

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**RADYOİŞARETLİ BEVACİZUMAB'IN
RADYOFARMASÖTİK
POTANSİYELİNİN İNCELENMESİ**

İlknur DEMİR

Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Bilim Dalı Kodu : 622.02.01

Sunuş Tarihi : 15 .01.2009

Tez Danışmanı: Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Bornova, İZMİR

ÖZET**RADYOİŞARETLİ BEVACİZUMAB'IN
RADYOFARMASÖTİK POTANSİYELİNİN
İNCELENMESİ****DEMİR, İlknur****Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı****Tez Yöneticisi : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER****Ocak 2009, 61 sayfa**

Anjiogenezis, tümör gelişimini içeren bir çok fizyolojik ve patolojik proseslerde önemli bir rol oynamaktadır. Vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF); tümör hücreleri ile ilişkili tümör anjiogenezisde önemli bir büyüme faktörüdür. Bevacizumab (BevMab) VEGF'ye karşı geliştirilmiş hümanize monoklonal antikör olup, VEGF'nin endotel hücre yüzey reseptörlerine bağlanmasını inhibe eder. Food and Drug Administration (FDA) tarafından önerilen çeşitli solid tümörlerinin tedavisinde kullanılan ilk antianjiogenik ilaçtır.

Bu çalışmanın esası VEGF'yi *in vivo* olarak görüntülemeye kullanılabilecek ^{99m}Tc ile işaretli bir antianjiogenik ajan geliştirmektir.

Bu amaçla BevMab; hidrofilik bir grup olan dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) ile konjuge edilip, yapı hidrofilik hale getirilerek ^{99m}Tc radyonüklidi ile kalay klorür indirgeme yöntemine göre işaretlenmiştir.

Radyoişaretli bileşiğin kalite kontrol çalışmaları İnce Tabaka Radyo Kromatografi (TLRC) ve Yüksek Performanslı Sıvı Radyo Kromatografi yöntemleri kullanılarak yapılmış ve bağlanma verimi % 95'in üzerinde belirlenmiştir. Biyodağılım çalışmaları dişi ve erkek Albino Wistar sıçanlar üzerinde gerçekleştirilmiş gram doku başına enjekte edilen doz değerleri hesaplanarak zamanla değişimi incelenmiştir. Tüm deneysel veriler SPSS 13 programı kullanılarak istatistiksel değerlendirme yapılmıştır.

^{99m}Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin *in vivo* olarak VEGF'yi görüntüleme bir antianjiogenik konjugat olarak kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

Keywords: Anjiogenesis VEGF, Bevacizumab, ^{99m}Tc, ^{99m}Tc-BevMab-DTPA.

ABSTRACT

**INVESTIGATION OF RADIOPHARMACEUTICAL
POTENTIAL OF RADIOLABELED BEVACIZUMAB**

DEMİR, İlknur

Yüksek Lisans Tezi, Nükleer Bilimler Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi : Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER

Ocak 2009, 61 sayfa

Angiogenesis plays a crucial role in many physiological and pathologic processes including tumor growth. Vascular endothelial growth factor (VEGF), released by tumor cells, is an important growth factor in tumor angiogenesis. Bevacizumab (BevMab), a humanized monoclonal antibody against VEGF, binds to soluble VEGF, preventing receptor binding and inhibiting endothelial cell proliferation and vessel formation. It is the first antiangiogenic treatment in various solid tumors approved by the American Food and Drug Administration.

The goal of this study is to develop an antiangiogenic agent radiolabeled with ^{99m}Tc and to be used for *in vivo* imaging of VEGF.

For this purpose, BevMab was conjugated with the hydrophilic group diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA) and the product was labeled with ^{99m}Tc using stannous chloride reducing method.

VIII

The quality control studies of radiolabeled compound (^{99m}Tc -BevMab-DTPA) were done with Thin Layer Radio Chromatography (TLRC) and High Performance Liquid Radio Chromatography (HPLRC) methods ($\% 95 \leq$) to confirm labeling efficiency. The biodistribution studies are performed on female and male Albino Wistar rats. The injected dose per gram tissue is calculated and time-activity curves are examined. All the experimental data are evaluated using statistical SPSS 13 program.

^{99m}Tc -BevMab-DTPA may be used for *in vivo* VEGF imaging agent as an antiangiogenic conjugate.

Keywords: Angiogenesis VEGF, Bevacizumab, ^{99m}Tc , ^{99m}Tc -BevMab-DTPA.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince ve tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar ki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen, benim için çok değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. F. Zümrüt BİBER MÜFTÜLER'e, bilimsel, verimli ve destekleyici bir ortam için Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı Başkanı ve Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Perihan ÜNAK'a teşekkürlerimi sunarım. Çalışmalarım süresince beni yalnız bırakmayan dostluğunu ve yardımlarını esirgemeyen başta Çiğdem İÇHEDEF'e ve tüm arkadaşlarıma, her türlü maddi ve manevi desteğiyle hep yanımda olan anneme teşekkür ederim.

İlknur DEMİR

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	V
ABSTRACT.....	VII
TEŞEKKÜR.....	IX
İÇİNDEKİLER.....	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	XVIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1 Kanser Nedir?.....	4
2.2 Anjiogenezis Nedir?.....	5
2.2.1 Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF).....	7
2.3 Kanser ve Anjiogenezis	9
2.4 Antikor	11
2.5 Bevacizumab.....	12

İÇİNDEKİLER (Devam)

	<u>Sayfa</u>
2.5.1 Kanser ve Bevacizumab.....	14
2.6 Radyoışaretli Anti VEGF Ajanlar	16
2.7 Teknesyum-99m (^{99m} Tc) Kimyası.....	17
2.7.1 ^{99m} Tc işaretli bileşiklerin kalite kontrolü.....	18
2.7.1.1 İnce tabaka kromatografisi.....	19
2.7.1.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC).....	20
3. MATERYAL VE METOD	22
3.1 Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar.....	22
3.1.1 Kullanılan Kimyasallar.....	22
3.1.2 Kullanılan Cihazlar.....	23
3.2 Kimyasal Sentez Basamakları	23
3.2.1 BevMab bileşiğinin saflaştırılması.....	23
3.2.2 BevMab bileşiğinin DTPA ile Konjugasyonu (BevMab-DTPA)	23
3.3 İnaktif Bileşenler İçin Kullanılan Kromatografik Yöntemler ...	25
3.3.1 TLC Yöntemi	25
3.3.2 HPLC Yöntemi	26

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
3.4 İşaretleme Yöntemi	26
3.4.1 ^{99m} Tc-DTPA çözeltisinin hazırlanması.....	26
3.4.2 ^{99m} Tc-BevMab-DTPA çözeltisinin hazırlanması.....	27
3.5 Radyoişaretleli Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler.....	27
3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi.....	27
3.6 n-Octanol / Su Oranın Bulunması (Lipofilite).....	28
3.7 Serum Stabilite	29
3.8 Dişi ve Erkek Albino Wistar Sıçanlar Üzerinde Yapılan Biyodağılım Çalışmaları.....	29
3.9 İstatistik Analizler.....	30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	31
4.1 İnaktif Bileşenler (BevMab, DTPA, BevMab-DTPA) için Kullanılan Kromatografik Yöntem ve Sonuçlar.....	31
4.1.1 TLC yöntemi ile elde edilen R _f sonuçları.....	31
4.1.2 HPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar.....	31
4.2 Radyoişaretleli Bileşiklerin Kalite Kontrol Sonuçları	32
4.2.1 HPLRC yöntemi ile elde edilen radyoişaretleli bileşiklere ait kromatogramlar.....	32
4.2.2 TLRC ile elde edilen sonuçlar	34

İÇİNDEKİLER (Devam)	<u>Sayfa</u>
4.3 n-Octanol / Su oranı (Lipofilite) sonuçları.....	37
4.4 Serumda stabilite sonuçları.....	37
4.5 Erkek ve Dişi Albino Wistar sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarının sonucu.....	38
4.5.1. Erkek sıçanlar üzerinde biyodağılım sonuçları	38
4.5.2 Dişi sıçanlar üzerinde biyodağılım sonuçları	39
4.6 İstatistik Analiz Sonuçları	45
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	49
6. KAYNAKLAR DİZİNİ	50
7. ÖZGEÇMİŞ	61

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Kadınlarda kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.....	5
2.2 Erkeklerde kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.....	5
2.3 Anjiogenezis	7
2.4 Anjiogenezis ve Kanser	10
2.5 Genel bir antikor şekli	11
2.6 Bevacizumab	13
2.7 Bevacizumab ve tümör ilişkili anjiogenez	15
2.8 Bevacizumab'ın etki mekanizması.....	15
2.9 ⁹⁹ Mo'un ⁹⁹ Tc'a bozunması	18
2.10 İnce tabaka kromatografisi.....	19
2.11 Temel bir HPLC sistemi	21
3.1 BevMab-DTPA bileşiğinin oluşum mekanizması.....	24

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.2 Örnek damlatma ve kromatografi yürütme işlemi.....	25
3.3 TLC scanner cihazı.....	28
4.1 BevMab,DTPA, BevMab-DTPA, bileşiklerinin HPLC kromatogramı.....	32
4.2 ^{99m} Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin HPLRC kromatogramı.....	33
4.3 ^{99m} Tc ve ^{99m} Tc-BevMab-DTPA HPLRC kromatogramı.....	33
4.4. ^{99m} Tc-DTPA bileşiğine ait TLRC kromatogramı	35
4.5. ^{99m} Tc-BevMab-DTPA bileşiğine ait TLRC kromatogramı.....	35
4.6. ^{99m} TcO ₄ ⁻² 'ün TLRC kromatogramı	36
4.7. İnd ^{99m} Tc'nin TLRC kromatogramı.....	36
4.8. ^{99m} Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin serum stabilitesi.....	38

ŞEKİLLER DİZİNİ (Devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.9. Erkek Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılım grafiği.....	41
4.10. Dişi Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılım grafiği.....	41

ÇİZELGE DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.....	26
4.1 BevMab, DTPA ve BevMab-DTPA bileşiklerinin su'daki Rf değerleri.....	31
4.2. ^{99m} Tc ile işaretli bileşikler ve radyoaktif bileşenlere ait Rf değerleri.....	34
4.3. Bileşiklerin LogP değerleri.....	37
4.4. Erkek Albino Wistar sıçanlarda ^{99m} Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin % ID / g (organ) verileri.....	39
4.5 Dişi Albino Wistar sıçanlarda ^{99m} Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin % ID / g (organ) verileri.....	40
4.6. Varyans analizi sonucuna göre erkek sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri.....	46
4.7. Varyans analizi sonucuna göre dişi sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri.....	47
4.8. Pearson korelasyonuna göre erkek sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P değerleri.....	47

ÇİZELGE DİZİNİ (Devam)

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
4.9 Pearson korelasyonuna göre dişi sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P değerleri.....	48

1. GİRİŞ

Çoğu kanser türünün insan vücudunda büyüme ve yayılma mekanizması benzer şekilde olup, tümör hücrelerinin damar yoluyla beslenerek buldukları dokulardan farklı çevre dokulara yayılım göstermesi şeklindedir. Yayılma; primer tümörün bitişik doku içindeki uzantısı olan lokal yayılma ya da malign tümörlerden ayrılan hücrelerin yeni tümör odakları oluşturarak buldukları doku dışında başka bölgelere sıçraması olan metastatik yayılma şeklindedir (Franks et al., 1996; Hiçyılmaz, 2005).

Tümörler etraf damarlardan difüzyonla beslenir ve en fazla 0.5 – 1 cm³'lük hacme kadar büyüeyebilirler. Bu hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiogenez gereklidir (Folkman, 1971). Anjiogenez; var olan damarlardan kılcal damarların oluşması olarak ifade edilmektedir. (Ribatti et al., 1999). Tümör gelişiminde ise anjiogenez en önemli parametrelerden biridir. Anjiogenezis olmadan primer tümörün gelişmesi ve metastaz oluşumu gerçekleşemez. Tümör ilişkili anjiogenez; spesifik büyüme faktörlerine, endotel hücre reseptörlerinin aktivasyonuna ve endotel hücrelerinin çoğalma kapasiteleri ile buna hizmet eden hücre dışı matriks komponentlerine bağlı olarak değişim gösterir (Zhong and Bowen, 2006; Güran, 2004).

Tümör anjiogenezinde diğer bir önemli faktör ise tümör hücreleri tarafından salgılanan damar endotel büyüme faktörüdür (VEGF) (Nagengast et al., 2007). Anjiogenik moleküller içinde en önemlisi ve

üzerinde en çok durulanı VEGF olup, VEGFR-1 ve VEGFR-2 reseptörlerini aktive ederek anjiogenezi başlatır. VEGF anti anjiogenik terapi için istenen bir hedefdir. Çünkü VEGF reseptörleri sadece genetik olarak kararlı non-neoplastik endotel hücrelerde bulunmaktadır ve normal endotelium ile kıyaslandığında tümör damarları içerisinde düzensizdir (Raymond and Ruddon, 2007).

Günümüz teknolojiyle birlikte anjiyogenez mekanizmaları üzerine çalışılmış ve anti anjiogenik tedavi yaklaşımları geliştirilmeye başlanmıştır. VEGF'in etkinliğini önlemek için kullanılan mekanizmalardan biri monoklonal antikorlardır. Çeşitli hedef moleküllere yönelik bu moleküller kanser tedavisinde en etkin araçlar olarak kullanılmaktadır (Jimeno et al., 2005; Heinemann et al., 2008; Patel et al., 2009).

Tümör anjiogenezinde solid tümör davranışlarında VEGF etkilerini engellemek için son birkaç yılda geliştirilen anti kanser ajanlardan biri olan Bevacizumab (BevMab); anjiogenezi inhibe ederek meme, kolon, pankreas, prostat, yumurtalık, üriner sistem ve santral sinir sistem kanserlerinde tümör dokusunda VEGF'ye duyarlı monoklonal antikor olan ilk ilaçtır. Bevacizumab vücuttaki kan ve lenf damarları üzerinde bulunan VEGF proteinine bağlanarak, kan damarlarının gelişimini bloklayarak tümör gelişimini engeller. Faz I çalışmalarında kemoterapi ile birlikte kullanıldığında serum VEGF seviyelerini ölçülemeyecek seviyelere kadar düşürdüğü ve farklı tümörlerde büyümeyi inhibe ettiği bulunmuştur (Roche San. A.Ş., 2004). Bu çalışmanın çıkış maddesi olan anti VEGF olarak bilinen Bevacizumab'ın

klirik uygulamalarıyla ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Özellikle gözde makula dejenerasyonu ve korneal anjiogenezis ile ilgili çok fazla sayıda çalışmalar yapılmıştır (Ghajarnia et al., 2007; Hosseini et al., 2007).

Radyonüklidle işaretli Bevacizumab'ın etki mekanizması ile ilgili olarak ise literatürde sadece ^{111}In , ^{89}Zr , ^{125}I ve ^{213}Bi ile ilgili çalışmalar mevcut olup $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli bir çalışmaya rastlanılmamıştır. ^{111}In ve ^{89}Zr ile radyoişaretli Bevacizumab'ın yumurtalık tümör hücrelerinde her iki işaretli bileşik için yüksek tutulum gösterdiği görülmüştür (Nagengast et al., 2007). ^{125}I ile işaretli Bevacizumab'ın solid tümörlerin tedavisinde intravenöz uygulama sonrası yapılan farmakokinetik çalışmaları; nude mice, sıçan, maymun ve tavşanlar üzerinde denenmiştir. Doku dağılımı ve farmakokinetik veriler radyoişaretli bileşiğin vücudun spesifik bölgelerinde toplandığını ve atılımın çok yavaş olduğunu göstermiştir (Lin et al., 1999). Bir başka çalışmada ise Bevacizumab'ın ^{213}Bi ve $^{205}\text{Bi}/^{206}\text{Bi}$ ile radyoimmunokonjugatları hazırlanmıştır. Bu çalışma kapsamında *in vitro* ve *in vivo* denemeler için iki farklı şelatlayıcı ajan (cDTPA ve CHX-A) kullanılarak radyoişaretleme verimleri kıyaslanmıştır. İşaretleme verimi cDTPA ajanının kullanıldığı radyo işaretli bileşik için diğerine göre daha yüksek bulunmuştur (Abbas et al., 2008). Bu çalışmanın esası; Bevacizumab gibi tedavi amacı ile kullanılan bir anti kanser ilacın, kimyasal bir ajan ile konjugasyonu sonucu, lipofiliteyi azaltıp, uygun gama enerjisine sahip kısa yarı ömürlü $^{99\text{m}}\text{Tc}$ radyonüklidi ile işaretleyerek bir kanser görüntüleme ajanına dönüştürülmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

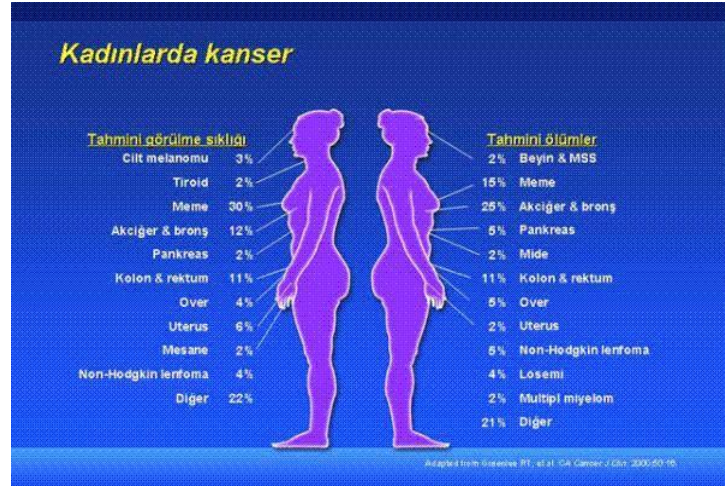
2.1 Kanser Nedir?

Vücudumuzda kontrol dışı çoğalan, çevre dokulara ve uzak organlara yayılma özelliği gösteren anormal hücre topluluklarına genel olarak kanser denir (www.memorial.com.tr).

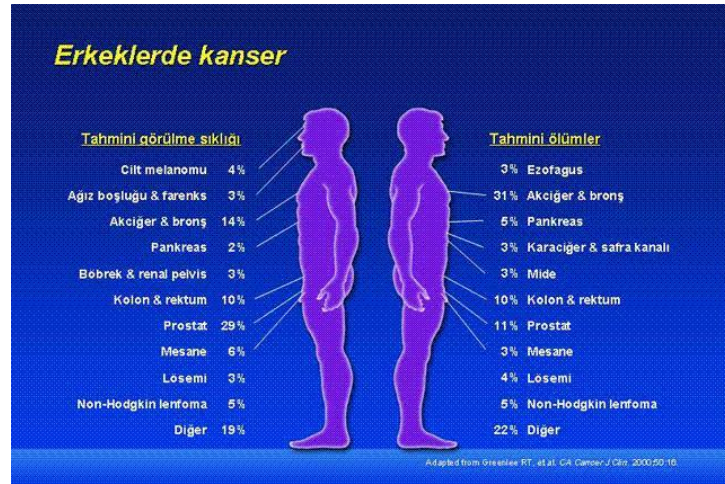
Günümüzde halen en önemli sağlık sorunlarından biri olan kanser; hücrelerin sürekli çoğalarak artan hücre sayısının normal olarak gerçekleşen hücre kaybıyla dengelenmemesi sonucu oluşur. Kanser, kan ve lenfotik sistem aracılığı ile vücudun diğer bölgelerine dağılarak damar yoluyla beslenir. Normal hücrelerin büyüme yeteneği sınırlı olup bazen büyümedeki bu sınırlanma yeteneği kaybolur ve sınırsız büyüyüp, çoğalan hücreler topluluğu oluşur. Buna “tümörleşme” denir. Tümör benign (iyi huylu) ve maning (kötü huylu) tümör olmak üzere iki kısımda incelenir.

Kanser hücrelerini normal hücrelerden ayıran en önemli özellikler; proliferatif büyüme, sinyal oluşumunda kendi kendine yetme, büyümeyi inhibe eden sinyallere karşı duyarsızlık, apoptozdan kaçma, sınırsız replikatif potansiyel kazanma, anjiogenezi devam ettirebilme, invazyon ve metastasın indüklenbilmesidir. Anjiogenezi indükleyici mekanizmaların, tümör hücrelerinin kendileri tarafından aktive edildiği gösterilmiştir (Blood et al.,1990; Halvorsen et al., 2000; Taşdemiroğlu., 2003).

İstatistiklere göre her yıl dünyada 11 milyon, Türkiye’de ise 150 bin kişi kansere yakalanmaktadır. (Kanser Yüku Raporu, 2006). Şekil 2.1 ve Şekil 2.2’de 2000 yılına ait kadın ve erkeklerde kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları hakkında tahmini değerler verilmektedir.



Şekil 2.1 Kadınlarda kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.



Şekil 2.2 Erkeklerde kanser görülme sıklığı ve ölüm oranları.

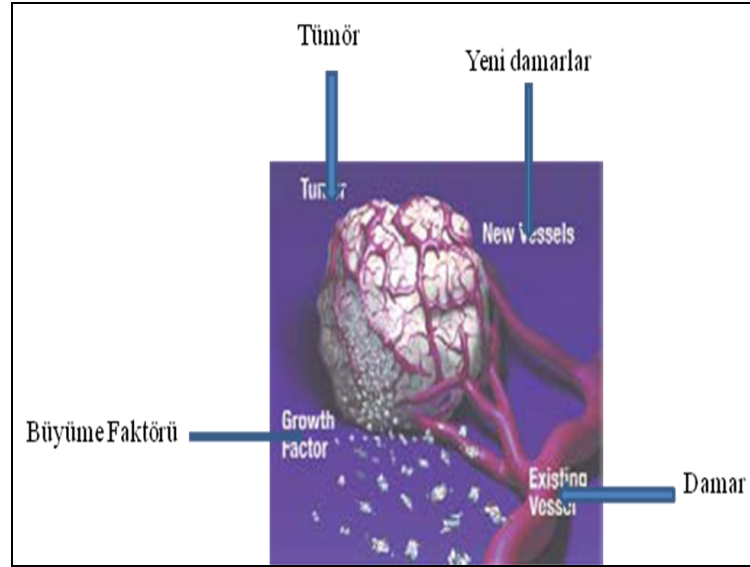
2.2 Anjiogenezis Nedir?

Yeni damar oluşumu ya da daha yaygın kullanılan adıyla anjiogenezis hakkında yapılan çalışmaların 18.yy da başladığı bilinmektedir. Bu konu ilk defa 1971'de Judah FOLKMAN tarafından tümör gelişiminin var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşumuna bağlı olduğunu içeren hipotezce önerilmiştir (Folkman, 1990; Ranieri et al., 2006).

Aktif anjiogenetik faktörler tümör hücrelerinin gelişiminde 2 mm'lik çapı geçtikten sonra hipoxiden dolayı salgılanırlar. Damarların bazal membranları yıkılmakta ve endotel hücreleri doku içerisine ilerleyerek yeni damar oluşumlarına neden olmaktadır (Macdonald et al., 2004) .

Kısaca damarlanma olarak bilinen anjiogenezis yaşam boyunca gelişim, ovulasyon ve kalpte yeni kolletaral damarların gelişmesi açısından istenen bir durumdur. Tümör gelişiminde ise anjiogenezis en önemli parametrelerden biri olup, tümör büyümesi ve metastazı için temeldir.

Bu nedenle tümörün büyümesi, metastazında ve kronik inflamatuvar hastalıklarda (romatoid artritid (RA), diabetik retinopati gibi) anjiogenezis istenmeyen bir süreçtir (Distler et al., 2002 ; Folkman, 1995, Salgado et al., 2004). Şekil 2.3' de anjiogenezis oluşumu görülmektedir.



Şekil 2.3 Anjiogenezis (www.gene.com).

2.2.1 Vasküler Endotel Büyüme Faktörü (VEGF)

Vasküler endotelial büyüme faktörü 6. kromozomun kısa kolunda lokalize molekül ağırlığı 45 kDA olan bir proteindir. Normal doku ve birçok tümör neovaskularizasyonunda önemli rol oynamaktadır (Thomas, 1996; Ferrara, 2003). VEGF ailesi VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF ve svVEGF (VEGF-F) adı verilen yedi üyeden oluşur. VEGF; endotel hücresi yüzeyinde bulunan reseptörlerine bağlanıp bu hücreyi etkilemektedir. Bu reseptörler VEGF reseptör-1, VEGF reseptör-2 ve VEGF reseptör-3 olup yaklaşık 1300 amino grup asitten oluşmaktadır (Demirci, 2006; Leslie et al., 2006).

Anjiogenezis; anjiogenik stimulus, anjiogenik faktörün salınımı (VEGF), mevcut kapiller damarlardan endotel hücrelerinin aktivasyonu, bazal membranın parçalanması, endotel hücrelerinin göçü, çoğalması ve olgunlaşarak tüpün meydana gelmesi ve yeni kapiller damarların oluşumu şeklindedir (Deveci, 2003). Bu zincirleme olaylarda görüleceği üzere VEGF salınımının önemli bir unsur olduğu anlaşılmaktadır. VEGF'nin hücre içindeki salınımının başlaması ile endotel hücreleri üzerinde bulunan VEGF reseptörlerine VEGF ligandı bağlanarak anjiogenezisi başlatacak olan gen uyarılır (Ferrara, 2004).

VEGF'in endotel hücreleri üzerinde bulunan transmembran tirozin kinaz reseptörlerine bağlanması ile tetiklenen sinyal yolu birçok seviyede farklı açılardan inhibe edilerek VEGF'in etkinliği önlenmektedir (Jung et al., 2002). Bu mekanizma VEGF inhibitörleri, VEGFR inhibitörleri ve monoklonal antikorlar şeklinde üç grupta toplanmaktadır.

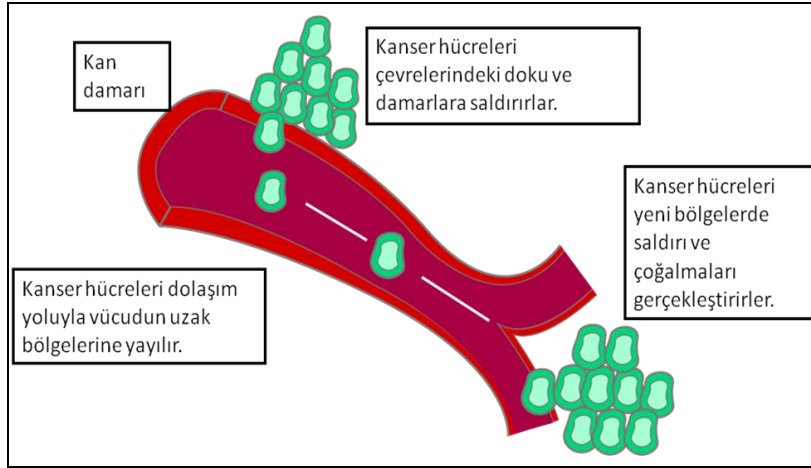
Çeşitli denemeler anti VEGF monoklonal antikorlar ile tedavinin insan tümörlerinin (glioblastoma ve rhabdomysarcoma) gelişimini azalttığını göstermiştir (Jimeno et al., 2005).

VEGF tümör anjiogenezisin yanı sıra post-natal damarlanma, yara iyileşmesi, retinada yeni damarlanma ve kalp damar hastalıkları dahil olmak üzere bir çok patofizyolojik durumda da oldukça önemlidir (Demirci, 2006).

2.3 Kanser ve Anjiogenezis

Tümörler besinlerini çevrelerindeki doku ve damarlardan sağlarlar, yeni damarlar olmaksızın etraf damarlardan difüzyonla beslenir ve en fazla 0.5 – 1 cm³'lük hacme kadar büyüebilirler. Bu hacimden sonra çoğalmaları ve metastaz yapabilmeleri için anjiogenez gereklidir (Folkman, 1971).

Tümör hücrelerinden, monosit, fibroblast gibi ortamdaki diğer hücrelerden ve kollajen matriksin yıkımı sonrasında açığa çıkan, spesifik büyüme faktörleri ve hücre dışı matriks komponentleri anjiogeneziste önemli parametrelerdir (Klagsbrun et al., 1996). Bilinen önemli anjiogenik faktörlerden bazıları; vasküler endotelial büyüme faktör (VEGF), epidermal büyüme faktör, hepatosit büyüme faktördür. Özellikle VEGF, tümör anjiogenezisinde kilit rol oynamaktadır (Lin et al., 1999; İncekara, 2006; Nagengast et al. 2007). VEGF; endotel hücreleri için uyarıcı özelliğinin yanı sıra, hücre dışı matriks yıkımından sorumlu enzimlerin aktivatörlerinin salınımını da uyarır. Böylelikle invazyon ve metastazı da kolaylaştırır (Ferrara, 1997).



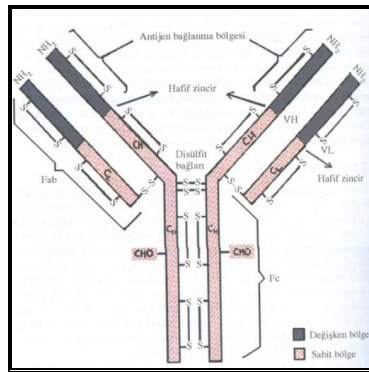
Şekil 2.4. Anjiogenezis ve Kanser (Lacouture , 2004).

Şekilde 2.4’de görüldüğü üzere tümör büyümesi ile birlikte artan kanlanma ihtiyacı anjiogenezis prosedürü ile sağlanır ve metastaz oluşur. Metastaz; malign tümörlerden ayrılan hücrelerin damarlar veya doku aralıkları ile uzak dokulara taşınarak buralarda yeni tümör odakları oluşturmasıdır. Bu noktada tümöre müdahale ve anjiogenezis inhibisyonu, etkili bir kanser tedavi seçeneği olarak gözükmektedir.

Günümüzde kanser araştırmalarının en heyecan verici alanlarından biri, anjiogenezi inhibe edici hedefli terapi şeklidir. Bu hedefli stratejilerinin çoğu monoklonal antikor kullanımını içermektedir. Monoklonal antikorlar ve monoklonal antikorlar ile kanser tespit etme ve tedavi geliştirme çalışmaları her tür kanser çeşidi için ilerlemekte olup, araştırmalarda kanserle bağlantılı antijenler bulunmakta, dolayısıyla kansere karşı daha fazla antikorlar hazırlanmaktadır.

2.4 Antikor

Antikor; kovalent olmayan bağlar yardımıyla antijene özgün ve antijene cevap olarak üretilen bir glikoproteindir. Sıklıkla, ‘immunoglobulin veya antibody’ olarak da adlandırılırlar (Arıcan, 2006). Şekil 2.5 genel bir antikor şeklini içermektedir.



Şekil 2.5 Genel bir antikor şekli.

Antikorlar 2 ağır ve 2 hafif olmak üzere 4 polipeptid zincirinden oluşur, ağır zincir 440 ile 550 amino asitten oluşurken, hafif zincirde ise 220 amino asit bulunmaktadır. Her bir zincir sabit ve değişken bölge olmak üzere iki yapıdan oluşur (Margaret et al., 2003). Antikorlar serbest veya çeşitli mikroorganizmaların yapısında bulunan antijenlere spesifik bir şekilde bağlanarak onların vücuttan temizlenmesini ve etkisiz hale getirilmesini sağlar. Antikorlar; monoklonal ve poliklonal olmak üzere iki şekildedir. Monoklonal antikor genetik mühendislik teknikleriyle üretilen ve yalnızca bir antijenik özelliği olan antikora verilen addır. Bir hücre klonundan üretildikleri için monoklonal olarak adlandırılan

antikorlar, laboratuvar ortamında yapay olarak üretilen ve yalnız kendisinin hedeflediği antijenlere bağlanan yapılardır. 1975 yılında İngiliz araştırmacı Cesar Milstein ve George Kohler tarafından Monoklonal antibody (MAb) teknolojisi geliştirilmiştir (Milstein, 1981).

Biyolojik deneylerde kullanılan büyük moleküllerin işaretlenmesinde, tümör tedavisinde kullanılan radyoaktif ya da sitotoksik ajanların oluşturulmasında kullanılmakta olan monoklonal antikolar, kanser tedavisinde de günümüzde en yoğun kullanım alanı bulan uygulamalardan biri olmuştur.

2.5 Bevacizumab

Tümör anjiogenezisinde solid tümör davranışlarında VEGF etkilerini engellemek için anti anjiogenik ve anti tümör etkinliği olan rekombinant insan monoklonal VEGF antikoru olan Bevacizumab, yeni kan damarlarının oluşmasını önleyen ve VEGF'nin VEGF1 ve VEGF2 reseptörlerine bağlanmasını inhibe eden ilk anti VEGF ilaç olma özelliğini taşır. Birçok tümör tipinde oldukça yüksek oranda sağkalım avantajı sağladığı bilinen bu ajan, özellikle metastatik kolon ve rektum kanseri olgularında kemoterapiye ek olarak kullanılan yeni bir antikanser ajandır (Wang et al., 2004; Gaudreault et al., 2005; Ranieri et al., 2006; Spitzer et al., 2007).

Bevacizumab, hümanize mürin antikorusunun komplementer-determinant bölgeleri VEGF'ye bağlanan, insan antikoru temel

bölgelerini içeren, 214 amino asitten oluşan, molekül ağırlığı yaklaşık 149.000 dalton olan bir ilaçtır (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Bevacizumab (www.gene.com).

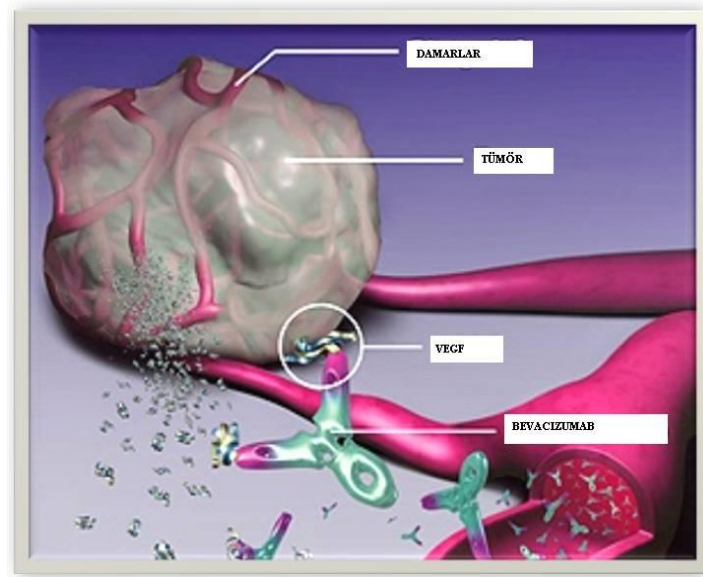
Gentamisin antibiyotiği içeren besi ortamındaki Chinese Hamster'ın over memeli hücresi ekspresyon sisteminde, rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulur ve spesifik viral inaktivasyon ve çıkarılma aşamalarından oluşan bir süreç ile saflaştırılır. Bevacizumab yüksek afinite ve neovaskularizasyonunun inhibisyonunu doğrudan sitotoksik etki yapmaksızın hedefler.

Kolon kanserinin tedavisi için uygulanan standart ilaç tedavisi ile kombine olarak intravenöz yoldan verildiğinde, hastaların yaşamında yaklaşık beş aylık bir uzama sağladığı gösterilmiştir. (Roche San. A. Ş., 2004). Bu nedenle kolorektal, meme, akciğer, prostat, renal kanser türleri, diyabetik retinopati ve yaşlanmaya bağlı yaş tip makula dejenerasyonunun tedavisinde de denenmiş olup, 2004 yılında Food and

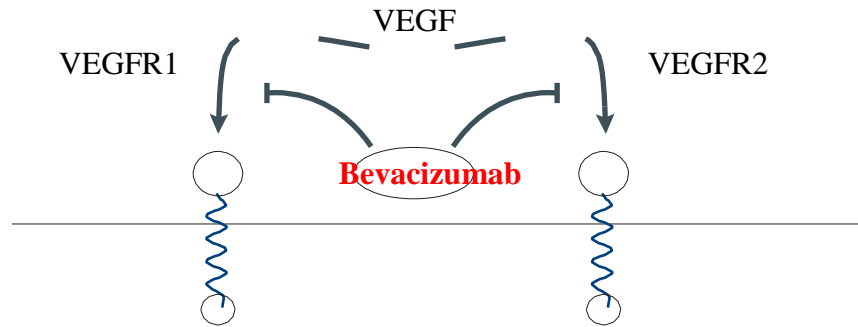
Drug Administration (FDA) tarafından metastatik kolon veya rektum kanserli hastalarda olmak üzere intravenöz 5-florourasil ile sürdürülen tedavide kombine olarak birinci sıra tedavi için onaylamıştır (Ghajarnia et al., 2007; Roche, San.A.Ş., 2004).

2.5.1 Kanser ve Bevacizumab

Bu ajan etkisini yeni kan damarlarının oluşumunu stimule eden doğal bir protein olan VEGF'yi hedefleyip inhibe ederek gösterir. Nagengast ve arkadaşlarında çalışmalarında belirttiği gibi insan monoklonal antikoruna bevacizumab'ın bağlanarak VEGF'nin neden olduğu tümör anjiogenezini durdurup böylece VEGF'yi nötralleştirdiğini vurgulamışlardır (Nagengast et al., 2007). Şekil 2.7. Bevacizumab ve tümör ilişkili anjiogenezisi, Şekil 2.8'de ise Bevacizumab'ın etki mekanizmasını göstermektedir.



Şekil 2.7 Bevacizumab ve tümör ilişkili anjiogenez (www.gene.com).



Şekil 2.8 Bevacizumab'ın etki mekanizması.

Yukarıdaki gibi Bevacizumab VEGF'ye bağlanarak ve VEGF'nin endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan VEGFR1 ve VEGFR2 reseptörlerine bağlanmasını önleyerek VEGF yeni kan damarlarının oluşumunda önemli bir rol oynar (Presta et al., 1997, Roche San.A.Ş., 2004).

2.6 Radyoışaretli Anti VEGF Ajanlar

Kanserin teşhis ve tedavisinde kullanım amaçlı çeşitli radyoizotoplarla işaretli monoklonal antikorlar önemli bir potansiyele sahiptir (Anderson et al., 1985, Jimeno et al.; 2005, Slapnicková, 2007; Stollman, 2008; Chen et al., 2008). Gama yayınlı, pozitron, beta parçacıkları veren radyonüklidlerle işaretli antikorlar, primer ya da metastatik kanserlerin sintigrafik dedeksiyonunda ve anjiogenezis mekanizması ile ilişkili reseptörlerin görüntülenmesi için kullanılmaktadır (Bouziotis et al., 2006; Matsumura et al., 2008).

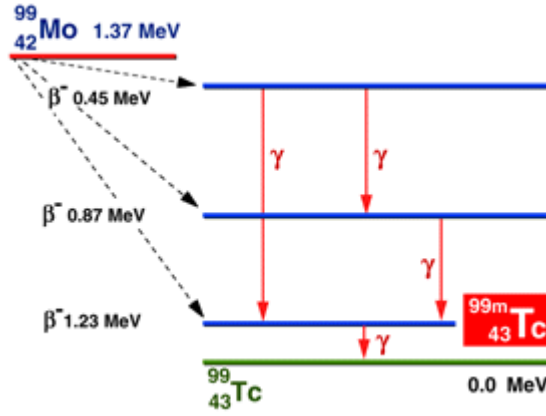
Anti VEGF olarak çalışan ve monoklonal antikor olan Bevacizumab ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak radyonüklidle işaretli bileşiklerinin etki mekanizması ile ilgili olarak ise literatürde sadece ^{111}In , ^{89}Zr , ^{125}I , ve ^{213}Bi ile ilgili çalışmalara rastlanılmıştır. ^{111}In ve ^{89}Zr ile yapılan çalışmalar sonucu radyoışaretli Bevacizumab'ın ovarian tümör xenograft yöntemi kullanılarak her iki işaretli bileşik için yüksek tutulum görülmüş ve biyodağılım çalışmalarıyla tutulum değerleri kıyaslanmıştır (Nagengast et al., 2007).

^{125}I ile işaretli Bevacizumab'ın farmakokinetiği fare, sıçan ve cynmolgus maymunlarında değerlendirilmiştir. Yapılan doz çalışmalarında bileşiğin nonspesifik boşaltım ve doku dağılımı gözlenmiştir (Lin et al., 1999).

Bir başka çalışmada ise bir alfa yayınlıyıcı olan ^{213}Bi ile işaretli BevMab iki farklı şelatlayıcı ajan (cDTPA ve CHX-A) kullanılarak *in vitro* ve *in vivo* deneyler yapılmıştır. İşaretleme verimi cDTPA ajanının kullanıldığı bileşik için daha yüksek bulunmuştur (Abbas et al., 2008).

2.7 Teknesyum-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) Kimyası

Atom numarası 43 olan Teknesyum, periyodik tablonun 7B grubunda yer alır ve -1 ile +7 arasındaki tüm değerlikleri alabilir. Hepsi radyoaktif 30 tane izotopu olan teknesyumun, 6.02 saat yarı ömürlü, 140 keV ışımaya yapan radyoizotopu $^{99\text{m}}\text{Tc}$ Nükleer Tıpta en çok kullanılan radyonüklid olma özelliğini yıllardır korumaktadır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$, radyoaktif ^{99}Mo ' un bozunmasından oluşur ve "radyonüklid jeneratör" den sağım yoluyla ^{99}Mo ' dan ayrılır. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ' in bozunmasından ise ^{99}Tc oluşur, buradaki "m" harfi de radyonüklidin "meta stabil" olduğunu göstermektedir. Jeneratörden elde edilen $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4$)⁻ teknesyum perteknetat yapısındadır ve bu bileşik içinde $^{99\text{m}}\text{Tc}$ +7 değerliklidir. Bu değerlikte inert yapıda olan teknesyum hiçbir kimyasal bileşik yapamaz. Ancak kalay klorür gibi indirgeyici bir madde ile indirgenmesi durumunda kimyasal bileşik oluşturabilir. Şekil 2.9 Teknesyumun bozunma şemasını içermektedir.



Şekil 2.9 ^{99}Mo 'un ^{99}Tc 'a bozunması (www.monrol.com.tr).

2.7.1. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ işaretli bileşiklerin kalite kontrolü

$^{99\text{m}}\text{Tc}$; kitteki ligand adı verilen ve özgül bir organ sisteminde lokalize olmak üzere geliştirilmiş substrat molekülüne tutunur. Radyofarmasötığın etkili olabilmesi için $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'nin çoğunun ligandla bağlanması ($\geq \% 95$) ve ürün içinde serbest $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'nin çok düşük miktarda kalmış olması gerekir. İşaretleme işleminin bir diğer yan ürünü olan indirgenmiş $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 'de indirgenmiş teknesyum (İnd. Tc) düşük düzeyde bulunmalıdır. Hem serbest hem indirgenmiş $^{99\text{m}}\text{Tc}$, görüntülerde yanlış tanıya neden olabilecek ya da değerlendirmeyi güçleştirecek safsızlıklar oluşturabilir.

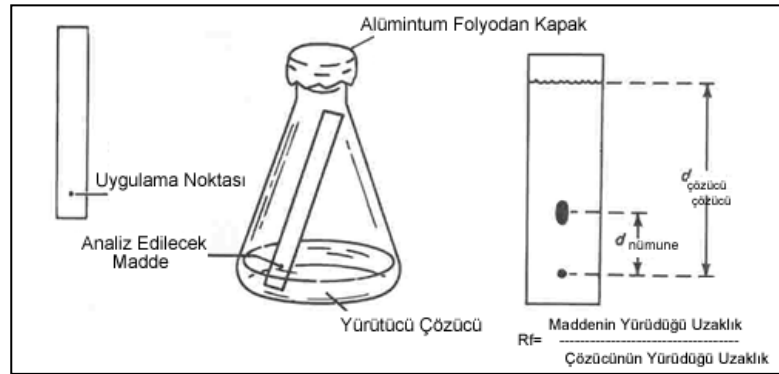
Hazırlanan radyofarmasötiklerin herbiri hastalarda kullanılmadan önce radyokimyasal saflık yönünden test edilmelidir. Teknesyum radyofarmasötiklerinin kalite kontrolü için çeşitli kontrol prosedürleri geliştirilmiştir. En sık kullanılan kalite kontrol yöntemleri; ince tabaka

kromatografisi (TLC), kağıt elektroforezi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemleridir (Theobald, 1989; Ünak, 2003).

2.7.1.1 İnce tabaka kromatografisi

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin birbirinden ayrılmasını gerçekleştiren yöntemlerin genel adıdır.

Kromatografi, çeşitli maddelerin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz üzerinde değişik hızlarla hareket etmeleri temeline dayanır. İnce tabaka kromatografisinde, cam, alüminyum gibi maddelerden yapılmış levhalar üzerine silikajel, alüminyum oksit gibi malzemelerin ince bir katman halinde yayılmasıyla hazırlanmış tabakalar sabit faz olarak kullanılır.



Şekil 2.10 İnce tabaka kromatografisi.

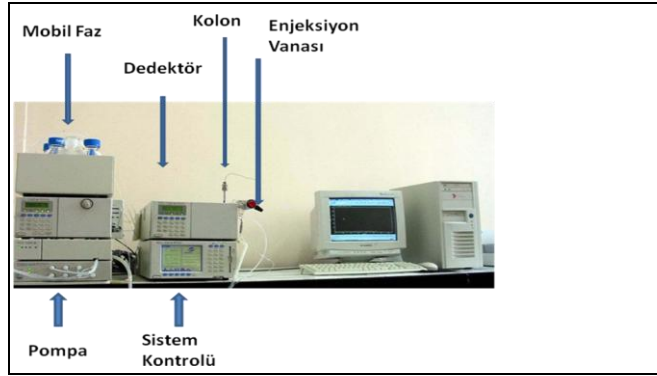
İnce tabaka kromatografisinin başarısı için uygulanan örneğin miktarı, çapı ve şekli önemlidir. Uygulanan çözelti nokta şeklinde ve yeterince küçük olmalıdır. Çözelti aşırı konsantre ya da nokta çok geniş olursa, örnekteki bileşikler iyi şekilde ayrılmayabilir. Uygulanan örnek

kuruduktan sonra kromatogram, yürütme kabına yerleştirilir (Şekil 3.2). İyi bir kromatografik çözümüleme için ayırma kabının içi, çözücü buharı ile dolana kadar beklenmelidir. Çözücünün taşıyıcılık gücü ne kadar fazlaysa adsorblanan maddeler o kadar daha hızlı hareket edeceklerdir.

Yürütme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. Polar maddeler, çözücü/adsorban madde ikilisinden daha polar olan ile daha sıkı etkileşim gösterirler. Çözücü birkaç cm kadar ilerledikten sonra, plaka yürütme kabından alınır. Çözücünün ulaştığı seviye kurşun kalemle hafifçe işaretlenir ve çözücünün buharlaşması sağlanır. Renksiz maddelerin ayrılması gerçekleştirildiyse bazı metotlarla görünür hale getirilirler. Plaka UV lambasının altına yerleştirildiğinde belirgin hale gelirler. Gereken ölçümlerin yapılmasıyla R_f (alıkonma değeri) değerleri hesaplanarak maddelerin ayrımı yapılır. R_f değeri; şekil 2.10'da görüldüğü üzere maddenin sürüklendiği noktanın başlangıç noktasına uzaklığının toplam yürütme mesafesine oranına R_f değeri denir.

2.7.1.2 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ise sıvı fazda çözünebilen bir kimyasal karışımının kolay ve hızlı bir şekilde bileşenlerine ayrılabilirdiği oldukça duyarlı bir kromatografik yöntemdir (Macherey-Nagel, 2006).



Şekil 2.11 Temel bir HPLC sistemi.

Klasik bir HPLC sistemi Şekil 2.11’de gösterilmiştir. Bu sistemin önemli bölümü ayırmanın gerçekleştiği kolondur. Kromatografik analiz süreci çözücüde çözülmüş örneğin sisteme enjekte edilmesi ile başlar. Hareketli (sürekli) faz ile birlikte kolona pompalanan örnek, kolon içinde bileşenlerine ayrılmaya başlar. Her bileşenin gönderdiği sinyaller dedektör tarafından kaydedilir. Dedektör tarafından kaydedilen ve bilgisayara aktarılan sinyallerin tamamına ‘kromatogram’ adı verilir.

Günümüzde HPLC, birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır. Başlıca kullanım alanları bileşen ayırma, saflaştırma, tanımlama ve derişim tayinidir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1 Kullanılan kimyasallar

BevMab (Roche San.A.Ş., 2004),
Sodyum perteknetat ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) (Monrol A.Ş.),
Kalay klorür dihidrat ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck),
Dietilentriamin pentaasetik asit (DTPA) (dianhidrid) (Sigma),
Asetonitril (CH_3CN) (Merck),
Aseton (CH_3COCH_3), (Merck),
Amonyum asetat (Merck),
Sodyum karbonat (Na_2CO_3), (pH 9.5),
Potasyum karbonat (K_2CO_3) (Merck),
Kloroform (CHCl_3) (Merck),
Metanol (CH_3OH) (Merck),
Etanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) (Merck),
Dipotasyum hidrojenfosfat (K_2HPO_4) (Merck),
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4) (Merck),
n-oktanol (Merck),
pH = 7 tamponu (Merck),
Sitrat tamponu (pH: 6.6),
Serum Fizyolojik (SF) (% 0.9 NaCl çözeltisi),
ITLC-SG (Merck - 5554),
Elektroforez Kağıdı (Whatman 1),
Vivaspin-2 Ultrafiltrasyon aparatı (Sartorius).

3.1.2 Kullanılan cihazlar

RAD-501 Cd(Te) tek kanallı sayım sistemi (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), HPLC Shimadzu (LC-10Atvp quaterner pompalı, SPD-10AV UV dedektörlü, FRC-10A fraksiyonlama kollektörü) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), UV lamba (G15T8 15W Germicidal Lamp UV-C) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), TLC Scanner cihazı (Bioscan 2000) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı), Ultasantrifüj cihazı (Hettich Rotina 38R Soğutmalı Santrifüj) (E. Ü. Nükleer Bilimler Enstitüsü, Nükleer Uygulamalar Anabilim Dalı).

3.2 Kimyasal Sentez Basamakları

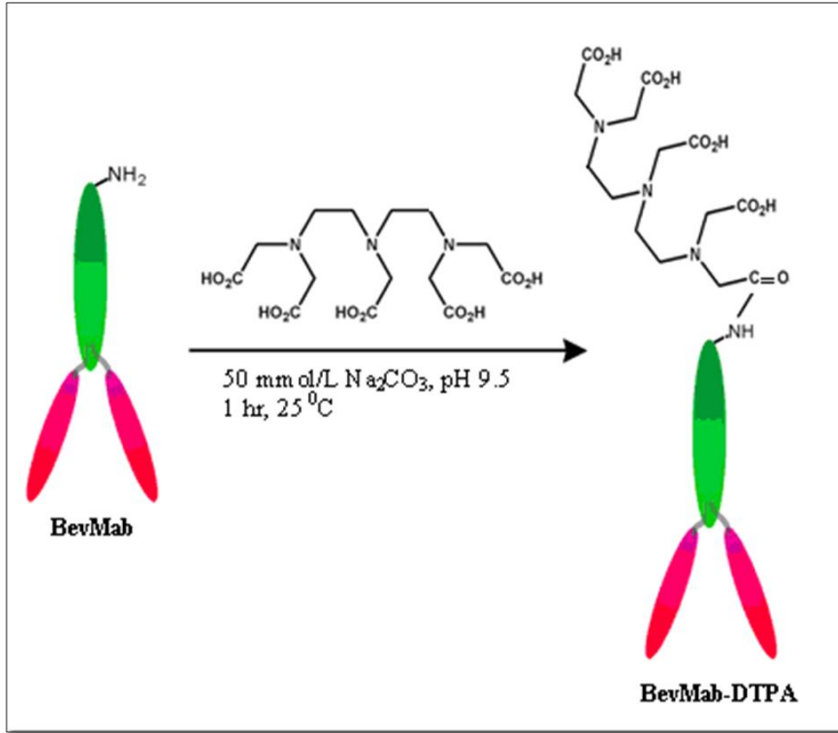
3.2.1 BevMab bileşiğinin saflaştırılması

Ticari olarak elde edilen BevMab bileşiğinin saflaştırılması için Vivaspin-2 (Sartorius) ultrafiltrasyon aparatı (50.000`lik membran) kullanılmıştır. Önceden 2 mL ultra su ile ıslatılan membrana, 5mg/1mL BevMab ilave edilerek, 3000 rpm`de 5 dakika santrifuj edilmiştir.

3.2.2 BevMab bileşiğinin DTPA ile Konjugasyonu (BevMab-DTPA)

Saflaştırılmış BevMab bileşiği, 50 mmol/L Na₂CO₃ ile pH değeri 9.2 - 9.5 arası ayarlanıp, 50 M DTPA ilavesiyle 1 saat oda sıcaklığında

konjuge edilmiştir. Bağlanmamış DTPA bileşimini ortamdan uzaklaştırmak için, reaksiyon karışımı pH 5.5 değerinde 50 mmol/L amonyum asetat ile ultrasantrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen ürün BevMab-DTPA olarak tanımlanmış olup; 5 mg/1mL olacak şekilde amonyum asetat ile dilüe edilip daha sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de dondurucu da saklanmıştır (Nagengast et al., 2007). Şekil 3.1 BevMab-DTPA bileşiğinin oluşum mekanizmasını içermektedir.



Şekil 3.1 BevMab-DTPA bileşiğinin oluşum mekanizması.

3.3 İnaktif Bileşenler (BevMab, DTPA, BevMab-DTPA) için Kullanılan Kromatografik Yöntemler

BevMab, DTPA, BevMab-DTPA maddelerinin kalite kontrolü İnce Tabaka Kağıt Kromatografi (TLC), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) yöntemleri ile gerçekleştirilmiştir.

3.3.1 TLC yöntemi

TLC için silikajelle kaplı, kalınlıkları 0.1 mm olan 20 x 20 cm boyutlarındaki alimünyum tabakalar kullanılmış ve bu tabakalar 1.5 x 10 cm'lik şeritler halinde kesilmiştir. Hazırlanan şeritlerin üzerine tabandan 0.5 cm yukarıya kapiler yardımıyla inaktif bileşenler damlatılmıştır. Maddelerin uygulandığı bu şeritler içerisinde çözücü olarak saf su içeren TLC tankına konmuştur. Şekil 3.2. örnek damlatma ve kromatografi yürütme işlemini göstermektedir.



Şekil 3.2 Örnek damlatma ve kromatografi yürütme işlemi.

Tanktaki çözücünün yaklaşık 7 cm kadar ilerlemesinden sonra şeritler tank içerisinden çıkartılıp oda sıcaklığında kurutulmuştur.

Kurutulan TLC örnekleri UV lamba altında bakılmış ve bileşenlerin çözgen (su) içerisinde ilerleme mesafelerinin ve R_f değerlerinin birbirinden farklı olduğu görülmüştür. Bu basamağa ilişkin sonuçlar 4. Bölüm’de yer almaktadır.

3.3.2 HPLC yöntemi

Bu çalışmada uygulanan kromatografik koşullar Çizelge 3.1’de verilmiştir. İnaktif BevMab, DTPA, BevMab-DTPA bileşenlerine ait kromatogramlar 4. Bölüm’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. HPLC yönteminde uygulanan kromatografik koşullar.

Kolon	EC 250 / 4.6 NUCLEODUR 100 – 5 C18 (250 x 4.6 mm I.D.) Analitik kolon (Macherey - Nagel)
Akış hızı	1.0 mL / dak
Dalga boyu	240 nm ve 280 nm
Mobil faz	%40 bidistile su - %60 asetonitril
Sıcaklık	30 °C

3.4 İşaretleme Yöntemi

3.4.1 ^{99m}Tc -DTPA çözeltisinin hazırlanması

1 mg DTPA (dianhidrid) 1 mL saf suda çözülerek stok çözelti hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiden 100 μg alınıp üzerine 50 μL SnCl_2 (1

mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 1 mL HCl) ilave edildikten sonra 1 M NH_3 ile pH değeri 5'e ayarlanmıştır. Üzerine 60 μL 37 MBq (1 mCi) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ilave edilerek 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Aktivite değeri 3.7 MBq / μg 'dır.

3.4.2 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -BevMab-DTPA çözeltisinin hazırlanması

Ultrafiltrasyon ve konjugasyon sonucu elde edilen BevMab-DTPA bileşiğinden (100 μg) 150 μL alınıp üzerine 50 μL kalay klorür çözeltisi (1 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 1 mL 0.1 M HCl) ilave edilmiştir. Çözeltinin pH değeri 1 M NaOH ile 5'e ayarlanarak 60 μL 37 MBq (1 mCi) $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ilave edilmiş ve 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edilerek işaretleme reaksiyonu gerçekleştirilmiştir. Aktivite değeri 3.7 MBq / μg 'dır.

3.5 Radyoışaretli Bileşiklerin Kalite Kontrolünde Kullanılan Yöntemler

3.5.1 İnce tabaka radyo kromatografi (TLRC) yöntemi

$^{99\text{m}}\text{Tc}$ ile işaretli bileşiklerin, $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. $^{99\text{m}}\text{Tc}$ için TLRC yöntemi ile kalite kontrolü, Bölüm 3.3.1'de yer alan TLC uygulaması şeklinde olup, kurutulan örneklerin dış yüzeyi yapışkan bir bantla kaplanarak herhangi bir kontaminasyona neden olmadan TLC scanner cihazı ile sayımlar alınmıştır. Şekil 3.3 enstitümüzde kullanılan TLC scanner cihazını göstermektedir.



Şekil 3.3 TLC scanner cihazı (Bioscan 2000).

TLRC banyo çözeltisi olarak amonyum asetat çözeltisi kullanılmıştır. ^{99m}Tc ile işaretli, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc bileşenlerine ait R_f değerleri çizelge 4.2’de yer almaktadır. TLRC kromatogramları ise sırasıyla Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve 4.7’de yer almaktadır. TLRC banyosu olarak amonyum asetat çözeltisi yanısıra; SF, su, sitrat tamponu (pH: 6.6) ve asetonitril-su (60:40) çözeltileri de kullanılmış olup, bağlanma veriminin en yüksek görüldüğü çözelti amonyum asetat çözeltisi olarak saptanmıştır. Bu banyo çözeltisinde elde edilen ^{99m}Tc -DTPA, ^{99m}Tc -BevMab-DTPA, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ve İnd. ^{99m}Tc bileşiklerine ait R_f değerlerini içeren TLRC kromatogramları 4. Bölüm’de verilmiştir.

3.6 n-Octanol / Su Oranın Bulunması (Lipofilite)

Lipofilite maddenin yağda çözünme eğiliminin ölçüsüdür ve lipid / su oranı şeklinde partiyon katsayısı olarak ifade edilir. Bu katsayı ne kadar büyükse; maddenin lipid membrandan absorpsiyonu o kadar fazla olur (Özyazgan, 2002). Kimyasal bileşikler için yağ, petrol, lipid ve hekzan, toluen, oktanol gibi apolar çözügenlerde çözünme yeteneğini gösterir (Theobald, 1989).

Bir santrifuj tüpüne eŐit oranlarda n-oktanol ve pH = 7 tamponu koyulduktan sonra ^{99m}Tc ile işaretli örnekten 0.1 mL alınarak bu karıŐıma ilave edilip önce 1 dakika vortekslenerek 2500 rpm'de 30 dakika santrif jleŐimıŐtir (Zhang and Wang, 2001). Santrifüj sonrasında fazlara ayrılan bu karıŐımın üst ve alt fazlarından 100'er μL alınarak aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile sayılmıştır. Aynı iŐlemler  c kez tekrarlanmıŐ olup, elde edilen deneysel ve teorik sonuçlar  izelge 4.3'de yer almaktadır.

3.7 Serum Stabilite

^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileŐiŐinden (66.66 μg) 100 μL alınıp, 300 μL kan serumuna eklenmiŐ ve 24 saat 37 $^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmiştir. 30, 60, 240, 1440. dakikalara ait örnekler alınmış ve TLRC yöntemi ile işaretli bileŐiŐin serumdaki stabilitesi izlenmiŐtir. Bu bölüme ait deneysel çalışmalar  c kez tekrarlanmıŐtır. Bu çalışmaya ait sonuçlar 4. Bölüm'de bulunmaktadır.

3.8 Dişi ve Erkek Albino Wistar Sıçanlar  zerinde Yapılan BiyodaŐılım  alıŐmaları

BiyodaŐılım  alıŐmaları için 9'ar adet dişi ve erkek Albino Wistar sıçan kullanılmıştır. (100 μg) 150 μL BevMab-DTPA bileŐiŐi alınıp  zerine 50 μL kalay klorür  zeltisi (1 mg $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ / 1 mL 0.1 M HCl) ilave edilmiştir.  zeltinin pH deŐeri 1 M NaOH ile 5'e ayarlanarak 300 μL , 555 MBq (15 mCi) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ ilave edilmiş ve 30 dakika oda sıcaklıŐında inkübe edilerek işaretleme reaksiyonu

gerçekleştirilmiştir. Her hayvana kuyruk veninden (4 µg) 0.1 mL ^{99m}Tc ile işaretli BevMab-DTPA bileşiği enjekte edilmiştir. Aktivite yaklaşık 5.55 MBq / µg olarak bulunmuştur.

Enjeksiyon öncesinde ve sonrasında enjektör aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile sayılmıştır. Sıçanlar 60. 240. ve 420. dakikalar sonunda eter ortamında sakrifiye edilerek önceden daraları alınmış olan küçük kaplar içerisine belirlenen organlar alınmıştır. Her organa ait tartım değeri ve aktiviteleri Cd(Te) dedektörü ile ikişer kez alınmıştır. Aktivitelerinin ortalamaları alınmış ve her bir organ için gram başına düşen doz değerleri (% ID / g) hesaplanmıştır. Bu veriler kullanılarak Excel programında zamana karşı biyodağılım grafikleri elde edilmiştir.

3.9 İstatistik Analizler

Biyodağılım çalışmalarının istatistik değerlendirmesi SPSS 13 yazılım programı kullanılarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla tüm verilerin varyans analizleri (Univariate Variance Analyses) yapılmış ve uygulanan işaretli bileşik ile organlar arasındaki ilişki Pearson Korelasyonu uygulanarak değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 İnaktif Bileşenler (BevMab, DTPA, BevMab-DTPA) için Kullanılan Kromatografik Yöntem ve Sonuçlar

4.1.1 TLC yöntemi ile elde edilen R_f sonuçları

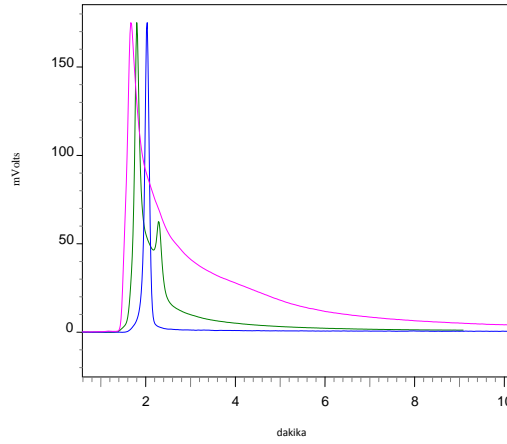
Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi BevMab-DTPA’nın R_f değerinin BevMab ve DTPA’nın R_f değerlerinden farklı olması DTPA ile konjugasyon basamağının gerçekleştiğini göstermektedir.

Çizelge 4.1 BevMab, DTPA ve BevMab-DTPA bileşiklerinin su’daki R_f değerleri.

Bileşik	R_f
BevMab	0.89
DTPA	0.00
BevMab-DTPA	0.81

4.1.2 HPLC yöntemi ile elde edilen kromatogramlar

BevMab, DTPA ve BevMab-DTPA bileşiklerine ilişkin HPLC kromatogramları Şekil 4.1’ de görülmektedir.



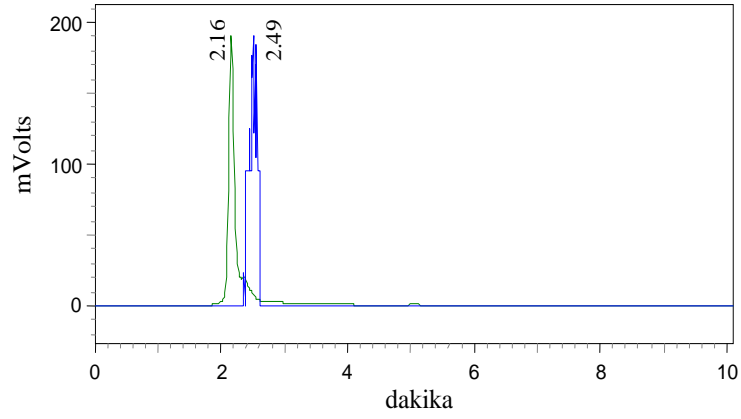
Şekil 4.1 BevMab,DTPA, BevMab-DTPA, bileşiklerinin HPLC kromatogramı.
(Mavi: UV dedektöründen alınan BevMab bileşiğine ait pik, Pembe: UV dedektöründen alınan DTPA bileşiğine ait pik, Yeşil: UV dedektöründen alınan BevMab – DTPA bileşiğine ait pik.).

Şekil 4.1’de görüleceği gibi inaktif bileşenler HPLC aisteminde farklı piklere ve farklı R_t (alınma zamanı) değerlere sahiptir. Bu durumda HPLC sonuçları da TLC sonuçları gibi Bevacizumab ile DTPA’nın konjuge olduğunu göstermektedir.

4.2 Radyoişaretli Bileşiklerin Kalite Kontrol Sonuçları

4.2.1. HPLRC yöntemi ile elde edilen radyoişaretli bileşiklere ait kromatogramlar

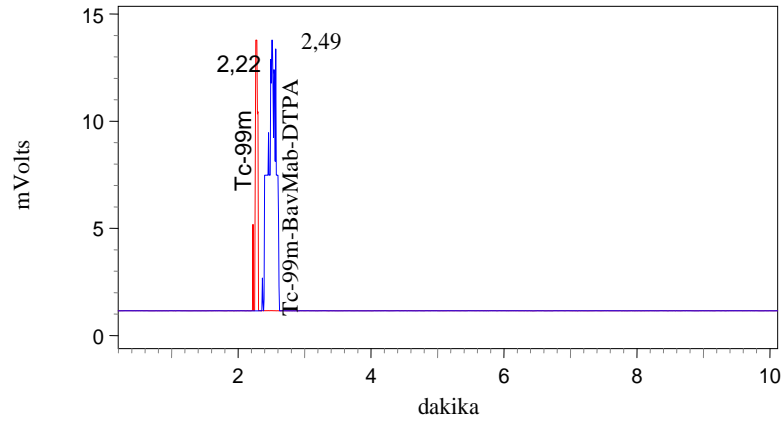
Çizelge 3.1’de verilen koşullar uygulanarak ^{99m}Tc işaretli BevMab-DTPA bileşiğine ait HPLRC kromatogramları ve R_t değerleri Şekil 4.2. ve Şekil 4.3’de görülmektedir.



Şekil 4.2 ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin HPLRC kromatogramı.

(Yeşil: UV dedektöründe alınan ^{99m}Tc - BevMab-DTPA bileşiğine ait pik).

(Mavi: Cd(Te) dedektöründe alınan ^{99m}Tc - BevMab-DTPA bileşiğine ait pik).



Şekil 4.3. ^{99m}Tc ve ^{99m}Tc -BevMab-DTPA HPLRC kromatogramı.

(Mavi: UV dedektöründe alınan ^{99m}Tc - BevMab-DTPA bileşiğine ait pik)

(Kırmızı: Cd(Te) dedektöründe ^{99m}Tc bileşiğine ait pik).

Şekil 4.2 ve 4.3’de yer alan ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğine ait HPLRC kromatogramları incelendiğinde, 240 nm’de UV dedektöründe bileşiğe ait kolondaki olan R_t değeri 2.16, Cd(Te) dedektöründe ise bu değer 2.49 olarak bulunmuştur. ^{99m}Tc bileşiği için ise 2.22’dir (Şekil 4.3). Radyoışaretli bileşiğin ve teknesyuma ait R_t değerlerinin radyoaktivite dedektöründe farklılık göstermesi radyo işaretlemenin gerçekleştiğine işaret etmektedir.

4.2.2 TLRC ile elde edilen sonuçlar

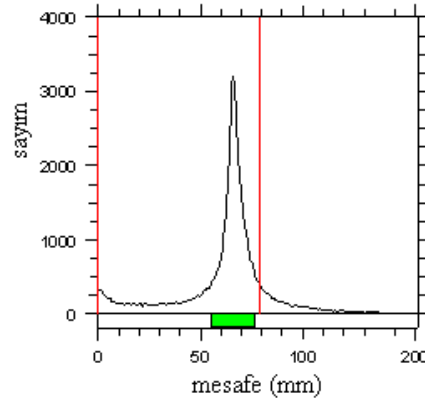
İşaretli bileşiklere ve radyoaktif bileşenlere ait R_f değerleri Çizelge 4.2’de yer almaktadır. Kromatogramlar ise Şekil 4.4, 4.5, 4.6 ve Şekil 4.7’de görülmektedir.

Çizelge 4.2. ^{99m}Tc ile işaretli bileşikler ve radyoaktif bileşenlere ait R_f değerleri.

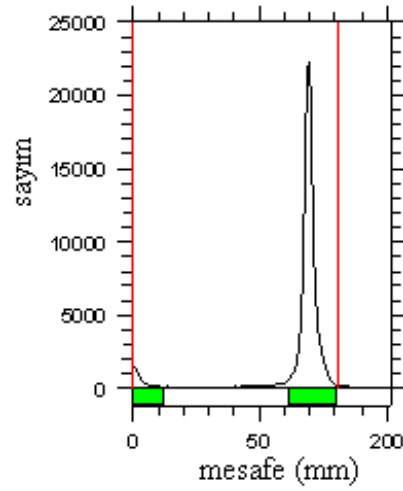
Banyo Çözeltisi	R_f			
	^{99m}Tc - Bevmab-DTPA	^{99m}Tc - DTPA	İnd ^{99m}Tc	^{99m}Tc
Amonyum asetat	0.84	0.82	0.02	0.90

Çizelge 4.2 incelendiğinde banyo çözeltisinde ^{99m}Tc ve ^{99m}Tc ile işaretli tüm bileşiklerin R_f değerlerinin birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Optimum koşullar sağlanana kadar farklı TLRC banyo çözeltileri de denenmiştir. Ancak bu denemeler de en yüksek işaretleme verimi amonyum asetat banyosu için bulunmuştur. Bu değer % $97.99 \pm$

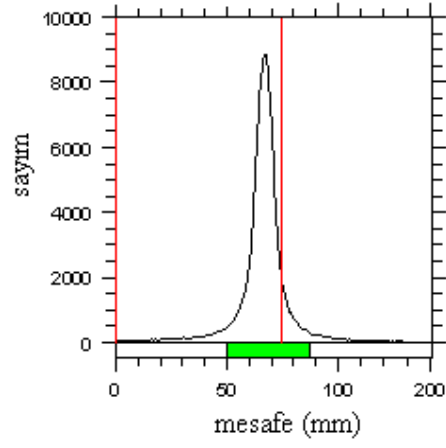
2.83 (n=11) olarak saptanmıştır. TLRC kromatogramlarından yararlanarak işaretli bileşiğe ilişkin pikin toplam alanına karşıt gelen sayımlar, toplam sayıma bölünerek işaretli bileşiğin bağlanma verimi bulunmuştur.



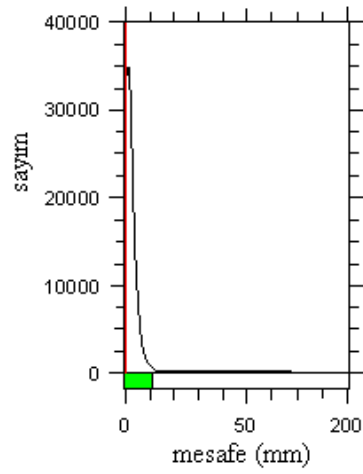
Şekil 4.4 ^{99m}Tc -DTPA bileşiğine ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.5 ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğine ait TLRC kromatogramı.



Şekil 4.6 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 'ün TLRC kromatogramı.



Şekil 4.7 İnd ^{99m}Tc 'nin TLRC kromatogramı.

4.3 n-Octanol / Su oranı (Lipofilite) sonuçları

Bileşiklere ait lipofilite deneyleri ACD / logP Algorithm programı ile değerlendirilmiştir. Çizelge 4.3’de görüleceği üzere DTPA bileşiğinin logP değeri -2.08 ± 0.86 olarak bulunmuştur. Bu program ile Bevacizumab’ın teorik logP değeri oldukça yüksek olan molekül ağırlığından dolayı (~150 kda) hesaplanamamış olup ancak yüksek bir değere sahip olması beklenmektedir. Deneysel olarak hesaplanan ^{99m}Tc -BevMab-DTPA’nın logP değeri ise -1.06 ± 0.1 (n=3) olarak bulunmuştur.

Çizelge 4.3. Bileşiklerin logP değerleri.

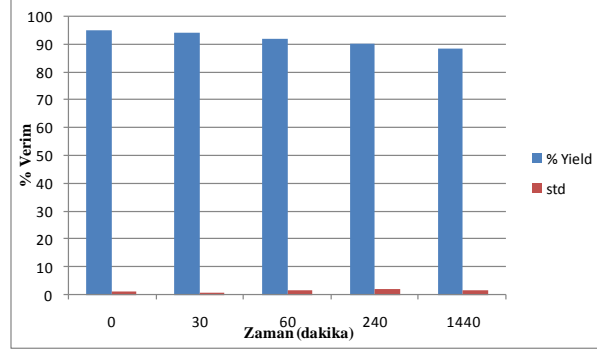
Bileşik	Teorik logP	Deneysel logP
DTPA	-2.08 ± 0.86	-
^{99m}Tc -BevMab-DTPA	-	-1.06 ± 0.1

DTPA ve ^{99m}Tc -BevMab-DTPA’nın logP değerlerinin birbirine yakın olması beklenen bir sonuçtur, çünkü DTPA hidrofilik bir gruptur, dolayısıyla bağlandığı bileşiğin lipofilitesini düşürmektedir. Ayrıca Şekil 4.1’deki BevMab, DTPA ve BevMab-DTPA, bileşiklerinin HPLC kromatogramları da lipofilite sıralamasını desteklediği görülmektedir.

4.4. Serum stabilite sonuçları

^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenen BevMab-DTPA bileşiğinin 37 °C’de insan kan serumundaki davranışını içeren grafik Şekil 4.8’de yer almaktadır. Grafikte görüldüğü gibi işaretli bileşiğin çalışma periyodu

boyunca stabilitesinin koruduğu ve işaretleme veriminin yaklaşık olarak % 90'nın üzerinde olduğu görülmüstür.



şekil 4.8 ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin serumda stabilitesi.

4.5 Erkek ve Dişi Albino Wistar sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım çalışmalarının sonuçları

DTPA ile konjuge edilmiş ^{99m}Tc ile işaretli Bevacizumab (^{99m}Tc -BevMab-DTPA), normal dişi ve erkek Albino Wistar sıçanlara kuyruk veninden enjekte edilerek 60, 240, ve 420. dakikalara ait biyodağılım verileri elde edilmiştir.

4.5.1 Erkek sıçanlar üzerinde biyodağılım sonuçları

Çizelge 4.4'de erkek sıçanlardaki ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğine ait organlardaki gram başına enjekte edilen doz (% ID / g) değerleri görülmektedir. şekil 4.9 ise erkek Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılım grafiğini vermektedir.

Çizelge 4.4. Erkek Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin % ID / g (organ) verileri.

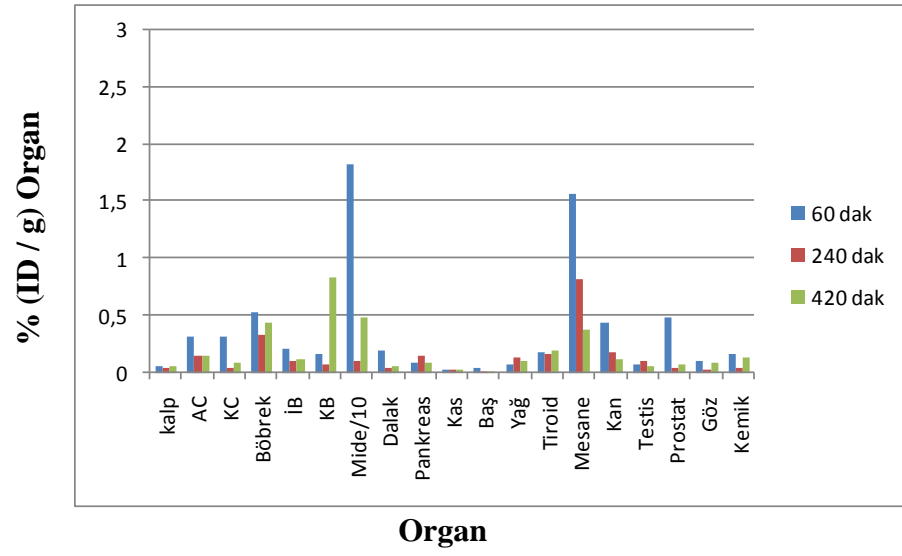
% ID / g (Organ)	60 Dak.	240 Dak.	420 Dak.
Kalp	0.07±0.01	0.05±0.04	0.07±0.04
Akciğer	0.31±0.22	0.15±0.05	0.15±0.08
Karaciğer	0.31±0.20	0.04±0.02	0.10±0.05
Böbrek	0.53±0.45	0.33±0.17	0.44±0.16
İ. Bağırsak	0.21±0.17	0.11±0.02	0.12±0.04
K. Bağırsak	0.17±0.06	0.07±0.01	0.83±0.28
Mide	18.22±4.70	1.07±0.24	4.82±3.43
Dalak	0.20±0.11	0.04±0.02	0.06±0.03
Pankreas	0.09±0.01	0.15±0.06	0.09±0.04
Kas	0.04±0.03	0.03±0.01	0.03±0.02
Baş	0.04±0.02	0.02±0.01	0.01±0.01
Yağ	0.08±0.03	0.14±0.06	0.10±0.02
Tiroid	0.18±0.13	0.16±0.03	0.20±0.06
Mesane	1.57±1.18	0.83±0.36	0.38±0.04
Kan	0.44±0.20	0.19±0.09	0.12±0.06
Testis	0.08±0.03	0.10±0.07	0.05±0.02
Prostat	0.49±0.38	0.04±0.02	0.08±0.04
Göz	0.10±0.05	0.04±0.02	0.09±0.03
Kemik	0.17±0.09	0.04±0.02	0.14±0.07

4.5.2 Dişi sıçanlar üzerinde biyodağılım sonuçları

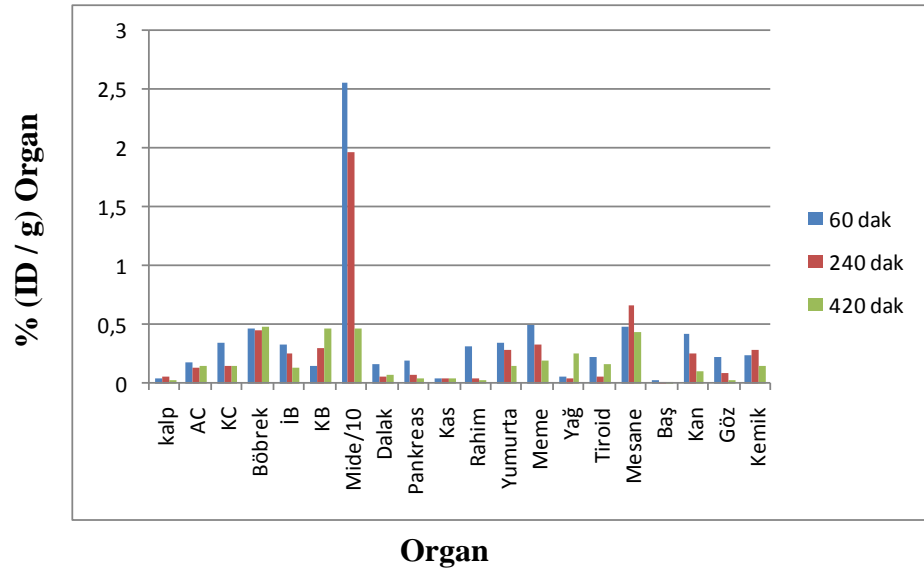
Çizelge 4.5 dişi sıçanlardaki ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğine ait organlardaki gram başına enjekte edilen doz (% ID / g) değerleri, şekil 4.10 ise bu bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılımını içermektedir.

Çizelge 4.5 Dişi Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin % ID / g (organ) verileri.

% ID / g (Organ)	60 dak.	240 dak.	420 dak.
Kalp	0.04±0.01	0.06±0.02	0.03±0.01
Akciğer	0.18±0.07	0.13±0.07	0.15±0.09
Karaciğer	0.35±0.17	0.15±0.08	0.15±0.10
Böbrek	0.47±0.35	0.45±0.18	0.48±0.24
İ. Bağırsak	0.33±0.08	0.26±0.14	0.13±0.06
K. Bağırsak	0.15±0.08	0.30±0.11	0.47±0.16
Mide	25.57±19.16	19.70±10.59	4.73±2.27
Dalak	0.16±0.06	0.05±0.04	0.06±0.04
Pankreas	0.20±0.08	0.07±0.03	0.04±0.03
Kas	0.05±0.03	0.04±0.02	0.03±0.01
Rahim	0.32±0.19	0.05±0.02	0.03±0.02
Yumurta	0.35±0.16	0.29±0.13	0.14±0.05
Meme	0.50±0.26	0.33±0.16	0.19±0.08
Yağ	0.07±0.02	0.04±0.03	0.25±0.17
Tiroid	0.23±0.12	0.06±0.02	0.16±0.06
Mesane	0.48±0.19	0.66±0.32	0.43±0.21
Baş	0.04±0.02	0.01±0.00	0.01±0.01
Kan	0.43±0.27	0.26±0.12	0.10±0.03
Göz	0.23±0.20	0.08±0.06	0.02±0.01
Kemik	0.24±0.03	0.29±0.01	0.15±0.07



Şekil 4.9 Erkek Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılım grafiği.



Şekil 4.10. Dişi Albino Wistar sıçanlarda ^{99m}Tc -BevMab-DTPA bileşiğinin bazı organlardaki biyodağılım grafiği.

Hayvanlar üzerinde geliştirilen tümör modelleri VEGF'ye karşı kullanılan monoklonal antikor tedavisinin, tümör gelişimini baskıladığını göstermektedir (Kim et al., 1993; Asano et al., 1995). Dolayısıyla günümüzde kanser tedavisinde anti anjiogenik terapi kullanımına ilgi oldukça artış göstermektedir (Lin et al., 1999).

Bu çalışmada; VEGF'nin reseptöre bağlanmasını bloke eden ilk monoklonal antikor ilaç olarak bilinen Bevacizumab'ın sırasıyla DTPA ile konjugasyonu, kalay klorür ile indirgeme metodu kullanılarak ^{99m}Tc ile işaretlenmesi ve iki ayrı cins Albino Wistar sıçanlarda biyodağılım farklılıklarının araştırılması amaç edilmiştir.

Meme, beyin ve yumurtalık tümör sitozollerinde, tümörsüz dokulara göre daha fazla artan VEGF seviyelerine rastlanıldığı rapor edilmiştir (Lin et al., 1999). Çizelge 4.5 ve şekil 4.10'a bakılacak olursa; normal dokuya sahip (tümörlü olmayan) dişi sıçanların yumurtalık ve meme dokularında bir tutulum görülmüştür. %ID/g değerleri sırasıyla yumurtalık için 0.35, 0.29, 0.14; meme için 0.50, 0.33, 0.19 olarak birbirine yakın değerler bulunmuştur. Çizelge 4.9'da ise meme-yumurtalık arası istatistiksel bir anlamlılık görülmektedir ($P<0.05$).

Biyodağılım grafiklerine bakıldığında radyoişaretli bileşiğin hem dişi hem de erkek sıçanlarda temel atılımının böbrek ve mesaneden olduğu görülmektedir. Her iki tür içinde böbreklerde %ID/g değerlerinin çalışma periyodu boyunca hemen hemen benzer olduğu yaklaşık 0.5 olarak saptanmıştır. DTPA bir böbrek ajanı olup, dolayısıyla

böbreklerden atılımın gerçekleşmesi beklenen bir sonuçtur. BevMab bileşiğinin DTPA ile konjugasyonu sonucu yapı hidrofilitik olduğu ve lipofilitik değeri azaldığı için böbreklerden atılım gözlenmektedir. Bunun yanı sıra Pillai ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada karboksilik asit grupları içeren komplekslerin hidrofilitik hale geldiği ve böbrek yoluyla temizlenme gösterdiği sonucuna varmışlardır (Pillai et al., 1999). Ancak bizim çalışmamızda erkek sıçanlarda 60. dakikadaki mesane tutulumunun (%ID/g değeri 1.57), dişilerdeki orana göre (%ID/g değeri 0.48) yaklaşık 3 kat daha fazla olduğu, bunu takiben diğer dakikalarda ise benzer bir tutulum gösterdiği görülmüştür.

Kalp, testis ve böbrek dokularında VEGF'nin varlığı rapor edilmiştir (Jakeman et al., 1992). Lin ve arkadaşları ¹²⁵I ile işaretli BevMab bileşiğinin normal tümör içermeyen tavşanlarda 48 saat sonra mesane ve böbrekler yanı sıra kalp ve testis için yüksek radyoaktivite tutulumu gözlemişlerdir (Lin et al., 1999).

Nagengast ve arkadaşları ise SKOV-3 (insan ovarian kanseri) hücreleri içeren erkek athymic nude mice cinsi hayvanlar üzerinde ¹¹¹In-bevacizumab-DTPA ile yaptıkları biyodağılım sonuçlarında, 24., 72. ve 168. saatlerde diğer organlara göre kalp ve kanda zamanla azalan diğer organlara göre yüksek bir tutulum, yine aynı saatlerde karaciğer ve dalakta ise zamanla sabit kalan yüksek bir tutulum değeri ile karşılaşmışlardır (Nagengast et al., 2007).

Bir başka çalışmada ise ^{213}Bi ile işaretli cDTPA-bevacizumab'ın yüksek bir böbrek tutulumu yanısıra, karaciğer ve dalakta ise düşük bir tutulum tespit edilmiştir (Abbas et al., 2008). Hidrofobik bileşiklere kıyasla hidrofilik analoglarda karaciğer ve akciğer tutulumu daha azdır (Delpassand, 1996). Bizim çalışmamızda ise çizelge 4.7 ve 4.8 de yer alan erkek ve dişi sıçanların kalp, kan, karaciğer ve dalak dokusuna ait %ID/g değerleri birbirleriyle kıyaslandığında hemen hemen yakın oldukları görülmektedir.

Erkek sıçanlarda hem biyodağılım hem istatistik olarak (Çizelge 4.6.) uyum gösteren organlardan biri de kalın bağırsak olarak saptanmıştır ($P<0.05$). Sırasıyla %ID/g değerleri 0.17, 0.07, 0.83 olmak üzere görüleceği gibi 240. Dakikadaki tutulum ile 420. dakikadaki tutulum değerleri arasında mevcut 11.85 kat artış söz konusudur. Şekil 4.9'a bakıldığında, 420. dakikada radyo işaretli bileşiğin mide atılımı sonrası kalın bağırsakta boşaltımın devam ettiği görülmektedir. Ayrıca dişi sıçanlar ile erkek sıçanların kalın bağırsaktaki 240. dakikadaki %ID/g değerleri oranı 4.28'dir.

Testislerde de her hangi bir yüksek aktivite gözlenmemiş olmasına rağmen, prostat dokusunda 60. dakikada ulaşılan %ID/g değeri 240. dakika ile oranlandığında 12.25, 420. dakika ile ise 6.12 kat gibi daha yüksek değerlere ulaşılmıştır. Çizelge 4.8 Pearson korelasyonuna göre istatistik sonucunun biyodağılım sonucunu desteklediği görülmektedir ($P<0.05$).

Bizim çalışmamızda DTPA gibi hidrofilik bir bileşiğin yapıya takılmasıyla hem erkek hem de dişi hayvanlara ait biyodağılım sonuçlarından elde edilen %ID/g verileri arasında çok net bir fark izlenmemiş olmakla birlikte, yapılan her iki cins hayvan deneylerinde diğer organlara kıyasla çok yüksek mide tutulumu gözlenmiştir. Dişi sıçanlarda özellikle midede tutulum erkeklere göre daha yüksek olup, özellikle dişi sıçanlarda 240. dakikada erkek sıçanlardaki mide tutulumu oranı yaklaşık 18 kattır. Literatürde endotel fenestrasyonu (penceri düzeni, delikli) gösteren kapiller damarların VEGF sinyallerine bağımlı olduğu, tümör damarlarında endotel fenestrasyonlarının olması VEGF inhibisyonuna duyarlılığı arttırabileceği belirtilmiştir. (Inai et al., 2004; Kamba, 2006; 2007). Bunun yanı sıra literatürde fenestre (delikli) kapiller damarların, tümörlü dokularda olduğu kadar endokrin organlarında, gastrointestinal sistem, böbrek glomeruli ve beynin spesifik bölgelerinde de bulunduğu rapor edilmiştir (Roberts and Palade, 1997; Esser et al., 1998).

4.6 İstatistik Analiz Sonuçları

Biyodağılım sonucu elde edilen verilerin istatistiksel analizleri (Univariate Variance Analyses) SPSS 13 programı kullanılarak yapılmıştır. ^{99m}Tc-BevMab-DTPA bileşiği için dişi ve erkek sıçanlar üzerinde yapılan biyodağılım sonucu organlar arasında Pearson korelasyonu uygulanmıştır. Pearson korelasyonuna göre işaretli bileşiğin tutulumu ile organlar arasında bir ilişki tanımlanmaktadır. Anlamlılık düzeyi (P) değeri ile ifade edilecek olursa $P < 0.05$ değeri anlamlı olarak

kabul edilmiştir. Özellikle dişi sıçanlarda, mide ile karaciğer, ince bağırsak, dalak, pankreas, yumurtalık ve göz arasında, pankreas ile yumurtalık ve meme arasında, rahim ile yumurtalık arasında mevcut istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur. Erkek sıçanlarda ise mide ile ince bağırsak, dalak ve göz arası, prostat ile karaciğer, kan arası, dalak ile akciğer ve göz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur. Her bir organ için yapılan varyans analizinde organ ile süre ilişkisine bakıldığında dişi sıçanlarda kalın bağırsak, pankreas, rahim ve kemikte, erkek sıçanlarda ise kalın bağırsak, mide ve dalak arasında mevcut istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık söz konusudur. ($P < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edilmiştir). Çizelge 4.6, 4.7, 4.8, 4.9'dan da görüleceği gibi erkek ve dişi sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.6. Varyans analizi sonucuna göre erkek sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri.

Organ	P Değeri	r Değeri
K.Bağırsak	0.00	0.81
Mide	0.00	0.83
Dalak	0.04	0.52

Çizelge 4.7. Varyans analizi sonucuna göre dişi sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P ve r (korelasyon katsayısı) değerleri.

Organ	P Değeri	r Değeri
K. Bağırsak	0.04	0.53
Pankreas	0.01	0.67
Rahim	0.03	0.57
Kemik	0.02	0.64

Çizelge 4.8. Pearson korelasyonuna göre erkek sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P değerleri.

Organ	P Değeri
Mide-İ. bağırsak arası	0.03
Mide-Dalak arası	0.01
Mide-Göz arası	0.05
Prostat-Karaciğer arası	0.01
Prostat-Kan arası	0.03
Dalak-Akciğer arası	0.01
Dalak-Göz arası	0.01

Çizelge 4.9 Pearson korelasyonuna göre dişi sıçanlar ile yapılan biyodağılım çalışmalarında bazı organlara ait P değerleri.

Organ	P Değeri
K.Bağırsak-Yağ arası	0.02
Mide- Karaciğer arası	0.01
Mide-İ. bağırsak arası	0.02
Mide-Dalak arası	0.03
Mide-Pankreas arası	0.01
Mide-Yumurta arası	0.02
Mide-Göz arası	0.01
Pankreas-Yumurta arası	0.01
Pankreas-Meme arası	0.01
Rahim-yumurtalık arası	0.03
Meme-Yumurtalık arası	0.02

Çizelge 4.6 ve 4.7'den de görüldüğü üzere dişi ve erkek sıçanlar için yapılan varyans analizinin sonucuna göre her iki cins içinde kalın bağırsakta, çizelge 4.8 ve 4.9'da ise Pearson korelasyonuna göre mide ile ince bağırsak, dalak ve göz arasında istatistiksel bir uyum görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

BevMab bileşiği ile DTPA'nın konjugasyonu sonucu oluşan BevMab-DTPA bileşiğinin ^{99m}Tc radyonüklidi ile işaretlenme potansiyeli TLRC, ve HPLRC analizleri yöntemleri ile değerlendirilmiş, %95'in üzerinde bir işaretleme verimi bulunmuştur. Serumda stabilite çalışmaları ^{99m}Tc-BevMab-DTPA bileşiğinin 37 °C'de çalışma periyodu süresince oldukça kararlı olduğunu göstermiştir.

Hem dişi hem de erkek sıçanlarda biyodağılım sonuçlarının erkeklik ve dişilik organları dışında kalan organlar %ID/g değerleri belirgin bir farklılık göstermediği görülmüştür. Ancak işaretli bileşiğin tutulumu; özellikle dişi hayvanlar için mide, meme, yumurtalık, erkekler için ise mide yanısıra prostat, kalın bağırsak gibi organlarda 240. dakikaya değin istatistik sonuçlarıyla da uyum içerisinde olması nedeniyle tümör dokusunu görüntüleme kullanılabilirliği önerilmektedir.

Sonuç olarak yapılan bu çalışma doğrultusunda, anjiogenezisde kilit rol oynayan VEGF'e karşı etkin olan Bevacizumab'ın, DTPA ajanı ile daha hidrofilik bir yapıya dönüştürülerek ^{99m}Tc ile işaretli bileşiğinin, kanserde *in vivo* görüntüleme ajanı olarak kullanılabilineceği düşünülmektedir. Hücre kültürü deneyleri ve tümörlü hayvan modeli içeren ilave çalışmalarla, elde edilen sonuçların geliştirilerek, bileşiğin, erken tümör dedeksiyonu yanısıra, tümör gelişiminin inhibasyonuna da yönelik ilerlemelere katkıda bulunabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Abbas S. M., Song, E. Y., Raja, C., Beretov, J., Morgenstern, A., Apostolidis, C., Russell, P. J., Kearsley, J. H., Abbas, K., Allen, B. J.**, 2008, Preparation And Testing Of Bevacizumab Radioimmunoconjugates With Bismuth-213 And Bismuth-205/Bismuth-206, *Cancer Biol Ther*, (10): 1547-1554 p.
- Anderson, W. T. and Strand, M.**, Stability, Targeting, And Biodistribution Of Scandium-46- And Gallium-67- Labeled Monoclonal Antibody In Erythroleukemic Mice, *Cancer Research*, Vol; 45, 2154-2158 p.
- Asano, M., Yukita, A., Matsumoto, T., Konda, S., and Suzuki, H.**, 1995, Inhibition Of Tumor Growth And Metastasis By An Immunoneutralizing Monoclonal Antibody To Human Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor 121, *Cancer Research*, 55:5296–5301 p.
- Ataergin, A. S.**, 1999, Kanser Tedavisinde Anjiogenez İnhibitörlerinin Yeri (The Place of Angiogenesis Inhibitors in Cancer Therapy), *T Klin Tip Bilimleri*, 19:100 – 105 s.
- Blood, C. H., and Zetter B. R.**, 1990, Tumor İnteractions With Thevasculature: Angiogenesis And Tumor Metastasis, *Biochem Biophys Acta* 1032: 89-118 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Chen, W. J., Yen, C. L., Lo, S. T., Chen, K. T., Lo, J. M.,** 2008, Direct ^{99m}Tc Labeling Of Herceptin (Trastuzumab) By $^{99m}\text{Tc}(\text{I})$ Tricarbonyl Ion, *Applied Radiation and Isotopes*, 66(3):340-5 p.
- Curtis, I. R., Wendi, T., Martin, B., Sead, M., Otto, G. And Mette, S.,** 1990, Improved in Vivo Stability and Tumor Targeting of Bismuth-labeled Antibody, *Cancer Research* 50, 4221 – 4226 p.
- Delpassand, S. E., Yang, J. D., Wallace, S., Cherif, A., Quadri, M. S., Price, J., Joubert, A., Inoue, T. and Podoloff, A. D.,** 1996, Synthesis, Biodistribution And Estrogen Receptor Scintigraphy Of Indium-111-Diethylenetriamine Pentaacetic Acid-Tamoxifen Analogue, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 85(6), 553 – 559 p.
- Demirci U.,** 2006, Karaciğer Hastalıklarında Vasküler Endotel Büyüme Faktör (Vascular Endothelial Growth Factor, Vegf) Düzeyleri, Uzmanlık Tezi ,*T.C. Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi 3. İç Hastalıkları Kliniği*.
- Demirelli, F.,** 2005, Hedefe Yönelik Kanser Tedavisi Ve Monoklonal Antikorlar, *Ankem Derg*, 123 – 125 s.
- Deveci, D.,** 2003, Anjiogenezis, Arteriyojenezis Ve Vaskülojenezis Terimlerinin Anlamları Ve Hipoksik Ve/Veya İskemik Kosullarda Anjiogenezis, *Genel Tıp Derg* , 13(3): 141 – 151 s.
- Esser, S., Wolburg, K., Wolburg, H., Breier, G., Kurzchalia, T., and Risau, W.,** 1998, Vascular Endothelial Growth Factor Induces Endothelial Fenestrations In Vitro, *The Journal of Cell Biology*, Volume 140, Number 4, 947–959 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Ferrara, N. and Davis, T.**, 1997, The Biology Of Vascular Endothelial Growth Factor, *Endocrine Reviews*, 18: 4-25 p.
- Ferrara et al.**, 2003, The Biology Of VEGF And Its Receptors, *Nature Medicine*, 9:669-676 p.
- Ferrara, N., Hillan, J.K., Gerber, H. P. and Novotny, W.**, 2004, Discovery And Development Of Bevacizumab, An Anti-VEGF Antibody For Treating Cancer, *Nature Reviews Drug Discovery*, 391-400 p.
- Ferrara, N.**, 2004, Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science And Clinical Progress, *Endocrine Reviews*, 25 (4): 581-611 p.
- Folkman, J.**, 1971, Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications, *N Eng J Med* 285: 1182-6 p.
- Folkman, J.**, 1990, What Is the Evidence That Tumors Are Angiogenesis Dependent?, *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 82, No. 1.
- Folkman, J.**, 1995, Angiogenesis In Cancer, Vascular, Rheumatoid And Other Disease, *Nature Medicine*, 1:27-31 p.
- Franks, L. M., Teich, N.**, 1996, Introductin To The Cellular And Molecular Biology Of Cancer.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Garcia, J. A. S., Miguel, M., and Diaz, E. R.,** 2007, Vascular Endothelial Growth Factor Levels In Immunodepleted Plasma Of Cancer Patients As A Possible Pharmacodynamic Marker For Bevacizumab Activity, *Journal Of Clinical Oncology*, 1816-1818 p.
- Gaudreault, J., Shiu, V., Bricarello, A., Christian, J. B., Zuch, L. C. and Mounho, B.,** 2005, Concomitant Administration of Bevacizumab, Irinotecan, 5-Fluorouracil, and Leucovorin: Nonclinical Safety and Pharmacokinetics, *International Journal of Toxicology*, 24:357–363 p.
- Ghajarnia, M., Shere Kurup, S., and Eller, A.,** 2007, The Therapeutic Effects of Intravitreal Bevacizumab in a Patient with Recalcitrant Idiopathic Polypoidal Choroidal Vasculopathy, *Seminars in Ophthalmology*, 22:127–131 p.
- Güran, Ş.,** 2004, Kalp Yetmezliğinde Anjiyogenezis Ve Gen Tedavisi, *Gülhane Tıp Dergisi*, 46 (1) : 84 – 87 p.
- Hosseini, H., Nejabat, M., Mehryar M., Yazdchi, T., Sedaghat, A., and Noori, F.,** 2007, Bevacizumab Inhibits Corneal Neovascularization In An Alkali Burn Induced Model Of Corneal Angiogenesis, *Clinical and Experimental Ophthalmology*, 35: 745–748 p.
- Halvorsen, O. J., Haukaas, S., Hoiseter, P. A.,** 2000, Independent Prognostic Importance Of Microvessel Density In Clinically Localized Prostate Cancer, *Anticancer Research*; 20: 3791-3800 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Heinemann, V., Stintzing, S., Kirchner, T., Boeck, S., Jung, A.,** 2008, Clinical Relevance Of EGFR- And KRAS-Status In Colorectal Cancer Patients Treated With Monoclonal Antibodies Directed Against The EGFR, *Cancer Treatment Reviews*.
- Hiçyılmaz, Z.,** 2005, Malign Tümörlerin Yayılması, Tümörlerin Klinik Ve Patolojik Etkileri, *Veteriner Kontrol ve Araştırma Enstitüsü*, Samsun.
- Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D. D., Shalinsky, D. R., Thurston, G., Yancopoulos, G. D., McDonald, D. M.,** 2004, Inhibition Of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling In Cancer Causes Loss Of Endothelial Fenestrations, Regression Of Tumor Vessels, And Appearance Of Basement Membrane Ghosts, *Am. Journal Pathol*, 165:35-52 p.
- İncekara, O., Aksakal, Ö., İnanç, K.,** 2006, The Prognostic Factors Influencing The Overall Survivalın Patients With Endometrial Cancer, *Kartal Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi*, X V I I (3) : 1 3 2 - 1 3 6, p.
- Jakeman, L. B., Winer, J., Bennett, G. L., Altar, C. A., and Ferrara, N.,** 1992, Binding Sites For Vascular Endothelial Growth Factor Are Localized On Endothelial Cells In Adult Rattissues, *J Clin Invest*, 89:244–253 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Jimeno, A. and Funes, H.,** 2005, Membrane Receptor And Antiangiogenic Targeted Therapies In The Treatment Of Cancer, *Current Cancer Therapy Reviews*, 1: 51-61 p.
- Jung, Y.D., Mansfield, P.F., Akagi M.,** 2002, Effects Of Combination Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Receptor And Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Therapies On The Growth Of Gastric Cancer In Nude Mice Model, *Eur J Cancer*,38: 1133-40 p.
- Kamba, T., Tam, B. Y., Haskell, A., Sennino, B., Mancuso, M. R., Norberg, S. M., Davis, R. B., Gowen, L. C., Anderson, K.D., Thurston, G., Joho, S., Springer, M. L., Kuo, C. J., McDonald, D. M.,** 2006, VEGF Dependent Plasticity Of Fenestrated Capillaries In The Normal Adult Microvasculature, *Am Journal Physiol Heart Circ Physiol*, 290: H560-576 p.
- Kamba, T., and McDonald, D. M.,** 2007, Mechanisms Of Adverse Effects Of Anti-VEGF Therapy For Cancer, *British Journal of cancer*, 96, 1788-1795 p.
- Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillet, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N.,** 1993, Inhibition Of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis Suppresses Tumour Growth In Vivo, *Nature (London)*, 362:841–844 p.
- Klagsbrun, M. D., Amore, P.,** 1996, Vascular Endothelial Growth Factor And Its Receptors, *Cytokine Growth Factor Rev*, 7: 259-70 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Kowanetz M., Ferrara N.**, 2006, Vascular Endothelial Growth Factor Signaling Pathways: Therapeutic Perspective, *Clinical Cancer Research* 1;12(17):5018-22 p.
- Lacouture , E. M. D.**, 2004, Getting Under The Skin Of Cancer Development, *Section of Dermatology, Institute for Biophysical Dynamics Departments of Medicine and Chemistry The University of Chicago*.
- Lesslie, D. P., Summy, J. M., Parikh, N.U., Fan, F., Trevino, J. G., Sawyer, T. K., Metcalf, C. A., Shakespeare, W.C., Hicklin, D.J., Ellis, L.M. and Gallick, G. E.**, 2006, Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1 Mediates Migration Of Human Colorectal Carcinoma Cells By Activation Of Src Family Kinases, *British Journal of Cancer*, 94, 1710 – 1717 p.
- Lin, Y. S., Nguyen, C., Mendoza, J. L., Escandon, E., Fei, D., Meng, Y. G., and, Modi, N. B.**, 1999, Preclinical Pharmacokinetics, Interspecies Scaling, And Tissue Distribution Of A Humanized Monoclonal Antibody Against Vascular Endothelial Growth Factor, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 288-371-378 p.
- Macdonald, F., Ford, C.H.J., Casson, A.G.**, 2004, Molecular Biology of Cancer, 225-226 p.
- Macherey – Nagel.**, 2006, LC Applications.
- Margaret, M., Adams,P. G. and Weiner, M. L.**, 2003, Monoclonal Antibody Therapy For Cancer, *Annual Reviews Medicine*, 54:343–69 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Matsumura, K., Niki, I., Tian, H., Takuma, M., Hongo, N., Matsumoto, S., Mori, H.,** 2008, Radioimmunosintigraphy Of Pancreatic Cancer In Tumor-Bearing Athymic Nude Mice Using (99m)Technetium-Labeled Anti-KL-6/MUC1 Antibody, *Radiation Medicine*, 26(3):133-9 p.
- Milstein C.,** 1981, From Antibody Diversity to Monoclonal Antibodies, *Eur. J. Biochem*, 118, 429-436 p.
- Nagengast, W. B., Vries, B. G., Hospers, G. A., Mulder, N. H., Jong, J. R., Hollema, H., Brouwers, A. H., Van, D. G. A., Perk, L. R., and Lub, H. M. N.,** 2007, In Vivo VEGF Imaging with Rdiolabeled Bevacizumab in a Human Ovarian Tumor Xenograft, *The Journal of Nuclear Medicine*; 48: 8; *Health & Medical Complete*, pg.1313.
- Olgar, ve Yetgin,** 2003, Anjiogenezis, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 46, 139 – 147 s.
- Özyazgan, S.,** 2002, Toksikokinetik, *Zehirlenmeler Sempozyum Dizisi*, 32: 9 – 19 s.
- Patel, D., Bassi, R., Hooper, A., Prewett, M., Hicklin, D. J., Kang, X.,** 2009, Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab inhibits EGFR/HER-2 heterodimerization and activation, *International Journal of Oncology*, 34(1):25-32 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Paxton, R., Jakowatz, G., Beatty, J. D., Beatty, B., Viahos, W., Williams, E., Clark, B. And Shively, J.,** 1985, High-Specific-Activity ¹¹¹In-labeled Anticarcinoembryonic Antigen Monoclonal Antibody: Improved Method for the Synthesis of Diethylenetriaminepentaacetic Acid Conjugates, *Cancer Research* 45, 5694 – 5699 p.
- Pillai, M. R. A., Kothari, K., Banerjee, S., Samuel, G., Suresh, M., Sarma, H. D. and Jurisson,** 1999, Radiochemical Studies of ^{99m}Tc Complexes of Modified Cysteine Ligands and Bifunctional Chelating Agents, *Nuclear Medicine and Biology*, 26: 555 – 561 p.
- Raymond ,W., Ruddon, M.D.,** 2007, Cancer Biology, *Oxford University Press, Inc*, 207-210 p.
- Ranieri, G., Patruno, R., Ruggieri, E., Montemurro, S., Valerio, P. And Ribatti, D.,** 2006, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Target of Bevaciyumab in Cancer: From the Biology to the Clinic, *Current Medicinal Chemistry*, 13, 1845- 1857 p.
- Ribatti, D., Vacca, A., and Dammacco, F.,** 1999. The Role of the Vascular Phase in Solid Tumor Growth: A Historical Review, *Neoplasia*, 1(4): 293–302 p.
- Roberts, W. G., and Palade, G. E.,** 1997, Neovasculature Induced By Vascular Endothelial Growth Factor Is Fenestrated, *Cancer Reseach*, 57:765-772 p.
- Rosen, L. S.,** 2002, Inhibitors Of The Vascular Endothelial Growth Factor Receptor, *Hematol Oncol Clin North Amer*, 16:1173 p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

Presta, I. G., Chen, H., O'Connor, S. J., 1997, Humanization Of An Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Monoclonal Antibody For The Therapy Of Solid Tumors And Other Disorders, *Cancer Research*, 57: 4593-4599 p.

Roche San.A.Ş, 2004, Altuzan İlaç Prospektüsü.

Slapnicková, K., Kolárová P., Kynclová K., 2007, Labelling Of The Anti-III-Neurotubulin Monoclonal Antibody By ^{99m}Tc And Its Binding To Responsible Antigen, *Nuclear Medicine Rev Cent East Eur*, 10(1): 1-5 p.

Spitzer S. M., Yoeruek, E., Sierra , A., Wallenfels-Thilo, B., Schraermeyer, U., Spitzer, B., Bartz-Schmidt, U. K., Szurman, P., 2007, Comparative Antiproliferative And Cytotoxic Profile Of Bevacizumab (Avastin), Pegaptanib (Macugen) And Ranibizumab (Lucentis) On Different Ocular Cells, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol*, 245:1837–1842 p.

Stollman, T.H., Scheer, M.G., Leenders, W. P., Verrijp, K. C., Soede, A. C., Oyen, W. J., Ruers, T. J., Boerman O. C., 2008, Specific Imaging Of VEGF-A Expression With Radiolabeled Anti-VEGF Monoclonal Antibody, *Int. J. Cancer*, 122(10):2310-2314 p.

Taşdemiroğlu, E., Cases And Metastasis; Malign Tumor Tumor Pediatric Solid Relationship Between Analysis Of The 154, 2003, *Türk Nöroloji Dergisi*, 13: 8 – 11 s.

Theobald, A. E., 1989, Radiopharmaceuticals Using Radioactive Compounds In Pharmaceutics And Medicine, *Ellis Horwood Edition*.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devamı)

- Thomas, K. A.**, 1996, Vascular Endothelial Growth Factor, A Potent And Selective Angiogenic Agent, *Journal Bio Chem*; 271: 603-6 p.
- Ünak P.**, 2003, Ulusal Radyofarmasi Kursu Ders Notları, Bölüm I.
- Wang, Y., Fei1, D., Vanderlaan, M. and Song A.**, 2004, *Angiogenesis*, 7: 335–345 p.
- Wendie T.A., Strand,M.**, 1985, Stability, Targeting, And Biodistribution Of Scandium – 46 – And Gallium – 67 – Labeled Monoclonal Antibody İn Erythroleukemic Mice, *Cancer Research* 45, 2154 – 2158 p.
- Zhong, H., and Bowen, J. P.**, 2006, Antiangiogenesis Drug Design: Multiple Pathways Targeting Tumor Vasculature, *Current Medicinal Chemistry*, , 13, 849-862 849 p.
- Zhang, Junbo and Wang, X.**, 2000, Synthesis Of ^{99m}tcn(IPDTC)₂ And Its Biodistribution İn Mice, *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 249(3): 573 – 576 p.

www.monrol.com.tr

www.memorial.com.tr

www.gene.com

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlknur Demir

Doğum Yeri : Gümüşhane / Şiran

Doğum Yılı : 30.08.1982

Öğrenim Durumu:

Lisans: 2006 – Süleyman Demirel Üniversitesi Biyoloji Bölümü

Lisans: 2005 – 2006 Alexander-Friedrich-Üniversitesi Biyoloji

Yüksek Lisans: 2009 - Ege Üniversitesi Nükleer Bilimler Enstitüsü