

**GLİOBLASTOM TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE
DOKSORUBİSİN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİN
GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF
DOXORUBICIN LOADED NANOPARTICLES FOR
TREATMENT OF GLIOBLASTOMA**

EDA ERKAN

PROF. DR. SİBEL PEHLİVAN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

Tanıdığım en araştırmacı bilim insanı; Oğluma

ÖZET

GLİOBLASTOM TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE DOKSORUBİSİN YÜKLÜ PLGA NANOPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Kim. Müh. Eda ERKAN

Yüksek Lisans, Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN

Haziran 2025, 115 sayfa

Malign gliomlar, en agresif beyin tümörlerindendir. Bu grupta en çok rastlanan türlerden biri olan glioblastom tedavisinde, cerrahi, radyasyon terapisi ve kemoterapi yöntemlerinin tek veya kombinasyon halinde uygulanmasına rağmen tanıdan sonra hastaların yaklaşık %5'i 5 yıl hayatta kalmaktadır.

Glioblastomda uygulanan klasik kemoterapide yüksek doz antineoplastik ilaç verilmesi hastalarda çok ciddi yan etkilere neden olabilmektedir. Ayrıca Kan Beyin Bariyeri (KBB) pek çok antineoplastik ilacın beyne ulaşmasını engellemektedir. Glioblastomun daha etkin bir şekilde tedavi edilmesi için, tümör dokusuna yüksek/istenen miktarda antineoplastik ilacı ulaştırmak üzere yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlere büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Bu sistemler arasında nanopartiküller son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur.

Bu tez çalışmasının amacı, tümör dokusunda yüksek miktarda, uzun süre ve kontrollü etkin madde salımı sağlayacak, borneol ile permeabilitesi artırılmış, intravenöz yolla uygulanmak üzere tasarlanmış doksorubisin HCl yüklü PLGA (poli-laktik-ko-glikolik

asit) nanopartiküllerini geliştirmektedir. Geliştirilen sistemin, KBB'yi geçerek GBM hücrelerine hedefli ilaç taşması ve tedavi etkinliğini artırması amaçlanmaktadır. Bu kapsamda, nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmış ve sistemin etkinliği RG2 ve U87 GBM hücre hatlarında iki boyutlu ve üç boyutlu (tümör sferoid) hücre kültürü modellerinde değerlendirilmiştir.

PLGA nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için S/Y/S oklu emülsiyon-c buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Doksorubisin HCl miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi ve validasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı proses parametrelerinin etkilerinin değerlendirildiği n formülasyon çalışmalarının ardından belirlenen sonuç formülasyon üzerinde partikül büyüklüğü, zeta potansiyel, ilaç yükleme etkinliği, ilaç salım ve yüzey özelliklerinin değerlendirilmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Formülasyonların etkinliğinin hücre kültürü üzerinde değerlendirildiği çalışmalarda RG2 ve U87 hücre hatlarında iki boyutlu ve üç boyutlu (tümör sferoid) hücre kültürü deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bunun için doksorubisin HCl'nin bu iki hücre hattı zerindeki IC50 değerleri elde edilmiştir. İki boyutlu hücre kültüründe kontrol ve doksorubisin HCl çözeltisine göre borneol içeren veya içermeyen doksorubisin HCl yüklü PLGA nanopartiküllerinin sitotoksisite değerlendirmeleri MTT testi ile yapılmıştır. Üç boyutlu hücre kültüründe tümör sferoidleri oluşturularak, iki boyutlu hücre kültüründe yer alan grupların sferoidler üzerindeki sitotoksisite değerlendirmeleri WST-1 testi ile yapılmıştır. Borneolün *in vitro* hücre kültüründe permeasyon üzerine etkilerini değerlendirmek üzere doksorubisin HCl zeltisi, borneol içeren veya içermeyen doksorubisin HCl yüklü PLGA nanopartikülleri kullanarak *in vitro* permeabilite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda hedeflenen karakterizasyon özelliklerine sahip PLGA nanopartikülleri elde edilebilmiş ve hücre kültüründe, hazırlanan nanopartikül formülasyonlarının ilaç çözeltisine göre daha etkin olduğu ve borneol içeren formlasyoların en yüksek etkinlik göstererek permeabilitede artışa neden olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Glioblastom, doksorubisin, PLGA, borneol, nanopartikül, permeasyon artırıcı.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND *IN VITRO* EVALUATION OF DOXORUBICIN LOADED NANOPARTICLES FOR TREATMENT OF GLIOBLASTOMA

Kim.Müh. Eda ERKAN

Master of Science, Department of Nanotechnology and Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN

June 2025, 115 pages

Malignant gliomas are among the most aggressive brain tumors. Despite the use of surgery, radiation therapy and chemotherapy alone or in combination in the treatment of glioblastoma, which is one of the most common types in malignant gliomas, approximately 5% of patients survive 5 years after diagnosis.

In classical chemotherapy applied to glioblastoma, high-dose antineoplastic drugs can cause very serious side effects in patients. In addition, the Blood Brain Barrier (BBB) prevents many antineoplastic drugs from reaching the brain. In order to treat glioblastoma more effectively, there is a great need for innovative drug delivery systems to deliver high/desired amounts of antineoplastic drugs to the tumor tissue. Among these systems, nanoparticles have been the focus of researchers in recent years.

The aim of this thesis is to develop doxorubicin-loaded PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles, enhanced with borneol for increased permeability, and designed for intravenous administration, in order to achieve high, prolonged, and controlled drug release within tumor tissue. The system is intended to cross the BBB and deliver the active compound specifically to GBM cells, thereby enhancing therapeutic efficacy. The nanoparticles were characterized, and their performance was evaluated in two-dimensional and three-dimensional (tumor spheroid) cell culture models using RG2 and U87 GBM cell lines.

O/W emulsion and solvent evaporation method were used for the preparation of PLGA nanoparticle formulations. High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis and validation studies were performed for the determination of doxorubicin amount. After the preliminary formulation studies in which the effects of different process parameters were evaluated, particle size, zeta potential, drug loading efficiency, drug release and surface properties were evaluated on the final formulation.

In the studies in which the effectiveness of the formulations was evaluated on cell culture, two-dimensional and three-dimensional (tumor spheroid) cell culture studies were performed on RG2 and U87 cell lines. For this purpose, IC₅₀ values of doxorubicin on these two cell lines were determined. Cytotoxicity evaluations of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with or without borneol were performed with MTT test compared to control and doxorubicin solution in two-dimensional cell culture. Tumor spheroids were formed in three-dimensional cell culture and cytotoxicity evaluations of the groups in two-dimensional cell culture on spheroids were performed with WST-1 test. Cell permeability experiments were performed using doxorubicin solution, doxorubicin loaded PLGA nanoparticles with or without borneol to evaluate the effects of borneol on permeation in *in vitro* cell culture. As a result of the experiments, PLGA nanoparticles with targeted characterization properties could be obtained and in cell culture studies, it was determined that nanoparticle formulations were more effective than drug solution and borneol-containing formulations showed the highest effectiveness and caused an increase in permeability.

Keywords: Glioblastoma, doxorubicin, PLGA, borneol, nanoparticle, permeation enhancer.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans çalışmamda, her an gerçek anlamıyla yanımda olan, kapısını her çaldığımda büyük bir özveri ile sorularımı cevaplayan, endişelerimi gideren, beni teşvik eden, ilham veren, bu akademik süreçte bir danışmandan daha fazlası olan danışmanım Prof.Dr. Sibel Pehlivan’a teşekkürü bir borç bilirim.

Tez sürecimde sunduğu olanaklar ve destek için Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Erem Bilensoy’a, değerli katkıları ve verdikleri kıymetli eğitim için bölümümüzdeki tüm hocalarıma teşekkür ederim. Ayrıca, Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı’nda aldığım eğitimle akademik çalışmalarımı zenginleştirme fırsatı bulduğum için başta Prof. Dr. Eylem Güven olmak üzere tüm bölüm hocalarına gönülden teşekkür ederim.

Hücre kültürü çalışmalarında destek veren, bilgi birikimi ve deneyimi ile yol gösteren Dr.Öğr.Üyesi Gamze Varan’a teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bana her zaman büyük bir özveriyle destek olan, bilgi birikimlerini ve emeklerini esirgemeyen, takım ruhunu güçlü bir şekilde hissettiren; Dr. Öğr. Üyesi Eren Aytekin’e, Öğr. Gör. Dr. Tuğba Çopur’a, Ecz. Maide Dalkılınc’a, Ecz. Rümeyza Ceylan’a ve Pehlivan Ekibi’nin her bir üyesine içten teşekkür ederim.

Eğitim sürecim ve tez çalışmalarım esnasında, desteklerini hissettiğim, omzumda her an elleri olan canım aileme; Vildan Erkan, Nebih Erkan, Aybüke Erkan’a ne kadar teşekkür etsem az olacaktır. Bu süreçte desteğini hep hissettiğim canım babam Şaban Yapar’a, şu günleri görse en az benim sevineceğini bildiğim canım annem Vesile Yapar’a gönülden teşekkür ederim.

İçimdeki okuma hevesini her zaman destekleyen, bana bu imkânı sağlayan, bu yolda benimle yürüyen, sabırla beni bekleyen ve sayısız özveride bulunan biricik eşim Sertaç Erkan’a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Teşekkürlerin en büyüğü ise; bana sonsuz güvenen, yapabileceğime inanan, yorulduğumda bana “hadi yaparsın” diyen, en büyük ilham kaynağım, araştırma arkadaşım, ilgi ve ufuk alanımı sonsuz yapan oğlum; Mustafa Uras Erkan’a. Seninle yapacağımız yeni deneyleri, gözlemleri ve keşifleri her zaman heyecanla bekleyeceğim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kanser	4
2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri	4
2.3. Glioblastom	5
2.3.1. Glioblastom Epidomiyolojisi ve Fizyolojisi	6
2.3.2. Glioblastomun Tedavi Yöntemleri	6
2.4. Beyne İlaç Taşıma Stratejileri	9
2.5. Kan Beyin Bariyeri	10
2.5.1. Kan Beyin Bariyerinin Anatomik Yapısı	10
2.5.2. Kan Beyin Bariyeri ve Glioblastom	11
2.5.3. Kan Beyin Bariyerini Aşma Stratejileri	12
2.6. Nanoteknoloji	17
2.6.1. Nanotıp	19
2.6.2. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistemler	25
2.7. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü	45
2.7.1. Üç Boyutlu Hücre Kültürünün Üstünlükleri	46
2.7.2. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Üç Boyutlu Hücre Kültürü	48
2.7.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Teknikleri	49
2.7.4. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerinin Karakterizasyonu	54
2.8. Doksorubisin Hidroklorür	55

2.9. Borneol	60
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	62
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar 62	
3.1.1. Kimyasal Maddeler	62
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar	63
3.2. Doksorubisin HCl'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini	64
3.3. Analitik Yöntem Validasyonu	64
3.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi	67
3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	69
3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini	69
3.5.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi	69
3.5.3. İlaç Yükleme Çalışmaları	70
3.5.4. <i>In Vitro</i> Salım Çalışmaları	70
3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları	71
3.6.1. İki Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları	71
3.6.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları	72
3.6.3. Hücre Kültüründe Permeabilite Çalışmaları	73
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	75
4.1. Doksorubisin HCl'nin HPLC Miktar Tayini ve Analitik Validasyon Çalışmaları	76
4.2. Formülasyon Çalışmaları	80
4.2.1. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Geliştirilmesi 80	
4.2.2. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu	82
4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları	87
4.3.1. İki Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları	87
4.3.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları	90
4.3.3. <i>In Vitro</i> Permeabilite Çalışmaları	93

5. YORUM	95
6. KAYNAKLAR	96
EKLER	116
EK 1- Tez Çalışması Orjinallik Raporu	116
ÖZGEÇMİŞ	117



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Glioblastom için lokal tedavi yöntemlerinin şematik gösterimi ((22) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	7
Şekil 2.2. Glioblastom tedavisinde kan beyin bariyerini aşan tedavi yöntemleri ((27) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	9
Şekil 2.3. Glioblastom ve kan beyin bariyerinin şematik gösterimi ((46) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	12
Şekil 2.4. Nanomalzeme boyutlarının karşılaştırılmasının şematik gösterimi ((65) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	18
Şekil 2.5. Nanopartikül tipleri ve bazı nanopartikül uygulama alanlarının şematik gösterimi ((68) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	19
Şekil 2.6. Nanopartiküllerin kanser tanısı ve tedavisinde kullanımlarının şematik gösterimi ((73) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	21
Şekil 2.7. Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerin tarihsel gelişiminin şematik gösterimi ((88) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	26
Şekil 2.8. Emülsiyon çözücü uzaklaştırma metodunun şematik gösterimi((103) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	32
Şekil 2.9. Nanopartiküler karakterizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi ((110) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	39
Şekil 2.10. İskele içermeyen yöntemler ile sferoid eldesinin şematik gösterimi ((131) numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).....	52
Şekil 2.11. Doksorubisin HCL'nin kimyasal yapısı (137).....	56
Şekil 3.1. İn vitro permeasyon çalışması için kullanılan Thincert® yöntemi ve TEER ölçüm cihazının şematik gösterimi.....	74
Şekil 4.1. Doksorubisin HCL' e ait HPLC kromatogramı (25 µg/mL).....	77
Şekil 4.2. Doğrusallık çalışmasıyla elde edilen doksorubisin HCL kalibrasyon eğrisi (n=6).....	77
Şekil 4.3. Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü değerleri ($X \pm SS$, n=6). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP:Doksorubisin HCL içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksorubisin HCL ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)	82
Şekil 4. 4. Doksorubisin HCL ve borneol içeren PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve PDI sonuç raporu örneği.....	83
Şekil 4.5. Hazırlanan formülasyonların polidispersite değerleri ($X \pm SS$, n=6). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP: Doksorubisin HCL içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksorubisin HCL ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)	84

Şekil 4.6. Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyeli değerleri ($\bar{X} \pm SS$, n=6). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP:Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)	84
Şekil 4. 7. Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel sonuç raporu örneği.	85
Şekil 4.8. Hazırlanan formülasyonlara ait SEM görüntüleri. (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP:Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu).....	86
Şekil 4.9. Doksoşrubisin HCl Yüklü PLGA Nanopartikül Formülasyonun Kümülatif İlaç Salım Profili (kümülatif ND salım profili ($\bar{X} \pm SS$, n=6))......	87
Şekil 4.10. RG2 hücre hattı için uygulanan formülasyonların sitotoksisite bulguları. (n=3, $\bar{x} \pm SS$) (DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül, NP: boş nanopartikül, DÇ: Doksoşrubisin HCl çözeltisi) İstatiksel olarak iki yönlü ANOVA testi uygulanmış olup ****= $p < 0,0001$ olarak gösterilmiştir.	89
Şekil 4.11. U87 hücre için uygulanan formülasyonların sitotoksisite bulguları. (n=3, $\bar{x} \pm SS$) (DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: Doksoşrubisin HCl çözeltisi) İstatiksel olarak iki yönlü ANOVA testi uygulanmış olup ns=anlamlı değil, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ olarak gösterilmiştir.	90
Şekil 4.12. RG2 hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin 0. ve 48.saate ait mikroskop görüntüleri. (Kontrol: Hiçbir uygulama yapılmamış sferoid, DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikü formülasyonu uygulanan sferoid)	91
Şekil 4.13. RG2 hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin 0. ve 72.saate ait mikroskop görüntüleri. (Kontrol: Hiçbir uygulama yapılmamış sferoid, DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan sferoid).....	91
Şekil 4.14. RG2 sferoidlerine uygulanan formülasyonların sitotoksisite 48 saatlik bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül, NP: Doksoşrubisin HCl içermeyen nanopartikül) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ olarak gösterilmiştir.....	92
Şekil 4.15. U87 sferoidlerine uygulanan formülasyonların sitotoksisite 72 saatlik bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül, NP: Doksoşrubisin HCl içermeyen nanopartikül, DÇ: Doksoşrubisin HCl çözeltisi) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup; ns=anlamlı değil, *= $p < 0,05$, olarak gösterilmiştir.	93
Şekil 4.16. RG2 hücre hattında Doksoşrubisin HCl'in permeabilite bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: Doksoşrubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksoşrubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: Doksoşrubisin HCl çözeltisi, DBÇ: Doksoşrubisin HCl ve borneol çözeltisi) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup ***= $p < 0,001$ olarak gösterilmiştir.....	94

Şekil. 4.17. U87 hücre hattında Doksorubisin HCl'in permeabilite bulguları ($n=3$, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: Doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: Doksorubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: Doksorubisin HCl çözeltisi, DBÇ: Doksorubisin HCl ve borneol çözeltisi) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ olarak gösterilmiştir.....94



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'ne (2021) göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi (16).....	4
Çizelge 2.2. Kan beyin engelini aşma metotları.....	14
Çizelge 2.3. FDA Onaylı Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistem Örnekleri (75-77).....	23
Çizelge 2.4. İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürünün karşılaştırılması (117,118,121).	47
Çizelge 2.5. Sferoid yapılı hücre dizilerinin karakterizasyon yöntemleri (131).....	55
Çizelge 2.6. Doksorubisin HCl'in fizikokimyasal özellikleri (138).	57
Çizelge 2.7. Doksorubisin HCl'in yan etkileri (5,6,140).	59
Çizelge 2.8. Borneolün fizikokimyasal özellikleri (139).....	60
Çizelge 3.1. Kullanılan maddeler ve markaları.....	62
Çizelge 3.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar.....	63
Çizelge 3.3. Doksorubisin HCl'in HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar(142).	64
Çizelge 3.4. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan nanopartikül formülasyon parametreleri.	68
Çizelge 3.5. Sonuç formülasyonunun hazırlanması için kullanılan formülasyon parametreleri.	68
Çizelge 4.1. Doksorubisin HCl'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=6).	78
Çizelge 4.2. Doksorubisin HCl'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik çalışması sonuçları (n=6)	79
Çizelge 4.3. Doksorubisin HCl'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).....	79
Çizelge 4.4. Doksorubisin HCl'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait stabilite çalışması sonuçları (n=6).....	80
Çizelge 4.5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan formülasyon kodları ve içerikleri.....	88

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A	Geçirgenliğin gerçekleştiği yüzey alanı
C_0	Başlangıç konsantrasyonu
dQ/dt	Zaman başına geçen madde miktarı
P_{app}	Görünür geçirgenlik katsayısı

Kısaltmalar

AFM	Atomik kuvvet mikroskobu
AuNP	Altın nanopartikül
BOS	Beyin-omurilik sıvısı
BTB	Beyin-tümör bariyeri
CT	Bilgisayarlı tomografi
DLS	Dinamik ışık saçılması
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
ECM	Hücre dışı matrisi
EDX	Enerji dağılımlı X-ışını analizi
EMA	Avrupa İlaç Ajansı
EPR	Artmış geçirgenlik ve alıkonma
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GBM	Glioblastom
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IV	İntravenöz
KBB	Kan beyin bariyeri
LNP	Lipit nanopartikül

MRI	Manyetik rezonans görüntüleme
MSS	Merkezi sinir sistemi
NVU	Nörovasküler birim
PDT	Fotodinamik terapi
p-GBM	Pediyatrik glioblastoma
PLGA	Poli laktik-ko-glikolik asit
PTT	Fototermal terapi
QDs	Kuantum noktaları
RES	Retikuloendotelial sistem
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPION	Süperparamanyetik demir oksit
SPR	Yüzey plazmon rezonansı
STM	Taramalı tünelleme mikroskobu
TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
TMZ	Temozolomid
UV-Vis	Morötesi-görünür spektrometri
V _d	Dağılım hacmi
XPS	X-Işını fotoelektron spektroskopisi
XRD	X-Işını kırınımı

1. GİRİŞ

Glioblastom (GBM), merkezi sinir sisteminin en agresif özellikte ve yaygın olan malign tümörlerindendir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından sınıf 4 olarak sınıflandırılan bu tümör, hızlı hücre çoğalması, çevre dokulara yayılma eğilimi ve yoğun damar oluşumu gibi özellikler göstermektedir [1]. Hastalığın tedavisinde cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapi kombinasyonu uygulanmasına rağmen, ortalama sağkalım süresi 12-15 aydır [2].

GBM’de tümör hücrelerinin çevredeki sağlıklı hücrelerin aralarına yayılması nedeniyle cerrahi işlem ile ana tümör kitlesi çıkarılsa bile bir miktar tümör hücresi ortamda kalarak nükse neden olabilmektedir. Radyoterapi erken evredeki tümörlerin tedavisinde daha etkindir. Sistemik klasik kemoterapide yüksek doz antineoplastik ilaç uygulaması, ciddi yan etkilere neden olabilmekte ve bu nedenle tedavi yarıda kalabilmektedir. Ayrıca, Kan Beyin Bariyeri (KBB) pek çok antineoplastik ilacın beyne ulaşmasını engellemektedir. GBM’nin yüksek tekrar etme oranı ve tedaviye karşı direnç göstermesi hastalığın tedavi sürecini oldukça güçleştirmektedir. GBM’de uygulanan kemoterapinin daha etkin ve minimum yan etki gösterecek şekilde yürütülebilmesi için; sistemik olarak herhangi bir zarar vermeden tümör dokusuna yüksek/istenen miktarda antineoplastik ilacı ulaştırmak üzere yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlere büyük ihtiyaç bulunmaktadır. Bu sistemler arasında nanopartiküller son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı olmuştur [3].

Nanopartiküller, terapötik ve diagnostik ilaçların hedef dokulara daha iyi penetre olmasını sağlayan, içerdikleri etkin maddenin salımını kontrol altında tutabilen ve uzun süreli etki sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu nedenle ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemler GBM tedavisinde konvansiyonel tedavilere göre üstünlük göstermektedir. Nanopartiküllerin aktif hedeflendirme maddeleri ile tasarlanması veya pasif hedeflendirme ile istenen bölgelere ulaşabilmesi, hedeflenen dokuda sürekli ve yüksek miktarlarda ilaç bulunmasını sağlamaktadır.

Özellikle penetrasyonu zayıf olan ilaçların nanopartiküler sistemlerle uygulanması ve formülasyona permeabilite artırıcı yardımcı maddelerin ilave edilmesi, ilaçların absorpsiyonunun artırılmasında önemli bir stratejidir [4].

Doksorubisin, antrasiklin grubu bir antineoplastik ilaçtır ve birçok kanser türünün tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Doksorubisin, DNA'nın yapısını bozar ve hücrelerin çoğalmasını sağlayan topoisomera 2 enzimini bloke ederek kanserli hücrelerin ölmesini sağlar [5]. Meme kanseri, lösemi, lenfoma ve over kanseri gibi katı tümörlerde etkili olduğu gözlenmiştir [6]. Ancak, doksorubisin uygulamasından sonra gelişen genel yan etkilerin yanında anafilaksi, kalp hasarı gibi ciddi yan etkiler de gözlenebilmektedir. Doksorubisinin uzun süreli kullanımının önemli kardiyak toksisiteye neden olduğu ve doksorubisin kaynaklı konjestif kalp yetmezliğinde 1 yıl içinde ölüm oranının yaklaşık %50 olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar doksorubisinin doku/tümör penetrasyonunda problemlerle karşılaştığını da göstermiştir. Ayrıca, doksorubisin KBB'yi etkin biçimde geçememektedir. Bu durum, doksorubisinin hedeflendirilmiş bir nano taşıyıcı tarafından etki bölgesine taşınarak, aynı zamanda doku penetrasyonunun artırılması ve sistemik ilaç dozunun düşürülmesi yaklaşımını rasyonel kılmaktadır [7].

PLGA (poli laktik-ko-glikolik asit), fiziksel dayanıklılığı yüksek, biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen bir polimerdir. Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmış olması nedeniyle ilaç, protein, DNA, RNA ve peptit gibi çeşitli makromoleküllerin taşınmasında kapsamlı olarak araştırılmıştır [8]. Klinik alanda uzun yıllara dayanan kullanım geçmişi ve kontrollü ilaç salımı sağlama potansiyeli sebebiyle sentetik polimerler arasında en çok tercih edilen polimerdir (9–11).

İlaçların biyolojik bariyerlerden geçişini artırmak amacıyla çeşitli permeasyon artırıcı maddeler kullanılmaktadır. Penetrasyon artırıcı olarak kullanılan maddelerden biri de borneoldür. Borneolün gastrointestinal mukoza zarı, cilt,

burun mukozası, kornea ve KBB gibi çeşitli biyolojik bariyerlerden ilaç geçişini arttırdığı bildirilmiştir [12], [13].

Bütün bu bilgilerin ışığında bu tez çalışmasının amacı, intravenöz yol ile kullanılmak üzere tümör dokusunda yüksek miktarda, uzun süre ve kontrollü etkin madde salımı sağlayacak, borneol ile permeabilitesi artırılmış doksorubisin HCl yüklü PLGA nanopartiküllerini geliştirmek, karakterizasyon çalışmalarını yaparak RG2 ve U87 GBM hücre hatlarında iki boyutlu ve üç boyutlu (tümör sferoid) hücre kültürlerinde etkinliğini değerlendirmektir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanser

Kanser, hücre büyümesi ve bölünmesinin normal düzeninin bozulmasıyla karakterize, genetik ve çevresel etkenlerin karmaşık etkileşimi sonucu ortaya çıkan heterojen bir hastalık grubudur [14]. Kanser, küresel ölçekte en yaygın ölüm nedenlerinden biri olarak 2020 yılında yaklaşık 10 milyon insanın yaşamını yitirmesine neden olmuştur [15]. 2018'de yaklaşık 17 milyon kişiye kanser tanısı konmuş ve 9,6 milyon kişi bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir ve 2040 yılında kanser vakalarının sayısının 27,5 milyona ulaşacağı tahmin edilmektedir [16]. Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) verilerine göre, Türkiye'de 2022 yılında toplam 240.013 yeni kanser vakası teşhis edilmiş ve 129.672 kişi kanser nedeniyle hayatını kaybetmiştir [17].

2.2. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri, beyin ve omuriliği etkileyen neoplastik oluşumlardır ve tüm kanserlerin yaklaşık %2'sini oluşturmalarına rağmen, yüksek morbidite ve mortalite oranları nedeniyle klinik olarak büyük öneme sahiptir. Bu tümörler, yerleşim yerine ve biyolojik davranışlarına göre iyi huylu (benign) ya da kötü huylu (malign) olarak sınıflandırılabilir. MSS tümörleri içinde GBM, düşük sağkalım oranları ve giderek artan görülme sıklığı nedeniyle öne çıkan bir tümör tipidir. DSÖ tarafından yapılan güncel sınıflamada, 130'dan fazla farklı beyin tümörü tipi tanımlanmıştır. Bu çeşitlilik, tanı ve tedavi süreçlerinde multidisipliner yaklaşımların önemini ortaya koymaktadır [16].

Çizelge 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'ne (2021) göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi [16].

Derece	Örnek Tümör Tipleri	Genel Özellikleri
Derece I (Düşük Derece)	Pilositik astrositom, gangliogliom, kraniyofaringiom	Genellikle iyi huylu tümörlerdir. Cerrahi ile tamamen çıkarılabilirler ve uzun sağkalım süresi sunarlar.

		Yavaş büyürler ve infiltrasyon yapmazlar.
Derece II (Düşük-Orta Derece)	Diffüz astrositom, saf oligodendrogliom	Hafif infiltratif yapıdadırlar. Yavaş seyirli dirler ancak zamanla yüksek dereceli tümörlere dönüşebilirler.
Derece III (Yüksek Derece)	Anaplastik astrositom, anaplastik oligodendrogliom, anaplastik ependimom	Malign potansiyeli yüksek, hızlı büyüyen ve tekrarlama eğilimi gösteren tümörlerdir. Tedaviye direnç gösterebilirler.
Derece IV (En Yüksek Derece)	Glioblastom (GBM), medulloblastom, ependimoblastom, pineoblastom	En agresif tümör grubudur. Hızlı büyüme, yayılma, nekroz ve yüksek malignite potansiyeli taşırlar. Prognoz genellikle kötüdür.

2.3. Glioblastom

GBM, yetişkinlerde en sık rastlanan ve en agresif primer beyin tümörlerinden biridir. DSÖ tarafından dördüncü derece gliom olarak sınıflandırılan GBM, tüm gliomların yaklaşık %50'sini oluşturur [16]. Bu tümör, hızlı hücre bölünmesi, yoğun damar oluşumu (anjyogenez), çevre dokulara yayılma ve nekroz alanları gibi karakteristik özelliklere sahiptir [1]. GBM taşıyan hastaların ortalama yaşam süresi 12–15 ay civarındadır ve beş yıl sağ kalım oranı %5'in altındadır [2].

GBM'de standart tedavi, cerrahi işlem, radyoterapi ve kemoterapiyi içerir [2]. Ancak GBM'nin yayılım gösterdiği alanların cerrahi işlem ile tam temizlenememesi, KBB' nin ilaçların tümöre ulaşmasını engellemesi ve tedavinin sağlıklı beyin dokularına da zarar verme olasılığı tedavi başarısını sınırlar. Ayrıca, tümör mikro çevresindeki oksijen yetersizliği (hipoksi), radyoterapiye karşı direnç oluşturur [18]. Bu nedenlerle, mevcut tedavilere rağmen hastaların sağ kalım süresi sınırlı kalmaktadır. Son yıllarda nanoteknoloji, immünoterapi ve gen tedavisi gibi yenilikçi yaklaşımlar, GBM tedavisinde umut verici alternatifler olarak araştırılmaktadır [16].

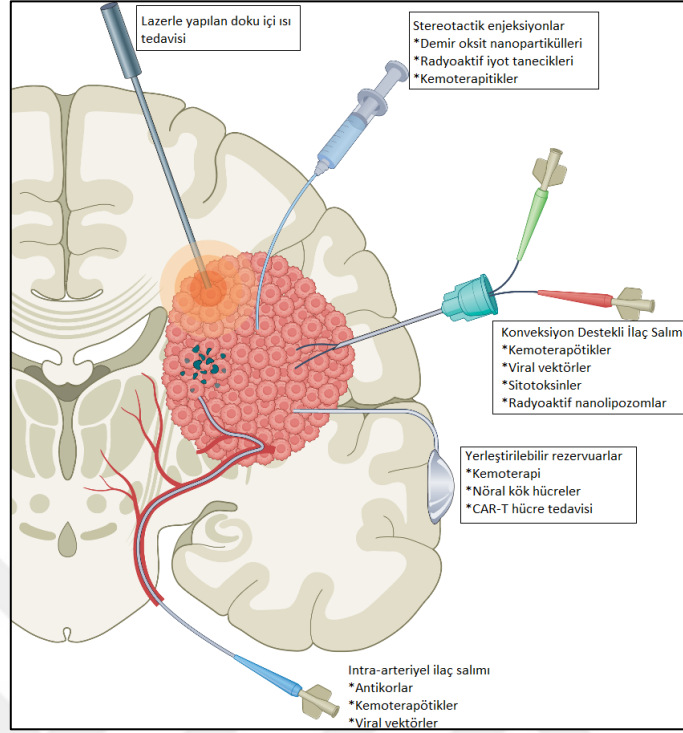
2.3.1. Glioblastom Epidemiyolojisi ve Fizyolojisi

GBM, astrositik glial hücrelerden köken alan ve DSÖ sınıflamasına göre en yüksek dereceye (Derece IV) sahip malign gliom türüdür [16]. GBM'nin görülme sıklığı farklı çalışmalarda değişiklik göstermekle birlikte, 100.000 kişi/yıl başına 3,19 ile 4,17 arasında bildirilmektedir. Pediatrik yaş grubunda (0–18 yaş) GBM insidansı daha düşüktür ve yaklaşık 100.000 kişide 0,85 olarak rapor edilmiştir. Bu yaş grubunda görülen pediatrik GBM (p-GBM) olguları, primer beyin tümörlerinin %3 ila %15'ini oluşturmaktadır. Merkezi Sinir Sistemi (MSS) kaynaklı tümörler, çocukluk çağındaki kanserler arasında ikinci sırada yer alırken, katı (solid) tümörler içinde en yaygın olanıdır [19].

GBM, beynin destek hücrelerinden biri olan astrositlerden kaynaklanan yüksek dereceli bir tümördür. Astrositler, beyin ve omurilikte sinir hücrelerini destekleyen, besleyen ve çevreleyen hücrelerdir [20]. GBM, bu hücrelerin kontrolsüz çoğalmasıyla ortaya çıkar ve beyin dokusuna hızla yayılma özelliği gösterir. Tümör hücreleri, normal hücrelere göre daha hızlı bölünür, yeni damarlar oluşturarak beslenir ve çevre dokulara saldırarak yayılır. Ayrıca, tümör içindeki oksijen eksikliği (hipoksi), tümörün daha agresif hale gelmesini tetikler. GBM hücreleri, bağışıklık sisteminden kaçmak için çevresindeki savunma hücrelerini etkileyebilir ve bu da hastalığın tedavisini zorlaştırır [21]. GBM hücrelerinin çoğalmasını destekleyen başlıca mekanizmalar arasında hücre döngüsü kontrolünün bozulması, apoptozisin engellenmesi ve anjiyogenez (yeni damar oluşumu) önemli rol oynar [21].

2.3.2. Glioblastomun Tedavi Yöntemleri

GBM, hızlı ilerleyen ve yüksek dereceli bir beyin tümörü olduğu için tedavi süreci oldukça zorludur ve GBM tedavisi genellikle multidisipliner bir yaklaşım gerektirir (Şekil 2.1). Tedavideki temel amaç; tümör kitlesini mümkün olduğunca azaltmak, hastalığın ilerlemesini yavaşlatmak, hastanın nörolojik fonksiyonlarını korumak ve yaşam süresini uzatmaktır. Tedavi süreci; cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve kemoterapiden oluşan standart bir kombinasyonla yürütülmektedir. Bu üçlü yaklaşım, “Stupp protokolü” olarak da bilinir ve günümüzde GBM tedavisinde altın standart kabul edilmektedir [2].



Şekil 2.1. Glioblastom için lokal tedavi yöntemlerinin şematik gösterimi ([22] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

2.3.2.1. Cerrahi Tedavi

Cerrahi, GBM hastalarında genellikle ilk başvuru ve en kritik tedavi aşamasıdır. Bu yöntem hem tümörün mümkün olduğunca çıkarılması hem de tanı amaçlı biyopsi alınabilmesi için uygulanmaktadır. Tümörün çıkarılmasıyla birlikte kafa içi basınç azalır ve buna bağlı semptomlarda belirgin bir hafifleme sağlanabilir. Ancak, GBM'nin sağlıklı beyin dokusu içine yayılım göstermesi nedeniyle tümörün tam olarak çıkarılması çoğu zaman mümkün olamaz ve bu durum yaklaşık %90 oranında nüksle sonuçlanır. Cerrahinin başarısı, tümörün büyüklüğü, beyin içindeki lokalizasyonu ve hastanın genel durumu gibi faktörlere bağlıdır. Ayrıca, kemoterapi ilaçlarının doğrudan tümör bölgesine uygulanabilmesi gibi amaçlarla da cerrahi girişim gerekebilir. Bununla birlikte, cerrahi invaziv bir yöntem olduğu için komplikasyon riski taşıyabilir ve iyileşme süresi diğer yöntemlere göre daha uzun olabilir [2], [23].

2.3.2.2. Radyoterapi

Cerrahi müdahale sonrasında, geride kalabilecek tümör hücrelerini yok etmek ve hastalığın tekrar etme riskini azaltmak amacıyla radyoterapi sıklıkla tercih edilen bir tedavi seçeneğidir. Genellikle kemoterapi ile eş zamanlı olarak uygulanır ve klasik protokole göre 6 hafta boyunca, toplamda 60 Gy dozda fraksiyonel radyoterapi şeklinde planlanır. Bu yaklaşım, hastanın sağkalım süresini uzatma potansiyeline sahiptir. 1980'li yıllardan itibaren, radyoterapinin sağkalım oranlarında birkaç ay ile bir yıl arasında artış sağladığı bildirilmiştir. Ancak, uygulanan radyasyon yalnızca tümör hücrelerine özgü olmadığından, çevredeki sağlıklı dokular da zarar görebilmekte, bu durum tedaviye bağlı yan etki ve toksisite riskini beraberinde getirmektedir. Günümüzde gelişmiş radyoterapi teknikleriyle bu risklerin azaltılması hedeflenmektedir [2], [23].

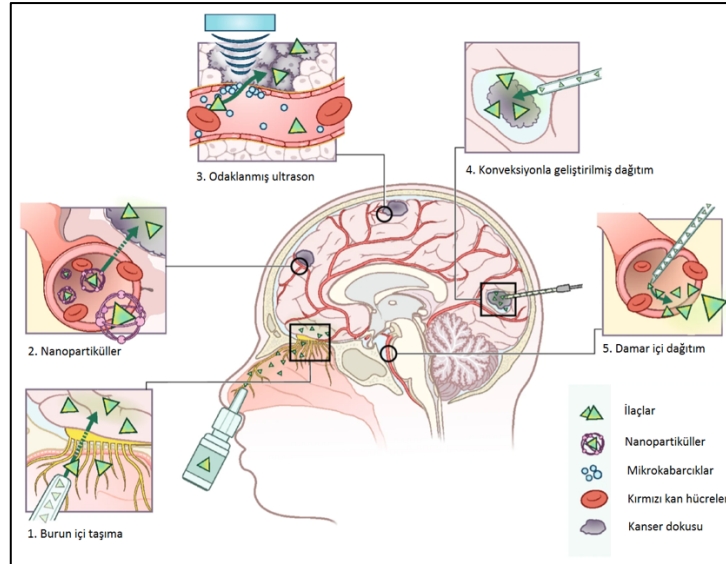
2.3.2.3. Kemoterapi

Kemoterapi, GBM tedavisinde cerrahi ve radyoterapi sonrası destekleyici bir yaklaşım olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Temel amacı, tümör hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını engellemek olan bu yöntemde, genellikle birden fazla anti-kanser ilaç belirli bir tedavi protokolüne göre uygulanır. GBM tedavisinde en sık tercih edilen kemoterapötik ilaç, oral yolla alınan bir alkilleyici ilaç olan temozolomid (TMZ)'dir. TMZ'nin özellikle radyoterapiyle eş zamanlı kullanımı, tedavi etkinliğini artırarak ortalama yaşam süresini yaklaşık 12–15 aya kadar uzatabilmektedir. Ancak, kemoterapinin tek başına uygulanması sınırlı başarı sağlamaktadır; çünkü birçok kemoterapötik ilaç, KBB'yi yeterli düzeyde geçemez veya tümör hücreleri ilaca direnç geliştirebilir. Özellikle MGMT ("O-6-methylguanine-DNA methyltransferase") gen promotöründe metilasyon olmayan hastalarda TMZ'ye karşı direnç oranı daha yüksektir. Ayrıca, kemoterapiye bağlı bulantı gibi yan etkileri önlemek amacıyla verilen ek ilaçlar, potansiyel ilaç etkileşimlerine neden olabilmektedir ve bu durum tedavinin tolere edilebilirliğini azaltabilir [24], [25].

Yapılan araştırmalarda GBM'nin agresif bir tümör türü olması sebebiyle, etkin bir tedavi için kombine tedavi yaklaşımının benimsenmesi gerektiği bildirilmiştir (13,14).

2.4. Beyne İlaç Taşıma Stratejileri

Beyin tümörlerinin tedavisinde karşılaşılan en büyük zorluklardan biri, KBB nedeniyle ilaçların MSS'ye etkin şekilde ulaştırılamamasıdır. KBB, beyni zararlı maddelere karşı koruyan seçici geçirgenliğe sahip bir yapıdır, ancak bu özellik, birçok ilacın beyin dokusuna ulaşmasını da engellemektedir. Özellikle GBM gibi agresif tümörlerin tedavisinde bu engel, tedavi etkinliğini önemli ölçüde azaltmaktadır. Bu nedenle, ilaçların beyne taşınmasını kolaylaştıracak yeni taşıma sistemlerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda nanoteknoloji esaslı taşıyıcı sistemler, kimyasal modifikasyonlar, biyolojik vektörler ve fiziksel yöntemler gibi çeşitli stratejiler üzerinde yoğun çalışmalar yürütülmektedir [22], [26]. Bunlar arasında nanopartikül esaslı taşıyıcı sistemler, konveksiyonel ilaç taşınımı, odaklanmış ultrason, intranazal (burun yoluyla) ve intra-arteriyel (atar damar yoluyla) uygulamalar yer almaktadır. Ancak, bu yöntemlerin her biri kendi kısıtlamalarıyla birlikte gelir ve çoğu zaman sınırlı başarı sağlar. Bu nedenle, birden fazla yöntemin kombinasyonunu içeren kombine yaklaşımlar, KBB'yi aşmada daha etkili olabilir. Özellikle odaklanmış ultrason ve nanopartikül sistemlerinin birlikte kullanımı, ilaçların beyin dokusuna daha etkin bir şekilde taşınmasını sağlayabilir. Ancak, bu alanda daha fazla araştırma ve klinik çalışma gerekmektedir [27].



Şekil 2.2. Glioblastom tedavisinde kan beyin bariyerini aşan tedavi yöntemleri ([27] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

2.5. Kan Beyin Bariyeri

KBB, MSS'yi çevreleyen mikroskobik damarları kapsayan seçici geçirgen bir yapıdır. Bu bariyerde, damarları kaplayan kama biçimindeki endotel hücreleri sıkı bağlantılarla bir araya gelmiştir [28], [29]. Reseptörler, taşıyıcı proteinler, pompalar ve diğer hücresel elemanlarla birlikte, KBB vasküler alandaki moleküllerin beyne girişini ve atılımını düzenler. Sağlam bir KBB, kan dolaşımındaki pek çok maddeyi beyne geçmekten korurken, küçük molekülü ilaçların %98'inden fazlası ve makromoleküler tedavilerin tümü beyne ulaşamaz [30]. Bu bariyer, sadece moleküler ağırlığı 400-600 Dalton arasında olan ve lipit çözünürlüğü yüksek olan ilaçların pasif olarak difüzyonuyla geçişine izin verir [30]. Bu nedenle, terapötik ilaçların lipofilik özelliklerinin artırılması, KBB'yi aşmada etkili bir strateji olarak değerlendirilmektedir.

2.5.1. Kan Beyin Bariyerinin Anatomik Yapısı

KBB'nin varlığı ilk kez Paul Ehrlich tarafından öne sürülmüş ve daha sonra Edwin Goldmann tarafından deneysel olarak doğrulanmıştır [31]. KBB, MSS'yi kan dolaşımındaki yabancı maddelerden ayıran çok hücreli, dinamik ve yarı geçirgen bir yapıdır [32]. Bu bariyer, beyin ortamının stabil kalmasını sağlayarak dokuların zarar görmesini engeller. Ancak, aynı zamanda nörodejeneratif hastalıklar ve beyin kanseri gibi durumların tedavisinde kullanılan ilaçların MSS'ye ulaşmasını zorlaştırır. KBB'nin temel yapısı kılcal damarlarda bulunur ve sinir hücrelerinin bu damarlara olan uzaklığı yaklaşık 25 mikrometredir. Bu nedenle, ilaçların beyne etkili şekilde ulaşabilmesi için KBB'yi aşmak büyük bir öneme sahiptir [33].

KBB'nin yapısı, yalnızca endotelial (damar iç yüzeyini oluşturan) hücrelerle sınırlı değildir. Endotelial hücrelerle birlikte astrositler ve perisitler gibi diğer hücreler bir araya gelerek nörovasküler birimi (NVU) oluşturur. Bu yapı, beyin damarlarında dinamik bir bariyer görevi görür [34]. Endotelial hücreler arasındaki sıkı bağlantılar ("tight junctions"), özellikle "claudin-5" ve "occludin" gibi proteinler aracılığıyla, KBB'nin geçirimsizliğini sağlar. Bu bağlantılar sayesinde büyük ve suda çözünürlüğü yüksek olan moleküller beyin dokusuna geçemez [35]. Bazı küçük, yağda çözünebilen ilaçlar bu

bariyeri aşabilirken, büyük moleküllerin geçişi için özel taşıyıcı sistemlere veya fiziksel müdahalelere ihtiyaç duyulmaktadır.

Perisitler, damarların çevresini sararak kan akışını düzenler ve bariyerin yapısal bütünlüğünü korur. Aynı zamanda endotelyal hücrelerin genetik aktivitelerini etkiler ve astrositlerin davranışlarını şekillendirir. Astrositler ise bu hücrelerin çevresine uzantılar göndererek yapısal ve metabolik destek sağlar [36]. Ayrıca beyin içinde bağışıklık yanıtlarını düzenler. NVU dışında yer alan mikroglia ve nöronlar, doğrudan bu yapının parçası olmasalar da KBB'nin geçirgenliğini dolaylı olarak etkilerler. Mikroglia hücreleri bağışıklık sisteminin bir parçası olarak hücresel atıkları temizlerken, nöronlar astrosit ve perisitlerle etkileşerek bariyerin korunmasına katkı sağlar [37].

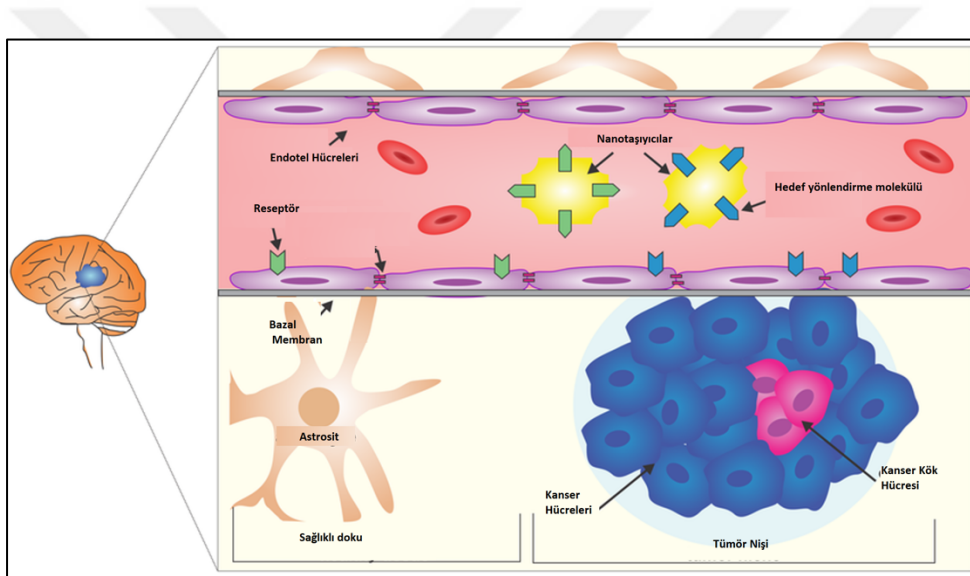
KBB, MSS'de iyon ve besin dengesini regüle ederek beynin sağlıklı çalışmasını sağlar. Potasyum, amino asitler ve plazma proteinleri gibi maddelerin geçişi özel kontrol mekanizmalarıyla düzenlenir [38]. Besinler, özellikle glukoz gibi maddeler, GLUT1 gibi taşıyıcı proteinler aracılığıyla hücre içine alınır. Öte yandan, istenmeyen maddelerin dışarı atılmasını sağlayan çok sayıda dışa atım ("efflux") taşıyıcısı da vardır. Örneğin, ABCB1 (P-glikoprotein) ve ABCG2 (BCRP) gibi proteinler, ilaç ve toksinleri beyinden kana geri taşır [39]. Bu taşıyıcılar, atıkların uzaklaştırılması açısından önemli olmakla birlikte, ilaçların beyne ulaşmasında engel teşkil eder.

KBB'nin hücreleri arasında madde geçişini sağlayan transitoz gibi yollar oldukça sınırlıdır. Ayrıca bağışıklık hücrelerinin beyne geçişi, lökositlerin yapışmasını sağlayan moleküllerin azaltılması ile sınırlandırılmıştır. Tüm bu seçici mekanizmalar, yalnızca belirli maddelerin beyne geçişine izin verir ve bu da ilaç tedavisinde önemli bir engel oluşturur [37].

2.5.2. Kan Beyin Bariyeri ve Glioblastom

KBB, yapısal ve hücresel bileşenleri bakımından beyin bölgeleri arasında önemli farklılıklar göstermektedir. Bu heterojenlik, GBM gibi beyin tümörlerinin tedavisinde

ilaca yanıtı etkileyen önemli bir faktördür [40]. Tümör çevresindeki beyin-tümör bariyeri (BTB), normal KBB'ye kıyasla daha geçirgendir; ancak bu geçirgenlik homojen değildir ve aktif taşıyıcı proteinlerin (ABCB1, ABCG2) ve sıkı bağlantı proteinlerinin azalması gibi düzensiz yapısal değişikliklerle ilişkilidir [41], [42]. Klinik ve deneysel çalışmalarda, BTB'nin ilaç geçişine olanak sağladığı, ancak bu geçirgenliğin tümör içindeki farklı bölgelerde büyük değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. Örneğin, Paklitaksel ve Doksorubisin'in fare modellerinde farklı metastatik odaklarda 200 kata kadar değişen dağılım gösterdiği rapor edilmiştir [43]. Ayrıca, radyasyon tedavisi gibi uygulamalar BTB'nin yapısını daha da bozarak taşıyıcı protein düzeylerini değiştirmekte ve geçirgenliği artırmaktadır (33, 34).



Şekil 2.3. Glioblastom ve kan beyin bariyerinin şematik gösterimi ([46] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

2.5.3. Kan Beyin Bariyerini Aşma Stratejileri

KBB, 400 Da (Dalton) boyutundan büyük molekül ağırlığı olan ve sekizden daha az hidrojen bağı taşıyan ilaç moleküllerinin %98'nin geçişini engellemektedir. Bu sebeple KBB'yi aşmak için literatürde pek çok yöntem bulunmaktadır [47].

Kan beyin bariyerini geçmede molekülün lipofilik özelliği, molekül ağırlığı ve hidrojen bağı sayısı kadar önemli bir faktördür [48]

2.5.3.1. Kan Beyin Bariyerini Girişimsel Yöntemlerle Aşma Stratejileri

KBB'nin birçok ilaca karşı oldukça seçici geçirgen olması nedeniyle ilaçların doğrudan beyin dokusuna ulaştırılabilmesi için bazı **girişimsel (invaziv)** yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemler, KBB'yi doğrudan aşmayı veya geçici olarak geçirgenliğini artırmayı hedeflemektedir:

Doğrudan İntrakraniyal İlaç Uygulaması

Bu yöntemde ilaçlar, KBB'yi mekanik olarak aşarak doğrudan tümör dokusuna veya çevresine enjekte edilir. Bu yöntem sayesinde sistemik dolaşımdaki metabolik etkiler ve ilaç kayıpları minimize edilirken, hedef bölgede yüksek konsantrasyonda ilaç birikimi sağlanır. Ancak, bu yöntem girişimsel bir işlem gerektirir ve uygulama sadece lokal etkiyle sınırlıdır. Bu nedenle bu yöntem özellikle cerrahi sonrası kalan tümör alanlarının tedavisinde kullanılmaktadır [49].

Konvektif İnfüzyon (“Convection-Enhanced Delivery”- CED)

Konvektif infüzyon, pozitif basınç altında bir ilaç çözeltisinin beyin dokusuna verilmesini sağlar. Difüzyon yerine konveksiyonla iletim gerçekleştiğinden, daha geniş doku alanlarına ulaşmak mümkündür. Özellikle büyük moleküllü veya nanopartikül taşıyıcı sistemler ile kullanıldığında tedavi etkinliği artmaktadır. Bu yöntemde de kateter yerleştirme işlemi girişimsel olduğundan, uygulanacak olan hastanın dikkatli seçilmesi gerekmektedir [50][51].

Odaklanmış Ultrason (“Focused Ultrasound”- FUS)

FUS, damar içi mikro baloncuklar ile uygulandığında KBB’nin geçici ve bölgesel olarak açılmasını sağlar. Ultrason dalgaları, mikro baloncukların titreşmesine neden olur ve bu da kapiller endotelyal yapıların kısa süreli bozulmasına yol açar. Böylece hedeflenen bölgeye ilaç geçişi sağlanır. Bu yöntem minimal girişimsel sayılmakla birlikte hala klinik kullanım için optimize edilmektedir [53], [54].

Polimerik İmplantlar

Cerrahi rezeksiyon işlemi sonrası beyin boşluğuna yerleştirilen polimerik implantlar sayesinde lokal ve kontrollü ilaç salımı sağlanır. Bu implantlar genellikle kemoterapötikleri içerir ve günler ya da haftalar boyunca ilaç salımı yapabilir. "Gliadel Wafer", GBM tedavisinde FDA onayı almış ilk lokal etkili polimerik implanttır. Lokal implantların uygulanması sistemik toksisiteyi azaltır ancak yalnızca cerrahi sonrası uygulanabilir [55].

Çizelge 1.2. Kan beyin engelini aşma metotları.

Yöntem	Açıklama	Üstünlükleri	Kısıtlamaları
İntrakraniyal enjeksiyon [49]	İlaç doğrudan tümör veya çevresine enjekte edilir	Hedef bölgeye yüksek doz ilaç	Cerrahi gerekir, lokal etki
Konvektif İnfüzyon (CED) [50], [51]	Pozitif basınçla ilaç geniş alana verilir	Büyük moleküller için etkili, geniş dağılım	Kateter yerleştirme gerekir
İntratekal / İntraventriküler uygulama [52]	BOS içine ilaç uygulanır	BOS tutulumu olan hastalıklar için etkili	BOS’tan dokuya geçiş sınırlı
Odaklanmış Ultrason (FUS) [53], [54]	Ultrason + mikro kabarcıklarla geçici KBB açılır	Hedefe yönelik, girişimsel olmayan sayılır	Klinik uygulama hâlâ araştırma aşamasında

Polimerik implant (Gliadel Wafer) [55]	Cerrahi sonrası yerleştirilen lokal kemoterapi	Uzun süreli salım, sistemik toksisite düşük	Sadece cerrahi sonrası uygulanabilir
--	--	---	---

2.5.3.2. Kan Beyin Bariyerini Girişimsel Olmayan Yöntemlerle Aşma Stratejileri

Girişimsel olmayan stratejiler, KBB'yi aşmak amacıyla uygulanan invaziv olmayan yaklaşımları ifade eder. Genel olarak kimyasal, biyolojik ve ilaç taşıyıcı sistemler olmak üzere üç ana grupta sınıflandırılır [56].

Kimyasal Yaklaşım

Kimyasal yöntemler, ilaç moleküllerinin yapısal özelliklerini modifiye ederek KBB permeabilitesini artırmayı hedefler.

- **Lipofilisitenin Artırılması:** İlacın lipofilikliğini artırmak, pasif difüzyon yoluyla endotel hücrelerini geçmesini kolaylaştırır. Bu, özellikle küçük moleküller için geçerli bir stratejidir [57].
- **Moleküler Ağırlığın Belirlenmesi:** Moleküler ağırlığı düşük olan bileşiklerin KBB'yi daha kolay geçtiği bilinmektedir. Bu nedenle ilaç tasarımında molekül ağırlığının azaltılması tercih edilebilir [58].
- **“Prodrug” (Ön İlaç) Stratejileri:** İlaç molekülü, KBB'yi geçebilecek şekilde kimyasal olarak değiştirilir. Beyin dokusunda enzimatik olarak aktif forma dönüşür [56]. Örneğin, ester yapısında ön ilaçlar beyin içinde esterase ile hidrolize edilerek aktif forma dönüşebilir.

Biyolojik Yaklaşım

Biyolojik yaklaşım, vücutta doğal olarak bulunan taşıyıcılar veya reseptörler aracılığıyla ilaçların KBB'den taşınmasını sağlar.

- **Taşıyıcı Aracılı Geçiş (“Carrier-Mediated Transport, CMT”):** GLUT1 (glukoz taşıyıcısı) ve LAT1 gibi taşıyıcı proteinler, substrat benzeri yapıdaki ilaçların endotel hücreleri üzerinden taşınmasına olanak sağlar [59].

- Reseptör Aracılı Transsitoz (“Receptor-Mediated Transcytosis, RMT”): Transferrin, insülin ve LDL reseptörleri gibi yapılar, spesifik ligandlarla etkileşerek ilacın endositoz ve ekzositoz yoluyla beyin dokusuna taşınmasına olanak tanır [57].
- Adsorptif Aracılı Transsitoz (AMT): Pozitif yüklü ilaç veya taşıyıcı yapılar, endotel hücre zarındaki negatif yüklerle etkileşerek veziküler geçişi tetikler. Bu yöntem, seçiciliğin düşük olması nedeniyle daha sınırlı kullanılır [60].

İlaç Taşıyıcı Sistemler

Bu sistemler, ilacı fiziksel ya da kimyasal yollarla taşıyıcı yapılar içine alarak hem KBB’yi geçmesini kolaylaştırır hem de hedefe yönelik taşınmasını sağlar.

Nanopartiküller, günümüzde ilaç taşıyıcı sistemler alanında önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Nanopartiküller, ilaçların hasta dokulara daha etkili ve hedeflenmiş biçimde ulaşmasını sağlayarak yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine büyük katkı sağlamaktadır [61], [62].

KBB’yi geçemeyen ilaçlar, nanopartiküllerin kazandırdığı özellikler sayesinde beyne ulaşabilir. Farklı türdeki nanopartiküller, kendilerine özgü geçiş mekanizmalarına sahip olabilir. Özellikle polimerik nanopartiküller, ilaçların beyinde daha uzun süre kalmasını sağlayarak kontrollü ilaç salımını mümkün kılmaktadır [61], [62]. Ancak, nanopartiküllerin KBB’yi aşma ve beyne ulaşma yolları henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Bu nedenle, nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin güvenliği ve etkinliği üzerine daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [61], [62]. Bu çalışmalar, nörolojik hastalıkların tedavisinde daha etkili ve güvenilir çözümler geliştirilmesini sağlayabilir.

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin üstünlükleri şu şekilde sıralanabilir:

- Küçük boyutları sayesinde damarlardan kolay geçiş,
- Artan yüzey alanı ile ilacın emilimi, çözünürlüğü, biyoyararlanımı ve stabilitesinin artması,

- İlaçların hedeflenen bölgeye yönlendirilebilmesi,
- Uzun süre dolaşımda kalabilme yeteneği [62], [63].

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemler, KBB'yi geçmesi güç veya imkânsız olan makromoleküllerin MSS'ye ulaştırılmasında önemli bir üstünlük sağlamaktadır. Özellikle protein yapısındaki ilaçların biyolojik sıvılarda düşük stabilite göstermesi ve enzimatik degradasyona uğraması gibi engeller, nanopartiküller aracılığıyla büyük ölçüde giderilebilmektedir. Bununla birlikte, terapötik indeksi dar olan ilaçların bu sistemlere entegre edilmesiyle, istenmeyen toksik etkilerin azaltılması ve tedavi güvenliğinin artırılması mümkün hale gelmektedir [62].

Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında, biyouyumluluk ve biyoparçalanabilirlik gibi farmasötik açıdan temel özelliklerin yanı sıra hem nanopartiküllerin hem de parçalanma ürünlerinin toksisite oluşturmaması büyük önem taşımaktadır. Sistemlerin KBB'yi geçebilmesi, etkinliğini sürdürebilmesi açısından, partikül boyutlarının 200 nm'nin altında olması, kanda fiziksel stabilitenin korunması ve aglomerasyonun önlenmesi gereklidir. Ayrıca, istenen farmakokinetik profili sağlayacak şekilde kontrollü ilaç salımı ve formülasyona bağlı olarak ilacın kimyasal stabilitesinin artırılması da öncelikli tasarım kriterleri arasında yer almaktadır [62].

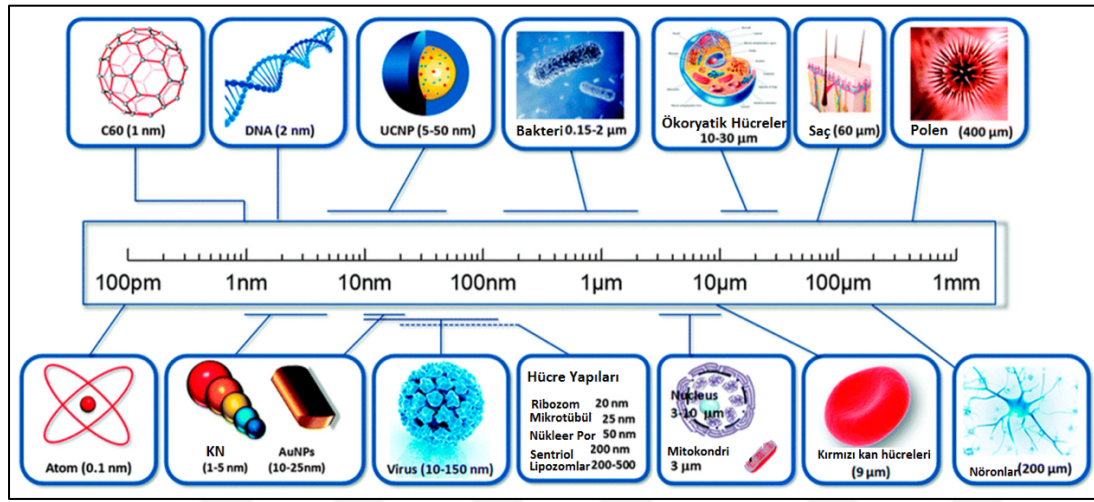
Literatürde KBB'yi aşmak için lipid, polimerik ve metalik nanopartiküllerin yaygın şekilde kullanıldığı bildirilmiştir [62], [64].

2.6. Nanoteknoloji

Nanoteknoloji, maddenin atomik ve moleküler düzeyde kontrol edilmesini içeren, yaklaşık 1 ile 100 nanometre boyut aralığında çalışan bir bilim ve mühendislik alanıdır. Bir nanometre, metrenin milyarda biridir (10^{-9} m). Bu ölçekteki maddeler, klasik fizik kurallarından farklı olarak kuantum etkileri gösterebilirler. Nanoteknolojinin temel amacı, daha küçük, daha hafif, daha güçlü ve daha verimli malzemeler ya da sistemler geliştirmektir [65]. Kavram olarak ilk defa 1959 yılında ünlü fizikçi Richard Feynman'ın

“There’s Plenty of Room at the Bottom” (“Altta Çok Yer Var”) başlıklı konuşmasında ortaya atılmış, 1980’lerden itibaren ise teknik olarak uygulanabilir hale gelmiştir.

Nanoyapılar, MS dördüncü yüzyılda Romalılar tarafından kullanılmış ve nanoteknolojinin ilginç örneklerinden birini ortaya koymuştur. British Museum’da sergilenen “Lycurgus kupası”, dikroik bir cam örneğidir ve doğrudan ışıktaki yeşil, ışık camdan geçtiğinde ise kırmızı-mor görünür [66].

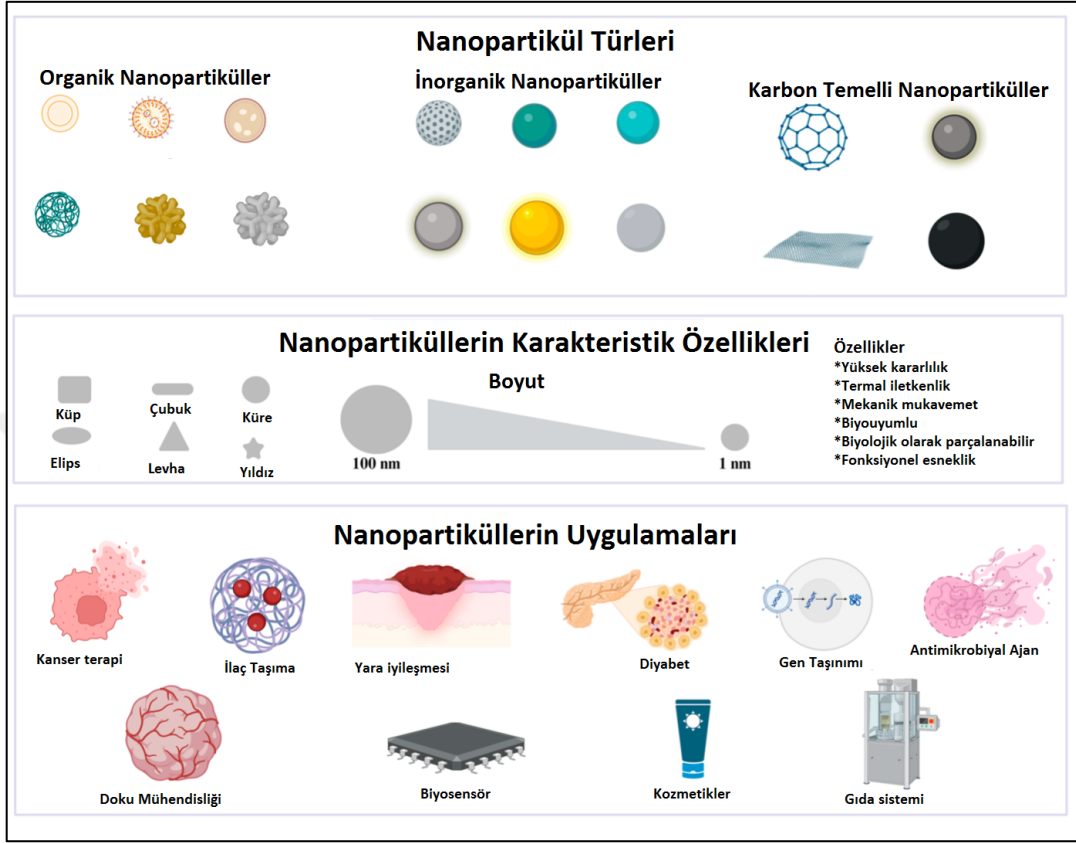


Şekil 2.4. Nanomalzeme boyutlarının karşılaştırılmasının şematik gösterimi ([66] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

Nanoteknolojinin en önemli özelliklerinden biri, malzemelerin yüzey alanı/hacim oranının artmasıdır. Bu sayede kimyasal reaksiyonlar hızlanabilir, optik, mekanik ve elektriksel özellikler değişebilir. Günümüzde nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji, malzeme bilimi ve mühendislik gibi pek çok disiplini bir araya getirerek tıp, elektronik, enerji ve çevre alanlarında uygulanabilmektedir [67].

Tıpta nanoteknoloji, özellikle tanı (diagnostik) ve tedavi (teranostik) amaçlı sistemlerde kullanılmaktadır. Örneğin, nanoölçekli ilaç taşıyıcı sistemlerle ilaçlar doğrudan hasta hücrelere yönlendirilerek hem etkinlik artırılmakta hem de yan etkiler azaltılmaktadır. Kanser tedavisinden gen terapisine kadar pek çok alanda nano-biyoteknolojik çözümler geliştirilmektedir [68]. Ayrıca, nanoteknolojik sensörler sayesinde çok küçük

miktarlardaki biyomoleküller tespit edilebilmekte, bu da erken teşhis olanağı sağlamaktadır.



Şekil 2.5. Nanopartikü tipleri ve bazı nanopartikül uygulama alanlarının şematik gösterimi ([69] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

2.6.1. Nanotıp

Nanotıp, nanoteknolojinin tıp ve sağlık bilimlerine uygulanmasıyla gelişen, tanı, tedavi, izleme ve hastalık önleme gibi süreçlerde nanometre boyutundaki yapıların kullanılmasını kapsayan disiplinler arası bir alandır. Nanotıp, yalnızca moleküler ve hücresel düzeyde hastalıkların anlaşılmasını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda daha hassas tanı yöntemleri, hedefe yönelik tedaviler ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamaları gibi devrimsel yeniliklerin de temelini oluşturur [68].

Tıbbi amaçlı nanopartiküller, vücutta doğal olarak bulunan çeşitli "doğal" nanopartiküllerden ilham alınarak geliştirilmiştir. Bu doğal nanopartiküller arasında nano

boyutlu veziküller, lipitler, proteinler ve aktif moleküllerin taşıyıcısı olarak görev yapan karmaşık biyomakromoleküller yer almaktadır. Vücuttaki doğal işleyişi düzenleyebilen bu yapılar, nanotıp alandaki uygulamalara da temel oluşturmuştur [70].

Nanotıp uygulamalarının çoğu, hedeflenmiş ve kontrollü ilaç salımı sağlayan, lipit veya polimer bazlı nanotaşıyıcı sistemler üzerine kurulmuştur. Bununla birlikte, nanometre ölçeğinde benzersiz özelliklere sahip inorganik bazlı, daha küçük nanopartiküllerin tıbbi uygulamalardaki potansiyelinin fark edilmesiyle birlikte, tanı amaçlı "nanoproblar" ve harici olarak aktive edilen yeni tedavi maddelerinin geliştirilmesine yönelik araştırmalarda büyük bir artış yaşanmıştır [70].

Diagnostik alanında da nanotıp büyük bir potansiyele sahiptir. Nano ölçekli biyosensörler ve kontrast maddeler, çok düşük konsantrasyonlardaki biyomoleküllerin tespitini sağlayarak erken tanı üstünlüğüne yol açar. Özellikle manyetik nanopartiküller, floresan kuantum noktaları ve altın nanopartiküller, görüntüleme tekniklerinde (MRI, PET, CT gibi) kullanılmakta ve doku spesifikliği artırılmaktadır [71]. Ayrıca, bu tanı maddeleri tedavi edici moleküllerle birleştirilerek hem tanı hem tedaviyi aynı anda gerçekleştiren teranostik sistemler geliştirilmektedir.

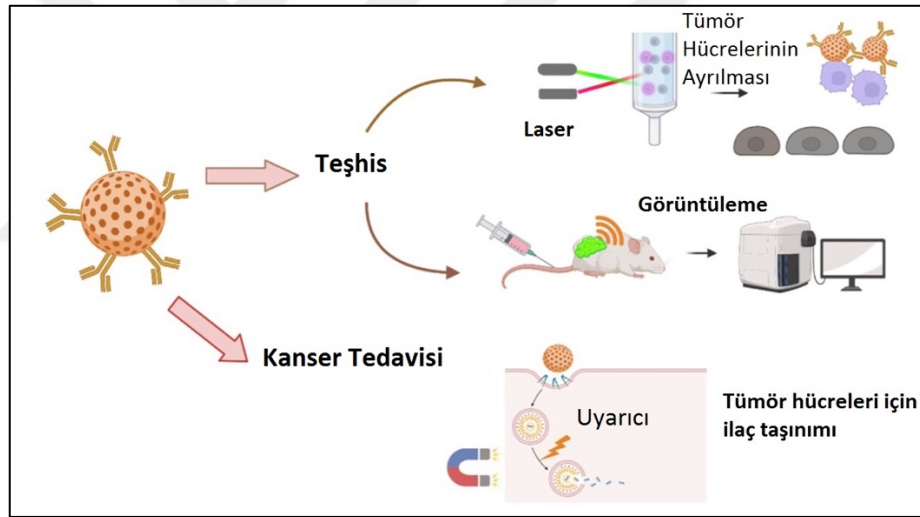
Gen terapisi, doku mühendisliği, aşı geliştirme, nörolojik hastalıkların tedavisi, antibakteriyel kaplamalar, kanser immünoterapisi gibi alanlar da nanotıbbın giderek gelişen diğer uygulama alanlarıdır. Örneğin, "CRISPR-Cas9" gibi gen düzenleme teknolojilerinde genetik materyalin hedefe taşınmasında nanopartiküllerin kullanımı giderek artmaktadır [72]. COVID-19 pandemisinde mRNA aşılarının stabil hale getirilmesinde kullanılan lipit nanopartiküller (LNP'ler), nanotıbbın küresel ölçekteki önemini bir kez daha ortaya koymuştur.

Nanotıpla ilgili etik ve güvenlik tartışmaları da bulunmaktadır. Nanomalzemelerin uzun vadeli biyoyumluluğu, vücutta birikme potansiyeli, bağışıklık sistemi ile etkileşimi ve çevresel etkileri henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Ayrıca, bu teknolojilerin sadece belirli ekonomik gruplar tarafından erişilebilir olması da sağlıkta adalet konusunda

tartışmalara yol açmaktadır [73]. Bu nedenle nanotıbbın geliştirilmesi kadar, risk değerlendirmesi ve düzenleyici çerçevelerinin oluşturulması da büyük önem taşımaktadır.

Kanser Tedavisinde Nanoteknoloji

1–1000 nanometre aralığındaki boyutlarına bağlı olarak yüksek yüzey-hacim oranlarına sahip olmaları ve yüzeylerinin işlevselleştirilebilir olması nanopartiküllere hedefe yönelik ilaç taşınmasında üstünlük sağlamaktadır. Hedefe yönelik tedaviler, geleneksel kemoterapiye göre daha az yan etki ve daha yüksek etkinlik sunduğu için tercih edilmektedir. Ayrıca daha düşük dozlarla etkili olabilir, yan etkileri azaltır, tedavi özgüllüğü artırılır.



Şekil 2.6. Nanopartiküllerin kanser tanısı ve tedavisinde kullanımlarının şematik gösterimi ([74] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

Nanopartiküller, tanı ve tedavi süreçlerini dönüştürme potansiyeline sahiptir. Örneğin, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), bilgisayarlı tomografi (CT) ve ultrason gibi tekniklerin duyarlılığını artırmak için kullanılabilirler. Demir oksit nanopartikülleri, MRI’da görüntü kontrastını artıran süperparamanyetik özellikleri sayesinde tercih edilirken; altın nanopartiküller (AuNP’ler) yüksek atom numaraları sayesinde CT görüntülerinde kontrastı artırır. Ayrıca kuantum noktaları (QDs) ve altın nanopartiküller,

biyomolekülleri tespit eden biyosensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır. Antikor veya DNA problemleriyle bağlanarak belirli hedefleri yüksek özgüllükle tanımlayabilirler.

Tedavi alanında nanopartiküller kemoterapiye ek olarak fototermal terapi (PTT) ve fotodinamik terapi (PDT) gibi alternatif yaklaşımlarda kullanılmaktadır. Örneğin, altın ve silika nanopartiküller ışık enerjisini ısıya dönüştürerek kanser hücrelerinin yok edilmesini sağlar. PDT’de ışık etkisiyle reaktif oksijen türleri üretilerek hücre ölümüne yol açılır. Ayrıca, lipit veya polimer bazlı nanopartiküller genetik materyali (DNA, RNA, CRISPR bileşenleri) hücre içine taşıyarak gen terapisi uygulamalarında da rol oynar. Bu sistemler, genetik materyali bozulmaya karşı koruyarak hedef hücrelere daha etkili ulaşmasını sağlar.

Nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerin biyolojik uyumluluğu ve uzun vadeli toksisitesi, üretim standardizasyonundaki ve ilaç otoritelerince onay süreçlerindeki zorluklar gibi çeşitli sorunları da mevcuttur. Gelecekteki araştırmaların odak noktası, bu sistemlerin hedefleme kapasitelerinin geliştirilmesi ve yan etkilerinin azaltılması olacaktır. Genelde lipozomlar, dendrimerler, polimerik sistemler, metal nanopartiküller (altın, gümüş, titanyum) ve karbon yapılar (grafen, nanotüpler, nanodiyamontlar) gibi birçok farklı nanosistem üzerinde çalışmalar sürmektedir [75]. FDA onaylı nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistem örnekleri Çizelge 2.3’te sunulmuştur.

Çizelge 2.2. FDA Onaylı Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistem Örnekleri [76], [77], [78].

Ürün Adı	Taşıyıcı Tipi / Formülasyon	Ortalama Partikül Boyutu	Endikasyon
Doxil®	PEGile liposomal doksorubisin	80–90 nm	Kaposi sarkomu, over kanseri, multipl miyelom
Abraxane®	Albümin bağlı nanopartikül (nab-paklitaksel)	~130 nm	Meme kanseri, NSCLC, pankreas kanseri
Onivyde®	Liposomal irinotekan	110–120 nm	Metastatik pankreas kanseri
Vyxeos®	Liposomal daunorubisin + sitarabin kombinasyonu	100–120 nm	Akut miyeloid lösemi (AML)
Hensify®	Hafniyum oksit nanopartikülleri (NBTXR3)	50–70 nm	Yumuşak doku sarkomu (radyoterapi ile birlikte)
Marqibo®	Liposomal vincristin sülfat	~100 nm	Akut lenfoblastik lösemi (ALL)
DepoCyt®	Liposomal sitarabin	~100 nm	Neoplastik menenjit
Mepact®	Liposomal mifamurtid (MTP-PE)	~100 nm	Osteosarkom (EMA onayı)
Genexol-PM®	PEG-PLA polimerik misel içinde paklitaksel	~20–50 nm	Meme, akciğer, over kanseri
Oncaspar®	PEGile L-asparaginaz (polimer-protein konjugatı)	~5–10 nm	Akut lenfoblastik lösemi

2.6.1.1. Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme, ilaç taşıyıcı sistemlerin doğal fizyolojik koşullardan yararlanarak belirli doku ya da organlara yönlendirilmesi esasına dayanır. Özellikle hastalık durumlarında damar endotel yapısında meydana gelen değişiklikler damar geçirgenliğini artırır. Bu olaya Artmış Geçirgenlik ve Alıkonma (“Enhanced Permeability and Retention, EPR”) etkisi olarak tanımlanır. EPR etkisi, özellikle tümör dokularında gözlemlenir [79]. Tümör gelişimi sırasında, endotel hücrelerinden oluşan damar yapısı bozulur ve lenfatik kanallar genişleyebilir; normalde 30-120 nm olan bu kanallar yaklaşık 10 katına kadar çıkabilir. Bu nedenle, 100 nm'den küçük makromoleküller ve nanopartiküller, lenfatik sistem üzerinden kolaylıkla tümör bölgesine ulaşabilir [80].

EPR etkisi ile, geliştirilecek taşıyıcı sistemin partikül boyutunun uygun şekilde ayarlanması sonucunda pasif hedefleme yoluyla istenen bölgeye ulaşımı mümkün kılabilir. Ancak, dolaşıma verilen nanotaşıyıcılar vücut tarafından fark edilerek Retiküloendotelyal Sistem (RES) tarafından fagosite edilebilir. Nanotaşıyıcıların yüzey özellikleri ve boyutları, RES hücreleri tarafından tanınmalarında önemli rol oynar [81]. Bu nedenle, sistemlerin dolaşım süresini uzatmak ve RES'ten kaçışını sağlamak amacıyla yüzeylerine PEG gibi hidrofilik ve esnek polimerlerle kaplama işlemi yapılabilir. Bu modifikasyon, taşıyıcı sistemin tümörlü dokuya pasif olarak ulaşmasını kolaylaştırır [82].

RES ve EPR etkisi dikkate alındığında, nanotaşıyıcıların tümör bölgesinde birikebilmesi için ideal partikül boyutu aralığı 20-200 nm arasında belirlenmiştir [83]. Bununla birlikte, beyin tümörlerinin tedavisinde, KBB'nin aşılması gerekliliği, tümör mikroçevresinin özellikleri ve tümör hücrelerinin fizyolojisindeki farklılıklar gibi etkenler, bu hedeflendirme stratejisinin karmaşıklığını artırır [84].

2.6.1.2. Aktif Hedeflendirme

Aktif hedeflendirme, ilaç taşıyıcı sistemlerin belirli hücre, doku veya organlara yönlendirilmesi amacıyla taşıyıcı yapısında çeşitli modifikasyonların yapılmasıyla gerçekleştirilir. Bu yöntem kapsamında fiziksel (örneğin manyetik alan, ısı, ultrason),

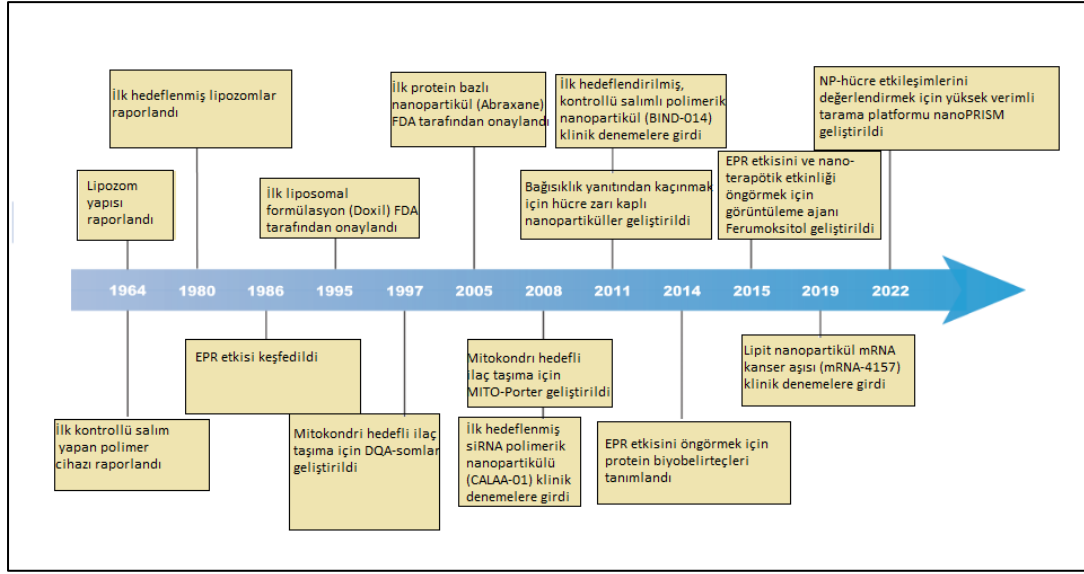
kimyasal (pH değışiklikleri, enzimatik aktiviteler gibi) uyarılar veya hedefe özgü ligandlar kullanılarak bağlanma stratejileri uygulanır [85].

KBB'yi geçmek için farklı aktif taşıma mekanizmaları kullanılabilir; bunlar arasında transselüler difüzyon, iyon taşınması, taşıyıcı protein aracılığıyla madde geçişı, reseptör aracılı endositoz ve adsorptif aracılı geçiş gibi yöntemler yer alır [86].

KBB üzerinde yaygın olarak hedeflenen reseptörler arasında transferrin reseptörü (TfR), insülin reseptörü (InsR) ve lipoprotein reseptörü (LRP1) bulunur. Ancak, bu reseptörler üzerinden taşımada nanotaşıyıcıların etkin ve güvenli kullanımına ilişkin birtakım kısıtlamalar ve sorunlar gözlemlenmiştir. Bu sebeple, araştırmacılar, örneğin antikor teknolojisi gibi ileri yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğunu belirtmektedir [87].

2.6.2. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanotıbbın en önemli uygulama alanlarından biri, ilaç taşıma sistemleridir. Geleneksel kemoterapilerde sıklıkla görülen sistemik yan etkiler, ilacın doğrudan tümörlü hücrelere taşınmasıyla azaltılabilir. Bu bağlamda, nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistem tasarlanarak ilacın biyoyararlanımı artırılabilir, dolaşım süresi uzatılabilir ve hedefleme yapılarak sağlıklı hücrelere zarar verilmesi engellenebilir [88]. Örneğin, lipozomlar, dendrimerler, polimerik nanopartiküller ve inorganik nanotaşıyıcılar gibi sistemler üzerinde yoğun çalışmalar yapılmaktadır. FDA tarafından onaylanan ilk nanotıp ürünü, 1995 yılında kullanıma giren liposomal doksorubisin (Doxil®) olmuştur.



Şekil 2.7. Kanser tedavisinde kullanılan nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlerin tarihsel gelişiminin şematik gösterimi ([89] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

Metalik Nanopartiküller

Metalik nanopartiküller, özellikle altın (Au), gümüş (Ag), platin (Pt) ve süperparamanyetik demir oksit (SPION'lar) gibi metaller kullanılarak geliştirilen sistemlerdir. Bu yapılar, biyouyumlu yüzey modifikasyonları ile birleştirildiğinde, KBB'yi aşabilme potansiyeli gösterir. Özellikle altın nanopartiküller, yüzeylerine eklenen ligandlar veya peptitler sayesinde nöronal hedefleme yapabilir ve hücreler arası aktif taşıma mekanizmaları yoluyla KBB'yi geçebilirler [90].

SPION'lar, manyetik alanlara duyarlı yapıları sayesinde hem hedefleme hem de görüntüleme uygulamalarında kullanılır. Bu partiküller, uygun yüzey modifikasyonları ile hem sistemik dolaşımda uzun süre kalabilir hem de KBB'yi aşarak merkezi sinir sistemine ilaç taşıyabilirler. Ayrıca SPION'lar, manyetik yönlendirme ile belirli bölgelere odaklanabilir, bu da nörolojik hastalıklarda daha etkin tedavi imkanı sunar [91].

Metalik nanopartiküller, ilaç taşımanın yanı sıra teranostik uygulamalarda da rol oynamaktadır. Bu çift fonksiyonlu sistemler hem görüntüleme hem de ilaç salımı için kullanılabilir. Özellikle altın ve demir oksit nanopartikülleri, hem fototermal terapiye

olanak tanır hem de hücre içinde kontrollü ilaç salımı sağlar. Bu kombinasyon, tedavi etkinliğini artırırken yan etkileri minimize edebilir [92].

Metalik nanopartiküllerin potansiyel toksik etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Nanopartikül boyutu, yüzey yükü, şekli ve kaplama materyalleri, biyolojik ortamlarda farklı yanıtlar doğurabilir. Uzun süreli birikim, inflamasyon, oksidatif stres ve genotoksisite gibi riskler barındırabilir. Bu nedenle, metalik nanopartiküler sistemlerinin klinik kullanıma geçmeden önce detaylı toksikolojik değerlendirmelere tabi tutulması gereklidir [93].

Lipit Nanopartiküller

KBB, terapötik moleküllerin MSS'ye ulaşmasını sınırlayan seçici bir engeldir. Lipit bazlı nanopartiküller, özellikle lipozomlar, katı lipit nanopartiküller ve lipoprotein temelli HDL/LDL nanopartiküller, KBB geçişinde yüksek potansiyel sunan taşıyıcı sistemlerdir. Lipozomlar, fosfolipit çift tabakalı yapıları sayesinde hem hidrofilik hem hidrofobik ilaçları taşıyabilir ve yüzey modifikasyonlarıyla (örneğin transferrin veya folat ligandları) beyin endotel hücrelerindeki reseptörlere bağlanarak hedefe özgü taşıma sağlar. Katı lipit nanopartiküller, polisorbit 80 gibi yüzey aktif maddelerle beyin endotel hücre yüzeyine tutunarak transsitoz yoluyla beyin dokusuna ilaç transferini kolaylaştırır. HDL ve LDL nanopartiküller, doğal lipit ve apolipoprotein yapıları sayesinde, apolipoprotein A1 gibi moleküller aracılığıyla KBB'yi etkin biçimde geçebilir ve ilaçların beyne taşınmasını sağlayabilir [47].

Lipozomlar

Lipozomlar, KBB'yi aşmak için geliştirilen taşıyıcı sistemler arasında öne çıkmaktadır. Fosfolipit çift katmanlı yapıları sayesinde hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları taşıyabilen lipozomlar, ilaçların hedef dokuya kontrollü ve etkili bir şekilde iletilmesini sağlar [94].

Lipozomların KBB'yi aşma yetenekleri, çeşitli taşıma mekanizmalarıyla ilişkilidir. Özellikle reseptör aracılı transitoz (RMT) ve adsorptif aracılı transitoz (AMT) gibi

endositoz yolları, lipozomların beyin endotel hücreleri tarafından alınmasını kolaylaştırır. Bu süreçlerde, lipozomların yüzeyine eklenen spesifik ligandlar veya antikorlar, hedef reseptörlerle etkileşime girerek taşıyıcının beyin dokusuna geçişini artırır. Ayrıca, lipozomların yüzey özelliklerinin modifikasyonu, taşıma etkinliğini ve biyoyararlanımı artırabilir.

Hayvan modellerinde yapılan mikrodializ çalışmaları, lipozomal formülasyonların beyin dokusundaki serbest ilaç konsantrasyonlarını artırdığını göstermiştir [95]. Bu çalışmalar, lipozomların KBB'yi aşma kapasitelerinin yanı sıra, beyin içi dağılım ve hedef dokuya ulaşma etkinlikleri hakkında da önemli bilgiler sunmaktadır.

Lipozomlar, beyne ilaç taşıma konusunda umut vadeden taşıyıcı sistemlerdir. KBB'yi aşma yetenekleri ve hedefe yönelik ilaç iletimi özellikleri sayesinde, MSS hastalıklarının tedavisinde önemli bir rol oynayabilirler. Ancak, bu potansiyelin klinik uygulamalara yansıtılabilmesi için mekanistik çalışmaların artırılması ve insan verileriyle desteklenmesi gerekmektedir [95].

Miseller

Miseller, beyne ilaç taşıma konusunda umut vadeden nanotaşıyıcılar arasında yer almaktadır. Yüksek biyouyumluluk, düşük toksisite, kolay üretim ve yüzey fonksiyonelleştirme gibi üstünlükleri sayesinde, misellerin klinik kullanım potansiyeli gün geçtikçe artmaktadır.

Polimerik miseller, küçük boyutları, uzun dolaşım süreleri, iyi stabiliteleri ve hedeflenebilirlikleri sayesinde beyne ilaç taşıma için yeni ufuklar açmıştır. Bu sistemler, GBM, migren, Alzheimer, Parkinson ve diğer beyinle ilişkili durumların tedavisinde kullanılmaktadır [96].

Miseller ilaç taşıma sistemleri, RES alımı ile beyni hedefleyebilir ve uzun dolaşım etkisi üretebilir. Bu sistemler, hidrofobik çekirdek-hidrofilik kabuk konfigürasyonu sayesinde,

hidrofobik ilaçların çekirdeğe yüklenmesini kolaylaştırır ve bu ilaçların çözünürlüğünü artırır. Ayrıca, miseller, spesifik hücreler tarafından alınımı artıran hedefleme ligandları ile birleştirilebilir ve böylece hedef dışı etkiler azaltılabilir [97].

2.6.2.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller kontrollü ilaç salımı, hücresel hedefleme, hücre içi alım kolaylığı ve RES fagositoz mekanizmalarından kaçınma gibi üstünlükler sunarak, MSS hastalıklarının farklı hayvan modellerinde yapılan klinik öncesi çalışmalarda umut verici sonuçlar ortaya koymuştur [97]. Polimerik nanopartiküllerin başlıca üstünlükleri; ilacın çözünürlüğünü arttırmak, hedef dokulara istenilen şekilde ve miktarda ilacın ulaşmasını sağlamak, farmakokinetik ve seçiciliği artırmak olarak sıralanabilir [98].

Kanser tedavisinde polimerik nanopartiküller, terapötik maddelerin hassas ve kontrollü salımını sağlayarak hasta uyuncunu iyileştirme potansiyelleri sayesinde giderek daha fazla önem kazanmaktadır. Bu nanopartiküller, tümör bölgelerinde optimal ilaç konsantrasyonlarını koruyarak tedavi etkinliğini artırabilir. Hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaçları hapsedme yetenekleri ve biyoyumlulukları sayesinde çok çeşitli antikanser tedaviler için uygundur. Ayrıca, polimerik nanopartiküllerin hedefleme ligandlarıyla fonksiyonlandırılması sayesinde, ilaçların kanser hücrelerine doğrudan ve hassas bir şekilde iletimi sağlanabilir [99].

Poli(laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) Nanopartikülleri

PLGA, FDA tarafından onaylanmış, biyoyumlu ve biyoparçalanır bir polimer olup, biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak taşıma sistemlerinin formülasyonunda kullanılmaktadır [100]. PLGA esaslı ilaç taşıyıcı sistemler; küçük moleküllü ilaçlar, genler, proteinler ve aşılarda dahil olmak üzere çok çeşitli terapötik maddelerin enkapsülasyonu için uygundur. Bu sistemler, terapötik maddelerin stabilitesini sağlayarak yüksek biyoyararlanım sağlamaktadır.

PLGA içeren ilaç taşıyıcı sistemleri, hem FDA hem de EMA tarafından insan kullanımına uygun bulunarak onaylanmıştır. Bu biyobozunur ve biyoyumlu polimer, özellikle

kontrollü salım sistemleri, kanser tedavileri ve uzun etkili enjeksiyon formülasyonları gibi alanlarda güvenli bir taşıyıcı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Onaylı ürün örnekleri arasında Lupron Depot® (leuprolid asetat içeren uzun etkili enjeksiyon) ve Sandostatin LAR® (oktreotid içeren mikroküreler) yer almaktadır.

Farklı moleküler ağırlıklara ve çeşitli kopolimer kompozisyonlarına sahip PLGA türleri ticari olarak temin edilebilmektedir. Bu türler genellikle içerdiği monomer oranlarına göre adlandırılır. Örneğin, PLGA 50:50, %50 laktik asit ve %50 glikolik asitten oluşan bir kopolimeri ifade eder. Bu oran, PLGA'nın en hızlı parçalanan formu olarak bilinir ve genellikle kısa süreli ilaç salımı gerektiren uygulamalarda tercih edilir [101].

PLGA'nın parçalanma süresi; sahip olduğu molekül ağırlığına ve monomer oranına bağlı olarak birkaç ay ile birkaç yıl arasında değişiklik gösterebilir [101], [102]. Polimerin içerdiği laktik asit ve glikolik asit oranları hem materyalin sertliğini hem de bozunma hızını belirleyen önemli etmenlerdir. Polimerik nanopartiküllerde ilacın salım hızını belirleyen temel faktörlerden biri bu parçalanma süresidir. Laktik asit oranının artması, PLGA'nın daha sert bir yapı kazanmasına ve dolayısıyla daha yavaş bir şekilde bozunmasına neden olur. Bu nedenle, kontrollü ve uzun süreli ilaç salımı hedeflenen formülasyonlarda laktik asit oranı yüksek PLGA türleri tercih edilmektedir [102].

Herhangi bir yüzey işlevselleştirme yapılmaksızın kullanılan PLGA nanopartikülleri, beyinde %16,4'e varan oranda dağılım gösterebilmekte ve bu yoğunluk en az yedi gün boyunca sürdürülebilmektedir [103]. Ayrıca, hedefe yönelik ligandların nanopartikül yüzeyine bağlanması, biyolojik bariyerlerin aşılmasını kolaylaştırarak beyin hedefleme etkinliğini daha da artırabilmektedir (93).

2.6.2.2. Nanopartikül Hazırlama Yöntemleri

Nanoteknolojinin ilaç taşıyıcı sistemlerinde kullanımı, terapötik etkinliğin artırılması ve yan etkilerin azaltılması açısından büyük önem taşımaktadır. Nanopartiküller, ilaçların hedefe yönelik, kontrollü ve kararlı bir şekilde iletilmesini sağlayan taşıyıcı sistemler olarak ön plana çıkmaktadır. Bu nedenle, ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılacak

nanopartiküllerin hazırlanmasında uygulanacak yöntem, sistemin etkinliği açısından kritik rol oynar.

İlaç taşıyıcı nanopartiküller, genellikle biyouyumlu ve biyoparçalanır polimerler kullanılarak hazırlanır. Bu amaçla en yaygın kullanılan yöntemler aşağıda özetlenmiştir:

Emülsiyon / Çözücü Difüzyon Yöntemi

Emülsiyon / çözücü difüzyon yöntemi, nanopartikül hazırlamada sık kullanılan ve nispeten basit bir tekniktir. Bu yöntemde, polimer (ör.PLGA) kısmen su ile karışabilen bir organik fazda (ör. benzil alkol, propilen karbonat, etil asetat) çözülür. Organik faz, uygun bir yüzey aktif maddenin (ör. sodyum dodeasil sülfat, polivinil alkol (PVA), didodesil dimetil amonyum bromür sudaki çözeltisiyle karıştırılarak emülsifiye edilir. Organik çözücünün difüzyonu ve suyun emülsiyon damlacıklarına karşı difüzyonu, polimer nanopartikül oluşumunu sağlamaktadır [102].

Partiküllerin boyutu, kullanılan polimer, çözücü tipi, stabilizatör ve emülsiyon oluşturma koşullarına göre değişkenlik gösterir. Emülsiyonun stabilitesi ve çözücünün difüzyon hızı nanopartikül boyutunun kontrolünde önemli parametrelerdir. Bu yöntemle üretilen nanopartiküller genellikle dar dağılım ve homojen yapıdadır, bu da kontrollü salım sistemleri için üstünlük sağlar. Ayrıca, yüksek yükleme verimi elde etmek mümkündür.

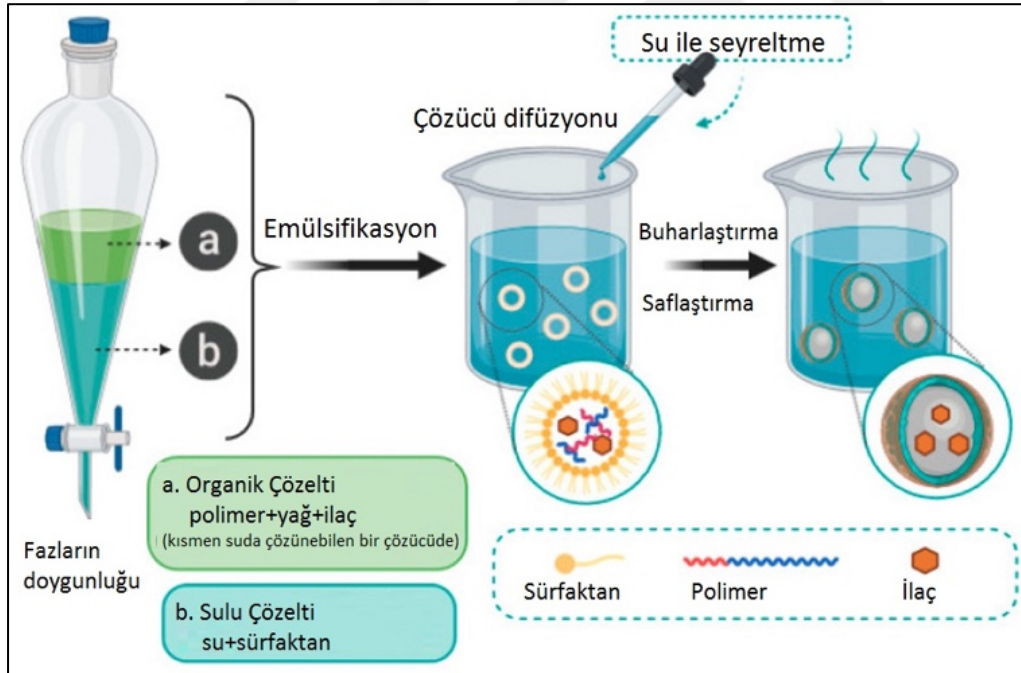
Ancak, bu yöntemin sakıncaları da vardır. Organik çözücülerin tamamen uzaklaştırılması zor olabilir ve çözücü kalıntıları ürünün toksik olmasına yol açabilir. Ayrıca, proses optimizasyonu oldukça hassas olup, emülsiyon stabilitesinin sağlanması için uygun yüzey aktif madde seçimi gereklidir. Bu nedenle özellikle farmasötik alanda, biyouyumlu ve uçucu çözücüler tercih edilir.

Bu yöntemin biyomedikal uygulamalarda, özellikle kontrollü ilaç salımında ve hedefe yönelik taşıyıcı sistemlerde kullanımı yaygındır. Ayrıca, hidrofilik ve hidrofobik

maddelerin beraber nanopartikül yapısına dahil edilmesi mümkündür, bu da yöntemin esnekliğini artırır [102].

Emülsiyon / Çözücü Buharlaştırma Yöntemi

Emülsiyon çözücü buharlaştırma yönteminde öncelikle polimer aseton, etil asetat, diklorometan ve kloroform gibi uçucu bir organik çözücünde çözülür ve ardından etkin maddenin organik çözücünde (polimer içeren çözelti) çözünmesi veya dağılması sağlanır. Daha sonra bu organik faz, polivinil alkol veya jelatin gibi uygun bir emülgatör içeren sulu faza eklenerek emülsiyon elde edilir. Son olarak organik faz uygun bir yöntemle uçurularak nanopartiküllerin oluşumu sağlanır. Formülasyonun partikül boyutu karıştırma hızına, sıcaklığa ve dağıtıcı maddeye bağlıdır. Bu yöntemin sakıncalarından biri, sürekli karıştırma için yüksek hızlı homojenizatörün kullanılmasıdır. Özel önlemler alınmazsa heterojen boyut dağılımı bu yöntemin diğer bir sakıncasıdır [102].



Şekil 2.8. Emülsiyon/çözücü buharlaştırma metodunun şematik gösterimi([104] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

Diyaliz Yöntemi

Diyaliz yöntemi, nanopartikül hazırlamada kullanılan bir diğer önemli tekniktir. Bu yöntemde, polimer ve etkin madde organik çözücünde çözülür ve bu çözelti yarı geçirgen membran içeren bir diyaliz torbasına veya tüpüne yerleştirilir. Torba, bir uygun çözücü veya su dolu bir banyoya konur. Organik çözücü, membran vasıtasıyla yavaş yavaş dış faza difüze olur. Bu difüzyon süreci polimerin çözeltiden ayrılarak nanopartiküller oluşturmaya neden olur. Yöntemin en önemli üstünlüklerinden biri, çözücü kalıntısının en düşük düzeye indirilebilmesidir.

Diyaliz yöntemi, özellikle hassas moleküllerin nanopartikül haline getirilmesinde tercih edilir çünkü çözücü uzaklaştırma işlemi yavaş ve kontrollüdür. Bu sayede partiküllerin yapısı korunur ve büyüklük kontrolü sağlanır. Ancak, işlem süresi diğer yöntemlere göre daha uzundur ve ölçeklendirme zorlukları mevcuttur. Membran seçimi, çözücü ve polimerin kimyasal özellikleri işlemin başarısı için kritik önem taşır.

Yöntemin uygulama alanları, genellikle biyolojik aktif maddelerin (proteinler, peptitler, DNA) taşınması ve kontrollü salımıdır. Diyaliz sayesinde partiküller daha homojen bir yapıya kavuşur ve istenmeyen çözücü kalıntıları büyük ölçüde ortadan kalkar. Bu da farmasötik uygulamalarda güvenlik açısından büyük bir üstünlük sağlar.

Diyaliz yöntemi, laboratuvar ölçeğinden küçük ölçekli üretime uygundur, ancak endüstriyel ölçeklendirme aşamasında bazı teknik zorluklar ortaya çıkabilir. Bu nedenle genellikle AR-GE ve prototip üretim aşamalarında tercih edilir [105].

Süperkritik Sıvı Teknolojisi

Süperkritik sıvı teknolojisi, nanopartikül üretiminde çevre dostu ve ileri teknoloji bir yöntem olarak öne çıkar. Bu teknikte, süperkritik haldeki karbondioksit (CO_2) kullanılır; süperkritik CO_2 , hem gaz hem sıvı özellikleri taşıyan özel bir haldedir ve bu sayede çözücü veya taşıyıcı madde olarak işlev görür. Polimerler veya etkin maddeler süperkritik CO_2 içinde çözülür ve ardından basınç veya sıcaklık değişimi ile kontrollü bir şekilde

ökelerek nanopartiküller oluşturulur. Bu yöntem çözücü kalıntısı problemini büyük oranda ortadan kaldırır.

Bu teknolojinin önemli üstünlüklerinden biri, prosesin düşük sıcaklıkta yapılabilmesi nedeniyle biyolojik moleküllerin yapısal bütünlüğünün korunmasıdır. Ayrıca partikül boyutları ve morfolojisi çok hassas bir şekilde kontrol edilebilir. Süperkritik sıvı teknolojisi sayesinde yüksek saflıkta ve biyouyumlu nanopartiküller üretmek mümkündür. Ancak, kullanılan ekipmanlar yüksek maliyetlidir ve prosesi optimize etmek zaman alıcı olabilir.

Süperkritik sıvı teknolojisi özellikle farmasötik, gıda ve kozmetik endüstrilerinde tercih edilmektedir. İlaç taşıyıcı sistemlerinde ve kontrollü salımda kullanılan nanopartiküllerin üretiminde sürdürülebilir ve çevre dostu bir alternatif olarak görülmektedir. Ayrıca, özücü içermeyen yapısı nedeniyle regülasyon açısından üstünlük sağlar.

Yöntemin sakıncası olarak, yüksek basınçlı ortamın gerekliliğı ve bunun beraberinde getirdiğı güvenlik önlemleri sayılabilir. Ayrıca proses karmaşıklığı nedeniyle deneyimli personel ve ileri teknoloji cihazlar gereklidir [106].

Tuzla öktürme (“Salting Out”)

Tuzla öktürme yöntemi, nanopartikül üretiminde kullanılan klasik ve etkili yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, polimerin çözüldüğü organik çözücü faz ile yüksek konsantrasyonda tuz içeren su fazı emülsiyon haline getirilir. Tuz, polimer ve çözücünün çözünürlüğünü azaltarak çöktürmeyi sağlar ve böylece nanopartiküller oluşur. Tuzun etkisiyle, polimer sulu faza geçemeyen bir duruma gelir ve küçük partiküller halinde çöker.

Yöntemin üstünlüğü, toksik çözücülerin kullanılmadan veya çok az kullanılarak alışılabilmesidir. Ayrıca, işlem sıcaklığı genellikle oda sıcaklığında olduğundan hassas

biyolojik maddeler için uygundur. Tuzla çöktürme yöntemi, ölçeklenebilir olması ve kolay uygulanabilirliği ile endüstride tercih edilen tekniklerden biridir.

Yöntemde tuz konsantrasyonunun dikkatli ayarlanması gereklidir; yüksek tuz konsantrasyonu partiküllerin aglomerasyonuna yol açabilir. Ayrıca, tuzun nanopartiküllerden uzaklaştırılması için ekstra saflaştırma adımları gerekir, bu da üretim sürecini uzatabilir.

Tuzla çöktürme yöntemi özellikle biyopolimerlerin ve etkin maddelerin nanopartikül haline getirilmesinde kullanılmaktadır. Ayrıca, kontrollü salım ve biyouyumluluk açısından uygun taşıyıcı sistemler geliştirmek için tercih edilmektedir [107].

Emülsiyon Polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonu, nanopartiküllerin sentez yoluyla elde edilmesinde yaygın kullanılan bir yöntemdir ve temel prensip olarak monomerlerin sulu fazda emülsiyon halinde polimerizasyonu esasına dayanır. Bu yöntemde, monomerler ve başlatıcılar su fazında küçük damlacıklar oluşturacak şekilde dağıtılır ve ardından polimerizasyon başlatılır. Sonuçta polimer partikülleri sulu fazda stabilize olur ve istenilen boyutlarda nanopartiküller elde edilir.

Bu yöntemin üstünlükleri arasında partikül boyutunun ve dağılımının iyi kontrol edilebilmesi, yüksek verim ve endüstriyel ölçeklendirmeye uygun olması sayılabilir. Ayrıca, sulu ortamda gerçekleştiği için çevreye duyarlı ve toksik olmayan bir proses olarak kabul edilir.

Emülsiyon polimerizasyonunda yüzey aktif madde ve diğer katkı maddelerinin kullanılması gereklidir, bu da bazı durumlarda ürün saflığını olumsuz etkileyebilir. Ayrıca, polimerizasyonun tamamlanması ve stabilizasyon için belirli koşulların sağlanması gerekir [108].

Ara Yüzey Polimerizasyonu

Ara yüzey polimerizasyonu yöntemi, iki çözeltinin bir ara yüzeyde reaksiyona girerek polimer oluşturmaya dayanan bir tekniktir. Genellikle biri suda (hidrofilik), diğeri organik çözücünde (hidrofobik) çözünmüş iki monomer fazı bir araya getirilir. Bu iki fazın ara yüzeyinde polimerizasyon reaksiyonu gerçekleşir ve bu ara yüzeyde ince bir polimer kabuk oluşur. Bu yöntemle genellikle çekirdek-kabuk yapılı, kontrollü salım sağlayan nanopartiküller elde edilir.

Yöntem, özellikle çift fazlı sistemlerde kontrollü yapılar oluşturmak için uygundur. Polimerizasyon sadece ara yüzeyde gerçekleştiği için reaksiyon süresi kısa ve enerji gereksinimi düşüktür. Aynı zamanda hem lipofilik hem de hidrofilik etkin maddelerin enkapsülasyonu mümkündür. Nanokapsül ve nanoemülsiyon sistemleri oluşturmak için sıkça tercih edilir.

Bu yöntemin sakıncaları arasında monomerlerin toksik olabilmesi, reaksiyon sırasında oluşan yan ürünlerin saflaştırılması gerekliliği ve çözücü seçiminde dikkatli olunması yer alır. Ayrıca polimer kabuk kalınlığının ve partikül boyutunun kontrolü karmaşık olabilir.

Ara yüzey polimerizasyonu, özellikle kontrollü salım sistemlerinde, kanser tedavisine yönelik ilaç taşıyıcılarda ve kozmetik ürünlerde kullanılmaktadır [109].

İyonik Jelleşme ve Koaservasyon

İyonik jelleşme yöntemi, özellikle biyopolimerlerin nanopartikül oluşturmaya için kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, genellikle pozitif ve negatif yüklü polielektrolitler bir araya getirilerek elektrostatik çekim ile jelleşme sağlanır. Örneğin, pozitif yüklü kitosan ile negatif yüklü sodyum tripolifosfat gibi bir çapraz bağlayıcı maddenin karıştırılması sonucunda jelleşme olur ve nanopartiküller oluşur.

Yöntem, düşük sıcaklık ve organik çözücü gerektirmemesi nedeniyle çevre dostudur ve biyolojik açıdan hassas moleküller için uygundur. İyonik jelleşme ile oluşan

nanopartiküller genellikle biyouyumlu, biyoparçalanır ve toksik olmayan özellikler gösterir. Bu nedenle özellikle protein, peptit ve gen taşınımı gibi uygulamalarda tercih edilir.

Koaservasyon yöntemi, polimerlerin çözücüsüz faza geçişi ile mikro/nano kapsül oluşturduğu bir süreçtir. Bu yöntem termodinamik kararsızlık yaratarak polimerin çöktürülmesini sağlar. Koaservasyon sırasında kullanılan maddeler ve koşullar partikül boyutunu etkiler. Tekli veya çiftli koaservasyon teknikleri kullanılabilir.

Bu yöntemlerin sakıncaları; partikül stabilitesinin düşük olması, partiküllerin birleşme (agregasyon) eğilimi ve sınırlı taşıyıcı kapasite olabilir. Ancak, yöntemlerin basitliği ve biyouyumlu maddelerle uygulanabilirliği önemli bir üstünlüktür [109].

Nanopresipitasyon

Nanopresipitasyon yöntemi, çözücü-değişimi esaslı ve oldukça hızlı bir nanopartikül üretim yöntemidir. Bu yöntemde, polimer ve etkin madde, uygun bir çözücü (örneğin aseton) içinde çözülür. Ardından bu organik çözelti, karıştırılarak bir sulu faza (genellikle yüzey aktif madde içerir) eklenir. Organik çözücünün suya difüzyonu sırasında polimerin çözünürlüğü azalır ve bu da ani çökmeye yol açarak nanopartikül oluşumunu başlatır.

Bu yöntem, basitliği ve toksik çözücü gerektirmemesiyle öne çıkar. Ayrıca bu yöntemle elde edilen nanopartiküllerin partikül büyüklüğü dağılımı dar bir aralık gösterir ve üretim süresi oldukça kısadır. Emülsiyon oluşumu gerekmediğinden işlem daha az karmaşıktır. Çözünürlüğü sınırlı ilaçlar için taşıyıcı sistem tasarlanmasında çok tercih edilen bir yöntemdir.

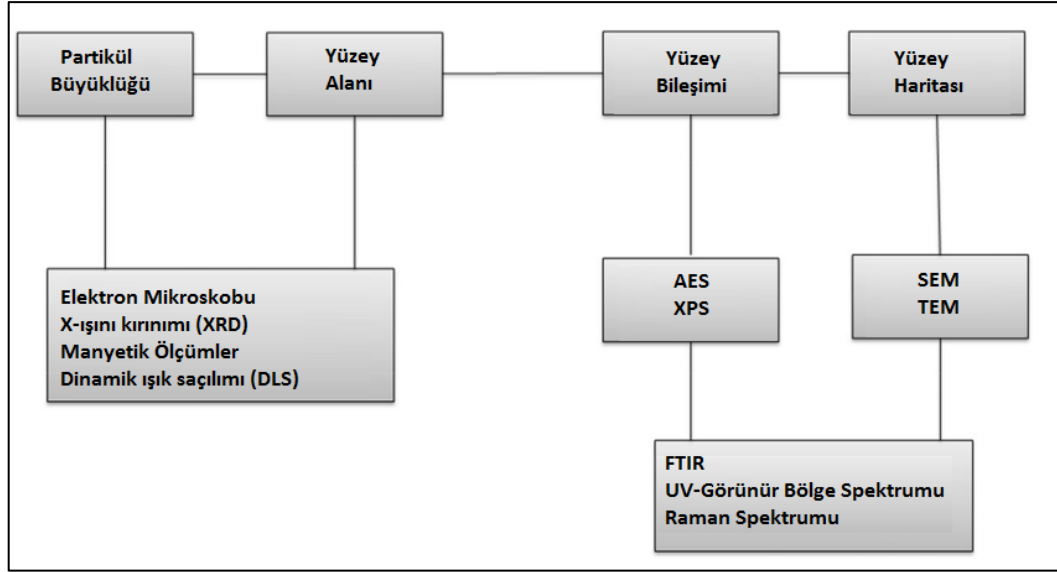
Yöntemin sakıncası olarak, düşük enkapsülasyon verimi ve partikül boyut kontrolünün zor olması sayılabilir. Özellikle hızlı çökme işlemi sırasında bazı etkin maddelerin nanopartiküle tam olarak entegre olmaması mümkündür. Ayrıca stabilite problemi yaşanabilir.

Bu yöntem, özellikle lipofilik ilaçların hedefe yönelik taşınması ve biyolojik sistemlerde kontrollü salım amaçlı olarak kullanılır. Formülasyon kolaylığı nedeniyle AR-GE süreçlerinde yaygın olarak tercih edilmektedir [107].

2.6.2.3.Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküllerin karakterizasyonunda en temel parametreler partikül büyüklüğü ve şeklidir. Buna ek olarak, partikül büyüklüğü dağılımı (polidispersite indeksi - PDI), yüzey yükü (zeta potansiyeli), yüzey alanı, yüzey kimyası, morfoloji, etkin madde yükleme kapasitesi ve enkapsülasyon verimi gibi özellikler de sistemin stabilitesi, biyoyararlanımı ve terapötik etkinliği üzerinde belirleyici rol oynamaktadır. Özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerde, bu parametrelerin optimize edilmesi, hedef dokuya etkin madde taşınmasını ve salım profilini doğrudan etkileyebilmektedir.

Bu nedenle karakterizasyon sürecinde yalnızca çekirdek yapıya değil, yüzeydeki ligandlara da odaklanılarak kapsamlı analizler yapılmalıdır [110]. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) analizi, Enerji Dağılımlı X-Işını Analizi (EDX), Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) Analizi, Taramalı Tünelleme Mikroskobu (STM), Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), Raman Spektroskopisi, Morötesi-görünür Spektrometri (UV-Vis), Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR), X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS), Dinamik Işık Saçılması (DLS), X-Işını Kırınımı (XRD) ve zeta potansiyel analizi, nanopartiküler sistemlerin karakterizasyonu için kullanılmaktadır [111].



Şekil 2.9. Nanopartiküler karakterizasyon yöntemlerinin şematik gösterimi ([111] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM, numune yüzeyini incelemek amacıyla yüksek enerjili bir elektron hüzmesi kullanan bir mikroskop türüdür. Optik mikroskoplardan farklı olarak, görüntü oluşturmak için ışık dalgaları yerine elektronlar kullanılır. Cihazın üst kısmında yer alan elektron tabancasından çıkan elektron hüzmesi, elektromanyetik mercekler aracılığıyla odaklanarak numune yüzeyine yönlendirilir.

SEM cihazlarında yaygın olarak iki tip elektron tabancası kullanılır:

- Termiyonik tabanca, elektron akışı sağlanana kadar filamentin ısıtılması prensibine dayanır.
- Alan emisyon tabancası ise elektronları, yüksek elektrik alanı ile atomlardan kopararak üretir ve daha yüksek çözünürlük sağlar.

Elektron hüzmesi, yüzeye çarptığında çeşitli sinyaller ortaya çıkar: ikincil elektronlar, geri saçılmış elektronlar (birincil elektronlar), Auger elektronları ve karakteristik X-ışınları. SEM görüntülemeye en sık ikincil ve geri saçılmış elektronlar kullanılır. İkincil elektronlar, yüksek çözünürlüklü görüntü elde edilmesinde özellikle etkilidir ve yaklaşık

1–5 nm düzeyinde detay sunabilir. Numunenin elementel bileşimi ise, yüzeyden yayılan karakteristik X-ışınlarının analiz edildiği EDX yöntemiyle belirlenebilir [112].

Cihazın elektron sütununda yer alan tarama bobinleri, elektron ışını yatay ve dikey yönlerde saptırarak yüzey üzerinde "raster tarama" gerçekleştirir. Bu tarama sırasında elde edilen sinyaller, elektronik sistemler tarafından algılanır, yükseltilir ve görüntü ekranında (genellikle katot ışın tüp) görüntüye dönüştürülür. Böylece, taranan yüzeyin topografik ve/veya kompozisyonel özellikleri hakkında detaylı bilgi elde edilir [112].

Enerji Dağılımlı X-Işını (EDX) Analizi

EDX analizi, SEM ile kullanılan bir karakterizasyon tekniğidir. Bu yöntem, numunenin yüzeye yakın bölgelerinde bulunan elementleri tespit ederek, farklı noktalardaki elementel dağılımları hakkında genel bir haritalama sağlar. Yaklaşık 10–20 keV enerjiye sahip elektron hüzmesinin iletken numune yüzeyine çarpmasıyla oluşan karakteristik X-ışınlarının enerjisi, numunedeki elementlerin türüne bağlı olarak değişir.

EDX, özellikle yüzeyde ya da yüzeye yakın bölgelerde bulunan ağır metal iyonları içeren nanopartiküllerin varlığını ve miktarını belirlemek için uygundur. Örneğin, gümüş, altın veya paladyum gibi elementleri içeren nanopartiküller bu yöntemle kolaylıkla tespit edilebilir. Ancak, düşük atom numarasına sahip elementlerin tespitinde sınırlamalar söz konusudur [112].

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

AFM, nanometrik ölçekte yüzey karakterizasyonu yapmak için kullanılan güçlü ve çok yönlü bir mikroskopi tekniğidir. Üç boyutlu yüzey topografisi görüntüsü elde etmenin yanı sıra, yüzey pürüzlülüğü, yüzey yapısı ve diğer fiziksel özellikler hakkında detaylı bilgi sunar. Atomik çözünürlükte görüntüleme yapabilen bu yöntem, çok az örnek hazırlığı gerektirmesi ve örneğe zarar vermeden analiz yapabilmesi nedenleriyle diğer yöntemlere üstünlük göstermektedir. Özellikle polimer nanokompozitlerde yüzeyin morfolojik özelliklerini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır [113].

Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM, elektron hüzmesinin numune içerisinde geçirilmesi prensibine dayalı olarak çalışan güçlü bir mikroskopi tekniğidir. Elektronlar numune ile etkileşime girdikten sonra, objektif mercekle yardımıyla büyütülerek ve odaklanarak görüntü oluşturulur.

TEM görüntülerinde kontrast oluşumu, ışık mikroskobuna kıyasla farklı bir mekanizmaya dayanır. Işık mikroskobunda absorpsiyon esas alınırken, TEM’de elektron hüzmesinin numune ile etkileşimi sonucunda kırınım (difraksiyon) meydana gelir. Numunenin kristal düzlemlerinin elektron huzmesiyle olan konumuna bağlı olarak kırınım yoğunluğu değişir. Elektronlar, belirli açılarda kuvvetli şekilde eksenenden saparken, bazı açılarda ise doğrudan geçer.

Numunenin farklı açılarla eğilmesini sağlayan özel tutucular kullanılarak istenen kırınım koşulları elde edilebilir. Difrakte olmuş elektronların bir diyafram yardımıyla engellenip yalnızca saçılmamış (doğrudan geçen) elektronların görüntü oluşturmada kullanılmasıyla elde edilen görüntü “aydınlık alan görüntüsü” (“bright field”) olarak adlandırılır. Buna karşılık, sapmış elektronlar ile elde edilen görüntü karanlık alan görüntüsü (“dark field”) olarak bilinir [111].

Tünelleme Mikroskobu (STM)

STM, iletken yüzeylerin atomik düzeyde görüntülenmesini sağlayan güçlü bir mikroskopi tekniğidir. Yüzey görüntüleri, yüksek yanıl çözünürlükle (yaklaşık 0,1 nm) ve derinlik çözünürlüğü (yaklaşık 0,01 nm) ile elde edilir. STM, iletken bir numunenin yüzeyinde çok ince uçlu bir probun, piezoelektrik kristal yardımıyla tarama yapması ve oluşan tünelleme akımının ölçülmesi prensibine dayanır.

STM’nin çalışma prensibi kuantum tünelleme olgusuna dayanır. Numune yüzeyi ile iletken uç arasında çok küçük bir mesafe olduğunda ve düşük voltaj uygulandığında, elektronlar bu aralıktan tünelleme yoluyla geçebilir. Bu tünelleme akımı, numunenin Fermi seviyesi civarındaki yerel yoğunluk durumuna bağlı olarak değişir.

Taramada, uç ve yüzey arasındaki mesafe, akım sabit tutulacak şekilde piezoelektrik kontrolle ayarlanır. Uç yüzey üzerinde yatay (raster) hareket ettikçe, yüksekliği konumuna bağlı olarak kaydedilir ve bu sayede yüzeyin topografik haritası çıkarılır.

STM, hava, vakum, sıvı veya gaz ortamlarında ve farklı sıcaklıklarda çalıştırılabilir. Ancak yüzeyin çok temiz olması ve ucun oldukça keskin olması gerektiğinden uygulaması hassasiyet gerektirir. Bu amaçla karbon nanotüp uçlar da kullanılmaktadır [114].

Morötesi-Görünür (UV-Vis) Spektroskopisi

UV-Vis spektroskopisi, bir örneğin morötesi (UV) ve görünür bölgedeki ışığı absorplama yeteneğini inceleyen bir tekniktir. Sistemde genellikle UV bölgesi için döteryum lambası, görünür bölge için tungsten lambası, bir monokromatör, dedektör, referans ve örnek ışın yolu bulunur.

Analiz sırasında örnek, belirli dalga boylarında değişen UV-Vis ışığa maruz bırakılır. Örnek ışını, örnek çözeltiden geçerken bir kısmı absorplanır, geri kalanı ise dedektöre ulaşır. Örnek etkileşmeyen ışık ise referans ışını olarak alınır. Dedektör, referans ve örnek ışınlarının şiddetlerini karşılaştırarak absorpsiyon değerini belirler. En yüksek absorbans değerinin gözleendiği dalga boyu, maddenin maksimum absorpsiyon dalga boyu (λ_{max}) olarak tanımlanır.

Metal nanopartiküller (100 nm altı çapta), özellikle yüzey plazmon rezonansı (SPR) nedeniyle UV-Vis bölgesinde güçlü bir optik saçılım ve absorpsiyon gösterirler. SPR, metalin iletken elektronlarının kolektif salınımıdır. Bu rezonansın şiddeti, dalga boyu ve spektral genişliği; partiküllerin boyutu, şekli, bileşimi ve bulundukları ortamın kırılma indisine bağlı olarak değişir. Örneğin, gümüş nanopartiküller 420–500 nm aralığında bir SPR absorpsiyon pikine sahiptir. Partikül boyutu arttıkça, SPR dalga boyu daha uzun dalgalara (kırmızıya) kayar [111].

Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, monokromatik bir lazer ışığının maddeyle etkileşimi sonucu oluşan Raman saçılması (inelastik saçılma) prensibine dayanan bir tekniktir. Bu teknik, moleküllerin dönme, titreşim ve diğer düşük enerjili hareketleri hakkında bilgi sağlar. Lazer ışığının örnekle etkileşmesi sonucu enerji değişimleri oluşur; bu enerji kaymaları, sistemdeki fonon modlarına ilişkin bilgiler sunar.

Genellikle bir lazer demeti örneği aydınlatmak için kullanılır. Örneğe çarpan elektromanyetik ışınlar, bir mercek ile toplanır ve bir kolimatörden geçirilir. Molekül, temel enerji seviyesinden uyarılmış bir duruma geçerek kısa bir süre burada kalır, ardından titreşimsel olarak uyarılmış bir hale gevşer. Bu süreçte gözlenen saçılma Stokes Raman saçılması olarak adlandırılır. Eğer molekül başlangıçta titreşimsel uyarılmış bir durumda ise ve daha düşük enerjili bir duruma geçerse, bu saçılma Anti-Stokes Raman saçılması olarak bilinir.

Raman spektroskopisinin ileri düzey teknikleri şunlardır:

- Yüzey Destekli Raman Spektroskopisi (SERS): Metal yüzeylerde sinyali güçlendirerek düşük konsantrasyonlarda bile tespit yapılmasına olanak tanır.
- Rezonans Raman Spektroskopisi: Lazer dalga boyunun, molekülün elektronik geçişleriyle rezonansa girmesi sonucu seçici ve kuvvetli Raman sinyali sağlar.
- Uyarılmış Raman Spektroskopisi (“Stimulated Raman Spectroscopy”): Lazer kaynakları kullanılarak Raman sinyalinin güçlendirilmesini sağlar.

Dinamik Işık Saçılması (DLS)

DLS, kolloidal çözeltiler ve nanopartiküllerin boyut dağılımını belirlemek için yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, bir lazer ışını kolloidal çözelti içerisinden geçirilir ve saçılan ışığın yoğunluğu zamana bağlı olarak analiz edilir. Işık yoğunluğundaki bu dalgalanmalar, partiküllerin hareketine (Brown hareketi) bağlı olarak değişir.

DLS analizinin temelinde oto-korelasyon fonksiyonu yer alır. Bu fonksiyon, saçılan ışığın zamanla değişimini değerlendirerek partiküllerin difüzyon hızını ortaya koyar. Büyük partiküller daha yavaş hareket eder ve daha fazla ışık saçar; küçük partiküller ise daha hızlı hareket eder.

Bu hareketten elde edilen verilerle, parçacığın hidrodinamik çapı hesaplanır. Bu çap, aynı hızda difüze olan teorik, geçirimsiz bir kürenin çapıdır. Hidrodinamik çap, partiküllerin yüzeyindeki çözünmüş molekülleri ve agregasyonu da hesaba katar. Bu sayede yalnızca boyut değil, aynı zamanda sistemdeki agregasyon durumu hakkında da bilgi elde edilir. Örneğin, çözelti içinde partiküller bir araya gelerek kümelenmişse, bu durum DLS analizinde daha büyük bir ortalama çap olarak kendini gösterir [115].

Agregasyon, DLS analizinde ölçülen hidrodinamik çapı önemli ölçüde etkileyebilir. Agregasyona uğramış bir çözelti, genellikle TEM ile belirlenen boyutlara kıyasla daha büyük hidrodinamik çaplar gösterir. Bu durum, birden fazla partikülün bir araya gelerek daha büyük yapılar oluşturmamasından kaynaklanır. Öte yandan, agregasyona uğramamış çözeltilerde ölçülen hidrodinamik çap, çoğunlukla TEM ile belirlenen boyutlara yakın veya bir miktar daha büyük olabilir. Bunun nedeni, DLS'nin sadece çekirdek boyutunu değil, parçacık etrafındaki çözünmüş tabaka ve yüzeydeki moleküler etkileşimleri de kapsayan hidrodinamik hacmi ölçmesidir. Ayrıca, hidrodinamik çap, sadece boyuta değil, aynı zamanda partiküllerin şekli ve moleküler yapısı gibi faktörlere de bağlıdır. Bu nedenle DLS, tek başına parçacık boyutunu belirlemekten ziyade, partiküllerin dispersiyon ortamındaki davranışlarını değerlendirmek için kullanışlı bir yöntemdir [115].

Zeta Potansiyel

Nanopartiküller veya kolloidal partiküller, süspansiyon içinde yüzey yüküne sahiptir. Elektrik alanı uygulandığında, bu yüklü partiküller elektrik alan ile etkileşime girerek hareket etmeye başlar. Partikülün hızı ve hareket yönü, elektrik alanının büyüklüğü, parçacığın yükü ve ortamın özelliklerine bağlıdır.

Partikülün hızı, saçılan ışığın Doppler kayması gözlenerek ölçülür. Bu hız, partikülün kesme düzlemindeki elektriksel potansiyeline orantılıdır ve bu değere zeta potansiyeli denir. Böylece, elektrik alan altında partikül hareketinin optik ölçümü zeta potansiyelini belirlemek için kullanılır [116], [117]. Bu olaya elektroforez denir. Numune partikülleri, bilinen kırılma indisine sahip bir çözücü içinde askıda tutulur. Zeta potansiyeli, nanopartikül yüzeyindeki etkin elektrik yükünün ölçüsüdür ve kolloidal partiküllerin yük stabilitesini nitelendirir. Yüzey yüküne sahip bir nanopartikülde, yükü dengelemek üzere zıt yüklü iyonlar nanopartikül yüzeyine yakın bölgede toplanır. Bu iyon tabakası nanopartikül ile hareket eder ve böylece bir elektriksel çift tabaka oluşur. Zeta potansiyeli, bu çift tabakanın sıvıdaki potansiyel farkını temsil eder.

Negatif yüklü partiküller pozitif yüklü yüzeylere bağlanırken, pozitif yüklü partiküller negatif yüklü yüzeylere bağlanır. Zeta potansiyelinin büyüklüğü, parçacık stabilitesi hakkında bilgi verir; yüksek mutlak değerler, elektrostatik itmenin artması nedeniyle artan stabiliteyi gösterir.

0–5 mV arası: Partiküller kolayca agregasyon yapar (düşük stabilite).

5–20 mV arası: Minimum stabilite.

20–40 mV arası: Orta düzeyde stabilite.

40 mV üzeri: Yüksek stabilite.

Zeta potansiyelinin büyüklüğünü etkileyen önemli bir diğer faktör ise çözeltinin pH değeridir. Belirli bir pH'da yüzey yükü sıfıra düşer; buna izoelektrik nokta denir.

2.7. Üç Boyutlu (3B) Hücre Kültürü

Geleneksel iki boyutlu (2B) hücre kültürü sistemlerinde hücreler, genellikle polistiren gibi sentetik malzemelerden üretilmiş düz yüzeylere tutunarak tek katmanlı bir düzlemde büyür. Ancak bu yapay ortam, hücrelerin doğal mikroçevresini ve üç boyutlu organizasyonunu yansıtmakta yetersiz kaldığı için fizyolojik koşulları tam olarak taklit edemez. Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin sınırlı olması, hücre polaritesinin

bozulması ve difüzyon gradyanlarının oluşmaması gibi nedenlerle, 2B kültürlerde elde edilen veriler genellikle *in vivo* modellerle örtüşmemektedir [118].

Bu nedenle son yıllarda üç boyutlu (3B) hücre kültürü sistemlerine olan ilgi artmıştır. 3B modeller, hücrelerin doku benzeri bir mimaride organize olmasına imkân tanıyarak, proliferasyon, diferansiyasyon, gen/protein ekspresyon profili ve ilaç yanıtları açısından daha fizyolojik sonuçlar elde edilmesini sağlar [119]. Özellikle tümör mikroçevresi, kan-beyin bariyeri ve nörolojik hastalık modellerinde sıklıkla tercih edilen bu sistemler; sferoidler, organoidler, hidrojeller, biyobozunur iskeletler ve biyobaskı teknikleri kullanılarak oluşturulabilir.

Onkoloji alanında, bu modeller kemoterapötik ajanlara karşı gelişen direnç mekanizmalarını anlamak ve ilaç penetrasyonunu değerlendirmek açısından değerli araçlar sunar. Böylece 3B kültür sistemleri, ilaç geliştirme sürecinde klasik 2B modellere kıyasla daha gerçekçi ve güvenilir veriler sağlamaktadır [120].

2.7.1. Üç Boyutlu Hücre Kültürünün Üstünlükleri

3B hücre kültürü sistemleri, hücrelerin doğal yaşamsal ortamlarına daha yakın koşullarda büyümesini ve fonksiyon göstermesini sağlayarak klasik 2B kültürlerle kıyasla çok sayıda üstünlük sunar. 2B kültürlerde hücreler, sert ve düz bir plastik yüzeyde tek katman halinde büyürken, 3B kültürlerde hücreler, hücre dışı matrisi (ECM) taklit eden bir yapı içinde bir araya gelerek çok katmanlı ve doku benzeri yapılar oluşturur. Bu durum, hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin daha doğal biçimde gerçekleşmesine imkan tanır [118].

3B sistemlerde hücrelerin morfolojisi, proliferasyon hızı, gen ve protein ekspresyon profili, metabolizma ve sinyal iletim yolları, *in vivo* koşullara daha benzer şekilde ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle özellikle ilaç geliştirme, kanser araştırmaları, nörodejeneratif hastalık modelleri ve doku mühendisliği gibi alanlarda tercih edilmektedir. Örneğin, 3B ortamlarda yetiştirilen kanser hücreleri, 2B sistemlerdeki hücrelere göre sitotoksik maddelere daha dirençli davranmakta ve bu da kemoterapiye karşı *in vivo* tümör direncini daha iyi taklit etmektedir [120]. Ayrıca, 3B kültür sistemleri besin, oksijen ve ilaç moleküllerinin hücre kütlesi içinde difüzyonuyla oluşan gradyanlara izin verir. Bu

gradyanlar, *in vivo* tümör mikro çevresinde görülen hipoksi, düşük pH ve metabolit birikimi gibi özelliklerin taklit edilmesine olanak tanır. Bu özellik, özellikle tümörlerde görülen heterojen yapının modellenmesinde çok önemlidir [119]. Böylece ilaçların hücreye penetrasyon yeteneği, etkinliği ve toksisitesi daha gerçekçi biçimde değerlendirilebilir.

3B hücre kültürü aynı zamanda hayvan deneylerine alternatif bir model sunarak etik kaygıların azaltılmasına katkı sağlar. Bu sistemlerde hücreler ya doğal/hidrojeller içinde (örneğin kollajen, Matrigel), ya da sentetik iskeleler üzerinde (örneğin PLA, PLGA) üç boyutlu olarak büyütülür. Ayrıca sferoidler, organoidler ve biyobaskı yöntemleri ile daha kompleks yapılar elde edilerek doku ve organ benzeri sistemlerin laboratuvar ortamında oluşturulması da mümkün olmaktadır [121]. 3B hücre kültürü sistemleri, hücresel davranışların fizyolojik koşullara daha yakın bir biçimde modellenmesini mümkün kılmakta ve bu yönüyle geleneksel iki boyutlu kültür sistemlerine kıyasla önemli üstünlükler sunmaktadır. Bu sistemler, özellikle tümör mikroçevresi, ilaç direnci mekanizmaları ve hücre-hücre/matris etkileşimlerinin incelenmesi gibi kompleks biyolojik süreçlerin daha gerçekçi bir şekilde çalışılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca, yeni terapötik ajanların taranması, tedaviye yanıtın öngörülmesi ve kişiselleştirilmiş tıp uygulamalarının geliştirilmesi açısından da translasyonel potansiyele sahip güçlü bir araştırma platformu olarak değerlendirilmektedir [118], [122].

Çizelge 2.3. İki boyutlu ve üç boyutlu hücre kültürünün karşılaştırılması [118], [119], [122].

Özellik	2B Hücre Kültürü	3B Hücre Kültürü
Hücre morfolojisi	Yassı, yayılmış yapı	İn vivo'ya benzer, çok katmanlı
Hücre-hücre/matris etkileşimi	Sınırlı	Gerçeğe yakın, kuvvetli
Gen/protein ekspresyonu	Değişime uğramış	Fizyolojik düzeye daha yakın

İlaç penetrasyonu	Homojen, hızlı	Difüzyon sınırlı, gradyan oluşturabilir
Sitotoksik yanıt	Genellikle daha yüksek duyarlılık	Dirençli, tümöre benzer
Oksijen ve besin gradyanı	Genellikle yok	Varlığı, hipoksi ve mikroçevreyi taklit edebilir
Yapay ortam ile benzerlik	Düşük	Yüksek
Uygulama alanları	Rutin hücre çoğaltma, basit toksisite testleri	Kanser, nöroloji, rejeneratif tıp, ilaç tarama
Etik üstünlük	Orta	Yüksek (hayvan deneylerine alternatif)

2.7.2. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Üç Boyutlu Hücre Kültürü

İlaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilme sürecinde kullanılan *in vitro* modeller, yeni moleküllerin ve formülasyonların etkinliğinin ve güvenliğinin değerlendirilmesinde kritik bir rol oynar. Geleneksel olarak yaygın şekilde kullanılan 2B hücre kültürü sistemleri, hücrelerin tek bir düzlemde ve homojen bir yüzey üzerinde büyümesini sağlayarak, hücrelerin doğal dokusal ve mekansal organizasyonunu yeterince taklit edemezler [118]. Bu sınırlama, özellikle ilaç taşıyıcı sistemlerin hücre içine alımı, biyouyumluluğu, toksisite ve terapötik etkinliği gibi parametrelerin gerçekçi olmayan sonuçlarla değerlendirilmesine neden olabilir. Dolayısıyla, 2B modellerden elde edilen veriler, klinik başarının öngörülmesinde çoğu zaman yanıltıcı olabilir. Buna karşılık, 3B hücre kültürü modelleri, hücrelerin doğal ortamlarındaki gibi hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini koruyarak, oksijen, besin ve metabolitlerin gradyanlarını oluşturabilen, ayrıca ilaçların difüzyonunu ve dağılımını *in vivo* koşullara yakın biçimde taklit eden mikroortamlar sağlar [123]. Bu özellikleriyle 3B modeller, ilaç taşıyıcıların fizyolojik koşullarda davranışlarını ve etkilerini daha doğru ve güvenilir biçimde değerlendirme imkanı sunar.

Son yıllarda, nanotaşıyıcılar, polimerik nanopartiküller, lipit bazlı taşıyıcı sistemler, mikroküreler ve hidrojel­ler gibi çeşitli ilaç taşıyıcı sistemlerin etkinliğinin ve hücre içi alımının 3B hücre kültürü modellerinde test edilmesi yaygınlaşmıştır [124]. Özellikle kanser araştırmalarında kullanılan çok hücreli tümör sferoidleri, tümör mikroçevresinin karmaşık yapısını ve heterojenliğini yansıtarak, taşıyıcı sistemlerin tümör dokusuna penetrasyonu, dağılımı ve tedavi etkinliğinin gerçekçi bir şekilde modellenmesine olanak sağlar [119].

3B hücre kültürü modellerinin klinik öncesi araştırmalarda tercih edilmesinin bir diğer önemli nedeni, ilaç direncinin ve farmakodinamik yanıtların *in vivo* koşullara daha yakın biçimde gözlemlenebilmesidir. Literatürde, 3B modellerde büyütülen hücrelerin antikanser ilaçlara karşı 2B modellerden daha dirençli olduğu ve bu direncin hücreler arası sinyalleşme, ECM ile etkileşimler ve hipoksik mikroçevre koşulları gibi faktörlerden kaynaklandığı bildirilmiştir [125]. Bu durum, 2B kültürlerde gözlemlenemeyen ilaç direnci mekanizmalarının 3B modellerde daha iyi anlaşılmasına ve daha etkili tedavi stratejilerinin geliştirilmesine olanak verir.

2.7.3. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Teknikleri

3B hücre kültürü teknikleri, hücrelerin *in vivo* doku mikroçevresine daha yakın ve fonksiyonel modeller oluşturmalarını sağlayarak, hücre­sel morfoloji, proliferasyon, farklılaşma ve hücreler arası etkileşimlerin detaylı incelenmesine olanak tanır [119], [126]. Bu teknikler, temel olarak iskele (“scaffold”) içermeyen ve iskele içeren olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. İskele içermeyen yöntemlerde, hücreler kendi kendilerine agregasyon yoluyla küresel yapılar (sferoidler) oluşturur; bu yaklaşım, hücrelerin doğal hücre-hücre etkileşimlerini ve sinyalizasyon ağlarını korumasına olanak verir [127]. Buna karşılık, iskele içeren tekniklerde biyouyumlu ve biyoparçalanır materyaller kullanılarak hücrelerin 3B yapılar oluşturmaları desteklenir, bu iskeleler, hücrelerin yapısal destek alması, ECM benzeri ortamın sağlanması ve daha kontrollü hücre­sel davranışların gözlemlenmesini mümkün kılar [119]. Her iki yaklaşım da hücrelerin *in vivo* benzeri fenotipik özellikler sergilemesini sağlamakla birlikte, kullanım alanları ve uygulama teknikleri açısından farklılık göstermektedir.

2.7.3.1. İskele İçermeyen Yöntemler

İskele içermeyen 3B hücre kültürü yöntemleri, hücrelerin herhangi bir dış destekleyici materyal kullanılmadan, kendi kendine organize olarak sferoid veya hücre agregatları oluşturmaya olanak tanır. Bu yöntemlerde temel olarak hücre-hücre etkileşimleri ön plandadır ve hücrelerin *in vivo* mikroçevresine daha yakın mimariler geliştirmesi hedeflenmektedir [118], [127]. Hücrelerin ekstraselüler matriks gibi dış faktörler olmaksızın morfolojik olarak yeniden düzenlenmesi, hücresel yanıtların daha fizyolojik bir şekilde modellenmesini sağlar. Bu yönüyle özellikle anti-kanser ilaç taramaları, toksisite analizleri ve hücre farklılaşması çalışmaları için üstünlük sunar.

a) Sıvı Kaplama (“Liquid Overlay”) Yöntemleri

Bu teknikte, hücrelerin tabakaya yapışmasını önlemek amacıyla kültür yüzeyleri hidrofobik veya hücre tutunmasını engelleyici materyallerle kaplanır. En sık kullanılan kaplama maddeleri şunlardır:

- **poli-HEMA (“poly-2-hydroxyethyl methacrylate”):** Polimer yapısı nedeniyle hücrelerin yüzeye bağlanmasını engeller. Bu durumda hücreler serbest halde agregatlar oluşturarak sferoid yapı kazanır.
- **Agaroz:** Düşük yüzey gerilimine sahip olduğu için hücre adezyonunu önler ve sferoid oluşumunu destekler.
- **Poli (N-p-vinil benzil-D-lakton amid):** Özellikle yüksek moleküler biyolojik saflık gerektiren çalışmalarda kullanılır.

Bu yöntem ucuz ve uygulanması kolaydır ancak sferoidlerin boyut kontrolü sınırlı olabilir [120], [128].

b) Asılı Damla (“Hanging Drop”) Yöntemi

Asılı damla yöntemi, hücrelerin küçük hacimli damlalar içerisinde yerçekimi etkisiyle bir araya gelip kompakt sferoid yapılar oluşturmaya sağlar. Genellikle 20–40 µL’lık hücre süspansiyonu damla şeklinde petri kabı kapağının alt yüzeyine yerleştirilir ve inkübasyon süresince ters çevrilerek sarkıtılır.

Bu yöntemin üstünlükleri:

- Homojen boyutta sferoid oluşumu,
- Hücre-hücre etkileşimlerinin iyi şekilde simülasyonu,
- Basit ve düşük maliyetli olması, olarak sıralanabilir.

Modern uygulamalarda, süperhidrofobik mikroçipler ya da çok kuyucuklu plakalar ile süreç otomatize edilmiştir [129], [130].

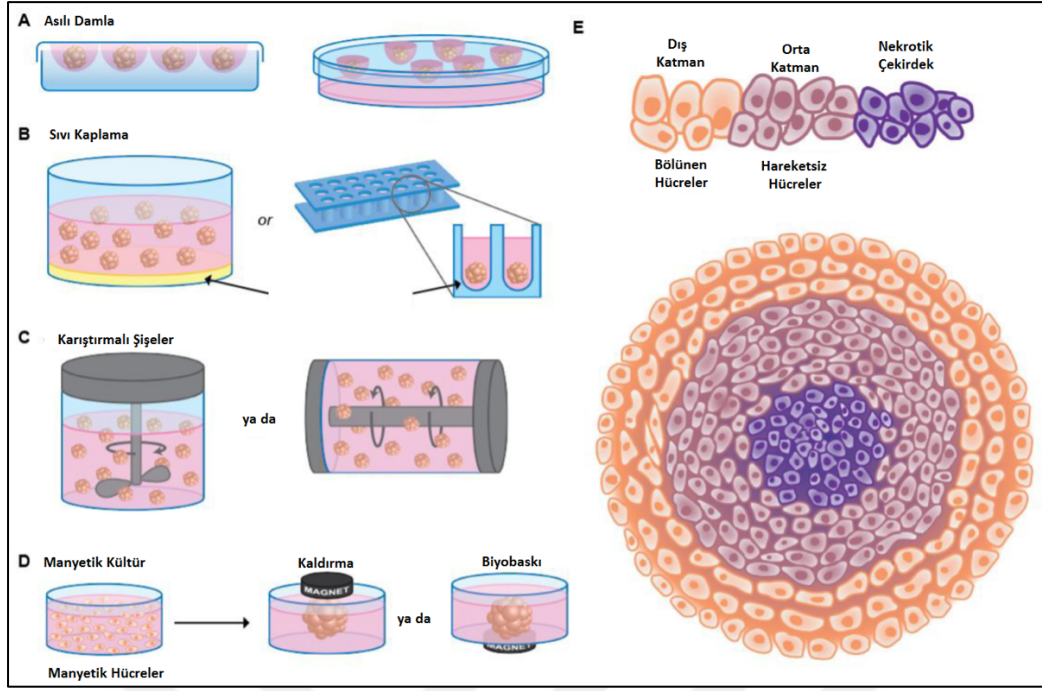
c) Biyoreaktör Sistemleri

Bu yöntemler, hücrelerin sürekli hareket ettirilen sıvı ortamlarda kültürlenmesi esasına dayanır. Mekanik karıştırma veya rotasyon sayesinde hücrelerin birbirine tutunarak sferoid formasyonu teşvik edilir.

Başlıca biyoreaktör sistemleri:

- **Döndürücü şişe (“Spinner Flask”):** Sürekli karıştırılan ortamda hücrelerin çarpışarak kümeleşmesi sağlanır. Büyük hacimli kültürler için uygundur.
- **Döner kültür sistemleri (“Rotational Wall Vessel”):** Mikro yerçekimi ortamı simüle edilir. Özellikle doku mühendisliği ve organoid çalışmaları için uygundur.
- **Kuvvet tahrikli sistemler (“Force-driven systems”):**
 - **Manyetik güç:** Hücrelere manyetik nanopartikül bağlanarak yönlendirme yapılır.
 - **Elektrik gücü:** Hücrelerin elektrostatik yüküyle yönlendirilmesi sağlanır.
 - **Akustik güç:** Ultrasonik dalgalarla hücrelerin kümelenmesi sağlanır. Yüksek hassasiyetli uygulamalar için kullanılır.

Bu sistemler hücre çoğaltımı, toksisite analizi ve ilaç testleri için gelişmiş ve kontrollü 3B ortamlar sunar [119], [131].



Şekil 2.10. İskele içermeyen yöntemler ile sferoid eldesinin şematik gösterimi ([132] numaralı kaynak referans alınarak düzenlenmiştir.).

2.7.3.2. İskele İçeren Yöntemler

3B hücre kültürü sistemlerinde iskele içeren yöntemler, hücrelerin doğal hücre dışı matriksi taklit eden yapay ya da doğal destekler üzerinde büyütülmesini mümkün kılar. Bu yapılar, hücrelerin yapışması, çoğalması, farklılaşması ve fonksiyonlarını sürdürmesi için gerekli mikroçevresel sinyalleri sağlayarak, hücre-hücre ve hücre-çevre etkileşimlerinin *in vivo* koşullara yakın biçimde gerçekleşmesini destekler [118]. İskelelerin fizikokimyasal özellikleri, biyomekanik dayanıklılığı, gözeneklilik oranı, biyoparçalanması ve yüzey kimyası hücre davranışını doğrudan etkiler [126].

a. İskele Materyalleri

İskeleler temel olarak doğal veya sentetik polimerlerden üretilir ve aşağıdaki özelliklere sahip olmalıdır:

- **Biyouyumluluk:** Hücrelerin tutunmasını ve canlı kalmasını desteklemelidir.
- **Biyobozunurluk:** Hücrelerin büyümesiyle paralel olarak kontrollü bir şekilde zaman içinde degradasyon göstermelidir.

- **Mekanik Dayanıklılık:** Hücrelerin oluşturduğu doku yapısına uygun mekanik destek sağlamalıdır.
- **Gözeneklilik:** Hücrelerin besin, oksijen alımı ve atıkların uzaklaştırılması için yeterli gözenek yapısına sahip olmalıdır.

Doğal Polimerler: Kollajen, fibrin, jelatin, hyaluronik asit, alginat ve kitosan gibi moleküller, ekstraselüler matriks bileşenlerini taklit ederek hücrelerin biyolojik olarak aktif bir ortamda büyümesini sağlar. Bu materyaller hücre tutunması için integrin reseptörleri aracılığıyla sinyal iletimini kolaylaştırır. Örneğin, kollajen, bağ dokusunun ana yapısal proteini olarak hücrelerin doğal ortamında kritik rol oynar [133].

Sentetik Polimerler: Polilaktik asit (PLA), poliglikolik asit (PGA), PLGA gibi polimerler, mekanik özellikleri ve biyoparçalanma hızları kontrol edilebilir olduğu için tercih edilir. Sentetik iskeleler, doğal polimerlere göre daha tekrarlanabilir ve modifiye edilebilir olmalarıyla üstünlük sağlar ancak biyolojik sinyaller açısından genellikle doğal polimerlere göre daha az aktiftir [122].

b. İskele Üretim Teknikleri

İskelelerin üretiminde kullanılan teknikler, yapının mikro ve makro mimarisini belirler; bu da hücrelerin iskele içindeki davranışını etkiler:

Elektroeğirme (“Elektrospinning”): Yüksek voltaj altında polimer çözeltilerinin ince lifler halinde ipliksi yapıya dönüştürülmesiyle, nanometre ölçeğinde liflerden oluşan yüksek yüzey alanlı iskeleler elde edilir. Bu yöntem, doğal ECM’nin fibröz yapısını taklit eden yapılar oluşturur ve hücre yapışması için idealdir.

Dondurarak Kurutma (“Freeze-Drying”): Polimer çözeltileri dondurulup, ardından sublimasyon ile kurutularak makroporöz yapılar oluşturulur. Bu teknikle, yüksek gözeneklilik ve hücre penetrasyonunu destekleyen iskeleler elde edilir.

3D Biyobaskı (“3D Bioprinting”): Hücre ve biyomateryal içeren biyomürekkeplerin bilgisayar kontrollü katmanlı üretimi ile doku benzeri yapılar oluşturulur. Bu yöntem, hücrelerin organizasyonunu ve mikromimariyi yüksek doğrulukla kontrol etmeye olanak sağlar.

Sol-gel Tekniği: Polimerlerin veya seramiklerin jel formunda oluşturulup katılaşması ile iskelet oluşturulmasıdır. Özellikle inorganik iskelelerde kullanılır.

Gaz Köpürtme (“Gas Foaming”): Polimer matriks içine gaz baloncuklarının enjekte edilmesiyle gözenekli yapılar meydana getirilir. Kimyasal madde kullanmadan gözeneklilik sağlanır.

Partikül Uzaklaştırma (“Particle Leaching”): Suya znebilir partiküller polimer karışımına eklenip, üretim sonrası bu partiküller yıkanarak çıkarılır ve gözenekli yapı oluşturulur [132], [134].

c. İskelelerin Fonksiyonel zellikleri

Mekanik Dayanıklılık ve Esneklik: Doku tipine bağlı olarak iskelelerin sertlik ve elastikiyet özellikleri ayarlanmalıdır. Örneğin, kemik dokusu için daha sert, yumuşak doku mühendisliği için daha elastik iskeleler tercih edilir.

Hücre Sinyalizasyonu: Doğal ekstraselüler matriks bileşenlerinin varlığı hücelere doğru biyokimyasal sinyaller sağlar; bu da hücre proliferasyonu, farklılaşması ve migrasyonu için kritiktir.

Mikroçevre Düzenleme: Gözenek boyutları ve yapısı hücrelerin iskele içerisinde homojen dağılmasını ve besin/atık değişimini sağlar [122], [132].

2.7.4. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Sistemlerinin Karakterizasyonu

3B hücre kültürü sistemlerinde kullanılan iskelelerin ve hücre-iskele etkileşimlerinin detaylı biçimde karakterize edilmesi, sistemin biyouyumluluğunu, hücresel davranışları ve genel başarısını değerlendirmek açısından önemlidir. Bu amaçla literatürde; morfolojik (SEM, TEM, CLSM), mekanik (ekme-sıkıştırma testleri), kimyasal (FTIR, XPS), yzeyssel (temas açısı ölçümleri) ve biyolojik (MTT, Live/Dead assay, immnboyama) olmak üzere çok çeşitli karakterizasyon yöntemleri kullanılmaktadır [132].

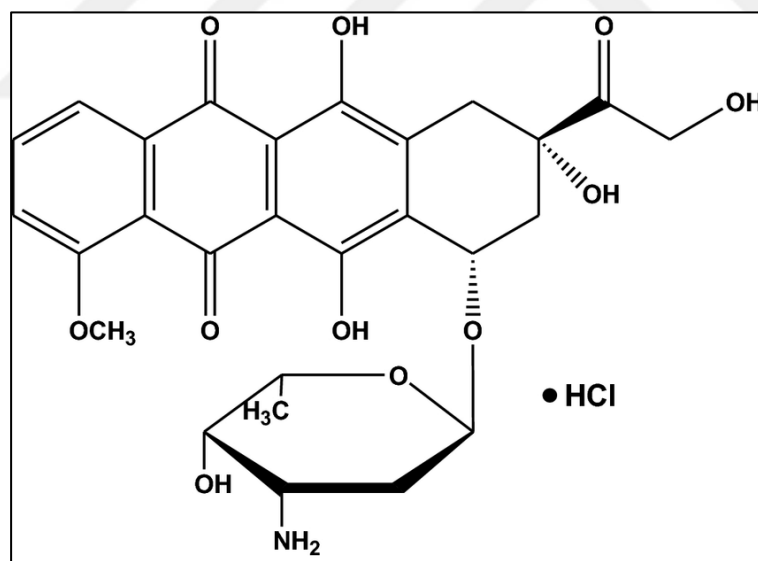
Çizelge 2.4. Sferoid yapılı hücre dizilerinin karakterizasyon yöntemleri [132].

Yöntem Türü	Teknik	Amaç
Morfolojik	SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu)	Hücre iskele yapısının yüzey morfolojisinin analizi
	TEM (Geçirimli Elektron Mikroskobu)	Hücre içi ve iskele yapı detaylarının incelenmesi
	CLSM (Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop)	Hücrelerin 3B dağılımı, canlılık durumu
Kimyasal	FTIR	Polimer yapıların kimyasal bileşiminin tayini
	XPS	Yüzey elementel bileşimi
Yüzey Özellikleri	Temas Açısı Ölçümü	Hidrofobiklik/hidrofiliklik analizi
Mekanik	Sıkıştırma/Çekme Testleri	İskele dayanımı ve elastikiyet ölçümü
Biyolojik	MTT, Alamar Blue	Hücre canlılığı, proliferasyon analizi
	Live/Dead Assay	Canlı-ölü hücre ayırımı
	İmmünboyama (IF, IHC)	Belirli proteinlerin ekspresyonu

2.8. Doksorubisin Hidroklorür

Doksorubisin, *Streptomyces peucetius* bakterisinden elde edilen, antrasiklin türevi bir antibiyotiktir ve 1960'lı yıllardan bu yana geniş spektrumlu bir kemoterapötik ilaç olarak kullanılmaktadır [6]. Daunorubisin, idarubisin ve epirubisin gibi diğer antrasiklinlerle birlikte, özellikle hematolojik maligniteler ve katı tümörlerin tedavisinde etkinliği kanıtlanmış bir ilaçtır. Doksorubisin, meme, over, mesane ve tiroit kanserleri ile yumuşak doku ve kemik sarkomlarında yaygın şekilde tercih edilmekte olup; akut lenfoblastik lösemi (ALL), akut miyeloblastik lösemi (AML), Hodgkin lenfoma ve küçük hücreli akciğer kanseri gibi hematolojik ve pulmoner malignitelerin tedavisinde de kullanılmaktadır [135].

Doksorubisinin antitümör etkisi, esas olarak DNA baz çiftleri arasına interkalasyon yoluyla replikasyon ve transkripsiyonun inhibisyonuna dayanır. Ayrıca topoizomera II enzimini inhibe ederek DNA kırıklarına ve apoptoz indüksiyonuna yol açar [5]. Demir iyonları ile kompleks oluşturarak serbest radikal üretimine neden olması, oksidatif stres aracılığıyla DNA hasarını artırır. Bu mekanizma, tedavi etkinliğini artırmakla birlikte kardiyotoksisite gibi ciddi yan etkilere de neden olabilmektedir. Bu nedenle, doksorubisinle kombine tedavilerde “dexrazoxane” gibi demir şelatörleri, oksidatif hasarı sınırlamak amacıyla kullanılabilir [137].



Fizikokimyasal Özellikleri

56

amino şeker olan daunosamin içerir. Bu yapısal özellikleri, DH'nin hem lipofilik hem de hidrofilik karakter göstermesini sağlar [6].

Suda çözünürlüğü oldukça iyidir; özellikle hidroklorür formu yaklaşık 50 mg/mL'ye kadar çözünürlük gösterebilir. pKa değeri yaklaşık 8.2'dir. Bu değer, molekülün fizyolojik pH'da hem iyonize hem de noniyonize formlarda bulunabileceğini ve bu durumun hücre zarından geçişine etki edebileceğini gösterir. Doksorubisin, 480–500 nm dalga boylarında maksimum absorpsiyon gösterir ve bu özelliği, özellikle UV-Vis spektrofotometrisi ile kantitatif analiz yapılmasını sağlar [136].

Ayrıca, yüksek reaktiviteye sahip karbonil grupları ve aromatik halkaları, molekülün DNA baz çiftleri arasına interkale olmasına ve reaktif oksijen türleri üretmesine olanak tanır. Bu özellikleri, antineoplastik etkisinin yanı sıra toksisite profili üzerinde de önemli rol oynar. Kristal formda stabilitesini koruyabilse de sulu çözeltilerde ışık ve oksijen varlığında bozunmaya uğrayabilir. Bu nedenle hazırlanan çözeltiler genellikle ışıktan korunarak saklanır ve kısa sürede kullanılır [5].

Çizelge 2.5. Doksorubisin HCl'nin fizikokimyasal özellikleri [139].

Özellik	Açıklama
IUPAC Adı	(8S,10S)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-8-glycoloyl-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-1-methoxy-5,12-naphthacenedione
Kimyasal Formül	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁
Moleküler Ağırlık	543.52 g/mol
Görünüm	Kırmızımsı toz
Erime Noktası	Yaklaşık 205–210 °C
Suda Çözünürlük	1–5 mg/mL
LogP (n-oktanol/su)	-0.5 - 1.3

pKa Değeri	~ 8.3
UV Emme Maksimumu (λ_{max})	480-500 nm (etanol)
Stabilite	Işığa ve düşük pH değerlerine hassastır.

Farmakokinetik Özellikleri

Doksorubisin intravenöz (IV) yolla uygulandığında, farmakokinetik profili üç kompartmanlı modele uygunluk gösterir. İlaç, uygulamayı takiben hızla plazmadan dağılarak başta karaciğer, kalp, böbrekler ve kemik iliği olmak üzere birçok dokuda birikir. Dağılım hacmi (Vd) genellikle geniştir ve 800–1200 L/m² civarında bildirilmiştir, bu da dokulara yaygın dağılımı destekler [5].

Plazma proteinlerine bağlanma oranı yaklaşık %70–75'tir. Bu bağlanma, ilacın biyoyararlanımı ve doku penetrasyonu üzerinde etkili olabilir. Doksorubisin, karaciğerde sitokrom P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilir; özellikle aldo-keto redüktazlar aracılığıyla doksorubisinol adlı aktif ve kardiyotoksik bir metabolite dönüşür [6].

İlacın eliminasyonu öncelikle safra ve fekal yolla gerçekleşir. Doksorubisin uygulamasından sonra verilen dozun yaklaşık %40'ı ilk 5 gün içinde feçesle atılır. Böbrek yoluyla atılım ise genellikle %5–10 seviyesindedir. Terminal eliminasyon yarı ömrü yaklaşık 20–48 saat arasında değişmektedir; bu süre bireyler arası metabolik farklılıklar ve dağılım hacmiyle ilişkilidir [136].

Liposomal doksorubisin formülasyonlarında dolaşım süresinin uzadığı ve ilacın tümör bölgesine daha hedeflenmiş bir şekilde ulaşmasının sağlandığı bildirilmiştir. Bu formülasyonların, klasik doksorubisin formuna kıyasla daha düşük pik plazma konsantrasyonu ile sistemik toksisiteyi azaltırken, tümör dokusunda daha uzun süreli birikim sağladığı belirtilmiştir [140].

Yan Etkileri

Doksorubisin, etkili bir antikanser ilaç olmasına rağmen, çeşitli organ ve sistemleri etkileyen belirgin yan etkilere sahiptir. Bu yan etkiler, tedavi süresince hastanın yaşam kalitesini önemli ölçüde düşürebileceği gibi, tedavi sürecinin devamını da sınırlayabilmektedir. Yan etkilerin şiddeti, genellikle uygulanan toplam kümülatif doza, hastanın yaşına, genel sağlık durumuna ve eş zamanlı kullanılan diğer kemoterapötik ilaçlara bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Doksorubisin özellikle kardiyotoksik etkileri ile öne çıkmakta olup, bu etki ciddi klinik sonuçlara yol açabileceğinden hastaların tedavi sürecinde kardiyak fonksiyonları yakından izlenmelidir. Bunun yanı sıra hematolojik, gastrointestinal, dermatolojik ve immün sistem kaynaklı birçok yan etki de gözlemlenebilir. Aşağıda, literatürde en sık bildirilen yan etkiler özetlenmiştir:

Çizelge 2.6. Doksorubisinin yan etkileri [5], [6], [141].

Yan Etki Türü	Belirtiler / Açıklama	Notlar
Hematolojik	Lökopeni, nötropeni, anemi, trombositopeni	Doza bağlı; genellikle geçici
Gastrointestinal	Bulantı, kusma, mukozit, stomatit, iştahsızlık	Antiemetiklerle önlenabilir
Kardiyotoksisite	Kümülatif dozla ilişkili konjestif kalp yetmezliği, aritmi	En ciddi yan etkilerden biridir; kümülatif doz sınırı (~450–550 mg/m ²)
Alerjik Reaksiyonlar	Döküntü, kaşıntı, anafilaksi nadiren	Liposomal formda daha az sıklıkta
Alopeci (Saç Dökülmesi)	Neredeyse tüm hastalarda gözlenir	Genellikle geçicidir
Renal/Hepatik Toksisite	Karaciğer enzimlerinde yükselme, renal fonksiyon bozukluğu	Hepatik yetmezlikte dikkatli kullanılmalı
Enjeksiyon Bölgesi	Ekstravazasyon durumunda doku nekrozu	İnfüzyon dikkatle yapılmalı
İmmünsüpresyon	Artmış enfeksiyon riski	Özellikle nötropenik dönemlerde

İkincil Riski	Malignite	Özellikle lösemi riski (uzun süreli kullanım sonrası)	Nadir ama ciddi bir risk
---------------	-----------	---	--------------------------

2.9. Borneol

Borneol, (C₁₀H₁₈O) doğal kaynaklı, uçucu bir monoterpenoid alkoldür. Kimyasal olarak bisiklik bir yapıya sahip olup, iki ana stereoizomer formda (endo-borneol ve ekzo-borneol) bulunabilir. Borneol, özellikle *Dryobalanops aromatica*, *Blumea balsamifera*, *Artemisia* spp., *Valeriana* spp. gibi bitki türlerinden elde edilmektedir.

Geleneksel Çin tıbbında yüzyıllardır kullanılan borneol, “Bing Pian” veya “Long Nao” olarak adlandırılır. Bu geleneksel kullanım alanı, borneolün merkezi sinir sistemi üzerindeki etkileriyle ilişkilidir. Özellikle, KBB geçirgenliğini geçici olarak artırabilme yeteneği nedeniyle, günümüzde formülasyonlara penetrasyon artırıcı olarak ilave edilmektedir. Yapılan araştırmalarda borneolün, sıkı bağlantı (“tight junction”) proteinlerini (claudin-5, occludin gibi) modüle ederek ve trans-selüler transportu uyarak, ilaçların KBB’yi aşmasını kolaylaştırabileceği bildirilmiştir. Bu özelliği sayesinde özellikle beyin tümörlerinin tedavisinde kullanılan ilaçların hedefe ulaşmasını kolaylaştırmak amacıyla çeşitli nano-taşıyıcı sistemlerde de değerlendirilmiştir.

Borneol aynı zamanda lipofilik yapısı, düşük moleküler ağırlığı ve uygun logP değeri (~2.7) sayesinde biyolojik membranlar üzerinden pasif difüzyonla geçebilir; bu özellikleri, onu farmasötik formülasyonlar açısından cazip bir taşıyıcı ajan haline getirmiştir [5], [137], [140].

Çizelge 2.7. Borneolün fizikokimyasal özellikleri [140].

Özellik	Açıklama
IUPAC Adı	(1R)-1,7,7-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-ol
Moleküler Formül	C ₁₀ H ₁₈ O
Moleküler Ağırlık	154.25 g/mol

Fiziksel Form	Katı, beyaz kristal
Erime Noktası	~208–210°C
LogP (Lipit/Su Dağılım Katsayısı)	2.75 – 3.25
Suda Çözünürlük	Düşük
Farmakolojik Etkileri	Anti-inflamatuar, analjezik, antikanser, nöroprotektif

Borneol, doğal bir monoterpenoid bileşik olarak *in vitro* hücre kültürü çalışmalarında membran geçirgenliğini artırdığı, ilaçların hücre içi alımını kolaylaştırdığı ve hücrel yanıtı modüle ettiği gösterilmiştir [13].

Borneolün kullanım alanları aşağıda özetlenmiştir:

Membran geçirgenliğinin artırılması: Borneol, hücre membranında lipit tabakasının akışkanlığını artırarak özellikle KBB modellerinde ilaç moleküllerinin penetrasyonunu kolaylaştırdığı *in vitro* çalışmalarda gösterilmiştir.

İnflamasyon ve oksidatif stres etkileri: Hücre kültürlerinde borneol, anti-inflamatuar ve antioksidan özellikleri sayesinde oksidatif stres modellerinde hücre canlılığını destekleyerek koruyucu etkiler göstermektedir.

İlaç taşıyıcı sistemlerde kullanımı: Borneol, nanopartiküller ve lipozom formülasyonlarında hedefleyici olarak kullanılmış, hücre içi hedeflemeyi ve etkin madde salınımını optimize etmek için *in vitro* olarak test edilmiştir.

Bu özellikleri nedeniyle borneol, hem hücre kültürü çalışmalarında hem de nanotaşıyıcı sistemlerin geliştirilmesinde *in vitro* modellerde sıkça tercih edilen bir yardımcı madde olarak kullanılmaktadır [12], [13], [142].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Çizelge 3.1. Kullanılan maddeler ve markaları.

Madde / Materyal	Marka
Asetonitril	Sigma, ABD
Diyaliz Membranı	Sigma, ABD
DMEM	Sigma, ABD
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Serva, Almanya
Diklorometan (DCM)	Merck, Almanya
Doksorubisin HCl	DZD Heze Pharmaceutical, Çin
Etanol	Sigma, ABD
Fosfat Tamponu Tuzu (PBS)	Biochrom AG, Almanya
Fetal Sığır Serum (FBS)	Biological Industries, İsraill
Matrigel®	Corning, ABD
Metanol	Merck, Almanya
MTT(Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma, ABD
o-Fosforik Asit	Sigma, ABD
Penisilin-Streptomisin	Biowest, ABD
PLGA (50:50) (Resomer RG 503 H) (MA: 24.000-38.000)	Sigma, ABD
Pluronic F-127	Sigma, ABD
PVA (MA: 30-70.000)	Sigma, ABD
Poli-Hema	Sigma, ABD
Thincert (0.4µ)	Grenier Bio One, Avusturya
Tripan Mavis Solüsyonu	Sigma, ABD

U87 Hücre Hattı	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
RG2 Hücre Hattı	Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (ATCC), ABD
WST-1	Roche, Almanya

3.1.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

Çizelge 3.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar.

Çok Modlu Mikroplaka Okuyucu	SpectraMax® ID3, ABD
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Variomag Telesytem, Almanya
Elisa Mikro Plaka Okuyucu	Molecular Devices, ABD
Hassas Terazı	Mettler Toledo, İsviçre
Homojenizatör	Ultra Turrax T-18 IKA, Almanya
HPLC cihazı	Agilent 1200, ABD
Isıticılı Manyetik Karıştırıcı	IKA, Almanya
Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Mikroskop	Nikon Eclipse TS2
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Santrifüj Aleti	Hermle Z383K, Almanya
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	FEI Quanta 400 FEG
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonikatör Cihazı	Bandelin, Almanya
UV Spektrofotometre	Shimadzu, Japonya
Vorteks	IKA, Almanya

3.2. Dokсорubisin HCl'nin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Tez çalışmaları kapsamında, DH miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır (142). Kromatografik koşullar Çizelge 3.3'te belirtilmiştir.

Çizelge 3.3. Dokсорubisin HCl'nin HPLC ile miktar tayininde kullanılan kromatografik koşullar [143].

Koşullar	Özellikler
Mobil faz	Asetonitril:Su (30:70/v:v) pH:2,6
Enjeksiyon Hacmi	50 mL
Akış hızı	1 mL/dk
Dedektör	Floresan dedektörü
Dalga boyu	Eksitasyon (uyarma) 470 nm & Emisyon(ışılma) 555 nm
Kolon	InertSustainSwift C18 HPLC Column, 5 µm, 125 x 4.6 mm
Sıcaklık	35 °C
Analiz Süresi	6 dk

3.3. Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak olan maddenin tayin yöntemini belirlerken, yöntemin belirlenen koşullarda doğru, özgün ve tekrarlanabilir olduğunu göstermek amacıyla yapılan sistematik çalışmalardır[144]. Validasyon çalışması, geliştirilen analitik yöntemin, kalite kontrolünde kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini ortaya koymak amacıyla yapılmaktadır. HPLC metodunun doğruluğu için yapılan çalışmalarda aşağıdaki parametreler yorumlanmıştır;

- Doğrusallık
- Doğruluk

- Kesinlik
- Günler arası tekrarlanabilirlik
- Duyarlılık
- Stabilit [144].

Doğrusallık (“Linearity”)

Analitik yöntemle yapılacak madde tayinlerinde, elde edilen sonuçların analit konsantrasyonu ile orantılı olması yöntemin doğrusallığını ifade eder. DH’nin HPLC tayininde doğruluk parametresinin değerlendirilmesi için kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Bunun için asetonitril:su (30:70) ç       olarak kullanılarak, 1000 µg/mL konsantrasyonunda DH stok ç       hazırlanmıştır. Daha sonra gerekli seyreltmeler yapılarak 0,5, 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100 µg/mL konsantrasyonda ç       hazırlanmış ve Çizelge 3.3’te belirtilen koşullarda HPLC analizi yapılmıştır. Analiz sonuçlarına g         konsantrasyona karşı pik alanları kullanılarak, kalibrasyon doğrusu çizilmiş ve korelasyon katsayısı hesaplanmıştır [144].

Doğruluk (“Accuracy”)

Analiz için kullanılan analitik yöntemle hazırlanan numunelerden elde edilen sonuçların, gerç     (veya kabul edilen standart) değ       olan yakınlığı doğruluk olarak tanımlanır. Hazırlanan numunede bulunan yardımcı maddeler, analiz esnasında etkin maddenin absorbands değ       etkileyebilmektedir. Bu sebeple HPLC ile DH miktar tayini i       kullanılan koşullar ile d      , orta ve y       konsantrasyonda (2,5, 10, 100 µg/mL) 6 numune hazırlanmış ve daha sonra elde edilen konsantrasyon verilerinden, % geri kazanım değ       hesaplanmıştır [144].

Kesinlik (“Precision”)

Bir yöntemin birbirini takip eden          arasındaki yakınlığının derecesini ifade eder. Genellikle standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısı (CV) ile değ        . Aynı spesifik analiz koşulları altında yapılan bağımsız ç         birbirine olan uyumunu g      .

Tekrarlanabilirlik (“Repeatability”)

Yöntemin tekrarlanabilirliğini değerlendirmek amacıyla, aynı konsantrasyonda hazırlanan örnekten, aynı analiz koşulları altında ardışık olarak altı kez ölçüm yapılmış; elde edilen pik alanlarının ortalaması ($\bar{X}$), standart sapması (SS) ve varyasyon katsayısı (VK) hesaplanmıştır [144].

Özgüllük (“Specifity”)

Analiz edilen maddeyi, spesifik olarak tayin etme yönteminde özgüllük denir [144]. İlaç yükleme etkinliğinin tayini için, ilaç içeren ve ilaç içermeyen formülasyonlardan, *in vitro* çalışmalarında kullanılacağı formlarında hazırlanmış ve HPLC kromatogramları alınmıştır. Bu sayede formülasyonda yer alan etken madde (DH) ve yardımcı maddelerin (PLGA, organik çözücüler, borneol, PBS) HPLC kromatogramları incelenerek, aynı alıkonma zamanlarında absorbands piki verip vermediği incelenmiştir.

Duyarlılık (“Sensitivity”)

- **Miktar Tayini Sınırı (“Limit of Quantitation”, LOQ)**

Analitik yöntemin, belirlenen koşullar altında analiz edilen maddeyi kabul edilebilir düzeyde doğruluk ve kesinlikle kantitatif olarak belirleyebildiği en düşük konsantrasyon, yöntemin kantitatif tayin sınırı (LOQ – Limit of Quantitation) olarak tanımlanır. Bu sınır, genellikle sinyal/gürültü (S/N) oranının 10:1 olduğu konsantrasyon düzeyi ile ifade edilir. LOQ, yöntemin duyarlılığını göstermesi açısından kritik bir parametredir ve validasyon sürecinde doğruluk ve kesinlik çalışmaları ile desteklenmelidir [145].

- **Saptama Sınırı (“Limit of Detection”, LOD)**

Analizi yapılan maddenin yalnızca varlığının saptanabildiği en düşük konsantrasyon, yöntemin saptama sınırı (LOD – “Limit of Detection”) olarak tanımlanır. Bu sınır genellikle sinyal/gürültü (S/N) oranının 3:1 olduğu konsantrasyon düzeyi ile ifade edilir [145].

Stabilite (“Stability”)

Analiz edilen örnekte bulunan etkin maddenin veya analiz edilen bileşiğin, belirli koşullar altında kimyasal olarak değişmeden kalma süresini ifade eder. Stabilite çalışmaları, örneklerin analiz öncesinde, sırasında ve sonrasında belirli sürelerle saklandığında analitik sonuçların güvenilirliğini koruyup korumadığını değerlendirmek amacıyla gerçekleştirilir [146]. DH çözeltisinin stabilite tayini 0., 24. ve 48. saatlerde gerçekleştirilmiştir.

3.4. Nanopartikül Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Tez çalışması kapsamında, ilaçların KBB’yi geçmesi için sıklıkla tercih edilen taşıyıcı sistemlerden biri olan polimerik (Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA)) nanopartikül formülasyonları tasarlanmıştır.

Formülasyonların hazırlanmasında S/Y/S (Su/Yağ/Su) emülsiyon - çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır [147]. Nanopartikül formülasyon çalışmalarında en temel adımlardan biri uygun hazırlama yönteminin belirlenmesidir. Bu amaçla, farklı parametreler kullanılarak ön formülasyon çalışmaları yapılarak deneme formülasyonları hazırlanmış (Çizelge 3.4); elde edilen partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve üretimin tekrarlanabilirliği değerlendirilerek en uygun yöntem (A6) seçilmiştir (Çizelge 3.4).

Nanopartikül formülasyonlarının hazırlanması için öncelikle ilk su fazı oluşturulmuştur. Bunun için, Çizelge 3.4’den görüleceği üzere, % 0.1 PVA içeren sulu çözeltiye (0.5 mL) DH (0.2, 0.5 veya 1 mg) ilave edilerek çözülmüştür. Daha sonra yağ fazının oluşturulması için PLGA polimeri (20, 30 veya 50 mg) ve 3 mg borneol, 2.5 mL etilsetat veya DCM içerisinde çözülmüştür. Su fazı yağ fazının üzerine eklenerek 1 dk vorteks uygulanmış ve ilk emülsiyon (S/Y) elde edilmiştir. Daha sonra elde edilen bu emülsiyon ikinci su fazı olan %1’lik PVA çözeltisine (5 veya 8 mL) ilave edildikten sonra, 5 veya 15 dakika homojenizatör (Ultraturrax, 15000 rpm) uygulamasıyla S/Y/S çoklu emülsiyon oluşumu sağlanmıştır. Oluşan emülsiyon daha sonra 10 mL % 0.32’lik PVA çözeltisine ilave edilerek seyreltilmiş ve 800 rpm’de magnetik karıştırıcıda 4 saat karıştırılarak organik çözücünün buharlaşması ve nanopartiküllerin eldesi gerçekleştirilmiştir. İşlem

sonunda, elde edilen nanopartiküller santrifüj işlemi ile toplanmış ve üç kez ultrasaf su ile yıkanmıştır. Sonuç formülasyona ait parametreler Çizelge 3.5’te sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Ön formülasyon çalışmalarında kullanılan nanopartikül formülasyon parametreleri.

Kod	İlk su fazı (%0.1 PVA,suda) (mL)	Organik Çözücü	DH Mik-tarı (mg)	İkinci Su Fazı (%1 PVA, suda) (mL)	PLGA Miktarı (mg)	Ultra-turrax Süre (dk)	Sonuç
A1	0.5	Etil Asetat	0.2	5	50	5	< 200 nm partikül büyüklüğü Düşük hazırlama verimi (%20)
A2	0.5	Diklorometan	1	5	50	5	Düşük fiziksel stabiliteye sahip emülsiyon oluşumu
A3	0.5	Etil Asetat	1	8	30	5	> 200 nm partikül büyüklüğü
A4	0.5	Diklorometan	1	8	30	15	> 200 nm partikül büyüklüğü
A5	0.5	Etil Asetat	0.2	8	20	15	< 200 nm partikül büyüklüğü Düşük hazırlama verimi (%25)
A6	0.5	Etil Asetat	0.5	8	20	15	< 200 nm partikül büyüklüğü Yüksek hazırlama verimi (%80)

Çizelge 3.5. Sonuç formülasyonun hazırlanması için kullanılan formülasyon parametreleri.

Bileşen/İşlem	Parametre	Parametre
İlk Su Fazı	Yüzey Etkin Madde	PVA (% 0.1, suda)
	Hacim	0.5 mL
	Etkin Madde Miktarı	0.5 mg
Yağ Fazı	Polimer Miktarı	20 mg
	Borneol Miktarı	3 mg

S/Y Emülsiyon Oluşumu	Vorteksleme işlemi	1 dk
İkinci Su Fazı	Yüzey Etkin Madde	PVA (% 1, suda)
	Su Faz Hacmi	8 mL
S/Y/S Emülsiyon Oluşumu	Ultraturrax Karıştırma Hızı	15.000 rpm
	Ultraturrax Karıştırma Süresi	15 dk
Seyreltme çözeltisi	Yüzey Etkin Madde	PVA (% 0.32, suda)
	Hacim	10 mL
Organik Çözücü Uçurma	Manyetik Karıştırıcı Çalışma Hızı	800 rpm
	Manyetik Karıştırıcı Çalışma Süresi	4 saat

3.5. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

3.5.1. Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyel Tayini

Nanopartiküllerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyel değerleri Malvern Zetasizer Nano Series ZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan formülasyonlar %20 oranında (1:4) ultrasaf su ile seyreltildikten sonra polistiren küvetlere (12,5 × 12,5 × 45 mm) alınarak cihaz yardımıyla partikül büyüklüğü ölçülmüştür. Benzer şekilde, zeta potansiyel ölçümleri için seyreltme yapılmış formülasyondan yaklaşık 800 µL alınarak uygun zeta potansiyeli ölçüm küvetlerine (DTS1070) yerleştirilmiş ve analizler aynı cihaz ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan ölçümler üç defa tekrar edilmiştir.

3.5.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Elde edilen formülasyonların yüzey ve şekil özelliklerinin belirlenmesi için SEM cihazı kullanılmıştır. Hazırlanan numuneler, karbon grid üzerine tespit edilmiş ve 3 mm Au-Pd kaplama ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiştir. Görüntüleme QUANTA 400F Field Emission SEM cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. İlaç Yükleme Çalışmaları

İlaç yükleme çalışmaları ile enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve yükleme kapasitesi (%LC) belirlenmiştir. Bu amaçla, nihai formülasyon elde edildikten sonra formülasyondan 1 mL alınarak ependorf tüplere transfer edilmiştir. Numuneler, 14.000 rpm’de 20 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Elde edilen nanopartiküller ultra saf su ile üç kez yıkanmış ve her yıkama sonrasında yeniden santrifüj edilmiştir.

Yıkama işlemlerinin ardından nanopartikül süspansiyonu içeren tüplere 1 mL DMSO ilave edilmiş ve %70 güçte çalışan bir ultrasonik prob ile muamele edilerek polimer matriksin parçalanması ve ilacın serbest kalması sağlanmıştır. Elde edilen çözelti 1:9 oranında mobil faz ile seyreltilmiştir. Son olarak, seyreltilmiş çözelti 0.45 µm gözenekli (politetrafloroetilen/PTFE) şırınga filtresinden geçirilerek süzölmüş ve HPLC analizine tabi tutulmuştur (142).

Enkapsülasyon etkinliği ve yükleme kapasitesi değerleri aşağıdaki eşitliklere göre hesaplanmıştır;

Denklem 1. Yükleme Kapasitesi [148].

$$\%Yükleme\ Kapasitesi\ (\%LC) = \frac{\text{Ölçülen doksorubisin miktarı}(\mu g)}{\text{Polimer miktarı}(\mu g)} \times 100$$

Denklem 2. Enkapsülasyon Etkinliği [148].

$$\%Enkapsülasyon\ Etkinliği\ (\%EE) = \frac{\text{Ölçülen doksorubisin miktarı}(\mu g)}{\text{Başlangıçtaki doksorubisin miktarı}(\mu g)} \times 100$$

3.5.4. *In Vitro* Salım Çalışmaları

DH yüklü PLGA nanopartiküllerin *in vitro* salım değerlendirmesini yapmak için “Diyaliz Membran Yöntemi” kullanılmıştır [149]. Salım ortamı olarak, pH 7,4 fosfat tamponu

(Phosphate-buffered saline PBS) kullanılmıştır. Analiz için 15 mL’lik polipropilen tüplere, 10 mL pH 7,4 PBS eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan formülasyondan 1 mL alınarak diyaliz membrana (MW 14000 cut off) yerleştirilmiş ve iki ucu kapatıldıktan sonra, PBS içeren tüplere aktarılmıştır. Hazırlanan düzenek, 37 ± 2 °C’ de 50 rpm hızında çalışmakta olan yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0,25, 0,5, 1, 2, 5, 8, 12, 24 ve 48. saat) 1 mL örnek alınmış ve ortama 1 mL taze ortam eklenmiştir. Alınan örnekler HPLC ile analiz edilmiştir.

3.6. Hücre Kültürü Çalışmaları

3.6.1. İki Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları

Hazırlanan formülasyonların *in vitro* ortamda sitotoksitelerinin değerlendirmeleri için öncelikle 2B hücre kültürü çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, insan (U87) ve fare (RG2) glioblastoma hücre hattı kullanılmış ve MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) testi gerçekleştirilmiştir. MTT testi, hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* sitotoksite testidir. Canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından indirgenen MTT, çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen absorbans, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır [150], [151].

MTT çalışmalarından önce DH’nin U87 ve RG2 hücre hatları için IC₅₀ değeri belirlenmiştir [152]. Bunun için 2,95, 3,9, 7,8, 15,6, 31,25, 62,5, 125, 250 µM konsantrasyonlarında DH çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra 96 kuyucuklu plakalara her kuyucukta 5000 hücre/100 µL olacak şekilde hücreler ekilmiş ve farklı konsantrasyondaki ilaç çözeltileri ilave edilmiştir. Plakalar 24 saat inkübasyona tabi tutulduktan sonra absorbans değerleri Spectramax ID3 cihazı ile okunarak IC₅₀ değerleri tespit edilmiştir.

Belirlenen IC₅₀ değerleri göz önünde bulundurularak, nanopartikül formülasyonları üzerinde MTT analizi yapılmıştır. Bunun için, %10 fetal bovin serum FBS ve 100 U/mL penisilin, 100 µL (%1 Pen/Strep) içeren DMEM (Dulbecco’s Modified Eagle Medium) besiyeri olarak kullanılmıştır. U87 ve RG2 hücreleri birbirinden farklı 96 kuyucuklu plakalara ekilmiş ve 100 µL besi yeri eklenerek, 37 °C’de %5 CO₂ içeren inkübatörde bir

gece bekletilmiştir. Hazırlanan formülasyon grupları plakalara belirlenen konsantrasyonlarda eklenerek, DMEM ile seyreltilmiştir. Hazırlanan plakalar 24, 48 ve 72. saat süre ile inkübe edilmiş ve süre sonunda her kuyucuğa 20 µL MTT eklenerek 4 saat inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda kuyucuklardan MTT uzaklaştırılmış ve formazan kristallerini çözmek için 80 µL DMSO eklenmiştir. Daha sonra plakalar Spectramax ID3 cihazına yerleştirilerek 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri elde edilmiştir [150], [151].

3.6.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları

Elde edilen formülasyonların sitotoksik etkilerinin detaylı değerlendirilebilmesi için 3B hücre kültüründe tümör sferoidler üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir.

Sferoidlerin oluşturulmasında poli-Hema ve Matrigel® bileşenlerinden yararlanılarak polimer esaslı iskele yöntemi kullanılmıştır [153]. Poli-Hema, hücrelerin 96 kuyucuklu yuvarlak tabanlı plakaların yüzeyine yapışmasını önlemek amacıyla kullanılmaktadır. Bu çalışma için 1,2 gram poli-Hema 40 mL %95'lik etanol içerisinde çözülmüş ve 96 kuyucuklu plakalara her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde eklenmiştir. Daha sonra kuyucuklarda bulunan etanolün uçması için plakalar ağzı açık bir şekilde 24 saat steril koşullar altında kabin içinde bekletilmiştir. Etanolün uçurulmasından sonra, plakaların ağzı kapatılarak, karanlık bir ortamda kullanım anına kadar steril koşullarda bekletilmiştir [153], [154]. Matrigel®, hücrelerin doğal ortamını taklit etmek amacıyla kullanılan, zengin bir ekstraselüler matriks (ECM) takviyesidir. Bu sayede hücrelerin üç boyutlu bir yapı içerisinde tutunmasını, çoğalmasını ve doğal halini sürdürebilmesini sağlar [154]. Sferoid yapıların oluşturulması amacıyla U87 ve RG2 hücreleri için ayrı Poli-Hema kaplı 96 kuyucuklu plakalar kullanılmış ve her bir kuyucukta %3 (h/h) Matrigel® ve 5000 hücre /200 µL olacak şekilde hücre ekimi yapılmıştır. Ekme işleminden sonra 1000 rpm'de 10 dakika süre ile santrifüj işlemi yapılmış ve daha sonra plakalar 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatöre yerleştirilmiştir. Sferoid oluşumu için inkübasyon süresi 10 gün olarak belirlenmiş ve bu süre zarfında 2 günde bir besi yeri değiştirilmiştir. 10. günün sonunda sferoidlerin yeterli büyüklüğe geldiği tespit edilerek belirlenen konsantrasyonda formülasyonlar sferoidlere uygulanmıştır. Bu işlemde WST-1 kullanılarak hücrelerin

canlılığı incelenmiştir. Bu esnada gerekli görüntüler alınmış ve Spectramax ID3 cihazı ile absorbans değerleri ölçülmüştür.

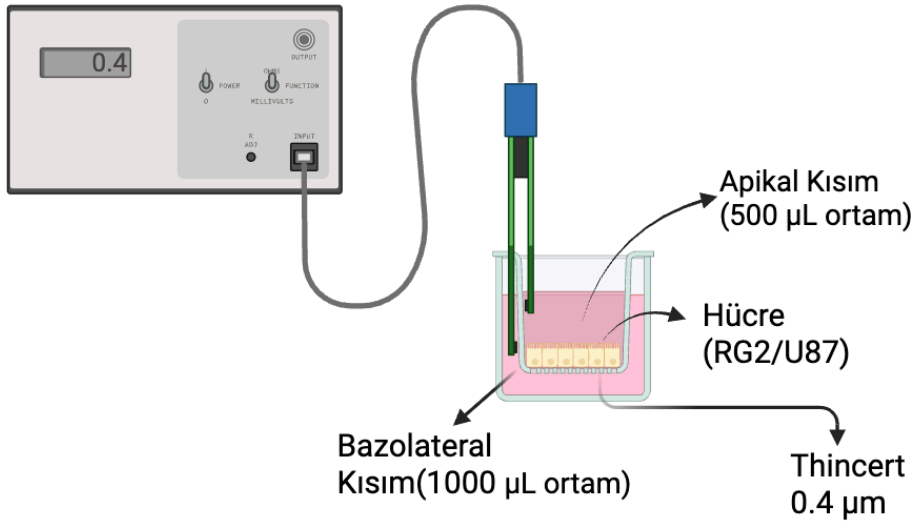
3.6.3. Hücre Kültüründe Permeabilite Çalışmaları

In vitro permeabilite çalışmalarında hücre kültür ortamı olarak 100 µL, %10 FBS ve 100 U/mL penisilin içeren DMEM kullanılmıştır. Permeabilite çalışmalarında 12 kuyucuklu plaka (113.1 mm² yüzey alanı) ve 0.4 µm çaplı şeffaf “thincert” membran kullanılmıştır. Plakalardaki her bir kuyucuğa 15x10⁴ hücre olacak şekilde RG2 veya U87 hücreleri ekilmiş ve daha sonra 37 °C’de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyon işlemi yapılmıştır. Hücre ekiminden 15 gün sonra, Millicell® ERS yardımıyla transepitelyal direnç (TEER) ölçümü yapılmış ve direnç değerlerinin 200-250 Ωcm² olduğu görüldükten sonra formülasyon grupları uygulanmıştır. Bunun için PBS ortamında dağıtılmış olan formülasyon gruplarından 0.5 mL alınarak, hücre tek tabakasının apikal yüzeyine, 1 mL PBS ise hücre tek tabakasının bazolateral yüzeyine eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan plakalar, 30 rpm hızındaki çalkalayıcıya yerleştirilmiş ve 37 °C’de 2 saat inkübe edilmiştir. Bu işlem sonrası bazolateral taraftan alınan örneklerdeki ilaç miktarı HPLC ile tespit edilmiştir.

Elde edilen sonuçlardan DH için görünür permeabilite sabiti (Papp,cm/s) ile hesaplanmıştır [155], [156], [157].

Denklem 3. Permeabilite Sabiti Denklemi [157].

$$P_{app} = \frac{dQ/dt}{A.C_o}$$



Şekil 3.1. *In vitro* permeasyon çalışması için kullanılan Thincert® yöntemi ve TEER ölçüm cihazının şematik gösterimi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Günümüzde, klasik tedavi yöntemlerinden tümörün çıkarılması (cerrahi), radyasyon tedavisi ve kemoterapi gibi standart yöntemlerin uygulanması sonucu GBM hastaların ortalama sağkalım sürelerinde istenen düzeyde iyileşme sağlanamamakta ve hastaların %50'sinden fazlası ilk bir yıl içinde olmak üzere tamamı kaybedilmektedir. Terapötik etkin maddelerin tümöre spesifik olmamaları, buna bağlı görülen ciddi yan etkiler ve KBB nedeniyle tümöre etkin miktarda taşınamamaları konvansiyonel tedavilerde sıklıkla görülen problemlerdir ve bahsedilen düşük başarı oranlarının ana sebeplerini oluşturmaktadır. Bu problemlerin üstesinden gelmek için yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemler taşıdıkları ilacın düşük çözünürlük, düşük penetrasyon gibi özelliklerini iyileştirir ve ayrıca hedeflendirilmiş tedavi imkanı sunar.

Nanopartiküller, terapötik ve diagnostik ilaçların hedef dokulara daha iyi penetre olmasını sağlayan, içerdikleri etkin maddenin salımını kontrol altında tutabilen ve uzun süreli etki sağlayan ilaç taşıyıcı sistemlerdir. Bu nedenle ilaç taşıyıcı nanopartiküler sistemler GBM tedavisinde konvansiyonel tedavilere göre üstünlük göstermektedir. Nanopartiküllerin aktif hedeflendirme maddeleri ile tasarlanması veya istenen bölgelere ulaşabilmesi, hedeflenen dokuda sürekli ve yüksek miktarlarda ilaç bulunmasını sağlamaktadır. Özellikle penetrasyonu zayıf olan ilaçların nanopartiküler sistemlerle uygulanması ve formülasyona permeabilite artırıcı yardımcı maddelerin ilave edilmesi, ilaçların absorpsiyonunun artırılmasında önemli bir stratejidir. Topoizomera II enzimi blokajı ile etki gösteren ve antrasiklin grubu bir kemoterapötik ilaç olan DH, pek çok kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, DH uygulamasından sonra gelişen genel yan etkilerin yanında anafilaksi, ciddi kalp hasarı, gibi ciddi yan etkiler de gözlenebilmektedir. DH'nin uzun süreli kullanımının önemli kardiyak toksisiteye neden olduğu ve DH kaynaklı konjestif kalp yetmezliğinde 1 yıl içinde ölüm oranının yaklaşık %50 olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmalar DH'nin doku/tümör penetrasyonunda problemlerle karşılaşıldığını göstermiştir. Bu durum, DH'nin hedeflendirilmiş bir nano taşıyıcı tarafından etki bölgesine taşınarak, aynı zamanda doku penetrasyonunun artırılması ve sistemik ilaç dozunun düşürülmesi yaklaşımını rasyonel kılmaktadır. Penetrasyon artırıcı olarak kullanılan maddelerden biri de borneoldür. Borneolün

gastrointestinal mukoza zarı, cilt, burun mukozası, kornea ve kan beyin bariyeri gibi çeşitli biyolojik bariyerlerden ilaç geçişini arttırdığı bildirilmiştir.

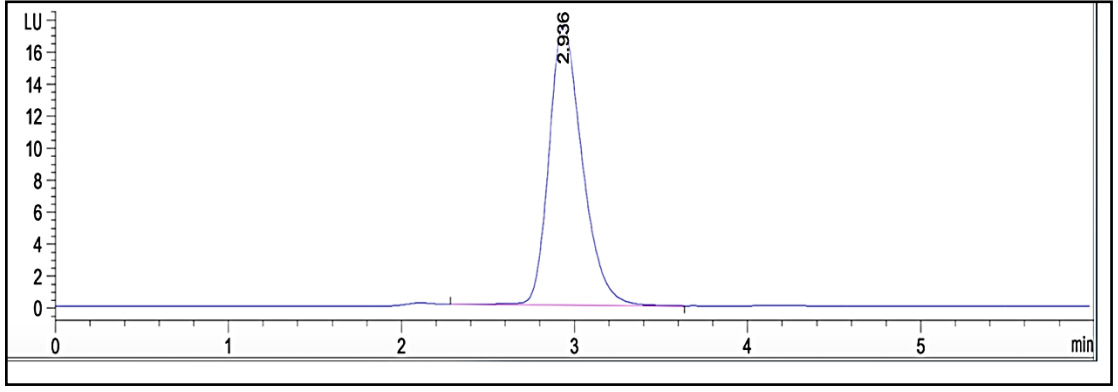
Literatürde borneol ile modifiye edilmiş ve DH içeren bazı nanotaşıyıcı sistemlerin GBM dışındaki kanserlere uygulanması üzerine kısıtlı sayıda araştırma bulunmakla birlikte, bu araştırmaların kapsamının sınırlı olması ve elde edilen etkililik ve yan etki sonuçlarının hala geliştirmeye ihtiyaç duyduğunun tespit edilmesi, söz konusu iki maddenin farklı bir nanosistem çatısı altında ve GBM özelinde değerlendirilmesinin tedaviye uzanan araştırma basamaklarından biri olmak açısından önemli olduğunu göstermiştir.

Bu tez çalışmasının amacı, tümör dokusunda yüksek miktarda, uzun süre ve kontrollü etkin madde salımı sağlayacak, intravenöz yol ile uygulanabilecek, borneol ile permeabilitesi artırılmış DH yüklü PLGA nanopartiküllerini geliştirmek, karakterizasyon çalışmalarını yaparak RG2 ve U87 GBM hücre hatlarında 2B ve 3B (tümör sferoid) hücre kültürlerinde etkinliğini değerlendirmektir.

Sonuçlar ve tartışma bölümünde, yöntem bölümüyle de uyumlu şekilde bir başlık sıralaması takip edilecek ve öncelikle analitik yöntem geliştirilmesi ve validasyonu, sonrasında nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yer alacaktır, son kısımda da hücre kültürü çalışmalarına ait bulgular üzerinde değerlendirme yapılacaktır.

4.1. Doksorubisin HCl'nin HPLC Miktar Tayini ve Analitik Validasyon Çalışmaları

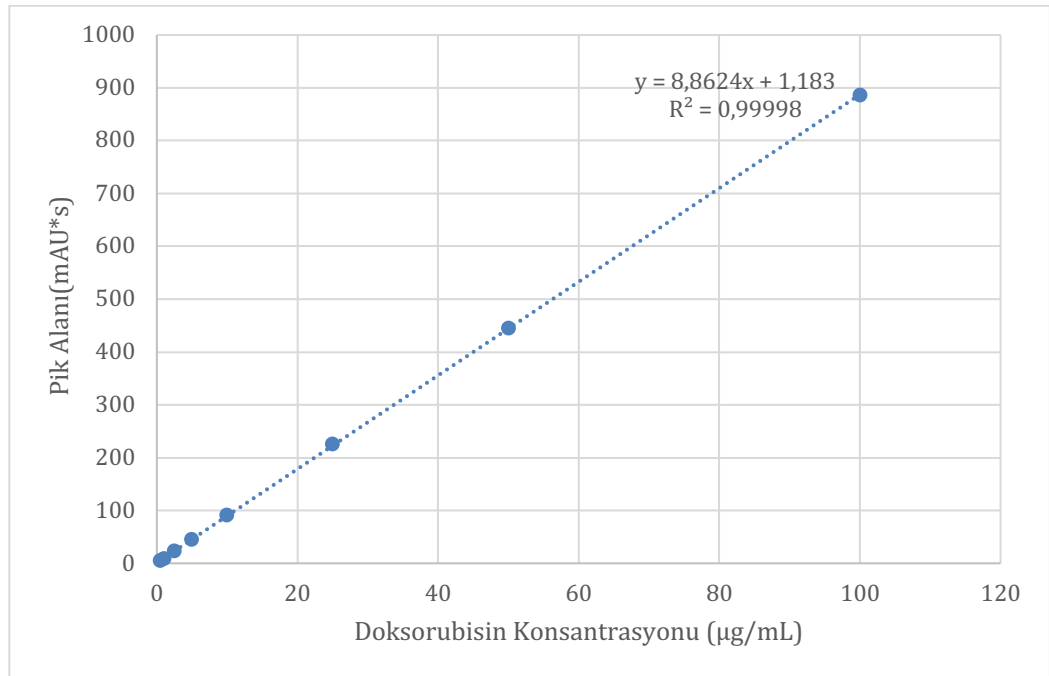
DH'nin miktar tayini için Bölüm 3.2.' de açıklanan HPLC sistemi kullanılmış ve analitik yöntem validasyonu gerçekleştirilmiştir. 25 µg/mL konsantrasyonda DH'nin analizi ile elde edilen HPLC kromatogramı Şekil 4.1.'de sunulmuştur. HPLC kromatogramında görüleceği üzere DH'ye ait pik spesifik bir şekilde elde edilmiş ve alıkonma zamanı 2,93 dakika olarak saptanmıştır.



Şekil 4.1. Dokсорubisin HCl'ye ait HPLC kromatogramı (25 µg/mL).

Doğrusallık

DH'nin validasyon çalışmaları kapsamında, doğrusallık kriterinin belirlenmesi için ICH kılavuzlarından yararlanılmıştır [146]. Bunun için, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında etkin madde piklerinin eğri altında kalan alanları belirlenmiştir. Bu konsantrasyon değerleri HPLC cihazı ile analiz edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Doğrusallık çalışmasıyla elde edilen Dokсорubisin HCl kalibrasyon eğrisi (n=6).

Elde edilen verilerle oluşturulan grafikte kalibrasyon doğrusuna ait denklem $y = 8,8624x + 1,183$ olarak bulunmuştur. Doğrusal regresyon analizinde modelin uygunluğunu gösteren R^2 değeri 0,99998 olarak bulunmuş ve denklemin doğrusallığı doğrulanmıştır.

Doğruluk ve Geri Kazanım

Validasyon çalışması kapsamında, kullanılan analitik değerin doğruluğunu göstermek için, kalibrasyon çalışması içinde belirlenen konsantrasyon değerleri içinden düşük, orta ve yüksek olacak şekilde çözeltiler hazırlayarak, HPLC cihazı ile analiz yapılmıştır. Analitik validasyon rehberlerinde %VK'nın %2'den daha küçük olması gerektiği açıklanmıştır. Çizelge 4.1.'de görüldüğü üzere varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunarak, yöntemin doğruluğu gösterilmiştir [144].

Çizelge 4.1. Dokсорubisin HCl'nin HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
2,5	2,3280	98,11	0,26
10	10,0724	100,7	0,4
100	99,8929	99,9	0,2

Kesinlik

DH'nin 2,5, 10 ve 100 µg/mL konsantrasyonlarında hazırlanan çözeltileri 6 ayrı kez HPLC cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen pik alanlarının ortalamaları, kalibrasyon doğrusu aracılığı ile hesaplanarak, hesaplanan konsantrasyon ve varyasyon katsayı değerleri elde edilmiştir. Analitik validasyon rehberlerinde %VK'nın %2'den daha küçük olması gerektiği açıklanmıştır. Çizelge 4.2.'de görüldüğü üzere varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunarak, yöntemin kesinliği gösterilmiştir [144].

Çizelge 4.2. Dokсорubisin HCl'nin HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik çalışması sonuçları (n=6)

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
2,5	2,71	0,13
10	10,82	0,42
100	100,43	0,13

Günler Arası Tekrar Edilebilirlik

DH'nin 2,5, 10 ve 100 µg/mL çözeltilerinin, 3 gün boyunca arka arkaya 6 ayrı kez HPLC cihazı ile ölçülmesi elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması kullanılarak, kalibrasyon doğrusunda gerekli hesaplamalar yapılarak, konsantrasyon ve varyasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. Analitik validasyon rehberlerinde %VK'nın %2'den daha küçük olması gerektiği açıklanmıştır. Çizelge 4.3.'de görüldüğü üzere varyasyon katsayıları %2'nin altında bulunarak, yöntemin tekrar edilebildiği gösterilmiştir [144].

Çizelge 4.3. Dokсорubisin HCl'nin HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6)

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
2,5	2,6	1,28
10	10,05	0,16
100	100,95	0,94

Özgüllük

DH formülasyonunda kullanılan PLGA, PVA, borneol, diklorometan gibi yardımcı maddelerin, HPLC cihazında yapılan değerlendirmelerinde, çalışılan dalga boyunda pik vermediği gözlenmiştir.

Duyarlılık

Analitik yöntemin duyarlılığı, saptama sınırı ve miktar tayini sınırı olarak belirtilmiştir; saptama sınırı 0,023 µg/mL, miktar tayini sınırı ise 0,077 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bulgular yöntemin tespit edebileceği minimum konsantrasyonu ve yöntemin duyarlılığını göstermektedir [158], [159].

Stabilite

Stabilite çalışmaları için 10 µg/mL konsantrasyondaki DH çözeltisi 0, 24 ve 48. saatlerde analiz edilmiş ve elde edilen bulgular Çizelge 4.4'te paylaşılmıştır. Elde edilen bulgular karşılaştırılmış ve çalışma süresi boyunca (0-48 saat) herhangi bir bozunma piki gözlenmemiştir. Böylece doksurubisinin 48 saatlik analiz boyunca stabil kaldığı gösterilmiştir.

Çizelge 4.4. Doksurubisin HCl'nin HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait stabilite çalışması sonuçları (n=6)

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (saat)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
10	0	10,36	103,64
10	24	10,05	100,46
10	48	10,45	104,49

4.2. Formülasyon Çalışmaları

4.2.1. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Geliştirilmesi

Bu tez çalışması kapsamında KBB'yi aşmak üzere sıklıkla literatürde tercih edilen bir ilaç taşıyıcı sistem olan polimerik nanopartikül formülasyonları tasarlanmıştır. Nanopartiküllerin hazırlanmasında S/Y/S emülsiyon-çözücü buharlaştırma yöntemi kullanılmıştır. Literatürde, bu yöntemin suda çözünen etkin maddelerin enkapsülasyonu için ideal olduğu, antikanser ve antibiyotik içeren nanopartiküllerin hazırlanmasında en çok tercih edilen yöntem olduğu bildirilmiştir [160]. Bu yöntemde homojenizasyon iki

adımında gerçekleştirilir; ilk adımda, suda çözünen ilaçlar iç sulu faza (S1) ilave edilir veya polimer/lipofilik ilaçlar yağ fazına (Y) eklenir, ardından her iki faz da uygun şekilde karıştırılarak birincil emülsiyon (S1/O) oluşturmak üzere homojenize edilir. Ardından, birincil emülsiyon, uygun yüzey aktif madde içeren ikinci sulu fazla emülsifiye edilerek çift/çoklu emülsiyon (S1/O/S2) oluşturulur. Çift emülsiyonun oluşumu, dağılmış fazdan organik çözücünün (O) buharlaşmasıyla etkin maddeyi enkapsüle eden polimerin sertleşmesine yol açar ve nanopartiküller oluşur [161].

PLGA, nanopartikül hazırlanmasında çoklu emülsiyon tekniklerinde yaygın olarak kullanılan biyoyoumlu ve biyoparçalanır bir polimerdir. FDA tarafından onaylanmış bir polimer olan PLGA, vücutta hidroliz yoluyla kademeli olarak laktik ve glikolik aside parçalanır ve böylece yüklenen ilaçları uzun bir süre (haftalar-aylar) boyunca yavaşça salar. Bu polimer farklı PLGA/PLA oranlarında mevcuttur. Laktik asit, glikolik asitten daha hidrofobik olduğundan, laktik asit açısından zengin PLGA kopolimerleri daha az hidrofiliktir ve çok yavaş parçalanır.

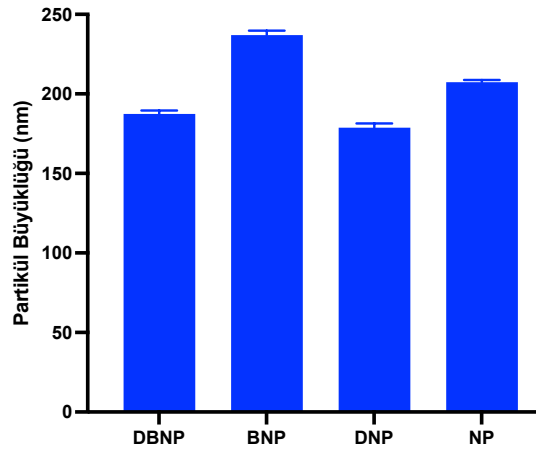
Formülasyon geliştirme sırasında ön formülasyon çalışmaları yapılarak deneme formülasyonları hazırlanmıştır (Çizelge 3.4). Bu kapsamda ilk olarak farklı organik faz kullanımının etkisi değerlendirilmiştir. Formülasyonlarda organik faz olarak diklorometan veya etil asetat kullanılmıştır. Diklorometan kullanılan formülasyonlarda emülsiyon sisteminin fiziksel stabilitesinin düşük olduğu buna karşın etil asetat kullanılan formülasyonlarda stabil emülsiyon elde edildiği tespit edilmiştir (Çizelge 3.4). Benzer şekilde literatürde PLGA nanopartiküllerin hazırlanmasında kullanılan organik çözücü tipinin nanopartiküllerin fiziksel özellikleri üzerine etkisi olduğu bildirilmiştir. Bu parametre dışında, dış fazdaki PVA çözeltisinin hacmi, organik fazdaki polimer miktarı ve karıştırma süresi gibi parametreler değiştirilmiştir. Elde edilen formülasyonlardaki partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve üretimin tekrarlanabilirliği değerlendirilerek en uygun yöntem (A6) seçilmiştir.

4.2.2. Poli Laktik-ko-Glikolik Asit (PLGA) Nanopartiküllerinin Karakterizasyonu

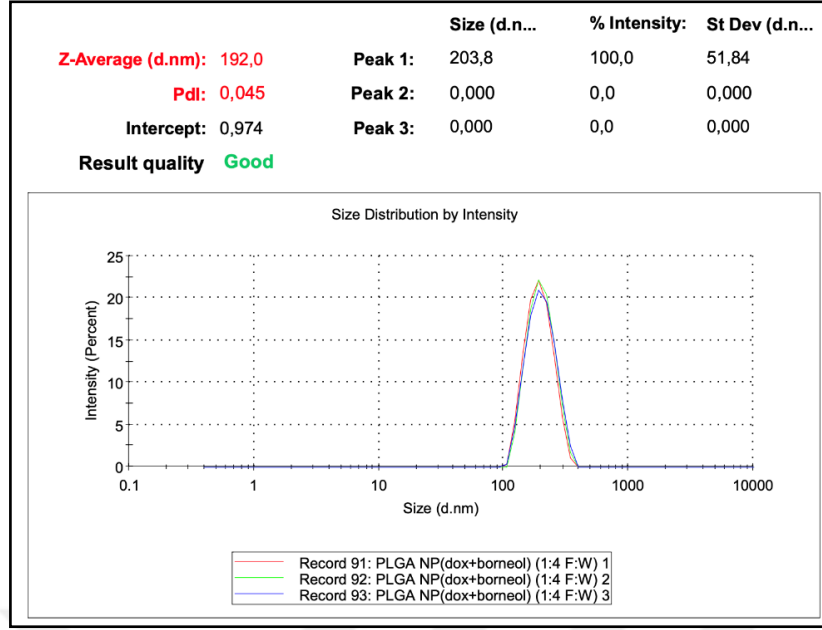
Yapılan ön formülasyon çalışmaları sonucu belirlenen sonuç formülasyonu üzerinde karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Karakterizasyon çalışmalarında ilk olarak partikül büyüklüğü, polidispersite indeksi ve zeta potansiyel ölçümü yapılmıştır. Elde edilen bulgular Şekil 4.3.- Şekil 4.7.'de sunulmuştur.

Şekil 4.3.'de görüleceği üzere sonuç formülasyonun (DH ve borneol içeren) partikül büyüklüğü 185,3 nm $\pm$ 1,3 nm olarak bulunmuştur. Boş nanopartiküllere borneol, DH veya DH+borneol eklenmesinin partikül büyüklüğünü değiştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.4.). Literatürde, KBB'yi aşmak için geliştirilen nanotaşıyıcılarda optimum partikül büyüklüğünün <200 nm olması gerektiği bildirilmiştir ([162]). Bu bilgi doğrultusunda sonuç formülasyonun partikül büyüklüğünün uygulama amacı için uygun olduğu değerlendirilmiştir.

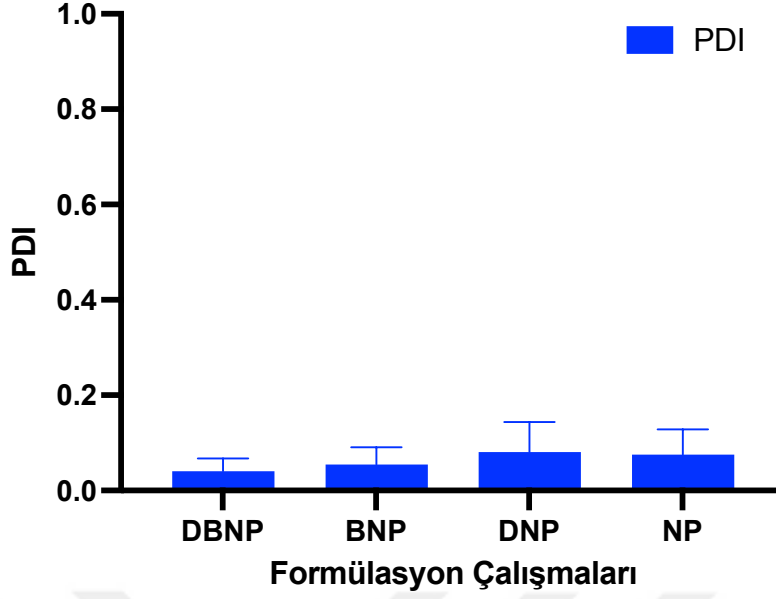


Şekil 4.3. Hazırlanan formülasyonların partikül büyüklüğü değerleri ($X \pm SS$, n=6). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP: Doksurubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksurubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)



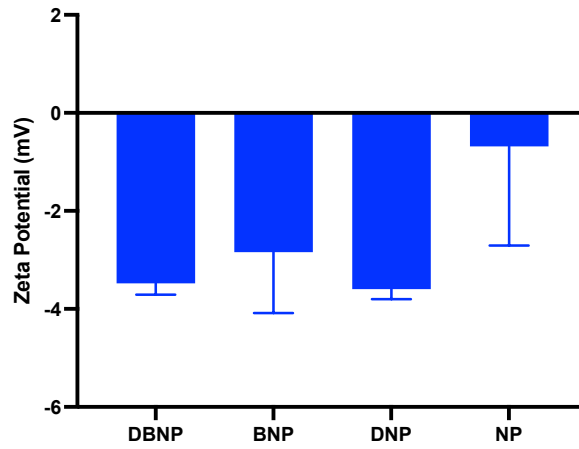
Şekil 4. 4. Doksorubisin HCl ve borneol içeren PLGA nanopartiküllerinin partikül büyüklüğü ve PDI sonuç raporu örneği.

İdeal bir nanotaşıyıcı sistemde partikül büyüklüğü dağılımının homojen olması istenmektedir. Literatürde PDI değerinin 0,2'den küçük olmasının partikül büyüklüğü dağılımının tekdüze olduğuna işaret ettiği bildirilmiştir [163]. Tez çalışmasında sonuç formülasyona (DH ve borneol içeren) ait PDI değerinin $0,04 \pm 0,02$ ($< 0,2$) olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Bu durum, hazırlanan sonuç formülasyonun partikül büyüklüğü dağılımının tekdüze olduğunu göstermektedir.



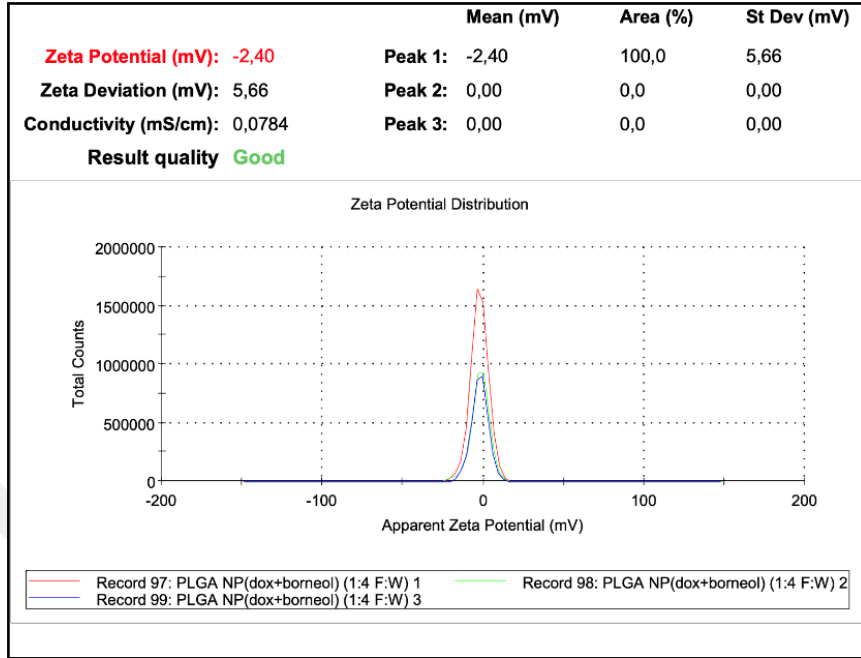
Şekil 4.5. Hazırlanan formülasyonların polidispersite değerleri ($X \pm SS$, $n=6$). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP: Doksorubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)

Şekil 4.6.'da görüleceği üzere sonuç formülasyonun (DH ve borneol içeren) zeta potansiyel değeri $-2,17 \pm 0,23$ mV olarak bulunmuştur. Boş nanopartiküllere borneol, DH veya DH+borneol eklenmesinin zeta potansiyel değerlerini değiştirdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7).



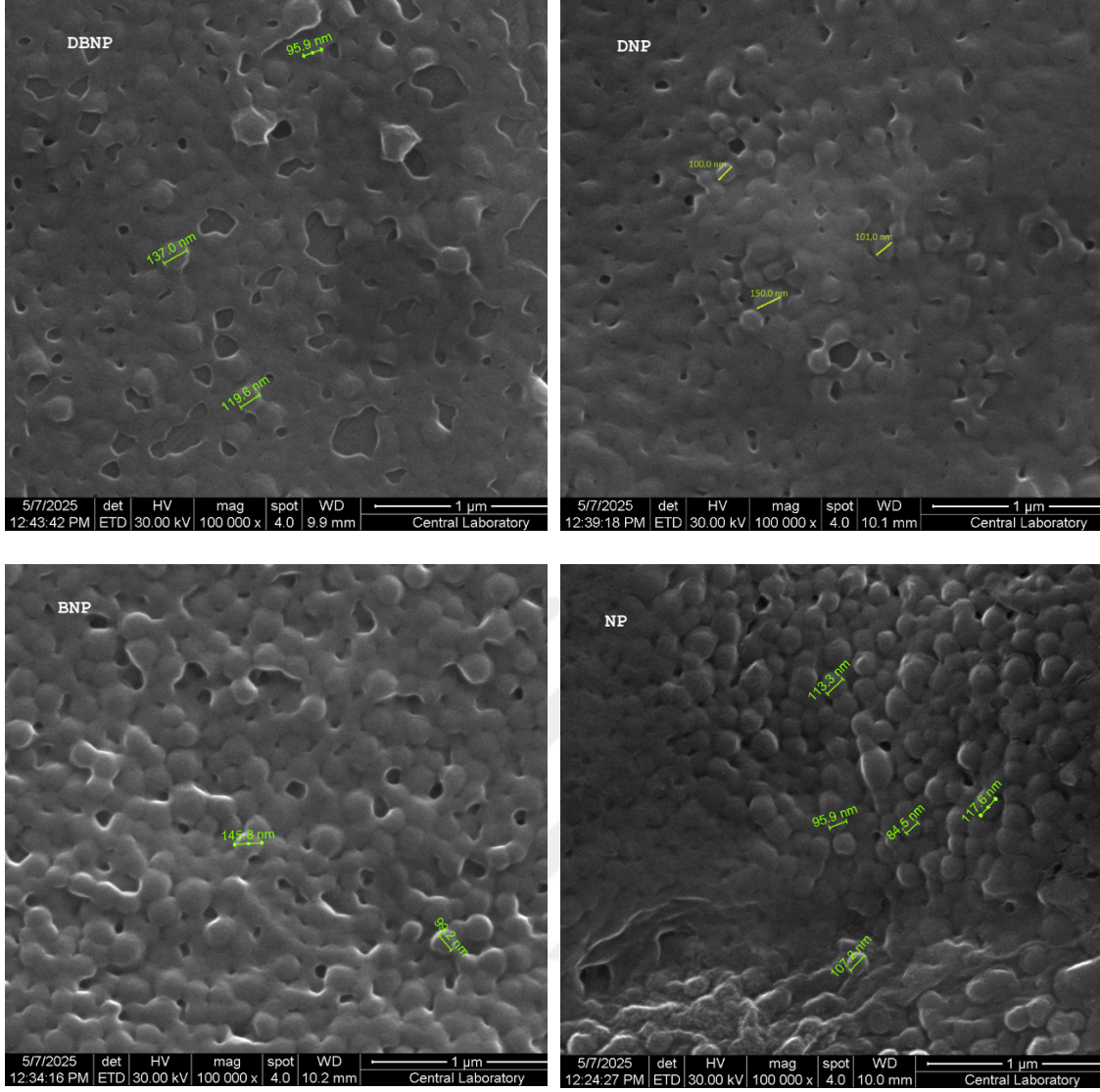
Şekil 4.6. Hazırlanan formülasyonların zeta potansiyeli değerleri ($X \pm SS$, $n=6$). (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP: Doksorubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu,

BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)



Şekil 4. 7. Doksorubisin HCl ve borneol içeren PLGA nanopartiküllerinin zeta potansiyel sonuç raporu örneği.

Hazırlanan formülasyonların yüzey ve şekil özellikleri SEM kullanılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen nanopartiküllerin küresel yapıda olduğu, partikül büyüklüğü ölçümleri ve PDI değerleri ile uyumlu şekilde homojen bir dağılım sergilediği gözlenmiştir (Şekil 4.8.).

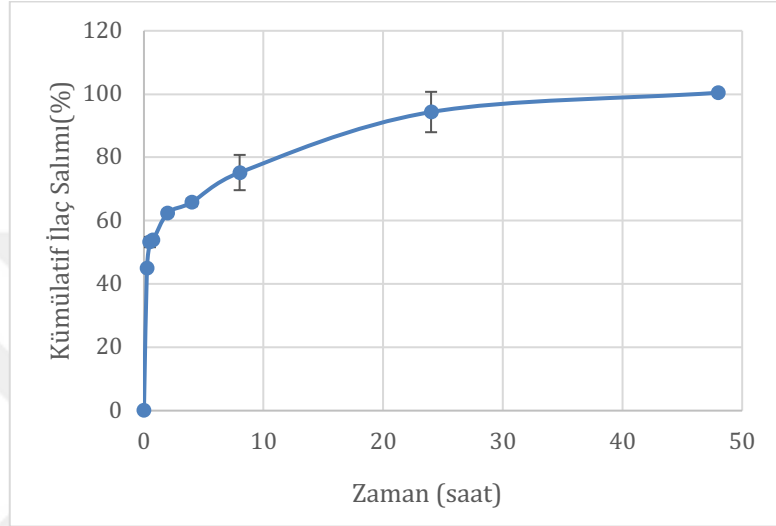


Şekil 4.8. Hazırlanan formülasyonlara ait SEM görüntüleri. (NP: Boş nanopartikül formülasyonu, DNP:Doksorubisin HCl içeren nanopartikül formülasyonu, BNP: Borneol içeren nanopartikül formülasyonu ve DBNP: Doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu)

Sonuç formülasyonunun (DH ve borneol içeren) DH yükleme kapasitesi 1.28 ± 0.002 ve enkapsülasyon etkinliği değeri 51.07 ± 1.29 olarak bulunmuştur, sonuçlar literatür ile uyumludur[164] [165].

İn vitro salım sonuçları incelendiğinde sonuç formülasyonunun (DH ve borneol içeren) 48 saat süre ile salım yaptığı tespit edilmiştir (Şekil 4.9). Salım profili incelendiğinde DH salımının 0.5 saatte %58'lik bir salım değeri ile patlama etkisi ("burst effect") gösterdiği tespit edilmiştir. Benzer şekilde literatürde PLGA nanopartiküllerden ilaç salımının

başlangıçta hızlı, ardından nispeten yavaş bir salım fazı içerdiği ve patlama etkisi ile salınan ilaç miktarının genellikle nanopartikül formülasyonuna bağlı olduğu bildirilmiştir. Buna ilaveten, partikülün yüzeyine yakın veya bağlı olan ilaç fraksiyonunun ilk patlamaya katkıda bulunduğu belirtilmiştir [166].



Şekil 4.9. Doksorubisin HCl Yüklü PLGA Nanopartikül Formülasyonundan Kümülatif İlaç Salım Profili ($X \pm SS$, $n=6$).

4.3. Hücre Kültürü Çalışmaları

4.3.1. İki Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları

2B hücre kültürü çalışmalarında öncelikle DH'nin RG2 ve U87 hücre hatlarındaki IC50 tayini yapılmıştır. GraphPad Prism yazılımı kullanılarak yapılan analizler sonucunda, 24 saatlik uygulama sonunda RG2 hücreleri için IC50 değeri 24,18 μM , U87 hücreleri için ise 42,65 μM olarak hesaplanmıştır.

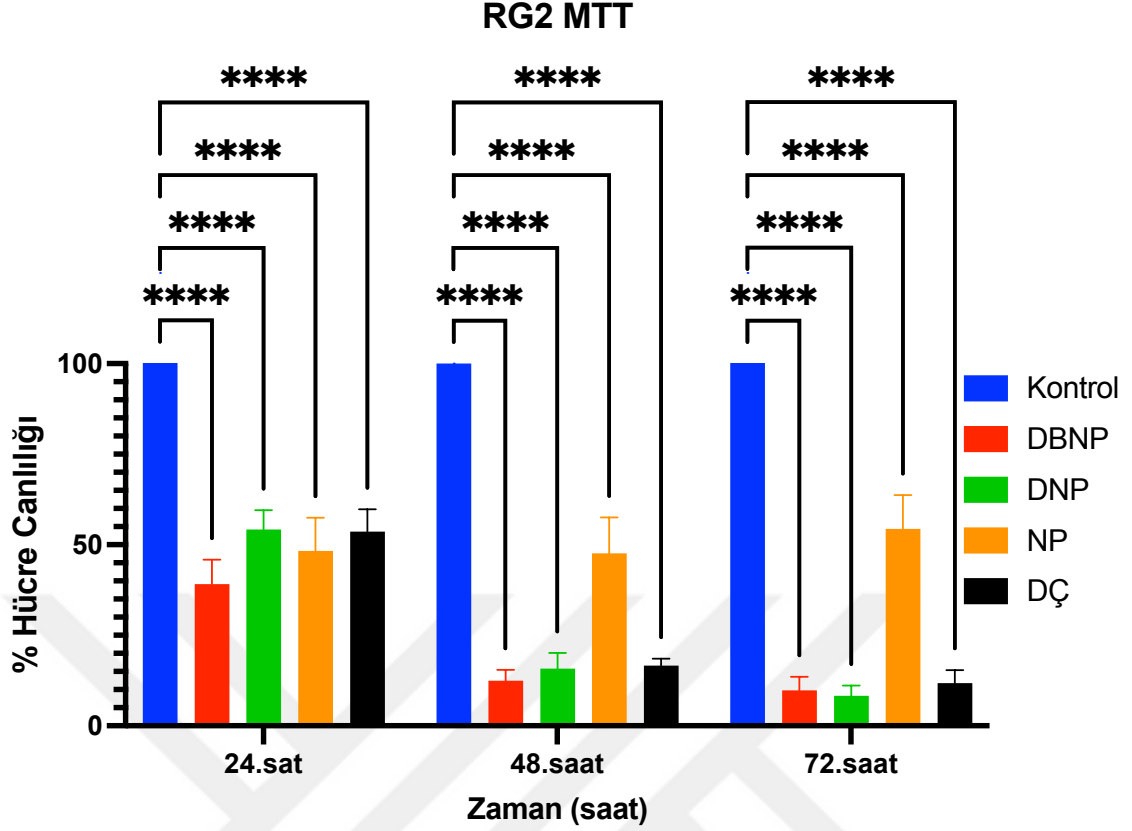
Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan formülasyon kodları ve içerikleri Çizelge 4.5'te sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan formülasyon kodları ve içerikleri.

Formülasyon	İçerik
DBNP	PLGA Nanopartikül (DH ve Borneol içeren)
DNP	PLGA Nanopartikül (DH içeren, Borneol içermeyen)
NP	PLGA Nanopartikül (DH ve Borneol içermeyen)
DÇ	DH Çözeltisi

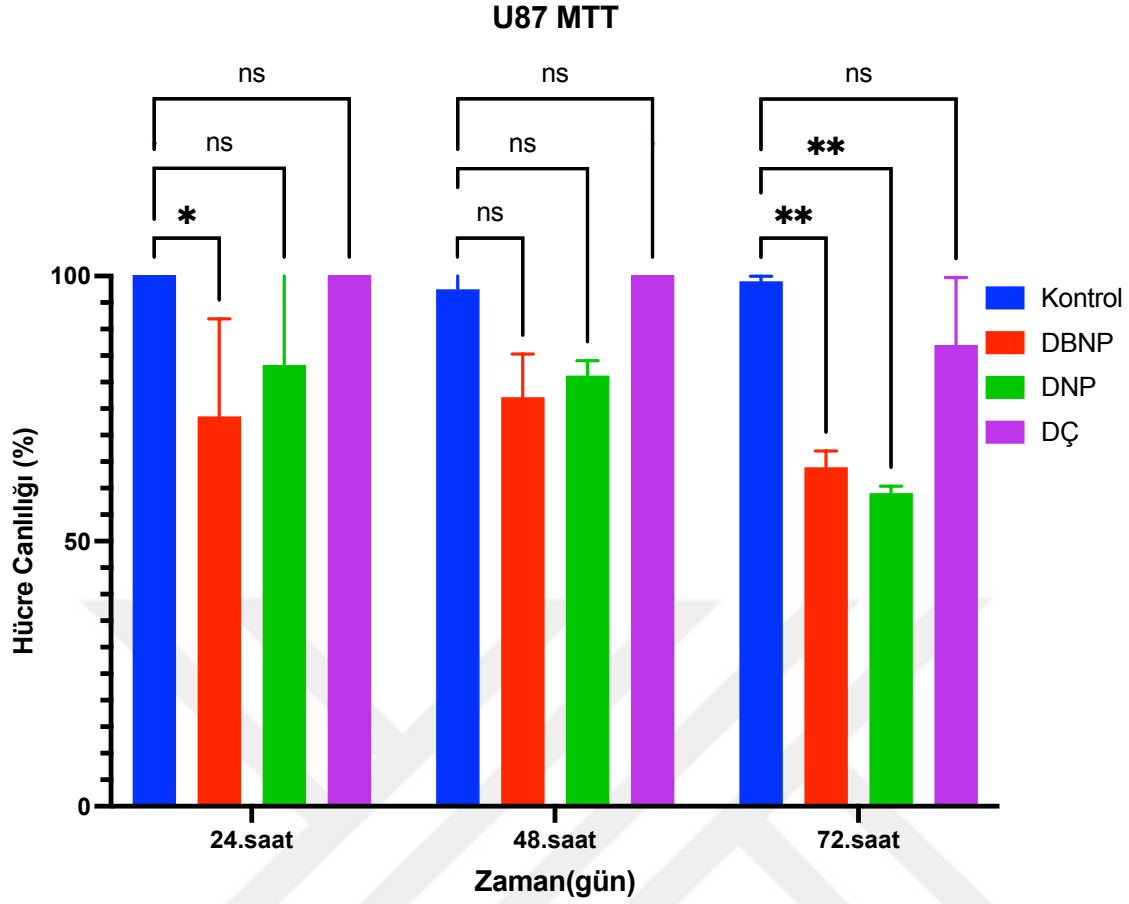
DÇ, NP, DNP ve DBNP kodlu grupların RG2 ve U87 hücreleri üzerinde *in vitro* sitotoksitesini değerlendirmek için MTT testi gerçekleştirilmiştir. Uygulanan grupların bu hücreler üzerindeki 24, 48 ve 72 saatlik hücre canlılığına etkisi değerlendirilmiş, bulgular Şekil 4.10 ve Şekil 4.11’de gösterilmiştir. Kontrol grubunun hücre canlılığı %100 olarak kabul edilmiştir.

Şekil 4.10’da görüleceği üzere, RG2 hücreleri üzerinde, 24 saatlik hücre canlılığı verileri kontrol > DNP > DÇ > NP > DBNP olarak sıralanmıştır. Bir başka deyişle, uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Bu formülasyon ile elde edilen sitotoksite değerlerinin sadece DH içeren nanopartikül formülasyonundan daha yüksek olması borneolün de formülasyonun etkinliği üzerine pozitif yönde etkisi olduğunu göstermektedir. 48 ve 72. saatlik verilerde de en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiştir.



Şekil 4.10. RG2 hücre hattı için uygulanan formülasyonların sitotoksosite bulguları. (n=3, $\bar{x} \pm SS$) (DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, NP: boş nanopartikül, DÇ: doksorubisin HCl çözeltisi) İstatiksel olarak iki yönlü ANOVA testi uygulanmış olup ****= $p < 0,0001$ olarak gösterilmiştir.

Şekil 4.11’de görüleceği üzere, U87 hücreleri üzerinde, 24 saatlik hücre canlılığı verileri kontrol > DÇ > DNP > DBNP olarak sıralanmıştır. Bir başka deyişle, uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Bu formülasyon ile elde edilen sitotoksite değerlerinin sadece DH içeren nanopartikül formülasyonundan daha yüksek olması borneolün de formülasyonun etkinliği üzerine pozitif yönde etkisi olduğunu göstermektedir. 48. saatlik verilerde de en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiş, 72. Saatte DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu ile DH içeren nanopartikül grupları benzer etki göstermiştir.

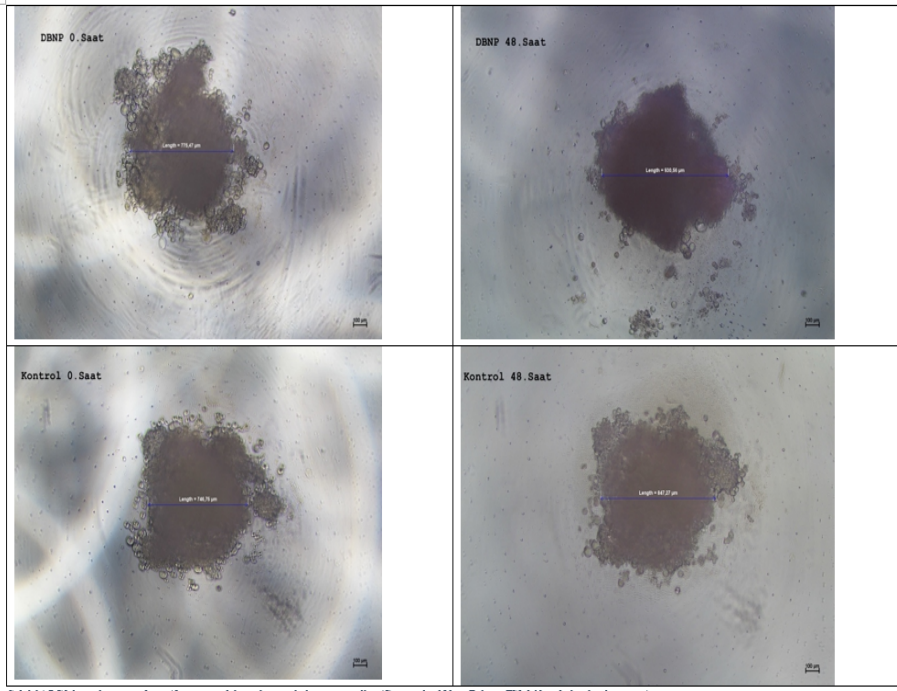


Şekil 4.11. U87 hücre için uygulanan formülasyonların sitotoksikite bulguları. (n=3, $\bar{x} \pm SS$) (DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: doksorubisin HCl çözeltisi) İstatiksel olarak iki yönlü ANOVA testi uygulanmış olup ns=anlamalı değil, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ olarak gösterilmiştir.

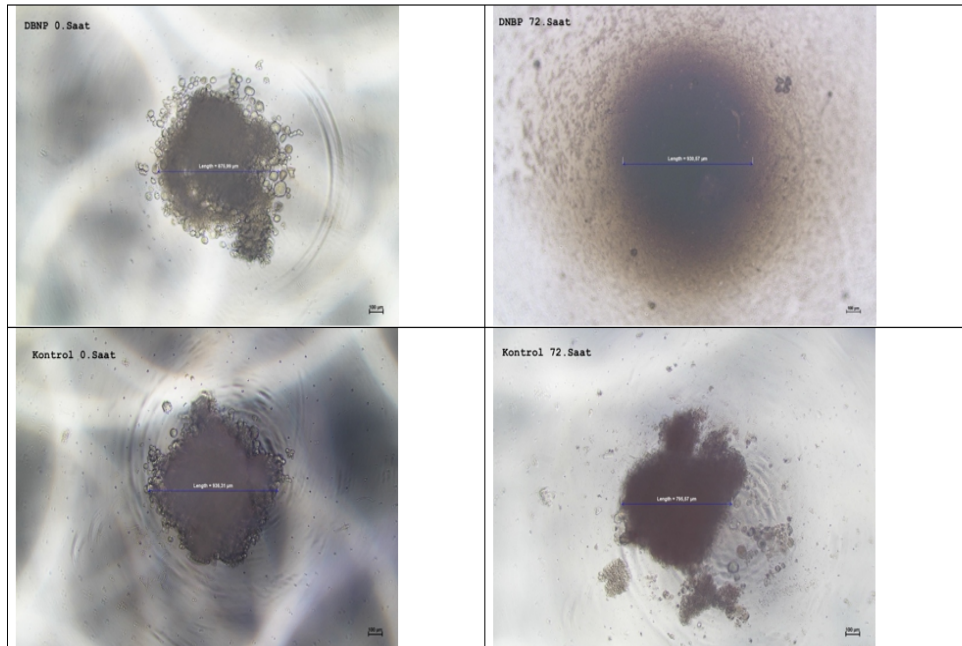
4.3.2. Üç Boyutlu Hücre Kültürü Çalışmaları

3B kültür sistemi, hücrelerin doğal hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerini sürdürebilmesine olanak tanıyan bir sistemdir. DÇ, NP, DNP ve DBNP kodlu grupların RG2 ve U87 tümör sferoidleri üzerinde *in vitro* sitotoksitesini değerlendirmek için “Suda Çözünür Tetrazolyum Tuzu-1(WST-1)” yöntemi ile analiz yapılmıştır.

Sferoidlerin oluşturulmasında poli-Hema ve Matrigel® bileşenlerinden yararlanılarak polimer esaslı iskele yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen RG2 ve U87 sferoidlerinin mikroskop (Nikon Eclipse TS2 Mikroskobu) görüntüleri Şekil 4.12 ve Şekil 4.13’de gösterilmiştir.

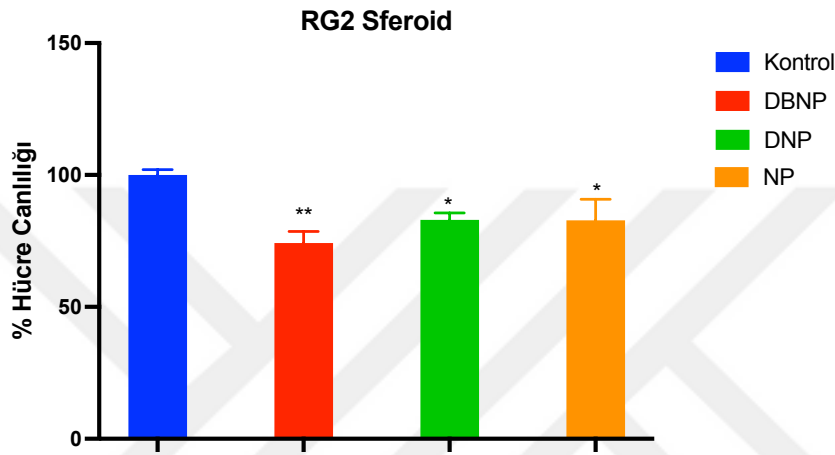


Şekil 4.12. RG2 hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin 0. ve 48.saate ait mikroskop görüntüleri. (Kontrol: Hiçbir uygulama yapılmamış sferoid, DBNP: DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan sferoid)



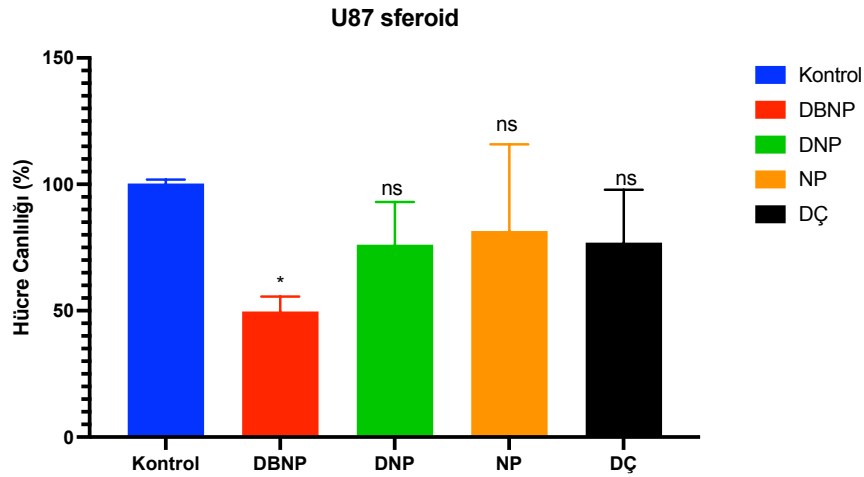
Şekil 4.13. RG2 hücrelerinin oluşturduğu sferoidlerin 0. ve 72.saate ait mikroskop görüntüleri. (Kontrol: Hiçbir uygulama yapılmamış sferoid, DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu uygulanan sferoid)

Şekil 4.14’de görüleceği üzere, RG2 sferoidleri üzerinde, 48 saatlik hücre canlılığı verileri kontrol > NP > DNP > DBNP olarak sıralanmıştır. Bir başka deyişle, uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksisteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Bu formülasyon ile elde edilen sitotoksiste değerlerinin sadece DH içeren nanopartikül formülasyonundan daha yüksek olması borneolün de formülasyonun etkinliği üzerine pozitif yönde etkisi olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.14. RG2 sferoidlerine uygulanan formülasyonların sitotoksiste 48 saatlik bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: doksorubisin ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, NP: doksorubisin HCl içermeyen nanopartikül) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, $*=p<0,05$, $**=p<0,01$ olarak gösterilmiştir.

Şekil 4.15’te görüleceği üzere, U87 sferoidlerine uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksisteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonu göstermiştir. Bu formülasyon ile elde edilen sitotoksiste değerlerinin sadece DH içeren nanopartikül formülasyonundan daha yüksek olması borneolün de formülasyonun etkinliği üzerine pozitif yönde etkisi olduğunu göstermektedir. Uygulanan diğer gruplarda kontrole göre istatistiki olarak anlamlı bir fark görülmemiştir.

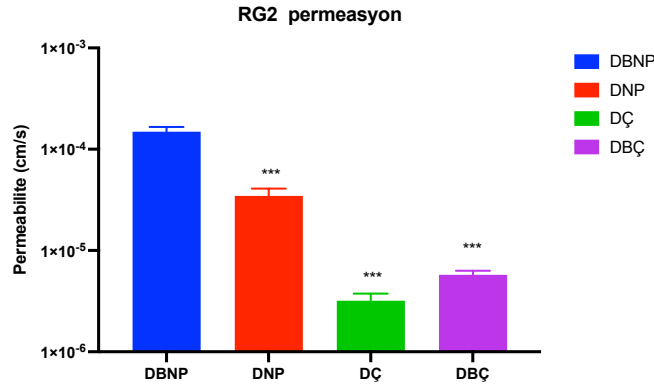


Şekil 4.15. U87 sferoidlerine uygulanan formülasyonların sitotoksikite 72 saatlik bulguları ($n=3$, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, NP: doksorubisin HCl içermeyen nanopartikül, DÇ: doksorubisin HCl çözeltisi) İstatistiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup; ns=anlamlı değil, $*=p<0,05$, olarak gösterilmiştir.

4.3.3. *In Vitro* Permeabilite Çalışmaları

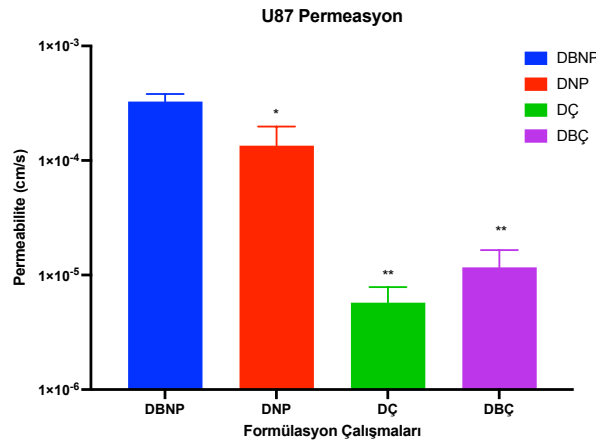
RG2 veya U87 hücre hattı tabakasından formülasyonların permeabilitesinin değerlendirildiği çalışmalara ait bulgular Şekil 4.16 ve Şekil 4.17’de gösterilmiştir.

Şekil 4.16’dan görüleceği üzere, RG2 hücre hattında permeabilite değerleri DBNP> DNP> DÇ> DBÇ olarak sıralanmıştır. Elde edilen bulgulardan DH’nin çözelti şekline göre nanopartikül içine hapsedilmesinin permeasyonu artırdığı ve ayrıca nanopartiküllere borneol eklenmesi ile en yüksek permeabilite değerinin elde edildiği tespit edilmiştir. Elde edilen veriler literatür ile uyumludur [167].



Şekil 4.16. RG2 hücre hattında doksorubisin HCl'nin permeabilite bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: doksorubisin HCl çözeltisi, DBÇ: doksorubisin HCl ve borneol çözeltisi) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup ***= $p < 0,001$ olarak gösterilmiştir.

Şekil 4.17'den görüleceği üzere, U87 hücre hattında permeabilite değerleri DBNP > DNP > DÇ > DBÇ olarak sıralanmıştır. Elde edilen bulgulardan DH'nin çözelti şekline göre nanopartikül içine hapsedilmesinin permeasyonu artırdığı ve ayrıca nanopartiküllere borneol eklenmesi ile en yüksek permeabilite değerinin elde edildiği tespit edilmiştir.



Şekil. 4.17. U87 hücre hattında doksorubisin HCl'nin permeabilite bulguları (n=3, $\bar{x} \pm SS$). (DBNP: doksorubisin HCl ve borneol içeren nanopartikül, DNP: doksorubisin HCl içeren nanopartikül, DÇ: doksorubisin HCl çözeltisi, DBÇ: doksorubisin HCl ve borneol çözeltisi) İstatiksel olarak tek yönlü varyans analizi uygulanmış olup, *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$ olarak gösterilmiştir.

5. YORUM

Bu tez çalışmasında borneol ile permeabilitesi artırılmış DH yüklü PLGA nanopartiküllerini geliştirilmiş, karakterizasyon çalışmaları yapılarak RG2 ve U87 GBM hücre hatlarında iki boyutlu ve üç boyutlu (tümör sferoid) hücre kültürlerinde etkinliğini değerlendirilmiştir.

Tez kapsamında elde edilen sonuçlar özetlenecek olursa:

- KBB'yi aşmak üzere intravenöz uygulama yolu için uygun özelliklerde (partikül büyüklüğü < 200 nm, PDI $< 0,200$, kontrollü salım özelliği gösteren) nanopartiküller tasarlanmıştır.
- Formülasyon parametrelerinde yapılan değişikliklerin nanopartiküllerin partikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel özellikleri üzerine etkili olduğu gösterilmiştir.
- İki boyutlu hücre kültürü çalışmalarında DH'nin RG2 ve U87 hücre hatlarındaki IC50 değeri tespit edilmiştir.
- İki boyutlu hücre kültürü çalışmalarında RG2 ve U87 hücre hatlarında uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonunun gösterdiği tespit edilmiştir.
- RG2 ve U87 hücre hatları ile 3 boyutlu tümör sferoidleri oluşturulmuştur.
- Üç boyutlu hücre kültürü çalışmalarında RG2 ve U87 tümör sferoidlerine uygulanan gruplar arasında en yüksek sitotoksiteyi DH ve borneol içeren nanopartikül formülasyonunun gösterdiği tespit edilmiştir.
- RG2 ve U87 hücre hatları kullanılarak gerçekleştirilen *in vitro* permeabilite deneylerinde nanopartikül formülasyonuna borneol ilavesinin DH'nin permeabilitesini artırdığı bulunmuştur.

Tez çalışması kapsamında elde edilen bulgular göz önünde bulundurulduğunda, DH ve borneol içeren PLGA nanopartikül formülasyonunun beyne ilaç taşınması için uygun karakteristiklere sahip olması, iki ve üç boyutlu olarak RG2 ve U87 hücre hatlarında etkin olduğunun tespit edilmesi nedeniyle gelecek çalışmalarda farelerde geliştirilecek GBM modelinde etkinliğinin araştırılmasının uygun olduğu değerlendirilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- [1] Q. T. Ostrom *et al.*, “CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Other Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2012-2016,” Oct. 01, 2019, *Oxford University Press*. doi: 10.1093/neuonc/noz150.
- [2] R. Stupp *et al.*, “Radiotherapy plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide for Glioblastoma,” *New England Journal of Medicine*, vol. 352, no. 10, pp. 987–996, Mar. 2005, doi: 10.1056/NEJMoa043330.
- [3] X. Wang, L. Yang, Z. Chen, and D. M. Shin, “Application of Nanotechnology in Cancer Therapy and Imaging,” *CA Cancer J Clin*, vol. 58, no. 2, pp. 97–110, Jan. 2008, doi: 10.3322/CA.2007.0003.
- [4] S. Gelperina, K. Kisich, M. D. Iseman, and L. Heifets, “The Potential Advantages of Nanoparticle Drug Delivery Systems in Chemotherapy of Tuberculosis,” *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 172, no. 12, pp. 1487–1490, Dec. 2005, doi: 10.1164/rccm.200504-613PP.
- [5] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, and L. Gianni, “Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity,” *Pharmacol Rev*, vol. 56, no. 2, pp. 185–229, Jun. 2004, doi: 10.1124/pr.56.2.6.
- [6] O. Tacar, P. Sriamornsak, and C. R. Dass, “Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems,” *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 65, no. 2, pp. 157–170, Feb. 2013, doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
- [7] I. Sardi *et al.*, “Delivery of doxorubicin across the blood–brain barrier by ondansetron pretreatment: a study in vitro and in vivo,” *Cancer Lett*, vol. 353, no. 2, pp. 242–247, Oct. 2014, doi: 10.1016/j.canlet.2014.07.018.
- [8] H. K. Makadia and S. J. Siegel, “Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier,” *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1377–1397, Aug. 2011, doi: 10.3390/polym3031377.
- [9] F. Mohamed and C. F. van der Walle, “Engineering Biodegradable Polyester Particles With Specific Drug Targeting and Drug Release

- Properties,” *J Pharm Sci*, vol. 97, no. 1, pp. 71–87, Jan. 2008, doi: 10.1002/jps.21082.
- [10] R. C. Mundargi, V. R. Babu, V. Rangaswamy, P. Patel, and T. M. Aminabhavi, “Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives,” *Journal of Controlled Release*, vol. 125, no. 3, pp. 193–209, Feb. 2008, doi: 10.1016/j.jconrel.2007.09.013.
- [11] S. D. Allison, “Effect Of Structural Relaxation On The Preparation And Drug Release Behavior Of Poly(lactic-co-glycolic)acid Microparticle Drug Delivery Systems,” *J Pharm Sci*, vol. 97, no. 6, pp. 2022–2035, Jun. 2008, doi: 10.1002/jps.21124.
- [12] Q.-L. Zhang, B. M. Fu, and Z.-J. Zhang, “Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood–brain barrier permeability,” *Drug Deliv*, vol. 24, no. 1, pp. 1037–1044, Jan. 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1346002.
- [13] Q.-L. Zhang, B. M. Fu, and Z.-J. Zhang, “Borneol, a novel agent that improves central nervous system drug delivery by enhancing blood–brain barrier permeability,” *Drug Deliv*, vol. 24, no. 1, pp. 1037–1044, Jan. 2017, doi: 10.1080/10717544.2017.1346002.
- [14] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer: The next generation,” Mar. 04, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [15] World Health Organization (WHO), “Cancer.”
- [16] D. N. Louis *et al.*, “The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary,” *Neuro Oncol*, vol. 23, no. 8, pp. 1231–1251, Aug. 2021, doi: 10.1093/neuonc/noab106.
- [17] World Health Organization, “GLOBOCAN Türkiye,” <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/792-turkiye-fact-sheet.pdf>.
- [18] D. Hambardzumyan and G. Bergers, “Glioblastoma: Defining Tumor Niches,” Dec. 01, 2015, *Cell Press*. doi: 10.1016/j.trecan.2015.10.009.

- [19] S. Grochans *et al.*, “Epidemiology of Glioblastoma Multiforme—Literature Review,” May 01, 2022, *MDPI*. doi: 10.3390/cancers14102412.
- [20] D. N. Louis *et al.*, “The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary,” Jun. 01, 2016, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00401-016-1545-1.
- [21] F. B. Furnari *et al.*, “Malignant astrocytic glioma: Genetics, biology, and paths to treatment,” Nov. 01, 2007. doi: 10.1101/gad.1596707.
- [22] E. ter Linden, E. R. Abels, T. S. van Solinge, J. Neefjes, and M. L. D. Broekman, “Overcoming Barriers in Glioblastoma—Advances in Drug Delivery Strategies,” *Cells*, vol. 13, no. 12, p. 998, Jun. 2024, doi: 10.3390/cells13120998.
- [23] M. Weller *et al.*, “EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma,” 2014, *Lancet Publishing Group*. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70011-7.
- [24] A. C. Tan, D. M. Ashley, G. Y. López, M. Malinzak, H. S. Friedman, and M. Khasraw, “Management of glioblastoma: State of the art and future directions,” *CA Cancer J Clin*, vol. 70, no. 4, pp. 299–312, Jul. 2020, doi: 10.3322/caac.21613.
- [25] R. Stupp *et al.*, “Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial,” *Lancet Oncol*, vol. 10, no. 5, pp. 459–466, May 2009, doi: 10.1016/S1470-2045(09)70025-7.
- [26] D. Wu, Q. Chen, X. Chen, F. Han, Z. Chen, and Y. Wang, “The blood–brain barrier: structure, regulation, and drug delivery,” Dec. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-023-01481-w.
- [27] R. Haumann, J. C. Videira, G. J. L. Kaspers, D. G. van Vuurden, and E. Hulleman, “Overview of Current Drug Delivery Methods Across the Blood–Brain Barrier for the Treatment of Primary Brain Tumors,” Nov. 01, 2020, *Adis*. doi: 10.1007/s40263-020-00766-w.

- [28] N. J. Abbott, A. A. K. Patabendige, D. E. M. Dolman, S. R. Yusof, and D. J. Begley, "Structure and function of the blood–brain barrier," *Neurobiol Dis*, vol. 37, no. 1, pp. 13–25, Jan. 2010, doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.
- [29] N. J. Abbott, "Blood–brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery," *J Inherit Metab Dis*, vol. 36, no. 3, pp. 437–449, May 2013, doi: 10.1007/s10545-013-9608-0.
- [30] R. Pandit, L. Chen, and J. Götz, "The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 165–166, pp. 1–14, 2020, doi: 10.1016/j.addr.2019.11.009.
- [31] S. Liebner, C. J. Czupalla, and H. Wolburg, "Current concepts of blood-brain barrier development," *Int J Dev Biol*, vol. 55, no. 4–5, pp. 467–476, 2011, doi: 10.1387/ijdb.103224sl.
- [32] D. H. Upton, C. Ung, S. M. George, M. Tsoli, M. Kavallaris, and D. S. Ziegler, "Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy," *Theranostics*, vol. 12, no. 10, pp. 4734–4752, 2022, doi: 10.7150/thno.69682.
- [33] C. Greene and M. Campbell, "Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules," *Tissue Barriers*, vol. 4, no. 1, p. e1138017, Jan. 2016, doi: 10.1080/21688370.2015.1138017.
- [34] E. A. Neuwelt *et al.*, "Engaging neuroscience to advance translational research in brain barrier biology," *Nat Rev Neurosci*, vol. 12, no. 3, pp. 169–182, Mar. 2011, doi: 10.1038/nrn2995.
- [35] R. F. Haseloff, S. Dithmer, L. Winkler, H. Wolburg, and I. E. Blasig, "Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects," *Semin Cell Dev Biol*, vol. 38, pp. 16–25, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.semcdb.2014.11.004.
- [36] M. M. Patel and B. M. Patel, "Crossing the Blood–Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain," *CNS Drugs*, vol. 31, no. 2, pp. 109–133, Feb. 2017, doi: 10.1007/s40263-016-0405-9.
- [37] N. Mokarram, A. Case, N. N. Hossainy, J. G. Lyon, T. J. MacDonald, and R. Bellamkonda, "Device-assisted strategies for drug delivery across the

- blood-brain barrier to treat glioblastoma,” Dec. 01, 2025, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s43246-024-00721-y.
- [38] H. Kadry, B. Noorani, and L. Cucullo, “A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 17, no. 1, p. 69, Dec. 2020, doi: 10.1186/s12987-020-00230-3.
- [39] J. A. Schulz, A. M. S. Hartz, and B. Bauer, “ABCB1 and ABCG2 Regulation at the Blood-Brain Barrier: Potential New Targets to Improve Brain Drug Delivery,” *Pharmacol Rev*, vol. 75, no. 5, pp. 815–853, Sep. 2023, doi: 10.1124/pharmrev.120.000025.
- [40] K. E. Schlageter, P. Molnar, G. D. Lapin, and D. R. Groothuis, “Microvessel Organization and Structure in Experimental Brain Tumors: Microvessel Populations with Distinctive Structural and Functional Properties,” *Microvasc Res*, vol. 58, no. 3, pp. 312–328, Nov. 1999, doi: 10.1006/mvre.1999.2188.
- [41] J. A. Macdonald, N. Murugesan, and J. S. Pachter, “Endothelial cell heterogeneity of blood-brain barrier gene expression along the cerebral microvasculature,” *J Neurosci Res*, vol. 88, no. 7, pp. 1457–1474, May 2010, doi: 10.1002/jnr.22316.
- [42] S. Ge, L. Song, and J. S. Pachter, “Where is the blood–brain barrier ... really?,” *J Neurosci Res*, vol. 79, no. 4, pp. 421–427, Feb. 2005, doi: 10.1002/jnr.20313.
- [43] P. R. Lockman *et al.*, “Heterogeneous Blood–Tumor Barrier Permeability Determines Drug Efficacy in Experimental Brain Metastases of Breast Cancer,” *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 23, pp. 5664–5678, Dec. 2010, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1564.
- [44] B. D. Allen and C. L. Limoli, “Breaking barriers: Neurodegenerative repercussions of radiotherapy induced damage on the blood-brain and blood-tumor barrier,” *Free Radic Biol Med*, vol. 178, pp. 189–201, Jan. 2022, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.12.002.
- [45] C. Santarosa *et al.*, “Dynamic contrast-enhanced and dynamic susceptibility contrast perfusion MR imaging for glioma grading:

- Preliminary comparison of vessel compartment and permeability parameters using hotspot and histogram analysis,” *Eur J Radiol*, vol. 85, no. 6, pp. 1147–1156, Jun. 2016, doi: 10.1016/j.ejrad.2016.03.020.
- [46] T. Glaser, I. Han, L. Wu, and X. Zeng, “Targeted Nanotechnology in Glioblastoma Multiforme,” *Front Pharmacol*, vol. 8, Mar. 2017, doi: 10.3389/fphar.2017.00166.
- [47] J. Kim, S. I. Ahn, and Y. T. Kim, “Nanotherapeutics engineered to cross the blood-brain barrier for advanced drug delivery to the central nervous system,” May 25, 2019, *Korean Society of Industrial Engineering Chemistry*. doi: 10.1016/j.jiec.2019.01.021.
- [48] W. M. Pardridge, “The blood-brain barrier: Bottleneck in brain drug development,” *NeuroRX*, vol. 2, no. 1, pp. 3–14, Jan. 2005, doi: 10.1602/neurorx.2.1.3.
- [49] A. Sarashina *et al.*, “Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in development for the treatment of type 2 diabetes mellitus: A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single and multiple escalating doses in healthy adult male japanese subjects,” *Clin Ther*, vol. 32, no. 6, pp. 1188–1204, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.clinthera.2010.06.004.
- [50] A. Jahangiri, A. T. Chin, P. M. Flanagan, R. Chen, K. Bankiewicz, and M. K. Aghi, “Convection-enhanced delivery in glioblastoma: a review of preclinical and clinical studies,” *J Neurosurg*, vol. 126, no. 1, pp. 191–200, Jan. 2017, doi: 10.3171/2016.1.JNS151591.
- [51] R. H. Bobo, D. W. Laske, A. Akbasak, P. F. Morrison, R. L. Dedrick, and E. H. Oldfield, “Convection-enhanced delivery of macromolecules in the brain,” *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 91, no. 6, pp. 2076–2080, Mar. 1994, doi: 10.1073/pnas.91.6.2076.
- [52] J. Punj *et al.*, “Sympathetic Blocks for Raynaud’s Phenomena in Pediatric Rheumatological Disorders,” *Pain Medicine*, vol. 23, no. 7, pp. 1211–1216, Jul. 2022, doi: 10.1093/pm/pnac015.

- [53] Y. Alyassin *et al.*, “Application of mesoporous silica nanoparticles as drug delivery carriers for chemotherapeutic agents,” *Drug Discov Today*, vol. 25, no. 8, pp. 1513–1520, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.drudis.2020.06.006.
- [54] N. McDannold, N. Vykhodtseva, and K. Hynynen, “Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Focused Ultrasound and Circulating Preformed Microbubbles Appears to Be Characterized by the Mechanical Index,” *Ultrasound Med Biol*, vol. 34, no. 5, pp. 834–840, May 2008, doi: 10.1016/j.ultrasmedbio.2007.10.016.
- [55] H. Brem *et al.*, “Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas,” *The Lancet*, vol. 345, no. 8956, pp. 1008–1012, Apr. 1995, doi: 10.1016/S0140-6736(95)90755-6.
- [56] Y. Chen and L. Liu, “Modern methods for delivery of drugs across the blood–brain barrier,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 64, no. 7, pp. 640–665, May 2012, doi: 10.1016/j.addr.2011.11.010.
- [57] W. A. Banks, “From blood–brain barrier to blood–brain interface: new opportunities for CNS drug delivery,” *Nat Rev Drug Discov*, vol. 15, no. 4, pp. 275–292, Apr. 2016, doi: 10.1038/nrd.2015.21.
- [58] W. M. Pardridge, “Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain,” *Front Aging Neurosci*, vol. 11, Jan. 2020, doi: 10.3389/fnagi.2019.00373.
- [59] H. Kadry, B. Noorani, and L. Cucullo, “A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity,” Dec. 01, 2020, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s12987-020-00230-3.
- [60] C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, and L. Bernardino, “Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases,” *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 34–47, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.044.
- [61] E. Barbu, É. Molnár, J. Tsibouklis, and D. C. Górecki, “The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood–brain

- barrier,” *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 6, no. 6, pp. 553–565, Jun. 2009, doi: 10.1517/17425240902939143.
- [62] D. M. Teleanu, C. Chircov, A. M. Grumezescu, A. Volceanov, and R. I. Teleanu, “Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology,” *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, p. 269, Dec. 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10040269.
- [63] D. Yohan and B. D. Chithrani, “Applications of Nanoparticles in Nanomedicine,” *J Biomed Nanotechnol*, vol. 10, no. 9, pp. 2371–2392, Sep. 2014, doi: 10.1166/jbn.2014.2015.
- [64] W. M. Pardridge, “A Historical Review of Brain Drug Delivery,” *Pharmaceutics*, vol. 14, no. 6, p. 1283, Jun. 2022, doi: 10.3390/pharmaceutics14061283.
- [65] B. Bhusban, *Springer Handbook of Nanotechnology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. doi: 10.1007/978-3-642-02525-9.
- [66] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, and F. Rizzolio, “The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine,” *Molecules*, vol. 25, no. 1, p. 112, Dec. 2019, doi: 10.3390/molecules25010112.
- [67] M. C. Roco, “Broader Societal Issues of Nanotechnology,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 5, no. 3–4, pp. 181–189, Aug. 2003, doi: 10.1023/A:1025548512438.
- [68] V. Wagner, A. Dullaart, A.-K. Bock, and A. Zweck, “The emerging nanomedicine landscape,” *Nat Biotechnol*, vol. 24, no. 10, pp. 1211–1217, Oct. 2006, doi: 10.1038/nbt1006-1211.
- [69] F. Eker *et al.*, “A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity,” *Molecules*, vol. 29, no. 15, p. 3482, Jul. 2024, doi: 10.3390/molecules29153482.
- [70] G. Chen, I. Roy, C. Yang, and P. N. Prasad, “Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy,” *Chem Rev*, vol. 116, no. 5, pp. 2826–2885, Mar. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00148.

- [71] S. M. Hosseini, J. Mohammadnejad, R. Najafi-Taher, Z. B. Zadeh, M. Tanhaei, and S. Ramakrishna, "Multifunctional Carbon-Based Nanoparticles: Theranostic Applications in Cancer Therapy and Diagnosis," *ACS Appl Bio Mater*, vol. 6, no. 4, pp. 1323–1338, Apr. 2023, doi: 10.1021/acsabm.2c01000.
- [72] G. Chen, I. Roy, C. Yang, and P. N. Prasad, "Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy," *Chem Rev*, vol. 116, no. 5, pp. 2826–2885, Mar. 2016, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00148.
- [73] B. , P. A. , & S. A. A. (Eds.) Fadeel, "Adverse effects of engineered nanomaterials: exposure, toxicology, and impact on human health. ," *Academic Press*, 2017.
- [74] A. T. Aborode *et al.*, "Nanomedicine in cancer therapy: Advancing precision treatments," *Adv Biomark Sci Technol*, vol. 6, pp. 105–119, 2024, doi: 10.1016/j.abst.2024.06.003.
- [75] A. T. Aborode *et al.*, "Nanomedicine in cancer therapy: Advancing precision treatments," *Adv Biomark Sci Technol*, vol. 6, pp. 105–119, 2024, doi: 10.1016/j.abst.2024.06.003.
- [76] D. L. Cooper, C. M. Conder, and S. Harirforoosh, "Nanoparticles in drug delivery: mechanism of action, formulation and clinical application towards reduction in drug-associated nephrotoxicity," *Expert Opin Drug Deliv*, vol. 11, no. 10, pp. 1661–1680, Oct. 2014, doi: 10.1517/17425247.2014.938046.
- [77] C. Sorrentino, S. L. Ciummo, C. Fieni, and E. Di Carlo, "Nanomedicine for cancer patient-centered care," *MedComm (Beijing)*, vol. 5, no. 11, Nov. 2024, doi: 10.1002/mco2.767.
- [78] F. Rodríguez *et al.*, "Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges," *Biomolecules*, vol. 12, no. 6, p. 784, Jun. 2022, doi: 10.3390/biom12060784.
- [79] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review,"

- Journal of Controlled Release*, vol. 65, no. 1–2, pp. 271–284, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00248-5.
- [80] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, and O. C. Farokhzad, “Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 66, pp. 2–25, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
- [81] D. OWENSIII and N. PEPPAS, “Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles,” *Int J Pharm*, vol. 307, no. 1, pp. 93–102, Jan. 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.010.
- [82] F. Alexis, E. Pridgen, L. K. Molnar, and O. C. Farokhzad, “Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles,” *Mol Pharm*, vol. 5, no. 4, pp. 505–515, Aug. 2008, doi: 10.1021/mp800051m.
- [83] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, “The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 63, no. 3, pp. 136–151, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.addr.2010.04.009.
- [84] C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, and L. Bernardino, “Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases,” *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 34–47, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.044.
- [85] N. Bertrand, J. Wu, X. Xu, N. Kamaly, and O. C. Farokhzad, “Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 66, pp. 2–25, Feb. 2014, doi: 10.1016/j.addr.2013.11.009.
- [86] C. Saraiva, C. Praça, R. Ferreira, T. Santos, L. Ferreira, and L. Bernardino, “Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases,” *Journal of Controlled Release*, vol. 235, pp. 34–47, Aug. 2016, doi: 10.1016/j.jconrel.2016.05.044.

- [87] N. A. Abdelsalam, A. T. Ramadan, M. T. ElRakaiby, and R. K. Aziz, "Toxicomicrobiomics: The Human Microbiome vs. Pharmaceutical, Dietary, and Environmental Xenobiotics," *Front Pharmacol*, vol. 11, Apr. 2020, doi: 10.3389/fphar.2020.00390.
- [88] M. L. Etheridge, S. A. Campbell, A. G. Erdman, C. L. Haynes, S. M. Wolf, and J. McCullough, "The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 1–14, Jan. 2013, doi: 10.1016/j.nano.2012.05.013.
- [89] D. Fan, Y. Cao, M. Cao, Y. Wang, Y. Cao, and T. Gong, "Nanomedicine in cancer therapy," Dec. 01, 2023, *Springer Nature*. doi: 10.1038/s41392-023-01536-y.
- [90] M. Khongkow, T. Yata, S. Boonrungsiman, U. R. Ruktanonchai, D. Graham, and K. Namdee, "Surface modification of gold nanoparticles with neuron-targeted exosome for enhanced blood–brain barrier penetration," *Sci Rep*, vol. 9, no. 1, p. 8278, Jun. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-44569-6.
- [91] A. K. Gupta and M. Gupta, "Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications," *Biomaterials*, vol. 26, no. 18, pp. 3995–4021, Jun. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.10.012.
- [92] C. R. Patra *et al.*, "Targeted Delivery of Gemcitabine to Pancreatic Adenocarcinoma Using Cetuximab as a Targeting Agent," *Cancer Res*, vol. 68, no. 6, pp. 1970–1978, Mar. 2008, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6102.
- [93] M. Simkó, M.-O. Mattsson, and R. A. Yokel, "Neurological System," in *Adverse Effects of Engineered Nanomaterials*, Elsevier, 2017, pp. 275–312. doi: 10.1016/B978-0-12-809199-9.00012-4.
- [94] Y. S. Park, "Tumor-Directed Targeting of Liposomes," *Biosci Rep*, vol. 22, no. 2, pp. 267–281, Apr. 2002, doi: 10.1023/A:1020190606757.
- [95] F. Juhairiyah and E. C. M. de Lange, "Understanding Drug Delivery to the Brain Using Liposome-Based Strategies: Studies that Provide Mechanistic

- Insights Are Essential,” *AAPS J*, vol. 23, no. 6, p. 114, Oct. 2021, doi: 10.1208/s12248-021-00648-z.
- [96] J. Kanoujia, A. Kishore, and P. Parashar, “Progress in Polymeric Micelles as Viable Wagons for Brain Targeting,” *Curr Pharm Des*, vol. 29, no. 2, pp. 116–125, Jan. 2023, doi: 10.2174/1381612829666221223101753.
- [97] P. Kaur *et al.*, “The Sojourn of Polymeric Micelles for Effective Brain Drug Delivery System,” *Curr Drug Deliv*, vol. 21, no. 1, pp. 65–79, Jan. 2024, doi: 10.2174/1567201820666230413082352.
- [98] L. Liu *et al.*, “Biologically active core/shell nanoparticles self-assembled from cholesterol-terminated PEG–TAT for drug delivery across the blood–brain barrier,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 10, pp. 1509–1517, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.014.
- [99] P. Samathoti, R. K. Kumarachari, S. P. N. Bukke, E. S. K. Rajasekhar, A. A. Jaiswal, and Z. Eftekhari, “The role of nanomedicine and artificial intelligence in cancer health care: individual applications and emerging integrations—a narrative review,” Dec. 01, 2025, *Springer Science and Business Media B.V.* doi: 10.1007/s12672-025-02469-4.
- [100] E. Lagreca, V. Onesto, C. Di Natale, S. La Manna, P. A. Netti, and R. Vecchione, “Recent advances in the formulation of PLGA microparticles for controlled drug delivery,” *Prog Biomater*, vol. 9, no. 4, pp. 153–174, Dec. 2020, doi: 10.1007/s40204-020-00139-y.
- [101] F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, and V. Préat, “PLGA-based nanoparticles: An overview of biomedical applications,” *Journal of Controlled Release*, vol. 161, no. 2, pp. 505–522, Jul. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.01.043.
- [102] M. Vert, J. Mauduit, and S. Li, “Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity,” *Biomaterials*, vol. 15, no. 15, pp. 1209–1213, Dec. 1994, doi: 10.1016/0142-9612(94)90271-2.
- [103] B. Semete *et al.*, “In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PLGA nanoparticles as drug delivery systems,” *Nanomedicine*, vol. 6, no. 5, pp. 662–671, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.nano.2010.02.002.

- [104] A. Zielińska *et al.*, “Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology,” *Molecules*, vol. 25, no. 16, p. 3731, Aug. 2020, doi: 10.3390/molecules25163731.
- [105] W. Xu, P. Ling, and T. Zhang, “Polymeric Micelles, a Promising Drug Delivery System to Enhance Bioavailability of Poorly Water-Soluble Drugs,” *J Drug Deliv*, vol. 2013, pp. 1–15, Jun. 2013, doi: 10.1155/2013/340315.
- [106] E. Reverchon, “Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products,” *J Supercrit Fluids*, vol. 10, no. 1, pp. 1–37, Apr. 1997, doi: 10.1016/S0896-8446(97)00014-4.
- [107] H. Fessi, F. Puisieux, J. Ph. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,” *Int J Pharm*, vol. 55, no. 1, pp. R1–R4, Oct. 1989, doi: 10.1016/0378-5173(89)90281-0.
- [108] George. Odian, *Principles of polymerization*. John Wiley & Sons, 2004.
- [109] G. Lambert, E. Fattal, and P. Couvreur, “Nanoparticulate systems for the delivery of antisense oligonucleotides,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 47, no. 1, pp. 99–112, Mar. 2001, doi: 10.1016/S0169-409X(00)00116-2.
- [110] S. Mourdikoudis, R. M. Pallares, and N. T. K. Thanh, “Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties,” *Nanoscale*, vol. 10, no. 27, pp. 12871–12934, 2018, doi: 10.1039/C8NR02278J.
- [111] D. Titus, E. James Jebaseelan Samuel, and S. M. Roopan, “Nanoparticle characterization techniques,” in *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, Elsevier, 2019, pp. 303–319. doi: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00012-5.
- [112] J. I. , N. D. E. , M. J. R. , R. N. W. , S. J. H. J. , & J. D. C. (2017). Goldstein, *Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis*. . Springer, 2017.
- [113] G. , Q. C. F. , & G. C. BINNING, “Atomic force microscope,” *Phys Rev Lett*, 1986.

- [114] A. Pasquini, G. B. Picotto, and M. Pisani, "STM carbon nanotube tips fabrication for critical dimension measurements," *Sens Actuators A Phys*, vol. 123–124, pp. 655–659, Sep. 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.02.036.
- [115] J. Stetefeld, S. A. McKenna, and T. R. Patel, "Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences," *Biophys Rev*, vol. 8, no. 4, pp. 409–427, Dec. 2016, doi: 10.1007/s12551-016-0218-6.
- [116] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, and J. Lyklema, "Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena," *J Colloid Interface Sci*, vol. 309, no. 2, pp. 194–224, May 2007, doi: 10.1016/j.jcis.2006.12.075.
- [117] R. Xu, "Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement," *Particuology*, vol. 6, no. 2, pp. 112–115, Apr. 2008, doi: 10.1016/j.partic.2007.12.002.
- [118] R. Edmondson, J. J. Broglie, A. F. Adcock, and L. Yang, "Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors," *Assay Drug Dev Technol*, vol. 12, no. 4, pp. 207–218, May 2014, doi: 10.1089/adt.2014.573.
- [119] D. Antoni, H. Burckel, E. Josset, and G. Noel, "Three-Dimensional Cell Culture: A Breakthrough in Vivo," *Int J Mol Sci*, vol. 16, no. 3, pp. 5517–5527, Mar. 2015, doi: 10.3390/ijms16035517.
- [120] J. Friedrich, C. Seidel, R. Ebner, and L. A. Kunz-Schughart, "Spheroid-based drug screen: considerations and practical approach," *Nat Protoc*, vol. 4, no. 3, pp. 309–324, Mar. 2009, doi: 10.1038/nprot.2008.226.
- [121] J.-K. Yoon, "Advanced 3D Cell Culture Platform for Tissue Engineering," *Tissue Eng Regen Med*, vol. 20, no. 4, pp. 519–521, Jul. 2023, doi: 10.1007/s13770-023-00562-9.
- [122] Y. Fang and R. M. Eglen, "Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development," *SLAS Discovery*, vol. 22, no. 5, pp. 456–472, Jun. 2017, doi: 10.1177/1087057117696795.

- [123] Y. Fang and R. M. Eglen, "Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development," *SLAS Discovery*, vol. 22, no. 5, pp. 456–472, Jun. 2017, doi: 10.1177/1087057117696795.
- [124] K. Duval *et al.*, "Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture," *Physiology*, vol. 32, no. 4, pp. 266–277, Jul. 2017, doi: 10.1152/physiol.00036.2016.
- [125] C. Jensen and Y. Teng, "Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture?," *Front Mol Biosci*, vol. 7, Mar. 2020, doi: 10.3389/fmolb.2020.00033.
- [126] M. Ravi, V. Paramesh, S. R. Kaviya, E. Anuradha, and F. D. P. Solomon, "3D Cell Culture Systems: Advantages and Applications," *J Cell Physiol*, vol. 230, no. 1, pp. 16–26, Jan. 2015, doi: 10.1002/jcp.24683.
- [127] E. Fennema, N. Rivron, J. Rouwkema, C. van Blitterswijk, and J. de Boer, "Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues," *Trends Biotechnol*, vol. 31, no. 2, pp. 108–115, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.tibtech.2012.12.003.
- [128] M. Vinci *et al.*, "Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation," *BMC Biol*, vol. 10, no. 1, p. 29, Dec. 2012, doi: 10.1186/1741-7007-10-29.
- [129] J. M. Kelm, N. E. Timmins, C. J. Brown, M. Fussenegger, and L. K. Nielsen, "Method for generation of homogeneous multicellular tumor spheroids applicable to a wide variety of cell types," *Biotechnol Bioeng*, vol. 83, no. 2, pp. 173–180, Jul. 2003, doi: 10.1002/bit.10655.
- [130] Y.-C. Tung, A. Y. Hsiao, S. G. Allen, Y. Torisawa, M. Ho, and S. Takayama, "High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array," *Analyst*, vol. 136, no. 3, pp. 473–478, 2011, doi: 10.1039/C0AN00609B.
- [131] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue," *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 8, no. 10, pp. 839–845, Oct. 2007, doi: 10.1038/nrm2236.

- [132] I. Van Zundert, B. Fortuni, and S. Rocha, "From 2D to 3D Cancer Cell Models—The Enigmas of Drug Delivery Research," *Nanomaterials*, vol. 10, no. 11, p. 2236, Nov. 2020, doi: 10.3390/nano10112236.
- [133] O. Chaudhuri, J. Cooper-White, P. A. Janmey, D. J. Mooney, and V. B. Shenoy, "Effects of extracellular matrix viscoelasticity on cellular behaviour," *Nature*, vol. 584, no. 7822, pp. 535–546, Aug. 2020, doi: 10.1038/s41586-020-2612-2.
- [134] S. J. Hollister, "Porous scaffold design for tissue engineering," *Nat Mater*, vol. 4, no. 7, pp. 518–524, Jul. 2005, doi: 10.1038/nmat1421.
- [135] C. Carvalho *et al.*, "Doxorubicin: The Good, the Bad and the Ugly Effect," *Curr Med Chem*, vol. 16, no. 25, pp. 3267–3285, Sep. 2009, doi: 10.2174/092986709788803312.
- [136] Y. (Chezy) Barenholz, "Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned," *Journal of Controlled Release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, Jun. 2012, doi: 10.1016/j.jconrel.2012.03.020.
- [137] S. M. Swain, F. S. Whaley, and M. S. Ewer, "Congestive heart failure in patients treated with doxorubicin," *Cancer*, vol. 97, no. 11, pp. 2869–2879, Jun. 2003, doi: 10.1002/cncr.11407.
- [138] A. Rahdar, M. R. Hajinezhad, H. Hamishekar, A. Ghamkhari, and G. Z. Kyzas, "Copolymer/graphene oxide nanocomposites as potential anticancer agents," *Polymer Bulletin*, vol. 78, no. 9, pp. 4877–4898, Sep. 2021, doi: 10.1007/s00289-020-03354-6.
- [139] P. K. Panda *et al.*, "Synthesis and physicochemical properties of doxorubicin-loaded PEGA containing amphiphilic block polymeric micelles," *Journal of Polymer Research*, vol. 31, no. 10, p. 306, Oct. 2024, doi: 10.1007/s10965-024-04153-7.
- [140] A. Gabizon, H. Shmeeda, and Y. Barenholz, "Pharmacokinetics of Pegylated Liposomal Doxorubicin," *Clin Pharmacokinet*, vol. 42, no. 5, pp. 419–436, 2003, doi: 10.2165/00003088-200342050-00002.
- [141] Cancer Research UK, "Doxorubicin – Side Effects."

- [142] Q. Zheng *et al.*, "Borneol, a messenger agent, improves central nervous system drug delivery through enhancing blood–brain barrier permeability: a preclinical systematic review and meta-analysis," *Drug Deliv*, vol. 25, no. 1, pp. 1617–1633, Jan. 2018, doi: 10.1080/10717544.2018.1486471.
- [143] M. Daeihamed, A. Haeri, and S. Dadashzadeh, "A Simple and Sensitive HPLC Method for Fluorescence Quantitation of Doxorubicin in Micro-volume Plasma: Applications to Pharmacokinetic Studies in Rats.," *Iran J Pharm Res*, vol. 14, no. Suppl, pp. 33–42, 2015.
- [144] G. A. Shabir, "Prepare a Protocol Validation Assay Testing for Impurities Identification Characteristics."
- [145] "INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1)."
- [146] "ICH Topic Q 1 A (R2) Stability Testing of new Drug Substances and Products Step 5 NOTE FOR GUIDANCE ON STABILITY TESTING: STABILITY TESTING OF NEW DRUG SUBSTANCES AND PRODUCTS," 2003. [Online]. Available: <http://www.emea.eu.int>
- [147] S. D'Souza, "A Review of *In Vitro* Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms," *Advances in Pharmaceutics*, vol. 2014, pp. 1–12, Nov. 2014, doi: 10.1155/2014/304757.
- [148] B. C. Garms *et al.*, "Evaluating the effect of synthesis, isolation, and characterisation variables on reported particle size and dispersity of drug loaded PLGA nanoparticles," *Mater Adv*, vol. 2, no. 17, pp. 5657–5671, 2021, doi: 10.1039/D1MA00410G.
- [149] S. D'Souza, "A Review of In Vitro Drug Release Test Methods for Nano-Sized Dosage Forms ," *Advances in Pharmaceutics*, vol. 2014, pp. 1–12, Nov. 2014, doi: 10.1155/2014/304757.

- [150] J. Ahlstedt *et al.*, “Evaluating vacquinol-1 in rats carrying glioblastoma models RG2 and NS1,” *Oncotarget*, vol. 9, no. 9, pp. 8391–8399, Feb. 2018, doi: 10.18632/oncotarget.23842.
- [151] A. F. Haddad *et al.*, “Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies,” *Neurooncol Adv*, vol. 3, no. 1, Jan. 2021, doi: 10.1093/noajnl/vdab100.
- [152] İ. Ünlü, İ. Özdemir, and M. C. Tuncer, “Napabucasin Inhibits Proliferation and Migration of Glioblastoma Cells (U87) by Regulating JAK2/STAT3 Signaling Pathway,” *Medicina (Lithuania)*, vol. 60, no. 10, Oct. 2024, doi: 10.3390/medicina60101715.
- [153] G. Varan, V. Patrulea, G. Borchard, and E. Bilensoy, “Cellular interaction and tumoral penetration properties of cyclodextrin nanoparticles on 3D breast tumor model,” *Nanomaterials*, vol. 8, no. 2, Feb. 2018, doi: 10.3390/nano8020067.
- [154] G. Benton, I. Arnaoutova, J. George, H. K. Kleinman, and J. Koblinski, “Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research,” Dec. 15, 2014, *Elsevier B.V.* doi: 10.1016/j.addr.2014.06.005.
- [155] S. Digiovanni *et al.*, “Blood-brain barrier permeability increases with the differentiation of glioblastoma cells in vitro,” *Fluids Barriers CNS*, vol. 21, no. 1, p. 89, Nov. 2024, doi: 10.1186/s12987-024-00590-0.
- [156] A. Naseem *et al.*, “Intracellular Metabolomics Identifies Efflux Transporter Inhibitors in a Routine Caco-2 Cell Permeability Assay—Biological Implications,” *Cells*, vol. 11, no. 20, p. 3286, Oct. 2022, doi: 10.3390/cells11203286.
- [157] D. Watanabe *et al.*, “Characterization of a Primate Blood-Brain Barrier Co-Culture Model Prepared from Primary Brain Endothelial Cells, Pericytes and Astrocytes,” *Pharmaceutics*, vol. 13, no. 9, p. 1484, Sep. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13091484.

- [158] Z. Zheng, C. W. Humphrey, R. S. King, and J. L. Richard, "Validation of an ELISA test kit for the detection of total aflatoxins in grain and grain products by comparison with HPLC."
- [159] R. S. Ferraz *et al.*, "Validation of a UV-spectrophotometric analytical method for determination of LPSF/AC04 from inclusion complex and liposomes," *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 51, no. 1, pp. 183–191, Jan. 2015, doi: 10.1590/S1984-82502015000100018.
- [160] E. Pisani, E. Fattal, J. Paris, C. Ringard, V. Rosilio, and N. Tsapis, "Surfactant dependent morphology of polymeric capsules of perfluorooctyl bromide: Influence of polymer adsorption at the dichloromethane–water interface," *J Colloid Interface Sci*, vol. 326, no. 1, pp. 66–71, Oct. 2008, doi: 10.1016/j.jcis.2008.07.013.
- [161] R. Dinarvand, nima Sepehri, Manouchehri, Rouhani, and F. Atyabi, "Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents," *Int J Nanomedicine*, p. 877, Apr. 2011, doi: 10.2147/IJN.S18905.
- [162] R. Singh and J. W. Lillard, "Nanoparticle-based targeted drug delivery," *Exp Mol Pathol*, vol. 86, no. 3, pp. 215–223, Jun. 2009, doi: 10.1016/j.yexmp.2008.12.004.
- [163] M. Danaei *et al.*, "Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 2, p. 57, May 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020057.
- [164] K. Kataoka *et al.*, "Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)–poly(β -benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance," *Journal of Controlled Release*, vol. 64, no. 1–3, pp. 143–153, Feb. 2000, doi: 10.1016/S0168-3659(99)00133-9.
- [165] G. Ling *et al.*, "Development of novel self-assembled DS-PLGA hybrid nanoparticles for improving oral bioavailability of vincristine sulfate by P-gp inhibition," *Journal of Controlled Release*, vol. 148, no. 2, pp. 241–248, Dec. 2010, doi: 10.1016/j.jconrel.2010.08.010.
- [166] I. Takeuchi, K. Tomoda, A. Hamano, and K. Makino, "Effects of physicochemical properties of poly(lactide-co-glycolide) on drug release

behavior of hydrophobic drug-loaded nanoparticles,” *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, vol. 520, pp. 771–778, May 2017, doi: 10.1016/j.colsurfa.2017.02.054.

- [167] H. Song *et al.*, “Enhanced permeability of blood–brain barrier and targeting function of brain via borneol-modified chemically solid lipid nanoparticle,” *Int J Nanomedicine*, vol. Volume 13, pp. 1869–1879, Mar. 2018, doi: 10.2147/IJN.S161237.

