

**RADYOTERAPİDE KULLANILMAK ÜZERE KUANTUM
NOKTALARI VE FOTODUYARLAŞTIRICI İÇEREN
TÜMÖRE SPESİFİK NANOBOYUTLU LİPOZOMLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF TUMOR SPESIFIC TARGETED
LIPOSOMES CONTAINING QUANTUM DOTS AND
PHOTOSENSITIZER USED FOR RADIOTHERAPHY**

MEHMET KARABUĞA

Prof. Dr. SUNA ERDOĞAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü
DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2020

Bu alışma 116S323 nolu proje olarak
TUBİTAK-Sağlık Bilimleri Araştırma Grubu
tarafından desteklenmiştir.

Doktora alışmaları sırasında belki de haklarından aldığım ve hiçbir zaman haklarını ödeyemeyeceğim;

Sevgili Annem Leman,

Babam Orhan ve

Oğlum Umut KARABUĞA'ya

bir nebzedede olsa fedakarlıklarının karşılığı olması dileğiyle,

Sevgi ve Umut'la...

2020

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

08/07/2020

MEHMET KARABUĞA

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

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

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

08 / 07 / 2020

(İmza)

MEHMET KARABUĞA

ÖZET

RADYOTERAPİDE KULLANILMAK ÜZERE KUANTUM NOKTALARI VE FOTODUYARLAŞTIRICI İÇEREN TÜMÖRE SPESİFİK NANOBOYUTLU LİPOZOMLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Mehmet KARABUĞA

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna ERDOĞAN

Temmuz 2020, 177 sayfa

Tüm dünyada ikinci en önemli ölüm sebebi olarak gösterilen kanser tedavisinde genel yaklaşımlar; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapi, immün terapi ve hedefe yönelik tedavidir. İyonlaştırıcı radyasyonun kanser hücrelerinde letal hasara sebep olarak yok edilmesini sağlayan radyoterapide, uygulanan radyasyon dozunu artırmadan biyolojik etkisini artırmak amacıyla çeşitli yaklaşımlar denenmektedir. Radyoduyarlaştırıcılar, hücreleri radyasyona karşı olduğundan daha duyarlı hale getiren maddelerdir ve radyoterapiden önce, radyoterapi sırasında veya sonradan verilebilirler. Son yıllarda, metal nanoparçacıkları (Au, Ag), kuantum noktaları (KN), süper paramanyetik demir oksit ve metal olmayan nanoparçacıklar (silikon, fulleren) gibi nanoteknoloji temelli radyoduyarlaştırıcılar üzerinde çalışmalar yapılmaktadır. Bu yöntem “*Nanoparticle Enhanced X ray Therapy = NEXT*” olarak adlandırılmaktadır. Ayrıca, KN gibi sintilasyon ya da sürekli lüminesans yapan nanoparçacıkların fotoduyarlaştırıcılarla beraber radyoduyarlaştırıcı olarak kullanımı da üzerinde çalışma yapılan yeni bir alandır.

Bu çalışmada; Kuantum nokta (KN) (CdSeZnS)- Klorin E-6 (Ce6) konjugatı içeren, PEG kaplı, nanoboyutlu, yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş lipozomal radyoduyarlaştırıcı

geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu sayede kanser tedavisinde daha az radyasyon dozunda daha fazla faydanın sağlanması ve klinikte kullanılan X ışını dozlarına nazaran daha düşük radyasyon dozu kullanılarak tümör hücrelerinin yok edilmesi amaçlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları lipozomların uygun enkapsülasyon verimi ve partikül büyüklüğüne sahip olduğunu göstermiştir. Lipozom formülasyonlarının 4T1 (fare meme kanseri) tümör hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri incelenmiş ve tek başına 5 Gy X ışını radyasyon dozunun hücre kültürü üzerinde yaptığı etki ile lipozom uygulandıktan sonra 5 Gy X-ışını uygulandıktan sonra hücre ölümü açısından % 27,1±1,73'lik artış sağlandığı görülmüştür. KN-Ce6 konjugatı içeren lipozomal radyoduyarlaştırıcının antitümör etkinliği in vivo tümör modeli oluşturulmuş farelerde incelenmiştir. Bu kapsamda, farelerdeki ağırlık değişimleri, tümör hacmindeki değişimler, sağ kalım süreleri izlenmiş ve tümör dokusu ve diğer organlar üzerinde histopatolojik değerlendirmeler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar, DSPC_L-FA-K lipozom dispersiyonunun (KN-Ce6 konjugatı içeren DSPC:Chol:SA:PEG2000-DSPE:FA-PEG2000-DSPE lipit bileşimine sahip formülasyon), radyoterapide daha az radyasyon dozu uygulanarak tedavide aynı veya daha iyi etkinlik sağlanması için umut verici bir radyoduyarlaştırıcı ajan olabileceğini göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Radyoterapi, Nanotaşıyıcı, Lipozom, Kuantum Nokta, Fotoduyarlaştırıcı, Klorin e-6

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF TUMOR SPESIFIC TARGETED LIPOSOMES CONTAINING QUANTUM DOTS AND PHOTSENSITIZER USED FOR RADIOTHERAPHY

Mehmet KARABUĞA

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology And Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Suna ERDOĞAN

Temmuz 2020, 177 pages

Cancer is the second most common cause of death in the world. Common approaches in cancer treatment include surgery, radiotherapy, chemotherapy, hormone therapy, immune therapy, and targeted therapy. In radiotherapy, which causing lethal damage in cancer cells by using ionizing radiation, various approaches are tried to increase the biological effect without increasing the applied radiation dose. Radiosensitizers can be applied before, during or after radiotherapy and make cells more sensitive to radiation. In recent years, number of studies have been performed on nanotechnology-based radiosensitizers such as metal nanoparticles (Au, Ag), quantum dots (QDs), super paramagnetic iron oxide and non-metal nanoparticles (silicon, fulleren). This method is called as "Nanoparticle Enhanced X-ray Therapy = NEXT". In addition, the use of scintillating or continuously luminescent nanoparticles such as QDs with photoensitizers is a new field of study.

In this study, it is intended to develop liposomal radiosensitizer which is quantum dots -Chlorine e6 conjugate encapsulated, PEG-coated, nanoscale and surface modified with folic acid.

By this way, it is aimed to provide more benefit and to destroy tumor cells by using lower radiation dose compared to clinically used X-ray doses. Characterization studies have

shown that liposomes have appropriate encapsulation efficiency and particle size. The cytotoxicity of liposome formulations on 4T1 (mouse breast cancer) tumor cell lines were examined. It was observed that there is $27,1 \pm 1,73$ % increase in cell death when it is compared with the effect of only 5 Gy X-ray radiation dose was compared with the administration of liposome formulation following by 5 Gy X-ray radiation dose. The antitumor efficacy of the liposomal radiosensitizer containing the QD-Ce6 conjugate was investigated in mice having in vivo tumor model. In this context, weight changes in mice, changes in tumor volume, survival times were monitored and pathological and histological evaluations were made on tumor tissue and other organs. The obtained results showed that DSPC_L-FA-K liposome dispersion (QD-Ce6 conjugate containing formulation which has DSPC:Chol:SA:PEG2000-DSPE:FA-PEG2000-DSPE lipid composition) prepared in this thesis scopes might be a promising radiosensitizing agent to achieve the same or better efficacy in treatment by applying less radiation dose in radiotherapy.

Keywords: Radiotherapy, Nano-carrier, Liposome, Quantum Dot, Photosensitizer, Chlorine e6

TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanması sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her adımda yol gösterici olan Danışmanım Prof. Dr. Sn. Suna Erdoğan'a,

Değerli bilgi ve görüşleri ile yardımını esirgemeyen duayen hocamız Prof. Dr. Sn. A. Yekta Özer'e,

Konjugat hazırlama çalışmaları sırasında bilgi ve deneyimlerini paylaştan Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Temel Eczacılık Bilimleri Bölümünden Prof. Dr. Sn. Kezban Ulubayram ve Dr. Kim. Semih Çalamak'a,

Kuantum noktası sentezi ve yüzey modifikasyonları çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Abdullah Gül Üniversitesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümünden Doç. Dr. Evren Mutlugün'e, Araş. Görev. Miray Ünlü'ye, Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümünden Prof. Dr. Sn. Süleyman Ali Tuncel'e,

Hücre Kültür çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Sn. İmran Vural ve Dr. Öğr. Üyesi Selin Seda Timur'a,

Sintigrafi çekimlerindeki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Nükleer Tıp Anabilim Dalından Prof. Dr. Sn. Murat Tuncel'e,

Radyoterapi çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Sn. Mustafa Cengiz'e ve Hacettepe Üniversitesi Radyasyon Onkoloji Anabilim Dalı medikal fizik uzmanı Sayın Talip Yolcu ve Yağız Yedekçi'ye ve Anabilim Dalı teknisyenlerine,

Mikro-BT cihazını kullanma konusunda imkan tanıyan A.Ü. Tıp Fakültesi Nükleer Tıp ABD öğretim üyesi Prof. Dr. Sn. Özlem Küçük ve Çiğdem Soydal'a A.Ü. RÜAG Tesisi Sorumlusu Sn. Tahsin Pehlivan'a ve AR-GE Teknisyeni Sn. Songül Tanrıverdi'ye,

Hayvan deneyleri kapsamındaki histopatolojik değerlendirme çalışmalarındaki bilgi ve deneyimlerini paylaşan Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sn. Rıfkı Hazıroğlu ve Araş. Gör. Kürşat Filiki'ye,

Deneyisel çalışmalarım sırasında yardım ve desteğini esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Radyofarmasi Anabilim Dalından Dr. Öğr. Üyesi Sn. Mine Silindir Günay'a ve Anabilim Dalının tüm araştırma görevlisi ve doktora ğrencilerine,

Fizik mühendisliği lisans eğitimim sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana her adımda yol gösterici olan ve belki de bu günlerin mimarı olan Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği Bölümü ğretim yesi (E.) Prof. Dr. Sn. Turan zbey'e,

Tez çalışmalarım sırasında gösterdikleri dostlukları ve çalışmalarıma katkılarından dolayı, Hacettepe Üniversitesi Adli tıp Anabilim Dalında görev yapan Ebru zcan'a, Nükleer Tıp Anabilim Dalında görev yapan Serap Yılmaz'a

Sevgi, destek ve fedakarlıklarından dolayı canım annem Leman Karabuğa'ya,

Tez alışmaları sırasında kaybettiğim babam Orhan Karabuğa'ya,

ve

Oğlum Umut Karabuğa'ya

sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Mehmet KARABUğA

Temmuz 2020, Ankara

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
EŞİTLİKLER DİZİNİ	xviii
KISALTMALAR	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİ	4
2.1. <i>Kanser Ve Tedavi Yöntemleri</i>	4
2.1.1. Radyoterapi	4
2.1.1.1. Radyoterapi Etkinliğinin Artırılması	6
2.1.1.1.1. Tümör Dokusunda Radyasyon Direncinin Geri Çevrilmesi	6
2.1.1.1.2. Sağlıklı Dokunun Radyasyon Direncinin Arttırılması	7
2.1.1.1.3. Tümör Dokusunun Duyarlılığının Arttırılması.....	7
2.1.1.2. Radyoterapide Kullanılan Radyoduyarlaştırıcılar	8
2.1.1.2.1. Kimyasal Radyoduyarlaştırıcılar	8
2.1.1.2.2. Nanoteknoloji Temelli Radyoduyarlaştırıcılar	9
2.1.1.2.2.1. Kuantum Nokta (KN).....	11
2.1.2. Fotodinamik Terapi (FDT).....	14
2.1.2.1. FDT’ de Singlet Oksijen (1O_2) ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üretim Mekanizmaları	16
2.1.2.2. FDT’de Kullanılan Fotoduyarlaştırıcılar.....	17
2.1.2.2.1. Birinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar	17
2.1.2.2.2. İkinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar	18

2.1.2.2.3.	Üçüncü Nesil Fotoduyarlaştırıcılar	18
2.1.2.2.4.	İdeal Fotoduyarlaştırıcıların Özellikleri	19
2.1.2.2.5.	Klinik Kullanıma Girmiş ve Henüz Klinik Araştırma Fazında Olan Fotoduyarlaştırıcılar.....	20
2.2.	<i>Nano Taşıyıcı Sistemler</i>	21
2.2.1.	Lipozom.....	22
2.2.1.1.	Lipozomların Avantaj ve Dezavantajları.....	23
2.2.1.2.	Lipozomların Hedeflendirilmesi.....	23
2.2.1.2.1.	Hedeflendirme Mekanizmaları	24
2.3.	<i>Nanopartikülle Arttırılmış X-Işını Tedavisi</i>	28
2.3.1.	FRET Prensibi	29
2.3.2.	FRET Gerçekleşme Kriterleri.....	29
2.3.3.	KN'de FRET Zorlukları	31
2.3.4.	KN-Fotoduyarlaştırıcı Konjugasyonu.....	31
2.3.5.	KN-Fotoduyarlaştırıcı Konjugatlarının Radyoterapide Kullanımı.....	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1.	<i>Kullanılan Kimyasal Maddeler</i>	36
3.2.	<i>Kullanılan Araç ve Gereçler</i>	37
3.3.	<i>Ce6 Üzerinde Yapılan Kontroller</i>	39
3.3.1.	Ce6'nın Yapısı	39
3.3.2.	Ce6'nın UV-Vis Spektrumunun Elde Edilmesi.....	39
3.3.3.	Ce6'nın Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması.....	39
3.4.	<i>KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması</i>	40
3.4.1.	KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması İçin Yapılan Ön Çalışmalar	40
3.4.1.1.	KN Sentezi.....	40
3.4.1.2.	KN-Silika Kaplama.....	41
3.4.2.	Uç Grubu Amin ile Fonksiyonelleştirilmiş KN ile Ce6 Konjugatının Hazırlanması	44
3.4.3.	KN-Ce6 Konjugatının Karakterizasyonu Çalışmaları	45

3.4.3.1.	KN-Ce6 Konjugatının FTIR Analizi ile Tanınması.....	45
3.4.3.2.	KN-Ce6 Konjugatının UV-Vis Spektrofotometre ile Tanınması	45
3.4.3.3.	KN-Ce6 Konjugatının Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) İle Görüntülenmesi.....	45
3.5.	<i>Lipozom Dispersiyonlarının Formülasyon Çalışmaları</i>	46
3.5.1.	<i>Ön Formülasyon Çalışması</i>	46
3.5.2.	Etken Madde İçermeyen Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması.....	46
3.5.3.	KN-Ce6 Konjugatı İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması.....	47
3.5.4.	KN-Ce6 Konjugatı İçeren Yüzeyi Folat İle Modifiye Edilmiş İmmunolipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	47
3.6.	<i>Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu</i>	47
3.6.1.	Veziküllerin Partikül Büyüklüklerinin ve Zeta Potansiyellerinin Tayini ...	47
3.6.2.	İçte Tutulan KN-Ce6 Konjugat Miktarı ve Enkapsülasyon Verimi	47
3.6.3.	Lipozomların Mikroskop ile Görüntülenmesi.....	48
3.6.3.1.	Lipozomların Polarizan Mikroskobu ile Görüntülenmesi.....	48
3.6.3.2.	Lipozomların CTEM ile Görüntülenmesi	48
3.7.	<i>Lipozom Dispersiyonlarının Stabilite Çalışmaları</i>	48
3.8.	<i>Hücre Kültürü Çalışmaları</i>	48
3.8.1.	Hücrelerin Büyütülmesi	48
3.8.2.	Hücelere Uygulanacak Konjugat Dozunun Belirlenmesi	48
3.9.	<i>4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkinin İncelenmesi</i>	49
3.9.1.	Ön Çalışmalar	49
3.9.2.	Lipozom Formülasyonlarının 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi.....	49
3.9.3.	İşnlama prosedürü.....	50
3.10.	<i>In Vivo Çalışmalar</i>	51
3.10.1.	Hayvanlarda Tümör Modelinin Oluşturulması.....	51
3.10.2.	Tümör Görüntüleme Çalışması.....	51
3.10.2.1.	Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m İle İşaretlenmesi ve İşaretlemenin Kalite Kontrolü.....	52
3.10.2.2.	Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmaları	52

3.10.3. Lipozom Formülasyonlarının Sitotoksik Etkinliğinin İn Vivo İncelenmesi	53
3.10.3.1. Tedavi Planlamasının Yapılması	53
3.10.3.2. Işınlama Prosedürü.....	54
3.10.3.3. Tedavi etkinliğinin İzlenmesi	55
3.10.3.3.1. Farelerin Vücut Ağırlıklarındaki Değişimin Saptanması	55
3.10.3.3.2. Hayvanlardaki Tümör Boyutundaki Değişimin Belirlenmesi	55
3.10.3.3.2.1. MikroBT Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesi.....	55
3.10.3.3.2.2. BT Similatör Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesi	56
3.10.3.3.2.3. Manuel Olarak Tümör Boyutlarının Ölçülmesi ve Tümör Hacminin Hesaplanması.....	57
3.10.3.3.3. Biyokimyasal Değerlendirme	57
3.10.3.3.4. Sağ Kalım Sürelerinin İzlenmesi	57
3.10.3.3.5. Histopatolojik ve İnceleme	57
3.11. İstatistiksel Analiz.....	58
4. BULGULAR	59
4.1. Ce6'nın Yapısına Ait Bulgular	59
4.1.1. Ce6'nın UV-VİS Spektrumu.....	59
4.1.2. Ce6'nın Kalibrasyon Doğrusu.....	59
4.2. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması	60
4.2.1. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular	60
4.2.2. KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanmasına Ait Bulgular.....	60
4.2.3. KN-Ce6 Konjugatının Karakterizasyonuna Ait Bulgular	61
4.2.3.1. KN-Ce6 ve Konjugatının FTIR Analizi ile Tanınması	61
4.2.3.2. KN-Ce6 Konjugatının UV Spektrofotometresi ile Tanınması	64
4.2.3.3. KN-Ce6 Konjugatının CTEM ile Görüntülenmesi	64
4.3. Lipozom Dispersiyonlarının Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular	65
4.3.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	65
4.3.2. Lipozom Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular.....	68
4.3.3. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu	68

4.3.3.1. Veziküllerin Partikül Büyüklüklerinin ve Zeta Potansiyellerinin Tayini Bulguları.....	68
4.3.3.2. İçte Tutulan KN-Ce6 Konjugat Miktarı ve Enkapsülasyon Verimine Ait Bulgular.....	70
4.3.4. Lipozomların Mikroskopla Görüntülenmesine Ait Bulgular.....	71
4.3.4.1. Lipozomların Polarizan Mikroskop ile Görüntülenmesine Ait Bulgular.....	71
4.3.4.2. Lipozomların CTEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular.....	71
4.3.5. Lipozom Dispersiyonlarının Stabilite Çalışmalarına Ait Bulgular.....	73
4.4. Hücre Kültür Çalışmasına Ait Bulgular.....	75
4.4.1. Hücrelere Uygulanan Konjugat Dozunu Belirleme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	75
4.4.2. 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Stotoksik Etkilerinin İncelenmesine Ait Bulgular.....	79
4.4.2.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular.....	79
4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular.....	89
4.5.1. Tümör Görüntüleme Çalışması.....	89
4.5.1.1. Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m İle İşaretlenmesi ve İşaretlemenin Kalite Kontrolüne Ait Bulgular.....	89
4.5.1.2. Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular.....	89
4.5.2. Lipozom Dispersiyonlarının Antitümöral Etkinliğinin İnVivo İncelenmesine Ait Bulgular.....	90
4.5.2.1. Tedavi Planlaması Sonuçları.....	90
4.5.2.2. Tedavi Etkinliğinin İzlenmesi.....	91
4.5.2.2.1. Farelerin Vücut Ağırlıklarındaki Değişimin Saptanması.....	91
4.5.2.2.2. Hayvanlardaki Tümör Boyutundaki Değişimin Belirlemesine Ait Bulgular.....	95
4.5.2.2.2.1. BT Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesinden Elde Edilen Bulgular.....	95
4.5.2.2.2.2. Kumpas İle Elde Edilen Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular.....	97
4.5.2.2.3. Biyokimyasal Değerlendirme.....	99
4.5.2.2.4. Sağ Kalım Sürelerinin İzlenmesi Bulguları.....	101
4.5.2.2.5. Histopatolojik İnceleme Sonuçları.....	101

5. TARTIŞMA	111
5.1. <i>Ce6 Üzerinde Yapılan Kontrollerin Değerlendirilmesi</i>	111
5.2. <i>KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması ve Konjugatın Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi</i>	111
5.3. <i>KN-Ce6 Konjugatı İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Değerlendirilmesi</i> .	113
5.4. <i>Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi</i>	115
5.5. <i>Hücre Kültür Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi</i>	119
5.6. <i>İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi</i>	122
5.6.1. <i>Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular</i>	122
5.6.2. <i>Lipozom Formülasyonlarının Antitümöral Etkinliğinin İn Vivo İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi</i>	123
6. SONUÇ	128
7. KAYNAKLAR	130
EKLER	142
<i>EK 1 –Etik Kurul İzin Belgesi</i>	142
<i>EK 2 –Tez Çalışması Orjinallik Raporu</i>	144
ÖZGEÇMİŞ	145

ŞEKİLLER DİZİNİ

		Sayfa
Şekil 1	TCP (A), NTCP (B) arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoid eğrisi	5
Şekil 2	Ce6 açık formülü	39
Şekil 3	Amin fonksiyonlu silika nanoparçacıkları ile KN ve Ce6'nın birleştirilmesi	41
Şekil 4	KN'lerin AEP ve EDC, NHS reaksiyonu ile uç gruplarının fonksiyonelleştirilerek Ce6 ile bağlanması şematik gösterimi	44
Şekil 5	Plakların 6 MV lineer hızlandırıcı ile ışınlama düzeneği	50
Şekil 6	TPS' de tümör kontürleme ve body çizimi	54
Şekil 7	Varian Clinac lineer hızlandırıcı cihazında farelerin üzerine 1 cm bolus yerleştirilerek yapılan ışınlamanın görüntüsü	55
Şekil 8 a-b	Mikro-BT (a) ve BT similatörde (b) yapılan görüntüleme işlemi	56
Şekil 9	Ce6'nın DMSO içindeki çözeltisinin UV spektrumu	59
Şekil 10	Ce6 DMSO içinde hazırlanan kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi	60
Şekil 11	FTIR spektrumları (1 saat inkübasyon sonrası CdSe/CdS KN (■), serbest Ce6 (■), Konjugat 1 (■), Konjugat 2 (■), Konjugat 3 (■))	62
Şekil 12	Konjugat-2'nin liyofilize (sarı çizgi) ve PBS içindeki çözeltisinin (siyah çizgi) FT-IR spektrumu	62
Şekil 13	KN, Ce6 ve liyofilize Konjugat-2'nin FTIR analizi sonucu	63
Şekil 14	Ce6 (siyah) ve KN-Ce6 Konjugatı (kırmızı)' nin UV spektrumu	64
Şekil 15 a-d	CdSeZnS KN'lerinin (a) 50 nm ve (b) 100 nm ve KN-Ce6 konjugatının (c) 50 nm ve (d) 100 nm ölçekli CTEM görüntüleri	65
Şekil 16 a-h	DSPC _L (a), DSPCL-K(b), DSPCL-FA(c), DSPCL-FA-K(d), PCL-K (e), PCL-FA-K(f), PCL(g), PCL-FA(h) lipozom dispersiyonlarının polarizan ışık mikroskobu görüntüleri (x 40).	72

Şekil 17 a-f.	PC _L -K lipozomların ekstrusion öncesi a) 50, b)100 c) 500 nm ölçeklerde ve ekstrusion sonrası d) 50, e)100, ve f) 1 µm ölçeklerde CTEM görüntüleri.	72
Şekil 18	4T1 hücrelerinin 10, 20 Gy X ışını dozu uygulandıktan sonra 24, 48, 72 saat bekleme sonrasında hücre canlılığı sonuçları	76
Şekil 19	DSPC _L , DSPC _L -K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi	76
Şekil 20	DSPC _L -FA, DSPC _L -FA-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi	77
Şekil 21	PC _L , PC _L -K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi	77
Şekil 22	PC _L -FA, PC _L -FA-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi	77
Şekil 23	4T1 hücre kültürü kullanılarak 72 saat bekleme sonrasında DSPC _L ve DSPC _L -FA'in farklı konsantrasyonları için 2x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi.	78
Şekil 24	4T1 hücre kültürü kullanılarak 72 saat bekleme sonrasında PC _L ve PC _L -FA'in farklı konsantrasyonları için 2x10 ³ hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi.	78
Şekil 25	1,5 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 4T1 hücre canlılığı sonuçları (formülasyonlarla inkübasyon: 4 saat; ışınlama dozları; 5-10-15-20 Gy ve ışınlama sonrası bekleme süresi: 72 saat).	79
Şekil 26	3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 4T1 hücre canlılığı sonuçları (formülasyonlarla inkübasyon: 4 saat; ışınlama dozları; 5-10-15-20 Gy ve ışınlama sonrası bekleme süresi: 72 saat).	80

Şekil 27	3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 5 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.	80
Şekil 28	3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 10 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.	81
Şekil 29	3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 15 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.	81
Şekil 30	3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 20 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.	81
Şekil 31	Hücre kültürü sonuçlarından elde edilen hücre canlılığına karşılık uygulanan doz yarı logaritmik grafiği	88
Şekil 32	Enjeksiyondan sonra sırasıyla 0. ve 3. saatlerde çekilen Gama kamera görüntüleri	90
Şekil 33 a-f	Grup II' ye ait (a) planlama, (b) doz dağılımı görüntüleri ve (c) DVH görüntüsü, Grup III' e ait (d) planlama, (e) doz dağılımı görüntüleri ve (f) DVH görüntüsü.	92
Şekil 34	Farelerin ortalama ağırlıkların zamana göre değişimi grafiği	93
Şekil 35	Grup I farelerin mikroBT görüntüleri	95
Şekil 36	Grup II farelerin mikroBT görüntüleri	96
Şekil 37	Grup III farelerin mikroBT görüntüleri	96
Şekil 38	Tümör oluşturulmuş farelerin tedavi sonrası sağ kalım eğrileri	101
Şekil 39 a-d	Grup I' de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri	102
Şekil 40 a-f	Grup II' de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri	104
Şekil 41 a-f	Grup III' de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri	106

TABLolar DİZİNİ

		Sayfa
Tablo 1	KN-silika kaplamada kullanılan oranlar	42
Tablo 2	6 MV foton enerjisi için hücre kültür serilerine verilen MU (Monitör Unit) değerleri ve bu değerlere karşılık gelen dozlar.	51
Tablo 3	Kullanılan stok çözeltiler ve konjugasyon çalışmasında kullanılan oranlar	61
Tablo 4	Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan lipozom dispersiyonları, bileşimleri, partikül büyüklüğü dağılımları ve gözlenen sonuçlar	66-67
Tablo 5	Çalışmada kullanılan lipozom dispersiyonları ve kodları	68
Tablo 6	Lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü dağılımları ve zeta potansiyel sonuçları (n=6)	69
Tablo 7	Farklı lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	69
Tablo 8	Farklı lipozom dispersiyonlarının zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması	70
Tablo 9	Lipozom dispersiyonlarının içte hapsedilen etkin madde miktarı sonuçları (n=6)	71
Tablo 10	+4 ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının % enkapsülasyon verimleri	73
Tablo 11	+4 ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının ortalama partikül büyüklükleri (n= 6)	74
Tablo 12	+4°C ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının zeta potansiyel değerleri (n= 6)	75
Tablo 13	Radyasyon uygulanmayan gruplarda formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).	82
Tablo 14	5 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonlar için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).	82
Tablo 15	10 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonlar için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).	83
Tablo 16	15 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonlar için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).	83
Tablo 17	20 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonlar için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	84

Tablo 18	5 Gy radyasyon dozunda formülasyonların hücre ölümü üzerindeki etkisinin karşılaştırması	84
Tablo 19	DSPC _L formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	85
Tablo 20	DSPC _L -K formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	85
Tablo 21	DSPC _L -FA formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	86
Tablo 22	DSPC _L -FA-K formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	86
Tablo 23	Serbest konjugat için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	86
Tablo 24	Tek başına artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması	87
Tablo 25	Tümör oluşturulmuş kontrol ve deney grubu hayvanlarının farklı günlerde ölçülen vücut ağırlıkları ve % ağırlık değişimleri	94
Tablo 26	Tümör oluşturulan farelerin 10Gy ışınlama sonrası farklı günlerde mikroBt ve Bt simülatör görüntülerinden hesaplanan tümör hacim (cm ³) değerleri	98
Tablo 27	Tümör oluşturulan farelerin 10Gy ışınlama sonrası farklı günlerde kumpas ile manuel ölçümle hesaplanan tümör hacim (cm ³) değerleri	98
Tablo 28	Tümör hacimlerinin günler arasındaki % değişimleri	99
Tablo 29	Farklı günlerde farelerden elde edilen kan numunelerinin analiz değerleri	100
Tablo 30	Grup I farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri	103
Tablo 31	Grup II farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri	105
Tablo 32	Grup III farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri	107

EŞİTLİKLER DİZİNİ

	Sayfa
Eşitlik 1 $E_{FRET} = R_o^6 / R_o^6 + r^6$	30
Eşitlik 2 $R_o = 9.78 \times 10^3 (n^{-4} f_d . J)^{1/6} A^0$	30
Eşitlik 3 % işaretleme verim $= \frac{\text{İşaretli Tc} - 99\text{m aktivitesi}}{\text{İşaretli T} - 99\text{m} + \text{Serbest Tc} - 99\text{m aktivitesi}} \times 100$	52
Eşitlik 4 Tümör hacmi (mm ³) = 0,52 x genişlik x uzunluk x derinlik	56
Eşitlik 5 Tümör hacmi (mm ³) = 0,52 x (genişlik) ² x uzunluk	57
Eşitlik 6 SER = Radyoduyarlayıcı yokluğundaki doz/ Radyoduyarlayıcı varlığındaki doz	87

KISALTMALAR

AEP	2-aminodihidrojenfosfat
APTES	3-Aminopropil trietoksisilan
BT	Bilgisayarlı Tomografi
Ce6	Klorin e-6
CTEM	Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu
DSPC	1,2-Distearil-Sn-Glisero-3-Fosfokolin
DMSO	Dimetilsülfoksit
DTPA-PE	Dietilentriaminpentaasetik asit-1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin
EDC	1-etil-3-(3- dimetilaminopropil)-karbodimid
FD	Fotoduyarlaştırıcı
FDT	Fotodinamik Terapi
FRET	Förster Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Transform Infrared Spektrometresi
ITLC-SG	Ani ince tabaka kromatografisi
KN	Kuantum Nokta
MPS	3-merkaptopropil trimetoksisilan
MV	Mega Volt
NEXT	Nanopartikülle Arttırılmış X-Işını Tedavisi
NHS	N-hidroksisulfosukkinimid sodyum
NTCP	Sağlam Doku Hasar Olasılığı
PBS	Fosfat Tamponu
PC	L- α -fosfatidil kolin
PEG	Polietilen Glikol
RT	Radyoterapi
SER	Sensitörün Duyarlılaştırma Oranı
ROS	Reaktif Oksijen Türevleri
SPECT	Tek Foton Emisyon Tomografi
TCP	Doza Bağlı Tümör Kontrol Olasılığı
TEOS	Tetraetil ortosilikat
TPS	Tedavi Planlama Sistemi

1. GİRİŞ

Kanser; kontrolsüz hücre çoğalması sonucu çevre dokulara invazyon gösteren, lenf ve kan yoluyla uzak metastaz yapabilen habis tümörlere denilmektedir. Dünyada kardiyovasküler hastalıklardan sonra ikinci en yüksek ölüm oranına sahiptir. Kanser tedavisinde genel yaklaşımlar; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapi, fototerapi, immün terapi ve hedefe yönelik tedavidir (1, 2).

İyonlaştırıcı radyasyon kullanılarak uygulanan radyoterapi, klinikte kanser tedavisinde yaygın kullanılan tedavi yöntemlerindedir. Her ne kadar gelişen teknoloji ile radyoterapinin yan etkileri azaltılmaya çalışılsa da çevre sağlıklı dokulara verdiği tahribat tam olarak engellenememektedir. Uygulanan radyasyon dozunu artırmadan, radyasyonun hedef dokudaki etkisini artırabilmek için çeşitli yaklaşımlar denenmektedir. Bunlardan birisi de radyoduyarlaştırıcı olarak adlandırılan hücrelerin radyasyona duyarlılığını artıracak bileşiklerin kullanılmasıdır. Bu amaçla kimyasal duyarlaştırıcılar ve nanoteknoloji bazlı radyoduyarlaştırıcılar kullanılmaktadır. Radyoduyarlaştırıcıların etki mekanizmaları tam olarak açıklanamamış olmakla birlikte bu konuda iki farklı görüş vardır. Bunlardan ilki; radyoduyarlaştırıcılar, radyasyonun soğurulması ile oluşan elektronları yakalayarak DNA'ya transfer ederek hasar oluşumunu artırırlar. İkinci görüş ise radyoduyarlaştırıcılar, hücrelerde doğal olarak bulunan ve hücreyi radyasyona karşı koruyucu etkiye sahip glutatyon gibi tiyoller ile reaksiyona girerek etkisiz hale getirmektedirler.

Kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri olan fotodinamik tedavide kullanılan fotoduyarlaştırıcılar, normal halde inaktifken oksijen ve ışık varlığında aktifleşerek Reaktif Oksijen Türevleri (ROS = *Reactive Oxygen Species*) üretirler ve bu etki ışık kaynağının kontrolü ile sadece kanserli alanda lokalize edilebilir. Bu durum tümör dokusu etrafındaki sağlıklı doku hasarının sınırlandırılmasını ve yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır. Ancak bileşiklerin aktif hale geçmesi için kullanılan ışığın dalga boyu 780-950 nm arasında olduğu için yöntemin en büyük dezavantajı ışığın penetrasyon yeteneğinin limitli olmasıdır. Bu nedenle daha çok yüzeysel tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak deri kanseri tedavisinde kullanılmakla birlikte baş-boyun, akciğer, özefagus, prostat ve mesane kanserlerinde kullanımı da araştırılmaktadır. Ayrıca daha derinde lokalize olan tümörlerin tedavisinde

kullanılabilecek doku penetrasyon kapasitesi artırılmış yeni duyarlaştırıcıların geliştirilmesi konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Son yıllarda nano malzemelerin radyoterapide radyoduyarlaştırıcı olarak kullanımına nanopartikülle artırılmış X-ışını tedavisi (NEXT= Nanoparticle Enhanced X-ray Therapy) denilmektedir ve sağlıklı dokuların maruz kaldığı zararın azaltılması için oldukça etkili olacağı düşünülmektedir (3, 4, 5). Bu amaçla geliştirilen ilaç taşıyıcı sistem temelli bileşikler, çevre sağlıklı dokulara tahribatın en az olması için hedefe yönlendirilebilirler, her biri kendi başına kanser hücreleri için toksik olan bileşikler radyasyon ile etkileşerek daha fazla kanser hücresi öldürülmesini gerçekleştirirler ve bu sayede tek başına iyonlaştırıcı radyasyon etkisinden çok daha fazla tahribat yaratarak, klinikte hali hazırda kullanılan radyoterapi dozundan daha az dozlar kullanılarak, kanser hücrelerinin yok olmasını sağlayabilirler.

Günümüzde pek çok alanda faaliyet gösteren ya da göstermeye aday olan ve 2025'te tam olarak girilmesi düşünülen yeni bir devrimin adı olan nanoteknoloji, birçok alanda olduğu gibi tıpta da geniş kullanım alanı bulunmuştur. Günümüzde teşhis ve tedavi amacıyla klinik kullanım onayı almış nanoteknoloji bazlı ilaçlar bulunmaktadır, ayrıca bu amaçla yeni ilaçlar geliştirmeye yönelik de birçok çalışma yapılmaktadır.

Kanser tanısı, görüntülemesi ve tedavisi nanoteknolojinin geniş yer bulunduğu alanlar arasında yer almaktadır. Kanser tanısı, görüntülemesi ve tedavisinde nanoteknoloji kullanımının sağladığı avantajlar; kanserin erken teşhis ve tedavisi, cerrahide ulaşılamayan tümör hücrelerin ölümünün sağlanması, spesifik olarak kanser hücrelerine yönelik tedavi ile normal dokunun maksimum korunması, geciktirilmiş ya da kontrollü salım ile hedef bölgede ilaç konsantrasyonunun artırılması ve korunmasıdır. Bu amaçla ilaç taşıyıcı sistemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Nanometreden mikrometreye ulaşan boyutlarıyla lipozomlar pek çok avantajları nedeniyle kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmak amacıyla üzerinde en çok çalışma yapılan ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olmuştur.

Bu çalışma kapsamında klinikte kanser tedavisinde kullanılan yöntemlerden biri olan radyoterapide kullanılmak üzere, nanoteknoloji temelli radyoduyarlaştırıcı geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda PEG kaplı Kuantum nokta-Klorin e6 konjugatı içeren yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş immünolipozom dispersiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan formülasyonun sitotoksik etkileri ve antikanser etkinlikleri Folat reseptörü pozitif 4T1 (fare meme kanseri) hücre hatlarında incelenmiştir. Ardından in vivo deneyler

kapsamında, tümör modeli oluşturulmuş 4-6 haftalık dişi Bulb/c fareleri kullanılarak lipozom dispersiyonlarının tümör dokusundaki maksimum tutulduğu zamanın belirlenmesi için gama kamera ile görüntüleme yapılmıştır. Radyoterapi etkinliğinin incelenmesinde tümör modeli oluşturulmuş farelere lipozomal konjugat içeren lipozom dispersiyonları uygulanmış ve ardından 6MV X-ışını ile ışlandıktan sonra (hiçbir işlem yapılmayan kontrol grubu fareleri hariç) 0, 5 ve 10. günlerde kan örnekleri alınmış, ağırlıkları ölçülmüş, tümör boyutu ölçülmüş ve sağkalımları değerlendirilmiştir. Ardından histopatolojik olarak incelenerek hazırlanan formülasyonun etkinliği gösterilmiştir.



2. KURAMSAL BİLGİ

2.1. Kanser Ve Tedavi Yöntemleri

Kanser; kontrolsüz hücre çoğalması sonucu çevre dokulara invazyon gösteren, lenf ve kan yoluyla uzak metastaz yapabilen habis tümörlerdir. Tüm dünyada ikinci en önemli ölüm sebebi olarak gösterilen kanser, Amerikan Kanser Topluluğu'nun (1) verilerine göre; 2020'de Amerika' da 1.806.590 yeni kanser vakasının oluşacağı ve yaklaşık olarak 606.520 kişinin ölümüne sebep olacağı öngörülmektedir.

Kanser tedavisinde genel yaklaşımlar; cerrahi, radyoterapi, kemoterapi, hormon terapi, immün terapi, ve hedefe yönelik tedavidir(1,2). Ayrıca ülkemizde standart tedaviler arasında yer almamasına rağmen fotodinamik terapi de bazı kanser türlerinin tedavisinde dünyada birçok ülkede uygulanan bir yöntemdir.

2.1.1. Radyoterapi

Radyoterapi; iyonlaştırıcı radyasyonun kanser hücrelerinde letal hasara sebep olarak yok edilmesini sağlayan, pek çok kanser çeşidinin tedavisinde etkin ve yaygın olarak kullanılan tedavi yöntemlerinden birisidir.

Radyoterapi'de kullanılan iyonlaştırıcı radyasyon ile hücreye verilen zarar, direkt ve indirekt etkiler olmak üzere iki etki mekanizmasıyla olur. İyonlaştırıcı radyasyonun direkt ve indirekt etkileri ile DNA hedef molekül olarak kabul edilir ve DNA'da hasara yol açarak hücre ölümüne sebep olur. Direkt etkide foton enerjisi transferi sonucunda açığa çıkan elektron DNA molekülünü doğrudan etkileyerek hasara yol açarken, indirekt etkide elektron ilk aşamada suyla etkileşime girerek serbest radikallerin oluşmasına sebep olur, bu serbest radikaller DNA molekülünde hasara yol açar (6).

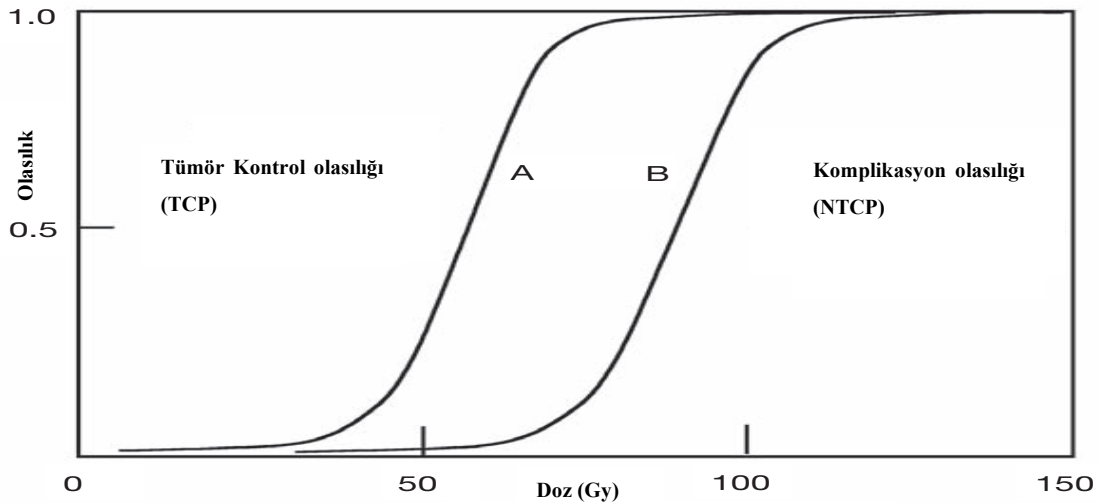
X ve gama ışınları gibi yolları boyunca seyrek iyonlaşma olaylarına yol açan radyasyonların etkisi daha çok indirekt yolla olur. Biyolojik açıdan hedef molekülün direkt ya da indirekt yoldan etkilenerek hasar görmesi büyük önem taşımaz (6,7). İndirekt yolla oluşan serbest radikaller hidrojen, hidroksil, süper oksit, hidrojen peroksit, hidroperoksit gibi radikaller membran yapı ile etkileşime girerek apoptozisi indükler (8).

Radyoterapi'de amaç belirlenen hedefe optimum doz verirken, çevre sağlıklı organları korumak ve tümör hacmi içerisindeki doz dağılımının homojenliğini sağlamaktır. Tümörün radyasyona duyarlılığı kadar çevre normal doku ve organların da

radasyona duyarlılığı tedavide büyük öneme sahiptir. Bilindiği gibi tümöral dokulardaki hücreler kaotik bir büyüme profiline ve farklı radyasyon duyarlılığına sahiptir. Ayrıca tümöral hücreler farklı büyüklükte, farklı kromozom yapısında ve farklı morfolojik yapıda olabilirler. Komşu normal doku hücrelerinde bu durumdan bahsedilemez (9).

Radyoterapi, kanser hücrelerinde letal hasara sebep olarak tümörlü hücrelerin yok edilmesini sağlarken, çevre sağlam dokulara da zarar verebilmektedir. Bu hasarın azaltılmasına yönelik birçok cihaz tasarlanmış ve hizmete sokulmuş olmasına rağmen halen sağlam dokuların hasar görmesi tam olarak engellenememiştir (10).

Tedavide “*primum non nocere (önce, zarar verme)*” ilkesi geçerlidir. Bu kavram doğrultusunda radyasyon onkolojisi disiplininde tümörü yok etmek, sağlıklı dokuyu korumak için Doza Bağlı Tümör Kontrol Olasılığı (TCP= *Tumor Control Probability*) ve Sağlam Doku Hasar Olasılığı (NTCP= *Normal Tissue Complication Probability*) gibi radyoterapiye yol gösterecek çeşitli kavramlar öne sürülmüştür. Tümörün yanıt verebileceği dozlarda, normal dokular zarar görebilir, normal dokular korunmak istendiğinde ise tümör yeterli dozu almayabilir. TCP ve NTCP'nin dengelenmesi radyoterapinin başta gelen amaçlarındanıdır. Bütün teknolojik gelişmeler bu amacı gerçekleştirmek için yapılmaktadır. Tedavilerin amacı Şekil 1’de gösterilen sigmoid yapılarıdaki eğrilerde, TCP eğrilerinin sola, NTCP eğrilerinin sağa ilerlemesini sağlamaktır. İkisi arasındaki alan büyüdükçe terapötik indeks genişler ve tedaviden sağlanan yarar artmış olur (9, 11).



Şekil 1. TCP (A), NTCP (B) arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoid eğrisi (9)

TCP'yi etkileyen faktörler; tümöre bağlı faktörler ve tedaviye bağlı faktörler olmak üzere ikiye ayrılır.

Tümöre bağlı faktörler; tümörün radyoduyarlılığı, yerleşim yeri ve büyüklüğü, hücre tipi ve oksijen etkisine bağlı olarak değişir.

Tedaviye bağlı faktörler; doz-zaman-fraksinasyon, radyasyonun kalitesi, doz hızı, radyoduyarlaştırıcı kullanımı, radyoterapinin cerrahi ve kemoterapi ile kombinasyonu ve kullanılan teknik ile tedavi modalitesidir(7).

2.1.1.1. Radyoterapi Etkinliğinin Artırılması

Radyoterapide radyasyonun etkinliğinin artırılmasında etkili başlıca üç yaklaşımdan bahsedilmektedir. Bunlar tümör dokusunun duyarlılığını artırılması, tümör dokusunda radyasyon direncinin geri çevrilmesi ve sağlıklı dokunun radyasyon direncinin artırılmasıdır (8).

2.1.1.1.1. Tümör Dokusunda Radyasyon Direncinin Geri Çevrilmesi

Tümör dokusunda radyasyon direncinin geri çevrilmesi, survivin hedeflendirme, Epidermal büyüme faktör reseptörü (Epidermal growth factor receptor-EGFR) hedeflendirme ve phosphatidylinositol3' kinaz hedeflendirme (PI3K/AKT) ile sağlanabilmektedir. Survivin özellikle kanser hücrelerinde bulunan antiapoptotik fonksiyonu olan bir gendir. Hücre bölünmesi ve metastazda görev alır. Kanser hücrelerinde survivinin baskılanması normalden fazla sayıda anormal mitozun gerçekleşmesine neden olur. EGFR'de meydana gelebilecek mutasyonlar hücrenin anormal çoğalmasına sebep olurlar. Bu reseptör ailesi üyelerinde meydana gelen genetik değişimler pek çok kanser türünde gösterilmiştir. Hücre içi sinyal iletiminde çeşitli sinyal yolları bulunmaktadır. Bu sinyal yollarının aktivasyonu ile hücre proliferasyonu, metastaz, tümör invazyonu, antiapoptotik sinyal iletimi, kemoterapiye direnç, anjiyogenez ve hücre-hücre bağlantılarının kurulması ile ilişkili hücresel aktiviteleri tetiklemektedir (12).

2.1.1.1.2. Sağlıklı Dokunun Radyasyon Direncinin Arttırılması

Sağlıklı dokunun radyasyon direncinin arttırılmasında antioksidanlar, amifostin ve fitokimyasallar kullanılmaktadır. Antioksidanlar serbest radikallerle reaksiyona girerek hücrelere zarar vermelerini önler. Amifostin, baş-boyun kanseri radyoterapisi sonrasında gelişen ağız kuruluğunu önlemek için kullanılan FDA onaylı bir ilaçtır. Sisplatine bağlı gelişen böbrek, kulak ve sinir sistemi hasarları ve toksisitesine karşı da koruyuculuğu bulunmaktadır(11).

Radyokoruyucuların etki mekanizması sülfidril gruplarının radikal yakalama özelliğinden yararlanılarak, oksijen yerine serbest radikallerle birleşerek oluşacak hasarı engellemesidir(11).

2.1.1.1.3. Tümör Dokusunun Duyarlılığının Arttırılması

X ışını madde ile etkileşiminde çeşitli etkileşimlerde bulunur. Bunlar düşük enerjiden yüksek enerjiye göre klasik saçılma (Rayleigh saçılımı), fotoelektrik etki, compton saçılımı, çift oluşumu ve fotodisintegrasyondur(11,13).

Düşük enerjili (10-500 keV) iyonlaştırıcı radyasyon ile madde etkileşiminde baskın olan etkileşim fotoelektrik etkidir. Bu etkide foton madde ile etkileşime girerken atom tarafından soğurulur ve atomdan bir elektron fırlatılır. Fotoelektrik etki fotonun enerjisinin küpü ile ters orantılı, atomun atom numarasının küpü ile doğru orantılı olarak değişir (13).

Standart radyoterapide kullanılan enerji, orta ve yüksek enerji seviyesi (100 keV-10 MeV) mertebelerinde olduğu için baskın olan etkileşim compton etkileşimidir. Compton etkileşiminde foton hedef atomun dış yörünge elektronuna çarparak onu yörüngesinden fırlatır, atomdan sökülen elektrona compton elektronu denir. Başlangıç fotonu ise elektron tarafından saptırılır ve başka bir yöne saçılan foton olarak yoluna devam eder. Compton etkileşimi fotoelektrik etkide olduğu gibi atom numarası ile bağlantılı değildir. Compton etkileşimi foton enerjisi ile ters orantılı, elektron yoğunluğu (g/cm^2) ile doğru orantılı olarak değişir(13). Compton elektronu, fotoelektron ya da Auger elektronu delta ışınları olarak adlandırılan ve hücre hasarında baskın olarak sorumlu olduğu düşünülen ikincil elektronların yayılmasına sebep olabilir. X ışını

dozunun etkisini arttırmak için X ışını tesir kesitini (cross section) artıran fiziksel radyasyon arttırıcılar kullanılır (11).

2.1.1.2. Radyoterapide Kullanılan Radyoduyarlaştırıcılar

Radyoduyarlaştırıcılar radyasyonun letal etkisini artıran yani ışınlama sırasında var olmaları durumunda canlıyı radyasyona karşı olduğundan daha duyarlı hale getiren maddelerdir.

Radyoduyarlaştırıcıların etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamakla birlikte bu konuda iki farklı görüş vardır. Bunlardan ilki; radyoduyarlaştırıcılar, radyasyonun soğurulması ile oluşan elektronları yakalayarak DNA'ya transfer ederler ve hasar oluşumunu arttırmaları. İkinci görüş ise radyoduyarlaştırıcıların hücrelerde doğal olarak bulunan ve hücreyi radyasyona karşı koruyucu etkiye sahip glutatyon gibi tiyoller ile reaksiyona girerek etkisiz hale getirdiklerini ileri süren görüştür (7).

Radyoduyarlaştırıcı olarak kullanılan çeşitli maddeler bulunmaktadır. Bunlar kimyasal duyarlaştırıcılar olarak isimlendirilmektedirler. Son yıllarda nanoteknoloji temelli radyoduyarlaştırıcıların da radyoterapide kullanımı yoğun olarak araştırılmaktadır.

2.1.1.2.1. Kimyasal Radyoduyarlaştırıcılar

Radyoprotektif tiyollerin süpresyonu (14, 15), hipoksik hücrelerin hedeflenmesi ve DNA onarım inhibisyonu (15, 16, 17) gibi farklı biyokimyasal yollarla radyasyonun tümör hücrelerinde etkinliğini ya da duyarlılığını arttırmak için kullanılırlar. Bu uygulamalar bir veya birkaç alanda umut vaat etmesine rağmen, genelde normal dokular için toksik, duyarlaştırma mekanizması tam olarak belli olmayan ve subselüler hasara sebep olmaktadır. Lokalizasyonları, zamanlamaları ve aktivitelerinin kontrolünün tam olarak yapılamaması başka radyoduyarlaştırıcıların araştırılma sebebi olmuştur. Kimyasal duyarlaştırıcıları, halojenli primidinler ve hipoksik hücre sensitizörleri olarak iki ana grupta toplamak mümkündür.

Halojenli Primidinler

Klor, brom ve iyot atomlarının bağlanma özellikleri metil grubunun bağlanma özellikleri ile büyük benzerlik gösterirler. Bunun sonucu olarak 5-klorodeoksiüridin, 5-iyododeoksiüridin ve 5-bromodeoksiüridin gibi halojenli primidinler yapısında metil grubu sebebi ile DNA'da timidine çok benzerler. Bu sebeple DNA sentezi esnasında timidinin yerini alarak DNA zincirinin yapısına girebilirler ve DNA zincirinde zayıflama meydana getirirler. Böylece X ve gamma ışınına karşı duyarlı hale getirirler (6,7).

Hipoksik Hücre Sensitizörleri

Tümörde iyi damarlanmamış bölgelere nüfus ederek hipoksik hücreleri duyarlı hale getiren hipoksik hücre sensitizörlerinin çoğu elektron yakalayıcı özelliğe sahiptirler ve oksijen etkisi gibi davranırlar. İyi oksijenlenmiş hücrelerin duyarlılıklarını artırmazlar. Bu amaçla kullanılan ilk örnekler nitrobenzenlerdir daha sonra bunları nitrofuranlar ve nitroimidazoller takip etmiştir (6,7).

2.1.1.2.2. Nanoteknoloji Temelli Radyoduyarlaştırıcılar

Nanoteknoloji bazlı radyoduyarlaştırıcılara örnek; metal bazlı olanlar; Altın (Au), Gadolinyum (Gd), Titanyum (Ti), Gümüş (Ag), Hafniyum (Hf) tabanlı ve metal olmayan (Silikon, Fulleren,) nanopartikülleri, süperparamagnetik demir oksit nanopartikülleri ve kuantum noktalar (KN) olarak özetlenebilir.

İdeal nanoteknoloji bazlı radyoduyarlaştırıcılar yüksek atom numaralı olmalıdır. Örneğin altın nanoparçacığının (AuNp) atom numarası yumuşak dokunun atom numarasından 10 kat daha fazladır. Böylece X ışınının soğurulmasının ve fotoelektrik etki ile elektron salınımını artırılmasına sebep olur (11) . Auger etkisi özellikle düşük atom numaralı atomlarla ilgilidir. Bunun için yüksek atom numaralı atomların doz soğurmalarına katkıda bulunmazlar. Atom numarası 15'ten küçük olan atomlarda baskın iken 60'dan büyük olan atomlarda etkisi sıfırdır (18).

Metal tabanlı nanopartiküller yüksek atom numaralarından dolayı fotoelektrik etkiyi artırırlar ve sadece düşük enerjili X ışınları ile kullanılmaları durumunda bir anlam ifade ederler. Bu konuda pek çok çalışma yayınlanmakla birlikte düşük enerjili X ışını kullanımı derin yerleşimli tümörlerin tedavisinde etkili değildir. Bu bağlamda en çok çalışılan Altın nanopartilleri (AuNp), yüksek atom numarası, inert ve biyouyumlu oluşu,

bir çok şekil ve boyutta ayarlanabilir olması yönünden radyoterapide kullanımını çekici kılmaktadır. Ayrıca Au'nun yüksek K kenarı (yaklaşık olarak 81 KeV) 200 KeV'nin altındaki fotonlarla ışınlamalarda düşük enerjili auger elektronları ve fotoelektronların emisyonuna sebep olur (19). Yaklaşık olarak 100 KeV ile ışınlanan AuNp'leriyle yapılan ışınlamada %65'lik bir doz arttırımı söz konusu iken, MV mertebelerinde bir enerji ile ışınlamada % 0.7'lik bir doz artışından bahsedilmektedir (19,20). Eksternal ışınlama ve düşük enerji yayan brakiterapi kaynakları kullanılarak Monte Carlo ile yapılan çalışmalarda; brakiterapi kaynakları ile yapılan ışınlamalarda % 70'e varan daha iyi doz artışı sağlandığı bulunmuştur. 6MV foton ışını ile yapılan ölçümlerde ise % 0.7'lik bir doz artışı sağlandığı bulunmuştur (19, 21, 22). AuNp'lerinin kimyasal olarak aktif yüzeyleri ve protein -SH domainleri arasında güçlü etkileşim olabileceği ve bu yüzden de protein konformasyon değişikliklerine sebep olabileceği düşünülmektedir (23). Au gibi fiziksel radyoduyarlaştırıcılar, üstün kontrol edilebilirlik özelliklerinin yanı sıra kimyasal radyoduyarlaştırıcılarla karşılaştırıldıklarında daha az toksik özellik göstermektedirler. Sadece ışınlanan alanda hücre ölümlerini arttırırlar. Ancak günümüzde kanser hastaları megavoltaj seviyesinde enerjilerde X-ışınları ile tedavi edilmektedir, dolayısı ile Au gibi fotoelektrik etkiyi arttıran Np'lar, kompton etkisinin baskın olduğu bu enerji seviyesinde tam olarak etkili olamazlar (15, 24). Kanser tedavisinde kullanılan diğer metal tabanlı nanopartikül Gd nanopartiküldür. Gd nötron yakalama terapide kullanılır. Burada termal nötron ile ışınlanan Gd, nötron yakalama reaksiyonu ile meydana gelen uzun erimli gama ışını, iç çevrim elektronu, X ışını ve büyük kinetik enerjili auger elektronu ile kanser tedavi edilmeye çalışılır(18).

TiO₂ nanopartikülleri, ROS üretme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca TiO₂'nin düşük maliyetli, kimyasal olarak biyolojik sistemlerle etkileşime girmeyen ve nanopartikül formunda hazırlanması kolay olan bir madde olduğu belirtilmiştir (25, 26). Titanyum dioksit (TiO₂) nanopartikülleri ile literatürde oldukça fazla çalışma bulunmaktadır. TiO₂'nin ultraviyole (UV) ile ışınlanmasıyla hücrede öldürücü etkisi olduğu görülmüştür (15). Ancak UV ışınının insan dokusunun derinlerine tam olarak penetre olmadığı ve TiO₂ nanopartiküllerinin fizyolojik pH'da düşük stabiliteye sahip olduğu görülmüştür (27, 28).

Klinik uygulamalar için ultrason frekansı (39 kHz) çok düşük olmasına rağmen, TiO₂'in ultrason ile ışınlandığında reaktif oksijen türleri (ROS= *Reactive Oxygen Species*) ürettiği görülmüştür. Bir çalışmada canlı dokuya enjekte edilen TiO₂ ile son zamanlarda

linik olarak uygun frekansta (1MHz) ultrason ile ışınlanan TiO₂ nanopartiküllerinin hücrelerin yaşamasında ve tümör büyümesinin önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (29).

HfO₂ (hafniyum oksit) yüksek atom numaralı bir metal olup iyonlaştırıcı radyasyon ile etkileşime girdiğinde fotoelektrik etkisini artırıcı özelliğinden dolayı tedavinin etkinliğini arttırmaktadır. Ayrıca yüksek elektron yoğunluklu nanopartikül olan HfO₂ biyolojik ortamlarla inert davranması, düşük çözünürlüğe sahip olması, redoks ya da elektron transferinin olmadığı düşünülmektedir. Maggioorella ve arkadaşları HfO₂ ile ürettikleri NBTXR3'ün biyolojik sistemde iyolaştırıcı radyasyon ve yüksek atom numaralı HfO₂ etkileşimi üzerinde çalışmalarda bulunmuşlardır. Monte Carlo simülasyonu ile bu nanopartiküllerin yüksek enerjili iyonlaştırıcı radyasyon ile ışınladıklarında, su ile karşılaştırıldığında yaklaşık 9 kat daha fazla radyasyon etkisini arttırdığı belirtilmiştir. Nanopartikül büyüklüğü, şekli ve yüzey özelliklerinin, nanopartikül ve biyolojik çevre arasında etkileşimi etkileyeceğinden yaptıkları çalışmada kullandıkları nanopartikülün boyutunun 50 nm, küre şeklinde, yüzey yükü negatif olan yüksek atom numaralı, biyolojik ortamda inert davranan bir nanopartikül olduğunu belirtmişlerdir (23).

2.1.1.2.2.1. Kuantum Nokta (KN)

Adımı kuantum sınırlaması etkisinden almış olan KN'leri, nanometre boyutlarında yarı iletken kristaller olup, birkaç atomdan binlerce atoma kadar atom barındırabilen yapay atomlardır (30, 31). Çapları genelde 2-10nm olan KN periyodik tablonun 2-6 (CdSe, CdS ve CdTe gibi), 3-5 (InP, InAs gibi) ya da 4-6 grubu (PbSe gibi) bileşiklerden elde edilirler.

Uyarılmış atomdaki elektron ile boşluk (hole) arasındaki mesafeye “Eksiton Bohr Yarıçapı”, elektron-boşluk çiftine de “Exciton” denilir. Büyük malzemelerde yarı-iletken kristalin boyutları Eksiton Bohr Yarıçapından büyüktür, bu elektron için yeterli bir boşluk anlamına gelir. Kristal nanometre boyutlarına geldiğinde kuantum mekaniği devreye girer ve enerji seviyeleri sürekli davranmak yerine kesikli hal alır (32).

KN'de eksiton bohr yarıçapı, kristal boyutundan küçük ya da ancak kristal boyutu kadardır. Bu durumda uyarılmış atomda elektron bu mesafeye kadar gitmek isteyecek fakat üç boyutta da sıkışan elektron enerjisini üst seviyelere çıkaramaz (kuantum

sınırlaması) dolayısı ile kinetik enerjisi artmaya başlar ve sonuçta elektronun yaptığı ışımının rengi değişir (32)

KN tek katman olabileceği gibi bir çekirdek (*core*) birde kabuktan (*shell*) oluşabilir. Sadece çekirdekten oluşan KN, çekirdek yüzeyinin biyokonjugasyon reaksiyonları ile zayıf etkileştiği ve kimyasal reaksiyonlara karşı dengesiz oldukları için biyokonjugasyon ve biyolojik görüntüleme az ilgi çeken materyallerdir (33).

Çekirdek yüksek yüzey alanı/hacim oranı özelliğinden dolayı oldukça reaktiftir. Değerlik (valance), iletkenlik (conduction) ve özellikle yasak bölge (energy band gap) bandın pozisyonuna bağlı olarak farklı çekirdek-kabuk KN elde edilir (34, 35). Çekirdek-kabuktan daha büyük yasak bölgeye sahip olabilir (Tip I) ya da tam tersi olabilir (Ters Tip I) , çekirdeğin iletkenlik ya da değerlik bandı kabuğun yasak bölgesinin içine lokalize edilebilir (Tip II) veya terside olabilir (Ters Tip II). Yük taşıyıcıları kabuğa lokalize edilebilir böylece kabuğun kalınlığı tüm yayılan dalga boyunu kontrol eder. Ters tip I'e örnek olarak; CdS/HgS, CdS/CdSe, ZnSe/CdSe, Tip II'ye örnek olarak; CdTe/CdSe ve CdSe/ZnTe KN'leri gösterilebilir (33).

Kabuğun büyük enerji band aralığı çekirdeğin uyarılma ve ışın yayılımını sınırlar, sönümlemeyi azaltır, reaktif olan çekirdek yüzey atomlarını oksidasyondan, fotokimyasal bozunmadan ve diğer kimyasal reaksiyonlardan korur, kuantum verimini % 90 lara kadar artırır ve fotostabiliteyi artırır. CdS/ZnS, CdSe/ZnS, CdTe/ZnS, InP/ZnS, CdSe/CdS, CdTe/CdSe, CdS/ZnSe ve CdSe/ZnTe gibi KN'lerde kabuk sadece çekirdeği korumaz aynı zamanda luminesans kuantum verimini ve kıızıla kayma (red shifted) luminesans spektrumunu da geliştirir (33). KN'nin boyutu arttıkça yaydığı ışının dalga boyu (λ) artar. KN'nin yaydığı renk kırmızıya kayar ve KN'deki elektronları uyarmak için gerekli olan enerji azalır. Ayrıca yaydığı ışının dalga boyu uzun ve enerjisi düşüktür (32). KN diğer özellikleri arasında artmış parlaklık, yüksek kuantum verimi, sönümlenme direnci ve uzun floresans zamanı gelmektedir.

KN'lerin Sitotoksitesi

KN'lerin sitotoksitesi; KN'nin büyüklüğü, dozu, rengi, kaplandığı malzemesi, yüzey kimyası, kaplama biyoaktivitesi ve işlem parametreleri gibi bir çok faktöre bağlıdır (36,37,38,39). KN'nin serbest Cd salması, serbest radikal oluşumu ve hücrealtı bileşiklerle KN etkileşimi gibi KN'nin sorumlu olduğu birkaç sitotoksite mekanizması vardır (38, 40, 41).

KN'ler, singlet oksijenin yanında bazı reaktif oksijen ve nitrojen türleri de üretirler. KN ve dihydrorhodamine-123 ile yapılan çalışmada hidrojen peroksit (H₂O₂) ve peroksinitrit (ONOO⁻) üretildiği bildirilmiştir (5, 42, 43). Ayrıca KN'nin yasak bölge aralığı süper oksit (O₂⁻) ya da hidroksil radikali ([•]OH) üretmeye müsait olduğu da bildirilmiştir (5,44).

CdSe/ZnS KN'lerinin DNA'ya verdiği hasarın incelendiği bir çalışmada DNA ile inkübe edilen KN, UV ışını ile ışınlanmış ve sonuçta %56 oranında DNA'nın hasar gördüğü bulunmuştur. UV ışını kullanmadan deney tekrar edildiğinde % 29'luk bir DNA hasarı gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada sülfür tabanlı serbest radikallerin de üretildiği, bunun da ZnS'nin hava ve su ortamında oksitlenmesi ve açığa SO₂ çıkarmasıyla, SO₂⁻, O₂⁻ ile OH radikalının oluşumuna sebep olduğu gözlenmiştir. Aynı koşullar altında titanyum ve CdSe/ZnS KN'nin DNA'ya verdiği zarar gözönüne alındığında CdSe/ZnS KN'nin DNA'ya hasarının titanyuma göre daha az olduğu bildirilmiştir (45).

Lenfoma hücrelerinin CdSe/ZnS KN ile 0.1 – 0.4 mg/mL konsantrasyonda 0-24 saat inkübasyona bırakıldığı yapılan çalışmada 0.1 mg/mL konsantrasyonda hücre büyümesini değiştirdiği, 0.4mg/mL konsantrasyonda ise pek çok hücrenin öldüğü bildirilmiştir (46,31).

İnsan lenfoblast hücrelerinin (WTK1) CdSe/ZnS-MUA KN'leri ile 1-2µM konsantrasyonda 12 saat inkübe edildikleri bir başka çalışmada, 2 µM konsantrasyonda 2 saatte DNA hasarının olduğu ancak 12 saatlik uzun süreli inkübasyonda DNA'nın onarıldığı rapor edilmiştir (31,47).

CdTe KN ile sıçan feokromositoma hücrelerinde, fare mikroglial hücrelerinde 0.01- 100 µg/mL konsantrasyonda 2-24 saat ışınlama süresinde yaptıkları çalışmada 10µg/mL üzerindeki konsantrasyonlarda sitotoksikite gözlemlenmiştir (39, 31).

Fareler üzerinde yapılan bir diğer çalışmada 180 nM konsantrasyonundaki KN (CdSe/ZnS), 20 pmol/g hayvan ağırlığı olacak şekilde, intravenöz enjeksiyonla uygulanmış, 15 dakika hücre inkübasyonu, 1-133 gün in vivo ışınlama süresinde çökme bölgesinde lokalize olan nekroz sinyaline rastlanmamıştır (48, 31). Avidin bağlı CdSe/ZnS- KN, HeLa hücrelerinde 0.5-1.0 µM, 15 dakika ışınlama süresinde yaptıkları çalışmada hücre büyümesi yada gelişmesinde herhangi bir değişimin olmadığı gözlenmiştir (31, 49).

Diğer bir çalışmada sulu sentezlenmiş KN ve organik sentezlenmiş KN arasında sitotoksosite ve in vivo davranışlarda farklılık olduğu belirtilmiştir. Sulu sentezlenmiş KN (CdTe, CdTe/CdS, CdTe/CdS/ZnS) ile yaptıkları sitotoksosite çalışmalarında; CdTe sulu sentezlenmiş KN'lerinin farklı hücre serileri için çok yüksek oranda toksik oldukları bulunmuştur. CdS'nin sitotoksositeyi azaltabileceğini ve ZnS'ninde Cd²⁺ salınımını engellediği için hücreler için uyumlu olduğunu hale geleceği belirtilmiştir (50, 51). Ayrıca aynı konsantrasyonlarda yapılan çalışmada; CdTe KN'sinin hücreler arası Cd²⁺ konsantrasyonunun, CdTe/CdS/ZnS KN'sinden yaklaşık 10 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Sulu sentezlenmiş KN'lerin enjeksiyondan kısa süre sonra (0.5 - 4 saat) karaciğerde toplandıklarını ve 15-80 günde uzun süreli kan dolaşımı sırasında böbrekte tutulumun arttığını belirtilmiştir. Sulu sentezlenmiş KN'lerin biyodağılımının KN'lerin büyüklüğüne bağlı olduğu belirtilmiştir (51).

2.1.2. Fotodinamik Terapi (FDT)

FDT kavramı ilk olarak 1900'lü yıllarda Almanya Münih'de çalışan tıp öğrencisi, Oscar Raab'ın daha sonra fotoduyarlaştırıcı olarak adlandırılan bazı boyalarla inkübe edilen *paramecia* gibi mikroorganizmaların karanlıkta tutuldukları zaman yaşamalarına rağmen, ışığa maruz kaldığında öldüğünü görmesi ile tesadüfen keşfedilmiş bir yöntemdir. Daha sonra bu ışık aracılı öldürme etkisinin gerçekleşmesi için havadaki oksijenin de bulunması gerektiğini keşfedilmiş ve böylece 'fotodinamik eylem' teriminin temelleri atılmıştır. İlk klinik uygulaması 1970'de yüzeysel deri kanseri tedavisi için ABD'de yapılmıştır. Hematoporfirin türevi (HpD) olarak adlandırılan ilk fotoduyarlaştırıcı, suda çözünür bir porfirin karışımıdır ve daha sonra Photofrin isimiyle ticarileştirilmiştir (52, 53).

FDT, serbest radikal oluşumunda etkili yöntemlerden biridir. Spesifik dalga boyunda uyarıldığında aktive olan ve serbest radikal üreterek hedeflenen hücreyi direkt olarak öldüren bir tedavidir. İlk kullanılan bileşik olan Photofrin'in 1993 yılında onaylanmasının ardından kanser tedavisinde FDT'nin kullanımı belirgin bir artış göstermiştir(52, 53).

Bu tedavi diğer kanser tedavi yöntemlerinden temelde farklılık gösterir. İyonlaştırıcı radyasyondan farklı olarak FDT, sitotoksik etkisini DNA'dan başka

hedeflere zarar vererek gösterir. Fotoduyarlaştırıcının hücredeki lokalizasyonuna bağlı olarak FDT tarafından zarar gören spesifik subselüler hedef değişir. Farklı tip hasarlar farklı tür hücre ölümlerine sebep olur. Mitokondriye zarar verilirse düşük dozda ışıkla bile apoptozise sebep olur. Eğer fotoduyarlaştırıcı bir damar sisteminde tutunursa, tümör hücresinin direk ölümündense damar hasarıyla tümörü yok eder (54, 55).

Fotoduyarlaştırıcının ışıkla uyarılması sonucu ortaya çıkan singlet oksijenin ömrü çok kısadır (~10-320 ns) ve hücrelere difüzyonu sadece 10-55 nm'yle sınırlıdır. Bu nedenle fotodinamik hasar, fotoduyarlaştırıcının hücre içi konumuna çok yakın olması ile muhtemeldir. FDT, hücre ölümünü üç ana şekilde gerçekleştirir. Bunlar apoptotik, nekrotik ve otofaji ile hücre ölümüdür. Fotoduyarlaştırıcının farklı organellerde (mitokondri, lizozomlar, endoplazmik retikulum, plazma zarı vb.) subselüler lokalizasyonunun, hücre ölüm mekanizmasının tipinde dominant ve önemli bir rol oynadığı, fakat genel FDT dozunun (fotoduyarlaştırıcı konsantrasyonu \times ışık akısı) ve DLI (*Drug Light Interval*)'nin de etkili diğer faktörler olduğu düşünülmektedir. Genel olarak, hücreler FDT ile in vitro tedavi edildiğinde apoptozun hücre ölümünün başlıca modalitesi olduğu kabul edilmektedir (52).

Normal halde inaktif olan sitotoksik bileşikler, moleküler oksijen ve ışık varlığında aktifleşerek Reaktif Oksijen Türevleri (ROS = *Reactive Oxygen Species*) üretirler ve bu etki ışık kaynağının kontrolü ile sadece kanserli alanda lokalize edilebilir. Bu durum tümör dokusu etrafındaki sağlıklı doku hasarının sınırlandırılmasını ve yan etkilerin azaltılmasını sağlamaktadır. Ancak bileşiklerin aktif hale geçmesi için kullanılan ışığın dalga boyu 780-950 nm arasında olduğu için yöntemin en büyük dezavantajı ışığın penetrasyon yeteneğinin limitli olmasıdır. Bu nedenle daha çok yüzeysel tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde yaygın olarak deri kanseri tedavisinde kullanılmakla birlikte baş-boyun, akciğer, özefagus, prostat ve mesane kanserlerinde kullanımı da araştırılmaktadır. Ayrıca daha derinde lokalize olan tümörlerin tedavisinde kullanılacak doku penetrasyon kapasitesi artırılmış yeni duyarlaştırıcıların geliştirilmesi konusunda yoğun çalışmalar sürdürülmektedir (56).

2.1.2.1. FDT' de Singlet Oksijen (1O_2) ve Reaktif Oksijen Türleri (ROS) Üretim Mekanizmaları

FDT' de 1O_2 ve ROS üretim mekanizmaları iki tipte gerçekleşir. Tip I reaksiyon ile ROS üretimi, Tip II reaksiyonla 1O_2 üretimi söz konusudur (57, 58).

Moleküler oksijen (3O_2), paralel spin durumlu iki ortaklanmamış (eşleşmemiş) elektrona sahiptir. Biradikal oksijenin elektronlarından birinin enerji alarak kendi spininin ters yönünde olan başka bir orbitalle yer değiştirmesiyle 1O_2 oluşur. 1O_2 , eşleşmemiş elektronu olmadığı için radikal olmayan reaktif oksijen molekülüdür. 1976'da Weishaupt ve arkadaşları 1O_2 'nin tümör hücrelerinin fotoinaktivasyonundan sorumlu bir sitotoksik ajan olduğunu bildirmişlerdir (59).

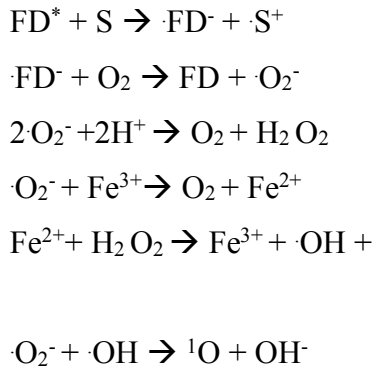
Tip I Reaksiyon

Tip I reaksiyonda, fotoduyarlaştırıcılar hücrel substratlarla reaksiyona girerek hücre için öldürücü ROS'ların oluşmasına sebep olur. Tip I reaksiyon Tip I (a) ve Tip I (b) olmak üzere ikiye ayrılır:

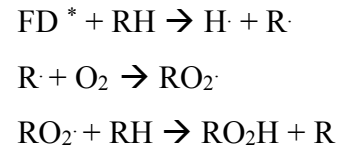
Tip I(a); Substrattan fotoduyarlaştırıcıya elektron transfer edilir. Ardından negatif yüklü fotoduyarlaştırıcı çevredeki oksijen ile etkileşerek süper oksit anyonuna dönüşür. Bu radikal oldukça reaktiftir ve diğer ROS formlarına dönüşerek hücre ölümlerine sebep olur (58).

Tip I(b); Uyarılmış fotoduyarlaştırıcı substrattan hidrojen alır ve peroksit içeren ROS'lara dönüşür. Bu da hücreler için ölümcüldür (58).

Tip I (a) reaksiyon



Tip I (b) reaksiyon

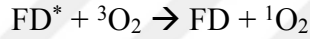


S:Substrat, FD : Uyarılmış Fotoduyarlaştırıcı, R: Alkali grup*

Tip II Reaksiyon

Fotoduyarlaştırıcı ışık tarafından uyarıldığında, fotoduyarlaştırıcı elektronu taban durumdan bir üst enerji seviyesine çıkar. Bu seviyeden sonra çeşitli yollar izleyebilir. İlk olarak ışınımsız relaksasyon (*nonradiative relaxation*) ya da iç çevirim ile S1 seviyesine iner. Buradan sonra üç farklı yol olan floresans, iç çevirim ve sistemler arası geçişi izleyerek taban duruma iner. Sistemler arası geçiş yaparsa buradan sonra çeşitli yollar izleyebilir. Fosforesans, iç çevirim, eğer ortamda oksijen varsa oksijen ile çarpışarak etkinliğini yitirir ve taban duruma düşer yada fotoduyarlaştırıcıdan oksijene elektron ya da enerji transferi olabilir. Bu enerji transferi sonrasında ¹O₂ meydana gelir. Bu tip reaksiyona Tip II reaksiyonu denir. Tip II reaksiyonda oksijen ile çarpışmadan dolayı fotoduyarlaştırıcı enerjisini kaybederek taban duruma döner ve moleküler oksijen (³O₂) iki uyarılmış duruma çıkar. ¹O₂'in ilk biçimi en dıştaki elektronlarından birisinin spini ters olduğu için yüksek enerjilidir. Bu form hızla enerji kaybederek daha kararlı singlet form olan iki elektronun da antibonding orbitalde çiftlendiği hale dönüşür (58).

Tip II reaksiyon



2.1.2.2. FDT'de Kullanılan Fotoduyarlaştırıcılar

FDT'de kullanılan fotoduyarlaştırıcılar, birinci nesil, ikinci nesil ve üçüncü nesil fotoduyarlaştırıcılar olarak 3 gruba ayrılırlar.

2.1.2.2.1. Birinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar

Suda çözünen porfirin karışımı hematoporfirin türevi (HpD)'dir. HpD, hematoporphyrin (Hp) olarak kullanılan ilk porfirinin kimyasal modifikasyonu ve saflaştırılması ile elde edilmiştir(53). Daha sonra, HpD'den izole edilen porfirin dimerleri ve oligomerleri karışımı, onay almış ilk fotoduyarlaştırıcı olarak Photofrin® ticari ismi ile klinik kullanıma sunulmuştur. Sodyum porfimer olarak da bilinen bu bileşik, halen en çok kullanılan fotoduyarlaştırıcıdır. Ancak klinikte geniş kullanımına rağmen klinik uygulamalarda bazı kısıtlamaları da vardır.

Bu kısıtlamalar;

- Düşük kimsayal saflığa sahip olması,
- 630 nm gibi nispeten kısa dalga boyunda maksimum soğurulma pikine sahip olması dolayısı ile zayıf doku penetrasyonuna sebep olması,
- Fotoduyarlaştırıcının uzun yarı ömründen ve deride yüksek tutulumundan dolayı FDT'den sonra birkaç hafta boyunca derinin ışığa aşırı duyarlılığa sebep olması olarak sıralanabilir.

Bu kısıtlamalardan dolayı yeni bileşiklerin keşfine ihtiyaç duyulmuş ve ikinci nesil fotoduyarlaştırıcılar geliştirilmiştir (53).

2.1.2.2.2. İkinci Nesil Fotoduyarlaştırıcılar

İkinci nesil fotoduyarlaştırıcılar; 5-aminolevulinik asid, benzoporfirin türevleri, teksafirinler, tiyopürin türevleri, klorinle birlikte bakterioklorin analogu ve fitalosiyeninler gibi sentetik fotoduyarlaştırıcılardır. İkinci nesil fotoduyarlaştırıcılar yüksek kimyasal saflık, yüksek 1O_2 üretimi, 650-800 nm aralığında dalga boyunda maksimum soğurulmalarından dolayı derin dokulara daha iyi penetre olabilmeleri ile karakterize edilirler. Ayrıca vücuttan daha çabuk temizlenmeleri ve kanserli dokuyu daha yüksek seçimlerinden dolayı daha az yan etki gösterirler. En büyük dezavantajı suda çözünürlükleri azdır ve bu intravenöz uygulamalarını kısıtlayan bir faktördür (53).

2.1.2.2.3. Üçüncü Nesil Fotoduyarlaştırıcılar

Üçüncü nesil fotoduyarlaştırıcıların gelişimi sağlıklı doku çevresindeki hasarı azaltan, tümör dokusuna afinitesi yüksek maddelerin sentezine dayanır. Onkolojide FDT'nin dünya çapındaki klinik uygulamalarındaki problem fotoduyarlaştırıcıların parenteral uygulamalarına olanak sağlayan dozaj formlarının hazırlanmasındaki zorluklardır. FDT'nin biyoyararlanımını etkin bir şekilde arttıran yeni ilaç salım sistemleri ortaya çıkmaktadır.

İlacın seçiciliğini arttırmak için;

- Hedef reseptöre odaklanmış moleküller ile ikinci nesil fotoduyarlaştırıcıların kombinasyonları,

- Proliferatif tümör hücrelerinin hücre duvarlarının sentezi için daha fazla kolesterole ihtiyaç duyması nedeniyle LDL lipoprotein ile fotoduyarlaştırıcıların kombinasyonları,
- Kanser hücresinin spesifik antijenine yönelik bir monoklonal antikor ile fotoduyarlaştırıcıların konjugasyonu,
- Büyüme faktörü reseptörleri, transferrin reseptörleri veya hormonları (İnsülin) gibi tümör yüzey markırlarının kullanılmasıyla fotoduyarlaştırıcıların modifikasyonları kullanılmaktadır (53).

2.1.2.2.4. İdeal Fotoduyarlaştırıcıların Özellikleri

Kanser tedavisinde kullanılan fotoduyarlaştırıcıların çoğu, hemoglobinde bulunan protoporfirin grubunda yer alan tetrapirrole dayanır. Klorin, bakteriyoklorin ve fitalosiyeninler gibi koyu kırmızı spektral bölgede güçlü absorbansa sahip maddeler çok daha verimli fotoduyarlaştırıcılar üretme eğilimindedir. İdeal fotoduyarlaştırıcılar kırmızıya yakın kızılötesi spektral bölgede (650 ve 800 nm arasında) güçlü bir absorpsiyon pikine sahip olmalıdır. Çünkü 800 nm'den daha uzun dalga boylu tekli fotonların Emilimi, oksijeni singlet durumuna uyarmak için yeterli enerji sağlamamaktadır. Fotoduyarlaştırıcılar, ışınlama sonrasında iyi ROS üretimine yol açan önemli triplet kuantum verimine sahip olmalıdır. Karanlıkta toksisiteye sebep olmamalı ve normal dokulardan nispeten daha hızlı temizlenmeli, böylece fototoksitenin yan etkilerinin en aza indirgenmesi sağlanmış olur (52).

İdeal fotoduyarlaştırıcı,

- Suda çözünür,
- Yüksek 1O_2 kuantum verimli (≥ 0.5),
- Uyarılmış triplet durumları yüksek kuantum verimli (≥ 0.5),
- Yüksek enerji transfer etkinliğine sahip,
- Triplet durum enerjisi; T1 ile S_0 arasındaki fark 94 kJ/mol' den büyük,
- Uzun triplet durum yaşam süresi (1 mikro saniye' den büyük),
- Yüksek fotostabilite ve sönmülme (photobleaching) dirençli, yüksek sönmüm katsayısına sahip,

- Doku soğurmasını engellemek ve derin doku penetrasyonunu sağlamak için yakın kızıl ötesi bölgesinde maksimum soğurma özelliğine sahip,
- Sadece tümör hücrelerine yönelmiş,
- Işık yokken toksisite yaratmayan,
- Vücuttan çabuk atılan,
- Basit sentezlenen, kolay elde edilebilen ve ucuz olmalıdır (58, 60, 61).

2.1.2.2.5. Klinik Kullanıma Girmiş ve Henüz Klinik Araştırma Fazında Olan Fotoduyarlaştırıcılar

Klinikte ve klinik araştırmalarda kullanılan fotoduyarlaştırıcılar üç grupta incelenebilir.

- Tetrapirrol Yapılar (Porfirinler, Klorinler, Bakteriyoklorinler, Fitalosiyeninler)
- Sentetik Boyalar (Fenotiazinyum tuzları, Rose Bengal, Skuarainler, Bor-diflimrometen boyları, Fenalenonlar, Geçiş metali bileşikleri)
- Doğal Ürünler (Hiperisin, Hiposrellin, B2 vitamini, Kurkumin)

Bu çalışma kapsamında tetrapirrol yapılardan olan Klorin fotoduyarlaştırıcı olarak kullanıldığı için bu bölümde sadece bunlar detaylı olarak anlatılacaktır.

Tetrapirrol Yapılar

Tetrapirrol yapılar, antikanser uygulamalar için kullanılan en büyük fotoduyarlaştırıcı grubunu oluşturur. Porfirinler, bakteriyoklorinler, fitalosiyeninler ve klorinler bu grubu oluşturan fotoduyarlaştırıcılardır. Tetrapirrol; *haem* (hemoglobin molekülünün proteinsiz kısmı), klorofil ve bakteriyoklorofil gibi birkaç önemli biyomolekül içinde doğal olarak bulunur. Aslında, tetrapirroller “yaşam pigmentleri” olarak adlandırılmıştır. Genel olarak, tetrapirrol fotoduyarlaştırıcılar (bakteriyoklorinler hariç), baskın olarak Tip II reaksiyon ile 1O_2 üretme eğilimindedir (52).

Klorinler

Klorinler, Klorin E6 (Ce6), m-tetrahidroksifenilklorin (Temoporfin® veya Foscan®), benzoporfirin türevi (Verteoporfin®) ve Radachlorin® gibi klinikte kullanılan fotoduyarlaştırıcıları içeren gruptur. Klorin E6 (Ce6) $C_{34}H_{36}N_4O_6$ kapalı formüle sahip doğal olarak oluşan klorofilden türetilmiş bir fotoduyarlaştırıcıdır. Fotodithazine olarak

bilinen trisodyum tuzu olarak ya da polivinilpirolidon içinde çözülmüş olarak formüle edilmiştir. Klorinleri aktive etmek için 650 ve 700 nm arasındaki kırmızı ışık kullanılır (52). Ce6 ve türevlerinin, mikroorganizmalara, kanser hücrelerine ve hücre hedeflendirme gibi proteaz içeren enzimlere karşı kuvvetli aktivitesi vardır

2.2. Nano Taşıyıcı Sistemler

Geleneksel ilaç uygulamalarında, düşük terapötik etkinlik, zayıf biyodağılım, kararlılık, ve çözünürlük, düşük bağırsak emilimi, yüksek yan etkiler ve plazma konsantrasyonundaki dalgalanmalar gibi tedavide pek çok zorluk ile karşılaşmaktadır. Bu zorlukların üstesinden gelmek için uygulanan yaklaşımlardan biri ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanılmasıdır. İlaç taşıyıcı sistemler, ilacın biyolojik ortamda bozunmasını engellerler, spesifik ilaç hedeflendirme ve kontrollü ilaç salımı ile istenmeyen yan etkileri azaltırlar ve tedavi için daha düşük dozda ilacın kullanımını sağlarlar (62, 63, 64).

Nanoteknolojideki son gelişmeler, 1–1000 nm arasında değişen boyutlardaki nanopartiküllerin; küçük boyut, artmış ilaç birikimi, artmış terapötik etkiler, hücre veya doku bariyerini geçebilme ve kontrollü ilaç salınımı gibi optimize edilmiş fizikokimyasal ve biyolojik özelliklere sahip ilaç taşıyıcılar olarak kullanılabilceğini göstermiştir (63).

İlaç taşıyıcı sistemler; kanser, kardiyovasküler hastalıklar, solunum yolu hastalıkları, hipertansiyon, AIDS, diabet gibi pek çok hastalığın tedavisinde kullanılan geleneksel ilaçlarla birlikte gelen yan etkilerin giderilmesinde önemli rol oynayabilirler (65).

Polimerik nanotaşıyıcılar, dendrimerler, miseller, niozomlar, lipozomlar, katı lipid nanoparçacıklar, metal nano parçacıklar, karbon nanotübler, nanoküreler, nanokapsüller, nanosüngerler, nanoemülsiyonlar, nanosüspansiyonlar ve nanojeller klinik kullanımda ya da araştırma aşamasında olan nano taşıyıcı sistemlerdir.

Lipozomlar pek çok avantajları nedeniyle kanser başta olmak üzere çeşitli hastalıkların teşhis ve tedavisinde kullanılmak amacıyla üzerinde en çok çalışma yapılan ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olmuştur.

2.2.1. Lipozom

İlaç taşıyıcı sistemlerin ilk örneklerinden olan lipozomlar literatürde ilk kez 1965 yılında Dr Alec D. Bangham tarafından yayımlanmıştır(66). Lipozomlar, ilaç, diyagnostik bileşikler veya genetik materyalin enkapsüle edildiği doğal veya sentetik fosfolipit lipit çift tabakasından oluşan küresel veziküllerdir. Hidrofobik ilaçlar lipit çift katmanları içinde tutulurken, hidrofilik ilaçların içteki sulu fazda tutulma eğiliminde olması bu yapının benzersiz olmasını sağlar. Bu sırada eğer in vivo stabilite problemi varsa ilaç, plazma enzimleri tarafından bozunmadan korunur veya ilaç toksisitesi yüksek olan bir ilaç ise sağlıklı hücreler ilacın toksisitesinden korunur. Lipozomlar, kontrollü ilaç salımını sağladıkları için yan etkilerin azaltılmasında avantaj sağlarlar. Ayrıca ilaç içeren lipozomlar füzyon veya endositoz mekanizmaları yoluyla ilaçları hücre içine taşırlar.

Ayrıca lipozomların yüzeyi çeşitli polimer veya hedeflendirme molekülleri ile modifiye edilebilirler. Bir lipozomun fiziksel ve kimyasal özellikleri (boyut, geçirgenlik, yük yoğunluğu ve sterik engelleme vb.) lipozomu oluşturan fosfolipidler tarafından belirlenir (65).

Genel olarak lipozomlar, tek katmanlı (unilameller) ve çok katmanlı (multilameller: MLV 100nm – 20 µm) olarak sınıflandırılır. Tek katmanlı lipozomlar küçük boyutlu (SUV: small unilameller vesicles: küçük tek katmanlı veziküller: 25- 100 nm) ve büyük boyutlu (large unilameller vesicles: LUV: büyük tek katmanlı veziküller: 100- 1000nm) olmak üzere ikiye ayrılır. SUV ve LUV tek bir lipid tabaka ve büyük sulu katmandan oluşur ve hidrofilik ilaçları hapsedebilirler. MLV' ler 14 katmana kadar lipid tabakadan oluşmasına rağmen limitli sulu alandan oluşur ve hidrofobik ilaçların yüklenmesi için daha uygundur (67).

Lipozomlar nanometreden mikrometreye kadar çok çeşitli boyutta hazırlanabilirler. Son zamanlarda nanoboyutlu hazırlanan lipozomlar nanolipozomlar olarak da isimlendirilmektedirler.

Lipozomal ilaç taşıyıcı sistemler diyagnostik ajanlardan terapötik ilaçlara kadar değişik grupta yer alan ilaçların uygulanmasında kullanılmaktadır. Antikanserojen ilaçlarda bunlardan biridir. Doksorubisin, daunorubisin, annamisin, sisplatin türevleri, vinkristin, paklitaksel, kamptotesin türevleri, 5 florourasil türevleri ve retinoidler

lipozomlara hapsedilmiş ve çeşitli tümörlerin tedavisindeki kullanımları araştırılmıştır (68-72).

Piyasada Doxil (Caelyx), DaunoXome, Myocet, AmBisome gibi birçok lipozomal ilaç salım sistemleri bulunmaktadır. En çok kullanılan lipozomal ilaç salım sistemi doksorubisin yüklü Doxil (Caelyx)' dir. Yumurtalık kanseri, meme kanseri ve Kaposi sarkomunun tedavisinde neredeyse tamamen serbest doksorubisinin yerini almıştır. Doxil'in dış yüzeyinin PEG kaplanmış olması, eski nesil lipozomal salım sistemlerinden ayrılmasının başlıca nedenidir. Bu sayede lipozomların kan dolaşımında bağışıklık sistemi tarafından algılanıp saldırıya uğraması önlenerek kanda daha uzun süre dolaşması sağlanır. Serbest doksorubisin tedavisindeki en büyük sorunlardan birisi olan kardiyotoksitenin Doxil tedavisinde öne çıkmaması yan etkilerin azaldığının göstergesidir (73).

2.2.1.1. Lipozomların Avantaj ve Dezavantajları

Lipozomların avantajları yanında dezavantajları da bulunmaktadır. Üretim maliyetinin yüksek olması, hapsedilmiş ilaç veya molekülün sızıntı oluşturabilmesi, fosfolipit yapının bozulabilmesi, fiziksel ve kimyasal kararsızlıktan dolayı raf ömrünün kısa olması ve bazı ilaçlar için enkapsülasyon veriminin sınırlı olması lipozomun dezavantajları arasında iken; ilaç biyodağılımında değişiklikler sağlayarak ilacın etkinliği ve terapötik etkilerini arttırması, ilaç stabilitesini arttırması, biyolojik olarak uyumlu olmaları, biyolojik olarak parçalanabilmeleri, enkapsüle ilacın toksisitesini azaltmaları, ilacın aktif yada pasif olarak hedeflenmesini sağlamaları, bileşiminde kullanılan maddelerin toksik olmamaları, esnek ve non-immunojenik olmaları (64) ve ilacın kan akımında daha fazla süre kalmasını sağlaması lipozomların avantajları olarak sayılabilir (65, 67, 74, 75).

2.2.1.2. Lipozomların Hedeflendirilmesi

İlaç hedeflendirme fikri '*sihirli mermi*' (magic bullet) kavramından yola çıkılarak yaklaşık yüzyıl önce Paul Ehrlich tarafından ortaya atılmıştır. Sihirli mermi kavramı hedefi tanımak ve bağlanmak gibi iki komponentten oluşan bir kavramdır. Günümüzde kullanılan ilaçlarda en sık yaşanan problemlerin başında ilacın vücuda verildikten sonra tüm dolaşımında yayılması ve patolojik organ ya da hücrelerde yeterli ilaç

konsantrasyonuna ulaşamaması gelir. Genelde ilaçlar vücutta eşit olarak dağılırlar. İlaçlar etki alanına ulaşmak için diğer organ, hücre ve hücre içi kompartmanlar gibi pek çok biyolojik bariyeri aşmak zorundadır. Belirli bir vücut kompartmanındaki ilacın gerekli olan tedavi edici konsantrasyona ulaşması için ilacın yüksek konsantrasyonda uygulanması gerekir. Bu ilacın büyük kısmı ilgili organ yerine normal dokularda harcanır özellikle sitotoksik ve antijenik ilaçlarda bu nedenle yan etki görülebilir. İlaç hedeflendirme bu problemin üstesinden gelmek için uygulanan çözüm yollarından biridir. Genel anlamda ilaç hedeflendirme, ilacı hedef organ ve dokuda toplayabilme yeteneğidir. Bu koşullar ideal olarak ilacı hedef organ ve dokuda en yüksek seviyede toplayarak normal doku ya da organlarda minimum ilaç konsantrasyonu sağlayarak gerçekleştirilir. İlaç hedeflendirme ile ilaç yönetim protokolü basitleştirilir, tedavi için gerekli ilaç miktarı azaltılır, tedavi maliyeti azaltılır, hedef dışındaki organ yada dokularda negatif bir etki olmadan tedavi alanındaki ilaç konsantrasyonu artırılır (76).

İlacın etki bölgesinde ve istenen hızda açığa çıkması ile en uygun etkileşme sağlanırken, etkin maddenin dozunun azaltılması ve sadece hedef organda etkileşim ile sınırlandırılması ilaçları seçici olarak hedeflendirmenin iki önemli nedenidir. Bu iki özellik sağlandığında; ilacın daha az dozda daha çok etkili olması ve ilacın yan etkilerinin daha az olması sağlanır.

2.2.1.2.1. Hedeflendirme Mekanizmaları

İlaç hedeflendirilmesi etkin maddenin etki veya absorpsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesi ile ilaç konsantrasyonunun bu bölgede diğer bölgelere oranla artırılması yöntemidir. Böylece etkin maddenin etkileri artar, dozu ve yan etkileri azalır. Taşıyıcı kullanarak ilaç hedeflendirme pasif, aktif ve birleşik hedeflendirme gibi yaklaşımlarla gerçekleştirilebilir (77).

Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirmede genel olarak doğal fizyolojik ya da pasif faktörler ile partiküllerin belirli bölgelere taşınması sağlanır. Taşıyıcı sistemin boyutu, hedeflendirmedeki etkin özelliklerden birisidir(77).

Bir diğerk faktör, lipozomun yüzey özellikleridir. Lipozomun yüzeyinin hidrofilik ya da hidrofobik olması kan dolaşımındaki davranışını belirlemektedir. Yüzey hidrofobisitesi arttıkça kanda makrofaj ve nötrofiller tarafından fagasitozunu kolaylaştırmak için bulunan antikor veya kompleman gibi immün sisteme ait bileşenler ile opsonin gibi kandaki proteinlerin etkileşmesi hızlıca gerçekleşir ve temizlenir. Bunun engellenmesi için polietilen glikol (PEG) ve polietilen oksit (PEO) gibi hidrofilik polimerlerle kaplanması kanda kalım süresi arttıracak dolayısı ile hedefe ulaşma olasılığını arttıracaktır(77).

Artmış geçirgenlik ve tutulum (EPR: Enhanced permeability and retention effect) etkisi, pasif hedeflendirmenin temelidir denilebilir. Tümör dokusu belli bir boyuta ulaştığında çevresinde bulunan normal damarlanma, daha fazla çoğalması için gerekli olan oksijen gereksinimini sağlamak için yeterli gelmeyerek hücreler ölmeye başlar. Böylece çevredeki kılcal damarlardan yeni kan damarlarının tomurcuklanmasını tetikleyen büyüme faktörleri salgırlar. Anjiyogenez olarak bilinen bu süreç, normal damar yapılarının bazal membranına sahip olmayan ve kesikli epitel yapıya sahip, düzensiz yeni kan damarlarının gelişimini destekler. Kılcal damarlarda ortaya çıkan boşluk (fenestrations), tümör tipine, çevresine ve lokalizasyonuna bağlı olarak 100 ila 780 nm arasında değişen boyutlara ulaşabilir. Kan elemanları ve makromoleküller normal damarlarda olmayan bu boşluklara geldiğinde çok az engelle karşılaşarak tümöre geçiş yapmaları, EPR etkisinin artmış geçirgenlik bölümünü temsil eder. Normal dokularda, hücre dışı sıvı sürekli olarak ortalama 0.1-2 µm/s akış hızında lenfatik damarlara boşaltılır. Bu, hücreler arası sıvının sürekli boşaltılmasına, yenilenmesine ve dolaşıma geri dönüştürülmesine izin verir. Tümörlerde ise lenfatik fonksiyon kusurlu olduğu için hücreler arası sıvı dolaşıma geri dönüştürülemez. Ancak 4 nm'den küçük moleküller kan dolaşımına geri yayılabilir ve yeniden emilebilir. Büyük çaplara sahip makromoleküller veya Np'lar kan dolaşımına geri yayılamazlar. Bu nedenle, damarlarda bulunan boşluğa ulaşan Np'lar etkili bir şekilde temizlenmez ve tümörde birikirler. Bu özellik, EPR etkisinin artmış tutulum bileşenini temsil eder (78,79).

Genelde 100 nm'nin altındaki taşıyıcıların patolojik dokuya geçtiği düşünülür. Çoğu periferel insan tümörünün etkili gözenek boyutunun, 200 nm ila 600 nm arasında değiştiği yani ortalama 400 nm olduğu bildirilmiştir (79). EPR etkisi 40-400 nm

çapındaki taşıyıcı sistemlerde veya makromoleküllerde gözlenebilir. Nanotaşıyıcılarda EPR etkisi, nanoparçacığın yüzey yükü, boyutu ve şeklinden etkilemektedir (78,79).

Aktif Hedeflendirme

İlaç taşıyıcı sistemin doğal dağılım modelinin değiştirilmesiyle belirli organ doku ya da hücelere yönlendirilmesi olarak tanımlanan aktif hedeflendirmede kimyasal (pH, reaktif oksijen türleri, proteazlar) ve fiziksel (ısı, magnetik alan, ultrason) faktörlerden ya da hücreye spesifik bağlanma (ligand aracılıklı hedeflendirme) gibi stratejilerden yararlanılır. Lipozom yüzeyindeki hedeflendirme moleküllerinin yoğunluğu, lipozomun büyüklüğü, şekli, yüzey ve ligand yükü, aktif hedeflendirmeyi etkileyen faktörlerdendir. Aktif hedeflendirmede ligandlar ve stimülasyon ile aktivasyona bağlı hedeflendirme yapılabilir. Stimülasyon ile aktivasyona bağlı hedeflendirme iki mekanizma ile elde edilebilir. Bunlardan ilki pH ve enzim aracılıklı hedeflendirme gibi internal hedeflendirme iken ikincisi sıcaklık, manyetik nanotaşıyıcılarla ve ultrason gibi eksternal hedeflendirme yardımıyla hedeflendirme stratejileri bulunmaktadır (77).

Ligandlar hedeflenmek istenen hücre, doku veya organlara özel reseptörlere göre seçilen yapılardır. Lipozomlarda kullanılan bazı ligantlar; Folat/Folik asit (FA), antikor fragmanları, glikoproteinler, peptitler, vitaminler ve oligonükleotit aptamerleridir (77).

Folat Hedeflendirme

Folik asit son zamanlarda, nanotaşıyıcılara kolaylıkla bağlandığı ve normal dokulara oranla tümör hücrelerine daha fazla afinitesi olduğu için ilaç taşıyıcı sistemlerde hedefleme ligandı olarak sıklıkla kullanılmaktadır (). Folat reseptörleri bazı over, meme, akciğer, kolon, böbrek ve beyin tümörlerinde aşırı eksprese edilir. Sedef hastalığı, Crohn hastalığı, romatoid artrit ve ateroskleroz gibi enflamatuvar hastalıkların bir göstergesi olan makrofajlarda Folat reseptörlerinin aşırı ekspresyonu nedeniyle, Folat aracılı hedefleme enflamatuvar hastalıkların tedavisi için ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde de kullanılmıştır. Folat modifiye lipozomlar ile yapılan çalışmalarda, hedeflendirilmiş lipozomların hedeflenmemiş lipozomlardan daha üstün oldukları açıkça gösterilmiştir (81-83).

Folat, tümör dokularını seçici olarak hedeflemek için misel, lipozom ve nanoküreciklere kovalent olarak kolaylıkla konjuge edilebilir (65,81,84-88).

Folat reseptörlerinin üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar FR_{α} , FR_{β} ve FR_{γ} 'dir. α ve β varyantları, hücre zarına glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlayıcıları aracılığıyla bağlanırken, FR_{γ} sadece hematopoietik hücrelerde bulunur ve GPI bileşeninden yoksun olup serbestçe çözünebilir hale gelir. FR_{β} izoformu, FR_{α} ile homolojisinin yaklaşık % 70'ini paylaşır ve her ikisi de Folat için benzer bir afiniteye sahiptir. FR_{β} , inflamatuvar ve otoimmün hastalıklara katılan aktive edilmiş miyeloid hücreleri (esas olarak monositler ve makrofajlar) üzerinde düzenlenir. FR_{β} izoformu, karaciğer, böbrek, deri, akciğer, kan ve yumuşak dokudakiler dahil olmak üzere birçok kanserin tümörle ilişkili makrofajlarında da tespit edilmiştir. Bu makrofajlar solid tümörlere nüfuz edebilir ve $CD8^{+}$ T hücrelerinin baskılanması ve proanjiyojenik faktörlerin salgılanmasıyla metastazlarını ve büyümelerini artırır. Sonuç olarak FR_{β} izoformu kanser tedavisinde sitotoksik maddelerin seçici olarak verilmesi için potansiyel bir hedef olabilir (82).

FR_{β} bazı kanser türlerinde bulunmasına rağmen, FR_{α} izoformları hedefe yönelik kanser tedavisinde tüm folat reseptörlerinin izoformları arasında en büyük potansiyele sahip olanıdır. FR_{α} epitel kaynaklı yumurtalık, meme, akciğer, böbrek kanserinde normal hücrelerden 100-300 kat daha fazla bulunur. Folat, folat reseptörüne bağlanarak beyinde koroid pleksus ve böbreklerde filtrelenir. Ayrıca FR_{α} sağlıklı hücrelerin sadece en üst yüzeyinde bulunduğu için dolaşımdaki folik asitin bu reseptör ile karşılaşmasını engeller. Böylece hücreler arasındaki bağlantılar küçük moleküllerin epitelden geçmesini engeller. Fakat tümör oluştuğu zaman hücrenin tüm mimarisi değişir, damar sistemi dağınık hale gelir ve hücreler arası bağlantılar kaybolur. Böylece endotelial hücreler arasında daha zayıf bir ilişkiye yol açar. Sonuç olarak, FR_{α} hücreyel yerleşimini kaybeder ve tüm hücre yüzeyi üzerinde rastgele dağılır. Bu fenomen FR_{α} 'yı kan dolaşımındaki ilaç konjugatlarına erişebilir kılmaktadır. Bu reseptörlerin hücreyel yerleşim değişikliği folik asit gibi okside folatların FR_{α} 'ya yüksek bağlanmasına sebep olup, hedeflendirme için folik asit ile ilaç konjugatlarının geliştirilmesine yol açmıştır (81, 82).

Folik asit, immünojenik değildir, düşük maliyetlidir, yüksek stabiliteye ve doku geçirgenliğine sahiptir, düşük moleküler ağırlığa sahiptir ve çeşitli organik moleküllere, antikorlara ve nanopartiküllere kolaylıkla konjuge edilebilir.

Terapi esaslı FR_{α} -hedefli modüller tarafından aracılık edilen hücre ölümüne ek olarak, FR_{α} 'nın floresans, pozitron emisyon tomografi (PET) ve tek foton emisyon tomografi (SPECT) görüntülemeye biyobelirteç olarak kullanılmıştır (82).

Birleşik Hedeflendirme

Aktif ve pasif hedeflendirmenin birlikte kullanıldığı birleşik hedeflendirmede taşıyıcı sistem ilk olarak EPR etkisi ile istenen bölgede toplanırken, istenen bölgeye özgü faktörlere bağlı olarak ilacın hücre içine alınması gerçekleştirilir(77).

2.3. Nanopartikülle Arttırılmış X-Işını Tedavisi

Nano malzemelerin radyoterapide radyoduyarlaştırıcı olarak kullanımına Nanopartikülle Arttırılmış X-Işını Tedavisi (NEXT = *Nanoparticle Enhanced X-ray Therapy*) denilmektedir (3, 4, 5). Derin yerleşimli kanserlerin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen bu yeni tedavi yaklaşımında, radyoduyarlaştırıcı özelliği olan nanopartiküller (örneğin; AuNp, KN) ve fotoduyarlaştırıcılarla konjuge edilirler ve X ışını uygulaması ile birlikte kullanılırlar. X-ışını uygulaması ile nanopartikül uyarılır eş zamanlı olarak uyarılan nanopartikülden fotoduyarlaştırıcıya enerji geçişi olur ve fotoduyarlaştırıcı aktive edilir. Bu yeni tedavi yaklaşımının bir çok avantajı vardır (5).

Bu avantajlar;

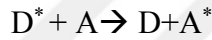
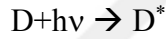
- İki etkin tedavi yöntemi birleştirilmiş olması,
- Derin yerleşimli tümörlerin tedavisi için etkili bir yöntem olması,
- İyonlaştırıcı radyasyonun sağlıklı dokulara etkisini azaltması ve
- Tedavinin basit, etkili ve görece daha az maliyetli olması olarak sıralanabilir.

KN'nin kendine özgü özellikleri, bu nanopartiküllerin pek çok biyolojik araştırmada kullanılmasına olanak tanımaktadır. KN'nin kullanımında en yeni gelişmelerden birisi KN temelli Förster Rezonans Enerji Transferi (FRET), Biyoluminesans Rezonans Enerji Transferi (BRET) ve Kemilüminesans Rezonans Enerji Transferi (CRET) gibi enerji transfer sistemleridir. KN'ler FRET'te verici olarak davranırken BRET ve CRET'te enerji alıcı olarak davranırlar (89).

FRET, uyarılmış vericiden (donör), alıcıya (acceptor) belirli bir mesafede (Förster yarı çapı) nonradiatif dipol-dipol etkileşimi ile enerji transferi olarak tanımlanır. 50 yıl önce tanımlanmış olan FRET pek çok biyomedikal araştırma ve ilaç keşfinde kullanılmıştır. Nanometre boyutlarında mesafelerde ve mesafe değişimlerinin ölçümünde hem in vivo hemde in vitro olarak kullanılan birkaç yöntemden biridir. FRET moleküler seviyede etkileşimlerin araştırılmasında kullanılmaktadır (90).

2.3.1. FRET Prensibi

FRET’de bahsedilen enerji transferi salınan bir uyarılmış floroforun, kendisiyle aynı rezonans frekansında salınan bir dipol ile enerji değişimidir. Buradaki rezonans enerji transferi bir çift osilatörün davranışı gibidir. Radiatif enerji transferi örneğin optik özellikleri ve fiziksel ebatlarına dayanır ve fotonun tekrar soğurulması ve yayınımlı gerekir. Nonradiatif mekanizmada; rezonans enerji transferi alıcı-verici çiftiyle ilgili yapısal bilginin önemli miktarını sağlamaktadır (90).



A: alıcı, D: verici

2.3.2. FRET Gerçekleşme Kriterleri

FRET gerçekleşmesi için;

- Vericinin yayılım (emission) spektrumu ile alıcının soğurulma (absorption) spektrumu örtüşmeli,
- Verici ve alıcı birbirine çok yakın olmalı (1-10nm),
- Verici ve alıcının geçiş dipol yönelimleri birbirine paralel olmalı,
- Vericinin floresans süresi FRET’in olması için yeterli sürede olmalıdır.

Förster, FRET işleminin etkinliğinin (E_{FRET}) verici ve alıcı çifti arasındaki uzaklığın altıncı katı ile ters orantılı olduğunu belirtmiştir (Eşitlik 1).

$$E_{\text{FRET}} = R_0^6 / R_0^6 + r^6 \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 1})$$

R_0 ; Vericiye transfer edilen verici uyarma enerjisinin yarısının olduğu yerdeki Förster yarıçapı

Förster yarıçapı, R_0 enerji transfer etkinliğinin %50 olduğu uzaklık, spektral olarak örtüşen verici-alıcı çiftinin integrali (J) ve A^0 verici-alıcı çifti arasındaki uzaklık olarak tanımlanmaktadır (Eşitlik 2).

$$R_0 = 9.78 \times 10^3 (n^4 f_d . J)^{1/6} A^0 \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 2})$$

R_0 vericinin floresans kuantum verimine (f_d), solüsyonun refraktif indeksine (n), her bir molekülün dipol açısall yönelimine (K^2) ve alıcı-verici çiftinin spektrumlarının örtüşmesine bağlıdır (90).

KN'ler, FRET vericisi olarak;

- Geniş soğurma spektrumuna,
- Büyük soğurma tesir kesitine,
- Dar ve ayarlanabilir büyüklük ayarı (size tunable) yayılım spektrumuna,
- Uzun floresans süresine,
- Parlak ve kararlı yayılıma,
- Büyük ve etkin Stokes kaymasına (shift) sahip olmaları bakımından harika fotofiziksel özelliklere sahiptirlerdir.

KN'nin nanopartikül yapısı büyük, çoklu biyomoleküllerle bağlanmayı kolaylaştıran ve biyokimyasal olarak ulaşılabilir yüzey alanına sahiptir (91).

Karotki ve arkadaşları (92), fotoduyarlaştırıcıların klinik olarak etkili olabilmesi için Photofrin'den 2-3 kat daha büyük çift-foton absorpsiyon düzeyi oluşturması gerektiğini bildirmişler ve bunu gerçekleştirmenin yollarından birisini duyarlaştırıcıların KN'ler gibi nanopartiküllerle kombine edilmesi olarak bildirmişlerdir. Bu sayede duyarlaştırıcı indirekt olarak yakın bölge kızılötesi fotonu ile uyarılmaktadır (92).

2.3.3. KN'de FRET Zorlukları

KN'de, FRET'in kullanımında farklı zorluklarla karşılaşılabilir (13, 93). FRET etkinliğini engelleyebilecek olan bu sınırlamalardan ilki boyut sınırlamasıdır. KN'ler moleküler boyalardan büyüktür. Bu da alıcıya çok fazla yaklaşmasını engeller. Yani, FRET oluşması için müsaade edilen minimum mesafe nanokristalin yarıçapından büyüktür. Bu yarıçap kırmızı ışık yayan KN'ler için daha büyük olur. Dalga boyu arttıkça bu limit daha da sınırlanır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için iki strateji kullanılmaktadır. Birincisi blok kopolimer ya da fosfolipit misellerle enkapsüle etmektir. İkincisi iki reaktif fonksiyonel gruplu ligandlarla doğal organik kabuğu değiştirmektir. Kabuk değişimi genelde küçük boyutlu nanokristaller üretmek için sunulsa bile, bu iki yaklaşım genelde nanoparçacığın etkin büyüklüğünü artırır.

KN'nin yarıçapını arttıran etkenlerden bir tanesi de raf ömrü ve pH stabilitesidir (93). Bu durum KN ve fotoduyarlaştırıcı arasındaki mesafeyi arttırarak FRET etkinliğini düşürür (58).

2.3.4. KN-Fotoduyarlaştırıcı Konjugasyonu

FDT'de ışık kaynağı olarak kullanılan nanopartiküller, FRET'in gerçekleşmesi için yüksek lüminesans verimine sahip olmalıdır. Örneğin lüminesans nanopartiküller kullanılıyorsa, nanopartiküller, X ışını ya da radyasyonun diğer formları ile uyarıldığında güçlü bir şekilde ışın yaymalıdır. Ayrıca nanopartikül; fotoduyarlaştırıcıya kolayca bağlanmalı, toksik olmamalı, suda çözünebilen ve biyolojik çevrede stabil olmalıdır. Daha fazla radyasyon durdurma gücüne (stopping power) ve yüksek radyasyon soğurma katsayısına sahip oldukları için yüksek yoğunluklu olmalıdır. Daha küçük Stokes kayma değerlerine sahip nanopartiküller daha büyük lüminesans verimi gösterdiklerinden dolayı tercih edilmelidirler (94).

Medintz ve Mattoussi enerji alıcı-verici KN-fotoduyarlaştırıcı konjugatları için standart tanımlar yapmışlardır (93,33). İlk KN-fotoduyarlaştırıcı konjugatının tanımlanmasını takiben çeşitli araştırmacılar bu alanda CdSe, CdSe/CdS/ZnS, CdSe/ZnS ve CdTe KN'lerini enerji verici olarak ve ftalosiyeninler, porfin, organik boyalar ve inorganik boyalar gibi çeşitli kromoforları enerji alıcı olarak pek çok araştırmada kullanılmıştır. KN-fotoduyarlaştırıcı konjugatı enerji alıcısına bağlı olarak KN-

ftalosiyeninler, KN–porfinler, KN–organik boyalar, KN–inorganik boyalar olarak sınıflandırılabilir (33).

Kanser tedavisinde hem KN hem de fotoduyarlaştırıcı kullanımın avantaj ve kısıtlamaları bulunmaktadır. Örneğin KN'nin yakın bölge kızılötesi soğurması, büyük iki foton soğurma tesir kesiti, geniş soğurma bandı ve fotostabilitesi gibi özelliklerinden dolayı radyoterapi ve FDT için ideal olduğu söylenebilirken, konvansiyonel fotoduyarlaştırıcıların dar soğurma bandı, zayıf fotostabilitelerinin olması, görünür bölge ışınlarını soğurması ve küçük iki foton soğurma tesir kesitinden dolayı FDT için KN'lere göre daha az ilgi çekici olduğu belirtilmektedir. Öte yandan fotoduyarlaştırıcı tarafından üretilen ROS miktarı %75 civarında olmakla birlikte, KN'nin buna nazaran %5'lik bir oranla daha düşük üretime sahip olmasından dolayı KN ve FD'nin avantaj ve kısıtlamaları birbirini tamamlamaktadır. Dolayısıyla KN-fotoduyarlaştırıcı konjugatı kullanımının avantajlı olduğu belirtilmektedir (33).

Samia ve arkadaşları (95), CdSe KN'leri ve silikon ftalosiyenin (Pc4) ile nonkovalent olarak hazırladığı konjugasyonda 1O_2 üretiminde FRET tabanlı konsepti çalışın ilk grup olmuştur.

KN-FD konjugasyonu FRET'den dolayı uyarılmayı artırır (115,58). Bu metod KN'nin yalnızken ürettiği 1O_2 'e nazaran daha etkili bir biçimde 1O_2 üretimine sebep olur. KN ile fotoduyarlaştırıcının konjugasyonu durumunda KN'nin yayılım spektrumu ile FD'nin soğurulma spektrumunun uyumlu olması gerekir. Ayrıca KN-FD'nin birbirine yakın olması (1-10nm) ve FD-KN konsantrasyon oranının 20:1 olması gerektiği vurgulanmaktadır (58,96).

Tsay ve arkadaşları (57), iki FD (Ce6, rose bengal) ve peptit kaplı KN ile yaptıkları çalışmada oldukça yüksek 1O_2 verimi elde ettiklerini belirtmişlerdir. KN'nin, tedavinin yanısıra aynı zamanda görüntüleme için de kullanılabileceğini belirtmişlerdir (57,58).

Samia ve arkadaşlarının (95) yaptığı çalışın, KN (CdSe) ile Pc4 ve oksijen konjugasyonunun spektral etkileşimini inceleyen ilk çalışmadır. Çalışın sonucunda; KN'nin Pc4'ü uyarın dalga boyu: 568nm, Pc4'ün direkt olarak uyarılın dalga boyu 550 ila 630 nm iken, Pc4 + KN 488nm de gözlenmiştir. Dolayısı ile konjugasyonun, fotoduyarlaştırıcının yalnız başına uyarılamayacağı bir dalga boyunda uyarılmasını

sağladığı bildirilmiştir. Konjugasyonun da %77'ye varan FRET etkinliği tespit edilmiştir. KN'nin boyutunun ayarlanması ile soğurulma özelliklerinin değiştirilebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca KN'nin kendi başına FDT ajanı olarak kullanılabilmesi; ancak Pc4'ten daha düşük kuantum veriminde olduğunu (%5-%43) belirtmişlerdir (95).

Peptit kaplı KN (yeşil ve kırmızı ışık yayan CdSe/CdS/ZnS) ve fotoduyarlatıcı (Rose Bengal ve Ce6) konjugasyonu ile yapılan çalışmada yüksek oranda 1O_2 ürettiklerini belirtirken, kırmızı KN ile Ce6'nın 1:26 oranında kovalent bağlanıp 532 nm dalga boyunda ışık ile uyarılarak elde edilen 1O_2 veriminin, yeşil KN ile rose bengal'in 1:1 oranında kovalent bağlanıp 355 nm dalga boyunda ışık ile uyarılarak elde edilen 1O_2 veriminden daha fazla olduğunu belirtmişlerdir (57).

2.3.5. KN-Fotoduyarlatıcı Konjugatlarının Radyoterapide Kullanımı

Kanser tedavisinde iyonlaştırıcı radyasyon, radyoduyarlatıcı nanopartikül ve fotoduyarlatıcıların birlikte kullanılması fikrinin ilk ortaya atıldığı çalışma Chen ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Bu tedavi yaklaşımında X ışını ile ışınlanan nanopartikül sintilasyon ya da sürekli luminesans yayarak fotoduyarlatıcıyı aktive eder ve sonuçta 1O_2 üretimi gerçekleşmiş olur. 1O_2 den dolayı da kanser hücreleri ölür. Bu yöntemde FDT, radyoterapinin etkinliğini artırmak için kullanılan bir yöntemdir. Çalışmada radyoterapi ve FDT'nin kombinasyonu ile tek bir enerji kaynağı ile aktive edilerek, daha düşük dozlarla benzer veya daha iyi terapötik sonuçların elde edilebileceği belirtilmiştir (94).

Kanser hücrelerinin hayatta kalma özelliğini sağlayan apoptozisin olmayışı, kanser tedavisinde bu özel hücre ölüm mekanizmasını yeniden kurmayı önemli bir amaç haline getirmiştir. RT'de hücre ölümünün nedeni DNA sarmalında meydana getirdiği kırıklar vasıtasıyla mitotik hücre ölümü yoluyla olurken nadir olarak apoptozis gözlenir. Tümör hücrelerinin DNA kırıklarına bağlı hasarı onarma kabiliyetleri, RT sonrası hastada lokal kontrolü düşüren radyasyon direncine sebep olmaktadır. RT'nin etkinliğini sınırlayan diğer bir parametre de radyasyonun neden olduğu hücre ölümünün tümör hücrelerinin hücre siklusuna bağlı olmasıdır. Işınlanma sırasında hücreler G1/S fazında radyasyona dirençli olurken G2/M fazında daha duyarlı olurlar. Dolayısıyla FDT ile apoptozun uyarılmasıyla, radyasyonun yol açtığı mitotik hücre ölümünün birleştirilmesi,

lokal kontrolü artıracak bir parametredir. KN (CdSe/ZnS) ile fotofrin konjugasyonunun, 6MV X ışını ve H460 hücre kültürü üzerinde yapılan bir çalışmada; konjugasyon ile yapılan tedavide apoptozis gözlenirken sadece radyasyon ile yapılan çalışmada gözlenmediği belirtilmiştir. Tek başına radyasyon ile yapılan tedaviye kıyasla konjugasyon ile yapılan radyoterapide dört-beş kat daha fazla hücre ölümü olduğu bildirilmiştir. Çalışmada nanopartiküllerin hücre çekirdeğinden ziyade sitoplazma içine alındığı ve endositozla FDT'nin birincil hücresel hedefi olan lizozomlara alındığı belirtilmiştir. 6 MV X-ışını ile yapılan ışınlama sonucunda konjugasyondan $^1\text{O}_2$ üretiminin doza bağlı olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışma, konjugasyon ve radyasyon ile yapılan tedaviyle elde edilen artmış hücre ölümünün basit doz arttırımından elde edilen etkiden farklı olduğunu bildiren ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır(94).

Radyoterapide geleneksel kimyasal radyoduyarlayıcılarla kıyasla konjugasyon kullanımının pek çok avantajları vardır. Bu avantajlardan bazıları şöyledir:

- Konjugasyonun uyarılmasıyla oluşan sitotoksite radyasyonun uyarması ile başlatılır.
- $^1\text{O}_2$ üretimi tekdüze bir şekilde artar.
- Radyoterapiden farklı olarak FDT'nin etkisi somatiktir.
- Hücre ölümü için belirli miktarda $^1\text{O}_2$ gerekir ve farklı zamanlardan tedavi birikmez.
- Toplam $^1\text{O}_2$ üretimi tipik FDT'den düşük olmasına rağmen, $^1\text{O}_2$ 'nin lokal konsantrasyonu konjugasyonun spesifik hücre içi dağılımından dolayı apoptotik hücre ölümünü tetikleyecek kadar yüksektir.
- Modern RT'de çeşitli cihaz ve tekniklerle yüksek radyasyon dozu tümöre yüksek bir doğrulukla uygulandığından konjugasyonun dağılımı tümör spesifik olmasa bile hedef doku ya da organda tümörü öldürmek için gerekli $^1\text{O}_2$ sağlanarak komşu organ ve dokular düşük giriş ve çıkış dozu almaktan korunur.

Bu şekilde yapılan tedavinin tek başına RT veya tek başına FDT'den avantajları şöyledir:

- Tek başına FDT'de kullanılan ışının dalga boyu derin yerleşimli tümörlere nüfuz etmek için yeterli değildir. Dolayısıyla X ışını kullanılırsa daha derin yerleşimli tümörlere ulaşılarak daha etkin bir tedavi elde edilir.

- Radyoterapi ve FDT kombine edilerek; bir tek enerji kaynağı (X ışını) ile aktive edilir.
- Daha düşük radyasyon dozu kullanılarak, benzer terapötik sonuçlar elde edilir.
- Tek başına FDT ya da radyoterapinin kullanıldığı sisteme göre, sistem daha basit ve daha ucuzdur (94).

Sintilasyon nanopartiküllerinin lüminesans verimi FDT etkinliğini arttırmada başlıca faktörler arasında gelir. X-ışınları uyarma enerjilerinin daha güçlü olmasından dolayı X-ışınlarının uyarması ile elde edilen luminesans, UV ışınları ile elde edilen luminesanstan 10 kat daha güçlüdür (94). Dolayısı ile daha fazla lüminesans FDT etkinliğini arttıracığından ışınlarının kullanılması çok daha fazla kanser hücresi ölümüne sebep olacaktır.

Yang ve arkadaşları (97) yaptıkları bir çalışmada KN (CdSe-ZnS) ve fotoduyarlatıcı (Photofrin) kovalent olarak bağlayarak konjugat oluşturmuş ve etkinliğini insan akciğer kanseri hücrelerinde incelemişlerdir. KN'nin foton yayılımının, kullanılan X-ışını doz hızı ile lineer orantılı olarak arttığı sonucuna varılmıştır. Ayrıca konjugasyon ve tek başına radyasyonunun kullanılması ile yapılan tedavi çalışmalarının sonuçlarını karşılaştırdıklarında, konjugasyon ile yapılan tedavinin, sadece radyasyon ile yapılan tedaviden %34±8 daha fazla hücre ölümüne sebep olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca tek başına KN, tek başına Photofrin ve konjugatın hücre ölümüne etkisi de araştırılmış ve tek başına KN olduğunda hücre ölümünde %8±10'luk bir artış, tek başına FD kullanıldığında ise %0,01±10'luk bir artış olduğu belirtilmiştir (97).

KN-fotoduyarlatıcı içeren ilaç taşıyıcı sistemlerle yapılmış literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. LaF₃: Ce³⁺/DMSO (dimetilsülfoksit) nanopartikülleri ve protoporphyrin IX (PPIX) içeren mikrokürelerle yapılan bir çalışmada 90 kV'lik X-ışınları ile ışınlama yapılmış ve sonuçta ışınlanan konjugasyonda LaF₃: Ce³⁺/DMSO dan PPIX'e enerji transferi olduğu ve kanser hücreleri için öldürücü olan ¹O₂ üretildiği tespit edilerek, sintilasyon nanopartiküllerinin konjuge fotoduyarlatıcılara ışık kaynağı olabileceği bildirilmiştir (98).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1,2-Distearil-Sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin-N-(Methoxy) (Polietilen Glikol)-2000 (Amonyum Tuzu) (PEG ₂₀₀₀ -PE)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2-Distearil-Sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin-N-[Folat(Polietilen Glikol)-2000] (Amonyum Tuzu) (DSPE PEG ₂₀₀₀ -Folat)	Avanti Polar Lipids, ABD
1,2-Distearil-Sn-Glisero-3-Fosfokolin (DSPC)	Avanti Polar Lipids, ABD
Absolut Etanol	Merck, Almanya
Amikon Filtre	Sigma, Almanya
CdSeZnS Amin Fonksiyonlu Kuantum Nokta	Sigma, Almanya
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Disetil Fosfat	Sigma, ABD
Dulbecco's Mem (Dmem) (Yüksek Glukoz) Besiyeri	Biochrom AG, İngiltere
Fetal Bovine Serum	Biochrom AG (İngiltere)
Fosfat Tamponu (PBS)	Sigma Chemicals, Almanya
Hidroklorik Asit (HCl) (%36-38)	J.T.Baker, Hollanda
Kalay Klorür Dihidrat	J.T.Baker, Hollanda
Klorin e6	Frontier Scientific, ABD
Kloroform	Riedel-de-Haen, Almanya
Kolesterol	Sigma, ABD
L- α -Fosfatidil Kolin (Soy) (Soy PC)	Avanti Polar Lipids, ABD
Penisilin/Streptomisin (100 IU/100 mg/mL)	Biochrom AG, İngiltere
RPMI-1640 Besiyeri	Sigma, ABD
Stearilamin	Sigma, ABD

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

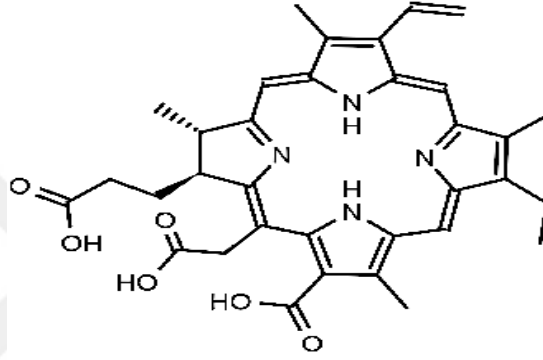
4T1 fare meme kanseri hücre hatları	ATCC, ABD
0.6 cc Farmer Tipi İyon Odası	PTW, Almanya
Analitik Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
Bloklama Cihazı, Shandon Histocentre3	Thermo Electron Corp., ABD
BT Simülatör	TOSHIBA Aquilion LB, ABD
18 Kromatografi Kolonu	HiChrom, İngiltere
Çalkalayıcı Su Banyosu	SBD50 LABNET, ABD
Dijital Çalkalayıcı	Schutzart DIN 40050-IP 20, Almanya
Diyaliz Selüloz Membran (MWCO=200, 400, 600nm)	Sigma-Aldrich, Almanya
Diyaliz Membran (MWCO= 10, 20, 30 KDa)	Spectrum Laboratories, Inc. (ABD)
Doku Takip Cihazı	Leica TP1020, ABD
Dynamic Light Scattering	Malvern Instruments, İngiltere
Ekstrüzyon Ünitesi	Lipex, Biomembranes, Kanada
Fluoresan Mikroskop	Sigma-Aldrich, Almanya
FT-IR Spektrometre	Perkin Elmer, ABD
Gama Kamera	GE Healthcare, ABD
Hücre Kültürü İnkübatörü	SAN40 CO ₂ incubator
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001, Almanya
Isıtma Bloğu	Nüve BH 250, Türkiye
Işık Mikroskobu	Olympus BX51, Japonya
Laminar Flow	Faster, BHG 2004, İtalya
Linear Hızlandırıcı	Elekta Versa HD, İsveç
Lineer Hızlandırıcı	Varian Clinac, ABD
Liyofilizatör (Heto Power Dry Pl 3000)	Thermo Fisher Scientific, ABD
Mikro PET/BT	SEDECAL, Superargus, İspanya
Mikrotom	Leica RM2255, ABD

Molibten-99/Tc-99m Jeneratörü	Monrol, Türkiye
Otomatik Boyama Makinesi	Leica Autostainer XL, ABD
Otomatik Kapatma Makinesi	Leica CV5030, ABD
Partikül Boyutu Analiz Sistemi	Malvern Instruments, İngiltere
PH Metre	Inolab pH metre, Türkiye
Polarize Işık Mikroskobu	Leica DM EP, Houston, TX, ABD
Polikarbonat Membran Filtre	Whatman, ABD
Rotavapor	Büchi; Karl Kolb, Almanya
RW-3 Katı Su Fantomu	PTW, Almanya
Santrifüj	Hettich (Almanya)
Su Banyosu	Büchi, İsviçre
Su Banyosu	GFL, Almanya
Tedavi Planlama Sistemi	Varian Eclipse TPS, Varian, Palo Alto, CA
Ultrasantrifüj	Hermle Z 323K, Almanya
Unidos Elektrometre	PTW, Almanya
UV-Vis Spektrometre	Agilent 8453, ABD
Vakum Sistemi	BÜCHI, İsviçre
Vakumlu Etüv	ShellLab (SL), İspanya
Vorteks	Heidolph Reax Top, Almanya
Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu (CTEM)	ODTÜ, Türkiye

3.3. Ce6 Üzerinde Yapılan Kontroller

3.3.1. Ce6'nın Yapısı

Ce6 açık formülü (7S,8S)-3-karboksi-5-(karboksimetil)-13-etenil-18-etil-7,8-dihidro-2,8,12,17-tetrametil-21H,23H-porfin-7-propanoik asit (Şekil 2) kapalı formülü $C_{34}H_{36}N_4O_6$, molekül ağırlığı 596,7 olan kristal toz formuna ikinci jenerasyon fotoduyarlaştırıcı maddedir.



Şekil 2. Ce6 açık formülü (99)

3.3.2. Ce6'nın UV-Vis Spektrumunun Elde Edilmesi

Kuantum Nokta (KN)-Ce6 konjugatı hazırlamadan önce KN'nin yaydığı elektromanyetik dalganın dalga boyu ile örtüşmesi yani uygun KN seçimi ve lipozom içine hapsedilen etkin madde miktarının tespitinde kullanılmak üzere Ce6'nın soğurulma pikini tespit etmek için UV- Vis Spektrofotometre kullanılarak Ce6'nın DMSO içindeki çözeltisi (1,5 $\mu\text{g/mL}$) kullanılarak 250-700 nm aralığında, UV-Vis Spektrumu çekilmiştir.

3.3.3. Ce6'nın Kalibrasyon Doğrusunun Hazırlanması

Ce6'nın DMSO çözeltisindeki kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Bunun için, Ce6'nın DMSO içindeki 20 $\mu\text{g/mL}$ stok çözeltisi kullanılarak farklı konsantrasyonda (0,5-1,0-1,5-2,0-2,5 ve 3,0 $\mu\text{g/mL}$) ve her bir konsantrasyon değeri için 6 farklı çözelti hazırlanarak 664 nm'de UV-vis absorbansları ölçülmüştür. Elde edilen absorbans değerlerinin ortalama ve standart sapmaları hesaplanmıştır. Konsantrasyona karşı

absorbans grafiklenerek kalibrasyon doğrusu çizilmiştir. Bu doğrunun denklemi ve R² değeri hesaplanmıştır.

3.4. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması

3.4.1. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması İçin Yapılan Ön Çalışmalar

3.4.1.1. KN Sentezi

Çalışmamızda kullanılmak üzere ilk olarak InPZnS kırmızı KN'leri sentezlenmeye çalışılmıştır. Trioktilfosfin (TOP=trioctylphosphine) kaplı InPZnS nanokristalleri sıcak enjeksiyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Üçlü boyunlu şişeye 0.45 mmol indiyum klorür (InCl₃), 2.2 mmol çinko klorür (ZnCl₂), 5mL (15 mmol) oleyamin yüklenerek, vakum altında, karışım 120 °C'ye kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta 1 saat tutulmuştur. Daha sonra sistem Argon gazı ile doldurularak, 180 °C'ye kadar ısıtılmıştır. Sistem belirtilen sıcaklığa ulaştığında 250µl Tris(dimetilamino)fosfin (tris(dimethylamino) phosphine = ((DMA)₃P) = PDMA) hızlı bir şekilde çözeltiye enjekte edilmiştir. 180 °C'de 20 dakika, nanoparçacıkların oluşması için etkili olmuştur.

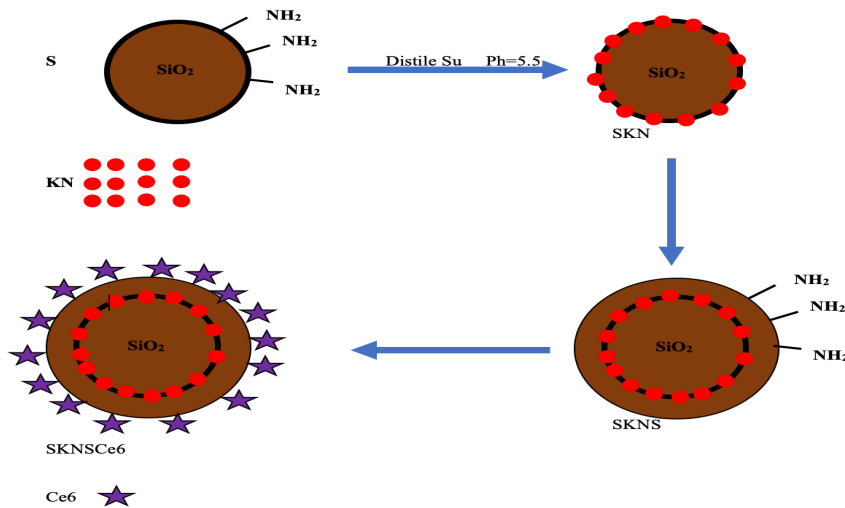
Çekirdek KN'nin (ana çözelti) üretilmesinden sonra, çekirdek KN'yi pasifleştiren ve koruyan kabuk yapısı oluşturmak için ilk önce, 2.2 M stok çözeltisinden 1 mL TOP-S (gloveboxta hazırlanan 10 mL TOP'da 0.72 g Sülfür) üç boyunluya enjekte edilmiş ve 40 dakika beklenmiştir. Daha sonra, sistem 200 °C'ye kadar ısıtılmış, 1 saat sonra 4 mL çinko stearat/ODE stok çözeltisi (Argon gazı altında üçlü boyunluda 6 mL oktadeken (ODE=Octadecene) içinde 2g çinko stearat ana çözeltiye enjekte edilmiştir ve 220 °C'ye kadar ısıtılmıştır. 30 dakika sonra, 2.2 M stok çözeltisinden 1ml TOP-S tekrar ana çözeltiye enjekte edilerek, sıcaklık 240 °C'ye arttırılarak 20 dakika bu sıcaklıkta tutulmuştur. Daha sonra, stok çözeltiden 2 mL çinko stearat/ODE ana çözeltiye ilave edilmiş ve 260°C'de 20 dakika tutulmuştur. 0.7 mL TOP-S (2.2 M) yüklendikten sonra, karışım 280 °C'de 20 dakika karıştırılmıştır. Sonunda 2 mL çinko stearat/ODE enjekte edilmiş ve 15 dakika sonra sistem oda sıcaklığına soğutulmuştur. Yıkama prosedürü, metanol kullanımı dışında yeşil KN sentezinde olduğu gibi uygulanmıştır

Hazırlanan KN'lerin saflaştırılması için yıkama işlemi uygulanmıştır. Bunun için ilk olarak hazırlanan KN'ler bir flakona aktarılarak, üzerine yarı hacimde hekzan

eklenmiştir; 1 dakika vortekslemenin ardından 15 dk 5000 rpm’de santrifüjlenmiş ve süpernatant stok solüsyonu diğer flakona alınmıştır. Bu adımlar KN çözeltisi içindeki reaksiyona girmemiş kimyasallar atmak için tekrarlanmıştır. Fazla ligandları atmak için hacim olarak iki katı kadar aseton eklenerek, 5 dk 5000 rpm’de santrifüjlenmiştir. Sıvı kısım atılmış ve bu işlem iki kez tekrarlanmıştır. Elde edilen pellet KN’ler oda sıcaklığında tüm gece bekletilerek kurutulmuş ve tartılmıştır. Daha sonra pellet KN’ler 10 mL hekzanda çözülmüş ve 100 mL’lik cam şişeye konarak, 15 mL amonyum hidroksit ve 40 mL su çözeltiye eklenmiş ve 3 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Sonra 0.75 g merkaptosüksinik asit (MSA) karışıma eklenmiş ve hızlıca karıştırarak MSA’nın KN yüzeyine eklenmesi kolaylaştırılmıştır. Su bazlı KN’lerin çökmesi için karışıma etanol eklenmiş (KN:etanol 4:1 (h/h)) 5000 rpm’de 10 dk karıştırılmıştır (100)

3.4.1.2. KN-Silika Kaplama

KN sentezlemenin ardından literatürde bulunan sandviç benzeri olarak adlandırılan yöntem kullanılmıştır (101). InPZnS KN’lerin fonksiyonel uç gruplarının karboksil grubu olmasından dolayı amin fonksiyonlu silikaya bağlanarak bunun ardından tekrar bir silika ile bağlanmış ve amin fonksiyonlu uç gruplara sahip silikaya karboksil uç gruplarına sahip Ce6 bağlanmaya çalışılmıştır. (Silika-KN-silika=SKNS) (Şekil 3)



Şekil 3. Amin fonksiyonlu silika nanoparçacıkları ile KN ve Ce6’nın birleştirilmesi (101).

15 mL amonyum hidroksit ve 125 mL etanol 100 mL'lik cam şişede 40 °C'de 5 dakika karıştırıldıktan sonra, 5 mL tetraetil ortosilikat eklenmiş, hızlı karıştırma ile silika formatına ulaşılmıştır. 1 saatlik zaman aralığında 2,5 mL tetraetil ortosilikat ve 0.2 mL 3-aminopropil trietoksisilan karışıma eklenerek, 6 saat süreyle inkübasyon ligand bağlı silika noktalarının oluşturulmuştur. etanol/su (1:3 h/h) ile 5 dakika 5000 rpm de santrifüjlenerek 3 kez yıkanan silika dotlar son yıkama işleminde tartılarak, 1.5 g silicadotlar elde edilmiştir. Daha sonra topaklanmayı engellenmek için sonikatör kullanılmış ve suda dağıtılmıştır.

50 mg sulu KN ve 1g silika noktalar, 100 mL deiyonize suda çözülerek, ısıtıcıda 2 dk karıştırılmıştır. 5 dakika etanol/su 1:2 (h/h) ile 5000 rpm santrifüjlenerek elde edilen silika-kuantum noktalar (SKN) çöktürülmüştür.

SKN'ler, 20 mL saf su da çözülmüş ve 66 µl 3-aminopropil trietoksisilan, 1600 µl tetraetil ortosilikat, 30 mL etanol karışıma eklenmiştir. 25°C da 4 saat karıştırılmış ve SKNS elde edilmiştir. SKNS; 5 dakika, 5000 rpm'de etanol/su (1:2 (h/h) ile santrifüjlenerek yıkanmıştır. Elde edilen peletler kurutularak daha sonra kullanılmak üzere +4°C de saklanmıştır.

Bu yöntemle hazırlanan KN-silika nanopartikülleri için Tablo 1'de verilen oranlar denenmiştir.

Tablo 1. KN-silika kaplamada kullanılan oranlar

Grup No	MPS (µl)	APS (µl)	APTES (µl)	TEOS (µl)	KN (mg)	Distile su (mL)	Toluen (mL)	Hekzan (mL)	Etanol (mL)	NH ₄ OH (mL)
1	132	333	-	-	5	-	4	-	-	-
2	-	-	200	100	5	2	-	-	2	-
3	-	-	200	200	5	2	-	2	-	1
4	-	-	20	10	2,5	1	-	-	1	-

*MPS: 3-merkaptopropil trimetoksisilan

*APS: Aminopropiltrimetoksisilan

*APTES: 3-Aminopropil trietoksisilan

*TEOS: Tetraetil ortosilikat

*NH₄OH: Amonyum hidroksit

*KN: Kuantum Nokta

1. Grupta, 4 mL toluen içinde 132 µl 3-merkaptopropil trimetoksisilan ile 333 µl aminopropiltrimetoksisilan ve 5 mg organik KN eklenerek 1 ve 2 saat karıştırılmıştır.

2. Grupta 2 mL distile su, 2 mL ethanol içinde 200 µl 3- aminopropil trietoksisilan ile 100 µl tetraetil ortosilikat ve 5 mg KN sulu fazda eklenerek 1 ve 2 saat karıştırılmıştır.

3. Grupta 2mL heksan, 2mL distile su içinde 1mL amonyum hidroksit (NH₄OH) eklenerek, iki kez aseton ile yıkama yapılmış, daha sonra 5 mg organik çözücüde hazırlanan KN'ler eklenerek, 1 ve 2 saat inkübasyonun ardından 200 µl 3-aminopropil trietoksisilan ve 100 µl tetraetil ortosilikat eklenmiştir.

4. Grupta 1 mL distile su ve 1 mL etanol içinde 20 µl 3-Aminopropil trietoksisilan ve 10 µl tetraetil ortosilikat, 2.5 mg KN eklenerek, 1 saat ve 2 saat karıştırılmıştır.

Her bir grubun 1 ve 2 saat sonra zeta potansiyel değerleri okunmuştur.

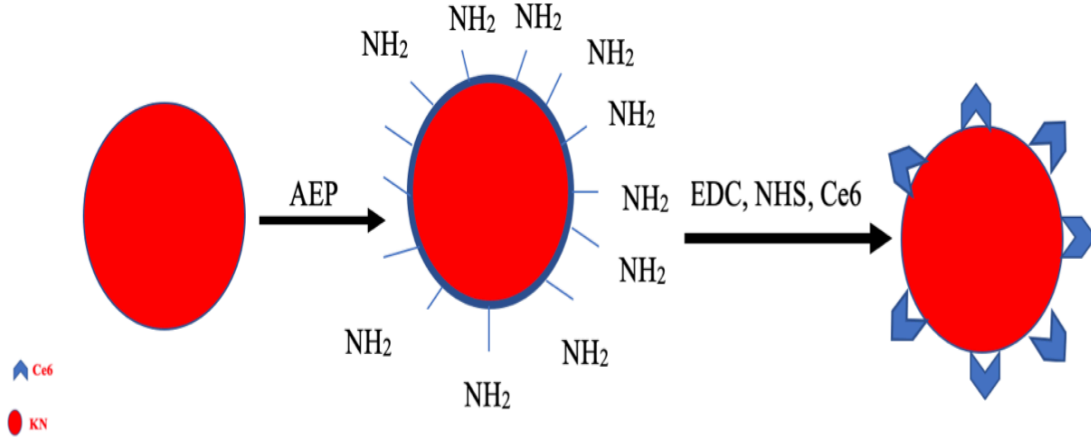
3.4.1.3 KN-Ce6 Konjugatının 2-aminodihidrojenfosfat (AEP) ile Hazırlanması

Diğer bir yöntem olan KN'lerin amin fonksiyonlu hale getirilmeye çalışılmıştır. Bunun için AEP ile Şekil 4' de belirtildiği gibi reaksiyona sokulan KN amin fonksiyonlu hale getirilerek Ce6 ile bağlanmaya çalışılmıştır (54). İlk olarak Bölüm 3.4.1.1' de belirtildiği gibi KN'ler üretilmiştir. Daha sonra 10 mL PBS (Fosfat Tamponu) (pH 5.5) tamponunda 10 mg AEP çözülerek bu karışımdan 5mL çekilerek 5 mg KN ile 2 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Çözelti I).

Başka bir kapta 10 mg Ce6 4 mL PBS (pH 5.5) tamponunda çözülerek bu karışımdan 1 mL alınmış ve 10 mg 1-etil-3-(3- dimetilaminopropil)-karbodimid (EDC) ve 6 mg N-hidroksisulfosukkinimid sodyum (NHS) eklenerek 1 saat manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Çözelti II).

I ve II nolu çözeltiler 24 saat oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra bağlanmayan Ce6'ların uzaklaştırılması için PBS (pH:5.5) de 3 gün süreyle diyaliz edilmiştir. Diyaliz sonrası elde edilen çözelti liyofilize edilmiştir.

Aynı hazırlama işlemi tampon yerine distile su kullanılarak da gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4. KN'lerin AEP ve EDC, NHS reaksiyonu ile uç gruplarının fonksiyonelleştirilerek Ce6 ile bağlanması şematik gösterimi (54).

3.4.2. Uç Grubu Amin ile Fonksiyonelleştirilmiş KN ile Ce6 Konjugatının Hazırlanması

Bu ön çalışmaların sonunda KN'nin uç gruplarının amin fonksiyonlu hale getirilememesi nedeniyle amin fonksiyonel KN'lerin ticari olarak temin edilmesi yoluna gidilmiştir. Ticari olarak temin edilen uç grubu amin ile fonksiyonelleştirilmiş KN'ler ile Ce6 konjugasyon çalışmaları yürütülmüştür.

KN'de bulunan NH₂ ile Ce6'da bulunan, -COOH grupları arasında amid reaksiyonu ile Ce6 kovalent olarak KN ile konjuge edilmiştir. Kısaca, (1mM, 200 µl Ce6) Ce6, (5 mM, 200 µl) EDC ile aktive edilmiştir. Daha sonra (5 mM, 200 µl) NHS eklenmiştir. Hazırlanan çözelti, ticari olarak temin edilen terminal grupları NH₂ ile fonksiyonelleştirilmiş KN çözeltisi (CdSeZnS) (40 µl, 250 µl PBS içindeki çözeltisi) ile karıştırılmıştır. Karışım, buz ile soğutulmuş ultrasonik banyoda yaklaşık bir saat sonike edildikten sonra amikon filtreden (MWCO = 30 KDa) geçirilerek bağlanmamış olan KN ve Ce6 karışımdan uzaklaştırılmıştır. Daha sonra belirlenen miktarda tampon çözeltisi içinde dağıtılmıştır. Konjugasyon için en uygun miktarları bulmak için, Ce6, EDC ve NHS oranları sabit tutularak KN miktarları değiştirilerek yukarıda anlatıldığı şekilde konjugasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.4.3. KN-Ce6 Konjugatının Karakterizasyonu Çalışmaları

KN-Ce6 konjugasyonunun doğrulanması için Fourier Transform Infrared Spektrometresinin (FT-IR), UV Spektrofotometre ve Yüksek Kontrastlı Transmisyon Elektron Mikroskobu (CTEM) karakterizasyon yöntemleri kullanılmıştır.

3.4.3.1. KN-Ce6 Konjugatının FTIR Analizi ile Tanınması

Konjugatın oluşumun doğrulanması için Fourier Transform Infrared Spektrometresi ile (ATR-FTIR) ile IR spektrumu çekilmiştir. FTIR-ATR eklentisi ile 500- 4000 cm^{-1} dalga boyu aralığında IR spektrumları çekilerek KN'lerin Ce6'yla bağlanması incelenmiş, Ce6 ve KN'lerin yüzeylerindeki moleküllerin çeşitli bağlarının titreşim frekansları ölçülmüş ve moleküldeki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir.

3.4.3.2. KN-Ce6 Konjugatının UV-Vis Spektrofotometre ile Tanınması

KN-Ce6 bağlanmasını göstermek için hazırlanan konjugat ve Ce6 1:1 oranında PBS (pH 5,5)'de seyreltilerek ve 250–700 nm aralığında UV-Vis spektrumu çekilmiştir.

3.4.3.3. KN-Ce6 Konjugatının Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) İle Görüntülenmesi

KN, konjugat ependorf tüp içine konulmuş ve tamamen homojen şekilde dağılmasını sağlamak için ultrasonik banyoda tutulmuştur. Çözeltiden mikropipet yardımıyla karbon film kaplı bakır ızgaralara 5-10 μL damlatılıp kurutularak, Lantan heksaborür (LaB_6) elektron tabancalı, 20-120 kV aralığında hızlandırıcı voltaj altında çalışan FEI Tecnai G² Spirit BioTwin model CTEM Mikroskop ile 120 kV enerjide incelenmiştir.

3.5. Lipozom Dispersiyonlarının Formülasyon Çalışmaları

3.5.1. Ön Formülasyon Çalışması

KN-Ce6 konjugatını hapsedebilmek için öncelikle en uygun lipozom bileşimi seçilmiştir. Kullanılan lipitler, KN'nın çok maliyetli olması ve hazırlanan konjugatın miktarının elimizde sınırlı olması nedeniyle lipozom bileşiminin seçiminde literatürdeki benzer çalışmalardan yola çıkılmıştır. Literatürde KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom ile yapılmış çalışma bulunmamakla birlikte sadece KN veya sadece Ce-6 içeren lipozomlarla yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Ön formülasyon çalışmalarında bu bileşim ve oranlardan yola çıkılarak lipozomlar bir sonraki bölümde detaylı olarak anlatıldığı şekilde film yöntemi ile hazırlanmıştır. Hazırlanan lipozomların faz ayrımı oluşturup oluşturmadığı görsel olarak incelenmiş ve daha sonra ortalama partikül büyüklükleri ölçülmüştür. Uygun partikül boyutuna sahip olan formülasyon bulunduktan sonra KN-Ce6 enkapsüle edilmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

3.5.2. Etkin Madde İçermeyen Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

Etkin madde içermeyen lipozom dispersiyonları film metodu ile hazırlanmıştır. Lipozomların hazırlanmasında faz geçiş sıcaklığı farklı olan 2 lipit kullanılmıştır; sıvı kristal lipit yapısına sahip L- α -fosfatidil kolin (PC; faz geçiş sıcaklığı 10°C) ve 1,2-distearil-sn-glisero-3-fosfokolin (DSPC; faz geçiş sıcaklığı 55°C). Lipozomların hazırlanması için tüm lipidler (PC veya DSPC) ve lipozom bileşenleri, [kolesterol (Chol), poletilen glikol 2000-distearil fosfatidil kolin (PEG₂₀₀₀-DSPE)] gerekli miktarlarda tartıldıktan sonra kloroformda çözülmüştür. Ardından rotavaporda düşük basınçta ve faz geçiş sıcaklığının 5-10°C üzerinde kloroform uçurularak balon duvarında ince bir lipid film tabakası elde edilmiştir. Elde edilen film tabakası, PBS (20 mM PBS, pH 5.5) tampon çözeltisi ile faz geçiş sıcaklığının 5-10°C üzerinde 30 dk. süre ile hidrate edilmiştir. Hazırlanan lipozomların partikül boyutunu küçültmek ve dispersiyonu homojenize etmek için sırasıyla 0,6 - 0,4 ve 0,2 μ m por açıklığına sahip membran filtrelerin her birinden üçer kez geçirilmiştir. Hapsedilmeyen konjugat +4°C'de, 21000 rpm de 3 kez 45 dakika santrifüjlenerek uzaklaştırılmıştır.

3.5.3. KN–Ce6 Konjugatı İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

KN–Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonları Bölüm 3.5.2’ de anlatıldığı gibi hazırlanmış, tek fark olarak elde edilen lipit film KN-Ce6 konjugatı içeren PBS (20 mM PBS pH: 5.5) tampon çözeltisi ilave edilerek hidrate edilmiştir.

3.5.4. KN-Ce6 Konjugatı İçeren Yüzeyi Folat İle Modifiye Edilmiş İmmunolipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

KN–Ce6 konjugatı içeren ve yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş lipozom dispersiyonları Bölüm 3.5.2’ de anlatıldığı gibi hazırlanmış, tek fark olarak lipit çifte tabaka bileşimine 1,2-distearil-sn-glisero-3- fosfoetanolamin-N- [folat(polietilen glikol) - 2000] (DSPE-PEG₂₀₀₀ - Folat) ilave edilmiştir.

3.6. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu

3.6.1. Veziküllerin Partikül Büyüklüklerinin ve Zeta Potansiyellerinin Tayini

Hazırlanan yüzeyi modifiye edilmemiş ve folat ile modifiye edilmiş lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları ile zeta potansiyelleri Coulter Nanosizer ve Malvern Zetasizer (Malvern Instrument, UK) ile 25 °C’de PBS (20 mM, pH=5,5) ile birebir seyreltilerek ölçülmüştür. Ölçümler 6 örnek üzerinden yapılmış ve her bir ölçüm arka arkaya 3 ayrı okumanın ortalaması olarak kaydedilmiştir.

3.6.2. İçte Tutulan KN-Ce6 Konjugat Miktarı ve Enkapsülasyon Verimi

KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonları Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde hazırlandıktan ve hapsedilmeyen etkin madde uzaklaştırıldıktan sonra, 100 µL lipozom dispersiyonu balon jöjeye alınmış, üzerine 2 mL DMSO ilave edilerek lipit çifte tabaka yapısı parçalanmış ve hapsedilen etkin maddenin açığa çıkması sağlanmıştır. Daha sonra içte tutulan etkin madde miktarı UV Spektrofotometre ile 664 nm dalga boyunda absorbanları ölçülmüştür ve Bölüm 3.3.3.’de anlatıldığı şekilde hazırlanan doğru denklemi kullanılarak enkapsülasyon verimi hesaplanmıştır.

3.6.3. Lipozomların Mikroskop ile Görüntülenmesi

3.6.3.1. Lipozomların Polarizan Mikroskobu ile Görüntülenmesi

Hazırlanan lipozom dispersiyonundan alınan 1-2 damla örnek lamel üzerine konularak polarizan mikroskopa görüntülenmiştir.

3.6.3.2. Lipozomların CTEM ile Görüntülenmesi

Hazırlanan lipozomlar Bölüm 3.4.3.3.'de anlatıldığı şekilde CTEM ile görüntülenmiştir.

3.7. Lipozom Dispersiyonlarının Stabilite Çalışmaları

Çalışmalarda taze hazırlanmış iki farklı lipit (PC, DSPC) bileşimine sahip iki farklı lipozom dispersiyonunun stabilitesi 6 ay süre ile izlenmiştir. Stabilite çalışmaları folat ile modifiye edilmemiş lipozom dispersiyonları üzerinden gerçekleştirilmiştir. Bunun için 0,5 mL'lik örnekler hazırlanarak +4 °C ve oda sıcaklığında 6 ay bekletilmiştir. Önceden belirlenen zamanlarda (0., 1., 2., 3., 4. ve 5. aylarda) örnekler görünüş (faz ayrımı, renk vs), partikül büyüklüğü ve dağılımı ile içte tutulan maddenin kaybı açısından değerlendirilmiştir.

3.8. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.8.1. Hücrelerin Büyütülmesi

Formülasyonların sitotoksik etkinliklerinin değerlendirilmesinde Folat reseptörü içeren 4T1 (fare meme kanseri) hücre hattı kullanılmıştır. Hücreler, 37°C'de %5 CO₂ içeren ortamda %10 Fetal Sığır Serum ve % 1 Penisilin-Streptomisin (10000U/10000 mg/mL) ile takviye edilmiş RPMI 1640 ortamı (4 mM L-glutamin ve sodyum piruvat) ile inkübe edilmiştir.

3.8.2. Hücrelere Uygulanacak Konjugat Dozunun Belirlenmesi

Hücrelere uygulanacak konjugat içeren lipozom dispersiyonunun dozu belirlenmeye çalışılmıştır. Bunun için, 96'lık plaklara 10⁴ hücre/kuyucuk olacak şekilde

4T1 hücreleri ekilmiştir. Ekilen hücreler, plaklara yapışması için 37 °C 'de %5 CO₂ içeren ortamda gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün hücre besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyucuklara belirlenen farklı konsantrasyonlarda etkin madde içeren ve içermeyen yüzeyi folat ile modifiye edilmiş ve edilmemiş lipozom dispersiyonları ve serbest konjugat uygulanmış ve 4 saat inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyonun ardından hücre canlılıkları 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi ile değerlendirilmiştir. Kısaca, belirlenen inkübasyon süreleri sonunda kuyucuklara MTT reaktifi (1mg/mL) ilave edilmiş ve 4 saat inkübasyon sonrasında canlı hücreler tarafından oluşturulan formazan kristalleri DMSO ilavesiyle çözülmüştür. Optik yoğunluk, 570 nm'de ELISA mikropilaka okuyucu (Molecular Devices, Silicon Valley, CA) ile ölçülmüştür.

Kuyulara ekilecek hücre sayısını optimize edebilmek için aynı işlemler 2x10³ hücre/kuyucuk olacak şekilde tekrarlanmıştır.

3.9. 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkinin İncelenmesi

3.9.1. Ön Çalışmalar

Optimum çalışma koşullarını belirlemek için 4T1 tümör hücreleri ile ön çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla, farklı hücre sayıları (10x10³, 5x10³, 2x10³ hücre/kuyucuk), formülasyonlarla farklı inkübasyon süreleri (4 ve 24 saat), farklı X ışını dozları (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 30, 45 Gy) ve ışınlama sonrası farklı bekleme süreleri (24, 48, 72 saat) denenmiştir. Hücre canlılıkları Bölüm 3.8.2.'de anlatıldığı gibi MTT testi ile ölçülmüştür.

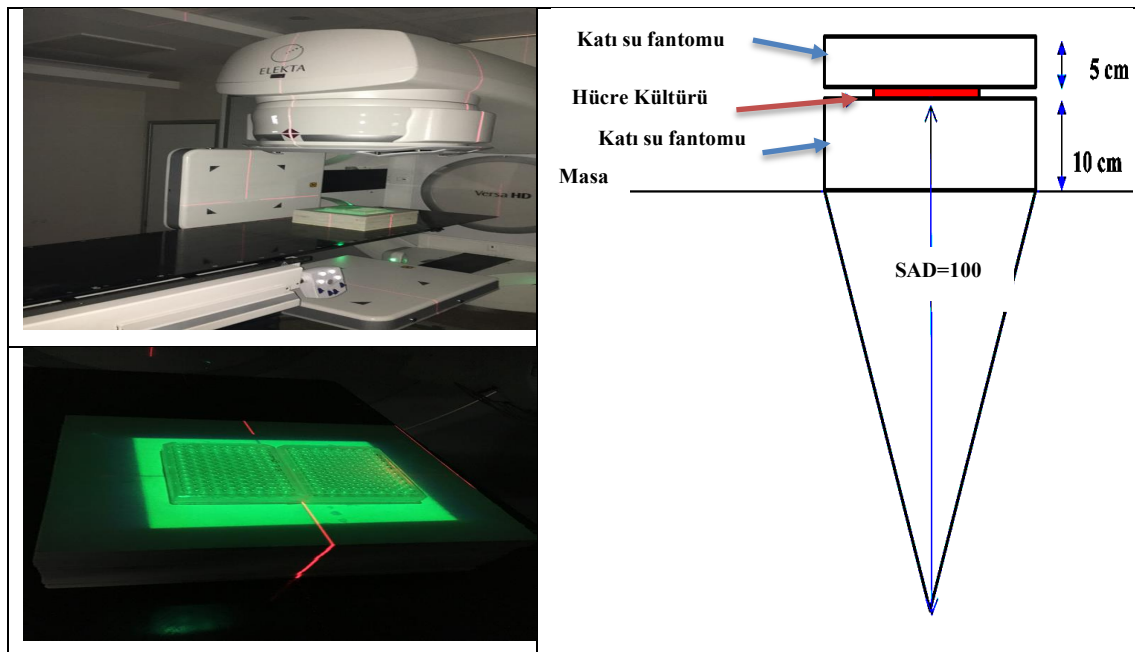
3.9.2. Lipozom Formülasyonlarının 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Sitotoksik Etkilerinin İncelenmesi

Bölüm 3.9.1' de anlatıldığı şekilde yapılan ön çalışmalar sonucunda belirlenmiş optimum deney şartlarında antitümoral etkinin incelenmesi için sitotoksikite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, 4T1 hücreleri, 2x10³ hücre/kuyucuk konsantrasyonunda 96 kuyucuklu plaklara ekilmiş ve Ekilen hücreler, plaklara yapışması için 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda gece boyunca bekletilmiştir. Ertesi gün besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra kuyulara 1.5 ve 3 µg/mL KN-Ce6 konjugatı ve etkin madde içeren ve içermeyen

yüzeyi folat ile modifiye edilmiş ve edilmemiş lipozom dispersiyonları uygulanmıştır. 4 saat inkübasyondan sonra, formülasyonlar uzaklaştırılarak hücreler PBS ile yıkanmıştır. Taze ortam eklenen hücreler önceden belirlenmiş radyasyon dozları (5, 10, 15 ve 20 Gy) ile aşağıda anlatıldığı şekilde (Bölüm 4.6.3.3) ışınlamaya tabi tutulmuş ve ışınlama sonrası hücreler 37 °C'de %5 CO₂ inkübatörde 72 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası hücre canlılıkları Bölüm 3.8.2.'de anlatıldığı gibi MTT testi ile ölçülmüştür.

3.9.3. Işınlama prosedürü

Işınlama öncesinde lineer hızlandırıcı (Electa versa HD) cihazının dozimetrik kontrolleri yapılarak cihazın ürettiği radyasyonun verimi kontrol edilmiştir. İlk olarak cihaz SAD=100 cm ve 10x10 cm² lik alan boyutlarında maksimum doz derinliğinde, 1 MU = 1 cGy verecek şekilde kalibre edilmiştir. Kalibrasyon için RW3 katı su fantomu ve 0.6 cc Farmer tipi iyon odası kullanılmıştır ve ölçümler IAEA Technical Report Series 398 (TRS 398) numaralı doz protokolü çerçevesinde yapılmıştır. Daha sonra hücre kültürleri PTW marka RW3 katı su fantomu kullanılarak SAD=100 cm'de, 20x20 cm² alanda 10 cm derinlikte belirlenen dozlarda Tablo 2.'de belirtilen doz ve monitör unitlerde (MU), 400 MU/dk doz hızında 6 MV lineer hızlandırıcı cihazında ışınlanmıştır (Şekil 5).



Şekil 5. Plakların 6 MV lineer hızlandırıcı ile ışınlama düzeneği

Tablo 2. 6 MV foton enerjisi için hücre kültür serilerine verilen MU (Monitör Unit) değerleri ve bu değerlere karşılık gelen dozlar.

Doz(Gy)	MU	Doz(Gy)	MU
0	0	12	1644
2	274	14	1918
4	548	15	2054
5	685	20	2740
6	822	30	4110
8	1096	45	6165
10	1370		

3.10. İn Vivo Çalışmalar

3.10.1. Hayvanlarda Tümör Modelinin Oluşturulması

İN vivo çalışmalar için Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınmıştır (27.08.2015 tarih ve 2015/62-04 sayılı karar). Bu çalışmalar 4-6 haftalık Balb-C dişi fareler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

İN vivo çalışmalar için 10^5 hücre/0.1 mL folat reseptörü eksprese eden 4T1 tümör hücresi, Balb/C (4-6 haftalık, dişi) farelerin sağ üst ayak bölgesine subkütan enjeksiyon yoluyla uygulanmıştır. Yaklaşık 3 hafta sonra palpasyonla tespit edilecek büyüklükte tümör gelişen fareler çalışma için kullanılmıştır.

3.10.2. Tümör Görüntüleme Çalışması

Folat reseptörü ile hedeflendirilmiş lipozom dispersiyonlarının tümöre tutulumunu göstermek ve hazırlanan lipozomların tümördeki tutulumlarının en yüksek olduğu zamanı tespit etmek amacı ile lipozom dispersiyonları Tc-99m ile işaretli lipozom dispersiyonları tümör modeli oluşturulmuş farelere uygulanmış ve gama kamera ile görüntüleme yapılmıştır.

3.10.2.1. Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m İle İşaretlenmesi ve İşaretlemenin Kalite Kontrolü

Sintigrafik görüntüleme için kullanılacak olan lipozomların yüzeyine Tc-99m'in stabil bağlanmasını sağlamak için lipozom dispersiyonu bileşimine dietilentriaminpentaasetik asit-1,2-distearoil-sn-glisero-3-fosfoetanolamin (DTPA-PE) eklenmiştir. Lipozom dispersiyonu Bölüm 3.5.2.' de anlatıldığı şekilde hazırlanmış tek fark olarak lipit bileşimine % 0.1 molar oranda DTPA-PE eklenmiştir. Tc-99m ile işaretlenme için 1 mL lipozom dispersiyonu için 1mg/mL kalay klorür (SnCl₂) ve 3,5 mCi Tc-99m çözeltisi eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübe edilmiştir.

İşaretlemenin kalite kontrolü ani ince tabaka kromatografisi (instant thin layer chromatography =ITLC) yöntemi için sabit faz olarak ITLC-SG hareketli faz olarak polar ve non-polar iki çözücüde kullanılarak İTK işlemi yapılmıştır. 1x10 cm plaklara işaretli lipozom dispersiyonları tatbik edildikten sonra hareketli fazda sürüklenmeye bırakılmıştır. Kurutulan plaklar ortadan ikiye kesilerek her iki parça ayrı ayrı gama sayıcıda aktiviteleri sayılarak ve Eşitlik 3 kullanılarak işaretleme verimi hesaplanmıştır.

$$\% \text{ işaretleme verimi} = \frac{\text{İşaretli Tc-99m aktivitesi}}{\text{İşaretli T-99m} + \text{Serbest Tc-99m aktivitesi}} \times 100 \dots \dots \dots (\text{Eşitlik 3})$$

3.10.2.2. Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmaları

Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı şekilde tümör modeli oluşturulan farelerde tümör boyutu yaklaşık 1-1,5 cm boyutuna ulaştığında Tc-99m işaretli yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonu 2,5 mCi / 0.2 mL olacak şekilde kuyruk veninden i.v yolla uygulanmıştır. Enjeksiyondan 0., 1. saat, 2. saat ve 3. saatlerde hayvanlar anestezi ile uyutularak ve planar sintigrafik görüntüler çekilmiştir. Elde edilen görüntüler analiz edilerek uygulanan lipozom dispersiyonunun tümör dokusunda maksimum tutulduğu zaman belirlenmeye çalışılmıştır.

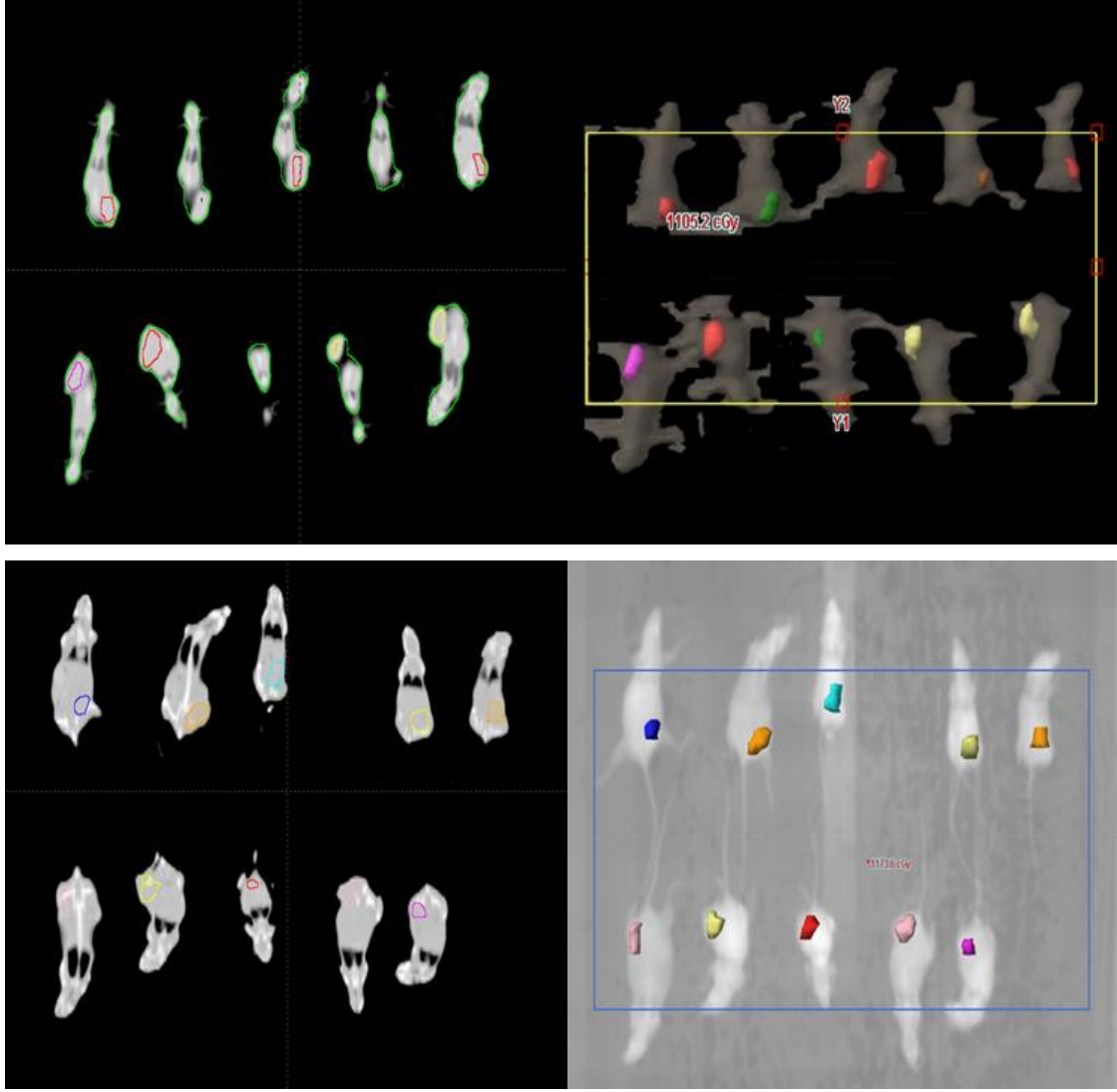
3.10.3. Lipozom Formülasyonlarının Sitotoksik Etkinliğinin İn Vivo İncelenmesi

Bu çalışmada hazırlanan formülasyonun uygulandığı farelere radyoterapi uygulayarak hiçbir tedavinin uygulanmadığı kontrol grubu ve sadece radyoterapi uygulanan grup arasındaki farklılığın araştırılması bu sayede tedavi etkinliğinin in vivo olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaç doğrultusunda Bölüm 3.10.1' de anlatıldığı şekilde tümör oluşturulmuş fareler, her grupta 12 hayvan olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Grup I' deki farelere herhangi bir işlem uygulanmamıştır (kontrol grubu), Grup II' deki farelere sadece 10 Gy doz ile tek seferde olmak üzere ışınlanarak radyoterapi uygulanmış (kontrol grubu), Grup III' deki farelere ise yüzeyi folik asitle modifiye edilmiş KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonu i.v olarak verilmiş, enjeksiyondan 6 saat sonra hayvanlar 10 Gy doz ile tek seferde olmak üzere ışınlanarak radyoterapi uygulanmıştır. Tedavi etkinliklerini izlemek için, hayvanların ağırlık değişimleri ve tümör hacimlerindeki değişim, sağ kalım süreleri izlenmiştir. Ayrıca, 0., 5. ve 10. günlerde her gruptan 2 fare kurban edilmek üzere tümör dokusu ve diğer organları çıkarılarak histopatolojik değerlendirme yapılmıştır. Bu işlemler yapılırken kendiliğinden ölen hayvanlar deneyden çıkarılmıştır.

3.10.3.1. Tedavi Planlamasının Yapılması

Tedavi planlaması yapılabilmesi için, Grup II ve Grup III'deki farelere anestezi uygulanmış (100mg/kg ketamin, 10mg/kg ksilazin; intraperitoneal enjeksiyon ile) ve farelerin Bilgisayarlı Tomografi (BT) simülatörde BT görüntüleri çekilmiş ve tedavi planlama sistemine (TPS) gönderilen BT görüntüleri üzerinde tümör hacimleri (GTV=gross target volume) ve farelerin kontürleri çizilmiş, ardından tedavi planlaması yapılmıştır (Şekil 6).



Şekil 6. TPS' de tümör kontürleme ve body çizimi

3.10.3.2. Işınlama Prosedürü

Işınlama öncesinde lineer hızlandırıcı (Varian Clinac) cihazının dozimetrik kontrolleri Bölüm 3.9.3.' de anlatıldığı şekilde yapılarak cihazın ürettiği radyasyonun verimi kontrol edilmiştir.

Tedavi planlaması yapıldıktan sonra farelere tekrar anestezi uygulanmış ve farelerin üzerine 1cm bolus yerleştirilerek, SSD = 100cm'de, 1,5 cm derinlikte, 38 x 14 cm² alanda 956 MU ve 400 MU/dk doz hızında 10 Gy radyasyon dozu tek seferde Şekil 7' de görüldüğü gibi uygulanmıştır. Grup III için bu uygulama lipozom dispersiyonu uygulandıktan 6 saat sonra yapılmıştır.



Şekil 7. Varian Clinac lineer hızlandırıcı cihazında farelerin üzerine 1 cm bolus yerleştirilerek yapılan ışınlamanın görüntüsü

3.10.3.3. Tedavi etkinliğinin İzlenmesi

3.10.3.3.1. Farelerin Vücut Ağırlıklarındaki Değişimin Saptanması

Tedavi etkinliğinin izlenmesi için farelerin vücut ağırlıklarındaki değişimin belirlenmesi amaçlanmıştır. Hayvanlar 0.,5.,10.,13.,14. günlerde hassas terazi ile ölçülerek ağırlıkları kaydedilmiştir. Grup III'de yer alan fareler daha uzun yaşadıkları için ilerleyen zamanlarda da ölçüm alınmıştır.

3.10.3.3.2. Hayvanlardaki Tümör Boyutundaki Değişimin Belirlenmesi

3.10.3.3.2.1. MikroBT Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesi

Hayvanlarda oluşan tümör boyutundaki değişimin belirlenmesi için 0, 5 ve 10. günlerde her bir grubun Mikro BT'de BT görüntüleri çekilmiştir (Şekil 8a). Mikro BT ile elde edilen BT görüntüleri GE Healthcare Advantage workstation 4.7 programı kullanılarak; uzunluk, genişlik ve derinlikler ölçülmüş ve Eşitlik 4 kullanılarak tümör hacimleri hesaplanmıştır. MikroBT'den elde edilen BT görüntüleri GE Healthcare Advantage workstation 4.7 ile değerlendirilmiştir (102, 103).

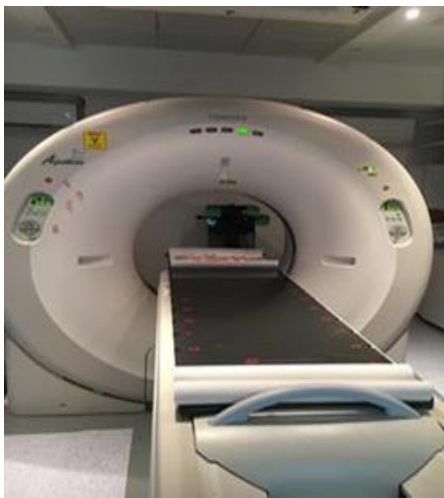
3.10.3.3.2.2. BT Similatör Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesi

Hayvanlarda oluşan tümör boyutundaki değişimin belirlenmesi için 0, 5 ve 10. günlerde her bir grubun BT simülatörde BT görüntüleri çekilmiştir (Şekil 8b). BT Simülatör ile elde edilen BT görüntüleri GE Healthcare Advantage workstation 4.7 programı kullanılarak; uzunluk, genişlik ve derinlikler ölçülmüş ve Eşitlik 4 kullanılarak tümör hacimleri hesaplanmıştır(102,103).

$$\text{Tümör hacmi (mm}^3\text{)} = 0,52 \times \text{genişlik} \times \text{uzunluk} \times \text{derinlik} \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 4})$$



(a)



(b)

Şekil 8 a-b. Mikro-BT (a) ve BT similatörde (b) yapılan görüntüleme işlemi

3.10.3.3.2.3. Manuel Olarak Tümör Boyutlarının Ölçülmesi ve Tümör Haciminin Hesaplanması

Her BT çekimi öncesinde ve 10.günden sonra yaşayan hayvanların 13., 14., 17., 19., ve 24., günlerde her bir farede bulunan tümörün uzunluk ve genişlikleri kumpas ile ölçülmüş, (Eşitlik 5) kullanılarak tümör hacimleri hesaplanarak ortalamaları alınmıştır (102,103).

$$\text{Tümör hacmi (mm}^3\text{)} = 0,52 \times (\text{genişlik})^2 \times \text{uzunluk} \dots\dots\dots(\text{Eşitlik 5})$$

3.10.3.3.3. Biyokimyasal Değerlendirme

Tedavi etkinliğinin değerlendirilmesinde yardımcı olmak üzere tam kan sayımı yapılmıştır, bunun için 0., 5. ve 10. günlerde farelerden kan alınmış ve tam kan sayımı yapılmıştır.

3.10.3.3.4. Sağ Kalım Sürelerinin İzlenmesi

Bölüm 3.10.3' de anlatıldığı şekilde 3 gruba ayrılan farelerin (histolojik çalışma ve diğer değerlendirmeler için kullanılan fareler hariç) sağ kalım süreleri kaydedilmiştir.

3.10.3.3.5. Histopatolojik ve İnceleme

Bölüm 3.10.3' de anlatıldığı şekilde sitotoksik etkinlik incelenen hayvanlar görüntüleme işlemlerinden sonra 0., 5. ve 10. günlerde sakrifiye edilerek tümör dokusundaki değişimleri histopatolojik olarak incelenmiştir. Sakrifiye edilen hayvanların tümör dokusu ve kalp, akciğer, beyin, beyincik, mide, bağırsaklar, dalak, karaciğerleri çıkarılmıştır. Çıkarılan tümör dokusunun boyutları (en: X, Boy: Y, derinlik: Z) ölçülmüştür. Daha sonra doku örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit içerisinde tespit edilmiştir. Tespit olduktan sonra doku örnekleri trimlenerek kasetlere yerleştirilmiştir. Bunu takiben örnekler akan su ile 12 saat boyunca yıkanmıştır. Ardından dokular rutin doku takip cihazına alınarak, parafinde bloklanmıştır. Her bir bloktan 5 µm kalınlığında mikrotomla hazırlanan kesitler; otomatik boyama makinesinde deparafinizasyon ve dehidrasyon aşamalarından sonra Harris'in Hematoksilen-Eozin (HE) yöntemiyle boyanarak; otomatik kapatma makinesinde lamel ile kapatılmıştır. Tüm bulgular (nekroz,

kanama, yangısal hücre infiltrasyonu, kireçlenme, tümör hücrelerinin morfolojisi, kapsül, çevre dokulara invazyon, uzak dokulara metastaz) ışık mikroskobu altında değerlendirilerek tanıları konulmuş, derecelendirilmiş ve gerekli görülen alanlar fotoğraflanmıştır. Nekroz, kanama, yangısal hücre infiltrasyonu, kireçlenme gibi bulgular semikantitatif olarak 10 farklı sahada, 4'lük, 10'luk ve 40'luk objektifte şiddetlerine göre derecelendirilmiştir. Buna göre; (-) negatif, (+) hafif şiddette, (++) orta şiddette ve (+++) şiddetli olarak değerlendirilmiştir. Tümör hücrelerinin morfolojisi, kapsül, uzak dokulara metastaz, çevre dokulara invazyon gibi bulgular ise var/yok olarak belirtilmiştir. Mitotik aktivitenin varlığını değerlendirmek için rastgele seçilen neoplazik hücrelerin yoğun olduğu 10 farklı mikroskop sahası 40'luk objektif ile taranmış ve gözlenen mitotik aktivite sayıları belirtilmiştir.

3.11. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizde SPSS 25 (IBM Corporation, New York, USA) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Tüm deneyler için ortalama \pm standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Üç veya daha fazla sayıda grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını test amacıyla kullanılan Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır.

Hayvan deneylerinde yapılan ağırlık, tümör boyutu ölçümlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde Friedman sıralamalı iki-yönlü varyans analizi (Friedman's Two-way Analysis of variance) testi kullanılmıştır. Bağımsız değişken olma durumunda Kruskal-Wallis testi uygulanmıştır. İstatistiksel olarak $p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir.

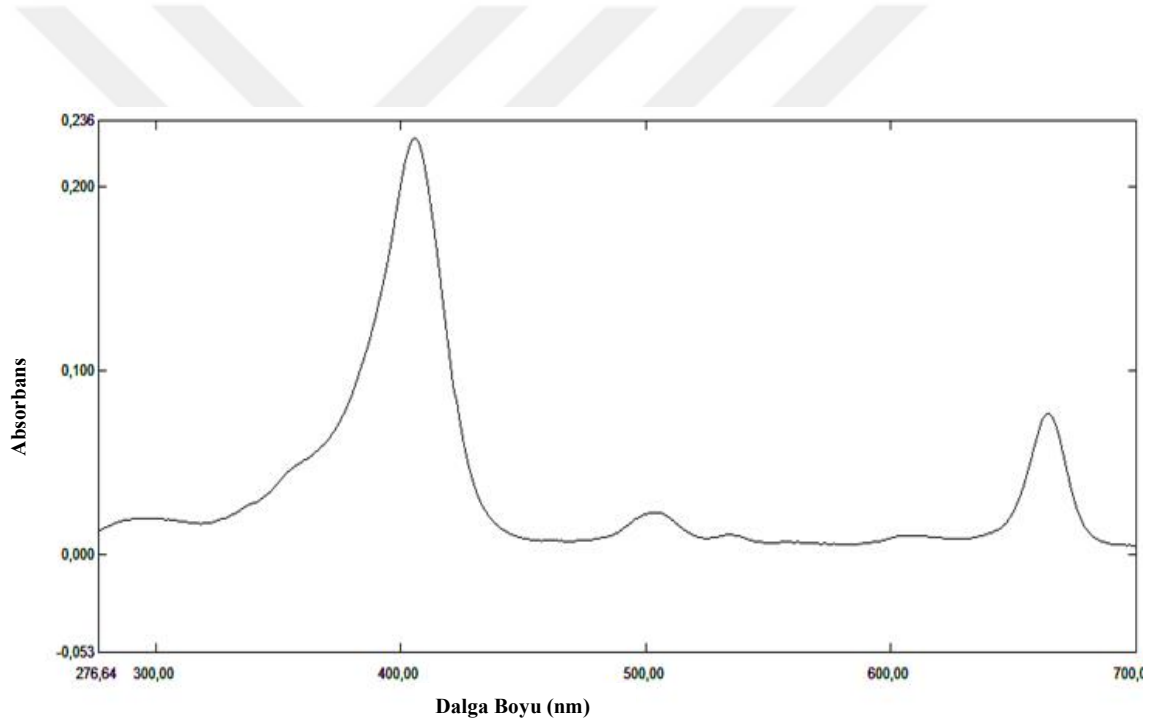
4. BULGULAR

4.1. Ce6'nın Yapısına Ait Bulgular

4.1.1. Ce6'nın UV-VİS Spektrumu

Bölüm 3.3.2' de anlatıldığı üzere Ce6' nın DMSO içindeki çözeltisinin UV spektrumu çekilmiş ve maksimum absorpsiyon dalga boyu olarak 406 nm ve 664 nm'lerde 2 pik gözlenmiştir (Şekil 9).

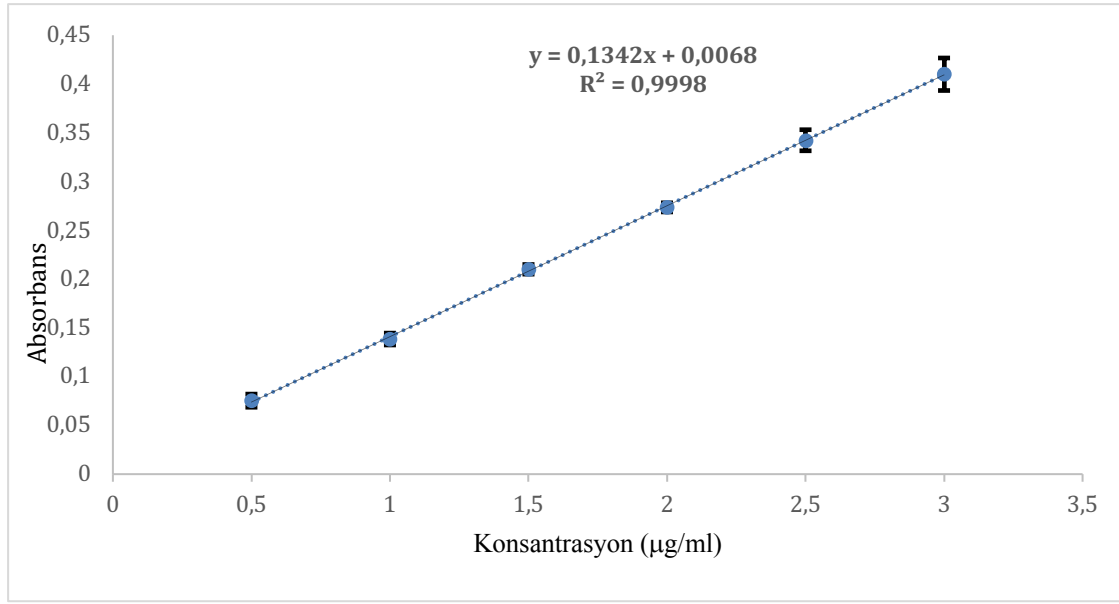
KN seçiminde, kalibrasyon doğrusu hazırlamada ve enkapsülasyon hesaplamalarında UV spektrofotometre ile yapılacak olan çalışmalarda 664 nm'deki dalga boyunun kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 9. Ce6'nın DMSO içindeki çözeltisinin UV spektrumu

4.1.2. Ce6' nın Kalibrasyon Doğrusu

Bölüm 3.3.3' de anlatıldığı şekilde Ce6'nın DMSO çözeltisi içindeki kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerin absorbansları okunarak, konsantrasyona karşı absorbans değerleri grafiklenerek kalibrasyon doğrusu çizilmiş, doğru denklemi $y = 0,1342x + 0,0068$ ve $R^2 = 0,9998$ olarak bulunmuştur (Şekil 10).



Şekil 10. Ce6 DMSO içinde hazırlanan kalibrasyon doğrusu ve doğru denklemi

4.2. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması

4.2.1. KN Sentezi ve KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması İçin Yapılan Ön Çalışmalara Ait Bulgular

Bölüm 3.4.1.1’de anlatıldığı şekilde KN sentezi yapılmıştır. Ancak bu çalışmalarda hazırlanan KN’lerde agregasyon gözlenmiş ve buna bağlı olarak hazırlanan KN’lerin partikül boyutları istenen boyutlardan daha büyük olarak bulunmuştur. Ayrıca hazırlanan KN’lerindeki yüzey fonksiyonel gruplarının karboksil grubu ve amin grubu ile yer değiştirmesinin istenilen oranda gerçekleştirilememesi nedeniyle ön çalışmalarda hazırlanan KN’lerin çalışmalarda kullanılmamasına ve deneylerin uç grubu amin ile fonksiyonelleştirilmiş fotoduyarlayıcı olarak çalışmada kullanılacak olan alıcı (Ce6)’nın soğurulma piki ile örtüşen görünür bölgede kırmızı ışık yayan 655–675 nm dalga boyuna sahip CdSe/CdS KN kullanılmasına karar verilmiştir.

4.2.2. KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanmasına Ait Bulgular

KN-Ce6 konjugatı Bölüm 3.4.2.’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. En uygun konjugasyon verimi elde etmek için denenen oranlar Tablo3’de gösterilmiştir. Hazırlanan konjugatların karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Tablo 3. Kullanılan stok çözeltiler(*) ve konjugasyon çalışmasında kullanılan oranlar

Kod	NHS	EDC	Ce6	KN
Konjugat 1	200 µl	200 µl	200 µl	20 µl
Konjugat-2	200 µl	200 µl	200 µl	40 µl
Konjugat-3	200 µl	200 µl	200 µl	60 µl

(*) NHS = 5 mM NHS [Fosfat tamponu (PBS) (pH 5.5) içindeki çözeltisi]

ECD = 5 mM EDC [PBS (pH 5.5) içindeki çözeltisi]

Ce6 = 1 mg/mL Ce6 [PBS (pH 5.5) içindeki çözeltisi]

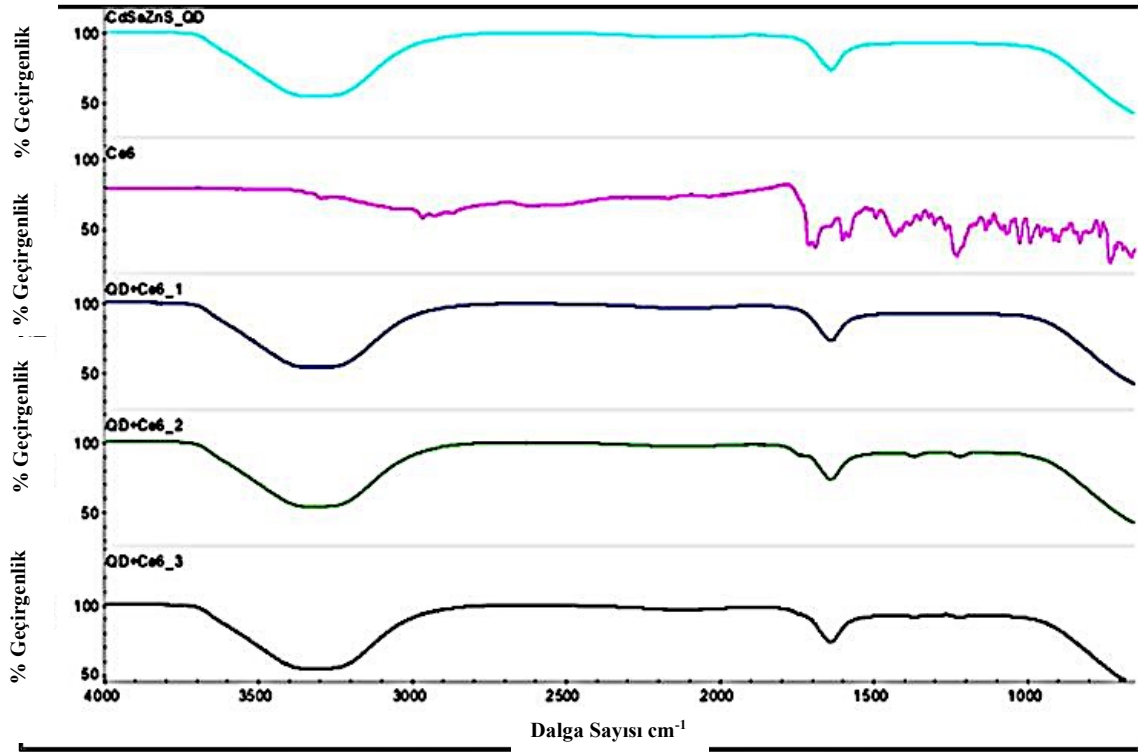
KN = KN (250 µl PBS içindeki çözeltisi)

4.2.3. KN-Ce6 Konjugatının Karakterizasyonuna Ait Bulgular

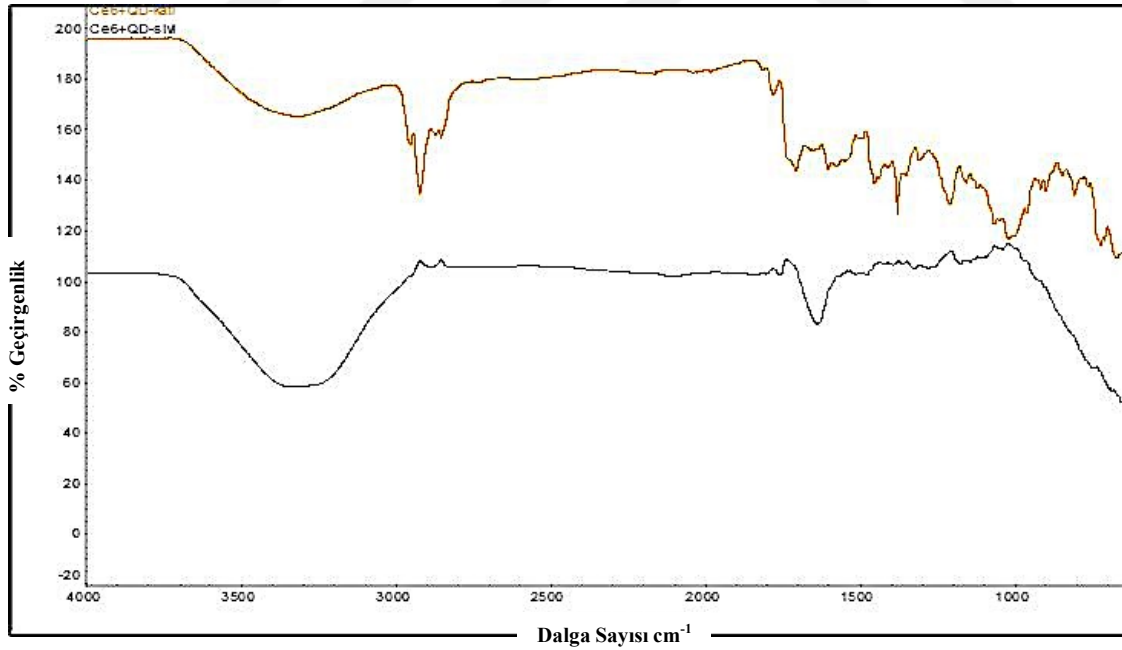
4.2.3.1. KN-Ce6 ve Konjugatının FTIR Analizi ile Tanınması

Tablo 3’de belirtilen oranlarda hazırlanan konjugatların FTIR spektrumları Bölüm 3.4.3.1’ de anlatıldığı şekilde çekilmiştir. Konjugatların yanısıra Ce-6 ve KN’lerin yüzeylerindeki moleküllerin çeşitli bağlarının titreşim frekansları ölçülmüş ve moleküldeki fonksiyonel gruplar belirlenmiş ve bağlanmanın (konjugasyonun) sağlanıp sağlanmadığı kontrol edilmiştir. Spektrumlar Şekil 11’ de gösterilmiştir.

Spektrumlar incelendiğinde Konjugat-2’de daha belirgin olmak üzere Konjugat-2 ve Konjugat-3’te bağlanmanın olduğu görülmüştür. Hazırlanan KN’ler PBS tamponu içinde dağıtıldığı için ve çözelti halindeki konjugatların FTIR spektrumunda su olan bölgelerin bağlanmanın gerçekleştiği bölge ile çakışmaya uğrayabileceği, dolayısı ile bağlanmanın görülmesini engelleyebileceği düşüncesi ile iyi sonuç veren Konjugat-2 liyofilize edilmiş ve hem liyofilize hem de çözelti halindeki konjugatın FTIR spektrumu çekilmiştir (Şekil 12).



Şekil 11. 1 saat inkübasyon sonrası CdSe/CdS KN (—), serbest Ce6 (—), Konjugat 1 (—), Konjugat 2 (—), Konjugat 3 (—)'e ait FTIR spektrumları



Şekil 12. Konjugat-2'nin liyofilize (sarı çizgi) ve PBS içindeki çözeltisinin (siyah çizgi) FT-IR spektrumu.

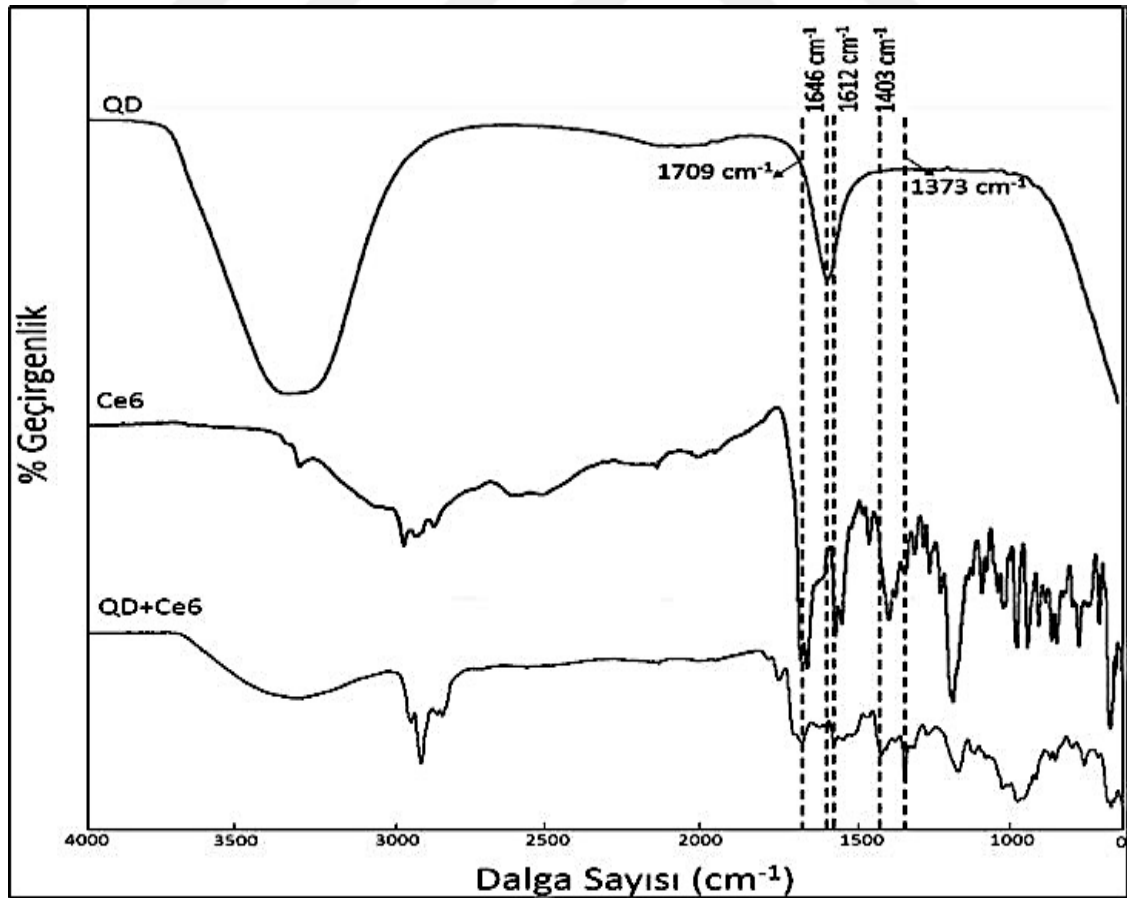
Son olarak; KN, Ce6 ve Konjugat-2'nin (liyofilize) infrared spektrumları karşılaştırılarak incelenmiştir. KN'lere ait FTIR spektrumu incelendiğinde, 3700 - 3000 cm^{-1} aralığında geniş ve yayvan bandın yer aldığı görülmüştür. Bu bant KN'nin sulu

ortamda süspansiyon olduğunu ve su molekülüne ait -OH gruplarının gerilme titreşimlerine ait olduğu belirlenmiştir. Buna ek olarak 1646 cm^{-1} 'de görülen absorpsiyon bandı ise KN'lerin -NH₂ gruplarıyla fonksiyonelleştirildiğinin göstergesidir.

Ce6'ya ait FTIR spektrumu incelendiğinde 1403 cm^{-1} 'de görülen bant Ce6 yapısında bulunan COO- gerilmesini ifade etmektedir.

KN'lerin Ce6 ile konjugasyonunda karbodiimid kimyası uygulanarak (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorid) (EDC) ve N-Hidroksisüksinimid (NHS) çapraz bağlayıcı ajan olarak kullanılmıştır. KN'lerin sahip oldukları primer amin grupları ile Ce6'ya ait karboksil grupları arasında kovalent bağlanma gerçekleştirilmiştir. KN-Ce6 örneğine ait spektrumda amit I bandındaki 1709 cm^{-1} ' de oluşan yeni absorpsiyon bandı KN'lerin üzerine Ce6'nın kovalent immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir.

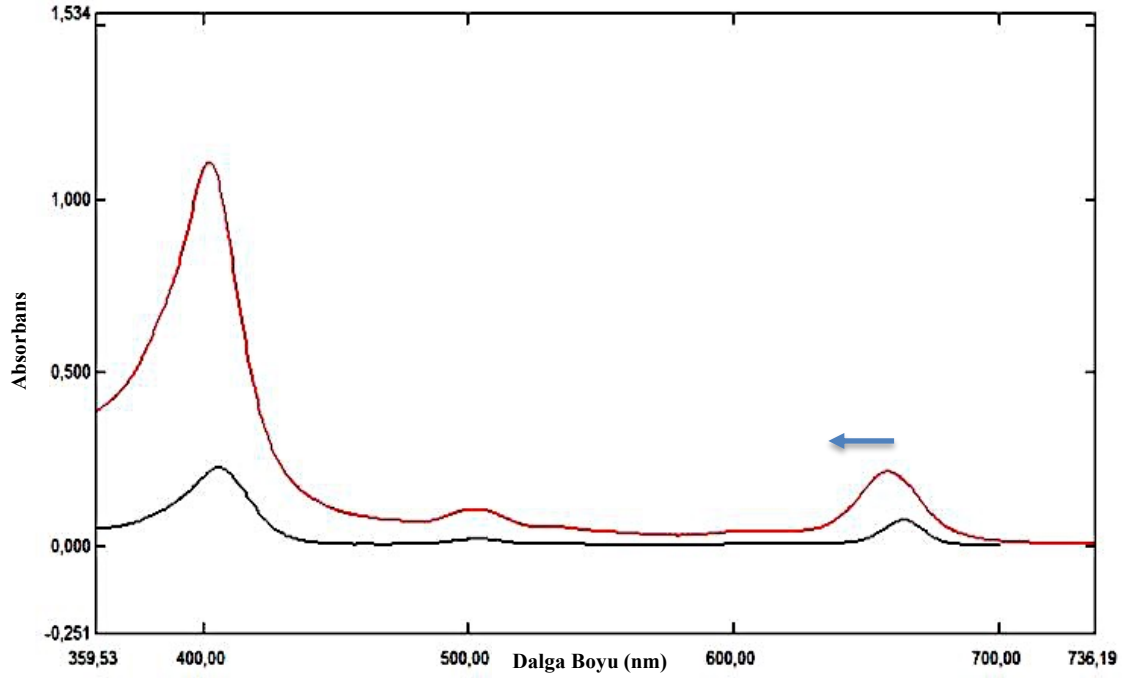
Ayrıca, 1612 ve 1373 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı, N-H bağ bükülmesi ve C-N gerilme titreşimine bu bantlarda amin grupları ile başarılı yüzey modifikasyonunun yani konjugat oluşumunu doğrulamaktadır (Şekil 13).



Şekil 13. KN, Ce6 ve liyofilize Konjugat-2'nin FTIR analizi sonucu

4.2.3.2. KN-Ce6 Konjugatının UV Spektrofotometresi ile Tanınması

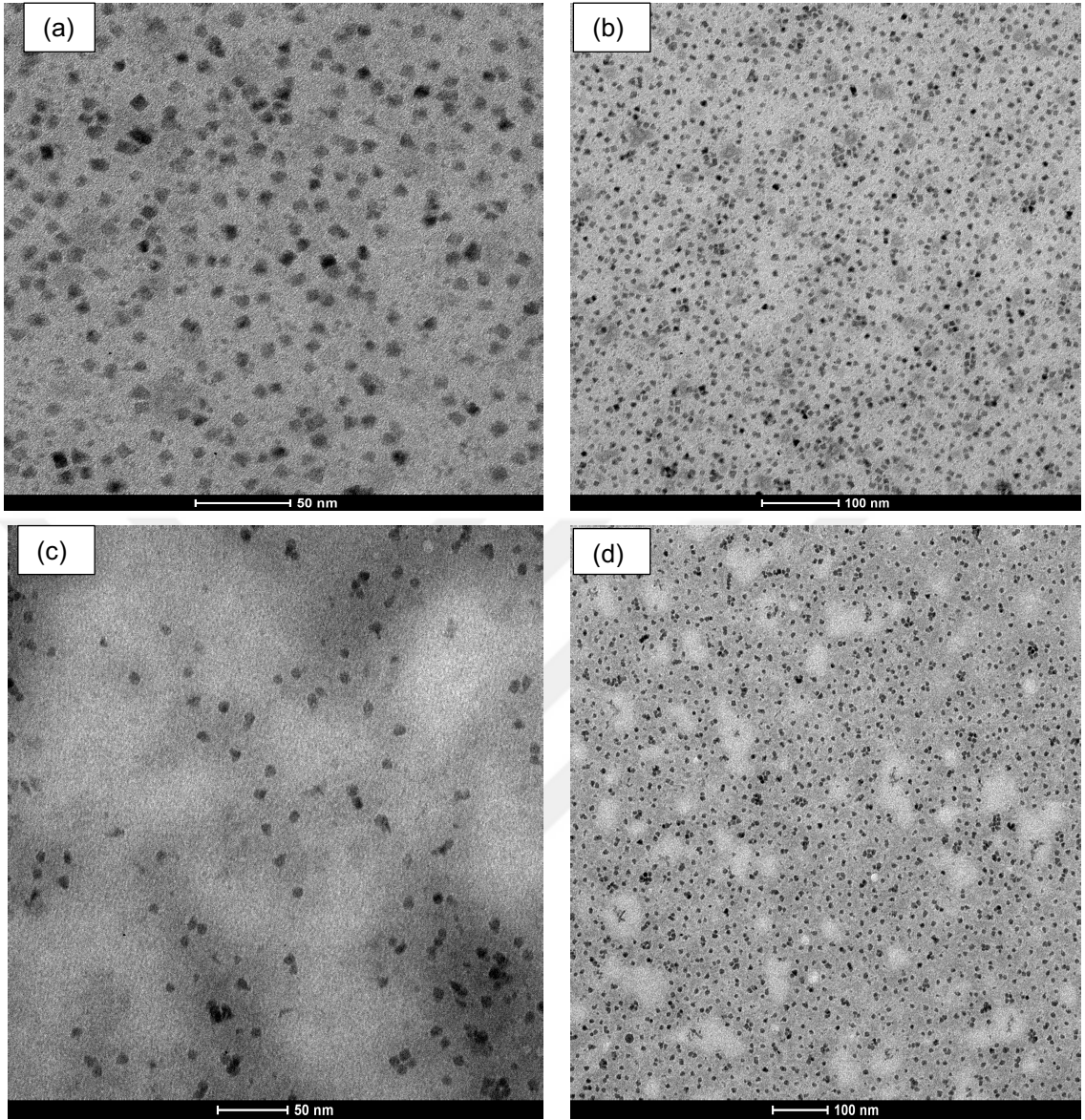
KN-Ce6 konjugatının gerçekleştiğini doğrulamak için Bölüm 3.4.3.2' de anlatıldığı şekilde UV-Vis Spektrofotometre ile de gösterilmiştir (Şekil 14). Bu spektrumda Ce6 ve KN-Ce6 konjugatının absorpsiyon bandları tam olarak uyduğu için kovalan olarak bağlandığı görülmektedir (104).



Şekil 14. Ce6 (siyah) ve KN-Ce6 Konjugatı (kırmızı)' nin UV spektrumu

4.2.3.3. KN-Ce6 Konjugatının CTEM ile Görüntülenmesi

Bölüm 3.4.3.3.'de anlatıldığı şekilde hazırlanan KN-Ce6 konjugatlarının CTEM görüntüleri alınmıştır. CTEM görüntüleri Şekil 15 a-d' de gösterilmiştir. KN'lerin etrafındaki daha düşük kontrastlı yapılar Ce6 olarak değerlendirilmiştir (Şekil 15 c-d) ve görüntülerdeki bu kontrast farklılık bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir(105,106). Ayrıca elde edilen CTEM görüntülerinden en küçük KN'nin çapının 1.6 nm, en yüksek 13,3 nm ve ortalama $3,11 \pm 1,67$ nm ($n=5524$) olduğu bulunmuştur.



Şekil 15 a-d. CdSeZnS KN'lerinin (a) 50 nm ve (b) 100 nm ve KN-Ce6 konjugatının (c) 50 nm ve (d) 100 nm ölçekli CTEM görüntüleri

4.3. Lipozom Dispersiyonlarının Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

4.3.1. Ön Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.5.1'de anlatıldığı şekilde hazırlanan farklı molar bileşimlerde lipozom dispersiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan bu lipozom dispersiyonlarında gözlenen sonuçlar Tablo 4' de verilmiştir.

Tablo 4. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan lipozom dispersiyonları ve bileşimleri ile partikül büyüklüğü-dağılımları ve gözlenen sonuçlar

Lipit Bileşimi	Molar Bileşim	DSPC (mg)	PC (mg)	Chol (mg)	Ce6 (mg)	Tampon (pH:7,4)	Ort.Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Gözlenen sonuç
DSPC:Chol:Ce6	6:4:0,5	192	-	62,0	11,9	PBS	833,0 754,1 794,9	0,709 0,637 0,692	Agregasyon oluştu, süzme işlemi başarı ile gerçekleştirilemedi.
DSPC:Chol:Ce6	6:4	192	-	62,0	2,4	Tris	2634,0 2410,0 2810,0	0,38 0,49 0,48	Agregasyon oluştu, süzme işlemi başarı ile gerçekleştirilemedi.
DSPC:Chol:Ce6	10:5	320	-	77,3	0,4	Tris	-	-	Agregasyon oluştu, boyut ölçülemedi
PC:Chol	2 :1	-	66,9	14,6	-	Tris	982,9 1061,0 1092,0	1,0 1,0 1,0	Partikül boyutu istenilen düzeye indirilemedi. Ayrıca PDI değeri 1 olduğu için homojen bir dağılıma sahip olmadığı görülmüştür.
PC:Chol	2:1	-	180	61,9	-	Tris	5781,0 6282,0 6179,0	0,475 0,782 0,761	Partikül boyutu istenilen düzeye indirilemedi.
DSPC:Chol	10:5	320	-	77,3	-	Tris	3,13E+04 3,83E+04 3,38E+04	0,213 0,062 0,334	Partikül boyutu istenilen düzeye indirilemedi.

Tablo 4. Ön formülasyon çalışmaları kapsamında hazırlanan lipozom dispersiyonları ve bileşimleri ile partikül büyüklüğü-dağılımları ve gözlenen sonuçlar (devamı)

Lipid Bileşimi	Molar Bileşim	DSPC (mg)	PC (mg)	Chol (mg)	Ce6 (mg)	Tampon (pH:7,4)	Ort.Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Gözlenen sonuç
PC:Chol	2:1	-	66,9	14,6	-	HEPES	189,8 196,5 195,8	0,202 0,188 0,187	Boyut analizinde 190 nm olarak belirlendi, mikroskopun çözünürlüğünden kaynaklı olarak polarizan mikroskop ile görüntülenemediği için TEM ile bakılmasına karar verildi. Bu oranların uygun olduğu düşünüldükten sonra bu formülasyonla devam edilmesine karar verildi.
PC:Chol	2:1	-	114	38,6	-	HEPES	197,5 197,4 199,0	0,157 0,165 0,154	
PC:Chol	2:1	-	13,8	2,92	KN+Ce6 (1ml)	PBS	850,3 894,9 991,6	1,0 1,0 1,0	Süzme gerçekleştirilememiştir.
PC:Chol:PEG 2000- DSPE	2:1:1:1	-	13,8	2,92	KN+Ce6 (1 mL)	PBS	-	-	PEG eklenerek devam edildi. agregasyon görüldüğü için, boyut ölçülmedi. Formülasyona yük verici madde eklenme kararı verilmiştir.
PC:Chol: PEG ₂₀₀₀ DSPE: SA	2:1:1:1	-	13,8	2,92	KN+Ce6 (1ml)	PBS	Sonuçlar Tablo 6'da verilmiştir.		SA ve DCP gibi yük verici maddeler ile lipozomların agregasyonlarını engellemeye çalışılmıştır. SA ilave edilen formülasyon başarılı bulundu.

4.3.2. Lipozom Formülasyon Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.5.1’de anlatıldığı şekilde yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucunda partikül boyutu ve enkapsülasyon verimi açısından en uygun bileşim ve oranlar seçilmiş, çalışmanın ilerleyen kısımlarında bu formülasyonlarla çalışmaya devam edilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız lipozom formülasyonları Bölüm 3.5.2’de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır, çalışmada kullanılan lipozom dispersiyonlarının bileşimi molar oranları ve kodları Tablo 5’te gösterilmiştir.

Tablo 5. Çalışmada kullanılan lipozom dispersiyonları ve kodları.

Lipozom Formülasyonu	Kodu
PC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE	PC _L
DSPC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE	DSPC _L
PC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE+KN- Ce6	PC _L -K
DSPC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE+KN-Ce6	DSPC _L -K
PC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE:FA-PEG 2000-DSPE	PC _L -FA
DSPC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE:FA-PEG 2000- DSPE	DSPC _L -FA
PC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE:FA-PEG 2000-DSPE+KN-Ce6	PC _L -FA-K
DSPC:Chol:SA:PEG 2000- DSPE:FA-PEG 2000-DSPE+KN-Ce6	DSPC _L -FA-K

4.3.3. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu

4.3.3.1. Veziküllerin Partikül Büyüklüklerinin ve Zeta Potansiyellerinin Tayini Bulguları

Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı ve zeta potansiyel değerleri Bölüm 3.6.1.’de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür. Sonuçlar Tablo 6’da verilmiştir.

Sonuçlardan görüldüğü üzere lipozomlara konjugat hapsedilmesi ile ve lipozomların yüzeyinin folik asit ile modifikasyonu ile partikül büyüklükleri artmıştır. Ayrıca DSPC ile hazırlanan tüm lipozomlar PC ile hazırlanan lipozomlardan daha büyük bulunmuştur. Ancak bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (Tablo 7).

Tüm formülasyonlar için PDI değerlerinin 0,1-0,2 arasında olması formülasyonların partikül büyüklüğü dağılımlarının homojen olduğunu göstermektedir.

Tablo 6. Lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü dağılımları ve zeta potansiyel sonuçları (n=6)

Formülasyon	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)
PC _L	168,4±3,8	0,136±0,015	-0,714±0,622
DSPCL	227,5±2,1	0,142±0,029	0,602±0,762
PC _L -K	196,4±4,9	0,208±0,015	-0,779±0,146
DSPCL-K	227,2±3,1	0,142±0,337	1,390±0,186
PC _L -FA	174,2±2,1	0,139±0,015	1,001±0,262
DSPCL-FA	208,1±2,6	0,112±0,187	-0,721±0,409
PC _L -FA-K	182,2±1,8	0,112±0,019	-2,381±0,208
DSPCL-FA-K	239,2±6,7	0,171±0,045	-2,138±0,262

Tablo 7. Farklı lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Karşılaştırılan Formülasyonlar	Sonuç
PC _L ile DSPCL	p>0,05
PC _L -K ile DSPCL-K,	p>0,05
PC _L -FA ile DSPCL-FA	p>0,05
PC _L -FA-K ile DSPCL-FA-K	p>0,05
PC _L ile PC _L -K	p>0,05
DSPCL ile DSPCL-K	p>0,05
PC _L ile PC _L -FA	p>0,05
PC _L -K ile PC _L -FA-K	p>0,05
DSPCL ile DSPCL-FA	p>0,05
DSPCL-K ile DSPCL-FA-K	p>0,05

Sonuçlardan görüldüğü üzere lipozomlara konjugat hapsedilmesi ile ve lipozomların yüzeyinin folik asit ile modifikasyonu ile zeta potansiyelde değişimler gözlenmiştir. Ancak bu değişimler küçük boyutlardadır. Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının stabilitesi için uygun zeta potansiyele sahiptir. Formülasyonlar arası zeta potansiyeller arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulunmamış olup sadece DSPCL-K ile DSPCL-FA-K formülasyonları arasında anlamlı bir farklılık olduğu bulunmuştur (Tablo 8).

Tablo 8. Farklı lipozom dispersiyonlarının zeta potansiyel değerlerinin istatistiksel karşılaştırılması

Karşılaştırılan Formülasyonlar	Sonuç
PC _L ile DSPCL	p>0,05
PC _L -K ile DSPCL-K,	p>0,05
PC _L -FA ile DSPCL-FA	p>0,05
PC _L -FA-K ile DSPCL-FA-K	p>0,05
PC _L ile PC _L -K	p>0,05
DSPCL ile DSPCL-K	p>0,05
PC _L ile PC _L -FA	p>0,05
PC _L -K ile PC _L -FA-K	p>0,05
DSPCL ile DSPCL-FA	p>0,05
DSPCL-K ile DSPCL-FA-K	p<0,05

4.3.3.2. İçte Tutulan KN-Ce6 Konjugat Miktarı ve Enkapsülasyon Verimine Ait Bulgular

Lipozom dispersiyonlarına hapsedilen KN-Ce6 konjugat miktarı Bölüm 3.6.2.'de anlatıldığı şekilde belirlenmiş ve sonuçlar Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Lipozom dispersiyonlarının içte hapsedilen etkin madde miktarı sonuçları (n=6)

Formülasyon	İçte tutulan Konjugat miktarı ($\mu\text{g/mL}$)	Enkapsülasyon verimi (%)
PC _L -K	9,5 \pm 0,5	24,5 \pm 5,4
PC _L -FA-K	6,1 \pm 0,6	15,7 \pm 8,2
DSPC _L -K	22,2 \pm 2,5	56,9 \pm 6,5
DSPC _L -FA-K	13,7 \pm 3,3	35,7 \pm 8,7

Elde edilen sonuçlardan da görüldüğü üzere DSPC lipozomlarının enkapsülasyon verimi PC lipozomlarından daha büyük bulunmuştur. Ayrıca yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş lipozomların hem PC hem DSPC lipozomlarında daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

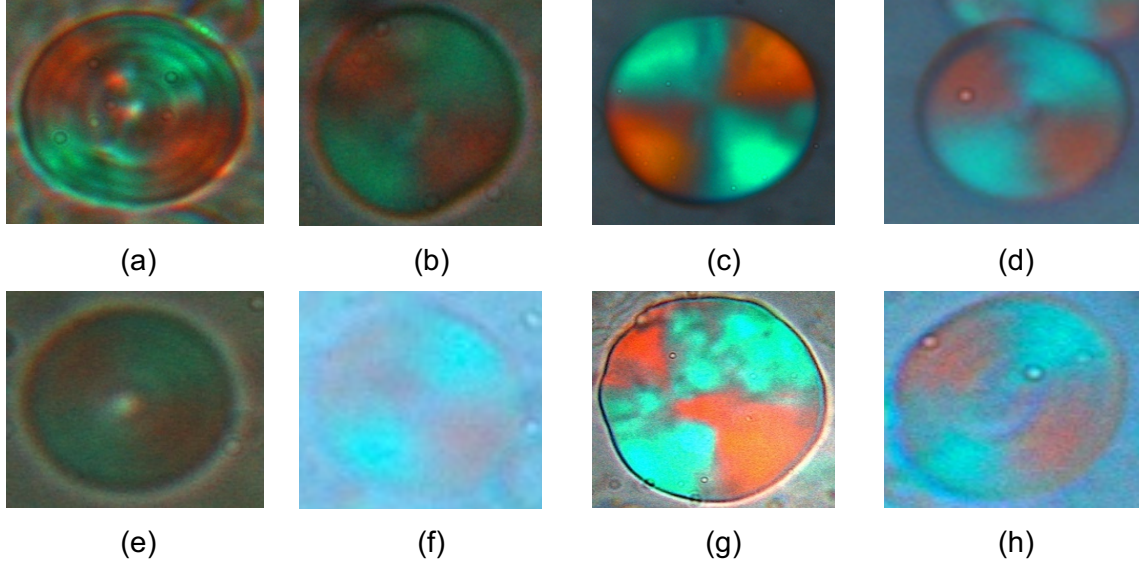
4.3.4. Lipozomların Mikroskopla Görüntülenmesine Ait Bulgular

4.3.4.1. Lipozomların Polarizan Mikroskop ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

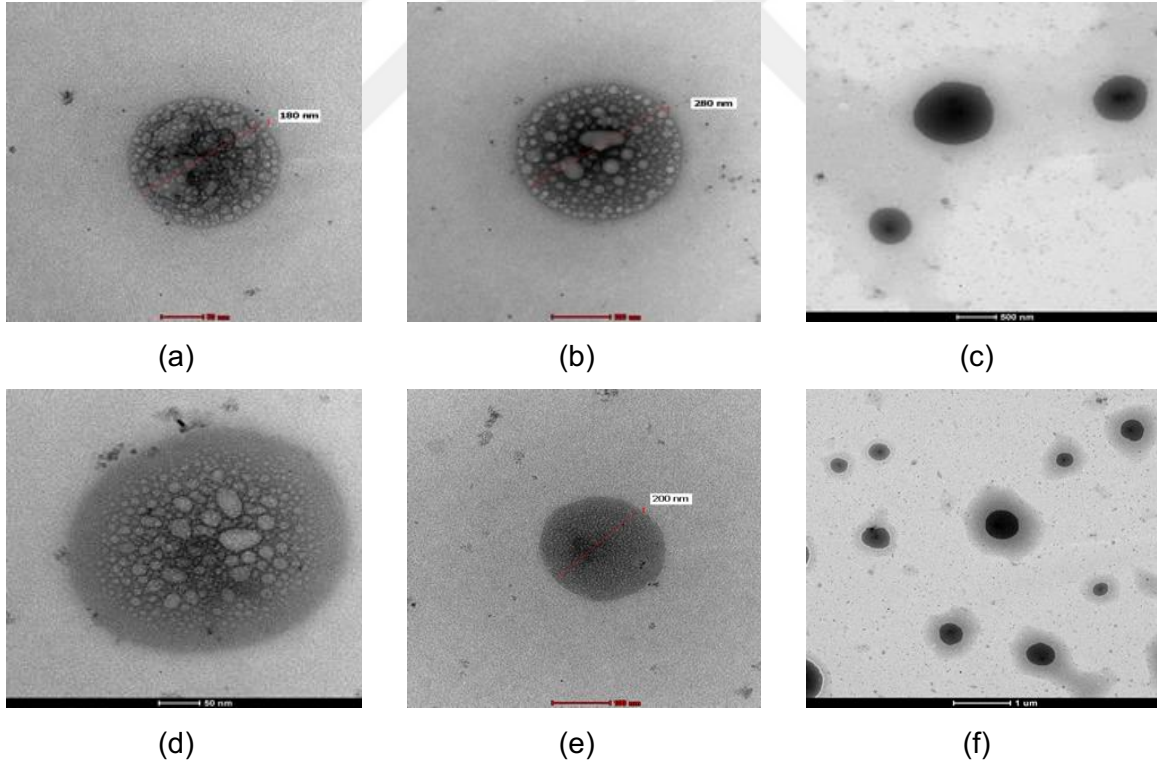
Lipozom dispersiyonları polarize mikroskopla Bölüm 3.6.3.1’de anlatıldığı şekilde görüntülenmiştir. Görüntüleme çalışmaları ekstrusyon öncesi yapılabilmektedir. Ekstrusyon sonrası lipozomların boyutu nanometre boyutuna indiği için polarize mikrosopla görüntülenmeleri mümkün olamamıştır. Polarize mikroskop görüntüleri Şekil 16 a-h’ de gösterilmiştir. Görüntülerden vezikül yapısı olduğu görülmüş ayrıca fosfolipitlere ve lipozomlara özgü sarı mavi çapraz bantlar da gözlenmiştir.

4.3.4.2. Lipozomların CTEM ile Görüntülenmesine Ait Bulgular

Lipozom dispersiyonları CTEM ile Bölüm 3.6.3.2’de anlatıldığı şekilde görüntülenmiştir. Ekstrusyon öncesi (Şekil 17 a-c) ve sonrasında (Şekil 17 d-f) farklı ölçeklerde CTEM görüntüleri verilmiştir. Görüntülerde içte hapsedilen konjugatın oluşturduğu kontrast farklılığı, konjugatın lipozom içine hapsedildiği doğrulamaktadır. Bu sonuçlar literatürde belirtilen diğer benzer uygulamalar ile uyumludur (107,108,109,110, 111,112).



Şekil 16 a-h. DSPC_L(a), DSPC_L-K(b), DSPC_L-FA(c), DSPC_L-FA-K(d), PC_L-K (e), PC_L-FA-K(f), PC_L(g), PC_L-FA(h) lipozom dispersiyonlarının polarizan ışık mikroskobu görüntüleri (x 40).



Şekil 17 a-f. PC_L-K lipozomların ekstrüzyon öncesi a) 50, b)100 c) 500 nm ölçeklerde ve ekstrüzyon sonrası d) 50, e)100, ve f) 1 µm ölçeklerde CTEM görüntüleri.

4.3.5. Lipozom Dispersiyonlarının Stabilité Çalışmalarına Ait Bulgular

Fiziksel stabilite çalışması Bölüm 3.7’ de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Bu kapsamda lipozom dispersiyonlarının iki farklı sıcaklıkta (+4°C ve 25°C) 6 ay bekletilen lipozomların önce görünüş olarak değerlendirilmiş, daha sonra enkapsülasyon verimi, ortalama boyut ve zeta potansiyel değerlerinde değişimler belirlenen zaman dilimlerinde (0, 1, 2, 3, 4, 5 ve 5. ay) izlenmiştir.

Tüm örneklerin görünüşünde 6 ay süresince bir değişiklik olmamıştır. Lipozomlarda faz ayrımı ve renk değişimi gözlenmemiştir. Enkapsülasyon verimi, ortalama partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel ölçüm sonuçları sırasıyla Tablo 10, Tablo 11 ve Tablo 12’ de verilmiştir.

Tablo 10. +4 ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının % enkapsülasyon verimleri

Zaman (ay)	Formülasyon	Saklama Sıcaklığı	
		+ 4 °C	25 °C
1	PC _L -K	75,5	83,7
	DSPC _L -K	100,0	100,0
2	PC _L -K	89,8	91,8
	DSPC _L -K	90,2	100,0
3	PC _L -K	97,9	60,6
	DSPC _L -K	100,0	100,0
4	PC _L -K	91,8	53,1
	DSPC _L -K	100,0	80,3
5	PC _L -K	75,5	69,4
	DSPC _L -K	88,5	78,7
6	PC _L -K	42,9	61,2
	DSPC _L -K	77,1	75,4

Sonuçlar karşılaştırıldığında her örnek alma zamanında, formülasyonlar arası (p=0,644) ve sıcaklıklar arası (p=0,212) istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Tablo 11. +4 ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının ort.partikül büyüklükleri(n= 6)

Zaman (ay)	Formülasyon	+ 4 °C		25 °C	
		Partikül Büyüküğü	PDI	Partikül Büyüküğü	PDI
1	PC _L -K	192.2±6,4	0.372±0,021	207.7±2,7	0.359±0,051
	DSPCL-K	196.8±3,2	0.136±0,032	197.4±2,8	0.118±0,025
2	PC _L -K	209,6±2,2	0,392±0,042	225,2±3,7	0,410±0,036
	DSPCL-K	203,8±8,2	0,215±0,027	191,5±2,5	0.150±0,025
3	PC _L -K	194,7±5,3	0,304±0,064	181,3±2,9	0,449±0,055
	DSPCL-K	201,5±7,2	0,207±0,051	197,9±1,9	0,126±0,094
4	PC _L -K	185,9±2,4	0,350±0,026	157,4±1,8	0,356±0,077
	DSPCL-K	191,3±5,1	0,128±0,054	199,5±3,5	0,202±0,016
5	PC _L -K	179,8±2,9	0,257±0,075	248,7±4,9	0,313±0,067
	DSPCL-K	245,1±2,1	0,326±0,025	190,7±2,3	0,193±0,043
6	PC _L -K	194,2±5,7	0,350±0,045	155,7±1,1	0,215±0,056
	DSPCL-K	217,3±9,7	0,251±0,039	219,6±4,4	0,244±0,029

Ortalama boyutlarlar arasındaki değerler üzerinden karşılaştırma yapıldığında her bir ayda formülasyonlar (p=0,706) ve sıcaklıklar arasındaki (4 ve 25°C) ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,977).

Ortalama PDI'lar arasındaki değerler üzerinden karşılaştırma yapıldığında her bir ayda formülasyonlar (p=0,222) ve sıcaklıklar arasındaki (4 ve 25°C) ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,849).

Tablo 12. +4°C ve 25°C bekletilen lipozom dispersiyonlarının zeta potansiyel değerlerindeki değişim (n= 6)

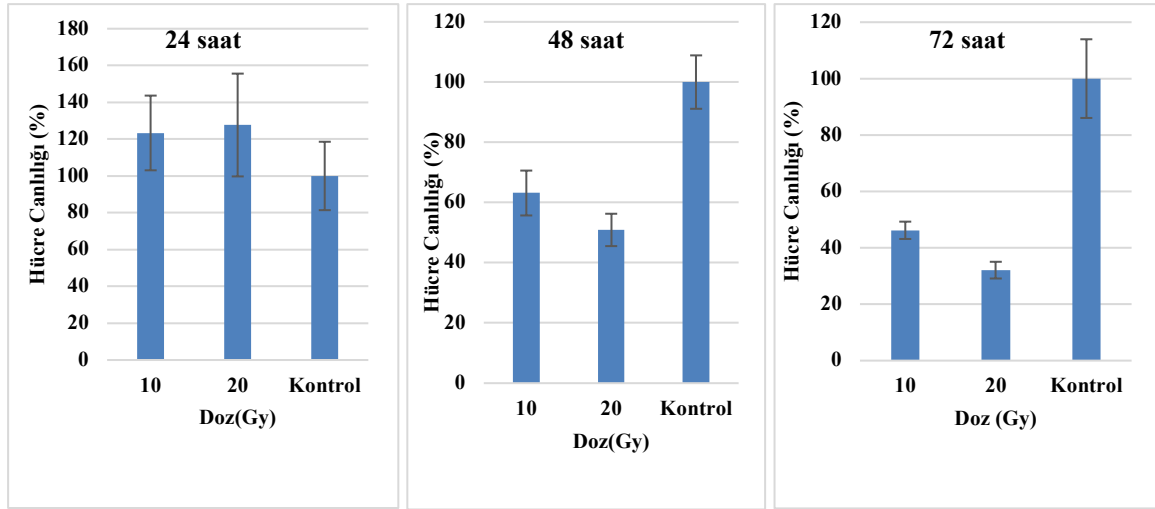
Zaman (ay)	Formülasyon	Zeta Potansiyel (mV)	
		+4°C	25 °C
1	PC _L -K	-4,6±0,5	-2.4±0,9
	DSPC _L -K	1.2±0,9	3,2±0,2
2	PC _L -K	-4,5±0,2	-2.4±1,1
	DSPC _L -K	1.3±0,8	3,2±0,8
3	PC _L -K	-5,1±0,7	-5,5±0,9
	DSPC _L -K	4,3±0,9	3.4±1,2
4	PC _L -K	-3,7±1,2	-4,1±0,7
	DSPC _L -K	4,4±0,8	4,6±0,7
5	PC _L -K	-5,2±0,6	-7,9±1,7
	DSPC _L -K	4,3±0,4	4,2±0,6
6	PC _L -K	-2,9±0,7	-7,8±1,7
	DSPC _L -K	4,9±0,9	3,1±1,6

Ortalama zeta potansiyel değerleri arasındaki değerler üzerinden karşılaştırma yapıldığında her bir ayda formülasyonlar (p=0,101) ve sıcaklıklar arasındaki (4 ve 25°C) ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır (p=0,907).

4.4. Hücre Kültür Çalışmasına Ait Bulgular

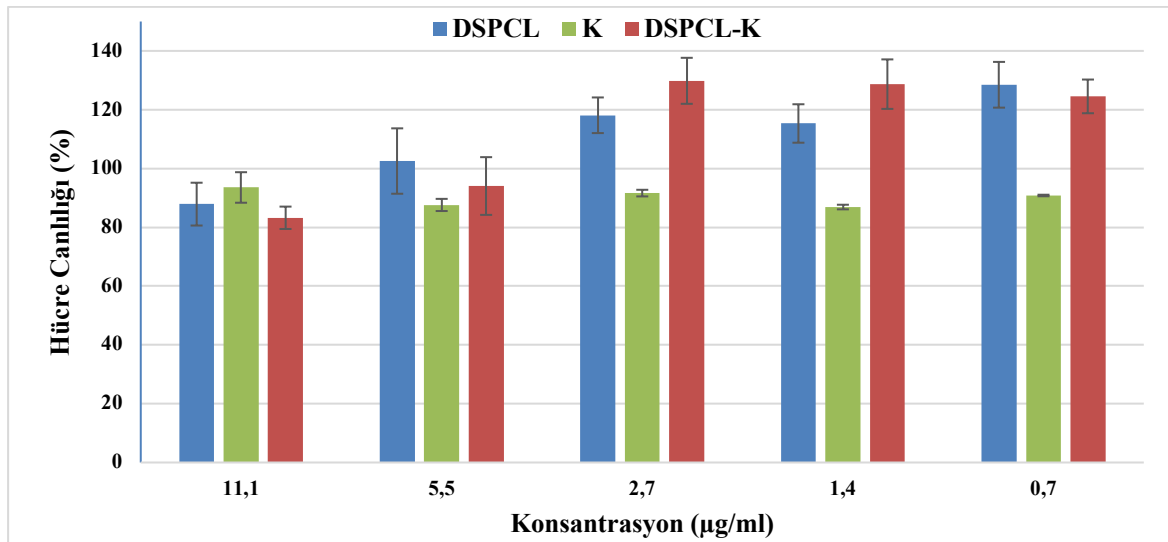
4.4.1. Hücrelere Uygulanan Konjugat Dozunu Belirleme Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.8.2' de anlatıldığı şekilde doz belirlenmeye çalışılmıştır. Öncelikle ışınlama sonrası MTT testi yapmadan önce hücrelerin ne kadar süre bekletilmesi gerektiğinin belirlenmesi için formülasyonlar uygulanmadan sadece hücreleri içeren plaklar farklı dozlarla ışınlanmış ve 24, 48 ve 72 saat bekletilerek optimum bekleme süresi belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 18'de gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre 72 saat bekleme süresinin en uygun süre olduğu bulunmuştur.

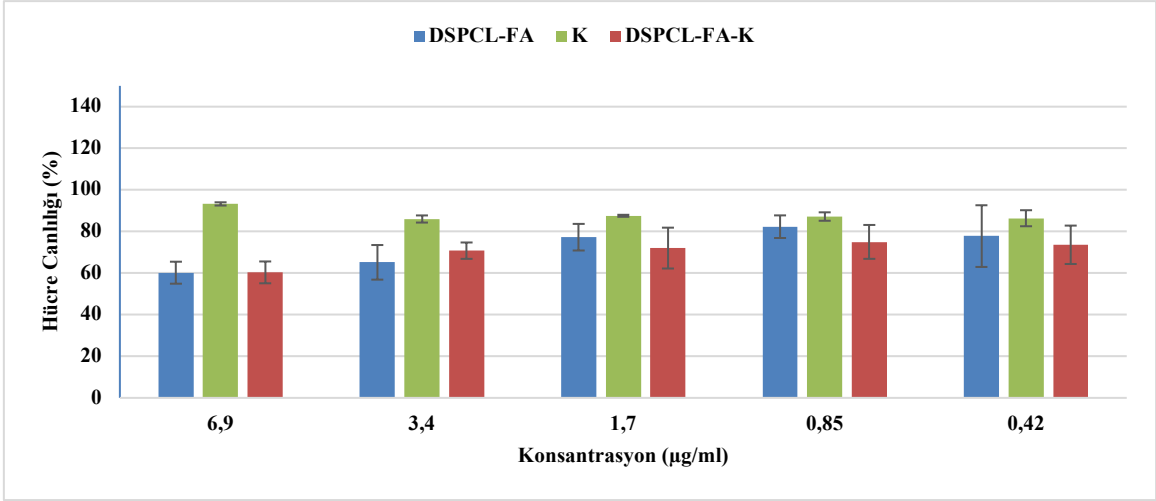


Şekil 18. 4T1 hücrelerinin 10, 20 Gy X ışını dozu uygulandıktan sonra 24, 48, 72 saat bekleme sonrasında hücre canlılığı sonuçları

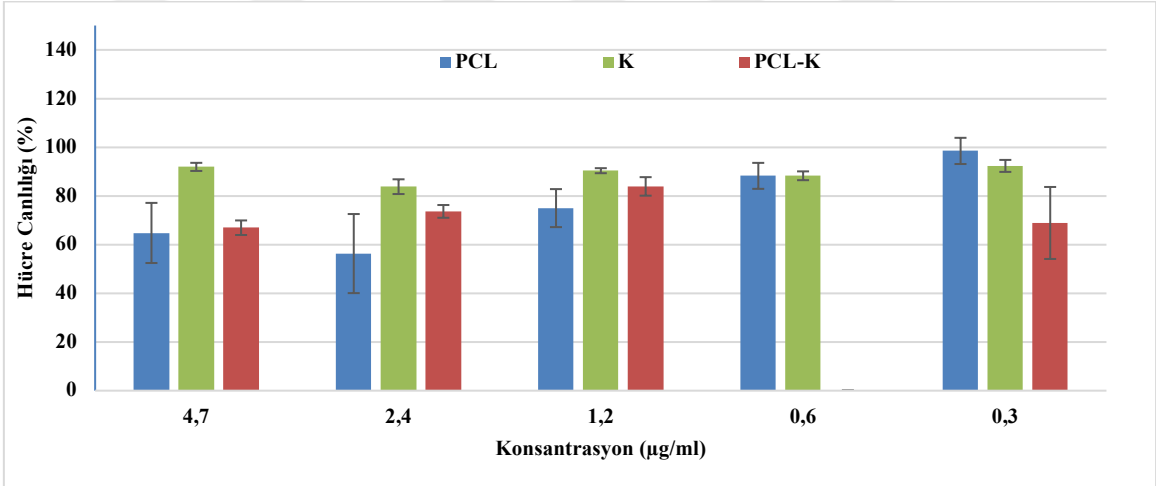
Daha sonra 10×10^3 ve 2×10^3 hücre/kuyucuk olacak şekilde iki farklı hücre sayısı ile deneyler yapılmıştır. Şekil 19-20' de DSPC lipozomlarının 10×10^3 hücre/kuyucuk ile elde edilen sonuçları, Şekil 21-22' de PC lipozomlarının 10×10^3 hücre/kuyucuk ile elde edilen sonuçları verilmiştir. PC lipozomları şaşırtıcı bir şekilde boş lipozomlar da dahil olmak üzere hücre canlılığı çok düşük çıkmıştır. Bu nedenle daha sonraki deneylere DSPC lipozomları ile devam edilmiştir.



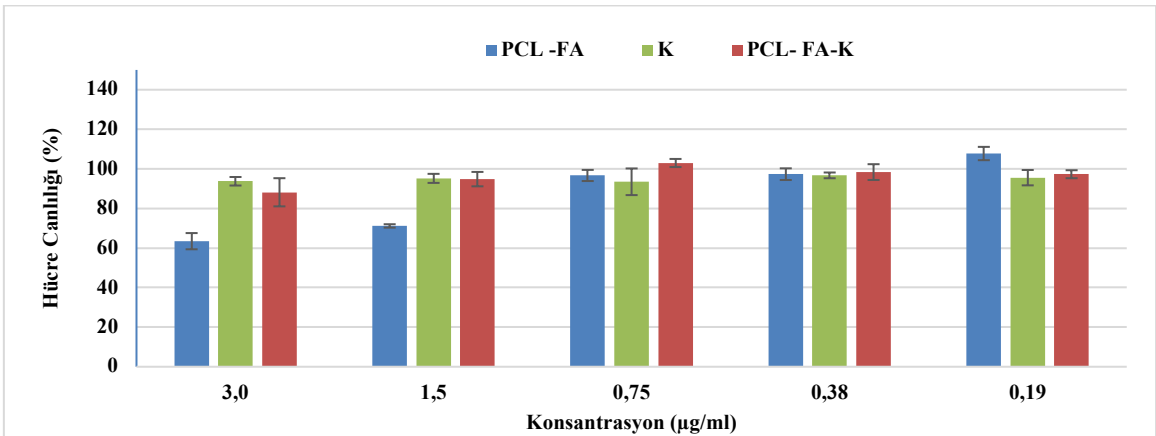
Şekil 19. DSPCL, DSPCL-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10×10^3 hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi



Şekil 20. DSPCL-FA, DSPCL-FA-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10×10^3 hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi

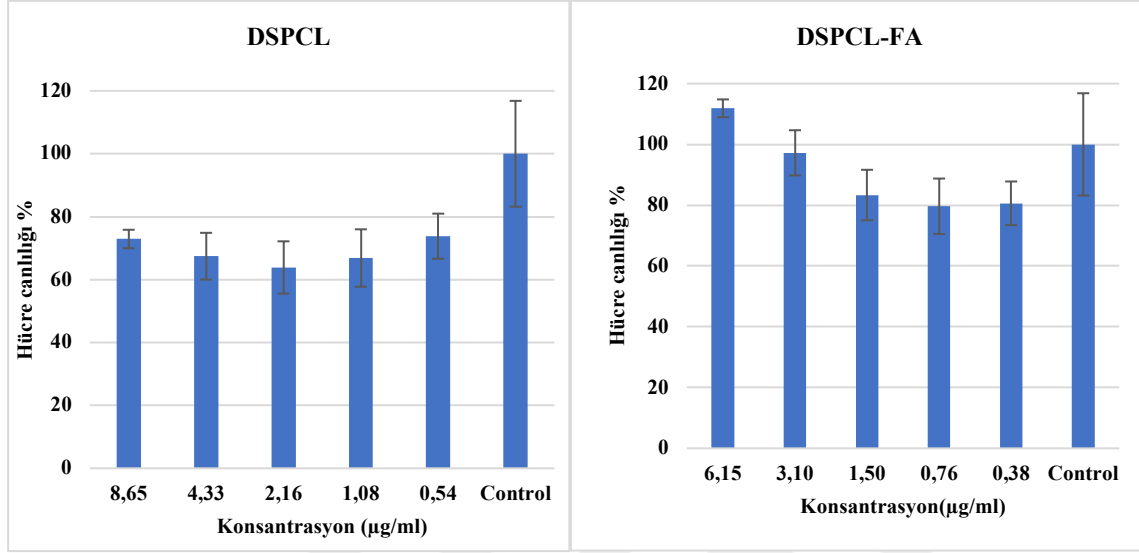


Şekil 21. PCL, PCL-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10×10^3 hücre / kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi

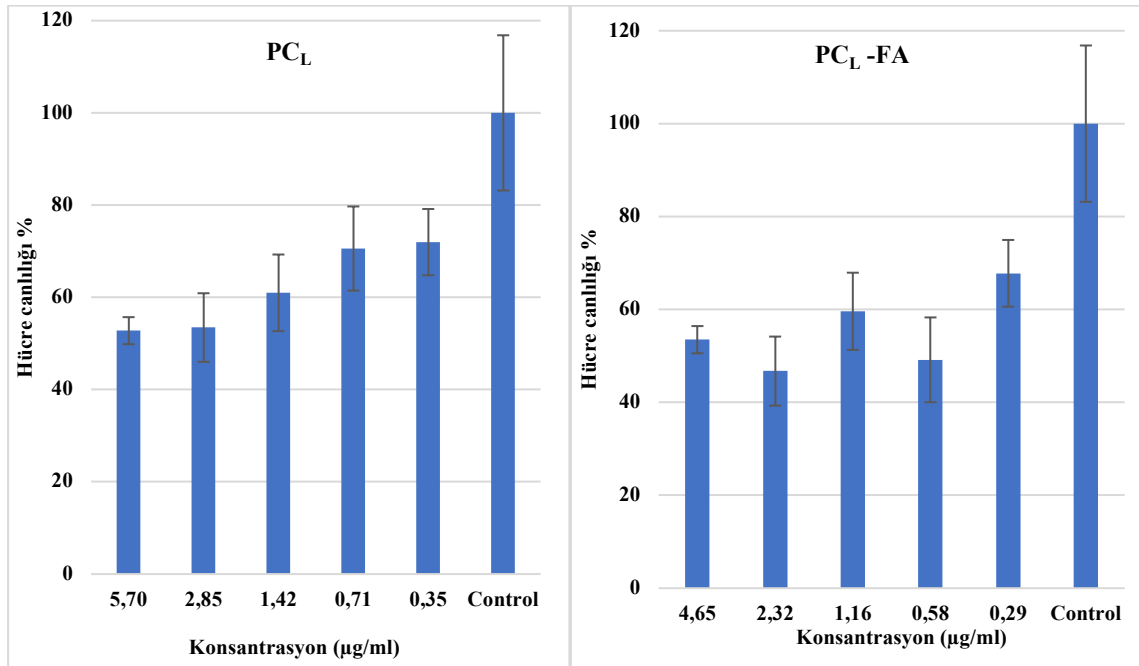


Şekil 22. PCL-FA, PCL-FA-K ve serbest konjugatın farklı konsantrasyonlarının 10×10^3 hücre/ kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi

Şekil 23-24' de ise 2×10^3 hücre/kuyucuk ile elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. Sonuç olarak 2×10^3 ve 10×10^3 hücre/kuyucuk hücre sayısında tüm formülasyonlar için hücelere uygulanacak doz olarak $3 \mu\text{g/mL}$ belirlenmiştir. Ayrıca elde edilen sonuçlarda 2×10^3 hücre/kuyucuk ile daha iyi sonuçlar alındığı görülmüştür.



Şekil 23. 4T1 hücre kültürü kullanılarak 72 saat bekleme sonrasında DSPCL ve DSPCL-FA'nin farklı konsantrasyonları için 2×10^3 hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi.



Şekil 24. 4T1 hücre kültürü kullanılarak 72 saat bekleme sonrasında PCL ve PCL-FA'nin farklı konsantrasyonları için 2×10^3 hücre/kuyucuk 4T1 hücrelerine etkisi.

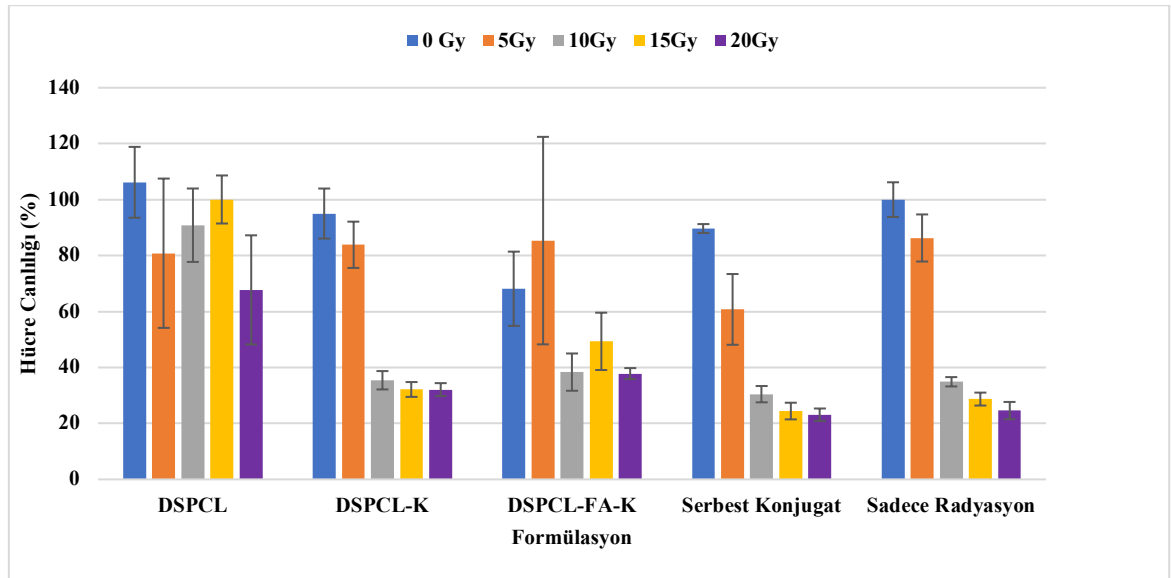
4.4.2. 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Stotoksik Etkilerinin İncelenmesine Ait Bulgular

4.4.2.1. Ön Çalışmalara Ait Bulgular

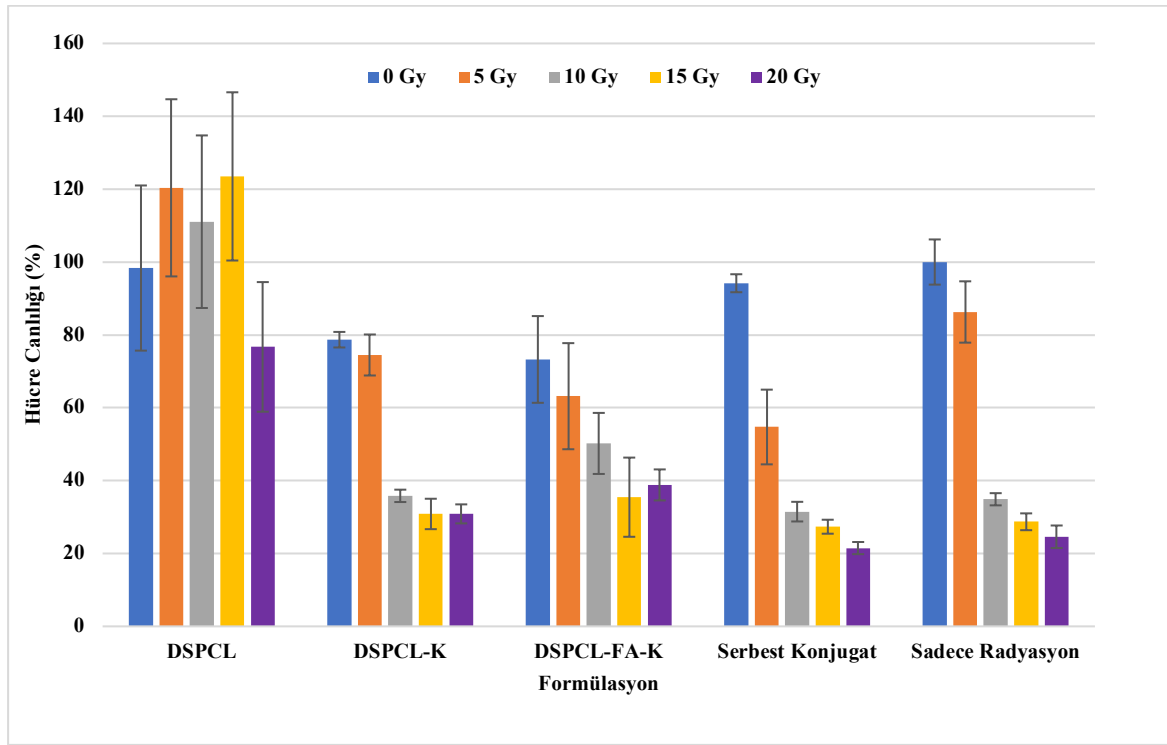
Optimum çalışma koşullarını belirlemek için Bölüm 3.9.1’de anlatıldığı şekilde ön çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalar ışığında; 2×10^3 hücre/kuyucuk hücre sayısı, formülasyonlar uygulandıktan sonra 4 saat inkübasyon süresi, 0,5,10,15 ve 20 Gy ışınlama dozu ve ışınlama sonrasında 72 saat bekleme süresi optimum koşul olarak belirlenmiştir.

4.4.2.2. Lipozom Formülasyonlarının 4T1 Tümör Hücreleri Üzerindeki Stotoksik Etkilerinin İncelenmesine Ait Bulgular

Bölüm 3.9.2’ de anlatıldığı şekilde serbest konjugat ve lipozom dispersiyonlarının stotoksik etkileri incelenmiştir. Bu çalışma için belirlenen doz olan belirtilen 3 $\mu\text{g/mL}$ doz ve daha düşük doz olarak da 1.5 $\mu\text{g/mL}$ doz seçilmiştir. Ön çalışmalarda belirlenen formülasyonlar 4 saat inkübasyon sonrasında, 5-10-15-20 Gy radyasyon dozlarında ışınlama yapılmış ve ışınlama sonrasında 72 saat bekleme süresi ile sonrasında MTT testi ile hücre canlılıkları belirlenmiştir. Sonuçlar Şekil 25 ve Şekil 26’da gösterilmiştir.

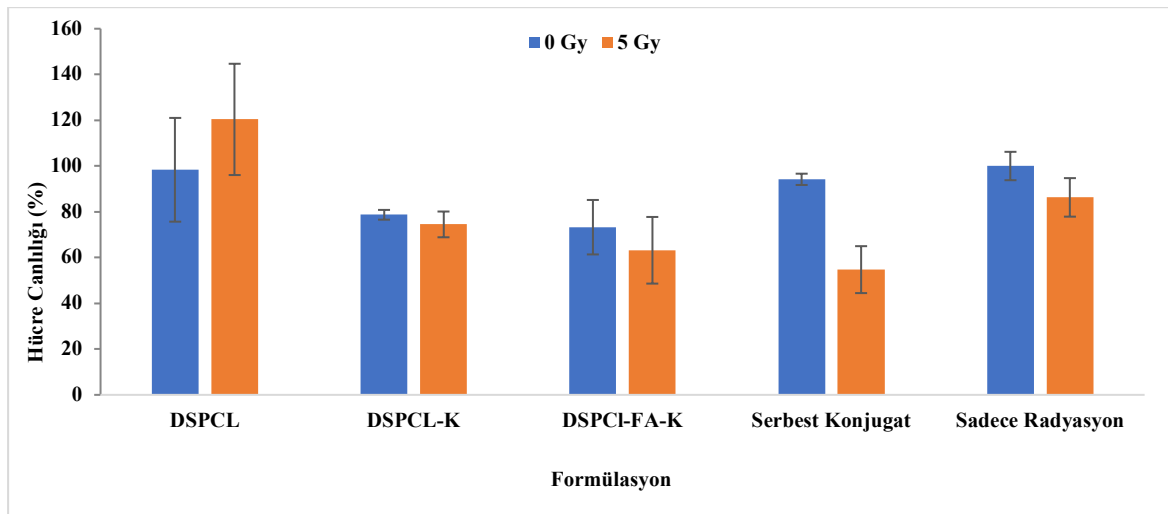


Şekil 25. 1,5 $\mu\text{g/mL}$ konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 4T1 hücre canlılığı sonuçları (formülasyonlarla inkübasyon: 4 saat; ışınlama dozları; 5-10-15-20 Gy ve ışınlama sonrası bekleme süresi: 72 saat).

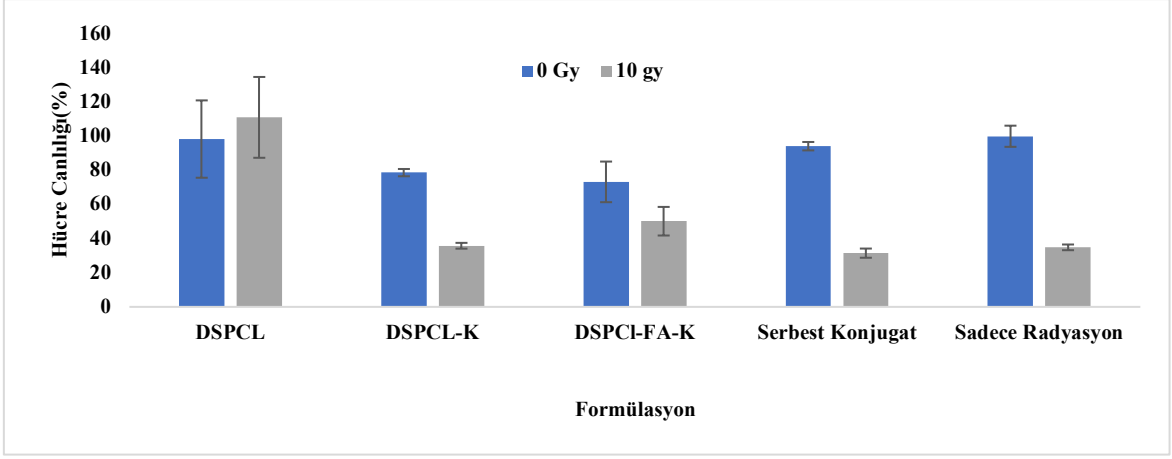


Şekil 26. 3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 4T1 hücre canlılığı sonuçları (formülasyonlarla inkübasyon: 4 saat; ışınlama dozları; 5-10-15-20 Gy ve ışınlama sonrası bekleme süresi: 72 saat).

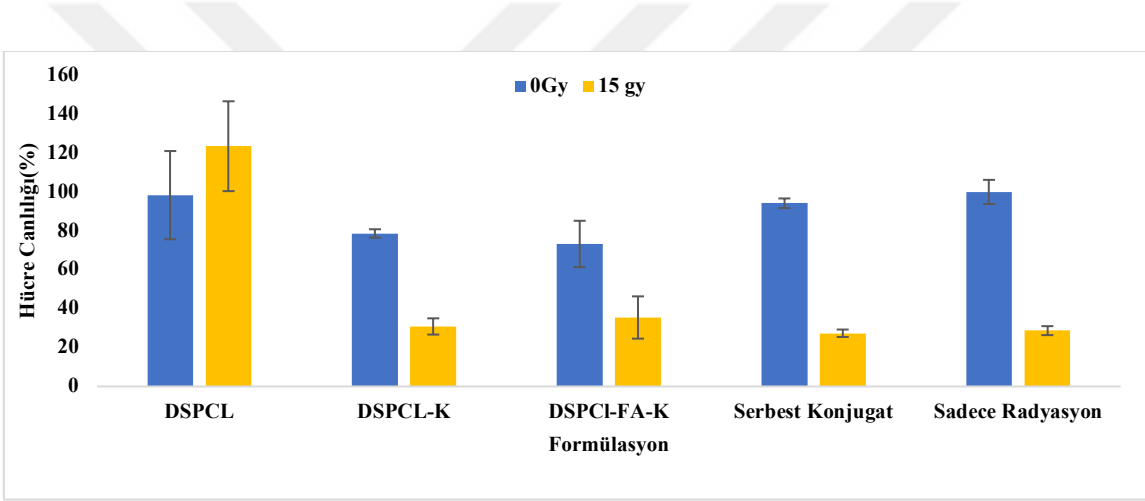
Dozların tek başına hücre canlılığı üzerindeki etkisini görebilmek için 5 Gy, 10 Gy, 15 Gy ve 20 Gy doz ile ışınlamanın hiç ışınlanmamış hücrelerin canlılığı ile karşılaştırma grafikleri sırasıyla Şekil 27-30'da verilmiştir.



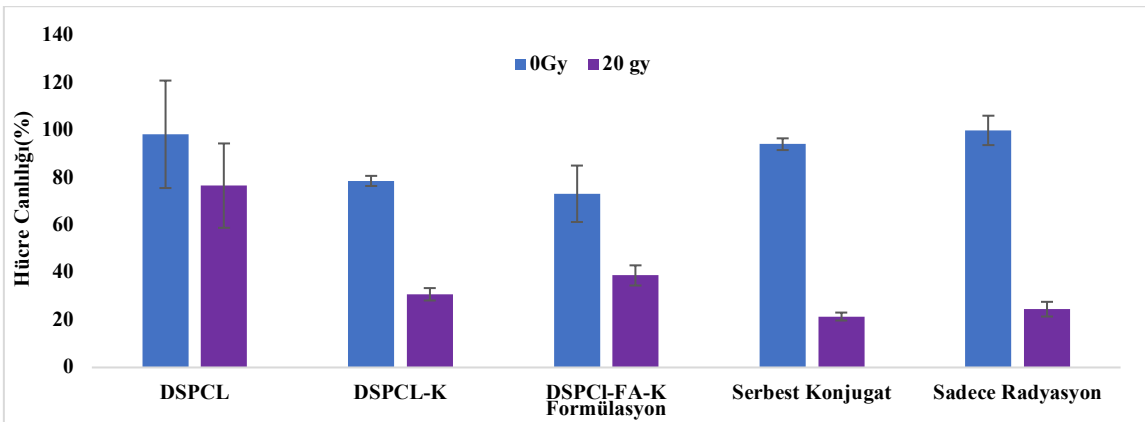
Şekil 27. 3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 5 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.



Şekil 28. 3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 10 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.



Şekil 29. 3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 15 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.



Şekil 30. 3 µg/mL konsantrasyonda etkin madde içeren DSPC lipozomlarının 20 Gy ışınlama sonrası 4T1 hücre canlılığının, ışınlanmamış hücrelerin canlılığına karşı karşılaştırması.

Hücre kültürü çalışmasında her bir doz değerinde gruplar arası karşılaştırmalarda; 0,5,10,15 ve 20 Gy’de formülasyonlar arasında istatistiksel olarak ciddi derecede anlamlı bir farklılık olduğu görülmüştür. Ancak ikili karşılaştırmalarda düzeltme yapıldıktan sonra bazı gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p>0,05$). Sonuçlar tablolar halinde verilmiştir (Tablo 13-17).

Tablo 13. Radyasyon uygulanmayan gruplarda formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).

Formülasyon	DSPCL	DSPCL- K	DSPCL- FA	DSPCL-FA-K	Serbest Konjugat
DSPCL	-	1,000	*0,002	1,000	1,000
DSPCL- K	1,000	-	*0,034	1,000	1,000
DSPCL- FA	*0,002	*0,034	-	0,467	*0,001
DSPCL-FA-K	1,000	1,000	0,467	-	0,841
Serbest Konjugat	1,000	1,000	*0,001	0,841	-

* $p<0.05$

Tablo 14. 5 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).

Formülasyon	DSPCL	DSPCL- K	DSPCL- FA	DSPCL-FA-K	Serbest Konjugat	Sadece Radyasyon
DSPCL	-	0,429	*0,001	*0,062	*0,022	1,000
DSPCL- K	0,429	-	*0,001	1,000	1,000	1,000
DSPCL- FA	*0,001	*0,001	-	1,000	1,000	1,000
DSPCL- FA-K	*0,062	1,000	1,000	-	1,000	0,449
Serbest Konjugat	*0,022	1,000	1,000	1,000	-	*0,157
Sadece Radyasyon	1,000	1,000	1,000	0,449	*0,157	-

* $p<0.05$

Tablo 15. 10 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).

Formülasyon	DSPC _L	DSPC _L -K	DSPC _L -FA	DSPC _L -FA-K	Serbest Konjugat	Sadece Radyasyon
DSPC _L	-	0,394	*0,001	1,000	*0,005	*0,058
DSPC _L - K	0,394	-	0,241	1,000	1,000	1,000
DSPC _L - FA	*0,001	0,241	-	*0,002	1,000	0,209
DSPC _L -FA-K	1,000	1,000	*0,002	-	*0,075	0,690
Serbest Konjugat	*0,005	1,000	1,000	*0,075	-	1,000
Sadece Radyasyon	*0,058	1,000	0,209	0,690	1,000	-

* $p < 0.05$

Tablo 16. 15 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).

Formülasyon	DSPC _L	DSPC _L -K	DSPC _L -FA	DSPC _L -FA-K	Serbest Konjugat	Sadece Radyasyon
DSPC _L	-	0,673	*0,001	1,000	*0,046	*0,044
DSPC _L - K	0,673	-	0,156	1,000	1,000	*1,000
DSPC _L - FA	*0,001	0,156	-	*0,034	1,000	*0,323
DSPC _L -FA-K	1,000	1,000	*0,034	-	1,000	1,000
Serbest Konjugat	*0,046	1,000	1,000	1,000	-	1,000
Serbest Konjugat	*0,044	1,000	0,323	1,000	1,000	-

* $p < 0.05$

Tablo 17. 20 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonların hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması (p değerleri).

Formülasyon	DSPC _L	DSPC _L -K	DSPC _L -FA	DSPC _L -FA-K	Serbest Konjugat	Sadece Radyasyon
DSPC _L	-	1,000	*0,001	1,000	*0,002	*0,018
DSPC _L - K	1,000	-	*0,082	1,000	0,498	1,000
DSPC _L - FA	*0,001	*0,082	-	*0,004	1,000	0,958
DSPC _L -FA-K	1,000	1,000	*0,004	-	*0,041	0,280
Serbest Konjugat	*0,002	0,498	1,000	*0,041	-	1,000
Serbest Konjugat	*0,018	1,000	0,958	0,280	1,000	-

* $p < 0.05$

Tüm bu ışınlama dozlarından elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında en iyi etkinin 5 Gy ışınlama dozu ile elde edildiği görülmüştür. 5 Gy ışınlama dozunda farklı formülasyonların hücre ölümündeki neden olduğu artışlar Tablo 18’ de gösterilmiştir.

Tablo 18. 5 Gy radyasyon dozunda farklı formülasyonların hücre ölümü üzerindeki etkisinin karşılaştırması

Karşılaştırılan Gruplar	Hücre Ölümündeki Artış (%)	İstatistiksel Değerlendirme
Sadece radyasyon ve Serbest konjugat	36,5 ± 1,2	($p < 0,05$)
Sadece radyasyon ve DSPC _L -K	16,5 ± 0,67	$p > 0,05$
Sadece radyasyon ve DSPC _L -FA-K	27,1 ± 1,7	($p < 0,05$)
DSPC _L -K ve DSPC _L -FA-K	15,4 ± 1,7	$p > 0,05$

Tek başına 5 Gy X ışını radyasyon dozunun neden olduğu hücre ölümü, tek başına etkin madde içermeyen DSPC lipozomlarının (DSPC_L) neden olduğu hücre ölümü ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde önemli bir değişime sebep olmadığı görülmüştür ($p > 0,05$).

Tek başına 10 Gy X ışını radyasyon dozunun neden olduğu hücre ölümü, tek başına DSPCL, DSPCL-K ve DSPCL-FA-K lipozomlarının neden olduğu hücre ölümü ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde önemli bir değişime sebep olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Yine tek başına 15 Gy X ışını ve tek başına 20 Gy radyasyon dozunun neden olduğu hücre ölümleri, tek başına DSPCL, DSPCL-K ve DSPCL-FA-K lipozomlarının neden olduğu hücre ölümleri ile karşılaştırıldığında hücre canlılığı üzerinde önemli bir değişime sebep olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Formülasyonların ve tek başına radyasyonun, artan radyasyon dozları ile hücre ölümleri üzerinde yarattığı etki incelendiğinde dozla birlikte hücre canlılığının azaldığı görülmüştür. İstatistiksel karşılaştırma sonuçları Sonuçlar Tablo 19-24'de gösterilmiştir.

Tablo 19. DSPCL formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000	p=1,000	p=0,892	p=1,000
5	p=1,000	-	p=1,000	p=1,000	P=0,118
10	p=1,000	p=1,000	-	p=1,000	p=0,356
15	p=0,892	p=1,000	p=1,000	-	p=0,042
20	p=1,000	p=0,118	p=0,356	p=0,042	-

Tablo 20. DSPCL-K formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000	p=0,434	p=0,008	p=0,007
5	p=1,000	-	p=1,000	p=0,040	p=0,035
10	p=0,434	p=1,000	-	p=1,000	p=1,000
15	p=0,008	p=0,040	p=1,000	-	p=1,000
20	p=0,007	p=0,035	p=1,000	p=1,000	-

Tablo 21. DSPC_L-FA formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000	p=0,026	p=0,017	p=0,004
5	p=1,000	-	p=0,532	p=0,392	p=0,143
10	p=0,026	p=0,532	-	p=1,000	p=1,000
15	p=0,017	p=0,392	p=1,000	-	p=1,000
20	p=0,004	p=0,143	p=1,000	p=1,000	-

Tablo 22. DSPC_L-FA-K formülasyonu için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000		p=0,007	p=0,015
5	p=1,000	-	p=1,000	p=0,077	p=0,143
10	p=0,857	p=1,000	-	p=0,938	p=1,000
15	p=0,007	p=0,077	p=0,938	-	p=1,000
20	p=0,015	p=0,143	p=1,000	p=1,000	-

Tablo 23. Serbest konjugat için artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000	p=0,504	p=0,040	p=0,001
5	p=1,000	-	p=1,000	p=0,455	p=0,014
10	p=0,504	p=1,000	-	p=1,000	p=0,252
15	p=0,040	p=0,455	p=1,000	-	p=1,000
20	p=0,001	p=0,014	p=0,252	p=1,000	-

Tablo 24. Tek başına artan radyasyon dozunun hücre canlılığı üzerine etkisinin istatistiksel karşılaştırılması

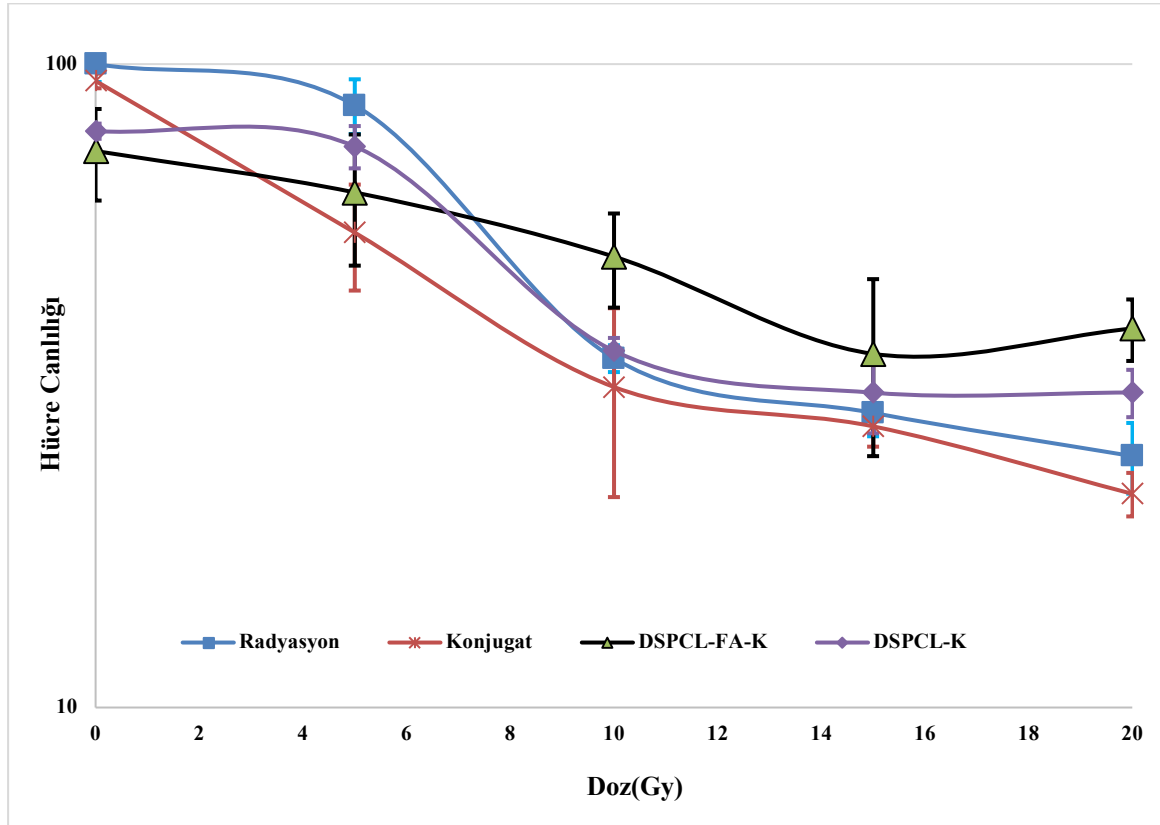
Radyasyon Dozları (Gy)	0	5	10	15	20
0	-	p=1,000	p=0,504	p=0,040	p=0,001
5	p=1,000	-	p=1,000	p=0,455	p=0,014
10	p=0,504	p=1,000	-	p=1,000	p=0,252
15	p=0,040	p=0,455	p=1,000	-	p=1,000
20	p=0,001	p=0,014	p=0,252	p=1,000	-

Serbest konjugat ve lipozom dispersiyonlarının hücre ölümleri üzerindeki etkisini daha iyi değerlendirebilmek için log hücre canlılığı radyasyon dozuna karşı grafiklendirilmiştir. Bu grafikten yola çıkılarak Sensitörün Duyarlaştırma Oranı (SER= *Sensitizer Enhancement Ratio*) değeri hesaplanmıştır. SER değeri, bir duyarlaştırıcının etkinliğini göstermektedir ve duyarlaştırıcının duyarlılaştırma oranı olarak bilir. Bu değer aynı biyolojik etkiyi elde etmek için radyoduyarlaştırıcı kullanılmayan ve radyoduyarlaştırıcı kullanılan koşullarda uygulanması gereken dozların oranı olarak hesaplanır (Eşitlik 6) ve bugüne kadar literatürde yapılan çalışmalarda farklı radyoduyarlaştırıcıların SER oranı 1,5 ile 2 arasında değiştiği rapor edilmiştir(6).

SER = Radyoduyarlaştırıcı yokluğundaki doz / Radyoduyarlaştırıcı varlığındaki doz (Eşitlik6)

Şekil 31'de tek başına radyasyonun 0-5 Gy doz aralığından elde edilen doğru denklemde, konjugat ve 5 Gy radyasyon dozu kullanılarak elde edilen hücre canlılığı verileri bu denklemde yerine konularak; tek başına radyasyon ve konjugat ile tek başına radyasyon uygulamasından elde edilen hücre canlılığı verilerinin uygulanan radyasyon dozunda nasıl bir değişim yarattığı yani konjugat uygulamasının ne kadar bir doz arttırımına sebep olduğu hesaplanmıştır. Bu hesaplamalara göre konjugat tek başına uygulandığında yani 0 Gy radyasyon dozunda 2,12 Gy radyasyonun etkisi gibi davranmakta, konjugat ile birlikte 5 Gy radyasyon uygulandığında bu oran artarak 16,51 Gy gibi bir farklılık yaratmaktadır. Buradan SER oranı = 16,5/5 = 3,3 olarak hesaplanmıştır. Aynı şekilde

DSPCL-FA-K için 0 Gy radyasyon dozunda 9,8 Gy, DSPCL-FA-K için 5 Gy radyasyon dozunda 13,4 Gy, $SER = 13,4/5 = 2,7$, DSPCL-K için 0 Gy radyasyon dozunda 7,8 Gy, DSPCL-K için 5 Gy radyasyon dozunda 9,3 Gy, $SER = 9,3/5 = 1,9$ olarak bulunmaktadır. Ancak doz arttıkça bu oran küçülmektedir. Her durumda en duyarlı olan ya da hücreyi en duyarlı hale getiren konjugat kullanımıdır.



Şekil 31. Hücre kültürü sonuçlarından elde edilen hücre canlılığına karşılık uygulanan doz yarı logaritmik grafiği

Sonuç olarak;

- 5 Gy'lik ışınlama dozunda lipozom formülasyonu ve serbest konjugatın radyasyonla birlikte kullanılması ile radyasyonun tek başına uygulanması durumunda tümör hücreleri üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında;
- DSPCL-FA-K + X ışınının tümör hücre hatlarında sebep olduğu hücre ölümünün tek başına X ışınının sebep olduğu hücre ölümlerinden $\% 27,1 \pm 1,73$ ' daha fazla olduğu ($p < 0,05$),

- Serbest konjugat + X ışınının hücre hatlarında sebep olduğu hücre ölümünün tek başına X ışınının sebep olduğu hücre ölümlerinden % 36,5±1,22 daha fazla olduğu ($p<0,05$) görülmüştür.
- Optimum koşullarda doz, konsantrasyon ve ışınlama öncesi ve sonrası inkübasyon zamanı uygulama sonrası elde edilen sonuçların karşılaştırılması ile konjugat içeren lipozom dispersiyonları ile düşük X ışını dozunda (5 Gy) daha fazla hücre ölümü sağladığı, yine düşük dozda (5 Gy) konvansiyonel ve tümöre spesifik lipozomlardan elde edilen sonuçların karşılaştırılması ile yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş lipozomların spesifik olarak tümör hücresine bağlandığı, bu şekilde etkinin arttığı gösterilmiştir.

4.5. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulgular

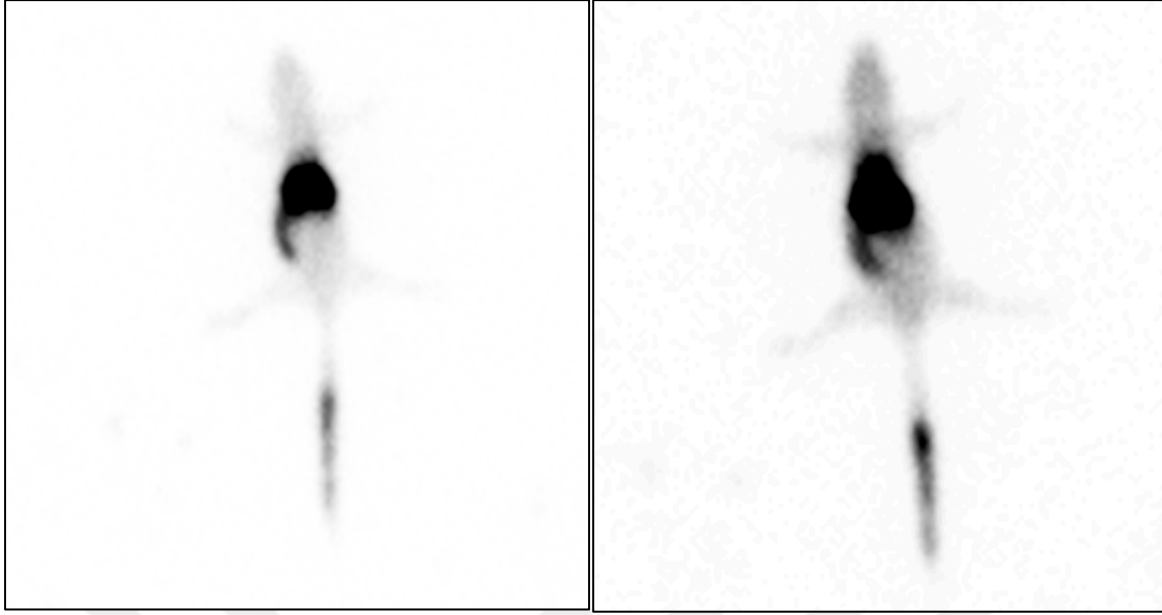
4.5.1. Tümör Görüntüleme Çalışması

4.5.1.1.Lipozom Dispersiyonlarının Tc-99m İle İşaretlenmesi ve İşaretlemenin Kalite Kontrolüne Ait Bulgular

Bölüm 3.10.2.1.'de anlatıldığı şekilde işaretleme çalışması ve işaretlemenin kalite kontrolü yapılmıştır. Eşitlik (3) kullanılarak hesaplanan işaretleme verimi % 90 bulunmuştur.

4.5.1.2. Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular

Bölüm 3.10.2.2.'de belirtilen koşullarda yapılan görüntüleme çalışmaları sonrasında elde edilen görüntüler Şekil 32' de verilmiştir. Bu safhada görüntü elde edilmesine karşın tümör tutulumu tam olarak belirlenememiştir. Bunun için görüntüleme çalışması sonrasında yaklaşık 5-6 saat sonra hayvanlar sakrifiye edilerek tümör aktivitesi gama sayıcı ile ölçülmüş ve aktivitenin diğer ayak ve çevre dokulara nazaran daha fazla olduğu tespit edilmiştir (sonuçlar burada verilmemiştir).



Şekil 32. Enjeksiyondan sonra sırasıyla 0. ve 3. saatlerde çekilen planar sintigrafik görüntüler

4.5.2. Lipozom Dispersiyonlarının Antitümöral Etkinliğinin İnVivo İncelenmesine Ait Bulgular

4.5.2.1. Tedavi Planlaması Sonuçları

Bölüm 3.10.3.1’ de anlatıldığı şekilde yapılan TPS’den elde edilen doz dağılımı ve doz volüm histogramları (DVH) değerlendirilerek tümör hacimlerinin belirlenen dozu aldığı değerlendirilmiştir. Şekil 33 a-c’ de Grup II’de yer alan fareler, Şekil 33 d-f’ de Grup III’de yer alan fareler üzerinde yapılan planlamalara ait görüntüler ve hesaplamalar verilmiştir. Hedef hacimde homojen doz tanımı Uluslararası Radyasyon Birimleri ve Ölçümleri Komitesi (International Commission on Radiation Units and Measurements=ICRU)’nun 50 no’lu raporu (113)’na göre $\pm\%5$ sınırları arasında bildirilmektedir. Elde edilen değerlerden bu sınırlar içerisinde bir doz dağılımı elde edilmiş tümör hücrelerinin 10 Gy dozu aldığı planlamadan elde edilen DVH’lerden görülmüştür.

4.5.2.2.Tedavi Etkinliğinin İzlenmesi

4.5.2.2.1. Farelerin Vücut Ağırlıklarındaki Değişimin Saptanması

Bölüm 3.10.1.'de anlatıldığı gibi tümör oluşturulmuş farelerin vücut ağırlıkları ölçülmüş, vücut ağırlık değerleri ve başlangıç ağırlıklarına göre % ağırlık değişimleri Tablo 25-26 ve Şekil 34' de gösterilmiştir.

0, 5,10,13 ve 14. günlerde farelerin vücut ağırlıklarındaki değişimi incelendiğinde 1. grupta yer alan hayvanların vücut ağırlıklarında azalış olduğu, Grup II. ve Grup III' te yer alan hayvanların vücut ağırlıklarında ise artış olduğu görülmüştür.

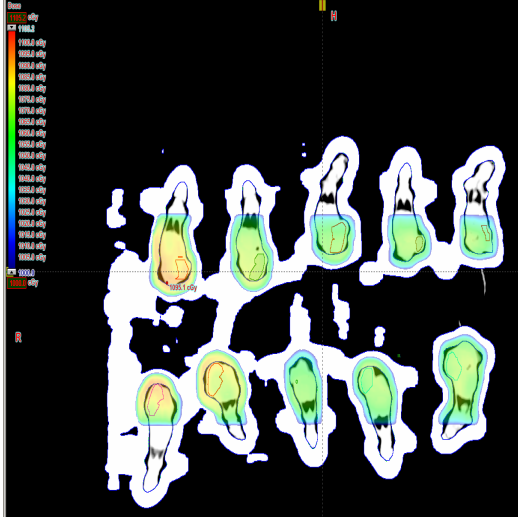
Günler arası ikili karşılaştırmalar yapıldığında bu artış ve azalmanın istatistiksel açıdan anlamlı olmadığı ($p>0,05$) bulunmuştur. Farklı günlerde grupların vücut ağırlıklarındaki değişim karşılaştırıldığında 0. günde gruptaki farelerin vücut ağırlıklarındaki değişimde istatistiksel açıdan anlamlı fark bulunmazken ($p=0,160$), $p>0,05$), 5. 10. ve 13. günde gruplar arasında anlamlı fark olduğu ($p<0,05$) görülmüştür.

Grup I' de yer alan farelerde, 0., 5. ve 10. günlerde ölçülen farelerin vücut ağırlıkları sonuçları arasında istatistik olarak anlamlı derecede farklılık olduğu tespit edilmiştir($p=0,018$).

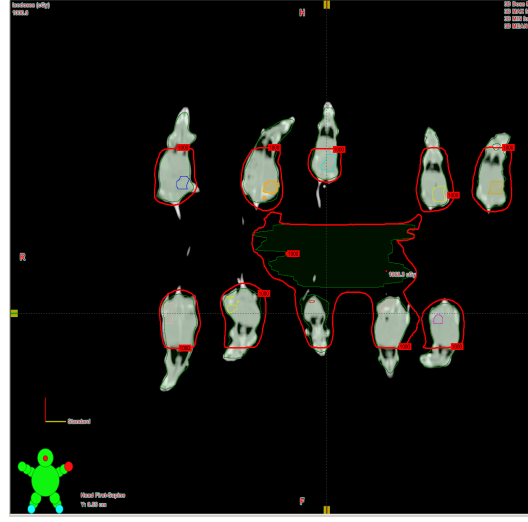
Grup II' de yer alan farelerde, 0., 5., 10. ve 13. günlerde ölçülen farelerin vücut ağırlıkları sonuçları arasında istatistik olarak anlamlı derecede farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,074$).

Grup III' de yer alan farelerde, 0., 5., 10. ve 13. günlerde ölçülen farelerin vücut ağırlıkları sonuçları arasında istatistik olarak anlamlı derecede farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($p=0,061$). Medyan (ortanca) değerleri incelendiğinde 0., 5., 10. ve 13. günlerde hayvanların vücut ağırlıklarında bir artışın olduğu gözlenmiştir.

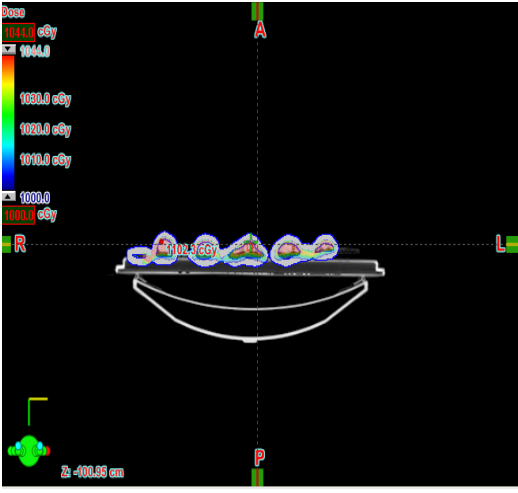
Grup III' deki hayvanların sağ kalım süresi daha uzun olduğu için 60. güne kadar vücut ağırlıkları ölçülmüş ve vücut ağırlığını gün geçtikçe arttığı 60. günde vücut ağırlığında % 37,89' luk bir artış olduğu gözlenmiştir.



(a)



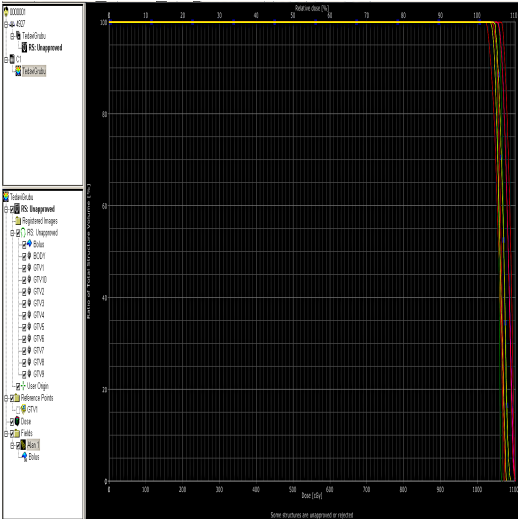
(d)



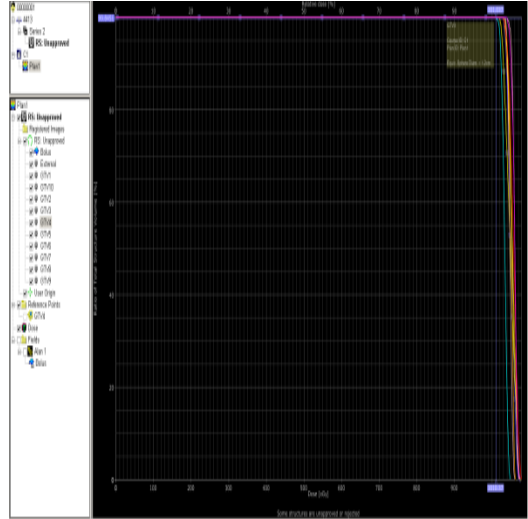
(b)



(e)

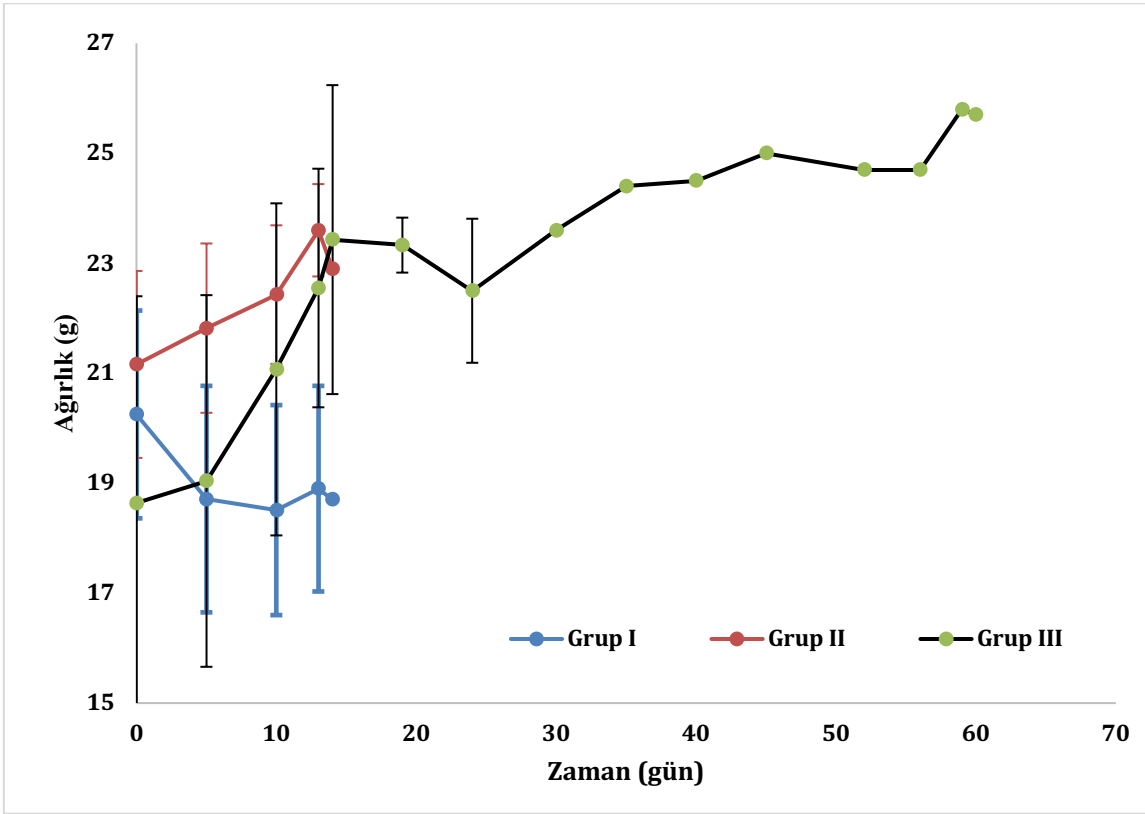


(c)



(f)

Şekil 33 a-f. Grup II' ye ait (a) planlama, (b) doz dağılımı görüntüleri ve (c) DVH görüntüsü, Grup III' e ait (d) planlama, (e) doz dağılımı görüntüleri ve (f) DVH görüntüsü.



Şekil 34. Farelerin ortalama ağırlıklarının zamana göre değişimi grafiği

Tablo 25. Tümör oluşturulmuş kontrol ve deney grubu hayvanlarının farklı günlerde ölçülen vücut ağırlıkları ve % ağırlık değişimleri

Grup No	0 gün		5 gün		10 gün		13 gün	
	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D
I	20,25±1,89	-	18,71±2,06	-7,60±7,76	18,51±1,91	-8,59±9,97	18,90±1,87	-6,67±10,2
II	21,16±1,70	-	21,82±1,54	+3,12±2,88	22,43±1,26	+6,00±0,89	23,60±0,84	+11,53±1,79
III	18,64±3,76	-	19,04±3,38	+2,15±0,84	21,07±3,02	+13,04±6,04	22,55±2,17	+20,98±1,85

Grup No	14 gün		19 gün		24 gün		30 gün	
	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D
I	18,7*	-7,65*	-	-	-	-	-	-
II	22,9*	+8,22*	-	-	-	-	-	-
III	23,43±2,81	+25,69±2,34	23,33±0,50	+ 25,16±3,63	22,5±1,31	+20,71±10,37	23,6*	+ 26,61*

Grup No	35 gün		40 gün		45 gün		60 gün	
	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D	VA (g)	% D
I	-	-	-	-	-	-	-	-
II	-	-	-	-	-	-	-	-
III	24,40*	+30,90*	24,50*	+31,44*	25,00*	+34,12*	25,7*	+ 37,89*

* Deney koşullarına bağlı olarak tek hayvan ile elde edilen ağırlık değeridir.

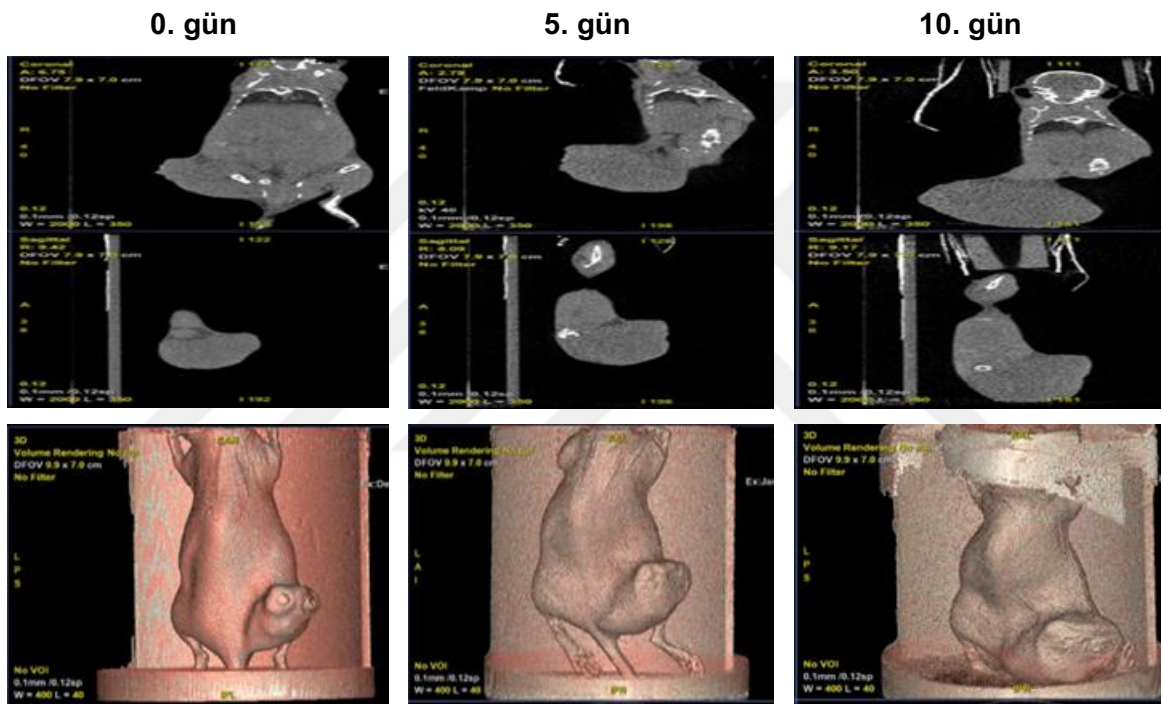
(-) değer vücut ağırlığında azalma olduğunu göstermektedir.

VA: Vücut ağırlıkları (gram) %D: % Ağırlık değişimleri

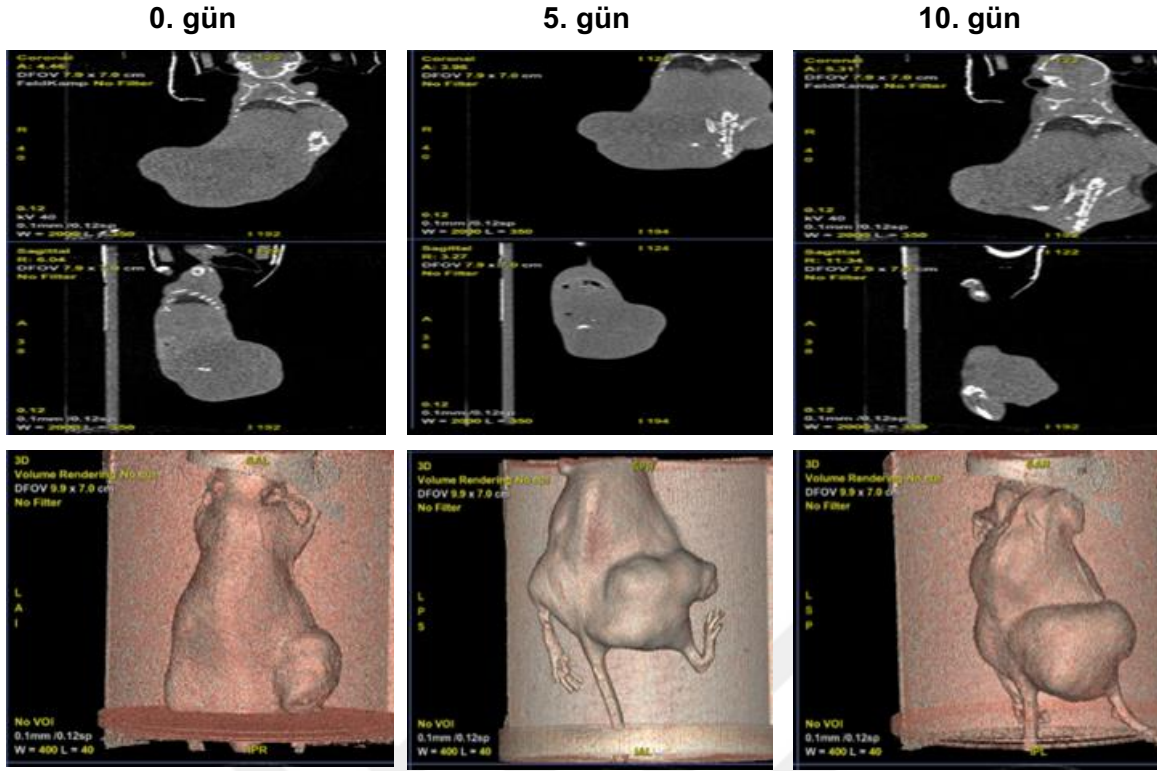
4.5.2.2.2. Hayvanlardaki Tümör Boyutundaki Değişimin Belirlemesine Ait Bulgular

4.5.2.2.2.1. BT Görüntülemesi ve Tümör Hacminin Belirlenmesinden Elde Edilen Bulgular

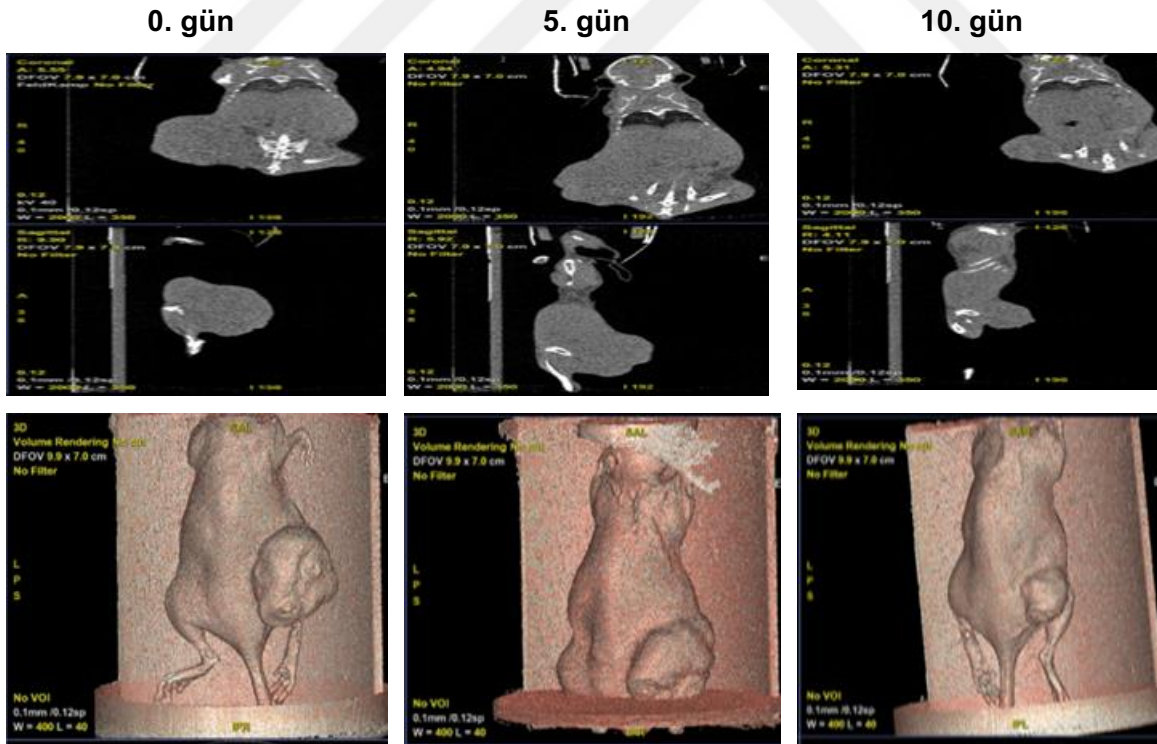
Bölüm 3.10.3.3.2.1.'de anlatıldığı şekilde çekilen Mikro-BT görüntüleri Şekil 35-37' de verilmiştir. Görüntülerden de görüleceği üzere Grup III' de yer alan farelerin tümör boyutu küçülürken Grup I ve Grup II' de yer alan farelerin tümör boyutunda artış olmuştur.



Şekil 35. Grup I farelerin mikroBT görüntüleri



Şekil 36. Grup II farelerin mikroBT görüntüleri



Şekil 37. Grup III farelerin mikroBT görüntüleri

Mikro BT ve BT simülör ile elde edilen görüntülerinden tümör hacimleri Bölüm 3.10.3.3.2’de anlatıldığı şekilde hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 26’ da gösterilmiştir.

Grup I ve Grup II' deki hayvanların tümör hacimlerinin medyan değerleri incelendiğinde 0.,5. ve 10. günlerde tümör boyutlarında bir artışın olduğu gözlenmiştir. 0 ve 10. günlerde yapılan ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık olduğu tespit edilmiştir($p<0,05$). Grup III' deki hayvanların tümör hacimlerinin medyan değerleri incelendiğinde 0., 5. ve 10. günlerde tümör boyutlarında bir azalışın olduğu gözlenmiştir. 0., 5. ve 10. günlerde yapılan ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak farklılık olmadığı tespit edilmiştir($p>0,05$).

4.5.2.2.2.2.Kumpas İle Elde Edilen Ölçümlerden Elde Edilen Bulgular

Mikro BT ve BT simülatör görüntülemeyen elde edilen görüntüler üzerinden hesaplanan tümör hacimlerinin yanı sıra, tümör dokusunun boyutları kumpas ile Bölüm 3.10.3.3.2.3'de anlatıldığı şekilde ölçülmüş ve tümör hacimleri hesaplanmıştır. Sonuçlar Tablo 27'de gösterilmiştir.

Grup I' deki hayvanların tümör hacimlerinin medyan değerleri incelendiğinde 0, 5 ve 10. günlerde tümör boyutlarında bir artışın olduğu gözlenmiştir. 0. ve 10. günlerde yapılan ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık olduğu tespit edilmiştir($p<0.05$).

Grup II'deki hayvanların tümör hacimlerinin medyan değerleri incelendiğinde 0, 5 ve 10. günlerde tümör boyutlarında bir artışın olduğu gözlenmiştir. 0. ve 10. günlerde yapılan ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık olduğu tespit edilmiştir($p<0.05$).

Grup III' deki hayvanların tümör hacimlerinin medyan değerleri incelendiğinde 0, 5 ve 10. günlerde tümör boyutlarında bir azalışın olduğu gözlenmiştir. 0., 5. ve 10. günlerde yapılan ölçüm sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık olduğu ancak ikili karşılaştırmalarda düzeltme yapıldıktan sonra gruplar arasında farklılık bulunmadığı tespit edilmiştir($p>0.05$).

Kumpas ile ölçüm sonuçlarının 0, 5 ve 10. gün zamanlarının her birinde 3 grup karşılaştırıldığında; 0, 5 ve 10. günlerde Grup II ve Grup III arasında anlamlı derecede fark olduğu ($p<0,05$) bulunmuştur. BT simülatör ve MikroBT ile ölçüm sonuçlarının 0, 5 ve 10. günlerde gruplar arasında farklılığın olmadığı görülmüştür ($p>0,05$).

Tablo 26. Tümör oluşturulan farelerin 10 Gy ışınlama sonrası farklı günlerde mikroBT ve BT simülatör görüntülerinden hesaplanan tümör hacim (cm³) değerleri

Grup No	0. gün		5. gün		10. gün	
	mBT	sBT	mBT	sBT	mBT	sBT
I	1,63±1,52	1,93±1,36	1,99±0,91	2,33±1,33	4,17±0,06	2,76±1,60
II	1,90±1,63	1,76±2,29	2,84±1,60	1,96±1,39	3,47±2,13	2,36±1,61
III	3,46±1,81	2,24±1,42	2,13±1,11	1,550±0,89	2,11±1,58	1,51±0,72

mBT: mikro BT görüntüleme

sBT: BT simülatör görüntüleme

Tablo 27. Tümör oluşturulan farelerin 10 Gy ışınlama sonrası farklı günlerde kumpas ile manuel ölçümle hesaplanan tümör hacim (cm³) değerleri

Grup No	0. gün	5. gün	10.gün	13.gün	14.gün	17.gün	19.gün	24.gün
I	1,16±0,87	2,34±1,41	3,93±2,11	5,67±2,79	7,15±2,70	-	-	-
II	0,49±0,31	2,47±1,27	3,71±2,14	4,42±2,56	6,05±1,91			
III	2,05±1,67	0,81±0,31	0,69±0,58	0,69±0,54	0,69± 0,54	0,76±0,54	1,10±078	0,99±0,67

Ayrıca farklı yöntemlerle ölçülen tümör hacimlerinin günler içindeki değişimleri de Tablo 28’ de verilmiştir.

Tablo 28. Tümör hacimlerinin günler arasındaki % değişimleri

Grup No	mBT		sBT		Manuel	
	0-5.gün	0-10.gün	0-5.gün	0-10.gün	0-5.gün	0-10.gün
I	22,54	156,54	20,48	43,11	95,79	228,67
II	49,31	82,55	11,54	34,16	408,56	663,13
III	-38,36	-39,04	-30,88	-32,54	-60,61	-80,55

Tablo28’e göre Grup III’deki hayvanların MikroBT’ye göre ortalama tümör hacimleri incelendiğinde bir farede tamamen tümörün yok olduğu görülmüş olup tek bir farede gözlemlendiği için istatistik olarak değerlendirmeye alınmamıştır. Grup III’de bulunan diğer farelerde bulunan tümör hacimleri incelendiğinde 0.gün ile 5.gün arasında %38,36’lık bir düşüş olduğu, 0.gün ile 10.gün arasında %39,04’lük bir azalış olduğu gözlenmiştir.

Grup III’deki hayvanların BT similatöre göre ortalama tümör hacimleri incelendiğinde bir farede tamamen tümörün yok olduğu diğer farelerde bulunan tümör hacimleri incelendiğinde 0. Gün ile 5.gün arasında %30,88’lik bir düşüş olduğu, 0.gün ile 10.gün arasında %32,54’lük bir azalış olduğu gözlenmiştir.

Grup III’deki hayvanların manuel ölçümlere göre ortalama tümör hacimleri incelendiğinde bir farede tamamen tümörün yok olduğu diğer farelerde bulunan tümör hacimleri incelendiğinde 0. Gün ile 5.gün arasında % 60,61’lik bir düşüş olduğu, 0.gün ile 10.gün arasında %66,29 ’lük bir azalış olduğu gözlenmiştir.

4.5.2.2.3. Biyokimyasal Değerlendirme

Tümör oluşturulmamış ve tedavi gruplarında yer alan farelerden elde edilen kanlar Bölüm 3.10.3.3.3’ de anlatıldığı şekilde biyokimyasal olarak değerlendirilmiştir.

Tümör oluşturulmamış fareden alınan kan örneklerinde WBC (White blood cell) =5,8, % LYM (Lenfosit)=77,9 , GRA (Granülosit) %=16,3, PLT (Platelet - trombosit) = 136 olarak elde edilmiştir. Grup I’deki farelerden alınan kan örneklerinde WBC =55,4

ve 100, %LYM=19,6 ve 15,4 , GRA %=71,7 ve 78,2, PLT = 151 ve 296 olarak elde edilmiştir. Grup II' deki farelerden alınan kan örneklerinde WBC =37,1 ve 4,3, %LYM=5,6 ve 45,6, GRA %=44,6 ve 4,3, PLT = 45 ve 597 olarak elde edilmiştir. Grup III'deki farelerden alınan kan örneklerinde WBC =39,9 ve 4,0, %LYM=9,3 ve 60,7, GRA %=83,9 ve 31,2, PLT = 39 ve 227 olarak elde edilmiştir. Ayrıntılı değerler Tablo 29' da verilmiştir.

Tablo 29. Farklı günlerde farelerden elde edilen kan numunelerinin analiz değerleri

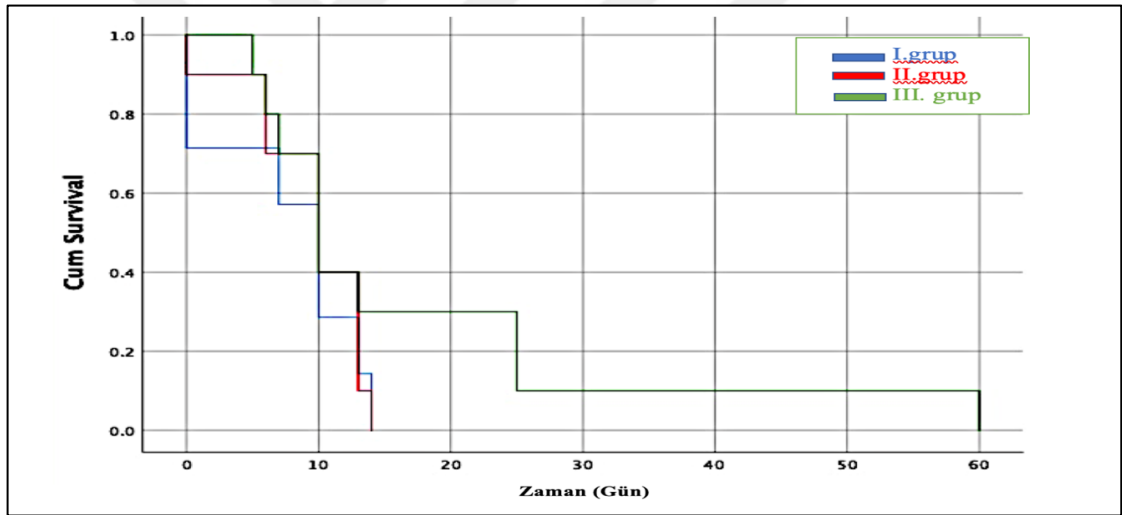
	Tümörsüz Hayvan							REFERANS DEĞERLER		
		0.gün	5.gün	0.gün	5. gün	0. gün	64. gün	birim		
		Grup I		Grup II		Grup III				
WBC	5,8	55,4	100	37,1	4,3	39,9	4	10 ⁹ / l	2,6	10,1
LYM	4,5	10,9	15,4	3,9	1,9	3,7	2,4	10 ⁹ / l	1,3	8,4
MONO	0,4	4,8	6,3	3,7	0,5	2,7	0,4	10 ⁹ / l	0	0,3
GRAN	0,9	39,7	78,3	30,7	1,9	33,5	1,2	10 ⁹ / l	0,4	2
LYM%	77,9	19,6	15,4	5,6	45,6	9,3	60,7	%	0	99,9
MON%	5,8	8,7	6,4	5,8	9,8	6,8	8,1	%	0	99,9
GRA%	16,3	71,7	78,2	44,6	4,3	83,9	31,2	%	0	99,9
RBC	8,96	9,04	6,73	5,81	12,52	7,68	8,09	10 ¹² / l	6,5	10,1
HGB	15,7	15,4	12,6	15,2	21,3	11,7	14,3	g/dl	10	16,1
HCT	42,6	48,3	32	18,1	64,8	35,8	35,5	%	32,8	48
MCV	47,5	53,3	47,6	31,2	51,7	46,6	43,9	fl	42,3	55,9
MCH	17,5	17	18,8	26,1	17	15,3	17,7	pg	13,7	18,1
MCHC	36,8	31,9	39,5	83,6	32,9	32,8	40,3	g/dl	29,5	35,1
RDWa	21,2	23,4	25,4	23,3	23,9	24,6	23	fl	0	99,9
RDW%	14,6	13,9	15,2	29,9	17	15,9	14,7	%	0	99,9
PLT	136	151	296	45	597	39	227	10 ⁹ / l	250	1540
MPV	5,4	5,6	7,1	6,4	5,3	6,2	5,7	fl	0	99,9

(*) Kontrol grup olarak adlandırılan grup herhangi bir işlem yapılmamış farelerin kan değerlerini ifade etmektedir.

4.5.2.2.4. Sağ Kalım Sürelerinin İzlenmesi Bulguları

Tümör oluşturulan farelerin sağ kalım süreleri Bölüm 3.10.3.3.4' de anlatıldığı şekilde izlenmiştir. Sonuçlar Şekil 38'de verilmiştir

Bu verilere göre en uzun yaşayan hayvanların Grup III' de olduğu daha sonra Grup II, en kısa yaşayan hayvanların ise Grup I' de olduğu görülmüştür. Yaşam süreleri incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın olmadığı ($p>0,05$) ancak ortalama değerler incelendiğinde Grup I için ortalama $7,7 \pm 5,7$ gün, Grup II için ortalama $9,5 \pm 4,3$ gün ve Grup III için ortalama $14,3 \pm 16,5$ gün olarak gözlenmiştir. Grup III' de tedavi edilerek tümörün tamamen yok olduğu hayvan 64 gün yaşamış deney sonlandırılarak sakrifiye edilmiştir. Bu tip bir tek hayvan bulunduğu için istatistik verilerde değerlendirilmemiştir.



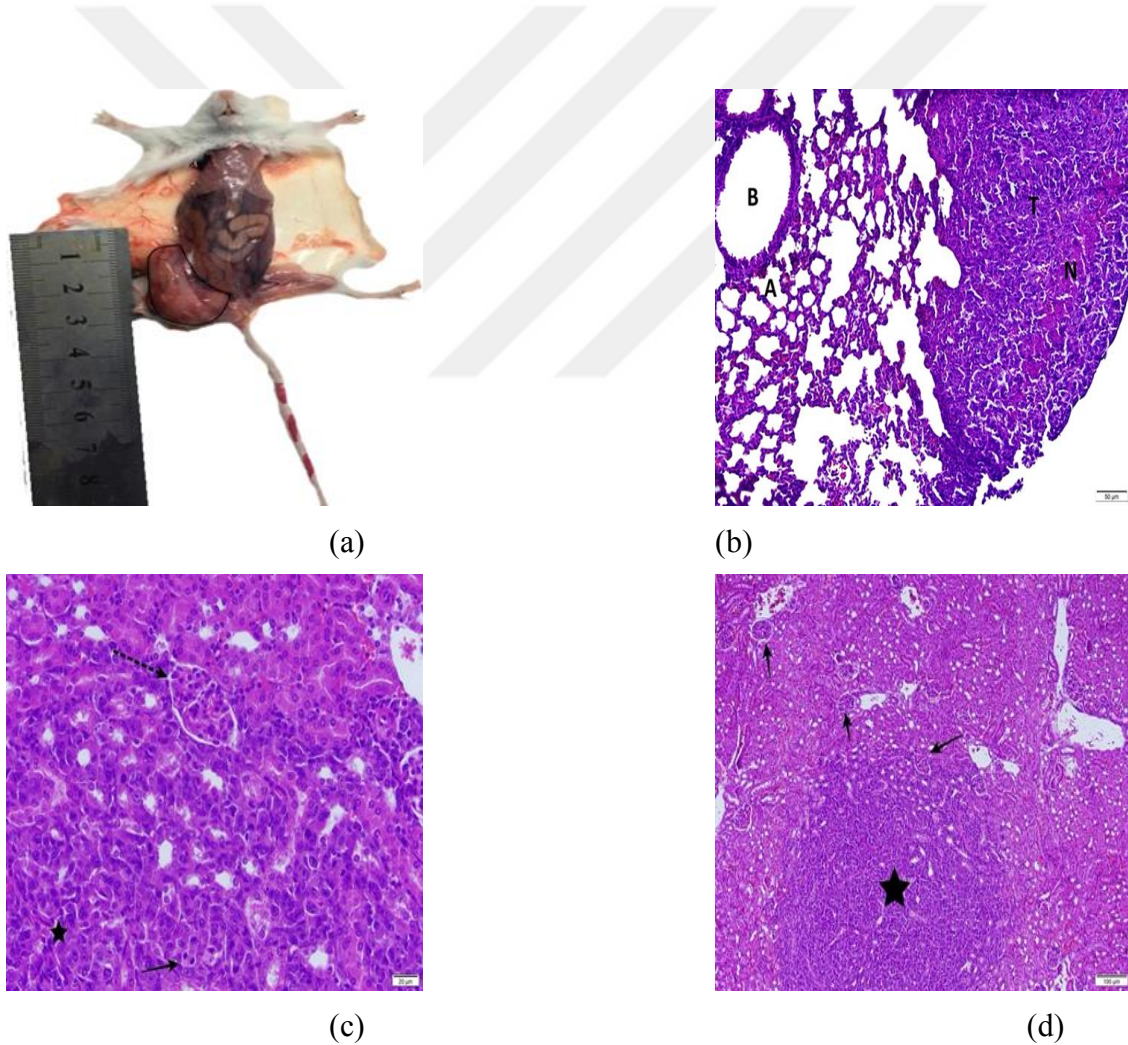
Şekil 38. Tümör oluşturulmuş farelerin tedavi sonrası sağ kalım eğrileri

4.5.2.2.5. Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Tümör oluşturulmuş farelerin tedavi sonrası tümör dokularının değişimleri Bölüm 3.10.3.3.2'de anlatıldığı şekilde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde;

Grup I farelerin sonuçları Şekil 39 a-d' de gösterilmiştir, Grup I' deki 7 hayvanın tümünde abdomenin üzerinde linea alba'nın sağ tarafından başlayıp sağ arka bacak diz eklemine kadar uzanabilen değişik boyutlarda kitleler gözlenmiştir. Histopatoloji'de oval veya yuvarlak şekilli bazıları normokromik bazıları hiperkromik çekirdekli, sitoplazma sınırları belli olmayan irili ufaklı çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip hücreler

gözlenmiştir. Söz konusu hücrelerin arasında az miktarda stroma gözlenmiştir. Tümörlere in situ karsinom tanısı konulmuştur. Tümöral kitlelerin histopatolojisi'nde bütün kitlelerde orta çaptaki alanlardan geniş alanlara değişen boyutlarda nekroz sahaları, bu sahalar üzerinde orta/şiddetli karyorektik ve normal nötrofil lökosit birikimleri ve 4 hayvanda nekroz sahaları üzerinde hafif şiddette kireçlenmeler gözlenmiştir. Mitotik indeks ortalama 9 olarak hesaplanmıştır. Bütün kitlelerde kısmen kapsül oluşumları bulunmakla birlikte sadece 1 hayvanda m. sartorius, m. pectineus, m. adductor, m. tensor fasciae latae ve m. gracilis kaslarına invazyon görülmüştür. Uzak dokulara metastaz araştırıldığında ise 3 hayvanda sadece akciğerlere (Şekil 39 b), 1 hayvanda hem akciğer hem kalbe, 1 hayvanda ise sadece böbreklere metastaz yaptığı görülmüştür (Şekil 39 c ve Şekil 39 d). Histolojik incelemeye ait detaylı değerlendirme Tablo 30'da gösterilmiştir.



Şekil 39 a-d: Grup I' de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri

a: Kadavra üzerinde tümörün (siyah çizgi ile sınırlanan yapı) yerleşimi ve boyutları,

b: Akciğere tümör metastazi, B:bronş, T: tümör hücreleri, N:nekroz, (HE boyama).

c: Böbreklere tümör metastazı (yıldız), mitoz (ok) ve glomerulus (kesikli ok), (HE boyama).

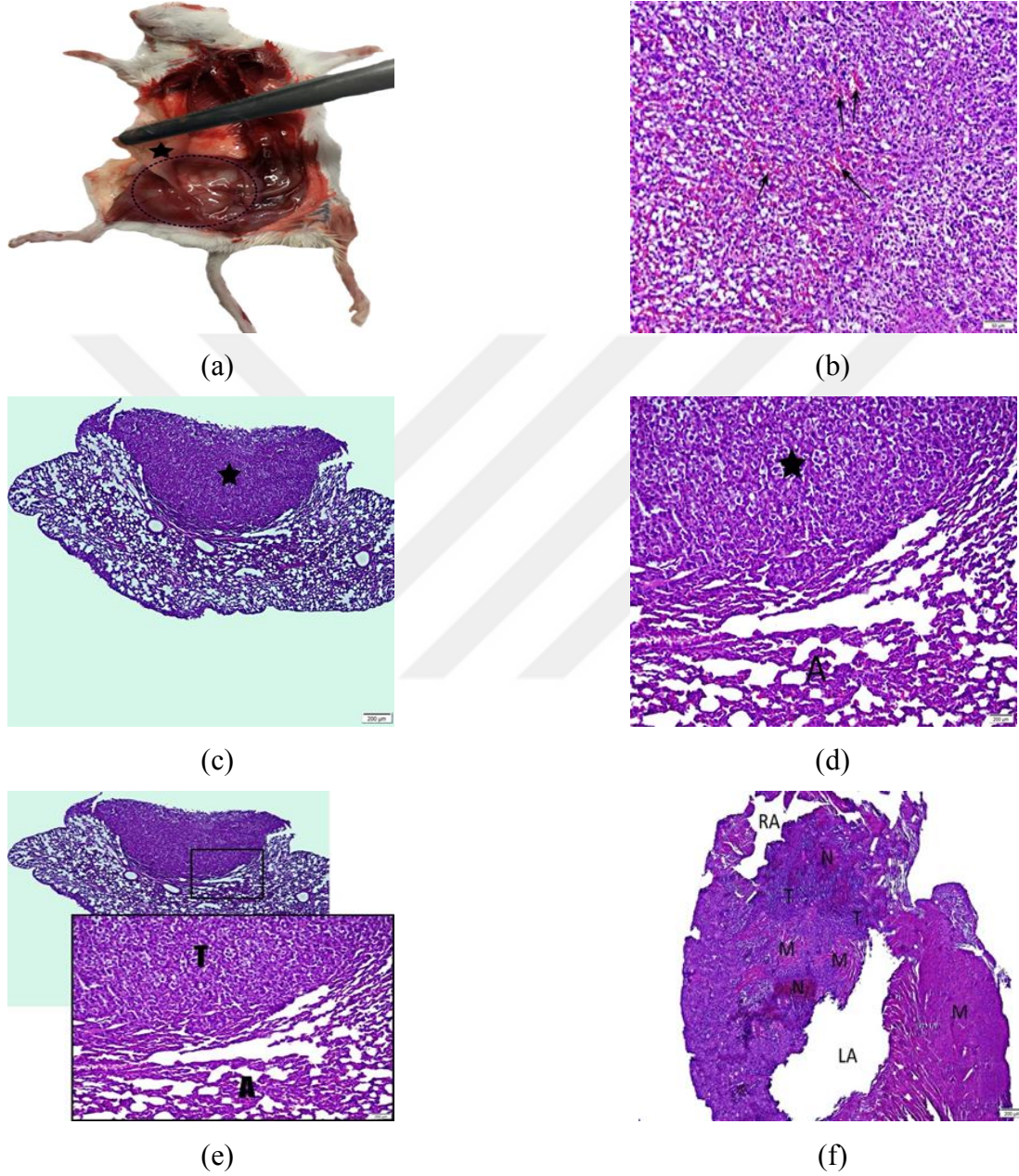
d: Böbrekte tümör metastazı (yıldız) ve glomeruluslar (oklar), (HE boyama).

Tablo 30. Grup I farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri

Hayvan No	Nekroz	Kanama	Yangı Hücreleri (Nötrofil)	Mitoz	Kapsül (var/yok)	Metastaz	Kireçlenme (var/yok)	Kas'a İnvazyon
1	+++	-	++	10	+	AC	-	-
2	+++	+	+++	7	+	AC, böbrek	+	-
3	++	-	++	10	+	-	+	+
4	+++	-	++	9	+	AC	-	-
5	+++	++	++	8	+	kalp, AC	-	-
6	++	-	++	7	+	-	+	-
7	+++	+	+++	12	+	-	+	-

Grup II' de yer alan 10 hayvanın tamamında nekropsi sırasında abdomende linea alba'nın sağ tarafından başlayıp sağ arka bacakta diz eklemine kadar uzanabilen tümöral oluşumlar gözlenmiştir (Şekil 40a). Söz konusu kitlelerin histopatolojik incelemesinde oval veya yuvarlak şekilli bazıları normokromik bazıları hiperkromik çekirdekli, sitoplazma sınırları belli olmayan irili ufaklı çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip hücreler gözlenmiştir. Söz konusu hücrelerin arasında az miktarda stroma gözlenmiştir. Tümörlere in situ karsinom tanısı konulmuştur. Bahsedilen neoplastik hücrelere geniş nekrotik alanlar ve bu nekrotik alanlar üzerinde karyorektik ya da normal nötrofil lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonları ve 4 hayvanda hafif şiddette kireçlenmeler tespit edilmiştir. 5 hayvanda neoplastik hücrelerin arasında serbest eritrositler mevcut olduğu görülmüştür (Şekil 40b). Mitotik aktivite indeksi 3,6 olarak hesaplanmıştır. Gruptaki hayvanlarda gözlenen tümörlerin hepsinde kısmen de olsa kapsül oluşumu dikkati çekmiştir. Uzak dokulara metastaz yönünden incelendiğinde 4 hayvanda akciğere metastaz yaptığı (Şekil 40c-e), 1 hayvanda kalbe metastaz yaptığı (Şekil 40f) ve 1 hayvanda da kalpte tümöral hücre embolisi olduğu görülmüştür. Bunlara ek olarak 4

hayvanda yakın dokulara (m. sartorius, m. pectineus, m. adductor, m. tensor fasciae latae ve m. gracilis kaslarına) invazyon tespit edilmiştir. Grupta yer alan hayvanlarla ilgili detaylı bilgiler Tablo 31’ de verilmiştir.



Şekil 40 a-f. Grup II’ de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri

A: Tümörün kadavra üzerindeki yerleşimi (kesikli çizgi ile sınırlanan bölge) ve periton (yıldız) ile ilişkisi,

B: Normal ve karyorektik nötrofil lökositlerin bulunduğu nekrotik bölgedeki serbest eritrositler (oklar), (HE boyama)

C: Akciğerde tümöral kitle (yıldız), (HE boyama).

D: Akciğerde (A) tümöral kitle (yıldız) (HE boyama)

E: Akciğerde (A) tümöral kitle (T), (HE boyama)

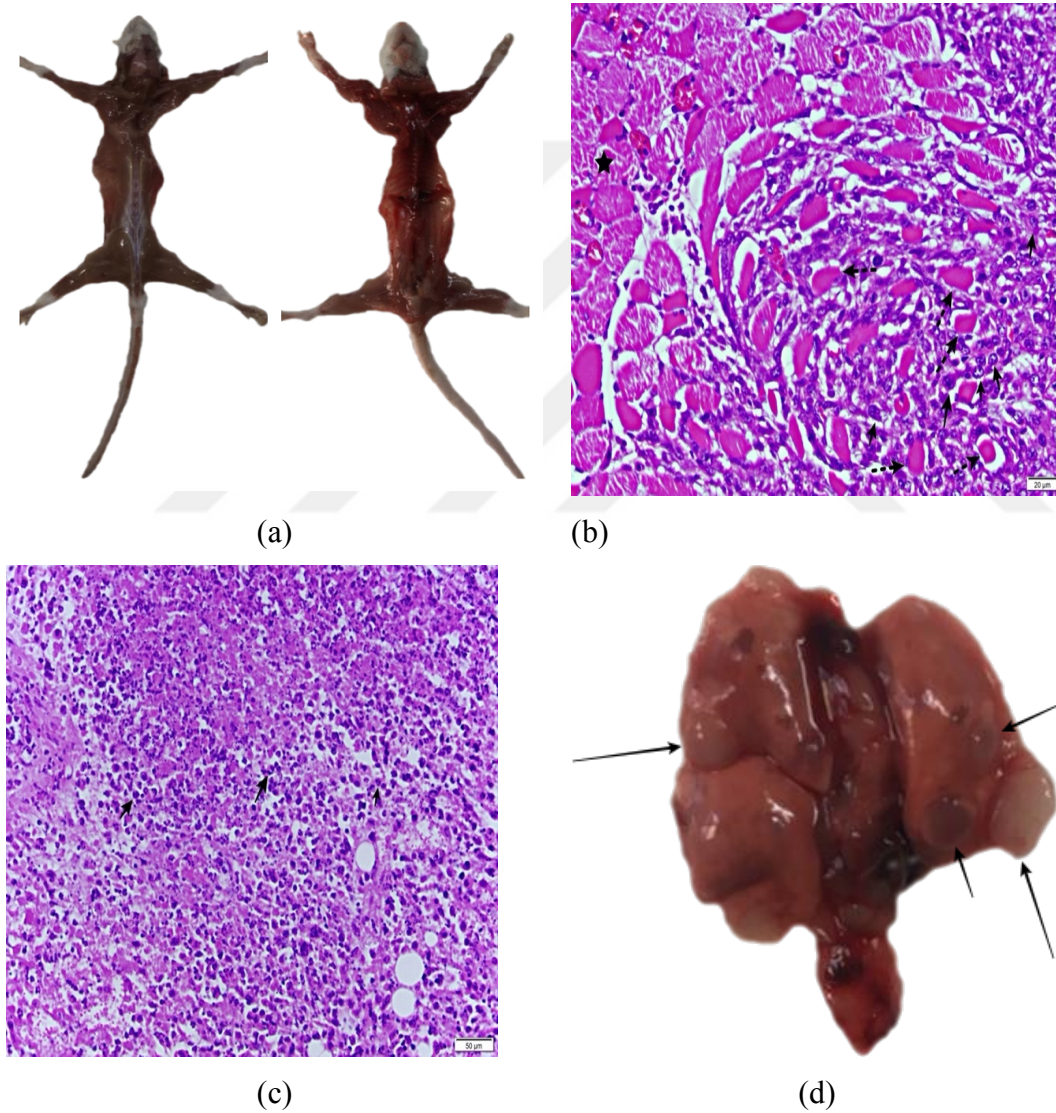
F: Kalpte tümör metastazı, N:nekroz, RA: sağ atrium, T:tümör hücre odakları, M:kas, LA: sol atrium, (HE boyama)

Tablo 31. Grup II farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri

Hayvan No	Nekroz	Kanama	Yangı Hücreleri (Nötrofil)	Mitoz	Kapsül (var/yok)	Metastaz	Kireçlenme (var/yok)	Kas'a İnvazyon
1	+++	+	+++	6	+	Kalp	+	+
2	+++	+	+	10	+	AC	-	+
3	+++	+	+++	1	+	-	+	-
4	++	-	++	1	+	-	-	-
5	++	-	+++	3	+	-	-	-
6	+++	-	+++	3	+	AC	-	+
7	+++	+	+++	3	+	AC	-	-
8	+++	-	+++	3	+	-	+	+
9	+++	-	++	2	+	AC	+	-
10	+++	+	++	4	+	Kalp	-	-

Grup III' de yer alan 12 hayvandan 11 tanesinde nekropsi'de abdomen bölgesinde linea albanın sağ tarafından başlayıp sağ arka bacakta diz eklemi hizasına kadar uzanabilen tümöral oluşumlar gözlenirken bir hayvanda herhangi bir tümöral oluşum ya da organlarda metastatik odak gözlenmemiştir (Şekil 41a). Tümöral kitlelerin histopatolojik incelemesinde oval veya yuvarlak şekilli bazıları normokromik bazıları hiperkromik çekirdekli, sitoplazma sınırları belli olmayan irili ufaklı çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip hücreler gözlenmiştir (Şekil 41b). Söz konusu hücrelerin arasında az miktarda stroma dikkati çekmiştir. Tümörlere in situ karsinom tanısı konmuştur. Söz konusu neoplastik hücrelerin dışında 4 hayvanda oldukça geniş alanlar halinde, 5 hayvanda orta çapta, 1 hayvanda ise küçük çaplı nekrotik alanlar ve bunların üzerinde normal ya da karyorektik nötrofil lökositlerden oluşan hücre infiltrasyonları (Şekil 41c) ve hafif şiddette kireçlenmeler gözlenmiştir. 2 hayvanda orta, 3 hayvanda hafif şiddetli olmak üzere toplam 5 hayvanda kanama alanları gözlenmiştir. Mitotik aktivite yönünden incelendiğinde ortalama 2,9 mitotik aktivite gözlenmiştir. Tümör

gözlenen hayvanların tamamında tümör yapısının etrafında kısmen de olsa kapsül şekillendiği tespit edilmiştir. Metastaz yönünden yapılan incelemede 5 hayvanda akciğerde metastaz odakları dikkati çekmiştir(Şekil 41d). Yakın dokulara invazyon açısından inceleme yapıldığında 4 hayvanda sağ arka bacakta kaslara (musculus (m.) sartorius, m. pectineus, m. adductor, m. tensor fasciae latae ve m. gracilis) invazyon şekillendiği tespit edilmiştir. Grupta yer alan hayvanlarla ilgili detaylı bilgiler Tablo 32’ de verilmiştir.



Şekil 41 a-f. Grup III’ de yer alan farelerin histopatolojik inceleme görüntüleri

a: Grup III’de yer alan makro ve mikro incelemelerde tümöre rastlanmayan, tümörün tamamen yok olduğu kadavraya ait resimler.

b: Tümör hücreleri (oklar) ve tümör hücreleri arasında kalmış hyalinize kas dokusu (kesikli oklar) ve normal kas dokusu (yıldız), Grup III kadavra. HE boyama

c: Nötrofil lökositler (oklar), pembe renkli nekrotik alanlar ve karyorektik nötrofil lökositler, 3. Gruptaki kadavra. HE boyama.

d: Akciğer de meme tümörü metastazları (oklar), 3. gruptaki kadavra

Tablo 32. Grup III farelerinin histopatolojik incelemede gözlenen bulgular ve şiddetleri

Hayvan No	Nekroz	Kanama	Yangı Hücreleri (Nötrofil)	Mitoz	Kapsül (var/yok)	Metastaz	Kireçlenme (var/yok)	Kas'a İnvazyon
1	+++	-	+	3	+	-	-	-
2	++	-	++	4	+	AC	-	+
3	++	+	+++	2	+	-	+	-
4	+	-	++	2	+	AC	-	+
5	+++	-	+++	1	+	AC	+	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
7	++	-	++	2	+	-	-	-
8	+++	-	+++	1	+	AC	-	-
9	++	++	++	3	+	AC		-
10	+++	+	+++	2	+	-		-
11	++	+	+	5	+	-	-	+
12	-	++	+	7	+	-	-	+

Tüm gruplarda tümör hücreleri; oval veya yuvarlak şekilli bazıları normokromik bazıları hiperkromik çekirdekli, sitoplazma sınırları belli olmayan irili ufaklı çekirdeğe ve belirgin çekirdekçiğe sahip hücreler gözlenmiştir. Söz konusu hücrelerin arasında az miktarda stroma gözlenmiştir.

Hayvanlarda bulunan nekroz incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 71,4 ünde 3. derece (şiddetli) nekroz görülürken, %28,6'sında 2. derece (orta şiddette) nekroz görülmüştür.
- Grup II' deki hayvanların % 80'ninde 3. derece nekroz görülürken, %20' sında 2. derece nekroz görülmüştür.
- Grup III' deki hayvanların % 58,6 sında 3. derece nekroz görülürken, %31'inde 2. derece nekroz ve %3,4'ünde 1. derece (hafif şiddette) nekroz görülmüştür.

- Üç grup karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak farklılık bulunmuştur ($p < 0.05$).

Hayvanlarda bulunan kanama alanları incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 14,3' ünde 2. derece (orta şiddette) kanama alanı görülürken, %28,6 sında 1. derece (hafif şiddette), % 57,1' inde kanama alanı gözlenmediği görülmüştür.
- Grup II' deki hayvanların kontrol grubunda hayvanların %50 sında 1. derece (hafif şiddette), % 50' sinde kanama alanı gözlenmediği görülmüştür.
- Grup III' deki hayvanların kontrol grubunda hayvanların % 16,7 sinde 2. derece (orta şiddette) kanama görülürken, %25inde 1. derece (hafif şiddette), % 58,3' ünde kanama alanı gözlenmediği görülmüştür.

Hayvanlarda bulunan yangısal hücre infiltrasyonu incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 28,6'sında şiddetli yangısal hücre infiltrasyonu gözlenirken, %71,4 ünde 2. orta şiddette yangısal hücre infiltrasyonu görülmüştür.
- Grup II' deki hayvanların %60' ında şiddetli yangısal hücre infiltrasyonu görülürken, %30' inde orta şiddette yangısal hücre infiltrasyonu ve %10'u hafif şiddette yangısal hücre infiltrasyonu görülmüştür.
- Grup III' deki hayvanların %33,3'ünde şiddetli yangısal hücre infiltrasyonu görülürken, %33,3'ünde orta şiddette yangısal hücre infiltrasyonu, %25'inde hafif şiddette yangısal hücre infiltrasyonu görüldü. %8,3' ünde yangısal hücre infiltrasyonu gözlenmemiştir.
- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur($p > 0.05$).

Hayvanlarda bulunan kapsül incelendiğinde;

- Grup I. ve Grup II'deki hayvanların % 100'ünde kapsül şekillendiği,
- Grup III' deki hayvanların %91,7' sinde kapsül gözlenirken, %8,3'ünde kapsül gözlenmemiştir.

- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

Hayvanlarda bulunan metastaz incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 51,7'inde metastaz gözleendiği (%28,6 sında akciğerde, %14,3' ünde akciğer ve beyinde, %14,3' ünde kalp ve akciğerde metastaz), % 42,9'unda gözlenmediği,
- Grup II' deki hayvanların % 70'inde metastaz gözleendiği (%40'unda akciğerde, %10' unda beyinde, %10' unda kalpte, % 10' unda kalpte ve kan pıhtısında), % 30'unda gözlenmediği,
- Grup III' deki hayvanların %41,7' sinde metastaz (akicğerde) gözlenirken, %58,3'ünde metastaz gözlenmemiştir.
- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur($p>0.05$).

Hayvanlarda bulunan Kireçlenme incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 57,1 inde,
- Grup II' deki hayvanların % 40' ında,
- Grup III' deki hayvanların % 20' sinde kireçlenmenin olduğu gözlenmiştir.
- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur($p>0.05$).

Hayvanlarda bulunan Kasa invazyon bulgusu incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların % 14,3 ünde,
- Grup II' deki hayvanların % 40' ında,
- Grup III' deki hayvanların %33,3'ünde Kasa invazyon olduğu gözlenmiştir.
- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı bulunmuştur($p>0.05$).

Farelerde bulunan tümörlerin mitotik aktivitesi incelendiğinde;

- Grup I' deki hayvanların ortalama mitotik aktivitesi $9\pm 1,8$,

- Grup II' deki hayvanların ortalama mitotik aktivitesi $3,6 \pm 2,7$,
- Grup III' deki hayvanların ortalama mitotik aktivitesi $2,6 \pm 1,9$ olarak bulunmuştur.
- İstatistiksel olarak üç grup karşılaştırıldığında aralarında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p=0,001$).



5. TARTIŞMA

5.1. Ce6 Üzerinde Yapılan Kontrollerin Değerlendirilmesi

Ce6'nın DMSO içindeki çözeltisinin UV spektrumu Bölüm 3.3.2'de anlatıldığı şekilde elde edilmiştir. Elde edilen spektrum literatür ile uyumlu bulunmuştur (104). UV-Vis spektrurumun da Ce6'nın 406 ve 664 nm'de iki pikinin olduğu gözlenmiştir. FRET'in sağlanmasında ya da gerçekleşmesindeki kurallardan birincisi olan 'vericinin yayım spektrumu ile alıcının soğurulma spektrumu ile örtüşmeli' prensibinin sağlanması için 664 nm dalga boyunun kullanılmasına karar verilmiştir (90,92,97).

Lipozom çalışmalarında içte tutulan etkin madde miktarı hesaplamalarında kullanılmak üzere Ce6'nın kalibrasyon doğrusu hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusunu çiziminde, doğrusallıktan ayrılışın önem kontrolü olarak R^2 değeri hesaplanır ve bu değer 1 olması istenir. Bölüm 3.3.3'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kalibrasyon doğrusunun R^2 değeri 0,9998 olarak bulunmuştur.

5.2. KN-Ce6 Konjugatının Hazırlanması ve Konjugatın Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Günümüzde henüz klinikte kullanıma girmemiş olsa da radyoduyarlaştırıcıların radyoterapide kullanımları deneysel düzeyde araştırılmaktadır. Radyoduyarlaştırıcılar hücrelerin/dokuların radyasyona duyarlılığını artıran bileşiklerdir. Bölüm 2.1.1.1'de detaylı şekilde anlatıldığı şekilde radyoduyarlaştırıcıların dokular üzerindeki etkisi radyasyonun- madde etkileşimi prensiblerine dayanmaktadır. Görüntüleme ve tedavide kullanılan radyasyon enerjisi sırası ile keV ve MeV mertebelerindedir. keV mertebelerinde baskın olan radyasyon-madde etkileşimi fotoelektrik etki iken, MeV mertebelerinde baskın olan etkileşim compton etkisidir.

Literatürde radyoduyarlaştırıcı olarak nanopartiküllerin kullanımı da yoğun olarak çalışılmaktadır. Bu amaçla kullanılan nanopartiküllerden bazıları (örneğin AuNP), fotoelektrik etkiyi arttırmaktadır, bu etki radyoterapide uygulanan MeV düzeyindeki dozlarda düşük olduğu için bu nanoparçacıkların radyoduyarlaştırıcı etkisi sınırlıdır.

Alternatif olarak elektron yoğunluğunu arttırarak Compton etkisini arttıracak nanopartiküllerin, radyoterapiden elde edilen etkiyi arttırdığı gösterilmiştir (23).

KN'ler içersinde birkaç atomdan binlerce atoma kadar atom barındırabilen yapay atomlardır (30, 31). Dolayısı ile bulunduğu ortamda elektron yoğunluğunu artıran nanopartiküllerdir. Bu özelliğinden dolayı Compton etkisini arttırarak tedaviyi hızlandırıcı etkisi olacağı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda KN tek başına kullanıldığında bu etkinin % 5 civarında olduğu bildirilmiştir (33). Bu etkiyi arttırmak için yeni yaklaşımlar da denenmektedir.

Kanser tedavisinde bazı ülkelerde klinik kullanıma girmiş olan FDT'de kullanılan fotoduyarlaştırıcıların KN ile birlikte kullanıldığında FRET mekanizması ile spontan olarak ROS ve 1O_2 ürettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (114). KN ve fotoduyarlaştırıcıların birlikte kullanılması hem elektron yoğunluğuna dayanan compton etkileşimi hem de FRET etkisi ile sitotoksik etkisi yüksek olan ROS'ların üretilmesini arttıracığı ve KN-fotoduyarlaştırıcı konjugasyonu FRET'den dolayı fotofuyarlaştırıcının uyarılmasını arttırarak KN'nin tek başına ürettiğinden daha fazla 1O_2 üretimi sağlanacağı bildirilmiştir (58, 115). Tsay ve arkadaşları KN ve FD'yi kovalent olarak bağlayarak tek başına FD'dan 3-4 kat daha fazla 1O_2 üretimi elde ettiklerini rapor etmişlerdir (57).

Konjugasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği FT-IR, UV spektrumları çekilerek ve CTEM ile görüntüleri alınarak Bölüm 3.4.3' de anlatıldığı şekilde kontrol edilmiştir.

Hazırlanan konjugatın UV absorpsiyon spektrumunda, Konjugatın karakteristik soiret bandının Ce6'nın absorpsiyon bandı üzerine üst üste binmesi, ayrıca Konjugatın Q (I) bandının 664 nm'den maviye kayması (hipsokromik etki), absorpsiyon bandının şiddetinin artması (hiperkromik etki), soiret bant çizgisi genişliğinde bir değişiklik gözlenmesi Ce6 moleküllerinin KN'lere kovalent bağlandığını göstermektedir (Bkz Şekil 9). Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (104,116,117,118).

IR spektroskopi, IR ışınının moleküller üzerinde oluşturduğu titreşimlerin neden olduğu karakteristik frekans değerlerinin kullanılması ile moleküler düzeyde madde analizi yapılmasını sağlar. Bu yöntemde belli bir enerjide örneğe iletilen ışığın ne kadarının soğurulduğuna bakılır. Soğurma spektrumunda bir sinyalin elde edildiği enerji, örnek molekülün titreşim frekansını verir. Bu sinyaller üzerinden farklı koşullardaki değişim FT-IR ile rahatlıkla izlenebilir. Örneklerin ölçülmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden birisi Fourier Transform Infrared Spektrometresinin Zayıflatılmış Toplam Yansıma (FT-IR ATR) eklentisidir. Bu yöntemde ZnSe 650 cm^{-1} altındaki kızılötesi bölgesi ışığını kuvvetli biçimde soğurur. Bu nedenle bu dalga sayısı altındaki sinyaller kullanılmaz (119).

Bu çalışmada ATR-FTIR yöntemi kullanılarak; KN'lere Ce6 bağlanmasının araştırılması için etken maddenin ve nanopartiküllerin yüzeylerindeki moleküllerin çeşitli bağlarının titreşim frekansları ölçülmüş ve moleküldeki fonksiyonel gruplar belirlenmiştir. Buna göre KN, Ce6 ve KN-Ce6 konjugatlarının infrared spektrumları karşılaştırılarak incelenmiştir. Bölüm 5.2.1.1' deki verilerden anlaşılacağı üzere ve KN-Ce6 örneğine ait spektrumda amid I bandındaki 1709 cm^{-1} ' de oluşan yeni absorpsiyon bandı KN'lerin üzerine Ce6'nın kovalent immobilizasyonunun gerçekleştiğini göstermiştir. Ayrıca, 1612 ve 1373 cm^{-1} 'deki absorpsiyon bandı, N-H bağ bükülmesi ve C-N gerilme titreşimine bu bantlarda amin grupları ile başarılı yüzey modifikasyonunu doğrulamaktadır. (Bkz Şekil 11-13). Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (54).

CTEM görüntülerinde KN'lerin etrafındaki daha düşük kontrastlı yapılar Ce6 olarak değerlendirilmiştir ve nanopartiküller etrafında gözlenen kontrast farklılık bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Bkz Şekil 15 a-d) . Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (105,106,109,120).

5.3. KN-Ce6 Konjugatı İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Değerlendirilmesi

Lipozomların keşfinden sonra (66) ilaç taşıyıcı sistem olarak kullanılabilirliklerinin anlaşılması ile birlikte, ilaç taşıyıcı sistemler arasında en çok tercih edilen ve üzerinde en fazla araştırma yapılan sistemlerden biri olmuştur. Bunun başlıca nedeni, lipozomların biyouyumlu ve biyoparçalanabilir yapıda olmalarıdır. Ayrıca, geniş yelpazedeki ilaçlar ve diyagnostik bileşikler etkin maddenin fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak sulu kompartmana hapsedilebilirler veya lipid membrana bağlanabilirler. Lipozomun içteki sulu fazına hapsedilen ilaçlar dış etkenlerden korunurken, ilacın istenmeyen yan etki oluşturması da engellenmiş olur. Lipozomların yüzeyleri uygun molekül/bileşiklerle modifiye edilerek, lipozoma hapsedilmiş ilacın hücreye hatta hücresel kompartmanlara bile taşınması sağlanabilir. Bu nedenle, çalışmamızda KN-Ce6 konjugatlarının tümöre hedeflendirilmesinde nanoboyutta taşıyıcı sistem olarak lipozomlar seçilmiş ve lipozomun iç sulu fazına hazırlanan konjugat hapsedilmiştir.

Lipozomu oluşturan lipidleri seçerken, fosfolipitlerin, karakteristik bir jel-sıvı faz geçiş sıcaklığında, faz geçişine uğrayarak vezikül oluşturdukları dikkate alınmalıdır. Faz geçiş sıcaklığı fosfolipitlerin yapısındaki açıl zincirinin bir fonksiyonudur ve 2 pozisyonuna her metilen ilavesi ile yaklaşık olarak 15°C civarında artış gösterir. Yapıda

doymamış açıl zincirleri, dallanma, fosfatidil serin ve fosfatidil gliserol gibi asidik fosfolipit baş grupları bulunması faz geçiş sıcaklığında düşüğe neden olmaktadır (121).

Çalışmada kullandığımız lipozomların hazırlanması sırasında sıvı kristal yapısındaki lipid olan PC ve jel tipinde olan DSPC kullanılmıştır. PC soya lesitini olup doymamış yapıdadır. DSPC ise doymuş sentetik lipiddir. PC yapısındaki doymamışlık nedeniyle stabilitesinin sağlanması ve korunması oldukça önemlidir. Jel tipinde olan DSPC’de ise yapıda bulunan doymamışlık ortadan kalkmıştır. Bu nedenle jel tipte olan lipidler sıvı tipte olanlara göre oksidasyona daha dayanıklı hale gelmektedirler.

Formülasyonda, fosfolipit yanında temel bileşen olarak kullanılan bir diğer madde kolesteroldür. Kolesterol veziküler sistemlere, çifte tabakanın geçirgenliğini optimize etmek için ilave edilir. Kolesterol jel tipteki veziküllerde az miktarda akışkanlaştırıcı etki gösterirken, sıvı tipte olan veziküllerde büyük oranda düzenleyici etkiye sahiptir. Bu nedenle kolesterol sıvı tipteki fosfolipit çifte tabakanın geçirgenliğini azaltıp, rijiditesini arttırarak, lipozomun sulu fazına hapsedilmiş olan hidrofilik ilaçların sızmasını azaltması ve ayrıca lipozomların in vivo stabilitesini arttırmaktadır (67).

Bölüm 3.5.1’de anlatılan ön formülasyon çalışmaları sırasında en sık gözlenen sonuç hazırlanan lipozom dispersiyonlarının agrege olması ve buna bağlı olarak partikül boyutunun istenenden çok daha büyük olmasıdır. Bu nedenle çalışmada kullanılan lipozom dispersiyonlarının fiziksel stabilitesini arttırmak ve agregasyonu engellemek amacı ile formülasyona yük verici madde eklenmiş ve elde edilen sonuçlar ışığında pozitif yük verici madde olarak stearylamin ilave edilmiştir.

Lipozom dispersiyonlarının RES hücreleri tarafından hızlı opsonizasyonunu önlemek, dolaşımda kalış sürelerini uzatmak ve EPR etkisi ile tümöre pasif olarak hedeflendirilmesini sağlamak için lipozomların yüzeyi hidrofilik bir polimer olan PEG ile kaplanmıştır. PEG, ilaç taşıyıcı sistemlerde en çok tercih edilen polimerdir. PEG kaplama ile nanopartiküllerin yüzeyinin kaplanması sonucunda yüzey yükü ve hidrofilisitede artma sağlanmakta ve kaplı ilaç taşıyıcı sistem ile kan bileşenleri arasında itici etkileşimleri arttırmaktadır. Sterik stabilizasyon olarak adlandırılan bu etki sayesinde plazma proteinleri, makrofajlar gibi RES sistemleri bileşenleri tarafından lipozomun opsonizasyonla hızla dolaşımdan uzaklaştırılması önlenir (122,123). Lukyanov ve ark. yaptıkları çalışmada 750-5000 Da arasında değişiklik gösteren PEG blokları ile hazırlanan farklı PEG-PE konjugatlarının oldukça stabil ve düşük kritik misel konsantrasyonuna sahip miseller oluşturduğunu ve bunların yüksek oranda in vivo tümör

tutuluma sahip olduğunu bildirmişlerdir(124). Bu bilgiler ışığında çalışmada lipozomların dolaşımında uzun süre kalmasını sağlamak için PEG₂₀₀₀-DSPE kullanılmıştır.

Lipozomların pasif hedeflendirilmesinin yanı sıra tümör hücrelerine spesifik olarak hedeflendirilmesi için lipozomların yüzeyi folat reseptörüne spesifik, folik asit ile modifiye edilmiştir. Bölüm 2.2.1.2.1.2.1’de detaylı şekilde anlatıldığı şekilde Folik asit lipozomlar da dahil olmak üzere ilaç taşıyıcı sistemlerde tümör ve enflamatuvar hastalıklarda hedefleme ligandı olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Folat reseptörleri, sağlıklı hücrelerde düşük düzeyde bulunurken meme, kolon, akciğer, prostat, ve beyin kanserleri gibi pek çok kanser türünde aşırı eksprese edilirler. Ayrıca folat reseptörü ekspresyonu ile tümörün evre ve derecesi arasında sıkı bir ilişki olduğu bulunmuştur. Bu özellikleri nedeniyle folik asit/folat hedeflendirme bileşeni olarak yaygın olarak kullanılan bileşiklerdir. Folik asitin düşük molekül ağırlığı (MW 441), suda çözünür olması, çeşitli çözücü, pH ve ısılardaki stabilitesi, diğer bileşiklerle kolay konjuge edilebilmesi, antikörlerin aksine immunojenite özelliğinin olmaması ve folat reseptörlerine yüksek afinite göstermesi, folik asitin hedeflendirmede sıklıkla tercih edilen ligand olmasının diğer nedenleri arasında yer almaktadır. Ayrıca hedeflendirme amacıyla yüzeyi peptit-protein veya antikörle modifiye edilmiş nanotaşıyıcılarla karşılaştırıldığında folik asit ile modifiye edilmiş nanotaşıyıcılar daha küçük boyutlara sahip olduklarından daha iyi doku penetrasyonu gösterirler ve folat reseptörü içermeyen dokulardan daha hızlı temizlenirler.

Sonuç olarak tüm bu bilgiler ışığında bu çalışma kapsamında KN-Ce6 konjugatı içeren yüzeyi PEG ile kaplı, tümöre hedeflendirme için yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş nanoboyutlu, pozitif yüklü PC ve DSPC lipozomları hazırlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm lipozom dispersiyonları Tablo 5’ de detaylı olarak sunulmuştur. Lipozom dispersiyonlarının hazırlanması için literatürde en sık tercih edilen yöntem olan film metodu kullanılmıştır.

5.4. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonunun Değerlendirilmesi

Veziküllerin Partikül Büyüklüklerinin ve Zeta Potansiyellerinin Tayini

Çalışmada kullanılan lipozom dispersiyonlarının ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımları ve zeta potansiyelleri Bölüm 3.6.1.’de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde PC lipozomlarının DSPC lipozomlarından daha küçük olduğu, konjugat hapsedilmesi ve yüzeyin folik asit ile modifikasyonu ile partikül boyutunun büyüdüğü görülmüştür (Bkz Tablo 6). Bu sonuçlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (110, 111).

Bölüm 2.2.1.2.1.1' de detaylı şekilde anlatıldığı üzere EPR etkisi için bazı kaynaklara göre 100 nm'nin altında (63), bazı kaynaklara göre ise 40–400 nm aralığında olması gerektiği bildirilmiştir (65). Bu anlamda çalışmada elde edilen partikül büyüklüğü literatür ile uyumlu olarak pasif hedeflendirmeye uygun olarak değerlendirilmiş olup, aktif hedeflendirmenin kullanıldığı formülasyonlar içinde folat modifikasyonuna bağlı olarak daha büyük parçacıklar elde edilmiştir ancak bu büyüklüğün halen EPR etkisinden yararlanmak için gerekli olan büyüklük sınırları içerisinde olduğu tespit edilmiştir.

Kolloidal bir dağılımın partikül boyutu değerlendirilirken göz önüne alınması gereken diğer bir parametre de dağılımın homojenitesini gösteren PDI değeridir. Bu değer 0-1 arasındadır ve homojen bir dağılım için sifıra yakın olması istenmektedir. Çalışmamızda hazırlanan tüm lipozom formülasyonlarının PDI değerlerinin 0.11 ile 0.20 arasında bulunması, partiküllerin homojen dağıldığını göstermektedir.

Zeta potansiyel, nanotaşıyıcıların biyodağılımını, opsonizasyonunu ve toksisitesini etkilemektedir. Lipozomlar dahil nanotaşıyıcıların yüzeylerinin kaplanması, nanotaşıyıcıların agregasyonunu ve opsonizasyonu engeller ve hücre alımı arttırmaktadır. Zeta potansiyel mV olarak ölçülmektedir ve nanotaşıyıcıların stabilitesi ile ilgili önemli bir parametredir. -10 mV dan büyük, + 10 mV dan küçük ise nanotaşıyıcılar agregasyon eğilimi gösterebilir; 25 mV dan büyük negatif ya da pozitif ise aynı yüklü her bir parçacığın yük itmesi nanotaşıyıcıların agregasyonunu engeller ve fiziksel stabilitesini artırır. Ancak literatürde PEG ile kaplı nanotaşıyıcıların zeta potansiyellerinin <10 mV dan küçük ise daha stabil olduğu da bildirilmiştir (65) Çalışmada hazırlanan lipozomların zeta potansiyeli 10mV'dan daha düşük olarak bulunmuştur. Literatürde direkt çalışmamızla aynı şekilde KN-fotoduyarlaştırıcı lipozom dispersiyonları ile yapılmış çalışma bulunmamakla birlikte sadece KN içeren lipozomlarla yapılan çalışmalarda benzer sonuçlar rapor edilmiştir (110).

İçte Hapsedilen Etkin Madde Miktarı

Çalışmada hazırlanan lipozom dispersiyonlarına hapsedilen KN-Ce6 konjugat miktarı ve enkapsülasyon verimleri Bölüm 3.6.2' de anlatıldığı şekilde belirlenmiştir. Sonuçlar incelendiğinde yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş lipozomların enkapsülasyon verimi yüzeyi modifiye edilmemiş olanlara göre daha düşük bulunmuştur (Bkz Tablo 9). Literatürde çalışmamızla aynı özellikte lipozom dispersiyonu bulunmamasına rağmen benzer çalışmalar incelendiğinde benzer sonuçlar bulunan çalışmalar olduğu gibi aktif hedeflendirilmiş lipozomlarda içte hapsedilen madde miktarının daha fazla olduğu çalışmalar da bulunmaktadır (110).

Lipozom Dispersiyonların Mikroskopla Görüntülenmesi

Lipozomların morfolojik özellikleri lipozom bileşimi ve hazırlama yöntemine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Çalışmada hazırlanan lipozomlar Bölüm 3.6.3'de anlatıldığı şekilde CTEM ve polarize mikroskopla görüntülenmiştir. Elde edilen CTEM görüntülerinde ölçülen partikül boyutunun, Tablo 6'da verilen boyutlarla uyumlu olarak ekstrusion sonrası 200 nm civarında olduğu görülmüştür. Ayrıca elde edilen görüntülerde gözlenen kontrast farklılığına bağlı olarak KN-Ce6 konjugatının lipozom içinde hapsedildiği görülmüştür. Sonuçlar literatürle uyumlu bulunmuştur (107,108, 109,110,111,112). Ayrıca polarize mikroskop görüntülerinde de veziküllerin oluştuğu ve lipozomlara özgü sarı mavi çapraz bantlar gözlenmiştir.

Lipozom Dispersiyonlarının Stabilite Çalışmaları

Tüm farmasötik preparatlarda olduğu gibi lipozomlarda da uygun raf ömrü önemli bir parametredir. Yani hastaya uygulanıncaya kadar geçen bekleme süresinde taşıyıcı sistemin in vivo davranışını etkileyecek partikül boyutu, içte tutulan etkin madde miktarı gibi fiziksel özelliklerinin değişmemesi gereklidir. Lipozomların fiziksel stabiliteleri, molar bileşimlerine, kullanılan fosfolipide ve saklama şartlarına bağlıdır.

Çalışmamızda PC_L-K ve DSPC_L-K lipozomlarının fiziksel stabilitelerini izlemek amacıyla buzdolabı sıcaklığı (+4°C) ve oda sıcaklığında (25°C) 6 ay bekletilen veziküllerin partikül büyüklüğü, zeta potansiyeli ve içte tutulan etkin madde miktarındaki değişimleri izlenmiştir.

Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Bekletilen Lipozom Dispersiyonlarının Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyelindeki Değişim

Lipozomlar gibi partiküler yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerdeki en önemli fiziksel stabilite göstergelerinden biri partikül büyüklüğündeki değişimdir, çünkü partikül büyümesi faz ayrımına kadar gidebilen bir sürecin başlangıcı olabilir ve bu nedenle fiziksel stabilite çalışmaları sırasında dikkatle incelenmelidir.

Sonuçlar incelenecek olursa, hem PC_L-K hem de DSPC_L-K lipozomları buzdolabı ve oda sıcaklığında bekletilme sonrasında zamanla partikül büyüklüğünde çok az bir artış görülmüştür (Bkz. Tablo 10). Aynı lipozom bileşimine sahip formülasyonların aynı örnek alma günlerindeki buzdolabı ve oda sıcaklığında bekletilmeleri sonrası partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında, buzdolabı sıcaklığında bekletilen formülasyonlar ile oda sıcaklığında bekletilen formülasyonlar arasında partikül büyüklüğü açısından anlamlı bir fark görülmemiştir (p>0,05).

Zeta potansiyelleri incelendiğinde ise +4⁰C zeta potansiyeli az bir değişim gösterirken, oda sıcaklığında bekletilen lipozomların zeta potansiyel değerleri büyümüştür. Ancak her iki sıcaklıkta da formülasyonların aynı ölçüm günlerindeki zeta potansiyel değerleri ve aynı formülasyonun farklı günlerdeki zeta potansiyel değerleri istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Elde edilen sonuçlar ışığında, hazırlanan lipozom dispersiyonlarının her iki sıcaklıkta da, izlenen süre içerisinde partikül büyüklüğü değişimleri açısından stabil oldukları söylenebilir.

Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Bekletilen Lipozom Dispersiyonlarının İçte Tutulan Etkin Madde Miktarındaki Değişim

Çalışmamızda kullandığımız KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonlarının fiziksel stabilitelerini değerlendirmek için stabilite çalışmalarında incelediğimiz bir diğer parametre ise içte tutulan konjugat miktarındaki değişimdir. Lipozomların istenilen etkinliğin sağlanabilmesi için, tüm raf ömürleri boyunca hapsedilen etkin madde miktarını koruması beklenmektedir. Bu nedenle, içte tutulan etkin madde miktarının izlenmesi fiziksel stabilite çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

Sonuçlar incelenecek olursa, DSPC_L-K lipozomlarının PC_L-K lipozomlarından daha stabil olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeni DSPC'nin jel yapıda bir fosfolipit olması ve sıvı kristal yapıda olan PC ile kıyaslandığında faz geçiş sıcaklığının çok daha yüksek olmasıdır. Lipidler, faz geçiş sıcaklıklarının altındaki sıcaklıklarda daha düzenli ve sıkı bir yapının gözlendiği jel yapıda bulunurlar ve sıcaklık arttıkça özellikle faz geçiş sıcaklıklarının üstündeki sıcaklıklara çıkıldıkça daha gevşek dizilişin görüldüğü sıvı-kristal yapıya geçerler. Sıvı-kristal yapıdaki lipidlerin polar baş grupları arasındaki mesafe jel yapıya oranla daha fazladır ve bu nedenle etkin maddenin kaybı daha fazla olmaktadır (67). Ayrıca hem PC hem de DSPC lipozomları için, +4°C'de içte tutulan etkin madde miktarındaki değişim 25°C'de deki değişime göre daha az olduğu görülmüştür. Bu beklenen bir durumdur, bu nedenle lipozomların buzdolabı sıcaklığında bekletilmesi önerilmektedir.

5.5. Hücre Kültür Çalışmalarına Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının sitotoksik etkilerini değerlendirmek için folat pozitif hücre hattı olan 4T1 hücresi ile çalışılmıştır. Hücrelerin ışınlanması için seçilen dozlar literatürde verilen dozlar esas alınarak seçilmiştir.

Hücre kültür çalışması için optimum koşulları belirlemek için yapılan ön çalışmalarda farklı hücre sayıları (10x10³, 5x10³, 2x10³ hücre/kuyucuk), formülasyonlarla farklı inkübasyon süreleri (4 ve 24 saat), farklı X ışını dozları (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 30, 45 Gy) ve ışınlama sonrası farklı bekleme süreleri (24, 48, 72 saat) denenmiştir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar ışığında 2x10³ hücre/kuyucuk, formülasyonlarla 4 saat inkübasyon, 5, 10, 15, 20 Gy radyasyon dozu ve ışınlama sonrası 72 saat bekleme süresine karar verilmiştir.

Literatürde 4T1 hücre hattının mitoz süresi 22,9 saat olarak bildirildiğinden dolayı 24, 48 ve 72 saat bekleme sürelerinde deneyler tekrarlanmış ve en uygun sonuç üç mitoz süresi sonrası olan 72 saatte bulunmuştur (6,125,126).

Işınlama dozu olarak uygulanan 5, 10, 15 - 20 Gy dozlarla elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, 5 Gy radyasyon dozunda; formülasyonların hücre canlılığındaki sitotoksitesini, Konjugat ve tek başına X ışını ile ışınlama ile karşılaştırdığımızda, %36,5 daha fazla kanser hücresi öldürdüğü ve DSPC_L-FA-Konjugat, sadece 5 Gy X ışını radyasyonundan %26,8 daha fazla kanser hücresi öldürdüğü görülmek ile birlikte,

hazırlanan formülasyonun 10, 15 ve 20 Gy radyasyon dozlarındaki etkisinin minimal olduğu bulunmuştur (Bkz. Şekil 25-30).

Radyasyon uygulanmadan tek başına serbest konjugat ve lipozom formülasyonlarının uygulandığında elde edilen hücre canlılık değerleri incelendiğinde FRET den dolayı bir etkileşimin olduğu görülmektedir. Serbest konjugat uygulandığında hücre canlılığı %94 bulunurken, DSPC_L-K ile bu değer %78,68 ve DSPC_L-FA-K ile %73,17 olarak bulunmuştur. Sonuçlardan da görüleceği üzere aktif hedeflendirmede hücre içine alım daha fazladır, X-ışını uygulanmadığında bile KN'nin FRET etkisinden dolayı bir hücre ölümü söz konusudur.

Radyoterapide hücre ölümü 2 şekilde olmaktadır; reproduktif ölüm ya da mitotik ölüm ve apoptotik ölüm. Reproduktif ölüm ya da mitotik ölümden hücreler canlı kalırken bölünme yeteneklerini yitirmektedir. Bu hücreler morfolojik olarak normal görünüme sahip olabilirler, hatta protein ve DNA sentezi yaparak bir ya da iki mitoz geçirebilirler. Ancak bundan sonra bölünme yeteneklerini kaybederler. Radyobiyojide bu olay bir hücre ölümü olarak adlandırılır. Apoptotik ölümden ise hücre canlılığını tamamen yitirmektedir (6,7).

Çalışmada hücre canlılığı MTT testi ile değerlendirilmiştir. MTT testi tetrazolyum tuzları kullanılarak hücrenin mitokondriyel aktivitesine bakılarak canlı hücrelerin belirlenmesi olarak özetlenebilir. Tetrazolyum tuzları elektron alarak indirgenir ve formazon kristallerine dönüşerek renk değişimi oluşur. Tetrazolyum halkası ancak aktif mitokondri tarafından kırılabilir bunun için renk reaksiyonu sadece canlı hücrelerde gerçekleşebilir. Ölü hücrelerde herhangi bir renk değişimi söz konusu olmaz (127, 128).

Bu bilgiler ışığında değerlendirilecek olursa; mitotik ölüm gösteren hücreler aslında hücre büyümeleri durmuş olmasına rağmen halen canlı durumda olan hücrelerdir ve dolayısıyla MTT testinde renk değişimi gösterebilmektedirler. Bu da bu hücrelerin canlı olarak değerlendirilmesine yol açabilir. Bu MTT testinin sınırlaması olarak değerlendirilebilir.

Çalışmada beklenmedik bir şekilde PC lipozomlarının etkin madde içermeyenlerde dahil olmak üzere sitotoksik etkileri yüksek bulunmuştur. Bu literatürdeki bulgularla uyuşmamaktadır. Çünkü genel olarak özellikle boş lipozomların sitotoksik olmadıklarına dair literatürde çok sayıda çalışma mevcuttur (129, 130, 131).

Bu durumu yorumlamak için radyasyonun hücrel hasarlarına bakmak uygun olabilir. Radyasyon hasarları letal, subletal ve potansiyel letal hasar olarak sınıflandırılmaktadır (6,7). Letal hasar onarılamayan olaylar olmakla birlikte hücrenin ölümüne sebep olurlar. Subletal hasarda ikinci bir doz uygulamasının eklenmemesi durumunda hücreler kendilerini onarabilirler ki bu çalışmada tek seferde 10Gy doz uygulandığından subletal hasarının oluşması beklenmektedir. Potansiyel letal hasarda ışınlamadan sonra hücrelerin buldukları ortam koşullarına göre değişiklik gösteren hasarlardır. Bilindiği üzere in vitro koşullarda hücrelerin yaşayabilmeleri için optimum koşullar belirlenmiştir ve yaşamları için gerekli olan nem, ısı, pH ve besin tam olarak hücrelere verilmektedir. Ayrıca in vitro hücre kültür çalışmalarında in vivo koşulların aksine radyasyon uygulanan hücrelerin vücutta diğer hücreler ile olan ilişkisi de söz konusu değildir. Dolayısıyla in vitro hücre kültür davranışlarının birebir in vivo koşulları yansıtması beklenmemelidir. İn vitro hücre kültür çalışmalarında hücrelerin büyümesi için gerekli ortamlar sürekli sağlandığı için hücrelerin kendini onarıp canlılığı sürdürmesi ve bölünerek çoğalması olasıdır. Bu durum in vivo apoptozise giderek hücrenin in vitro koşullarda optimum koşullar sağlandığı için hala canlı kalmasına sebep olabilecektir. Bu bilgiler ve ışınlama sonrası MTT testi yapmadan önce 72 saat bekleme süresi olduğu göz önünde tutulursa, çalışmada PC lipozomları ile elde edilen yüksek ölümlerin formülasyona bağlı olarak değil de hücrelerin bölünmeye devam etmesi nedeniyle birbirine fazla temas ederek deney koşullarına bağlı bir ölüm olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu konuda daha net sonuçlara varılabilmesi detaylı incelemelerin yapılması veya hücre canlılıklarının MTT dışında farklı yöntemlerle gösterilmesi gerekmektedir.

Apoptozis ve radyoduyarlılık arasında bir korelasyon sözkonusudur. Radyodirençli hücre hatlarında apoptozis gözlenmezken, radyoduyarlılık artıkça apoptozisin gözlendiği ya da arttığı bir gerçektir. Ayrıca klasik radyoterapide, apoptozisin mitotik ölüme nazaran daha az olduğu da bilinen bir gerçektir (6). Sağkalım eğrilerinde en geniş omuzlara sahip olan radyodirençli hücre serilerinde apoptoz gözlenmezken, üstel fonksiyon şeklinde azalan radyoduyarlı hücrelerde ise apoptozun gözlendiği bilinmektedir. Sağ kalım eğrilerinde daha küçük ve dar bir omuz ile birlikte artan radyoduyarlılık orantılıdır. Mitotik ölüm kromozom anormalliklerinden kaynaklanmaktadır. Apoptotik ölüm ise henüz tam olarak anlaşılamayan

mekanizmalardan kaynaklanmaktadır, ancak sağkalım eğrilerinde dozun üstel bir fonksiyonu olarak gerçekleşir (6,7, 127,128)

Yukarıda verilen bilgiler ışığında Şekil 31' de elde edilen sonuçlar incelendiğinde, çalışmada hazırlanan KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonlarının kullanılması ile artan radyoduyarlılıktan dolayı apoptozisin baskın hale geldiği, sadece radyasyon uygulandığı durumda ise mitotik ölümün baskın olduğu görülmektedir. Ayrıca sadece radyasyon uygulamasının sağ kalım eğrisi geniş bir başlangıç omzuna sahip iken KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonlarının sağ kalım eğrileri üstel fonksiyon şeklindedir. 15 ve 20 Gy radyasyon dozlarında hücre ölümlerinde kayda değer bir değişim olmaması hücrelerin tamamına yakınının mitotik ölüm ile öldüğü ve bunun MTT ile tespit edilemediği düşünülmektedir.

5.6. İn Vivo Çalışmalara Ait Bulguların Değerlendirilmesi

5.6.1. Gama Kamera İle Görüntüleme Çalışmalarına Ait Bulgular

Tc-99m işaretli KN-Ce6 konjugatı içeren yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş DSPC lipozomları ile yapılan görüntüleme çalışmalarında tümör görüntülenememiştir. Bunda en temel etkenlerden biri görüntüleme için insan görüntülemeye kullanılan gama kamera cihazı ile farelerin görüntülenmeye çalışılmasıdır. Bu çalışmanın microSPECT ile yapılması durumunda daha başarılı sonuçlar alınabileceği düşünülmektedir. Görüntüleme sonrası fareler öldürülerek tümör ve normal kas dokusu örnekleri alınarak radyoaktiviteleri ölçülmüştür. Tümör dokusunun aktivitesi normal dokuya göre yüksek bulunmuştur. Bu, uygulanan radyoaktif lipozom dispersiyonunun tümör dokusunda tutulduğunu göstermekle birlikte bu konuda daha kesin sonuçlara ulaşmak ve tutulum oranlarını sayısal olarak ifade etmek, diğer dokularla karşılaştırıldığında tümördeki tutulumun anlamlı olup olmadığı söylemek için biyodağılım çalışması yapılması düşünülebilir. Görüntüleme çalışmasından istenilen sonuçların elde edilememesi üzerine konu ile ilgili literatür araştırması yapılmıştır. Benzer çalışmalardan yola çıkılarak daha sonraki tedavi çalışmalarında lipozom dispersiyonlarının uygulanmasından sonra 6 saat beklenmesine ve süre sonunda radyoterapi uygulanmasına karar verilmiştir (132).

5.6.2. Lipozom Formülasyonlarının Antitümöral Etkinliğinin İn Vivo İncelenmesine Ait Bulguların Değerlendirilmesi

Tedavi Planlaması Sonuçları

Tedavi planlaması sonucunda elde edilen DVH'ler incelendiğinde ICRU'nun 50 no'lu raporuna (113) uygun olarak uygulanan dozların $\pm\%5$ sınırları arasında olduğu görülmüştür. Bazı farelerin setup pozisyonlarından dolayı belirlenen doz $\pm\%5$ den daha fazla doz aldığı, ancak bu minimal dozun tedaviye etkisi olmayacağı değerlendirilmiştir.

Yüksek enerjili hüzmelerde ikincil elektronların erişim mesafeleri daha uzundur. Ayrıca kompton etkisinden dolayı primer hüzmeye doğrultusundan açılı olarak saçılır. Bu nedenle yüksek enerjili fotonlar için, maksimum doz dokuda daha derinlerde oluşur. Örneğin 6 MV için 1,5 cm, 18 MV için 3,3 cm ve Co-60 için 0,5 cm derinliklerde maksimum doza ulaşılır. Giriş dozu bu enerji seviyelerinde her zaman daha düşük olduğundan dolayı ışınlama esnasında yüzeydeki tümörlerin eksik doz almasının engellenmesi, vücut konturlarındaki eğriliklerin giderilmesi ve boşlukların doldurulması için doku eşdeğeri boluslar kullanılır (133,134).

Bolus düzgün olmayan vücut yüzeylerinde demetin vücuda dik ve homojen olarak girmesini sağlamaktadır. Çalışmamızda kullandığımız farelerin sağ arka ayaklarına tümör enjekte edildiği için ve tümör vücut dışına doğru belirgin şekilde büyüdüğünden deri ve yakınındaki tümörlerin tam doz almasının sağlanması için 1 cm bolus kullanılmıştır.

Tedavi etkinliğinin İzlenmesi

Farelerin Vücut Ağırlıklarındaki Değişimin Saptanması

Kilo kaybı kanser hastalarında sık görülen semptomlardan biridir. Artmış enerji harcama ve azalmış beslenme gözlenen kilo kaybı için nedensel faktör olarak bilinmekle birlikte bu kilo kaybının altında yatan pek çok faktör söz konudur (135).

Bu çalışmada her bir gruptaki hayvanların ağırlıkları yaşam süreleri boyunca Bölüm 3.10.3.3.1' de anlatıldığı şekilde izlenmiştir. Grup I' deki hayvanların ağırlıklarında anlamlı bir azalma gözlenirken ($p=0,018$), Grup II ve Grup III' deki hayvanlarda bu azama daha azdır, sırasıyla ($p=0,074$) ve ($p=0,061$).

Tümör Boyutundaki Değişimin Belirlemesi

Bölüm 3.10.2’de anlatıldığı şekilde tümör oluşturulmuş fareler Bölüm 3.10.3’de anlatıldığı şekilde gruplara ayrılarak tedavi işlemi uygulanmış ve tedavi sonrası tümör boyutundaki değişimler; mikro BT ve BT simülatör (tedavi planlaması için kullanılan) görüntülerden elde edilen ölçümler ve kumpas kullanılarak manuel olarak elde edilen ölçümler kullanılarak tümör hacimleri hesaplanarak değerlendirilmiştir.

Bu 3 yöntemle hesaplanan değerler arasında farklılıklar görülmüştür. MikroBt ve BT similatör ile 3 boyutlu ölçümler yapılırken kumpas ile yapılan ölçümlerde 2 boyutlu ölçümler yapılabilmıştır. Çalışmada kullanılan BT simülatör insan için kullanılan cihazlar olduğu için elde edilen görüntülerde tümör sınırlarının belirlenmesinde zorluklar yaşanmıştır. En hassas görüntüleme ve ölçüm mikro BT ile elde edilmiştir.

MikroBT, teknik olarak konik ışıklı bilgisayarlı tomografi tekniği olup bu görüntüleme konik geometriye sahip X-ışınları kullanılır (136). MikroBT’de voksel aralıkları (sinyalin alındığı bölgenin hacmi) hacimsel olarak normal tomografilere göre 1 milyon kat daha küçük olup 1-50 µm arasındadır. Bu küçük voksel aralığı sayesinde mikroBT’ler kesitsel olarak çok iyi bir çözünürlüğe sahiptirler (125). Bu nedenlerden dolayı mikroBT ile elde edilen görüntülerden tümör hacimleri daha büyük doğruluk ile tespit edilebilmiştir. Ayrıca mikroBT’den elde edilen görüntüler kullanılarak tümörlerin hacimsel görüntüleri (volume rendering) oluşturulmuştur (Bkz Şekil 35-37). Elde edilen veriler doğrultusunda, DSPC_L-FA-K lipozomlarının kullanıldığı Grup III’deki farelerin tümör hacmi küçülürken diğer gruptaki hayvanların tümör boyutlarının arttığı gözlenmiştir. Grup III’deki farelerde tümör hacminde 0.gün ile 5.gün arasında %38,36’lık, 0.gün ile 10.gün arasında %39,04’lük bir azalış olduğu gözlenmiştir (Bkz. Tablo 28).

Biyokimyasal Değerlendirme

Tümör oluşturulmuş ve tedavi uygulanmış ve tedavi uygulanmamış hayvanlardan alınan kan örneklerine ait biyokimyasal değerlendirme sonuçlarına bakıldığında; tümör oluştuğunda non spesifik immun yanıtla ilişkili olarak ya da paraneoplastik olarak lökositoz gelişebilmektedir. Grup I, Grup II ve Grup III’deki farelerde lökositoz oluşumu gözlenmiştir. Tedavi sonrası Grup II ve Grup III’deki farelerde lökosit sayıları muhtemel tedaviye yanıtla normal aralığa gerilediği görülmüştür. Kanser tedavilerinde lökopeni

(WBC de normal değerin altına dūşülmesi) doz sınırlayıcı bir yan etki olarak görölmektedir. Tedavi sonrası Grup III ve Grup II'deki hayvanların lökosit sayılarının normal aralıkta kalması lökopeninin tedavi için doz sınırlayıcı bir yan etki olmayacağını düşündürmektedir.

Trombositopeni, çoğunlukla tümörün kemik iliğini infiltre etmesine bağlı nadiren de paraneoplastik olarak ortaya çıkabilmektedir. Grup II ve Grup III'deki farelerde başlangıçta trombositopeninin mevcut olduğu görölmek ile birlikte, tedavi sonrası muhtemel tümör yanıtıyla ilişkili olarak trombosit sayılarının normal aralığa geldiği görölmüştür. Aynı şekilde kanser tedavileri sırasında trombositopeni gelişmesi, lökopeniyle benzer şekilde çoğu kez doz sınırlayıcı toksisite olarak görölmektedir. Tedavi sonrası trombositopeni gelişmemesi de çalışma kapsamında uygulanan tedavi için bir avantaj olarak değerlendirmiştir.

Uygulanan tedavi ile ilişkili olarak anlamlı bir hemoglobin düşüştü de gelişmemiştir. Sonuç olarak uygulanan tedavi yöntemleri ile doz sınırlayıcı bir kemik iliği toksisitesi gelişmediği de görölmüştür (Bkz Tablo 29).

Sağ Kalım Sürelerinin İzlenmesi Bulguları

Tedavi uygulanmayan (Grup I) ve sadece radyoterapi uygulanan (Grup II) ve DSPC_L-FA-K lipozomları ve radyoterapi uygulanan farelerin sağ kalım süreleri incelendiğinde Grup III'de yer alan farelerin daha uzun yaşıdığı sağ kalım sürelerinin arttığı görölmüştür. Hatta Grup III'de yer alan 1 farede tümör dokusu tedavi sonrası tamamen yok olmuştur. Başlangıç tümör boyutları homojen tutulmaya çalışılsa da fareler arasında tümör büyüklüğü açısından farklılıklar kaçınılmaz olarak gözlenmiştir. Ancak tedavi gruplarında yer alacak fareler başlangıçta seçilerek bu farklılık minimize edilmeye çalışılmıştır. Deneysel gözlemler sonucunda başlangıç tümör boyutu küçük olduğunda tümörün daha fazla oranda küçülebildiği daha büyük tümörlerde ise tümör boyutunun küçülmesinden ziyade tümörün büyümesinin durdurulabildiği görölmüştür. Ancak bununla ilgili daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için daha fazla sayıda denekle çalışmaların planlanmasına ihtiyaç vardır.

Histopatolojik İnceleme Sonuçları

Tedavi uygulanmayan (Grup I) ve sadece radyoterapi uygulanan (Grup II) ve DSPCL-FA-K lipozomları ve radyoterapi uygulanan fareler belirlenen tedavi protokolüne göre belirlenen örnekleme günlerinde BT ile görüntülenmiş ve her örnekleme gününde her gruptan 2 hayvan alınarak sakrifiye edilmiş ve patolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmelere ait ayrıntılı sonuçlar Bölüm 4.6.4.2.5'de ayrıntılı olarak sunulmuştur.

Beşeri hekimlikte spontan olarak gelişen meme tümörlerinin prognozunun daha iyi belirlenebilmesi için bir derecelendirme metodu önerilmiştir. Bu metot bilim dünyasında geniş oranda kabul görmeye birlikte daha sonraları çeşitli hayvanlarda spontan gözlenen meme tümörlerinde de yaygın şekilde kullanılmıştır. Bahse konu olan metotta tubul oluşum durumu, nükleer pleomorfizm ve mitoz sayıları puanlanarak elde edilen toplam skora göre tümörler iyi diferansiye, orta diferansiye ve zayıf diferansiye olarak derecelenmiştir(138).

Bu tez çalışmasında tümörlerin prognozunun belirlenmesi için yukarıda belirtilen sistemin kullanılması planlanmıştır. Fakat deneysel olan bu çalışmada tümör hücreleri dışarıdan enjeksiyon yolu ile verildiğinden tubul oluşumunun görülüp görülmemesi ve hücrelerin hepsinin benzer morfolojik özelliklere sahip olması beklenebilir. Bu durum da çalışmada yer alan tümörlerde tubul oluşumunun gözlenmemesi ve hücre morfolojilerinin benzer olması normal olarak karşılanabilir. Bütün tümörler ilk iki maddeden aynı puanı alacakları için, bu maddelerin tümörlerin prognozunu kıyaslanmasında ayırıcı önemi kalmamaktadır. Tümörlerin prognozları için ayırıcı role sahip tek kriter, en belirgin değişimin görüldüğü mitoz sayısıdır.

HE kesitlerde mitotik figürlerin sayılması, hücre proliferasyonunun ve prognoz tahmin edilmesinde kullanılan en eski metotlardan birisi olmakla birlikte en çok tercih edilenidir (139). Mitotik aktivite sayıları Meuten ve ark. tarafından 2016 yılında yayınlanan kurallar dikkate alınarak hesaplanmıştır (140).

Mitoz sayıları değerlendirildiğinde grup I'in belirgin farklılıkla en kötü prognoza sahip olduğu görülmektedir. Grup II ve grup III, grup I'e kıyasla daha iyi prognoza sahiptir. Üç grup arasında grup III en az mitoz sayısı ortalamasıyla en iyi prognozlu olarak dikkati çekmektedir.

Ayrıca mitotik aktivitenin Grup III' de en az görülmesi (ortalama 2,9) DSPC_L-FA-K lipozomları uygulamasını takiben yapılan radyoterapinin, sadece radyoterapi uygulanan Grup II' ye göre daha fazla mitozda azalmaya sebep olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla DSPC_L-FA-K lipozomları apoptotik ölümlere ilave olarak tümör hücrelerinin çoğalma hızını da düşürerek tedaviye katkıda bulunmuştur.

Tümörlerde gözlenen nekroz; dolaşım yetmezliğinden ya da tümör nekroz faktör (TNF) olarak isimlendirilen ve canlıının immun sistemi tarafından aktive edilen bir sitokin tarafından meydana getirilir (141). Gruplarda gözlenen tümörlerin hepsinde damarlaşmanın fazla belirgin olmadığı göz önüne alınırsa TNF'lerin gözlenen nekrozlar üzerine daha fazla etkiye sahip oldukları düşünülebilir. Gruplardaki nekroz sahaları incelendiğinde Grup III diğer gruplara göre daha geri planda kalmaktadır. Bu durum yapılan uygulama'nın bir şekilde TNF'ler üzerine baskılayıcı etki yaptığını düşündürmektedir.

6. SONUÇ

Kanser tedavisinde daha az radyasyon dozunda daha fazla faydanın sağlanması ve klinikte kullanılan X ışını radyasyon dozlarına nazaran daha düşük radyasyon dozu kullanılarak tümör hücrelerinin yok edilmesinin amaçlandığı bu tez kapsamında radyoterapide kullanılmak üzere KN (CdSeZnS)-Ce-6 konjugatı içeren, PEG kaplı, nanoboyutlu, yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş, PC ve DSPC fosfolipitleri içeren immunolipozom dispersiyonları hazırlanarak klinikte kullanılmaya aday bir radyoduyarlaştırıcı üretilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda;

- FRET etkileşiminin gerçekleşmesi için gerekli olan “alıcı ile verici arasındaki mesafenin istenen ölçüde olması (< 10 nm)” kuralının yerine getirilebilmesi için KN ve Ce6'nın literatürle uyumlu olacak şekilde kovalent olarak bağlandıkları gösterilmiştir.
- Film metodu kullanılarak hazırlanan lipozomlarda uygun parçacık boyutu ve etkin madde enkapsülasyonu sağlanmıştır.
- Partikül büyüklükleri folik asitle modifiye edilmemiş lipozomlar için (PC_L-K 196,4 \pm 4,9; $DSPC_L-K$ 227,2 \pm 3,1), folik asitle modifiye edilmiş lipozomlar için (PC_L-FA-K 182,2 \pm 1,8; $DSPC_L-FA-K$ 239,2 \pm 6,7) olarak bulunmuştur.
- İçte tutulan konjugat yüzdesi folik asitle modifiye edilmemiş lipozomlar için (PC_L-K %9,5 \pm 0,5; $DSPC_L-K$ %22,2 \pm 2,5), folik asitle modifiye edilmiş lipozomlar için (PC_L-FA-K %6,1 \pm 0,6; $DSPC_L-FA-K$ %13,7 \pm 3,3) olarak bulunmuştur. Yüzeyi folik asit ile modifiye edilmiş lipozomların enkapsülasyon verimi yüzeyi modifiye edilmemiş olanlara göre daha düşük bulunmuştur.
- DSPC içeren lipozom formülasyonlarının, partikül büyüklüğü değişimi gerekse içte tutulan konjugat miktarının korunması açısından stabil olduğu, buzdolabında bekletilen formülasyonların stabilitelerinin oda sıcaklığında bekletilen formülasyonlara göre daha iyi olduğu gözlenmiştir.
- Hazırlanan formülasyonun sitoksik etkilerini değerlendirmek için folat pozitif hücre hattı olan 4T1 hücresi ile çalışılmıştır. Herhangi bir X ışını uygulaması olmadığında bile FRET etkisinden dolayı bir hücre ölümü görüldüğü gözlenmiştir. Ancak X ışını ve radyoduyarlaştırıcının birlikte kullanılması bu etkinin artmasını sağlamıştır ve sonuç olarak; tek başına 5 Gy X ışını radyasyon dozunun hücre kültürü üzerinde yaptığı etki ile karşılaştırıldığında serbest

konjugat +X ışınının uygulamasının hücre ölümünde %36,5±1,2 bir artış ve DSPC_L-FA-K +X ışını uygulamasının hücre ölümünde %27,1±1,7 artış sağladığı görülmüştür.

- Üretilen formülasyonun SER oranı 3.3 bulunmuştur.
- Çalışmada hazırlanan KN-Ce6 konjugatı içeren lipozom dispersiyonlarının kullanılması ile apoptozisin baskın hale geldiği, sadece radyasyon uygulandığı durumda ise mitotik ölümün baskın olduğu gösterilmiştir.
- İn vivo çalışmalarda; hazırlanan formülasyonların antitümöral etkinliklerinin izlenmesi çalışmalarında, tedavi uygulanmayan (Grup I) ve sadece X ışını uygulanan gruptaki (Grup II) farelerde tümör hacimlerinde artış görülürken, DSPC_L-FA-K lipozomları + X ışınının kullanıldığı gruptaki farelerde (Grup III) tümör hacminin küçüldüğü bazı hayvanlarda da tümör büyümesinin durduğu gözlenmiştir. Grup III'deki farelerde tümör hacminde 0.gün ile 5.gün arasında % 38,36'lık, 0.gün ile 10.gün arasında % 39,04'lük bir azalış olduğu gözlenmiştir.
- Ayrıca sağ kalım ve biyokimyasal değerlendirme sonuçlarından da DSPC_L-FA-K lipozomlarının tedaviye etkisinin pozitif olduğu gösterilmiştir.
- Histopatolojik inceleme sonuçları incelendiğinde; mitotik aktivitenin Grup III' de en az görülmesi (ortalama 2,9) DSPC_L-FA-K lipozomları uygulamasını takiben yapılan radyoterapinin, sadece radyoterapi uygulanan Grup II' ye göre daha az mitotik aktiviteye sebep olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla DSPC_L-FA-K lipozomları hem tümör hücrelerinin çoğalma hızını düşürdüğü hem de radyasyona oranla daha fazla apoptotik ölüme yol açtığı gösterilerek tedaviye katkı da bulunduğu gösterilmiştir.
- Sonuç olarak in vitro ve in vivo çalışmalardan elde edilen sonuçlar incelendiğinde DSPC_L-FA-K (DSPC:Chol:SA:PEG₂₀₀₀-DSPE:FA-PEG₂₀₀₀-DSPE+KN-Ce6) lipozom dispersiyonunun, radyoterapide daha az radyasyon dozu uygulanarak tedavide aynı veya daha iyi etkinlik sağlanması için umut verici bir radyoduyarlaştırıcı ajan olabileceği sonucuna varılmıştır. Daha kesin sonuçların elde edilmesi için daha geniş gruplarda in vivo çalışmaların yapılmasına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. American Cancer Society. "Cancer Facts & Figures", <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2018.html>, Son erişim tarihi: 29 Mart 2020.
2. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A. 2020. "Cancer statistics", CA Cancer Journal for Clinicians, 70(1), 7-30.
3. Guo, T., Nanoparticle radiosensitizers. Patent WO2006037081, Q3, 2006.
4. Praetorius, N.P., Mandal, T.K. 2007. "Engineered nanoparticles in cancer therapy", Recent Patents on Drug Delivery & Formulation, 1(1), 37-51.
5. Juzenas, P., Chen, W., Sun, Y.,P., Coelho, M.A.N., Generalov, R., Generalova, N., Christensen, N. 2008a. "Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer", Advanced Drug Delivery Reviews, 60(15), 1600-1614.
6. Hall, E., Giaccia, A. 2006. "Radiobiology for the Radiologist", Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, Section 1.
7. Özalpan, A., 2001. "Temel Radyobioloji", İstanbul: Haliç Üniversitesi Yayınları.
8. Kwatra, D., Venugopal, A., Anant, S., 2013. "Nanoparticles in radiation therapy: a summary of various approaches to enhance radiosensitization in cancer", Translational Cancer Research, 2(4), 330-342.
9. Podgorsak, E.B., 2003. "Review of radiation oncology physics: a handbook for teachers and students". Vienna, Austria: IAE Agency Publications.
10. Beyzadeoğlu, M., Ebruli,C.C. 2008, Temel Radyasyon Onkolojisi, Ankara: GATA Yayınları,
11. Cho, S.H., Krishnan, S. 2013. "Basic principles of Radiation Onchology and Radiosensitization" Cancer Nanotechnology: Principles and Applications in Radiation Oncology, USA, CRC Press.
12. Çoban, Z., Güran, Ş. 2013. "Hücre içi sinyal iletimi mekanizmalarının kanser tanı ve tedavisindeki rolü", Cumhuriyet Tıp Dergisi, 35(2), 302-310.
13. Khan, F.M., Gibbons, J.P. 2014. "Khan's the physics of radiation therapy", Lippincott Williams & Wilkins, USA.
14. Minchinton, A.I., Rojas, A., Smith, K.A., Soranson, J.A., Shrieve, D.C., Jones, N.R., Bremner, J.C. 1984. "Glutathione depletion in tissues after administration of

- buthionine sulphoximine”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 10(8), 1261-1264.
15. Wang, L., Yang, W., Read, P., Larner, J., Sheng, K. 2010. “Tumor cell apoptosis induced by nanoparticle conjugate in combination with radiation therapy”, *Nanotechnology*, 21(47), 475103.
 16. Eberhardt, W., Pöttgen, C. Stuschke, M. 2006. “Chemoradiation paradigm for the treatment of lung cancer”, *Nature Reviews Clinical Oncology*, 3(4),188-199
 17. Hao, D., Ritter M.A., BA, T.O., Brownman, G.P., 2006. “Platinum-based concurrent chemoradiotherapy for tumors of the head and neck and the esophagus”, *Seminars in Radiation Oncology*, 16(1), 10-19
 18. Retif, P., Pinel, S., Toussaint, M., Frochot, C., Chouikrat, R., Bastogne, T., Heyob, M.B. 2015. “Nanoparticles for radiation therapy enhancement: the key parameters”, *Theranostics*, 5(9):1030-1044.
 19. Berbeco, R.I., Ngwa, W., Makrigiorgos, G.M. 2011. “Localized dose enhancement to tumor blood vessel endothelial cells via megavoltage X-rays and targeted gold nanoparticles: new potential for external beam radiotherapy”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 81(1), 270-276.
 20. Roeske, J.C., Nuñez, L., Hoggarth, M., Labay, E., Weichselbaum, R.,R. 2007. “Characterization of the theoretical radiation dose enhancement from nanoparticles”, *Technology in Cancer Research & Treatment*, 6(5): 395-401.
 21. Cho, S.H. 2005. “Estimation of tumour dose enhancement due to gold nanoparticles during typical radiation treatments: a preliminary Monte Carlo study”, *Physics in Medicine & Biology*, 50(15), N163.
 22. Cho, S.H., Krishnan, S. 2007. “Dosimetric feasibility of gold nanoparticle-aided radiation therapy (GNRT) using a Yb-169 source”, *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 69(3), S639.
 23. Maggiorella, L., Barouch,G., Devaux, C., Pottier, A., Deutsch,E., Bourhis, J., Borghi, E., Levy, L. 2012. “Nanoscale radiotherapy with hafnium oxide nanoparticles”, *Future Oncology*, 8(9): 1167-1181.
 24. Hainfeld, J.F., Slatkin, D.N., Smilowitz, H.M. 2004. “The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice”, *Physics in Medicine & Biology*, 49(18), N309.
 25. Takahashi, J., Misawa, M. 2007. “Analysis of potential radiosensitizing materials for X-ray-induced photodynamic therapy”, *NanoBiotechnology*, 3(2): 116-126.

26. Harada, A., Ono, M., Yuba, E., Kono, K. 2013. "Titanium dioxide nanoparticle-entrapped polyion complex micelles generate singlet oxygen in the cells by ultrasound irradiation for sonodynamic therapy", *Biomaterials Science*, 1(1): 65-73.
27. Schwarz, P.F., Turro, N.J., Bossmann, S.H., Braun, A. M., Wahab, A.M.A.A., Dürr, H. 1997. "A new method to determine the generation of hydroxyl radicals in illuminated TiO₂ suspensions", *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(36): 7127-7134.
28. French, R.A., Jacobson, A.R., Kim, B., Isley, S.L., Penn, R.L., Baveye, P.C. 2009. "Influence of ionic strength, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles" *Environmental Science & Technology*, 43(5), 1354-1359.
29. Harada, Y., Ogawa, K., Irie, Y., Endo, H., Feril, L.B., Uemura, T., Tachibana, K. 2011. "Ultrasound activation of TiO₂ in melanoma tumors", *Journal of controlled release*, 149(2), 190-195.
30. West, J.L., Halas, N.J. 2003. "Engineered nanomaterials for biophotonics applications: improving sensing, imaging, and therapeutics", *Annual Review of Biomedical Engineering*, 5(1), 285-292.
31. Azzazy, H.M., Mansour, M.M., Kazmierczak, S.C. 2007. "From diagnostics to therapy: prospects of quantum dots", *Clinical Biochemistry*, 40(13-14), 917-927.
32. Durmuşoğlu, E.G. 2011. "Kuantum Nokta" *Teknik Yazı Metalurji, TMMOB Metalurji ve Malzeme Mühendisleri Odası*, 160, 31.
33. Ishikawa, M., Biju, V. 2011. "Luminescent quantum dots, making invisibles visible in bioimaging" *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 104, 53-99.
34. Bera, D., Qian, L., Tseng, T.K., Holloway, P.H. 2010. "Quantum Dots and Their Multimodal Applications: A Review", *Materials*, 3(4), 2260-2345.
35. Vasudevan, D., Gadham, R., R., Trinchì, A., Cole, I. 2015. "Core-shell quantum dots: Properties and applications", *Journal of Alloys and Compounds*, 636, 395-404.
36. Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K. 2004. "On the cyto-toxicity caused by quantum dots", *Microbiology and immunology*, 48(9), 669-675.
37. Hardman, R., 2006. "A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors", *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 165-172.

38. Jamieson, T., Bakhshi, R. Petrova, D., Pocock, R., Imani, M., Seifalian, A.M. 2007. "Biological applications of quantum dots", *Biomaterials*, 28(31), 4717-4732.
39. Lovric, J., Bazzi, H.S., Cuie, Y., Fortin, G. R. A., Winnik, F.M., Maysinger, D. 2005. "Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe quantum dots" *Journal of Molecular Medicine*, 83(5), 377-385.
40. Derfus, A.M., Chan, W.C., Bhatia, S.N. 2004. "Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots", *Nano letters*, 4(1), 11-18.
41. Medintz, I.L., Uyeda, H.T., Goldman, E.R., Mattoussi, H. 2005. "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing", *Nature materials*, 4(6), 435-446.
42. Crow, J.P. 1997. "Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species", *Nitric oxide*, 1(2), 145-157.
43. Wrona, M., Patel, K., Wardman, P. 2005. "Reactivity of 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms toward carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals", *Free Radical Biology and Medicine*, 38(2), 262-270.
44. Ipe, B.I., Lehnig, M., Niemeyer, C.M. 2005. "On the generation of free radical species from quantum dots", *Small*, 1(7), 706-709.
45. Green, M., Howman, E. 2005. "Semiconductor quantum dots and free radical induced DNA nicking" *Chemical Communications*, (1), 121-123.
46. Hoshino, A., Hanaki, K., Suzuki, K., Yamamoto, K. 2004a. "Applications of T-lymphoma labeled with fluorescent quantum dots to cell tracing markers in mouse body", *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 314(1), 46-53.
47. Hoshino, A., Fujioka, K., Oku, T., Suga, M., Sasaki, Y.F., Ohta, T., Yasuhara, M., Suzuki, K., Yamamoto, K. 2004b. "Physicochemical properties and cellular toxicity of nanocrystal quantum dots depend on their surface modification", *Nano Letters*, 4(11), 2163-2169.
48. Ballou, B., Lagerholm, B.C., Ernst, L.A., Bruchez, M.P., Waggoner, A.S. 2004. "Noninvasive imaging of quantum dots in mice", *Bioconjugate Chemistry*, 15(1), 79-86.
49. Jaiswal, J.K., Mattoussi, H., Mauro, J.M., Simon, S.M. 2003. "Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates", *Nature Biotechnology*, 21(1), 47-51.

50. Su, Y., He, Y., Lu, H., Sai, L., Li, Q., Li, W., Wang, L., Shen, P., Huang, Q., Fan, C. 2009. "The cytotoxicity of cadmium based, aqueous phase-synthesized, quantum dots and its modulation by surface coating", *Biomaterials*, 30(1), 19-25.
51. Chen, N., He, Y., Su, Y., Li, X., Huang, Q., Wang, H., Zhang, X., Tai, R., Fan, C., 2012. "The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots", *Biomaterials*, 33(5), 1238-1244.
52. Abrahamse, H. ve Hamblin, M.R. 2016. "New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.
53. Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kedzierska, E., Czop, K.K., Kotlinska, J., Michel, O., Kotowski, K., Kulbacka, J. 2018. "Photodynamic therapy-mechanisms, photosensitizers and combinations", *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 1098-1107.
54. Ai, F., Ju, Q., Zhang, X., Chen, X., Wang, F., Zhu, G. 2015. "A core-shell-shell nanoplatfrom upconverting near-infrared light at 808 nm for luminescence imaging and photodynamic therapy of cancer", *Nature*, 5, 10785.
55. Zhu, T.C., Finlay, J.C. 2008. "The role of photodynamic therapy (PDT) physics", *Medical Physics*, 35(7 Part1), 3127-3136.
56. Fowley, C., Nomikou, N. McHale, A.P., McCaughan, B., Callan, J.F. 2013. "Extending the tissue penetration capability of conventional photosensitizers: a carbon quantum dot-protoporphyrin IX conjugate for use in two-photon excited photodynamic therapy" *Chemical Communications*, 49(79), 8934-8936.
57. Tsay, J.M., Trzoss, M., Shi, L., Kong, X., Selke, M., Jung, M.E. Weiss, S. 2007. "Singlet Oxygen Production by Peptide-Coated Quantum Dot-Photosensitizer Conjugates", *Journal of the American Chemical Society*, 129(21), 6865-6871.
58. Sattler, K.D., 2010."Handbook of nanophysics: nanomedicine and nanorobotics" USA, CRC Press.
59. Weishaupt, K.R., Gomer, C.J., Dougherty, T.J. 1976. "Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor", *Cancer Research*, 36 (7 Part 1), 2326-2329.
60. Bakalova, R., Ohba, H., Zhelev, Z., Ishikawa M., Baba, Y. 2004a. "Quantum dots as photosensitizers?", *Nature Biotechnology*, 22(11), 1360-1361.
61. Josefsen, L.B., Boyle, R.W. 2008. "Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers", *Metal-Based Drugs*, 2008: 276109.

62. Douglas, S., Davis, S.S., Illum, L. 1987. "Nanoparticles in drug delivery. Critical reviews in therapeutic drug carrier systems", 3(3), 233-261.
63. Wilczewska, A.Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K.H., Car, H., 2012. "Nanoparticles as drug delivery systems", *Pharmacological Reports*, 64(5), 1020-1037.
64. Sayiner, Ö., Çomoğlu, T. 2016. "Nanotaşıyıcı Sistemlerde Hedeflendirme Targetting with Nanocarrier Systems", *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 40(3), 62-79.
65. Kalashnikova, I., Albekairi, N., Al-Enazy, S., Rytting, E. '2015. "Characterization of drug loaded nanoparticles". *Nano Based Drug Delivery*. Editör: Naik, J., Zagreb, Croatia, IAPC Publishing.
66. Bangham, A.D., Standish, M.M., Watkins, J.C. 1965. "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids", *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-252.
67. New, R.R.C. 1990. *Characterization of Liposomes. Liposomes A Practical Approach*, Editör: New, R.R.C. New York: Oxford University Press
68. Jha S., Sharma P.K., Malviya R. 2016. "Liposomal Drug Delivery System for Cancer Therapy: Advancement and Patents", *Recent Patent on Drug Delivery and Formulation*, 10(3), 177-183.
69. Fouladi F., Steffen K.J., Mallik, S. 2017. "Enzyme-Responsive Liposomes for the Delivery of Anticancer Drugs", *Bioconjugate Chemistry*, 28(4), 857-868.
70. Riaz, M.K., Riaz, M.A., Zhang X., Lin, C., Wong, K.H., Chen, X., Zhang, G., Lu, A., Yang, Z. 2018. "Surface Functionalization and Targeting Strategies of Liposomes in Solid Tumor Therapy: A Review", *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 195.
71. Olusanya, T.O.B., Haj, A.R.R., Ibegbu, D.M., Smith, JR, Elkordy, A.A. 2018. "Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs", *Molecules*, 23(4): 907.
72. Yan W., Leung, S.S., To K.K. 2020. "Updates on the use of liposomes for active tumor targeting in cancer therapy", *Nanomedicine*, 15(3), 303-318.
73. Barenholtz, Y. 2012. "Doxil®-The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned", *Journal of Controlled Release*, 160, 117-134.
74. Uhumwangho, M., Okor, R. 2005. "Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review", *JMBR: A Peer-review Journal of Biomedical Sciences*, 4 (1), 9-21.

75. Dua, J.S., Rana, A. C., Bhandari, A.K. 2012. "Liposome: methods of preparation and applications", *Int J Pharm Stud Res*, 3(2), 14-20.
76. Torchilin, V.P. 2000. "Drug targeting", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 11, S81-S91.
77. Erdoğan, S., Günay Silindir, M., Battal, H. 2020. "Lipozomların Hedeflendirilmesinde Kullanılan Yaklaşımlar", *Türkiye Klinikleri Dergisi*, (baskıda).
78. Maeda H. 2001. "The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vascularite: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting", *Advances in Enzyme Regulation*, 41, 189-207.
79. Maeda, H., 2012. "Vascular permeability in cancer and infection as related to macromolecular drug delivery, with emphasis on the EPR effect for tumor-selective drug targeting", *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 88(3), 53-71.
80. Torchilin, V.P. 2006. "Nanoparticulates as Drug Carriers", USA, Imperial College Press.
81. Deshpande, P.P., Biswas, S., Torchilin, V.P. 2013. "Current trends in the use of liposomes for tumor targeting", *Nanomedicine*, 8(9), 1509-1528.
82. Fernandez, M., Javaid, F., Chudasama, V. 2018. "Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers" *Chemical Science*, 9(4), 790-810.
83. Morales-Cruz, M., Delgado, Y., Castillo, B., Figueroa, C.M., Molina, A.M., Torres, A., Milián, M., Griebenow, K. 2019. "Smart Targeting To Improve Cancer Therapeutics", *Drug Design, Development and Therapy*, 13: 3753-3772.
84. Singh, R., Lillard, J.W. 2009. "Nanoparticle-based targeted drug delivery", *Experimental and Molecular Pathology*, 86(3), 215-223.
85. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., Farokhzad, O.C. 2014. "Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 66, 2-25.
86. Jain, V., Jain, S., Mahajan, S.C. 2015. "Nanomedicines based drug delivery systems for anti-cancer targeting and treatment", *Current Drug Delivery*, 12(2), 177-191.
87. Alibolandi, M., Abnous, K., Sadeghi, F., Hosseinkhani, H., Ramezani, M., Hadizadeh, F. 2016. "Folate receptor-targeted multimodal polymersomes for delivery of quantum dots and doxorubicin to breast adenocarcinoma: In vitro and in vivo evaluation", *International Journal of Pharmaceutics*, 500(1-2), 162-178.

88. Attia, M.F., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., Vandamme, T.F. 2019. "An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 71(8),1185-1198.
89. So, M.K., Xu, C., Loening, A., M., Gambhir, S.,S., Rao, J. 2006. "Self-illuminating quantum dot conjugates for in vivo imaging", *Nature Biotechnology*, 24(3), 339-343.
90. Hussain, S.A. 2012. "An introduction to fluorescence resonance energy transfer (FRET)", *Science Journal of Physics*, 2012, 268-272.
91. Chou, K.F., Dennis, A.M. 2015. "Förster resonance energy transfer between quantum dot donors and quantum dot acceptors", *Sensors*, 15(6), 13288-13325.
92. Karotki, A., Khurana, M., Lepock, R.,J., Wilson, B.C. 2006. "Simultaneous two-photon excitation of photofrin in relation to photodynamic therapy", *Photochemistry and Photobiology*, 82(2), 443-452.
93. Medintz, I.L., Mattoussi, H. 2009. "Quantum dot-based resonance energy transfer and its growing application in biology", *Physical Chemistry Chemical Physics*, 11(1), 17-45.
94. Chen, W., Zhang, J. ,2006. "Using nanoparticles to enable simultaneous radiation and photodynamic therapies for cancer treatment", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(4),1159-1166.
95. Samia, A.C., Chen, X., Burda, C. 2003. "Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy", *Journal of the American Chemical Society*, 125(51), 15736-15737.
96. Chen, W., 2008. "Nanoparticle fluorescence based technology for biological applications", *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 8(3),1019-1051,
97. Yang W., Read, P.W., Mi, J., Larner, J.M., Benedict, S.H., Sheng, K., Helmke, B.P. 2007. "Novel FRET-Based Radiosensitization Using Quantum Dot-Photosensitizer Conjugates," *Conference Record of the Forty-First Asilomar Conference on Signals, Systems and Computers*, Pacific Grove, CA, 1861-1865.
98. Zou, X., Yao, M., Ma, L., Hossu, M., Han, X., Juzenas, P., Chen, W. 2014. "X-ray-induced nanoparticle-based photodynamic therapy of cancer", *Nanomedicine*, 9(15), 2339-2351.
99. Frontier Scientific Official web, "Ce6"
<http://orders.frontiersci.com/Orders/WebPlugin/ProdDetail.aspx?cat=Ce6>,
 Son erişim tarihi :29.03.2020)

100. Tessier, M.D, Dupont, D., De, N.K., De R, J., Hens, Z. 2015. "Economic and Size-tunable Synthesis of InP/ZnE (E = S, Se) Colloidal Quantum Dots", *Chemistry of Materials*, 27, 4893-4898.
101. Ran, Z., Yang W. 2014. "Silica/CdTe/silica fluorescent composite nanoparticles via electrostatic assembly as a pH ratiometer", *RSC Advances*, 4, 37921-37927.
102. Tomayko, M.M., Reynolds, C.P. 1989. "Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice", *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 24, 148-154.
103. Brodin, N.P., Tang J., Skalina K., Quinn T.J., Basu I., Guha C., Tome, W.A., 2015. "Semi-automatic cone beam CT segmentation of in vivo pre-clinical subcutaneous tumours provides an efficient non-invasive alternative for tumour volume measurements". *British Journal of Radiology*, 88, 20140776.
104. Charron, G., Stuchinskaya, T., Edwards, R.D., Russell, D.A., Nann, T. 2012. "Insights into the mechanism of quantum dot-sensitized singlet oxygen production for photodynamic therapy", *The Journal of Physical Chemistry C*, 116(16), 9334-9342.
105. Shahbazi, R., Ozcicek, I., Ozturk, G., Ulubayram, K., 2017a "Functionalized gold nanoparticles manifested as potent carriers for nucleolar targeting", *Nanotechnology*, 28(2), 1124-1132.
106. Shahbazi, R., Asik, E., Kahraman, N., Turk, M., Ozpolat, B., Ulubayram, K. 2017b. "Modified gold-based siRNA nanotherapeutics for targeted therapy of triple-negative breast cancer", *Nanomedicine*, 12(16), 1961-1973.
107. Maestrelli, F., Rodriguez, M.L.G, Rabasco, A.M., Mura, P. 2006. "Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery", *International Journal of Pharmaceutics* 312, 53-60.
108. Schroeder, J., Shweky, I., Shmeeda, H., Banin, U., Gabizon, A. 2007. "Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles", *Journal of Controlled Release*, 124(1-2), 28-34.
109. Pan, J., Feng, S.S. 2009. "Targeting and imaging cancer cells by folate-decorated, quantum dots (QDs)-loaded nanoparticles of biodegradable polymers", *Biomaterials*, 30(6), 1176-1183.
110. Muthu, M.S., Kulkarni, S.A., Raju, A., Feng, S.S. 2012. "Theranostic liposomes of TPGS coating for targeted co-delivery of docetaxel and quantum dots", *Biomaterials*, 33(12), 3494-3501.

111. Batalla, J., Cabrera, H., Martín-Martínez, E.S., Korte, D., Calderón, A., Marín, E. 2015. "Encapsulation efficiency of CdSe/ZnS quantum dots by liposomes determined by thermal lens microscopy", *Biomedical Optics Express*, 6(10), 3898-3906.
112. Ren, W., Chen, S., Liao, Y., Li, S., Ge, J., Tao, F., Huo, Q., Zhang, Y., Zhao, Z. 2019. "Near-infrared fluorescent carbon dots encapsulated liposomes as multifunctional nano-carrier and tracer of the anticancer agent cinobufagin in vivo and in vitro", *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 174, 384-392.
113. International Commission on Radiation Units and Measurement (ICRU). 1995. "50. Prescribing, Recording and Reporting Photon Beam Therapy", ICRU Publication, USA.
114. Yang, W., Read, P.W., Mi, J., Baisden, J.M., Reardon, K.A., Larner, J.M., Helmke, B.P., Sheng, K. 2008. "Semiconductor nanoparticles as energy mediators for photosensitizer-enhanced radiotherapy", *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 72(3), 633-635.
115. Bakalova, R., Ohba, H., Zhelev, Z., Nagase, T., Jose, R., Ishikawa, M., Baba, Y. 2004b. "Quantum dot anti-CD conjugates: are they potential photosensitizers or potentiators of classical photosensitizing agents in photodynamic therapy of cancer?", *Nano Letters*, 4(9), 1567-1573.
116. Rotomskis, R., Valanciunaite, J., Skripka, A., Steponkiene, S., Spogis, G., Bagdonas, S., Streckyte, G. 2013. "Complexes of functionalized quantum dots and chlorin e6 in photodynamic therapy", *Lithuanian Journal of Physics*, 53(1), 57-68.
117. Martynenko, I.V., Orlova, A.O., Maslov, V.G., Baranov, A.V., Fedorov, A.V., Artemyev, M. 2013. "Energy transfer in complexes of water-soluble quantum dots and chlorin e6 molecules in different environments" *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 4(1), 895-902.
118. Martynenko, I.V., Kuznetsova, V.A., Orlova, A.O., Kanaev, P.A., Maslov, V.G., Loudon, A., Zaharov, V., Parfenov, P., Gun'ko, Y.K., Baranov, A.V., 2015. "Chlorin e6-ZnSe/ZnS quantum dots based system as reagent for photodynamic therapy", *Nanotechnology*, 26(5), 055102.
119. Demiralp, D.Ö., İğci, N., Peker, S., Ayhan, B. 2014. "Temel Proteomik Stratejiler" Ankara, Ankara Üniversitesi Yayınları, No: 411.
120. Li, P., Zhou, G., Zhu, X., Li, G., Shen, L., Xu, Q., Hamblin, M.R. 2012. "Photodynamic therapy with hyperbranched poly (ether-ester) chlorin (e6)

- nanoparticles on human tongue carcinoma CAL-27 cells”, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(1), 76-82.
121. Crommelin, D.J.A., Storm, G. 1987. “Liposomes as drug delivery systems in therapy: their potential and limitations”, *International Pharmacy Journal*, 1 (5), 179-181.
122. Kwon, G.S., Suwa, S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Kataoka, K. 1994. “Enhanced tumor accumulation and prolonged circulation times of micelle-forming poly(ethylene oxide-aspartate) block copolymers-andriamycin conjugates”, *Journal of Controlled Release*, 29, 17-23.
123. Maruyama, K. 2002. “PEG-Immunoliposomes”, *Bioscience Reports*, 22 (2), 251-266.
124. Lukyanov, A.N., Gao, Z., Mazzola, L., Torchilin, V.P. 2002. “Polyethylene glycol-diacyl lipid micelles demonstrate increased accumulation in subcutaneous tumors in mice”, *Pharmaceutical Research*, 19 (10), 1424-1429.
125. Şimşek, E.,O., Aydemir, E., Korcum, A.F., Fıskın, K. 2011. “Thalidomide and irradiation combination therapy increases substance P levels in vitro”, *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2(3), 529–535.
126. Karaçavuş, S., 2019. “Imaging Modalities Used in Preclinical Studies”. *Nuclear Medicine Seminars*, 5(1), 23-29.
127. Terzioğlu, G., Keskin, A., Demirel, G. 2013. “Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması”, *Turkish Journal of Immunology*, 1(3), 74-89.
128. Tokur, O., Aksoy, A. 2017. “In vitro sitotoksikite testleri”, *Harran Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 6(1), 112-118.
129. Torchilin, V.P., Levchenko, T.S., Rammohan, R., Volodina, N. Papahadjopoulos-Sternberg, B., D'Souza, G.,G. 2003. “Cell transfection in vitro and in vivo with nontoxic TAT peptide-liposome-DNA complexes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (4), 1972-1977.
130. Pappalardo, S.J., Quattrocchio, V., Langellotti, C., Giacomo, S.D., Gnazzo, V., Olivera, V., Calamante, G., Zamorano, P.I., Levchenko, T.S., Torchilin, V.P. 2009. “Improved transfection of spleen-derived antigen-presenting cells in culture using TATp-liposomes” *Journal of Controlled Release*, 134 (1), 41-46.
131. Sangsuriyawong, A., Limpawattana, M., Siriwan, D., Klaypradit, W. 2019. “Properties and bioavailability assessment of shrimp astaxanthin loaded liposomes”, *Food Science and Biotechnology*, 28(2), 529–537.

132. Polyaka, A., Hajdub, I., Bodnár, M., Trencsényi, G., Pöstényi, Z., Haásza, V., Jánokid, G., Jánokid, G., Balogha, L., Borbély, J. 2013. “^{99m}Tc-labelled nanosystem as tumour imaging agent for SPECT and SPECT/CT modalities”, *International Journal of Pharmaceutics*, 449, 10-17.
133. Khan, F.M., Gibbons, J.P. 2003. “The Physics of Radiation Therapy”, Third edition, USA, Lippincott Williams & Wilkins.
134. Podgorsak, E.B. 2005. “Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students”, Vienna, Austria: IAEA Publications.
135. Fredrix, E. W. H. M., Soeters, P. B., Wouters, E. F. M., Deerenberg, I. M., Meyenfeldt, M. F., Saris, W. H. M. 1991. “Effect of different tumor types on resting energy expenditure”, *Cancer Research*, 51(22), 6138-6141.
136. Yakıncı, M.E., Onar, K., Depci, T., Orhan, K., Turan, C.C. 2016. “Sağlık, Fen ve Mühendislik Bilimlerinde Mikro-Bilgisayarlı Tomografinin (Mikro-CT) Önemi”, *Tıp Teknolojileri Kongresi*, Antalya.
137. Zhu, T.C., Dimofte, A., Finlay, J.C., Stripp, D., Busch, T., Miles, J., Whittington, R., Malkowicz, S.B., Tochner, Z., Glatstein, E., Hahn, S., M. 2005. “Optical Properties of Human Prostate at 732 nm Measured In Vivo During Motexafin Lutetium-mediated Photodynamic Therapy”, *Photochemistry and Photobiology*, 81(1), 96-105.
138. C.W. Elston, I.O. Ellis, 1991, Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up, *Histopathology*, 403-410.
139. Moulton, Jack E., 1990, “Tumors in Domestic Animals”, University of California Press, Berkeley and Los Angeles, ABD, 3’üncü baskı.
140. D. J. Meuten, F. M. Moore, J. W. George, 2016. Mitotic Count and the Field of View Area: Time to Standardize, *Veterinary Pathology*, 53(1) 7-9
141. Wajant, H., Pfizenmaier, K., Scheurich, P. 2003. Tumor necrosis factor signaling, *Cell Death Differ*, 10, 45–65.

EKLER

EK 1 –Etik Kurul İzin Belgesi



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

06100 Sıhhiye-Ankara
Telefon: 0 (312) 305 1090-1082 • Faks: 0 (312) 310 0580
www.etikkurul.hacettepe.edu.tr/index_hdk.php

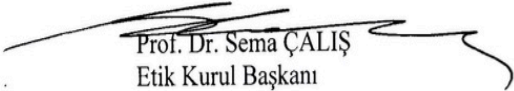
S
Sayı: 52338575 – 112

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL KARARI

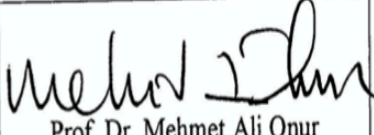
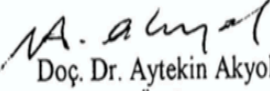
TOPLANTI TARİHİ	: 27.08.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI	: 2015/07
DOSYA KAYIT NUMARASI	: 2015/62
KARAR NUMARASI	: 2015/62 – 04
ARAŞTIRMA YÜRÜTÜCÜSÜ	Doç.Dr. Suna ERDOĞAN
HAYVAN DENEYLERİNDEN SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç.Dr. Suna ERDOĞAN ve Fiz.Yük.Müh. Mehmet KARABUĞA
YARDIMCI ARAŞTIRMACILAR	: Doç.Dr. Murat TUNCEL ve Yrd.Doç.Dr. Şükran ÜLGER
ONAYLANAN HAYVAN TÜRÜ ve SAYISI	: 36 adet (CB57BL/6) Fare

Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Radyofarmasi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Suna ERDOĞAN'ın araştırma yürütücüsü olduğu 2015/62 kayıt numaralı "*Radyoterapide Kullanılmak Üzere Kuantum Noktaları ve Fotoduyarlayıcı İçeren Tümöre Spesifik Nanoboyutlu Lipozomların Geliştirilmesi*" isimli çalışma Hayvan Deneyle Yere Etik Kurulu Yönergesi'ne göre uygun bulunarak oy birliğı ile onaylanmasına karar verilmiştir.

Sorumlu araştırmacı deneylere başlangıç tarihini Etik Kurula bildirmekle yükümlüdür


Prof. Dr. Sema ÇALIŞ
Etik Kurul Başkanı

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU GÜNDEMİ - İMZA SİRKÜLERİ
TOPLANTI TARİHİ : 27.08.2015 (PERŞEMBE)
TOPLANTI SAYISI : 2015/07
TOPLANTI SAATİ : 13.30

 Prof. Dr. Sema Çalış (Başkan)	 Prof. Dr. Nüket Örnek Büken (Üye)	 Prof. Dr. M. Yücel Sara (Üye)
 Prof. Dr. Neslihan H. Dikmenoğlu Falkmarken (Üye)	 Prof. Dr. Belgin Can (Üye)	 Prof. Dr. Mehmet Ali Onur (Üye)
- İZİMLİ - Doç. Dr. Hakan EL (Üye)	 Doç. Dr. Aytekin Akyol (Üye)	- İZİMLİ - Doç. Dr. Ersoy KONAŞ (Üye)
- İZİMLİ - Doç. Dr. İlyas Onbaşlar (Üye)	 Doç. Dr. Mehmet Alper Çetinkaya (Üye)	 Yrd. Doç. Dr. Banu Cahide Tel (Üye)
- İZİMLİ - Mevlüt Öksüzöğlü (Üye)	 Avukat Yasemin Özselçuk (Üye)	



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 08/07/2020

Tez Başlığı/Konusu: Radyoterapide Kullanılmak Üzere Kuantum Noktaları Ve Fotoduyarlastırıcı İçeren Tümöre Spesifik Nanoboyutlu Lipozomların Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 182 sayfalık kısmına ilişkin, 20/04/2020 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza
08/07/2020

Adı Soyadı: Mehmet KARABUĞA
Öğrenci No: N12242213
Anabilim Dalı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Programı: Nanoteknoloji ve Nanotıp
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof.Dr.Suna ERDOĞAN

(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet Karabuğa
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 31/07/1979
Yazışma adresi : Alacaatlı Mah. 4997 Sok. Özkar Kayra Park Sitesi A blok 8 numara Çankaya / ANKARA
Telefon : 05337121484
Elektronik posta adresi : mehmetkarabuga@hotmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fizik Mühendisliği
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Radyoterapi Fiziği Programı
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp ABD
İş Tecrübesi

- 1) **2013 - halen devam ediyor**, T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu, Medikal Fizik Uzmanı, Fizik mühendisi
- 2) **2012 - 2013**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Radyasyon güvenliği üst kurulu, Medikal Fizik Uzmanı, Radyasyondan Korunma ve Güvenlik Uzmanı.
- 3) **2008 - 2012**, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Nükleer Tıp Anabilim Dalı, Fizik mühendisi,
- 4) **2006 - 2010**, Hacettepe Üniversitesi Onkoloji Hastanesi, Radyasyon onkolojisi, Radyoterapi fiziği bölümü, Yüksek Lisans Öğrencisi, Tam zamanlı Gönüllü Çalışan.
- 5) **2005**, Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Medikal Fizik, Stajyer Öğrenci
- 6) **2004**, Türkiye Atom Enerjisi Kurumu (TAEK), Ankara Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi (ANAEM) Nükleer Enerji Laboratuvarı , X-Işınları Laboratuvarı, Stajyer Öğrenci

