135. www.pharmahealthsciences.net
- Hermanto, S., Dini, R., Ramli, M., Mutalib, A., & Hudiyono, S. (2016). ScienceDirect Synthesis and stability test of trastuzumab for theranostic agent of HER2 positive breast cancer. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(4), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2016.07.001>
- Hicks, D. G., & Kulkarni, S. (2008). HER2+ Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(2), 263–273. <https://doi.org/10.1309/99AE032R9FM8WND1>
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 39–51. <https://doi.org/10.1056/nejmra043186>
- Iaea. (2006). “Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Based on 177 Lu for Radionuclide Therapy.”
- Kameswaran, M., Pandey, U., Gamre, N., Sarma, H. D., & Dash, A. (2019). Preparation of 177 Lu-Trastuzumab injection for treatment of breast cancer. *Applied Radiation and Isotopes*, 148(April), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.04.002>
- Kar, N. R. (2019). Production and Applications of Radiopharmaceuticals: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 9(2), 36–42. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2019.2.8>
- KARABACAK ATAY, Ç., TİLKİ, T., & DEDE, B. (2019). Moleküler Docking Yöntemi ile Bazı Azo Bileşiklerinin Potansiyel Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(1), 150–154. <https://doi.org/10.29233/sdufeffd.544174>
- Kelkar, S. S., & Reineke, T. M. (2011). *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*. 22, 1879–1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>
- Kim, J. S. (2016). Combination Radioimmunotherapy Approaches and Quantification of Immuno-PET. In *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 50, Issue 2, pp. 104–111). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13139-015-0392-7>
- Kim, K., & Kim, S. J. (2018). Lu-177-Based Peptide Receptor Radionuclide Therapy

- for Advanced Neuroendocrine Tumors. In *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 52, Issue 3, pp. 208–215). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13139-017-0505-6>
- Knapp, F. F. R., & Dash, A. (2016). Introduction: Radiopharmaceuticals Play an Important Role in Both Diagnostic and Therapeutic Nuclear Medicine. In F. F. R. Knapp & A. Dash (Eds.), *Radiopharmaceuticals for Therapy* (pp. 1–347). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2607-9>
- Krebs, R. E. (2006). *The history and use of our earth's chemical elements: a reference guide*. Greenwood Publishing Group, Prager Publishers.
- La Vaque, T. J., & Rossiter, T. (2001). The ethical use of placebo controls in clinical research: The Declaration of Helsinki. In *Applied Psychophysiology Biofeedback* (Vol. 26, Issue 1, pp. 23–37). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1009563504319>
- Larson, S. M., Carrasquillo, J. A., Cheung, N. K. V., & Press, O. W. (2015). Radioimmunotherapy of human tumours. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 6, pp. 347–360). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3925>
- Li, L., Wartchow, C. A., Danthi, S. N., Shen, Z., Dechene, N., Pease, J., Choi, H. S., Doede, T., Chu, P., Ning, S., Lee, D. Y., Bednarski, M. D., & Knox, S. J. (2004). A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 58(4), 1215–1227. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.10.057>
- Li, Z. B., Wu, Z., Chen, K., Chin, F. T., & Chen, X. (2007). Click chemistry for 18F-labeling of RGD peptides and microPET imaging of tumor integrin $\alpha\beta 3$ expression. *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), 1987–1994. <https://doi.org/10.1021/bc700226v>
- Liu, S., Cheung, E., Ziegler, M. C., Rajopadhye, M., & Edwards, D. S. (2001). 90Y and 177Lu labeling of a DOTA-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for tumor therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4), 559–568. <https://doi.org/10.1021/bc000146n>
- Liu, S., & Edwards, D. S. (2001). Stabilization of 90Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4), 554–558. <https://doi.org/10.1021/bc000145v>

- Lub-De Hooge, M. N., Kosterink, J. G. W., Perik, P. J., Nijhuis, H., Tran, L., Bart, J., Suurmeijer, A. J. H., De Jong, S., Jager, P. L., & De Vries, E. G. E. (2004). Preclinical characterisation of ¹¹¹In-DTPA-trastuzumab. *British Journal of Pharmacology*, 143(1), 99–106. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705915>
- Malik, K., Duru, C., Jamaluddin Ahmed, M., & Matejtschuk, P. (2010). Analytical options for the measurement of residual moisture content in lyophilized biological materials. *American Pharmaceutical Review*, 13(5), 42–47.
- Manenti, S., Bonardi, M. L., Gini, L., & Groppi, F. (2014). Physical optimization of production by deuteron irradiation of high specific activity ¹⁷⁷Lu suitable for radioimmunotherapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 41(5), 407–409. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.02.007>
- Mankoff, D. (2019). Why Nuclear Imaging and Radiotherapy? In *Radiopharmaceutical Chemistry* (pp. 3–10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_1
- Matthias, D., Cecile, V., Catarina, X., An, A., Nathalie, I., Sarah, B., Hendrik, D. R., Serge, M., Vicky, C., Nick, D., & Tony, L. (2014). Targeted radionuclide therapy with A ¹⁷⁷Lu-labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, 4(7), 708–720. <https://doi.org/10.7150/THNO.8156>
- Maurin, M., Garnuszek, P., Baran, P., Pawlak, D., & Mikołajczak, R. (2015). The radiometal makes a difference. Synthesis and preliminary characterisation of DOTA-minigastrin analogue complexes with Ga, Lu and y. *Nuclear Medicine Review*, 18(2), 51–55. <https://doi.org/10.5603/NMR.2015.0014>
- Medicine, N. R. C. (US) and I. of M. (US) C. on S. of the S. of N. (2007). Advancing Nuclear Medicine Through Innovation. In *Advancing Nuclear Medicine Through Innovation*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/11985>
- Milenic, D. E., Brady, E. D., & Brechbiel, M. W. (2004). Antibody-targeted radiation cancer therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 6, pp. 488–498). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1413>
- Milenic, D. E., Wong, K. J., Baidoo, K. E., Nayak, T. K., Regino, C. A. S., Garmestani, K., & Brechbiel, M. W. (2010). Targeting HER2: A report on the in vitro and in vivo pre-clinical data supporting trastuzumab as a radioimmunoconjugate for clinical trials. *MAbs*, 2(5), 550–564. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.13054>
- Mirzadeh, S., Du, M., Beets, A. L., & Knapp, F. F. (2002). *Method for preparing high*

- specific activity 177Lu*. UT Battelle LLC. www.eichrom.com/analytical/
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Mukherjee, A., Lohar, S., Dash, A., Sarma, H. D., Samuel, G., & Korde, A. (2015). Single vial kit formulation of DOTATATE for preparation of 177Lu-labeled therapeutic radiopharmaceutical at hospital radiopharmacy. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 58(4), 166–172. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3267>
- Nadugopal, B., Sabhya Sampada, S., Sudip Kumar, O., & Chaitanya Prasad, M. (2017). Impact of Radiopharmaceuticals in Healthcare System. *PharmaTutor*, 5(8), 23–31.
- Norenberg, J. P., Krenning, B. J., Konings, I. R. H. M., Kusewitt, D. F., Nayak, T. K., Anderson, T. L., De Jong, M., Garmestani, K., Brechbiel, M. W., & Kvols, L. K. (2006). 213Bi-[DOTA0,Tyr3]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model. *Clinical Cancer Research*, 12(3 I), 897–903. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1264>
- Ocak, M., Helbok, A., von Guggenberg, E., Ozsoy, Y., Kabasakal, L., Kremser, L., & Decristoforo, C. (2011). Influence of biological assay conditions on stability assessment of radiometal-labelled peptides exemplified using a 177Lu-DOTA-minigastrin derivative. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.07.009>
- Özge Alaş, M., & Genç, R. (2016). Floresans Karbon Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi ve Pasivasyon Ajanının Molekül Ağırlığının Nanoparçacık Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Sinop Uni J Nat Sci*, 1(2), 123–134.
- Palm, S., Enmon, R. M., Matei, C., Kolbert, K. S., Xu, S., Zanzonico, P. B., Finn, R. L., Koutcher, J. A., Larson, S. M., & Sgouros, G. (2003). Pharmacokinetics and biodistribution of 86Y-Trastuzumab for 90Y dosimetry in an ovarian carcinoma model: Correlative MicroPET and MRI. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(7), 1148–1155.
- Park, J.-A., & Kim, J. Y. (2013). Recent Advances in Radiopharmaceutical Application of Matched-Pair Radiometals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(4), 458–469. <https://doi.org/10.2174/1568026611313040006>

- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O'Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., ... Sartor, O. (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 213–223. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1213755>
- Patnaik, P. (2003). *Handbook of Inorganic Chemical Compounds*. McGraw-Hill.
- Pauwels, E. K. J., McCready, V. R., Stoot, J. H. M. B., & Van Deurzen, D. F. P. (1998). The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. In *European Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 25, Issue 3, pp. 277–305). Springer. <https://doi.org/10.1007/s002590050229>
- Payolla, F. B., Massabni, A. C., & Orvig, C. (2019). Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: A short review. *Ecletica Quimica*, 44(3), 11–19. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v44.3.2019.p11-19>
- Penet, M. F., Chen, Z., Kakkad, S., Pomper, M. G., & Bhujwalla, Z. M. (2012). Theranostic imaging of cancer. *European Journal of Radiology*, 81(SUPPL1). [https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(12\)70051-7](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(12)70051-7)
- Pillai, A., & (Russ) Knapp, F. (2015). Evolving Important Role of Lutetium-177 for Therapeutic Nuclear Medicine. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 78–85. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150312155959>
- Pillai, M. R. A. (2010). Therapeutic Radiopharmaceuticals. In M. R. A. Pillai (Ed.), *Metalic Radionuclides and Therapeutic radiopharmaceuticals* (pp. 33–50). INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. https://www.academia.edu/5829130/Chapter_2_Therapeutic_Radiopharmaceuticals
- Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(24), 7479–7491. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0636>
- Press, M. F., Pike, M. C., Chazin, V. R., Hung, G., Udove, J. A., Markowicz, M., Danyluk, J., Godolphin, W., Sliwowski, M., Akita, R., Paterson, M. C., & Slamon, D. J. (1993). Her-2/neu Expression in Node-negative Breast Cancer: Direct Tissue Quantitation by Computerized Image Analysis and Association of

- Overexpression with Increased Risk of Recurrent Disease. *Cancer Research*, 53(20).
- Prise, K. M., Folkard, M., & Michael, B. D. (2003). Bystander responses induced by low LET radiation. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 45 REV. ISS. 5, pp. 7043–7049). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206991>
- Qaim, S. M. (2001). Therapeutic radionuclides and nuclear data. *Radiochimica Acta*, 89(4–5), 297–302. <https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.4-5.297>
- Rasaneh, S., Rajabi, H., Akhlaghpour, S., & Sheybani, S. (2012). Radioimmunotherapy of mice bearing breast tumors with Lu-labeled trastuzumab. 42, 1292–1298. <https://doi.org/10.3906/sag-1105-29>
- Rosenblat, T. L., McDevitt, M. R., Mulford, D. A., Pandit-Taskar, N., Divgi, C. R., Panageas, K. S., Heaney, M. L., Chanel, S., Morgenstern, A., Sgouros, G., Larson, S. M., Scheinberg, D. A., & Jurcic, J. G. (2010). Sequential cytarabine and α -particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, 16(21), 5303–5311. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0382>
- Saleh, T. B. (2011). Radiopharmacy: Basics. In M. M. Khalil (Ed.), *Basic Sciences of Nuclear Medicine* (pp. 25–41). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85962-8>
- Sgouros, G., Bodei, L., McDevitt, M. R., & Nedrow, J. R. (2020). Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 19, Issue 9, pp. 589–608). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
- Shepard, H. M., Jin, P., Slamon, D. J., Pirot, Z., & Maneval, D. C. (2008). Herceptin. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 181(181), 183–219. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_9
- Silberstein, E. B. (2012). Radioiodine: The classic theranostic agent. In *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 42, Issue 3, pp. 164–170). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2011.12.002>
- Smith J. Terry, & Hegedüs Laszlo. (2016). Graves' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 375(16), 1552–1565. <https://doi.org/10.1056/nejmra1510030>
- Stimmel, J. B., & Kull, F. C. (1998). Samarium-153 and Lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nuclear Medicine and*

- Biology*, 25(2), 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(97\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)00151-0)
- Strigari, L., Konijnenberg, M., Chiesa, C., Bardies, M., Du, Y., Gleisner, K. S., Lassmann, M., & Flux, G. (2014). The evidence base for the use of internal dosimetry in the clinical practice of molecular radiotherapy. In *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 41, Issue 10, pp. 1976–1988). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2824-5>
- Strosberg, J., El-Haddad, G., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., Mittra, E., Kunz, P. L., Kulke, M. H., Jacene, H., Bushnell, D., O’Dorisio, T. M., Baum, R. P., Kulkarni, H. R., Caplin, M., Lebtahi, R., Hobday, T., Delpassand, E., Van Cutsem, E., ... Krenning, E. (2017). Phase 3 Trial of 177 Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors . *New England Journal of Medicine*, 376(2), 125–135. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1607427>
- Suliman, A., Mayhoub, F. H., Salah, H., Al-Mohammed, H. I., Alkhorayef, M., Moftah, B., Al Rowaily, M., & Bradley, D. A. (2020). Occupational and ambient radiation exposures from Lu-177 DOTATATE during targeted therapy. *Applied Radiation and Isotopes*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109240>
- Tang, C., Li, L., Pang, Z., & Yuan, Z. (2009). Synthesis of small peptides and their use as bifunctional chelating agents in diagnostic radiopharmaceuticals. *Chinese Journal of Chemistry*, 27(1), 195–201. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200990018>
- Tang, Y., Wang, J., Scollard, D. A., Mondal, H., Holloway, C., Kahn, H. J., & Reilly, R. M. (2005). Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using 111In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.08.003>
- Thakral, P., Singla, S., Yadav, M. P., Vasisht, A., Sharma, A., Gupta, S. K., Bal, C. S., Snehlata, & Malhotra, A. (2014). An approach for conjugation of 177Lu- DOTA-SCN- Rituximab (Biosim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins Lymphoma patients. *Indian Journal of Medical Research*, 139(APR), 544–554. /pmc/articles/PMC4078492/
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M., & Wittrup, K. D. (2008). Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.004>

- Türkmen, C. (2012). *NÜKLEER TIP DERS KİTABI* (I. Adalet, A. Mudun, S. N. Ünal, & C. Türkmen (Eds.)). İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00147>
- Willowson, K. P. (2019). Production of radionuclides for clinical nuclear medicine. In *European Journal of Physics* (Vol. 40, Issue 4, p. 043001). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1361-6404/ab169b>
- Yordanova, A., Eppard, E., Kürpig, S., Bundschuh, R. A., Schönberger, S., Gonzalez-Carmona, M., Feldmann, G., Ahmadzadehfar, H., & Essler, M. (2017). Theranostics in nuclear medicine practice. In *OncoTargets and Therapy* (Vol. 10, pp. 4821–4828). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S140671>
- Yuliya S Jhanwar, & Chaitanya Divgi. (2005). Current status of therapy of solid tumors . *Journal of Nuclear Medicine*, 46(1), 141–150.
- Zaheer, J., Kim, H., Lee, Y. J., Kim, J. S., & Lim, S. M. (2019). Combination radioimmunotherapy strategies for solid tumors. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 22, p. 5579). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20225579>
- Abel, S. D. A., & Baird, S. K. (2018). Honey is cytotoxic towards prostate cancer cells but interacts with the MTT reagent: Considerations for the choice of cell viability assay. *Food Chemistry*, 241, 70–78. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.083>
- Agarwal, K. K., Singla, S., Arora, G., & Bal, C. (2015). 177Lu-EDTMP for palliation of pain from bone metastases in patients with prostate and breast cancer: a phase II study. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 42(1), 79–88. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2862-z>
- Alsharef, S., Alanazi, M., Alharthi, F., Qandil, D., & Qushawy, M. (2020). Review about radiopharmaceuticals: Preparation, radioactivity, and applications. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 12(3), 8–15. <https://doi.org/10.22159/ijap.2020v12i3.37150>
- Anderson, J., Farmer, F. T., Haggith, J. W., & Hill, M. (1960). The treatment of myelomatosis with lutecium 177. *The British Journal of Radiology*, 33, 374–378. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-33-390-374>

- Asikoglu, M., Ilem Ozdemir, D., Atlihan Gundogdu, E. (2017). *Radyofarmasi*. Ege Üniversitesi Yayınları.
- Azzam, E., de Toledo, S., & Little, J. (2005). Stress Signaling from Irradiated to Non-Irradiated Cells. *Current Cancer Drug Targets*, 4(1), 53–64. <https://doi.org/10.2174/1568009043481641>
- Balasubramanian, P. S. (1994). Separation of carrier-free lutetium-177 from neutron irradiated natural ytterbium target. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles*, 185(2), 305–310. <https://doi.org/10.1007/BF02041303>
- Ballangrud, Å. M., Yang, W. H., Palm, S., Enmon, R., Borchardt, P. E., Pellegrini, V. A., McDevitt, M. R., Scheinberg, D. A., & Sgouros, G. (2004). Alpha-particle emitting atomic generator (actinium-225)-labeled trastuzumab (Herceptin) targeting of breast cancer spheroids: Efficacy versus HER2/neu expression. *Clinical Cancer Research*, 10(13), 4489–4497. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0800>
- Ballinger, J. R. (2018). Theranostic radiopharmaceuticals: Established agents in current use. In *British Journal of Radiology* (Vol. 91, Issue 1091). British Institute of Radiology. <https://doi.org/10.1259/bjr.20170969>
- Banerjee, S., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Lutetium-177 therapeutic radiopharmaceuticals: Linking chemistry, radiochemistry, and practical applications. *Chemical Reviews*, 115(8), 2934–2974. <https://doi.org/10.1021/cr500171e>
- Baptista, P., Fernandes, A., Figueiredo, S., Vinhas, R., Cordeiro, M., Carlos, F., & Mendo, S. (2015). Gold nanoparticle-based theranostics: disease diagnostics and treatment using a single nanomaterial. *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*, 4, 11. <https://doi.org/10.2147/ndd.s60285>
- Beckford Vera, D. R., Eigner, S., Henke, K. E., Lebeda, O., Melichar, F., & Beran, M. (2012). Preparation and preclinical evaluation of ¹⁷⁷Lu-nimotuzumab targeting epidermal growth factor receptor overexpressing tumors. *Nuclear Medicine and Biology*, 39(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2011.07.001>
- Bhusari, P., Vatsa, R., Singh, G., Dhawan, D. K., Shukla, J., & Mittal, B. R. (2015). Development and characterization of DTPA-trastuzumab conjugates for radiolabeling with Tc-99m: A radiopharmaceutical for HER2/neu breast cancer. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 29, 8–15.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2015.05.014>

Biersack, H. J., & Hotze, A. (1991). The clinician and the thyroid. In *European Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 18, Issue 9, pp. 761–778). Springer-Verlag.
<https://doi.org/10.1007/BF00956719>

Breast cancer. (n.d.). Retrieved April 29, 2021, from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>

Brechbiel, M. W. (2008). Bifunctional chelates for metal nuclides. *Quarterly Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 52(2), 166–173.
[/pmc/articles/PMC2693392/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1663392/)

Bulut, G., Atmaca, H., & Karaca, B. (2019). Trastuzumab in combination with AT-101 induces cytotoxicity and apoptosis in Her2 positive breast cancer cells. *Future Oncology*, 16(3), 4485–4495. <https://doi.org/10.2217/fon-2019-0521>

Carpanese, D., Ferro-Flores, G., Ocampo-Garcia, B., Santos-Cuevas, C., Salvarese, N., Figini, M., Fracasso, G., Nardo, L. De, Bolzati, C., Rosato, A., & Meléndez-Alafort, L. (2020). Development of ¹⁷⁷Lu-scFvD2B as a Potential Immunotheranostic Agent for Tumors Overexpressing the Prostate Specific Membrane Antigen. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-66285-2>

Chan, C., Seki, J. T., Kwong, R., & Reilly, R. M. (2020). The pharmaceutical stability of trastuzumab after short-term storage at room temperature assessed by analytical techniques and tumour imaging by microSPECT/CT. *International Journal of Pharmaceutics*, 588, 119786.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119786>

Cheson, B. D. (2003). Radioimmunotherapy of non-Hodgkin lymphomas. In *Blood* (Vol. 101, Issue 2, pp. 391–398). American Society of Hematology.
<https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1793>

Chinn, P., Braslawsky, G., White, C., & Hanna, N. (2003). Antibody therapy of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 52(5), 257–280. <https://doi.org/10.1007/s00262-002-0347-6>

Crow, D. M., Williams, L., Colcher, D., Wong, J. Y. C., Raubitschek, A., & Shively, J. E. (2005). Combined radioimmunotherapy and chemotherapy of breast tumors with Y-90-labeled anti-Her2 and anti-CEA antibodies with taxol. *Bioconjugate Chemistry*, 16(5), 1117–1125. <https://doi.org/10.1021/bc0500948>

- Damen, C. W. N., Rosing, H., Schellens, J. H. M., & Beijnen, J. H. (2008). Quantitative aspects of the analysis of the monoclonal antibody trastuzumab using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(3), 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.11.002>
- Dash, A., Chakravarty, R., (Russ) Knapp, F., & Pillai, A. (2015). Indirect Production of No Carrier Added (NCA) ^{177}Lu from Irradiation of Enriched ^{176}Yb : Options for Ytterbium/Lutetium Separation. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 107–118. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150312161942>
- Dash, A., Knapp, F. F., & Pillai, M. (2014). Targeted Radionuclide Therapy - An Overview. *Current Radiopharmaceuticals*, 6(3), 152–180. <https://doi.org/10.2174/18744710113066660023>
- Dash, A., Pillai, M. R. A., & Knapp, F. F. (2015). Production of ^{177}Lu for Targeted Radionuclide Therapy: Available Options. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 49(2), 85–107. <https://doi.org/10.1007/s13139-014-0315-z>
- De Grand, A. M., Lomnes, S. J., Lee, D. S., Pietrzykowski, M., Ohnishi, S., Morgan, T. G., Gogbashian, A., Laurence, R. G., & Frangioni, J. V. (2006). Tissue-like phantoms for near-infrared fluorescence imaging system assessment and the training of surgeons. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1), 014007. <https://doi.org/10.1117/1.2170579>
- de Korte, M. A., de Vries, E. G. E., Lub-de Hooge, M. N., Jager, P. L., Gietema, J. A., van der Graaf, W. T. A., Sluiter, W. J., van Veldhuisen, D. J., Suter, T. M., Sleijfer, D. T., & Perik, P. J. (2007). ^{111}In -trastuzumab visualises myocardial human epidermal growth factor receptor 2 expression shortly after anthracycline treatment but not during heart failure: A clue to uncover the mechanisms of trastuzumab-related cardiotoxicity. *European Journal of Cancer*, 43(14), 2046–2051. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2007.06.024>
- De León-Rodríguez, L. M., & Kovacs, Z. (2008). The synthesis and chelation chemistry of DOTA - Peptide conjugates. In *Bioconjugate Chemistry* (Vol. 19, Issue 2, pp. 391–402). Bioconjug Chem. <https://doi.org/10.1021/bc700328s>
- Deep Kaur, C., Kumar Mishra, K., Sahu, A., Panik, R., Kashyap, P., Prasad Mishra, S., & Kumar, A. (2021). Theranostics: New Era in Nuclear Medicine and Radiopharmaceuticals. In Naqvi Syed Ali Raza & Imrani Muhammad Babar

- (Eds.), *Medical Isotopes* (Intechopen). IntechOpen.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.91868>
- Del Vecchio, S., Zannetti, A., Fonti, R., Pace, L., & Salvatore, M. (2007). Nuclear imaging in cancer theranostics. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 51(2), 152–163.
- Devi, N., Hadi, M., Piriya, V., & Babu, L. (2012). Design and Characterization of Floating Controlled Release Tablets of Imatinib Mesylate for Site Specific Drug Delivery. *Int Research J of Pharmacy*, 3(9).
- Durak, H. (2015). Personalized Therapy and Theranostic Approaches in Oncology. *Nuclear Medicine Seminars*, 1(2), 80–84. <https://doi.org/10.4274/nts.2015.014>
- Dvorakova, Z. (2007). *Production and chemical processing of ¹⁷⁷Lu for nuclear medicine at the Munich research reactor FRM-II*. Technical University of Munich.
- European Pharmacopoeia. (2017). *Lutetium (Lu-177) Solution for radiolabelling*.
- Fda, Cder, Beers, & Donald. (2015). *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics Guidance for Industry*.
<http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm> and/or <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>
- Ferro-Flores, G., E. Ocampo-Garcia, B., & Melendez-Alafort, L. (2012). Development of Specific Radiopharmaceuticals for Infection Imaging by Targeting Infectious Micro-organisms. *Current Pharmaceutical Design*, 18(8), 1098–1106.
<https://doi.org/10.2174/138161212799315821>
- Filippi, L., Chiaravalloti, A., Schillaci, O., Cianni, R., & Bagni, O. (2020). Theranostic approaches in nuclear medicine: current status and future prospects. In *Expert Review of Medical Devices* (Vol. 17, Issue 4, pp. 331–343). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/17434440.2020.1741348>
- Frost, S. H. L., Bäck, T., Chouin, N., Hultborn, R., Jacobsson, L., Elgqvist, J., Jensen, H., Albertsson, P., & Lindegren, S. (2013). Comparison of ²¹¹At-PRIT and ²¹¹At-RIT of ovarian microtumors in a nude mouse model. *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 28(2), 108–114.
<https://doi.org/10.1089/cbr.2012.1281>
- Frost, S. H. L., Frayo, S. L., Miller, B. W., Orozco, J. J., Booth, G. C., Hyilarides, M. D., Lin, Y., Green, D. J., Gopal, A. K., Pagel, J. M., Bäck, T. A., Fisher, D. R., &

- Press, O. W. (2015). Comparative efficacy of ^{177}Lu and ^{90}Y for anti-CD20 pretargeted radioimmunotherapy in murine lymphoma xenograft models. *PLoS ONE*, 10(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120561>
- Fukumori, N. T. O., Fernandes, A. V., De Campos, D. G., Gomes, A. C., Da Silva, N. G., De Pereira, N. P. S., Da Silva, C. P. G., & Matsuda, M. M. N. (2007). *A Challenge for the Validation of the Gel Clot Test in Radiopharmaceuticals Produced in the Radiopharmacy Center.*
- Guleria, M., Sharma, R., Amirdhanayagam, J., Sarma, H. D., Rangarajan, V., Dash, A., & Das, T. (2021). Formulation and clinical translation of [^{177}Lu]Lu-trastuzumab for radioimmunotheranostics of metastatic breast cancer. *RSC Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1039/d0md00319k>
- Gundogdu, E., Ozgenc, E., Ekinci, M., İlem, D., & Asikoglu, M. (2018). Radiopharmaceuticals Used in Imaging and Treatment in Nuclear Medicine. *Journal of Literature Pharmacy Sciences*, 7(1), 24–34. <https://doi.org/10.5336/pharmsci.2017-56434>
- Hapuarachchige, S., & Artemov, D. (2020). Theranostic Pretargeting Drug Delivery and Imaging Platforms in Cancer Precision Medicine. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 10, p. 1131). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01131>
- Haque, M. A., Bakhshi, V., Surekha, D., Gouthami, B., Hari, C., Reddy, P., & Yakamma, B. (2016). All rights reserved. *International Journal of Pharma Research and Health Sciences*, 4(2), 1130–1135. www.pharmahealthsciences.net
- Hermanto, S., Dini, R., Ramli, M., Mutalib, A., & Hudiyono, S. (2016). ScienceDirect Synthesis and stability test of trastuzumab for theranostic agent of HER2 positive breast cancer. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, 9(4), 441–448. <https://doi.org/10.1016/j.jrras.2016.07.001>
- Hicks, D. G., & Kulkarni, S. (2008). HER2+ Breast Cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 129(2), 263–273. <https://doi.org/10.1309/99AE032R9FM8WND1>
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 39–51. <https://doi.org/10.1056/nejmra043186>
- Iaea. (2006). “*Development of Therapeutic Radiopharmaceuticals Based on ^{177}Lu for Radionuclide Therapy.*”

- Kameswaran, M., Pandey, U., Gamre, N., Sarma, H. D., & Dash, A. (2019). Preparation of ¹⁷⁷Lu-Trastuzumab injection for treatment of breast cancer. *Applied Radiation and Isotopes*, 148(April), 184–190. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2019.04.002>
- Kar, N. R. (2019). Production and Applications of Radiopharmaceuticals: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Investigation*, 9(2), 36–42. <https://doi.org/10.5530/ijpi.2019.2.8>
- KARABACAK ATAY, Ç., TİLKİ, T., & DEDE, B. (2019). Moleküler Docking Yöntemi ile Bazı Azo Bileşiklerinin Potansiyel Antibakteriyel Özelliklerinin İncelenmesi. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi*, 14(1), 150–154. <https://doi.org/10.29233/sdufeffd.544174>
- Kelkar, S. S., & Reineke, T. M. (2011). *Theranostics: Combining Imaging and Therapy*. 22, 1879–1903. <https://doi.org/10.1021/bc200151q>
- Kim, J. S. (2016). Combination Radioimmunotherapy Approaches and Quantification of Immuno-PET. In *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 50, Issue 2, pp. 104–111). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13139-015-0392-7>
- Kim, K., & Kim, S. J. (2018). Lu-177-Based Peptide Receptor Radionuclide Therapy for Advanced Neuroendocrine Tumors. In *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 52, Issue 3, pp. 208–215). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s13139-017-0505-6>
- Knapp, F. F. R., & Dash, A. (2016). Introduction: Radiopharmaceuticals Play an Important Role in Both Diagnostic and Therapeutic Nuclear Medicine. In F. F. R. Knapp & A. Dash (Eds.), *Radiopharmaceuticals for Therapy* (pp. 1–347). Springer India. <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2607-9>
- Krebs, R. E. (2006). *The history and use of our earth's chemical elements: a reference guide*. Greenwood Publishing Group, Prager Publishers.
- La Vaque, T. J., & Rossiter, T. (2001). The ethical use of placebo controls in clinical research: The Declaration of Helsinki. In *Applied Psychophysiology Biofeedback* (Vol. 26, Issue 1, pp. 23–37). Springer. <https://doi.org/10.1023/A:1009563504319>
- Larson, S. M., Carrasquillo, J. A., Cheung, N. K. V., & Press, O. W. (2015). Radioimmunotherapy of human tumours. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 15, Issue 6, pp. 347–360). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrc3925>

- Li, L., Wartchow, C. A., Danthi, S. N., Shen, Z., Dechene, N., Pease, J., Choi, H. S., Doede, T., Chu, P., Ning, S., Lee, D. Y., Bednarski, M. D., & Knox, S. J. (2004). A novel antiangiogenesis therapy using an integrin antagonist or anti-Flk-1 antibody coated 90Y-labeled nanoparticles. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 58(4), 1215–1227. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.10.057>
- Li, Z. B., Wu, Z., Chen, K., Chin, F. T., & Chen, X. (2007). Click chemistry for 18F-labeling of RGD peptides and microPET imaging of tumor integrin $\alpha\beta 3$ expression. *Bioconjugate Chemistry*, 18(6), 1987–1994. <https://doi.org/10.1021/bc700226v>
- Liu, S., Cheung, E., Ziegler, M. C., Rajopadhye, M., & Edwards, D. S. (2001). 90Y and 177Lu labeling of a DOTA-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for tumor therapy. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4), 559–568. <https://doi.org/10.1021/bc000146n>
- Liu, S., & Edwards, D. S. (2001). Stabilization of 90Y-labeled DOTA-biomolecule conjugates using gentisic acid and ascorbic acid. *Bioconjugate Chemistry*, 12(4), 554–558. <https://doi.org/10.1021/bc000145v>
- Lub-De Hooge, M. N., Kosterink, J. G. W., Perik, P. J., Nijhuis, H., Tran, L., Bart, J., Suurmeijer, A. J. H., De Jong, S., Jager, P. L., & De Vries, E. G. E. (2004). Preclinical characterisation of 111In-DTPA-trastuzumab. *British Journal of Pharmacology*, 143(1), 99–106. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705915>
- Malik, K., Duru, C., Jamaluddin Ahmed, M., & Matejtschuk, P. (2010). Analytical options for the measurement of residual moisture content in lyophilized biological materials. *American Pharmaceutical Review*, 13(5), 42–47.
- Manenti, S., Bonardi, M. L., Gini, L., & Groppi, F. (2014). Physical optimization of production by deuteron irradiation of high specific activity 177gLu suitable for radioimmunotherapy. *Nuclear Medicine and Biology*, 41(5), 407–409. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2014.02.007>
- Mankoff, D. (2019). Why Nuclear Imaging and Radiotherapy? In *Radiopharmaceutical Chemistry* (pp. 3–10). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-98947-1_1
- Matthias, D., Cecile, V., Catarina, X., An, A., Nathalie, I., Sarah, B., Hendrik, D. R., Serge, M., Vicky, C., Nick, D., & Tony, L. (2014). Targeted radionuclide therapy

- with A ^{177}Lu -labeled anti-HER2 nanobody. *Theranostics*, 4(7), 708–720. <https://doi.org/10.7150/THNO.8156>
- Maurin, M., Garnuszek, P., Baran, P., Pawlak, D., & Mikołajczak, R. (2015). The radiometal makes a difference. Synthesis and preliminary characterisation of DOTA-minigastrin analogue complexes with Ga, Lu and y. *Nuclear Medicine Review*, 18(2), 51–55. <https://doi.org/10.5603/NMR.2015.0014>
- Medicine, N. R. C. (US) and I. of M. (US) C. on S. of the S. of N. (2007). Advancing Nuclear Medicine Through Innovation. In *Advancing Nuclear Medicine Through Innovation*. National Academies Press (US). <https://doi.org/10.17226/11985>
- Milenic, D. E., Brady, E. D., & Brechbiel, M. W. (2004). Antibody-targeted radiation cancer therapy. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 3, Issue 6, pp. 488–498). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrd1413>
- Milenic, D. E., Wong, K. J., Baidoo, K. E., Nayak, T. K., Regino, C. A. S., Garmestani, K., & Brechbiel, M. W. (2010). Targeting HER2: A report on the in vitro and in vivo pre-clinical data supporting trastuzumab as a radioimmunoconjugate for clinical trials. *MAbs*, 2(5), 550–564. <https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.13054>
- Mirzadeh, S., Du, M., Beets, A. L., & Knapp, F. F. (2002). *Method for preparing high specific activity ^{177}Lu* . UT Battelle LLC. www.eichrom.com/analytical/
- Morris, G. M., & Lim-Wilby, M. (2008). Molecular docking. *Methods in Molecular Biology*, 443, 365–382. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-177-2_19
- Mukherjee, A., Lohar, S., Dash, A., Sarma, H. D., Samuel, G., & Korde, A. (2015). Single vial kit formulation of DOTATATE for preparation of ^{177}Lu -labeled therapeutic radiopharmaceutical at hospital radiopharmacy. *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 58(4), 166–172. <https://doi.org/10.1002/jlcr.3267>
- Nadugopal, B., Sabhya Sampada, S., Sudip Kumar, O., & Chaitanya Prasad, M. (2017). Impact of Radiopharmaceuticals in Healthcare System. *PharmaTutor*, 5(8), 23–31.
- Norenberg, J. P., Krenning, B. J., Konings, I. R. H. M., Kusewitt, D. F., Nayak, T. K., Anderson, T. L., De Jong, M., Garmestani, K., Brechbiel, M. W., & Kvols, L. K. (2006). ^{213}Bi -[DOTA0,Tyr3]octreotide peptide receptor radionuclide therapy of pancreatic tumors in a preclinical animal model. *Clinical Cancer Research*, 12(3 I), 897–903. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1264>

- Ocak, M., Helbok, A., von Guggenberg, E., Ozsoy, Y., Kabasakal, L., Kremser, L., & Decristoforo, C. (2011). Influence of biological assay conditions on stability assessment of radiometal-labelled peptides exemplified using a ^{177}Lu -DOTA-minigastrin derivative. *Nuclear Medicine and Biology*, 38(2), 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2010.07.009>
- Özge Alaş, M., & Genç, R. (2016). Floresans Karbon Nanoparçacıkların Yeşil Sentezi ve Pasivasyon Ajanının Molekül Ağırlığının Nanoparçacık Özellikleri Üzerine Etkisinin İncelenmesi. *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi Sinop Uni J Nat Sci*, 1(2), 123–134.
- Palm, S., Enmon, R. M., Matei, C., Kolbert, K. S., Xu, S., Zanzonico, P. B., Finn, R. L., Koutcher, J. A., Larson, S. M., & Sgouros, G. (2003). Pharmacokinetics and biodistribution of ^{86}Y -Trastuzumab for ^{90}Y dosimetry in an ovarian carcinoma model: Correlative MicroPET and MRI. *Journal of Nuclear Medicine*, 44(7), 1148–1155.
- Park, J.-A., & Kim, J. Y. (2013). Recent Advances in Radiopharmaceutical Application of Matched-Pair Radiometals. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(4), 458–469. <https://doi.org/10.2174/1568026611313040006>
- Parker, C., Nilsson, S., Heinrich, D., Helle, S. I., O’Sullivan, J. M., Fosså, S. D., Chodacki, A., Wiechno, P., Logue, J., Seke, M., Widmark, A., Johannessen, D. C., Hoskin, P., Bottomley, D., James, N. D., Solberg, A., Syndikus, I., Kliment, J., Wedel, S., ... Sartor, O. (2013). Alpha Emitter Radium-223 and Survival in Metastatic Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*, 369(3), 213–223. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1213755>
- Patnaik, P. (2003). *Handbook of Inorganic Chemical Compounds*. McGraw-Hill.
- Pauwels, E. K. J., McCready, V. R., Stoot, J. H. M. B., & Van Deurzen, D. F. P. (1998). The mechanism of accumulation of tumour-localising radiopharmaceuticals. In *European Journal of Nuclear Medicine* (Vol. 25, Issue 3, pp. 277–305). Springer. <https://doi.org/10.1007/s002590050229>
- Payolla, F. B., Massabni, A. C., & Orvig, C. (2019). Radiopharmaceuticals for diagnosis in nuclear medicine: A short review. *Ecletica Quimica*, 44(3), 11–19. <https://doi.org/10.26850/1678-4618eqj.v44.3.2019.p11-19>
- Penet, M. F., Chen, Z., Kakkad, S., Pomper, M. G., & Bhujwalla, Z. M. (2012). Theranostic imaging of cancer. *European Journal of Radiology*, 81(SUPPL1).

[https://doi.org/10.1016/S0720-048X\(12\)70051-7](https://doi.org/10.1016/S0720-048X(12)70051-7)

Pillai, A., & (Russ) Knapp, F. (2015). Evolving Important Role of Lutetium-177 for Therapeutic Nuclear Medicine. *Current Radiopharmaceuticals*, 8(2), 78–85. <https://doi.org/10.2174/1874471008666150312155959>

Pillai, M. R. A. (2010). Therapeutic Radiopharmaceuticals. In M. R. A. Pillai (Ed.), *Metalic Radionuclides and Therapeutic radiopharmaceuticals* (pp. 33–50). INSTITUTE OF NUCLEAR CHEMISTRY AND TECHNOLOGY. https://www.academia.edu/5829130/Chapter_2_Therapeutic_Radiopharmaceuticals

Pohlmann, P. R., Mayer, I. A., & Mernaugh, R. (2009). Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 15(24), 7479–7491. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0636>

Press, M. F., Pike, M. C., Chazin, V. R., Hung, G., Udove, J. A., Markowicz, M., Danyluk, J., Godolphin, W., Sliwowski, M., Akita, R., Paterson, M. C., & Slamon, D. J. (1993). Her-2/neu Expression in Node-negative Breast Cancer: Direct Tissue Quantitation by Computerized Image Analysis and Association of Overexpression with Increased Risk of Recurrent Disease. *Cancer Research*, 53(20).

Prise, K. M., Folkard, M., & Michael, B. D. (2003). Bystander responses induced by low LET radiation. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 45 REV. ISS. 5, pp. 7043–7049). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206991>

Qaim, S. M. (2001). Therapeutic radionuclides and nuclear data. *Radiochimica Acta*, 89(4–5), 297–302. <https://doi.org/10.1524/ract.2001.89.4-5.297>

Rasaneh, S., Rajabi, H., Akhlaghpour, S., & Sheybani, S. (2012). *Radioimmunotherapy of mice bearing breast tumors with Lu-labeled trastuzumab*. 42, 1292–1298. <https://doi.org/10.3906/sag-1105-29>

Rosenblat, T. L., McDevitt, M. R., Mulford, D. A., Pandit-Taskar, N., Divgi, C. R., Panageas, K. S., Heaney, M. L., Chanel, S., Morgenstern, A., Sgouros, G., Larson, S. M., Scheinberg, D. A., & Jurcic, J. G. (2010). Sequential cytarabine and α -particle immunotherapy with bismuth-213-lintuzumab (HuM195) for acute myeloid leukemia. *Clinical Cancer Research*, 16(21), 5303–5311. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-0382>

- Saleh, T. B. (2011). Radiopharmacy: Basics. In M. M. Khalil (Ed.), *Basic Sciences of Nuclear Medicine* (pp. 25–41). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-85962-8>
- Sgouros, G., Bodei, L., McDevitt, M. R., & Nedrow, J. R. (2020). Radiopharmaceutical therapy in cancer: clinical advances and challenges. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 19, Issue 9, pp. 589–608). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0073-9>
- Shepard, H. M., Jin, P., Slamon, D. J., Pirot, Z., & Maneval, D. C. (2008). Herceptin. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 181(181), 183–219. https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_9
- Silberstein, E. B. (2012). Radioiodine: The classic theranostic agent. In *Seminars in Nuclear Medicine* (Vol. 42, Issue 3, pp. 164–170). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.semnuclmed.2011.12.002>
- Smith J. Terry, & Hegedüs Laszlo. (2016). Graves' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 375(16), 1552–1565. <https://doi.org/10.1056/nejmra1510030>
- Stimmel, J. B., & Kull, F. C. (1998). Samarium-153 and Lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nuclear Medicine and Biology*, 25(2), 117–125. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(97\)00151-0](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(97)00151-0)
- Strigari, L., Konijnenberg, M., Chiesa, C., Bardies, M., Du, Y., Gleisner, K. S., Lassmann, M., & Flux, G. (2014). The evidence base for the use of internal dosimetry in the clinical practice of molecular radiotherapy. In *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging* (Vol. 41, Issue 10, pp. 1976–1988). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00259-014-2824-5>
- Strosberg, J., El-Haddad, G., Wolin, E., Hendifar, A., Yao, J., Chasen, B., Mittra, E., Kunz, P. L., Kulke, M. H., Jacene, H., Bushnell, D., O'Dorisio, T. M., Baum, R. P., Kulkarni, H. R., Caplin, M., Lebtahi, R., Hobday, T., Delpassand, E., Van Cutsem, E., ... Krenning, E. (2017). Phase 3 Trial of 177 Lu-Dotatate for Midgut Neuroendocrine Tumors. *New England Journal of Medicine*, 376(2), 125–135. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1607427>
- Suliman, A., Mayhoub, F. H., Salah, H., Al-Mohammed, H. I., Alkhorayef, M., Moftah, B., Al Rowaily, M., & Bradley, D. A. (2020). Occupational and ambient radiation exposures from Lu-177 DOTATATE during targeted therapy. *Applied*

- Radiation and Isotopes*, 164. <https://doi.org/10.1016/j.apradiso.2020.109240>
- Tang, C., Li, L., Pang, Z., & Yuan, Z. (2009). Synthesis of small peptides and their use as bifunctional chelating agents in diagnostic radiopharmaceuticals. *Chinese Journal of Chemistry*, 27(1), 195–201. <https://doi.org/10.1002/cjoc.200990018>
- Tang, Y., Wang, J., Scollard, D. A., Mondal, H., Holloway, C., Kahn, H. J., & Reilly, R. M. (2005). Imaging of HER2/neu-positive BT-474 human breast cancer xenografts in athymic mice using ¹¹¹In-trastuzumab (Herceptin) Fab fragments. *Nuclear Medicine and Biology*, 32(1), 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.nucmedbio.2004.08.003>
- Thakral, P., Singla, S., Yadav, M. P., Vasisht, A., Sharma, A., Gupta, S. K., Bal, C. S., Snehlata, & Malhotra, A. (2014). An approach for conjugation of ¹⁷⁷Lu- DOTA-SCN- Rituximab (Biosim) & its evaluation for radioimmunotherapy of relapsed & refractory B-cell non Hodgkins Lymphoma patients. *Indian Journal of Medical Research*, 139(APR), 544–554. [/pmc/articles/PMC4078492/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24078492/)
- Thurber, G. M., Schmidt, M. M., & Wittrup, K. D. (2008). Factors determining antibody distribution in tumors. *Trends in Pharmacological Sciences*, 29(2), 57–61. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.11.004>
- Türkmen, C. (2012). *NÜKLEER TIP DERS KİTABI* (I. Adalet, A. Mudun, S. N. Ünal, & C. Türkmen (Eds.)). İstanbul Üniversitesi Yayınları.
- Vembadi, A., Menachery, A., & Qasaimeh, M. (2019). Cell Cytometry: Review and Perspective on Biotechnological Advances. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(JUN). <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2019.00147>
- Willowson, K. P. (2019). Production of radionuclides for clinical nuclear medicine. In *European Journal of Physics* (Vol. 40, Issue 4, p. 043001). Institute of Physics Publishing. <https://doi.org/10.1088/1361-6404/ab169b>
- Yordanova, A., Eppard, E., Kürpig, S., Bundschuh, R. A., Schönberger, S., Gonzalez-Carmona, M., Feldmann, G., Ahmadzadehfar, H., & Essler, M. (2017). Theranostics in nuclear medicine practice. In *OncoTargets and Therapy* (Vol. 10, pp. 4821–4828). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/OTT.S140671>
- Yuliya S Jhanwar, & Chaitanya Divgi. (2005). Current status of therapy of solid tumors . *Journal of Nuclear Medicine*, 46(1), 141–150.
- Zaheer, J., Kim, H., Lee, Y. J., Kim, J. S., & Lim, S. M. (2019). Combination radioimmunotherapy strategies for solid tumors. In *International Journal of*



Ekler

Ek-1 BAP Bilgileri

Genel Bilgiler	Çalışma Takvimi	Proje Bütçesi	Dosya Eklentileri	Komisyon Kararları
Projeden Sorumlu BAP Personeli				
Proje İşlemleri	: NEZAHAT BAYRAKTAR (D.Telefon: 311 2168)			
Satınalma İşlemleri	: Umran Satılmış (D.Telefon: 311 2138 Email)			
Genel Bilgiler				
Proje Yöneticisi	: Doç.Dr. EVREN ATLIHAN GÜNDOĞDU Araştırmacı Demirbaş Envanteri Birim-Bölüm Demirbaş Envanteri			
	Araştırmacının Projeleri ve Çıktıları			
Proje ID	: 22115			
Proje Kodu	: TDK-2020-22115			
Proje Başlığı	: Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere Lu177 ile radyoisaretlenecek yeni bir radyofarmasötik kitinin geliştirilmesi			
Proje Türü	: Tez Projesi, Doktora			
Proje Grubu	: Tıp Sağlık			
Başvuru Tarihi	: 24.08.2020			
Süresi (Ay)	: 24			

Ek-2 TEYDEP Bilgileri

	T.C. TÜRKİYE BİLİMSEL ve TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU BAŞKANLIĞI Teknoloji ve Yenilik Destek Programları Başkanlığı	
Sayı :	E-21400745-115.99-15838 5200074 numaralı proje	02.02.2021
Konu :	sözleşmesinin iletilmesi hakkında (Yürütücü Kuruluş)	
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE Ege Üniversitesi Rektörlüğü Gençlik Caddesi 35040 Bornova-İZMİR		
Yürütücü Kuruluş olarak "MEME KANSERİ HASTALIĞINDA TERANOSTİK AMAÇLI KULLANILACAK KİT HALİNDE YENİ RADYOFARMASÖTİKLERİN GELİŞTİRİLMESİ" isimli ve 5200074 numaralı projenizin "TÜBİTAK Üniversite-Sanayi İşbirliği Destek Programı Uygulama Esasları" çerçevesinde yapılan değerlendirme sonucunda 18- Ay süre ile Müşteri Kuruluş ve TÜBİTAK katkısı dahil toplam 188.789 TL (yüzseksenekizbinyediyüzseksendokuz Türk Lirası) bütçe ile desteklenmesine karar verilmiştir.		
Projenizin harcamaları "TÜBİTAK Kaynaklarından Genel Bütçe Kapsamındaki Kamu İdareleri ile Özel Bütçeli İdarelere Proje Karşılığı Aktarılacak Tutarların Harcanması ve TÜBİTAK Tarafından Yürütülen Dış Destekli Projelerin Harcamalarının Gerçekleştirilmesine İlişkin Esas ve Usuller" çerçevesinde Yürütücü Kuruluş tarafından gerçekleştirilecektir. Bu dokümanı ve projenizin yürütülmesi sırasında kullanılacak olan diğer doküman ve formları http://www.tubitak.gov.tr/tr/destekler/akademik/ulusal-destek-programlari/1505/icerik-yonetmelik-ve-esaslar linkinden temin edebilirsiniz.		
Taraflarca imzalanmış Proje Sözleşmesi ekte iletilmektedir. Bilgilerinizi ve gereğini arz ederim.		
Mehmet ASLAN Başkan a. TEYDEB Başkanı		

Ek-3 Etik Kurul Belgesi



Advanced In Vivo Imaging
Core Facility
Hungarian Centre of Excellence
for Molecular Medicine (HCEMM) Ltd
6723 Szeged, Római Blvd. 21
Hungary

29/04/2021
Evren Atlihan Gundogdu
Department of Radiopharmacy
Faculty of Pharmacy
Ege University
35100 Bornova
Turkey

Subject: Ethical Appovement for the project "Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere Lu-177 ile radyoişaretlenmiş kit halinde yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesi"

Dear Dr. Evren Gundogdu,

Following our e-mail communication, I confirm that Advanced In Vivo Imaging Core Facility Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine has the authorazitation to undertake all in vivo studies are required for the project "Meme kanseri tedavisinde kullanılmak üzere Lu-177 ile radyoişaretlenmiş kit halinde yeni radyofarmasötiklerin geliştirilmesi". Implementation of in vivo study was found appropriate by the ethical Community of Advanced In Vivo Imaging Core Facility Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine in Minimal Ethical Risk Project (Number: #2553).

Advanced In Vivo Imaging Core Facility Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine staffs have many years of experience on H2020 and other National Health Service funding programmes, which focus on the radiolabeling and in vivo imaging of different types of pharmaceuticals parts. By interacting with multidisciplinary consortia and actively participating in networking and training activities, we developed imaging platform, which allows production and characterization of complexes, functionalization and radiolabelling with SPECT radioisotopes, biodistribution and in vivo imaging with SPECT, CT and PET. We own an Individually Ventilated Cages system for animal hosting, thus it is possible to support a full study in-house. Through strategic collaborations, Advanced In Vivo Imaging Core Facility Hungarian Centre of Excellence for Molecular Medicine enriches its imaging portfolio by developing new software tools for processing of multimodal data.

Yours sincerely

Domokos Mathe, Prof Dr
Director of HCEMM
In Vivo Imaging

Ferhan Ayaydin, Dr
Director of HCEMM Functional
Cell Biology and Immunology

Zsuzsanna Darula, Dr
Director of HCEMM Single Cell
Omics

Teşekkür

Doktora tezimin her aşamasında katkıları ve yardımlarını esirgemeyen sayın danışman hocam Doç. Dr. Evren Gündoğdu'ya

Her zaman desteğini gördüğüm ilk danışman hocam sayın Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu'na

Doktora dönemim boyunca her zaman katkısı ve desteği olan Radyofarmasi Anabilim Dalı Başkanı sayın Doç. Dr. Derya İlem Özdemir'e

Nükleer tıpta yaptığımız tüm çalışmalarda her zaman desteği ve yardımı olan sayın Prof. Dr. Zeynep Burak'a

Nükleer Tıp Anabilim Dalı bünyesinde yaptığımız çalışmalardaki yardım ve destekleri için Nükleer Tıp Anabilim Dalı çalışanlarına ve sayın Hatice Birgül'e

Moleküler Yerleştirme çalışmalarındaki yardımları için sayın Dr. Öğretim Üyesi Günnur Güler'e

İn vivo çalışmalarına verdiği destek için sayın Prof. Dr. Domokos Mathe'ye

Sitotoksisite çalışmalarında verdiği destek için sayın Doç. Dr. Nur Selvi'ye

Partikül boyutu ve nem tayini analizlerinde verdikleri destek için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Eczacılık Teknolojisi Bölüm Başkanı sayın Prof. Dr. Özgen Özer ve sayın Dr. Öğretim Üyesi Aysu Yurdasiper Erdem'e

Radyoışaretleme ve kalite kontrol çalışmalarında gösterdikleri destek için Eczacıbaşı-Monrol Nükleer Ürünler Tic. ve San. A.Ş. ve sayın Serkan Oban'a

FABAL bünyesinde yaptığımız tüm çalışmalarda her zaman yardım ve destek de bulunan FABAL çalışanlarına

FTIR analizlerindeki yardımları için sayın Dr. Öğretim Üyesi Murat Çizmecioğlu'na

Doktora tez çalışmalarım sırasında her zaman fikirlerini aldığım Dr. Öğretim Üyesi Hasan Akbaba ve Arş. Gör. Fuat Karakuş'a

Doktora tez dönemim de düşünce olarak rahatlamamı sağlayan oyun arkadaşım sevgili İpek Özgenç'e

Güzel ve zor günlerimde hayatımın her anında yanımda olan sevgili eşim Ecz. Özlem Özgenç'e

Akademik kariyerimin en büyük destekçilerinden her zaman yanımda olan beni bu günlere getiren sevgili aileme sonsuz teşekkür ediyorum.

Doktora tez çalışmaları 5200074 nolu TEYDEP projesiyle ve 22115 Ege Üniversitesi

Bilimsel Araştırma Projesi ile gerçekleştirilmiştir. Katkılarından dolayı TÜBİTAK’a ve Ege Üniversitesi Rektörlüğü’ne teşekkür ediyorum.

İzmir, 1.09.2021

Emre ÖZGENÇ



Özgeçmiş

