

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TÜMÖR TEŞHİS VE TEDAVİSİ İÇİN GELİŞTİRİLEN
NANOBOYUTTA LİPOZOMAL İLAÇ TAŞIYICI
SİSTEMLER ÜZERİNDE İN VİTRO ÇALIŞMALAR

Ecz. Flonja LIKO

Radyofarmasi Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2011

T.C
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TÜMÖR TEŞHİS VE TEDAVİSİ İÇİN GELİŞTİRİLEN NANOBOYUTTA
LİPOZOMAL İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER ÜZERİNDE İN VİTRO
ÇALIŞMALAR**

Ecz. Flonja LIKO

Radyofarmasi Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Suna ERDOĞAN

YARDIMCI DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Yekta ÖZER

ANKARA

2011

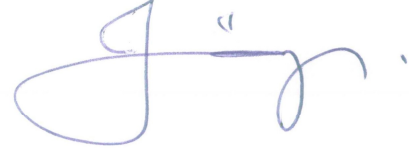
This thesis is dedicated to my wonderful mother Violeta and in loving memory to my father Hilli Liko.

Words are not sufficient to express my love and consideration, but thank you for teaching me wisdom, courage and grace and giving me the chance to prove and improve myself through the walks of life.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından Radyofarmasi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

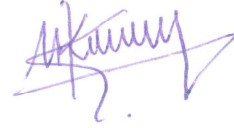
Jüri Başkanı: Prof. Dr. A. Yekta Özer
Hacettepe Üniversitesi



Danışman: Doç. Dr. Suna Erdoğan
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Prof. Dr. Makbule Aşıkoğlu
Ege Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. İmran Vural
Hacettepe Üniversitesi



Üye: Doç. Dr. Betül Arıca Yegin
Hacettepe Üniversitesi



ONAY

Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.



Prof. Dr. S. Hakan Orer
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarımı yönlendiren ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, büyük destek gördüğüm danışman hocam Sn. Doç. Dr. Suna ERDOĞAN'a,

İlgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olarak, bana yol gösteren, yardımcı danışman hocam Sn. Prof. Dr. A. Yekta ÖZER'e,
Kullandığımız 5-Fluorourasili sağlayan Orva İlaç Firmasına ve kullandığımız DPPC ve PL 90G fosfolipidleri sağlayan Natterman GmbH ve Phospholipon Firmasına,

Hücre kültürü çalışmalarında yardımları için H.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalından Sn. Doç. Dr. İmran VURAL'a,

IR spektrumlarının çekilmesindeki yardımlarından dolayı Nükleer Müh. Fırat ŞAKAR'a,

Partikül büyüklüğü ölçümleri için Anabilim Dalı olanaklarını kullanma imkanı sağlayan Eczacılık Teknoloji Bölüm Başkanı ve Farmasötik Teknoloji ABD öğretim üyesi Sn. Prof. Dr. Süeda HEKİMOĞLU'na,

Hoşgörü ve anlayışlarıyla bana destek veren ve yardımcı olan arkadaşım Uzm. Ecz. Mine SİLİNDİR'e,

Bana yardımcı olan herkese,

Hayatımın boyunca her konuda bana destek olan ve en çok değer verdiğim sevgili aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

ÖZET

Flonja Liko, Tümör Teşhis ve Tedavisi İçin Geliştirilen Nanoboyutta Lipozomal İlaç Taşıyıcı Sistemler Üzerinde *In Vitro* Çalışmalar, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Radyofarmasi Programı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2011.

Çalışmanın amacı, tümör teşhis ve tedavisinde kullanılacak, nanoboyutta, Poli Etilen Glikol (PEG) kaplı, farklı yüzey yüküne sahip teragnostik lipozomların geliştirilmesidir.

Lipozomların hazırlanmasında, jel ve sıvı-kristal yapıda iki farklı fosfolipit (DPPC ve PL 90G), stabilite artırıcı olarak kolesterol (CHOL), lipozomların dolaşımında uzun süre kalmalarını sağlamak için PEG₂₀₀₀-DSPE ve radyonüklidin stabil bir şekilde lipozom membranına bağlanması için şelat yapıcı madde olarak Dietilen Triamin Penta Asetik asit-Fosfatidil Etanolamin (DTPA-PE), pozitif yük verici madde olarak Stearilamin (SA), negatif yük verici madde olarak Disetil fosfat (DCP) kullanılmıştır. Hidrofilik özellikte etkin madde, 5-FloroUrasil (5-FU) (20 mg.mL⁻¹), lipozomun iç sulu fazına hapsedilmiştir. Çalışma kapsamında, hazırlanan lipozom formülasyonlarının karakterizasyon çalışmaları yapılmış, 5-FU'in lipozomlardan salımı ve tümör hücreleri üzerindeki antitümöral etkileri incelenmiş, ayrıca fiziksel stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Bütün lipozom dispersiyonlarının ortalama partikül boyutu 100- 150 nm arasında ölçülmüştür. Yüksüz lipozomlarda içte tutulan etkin madde miktarları açısından önemli fark görünmezken, pozitif ve negatif yüklü DPPC lipozomlarının içte tutulan etkin madde miktarı, PL 90G lipozomlarından daha yüksek olduğu bulunmuştur. 5-FU'in değişik lipozom dispersiyonlarından salım profilleri incelendiğinde salımların 1. derece kinetiğine uyduğu bulunmuştur. Hücre kültür çalışmalarında, serbest 5-FU ile karşılaştırıldığında, DPPC lipozomlarının çok daha düşük etkin madde miktarı ile (yaklaşık 10 kat daha az) ile aynı etkiyi gösterdiği bulunmuştur.

Kısaca, elde edilen sonuçlar incelendiğinde, nanoboyutta, PEG kaplı DTPA-PE ve 5-FU içeren DPPC lipozomlarının [DPPC:CHOL:PEG₂₀₀₀+DTPA-PE (61,7:33,3:5 µmol+ %1 mol.lipid⁻¹), DPPC:SA (veya DCP):CHOL:PEG₂₀₀₀+DTPA-PE (61,7:3,3:30:5 µmol+%1 mol.lipid⁻¹)] tümör teşhisi ve tedavisi için umut vaat eden bir taşıyıcı sistem olduğu görülmüştür. Bu çalışmanın, ilerideki çalışmalara temel teşkil edeceği düşünülmektedir.

Anahtar Sözcükler: Teragnostik Lipozom, Tümör Teşhisi ve Tedavisi, 5-FU, PEG Kaplı Lipozom

ABSTRACT

Flonja Liko, *In Vitro* Studies on Nanosized Liposomal Drug Delivery Systems developed for Diagnosis and Treatment of Tumor, Hacettepe University, Health Sciences Institute, Master Thesis in Radiopharmacy, Ankara, 2011.

The aim of this study is to develop nanosized, Poly Ethylene Glycol (PEG) coated, different charged theranostic liposomes for tumor diagnosis and treatment. For the liposome preparation two phospholipids; DPPC (gel state), PL 90G (liquid-crystalline state), cholesterol as bilayer condenser, PEG₂₀₀₀-DSPE for long-circulating liposomes, Diethylene Triamine Penta Acetic acid-Phosphatidyl Ethanolamine (DTPA-PE), as a chelator agent added to the liposomal membrane for the stable association of radionuclides, Stearylamine (SA) as a positive charge inducer and Dicapryl Phosphate (DCP) as a negative charge inducer, were used. The hydrophilic drug, 5-FluoroUracil (5-FU) (20 mg.mL⁻¹), was incorporated in the internal water phase of the liposomes. Characterization studies, such as the release of 5-FU from the liposomes and its cytotoxic effect, followed by physical stability studies, were done. The particle size of all liposomes was 100-150 nm. Neutral liposomes did not show any considerable change in the encapsulation amount of 5-FU, which in positive and negative DPPC liposomes was higher than PL 90G ones.

The release profile of 5-FU from different liposome dispersions was compatible with 1. Order Release Kinetics.

Cell culture studies showed that in comparison with the free 5-FU solution, neutral, positive and negative charged DPPC liposomes had the same antitumoral activity on MCF-7 cell lines, with less amount of drug (10 fold lower).

Shortly, the results of this study show that nanosized, PEG coated, DTPA-PE and 5-FU containing DPPC liposomes [DPPC:CHOL:PEG₂₀₀₀+DTPA-PE (61,7:33,3:5 μ mol+ %1 mol.lipid⁻¹), DPPC:SA (or DCP):CHOL:PEG₂₀₀₀+DTPA-PE (61,7:3,3:30:5 μ mol+%1 mol.lipid⁻¹)] are a promising delivery system for tumor diagnosis and treatment.

It is believed that this study will represent a foundation for the studies to come.

Key Words: Theranostic Liposome, Tumor Imaging and Treatment, 5-FU, Stealth Liposome

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xviii
TABLolar DİZİNİ	xxi
GİRİŞ ve AMAÇ	1
1. GENEL BİLGİLER	5
1.1. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER	5
1.1.1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Dağılımında <i>In Vivo</i> Bariyerler	7
1.1.2. Endotelyal Bariyer	7
1.1.3. RES Bariyeri	8

1.1.4.	Hücresel Bariyerler	8
1.2.	İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN SEÇİCİ TAŞINMASI VE HEDEFLENDİRİLMESİ	8
1.2.1.	İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Pasif Hedeflendirme	11
1.2.2.	İlaç Taşıyıcı Partiküler Sistemler ile Aktif Hedeflendirme	14
1.3.	LİPOZOMLAR	14
1.3.1.	Lipozom – Hücre Etkileşim Mekanizmaları	17
1.3.2.	Lipozomların Sınıflandırılması	17
1.3.3.	Lipozomlarda Dağılımı ve Klerensi Etkileyen Faktörler	19
1.3.4.	Lipozomların Hazırlama Yöntemleri	20
1.3.5.	Lipozomların Stabilitelerini Etkileyen Faktörler	21
1.3.6.	Lipozomların Tıpta Kullanılışları	25
1.3.6.1.	Lipozomların Diagnostik Amaçla Kullanılışları	26
1.3.6.2.	Lipozomların Kansere Tedavisinde Kullanılışları	28
1.4.	TERAGNOSTİK İLAÇ TAŞIYICI PARTİKÜLER SİSTEMLER	29
1.4.1.	Teragnostik Lipozomların Tıpta Kullanılışları	30
1.5.	5-FU' IN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ	33

1.5.1.	5-FU'in Kullanım Alanları	34
1.5.2.	5-FU'in Diğer İlaçlarla Etkileşimi	35
1.5.3.	5-FU'in Etki Mekanizması	36
1.5.4.	5-FU'in Yan Etkileri	38
2.	GEREÇ VE YÖNTEM	40
2.1.	KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	40
2.2.	KULLANILAN ALETLER VE GEREÇLER	41
2.3.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ YAPISINA GİREN MADDELER ÜZERİNDE YAPILAN KONTROLLER	42
2.3.1.	Fosfolipitler	42
2.3.1.1.	Fosfolipitlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Tanınması	42
2.3.1.2.	Fosfolipitlerin Infrared (IR) Analizi ile Tanınması	42
2.3.2.	Yük Verici Maddeler	42
2.3.2.1.	SA'in İTK ile Tanınması	42
2.3.2.2.	SA'in IR Analizi ile Tanınması	42
2.3.2.3.	DCP'ın İTK ile Tanınması	42

2.3.2.4.	DCP'in IR Analizi ile Tanınması	43
2.3.3.	Stabilite Artırıcı Madde	43
2.3.3.1.	Chol'un İTK ile Tanınması	43
2.3.3.2.	Chol'un IR Analizi ile Tanınması	43
2.3.4.	5-FU Üzerinde Yapılan Kontroller	43
2.3.4.1.	5-FU'in Yapısı	43
2.3.4.2.	5-FU'in 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğrusunun Hazırlanması	44
2.3.4.3.	5-FU'in %10 (a/a) Triton-X-100 (a/h) içeren 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğrusunun Hazırlanması	44
2.4.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI	44
2.4.1.	DTPA-PE Sentezi	44
2.4.2.	Etkin Madde İçermeyen Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	45
2.4.3.	5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	45
2.4.4.	Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu	46
2.4.4.1.	Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	46

2.4.4.2.	İçte Tutulan 5-FU Miktarı	46
2.4.4.3.	Lipozomal Fosfolipid Miktarının Tayin Edilmesi	46
2.5.	5-FU'İN LİPOZOM DİSPERSİYONLARINDAN <i>IN VİTRO</i> SALIMININ İNCELENMESİ	48
2.6.	HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI	48
2.6.1.	5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Kansere Hücreleri Üzerindeki Antitümöral Etkisinin Sitotoksikite Deneyleri ile Belirlenmesi	48
2.7.	FİZİKSEL STABİLİTE ÇALIŞMALARI	49
2.7.1.	Saklama Sırasında İncelenen Lipozom Dispersiyonlarının Ortalama Partikül Büyüklüklerinin İzlenmesi	50
2.7.2.	Saklama Sırasında İncelenen Lipozom Dispersiyonlarının İçte Tutulan 5-FU Miktarlarının İzlenmesi	50
2.8.	İSTATİSTİKSEL ANALİZ	50
3.	BULGULAR	51
3.1.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ YAPISINA GİREN MADDELER ÜZERİNDE YAPILAN KONTROLLERE AİT BULGULAR	51
3.1.1.	Fosfolipitler	51
3.1.1.1.	Fosfolipitlerin İTK ile Tanınması	51

3.1.1.2.	Fosfolipitlerin IR Analizi ile Tanınması	52
3.1.2.	Yük Verici Maddeler	55
3.1.2.1.	SA'in İTK ile Tanınması	55
3.1.2.2.	SA'in IR Analizi ile Tanınması	55
3.1.2.3.	DCP'in İTK ile Tanınması	56
3.1.2.4.	DCP'in IR Analizi ile Tanınması	57
3.1.3.	Stabilite Artırıcı Madde	58
3.1.3.1.	Chol'un İTK ile Tanınması	58
3.1.3.2.	Chol'un IR Analizi ile Tanınması	59
3.1.4.	5-FU Üzerinde Yapılan Kontroller	61
3.1.4.1.	5-FU'in 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğru	61
3.1.4.2.	5-FU'in %10 Triton-X-100 (a/h) İçeren 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğru	62
3.2.	LİPOZOMLARIN DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	64
3.2.1.	Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması	64
3.2.2.	Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu	65

3.2.2.1.	Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı	65
3.2.2.2.	İçte Tutulan 5-FU Miktarı	66
3.2.2.3.	Lipozomal Fosfolipid Miktarının Tayin Edilmesi	67
3.3.	5-FU'İN LİPOZOM DİSPERSİYONLARINDAN <i>IN VİTRO</i> SALIMININ İNCELENMESİ	69
3.4.	HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	71
3.4.1	5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Üzerindeki Antitümöral Etkisinin Sitotoksisite Deneyleri İle Belirlenmesi	71
3.5.	FİZİKSEL STABİLİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR	78
4.	TARTIŞMA	84
4.1.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	84
4.2.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	93
4.3.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ <i>IN VİTRO</i> SALIM ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	96
4.4.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ <i>IN VİTRO</i> TÜMÖR HÜCRELERİNDE TUTULUM ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	98

4.5.	LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ ÇALIŞMALARIN DEĞERLENDİRİLMESİ	STABİLİTE	99
	SONUÇ		105
	KAYNAKLAR		105
	ÖZGEÇMİŞ		121

SİMGE ve KISALTMALAR

5-FU	5- Fluoro Urasil
AGT	Artmış Geçirgenlik ve Tutulum Etkisi (<i>Enhanced Permeability and Retention Effect</i>)
CHEMS	Kolesterol hemisüksinat
Chol	Kolesterol
DCP	Disetilfosfat
DHF	Dihidrofolat
DMEM	Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>)
DMSO	Dimetil sülfoksit
DOPE	1,2-dioleil-sn-glisero-3-fosfatidiletanolamin
DPD	Dihidroprimidin dehidrogenaz
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfotidil kolin
dTDP	Deoksitimidin-5'-difosfat
dTMP	Deoksitimidin-5'-monofosfat
DTPA	Dietilen triamin penta asetik asit
DTPA-PE	Dietilen triamin penta asetik asit- fosfatidiletanolamin
dTTP	Deoksitimidin-5'-trifosfat
dUMP	Deoksiuridin-5'-monofosfat
DY- 615	<i>Dyomics</i> kontrast ajanı
F-BAL	α -floro- β -alanin
FBS	Fetal sığır serumu

F-DHU	5-florodihidrourasil
FdUDP	Florodeoksiuridin-5'-difosfat
FdUMP	Florodeoksiuridin-5'-monofosfat
FdUTP	Florodeoksiuridin-5'-trifosfat
FUDP	Floururidin -5'- difosfat
FuDR	Florodeoksiuridin
FUMP	Floururidin -5'- monofosfat
F-UPA	Floureidopropiyonat
FUR	Floururidin
FUTP	Floururidin -5'- trifosfat
GUV	Çok büyük tek tabakalı veziküller
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
IR	Kızılötesi spektrum = <i>Infrared spectrum</i>
İTK	İnce Tabaka Kromatografisi
LUV	Büyük tek tabakalı veziküller
MLV	Çok tabakalı veziküller
MUV	Orta büyüklükte tek tabakalı veziküller
MVV	Çok veziküllü veziküller
OLV	Oligolameler veziküller
PE	Fosfatidil etanolamin
PEG	Polietilenglikol
PEG ₂₀₀₀ -DSPE	Polietilenglikol-Distetaril Fosfatidil Etanolamin
PL 90G	Fosfolipon 90G

PPi	Pirofosfat
PRPP	5-fosforibosil-1-pirofosfat
QD	Kuantum noktaları (<i>Quantum dots</i>)
RES	Retikülo endotelyal sistem
REV	<i>Reverse-phase evaporation</i> veziküller
SA	Steraril Amin
SPIO	Süperparamanyetik demir oksit
SPIO/ Dil	Süperparamanyetik demir oksit nanopartikül / 1,1'-didodecyl-3,3,3',3'- tetrametilindo-karbosiyanin perklorat
SUV	Küçük tek tabakalı veziküller
TdR	Timidin
THF	Tetrahidrofolat
TS	Timidilat Sentaz
TSER	Timidilat Sentetaz Artırılma Bölgesi (<i>TS Enhancement Region</i>)
UV	Tek tabakalı veziküller

ŞEKİLLER

		Sayfa
Şekil 1.1.	Doksorubisin içeren stealth lipozomları.	13
Şekil 1.2.	Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik gösterimi.	15
Şekil 1.3.	Çok tabakalı lipozomların şematik gösterimi.	15
Şekil 1.4.	Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi.	22
Şekil 1.5.	Teragnostik ilaç taşıyıcı sistemler.	30
Şekil 1.6.	Anjiyogenez görüntüleme ve tedavi amaçlı hedeflendirilmiş multimodal lipozomun şematik gösterimi.	32
Şekil 1.7.	5-FU'in kimyasal yapısı.	33
Şekil 1.8.	5-FU'in metabolik yolları ve etki mekanizması.	37
Şekil 2.1.	5-FU'in açık formülü.	43
Şekil 2.2.	Lipozomların fosfolipid miktarının tayin edilmesinin şematik gösterimi.	47
Şekil 3.1.	DPPC'nin İTK kromatogramı.	51
Şekil 3.2.	PL 90G'nin İTK kromatogramı.	51
Şekil 3.3.	DPPC'nin IR spektrumu.	53

Şekil 3.4.	DPPC'nin kimyasal yapısı.	53
Şekil 3.5.	PL 90G'nin IR spektrumu.	54
Şekil 3.6.	PL 90G'nin kimyasal yapısı.	54
Şekil 3.7.	SA'nın İTK kromatogramı.	55
Şekil 3.8.	SA'nın IR spektrumu.	56
Şekil 3.9.	SA'nın kimyasal yapısı.	56
Şekil 3.10.	DCP'nin İTK kromatogramı.	57
Şekil 3.11.	DCP'nin IR spektrumu.	58
Şekil 3.12.	DCP'nin kimyasal yapısı.	58
Şekil 3.13.	Kolesterol'un İTK kromatogramı.	59
Şekil 3.14.	Kolesterol'un IR spektrumu.	60
Şekil 3.15.	Kolesterol'un kimyasal yapısı.	60
Şekil 3.16.	5-FU'in 10mM Tris (pH 9) tamponunda UV spektrumu.	61
Şekil 3.17.	5-FU'in 10mM Tris (pH 9) tamponunda hazırlanan standart doğrusu.	62
Şekil 3.18.	5-FU'in %10 (a/h) Triton-X-100 içeren 10mM Tris (pH 9) tamponunda UV spektrumu.	63

Şekil 3.19.	5-FU'in %10 Triton-X-100 İçeren 10mM Tris (pH 9) tamponunda hazırlanan standart doğrusu.	63
Şekil 3.20.	Lipozomal fosfolipid miktarı için hazırlanan standart doğru.	68
Şekil 3.21.	DTPA-PE ve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozomlarından 5-FU'in <i>in vitro</i> salımı (n=6).	69
Şekil 3.22.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom dispersiyonları ile 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.	71
Şekil 3.23.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom dispersiyonları ile 48 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.	72
Şekil 3.24.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren PL 90G lipozom dispersiyonları ile 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.	72
Şekil 3.25.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren PL 90G lipozom dispersiyonları ile 48 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.	73

TABLOLAR

		Sayfa
Tablo 1.1.	İlaç taşıyıcı sistemlerin kullanılışları.	6
Tablo 1.2.	Lipozomların bileşimlerine ve ilaç taşıma özelliklerine göre sınıflandırılması.	18
Tablo 1.3.	Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması.	19
Tablo 1.4.	Tedavide kullanılan ve klinik çalışma aşamasında olan lipozom preparatları.	27
Tablo 1.5.	Teragnostik nanopartikül örnekleri.	31
Tablo 3.1.	Etkin madde içermeyen lipozom dispersiyonları, bileşimi ve kodları.	64
Tablo 3.2.	5-FU içeren lipozom dispersiyonları, bileşimi ve kodları.	65
Tablo 3.3.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri ve dağılımı (n= 6).	66
Tablo 3.4.	DTPA-PE ve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozom dispersiyonlarının içte tutulan 5-FU miktarları.	67
Tablo 3.5.	DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının lipozomal fosfolipid miktarları.	68
Tablo 3.6.	5-FU'in lipozom formülasyonlarından salım kinetikleri.	70

Tablo 3.7.	Yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G lipozom formülasyonlarıyla yapılan hücre kültür çalışmalarında, 24 ve 48 saat sonra, % hücre canlılığı.	75
Tablo 3.8.	Lipozom dispersiyonlarının kontrol grubuna göre sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.	76
Tablo 3.9.	Farklı lipit bileşimine veya yüke sahip lipozom dispersiyonlarının sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.	77
Tablo 3.10.	Farklı lipit bileşimine veya yüke sahip lipozom dispersiyonlarının serbest 5-FU'e göre sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.	77
Tablo 3.11.	Farklı sıcaklıklarda bekletilen DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozomlarının partikül büyüklüğü değerleri.	79
Tablo 3.12.	Farklı sıcaklıklarda bekletilen DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü 5-FU içeren DPPC lipozomlarının içinde tutulan % etkin madde miktarları.	80
Tablo 3.13.	Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ veya $+25^{\circ}\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarında ölçülen partikül boyutlarının istatistiksel karşılaştırılması.	81
Tablo 3.14.	İki farklı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $+25^{\circ}\text{C}$) aynı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarında ölçülen partikül boyutlarının istatistiksel karşılaştırılması.	82
Tablo 3.15.	Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ veya $+25^{\circ}\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde ve iki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarının % içinde tutulan etkin madde miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.	83

GİRİŞ VE AMAÇ

Kanser diğer dokulara yayılma ve metazsaz gibi malign davranışla karakterize anormal ve kontrolsüz hücre bölünmesine neden olan bir hastalıktır. Günümüzde modern tıptaki tüm gelişmelere rağmen kanser hala teşhisi ve tedavisi zor bir hastalıktır ve dünya çapında en çok ölüme neden olan hastalıkların başında gelmektedir.

Teşhis açısından bakılacak olursa bugün mevcut olan klinik görüntüleme yöntemlerinin hemen hemen hepsi ancak tümör belli bir büyüklüğe ulaştığında ve hücresel değişiklikler başladıktan sonra tümörün görüntülenmesine olanak sağlamaktadır.

Tedavi açısından bakılacak olursa, günümüzde kanser tedavisinde kullanılan yöntemleri başlıca radyoterapi ve kemoterapi olarak ikiye ayırmak mümkündür. Bu yöntemlerin her ikisinin de en büyük dezavantajı tümör dokusuna spesifik yöntemler olmamasıdır. Yani gerek radyoterapi gerekse kemoterapi yöntemlerinde tümör hücresi yanında sağlıklı normal hücrelerde bu tedavi sürecinden zarar görebilmektedir.

Bu nedenle gerek tümörün teşhis ve görüntülenmesinde gerekse tedavisinde kullanılabilecek daha güvenli, daha etkin kontrast bileşik/ilaç geliştirmeye yönelik çalışmalar aralıksız devam etmektedir.

Nanoteknoloji, genellikle birkaç yüz nanometrenin altındaki materyallerin davranışını, özelliklerini ve yapısını inceleyen nispeten yeni sayılabilecek bir bilimsel araştırma alanıdır. Son yıllarda nanoteknolojideki gelişmeler bu materyallerin nanotıp alanında kullanımına da öncülük etmiştir. Nanomateryallerin sahip oldukları bazı avantajlar bunların nanotıp alanında ve özellikle kanser alanındaki kullanımlarını daha da cazip hale getirmektedir.

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef doku/organa ulaşmasındaki en büyük engel, damar dışındaki hedef doku ile vasküler sistem arasındaki endotelyal hücrelerdir. Birçok dokuda, vasküler sistem endotelyal hücrelerin kesintisiz olarak dizilmesi ile meydana gelmiştir ve genelde bu endotelyal

hücreler, bir zemin membran ile de desteklenmektedir. Bu endotelial bariyer, partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin damar dışına çıkarak hedef doku/organa ulaşmasını engellemektedir. Ancak tümör, enflamasyon ve enfekte olmuş alanlar gibi patolojik bölgelerde artmış kapiller geçirgenliğe sahip alanların bulunduğu gösterilmiştir. Bu alanlara, nano boyuttaki partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle ilaç taşınması, AGT [Artmış Geçirgenlik ve Tutulum (*Enhanced Permeability and Retention (EPR)*)] etkisi ve bozulmuş filtrasyon mekanizması aracılığı gibi pasif hedeflendirme mekanizmaları ile sağlanabilmektedir. Ayrıca bu taşıyıcı sistemlerin yüzeyinin hedef doku/organa spesifik bir ligand veya antikör ile modifikasyonu ile taşıyıcı sistemlerin aktif olarak hedeflendirilmesi de mümkündür.

Gerek pasif gerek aktif hedeflendirilen nano ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef dokuya ulaşabilmesi için vücuda verildiğinde Retikulo Endotelial Sistem (RES) hücreleri tarafından hemen vücuttan uzaklaştırılmamaları, dolaşımda uzun süre kalmaları gerekmektedir. Bu da bu taşıyıcı sistemlerin yüzeyinin PEG gibi hidrofilik bir polimer ile kaplanması ile mümkün olabilmektedir. Taşıyıcı sistemin yüzeyini kaplayan bu polimer plazma da bulunan ve opsonin adı verilen proteinlerin taşıyıcı sistemle etkileşmesini önleyerek RES hücreleri tarafından hızla tanınmalarını engeller ve dolaşımda uzun süre kalmalarına olanak sağlar.

Yukarıda bahsedilen avantajlarından dolayı partiküler ilaç taşıyıcı sistemler özellikle kanser alanında uzun yıllardır kullanılmaktadır. Bu alanda üzerinde en çok çalışma yapılan partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin başında lipozomlar, polimerik miseller, dendrimerler, nanoemülsiyonlar ve nanopartiküller gelmektedir.

Lipozomlar, aralarında sulu bir faz bulunan, biyolojik membrana benzeyen lipid tabakalarının oluşturduğu, mikroskobik boyutlarda, genellikle küre şeklindeki yapılardır. Boyutları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik gösteren bu sistemler çeşitli avantajlara sahiptir. Temel yapı taşı olan fosfolipitler hücre membran yapısında bulunan doğal bileşikler olduğu için toksik özellik göstermemesi, hem suda çözünen hem yağda çözünen maddelerin

enkapsülasyonuna olanak sağlaması, pasif ve/veya aktif olarak hedeflendirilebilmeleri, yüksek ilaç taşıma kapasitesine sahip olmaları, biyouyumlu olmaları bu avantajlarından sadece birkaçıdır. Özellikle kemoterapötik ilaçların büyük bir çoğunluğunun suda çözünmeyen bileşiklerden oluşması bunların formülasyonunu zorlaştırmaktadır. Bu noktada lipozom gibi ilaç taşıyıcı sistemler bu etkin maddeleri çözünürlüklerini artırarak formülasyonuna olanak sağlarlar.

Son yıllarda ilaç taşıyıcı sistem alanındaki çalışmalar, multifonksiyonel ilaç taşıyıcı sistemler geliştirme üzerine yoğunlaşmıştır. Hem teşhis ve tedavi için kullanılan ve teragnostik lipozomlar olarak adlandırılan sistemler de bu multifonksiyonel taşıyıcı sistemlerden biridir. Bu teragnostik lipozomlar, etkin maddenin özelliğine göre içteki sulu faz veya lipit çifte tabakada tedavi için kullanılan kemoterapötik ajanı ve görüntüleme için kullanılacak kontrast madde/radyometal/radyonüklidi taşır. Bu sistemler sayesinde terapötik ilaç spesifik olarak tümöre taşınırken eş zamanlı olarak tümör dokusunun görüntülenmesi sağlanır. Teragnostik lipozomlarla ilacın hedef dokuya ulaşip ulaşmadığı kontrol edilebilir, tümör dokusunun görüntülenmesi ile tümör boyutundaki değişimler izlenerek hastanın tedaviye cevap verip vermediği tedavi bittikten sonra değil tedavi devam ederken izlenebilir. Özellikle kemoterapi gibi yan etkileri yüksek olan tedavi yöntemlerinde hastanın tedaviye cevabı erken aşamada belirlenerek hasta tedaviye cevap vermiyorsa mevcut tedavinin kesilip başka bir tedavi rejiminin uygulanması mümkün olabilir.

Bu teragnostik sistemlerin geliştirilmesi ve klinik kullanıma sunulması ile konvansiyonel kemoterapinin yerini kişiye özel tedavi yöntemlerin alacağına inanılmaktadır.

Bu çalışma kapsamında tümör teşhis ve tedavisinde kullanılacak teragnostik lipozom sistemlerinin formülasyonu, ve karakterizasyon çalışmaları yapılması planlanmış, 5-FU'in lipozomlardan salımı ve tümör hücreleri üzerindeki antitümöral etkileri sitotoksisite deneyleri ile incelenmiştir. Ayrıca, lipozomların fiziksel stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmamızda değişik yüke sahip (nötral=yüksüz, pozitif ve negatif) teragnostik lipozom formülasyonları hazırlanmış, bu amaçla biri jel yapıda [1,2-dipalmitoil-sn-glisero-3-fosfotidil kolin (DPPC)] diğeri sıvı-kristal yapıda [Fosfolipon 90G (PL 90G)] olmak üzere iki farklı fosfolipit, stabilite artırıcı Chol, lipozomların dolaşımında uzun süre kalmaları sağlamak için PEG₂₀₀₀-DSPE ve radyonüklidin stabil bir şekilde lipozom membranına bağlanmasını sağlamak için membran bileşimine şelat yapıcı madde olan DTPA-PE ilave edilmiştir. Lipozomun iç sulu fazına etkin madde olarak 5-FU hapsedilmiş ve pozitif yüklü lipozomlarda yük verici madde olarak SA, negatif yüklü lipozomlarda ise DCP kullanılmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLER

İlaç taşıyıcı sistemler “bir bileşenin bir başka kimyasal ile, bir ilaç uygulama cihazıyla veya ilaç uygulama zamanı ile salım hızını, dokulara salımı veya her ikisini de kontrol eden” sistemler olarak tanımlanırlar. Konvansiyonel ürünlerin veya yeni moleküllerin güvenlik ve etkinliğini artırmak için, yan ve istenmeyen etkileri azaltıp, biyoyararlanım ve terapötik indeksi artırarak, daha iyi bir hasta uyumu elde etmek, ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmaları yapılmasının en önemli nedenlerindedir. Yakın zamanda pek çok ilaç taşıyıcı yeni sistem geliştirilmiştir. Lipozomlar, niozomlar, sfingozomlar, miseller, mikrokapsüller, mikroküreler, nanopartiküller, katı-lipit nanopartiküller, mikrosüngerler üzerlerinde en fazla çalışma yapılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında yer almaktadır. Bu yaklaşımlar, mikro/nanopartiküler (hareketli taşıyıcılar) ve vücudun belirli bölgelerine yerleştiren polimerik sistemler (statik sistemler) olarak sınıflandırılır (1).

İlaçların in vivo davranışları, taşıyıcı sistemlerle birleştirmek suretiyle değiştirebilir. İlaçların taşıyıcı sistemlerdeki enkapsülasyonu ile dokudaki dağılımı, metabolizması, kinetik parametreleri kısmen veya tamamen değişebilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerin uygulanmasında taşıyıcıların, ilgili hücre ve organ sistemleri ile ilişkisinin detaylı bir şekilde bilinmesi önemlidir (1, 2).

İlaç taşıyıcı sistemler, partikül büyüklüklerine göre değişik doku veya organlara hedeflendirilmektedirler. Bu sayede yan etki ve istenmeyen reaksiyonların azaltılması bu sistemlerin en büyük avantajıdır. Ancak ilaç hedeflendirmede etki zayıflığı, bazen hedef bölgeye geçişin yeterli olmaması, bazen de reseptör bölge ile zayıf etkileşmeden dolayı problemler ortaya çıkmaktadır. **Tablo 1.1.**' de ilaç taşıyıcı sistemlerinin partikül büyüklüğü hedef bölgeyle etkin maddenin spesifik olarak etkileşiminde etkili olduğunu gösterilmiştir (3).

Tablo 1.1. İlaç taşıyıcı sistemlerin kullanılışları (3):

Hedef bölge / Amaç	Hastalık / Tedavi (*Partikül büyüklüğü)
Farklı kompartmanlara direkt verilmiş (0.005 — 100 µm)	
Göz	Enfeksiyon
Akciğer	Allerji
Eklemler	Artrit
Gastrointestinal kanal	Crohn hastalığı
Lezyon içi	Tümör
İdrar kesesi	Enfeksiyon
Beyin ventrikülleri	Enfeksiyon
Dokular arasında sübkütan verilmiş (0.005 — 100µm)	
Lenf nodülleri	Bazı kanserler
Dokulararası intramüsküler verilmiş (0.005 — 100 µm)	
Depo	Anestezikler, proteinler
İntravasküler hedefler (0.1 — 1 µm)	
Hastalanmış makrofajlar	Parazitler, fungal, viral ve enzim depolanmasına ait hastalıklar, otoimmün hastalıklar, gen terapisi
Diğer kan hücreleri	Kanserler, plateletler, gen terapisi (Kemik iliği eritroblastları) İmmun hücreler (aşılama/ adjuvant), antivirüsler
Dolaşan depo ilaçlar	Anti enfektifler, antilösemiler, antitrombositler, antiviraller, polipeptitler ve proteinlerin salımsi
Intra vasküler (> 10 µm)	
Kapiller filtrasyon	Kanser, trombus, lokal endotelde ilaçların rolü
Ekstra vasküler hedefler (0.1 — 1 µm)	
Makrofaj aktivasyon	Anormal hücreler (örneğin kanserli ve viral enfeksiyonlu hücreler)
Devamlılığı bozulmuş veya zedelenmiş endotele doğru geçiş	Romatoid artrit, malign hipertansiyon, miyokardial enfarktüs, transluminal anjioplasti

1.1.1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Dağılımında *In Vivo* Bariyerler

Mikro/nano ilaç taşıyıcı sistemlerin esas farmakolojik hedefi, doku içerisinde bulunan reseptörler, enzimler ve diğer hücreler içerisindeki makromoleküllerdir. İlaç taşıyıcı sistemlerin başarılı olmasına yardımcı olacak terapötik yaklaşımlar için çeşitli bariyerlerin varlığını hesaba katmak gerekmektedir. Mikro/nano partiküler ilaç taşıyıcı sistemler, sistemik dolaşıma daha çok intravenöz yol ile verilmektedir. Bu uygulama sırasında karşılaşılabilecek bariyerler başlıca 3 başlık altında toplanabilir (1, 2):

1. Endotelyal bariyer
2. Retikuloendotelyal sistem bariyeri
3. Hücresel bariyerler olmak üzere.

1.1.2. Endotelyal Bariyer

Damarların iç boşluğu, endotelyal hücrelerin oluşturduğu tabaka ile çevrilmektedir. Endotelyal hücre tabakaları makro ve mikro moleküller içeren vasküler ve ekstravasküler doku kompartmanlarından oluşmaktadır. Bu doku kompartmanları arasında karşılıklı sıvı değişimi, geniş kan damarlarından ziyade, kapiler endotelyumda meydana gelmektedir. Bu sistemik kapiler yatağın yüzey alanı çok büyüktür ve bu sistemik kapiler endotelyumun yapısı dokudan dokuya farklılık göstermektedir. Karaciğer, dalak gibi endotelyuma sahip organlar, küçük mikropartiküllerin (0.1 μm), yine bu organların içerisindeki doku kompartmanlarına girmesine izin vermektedir (1).

Diğer tip kapiler endotelyum ise, renal, glomerular ve bazı bez dokularında bulunmaktadır. Bu tip endotelyumda ince hücresel tabaka 0.06-0.08 μm açıklıklara sahip olup, alttaki sürekli membran ile temas halindedir. Her ne kadar bu tip sürekli endotelyum, büyüklüğü 0.1 μm 'yi geçen mikropartiküllerin geçişini engellese de, daha uygun boyutlara sahip makromoleküllerin, bu bariyerleri geçebileceği açıktır (1).

1.1.3. RES Bariyeri

RES, fagositik hücrelerden oluşmaktadır. Makrofajlar vücudun ana savunma fonksiyonunu oluşturur. Bazen makrofajlar patojen tümör hücrelerine hücum etme ve onları yok etme yeteneğine sahiptirler. RES makrofajlarının basit ama önemli bir fonksiyonu, kan dolaşımını izlemek suretiyle dolaşan patojenleri, doku parçalarını ve zarar görmüş makromolekülleri ayırıp, bir girdap içine alıp yutmaktır. Bu yüzden RES hücreleri, etkili bir şekilde mevcut lipozom, mikroküre ve aynı zamanda diğer koloidal partikülleri içeren çeşitli mikropartiküler ilaç taşıyıcıları tutmakta ve dolaşımından uzaklaştırmaktadırlar. RES hücrelerinin anlaşılması, mikropartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin akıllıca tasarımı için bir ön koşuldur (1, 4).

1.1.4. Hücresel Bariyerler

İlaç taşıyıcı sistemlerin görevi, ilacı istenen doku veya hücreye göndermek ve hatta uygun reseptöre ulaştırmaktır. Bu amaçla reseptörle etkileşimi sağlayacak reseptöre özgü peptidler veya monoklonal antikolar kullanılmaktadır (5). Ayrıca manyetik ilaç taşıyıcılar ile veya immünolojik yöntemlerle spesifik hücreye yönlendirme yapılabilmektedir (6).

1.2. İLAÇ TAŞIYICI SİSTEMLERİN SEÇİCİ TAŞINMASI VE HEDEFLENDİRİLMESİ

İlaç hedeflendirilmesi, farmakolojik etkin maddenin, etki veya adsorbsiyon bölgesine seçici olarak yönlendirilmesidir. Hedef, özel bir organ, hücresel bir yapı veya intraselüler bölge olabilmektedir (7, 8). İlaç taşıyıcı sistemin hedeflendirilmiş bölgeye daha iyi bir etkileşimi için değişik yollar denenmiştir. Ancak, adsorbsiyonla sağlanan yüzey modifikasyonu yeterli olmadığından, yüzeyi daha etkin ve uzun süreli kaplamak için alternatif yollar denenmiştir. Bu amaçla polimer-lipit konjugatlar lipozom bileşimine eklendiğinde, polimerin (örn PEG) taşıyıcı sistemin yüzeyini etkin bir şekilde kapladığı, sterik stabilizasyon sağlayarak opsonizasyonu engellediği ve dolaşımda kalış süresini uzattığı gösterilmiştir (9). Ayrıca çözünen polimer konjugatları, büyüklüğü 100 kDa'dan

daha küçük olan çözünebilen polimerlerin ilaç taşıyıcı sistemlerinin hazırlanmasında kullanılmaktadır ve bu polimerler etkin madde ile kimyasal veya fizikokimyasal olarak bağlanabilmektedir (8).

Vücutta belli hedeflerde ilacın seçici olarak taşınmasının 2 yaşamsal avantajı vardır:

1. İlacın etki bölgesi veya bölgelerinde, istenen hızda etkinliği bakımından en uygun etkileşmeyi sağlamaktadır.
2. Buna eşdeğer önemde olan ikinci yararı ise, etkin maddenin dozunun azaltılması ve etkin maddenin sadece hedef organa dağılımıyla sınırlandırılmasıdır.

İlaç, normal yol ile (oral veya injeksiyon yolu ile) sistemik dolaşıma verildiğinde bütün vücuda yayılabilecektir. İlaç doku arasındaki etkileşim, sadece istenen bölgede olmayacaktır, diğer bölgelerde etkilenebilecek, istenmeyen reaksiyonlar meydana gelebilecek ve bunun yanısıra istenmeyen yan etkiler doğabilecektir. İlaçtan gözlenen yarar ancak, ilaç molekülleri istenen bölgeye hedeflendirildiğinde sağlanabilecektir (10-13).

Özellikle kanser kemoterapisi, ilaç hedeflendirmenin en yaygın kullanıldığı ve en fazla faydanın sağlandığı alanlardan biridir. Çünkü vücutta normal hücre ile hızla büyüyen tümör hücresi arasında büyük farklılık yoktur ve bu nedenle antitümör ajanların etkileri seçici değildir. Kanserli hücrelere olduğu kadar normal sağlıklı hücrelere de zarar verebilmektedir. İlaç hedeflendirme ile bu dezavantaj ortadan kaldırılabilen ve ilaç seçici olarak hedef dokuya gönderilebilmektedir.

Başarılı bir hedeflendirme için hedeflendirme üzerinde etkili olabilecek biyokimyasal, fizyolojik ve immunolojik mekanizmaların çok iyi anlaşılması gerekmektedir. Bu sebeple hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemleri geliştirme araştırmaları, polimer kimyası, immünoloji, hücre biyolojisi ve kolloid bilimi gibi çokdisiplinli gruplarla çalışmayı gerektirmektedir. İlaç moleküllerinin, özel bölgelerde belirli reseptörler üzerinde veya vücudun belirli dokularında etkileri

vardır. Özel reseptör ile ilaç molekülünün etkileşmesi, farmakolojik cevabı artırabilecek ve bazı durumlarda da klinik yararı yönüyle ümit verici olabilecektir.

Hedeflendirmenin basamakları (8, 14):

- İlacın seçici olarak hedef bölgeye girişi,
- O bölgede tutulması,
- İlacın etkinliği,
- Uygun doz uygulama sıklığı ve sürenin ayarlanması şeklindedir.

Hedeflendirmenin esası:

- Yan etkilerin büyük bir bölümünün ve dozun azaltılarak vücutta hastalık bölgesi veya özel hücrelere etkin maddenin ulaşması
- Öncelikle girilmesi zor olan bölgelere ve hedeflere etkin maddelerin ulaşması (örneğin, intraselüler bölgeler, virüsler, bakteriler, parazitler),
- Farmakolojik reseptöre bağlı olarak, etki bölgesine ulaşıncaya kadar, ilacın dozlama sıklığı ve hızında, hem ilacı ve hem de vücudu birbirine karşı koruma özelliği (polipeptit ilaçlar) şeklinde sıralanmaktadır.

İlacın istenilen doku veya organa hedeflendirilmesinde kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler arasında;

- Fosfolipid yapıda lipozomlar,
- Emülsiyonlar (Lipid mikroküreler),
- Polimerik yapıda mikroküreler (Sentetik ve doğal orijinli),
- Hücreler gibi doğal taşıyıcılar (Eritrositler),
- Lipoproteinler ilk sıraları almaktadır.

İlaç taşıyıcı sistemleri yönlendirmede gerekli olanlar: (13, 15).

- İstenen bölgede toplanması (seçicilik),
- İlacın yükü,
- Etki bölgesinde uygun hızda ilacın salımsı,

- *In-vitro* stabilite ve in-vivo olarak istenen bölgeye geçiş,
- Minimum toksisite, immünojenite
- Biyolojik olarak aşınabilirlik, resorpsiyon,
- Farmasötik teknolojik açısından geniş ölçüde hazırlama kolaylığı.

İlaç taşıyıcı sistemlerin tasarımı ve geliştirilmesi sırasında, hedeflendirmenin imkanları ve güçlükleri göz önünde tutulmalıdır. Bu konuda 4 temel elemanın arasındaki ilişkinin tam olarak bilinmesi yararlıdır. Bunlar ilaç, hedef, hastalık, taşıyıcı sistem olarak sayılabilir.

İlaç taşımada ana problemler zayıf affinite, hedefe zayıf geçiş, sınırlı etki şeklinde özetleyebiliriz (16). İlaç hedeflendirmede ön ilaçlar, doğal (pasif) hedeflendirme, ligand aracılığıyla hedeflendirme, hedeflendirmede fiziksel yaklaşım olmak üzere 5 farklı yaklaşım tanımlanabilir (3).

1.2.1. İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme genel olarak doğal fizyolojik süreçler veya pasif faktörler aracılığı ile belli bölgelere koloidal partiküllerin taşınmasıdır (3, 8, 17). Partiküler sistemin hedeflendirme açısından hem partikül boyutu hem de vücuda verilmiş yolu önemlidir. Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin pasif ve/veya aktif hedeflendirilmesinde çığır açan ve bunların hedeflendirilebilmesine olanak sağlayan gelişme, bu sistemlerin yüzeyinin protein adsorbsiyonuna karşı korunması ve fagositoz alımından korunması için yüzeyin hidrofilik bir polimerle kaplanmasıdır. Nanotaşıyıcıları hidrofilik bir polimer ile kaplamak, sterik olarak nanopartiküllerin yüzeyinin kan bileşenleri (plazma proteinleri, makrofajlar gibi) ile etkileşimini biyolojik seviyede engellenmektedir. Az sayıdaki suda çözünen ve oldukça esnek yapıya sahip polimer molekülleri, taşıyıcı sistemin yüzeyinde yeterli miktarda ve yüksek yoğunlukta bir bulut tabakası oluşturarak polimer ile kaplanmış partiküllerin, opsoninlerle etkileşmesini engelleyerek RES tarafından hızla dolaşımdan uzaklaştırılmasını önler (18). Hidrofilik polimer aracılığıyla opsonizasyonun engellenmesinin mekanizması; yüzeyin kaplanması ile yüzey

yükünün ve artmış itici etkileşimler ve partikül yüzeyi üzerinde düşük polimerik konsantrasyonlarda bile çözünenler için geçirimsiz polimerik tabaka oluşumudur (19-22).

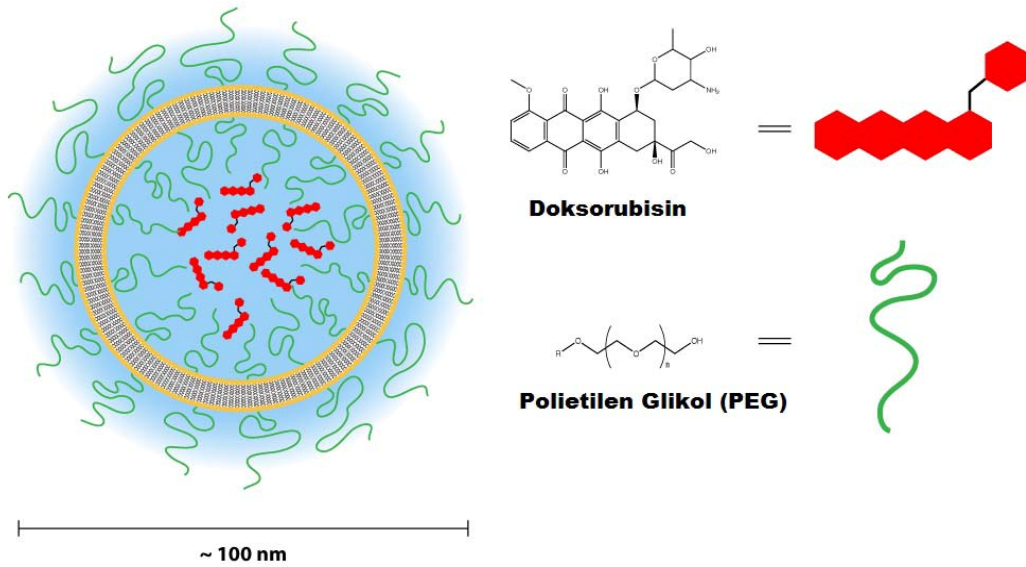
İlaç taşıyıcı sistemlerin dolaşımında uzun süre kalmalarını sağlamak için poliakril amid, poli vinil prolidon, poli vinil alkol, hidroksi propil metil selüloz gibi değişik polimerlerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Suda çözünürlüğünün yüksek olması, polimer zincirinde yüksek elastikiyete sahip olması, oldukça düşük toksisite, immunojenisite ve antijenite göstermesi, RES hücrelerinde az tutulması, biyoparçalanabilir olması ve modifiye edilmiş farmasötiklerin spesifik biyolojik özellikleri üzerine minimum etki etmesi gibi pek çok avantaja sahip PEG, en fazla tercih edilen hidrofilik bir polimerdir (19, 21, 23).

PEG ile kaplama, sadece dolaşımında kalma süresini uzatmakla kalmayıp, aynı zamanda klinik doz aralığı içerisinde ilaçların doza bağımlı (doyurulabilir) farmakokinetikten, göreceli olarak dozdan bağımsız (log-linear) farmakokinetiğe değişmesini de sağlamaktadır. Bir ilaç taşıyıcıdaki dozdan bağımsız farmakokinetik, dozun bir fonksiyonu olarak plazma ilaç seviyesinin daha kolay tahminine izin verir (24). **Şekil 1.**'de doksorubisin içeren ve yüzeyi PEG ile kaplı lipozomun şematik gösterimi yer almaktadır. İleriki bölümlerde daha detaylı olarak anlatılacak olan lipozomlar, ilaç taşıyıcı sistemler arasında üzerinde en çok araştırma yapılan sistemlerden biridir ve PEG kaplı lipozomların yüzeyindeki PEG, lipozomun yüzeyinde bir su bulutu oluşturarak lipozomu immün sistemden korumakta ve dolaşımdan hızla uzaklaştırılmalarını engellemektedir (25).

Partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin hedef doku/organa ulaşmasında karşılaştıkları en büyük engel, damar dışındaki hedef doku ile vasküler sistem arasındaki endotelyal hücrelerdir. Birçok dokuda, vasküler sistem endotelyal hücrelerin kesintisiz olarak dizilmesi ile meydana gelmiştir ve genelde bu endotelyal bariyer, ilaç taşıyıcı sistemlerin damar dışına çıkarak hedef doku/organa ulaşmasını engellemektedir.

Ancak tümörde, enflamasyon ve enfekte olmuş alanlar gibi patolojik bölgelerde artmış kapiller geçirgenliğe sahip alanların bulunduğu gösterilmiştir.

Aşırı geçirgen anjiyojenik tümör damarlanması, dolaşımda gezinen partiküllerin damar dışına sızmasına izin verir. Ayrıca, tümör dokuları genellikle etkin lenfatik drenajdan yoksundurlar. Bu alanlara partiküler ilaç taşıyıcı sistemlerle ilaç taşınması, AGT etkisi ve bozulmuş filtrasyon mekanizması aracılığı gibi pasif hedeflendirme mekanizmaları ile sağlanabilmektedir. Özellikle nanoboyuttaki taşıyıcı sistemler, AGT etkisi ile normal dokulara oranla tümör dokusunda daha fazla birikme eğilimindedirler (26). AGT etkisinin görülmesi için ön koşul ilaç taşıyıcı partiküler sistemin dolaşımda uzun süre kalması olduğundan, PEG kaplı taşıyıcı sistemlerin kanser tedavisinde etkin bir şekilde uygulanacağı bildirilmektedir (27, 28).



Şekil 1.1. : Doksorubisin içeren yüzeyi PEG₂₀₀₀-DSPE ile kaplı lipozomun şematik gösterimi (29).

1.2.2. İlaç Taşıyıcı Sistemler ile Aktif Hedeflendirme

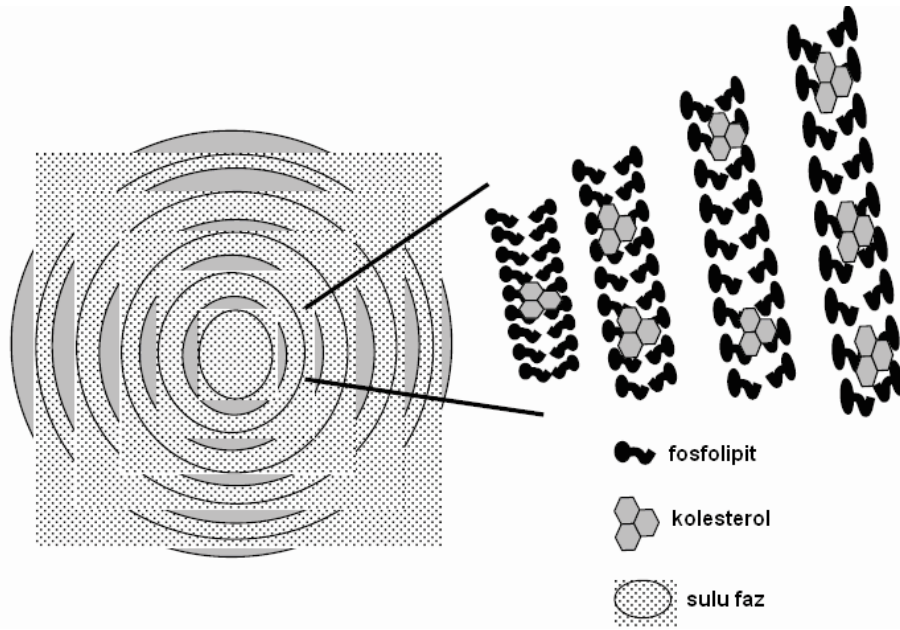
İlaç taşıyıcı sistemler, ilacın ve/veya ilaç taşıyıcı sistemin doğal dağılım modellerinin değiştirilmesi sonucu, spesifik doku, hücre ya da organlara aktif olarak yönlendirilebilirler. Aktif hedeflendirme, belli hücre yüzey antijenlerini tanıyan antikörlerin kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Bir başka aktif hedeflendirme ise dışarıdan manyetik alan uygulaması ile manyetik olarak işaretli ilaç partiküllerinin hedef bölgeye yönlendirilmesi şeklindedir (12, 17). Aktif hedeflendirme manyetik, ultrasonik ve ligant-reseptör aracılı hedeflendirme olmak üzere 3 ana başlık altında incelenmektedir.

1.3. LİPOZOMLAR

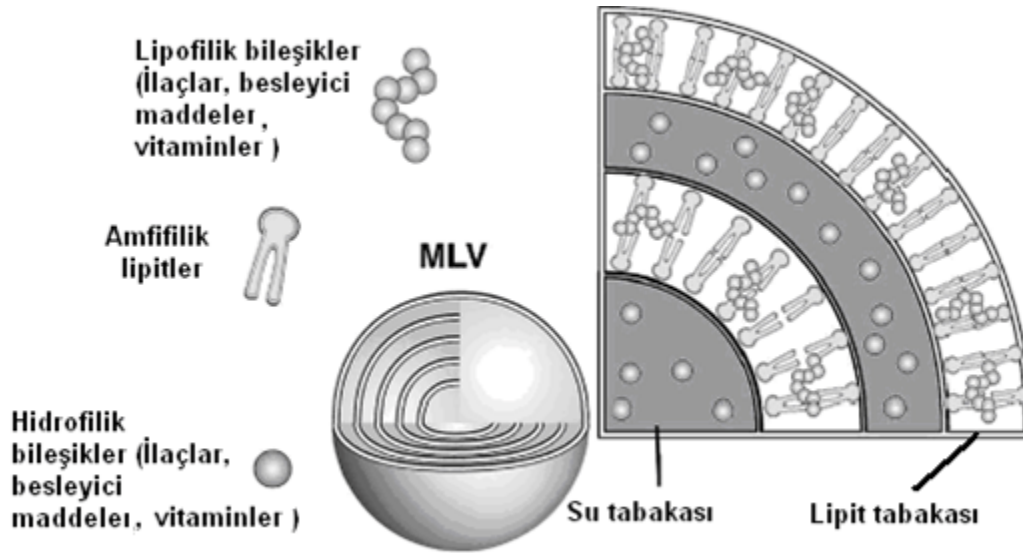
İlaç taşıyıcı sistemler içinde üzerinde en çok araştırma yapılan sistemlerden bir olan lipozomlar, aralarında sulu bir faz bulunan, biyolojik membrana benzeyen lipid tabakalarının oluşturduğu, mikroskobik boyutlarda, genellikle küre şeklindeki yapılardır (**Şekil 1.2.**). Lipozomların temel yapılarının hücre membran yapısına çok benzemesi nedeniyle ilk keşfedildiği yıllarda *in vitro* araştırmalarda model membran olarak kullanılan lipozomlar günümüzde başta ilaç taşıyıcı partiküler sistem olmak üzere birçok bilim dalında farklı kullanım alanlarına sahiptir (30- 32).

Veziküllerinin çapları nanometre ile mikrometre boyutları arasında değişiklik gösterir. Lipozomlar, biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özellikteki fosfolipit içerikleri sayesinde hücre membran yapısına benzerlik gösterir ve benzerlik derecesi çeşitli kimyasal modifikasyonlarla artırılabilir. Bu özellikleri sayesinde, ilaç hedeflendirme çalışmalarında yaygın olarak kullanılırlar (33, 34).

Lipozomların içine hapsedilen ilacı taşıyabilecek üç bölgesi mevcuttur: İlaç molekülü, fosfolipit tabakaya (lipofilik etkin maddeler), sulu kısma (hidrofilik etkin maddeler) veya su-lipit arayüzeyine (peptid ve küçük proteinler) hapsedilerek taşınabilir (**Şekil 1.3**). Bu sayede hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddeler hatta orta derecede lipofiliteye sahip etkin maddeler lipozom içine hapsedilebilir (35-37).



Şekil 1.2. Konvansiyonel çok tabakalı lipozomun şematik görüntüsü (37).



Şekil 1.3. Çok tabakalı lipozomların şematik görünüşü (38)

Diagnostik ve/ veya terapötik amaçla kullanılan lipozomların avantajları aşağıda özetlenmiştir (39, 40):

- Kolloidal büyüklüktedir.
- Lipofilik ve hidrofilik etkin maddeleri hapsedilebilen biyoyumlu sistemlerdir.
- Düşük sistemik toksisite ve düşük sitotoksositeye sahiptirler.
- Lipozomlar fosfolipit yapısında olduklarından, biyomembranlara benzerlik gösterirler. Bu sayede biyogeçimli ve biyoparçalanabilir özelliktedirler, immunojenite ve toksisite söz konusu değildir.
- Lipozomlar ilaç deposu olarak davranırlar. Etkin maddenin kontrollü salımı sağlanabilir. Uzatılmış salım profili ile dolaşımda veya lokal uygulama yerinde etkin terapötik ancak toksik olmayan kan seviyelerini sürdürülebilmektedirler.
- Etkin maddeyi enzimatik etkilerden korurlar. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyarak ilaç hedeflendirme yapabilirler.
- Düşük dozlarda terapötik etki gösterebilirler ve etkin madde plazma düzeyini istenilen süre terapötik değerde tutabilme yeteneğine sahiptirler.
- Dozlama aralığını ve ilaçların yarılanma ömrünü uzatırlarken, yan ve toksik etkileri çok azaltırlar veya ortadan kaldırırlar.
- Yüzey özelliklerinin modifikasyonu ile belirli dokulara ilaç hedeflemesi yapılabilir.
- Etkin madde çevresel etkinlerden korunur ve stabilitesi artırılır.
- Geniş spektrumlu kemoterapötikler, görüntüleme ajanları, antijenler, immunomodülatörler, şelasyon yapan bileşikler, hemoglobin ve kofaktörler, lipidler, genetik materyal gibi geniş yelpazedeki ilaçların taşınmasını sağlarlar.
- Kısa yarı ömre sahip maddelerin yarılanma ömrünü uzatırlar.
- Lipozomlar, içine hapsedilmiş etkin maddelerin farmakokinetik özelliklerini değiştirirler. Lipozom içine hapsedilmiş etkin maddenin, absorpsiyon, dağılım ve eliminasyon özellikleri serbest etkin maddeden tamamiyle farklıdır.
- Ekonomik olarak kabul edilebilir bir taşıyıcı sistemdir.

1.3.1. Lipozom – Hücre Etkileşim Mekanizmaları

Lipozomlar ve dolayısıyla lipozom içine hapsedilmiş etkin maddeler aşağıdaki yollardan bir veya birkaçının etkili olması ile hücre içine alınırlar (41):

Füzyon: Lipozomun en dış tabakasının hücre membranıyla birleşmesidir.

Adsorbsiyon: Lipozomun hücre yüzeyine sıkıca tutunmasıdır.

Lipit değişimi: Hücre membran yapısındaki lipitlerin, lipozom yapısında bulunan lipitlerle karşılıklı değişimidir.

Endositoz: Hücre yüzeyine temasta bulunan lipozomların fagositoz yoluyla hücre içine alınmasıdır.

Hücre içine lipozom sızıntısı: Hücre ve lipozomun birebir temasının sonucu olarak lipozomların hücre içine girişi söz konusu olur. Bu giriş lipozomların serum albumini ve lipoproteinler ile etkileşimi sonucunda meydana gelir.

1.3.2. Lipozomların Sınıflandırılması

Literatürde lipozomların değişik özelliklerine göre sınıflandırılmaları yer almaktadır. Hazırlama yöntemine göre, yüzey özelliklerine göre, büyüklüklerine göre, kanda kalış sürelerine göre değişik sınıflandırmaları mevcuttur. **Tablo 1.2.** ve **Tablo 1.3.**' te sırasıyla lipozomların bileşim ve ilaç taşıma özelliklerine ve yapısal özelliklerine göre sınıflandırılmaları verilmiştir.

Tablo 1.2. Lipozomların bileşimlerine ve ilaç taşıma özelliklerine göre sınıflandırılması (45):

Tip	Bileşim	Özellikler
Konvansiyonel lipozomlar	Nötral veya negatif yüklü fosfolipitler ve Chol.	<ul style="list-style-type: none"> • Kısa yarı ömür (RES tarafından hızla alınır). • RES'e hedeflendirme için uygun. • Doza bağlı farmakokinetik
pH-duyarlı lipozomlar	Fosfatidil etanolamin (PE) veya dioleoil fosfatil etanol amin (DOPE) gibi fosfolipitler, Ayrıca Chol hemisüksinat (CHEMS) veya oleik asit	<ul style="list-style-type: none"> • Zayıf bazların ve makromoleküllerin hücre içine taşınması için uygun. • Dağılımı ve farmakokinetiği konvansiyonel lipozomlara benzer
Katyonik lipozomlar	Katyonik lipitler	<ul style="list-style-type: none"> • Negatif yüklü makromoleküllerin taşınması için uygun (DNA, RNA, vb) • Yapısal olarak stabil değil. • Yüksek dozlarda toksik. • Lokal kullanımı sınırlı.
Dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar	Nötral yüksek camsı geçiş sıcaklığına sahip lipitler Chol %5-10 PEG ₂₀₀₀ -DSPE GM1 (galaktozil-Nasetilgalaktozaminil-(Nasetilnöroaminil)-galaktozilglikozil seramid) veya hidrojene fosfatidil inozitol	<ul style="list-style-type: none"> • Hidrofilik yüzey kaplama RES tarafından alımı zor. • Dolaşımda kalış süresi uzun. • Doza bağlı farmakokinetik
Immunolipozomlar	Antikora bağlı konvansiyonel veya dolaşımda uzun süre kalan lipozomlar	<ul style="list-style-type: none"> • Hücreye spesifik bağlanma • Hedef doku çevresinde salım

Tablo 1.3. Lipozomların yapısal özelliklerine göre sınıflandırılması (45, 49):

MLV	Multilameler (çok tabakalı) veziküller > 0.5 µm
OLV	Oligolameler veziküller 0.1-1 µm
UV	Tek tabakalı veziküller (her boyutta olabilir)
SUV	Küçük tek tabakalı veziküller (20-100 nm)
MUV	Orta büyüklükte tek tabakalı veziküller
LUV	Büyük tek tabakalı veziküller > 100 nm
GUV	Çok büyük tek tabakalı veziküller (çapları 1 µm'den büyük)
MVV	Çok veziküllü veziküller (genellikle 1 µm'den büyük)

1.3.3. Lipozomlarda Dağılımı ve Klerensi Etkileyen Faktörler

Partikül büyüklüğü ve partikül yükü lipozomun klerens kinetiğini etkilemektedir. Lipozomların in vivo davranışını etkileyen, taşıyıcıya ait fiziksel ve kimyasal özellikler çok fazla ayrıntıları ile çalışılmaktadır. Büyük lipozomlar, küçük olanlara göre çok hızlı bir şekilde biyolojik engelleri aşmaktadırlar. Negatif yüklü lipozomlar ise, nötral ve pozitif yüklü olanlara göre yine engelleri daha hızlı aşma yeteneğine sahiptirler (10, 42).

Negatif yüklü lipozomlar yüksüz ve pozitif yüklülerden daha çabuk elimine edilirler (43). Pozitif yüklü lipozomlar RES korunmalı lipozomların tersine hücre membranına ilgileri çok fazladır ve genellikle genetik maddeleri (RNA, oligonükleotidler gibi) hücre içine taşımak için kullanılırlar. Hücre membranı ile füzyon yaparak birleşirler (44, 45).

Lipozomun kimyasal bileşimi de yine lipozomun davranışında önemli olmaktadır, ayrıca az toksik sfingomiyelin lipozomlarını hariç tutarsak, lipozomların ve diğer mikropartiküllerin RES'e yapacakları toksik etkiler unutulmamalıdır (46).

Yukarıda bahsedilen bariyerlerin dışında pek çok biyolojik engeller mevcuttur. İlaç taşımada her türlü bariyere engel olmak için değişik stratejiler öne sürülmektedir.

Bunlar (47, 48) :

- Proteaz enzim aktivitesinin minimum olduğu GI kanalın, o bölgesinde dozaj şeklinin yerleştirilmesi
- İmmünoglobulinler ile makromoleküllerin kompleks oluşturma potansiyelinin azaltılması
- Proteaz enzim aktivitesinin inhibe edilmesi
- Protein yapısındaki ilaçların antijenlerinin maskelenmesi
- Seçilmiş mekanizmalar ile, lenfatik alımın azaltılması şeklinde önlemlerdir.

1.3.4. Lipozomları Hazırlama Yöntemleri

Lipozomların hazırlanmaları için mekanik, solvan dispersiyon veya deterjan çözme yöntemleri kullanarak değişik tipte lipozomlar hazırlanmaktadır (46).

Mekanik dispersiyon Yöntemleri:

- **Elle çalkalama yöntemi:** Cam balonun çeperlerinde oluşan lipit film, sulu faz eklendikten sonra elle çalkalanarak süspande edilir. Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.
- **Çalkalamadan hazırlama:** Lipit film kurduktan sonra, 15 dk boyunca suyla doymuş azot püskürtülür, böylece çalkalamadan sulu ortamda şişmesi sağlanır. Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.
- **Pro-lipozom hazırlama yöntemi:** Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.
- **Dondurup-kurutma yöntemi:** Bu yöntemle MLV'ler hazırlanır.

- **Lipit hidrasyon yöntemi**
- **Mikro-fluidizer yöntemi:** Bu yöntemle mikroemülsifiye lipozomlar hazırlanır
- **Sonikasyon yöntemi:** Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır. Probe sonikasyon, Sonikasyon banyosu
- **Membran ekstrüzyon yöntemi:** Bu yöntemle LUV'ler hazırlanır.
- **Kurutulmuş-rekonstitüe lipozom hazırlama yöntemi**
- **Dondurma-çözme sonikasyon yöntemi**
- **pH ile indüklenen vezikül oluşumu**
- **Kalsiyum ile indüklenen füzyon**

Solvan dispersiyon yöntemi:

Bu yöntemle hücre büyüklüğünde veziküller ve MVL'ler hazırlanabilir.

- **Etanol enjeksiyon yöntemi:** Bu yöntemle SUV'ler hazırlanır.
- **Eter enjeksiyon yöntemi**
- **S/Y emülsiyonu oluşturma yöntemi**
- **Ters faz buharlaştırma yöntemi:** Bu yöntemle *reverse-phase evaporation* (REV) veziküller hazırlanabilir.

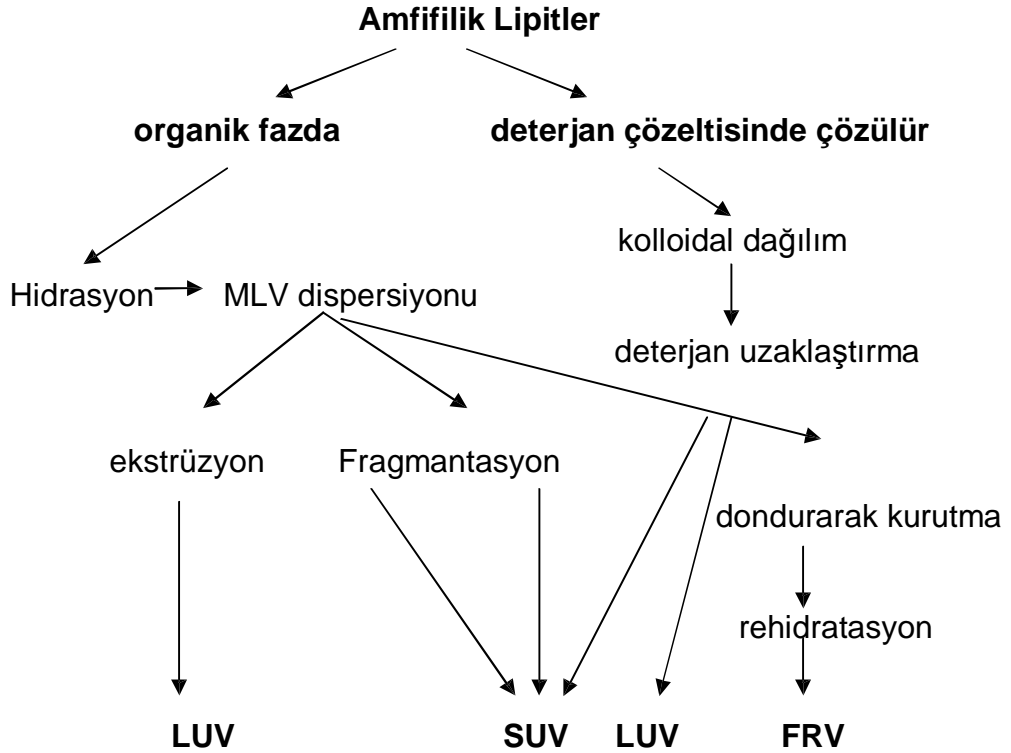
Lipozom hazırlama yöntemleri, genel olarak **Şekil 1.4.**'te gösterilmiştir.

1.3.5. Lipozomların Stabilitelerini Etkileyen Faktörler

Lipozomların özellikle ilk yıllarda kullanımını kısıtlayan en önemli noktalardan biri kimyasal ve fiziksel stabilitelerinin düşük olmasıdır. Ancak bu alanda yapılan çok sayıda araştırma sonucu elde edilen sonuçlar sayesinde lipozomların kimyasal ve fiziksel stabilitesini etkileyen parametrelerin aydınlatılmış olması ve gerek ilaç üretimindeki teknolojik gelişmeler gerekse fosfolipit alanındaki gelişmeler nedeniyle hem kimyasal hem de fiziksel stabilite artık lipozomlar için büyük sorun olmaktan çıkmıştır.

Lipozomların kimyasal ve fiziksel stabilitelerinin korunmasında öncelikle lipozomun yapısı, etkin maddenin lipozomda tutulduğu faz, lipozomun

büyüküğü, yükü, hazırlama koşulları ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır (30, 32, 51, 52).



Şekil 1.4. Lipozom hazırlama yöntemlerinin şematik gösterimi (50).

Lipozomların Kimyasal Stabilitesi

Lipozomların stabilitesini etkileyen en önemli faktör, bunların temel yapılarını oluşturan fosfolipidlerin kimyasal stabiliteleleridir. Fosfolipidler, lipozom yapısı içinde oksidasyon (lipid peroksidasyonu) ve hidroliz (yağlı asit esterlerinin hidrolizi) ile iki şekilde kimyasal parçalanmaya uğrarlar. Doğal fosfolipidlerin kimyasal yapısı, oksidatif hidrolitik işlemler yoluyla bozulmaya meyillidir.

Lipozomlarda kullanılan fosfolipidlerin çoğu moleküler yapı olarak doymamış açil zinciri içerirler. Bu zincirler oksidatif parçalanmaya karşı dayanıksızdır. Özellikle doymamış yağ asidi içeren fosfolipidlerle hazırlanan lipozomlar peroksidasyona uğrayabilir. Lipidlerde meydana gelen bu oksidatif

bozunma peroksitlerin ve hidroperoksitlerin oluşumu ile de sonuçlanan karmaşık bir olaydır. Meydana gelen bozunmanın miktarı ve hızı pH'ya, tampon ortamına ve sıcaklığa bağlı olarak değişir. Lipozomların hazırlanması sırasında doymamış fosfolipidler kullanılır ve oksidasyonun azaltılması için özel önlemler alınmazsa bu reaksiyonlar kolayca oluşur.

Böylece lipozomların hazırlanması, depolanması ve kullanımı sırasında oksidasyon reaksiyonları meydana gelebilir. Araştırmacılar, lipozom dispersiyonlarında sulu faz olarak Tris ve HEPES tamponlarının kullanımının lipid peroksidasyonunu büyük ölçüde önleyen faktörlerden biri olduğunu belirtmişlerdir (51, 53, 54).

Lipozomların kimyasal stabilitesi için istenmeyen lipid peroksidasyonunun bir kaç yöntemle en aza indirilebileceği bildirilmiştir (52, 54, 55).

Bunlar;

- Doymamış fosfolipitlerin kullanımının mümkün olduğunca azaltılması,
- Ortamdaki oksijen varlığını en aza indirmek için azot veya argon gazı kullanımı,
- Ortamdan ağır metallerin uzaklaştırılması,
- Antioksidanların kullanımı (α -Tokoferol gibi).

Hidroliz olayında; pH, sıcaklık, zaman, tampon, iyonik güçler, fosfolipitin zincir uzunluğu ve yapısı en etkili faktörlerdendir. Bir fosfolipid molekülünde mevcut olan ester bağları, su varlığında hidroliz olur (56- 58) .

Lipozomların Fiziksel Stabilitesi

Lipozomların fiziksel stabilitesi; lipozomun yapısına, kullanılan etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olmasına ve lipozomların depolanma şartlarına önemli ölçüde bağlıdır (30, 52, 59, 60).

Genellikle bir lipozomal preparatın fiziksel özelliklerindeki değişiklikler veziküllerin agregasyonu ya da lipozom hacminin büyümesi şeklinde görülür. Veziküllerde meydana gelen sızma ve füzyon olayları lipozomların üretimi

sırasında membran yapısında bazı zararlara yol açmaktadır. Bunun yanısıra diğer lipozomlarda faz geçiş sıcaklığı üzerinde membran yapısında bazı hasarlar oluşabilir. Etkin maddenin lipozom yapısından dışarı sızması tek tabakalı lipozomlarda daha çok görülmekte, çok tabakalı lipozomlarda bu olaya daha ender rastlanmaktadır. Çok tabakalı lipozomun, lipid tabakasında tutulmuş etkin maddenin dışarı sızması sulu fazdaki etkin maddenin dışarı sızmasına göre daha zordur (61).

Molekül ağırlığı büyük olan(>1000) etkin maddelerin lipozomlardan dışarı sızmaları daha güçtür. Buna karşılık küçük molekül ağırlıklı maddeler daha kolay dışarı sızabilirler. Sonikasyon koşullarının uygun olmadığı durumlarda lipozomlarda birleşme eğilimi artar ve etkin madde daha kolay dışarı sızabilir.

Van der Waals etkileşimleri nötral lipozomların agregasyonu ve sedimentasyonuna neden olabilir. Bu yüzden membranlar birbirine temas ederek büyük yapıların oluşmasına neden olur, böylece membran tabaka sayısı artar ve büyük veziküller oluşur. Özellikle yüksüz lipozomlarda bu durum çok fazla görülür. İyi uçurulmamış artık çözücüler ve eser elementler bu olayı arttırabilirler. Faz geçiş sıcaklığında, özellikle küçük tek tabakalı lipozomlar membranın eğrisel yapısından ileri gelen direncin az olması nedeniyle füzyona meyillidir.

Lipozomların faz geçiş sıcaklığında meydana gelen bu olayı önlemek için lipozom dispersiyonlarını faz geçiş sıcaklığından uzak bir sıcaklıkta saklamak yerinde olur. Ayrıca membran yapısına yeterli miktarda Chol ilavesi ile faz geçişi azalır veya tamamen ortadan kalkar. Lipozom membranlarının geçirgenliği, membranın lipid tabakasına ve lipozom içinde tutulan etkin maddenin yapısına bağlıdır. Lipozom membranları arasında özellikle büyük, polar veya iyonik maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili biçimde tutulurlar (51, 52, 59).

Araştırmacılar lipozomların fiziksel ve kimyasal stabilitelelerini artırmak için çeşitli çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışmalarda lipozomların stabilitesini artırmak

için en fazla uygulanan yöntemin liyofilizasyon olduğu görülmektedir (56, 58, 59, 62, 63)

Özer ve arkadaşları (64), bir grup *kriyoprotektif* maddenin lipozomların liyofilizasyonu üzerindeki etkilerini araştırmak üzere yaptıkları çalışmada özellikle trehaloz'un bu amaçla kullanılan maddeler arasında en etkili olduğunu saptamışlardır. Trehalozun hidrojen bağı yaparak fosfolipid membran ile doğrudan etkileştiği bildirilmiştir.

Özer ve Talsma (65), 5-FU içeren lipozomlardan etkin madde sızmasını oda sıcaklığında ve buzdolabında muhafaza ederek incelemiştir. Etkin madde kaybının, oda sıcaklığında bekletilen lipozomlarda daha fazla olduğu saptanmıştır. Ayrıca kristal tipi lipozomların jel tipi lipozomlara oranla daha dayanıklı oldukları ve daha çok etkin madde kaybına uğradıkları belirtilmiştir.

Dang ve Rogers (66), hazırladıkları lipozomları polimerlerle kaplamışlardır. Bu amaçla önce polimerin hidrofilik ve iyonik güçler yardımı ile lipozom yüzeyine adsorbsiyonu sağlanmış, daha sonra polimerin hidrofilik gruplara bağlanması gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle hazırlanan lipozomlardan asetil salisilik asitin salımını ve lipozom stabilitesini incelemiştir. Çalışma sonucunda polimerle kaplı lipozomların stabilitelerinin ve etkin madde salımlarının kaplanmamış lipozomlara göre daha iyi olduğunu saptamışlardır.

1.3.6. Lipozomların Tıpta Kullanılışları

Lipozomlar günümüzde teşhis ve tedavide geniş klinik kullanım alanlarına sahiptir. Farmakolojik olarak aktif maddelerin etki etmeleri istenen bölgelere spesifik olmamaları, tıpta araştırma ve tedavide her zaman engel oluşturmuştur. Etkin maddelerin hücrenin doğal membran yapısının benzeri lipozomlar içinde, istenen bölgelere hedeflendirilmeleri ilaçların istenmeyen yan etkilerini önlerken hedef bölgeye ulaşmadan yıkılmalarını da engellemektedir. Çok sayıda araştırmacının üzerinde yoğunlaştığı lipozomların tıbbi kullanımları ile ilgili çalışmalar, kanser, enzim eksikliği hastalıkları, paraziter, fungal hastalıklar gibi ölümcül ve yaygın hastalıkların tedavisi üzerinde odaklanmıştır (67).

Bir ilaç taşıyıcı sistem içindeki etkin madde, etkisini gösterebileceği hücrelere ulaşıncaya dek, vücuttaki birçok molekül, hücre, membran ve organla karşılaşır. Farmakolojik etkisi olan maddelerin bir kısmı, sağlam dokular için belirgin derecede toksiktir. Ayrıca madde vücuda girdikten sonra değişikliğe uğrayabilir, inaktive olabilir, veya hasta dokuya az miktarda ulaşabilir. Bütün bu problemlerin üstesinden gelebilmek için, etkin maddeyi hedef doku veya organa taşıyan taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir.

İlaç taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, toksik ve immunojenik olmamaları, ilacı kontrollü salabilmeleri, biyolojik olarak yıkılabilmeleri ve ilacın büyük kısmını hedef patolojik dokuya iletilebildiği için tıpta çok farklı alanlarda kullanımları araştırılmaktadır. Halen klinikte değişik amaçlarla kullanılan lipozom bazlı çok sayıda ilaç mevcuttur. Bazılarında faz çalışmaları, Faz III ve Faz IV aşamasındadır. Bugün tedavide kullanılan yani piyasaya sunulmuş sınırlı sayıda lipozomal ilaç formülasyonu olmasına karşın klinik araştırma aşamasında olan birçok çalışma vardır (**Tablo 1.4.**). Lipozomların tıpta değişik amaçlarla kullanılışları mevcuttur. Bu tez kapsamında lipozomların sadece kanser görüntülenmesi ve tedavisindeki kullanılışlarından bahsedilecektir.

1.3.6.1. Lipozomların Diagnostik Amaçla Kullanılışları

Nanoboyutlu ilaç taşıyıcı sistemler, diyagnostik olarak statik ve dinamik görüntüleme ve in vivo fonksiyon testlerinde kullanılmaktadır. Statik görüntüleme ile organların durumu, büyüklüğü, şekli gibi morfolojik özellikleri ve lezyonun, tümörün kapladığı alan hakkında bilgi edinilebilirken, dinamik görüntüleme çalışmaları ile kontrast bileşiğin çalışılan organ ya da dokudaki fonksiyonu hakkında bilgi edinilebilmektedir. Lipozomların diyagnostik görüntüleme alınandaki kullanımları üzerinde de uzun yıllardır çalışmalar yapılmaktadır.

Tablo 1.4. Tedavide kullanılan ve klinik çalışma aşamasında olan lipozom preparatları (39).

İlaç	Kullanılış	Firma	Durumu
Amfoterisin B	Mantar enf.	NeXstar	AmBisome®
Amfoterisin B	Mantar enf.	Liposome Co.	Abelcet®
Amfoterisin B	Mantar enf.	Sequus	Amphocil®
Danurobisin, Danurobisin sitrat	AIDS, kanser	NeXstar NeXstar	DaunoXome® Klinik çalışma
Danurobisin	AIDS, yumurtalık ve göğüs kanseri	Sequus Sequus NeXstar Liposome Co.	Doxil® (ABD) Caelyx® (Avrupa) Faz III Klinik çalışma Faz II
Trans- retinoik asit	Kanser	Aronex Pharma.	Antagen®
Anamisin	Kanser	Aronex Pharma.	Faz I/ II
Nistatin	Mantar enf.	Aronex Pharma.	Nyotran®
Vinkristin	Kanser	Sequus	Klinik çalışma
Cisplatin	Kanser	Sequus	Faz I
Muramil tripeptit	Tümör makrofaj aktivasyonu	Ciba- Geigy	Klinik çalışma
Prostaglandin E1	Solunum güçlüğü Miyokard infarktüs	Liposome Co. Liposome Co.	Faz III
Amikasin	Bakteri enf.	NeXstar	Mikasome®
Hepatit B	Aşı	Swiss Serum and Vaccine Institute	Hexapel®
Sitarabin	Menenjit	Skye Pharma.	DepoCyt®

Bu amaçla farklı görüntüleme yöntemleri için lipozom bazlı kontrast bileşikler geliştirilmiş ve bunların çeşitli hastalıkların teşhis ve görüntülenmesindeki kullanımları araştırılmıştır.

Lipozomlar, kontrast bileşikleri, kontrast maddenin özelliğine bağlı olarak hem sulu kompartmanda hem de lipit membranda hapsedebilme özelliğine sahiptirler (68). Ancak farklı görüntüleme modelleri için farklı kimyasal yapıda izleyici türlerin bulunması, lipozomları kontrast bileşiklerle yüklemeye çok farklı yöntemler kullanılmasını gerektirmektedir (69).

1.3.6.2. Lipozomların Kanser Tedavisinde Kullanılışları

Lipozomlar kanser hastalığında teşhis ve tedavi amaçla kullanılırlar. Fakat uzun yıllardır lipozomlarla ilgili çalışmalar yapılmasına rağmen piyasa preparatları sınırlıdır. (**Bkz. Tablo 1.4.**). Kanser tedavisinde kullanılan farklı etkin maddelerin lipozom formülasyonları hazırlanmakta ve bu sayede etkin maddenin tümör bölgesinde yoğunlaşması amaçlanmaktadır (70, 71). Örneğin, beyin tümörlerinin tedavisinde ilaçları lipozom içine hapsetmek ve böylelikle kan-beyin engelini geçmelerini sağlamak üzere çalışmalar yapılmıştır (72).

Kanser tedavisinde karşılaşılan en önemli sorun, ilaçların vücudun istenilen bölgesine ve hücrelerine hedeflendirilememeleridir. Lipozomlar geliştirmede hedef olarak başlıca hücre sinyal iletim sisteminde yer alanlar, hücre siklusunun düzenlenmesinde, apoptozisde, metastaz sürecinde ve angiogenezde rol oynayan moleküller seçilmektedir. Bunların yanı sıra tümör hücrelerinin yüzeyinde bulunan antijenler, hücre farklılaşmasını sağlayan moleküller ve tümör gelişiminde rol oynayan telomeraz, farnesil transferaz gibi enzimler de hedef olarak alınmaktadır. Başarılı bir kanser tedavisi için hedeflerin uygun seçilmesi büyük önem taşır. Bu hedeflendirme hedef hücrelerden ekstre edilen maddelerin, lipozom yüzeyine yerleştirilmesi ile sağlanabilmiştir. Antitümoral ajanların lipozom içine hapsedilebilmesi için, bileşiklerin fizikokimyasal özellikleri önemlidir. Tümöre karşı kullanılan ajanların bu tür

özelliklerinin bilinmesi, sürekli salım sağlayan ve hedeflendirilebilen taşıyıcıların formülasyonu açısından önemlidir (73).

Kanser olayların çoğunda birkaç tane makrofajın tüm tümör hücrelerini yok etmede yetersiz kalması nedeniyle, lipozom içerisinde hapsedilmiş MAF'ın (makrofaj aktivatörü) geniş yayılım göstermiş tümörlerin, küçük metastazların veya tümör kitlelerin kemoterapi sonrasında geride kalan küçük parçalarının tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Makrofaj aktivasyonu ile metastazların önlenmesinde önemli etkinlerden biri de; lipozomların, bileşimlerine bağlı olarak istenen organlarda tutulmalarıdır (74).

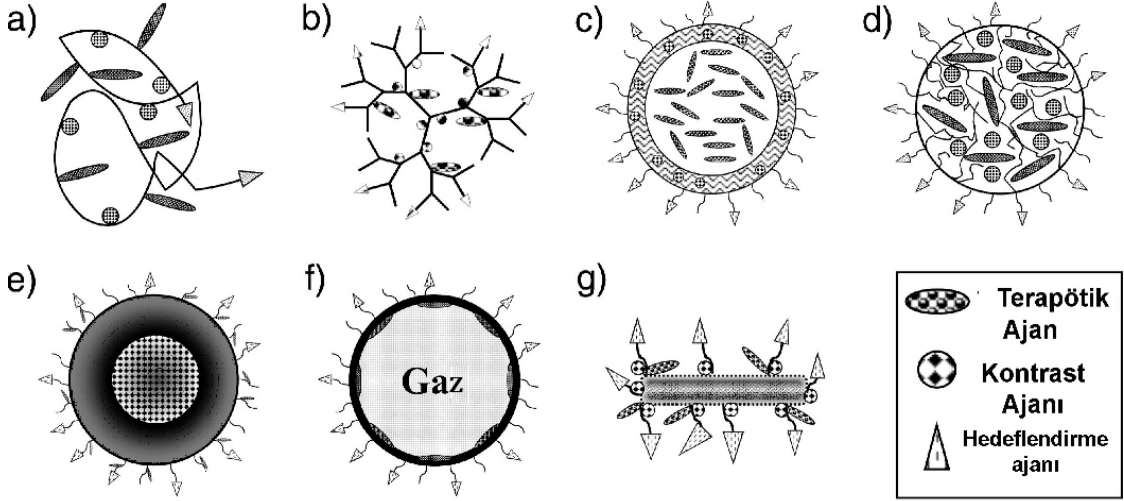
Aktive edilmiş makrofajların seçici şekilde neoplastik hücreleri tanıyıp yok ederken, neoplastik olmayan hücrelere zararsız oldukları gözlenmiştir. Kesin olarak mekanizması bilinmemekle beraber, neoplastik transformasyon ile ilişkili olduğu kabul edilmiştir. Makrofaj aktivasyonu yapan başlıca bileşiklerin, mikrobiyal hücre duvarı bileşenleri ve lenfokinler olduğu bulunmuştur (75).

1.4. TERAGNOSTİK İLAÇ TAŞIYICI PARTİKÜLER SİSTEMLER

Değişik terapötik ve diagnostik ajanların geliştirilmesi nanoteknoloji alanını önemli ölçüde etkilemektedir. Son zamanlarda, bu iki kullanım alanının kombinasyonu ile elde edilen ve klinikte etkili formülasyonlara, çok büyük bir ilgi vardır. Bu kavram teragnostik olarak bilinmektedir. Teragnostiğin kişiye özel tedavide çok büyük katkılar sağlayacağına inanılmaktadır. Tanım olarak, teragnostik ilaç taşıyıcı partiküler sistemler, hem terapötik hem de diagnostik ajanların birleştirilmesinden oluştuğu için, çok fonksiyonludur.

Buna ek olarak, bir teragnostik ilaç taşıyıcı sisteminde hem hedeflendirilmiş doku/organ tutulumu, hem de etkin maddenin aktivasyonu veya kontrast ajanının geliştirme mekanizmaları bulunabilir. İdeal bir teragnostik ilaç taşıyıcı sistemin vücutta dolaşımı sırasında gözlenebilir bir moleküler hedeflendirilmesi olabilir. Teragnostik ilaç taşıyıcı sistem, hedefine ulaştıktan sonra hücre yüzey reseptörleriyle etkileşir ve hücresel sitozola girer. Gerekirse intraselüler hedefe ulaşabilir ve orada etkin maddeyi salınır (76). **Şekil 1.5.** 'te

teragnostik olarak kullanılan ilaç taşıyıcı sistemler ve **Tablo 1.5.** 'te teragnostik nanopartikül örnekleri ve özellikleri özetlenmiştir.



Şekil 1.5. Teragnostik ilaç taşıyıcı sistemler. a) ilaç konjugatı; b) dendrimer; c) vezikül; d) lipozom ve/ veya misel; e) çekirdek kabuk (Core-shell) nanopartikül; f) mikrobaloncuklar; g) karbon nanotüp (29).

1.4.1. Teragnostik Lipozomların Tıpta Kullanılışları

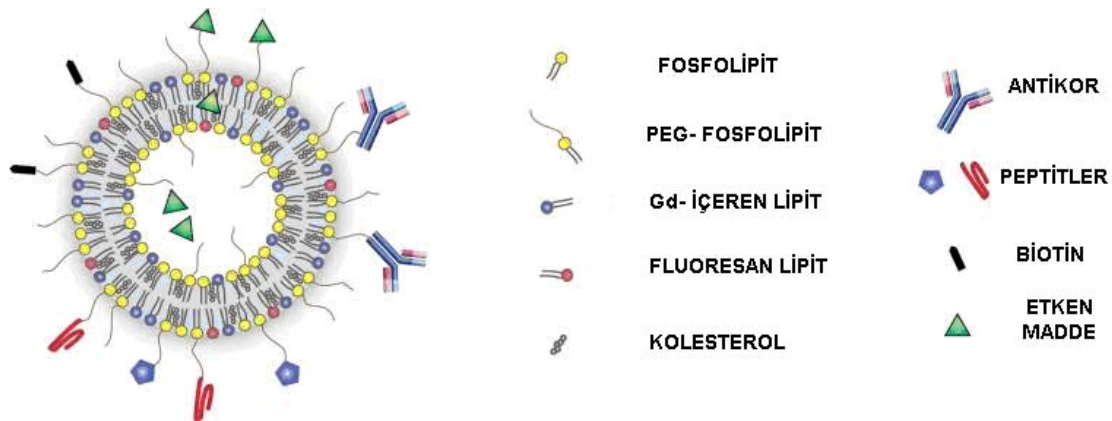
Teragnostik Tıp, teşhis, hedeflendirilmiş tedavi ve buna karşı oluşturulan cevabı izlemeye imkân veren bütünleşmiş bir nanoterapötik sistem olarak tanımlanabilir. Başlangıçta teragnostik terimi diagnostik test ve bu testin sonuçlarına dayanarak, hedeflendirilmiş tedavi içeren bir terapötik yaklaşım olarak tanımlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Kluza ve diğ. leri (84) görüntüleme ve tedavi amaçlı kombine hedeflendirilmiş sistemlerin duyarlılık ve seçicilik problemleri, en azından, kısmi olarak çözümlenebilen bir yeni yaklaşım olarak teragnostik sistemleri sunmuşlardır. Genel düşünce, anjiogenesis spesifik moleküler markerları hedeflendirme sürecine dahil etmektir.

Tablo 1.5. Teragnostik nanopartikül örnekleri.

Tip	Materyal	Büyükük	Terapötik	Kontrast Ajanı	Hedeflendirme	Kaynak
İlaç konjugatı	Hidroksi propil metakrilat	~ 74 kDa	Yok	DY-615	Aktif (RGD)	77
Dendrimer	Poliamidoamin/ Polietilen glikol	~ 100 nm	5-FU	5-FU	Aktif (Folik asit)	78
Vezikül	Poli (g-benzil l- glutamat)-blok- hyalüran	~ 260 nm	Doketaksel	Tc-99 m	Pasif	79
Misel	Polietilen glikol/ Polilaktik asit	~ 45 nm	Doksirubisin	SPIO	Aktif (RGD)	80
Çekirdek kabuk (<i>Core-shell</i>)	Poliakrilik asit / Süperparamanyetik demir oksit	~ 90 nm	Paklitaksel	SPIO/Dil	Aktif (Folik asit)	81
Mikrokabarcık (<i>Microbubble</i>)	Polietilen glikol)-b- poli(L-laktid)/ perfloropentan	~ 125 nm	Doksirubisin	Perfloropentan	Pasif	82
Karbon nanotübü	Karbon	~ 110 × 10 nm	Cisplatin	QD	Aktif (Epidermal büyüme faktörü)	83

Daha önce de belirtildiği gibi pasif ve/veya aktif hedeflendirilmiş lipozomların hem görüntüleme hem de tedavide kullanımları uzun yıllardır üzerinde çalışılan bir konu olmuştur. Bu amaçla örneğin Manyeki Rezonans görüntüleme için yüksek miktarda Gadolinyum-lipitler ve fuloresans görüntüleme için fuloresan lipitler içeren lipozomlar kullanılabildiği gibi (**Şekil 1.6.**) hazırlanan lipozomların daha sonra görüntülemede kullanılacak radyometal ile işaretlenmesi de yapılmıştır.

Tümörün heterojenitesi ve uyarlanabilen direnci kanser tedavisinde çok büyük engel olarak ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla kompleks kanser hastalığının tedavisinde bu iki özelliğin dikkate alınması gerekir. Kanser hastalığının heterojenite ve adaptasyon gibi komplikasyonların önüne geçebilmek için, diagnostik görüntüleme yeteneğinin terapötik yaklaşımla birleştirilmesi kritik bir öneme sahiptir. Hedeflendirilmiş bir tedavi için, başlangıçta her tümörün hücrel fenotiplerin karakterizasyonunda moleküler görüntüleme kullanılması gerekmektedir. Hem intra- hem de inter-tümör heterojenitesi, konvansiyonel tedavi yaklaşımlarından ötesinde, kişiselleştirilmiş tedavinin önemli bir parçası olarak ortaya koymaktadır (85).



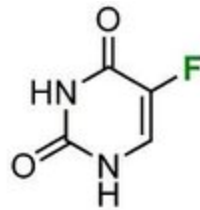
Şekil 1.6. Anjiyogenez görüntüleme ve tedavi amaçlı hedeflendirilmiş multimodal lipozomun şematik gösterimi. (Tümör büyümesi ve metastatik yayılım, fizyopatolojisinin anahtar aşaması anjiyogenezdır.)

Teragnostik taşıyıcı sistem kavramı ilaç taşıyıcı sistemler düşünüldüğünde oldukça yeni sayılabilecek bir kavramdır. Yaklaşık 10 yıl önce bu konu ile ilgili çalışmalar başlamış ve özellikle son yıllarda nanoteknolojide yapılan çalışmalarla paralel olarak bu konu ile ilgili çalışmalar da giderek artan bir önem kazanmaya başlamıştır (86- 89). Buna paralel olarak teragnostik lipozomlarla ilgili yapılan çalışmaların sayısı da bugün için sınırlı sayıdadır. Ancak bilindiği gibi kanser tedavisinde ilk kullanılan nanopartiküler taşıyıcı sistemler lipozomlardır ve çok uzun yıllardır bu alanda elde edilen bilgiler teragnostik lipozomlarla yapılan çalışmalara da yön vermekte ve rehberlik etmektedir.

Dolayısıyla kısa bir zamanda bu konu ile ilgili çalışmaların artacağı tahmin edilmektedir. Grange ve diğ. leri (95) Kaposi Sarkoma hastalarında doksorubisin ve MR görüntüleme ajanı içeren lipozomların in vivo biyodağılımını ve manyetik rezonans görüntüleme kullanımlarını göstermişler ve etkili sonuçlar elde etmişlerdir.

1.5. 5-FU'İN YAPISI VE ÖZELLİKLERİ

5-FU molekül ağırlığı 130.08 g olan suda ve etanol (% 96) de iyi çözünen eter ve kloroformda çözünürlüğü az olan bir moleküldür (21). 5-FU'nun kimyasal yapısı **Şekil 1.7.**' de gösterilmiştir.



5-Fluorouracil

Şekil 1.7. 5-FU 'in kimyasal yapısı

1.5.1. 5-FU 'in Kullanım Alanları

İlaçlara karşı direnç, kanser kemoterapi tedavisindeki başarısızlığın en önemli nedenidir. Düşük yanıt oranına rağmen (% 20 monoterapide), 5-FU dünya çapında en fazla reçete edilen antikanser ilaçtır. Bugüne kadar, 5-FU prodrogu, kolorektal kanser ve diğer katı tümörlerin tedavisinde bir dayanak noktası olmaya devam etmektedir. Solid tümörlerde, Dissemine kolorektal kanser ve meme ve mide kanserlerinde kullanılır. 5-FU sindirim sistemi kanserlerinde de yaygın olarak kullanılmaktadır. Mide kanseri hastalığa bağlı ölümler düşünüldüğünde, dünya çapındaki en ölümcül tümör tipidir. Hastalar genellikle hastalığın geç evresinde spesifik olmayan semptomlarla hekime başvururlar. Bu geç başvuruya bağlı olarak, büyük boyutta ulaşmış olan tümörün lokal tedavi imkanı kısıtlıdır. Ne yazık ki, kemoterapiden sağlanacak fayda da sınırlıdır. Kullanılabilecek tedavi, aralarında 5-FU, mitomisin C, doksorubisin, yüksek doz metotreksat ve cisplatin gibi mide kanserinde etkili olduğu düşünülen sınırlı sayıda ilaçtan ibarettir. Metastatik hastalığı olanlarda birçok ilacın etkili olduğu bildirilmiştir, ancak ilaç bileşimleri sağ kalım üzerinde her hangi bir geliştirici etki yapmamıştır.

Aynı zamanda adjuvan ve neoadjuvan kemoterapinin sağkalım üzerinde önemli bir etki yaptığı henüz görülmemiştir. Bu nedenle kemoterapinin kontrollü deneylerde kullanılması önerilmektedir. 5-FU temelli kombinasyon terapisi, ağır semptomlu hastalarda hafifletici amaçla kullanılabilir (96).

1957'de 5-FU'in sentezlenmesinden beri, kolorektal kanserin ilaçla tedavisi genişletilerek araştırılmaktadır. Metastatik hastalığın tedavisinde kemoterapinin rolü çok azdır. 5-FU tedavisinin belkemiği kemoterapidir.

Son çalışmalarda, irinotecanın (97) 5-FU tedavisinden randıman alınamayan hastalarda etkili olduğu, hatta sağkalımı uzattığı kanıtlanmıştır. Bu yüzden 5-FU ile kombinasyonu araştırılmakta ve ilk izlenimler bu kombinasyonun metastatik hastalığı olanların sağkalımını daha da uzattığı yönündedir. Kolorektal kanserin tedavisinde kemoterapi da uygulanmıştır. Kolorektal kanserinin ameliyatından sonra, 5-FU içeren yardımcı kemoterapi

rejiminin uygulanması hakkında bilgiler içeren başlangıç raporunun (98) ardından benzer yaklaşımlar üzerinde çalışılmış ve bu tedavilerin sağkalımı arttırdığı gösterilmiştir. Bu gelişmelerin istatistiksel bir değeri vardır ve yardımcı kemoterapiyle, her yıl binlerce hastanın hayatı kurtulabilmektedir. Uygulanan yardımcı rejimler, metastatik kanser hastalığının tedavisinde uygulanan rejime benzerdir. En son, oral 5-FU prodrugar geliştirilmiş (99) ve bunların en az metastatik hastalığının tedavisinde kullanılan temel ilaçlar kadar etkili olduğu gösterilmiştir. Bu ilaçların daha sonradan yardımcı (adjuvan) kürlerde test edilmesi muhtemeldir.

Farklı kanser formlarının palyatif tedavisinde tek başına veya kolorektal ve meme kanserlerinin tedavisinde kombine olarak, ayrıca pankreas bezi, karaciğerin malign tümörlerinde, karaciğer metastazında ve anal kanserde endikedir. 5-FU over kanserinde, servikal kanserde, mesane ve prostat kanserinde endikedir (100).

1.5.2. 5-FU'in Diğer İlaçlarla Etkileşimi

5-FU ile tedaviden önce veya tedavi sırasında, aminofenazon, fenilbutazon ve sulfanomid uygulanmamalıdır. Allopürinol, 5-FU 'in etkinliğini ve toksisitesini azaltır. Klordiazepoksit, disulfram, griseofulvin ve izoniazid, 5-FU' in aktivitesini artırabilir. 5-FU 'in mitomisin ile kombine kullanıldığı uzun süreli tedaviden sonra, hemolitik üremik sendromun ortaya çıktığı görülmüştür.

Diğer sitostatik ajanlarla (interferon-a, siklofosamid, vinkristin, metotreksat, cisplatin, doksorubisin) ve folinik asit ile kombinasyonda, 5-FU' in hem etkinliği hem de toksisitesi artabilir (101).

Diğer miyelosupresif ajanlarla kombinasyonda doz ayarlaması gerekmektedir; aynı anda veya daha önce yapılan radyoterapi de doz azaltılmasını gerektirebilir. Antrasiklinlerin kardiyotoksitesisi artabilir. Folik asit ile kombinasyon ağır diyareye neden olabilir.

İçine konulduğu cam kap tarafından adsorblanması nedeniyle 5-FU 'in etkinliğinin kaybolduğu belirtilmiştir. Tiroksin (T4) ve triiyodotronin (T3) hafif

artabilir [hastalar klinik olarak ötiroid (tiroid bezinin fonksiyonlarının normal olması) kalırlar]. İdrardaki bilirubin ve 5-hidroksindolasetik asidi test etme metodlarında artmış veya yanlış pozitif değerler bulunmasına neden olabilir; plazma albumini düşer.

1.5.3. 5-FU'in Etki Mekanizması

5-FU antimetabolit sitotoksikler ilaç grubunda yer almaktadır. Bunlar döneme özgü ilaçlardır. En sık kullanılan antineoplastik ilaçlardandır.

Bu ilaçlar, hücre proliferasyonunun çeşitli basamaklarında görevli metabolitlerin yapısal benzerleridirler. Doğal metabolitlerin bağlanacağı noktaya karşı onunla yarışıp o noktaları kapatır ve gerekli sentezin oluşmasını engellerler. Kemik iliği ve barsak mukozası epiteli üzerine toksik etkilidirler (102).

5-FU radyoresistan S fazında hücrelerin eliminasyonu için başarılıdır. Çoğalan hücreler üzerine sitotoksik etkisi daha fazladır. 5-FU bir ön ilaçtır ve asıl sitotoksik etkisini, DNA sentezi ve hücre çoğalması için gerekli bir enzim, timidilat sentetazı (TS) inhibe eden Florodeoksiuridin-5'-monofosfata (5-FdUMP) dönüşerek gösterir.

Önce, fluorouridilata sonra fluorodezoksiuridilata dönüşerek etkin olur. Bu yolla hücre içi Timidin depleksyonuyla TS'nin faaliyeti inhibe olur. Timin sentezi, DNA ve RNA fonksiyonları bozulur ve sonuçta hücre apoptozis indükte olur. Bu nedenle TS düzeyi değişiklikleri ilacın etkinliğinde önemli rol oynar. Timidilat Sentaz Artırılma Bölgesi (TSER) polimorfizmleri TS düzeyini değiştirmektedir. TSER 3R aleli taşıyan bireylerde ilaca yanıt azalır ve direnç artar. Kanser hastalarda TS'nin aşırı ekspresyonu, direnç oluşumu ve tedavi başarısızlığı için sıklıkla görülen bir nedendir. 5-FU'in metabolik yolları ve etki mekanizması **Şekil 8**'de özetlenmiştir.

5-FU büyük oranda Dihidroprimidin dehidrogenaz (DPD) ile inaktive edilir. DPD enzim eksikliğinde, kanda 5-FU ve aktif metabolitlerinin düzeyi artar. DPD enzimin kodlayan gende 20'nin üzerinde tek nükleotid polimorfizmi ve 40'tan fazla farklı polimorfizm bildirilmiştir. Bunun yanı sıra 5-FU etkinliğinde; Metilen

5-FU'in monoterapide genel yanıt oranı % 20-30'u geçmediği için, 5-FU'in etkinliğinin iyileştirilmesi, bugünün onkoloji çalışmalarında çok önemli bir husustur.

1.5.4. 5-FU'in Yan Etkileri

İlacın içerdiği maddelerden herhangi birine aşırı duyarlılık; kan değerlerinde ciddi değişiklikler, kemik iliğidepresyonu, kanama, malabsorbsiyon, ağır karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları, ağır enfeksiyonlar, herpes zoster, varisella, stomatit, ağız boşluğu ve gastrointestinal ülserasyonlar, psödömembranöz enterit 5-FU ile karşılaşılan kontrendikasyonlardır. 5-FU hamilelikte kesinlikle kontrendikedir (105).

Hematolojik yan etkileri: Lökopeni ve nötropeni ile miyelosupresyon, anemi, immünosupresyondur.

Gastrointestinal kanal: Anoreksi, mukozit, stomatit, farenjit, özofajit, enterit, ülserler (özellikle ağız boşluğu), hemoraji, malabsorbsiyon görülmektedir. Bulantı, kusma ve diyare antiemetiklerle ve antidiyaretik ajanlarla tedavi edilebilir.

Deri: Dermatit, kuru cilt, geçici ekzantem, ürtiker, kaşıntı, fotosensitivite, alopesi (saç kaybı), hiperpigmentasyon, akne, çatlak, telenjektazi (deride veya mukozalarda kırmızı lekeler şeklinde görülen ve kılcal, arteryol ve venüllerin genişlemesinden ibaret olan lezyonlar), kutanöz kanama; nadiren tırnakların kaybı ve tırnak değişiklikleri, avuç içi ve ayak tabanlarında eritem. Genellikle 5-FU tedavisi kesildikten 5- 7 gün sonra azalır.

Kardiyovasküler: Prekardiyal ağrı, iskemi, geçici EKG değişiklikleri, kardiyak enfarktüs.

Sinir sistemi: Nadiren konfüzyon, somnolans (gündüz aşırı uyuklama hali), ataksi (istemli kas hareketlerinde düzensizlik), öfori, fotofobi, nistagmus (göz küresinin düzenli aralıklarla ve istemdışı yinelenen gidip gelme hareketi), retrobulbar nevrit (göz küresi arkasındaki optik sınırların enfeksiyonu), dizartri

(beyinde bir lezyona bağlı konuşma bozukluğu), merkezi sinir sistemi fonksiyonlarında geri dönüşümsüz bozukluklar.

Diğer: Hemolitik anemi, karaciğer hasarı (nadiren nekroz), böbrek bozuklukları, hiperürisemi, spermatogenez ve ovülasyonda bozukluklar, anafilaktik çok derecesine kadar varabilen bronkospazm, öksürük, burun kanaması, çok nadir olarak lakrimal akışta artma ve lakrimal kanalın daralması.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

Diöleilfosfatidiletanolamin (DOPE)	Avanti Polar Lipids, ABD
Trimetilamin (C ₂ H ₅) ₃ N (min %99)	Sigma-Aldrich, Almanya
5-Florourasil (5-FU)	Orva, Türkiye
Absolu Etanol	Riedel-de-Haen, Almanya
Amonyumheptamolibdat kristali	Merck, Almanya
Askorbik asit	Atabay, Türkiye
Kloroform (CHCl ₃)	Riedel-de-Haen, Almanya
Kolesterol	Sigma Chemicals, ABD
Disetil Fosfat (DCP)	Sigma Chemicals, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck, Almanya
Dipalmitoilfosfatidilkolin (DPPC)	Avanti Polar Lipids, ABD
DTPA anhidrit	Sigma-Aldrich, Almanya
Dulbecco's MEM Besiyeri	Biochrom AG, Almanya
Fetal sığır serumu (%10)	Biochrom AG, Almanya
Hidroklorik Asit (HCL) (%36-38)	J.T.Baker, Hollanda
Perklorik Asit (HClO ₄) (%70)	Riedel-de-Haen, Almanya
Metanol	Riedel-de-Haen, Almanya
Sodyum dihidrojenfosfat dihidrat (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	J.T.Baker, Holanda
Polietilenglikol (PEG ₂₀₀₀ -DSPE)	Avanti Polar Lipids, ABD
Fosfolipon 90G (PL 90G)	Natterman Phospholipids GmbH, Almanya
Stearil Amin (SA)	Sigma Chemicals, ABD
TRIS (Tris(hidroksimetil)-aminometan)	Merck, Almanya
Triton- X-100	Sigma Chemicals, ABD

2.2. KULLANILAN ALETLER VE GEREÇLER

Analitik Terazî	Mettler Toledo, İsviçre
Çalkalayıcı Su Banyosu	SBD50 LABNET, ABD
Dijaliz selüloz membran	Sigma-Aldrich, Almanya
Dijital Çalkalayıcı	Schutzart DIN 40050-IP 20, Almanya
Dynamic Light Scattering	Malvern Instruments, İngiltere
Eliza Okuyucu	Molecular Devices, Versa max. tunable microplate reader, ABD
FT-IR Spektrometre	Perkin Elmer, ABD
Hücre kültürü inkübatörü	SAN40 CO ₂ incubator MCO-18AIC- Model, Japonya
Inverted Mikroskop	Leica DFC 320, İsviçre
Isıtıcıli Manyetik Karıştırıcı	Heidolph MR 3001, Almanya
Isıtma Bloğu	Nüve BH 250, Türkiye
ITK Plaklar	İnce Tabaka Kromatografi Plaklar Faster, BHG 2004, Ultraviyole Kabin, Biolab laboratuvar cihazları, İtalya
Laminar Flow	Malvern Instruments, İngiltere
Partikül Boyutu Analiz Sistemi	Inolab pH metre, Türkiye
pH metre	Whatman, ABD
Polikarbonat membrane filtre	Rotavapor Büchi; Karl Kolb, Almanya
Rotavapor	BÜCHI 461, İsviçre
Su banyosu	GFL, Almanya
Su banyosu	Agilent 8453, ABD
UV Spektrometre	Vacuum System B-169 BÜCHI, İsviçre
Vakum sistemi	Shel Lab (SL), İspanya
Vakumlu Etüv	Heidolph Reax Top, Almanya
Vorteks	

2.3. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ YAPISINA GİREN MADDELER ÜZERİNDE YAPILAN KONTROLLER

Lipozomların bileşiminde fosfolipit olarak DPPC ve PL 90G (Phospholipon GmBh), yük verici madde olarak SA, DCP ve stabilite artırıcı olarak Chol kullanılmıştır.

2.3.1. Fosfolipitler

2.3.1.1. Fosfolipitlerin İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) ile Tanınması

Çalışmalarımızda kullanılan fosfolipitlerin (DPPC, PL 90G) İTK ile tanınması için, fosfolipitlerin 20 mg.mL⁻¹'lik çözeltisi, etüvde 110°C'de 60 dakika aktive edilmiş, 0,25 mm kalınlığında Silikajel 60 F₂₅₄ ile kaplanmış 5x10 cm plaklara bir kılcal yardımıyla tatbik edilmiştir. Kurutulan plaklar kloroform: metanol:su (65: 250: 4) çözücü sisteminde sürüklendikten sonra kurutulup, iyot buharı ile doyurulmuş tanka konmuş ve daha sonra oluşan lekeler UV lambası altında 254 nm'de incelenerek R_f değerleri hesaplanmıştır (106,107).

2.3.1.2. Fosfolipitlerin Infrared (IR) Analizi ile Tanınması

DPPC ve PL 90G'nin IR spektrumu çekimi için, potasyum bromür tabletleri basılmış ve bu diskler kullanılarak 4000- 650 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında spektrumları çekilmiştir.

2.3.2. Yük Verici Maddeler

2.3.2.1. SA' in İTK ile Tanınması

SA' in İTK ile tanınması Bölüm 2.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

2.3.2.2. SA' in IR Analizi ile Tanınması

SA' in IR spektrumları Bölüm 2.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde çekilmiştir.

2.3.2.3. DCP' in İTK ile Tanınması

DCP' in İTK ile tanınması Bölüm 2.3.1.1.'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

2.3.2.4. DCP' in IR Analizi ile Tanınması

DCP' in IR spektrumları Bölüm 2.3.1.2.'de anlatıldığı şekilde çekilmiştir.

2.3.3. Stabilite Artırıcı Madde

2.3.3.1. CHOL'ün İTK ile Tanınması

Chol'ün İTK ile tanınması Bölüm 2.3.1.2'de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. Ancak fosfolipitlerden farklı olarak, lekelerin görüntülenmesi için plak üzerine %50 sülfürik asit çözeltisi (50 mL H₂SO₄: 50 mL Metanol) püskürtüldükten sonra etüvde 5- 10 dakika ısıtılarak UV lambası altında 254 nm dalga boyunda incelenmiştir (33).

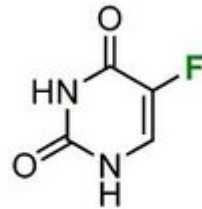
2.3.3.2. CHOL'ün IR Analizi ile Tanınması

CHOL'ün IR spektrumu Bölüm 2.3.1.2' de anlatıldığı şekilde çekilmiştir.

2.3.4. 5-FU Üzerinde Yapılan Kontroller

2.3.4.1. 5-FU'in Yapısı

Molekül ağırlığı 130.077 g•mL⁻¹ ve kapalı formülü C₄H₃FN₂O₂ olan 5-FU'in molekül yapısı Şekil 2.1'de verilmiştir.



Şekil 2.1: 5-FU'in açık formülü (102).

2.3.4.2. 5-FU'in 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğrusunun Hazırlanması

5-FU'in, 10 mM Tris (pH 9) tamponunda 200- 800 nm aralığında UV spektrumları çekilmiş ve maksimum dalga boyu tayin edilmiştir. Daha sonra, tayin edilen maksimum dalga boyunda 1 mg.mL^{-1} stok çözeltilerden hareketle değişik konsantrasyonlarda hazırlanan 5-FU çözeltilerinin, absorbansları okunarak standart doğru çizilmiş, doğru denklemi, korelasyon katsayısı "r" ve determinasyon katsayısı "r²" hesaplanmıştır.

2.3.4.3. 5-FU'in %10 (a/a) Triton- X-100 (a/h) içeren 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğrusunun Hazırlanması

5-FU'in %10 (a/a) Triton- X-100 (a/h) içeren 10 mM Tris (pH 7.4) tamponunda 200-800 nm aralığında UV spektrumları çekilmiş ve maksimum dalga boyu tayin edilmiştir. Daha sonra, tayin edilen maksimum dalga boyunda 1 mg.mL^{-1} stok çözeltilerden hareketle değişik konsantrasyonlarda hazırlanan 5-FU çözeltilerinin absorbansları okunarak standart doğru çizilmiş, doğru denklemi, korelasyon katsayısı "r" ve determinasyon katsayısı "r²" hesaplanmıştır.

2.4. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARI

2.4.1. DTPA-PE Sentezi

DTPA-PE-PE, şelat yapıcı bileşik olarak lipozom membranının yapısına eklenmek üzere sentezlenmiştir. Bunun için, 0,1 mM DOPE yaklaşık 4 mL kloroformda çözülmüş ve üzerine 30 µL trietil amin eklenmiştir. Başka bir flakonda 20 ml Dimetil Sülfoksit (DMSO)'da çözülmüş olan 1mM DTPA anhidrit, DOPE'li karışımın üzerine damla damla eklenmiştir. Karışım, 3 saat oda sıcaklığında azot gazı varlığında inkübe edilmiştir ve inkübasyonun ardından karışım, 4 °C'de su ile dializ edilmiştir. Ardından elde edilen ürün liyofilizatörde dondurularak kurutulmuştur (108).

2.4.2. Etkin Madde İçermeyen Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

DTPA-PE içeren yüksüz (nötral), negatif ve pozitif yüklü lipozom dispersiyonları film metodu (109, 110) kullanılarak hazırlanmıştır.

Bunun için, tüm maddeler fosfolipit, yük verici madde (eğer varsa) ve Chol] yuvarlak altlı balonda 30 ml kloroform ile çözülmüş. Maddeler iyice çözüldükten sonra balon lipidlerin faz geçiş sıcaklığının 10 °C üzerindeki su banyosu içindeki rotavapora yerleştirilmiştir. Kloroform tamamen vakum altında uzaklaştırılarak ince düzgün bir film tabakası elde edilmiştir. Eser miktarda kloroformu uzaklaştırmak için film içeren balonlar 1 gece 150- 200 mBar basınçtaki vakumlu etüvde bekletilmiştir. Daha sonra etüvden çıkarılan balonlar 10 mM Tris (pH:9) tamponu ile sulandırılmış yaklaşık 10 adet cam boncuk ile birlikte sırayla 1 dakika su banyosu, 1 dakika elle çalkalama, 1 dakika vorteksleme yapılarak filmin balon yüzeyinden tamamen uzaklaştırılması sağlanmıştır.

Elde edilen süt kıvamındaki lipozom dispersiyonları partikül boyutunun küçültülmesi ve partiküllerin homojen hale getirilmesi için azot gazı altında sırayla 0,6 µm por açıklığına polikarbonat membran filtreden (1 defa), 0,4 µm polikarbonat membran filtreden (1 defa) ve 2 katlı 0,2 µm polikarbonat membran filtreden (10 defa) basınçla süzme yöntemiyle süzölmüşlerdir.

2.4.3. 5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

DTPA-PE ve 5-FU içeren lipozom dispersiyonları Bölüm 2.4.2' de anlatıldığı şekilde hazırlanmıştır. Farklı olarak lipid film tabakası 5-FU'in 10 mM Tris (pH 9) tamponundaki çözeltisi (20 mg.mL⁻¹) ile sulandırılmıştır. İçte hapsedilmeyen serbest 5-FU'yi uzaklaştırmak için bir gece 3500 MWCO por açıklığına sahip diyaliz membranından Tris (10mM. pH 9) tamponuna karşı diyaliz işlemine tabi tutulmuştur.

2.4.4. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu

2.4.4.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri ve büyüklük dağılımları *Dynamic Light Scattering* metoduna göre 25 °C'de Nano-Zeta Sizer ile ölçülmüştür.

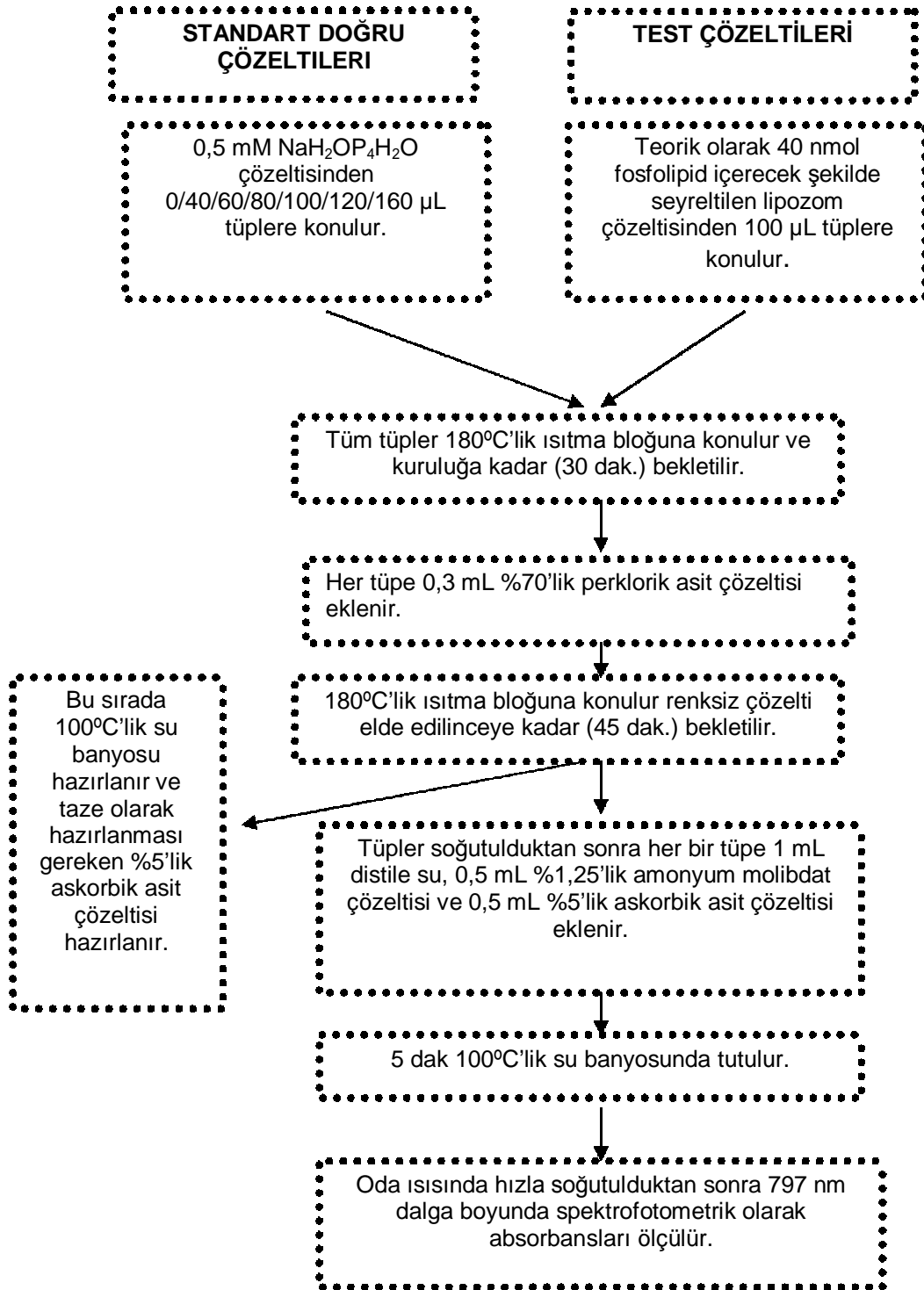
Lazer saçınımı tekniği damlacık yüzeyine çarpan ışığın gösterdiği dağılıma ve absorpsiyon gibi optik özelliklerin kullanıldığı bir tekniktir. Burada ışık yoğunluğu akıma çevrilerek dijitalize edilir, kaydedilir ve bilgisayarda değerlendirilerek sonuçlar partikül boyutu cinsinden elde edilir.

2.4.4.2. İçte Tutulan 5-FU Miktarı

Diyaliz ile serbest 5-FU uzaklaştırıldıktan sonra, veziküller %10 (a/h) Triton- X-100 içeren 10 mM Tris tamponu (pH 9) ile parçalanmış ve elde edilen berrak çözeltinin absorbansı 299 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmüş, Bölüm 2.3.4.3 anlatıldığı şekilde hazırlanan standart doğru kullanarak, içte tutulan 5-FU miktarı hesaplanmıştır.

2.4.4.3. Lipozomal Fosfolipid Miktarının Tayin Edilmesi

DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının fosfor içeriği Rauser yöntemine göre tespit edilmiştir (110). Bu yöntem **Şekil 2.2.**'de verilmiştir. Fosfolipid miktarının hesaplanmasında kullanılan standart doğru için **Şekil 2.2.**'de gösterildiği gibi standart doğru çözeltileri her test öncesi taze olarak hazırlanmış, bu çözeltilerin absorbansları $\lambda_{max}=797$ nm'de okunarak, standart doğru çizilmiş ve doğru denklemi hesaplanmıştır. Lipozom örneklerin 797 nm'de okunan absorbansları ve bu doğru denklemi kullanılarak lipozomların fosfolipid miktarları tayin edilmiştir.



Şekil 2.2. Lipozomların fosfolipid miktarının Rauser yöntemine göre tayin edilmesi (110).

2.5. 5-FU'İN LİPOZOM DİSPERSİYONLARINDAN *IN VITRO* SALIMININ İNCELENMESİ

5-FU'in *in vitro* salımı 37,5 °C' de 10 mM Tris (pH 9.0) tamponunda diyaliz yöntemi ile incelenmiştir. Bunun için 2 ml DTPA-PE ve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozom dispersiyonları diyaliz torbalarına konulmuş ve bu diyaliz torbaları 20 mL 10 mM Tris (pH 9.0) tamponu içeren beherlere yerleştirilmiştir. Salım ortamından 30 dakikalık zaman dilimlerinde 2 mL örnek alınmış, alınan bu hacim yerine 2 mL 10 mM Tris (pH 9.0) tamponu eklenmiştir. Alınan örneklerin absorbansı 299 nm'de okunmuştur. Bölüm 2.3.4.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan standart doğruyu kullanarak lipozomlardan salınan 5-FU miktarı hesaplanmıştır. Boş lipozom dispersiyonlarına da aynı işlemler uygulanmış ve alınan örnekler kör çözelti olarak kullanılmıştır. Lipozom dispersiyonundan salınan 5-FU'in 0., 1. Derece ve Higuchi salım kinetikleri incelenmiştir.

2.6. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARI

Hücre kültür çalışmaları için insan meme kanseri hücre dizini (MCF-7) hücreleri kullanılmış ve bu hücrelerin büyütülmesi ve çoğaltılmasında %10 Fetal sığır serumu, 1 mM sodyum piruvat ve 1 mM "*nonessential aminoasit*" ve L- glutamin içeren Dulbecco'nun modifiye Eagle ortamı (DMEM) hücre ortamı kullanılmıştır.

2.6.1. 5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Kanser Hücreleri Üzerindeki Antitümöral Etkisinin Sitotoksisite Deneyleri ile Belirlenmesi

MCF- 7 hücreleri Fetal sığır serumu (%10) (FBS) içeren DMEM besiyerinde çoğaltılmıştır. Hücreler tripsinizasyon sonrası kaplardan alınarak sayılmış ve 1 mL besiyeri içinde 5.000 hücre/kuyu olacak şekilde 96 kuyuluk plaklara ekilmiştir. Hücrelerin kuyuların yüzeyine tutunması için bir gece beklenmiş ve ardından hücrelerin üzerindeki besiyeri toplanıp, yerine 100 µL besiyeri eklenmiştir. Besiyeri içeren kuyulara 100 µL DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş veya 5-FU yüklü lipozom dispersiyonları seri dilüsyon

yöntemi ile 0.25- 32 μM konsantrasyonda olacak şekilde ilave edilmiş ve plaklar 24 ve 48 saat inkübasyona (37°C ve $5\% \text{CO}_2$) bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda kuyulardaki çözelti uzaklaştırılmış, kuyular 200 μL besiyeri ile yıkanmıştır. Başka bir yerde 15 ml MTT (*Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*)'in NaCl içeren fosfat tamponu içindeki çözeltisi ($5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ konsantrasyonda) hazırlandıktan sonra, her kuyuya 20 μL MTT çözeltisi eklenmiş, iyice karıştırılmış ve MTT'nin metabolize olabilmesi için 3 saat inkübasyona (37°C ve $5\% \text{CO}_2$) bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası, kuyulardaki çözelti uzaklaştırılmış ve oluşan formazon (MTT metabolik ürünü), 200 μL DMSO'da süspande edilmiş ve çalkalıyıcıda 5 dakika süre ile iyice çalkalanmıştır. Optik dansite 560 nm'de okunmuş ve % canlı hücre sayısı hesaplanmıştır.

2.7. FİZİKSEL STABİLİTE ÇALIŞMALARI

Karakterizasyon çalışmaları, in vitro salım çalışmaları ve hücre kültür çalışmalarının sonuçları değerlendirilerek en uygun formülasyonlar 61,7: 33.3: 5 μmol + 1% mol/lipid + $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ bileşiminde olan DPPC: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU formülasyonu, pozitif yüklü, 61,7: 3.3: 30: 5 + 1% mol/lipid+ $20 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ bileşiminde olan DPPC: SA: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU ve negatif yüklü DPPC: DCP: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU lipozom dispersiyonları üzerinde stabilite çalışmaları yapılmıştır.

Bu amaçla, Bölüm 2.4.3.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan lipozom dispersiyonları, yaklaşık 1 mL hacimde olacak şekilde flakonlara konulmuş üzerlerinden azot gazı geçirilerek ağızları sıkıca kapatılmış ve iki farklı sıcaklıkta [buzdolabı sıcaklığında ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) ve oda sıcaklığında ($+ 25^\circ\text{C}$)] bekletilmiştir. Önceden belirlenen zaman aralıklarında (3., 5., 8., 15., 30., 60., 90. günlerde) örnekler alınarak açığa çıkan etkin maddeyi uzaklaştırmak için 3500 MWCO por açıklığına sahip dializ membranı kullanılarak 10 mM Tris (pH 9.0) tamponuna karşı yaklaşık 2 saat diyaliz edilmiş ve daha sonra lipozomlar üzerinde aşağıda anlatılan çalışmalar yapılmıştır.

2.7.1. Saklama Sırasında İncelenen Lipozom Dispersiyonlarının Ortalama Partikül Büyüklüklerinin İzlenmesi

DTPA-PE içeren yüksüz, negatif ve pozitif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom formülasyonlarının ortalama partikül büyüklükleri Bölüm 2.4.4.1'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür.

2.7.2. Saklama Sırasında İncelenen Lipozom Dispersiyonlarının İçte Tutulan 5-FU Miktarlarının İzlenmesi

DTPA-PE içeren yüksüz, negatif ve pozitif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom formülasyonlarının içte tutulan etkin madde miktarları Bölüm 2.4.4.2'de anlatıldığı şekilde ölçülmüştür.

2.8. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Çalışmamızdan elde edilen sonuçlar arasında istatistiksel açıdan fark olup olmadığını değerlendirmek için istatistiksel analizler yapılmıştır. Deneylemlerden elde edilen veri sayıları 30'dan az olduğu için, değerlendirmelerde parametrik olmayan test yöntemleri uygulanmıştır. Karşılaştırılan grup sayısına bağlı olarak, iki grubun karşılaştırılması için Mann Whitney U testi, üç veya daha fazla grubun karşılaştırılması için ise Kruskal Wallis Varyans Analizi kullanılmıştır. Stabilité çalışmalarında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda SPSS programı ve Kruskal Wallis testi kullanılmıştır.

3. BULGULAR

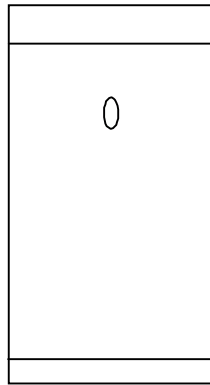
Bu bölümde lipozom dispersiyonlarının hazırlanmasında kullanılan maddelerin kimyasal ve fizikokimyasal özelliklerin incelenmesi, lipozomların karakterizasyonu, *in vitro* salım çalışmaları ve fiziksel stabilite çalışmaları ve 5-FU içeren lipozom dispersiyonlarının tümör hücreleri üzerindeki etkisinin incelenmesi için yapılan sitotoksosite deneylerine ait bulgular verilmiştir.

3.1. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ YAPISINA GİREN MADDELER ÜZERİNDE YAPILAN KONTROLLERE AİT BULGULAR

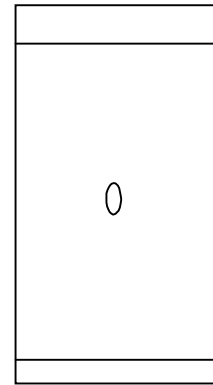
3.1.1. Fosfolipitler

3.1.1.1. Fosfolipitlerin İTK ile Tanınması

Bölüm 2.3.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan İTK analizi sonrası, plaklar UV lambası ile 254 nm'de incelenmiş ve sürüklenen maddelerin mor renkli lekeler oluşturduğu gözlenmiştir. DPPC'ye ait kromatogramdan Rf değeri 0. 71, PL 90G'ye ait kromatogramdan ise Rf değeri 0. 52 olarak bulunmuştur. DPPC ve PL 90G'ye ait İTK kromatogramları **Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.**'de verilmiştir.



Şekil 3.1. DPPC'nin İTK kromatogramı



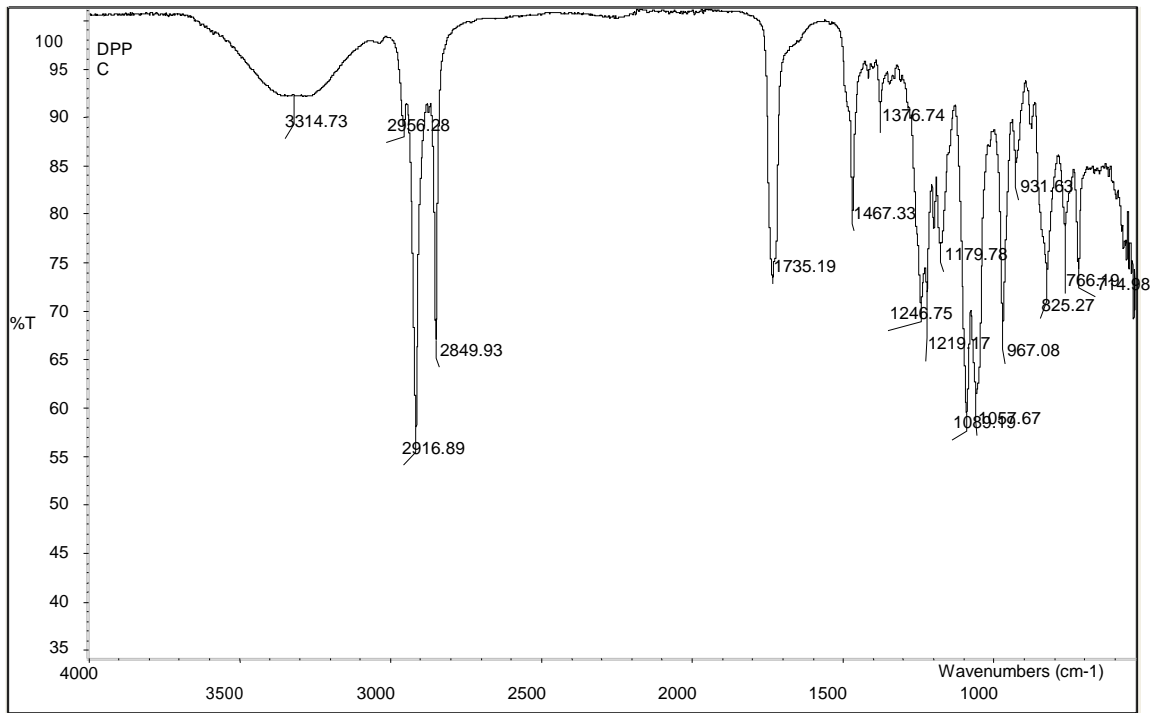
Şekil 3.2. PL 90G'nin İTK kromatogramı

3.1.1.2. Fosfolipitlerin IR Analizi ile Tanınması

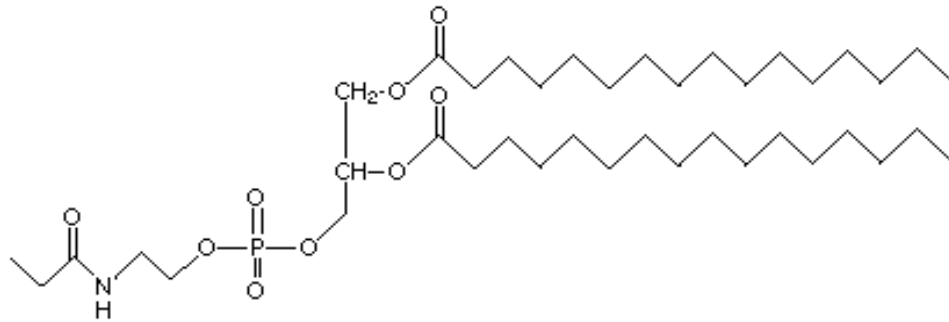
Bölüm 2.3.1.2'de anlatıldığı şekilde, IR spektrumları çekilen DPPC ve PL 90G'nin spektrumları sırasıyla **Şekil 3.3.** ve **Şekil 3.5.**'te verilmiştir. IR spektrumlarının kıyaslanabilmesi amacıyla DPPC ve PL 90G'ye ait kimyasal yapılar ise sırasıyla **Şekil 3.4.** ve **Şekil 3.6.**'da verilmiştir.

DPPC'ye ait IR spektrumunda; esterlere ait karbonil gerilme titreşimi 1690- 1760 cm^{-1} arasında, amide (N-H) ait orta şiddetteki gerilme titreşimi 3300- 3500 cm^{-1} arasında, amide ait (C-N) gerilme titreşimi 1180- 1360 cm^{-1} arasında ve alkanlara ait kuvvetli alifatik (C-H) gerilme titreşimleri 2800- 2970 cm^{-1} arasında görülmüştür (111). Spektrumda görüldüğü gibi 2956.28 cm^{-1} , 2916.89 cm^{-1} , 2849.93 cm^{-1} 'de, gözlenen absorpsiyon bantları C-H gerilme titreşimlerinin en tipik göstergesidir. Sekonder aminler için N-H gerilme bandı 3314.73 cm^{-1} olarak gözlenmiştir. Ester, lakton ve karboksilli asitlerde C=O gerilme titreşimi 1100 cm^{-1} -1300 cm^{-1} arasında çıkan C-O gerilme titreşimi ile birliktedir. Bu yüzden 1089.19 cm^{-1} , 1179.78 cm^{-1} , 1219.17 cm^{-1} 'de C=O gerilme titreşimi ile C-O gerilme titreşimi gözlenmektedir. 1246.75 cm^{-1} ve 1376.74 cm^{-1} 'de C-N gerilme bandı belirgin bir şekilde gözlenmektedir. 967.08 cm^{-1} , 967.08 cm^{-1} , 1057.67 cm^{-1} 'de P-OR gerilme titreşimi görülmektedir. 1219.17 cm^{-1} , 1246.75 cm^{-1} 'de P=O gerilme bandı görülmektedir.

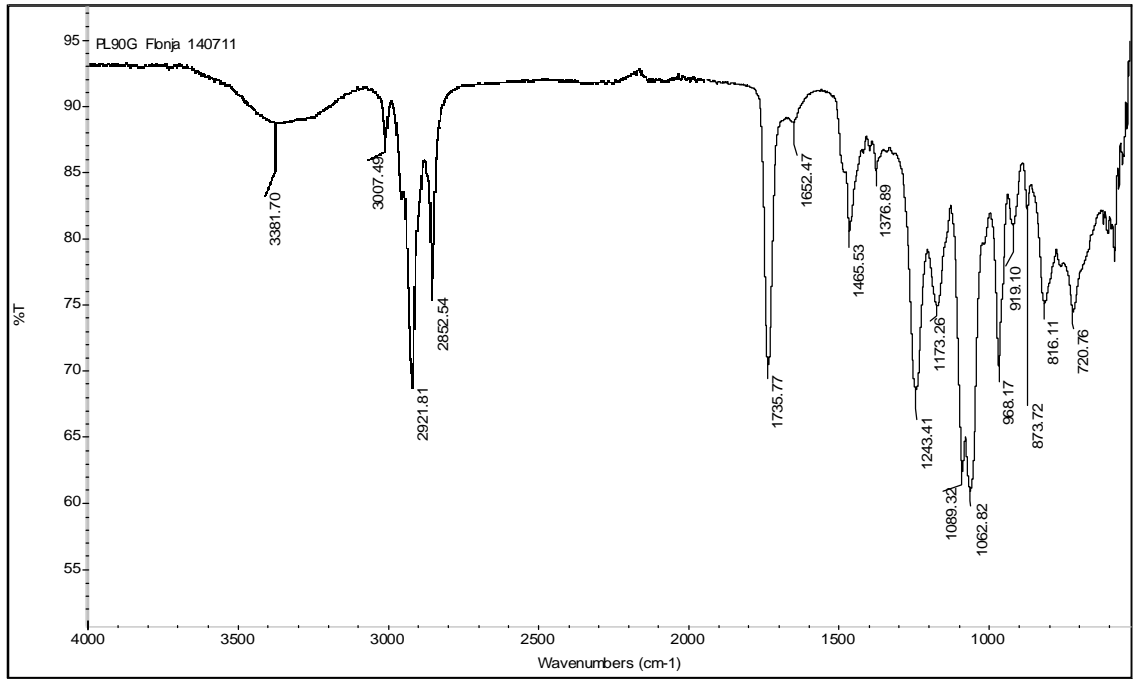
PL 90G'ye ait IR spektrumunda 3381,7 cm^{-1} 'de görülen yayvan torbamsı titreşimler 3300- 3500 cm^{-1} 'de çıkması gereken amin grubu (N-H) ve 3600- 3650 cm^{-1} arasında çıkması gereken hidroksi (O-H) grubu aynı yerde çıkmıştır. 3010- 2850 cm^{-1} arasında aromatik halkalara ait orta şiddette (C-H) gerilme titreşimi ile alkanlara ait titreşimler gözlenmiştir. 1690- 1760 cm^{-1} arasında kuvvetli karboksilik asidin karbonil gerilme titreşimi (C=O) gözlenmiştir. Alkanlara ait kuvvetli (C-H) gerilme piki ise 1340-1470 cm^{-1} de gözlenmiştir (111). Elde edilen spektrumlar, daha önceki bulgularla uyumlu bulunmuştur (112-115).



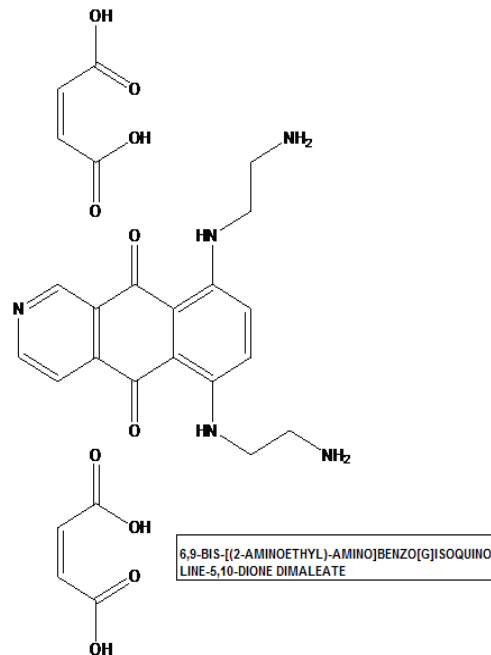
Şekil 3.3. DPPC'nin IR spektrumu



Şekil 3.4. DPPC'nin kimyasal yapısı (40).



Şekil 3.5 PL 90G'nin IR spektrumu

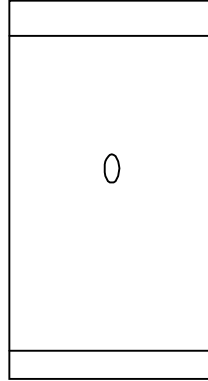


Şekil 3.6. PL 90G'nin kimyasal yapısı (40).

3.1.2. Yük Verici Maddeler

3.1.2.1. SA'in İTK ile Tanınması

Bölüm 2.3.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan İTK analizi sonrası plaklar, UV lambası ile 254 nm'de incelenmiş ve SA' e ait kromatogramdan R_f değeri 0,62 olarak bulunmuştur (**Şekil 3.7.**).

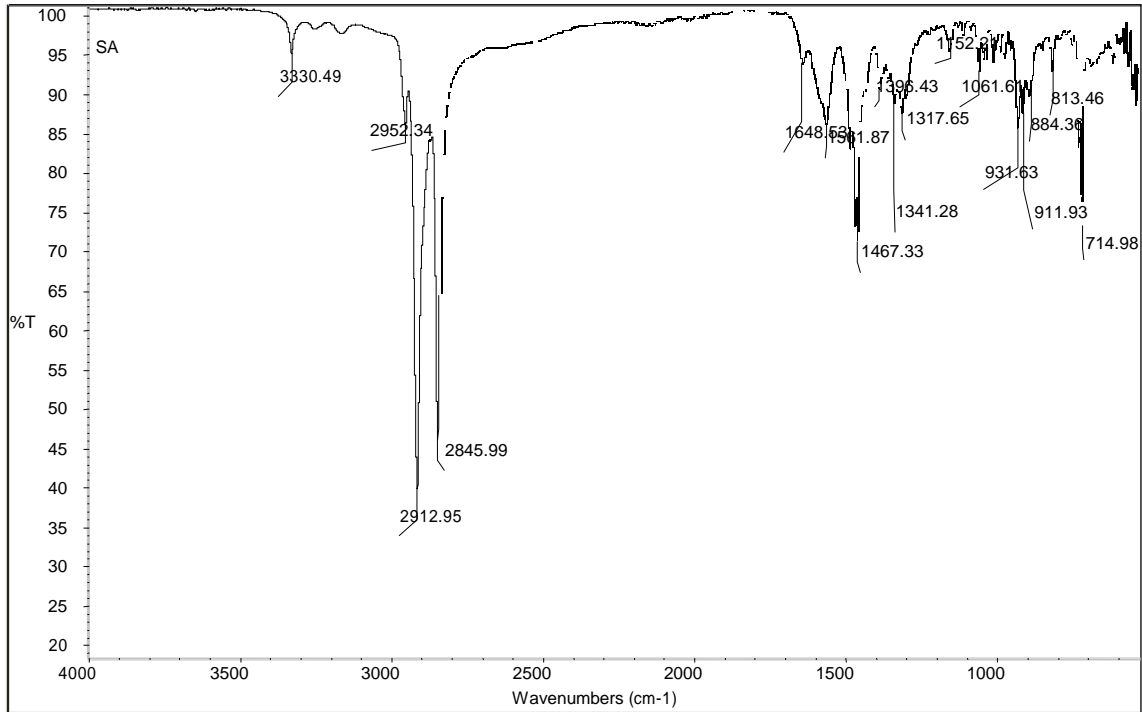


Şekil 3.7. SA' in İTK kromatogramı

3.1.2.2. SA'in IR Analizi ile Tanınması

Bölüm 2.3.1.2'de anlatıldığı şekilde, IR spektrumları çekilen. SA' in spektrumu ve kimyasal yapısı sırasıyla **Şekil 3.8.** ve **Şekil 3.9'**da verilmiştir. SA'e ait IR spektrumunda 931.63 cm^{-1} , 911.93 cm^{-1} , 714.98 cm^{-1} , 813.46 cm^{-1} , 884.36 cm^{-1} gözlenen N–H *stretching*'in (sadece primer ve sekonder aminler için) göstergesidir. Aminler bazdır ve onlara karşılık gelen konjuge asit '*onyum*' tuzları, bunların en sık karşılaşılan şeklidir. Bu türevlerin $2250-3000 \text{ cm}^{-1}$ arasındaki geniş N-H gerilme bandı çok belirgindir. Spektrumda 2952.34 cm^{-1} , 2912.95 cm^{-1} , 2845.99 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı N-H gerilme bandıdır. 1° -amonyum tuzların absorpsiyonu da en yüksek frekans ucunda olmakta ve C-H absorpsiyonuyla örtüşmektedir. IR'de 3330.49 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bandı primer N-H gerilme bandıdır. Spektrumda 1648.53

cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bandı NH_2 makaslama bandıdır. C–N gerilme (alifatik aminler): 1061.61 cm^{-1} , 1152.21 cm^{-1} de gözlenebilmektedir.



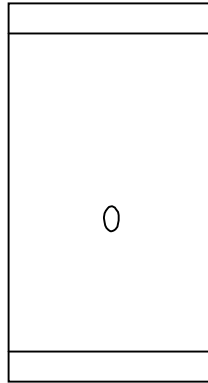
Şekil 3.8. SA'in IR spektrumu



Şekil 3.9. SA' in kimyasal yapısı (40).

3.1.2.3. DCP' in İTK ile Tanınması

Bölüm 2.3.1.1'de anlatıldığı şekilde yapılan İTK analizi sonrası plaklar, UV lambası ile 254 nm 'de incelenmiş ve DCP' a ait kromatogramdan R_f değeri 0.43 olarak bulunmuştur (**Şekil 3.10**).

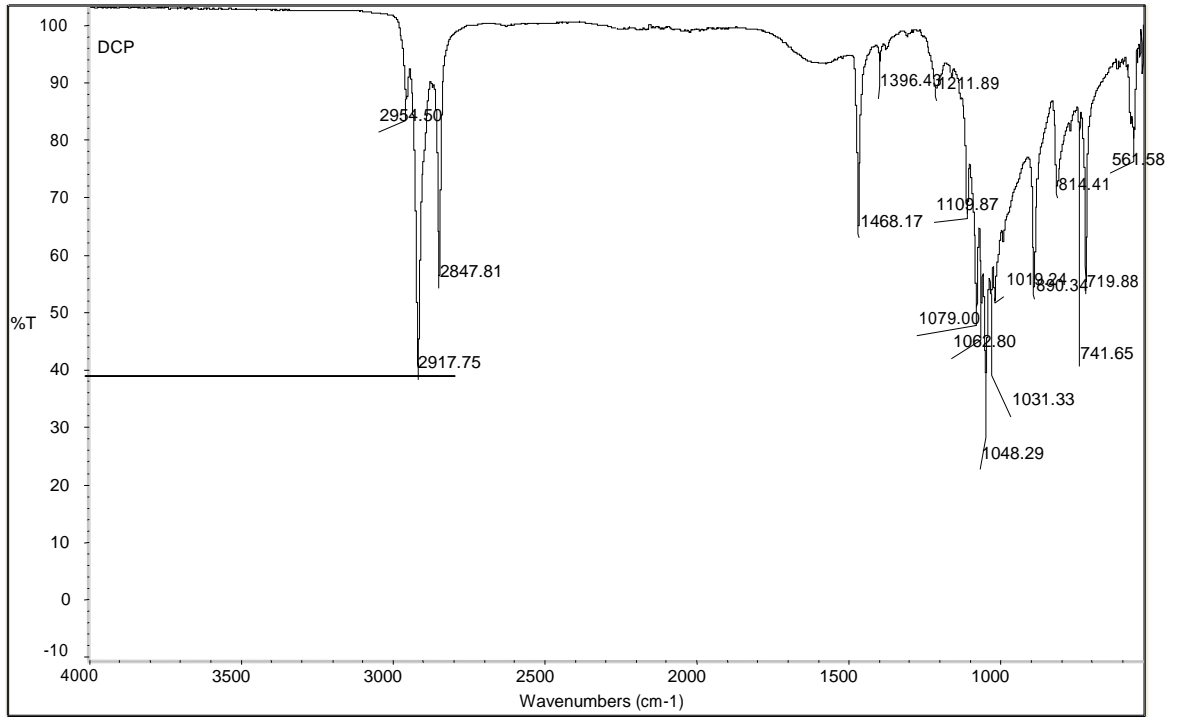


Şekil 3.10. DCP'in İTK kromatogramı

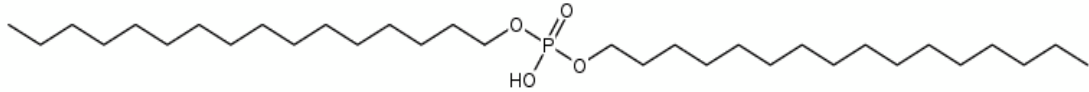
3.1.2.4. DCP'in IR Analizi ile Tanınması

Bölüm 2.3.1.2'de anlatıldığı şekilde, IR spektrumları çekilen DCP'in IR spektrumu ve kimyasal yapısı sırasıyla **Şekil 3.11** ve **Şekil 3.12**'de verilmiştir.

DCP'ye ait IR spektrumunda 1400 cm^{-1} civarında bir çift C-H eğilme bandı vardır. Alifatik bileşiklerde C-H gerilme titreşimleri 3000 cm^{-1} in biraz altında gözlenir. DCP'ye ait IR spektrumunda görüldüğü gibi 2954.50 cm^{-1} , 2917.75 cm^{-1} , 2847.81 cm^{-1} de, gözlenen absorpsiyon bantları C-H gerilme titreşimlerin en tipik göstergesidir. 1468.17 cm^{-1} , 1396.43 cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bantları C-H eğilme bandının göstergesidir. 1019.24 cm^{-1} , 1031.33 cm^{-1} , 1048.29 cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bantları P-O-R gerilme titreşimlerinin en tipik göstergesidir. (not: P-OR esterler $900-1050$ (gerilme bandı) 1109.87 cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bantları P=O gerilme titreşimlerinin göstergesidir. 719.88 cm^{-1} , 741.65 cm^{-1} de gözlenen absorpsiyon bantları " CH_2 rocking", metil göstergesidir ve sadece uzun zincirli alkanlarda görülmektedir.



Şekil 3.11. DCP' in IR spektrumu

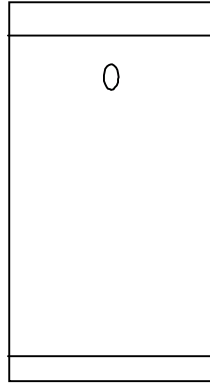


Şekil 3.12. DCP' in kimyasal yapısı (40).

3.1.3. STABİLİTE ARTIRICI MADDE

3.1.3.1. Chol'un İTK ile Tanınması

Bölüm 2.3.3.1'de anlatıldığı şekilde yapılan İTK analizi sonrası plaklar, UV lambası ile 254 nm'de incelenmiş ve Chol' e ait kromatogramdan 0,90 R_f değeri olarak bulunmuştur (**Şekil 3.13.**).



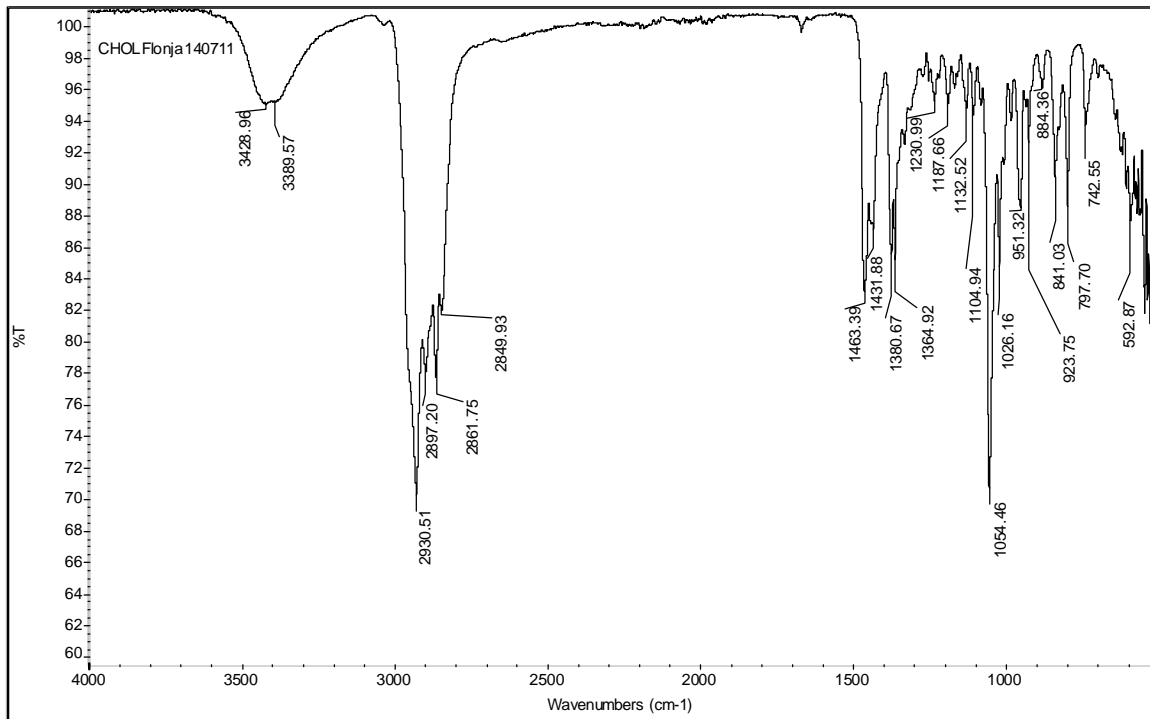
Şekil 3.13. Chol' un İTK kromatogramı

3.1.3.2. Chol'un IR Analizi ile Tanınması

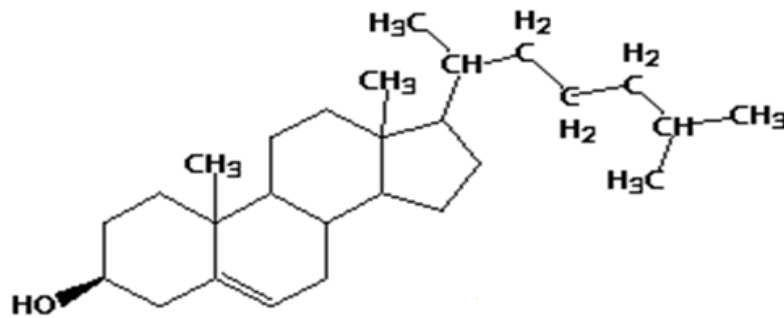
Bölüm 2.3.1.2'de anlatıldığı şekilde, IR spektrumları çekilen Chol' ün spektrumu ve kimyasal yapısı sırasıyla **Şekil 3.14** ve **Şekil 3.15**'te verilmiştir.

Chol'e ait olan IR spektrumda $3200-3600 \text{ cm}^{-1}$ olan gerilme titreşimleri hidroksi grubuna (O-H), $3010-3100 \text{ cm}^{-1}$ olan geniş torbamsı orta kuvvetteki gerilme titreşimleri siklik ve düz alkanlardan gelen (C-H) grubuna, ayrıca $1610-1680 \text{ cm}^{-1}$ olan titreşimler de yapıdaki alkene (C=C) aittir (115). Chole ait IR spektrumunda 3428.96 cm^{-1} ve 3389.57 cm^{-1} 'de hidrojen bağı O-H gerilmesi geniş bir bant şeklinde gözlenir. Bu bileşiklerin spektrumunda ayrıca 1300 cm^{-1} civarında C-O gerilme, $1000 \text{ cm}^{-1}-1200 \text{ cm}^{-1}$ arasında ise O-H eğilme bantları vardır.

Chol' e ait IR spektrumunda gördüğümüz gibi 2930.51 cm^{-1} , 2861.75 cm^{-1} , 2897.20 cm^{-1} , 2849.93 cm^{-1} ' de gözlenen absorpsiyon bantları C-H gerilme titreşimlerinin en tipik göstergesidir. 1431.88 cm^{-1} ve 1463.39 cm^{-1} 'de gözlenen absorpsiyon bantları aromatik halkada C-C gerilme titreşimlerinin göstergesidir. Spektrumda $950-1250 \text{ cm}^{-1}$ arasında gözlenen absorpsiyon bantları "*in-plane C-H eğilmenin*" göstergesidir. Bunlar görüntülemeye yararlı değildir ama süstitüe benzen aromatik halkanın bulunduğunu göstermektedirler.



Şekil 3.14. Chol' un IR spektrumu

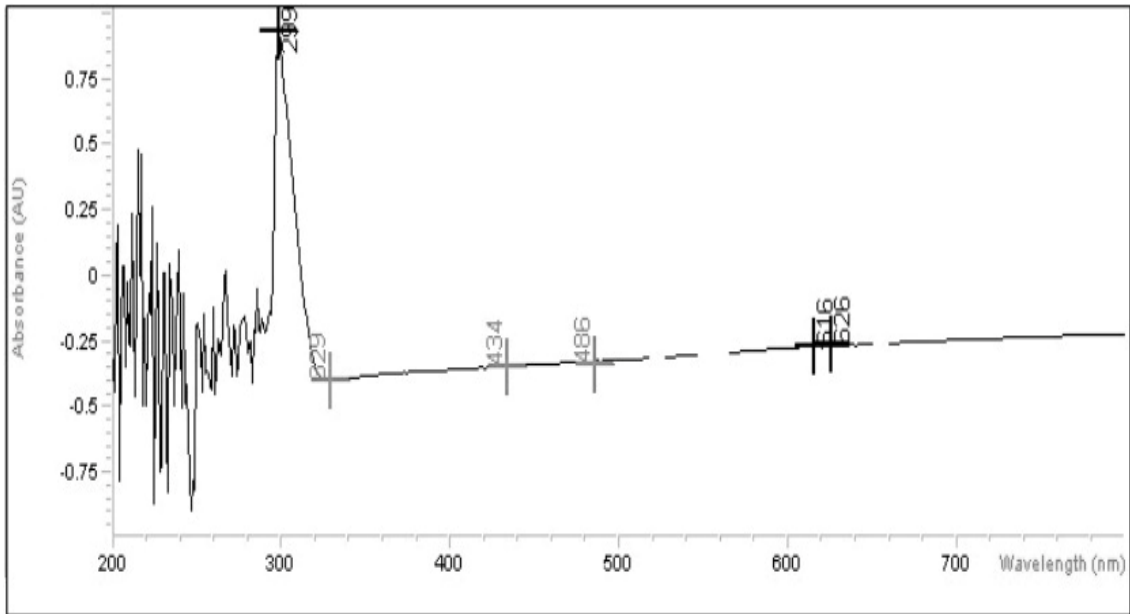


Şekil 3.15 Chol' un kimyasal yapısı (4).

3.1.4. 5-FU Üzerinde Yapılan Kontroller

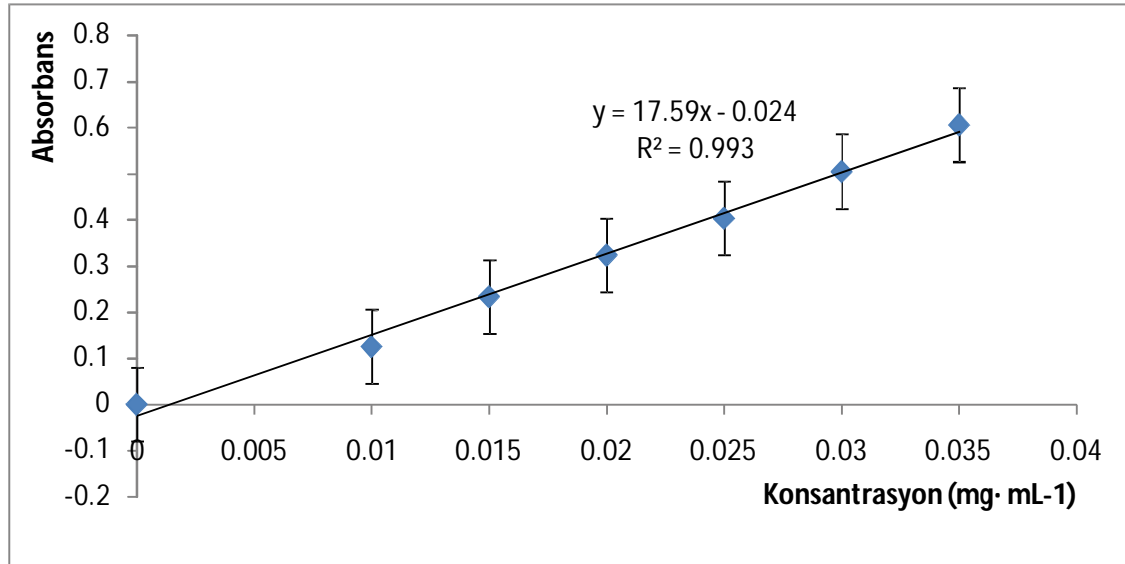
3.1.4.1. 5-FU'in 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğru

Bölüm 2.3.5.2' de anlatıldığı şekilde 5-FU'in 10 mM Tris (pH 9.0) tamponu'nda 6 seri şeklinde UV spektrumları alınmış ve $\lambda_{\max}=299$ nm olarak bulunmuştur ve buna ait spektrum **Şekil 3.16'** da verilmiştir.



Şekil 3.16. 5-FU' in 10mM Tris (pH 9) tamponunda UV spektrumu

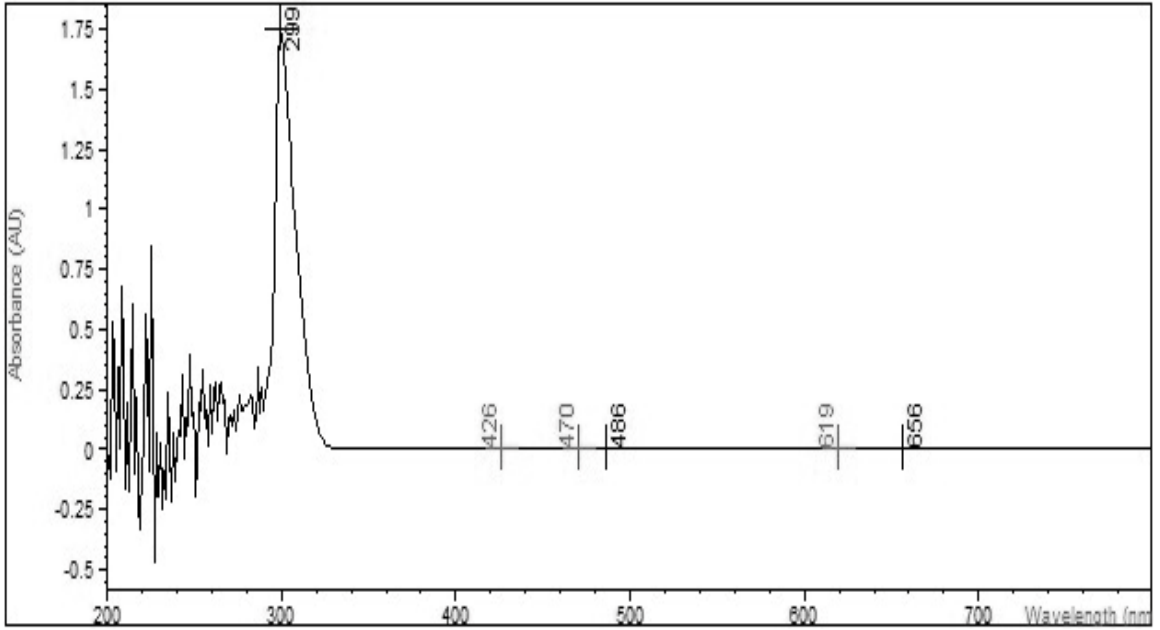
Bölüm 2.3.5.2' de anlatılan işlemler sonucunda 5-FU için $\lambda_{\max}=299$ nm'de çizilen standart doğru **Şekil 3.17'**de verilmiştir.



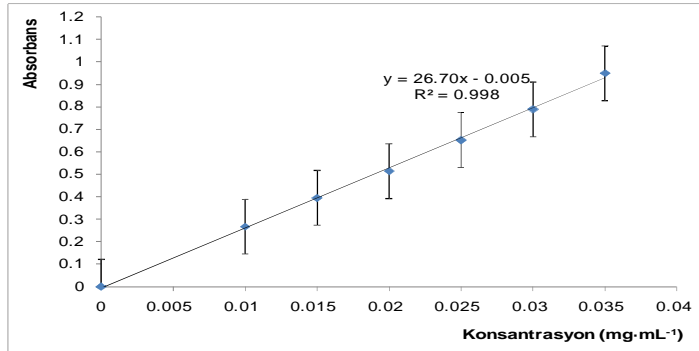
Şekil 3.17. 5-FU'in 10mM Tris (pH 9) tamponunda hazırlanan standart doğrusu.

3.1.4.2. 5-FU'in %10 Triton-X-100 (a/h) İçeren 10 mM Tris (pH 9) Tamponunda UV Spektrumu ve Standart Doğru

Bölüm 2.3.5.3' de anlatıldığı şekilde 5-FU'in %10 Triton-X-100 (a/h) içeren 10 mM Tris (pH 9.0) tamponu'nda 6 seri şeklinde UV spektrumları alınmış ve $\lambda_{\max} = 299$ nm olarak bulunmuştur ve buna ait spektrum **Şekil 3.18'** de ve 5-FU için $\lambda_{\max} = 299$ nm'de çizilen standart doğru **Şekil 3.19'** da verilmiştir.



Şekil 3.18. 5-FU'in %10 (a/h) Triton-X-100 içeren 10mM Tris (pH 9) tamponunda UV spektrumu



Şekil 3.19. 5-FU'in %10 Triton- X-100 içeren 10mM Tris (pH 9) tamponunda hazırlanan standart doğrusu.

3.2. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

3.2.1. Lipozom Dispersiyonlarının Hazırlanması

Bölüm 2.4.2'de anlatıldığı şekilde hazırlanan DTPA-PE içeren yüksüz, negatif ve pozitif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom formülasyonları, lipid bileşimleri ve kodları **Tablo 3.1** ve **Tablo 3.2**'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Etkin Madde İçermeyen Lipozom Formülasyonlarının Bileşimi ve Kodları.

Lipozom Formülasyonu	Bileşimi	Kod
DPPC:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 33.3: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	DPPC-Boş
PL 90G:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 33.3: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	PL 90G-Boş
DPPC:SA:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 3.3: 30: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	DPPC:SA-Boş
PL 90G:SA:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 3.3: 30: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	PL 90G:SA- Boş
DPPC:DCP:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 3.3: 30: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	DPPC:DCP- Boş
PL 90G:DCP:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE	61,7: 3.3: 30: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹	PL 90G:DCP- Boş

Tablo 3.2. 5-FU İçeren Lipozom Formülasyonları, Bileşimi ve Kodları

Lipozom Formülasyonu	Bileşimi	Kod
DPPC:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 33.3: 5 µmol + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	DPPC-5-FU
PL 90G:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 33.3: 5 + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	PL 90G-5-FU
DPPC:SA:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 3.3: 30: 5 + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	DPPC:SA-5-FU
PL 90G:SA:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 3.3: 30: 5 + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	PL 90G:SA-5-FU
DPPC:DCP:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 3.3: 30: 5 + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	DPPC:DCP-5-FU
PL 90G:DCP:CHOL:PEG ₂₀₀₀ -DSPE+DTPA-PE+5-FU	61,7: 3.3: 30: 5 + %1 mol·lipid ⁻¹ + 20 mg·mL ⁻¹	PL 90G:DCP-5-FU

3.2.2. Lipozom Dispersiyonlarının Karakterizasyonu

3.2.2.1. Ortalama Partikül Büyüklüğü ve Dağılımı

Bölüm 2.4.4.1'de anlatıldığı şekilde ortalama partikül büyüklüğü ve dağılımı ölçülmüş ve sonuçlar **Tablo 3.3'** te verilmiştir.

DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif yüklü ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü DPPC ve PL 90G lipozomlarının partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında boş lipozom dispersiyonlarının etkin madde içeren lipozom dispersiyonlarından biraz daha büyük olduğu bulunmuştur ama hem DPPC hem de PL 90G lipozomları için etkin madde içeren ve içermeyen lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Tablo 3.3. DTPA-PEiçeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri ve dağılımı (n= 6).

Formülasyon	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)	Polidispersite İndeksi (PI)
DPPC-Boş	330	0,252
PL 90G-Boş	171	0,503
DPPC:SA-Boş	162	0,292
PL 90G:SA-Boş	118	0,435
DPPC:DCP-Boş	166	0,327
PL 90G:DCP-Boş	125	0,466
DPPC-5-FU	217	0,129
PL 90G-5-FU	247	0,283
DPPC:SA-5-FU	119	0,170
PL 90G:SA-5-FU	110	0,285
DPPC:DCP-5-FU	157	0,322
PL 90G:DCP-5-FU	121	0,449

3.2.2.2. İçte Tutulan 5-FU Miktarı

Bölüm 2.4.4.2’de anlatıldığı şekilde içte tutulan 5-FU miktarı hesaplanmış ve sonuçlar **Tablo 3.4’** te verilmiştir.

DTPA-PE ve 5-FU içeren yüksüz DPPC ve PL 90G lipozomları arasında içte tutulan etkin madde miktarları arasında önemli fark görünmezken, pozitif ve negatif yüklü DPPC lipozomlarının içte tutulan etkin madde miktarı ve PL 90G lipozomlarının içte tutulan etkin madde miktarından daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).

Tablo 3.4. DTPA-PE ve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozom dispersiyonlarının içte tutulan 5-FU miktarları (n= 6).

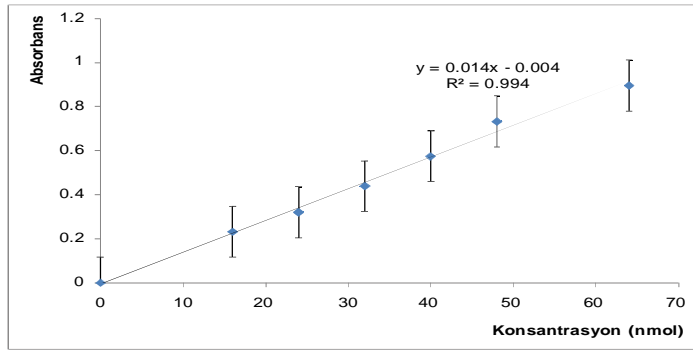
Formülasyon	İçte Tutulan 5-FU Miktarı (%)
DPPC-5-FU	10,1 ± 0,01
PL 90G-5-FU	10,5 ± 0,01
DPPC:SA-5-FU	7,1 ± 0,02
PL 90G:SA-5-FU	5,8 ± 0,02
DPPC:DCP-5-FU	7,5 ± 0,01
PL 90G:DCP-5-FU	5,8 ± 0,01

3.2.2.3. Lipozomal Fosfolipid Miktarının Tayin Edilmesi

Fosfolipid miktar tayini Bölüm 2.4.4.3'te belirtilen şekilde yapılmıştır. İlk olarak taze hazırlanmış çözeltiler ile standart doğru çizilmiş ve doğru denklemi hesaplanmıştır (**Şekil 3.20**). Daha sonra bu denklem kullanılarak DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom formülasyonlarının fosfolipid miktarları hesaplanmıştır. Sonuçlar **Tablo 3.5.**'te verilmiştir.

DTPA-PE içeren boş ve 5-FU yüklü DPPC ve PL 90G lipozom dispersiyonları arasında lipozomal fosfolipid miktarları açısından karşılaştırıldığında etkin madde içeren dispersiyonların fosfolipid miktarlarının daha düşük olduğu görülmüştür ancak fark istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G lipozom formülasyonları karşılaştırıldığında PL 90G lipozomlarının lipozomal fosfolipid miktarları DPPC lipozomlarının fosfolipid miktarından daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$).



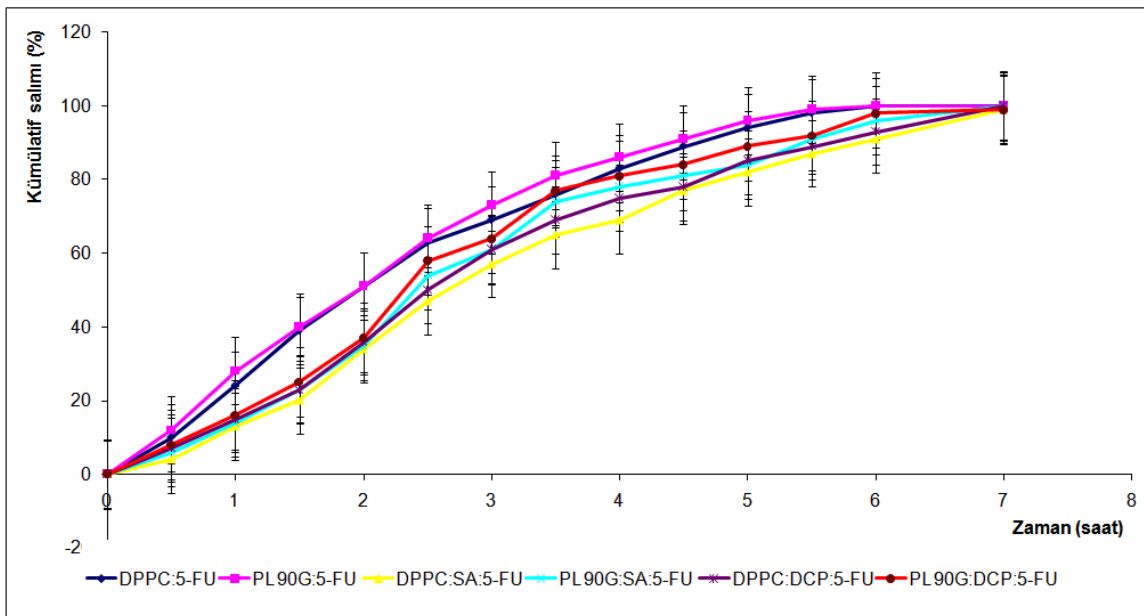
Şekil 3.20. Lipozomal fosfolipid miktarı için hazırlanan standart doğru

Tablo 3.5. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü lipozom dispersiyonlarının lipozomal fosfolipid miktarları (n=6).

Formülasyon	Lipozomal Fosfolipid Miktarı (%)
DPPC-Boş	73,1 ± 0,24
PL 90G-Boş	87,7 ± 0,29
DPPC:SA-Boş	98,0 ± 0,29
PL 90G:SA-Boş	98,5 ± 0,33
DPPC:DCP-Boş	99,3 ± 0,36
PL 90G:DCP-Boş	99,7 ± 0,25
DPPC-5-FU	68,0 ± 0,17
PL 90G-5-FU	98,5 ± 0,20
DPPC:SA-5-FU	85,0 ± 0,35
PL 90G:SA-5-FU	96,1 ± 0,38
DPPC:DCP-5-FU	76,8 ± 0,10
PL 90G:DCP-5-FU	94,1 ± 0,35

3.3. 5-FU'İN LİPOZOM DİSPERSİYONLARINDAN *IN VİTRO* SALIMININ İNCELENMESİ

In vitro salım çalışmaları Bölüm 2.5.' te anlatıldığı şekilde yapılmıştır. DPPC ve PL 90G içeren lipozom dispersiyonları karşılaştırıldığımızda 5-FU'in PL 90G içeren lipozom dispersiyonlarından DPPC lipozom dispersiyonlarına göre daha hızlı bir şekilde salınmıştır, ama fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. ($p>0.05$). Salım sonuçları **Şekil 3.21**' de verilmiştir (n=6).



Şekil 3.21. DTPA-PEve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozomlarından 5-FU'in *in vitro* salımı (n=6).

DTPA-PEve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü lipozom dispersiyonlarının salım kinetikleri incelendiğinde salımın 1. Derece kinetiğe uygun olduğu görülmüştür (**Tablo 3.6.**). Sonuçlar literatürle uyumludur (112, 113).

Tablo 3.6. 5-FU'in lipozom formülasyonlarından salım kinetikleri.

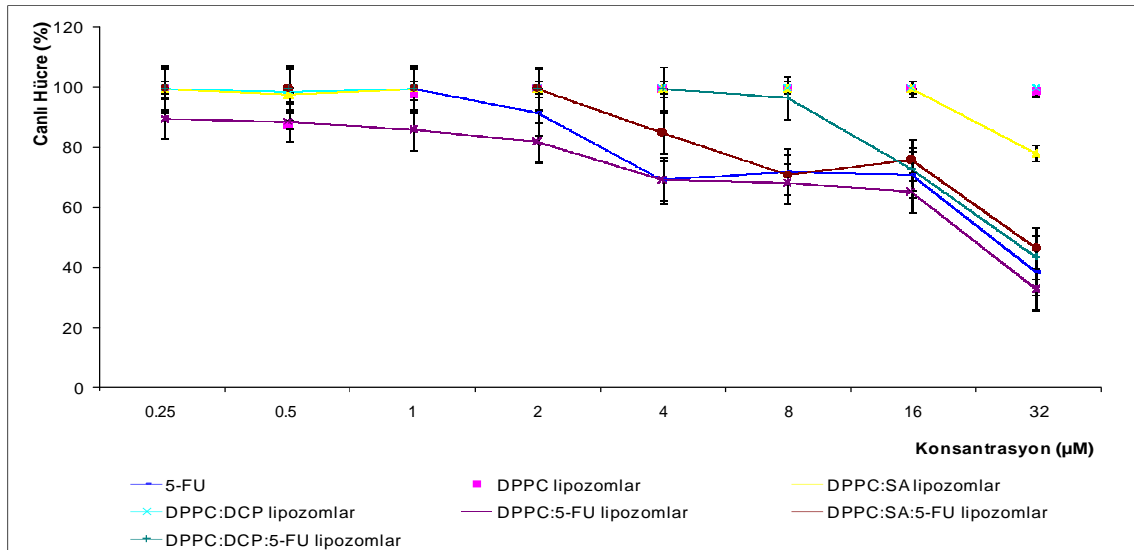
KINETİK		DPPC-5-FU	PL 90G-5-FU	DPPC:SA- 5-FU	PL 90G:SA- 5-FU	DPPC:DCP- 5-FU	PL 90G:DCP- 5-FU
Higuchi	Eğim	46,1784	46,2001	45,0326	45,0326	45,3589	46,9181
	Kesişim	-12,1943	-10,4445	-21,0181	-19,8999	-19,0566	-18,2719
	r	0,9832	0,9833	0,9680	0,9689	0,9719	0,9697
	r ²	0,9667	0,9669	0,9372	0,9387	0,9447	0,9404
0. Derece	Eğim	15,2012	15,0828	15,4272	15,7858	15,4391	15,7633
	Kesişim	14,0532	16,2278	2,5249	5,0609	5,0573	7,3491
	r	0,9575	0,9498	0,9837	0,9718	0,9788	0,9639
	r ²	0,9170	0,9021	0,9677	0,9445	0,9581	0,9292
1. Derece	Eğim	-0,2085	-0,2375	-0,1382	-0,1891	-0,1636	-0,1939
	Kesişim	2,0890	2,1145	2,0509	2,1055	2,0781	2,0963
	r	0,9893	0,9865	0,9873	0,9748	0,9852	0,9822
	r ²	0,9787	0,9733	0,9748	0,9503	0,9706	0,9649

3.4. HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

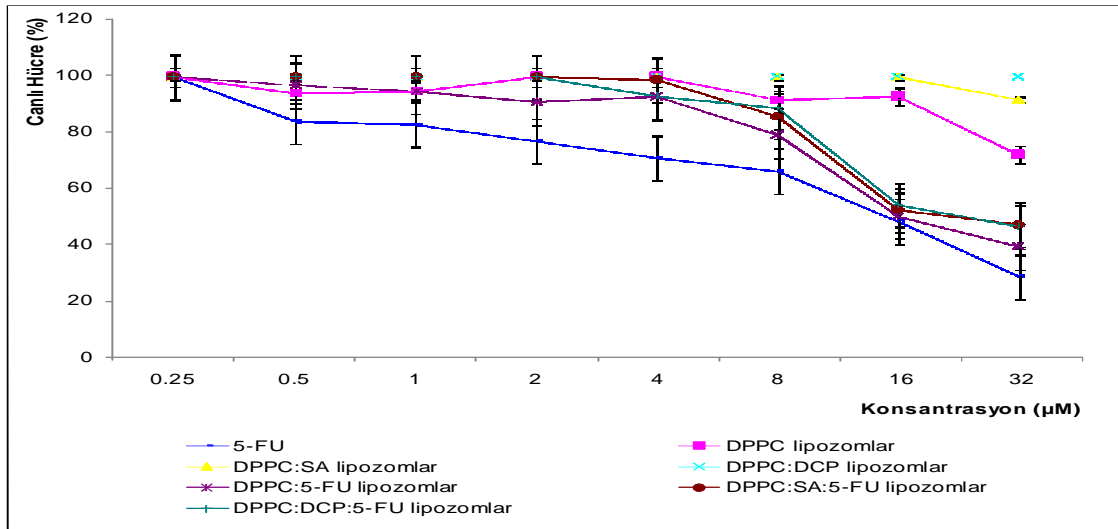
Bu bölümde Blüm 2.6'da anlatıldığı şekilde yapılan hücre kültür çalışmalarına ait bulgular verilmiştir.

3.4.1 5-FU İçeren Lipozom Dispersiyonlarının Tümör Hücreleri Üzerindeki Antitümöral Etkisinin Sitotoksosite Deneyleri İle Belirlenmesi

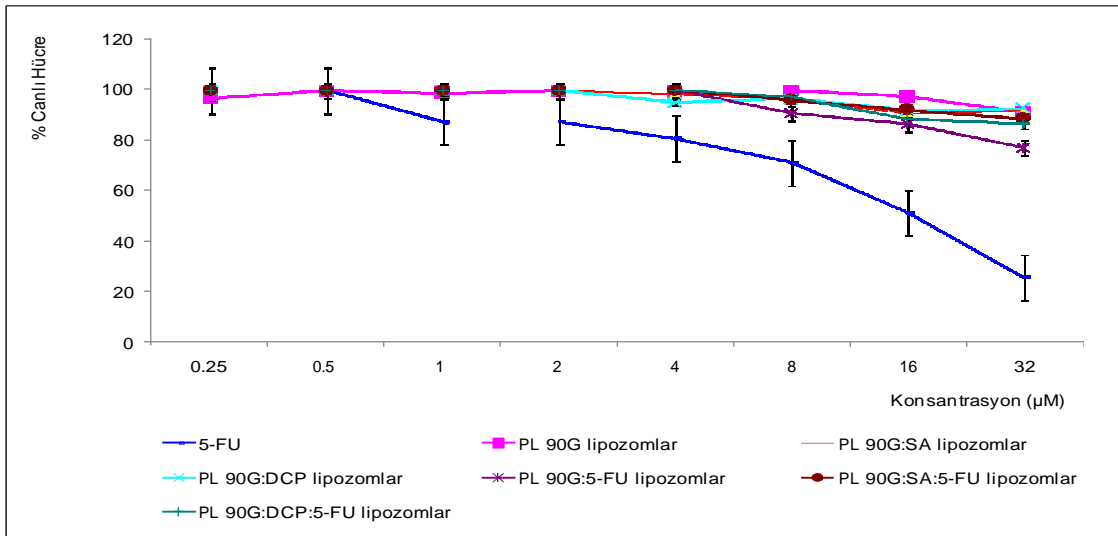
DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom formülasyonu ile yapılan 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen sitotoksosite çalışmalarına ait sonuçlar **Şekil 3.22** ve **3.23'** te ve PL 90G lipozom formülasyonu ile 24 ve 48 saat inkübasyon sonrası elde edilen sitotoksosite sonuçları ise **Şekil 3.24** ve **3.25'** te gösterilmiştir



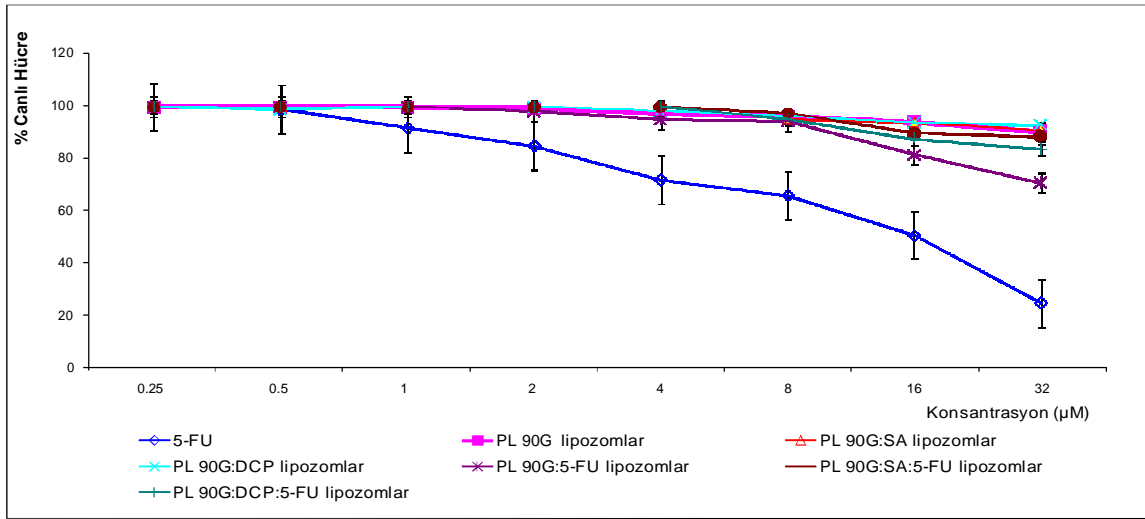
Şekil 3.22. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom dispersiyonları ile 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.



Şekil 3.23. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom dispersiyonları ile 48 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.



Şekil 3.24. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren PL 90G lipozom dispersiyonları ile 24 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.



Şekil 3.25. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren PL 90G lipozom dispersiyonları ile 48 saat inkübasyon sonrası MCF-7 tümör hücrelerin % hücre canlılığı.

Kontrol grubu olarak MCF-7 hücreleri 24 ve 48 saat inkübasyon süresince sadece hücre besiyeri ile inkübe edilmiş ve buradan elde edilen hücre sayısı %100 kabul edilerek lipozom dispersiyonları ile elde edilen kuyulardaki hücre sayısı bu değer ile karşılaştırılarak % hücre canlılığı hesaplanmıştır.

DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozom formülasyonları karşılaştırıldığında, boş lipozomların MCF-7 hücreleri üzerinde etkisi görülmezken, 5-FU yüklü lipozomların serbest 5-FU ile aynı etkiyi gösterdiği görülmüştür.

Lipozom dispersiyonlarında, etkin maddenin veziküllerden salımı söz konusu olduğu için serbest etkin maddeye oranla hücreler üzerindeki sitotoksik etkisi daha geç görülmüştür. Serbest etkin maddenin (5-FU'in) konsantrasyonu $20 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. DPPC içeren lipozom formülasyonlarda 5-FU'in enkapsülasyon verimi dikkate alındığında (%7-10'a kadar) 5-FU'in konsantrasyonu serbest 5-FU'in konsantrasyonu ile karşılaştırıldığında çok daha düşük bir düzeydedir.

Serbest 5-FU'in konsantrasyonu lipozomların içinde hapsettiğimiz 5-FU konsantrasyonundan ~10 kat daha yüksek olduğu için, aynı sitotoksik etki daha düşük dozla elde edilmiştir. Bu durum yan etkilerin azaltılması bakımından büyük bir öneme sahiptir. DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU yüklü PL 90G lipozom dispersiyonları karşılaştırıldığında ise boş ve etkin madde içeren lipozomların MCF-7 hücreleri üzerinde benzer etki gösterdiği görülmüştür.

Yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G lipozom formülasyonlarıyla yapılan hücre kültür çalışmalarında, 24. ve 48. saat sonra, canlı kalan MCF-7 kanser hücrelerinin %'si, **Tablo 3.7.**' de özetlenmiştir.

Boş ve etkin madde içeren formülasyonlar arasında % hücre canlılığı açısından önemi bir fark gözlenmemiştir. Tüm lipozom formülasyonlarının kontrol grubu ve birbirlerine göre istatistiksel karşılaştırması **Tablo 3.8., 3.9. ve 3.10.**' da gösterilmiştir.

Tablo 3.7. Yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G lipozom formülasyonlarıyla yapılan hücre kültür çalışmalarında, 24 ve 48 saat sonra, % hücre canlılığı.

Hücre canlılığı %																
Kons (μ M)	5 FU		Medium		DPPC:CHOL		DPPC:SA		DPPC:DCP		DPPC:5-FU		DPPC:SA:5-FU		DPPC:DCP:5-FU	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0.25	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	100	84	100	100	88	94	98	100	99	100	89	97	100	100	100	100
1	100	83	100	100	98	95	100	100	100	100	86	95	100	100	100	100
2	92	77	100	100	100	100	100	100	100	100	82	91	100	100	100	100
4	69	71	100	100	100	100	100	100	100	100	69	93	85	99	100	93
8	72	66	100	100	100	92	100	100	100	100	68	79	71	86	97	89
16	71	48	100	100	100	93	100	100	100	100	65	50	76	52	73	54
32	38	28	100	100	99	72	78	92	100	100	32	39	46	47	43	46
Kons (μ M)	5 FU		Medium		PL 90G:CHOL		PL 90G:SA		PL 90G:DCP		PL 90G:5-FU		PL 90G:SA:5-FU		PL 90G:DCP:5-FU	
	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat	24 saat	48 saat
0.25	100	100	100	100	97	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.5	100	99	100	100	100	100	100	100	100	99	100	100	100	100	100	100
1	87	92	100	100	99	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
2	88	85	100	100	100	99	100	100	100	100	100	98	100	100	100	100
4	81	72	100	100	100	98	98	100	95	98	100	95	100	100	100	100
8	71	65	100	100	100	97	96	95	96	96	91	94	96	98	97	95
16	51	50	100	100	97	94	91	94	93	93	87	82	92	90	88	88
32	24	24	100	100	91	91	92	90	92	92	77	70	88	88	86	83

Tablo 3.8. Lipozom dispersiyonlarının kontrol grubuna göre sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Formülasyonlar	24 saat için	48 saat için
Serbest 5-FU ve kontrol grubu	p<0,05	p<0,05
DPPC-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
PL 90G-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
DPPC:SA-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
PL 90G:SA-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
DPPC:DCP-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
PL 90G:DCP-Boş ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
DPPC:5-FU ve kontrol grubu	p<0,05	p<0,05
PL 90G:5-FU ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05
DPPC:SA:5-FU ve kontrol grubu	p<0,05	p<0,05
PL 90G:SA:5-FU ve kontrol grubu	p<0,05	p<0,05
DPPC:DCP:5-FU ve kontrol grubu	p>0,05	p<0,05
PL 90G:DCP:5-FU ve kontrol grubu	p>0,05	p>0,05

Tablo 3.9. Farklı lipit bileşimine veya yüke sahip lipozom dispersiyonlarının sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirilmesi.

Formülasyonlar	24 saat için	48 saat için
DPPC:5-FU ve PL 90G:5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:SA:5-FU ve PL 90G:SA:5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:DCP:5-FU ve PL 90G:DCP:5-FU	p>0,05	p<0,05
DPPC:5-FU ve DPPC:SA:5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU	p>0,05	p>0,05
PL 90 G:5-FU ve PL 90G:SA:5-FU	p>0,05	p>0,05
PL 90G:5-FU ve PL 90G:DCP:5-FU	p>0,05	p>0,05
PL 90G:SA:5-FU ve PL 90G:DCP:5-FU	p>0,05	p>0,05

Tablo 3.10. Farklı lipit bileşimine veya yüke sahip lipozom dispersiyonlarının serbest 5-FU'e göre sitotoksosite sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi.

Formülasyonlar	24 saat için	48 saat için
DPPC:5-FU ve serbest 5-FU	p>0,05	p>0,05
PL 90G:5-FU ve serbest 5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:SA:5-FU ve serbest 5-FU	p>0,05	p>0,05
PL 90G:SA:5-FU ve serbest 5-FU	p<0,05	p<0,05
DPPC:DCP:5-FU ve serbest 5-FU	p<0,05	p<0,05
PL 90G:DCP:5-FU ve serbest 5-FU	p<0,05	p<0,05

3.5. FİZİKSEL STABİLİTE ÇALIŞMALARINA AİT BULGULAR

Fiziksel stabilite çalışmaları Bölüm 2. 7.' de anlatıldığı şekilde yapılmıştır. 3 ay süre ile belirlenen zaman aralıklarında buzdolabı sıcaklığı ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) ve oda sıcaklığında ($+ 25^{\circ}\text{C}$) bekletilen boş ve 5-FU yüklü DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC lipozomlarının partikül boyutu ve içte tutulan 5-FU miktarları izlenmiştir (**Tablo 3.11.** ve **3. 12.**).

Hem buzdolabı sıcaklığı ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$) hem de oda sıcaklığında ($+ 25^{\circ}\text{C}$) bekletilen formülasyonlarda zamanın fonksiyonu olarak partikül büyüklüğünün arttığı gözlenmiştir.

Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ veya $+ 25^{\circ}\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu değişimi bütün DPPC:Chol, DPPC:SA, DPPC:DCP, DPPC:5-FU, DPPC:SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU lipozom dispersiyonları için istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$), (**Tablo 3.13.**).

İki farklı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $+ 25^{\circ}\text{C}$) aynı örnek alma günlerinde DPPC:CHOL, DPPC: 5-FU, DPPC: SA: 5-FU ve DPPC:DCP: 5-FU lipozom dispersiyonlarda ölçülen partikül boyutu değişimi istatistiksel açıdan önemlidir ($p<0.05$). Ancak, DPPC: SA ve DPPC: DCP lipozom dispersiyonlarında, iki farklı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ve $+ 25^{\circ}\text{C}$) aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutundaki değişim, istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$), (**Tablo 3.14.**).

Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ veya $+ 25^{\circ}\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde ölçülen enkapsülasyon verimindeki değişim DPPC:5-FU, DPPC:SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU lipozom formülasyonları için istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$). İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde DPPC:5-FU, DPPC:SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU lipozom dispersiyonlarında ölçülen enkapsülasyon verimindeki değişim de istatistiksel açıdan anlamlı değildir ($p>0.05$), (**Tablo 3.15.**)

Tablo 3.11. Farklı sıcaklıklarda bekletilen DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü boş ve 5-FU içeren DPPC lipozomlarının partikül büyüklüğü değerleri.

Zaman (Gün)	Ortalama Partikül Büyüklüğü (nm)											
	DPPC- Boş		DPPC: SA- Boş		DPPC: DCP- Boş		DPPC: 5-FU		DPPC: SA: 5-FU		DPPC: DCP: 5-FU	
	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C
1	313 (0,30*)	313 (0,30*)	174 (0,24*)	174 (0,24*)	176 (0,29*)	176 (0,29*)	213 (0,21*)	213 (0,21*)	172 (0,14)	172 (0,14*)	171 (0,22*)	171 (0,22*)
3	282 (0,30*)	313 (0,36*)	174 (0,20*)	175 (0,15*)	177 (0,12*)	179 (0,14*)	208 (0,26*)	213 (0,27*)	172 (0,14*)	173 (0,22*)	170 (0,29*)	172 (0,32*)
5	282 (0,30*)	314 (0,36*)	175 (0,12*)	175 (0,12*)	177 (0,15*)	179 (0,14*)	209 (0,27*)	214 (0,27*)	172 (0,14*)	175 (0,20*)	170 (0,11*)	174 (0,15*)
8	283 (0,26*)	314 (0,36*)	175 (0,14*)	178 (0,14*)	174 (0,12*)	190 (0,17*)	209 (0,26*)	216 (0,26*)	172 (0,15*)	185 (0,18*)	172 (0,13*)	176 (0,16*)
15	283 (0,24*)	317 (0,34*)	177 (0,17*)	178 (0,14*)	194 (0,22*)	194 (0,18*)	210 (0,26*)	216 (0,26*)	174 (0,16*)	185 (0,17*)	172 (0,12*)	180 (0,16*)
30	283 (0,25*)	317 (0,33*)	178 (0,15*)	178 (0,14*)	197 (0,22*)	222 (0,29*)	210 (0,26*)	217 (0,26*)	174 (0,16*)	185 (0,17*)	174 (0,14*)	182 (0,15*)
60	299 (0,30*)	321 (0,31*)	181 (0,17*)	184 (0,17*)	208 (0,25*)	236 (0,27*)	214 (0,26*)	240 (0,27*)	181 (0,17*)	189 (0,19*)	171 (0,16*)	186 (0,17*)
90	298 (0,30*)	320 (0,30*)	180 (0,17*)	183 (0,17*)	209 (0,25*)	237 (0,27*)	215 (0,26*)	241 (0,27*)	182 (0,17*)	190 (0,19*)	172 (0,16*)	188 (0,17*)

* PI: Polidispersite indeksi

Tablo 3.12. Farklı sıcaklıklarda bekletilen DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü 5-FU içeren DPPC lipozomlarının içinde tutulan % etkin madde miktarları.

Zaman (Gün)	DPPC:5-FU		DPPC:SA:5-FU		DPPC:DCP:5-FU	
	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C	5 ± 3°C	+25°C
1	11,2 ± 0,01	11.2 ± 0,01	7,0 ± 0,01	6,7 ± 0,01	7,4 ± 0,01	7,4 ± 0,01
3	10,2 ± 0,01	9.8 ± 0,01	7,0 ± 0,01	6,7 ± 0,01	7,4 ± 0,01	7,4 ± 0,01
5	10,0 ± 0,01	9.8 ± 0,01	7,1 ± 0,01	7,0 ± 0,01	7,5 ± 0,01	7,3 ± 0,01
8	10,0 ± 0,01	9.7 ± 0,01	7,1 ± 0,01	6,7 ± 0,01	7,4 ± 0,01	7,1 ± 0,01
15	9,9 ± 0,01	8.8 ± 0,01	6,7 ± 0,01	6,4 ± 0,01	7,3 ± 0,01	7,0 ± 0,01
30	9,7 ± 0,01	8.5 ± 0,01	6,5 ± 0,01	6,3 ± 0,01	7,2 ± 0,01	7,0 ± 0,01
60	9,0 ± 0,01	7.8 ± 0,01	5,6 ± 0,01	5,0 ± 0,01	6,8 ± 0,01	6,0 ± 0,01
90	8,7 ± 0,01	7.5 ± 0,01	5,5 ± 0,01	4,9 ± 0,01	6,7 ± 0,01	5,9 ± 0,01

Tablo 3.13. Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^\circ\text{C}$ veya $+25^\circ\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarında ölçülen partikül boyutlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Lipozomlar	Karşılaştırılan parametre	Sonuç
DPPC: CHOL ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: CHOL ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$

Tablo 3.14. İki farklı sıcaklıkta ($5 \pm 3^\circ\text{C}$ ve $+25^\circ\text{C}$) aynı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarında ölçülen partikül boyutlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Lipozomlar	Karşılaştırılan parametre	Sonuç
DPPC: CHOL ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: CHOL ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p < 0,05$
DPPC: SA ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: SA ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: DCP ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p < 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: SA: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p < 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: DCP: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p < 0,05$

Tablo 3.15. Aynı sıcaklıkta ($5 \pm 3^\circ\text{C}$ veya $+25^\circ\text{C}$) farklı örnek alma günlerinde ve iki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde lipozom dispersiyonlarının % içinde tutulan etkin madde miktarlarının istatistiksel karşılaştırılması.

Lipozomlar	Karşılaştırılan parametre	Sonuç
DPPC: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: SA: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: SA: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	Aynı sıcaklıkta farklı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$
DPPC: DCP: 5-FU ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) DPPC: DCP: 5-FU ($+25^\circ\text{C}$)	İki farklı sıcaklıkta aynı örnek alma günlerinde ölçülen partikül boyutu	$p > 0,05$

4. TARTIŞMA

4.1. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ FORMÜLASYON ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

A. Etkin Madde Seçimi

Yaklaşık 40 yıldır over, servikal kanser, mesane ve prostat kanserlerinin tedavisinde kullanılan 5-FU (ticari isimleri: Adrucil, Carac, Efudix, Efudex ve Fluoroplex) bir pirimidin analogudur ve çeşitli şekillerde etkisini gösterir, ama esas olarak timidilat sentetazı geri dönüşümsüz olarak inhibe ederek etki eder. Timidilat sentetaz enzimine geri dönüşümsüz olarak bağlanır ve DNA sentezini bozar. Aynı zamanda ribozom sentezini bozarak RNA oluşumunu engeller (114).

Antimetabolitler adı verilen ilaç ailesine aittir. Genellikle lökovorin ile kullanılmaktadır. 5-FU, farklı kanser formlarının palyatif tedavisinde tek başına veya kolorektal ve meme kanserlerinin tedavisinde kombine olarak, ayrıca pankreas bezi, karaciğerin malign tümörlerinde, karaciğer metastazında ve anal kanserde en sık tercih edilen bileşiktir.

Birçok anti-kanser ilaçlar gibi, 5-FU'in sistemik yan etkileri geniştir. Gastrointestinal bozukluklar, kemik iliği depresyonu, nörotoksik yan etkiler miyelosupresyon, mukozit, dermatit, ishal ve kardiyak toksisite en sık görülen yan etkiler arasındadır.

Özellikle yaygın karaciğer metastazı olan hastalarda ilacın içerdiği maddelerden herhangi birine aşırı duyarlılık; kan değerlerinde ciddi değişiklikler, kemik iliği depresyonu, kanama; malabsorbsiyon, ağır karaciğer ve böbrek fonksiyon bozuklukları; ağır enfeksiyonlar, herpes zoster, varisella, stomatit, ağız boşluğu ve gastrointestinal ülserasyonlar, psödömembranöz enterit dikkat edilmelidir.

İlacın metabolizması ve 5-FU deaktivasyonu için çok önemli olan dihidropirimidin dehidrogenaz (DPD) enzimi aktivitesi, hastaların yaklaşık %3-8'inde genetik bir varyasyon nedeniyle azalır. Bu varyasyona sahip hastalarda şiddetli toksik reaksiyonlar gözlenir. Bu reaksiyonlar, düşük dozda dahi ilk 5-FU uygulaması sonrasında ölümcül olabilir (115).

Yukarıda sayılan nedenlerden dolayı hemen hemen tüm kemoterapötik ilaçlarda olduğu gibi 5-FU'de de başarılı bir tedavi için yan etkilerin azaltılabilmesi büyük önem taşımaktadır. Daha önceki kısımlarda da açıklandığı gibi ilaç taşıyıcı sistemlerle ilaçlar pasif ve/veya aktif olarak istenilen doku/organa hedeflendirilebilmekte bu sayede hastaya verilen doz artırılmadan hedef doku/orgada daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşabilmektedir. Bu sayede yan etkiler veya diğer sağlam doku/organa verilen hasarda minümuma indirilmiş olmaktadır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında ciddi yan etkileri olan ama halen klinikte çok yaygın şekilde kullanılan bir ilaç olan 5-FU seçilmiş ve ilaç taşıyıcı sistemlere hapsedilerek terapötik etkinliği incelenmiştir.

B. Taşıyıcı seçimi

İlaç taşıyıcı sistemlerden biri olan lipozomlar, tek veya içice birçok tabakadan oluşmuş aralarında sulu faz içeren yaklaşık 0.02-3.5 µm çapında küresel veziküllerdir. Hücre membranına model oluşturmak üzere ilk defa 1964'de Bangham ve diğ.leri (108) tarafından hazırlanmışlardır. Toksik ve immunojenik değildirler. Suda ve yağda çözünen etkin maddeleri taşıyabilen lipozomlar, etkin maddeleri kontrollü olarak serbestleştirebilirler, hedef bölgeye taşıyabilirler ve biyolojik olarak yıkılırlar (30,39).

5-FU'in nispeten kısa bir yarılanma ömrü vardır. Bu nedenle intravenöz infüzyon olarak uygulanır. Ancak intravenöz infüzyondan sonra tehlikeli koronor spazm oluşabilir (101, 116, 117).

Yapılan çalışmalarda (118), lipozom içerisine enkapsüle edilmiş 5-FU'un daha yavaş olarak sağlandığını ve daha uzun etki ettiği gösterilmiştir.

Yakın zamanlara kadar, ilaç taşıyıcı sistemlerin görüntüleme ve tedavi alanında kullanımları ayrı ayrı incelenmiş ve bu konuda çok sayıda araştırma yapılmıştır (**Bkz. Tablo 1.4.**).

Görüntüleme ve tedavide kullanılan etkin maddeleri içeren çok sayıda ilaç taşıyıcı sistem ilaç piyasasına da girmiş bulunmaktadır. Ancak son zamanlarda bu iki ilacı aynı taşıyıcı sistem üzerinde taşıyan böylece hem teşhis (=diyagnostik) hem de tedavide (=terapi) kullanılan teragnostik olarak adlandırılan ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde çalışmalar yapılmaya başlanmıştır.

Özellikle nanoteknoloji de alınada gelişmeler bu sistemler üzerinde çalışmalara öncülük etmişlerdir (119).

Birçok nanomateryaller, görüntüleme ajanları olduğu için, tedavi edici fonksiyonlar eklenerek teragnostik ajanlara kolayca dönüştürülebilirler (120).

Teragnostik lipozomlar veya diğeri ilaç taşıyıcı sistemler ile, tek bir taşıyıcı sistemde hem diagnostik hem de terapötik etkileri kombine edilerek, birçok hastalıklar için kişiseye özgü tedavi uygulaması gündeme gelmiştir (121).

Teragnostik sistemler, görüntülemenin sadece tedavinin öncesinde veya sonrasında değil, tedavi süresince de yapılabilmesine olanak sağlamaktadır. Böylece tedavide kullanılan etkin maddenin hedef organ veya dokulara ulaşmış olup olmadığı kontrol edilebilir. Hastanın tedaviye verdiği cevap çok daha erken aşamada belirlenebilir. Bu özellik, özellikle kanser hastalarında tedavi programının daha etkin olarak planlanmasına olanak sağlamaktadır. Hasta tedaviye cevap vermiyorsa yan etkileri son derece fazla olan tedavi derhal kesilerek daha etkili olabilecek tedavi programına daha kısa sürede geçilebilir.

Bu sistemler pasif (AGT etkisi) ya da aktif olarak hedeflendirilebildikleri için çok daha düşük miktarda bir görüntüleme ajanı ve/veya tedavi için kullanılan etkin madde ile serbest ilaçla elde edilen etkinin aynısı veya daha fazlası elde edilebilir. Bu hem maliyet hem de ilaçların (hem görüntüleme ajanı hem de tedavide kullanılan etkin maddenin) olası yan etkileri açısından çok daha uygundur (122). Bir diğeri avantajı ise, lipozomal görüntüleme ajanı hedeflendirilmiş doku/organda daha uzun bir süre kaldığından, tedavinin yararlarını değerlendirebilmek için uzun vadeli tekrarlanan görüntüleme imkanı verir. Bunun bir sonucu olarak daha başarılı bir tedavi için elde edilen sürekli geri bildirim bilgileri dikkate alınarak öngörülen rejim ayarlanabilmektedir (119). Ayrıca hazırlanan bu ilaç taşıyıcı sistemlere radyonüklid yerine örneğin gadolinyum bağlanarak Manyetik Rezonans Görüntüleme gibi farklı görüntüleme yöntemlerinde de kullanılabilir olması bu hazırlanan taşıyıcı sistemlerin bir diğeri önemli avantajını oluşturmaktadır.

Bu yüzden çalışmamızda değişik teragnostik lipozom formülasyonları seçilmiş ve lipozomun iç sulu fazına etkin madde olarak 5-FU hapsedilmiş ve değişik radyonüklidin stabil bir şekilde lipozom membranına bağlanmasını sağlamak için membran bileşimine şelat yapıcı madde olan DTPA-PE ilave edilmiştir.

B1. Fosfolipitlerin Seçimi

Lipozomlar son yıllarda tıbbın pek çok uygulama alanında ilgi odağı haline gelmiştir. Lipozomların akışkanlığı, geçirgenliği ve moleküler organizasyonu gibi özellikleri üzerine yoğunlaşmış olan fizikokimyasal çalışmalar, doğal membranların yapısal elementi olarak çift katlı lipit tabakalarının önemini ortaya koymaktadır (123).

Lipozomu oluşturan lipidleri seçerken, fosfolipidlerin, karakteristik bir jel-sıvı faz geçiş sıcaklığında, faz geçişine uğrayarak vezikül oluşturdukları dikkate alınmalıdır. Her fosfolipit türü bir jel-sıvı geçiş sıcaklığı (Tc) ile karakterize edilmektedir. Bu sıcaklığın altında yağ asidi zincirleri hemen hemen bir kristal düzlemindedir. Bu sıcaklığın üzerinde ise zincirler daha sıvı bir fazdadır. Zincirin erimesi ile birlikte çift tabakanın kalınlığı azalmakta ve her bir molekül başına düşen alan artmaktadır. Bu değişiklikler X-Işını kırınımı, nükleer manyetik rezonans, elektron spin rezonans, *diferansiyel scanning kalorimetrisi* ve floresans depolarizasyonu gibi çeşitli fiziksel tekniklerle araştırılmıştır.

Genel olarak Tc değeri zincir boyu azaltılarak, ana zincirlerin doyurulmamasıyla, büyük yan gruplarla ve asıl zincirin dallanma göstermesi gibi durumlarla azaltılabilir. Polar bağ grupları da geçiş sıcaklığını etkiler, fakat ana zincirler kadar etkili olmaz. Doğal fosfolipidler (örneğin yumurta fosfatidilkolini), doymuş ve doymamış ana zincirlerin bir kompleksini içerir ve düşük sıcaklık geçişlerinin geniş oluşu ile karakterize edilir. Kendisi lipozom teşkil etmeyen Chol, fosfolipitlerin jel-sıvı kristal fazı geçişlerini genişletir ve tamamen kaybolmasına neden olabilir. Bu durum 1:1 oranında karıştırılan dipalmitoilfosfatidilkolin/ Chol karışımında görülür.

Lipozom membranlarının geçirgenliği, membranin lipid tabakasına ve lipozom içinde tutulan etkin maddenin yapısına bağlıdır. Lipozom

membranları arasında özellikle büyük, polar veya iyonik maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili biçimde tutulurlar (51,52).

Lipozomlar için yüksek sıcaklıklar; membran yapısını, faz geçiş sıcaklığına ulaşıldığı takdirde geri dönüşümsüz olarak değiştirebilir. Sistemin karşılaşılabileceği sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıkların kullanılması halinde sistemin tekrar eski halini almama riski vardır (2).

Çalışmamızda kullanılan lipozomların hazırlanması sırasında sıvı kristal yapısında lipid olan PL 90G ve jel tipinde olan DPPC seçilmiştir. PL 90G soya lesitini olup doymamış yapıdadır. DPPC ise doymuş sentetik lipiddir. PL 90G yapısındaki doymamışlık nedeniyle stabilitesinin sağlanması ve korunması oldukça önemlidir. Jel tipinde olan DPPC'de ise yapıda bulunan doymamışlık ortadan kalkmıştır. Bu nedenle jel tipte olan lipidler sıvı tipte olanlara göre oksidasyona daha dayanıklı hale gelmektedirler.

B2. Chol' un Eklenmesi

Chol'un stabilize edici etkisi, bir sıvı tabaka içerisindeki fosfolipid moleküllerinin yerleşimini sıkılaştırma kapasitesi olarak açıklanmıştır. Bunun yanısıra, başka bir kaynaktan, CHOL'ün esas etkisinin, plazma lipoproteinleri ve kırmızı kan hücrelerinin membranına fosfolipit transferin azaltmasından kaynaklandığı belirtilmiştir (24, 54). Aynı zamanda, esterleşmemiş Chol lipozom tabakasının akışkanlığını azaltmakta, bu da apoproteinlerin penetrasyonunu zorlaştırmaktadır. Böylece esterleşmemiş Chol içeren lipozomlar düşük dozlarda dahi plazmada stabil halde kalabilmektedir (124).

Chol jel tipte olan veziküllerde az miktarda akışkanlaştırıcı etki gösterirken, sıvı tipte olan veziküllerde büyük oranda düzenleyici etkiye sahiptir. Bu nedenlerle, Chol sıvı tipteki fosfolipid çifte tabakanın geçirgenliğini azaltıp, rijitesini arttırarak hapsedilmiş ilaçların sızmasını azaltmaktadır (33).

Birçok araştırmacı tarafından Chol'un lipozomlardan etkin madde salımı ve *High density lipoprotein* (HDL)' ne lipid transferi üzerindeki etkileri açıklanmıştır (10). Esterleşmemiş yapıda Chol içeren lipozomların, fosfolipit kütlelerini hızla HDL'ye vererek kaybetmedikleri yine de lipozomlar ile HDL

arasındaki fosfolipit değişiminin devam ettiği bildirilmiştir. Böylece, lipozom fosfolipiti ile lipoprotein türevi fosfolipitin yer değiştirmesi ile fosfolipit kaybının kompanse edildiği ve bu olayın taşıyıcıya büyük zarar vermediği anlaşılmıştır (33,125).

Bir başka çalışmada, HDL ile Chol içeriği yönünden zengin lipozom etkileşiminin tam olmadığı gösterilmiştir. Çünkü, bu etkileşim sırasında oluşan fosfolipit değişiminin lipozomal lipit tabakasının dış tabakasıyla sınırlı kaldığı bulunmuştur (126).

Yapılan diğer bir çalışmada, insan serum albumini taşıyan, yumurta fosfatidilkolin, Chol ve disetilfosfat (7:2:1) içeren MLV lipozomlar, sıçanlara i.v olarak injekte edilmiştir. Hem lipit hem de sulu faz işaretlenmiştir (¹³¹I işaretli albumin ve [³H] Chol). İki işaretleyicinin dolaşımdan temizlenmesinin gözlenmesi ile, bu stabil lipozomlarla kantitatif olarak proteinin (albumin) alıkonulduğu bulunmuştur (127).

Çalışmamızda yukarıda sayılan avantajları nedeniyle tüm formülasyonlarda Chol kullanılmıştır.

B3. şelat Yapıcı Madde Seçimi

Çalışmamızda kullandığımız lipozomların bileşiminde, görüntüleme için kullanılabilir radyonüklidi, stabil bir şekilde yüzeye bağlanmak için şelat yapıcı madde olan DTPA kullanılmıştır. Bu bileşiği lipozom lipid ifte tabakasına dahil edebilmek için DTPA-PE-lipid konjugatı olan DTPA-PE türevi kullanılmış ve bu madde laboratuvarımızda Grant ve diğ.'nin (108) yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir.

Etkin madde olan DTPA, zelti halinde ve ağır metal zehirlenme tedavilerinde şelatör olarak kullanılan bir maddedir. Ayrıca teknesyum-99m (Tc-99m) ile işaretlenen DTPA kiti ise böbrek, beyin ve kan akımı görüntülemelerinde kullanılır.

Lipozomlara sintigrafik görüntülemede kullanılacak Tc-99m, Indiyum-111 (In-111) gibi radyonüklitlerin yüklenmesinde farklı yöntemler kullanılmıştır. Bunlardan birisi radyonüklidin lipozom içine hapsedilmesidir. Ancak molekül ağırlığı çok küçük olan radyonüklid özellikle in vivo uygulama sırasında kolaylıkla dışarı sızdığından bu yaklaşım çok fazla kabul

görmemiştir. Bir başka yaklaşım fosfolipidin direkt radyonüklitle bağlanmasıdır. Ancak bu yöntemde işaretleme için radyonüklitle bağ yapabilecek serbest karboksil, hidroksil veya amino grubunun olması gerekmektedir. Aksi takdirde stabil bir işaretleme mümkün olmamaktadır (69). Lipozomların işaretlenmesi için kullanılan bir diğer yöntemde glutatyon içeren lipozomların Tc-99m-HMPAO kiti ile inkübasyonudur. Son derece stabil işaretleme elde edilmesine rağmen zaten pahalı olan lipozom sistemlerinin (128) maliyetin daha da artırması bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Alternatif bir yol olarak, DTPA-PE veya farklı bir şelat yapıcı ajan kimyasal bir işlemle hidrofobik bir gruba modifiye edilmiş ve hazırlama sırasında veya sonrasında bu şelat yapıcı ajan, lipozomun içi yerine lipozomun yüzeyindeki lipid membrana bağlanmıştır (32,75,101). Bu amaçla, en çok tercih edilen hidrofobik grup, fosfatidil etanolamin (PE)'dir. Şelat yapıcı ajan olan DTPA-PE, PE'nin amino baş grubuna bir –COOH grubu aracılığıyla bağlanır, böylece PE kısmı lipozom lipid çifte tabakasının yapısına katılırken, DTPA, kontrast madde veya radyonüklit ile birleşir (128). PE dışında SA ve stearylalkol de bu amaçla kullanılmış, ancak bu moleküllerin nörotoksik etkileri nedeniyle çok fazla tercih edilmemiştir. Çalışmamızda yukarıda sayılan avantajları nedeniyle tüm formülasyonlarda DTPA-PE şelat yapıcı madde olarak kullanılmıştır.

B4. PEG₂₀₀₀-DSPE Eklenmesi

Farmasötik nanotaşıyıcıların vasküler sistemde kalış süresini arttırmanın bir yolu da PEG₂₀₀₀-DSPE gibi hidrofilik polimeri ile kimyasal modifikasyonudur. PEG₂₀₀₀-DSPE günümüzde en çok tercih edilen polimerdir. Nanoteknolojik ilk ilaç taşıma sistemi 1960'larda tanımlanan ve daha sonra lipozomlar olarak kabul edilen lipid vezikülleridir. Ardından çeşitli organik ve inorganik biyomateryaller ilaç taşıma sistemi olarak araştırılmıştır (7, 16, 21).

Kontrollü salım yapan ilk polimer sistemi 1976'da tanımlanırken, 1980'de pH değişimlerine cevap vererek ilaç salımı yapabilen daha kompleks bir sistem olan ve hücre-spesifik hedefleme gerçekleştiren lipozomlar sentezlenmiştir. 1987'de uzun süre sirkülasyonda kalan ilk modifiye

lipozomlar tanımlanmıştır. Ardından PEG'nin lipozomların ve polimerik nanopartiküllerin sirkülasyon zamanını uzattığı belirlenmiştir. Bazı ilaç taşıyıcı sistemler günümüzde klinik uygulamalarda kullanılmakta olup çeşitli formları araştırılmaya ve çalışılmaya devam etmektedir (108). Özellikle lipozomların retiküloendotelial sistemde ve kapiller geçirgenliğin fazla olduğu dokularda ilacın depolanmasını sağladığı bilinmektedir (35).

Lipozomlar, kompleman aktivasyonu yapabilmeleri, kardiyovasküler ve hematolojik yan etkileri arttırabilmeleri nedeniyle tehlikeli olabilmektedir. Ayrıca, lipozomal yapının dolaşımında, birleşimin yapısından etkin maddeyi sızdırdığı da gözlemlenmiştir (27). Bu olumsuz özelliklerin çoğu ilaç formülasyonunda yapılacak bir PEG kaplama ile ortadan kaldırılabilir. PEG koruyucu bir kılıf etkisi yaratır ve bu da molekülün hem tripsin ve kimotripsin gibi çeşitli proteazlar ile yıkılmasını, hem de molekülün antijenitesini engelleyerek immunojenitesini azaltır. Böylece yeni molekülün farmakolojik aktif formunun yarı ömrü uzar. Molekülün yarı ömrünün uzaması ile ilacın uygulanım aralıkları uzatılıp, hastaların ilaç tüketimlerinde uyum sorunu azaltılabilir (129). Moleküler ağırlığı 400'un altında olan PEG molekülleri toksik hidroksi asit metabolitlerine metabolize olmaktadır. Bu durum, PEG'nin moleküler ağırlığı arttıkça azalmaktadır. Çalışmamızda PEG₂₀₀₀-DSPE kullanılmıştır.

İntravenoz olarak köpeklere yüksek dozda PEG molekülü verildiğinde, pulmoner ödem ve solunum durması gerçekleşmektedir. Maymun ve tavşanlarda yapılan subkronik PEG uygulamalarında majör toksisite bildirilmemiş olup, bu hayvanlarda yapılan oral toksisite çalışmalarında, teratojenik veya üreme üzerine ciddi yan etki görülmemiştir (129).

PEG ile kaplama işleminde, PEG molekülündeki hidroksil kaybı ile beraber elektrofilik fonksiyonel bir grup eklenir ve bu yapı amid-uraten bağları ile protein molekülü içindeki lizin histidin yapılarına veya N terminal bölgesine bağlanır. Çok sayıda PEG₂₀₀₀-DSPE molekülünün eklenmesi ile protein yapılarının reseptör etkileşimi bozulabilir ve oluşan konjüge bileşimin biyolojik etkilerini azaltabilir. Birden fazla PEG₂₀₀₀-DSPE molekülü eklemenin alternatifi, tek dallı bir PEG₂₀₀₀-DSPE yapısının proteine yapıştirılmasıdır.

Dallı zincirli PEG₂₀₀₀-DSPE molekülünün termal ve pH stabilitesi daha yüksek olup, lineer PEG₂₀₀₀-DSPE yapılarına göre dallı zincirli PEG molekülü proteolitik degradasyona daha dirençlidir (94). Lipozomların PEG ile kaplanması ek avantajlar sağlamaktadır. PEG'nin katyonik lipozomların kanda sirkülasyonunu uzatılarak başarılı olduğunu gösterilmiştir (131). PEG kaplı ve kaplı olmayan katyonik lipozomlar karşılaştırıldığında, kandaki yarı ömrün daha çok uzatılmasına rağmen, endotelyum ile etkileşim kabiliyetlerinin kaybının söz konusu olmadığını gösterilmiştir (132).

Çalışmamızda DPPC ve PL 90G fosfolipidleri ile hazırlanan tüm formülasyonlarda PEG₂₀₀₀-DSPE kullanılarak yüzey kaplanması sağlanmış ve bu şekilde lipozomların RES hücreleri tarafından hızlı opsonizasyonu önlenerek dolaşımda kalış sürelerinin uzatılması ve tümöre pasif olarak hedeflendirilmesi amaçlanmıştır.

B5. Yük verici madde eklenmesi

Çalışmamızda pozitif yük verici madde olarak SA ve negatif yük verici madde olarak DCP kullanılmıştır. Katyonik lipozomlar başarılı bir şekilde gen transfer vektörleri gibi kullanılmaktadır. Pozitif yüklü lipozomların negatif yüklü DNA ile etkileşimi, bunları aynı bileşime sahip diğer negatif yüklü lipozomlardan ayırmaktadır. Buna ek olarak, pozitif yüklü lipozomlar küçük hidrofobik etkin maddelerin hapsedilmesinde de etkili bir şekilde kullanılmıştır (133). Bu yüzden pozitif yüklü lipozomlar daha geniş klinik amaçlar için dikkate alınmaya başlanmıştır .

Lipozomların pozitif yükü endotelyumun glikoprotein membranı ile başarılı bir etkileşimi için gereklidir (131). Bazı araştırmalarda pozitif yüklü lipozomların kan dolaşım sisteminde stabil olduğunu (134) ve negatif yüklü hidrofobik etkin maddelerin (insülin gibi) enkapsülasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (135). Fakat diğer yandan pozitif yüklü lipozomlar *in vivo* ve *in vitro* toksik etkilere neden olabilmektedirler. Pozitif yüklü lipozomların beyne toksik oldukları gösterilmiştir. Buna ek olarak hem hücre kültürlerinde hem de eritrositlerde toksik etki gösterdikleri bulunmuştur. Bu yüzden lipozomların kan elemanları ile interaksiyonu sorun oluşturabilen bir konu olarak ortaya

çıkılmaktadır. Bu konuyla ilgili çeşitli ve başarılı araştırmalar yapılmıştır ve yapılmaya devam etmektedirler (74).

Lipozomların kan dolaşımından uzaklaştırılması taşıyıcı sistemin yüzey yüküne de bağlıdır. Yüksüz ve pozitif yüklü lipozomlar negatif yüklü lipozomlara göre kan dolaşımından daha hızlı bir şekilde temizlenmektedir (136). Araştırmalarda negatif yüklü lipozomların *transient trombositopeniyi* indüklediği için plateletlerin lipozom biyodağılımında aktif bir rol oynayabileceği düşünülmüştür (129, 137). Buna ek olarak plateletlerin negatif yüklü lipozomlarla öncelikle birleştirip, zaman geçtikçe doğal olarak lipozomlardan ayrılarak kan dolaşımına salınmakta oldukları bildirilmiştir (138).

Pozitif yüklü lipozomların bazı sakıncalarını gidermek için etkin madde enkapsüle edildikten sonra taşıyıcı sistemin yüzey özellikleri modifiye edilmektedir. Yüzey modifikasyonun amacı daha stabil, rijid, daha az toksik, dolaşımda daha uzun süre kalabilen ve anatomik hedeflendirme yapabilen lipozomlar elde etmektir. Çalışmamızda değişik yüklü ve yüksüz formülasyonlar tümör teşhis ve tedavisi için *in vitro* etkileri incelemek için geliştirildi.

4.2. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ KARAKTERİZASYON ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu bölümde boş ve 5-FU içeren yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G içeren lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklüğü, içte hapsedilen 5-FU miktarı ve lipozomal fosfolipid miktarları ile ilgili elde edilen veriler değerlendirilmiştir. Karşılaştırmalar yapılırken, lipozom bileşimlerinin her defasında uzun isimleri ile tekrarlanması zor olacağından karşılaştırmaların daha kolay yapılabilmesi için çalışmalarımızda kullandığımız lipozom bileşimleri kısaltılmış isimleri ile verilecektir (**Bkz Tablo 3.1. ve 3.2.**).

A. Partikül Büyüklüğü ve Partikül Büyüklüğü Dağılımı

Lipozomların partikül boyutları, dolaşımdaki kalış sürelerinin uzatılmasında ve özellikle tümör gibi damar yapısı bütünlüğü bozulmuş hedef

dokulara hedeflendirilmelerinde büyük önem taşımaktadır. Lipozom dispersiyonlarının partikül boyutuna, hazırlama yöntemi, kullanılan fosfolipidin türü, membran molar bileşimi ve içte hapsedilen bileşiğin molekül büyüklüğü gibi değişik faktörlerin etkisi vardır. Araştırmamızda kullanılan 5-FU içeren değişik lipozom dispersiyonlarının hazırlanmasında kuru lipid film yöntemini ve takiben hazırlanan dispersiyonların partikül boyutunu küçültmek için lipozom hazırlamada ve partikül boyutunu küçültmede etkinliği iyi bilinen bir yöntem olan, ekstrüzyon işlemi uygulanmıştır (139).

Hazırlanan tüm lipozom dispersiyonlarının ve ortalama partikül boyutları **Tablo 3.3** ve **Tablo 3.11'de** verilmiştir. Tüm formülasyonların partikül büyüklüğü 100- 150 nm civarında bulunmuştur (DPPC boş lipozomu hariç. Onların partikül büyüklüğü 300 nm civarında bulunmuştur).

DTPA-PE içeren yüksüz, pozitif yüklü ve negatif yüklü, boş ve 5-FU içeren DPPC ve PL 90G lipozomlarının partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında boş lipozom dispersiyonlarının etkin madde içeren lipozom dispersiyonlarından biraz daha büyük olduğu bulunmuştur ama hem DPPC hem de PL 90G lipozomları için etkin madde içeren ve içermeyen lipozom dispersiyonlarının partikül büyüklükleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır ($p>0,05$).

Lipozomlar farklı boyutlarda (15- 3500 nm çapında) ve şekilde (tek veya birleşik partiküller) olabilir. Belirli bir kompozisyonda bu parametreler, hazırlık sürecine çok bağlıdır. Preparatlar sıklıkla istikrarsızdır. Bu da serbest entalpinin durumunun çevre ile dengede olmadığı anlamına gelir. Sonuç olarak veziküller zamanla lameller oluşlarını, boyutlarını, boyut dağılımını ve şekillerini değiştirirler. Örneğin küçük veziküller daha büyük olarak biçimlenmeye, büyük olanlar da küçülmeye eğilimli olurlar. Neyse ki bu kalite açısından çok önemli değildir, çünkü veziküllerin bağlı olduğu fosfatidilkolinlerin özelliği genellikle değişmez kalır. Ancak stabilite en iyi 100 – 300 nm arasında gibi görünmektedir (140). Büyük lipozomlar (çapı > 200) hızlı bir şekilde fagosite oluyorlar ve dolaşımdan temizlenirler. 70- 200 nm büyüklükteki lipozomlar kanda uzun zaman sirküle olabilirler ve istenilen organa hedeflendirme yapılabilir. Daha küçük boyutta lipozomlar (< 70nm)

dolaşımında daha az süre kalabilmektedirler (72). Homojen bir dispersiyon için, dispersiyonların homojenliğinin bir göstergesi olan polidispersite indeksine bakıldığında, değerinin 0-1 arasında olması istenir. Bu açılardan değerlendirdiğinde hazırladığımız lipozom dispersiyonlarının partikül boyutu ve dağılımının uygun olduğu bulunmuştur.

B. İçte Tutulan 5-FU Miktarı

İçte tutulan 5-FU miktarı hedef dokuya gönderilecek etkin maddenin miktarı açısından büyük önem taşımaktadır. Çalışmalarımızda içte tutulan etkin madde miktarı % 7-10 aralığında bulunmuştur. Bu sonuçlar literatürle uyumludur. Hidrofilik özellikteki bir ilacın film metodu ile hazırladığında lipozomlarda hapsedilme yüzdesi en fazla %10'dur (141).

Sonuçlar karşılaştırıldığında genel olarak DPPC içeren formülasyonların enkapsülasyon verimi PL 90G içerenlere oranla daha fazla bulunmuştur ($p < 0,05$). DPPC içeren yüksüz lipozom dispersiyonların enkapsülasyon verimi pozitif ve negatif yüklü DPPC içeren lipozom dispersiyonlarıyla karşılaştırıldığında daha büyük olduğunu ortaya çıkmıştır ($p < 0,05$). Pozitif ve negatif yüklü lipozomların enkapsülasyon verimi karşılaştırıldığında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p > 0,05$) (**Bkz. Tablo 3.4 ile Tablo 3.15**).

C. Lipozomal Fosfolipid Miktarı

Lipozom dispersiyonlarının hazırlanmasında kullanılan yöntemin hazırlama verimine etkisi, lipozomal fosfolipit miktarının tayini ile belirlenir. Fosfolipit kaybı ekstrüzyon işlemi sırasında görülen "*Onion Peeling Effect*" ten kaynaklanmaktadır (46). Daha önce de belirtildiği gibi lipozom dispersiyonları, hazırlanmalarını takiben partikül boyutunu küçültmek için ekstrüzyon işlemine tabi tutulmuşlardır. Çok sayıda ard arda uygulanan ekstrüzyon sonucu, çifte tabakanın dış yüzeyindeki lipit tabaka uzaklaşacağı için fosfolipit kaybı olacak, dolayısıyla veziküllerin çapları azalacaktır. DTPA-PE içeren boş ve 5-FU yüklü DPPC ve PL 90G lipozom formülasyonları arasında lipozomal fosfolipid miktarları açısından karşılaştırıldığında etkin

madde içeren formülasyonların fosfolipid miktarlarının daha düşük olduğu görülmüştür ancak fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Yüksüz, pozitif ve negatif yüklü DPPC ve PL 90G lipozom dispersiyonları karşılaştırıldığında PL 90G lipozomlarının lipozomal fosfolipid miktarları DPPC lipozomlarının fosfolipid miktarından daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). PL 90G sıvı kristal yapıda olduğu için bu lipidle hazırlanan lipozomlar daha akışkan bir yapı gösterirler ve dolayısıyla basınç altında belli por açıklığına sahip filtrelerden DPPC lipozomlarına oranla daha rahat geçerler ve bu nedenle de fosfolipit kaybının daha az olduğu düşünülmektedir (109).

4.3. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ *IN VITRO* SALIM ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Araştırmamızda lipozom dispersiyonların *in vitro* salım çalışmalarında diyaliz yöntemi kullanıldı (142). Nounou ve ark.'nın (119) yaptıkları çalışmada, hidrofobik ve hidrofilik karakterdeki etkin maddelerin lipozom formülasyonlarını *in vitro* salım çalışmaları diyaliz yöntemi ile yapılmıştır. Etkin madde olarak hidrofobik karakterde dibukain ve hidrofilik karakterde 5-FU kullanılmıştır. Sonuç olarak, hidrofilik karakterde olan etkin madde salımlarının lipofilik madde salımlarından daha yüksek olduğu belirtilmiştir.

PL 90G ve DPPC içeren lipozom dispersiyonları karşılaştırıldığında DPPC içeren lipozomların salımları PL 90G içeren lipozom formülasyonlarından daha yavaş oldukları gözlenmiştir. Bunun nedeni DPPC' nin jel yapıda bir fosfolipit olması ve sıvı kristal yapıda olan PL 90G ile kıyaslandığında faz geçiş sıcaklığının çok daha yüksek olmasıdır. DPPC' nin faz geçiş sıcaklığı 53 °C, PL 90G' nin faz sıcaklığı ise -5 °C' dir. Lipitler faz geçiş sıcaklarının altındaki sıcaklıklara daha düzenli ve sıkı bir yapının gözlemlendiği jel yapıda bulunurlar ve sıcaklık artıkça, özellikle faz geçiş sıcaklıklarının üstündeki sıcaklıklarda çıkıldıkça daha gevşek dizilişin görüldüğü sıvı-kristal yapıya geçerler. Sıvı-kristal yapıdaki lipitlerin polar baş grupları arasındaki mesafe jel yapıya oranla daha fazladır ve bu nedenle etkin madde salımı daha hızlı bir şekilde olmaktadır (33). Reaksiyon kinetiği eczacılıkta, ilaç stabilitesinin izlenmesi, katı ilaç şekillerinin çözünme

profillerinin oluşturulması ve etkin maddenin vücuda alınmasını takiben emilim, dağılım atılım ve metabolizmasının incelenmesi açısından önem taşımaktadır.

Lipozomlarda matrislerde olduğu gibi, ilaç polimer içinde dağıtılır. Ancak matris sistemlerde salım süresince polimer faz değişmeden kalıp ilaç difüzyon ile salınırken vücutta aşınan lipozomlarda aşınmayla polimer faz zamanla azalır. Polimer matris aşınmaya uğrarken ilaç salınır (143). Vücutta aşınan matris tipi ilaç salım sistemlerinde salım hızı difüzyon veya aşınma ile kontrol edilir. Eğer matrisin aşınması ilacın difüzyonuna göre oldukça yavaş ise, salım difüzyon kontrollüdür. Eğer ilaç matris içinde immobilize edilmiş ise, dolayısıyla difüzyon aşınmaya göre yavaşsa, ilaç salım hızı aşınma kontrollüdür (144).

Pratikte yalnızca yüzey aşınmasının gözlemlendiği ideal ilaç salım sistemleri çok az sayıdadır. Yüzey aşınmasının yanı sıra kütle aşınması da gözlenir. Bu yaklaşımla kullanılan polimerik matrislerde aşınmayla birlikte difüzyon da ilaç salım hızını kontrol eder. Dolayısıyla vücutta aşınan sistemlerde salım olayını incelemek oldukça güçtür. Geçişin yön ve hızını saptayan faktör, hücre tabakasının ayırdığı iki ortam arasındaki ilaç konsantrasyonu farkıdır. Yani geçiş yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru (konsantrasyon gradientine göre) Fick Diffüzyon kanununa uygun şekilde, 1. derece kinetiğiyle olur. Enerji ve taşıyıcı gerekmez.

Üzerinde çalıştığımız lipozom dispersiyonları 1. derece kinetiğiyle salım göstermektedirler. Pozitif ve negatif yüklü lipozom dispersiyonları ise birbiriyle benzer bir salım göstermektedir. 1. derece reaksiyonlar sabit koşullarda bir reaksiyonun hızı, reaksiyona giren maddelerin derişimleri ile orantılıdır ve yarı ömür başlangıç derişiminden bağımsızdır. Yapılan araştırmalarda (145,146) sulu faz üzerinden difüzyon, birinci derece kinetik reaksiyonların oluşmasına yol açmıştır. Öngörülen bu 1. derece kinetik salımlarının oluşması için bazı varsayımların yerine getirilmesi gereklidir. Bunlar; düşük lipozomal etkin madde enkapsülasyon verimi, hız sabiteleri ve

etkin madde konsantrasyonları arasında orantı, lipozomlarda hapsedilen etkin maddenin agregasyona uğramaması.

Fakat yüksek enkapsülasyon verimi olan lipozomlar da, daha büyük bir aparent hız sabitesiyle (k_2), 1.derece salım kinetiği gösterebilmekte. Bu koşulları yerine getirmeyen sistemler genellikle belirgin bir 1. derece salım kinetiği gösteremezler. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur (147).

Yapılan bir araştırmada (149) SA ve DCP içeren yüklü ve yüksüz lipozomlar içte hapsedilen 5-FU verimi, partikül büyüklüğü ve dağılımı, *in vitro* etkin madde salımı ve *in vivo* hedeflendirme açısından karşılaştırılmıştır. Yüksüz ve yüklü lipozomlar arasında *in vitro* salım profillerinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Ancak, yüklü lipozomlar yüksüz lipozomlara göre RES organlarında daha çok tutulmuştur.

4.4. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ *IN VITRO* TÜMÖR HÜCRELERİNDE TUTULUM ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmamızda PEG₂₀₀₀-DSPE ile kaplı olan yüksüz, pozitif yüklü, negatif yüklü, DPPC veya PL 90G içeren, boş ve 5-FU'li farklı lipozom dispersiyonlarının tümör hücreleri ile etkileşimi incelemek için MCF-7 tümör hücreleri 24 saat ve 48 saat süre ile inkübe edilmiştir. Yapılan *in vitro* çalışmaların sonucunda sitotoksosite sonuçları açıkça göstermiş ki DPPC içeren etkin maddeli PEG₂₀₀₀-DSPE kaplı lipozom dispersiyonları, PL 90G içeren etkin maddeli PEG₂₀₀₀-DSPE kaplı lipozom dispersiyonlarına göre çok daha fazla bir sitotoksosite gösterilmiştir ($p < 0.05$) (**Bkz. Tablo 3.8.**).

5-FU içeren PL 90G ve DPPC lipozom dispersiyonlar karşılaştırıldığında DPPC içeren lipozom formülasyonlarının sitotoksosite açısından daha başarılı oldukları gözlenmiştir. 5-FU hidrofilik bir etkin madde olduğu için jel tipi fosfolipitler içeren lipozomlarda hapsedildiğinde daha başarılı bir sonuç verdiği görülmüştür. Ayrıca DPPC içeren lipozom dispersiyonlarda PL 90G içeren lipozomlara göre daha iyi bir enkapsülasyon verimi ve etkin madde salımı gözlenmektedir.

Yapılan bir başka araştırmada (52) hazırlanan PL 90G içeren lipozom formülasyonları başarısız çıktığı için, DPPC ve WHI-P131'in (4-[(6,7-dimetoksi-4-kinazolin) aminofenol) içeren etkili lipozom formülasyonları

hazırlanmıştır. Bu açıdan, sonuçlarımız literatürle uyumludur. DPPC:5-FU yüksüz lipozom dispersiyonu DPPC: SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU lipozom dispersiyonlarıyla kıyaslandığında sitotoksosite açısından daha başarılıdır. DPPC: SA: 5-FU ve DPPC: DCP: 5-FU lipozom formülasyonları ise birbiriyle benzer bir sitotoksosite gösterdiği için lipozom yükünün sitotoksosite açısından önemli olmadığı anlaşılmıştır.

4.5. LİPOZOM DİSPERSİYONLARININ STABİLİTE ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

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 kimyasal ve fiziksel stabiliteilerinin korunmasında öncelikle lipozomun yapısı, etkin maddenin lipozomda tutulduğu faz, lipozomun büyüklüğü, yükü, hazırlama koşulları ve etkin maddenin fizikokimyasal özellikleri önemli rol oynamaktadır (30, 51, 52).

Lipozomların fiziksel stabilitesi; lipozomun yapısına, kullanılan etkin maddenin hidrofilik ya da hidrofobik olmasına ve lipozomların depolanma şartlarına önemli ölçüde bağlıdır (30, 52, 61). Genellikle bir lipozom preparatının fiziksel özelliklerindeki değişiklikler veziküllerin agregasyonu ya da lipozom hacminin büyümesi şeklinde görülür. Veziküllerde meydana gelen sızma ve füzyon olayları lipozomların üretimi sırasında membran yapısında bazı zararlara yol açmaktadır.

Bu durum özellikle SUV'lerin (*Small Unilamellar Vesicles*) faz geçiş sıcaklığı altında hazırlanmasıyla meydana gelmektedir. Bunun yanı sıra diğer lipozomlarda faz geçiş sıcaklığı üzerinde membran yapısında bazı hasarlar oluşabilir. Etkin maddenin lipozom yapısından dışarı sızması tek tabakalı lipozomlarda daha çok görülmekte, çok tabakalı lipozomlarda bu olaya daha ender rastlanmaktadır. Çok tabakalı lipozomun, lipid tabakasında tutulmuş etkin maddenin dışarı sızması sulu fazdaki etkin maddenin dışarı sızmasına göre daha zordur (61).

Molekül ağırlığı büyük olan (>1000) etkin maddelerin lipozomlardan dışarı sızmaları daha güçtür Buna karşılık küçük molekül ağırlıklı maddeler daha kolay dışarı sızabilirler. Sonikasyon koşullarının uygun olmadığı durumlarda lipozomlarda birleşme eğilimi artar ve etkin madde daha kolay dışarı sızabilir (46).

Van der Waals etkileşimleri nötral lipozomların agregasyonu ve sedimentasyonuna neden olabilir. Bu yüzden membranlar birbirine temas ederek büyük yapıların oluşmasına neden olur, böylece membran tabaka sayısı artar ve büyük veziküller oluşur. Özellikle nötr lipozomlarda bu durum çok fazla görülür. İyi uçurulmamış artık çözücüler ve eser elementler bu olayı arttırabilirler. Faz geçiş sıcaklığında, özellikle küçük tek tabakalı lipozomlar membranm eğrisel yapısından ileri gelen direncin az olması nedeniyle füzyona meyillidir. Lipozomların faz geçiş sıcaklığında meydana gelen bu olayı önlemek için lipozom dispersiyonlarını faz geçiş sıcaklığından uzak bir sıcaklıkta saklamak yerinde olur. Ayrıca membran yapısına yeterli miktarda Chol ilavesi ile faz geçişi azalır veya tamamen ortadan kalkar (94).

Lipozom membranlarının geçirgenliği, membranin lipid tabakasına ve lipozom içinde tutulan etkin maddenin yapısına bağlıdır. Lipozom membranları arasında özellikle büyük, polar veya iyonik maddeler, küçük molekül ağırlığına sahip lipofilik maddelerden daha etkili biçimde tutulurlar (15, 119). Çalışmamızda kullandığımız DPPC: Chol, DPPC: 5-FU, DPPC: SA, DPPC: SA: 5-FU, DPPC: DCP, DPPC: DCP:5-FU lipozom dispersiyonlarının fiziksel stabilitelerini izlemek amacıyla buzdolabı sıcaklığı (+ 4 °C) ve oda sıcaklığında (+ 25 °C) 3 ay bekletilen veziküllerin partikül büyüklüğü ve içte tutulan 5-FU miktarındaki değişimleri izlenmiştir.

A. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Bekletilen Lipozom Formülasyonlarının Partikül Büyüklüğündeki Değişim

Daha öncede belirtildiği gibi, partikül büyüklüğü lipozomlar için önemli bir parametredir ve lipozomların raf ömürleri süresince mevcut partikül büyüklüklerini korumaları beklenmektedir. Özellikle lipozomlar gibi hassas sistemlere stabilite testleri sırasında uygulanan sıcaklık artışının ne yaptığı önemlidir. Lipozomlar için yüksek sıcaklıklar; membran yapısını, faz geçiş

sıcaklığına ulaşıldığı taktirde geri dönüşümsüz olarak değiştirebilir. Sistemin karşılaşılabileceği sıcaklıktan daha yüksek sıcaklıkların kullanılması halinde sistemin tekrar eski halini almama riski vardır (149). Lipozomlar gibi partiküler yapıdaki ilaç taşıyıcı sistemlerdeki en önemli fiziksel stabilite göstergelerinden biri partikül büyüklüğündeki değişimdir, çünkü partikül büyümesi faz ayırımına kadar gidebilen bir sürecin başlangıcı olabilir ve bu nedenle fiziksel stabilite çalışmaları sırasında dikkatle incelenmelidir.

Sonuçlar incelenecek olursa ölçülen DPPC:Chol, DPPC:SA, DPPC:DCP, DPPC:5-FU, DPPC:SA:5-FU ve DPPC:DCP:5-FU lipozom formülasyonlarında buzdolabı ve oda sıcaklığında bekletilmeleri sonrasında partikül büyüklükleri karşılaştırıldığında az bir artış görülmüştür (**Bkz.Tablo 3.11.**). DPPC içeren lipozom formülasyonlarının hem buzdolabı sıcaklığı hem de oda sıcaklığında bekletilmeleri sonrası zamanın fonksiyonu olarak partikül büyüklüklerinde değişimler incelendiğinde, hem buzdolabı sıcaklığında hem de oda sıcaklığında, zamanın fonksiyonu olarak partikül boyutunun arttığı görülmüştür. Ancak yapılan istatistiksel analiz sonrası, bu artışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur. Kısaca elde edilen sonuçlar ışığında, hazırlanan lipozom formülasyonlarının her iki sıcaklıkta da, izlenen süre içerisinde partikül büyüklüğü değişimleri açısından stabil oldukları söylenebilir.

B. Buzdolabı ve Oda Sıcaklığında Bekletilen Lipozom Formülasyonlarının İçte Tutulan 5-FU Miktarındaki Değişim

Çalışmamızda kullanılan 5-FU içeren lipozom formülasyonlarının fiziksel stabilitelerini değerlendirmek için stabilite çalışmalarında incelediğimiz bir diğer parametre ise içte tutulan 5-FU miktarındaki değişimdir. Bilindiği üzere lipozomlar gibi ilaç taşıyıcı sistemlerden istenilen etkinliğin sağlanabilmesi için, tüm raf ömürleri boyunca hapsedilen etkin madde miktarının izlenmesi fiziksel stabilite çalışmaları açısından önem taşımaktadır.

Sonuçlar incelenecek olursa aynı lipozom bileşimine sahip lipozom formülasyonları aynı örnek alma günlerindeki buzdolabı ve oda sıcaklığında bekletilmeleri sonrası içte tutulan 5-FU miktarlarındaki değişim

karşılaştırıldığında, buzdolabı sıcaklığında bekletilen lipozom formülasyonları ile oda sıcaklığında bekletilen aynı bileşimdeki lipozom formülasyonları arasında anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$).

DPPC içeren lipozom formülasyonlarının hem buzdolabı sıcaklığı hem de oda sıcaklığında bekletilmeleri sonrası zamanın fonksiyonu olarak içte tutulan 5-FU miktarındaki değişimler incelendiğinde, hem buzdolabı sıcaklığında hem de oda sıcaklığında, zamanın fonksiyonu olarak içte tutulan 5-FU miktarının azaldığını gözlenmiştir, ancak yapılan istatistiksel analiz sonrası, bu azalışın istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0,05$).. 5-FU içeren lipozom formülasyonların fiziksel stabilitesi buzdolabı sıcaklığında (4°C)' de, daha iyi olduğunu söylemeye değerdir. Lipozomların en yüksek fiziksel stabilitesini elde etmek için buzdolabında saklanması gerekmektedir. Sonuçlarımız literatürle uyumlu bulunmuştur (151).

SONUÇ

Tümör teşhisi ve görüntülemesi amacıyla geliştirilen PEG kaplı, değişik yüzey yüküne sahip, DTPA-PE içeren boş ve 5-FU yüklü DPPC ve PL 90G lipozom dispersiyonları üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda;

- Film metodunu kullanarak hazırlanan ve faz geçiş sıcaklığının 10 °C üzerinde ekstrüzyon işlemi uygulanan lipozom formülasyonlarında, uygun partikül boyutu ve 5-FU enkapsülasyonu sağlanmıştır.
- Tüm formülasyonlarda partikül boyutları ~100-150 nm civarında bulunmuştur. DPPC: Boş lipozomların partikül büyüklüğü ise ~ 300 nm olarak ölçülmüştür.
- İçte tutulan 5-FU yüzdesi % 6-12 aralığında bulunmuştur.
- Hazırlama işlemi sonrası dispersiyonların lipozomal fosfolipit miktarı 73-100 $\mu\text{mol lipit.ml}^{-1}$ bulunmuştur.
- DPPC içeren lipozom formülasyonlarının gerek partikül büyüklüğü değişimi gerekse içte tutulan 5-FU miktarının korunması açısından stabil olduğu, ayrıca buzdolabında bekletilen formülasyonların stabilitelerinin oda sıcaklığında bekletilen formülasyonlara göre daha iyi olduğunu gözlenmiştir.
- Serbest 5-FU ile karşılaştırıldığında yaklaşık 10 kat daha az etkin madde içeren DTPA-PE ve 5-FU içeren DPPC lipozom formülasyonlarının MCF-7 tümör hücreleri üzerinde aynı sitotoksik etkiyi gösterdiği bulunmuştur. Bu yan etkilerin azaltılması bakımından önemlidir.
- Bu çalışma tümör teşhis ve tedavisinde kullanılabilecek DTPA-PE ve 5-FU içeren teragnostik lipozom sistemlerin geliştirilmesi için ilk basamağı oluşturan, formülasyon, karakterizasyon ve *in vitro* çalışmalarını (salım ve siitotoksisite deneyleri) kapsamaktadır.

- Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde en uygun formülasyonların 61,7: 33,3: 5 μmol + %1 mol/lipid + 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ bileşiminde olan DPPC: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU formülasyonu, pozitif yüklü, 61,7: 3,3: 30: 5 + %1 mol/ lipid+ 20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ bileşiminde olan DPPC: SA: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU ve negatif yüklü DPPC: DCP: CHOL: PEG₂₀₀₀-DSPE+ DTPA-PE+ 5-FU lipozom dispersiyonları olduğu bulunmuştur.
- Hazırlanan lipozom dispersiyonlarının tedavi etkinliği *in vitro* hücre kültür çalışmaları ile gösterilmiştir. Bundan sonraki aşamada hazırlanan lipozom dispersiyonlarının görüntüleme için kullanılacak radyokontrast/ radyometal/ radyonüklid ile yüklenmesi ve görüntülemede kullanımlarının değerlendirilmesi ve daha sonra bu sistemlerin hayvanlara uygulanarak *in vivo* davranışlarının incelenmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Juliano, R.L. (1986). *Controlled Drug Delievery (2nd ed)*, Robinson. J.R., Lee V.H.L. (eds.) New York: Marcel Dekker Inc., 555-581.
- 2- Poznansky, M.S., Juliano, R. L. (1984). Biological Approaches to the Controlled Delievery of Drugs: A Critical Review. *Pharmacological Reviews*, 36, 277-336.
- 3- Davis, S.S. (January 1986). Drug Targeting. *M.F.G. Chemical*, 42-45.
- 4- Gülmezoğlu, E. (1975). *Bağışıklığın Temelleri*. Ankara: Halkevleri Kültür Vakfı Basımevi, 32-43.
- 5- Machy, P., Barbet, J., Leserman, L.D. (1982). Drug Transfer into Lymphoblast Mediated by Liposomes Bound to Dinstinct Sites on H-2 Encodet I-A, I-E, and K Molecules. *Journal of Immunology*, 129, 2098-2101.
- 6- Widder, K.J., Senyei, A.E., Ovadia, H. ve Paterson, P.Y. (1981). Specific Cell Binding using Staphylococcal Protein as Magnetic Microspheres. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70, 387-389.
- 7- Davis, S.S., Ilium, L. (1986). Colloidal Carriers and Drug Targeting. *Acta Pharmaceutica Technologica-International Journal Of Drug Formulaton And Biopharmaceutics*, 32, 4- 9.
- 8- Tomlinson, E., Livingstone, C. (November 1989). Selective Drug Delivery and Targeting. *The Pharmaceutical Journal*, 1, 619-621.
- 9- Gref R., Lück M., Quellec P., Marchand M., Dellacheria E., Harnis S. ve diğerleri (2000). Stealth Corona-Core Nanoparticles Surface Modified by Polyethylene Glycol (PEG): Influences of the Corona (PEG Chain Length and Surface Density) and the Core Composition on Phagocytic Uptake and Plasma Protein Adsorption. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 18, 301- 313.
- 10- Gregoriadis, G. (1979). *Drug Carriers in Biology and Medicine*. Gregoriadis, G. (ed.), London: Academic Press, 287-341.

- 11- Illum, L., Davis, S.S. (1984). The Organ Uptake of Intravenously Administered Colloidal Particles can be Altered Using a Non-Ionic Surfactant (Poloxamer 338). *FEBS Letters*, 167, 79-82.
- 12- Illum, L., Hunneyball, I.M., Davis, S.S. (1986). The Effect of Hydrophilic Coatings on the Uptake of Colloidal Particles by the Liver and Peritoneal Macrophages, *International Journal of Pharmacy*, 29, 53-65.
- 13- Tyle, P., Ram, B.P. (1990). *Targeted Therapeutic Systems*. New York: Marcel Dekker, Inc., 300-315.
- 14- Juliano, R.L. (1991). *Targeted Drug Delivery*, 100, Berlin Heidelberg: Springer:-Verlag, 181-230.
- 15- Davis, S.S., Illum, L. (1986). Colloidal Delivery Systems-Opportunities and Challenges, in: *Site Specific Drug Delivery*. Eds. Tomlinson, E., Davis, S.S., John Wiley and Sons Ltd., 93- 110.
- 16- Davis, S.S., Illum, L. (December 1983). The Targeting of Drugs Using Polymeric Microspheres. *European Polymer Journal*, 15, Britany, 160-164.
- 17- Benoit, J.P., Couvreur, P., Devissaguet, J.P., Fessi, H., Puisieux, F. ve Treupel-Roblot, L. (1986). Les Formes "Vectorisees" ou a "Distribution Modulee" Nouveaux Systems D'administration des Medicaments. *Journal of Pharmacy*, Belgium, 41, 319- 329.
- 18- Lukyanov, A. N., Torchilin, V.P. (2004). Micelles from Lipid Derivatives of Water Soluble Polymers as Delievery Systems for Poorly Soluble Drugs. *Advanced Drug Delievery Reviews*, 56, 1273- 1289.
- 19- Kwon, G. S., Suwa, S., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y. ve 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.
- 20- Storm, G., Crommelin, D. J. A. (April 1998). Liposomes: Qua Vadis? *PSTT*, 1, 19- 31.

- 21- Torchilin, V. P. (2006). Multifunctional Nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58, 1532- 1555.
- 22- Wu, N. Z., Da, D., Rudoll, T. L., Needham, D., Whorton, A. R. ve Dewhirst, M. W. (1993). Increased Microvascular Permeability Contributes to Preferential Accumulation of Stealth Liposomes in Tumor Tissue. *Cancer Research*, 53, 3765- 3770.
- 23- La, S. B., Okano, T., Kataoka, K. (1996). Preparation and Characterisation of the Micelle-Forming Polymeric Drug İndomethacin-Incorporated Poly (Ethylene Oxide)-Poly(Betabenzyl L-Aspartate) Block Copolymer Micelles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85, 85- 90.
- 24- Gregoriadis, G. (1989). The Physiology of the Liposome. *News in Physiological Sciences*, 4, 146.
- 25- Senior, J.H. , Delago, C., Fisher, D., Tilcock, C., ve Gregoriadis, G. (1991). Influence of Surface Hydrophilicity of Liposomes on their Interaction with Plasma Proteins and Clearance from the Circulation: Studies with Polyethylene Glycol-Coated Vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1062, 77.
- 26- Maeda, H. , Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y. ve Hori, K. (2000). Tumor Vascular Permeability and the AGT Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *Journal of Controlled Release*, 65, 1- 2, 271- 284.
- 27- Gabizon A.A. (2001). Stealth Liposomes and Tumor Targeting: One Step Further in The Quest for the Magic Bullet. *Clinical Cancer Research*, 7, 223- 225.
- 28- Önyüksel H. And Dagar S. (2001). *Liposomes: Recent Developments and their Use in Targeted Detection and Chemotherapy of Breast Cancer. Controlled Release Systems, Second Symposium.*
- 29- Bioimaging, <http://www.scienceinyoureyes.com/index.php?id=75>
- 30- Gürsoy, A., Pişkin, E., Dortunç, B. ve Peppas, N.A. (1989). *Kontrollu İlaç Serbestleştiren Sistemler*. İstanbul: Tekno Grafik, Ada Ofset, 173-

196

- 31- Lasic D. D. (1998). *Novel Applications of Liposomes*, Tibtech, 16, 307-321.
- 32- Taylan, B., Özer, A.Y. (1991). Lipozomların Tıpta Uygulanması. *Pharmacia*, 31, 16- 35.
- 33- New R.R.C. (1990). *Liposomes: a practical approach*, 1, New York: Oxford University Press.
- 34- Garcia-Garcia E, Andrieux K, Gil S, Couvreur P. (2005). Colloidal Carriers and Blood-Brain Barrier (Bbb) Translocation: A Way to Deliver Drugs to the Brain? *International Journal of Pharmaceutics*, 298, 274-292.
- 35- Allen TM. (1997). Liposomes: Opportunities in Drug Delivery. *Drugs*, 4, 8- 14.
- 36- Matteucci ML, Thrall DE. (2000). The Role of Liposomes in Drug Delivery and Diagnostic İmaging: a Review. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 41, 100- 107.
- 37- Uhumwangho MU, Okor RS. (2005). Current Trends in The Production and Biomedical Applications of Liposomes: a Review. *Journal of Medicine and Biomedical Research*, 4, 9- 21.
- 38- Keller BC. (2001). Liposomes in Nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 25- 31.
- 39- Gürsoy A.Z. (2002). *Kontrollü Salım Sistemleri*, ed. 1., 104.
- 40- Mine, S., Erdoğan, S., Özer, A.Y. (2009). *Lipozomal Sistemler Kullanarak Tümör Teşhisi ve Görüntülemesi*, Yüksek Lisans Tezi, Ankara, Hacettepe Üniversitesi, 6- 8.
- 41- Ostro MJ. (1983). *Liposomes*. (1). New York: Marcel Dekker Inc., 27, 289.
- 42- Alkan, H. (1983). Lipozomlar-II. İlaç Taşıyıcısı Olarak Hazırlanmaları. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 197- 222.

- 43- Allen T. M. (1997). Liposomes: Opportunities in Drug Delivery. *Drugs*, 54 (4), 14- 24.
- 44- Sakurai F. , Inoue R. , Nishino Y. , Okuda A. , Matsumoto O., Taga T., ve diğerleri (2000). Effects of Dna/ Liposome Mixing Ratio On The Physicochemical Characteristics, Cellular Uptake And Intracellular Trafficking of Plasmid Dna/Cationic Liposome Complexes and Subsequent Gene Expression. *Journal of Controlled Release*, 66, 255-269.
- 45- Sharma A., Sharma U. S., (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *International Journal of Pharmaceutics*, 154, 123- 140.
- 46- Szoka, Jr. F. (1980). Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes). *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 9, 467- 508.
- 47- Gruber, P., Longer, M.A., Robinson, J.R. (1987). "Some Biological Issues in Oral, Controlled Drug Delivery", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 1, 1-18.
- 48- Waser, P.G., Müller, U., Kreuter, J., Berger, S., Munz, K., Kaiser, E., ve diğerleri (1987). Localization of Colloidal Particles (Liposomes, Hexylcyanoacrylate Nanoparticles and Albumin Nanoparticles) by Histology and Autoradiography in Mice. *International Journal of Pharmaceutics*, 39, 213- 227.
- 49- Kreuter J. (1994). *Colloidal drug delivery systems*. 1. USA: Marcel Dekker, 219- 322.
- 50- Torchilin VP, Weissig V. (2003). *Liposomes*, 2, Boston: Oxford University Press, 193-229.
- 51- Konings, A.W.T. (1984). Lipid Peroxidation in Liposomes. In Gregoriadis, G. (Ed.), *Liposome Technology*, 1, Boca Raton: CRC Press, 141- 161.
- 52- Riaz, M., Weiner, N., Martin, F. (1989). Liposomes. in Lieberman, H.A.,

- Rieger, M.M. ve Banker, G.S., *Pharmaceutical Dosage Forms Disperse Systems*, New York and Basel: Marcel Dekker Inc, 567-602
- 53- Piraube, C, Postaire, E., Lize, J.M., Prognon, P. ve Pradeau, D. (1988). Evidence of Chemical Instability of Phosfolipids in Liposomes. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 36, 4600-4602.
- 54- Weiner, N., Martin, F., Riaz, M. (1989). Liposomes as Drug Delivery System, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15, 1523-1524.
- 55- Hunt, CA., Tsang, S. (1981). " α -Tocopherol Retards Autooxidation and Prolongs the Shelf-Life of Liposomes", *International Journal of Pharmaceutics*, 8, 101- 110.
- 56- Grit, M., Snidt, J.H., Struijke ve A., Crommelin, D.J.A. (1989). Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics*, 50, 1-6.
- 57- Grit, M., Crommelin, D.J.A. (1992). The effect of aging on the physical stability of liposome dispersions. *Chemistry and Physics of Lipids*, 62, 113–122.
- 58- Grit, M., Underberg, W.J.M., Crommelin, D.J.A. (1993). Hydrolysis of Saturated Soybean Phosphatidyl Choline in Aqueous Liposome Dispersions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 82, 362-366.
- 59- Ausborn, M., Nuhn, P., Schreier, H. (1992). Stabilization of Liposomes by Freeze-Thaw and Lyophilization Techniques: Problems and Opportunities. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 38, 133-139.
- 60- Crommelin, D.J.A., Storm, G. (1987). Pharmaceutical Aspects of Liposomes-Preparation, Characterization and Stability. Müller, B.W., (Ed), *Controlled Drug Delivery*, Studgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 80-91.
- 61- Arıca, B., Özer, Y. ve Hıncal, A.A. (1994). Primakin Difosfat Lipozomlarının Stabılıtesı Üzerinde Çalışmalar, *Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 14, 39-49.

- 62- Lentz, B.R., Carpenter, T.J. ve Alford, D.R. (1987). Spontaneous Fusion of Phosphatidylcholine Small Unilamellar Vesicles in the Fluid Phase". *Biochemistry*, 26, 5389-5397.
- 63- Van Bommel, E.M.G., Crommelin, D.J.A. (1984). Stability of Doxorubicin-Liposomes on Storage: as an Aqueous Dispersion, Frozen or Freeze-dried. *International Journal of Pharmaceutics*, 22, 299-310.
- 64- Özer, A. Y., Talsma, H., Crommelin, D. J.A. (1988). Influence of Freezing and Freeze Drying on the Stability of Liposomes Dispersed in Aqueous Media. *Acta Pharmaceutica*, 34, 129-139.
- 65- Özer, A. Y., Talsma, H., (1989). Preparation and Stability of Liposomes Containing 5-FU", *International Journal of Pharmaceutics*, 55, 185-191.
- 66- Dang, C, Rogers, J.A. (1992). Poly (4-vinylpyridine) Coated Liposomes: Stability Studies and Release of Acetylsalicylic acid. *Journal of Microencapsulation*, 9, 437-448.
- 67- Alkan, H., (1983). Lipozomlar I. Özellikleri ve Hazırlama Yöntemleri, *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 8, 181-196,
- 68- Torchilin, V. P. (2006). Multifunctional Nanocarriers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58 (14), 1532-1555.
- 69- Erdoğan, S. (2009). Liposomal Nanocarriers for Tumor Imaging. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5 (2), 141-150.
- 70- Cheema SK, Gobin AS, Rhea R, Lopez-Berestein G, Newman RA ve Mathur AB, et al. (2007). Silk Fibroin Mediated Delivery of Liposomal Emodinto Breast Cancer Cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 341, 221-229.
- 71- Zavaleta CL, Phillips WT, Soundararajan A ve Goins AB. (2007). Use of Avidin/Biotin-Liposome System for Enhanced Peritoneal Drug Delivery in An Ovarian Cancer Model. *International Journal of Pharmaceutics*, 337, 316-328.
- 72- Bozdağ S, Vural İ, Çapan Y, Dalkara T. (2002). Beyin Tümörlerinin

Tedavisinde İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Uygulanması. *FABAD Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27, 89-104.

- 73- Sasaki, H., Kakutani, T., Hashida, M., Sezaki, H. (1985). Absorption Characteristics of the Lipophilic Prodrug of Mitomycin C from Injection Liposomes or an Emulsion. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 37, 461-465.
- 74- Fidler, L.J., Barnes, Z., Fogler, W.E., Kirsh, R., Bugelski ve Poste, G. (1982). Involvement of Macrophages in the Eradication of Established Metastases Following Intravenous Injection of Liposomes Macrophage Activators, *Journal of Cancer Research*, 42, 496-501.
- 75- Fidler, I.J. (1980). Therapy of Spontaneous Metastases by intravenous Injection of ti-on Liposomes Containing Lymphokines. *ScienceDirect*, 208, 1469-1471.
- 76- E. Haglund, M.M. Seale-Goldsmith ve J.F. Leary (2009). Design of Multifunctional Nanomedical Systems. *Annals of Biomedical Engineering*, Vol: 37, 2048–2063.
- 77- D.B. Pike and H. Ghandehari (2010). HPMA Copolymer-Cyclic RGD Conjugates for Tumor Targeting. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 62, 167–183.
- 78- S.D. Konda, M. Aref, S. Wang, M. Brechbiel ve E.C. Wiener (2001). Specific Targeting of Folate-Dendrimer MRI Contrast Agents to the High Affinity Folate Receptor Expressed in Ovarian Tumor Xenografts. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 12, 104–113.
- 79- D.A. Christian, S. Cai, D.M. Bowen, Y. Kim, J.D. Pajerowski ve D.E. Discher (2009). Polymersome Carriers: From Self-Assembly to siRNA and Protein Therapeutics. *Magnetic Resonance Materials in Physics, Biology and Medicine*, 71, 463–474.
- 80- M. Talelli, C.J. Rijcken, C.F. van Nostrum, G. Storm ve W.E. Hennink (2010). Micelles Based on HPMA Copolymers, *Advanced Drug Delivery*

Reviews, 62, 231–239.

- 81- V.I. Shubayev, T.R. Pisanic II and S. Jin (2009). Magnetic Nanoparticles for Theragnostics *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 467–477.
- 82- Z. Gao, A.M. Kennedy, D.A. Christensen ve N.Y. Rapoport (2008). Drug-Loaded Nano/Microbubbles for Combining Ultrasonography and Targeted Chemotherapy. *Ultrasonics*, 48, 260–270.
- 83- S. Dhar, Z. Liu, J. Thomale, H. Dai ve S.J. Lippard (2008). Targeted Single-Wall Carbon Nanotube-Mediated Pt(IV) Prodrug Delivery using Folate as a Homing Device. *Journal of the American Chemical Society*, 130, 11467–11476.
- 84- Kluza E, Schaft DW, Hautvast PA, et al. (2010). Synergistic Targeting of $\alpha\beta 3$ Integrin and Galectin-1 with Heteromultivalent Paramagnetic Liposomes for Combined MR Imaging and Treatment of Angiogenesis. *Nano Letters*, 10, 52–58.
- 85- Ferrari M. (2005). Cancer Nanotechnology: Opportunities and Challenges. *Nature Reviews Cancer*, Vol: 5, 161–171.
- 86- M. Wanga, M. Thanou (2010). Targeting Nanoparticles to Cancer. *Pharmacological Research*, 62, 90–99.
- 87- Bae KH, Chung HJ ve Park TG (2011). Nanomaterials for Cancer Therapy and Imaging, *Molecules and Cells*, 31, 295-302.
- 88- JL Arias, LH Reddy, M Othman, B Gillet, D Desmaele, F Zouhiri ve diğerleri (2011). Squalene Based Nanocomposites: A New Platform for the Design of Multifunctional Pharmaceutical Theragnostics, *ACS Nano*, 5 (2), 1513–1521.
- 89- LH Eraso, MP Reilly, C Sehgal ve ER Mohler (2011). Emerging Diagnostic and Therapeutic Molecular Imaging Applications in Vascular Disease, *Vascular Medicine*, 16, 145-156.
- 90- Mc Carthy JR, Weissleder R. (2008). Multifunctional Magnetic Nanoparticles for Targeted Imaging and Therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60, Elsevier, 1241–1251.

- 91- Stride E. (2009). Physical Principles of Microbubbles For Ultrasound Imaging and Therapy. *Journal of Cerebrovascular Diseases*, 27 (2), 1–13.
- 92- JM Rosenholm, C Sahlgren ve M Linden (2010). Towards Multifunctional, Targeted Drug Delivery Systems Using Mesoporous Silica Nanoparticles – Opportunities and Challenges. *Nanoscale*, 2, 1870–1883.
- 93- Oliver, M., Ahmad A., Kamaly N., Perouzel E., Caussin A., Keller M., ve diğerleri. (2006). MAGfect: A Novel Liposome Formulation for MRI Labelling and Visualization of Cells. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 4, 3489–3497.
- 94- Treat J, Greenspan A ve Forst D, et al. (1990). Antitumor Activity of Liposome Encapsulated Doxorubicin in Advanced Breast Cancer: Phase II Study. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1706–10.
- 95- Grange, C., Geninatti-Crich, S., Esposito, G., Alberti, D., Tei, L., Bussolati, B., ve diğerleri. (2010). Combined Delivery and Magnetic Resonance Imaging of Neural Cell Adhesion Molecule-Targeted Doxorubicin-Containing Liposomes in Experimentally Induced Kaposi's Sarcoma. *Journal of Cancer Research*, 70, 2180– 2190.
- 96- Viglianti, B. L., Abraham, S. A., Michelich, C. R., Yarmolenko, P. S., MacFall, J. R., Bally, M. B. ve diğerleri. (2004). In Vivo Monitoring of Tissue Pharmacokinetics of Liposome/ Drug Using MRI: Illustration of Targeted Delivery. *Magnetic Resonance in Medicine*, 51, 1153– 1162.
- 97- Douillard JY, Cunningham D ve Roth A v.d. (1999). A Randomized Phase III Trial Comparing Irinotecan + 5-FU/ Folinic Acid to the Same Schedule of 5-FU/ FA in Patients with Metastatic Colorectal Cancer as Front Line Chemotherapy. *American Society of Clinical Oncology*, 18, 233.
- 98- Margolis, L. B., Namiot, V. A. ve Kljukin, L. M. (1983). Magnetoliposomes: Another Principle of Cell Sorting. *Biochimica et Biophysica Acta*, 735, 193– 195.

- 99- Alexander HR, Kelsen DG ve Tepper JC. (1997). Cancer of the stomach. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 5th edition, ed. De Vita VT, Hellman S ve Rosenberg SA. Philadelphia: PA, Lippincott, 21-53.
- 100- Moertel ChG, Fleming TG ve MacDonald JS, v.d (1990). Levamisole and Fluoroucil for Adjuvant Therapy of Resected Colon Carcinoma. *The New England Journal of Medicine*, 3121, 352-8.
- 101- Twelves Ch, Harper P, van Cutsum E v.d. (1999). A Phase III Trial of Xeloda® (Capecitabine) in Previously Untreated Advanced/ Metastatic Colorectal Cancer. *American Society of Clinical Oncology*, 18, 263.
- 102- Grem J.L. (2000). 5-fluorouracil: Forty-Plus and Still Ticking. A Review of its Preclinical and Clinical Development. *Investigational New Drugs*, 18, 299–313.
- 103- Petrelli N, Douglass Jr HO. ve Herrera L et al. (1989). The Modulation of Fluorouracil With Leucovorin in Metastatic Colorectal Carcinoma: A Prospective Randomized Phase III Trial. Gastrointestinal Tumor Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 7, 1419–1426.
- 104- Del Vecchio M, Procopio G ve Cassata A et al. (1999). Fluoropyrimidines in the Treatment of Advanced Neoplastic Diseases: Role and Advantages of UFT. *Tumori*, 85, 6–11.
- 105- Pinedo HM, Peters GJ. (1988). Fluorouracil: Biochemistry and Pharmacology. *Journal of Clinical Oncology*, 6, 1653–1664.
- 106- Bajetta E, Carnaghi C, Somma L et al. (1996). *A Pilot Safety Study of Capecitabine, a New Oral Fluoropyrimidine, in Patients with Advanced Neoplastic Disease*. Scientific Electronic Library Online, <http://www.scielo.br/img/fbpe/bjmbr/v34n9/html/4055i01.htm>.
- 107- Grem JL, Schoemaker DD, Petrelli NJ ve Douglass HO. (1987). Severe Life Threatening Toxicities Observed in Study Using Leucovorin With 5-Fluorouracil. *Journal of Clinical Oncology*, 6, 1704.
- 108- Grant, C. W., Stephen, K. ve Florio, E. (1989). A Liposomal MRI

- Contrast Agent: Phosphatidylethanolamine-DTPA-PE. *Magnetic Resonance in Medicine*, 11 (2), 236-243.
- 109- Bangham, A. D., Standish, M.M. ve Watkins, J.C. (1965). Diffusion of Univalent Ions Across the Lamellae of Swollen Phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13, 238-252.
- 110- Rouser, G., Fleischer, S. ve Yamamoto, A. (1970). Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Separation of Polar Lipids and Determination of Phospholipids by Phosphorus Analysis of Spots. *Lipids*, 5 (5), 494-496.
- 111- Skoog, D.A., Holler, F.J. ve Nieman, T.A. (1998). *Principles of Instrumental Analysis*, ABD: Sonders College Publishing, 404- 413.
- 112- Arıca, B. (1992). *Primakin Difosfat Lipozomlarının Formülasyonu, In Vitro Salımmesi ve In Vivo Dağılımı Üzerinde Çalışmalar*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- 113- Mazda, F. (1993). *Kozmetik Amaçlı Üre Lipozom ve Niozomlarının Formülasyonları, Hazırlanması ve In Vitro, In Vivo Değerlendirilmeleri*. Ankara: Hacettepe Üniversitesi.
- 114- A.Y. Özer, H. Talsma (1989). Preparation and Stability of Liposomes Containing 5-Fluorouracil. *International Journal of Pharmaceutics*, 5, 55, 185-191.
- 115- S. M. Bayomi, A. A. Al- Badr, ve K. Florey (eds.) (1989). *Analytical Profiles of Drug Substances*, 18, New York: Academic Press, 630.
- 116- Stern WH, Guerin C.J. ve Ericson PA, et al. (1983). Ocular Toxicity of Fluorouracil After Vitrectomy. *American Journal of Ophthalmology*, 96, 43.
- 117- Genetiks, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, 5 Floro Urasilin Toksisitesi, <http://www.genetiks.com.tr/tr/dpd-dna-testi-5-fluorourasil-toksisitesi>

- 118- Huang SSD, Blumenkranz MS ve Hernandez E., et al. (1988). Uptake and Clearance of 5-Fluorouridine Following Periocular and Intraocular Injection, *Retina*, 8, 205.
- 119- Flandroy P: M.J., Grandfils C. ve Jerome R.J. (1990). Clinical Applications of Microspheres in Embolization and Chemoembolization: A Comprehensive Review and Perspectives. *Topical Drug Delievery Formulations*, Eds.: D.W. Osborne, A.H. Amann, New York: Marcel Dekker, Inc., 321-366.
- 120- Mc. Carthy, J.R. (2009). The Future of Theranostic Nanoagents. *Nanomedicine*, 4, 693- 695.
- 121- Y. Liu, H. Miyoshi, M. MNakamura (2007). Nanomedicine for Drug Delievery and İmagining: A Promising Avenue for Cancer Therapy and Diagnosis using Targeted Functional Nanoparticles. *International Journal of Cancer*, 120, 2527- 2537.
- 122- W. Cai, X. Chen (2007). Nanoplatforms for targeted molecular imaging in living subjects. *Small*, Vol: 3, 1840- 1854.
- 123- Warner S. (2004). Diagnostics Plus Therapy= Theranostics. *Scientist*, 18, 38- 39.
- 124- H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura ve K. Hori, (2000). Tumor Vascular Permeability and the AGT Effect in Macromolecular Therapeutics: A Review. *Journal of Controlled Release*, 65, 271– 284.
- 125- G. Coral (2000). *Lipozom Protoplast Elektrofüzyon Metoduyla Aspergillus Niger Kökenli Glikoamilaz Geninin Saccharomyces Cerevisiae Hücrelerine Aktarılması Ve Ekspresyonu*, Doktora Tezi, Mersin Üniversitesi.
- 126- Weissig, V., Whiteman, K.R. ve Torchilin, V.P. (1998). Accumulation of Protein-Loaded Long-Circulating Micelles and Liposomes in Subcutaneous Lewis Lung Carcinoma in Mice. *Pharmaceutical Research*, 15, 1552-1556.
- 127- Williams K J., Tall A.R. (1988). Interaction of Liposomes with

Lipoproteins: Relevance to Drug Delivery Systems and to the Treatment of Atherosclerosis. *Liposomes as Drug Carriers*, ed. Gregoriadis G., New York: John Wiley and Sons, 93.

- 128- Gregoriadis, G. (1989). Liposomes as carriers of drugs. Observations on Vesicle Fate after Injection and its Control. *Subcellular Biochemistry*, 14, 34, 363-78.
- 129- Erdoğan, S., Özer, A.Y., Ercan, M.T. ve Hıncal, A.A. (2000). Scintigraphic Imaging of Infections with 99m-Tc Labelled Glutathione Liposomes. *Journal of Microencapsulation*, 17, 459-465.
- 130- Wang, X., et al. (2008). Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging. *A Cancer Journal For Clinicals*, 58, 97.
- 131- Rao B.M., Srinivasu M.K., Kumar K.P., Bhradwaj N., Ravi R., Mohakhud P.K. ve diğerleri (2005). A Stability Indicating LC Method for Rivastigmine Hydrogen Tartarate. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37, 57-63.
- 132- Working PK, Newman SMS ve Johnson J, et al. (1997). Safety of Poly (Ethyleneglycol) and Poly (Ethylene Glycol) Derivatives. Haris J.M., Zaplinsky S. eds., *Poly (ethylen glycol): Chemistry and Biological Applications*, San Francisco, CA.: American Chemical Society, 45-59.
- 133- Levchenko T. S., Rammohan R., Lukyanov A. N., Whiteman K. R. ve Torchilin V. P. (2002). .Liposome Clearance in Mice: The Effect of a Separate and Combined Presence of Surface Charge and Polymer Coating. *International Journal of Pharmaceutics*, 240, 95-102.
- 134- Litzinger D. C., Brown J. M., Wala I., Kaufman S. A., Van G. Y., Farrell C. L. ve diğerleri (1996). Fate of Cationic Liposomes and Their Complex with Oligonucleotide in Vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1281, 139-149.
- 135- Campbell R. B., Balasubramanian S. V. ve Straubinger R. M. (2001). Influence of Cationic Lipids on the Stability and Membrane Properties of Paclitaxel-Containing Liposomes. *Journal of Pharmaceutical Sciences*,

- 90, 1091-1105.
- 136- Bakker-Woudenberg, I.A., Storm, G. ve Woodle, M. C. (1994). Liposomes in The Treatment of Infections. *Journal of Drug Targeting*, 2 (Suppl: 5), 363-371.
- 137- Harsanyi, B.B., Hilchie, J.C., ve Mezei, M. (1986). Liposomes as Drug Carriers for Oral Ulcers. *Journal of Dental Research*, 65 (9), 1133-1141.
- 138- Stern WH, Lewis GP ve Ericson P.A. (1983). Fluorouracil Therapy for Proliferative Vitreoretinopathy after Vitrectomy. *American Journal of Ophthalmology*, 96, 33.
- 139- Lopez-Berestein, G., Hopfer, R., Mehta, R., Mehta, K. Hersh, E.M. ve Juliano, R.L. (1984). Liposome Encapsulated Amphotericin B in Disseminated Candidiasis in Neutropenic Mice. *International Journal of Infectious Diseases*, 150 (2), 278-283.
- 140- Doerschuk C.M., Gie R. P., Bally M. B., Cullis P.R. ve Reinish L. W. (1989). Platelet Distribution in Rabbits Following Infusion of Liposomes. *Thrombosis and Haemostasis*, 61 (3), 392.
- 141- Weiner N, Martin F, Riaz M. (1989). Liposomes as Drug Delivery System, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 15, 1523-1554.
- 142- Hoiuchi A., Satou T., Akao N., Koike K., Fujita K. ve Nikaido T. (2005). The Effect of Free and Polyethylene Glycol-Liposome-Entrapped Albendazole on Larval Mobility and Number in *Toxocara Canis* Infected Mice. *Veterinary Parasitology*, 129, 83-87.
- 143- Stevenson C.L., Augustijns P.F. ve Hendren R.W. (1999). Use of Caco-2 Cells and LC/MS/MS to Screen a Peptide Combinatorial Library for Permeable Structures. *International Journal of Pharmaceutics*, 177, 103-115.
- 144- Nounou M.M, El-khordagui LK, Khalafallah NA ve Khalil S.A. (2006) In Vitro Release of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs from Liposomal Dispersions and Gels. *Journal of Acta Pharmaceutica Scientia*, 56, 311-24.

- 145- Kamaly N., Kalber T. ve Ahmad A, et al. (2008). Bimodal Paramagnetic and Fluorescent Liposomes for Cellular and Tumor Magnetic Resonance Imaging. *Bioconjugate Chemistry*, 19, 118–129.
- 146- Gümüşderelioğlu, H. (1988). *Ca-aljinat Jellerin Uyarı-cevap Karakteristikleri ve bu Jellerin Ağızdan Alınan Geciktirilmiş İlaç Salım Sistemlerinde Kullanılabilirliğinin Araştırılması*, Yüksek Lisans Tezi. Ankara.
- 147- M. L. Immordino, F. Dosio, ve L. Cattel (2006). Stealth Liposomes: Review of The Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential. *International Journal of Nanomedicine*, 1, 297–315.
- 148- E. Yang, W. H. Huestis (1993). Mechanism of İntermembrane Phosphatidylcholine Transfer—Effects of pH and Membrane Configuration. *Biochemistry*, 32, (45), 12218–12228.
- 149- Al-Angary, A. A., Bayomi, M. A., Khidr, S. H., Al-Meshal ve M. A., Al-Dardiri, M. (1995). Characterization, Stability And in Vivo Targeting of Liposomal Formulations Containing Cyclosporin. *International Journal of Pharmaceutics*, 114 (2), 221-225.
- 150- D. Rajendran, S. Senthil Kumar, S. A. Dhanaraj, Rajeev Dube ve B. Suresh (1997). Comparative Evaluation of Targeting Efficiency of Charged and Neutral Liposomes of 5-Fluorouracil. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 23, 1099-1104.
- 151- Frokjaar, S., Hijorth, E.L. ve Worts, O. (1984). Stability Testing of Liposomes during Storage. in Gregoriadis G. (Ed.) *Liposome Technology* , Vol. 1, Florida: GRC Press, Boca Raton, 235- 244.
- 152- Du Plessis J., Weiner N., Muller D.G. ve Ramachandran C., (1996). The Influence of Lipid Composition and Lamellarity of Liposomes on the Physical Stability of Liposomes upon Storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 127, 273.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı : Flonja LIKO
Uyruk: Arnavutluk
Doğum Tarihi – Yeri: 27.05.1986 – Tiran/ Arnavutluk

EĞİTİM BİLGİLERİ

Lisans

Yıl: 2004–2008
Okul: Ankara Üniversitesi
Yer: Ankara
Bölüm: ECZACILIK Fakültesi

Lise

Yıl: 2000-2004
Okul: Turgut Özal' koleji- Genel Lise Eğitimi (Özel Türk Kız Koleji)
Yer: Tiran/ Arnavutluk

YABANCI DİLLER

Arnavutça : Ana Dili/ Anlama, yazma ve konuşma: çok iyi düzeyde
Türkçe : Anlama, yazma ve konuşma: çok iyi düzeyde
İngilizce: Anlama, yazma ve konuşma: çok iyi düzeyde
İtalyanca: Anlama, yazma ve konuşma: çok iyi düzeyde

1. 2004 yılında Arnavutluk'ta, ülke çapında yapılan Ulusal Biyoloji Olimpiyatında birinci seçildi ve TCS sınavına da girdikten sonra, Arnavutluk Milli Eğitim Bakanlığı'nın verdiği burslardan birini kazanarak Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesinde okudu.
2. 2007 yılında Tiran Askeri Hastanesinde Arnavutluk Savunma Bakanlığında finanse edilen bir staj yaptı.
3. 2011 yılında Sarı Basın Kartı verildi.

İŞ DENEYİMLERİ

Türkiye Radyo Televizyon Genel Müdürlüğü (TRT)

Yabancı Dil ve Lehçeler Müdürlüğü

Dış Yayınlar Dairesi Başkanlığı

Arnavutça Masası

Yıl: Eylül 2008 – devam ediyor

İnternet Adresi: www.trtworld.com;
www.trtalbanian.com.tr

Departman ve Görev:

TRT Dış Yayınlar Dairesi, Arnavutça Masası; Uzman Mütercim ve Spiker

Görev Açıklaması:

Haber bültenlerini, Türk ve dünya basın özetleri ve programları Türkçeden Arnavutça'ya veya Arnavutça'dan Türkçeye çevirmek, Türkiye'nin Sesi Radyosunda spiker olarak çalışmak, Windows Office programları, Adobe Audition, Adobe Photoshop, Ulead Video Studio, TRT İçerik Sistemi, Disyayros Sistemi vs kullanarak değişik montajlar ve teknik işler yapmak, haber ve program hazırlamak, internet yayıncılığında çalışmak, TRT'nin radyo ve televizyon programlarında mütercim olmak...

Yer: Ankara