



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü



**KARMUSTİN YÜKLÜ KATI LİPİD
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BEYİN KANSERİ
HÜCRE HATTINDA İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Didem AKSU

Biyokimya Anabilim Dalı

İzmir
2019

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

**KARMUSTİN YÜKLÜ KATI LİPİD
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BEYİN KANSERİ
HÜCRE HATTINDA İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Didem AKSU

Danışman(lar) : Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Biyokimya Anabilim Dalı
Biyokimya Yüksek Lisans Programı

İzmir
2019

Didem AKSU tarafından Yüksek lisans tezi olarak sunulan “KARMUSTİN YÜKLÜ KATI LİPİD NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI, KARAKTERİZASYONU VE BEYİN KANSERİ HÜCRE HATTINDA İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06.08.19 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı

: Prof. Dr. Feray Sarlıca

İmza

.....

Raportör Üye

: Prof. Dr. Feray Sarlıca

.....

Üye

: Prof. Dr. Gülşah SANLI
MOHAMED

.....



EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI**

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Karmustin Yüklü Katı Lipid Nanopartiküllerin Hazırlanması, Karakterizasyonu ve Beyin Kanseri Hücre Hattında İn Vitro Etkinliğinin Araştırılması” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06 / 08 / 2019

İmzası


Didem AKSU



ÖZET

**KARMUSTİN YÜKLÜ KATI LİPİD
NANOPARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI,
KARAKTERİZASYONU VE BEYİN KANSERİ HÜCRE
HATTINDA İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI**

AKSU, Didem

Yüksek Lisans Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şenay ŞANLIER

Ağustos 2019, 60 sayfa

Dünya çapında meydana gelen ölümlerin ikincil sebebi olan kanser, hücrelerin bölünme yeteneklerinin farklılaşması ve çevre dokulara yayılma gibi özellikler ile karakterize edilen bir hastalıktır. Glioblastoma, merkezi sinir sistemi onkolojik hastalıkları arasında bulunmakta ve primer beyin tümörlerinin % 30' unu oluşturmaktadır. Yaygın olarak yetişkenlerde görülen, invaziv ve agresif özellikte bir beyin tümörüdür. Cerrahi müdahale, radyasyon ve kemoterapi tedavi seçenekleri arasındadır, ayrıca son yıllarda immunoterapi ile tedavi potansiyeli araştırılmaktadır. Kullanılan tedavi yöntemlerinin yan etkileri ve tedavi sonrası sağ kalım oranlarının düşük olması sebebiyle ilaç taşıyıcı sistemler gibi yeni tedavi seçeneklerinin kullanımına ihtiyaç duyulmuştur.

Bu çalışmada glioblastoma tedavisinde kullanılan anti-kanser ajanı olan karmustini içeren katı lipid nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu yapılmış, oluşturulan sistemin in vitro etkinliği araştırılmıştır. Nanopartiküllerin kan-beyin bariyerinden geçişi için beyin endotel hücrelerinde bulunan MCT-1 reseptörüyle etkileşmeyi sağlayacak stearilamin/ β -Hidroksi bütirat konjugatı sentezlenmiştir. Ayrıca nanoyapının sentezi sırasında kan-beyin bariyerini aşmada yardımcı olduğu bilinen Tween 80 ile katı lipid nanopartiküllerin yüzeyleri kaplanmıştır. Karmustin içeren katı lipid nanopartiküller için optimum ilaç miktarı

0,1 mg/ml olarak belirlenmiştir. Nanoyapıların boyutu zeta boyut ölçüm cihazı ve SEM analizi ile belirlenmiş ve zeta potansiyel analizi yapılmıştır. Karakterizasyonu yapılan katı lipid nanopartiküllerin U87-MG-luc hücreleri üzerindeki sitotoksikite denemeleri sonucunda 48. ve 72. saat IC₅₀ değeri sırasıyla 353,4 and 442,3 µg/ml olarak tespit edilmiştir.

Yapılan çalışmalar sonucunda karmustin içeren katı lipid nanopartiküllerin beyin kanseri hücre hattı üzerinde etkili sitotoksik potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Glioblastoma, katı lipid nanopartikül, karmustin, kan-beyin bariyeri, β-hidroksi bütirat, Tween 80.

ABSTRACT

**CARMUSTINE LOADED SOLID LIPID NANOPARTICLES
PREPARATION, CHARACTERIZATION AND
INVESTIGATION OF IN VITRO ACTIVITY IN BRAIN
CANCER CELL LINE**

AKSU, Didem

MSc in Biochemistry.

Supervisor: Prof. Dr. Senay SANLIER

August 2019, 60 pages

Cancer, a secondary cause of worldwide death, is a disease characterized by differentiation of division capabilities of cells and spreading to surrounding tissues. Glioblastoma is one of the central nervous system oncological diseases and constitutes 30 % of primary brain tumors. It is an invasive and aggressive brain tumor that is commonly seen in adults. Surgical intervention, radiation, and chemotherapy are among the treatment options, and in recent years the potential for treatment with immunotherapy has been investigated. As a result of the side effects of the treatment methods that are used and the low survival rates after the therapy, new treatment options such as drug delivery systems were needed.

In this study, the synthesis and characterization of solid lipid nanoparticles containing carmustine which is the anti-cancer agent used in the treatment of glioblastoma were investigated. In order to the passage of nanoparticles through the blood-brain barrier, stearylamine / β -Hydroxybutyrate conjugate has been synthesized to allow interaction of the MCT-1 receptor in brain endothelial cells. Furthermore, during the synthesis of the nanostructure, the surfaces of solid lipid nanoparticles were coated with Tween 80, which is known to help pass through the blood-brain barrier. The optimum amount of drug for solid lipid nanoparticles containing carmustine was 0.1 mg/ml. The size of the nanostructures was measured by zeta size measurement device and SEM analysis, also zeta potential

analysis was performed. The characterized solid lipid nanoparticles on the U87-MG-luc cells, as a result of the cytotoxicity of the 48th and 72th hour IC_{50} value were respectively determined 353,4 and 442,3 $\mu\text{g/ml}$.

As a result of conducted studies, solid lipid nanoparticles containing carmustine are thought to have effective cytotoxic potential on the brain cancer cell line.

Keywords: Glioblastoma, solid lipid nanoparticle, carmustine, blood-brain barrier, β -hydroxy butyrate, Tween 80.





ÖNSÖZ

Çağımızın en önemli sağlık problemlerinden biri olan kanser tedavisi seçeneği ve tedaviye yanıt sınırlılığı bulunduğu için birçok kişinin hayatını kaybetmesine neden olmaktadır. Kanser türleri arasında en ölümcül olan glioblastomada, birçok tedavi seçeneğinin kombine olarak kullanılmasına rağmen etkili bir sonuç elde edilememektedir. Bu gibi sorunlardan dolayı nanoteknolojik yöntemler hedefe yönelik tedavi seçeneği sunduğu için tedavide umut vaat etmektedir. Bu amaçla ilaç taşıyıcı sistemlerden biri olan katı lipid nanopartiküllere kemoterapötik ajan olan karmustin yüklenmiştir. Bu nanoyapının beyin kaseri epitel hücrelerindeki taşıyıcılardan biri olan MCT 1'i hedefleyebilmesi ve KBB'den geçişi kolaylaştırmak için konjugat sentezlenmiştir. Bu konjugat β -Hidroksibütirat gibi bir ketonkoru içermekte ve geçişte hedeflemeyi sağlamaktadır. Stearilamin ise nanoyapının stabilitesini arttırmak için tercih edilmiştir. Bu çalışmalar süresince nanoyapılarının sentezi ve hedefli tedavinin hücre hatları üzerindeki potansiyel etkisi hakkında çeşitli tecrübeler elde ettim.

İZMİR

06/08/2019

Didem AKSU



İÇİNDEKİLERSayfa

İÇ KAPAK.....	iii
KABUL ONAY SAYFASI.....	v
ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI.....	vii
ÖZET	ix
ABSTRACT.....	xi
ÖNSÖZ	xiv
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xx
TABLolar DİZİNİ.....	xxii
ŞİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Glioblastoma	2
2.2 Glioblastomaya Yönelik Tedavi Yaklaşımları.....	5

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
2.2.1 Cerrahi Müdahale	6
2.2.2 Radyoterapi.....	6
2.2.3 Kemoterapi	7
2.2.4 İmmünoterapi.....	8
2.3 Kan- Beyin Bariyeri.....	8
2.4 Glioblastomada Kan- Beyin Bariyerinden Geçiş Stratejileri.....	12
2.4.1 Epiteliyal Hücrelerde Bulunan Sıkı Bağlantıların Açılması.....	12
2.4.2 Aktif Taşıyıcıların İnhibisyonu	13
2.4.3 Lokal Tedaviler ile İlaç Geçişini Arttırma.....	13
2.4.4 Reseptör Aracılı Transitoz.....	14
2.5 Monokarboksilat Taşıyıcıları ve Kan Beyin Bariyerinden Geçiş.....	15
2.6 Nanoteknolojik Yaklaşımlar ile Kan-Beyin Bariyerinden Geçiş Stratejileri	16
2.7 Katı Lipid Nanopartiküller	18
2.7.1 Yüksek Kesimli Homojenizasyon ve Ultrasonikasyon	22
2.8 Karmustin	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26

İÇİNDEKİLER (devam)

	<u>Sayfa</u>
3.1 Stearilamin (SA) ve β -hidroksibütirat (HBA) konjugasyonu	26
3.2 Katı Lipid Nanopartikül Sentezi	27
3.2.1 Katı Lipid Nanopartiküllerde İlaç Miktarı Optimizasyonu.....	27
3.3 <i>İn vitro</i> İlaç Salımı	28
3.4 Hücre Kültürü	28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	29
4.1 Stearilamin (SA) ve β -hidroksibütirat (HBA) konjugasyonu	29
4.2 Katı Lipid Nanopartikül Karakterizasyonu.....	31
4.2.1 Katı Lipid Nanopartiküllerde İlaç Miktarı Optimizasyonu.....	33
4.3 <i>İn Vitro</i> İlaç Salımı	38
4.4 Hücre Kültürü	39
5 GENEL DEĞERLENDİRME.....	43
KAYNAKLAR DİZİNİ.....	45
TEŞEKKÜR.....	60



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 WHO'ya ait 2007 ve 2016 yılındaki merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması.....	4
2.2 Glioblastoma tedavisinde kullanılan tedavi yaklaşımları	5
2.3.1 Kan beyin bariyeri gösterimi	9
2.3.2 KBTB oluşumunun aşamaları: a) birinci evre, b) ikinci evre, ve c) üçüncü evre	11
2.5.1 Katı lipid nanopartikül yapısı	20
2.5.2 Katı lipid nanopartiküllerin hazırlanmasında çoğunlukla kullanılan lipidler ve kullanım yüzdeleri	21
2.5.3 Katı lipid nanopartiküllerin sentezinde çoğunlukla kullanılan stabilize edici ajanlar ve kullanım yüzdeleri	21
2.6 Yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniğinin şematik gösterimi.....	23
2.8.1 Karmustin (BCNU) kimyasal formülü	24
2.8.2 Karmustin etki mekanizması.....	25
4.1 EDC-NHS kimyası ile sentezlenen konjugatın FTIR spekturumu.....	30
4.2 İlaç içermeyen SLN karakterizasyon analizi sonuçları a)SLN zeta potansiyel grafiği, b) SLN'ye ait SEM görüntüsü, c) SLN'ye ait FTIR spekturumu	32

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
4.2.1 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait zeta boyut analizi sonuçları a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN.....	34
4.2.2 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait zeta potansiyel analizi sonuçları a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN.....	35
4.2.3 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait SEM analiz görüntüleri a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN.....	36
4.2.4 BCNU-SLN karakterizasyon analizi sonuçları a)BCNU-SLN zeta potansiyel grafiği, b) BCNU-SLN'ye ait SEM görüntüsü, c) BCNU-SLN'ye ait FTIR spektrumu, d)BCNU-SLN'ye ait boyut dağılım grafiği.....	38
4.3 BCNU-SLN'ye ait in vitro ilaç salım grafiği.....	39
4.4.1 MTT sitotoksisite testine göre 48. saat % canlılık grafikleri a) BCNU yüklü ilaç taşıyıcı sistem b) Serbest BCNU.....	41
4.4.2 MTT sitotoksisite testine göre 72. saat % canlılık grafikleri a) BCNU yüklü ilaç taşıyıcı sistem b) Serbest BCNU.....	42



TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.5 İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan katı lipid nanopartiküllerin avantajları ve dezavantajları.....	19
4.2.1 Farklı konsantrasyonlarda ilaç yüklenerek sentezlenen BCNU-SLN'lere ait adsorplanan ilaç miktarları (μg ilaç/ mg SLN) ve enkapsülasyon verimleri (%)......	33
4.4 U87-MG-luc hücre hattında 48. ve 72. Saat için serbest BCNU ve BCNU-SLN sitotoksosite testi sonucu elde edilen IC50 değerleri.....	40



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**Simgeler** **Açıklama**

nm nanometre

mg miligram

ml mililitre

°C santigrat derece

g gram

% yüzde

mV milivolt

Kısaltmalar

BCNU Karmustin

BCRP Göğüs Kanseri Hücre Direnç Proteini

CCNU Lomustin

CEC Serebral Endoteliyal Hücreler

DMSO Dimetilsülfooksit

EGFR Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü

EPR Arttırılmış Alıkonma Etkisi

FDA Gıda ve İlaç Dairesi

GBM	Glioblastoma Multiform
GLUT	Glikoz Taşıyıcıları
GM1	Monosialogangliosid
HBA	β - hidoksibütirat
HPI	Hidrojenlenmiş Fosfatidilinositol
IDH	İzositrat dehidrogenaz
IR	İnsülin Reseptörleri
KBB	Kan Beyin Bariyeri
KBTB	Kan Beyin Tümör Bariyeri
LDLR	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein Reseptörleri
MCT	Monokarboksilat taşıyıcıları
MGMT	O ⁶ -Metilguanin DNA Metil Transferaz
MRP4	Çoklu ilaç protein
nAChR	Substrat Seçici Olan Nikotinik Asetilkolin Reseptörleri
PEG	Polietilen glikol
P-gp	P-glikoprotein
PTEN	Fosfat ve Tensin Homoloğu
RES	Retikulo Endotelial Sistem
RT	Radyoterapi

SLN	Katı Lipid Nanopartiküller
TCGA	Kanser Genom Atlas Projesi
Tf	Transferrin
Tfr	Transferrin Reseptörleri
TJ	Sıkı Bağlantılar
TMZ	Temozolomid
TPM	Transferrin Modifiye Paklitaksel Yüklü Miseller
WHO	Dünya Sağlık Örgütü



1. GİRİŞ

Glioblastoma (GBM), sınırlı tedavi seçeneklerine sahip ve ölümcül kanserler arasında yer alan yaygın olarak görülen kanser türlerinden biridir. GBM tedavisinde kullanılan tedavi yaklaşımlarının (kemoterapi, radyoterapi ve cerrahi müdahale) dezavantajları etkin stratejilerin geliştirilmesini gerekli kılmıştır. Tedavide kullanılan ilaçların kan beyin bariyerinden geçişinde karşılaşılan zorluklar, ilacın hedeflenen bölgede yeterli konsantrasyona ulaşamaması ve tedavi sonrası oluşan yan etkiler araştırmacıların ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımını arttırmaya yönelik çalışmalarda bulunmasına neden olmuştur.

Çalışmada GBM tedavisinde sıklıkla kullanılan oral alkilleyici bir kematerapötik ajan olan karmustin tercih edilmiştir. Karmustin, DNA'ya bağlanarak transkripsiyon ve replikasyonu durdurarak etki göstermekte ve tedavide kullanımı sonucunda sağ kalım oranını ortalama 2.5 ay arttırmaktadır. Geleneksel yaklaşımların tedavide yetersiz kalmasından dolayı etkili bir tedavi yaklaşımı için karmustin ilacını içeren katı lipid nanopartiküllerin sentezlenmesi ve beyin kanseri hücre hattındaki etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Sentezlenen katı lipid nanopartiküllerin kan-beyin bariyerini geçebilmesi için ilaç organik fazın içerisine β -hidroksi bütirat ve stearyl amin ile konjuge edilerek eklenecek ayrıca sentez aşamasında katı lipid nanopartiküllerin yüzeyi Tween 80 ile kaplanacaktır.

Literatürde karmustin içeren katı lipid nanopartiküllere ait çalışmalar bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda kullanılan sentez yöntemleri farklı ve kullanımları sınırlıdır. Bu çalışma için seçilen ilaç taşıyıcı sistemin hazırlanma ve kimyasal malzemelerin temininin kolaylığı klinik uygulamalarda kullanılabilirliğini arttırmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Glioblastoma

Glioma, glial hücre kaynaklı olan ve merkezi sinir sistemi tümörleri de dahil olmak üzere çoğu beyin tümörlerini kapsayan genel bir terimdir (Schwartzbaum et al., 2006; Anjum et al., 2017). Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yaptığı sınıflandırmada glioma çeşitli faktörler baz alınarak (mitoz oranı, nekroz varlığı ve vasküler proliferasyon vb.) dört sınıfa ayrılmakta ve dereceler malignite artışı hakkında bilgi vermektedir. Yapılan sınıflandırmada, astrositik tümörler (astrocitom-derece I ve II; anaplastik astrositom-derece III; glioblastoma-derece IV), ependimomlar, oligodendrogliomalar ve karma gliomaları içermektedir (Brown et al., 2010; Weller et al., 2015; Anjum et al., 2017). Bu sınıflandırma içerisinde yer alan glioblastoma multiform (GBM), merkezi sinir sistemi beyin tümörleri içerisinde malignitesi yüksek ve yaklaşık 8 ila 15 aylık ortalama sağ kalım oranına sahip olan yaygın bir hastalıktır (Vredenburgh et al., 2007; Anjum et al., 2017; Fernandes et al., 2019).

GBM tanısı konulan hastalarda yaşa bağlı olarak hastalığın insidansının arttığı gözlenmiştir. GBM, yaş aralığı 0-19 olan kişilerde tüm beyin tümörlerinin % 3 'ünü oluşturmakta ve yaş ortalaması yaklaşık 64 olan yetişkinlerde daha sık rastlanmaktadır. Ayrıca hastalık erkeklerde kadınlara oranla daha çok görülmektedir (Thakkar et al., 2014; Weller et al., 2015; Fernandes et al., 2019).

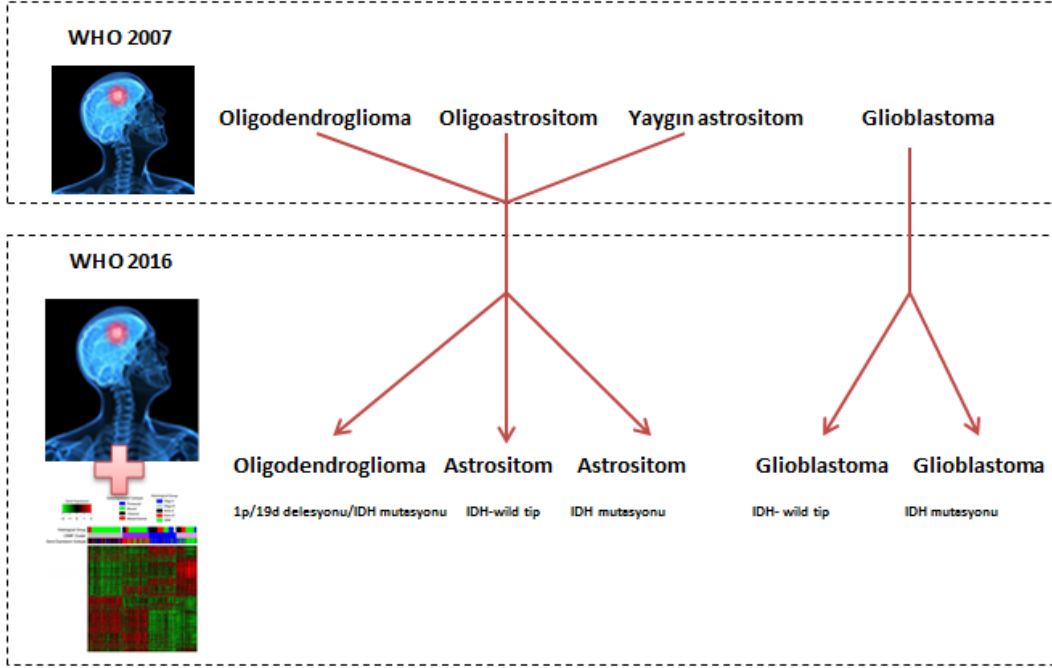
GBM etiyolojisi araştırılırken pek çok etken incelenmiştir. GBM oluşumunda terapötik dozda iyonlaştırıcı radyasyonun etkisi kesinleşen nedenler arasındadır. Salvati (2003) ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 1960'lı yıllardan itibaren radyoterapinin GBM ile bağlantısını içeren yaklaşık 116 vakadan 10 tanesi incelenmiş ve terapi sonrası GBM oluşma riski % 2,5 olarak hesaplanmıştır (Hanif et al., 2017). Çocuklarda primer beyin tümörleri ve yetişkinlerde iyi huylu

tümörlerin tedavisinde kullanılan yüksek dozda radyasyonun da riski arttırabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Weller et al., 2015). Nagazaki ve Hiroşima'da atom bombasına maruz kalan kişilerde iyonize edici radyasyon ve beyin tümörü artışını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Buna örnek olarak, Yonehara ve arkadaşlarının 1958 ve 1995 yılları arasındaki vakaları kapsayan kohort çalışmasında, en sık meningiomlara rastlanırken, 44 vakada glioma ve nöroepiteliyaller ve 13 vakada spesifik GBM tespit edilmiştir (Prasad and Haas-Koogan, 2009; Hanif et al., 2017). Ayrıca, cep telefonu kullanımı ve elektromanyetik alana maruz kalma, sigara tüketimi ve ağır kafa travmaları gibi çevresel risk faktörleri ile artan GBM insidansları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (Weller et al., 2015; Hanif et al., 2017).

Glioblastomaların sınıflandırmasının yapılması, yüksek genetik ve patolojik heterojeniteye sahip olmalarından dolayı oldukça zordur. Kanser Genom Atlas (TCGA) projesi ve genomik analizlerle genetik olarak karmaşık bir yapıya sahip olan glioblastomada patogenezi tetikleyen üç temel sinyal yolu (p53, reseptör tirozin kinaz / Ras / fosfoinositid 3-kinaz ve retinoblastoma) tanımlanmıştır. GBM' ler klinik düzeyde primer ve sekonder olarak ayrılmasına rağmen, hücrelerde kontrolsüz proliferasyon, yüksek hücre sağ kalımı ve tümör hücresinin hücre döngüsü ve apoptoz yollarından kaçışı gibi ortak özellikleri taşımaktadırlar.

Klinik düzeyde benzerlik taşıyan bu iki glioblastoma türünü, moleküler düzeydeki farklılıklar birbirinden ayırmaktadır. Primer GBM'de, epidermal büyüme faktörü reseptörü (EGFR) gen mutasyonu, fosfat ve tensin homologu (PTEN) mutasyonları ve 10q kromozom kaybı ayırt edici genetik değişikliklerdir. Sekonder GBM' de ise p53 mutasyonları, kromozom 19q kaybı ve izositrat dehidrojenaz 1 (IDH) mutasyonları ayırt edicidir (Wang et al., 2015; Davis, 2016; Hanif et al., 2017). Bunun yanı sıra IDH mutasyonu ile açıklanamayan GBM türleride bulunmaktadır. Bunlardan biri GBM hastalarında tedavinin belirlenmesinde önemli marker olan O⁶-metilguanin DNA metiltransferaz

(MGMT) promoterinin metilasyonudur. MGMT promoter-metillenmiş GBM hastalarında temozolamid ajanı ile tedavide başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Brighi et al., 2018). WHO' nun 2007 ve 2016'daki verilerine göre merkezi sinir sistemi tümörlerinin sınıflandırılması Şekil 2.1.' de gösterilmektedir.

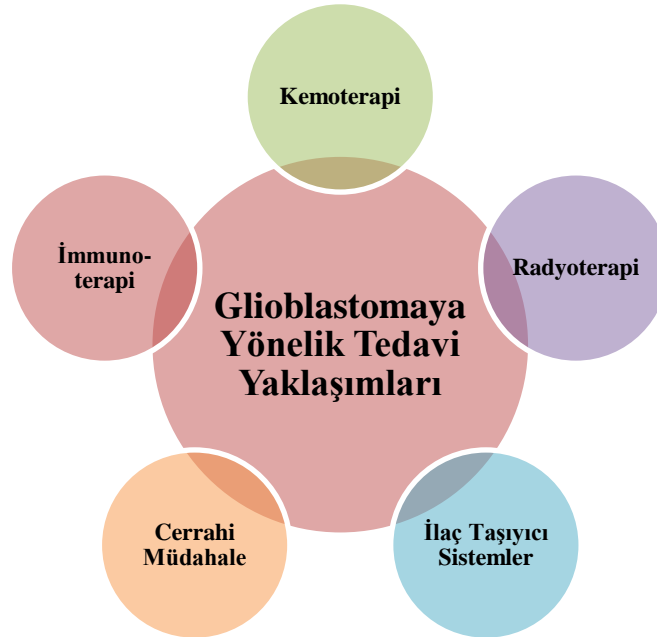


Şekil 2.1. WHO'ya ait 2007 ve 2016 yılındaki merkezi sinir sistemi tümörleri sınıflandırılması (Diamandis and Aldape'den 2018)

GBM' nin hızlı ve agresif büyüme özelliklerine sahip olması, müdahale edilebilemez bir prognoza neden olarak hastalığın erken evrede tanımlanmasını engellemektedir. GBM hastalarında sıklıkla görülen semptomlar baş ağrısı, hafıza kaybı, bilişsel bozukluklar ve hareket ve/veya vücudun bir bölümünde his kaybıdır (American Brain Tumor Association, 2017; Brighi et al., 2018).

2.2. Glioblastomaya Yönelik Tedavi Yaklaşımları

Glioblastomaya yönelik tedavi yaklaşımları cerrahi müdahale, radyoterapi, kemoterapi gibi geleneksel yaklaşımların yanı sıra son zamanlarda popüler olan immunoterapi ve hedefe yönelik tedavi seçeneği sunan ilaç taşıyıcı sistemler olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 2.2). GBM 'de geleneksel tedavi uygulamalarının net bir şekilde başarı gösterememesinin birçok sebebi bulunmaktadır. Tümör hücrelerinin beyin dokusunda agresif olması ve infiltratif özellik göstermesi, cerrahi müdahale sonrası hastalığı tekrar ortaya çıkarmaktadır. Aynı zamanda tedavi seçeneklerini kısıtlayan bir diğer kavram da tümör hücrelerinin inter ya da intra heterojenitesidir. İnter-tümör heterojenite, farklı organlardaki tümörlerin farklı özellikte olmasına rağmen aynı organdaki tümörlerinde birbirinden farklı karakterde olması sonucu tümörler arası heterojenite olarak tanımlanır. İnter-tümör heterojenite ise aynı tanıya sahip tümör bölgesi içerisindeki hücrelerinde farklı özellik göstermesidir. GBM tedavisinde uygulanan yöntemlerin geliştirilmesine rağmen ortalama sağ kalım oranı 15 aydan daha azdır (Yang et al., 2016; Anjum et al., 2017; Pinel et al., 2019).



Şekil 2.2. Glioblastoma tedavisinde kullanılan tedavi yaklaşımları (Pourgholi'den 2016)

2.2.1. Cerrahi Müdahale

Cerrahi müdahale, GBM' de tamamen iyileşme sağlamayan bir tedavi seçeneği olmasına ve müdahale sonrası hastaların % 80' inde hastalığın tekrar nüks etmesine rağmen tümör tipine ve lokalizasyonuna bağlı olarak tercih edilebilmektedir. Erken tanı konulan hastalarda cerrahi uygulama etkili bir prognoz gösterse dahi bazal ganglionlar, korteks ve beyin sapında bulunan tümörler cerrahi müdahale için uygun değildir ve hastalarda iyileşme oranı çok düşüktür (Scott et al., 2011; Mrugala, 2013; Hanif et al., 2017). Klinisyenler, ikinci bir cerrahi müdahalenin GBM tedavisinde etkisi veriler ile kanıtlanmasa da eğer cerrahi olarak uygunsa tedavi seçeneği olarak sunmaktadır. Ayrıca cerrahi uygulamalar, Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından onaylanmış tedavilerden biri olan kemoterapi waferlarının uygulanabilmesi için bir araç olarak ve radyasyon nekrozu şüphesi bulunan kişilerde teşhis için kullanılabilir (Mrugala, 2013).

2.2.2. Radyoterapi

Radyoterapi (RT), cerrahi müdahale sonrası kalan tümör hücrelerini yok etmek için kullanılabilir. Bu tedavi seçeneği ileri derecedeki gliomalarda hastanın yaşam kalitesini arttırsa da, tedavi sonrası tümörün nüks etme eğilimi bulunmaktadır. RT, dış ışın radyoterapisi, radyocerrahi, stereotaktik brakiterapi ve bor nötron yakalama tedavisi olmak üzere çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. RT, GBM tedavisinde DNA heliks yapısındaki elektronlara ve serbest radikallere hasar vererek düşük seviyede bir etkinlik göstermektedir. RT'nin tedavide yetersiz olduğu durumlarda hastalara kemoterapi ile kombine tedavi seçeneği

sunulmaktadır. Ancak GBM tedavisinde RT kullanımında bazı faktörler tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bunlar radyasyon sonrası oluşan nekroz riski, kalıcı nöral hasar ve radyoterapiye karşı bazı tümörlerde görülen direnç mekanizması olarak sınıflandırılabilir (Jacob and Dinca., 2009; Anjum et al., 2017; Hanif et al., 2017).

2.2.3. Kemoterapi

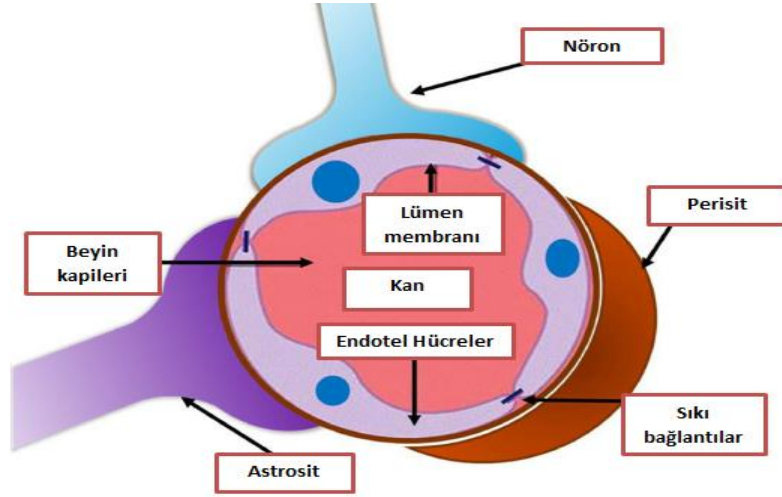
Kemoterapi terimi, ünlü Alman kimyager Paul Ehrlich tarafından 1990 yılında ortaya atılmıştır. Paul Ehrlich, bu terimi kimyasalların hastalık tedavisi için kullanımı olarak tanımlamıştır (Devita and Chu., 2008). Günümüzde de kemoterapi diğer geleneksel tedavi yaklaşımları ile birlikte kombine tedavi seçeneği olarak ya da tek başına kullanılmaktadır. Bu tedavi yaklaşımı kanser hücrelerinin sitotoksik ilaçlar ile öldürülmesi esasına dayanmaktadır. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapötik ajanlar, GBM tedavisinde de pozitif sonuçlar göstermesine rağmen yan etkiler oluşmaktadır. GBM tedavisinde kullanılan yaygın kemoterapötik ajanlar şunlardır; temozolomid (TMZ), karmustin (BCNU), vincristine, cisplatin ve lomustin (CCNU). GBM hastaları yukarıda belirtilen birinci basamak tedavi ajanlarına yanıt vermez ise oksaliplatin, karboplatin, etoposid ve irinotekan gibi ikinci basamak tedavi ajanları kullanılmaktadır. Tedavide bu ajanların kullanımı sırasında oluşan erken ilaç direnç gelişimi ve birçok yan etki tedaviyi sınırlandırmaktadır (Hanif et al., 2017; Kim et al., 2019).

2.2.4. İmmunoterapi

19. Yüzyılda William Coley tarafından kanser teşhisi konulan hastalara, iki bakteri türünün toksinlerinin karışımı verilmiştir. Karışım enjeksiyonu sonrası Streptococcus enfeksiyonu bulunan bir hastada sarkom regresyonu oluşmasıyla immunoterapinin tedavi potansiyeli görülmüştür (Wilcox et al., 2018). Bağışıklık sistemi, GBM’de bulunan tümör heterojenitesi sebebiyle tümör progresyonu ve regresyonu üzerine önemli bir faktördür. Amerika’da GBM tedavisine yönelik bağışıklık kontrol noktası inhibitörleri, kanser aşılı, uyarıcı hücre transfer stratejileri ve bispesifik T hücreli monoklonal antikolar olmak üzere çeşitli tedavi seçenekleri onaylanmıştır. Ancak, GBM mikro-çevresinde lenfosit infiltrasyonu yokluğundan dolayı, immunoterapi ile tedavide olumsuz sonuçlar gözlenmektedir (Geraldo et al., 2019).

2.3. Kan Beyin Bariyeri

Kan beyin bariyeri (KBB), başlıca serebral endotel hücreler (Cerebral endothelial cells- CEC) ve perivasküler hücrelerden (astroitler ve perisitler) oluşan farklı savunma mekanizmaları ile çeşitli moleküllerin geçişini düzenleyen nörolojik bir bariyer görevi görmektedir (Şekil 2.3.1) (Karim et al., 2016; Miranda et al., 2017). CEC’in morfolojilerinin çeşitliliği sayesinde KBB‘den geçiş kontrol edilmekte ve yapısında bulunan reseptörler ile seçimli bir taşımayı sağlamaktadırlar. KBB ‘nin bariyer görevi sayesinde toksik bileşiklerin sistemik dolaşımdan beyine geçişi engellenmektedir. Bunun için çeşitli savunma sistemleri; paraselüler ve transselüler bariyer, immünolojik bariyer, enzimatik bariyer ve akıntı taşıma sistemleri bulunmaktadır (Karim et al., 2016).



Şekil 2.3.1. Kan beyin bariyeri gösterimi (Alexandru Mihai Grumezescu 'dan 2016)

Parasellüler transport bariyeri, bitişik CEC arasında bulunan sıkı bağlantılar (Tight junctions-TJ) ve adherent bağlantılar ile karakterize olmaktadır. TJ, okludin ve klaudin gibi transmembran proteinlerinden, adhere bağlantılar ise kadherin ve integrin proteinlerinden oluşmaktadır (Matter and Malda., 2003; Hawkins and Davis., 2005; Karim et al., 2016). TJ, küçük iyonlar, makromoleküller ve hidrofilik bileşiklerin parasellüler taşınmasında rol oynamaktadır. Adherent bağlantılar ise endotelial hücrelerin bütünlüğünü korumakta ve kadherin ile bağlanarak sıkı bağlantılar oluşturmaktadırlar. Parasellüler bariyerin kaderi, adhere bağlantılar ve TJ'lerin her ikisinin de fonksiyon göstermesine bağlıdır. Bu iki bağlantı makromoleküller ve küçük moleküllü ilaçların % 98' inin transportunu engellemektedir (Wolburg and Lippoldt, 2002; O'Kane and Hawkins., 2003; Yu et al., 2005; Karim et al., 2016).

Transsellüler transport bariyeri, CEC'nin pinositik vezikül oluşturması ile geçişi kontrol etmektedir. Endositoz ve transitoz bu hücrelerde daha az gerçekleşmekte bu da birçok molekülün sitoplazmaya geçişini engellemektedir. Ayrıca enzimatik olarak pek çok ilacın degradasyonu CEC'de bulunan çeşitli intra ve ekstrasellüler enzimler ile sağlanmaktadır (El-Bacha and Minn., 1999; Karim

et al., 2016). İmmunolojik savunma ise KBB 'de bulunan mikroglialar, mast hücreleri ve perivasküler makrofajlar tarafından gerçekleştirilmektedir (Doneman and Rescigno., 2009; Aguzzi et al., 2013; Karim et al., 2016).

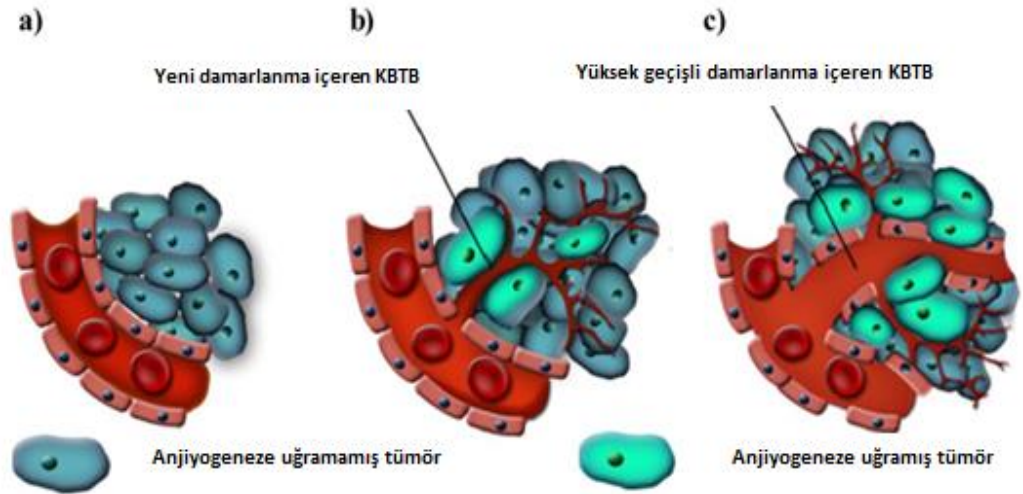
KBB'de ilaç geçirgenliğinin temel engellerinden biri, ilaçların aktif olarak hücre zarı içinden dışarı aktarılmasına sebep olan dışa aktarım taşıyıcılarıdır. Bu taşıyıcılar belirli konsantrasyondaki ilacın, hedefli olduğu bölgede farmakolojik etki göstermesini de sınırlayabilmektedir. CEC, pek çok anti tümör ilacının substratı olan membran bağlı dışa aktarım protein ailesi içerisindeki ATP bağlayıcı kaset (ATP binding cassette –ABC) taşıyıcılarını eksprese etmektedir (Borges-Walmsley et al., 2003; Sharom, 2011; Karim et al., 2016).

KBB'nin nörolojik bir bariyer görevi görmesinin yanı sıra gerekli molekülleri beyin dokularına iletmekte bir diğer görevidir. Ayrıca, KBB'den lipofilik moleküller ve gaz moleküllerinin geçişi enerji bağımsız taşıma mekanizmalarıyla sağlanırken, polar moleküllerin geçişi sınırlıdır (Reiber, 2001; Karim et al., 2016). CEC üzerinde bulunan reseptörler (transferin reseptörü, insülin reseptörü, düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü, endotel büyüme faktörü reseptörü vb.) makromoleküllerin seçimli bir şekilde beyne aktarımını sağlamaktadır. Tedavide kullanılan ilaçların yaklaşık % 98'i, yalnızca 8'den az hidrojen bağı bulunan lipofilik karakterde ve 400 Da'dan daha düşük molekül ağırlığında olmadıkları için KBB'den geçememektedirler (Pardridge, 2012; Karim et al., 2016).

Kılcal damarlar ve serebral tümör dokuları arasında kalan KBB, kan beyin tümör bariyeri (KBTB) olarak adlandırılmakta ve morfolojisi ve geçirgenliğine göre Şekil 2.3.2'de gösterilen değişen üç aşamadan oluşmaktadır (Groothuis, 2000). Birinci evre, malign beyin tümörlerinin ilk evresidir ve anjiyogenez görülmemekle birlikte KBTB'nin yapısında değişiklik gözlenmemektedir. İkinci evrede tümör büyümesine paralel olarak damarlanma başlamaktadır. Üçüncü evrede, vaskülarizasyonun daha da artmasıyla KBTB'nin bütünlüğü bozulmakta

ve endoteliyal hücreler arası boşluklar daha da artmaktadır (Schlageter et al., 1999; Squire et al., 2001; Karim et al., 2016).

GBM, yaygın olarak üçüncü evre KBTB' ye sahiptir ve KBTB'nin daha az zarar gördüğü sağlıklı dokulara yayılma eğilimi fazladır. Tedavi sırasında KBTB, GBM tümörlerine etkili ilaç konsantrasyonlarının verilmesinde büyük bir engel teşkil etmektedir (Juillerat-Jeanneret, 2008; van Tellingen et al., 2015).



Şekil 2.3.2 KBTB oluşumunun aşamaları: a) birinci evre, b) ikinci evre, ve c) üçüncü evre (Karim'den 2016)

2.4. Glioblastomada Kan Beyin Bariyerinden Geçiş Stratejileri

2.4.1. Epiteliyal Hücrelerde Bulunan Sıkı Bağlantıların Açılması

Son yıllarda GBM'de KBB'den tedavi edici ajanların geçiş stratejisi olarak endoteliyal hücrelerinde bulunan TJ'lerin geri dönüşümlü ve geçici olarak açılmasını sağlayan yöntemler geliştirilmektedir. Bu yöntemler ile KBB fiziksel ve kimyasal baskılara maruz bırakılarak istenen ilacın geçirgenliği arttırılmaktadır (Karim et al., 2016; Miranda et al., 2017). Bunlardan biri hiperosmotik bir ajan olan mannitol ile yapılan uygulamalarda TJ'leri birkaç saate kaçır açarak ilaç geçirgenliğine etki etmektedir. Biyolojik bir ajan olan bradikinin ise CEC'lerin yüzeyinde bulunan B2 reseptörlerine etki etmekte ve kalsiyum iyonu kontrasyonunda artış sağlayarak KBB'den geçişi kolaylaştırmaktadır (Regoli and Barabe., 1980; Prados et al., 2003).

Farklı yüzey aktif maddelerin (Polisorbat 80 ve sodyum dodesil sülfat vb.) kullanımı TJ'lerin açılmasını sağlayarak KBB ajanlarının geçişinde etkinlik göstermektedir. Ancak bu uygulamalarda toksik bileşikler KBB'nin bariyer görevini görmesine engel olabilmektedir. Ayrıca, elektromanyetik dalgalar ve ultrason gibi fiziksel kuvvetler aracılığı ile ilaç geçirgenliği arttırma çalışmaları yapılmaktadır (Sheikov et al., 2004; Stam, 2010). Tüm uygulanan bu yöntemler GBM tedavisinde ilaç geçirgenliğini arttırmakta başarılı olsa da yöntemlerin karmaşıklığı, CEC'nin zarar görmesi ve KBB'nin nörolojik bariyer işlevinin kısıtlanması ve düşük verimlilikleri gibi negatif sonuçlar kullanımlarını sınırlandırmaktadır (Karim et al., 2016).

2.4.2. Aktif Taşıyıcıların İnhibisyonu

Tedavide kullanılan birçok ilaç, KBB'de bulunan aktif taşıyıcıların (Effluks taşıyıcıları; ABC transportırlar, P-glikoprotein (P-gp), çoklu ilaç direnç proteini (MRP4) ve göğüs kanseri hücre direnç proteini (BCRP)) substralarıdır ve inhibisyon sağlayarak ilaç geçirgenliğini arttırmaktadır. Buna yönelik sikloporin A, verapamil, elacridar ve tariquidar vb. ilaçların çoğunun P-gp aktivitesini inhibe ettiği ve KBB 'den ilaç geçişini arttırdığı belirtilmiştir. Polietilen glikol (PEG) gibi sentetik polimerler, Tween ve Span gibi noniyonik yüzey aktif maddeler P-gp substratı olarak görev yapmakta ve effluks taşıyıcılarını inhibe etmektedir. Beyin kanseri tedavisinde effluks taşıyıcılarının inhibisyonu ile genel olarak pozitif sonuçlar alınsa da, klinik çalışmalarda anlamlı istatistiksel değerler elde edilmemiştir. Bu strateji ile etkili bir GBM tedavisi gerçekleştirmek için gerekli inhibisyon düzeyini belirlemek, uygulamanın güvenli olarak gerçekleştirilmesini sağlamak ve ilaç-inhibitör miktarının optimumunu belirlemek gerekmektedir (van Tellingen et al., 2015; Karim et al., 2016; Miranda et al., 2017).

2.4.3. Lokal Tedaviler ile İlaç Geçişini Arttırma

Lokal olarak gerçekleştirilen strateji içerisinde yer alan konveksiyonla güçlendirilme yoluyla, kateter tümörlü bölgeye yerleştirilmekte ve ilaç sürekli basınç altında o bölgeye uygulanmaktadır. Bu teknik diğerleri ile karşılaştırıldığında tümörlü bölgede daha yüksek konsantrasyonlarda ilacın birikimini gerçekleştirmektedir. Ancak tedavi sırasında kataterin yerleştirilmesine, boyut ve şekline, infüzyon hızına ve enjekte edilen ilacın hacmi ve içeriğine dikkat edilmesi gerekmektedir. Bu stratejinin avantajlarının yanı sıra ilacın sağlıklı dokulara geçişi nedeniyle oluşacak riskler tedaviyi sınırlandırmaktadır (Krauze et al., 2005; Allard et al., 2009; Karim et al., 2016).

Bir diğ er teknik olan kraniyotomi bazlı ilaç taşınımında ise tedavi edici bileşik hedeflenen bölgeye implatasyon ve enjeksiyon yoluyla doğrudan verilmektedir. Bu yöntem hedefli bir strateji seçeneği olmasına rağmen, geçirgenlik ilacın difüzyon kapasitesi ile sınırlıdır (Pardridge, 2002; Karim et al., 2016).

2.4.4. Reseptör Aracılı Transitöz

Reseptör aracılı transitöz, beyin tümörlerine yönelik hedefli tedavi yaklaşımları arasında yüksek spesifite ve substrat seçici olmaları ile karakterize bir yöntemdir. Ancak, bu stratejide homeostazis üzerinde etkili olan doğal ligandlar, ilaç ligandları ile yarışarak ilacın hedefleme verimliliğini düşürebilmektedir. CEC'nin yüzeyinde beyin kanseri tedavisinde hedef olarak kullanılabilir bir çok reseptör bulunmaktadır. Bunlara örnek olarak; glikoz taşıyıcıları (GLUT), düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri (Low density lipoprotein receptor - LDLR), transferrin reseptörleri (TfR), insülin reseptörleri (IR) ve substrat seçici olan nikotinik asetilkolin reseptörleri (nAChR) verilebilir. Beyin dokusunda ilaç hedefleme için kullanılan ve en çok tercih edilen reseptör endotel hücrelerin yüzeyinde aşırı ekprese edilen Tf'dir (Ponka and Lok., 1999; Wei et al., 2014; Miranda et al., 2017,).

Zhang ve arkadaşları (2012) transferrin modifiye paklitaksel yüklü misellerin (TPM), KBB'den geçişini in vitro ve in vivo çalışmaları ile incelemiş ve GBM tedavisinde etkili sonuçlar verdiği bulunmuştur. Ancak transferrin (Tf) ile modifiye edilmiş sistemler, Tf'nin doğal ligandlar ile rekabet edebilmesinden dolayı kullanımı sınırlandırmaktadır (Zhang et al., 2012; Qian et al., 2002; Wei et al., 2014). Bir diğ er hedef LDLR, çeşitli ligandlar ile konjuge edilmiş nanotaşıyıcıların KBB'den geçişine aracılık etmektedir. Buna yönelik yapılan bir çalışmada terapötik bir gen ve paklitakselin beyne etkin bir şekilde birlikte

verilmesi için LDLR ligandı olan anjiyopep-2 ile modifiye edilmiş katyonik lipozomlar oluşturulmuştur. Bu nanosistem ile yapılan prelinik çalışmalarda ortalama sağ kalım süresi diğer gruplara göre daha uzun olduğu için umut verici bir yaklaşım olarak görülmektedir (Demeule et al., 2008; Sun et al., 2012; Wei et al., 2014).

2.5. Monokarboksilat Taşıyıcıları ve Kan Beyin Bariyerinden Geçiş

Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, monokarboksilatlar grubunda olan laktat, pirüvat ve keton cisimlerinin beyin enerji metabolizmasındaki yeri tam olarak anlaşılmaya başlanmıştır (Pellerin, 2003). Anne sütünde oksidasyon ürünü olan asetoasetat ve β -hidroksibütirat (HBA) gibi keton gövdeleri süttten kesilmeden önce yeni doğanda beyin için önemli enerji substratlarıdır (Hawkins et al., 1971; Cremer, 1982). Kanla taşınan ve hidrofilik olan monokarboksilatlar kan beyin bariyerinden kolayca geçemedikleri için geçişi sağlayabilmek için spesifik taşıma sistemlerinin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (Pellerin and Magistretti, 2003; Pierre and Pellerin., 2005).

KBB'den keton cisimlerinin geçişi genellikle proton bağlantılı monokarboksilat taşıyıcıları (Monocarboxylate transporter–MCT) ile gerçekleşmektedir. Keton cisimciği olan HBA'nın KBB 'den geçişi de MCT 1 ile sağlanmaktadır. MCT 1 perisitler, gliyal hücreler, endotel hücreler ve doku-beyin omurilik sıvısı arayüzü başta olmak üzere birçok dokuda eksprese edilmektedir. HBA'nın KBB'den geçişi genellikle pasif ve/veya taşıyıcı aracılı difüzyon ile gerçekleşmektedir (Pardridge, 1983; Tildon and Roeder., 1988; Pellerin et al., 1998; Venishetty et al., 2013).

2.6. Nanoteknolojik Yaklaşımlar ile Kan-Beyin Bariyerinden Geçiş Stratejileri

Son yıllarda nanoteknolojide meydana gelen gelişmeler ile KBB'den geçiş stratejilerinde, ilaç taşıma etkinliği yüksek olan nanotaşıyıcılar büyük bir araştırma odağı haline gelmiştir. Bu nanoyapıların özelliklerinin amaca göre tasarlanabilir olması, ilaç yarı ömrünü arttırması ve aktif ajanının stabilitesini koruması gibi özellikleri popülerliğini daha da arttırmıştır. İlaçların nanosistemler aracılığı ile KBB'den geçişinin sağlanması için nanoyapıların bazı özellikleri taşınması gerekmektedir. Bunlar;

- Biyoyumlu, biyobozunur olması ve toksik etkisinin olmaması
- Retiküloendotelyal sistem (RES) tarafından atılımının engellenmesi ve uzun plazma yarı ömrüne sahip olması
- Boyutlarının 200 nm'den küçük olması
- Etkin ajanı bozulmaya karşı koruması
- Kontrol edilebilir ilaç salımı profiline sahip olması
- Hedefli taşıma stratejileri ile yönlendirilebilir olması
- İmmün sistem yanıtının oluşumuna sebep olmaması gerekir (Kao et al., 2006; Bhaskar et al., 2010; Karim et al.,2016).

Glioblastomada kullanılan başlıca nanoyapılar, lipozomlar, polimerik nanopartiküller, lipid bazlı nanotaşıyıcılar, dendrimerler, karbon nanotüpler ve nanojellerdir (Saedi et al., 2019). Nanoyapıların bağışıklık sisteminde bulunan RES ile atılımı gerçekleşebilmektedir. RES ile nanoparçacıkların atılımı partiküllerin boyutuna bağlıdır, ve 100 nm'den küçük yapılar RES tarafından yavaş bir şekilde ve az miktarda atılıma uğramaktadırlar. Bunun sebebi küçük

boyuttaki nanoyapıların KBTB'den geçebilmeleri ve arttırılmış alıkonma etkisi (Enhanced permeability and retention – EPR) ile glioblastoma tümörlerinde birikebilmeleridir (Senior et al., 1985; Yuan et al., 1994; Oja et al., 1996; Karim et al., 2016).

Nanoyapıların yüzey yükü, biyodağılımlarını ve farmakokinetik özelliklerini etkilemektedir. Yüklü nanoyapıların, hücrelerle etkileşimleri fazla, RES ile alımları daha yüksek ve plazmadan atılımı hızlıdır. Nötr nanoyapıların ise RES tarafından alıkonma olasılığı düşük olduğu için agregasyon olasılıkları fazladır ve hücreler ile etkileşimleri az olduğu için ilacın hücre dışına serbest bırakılması olasıdır (Gabizon et al., 1990; Sharma et al., 1993; Karim et al., 2016). Nanoyapıların plazma yarı ömrünü arttırmak için çeşitli yüzey hidrasyon ve sterik modifikasyon teknikleri kullanılmaktadır. Nanoparçacıklara hidrofilik grup içeren materyaller (monosialogangliosid (GM1), hidrojenlenmiş fosfatidilinositol (HPI), Tween 80 veya PEG) ile modifikasyonlar yapılması hidrasyon tabakası oluşturarak, plazmada bulunan yapılara sterik engel oluşturup RES ile alımı azaltmaktadır. Bu yöntemler sayesinde nanoyapıların plazma yarı ömrü 10 kat arttırılmış olmaktadır (Allen et al., 1991; Klivanov et al., 1991; Torchilin, 1994; Karim et al., 2016).

GBM tedavisinde kullanılan nanoyapıların yüzey yükleri, boyutları ve hedefleme stratejileri tedavinin başarısı için önemli parametrelerdir. Nanoyapıların hedeflendirilmesinde kullanılan stratejiler pasif ve aktif olmak üzere iki ana başlık altında verilmektedir.

GBM'de yüzey endotel hücreleri arasında boşluklar olması ve TJ'lerin bozulması, nano boyuttaki yapıların KBB'den pasif hedefleme ile geçişini kolaylaştırmaktadır (Abbott et al., 2006). Bu durumda EPR etkisi ile

nanoyapıların KBTB'den geçişi kolaylaşmakta ve tümör bölgesinde ilacın birikimini arttırmaktadır. Yapılan prelinik çalışmalar bu stratejinin başarılı olduğunu gösterse de klinik denemelerde etkili sonuçlar elde edilmemiştir. Bunun sebepleri arasında KBB'nin heterojen olarak bozulması, tümörün tipi, boyutu ve makrofajların sayısı ve dağılımı gibi EPR'ı etkileyen faktörler verilebilmektedir (Lu et al., 2007; Herve et al., 2008; Karim et al., 2016).

Aktif hedefleme stratejisi endojen taşıma yoluyla ilacın KBB'den geçişinin arttırılıp terapötik etkisinin gösterilmesini sağlamaktadır. Bu strateji taşıyıcı aracılı transitoz, reseptör aracılı transitoz ve adsorptif aracılı transitoz olmak üzere üçe ayrılmaktadır. Taşıyıcı aracılı transitoz, substrat seçici bir yöntemdir. Adsorptif aracılı transitoz, peptidler ve katyonik proteinler ile konjuge edilmiş nanosistemlerin elektrostatik etkileşimler ile ilaç geçirgenliğini sağlar. Reseptör aracılı transitoz ise, reseptörlere spesifik olarak bağlanan nanoyapıların ilaç geçirgenliğini sağlar ve yüksek oranda ilaç taşımaya sağlar (Bangham et al., 1965; Goren et al., 2000; Wanget at al., 2010; Karim et al., 2016).

2.7. Katı Lipid Nanopartiküller

Lipid bazlı nanoyapılar fizikokimyasal özellikleri ve sentezlerinde kullanılan yöntemlere göre çeşitli sınıflara ayrılmaktadır. Temel lipid bazlı taşıyıcılar; niozomlar, lipozomlar, transferazomlar, nanoyapıdaki lipid taşıyıcıları ve katı lipid nanopartiküller (Solid lipid nanoparticles-SLN) olmak üzere sınıflandırılmaktadır (Rajera et al., 2011; Ag Selecki et al., 2016; Tapeinos et al., 2017).

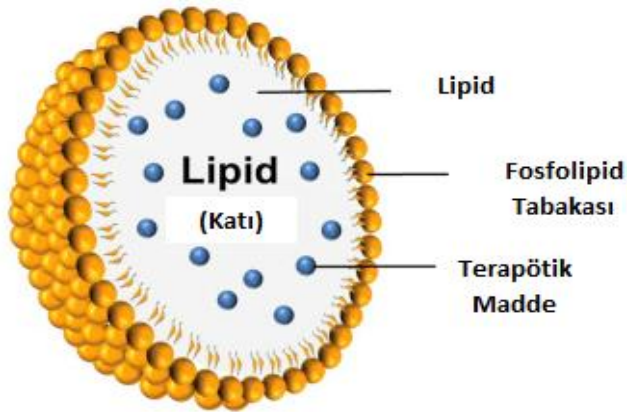
SLN'ler bu grubun en yeni üyelerinden biri olmakla birlikte hızlı gelişmelerinin sebeplerinden biri lipofilik ve hidrofilik ilaçların aynı anda tedavi

için kullanılabilmesi ve etkili sonuçların elde edilebilmesidir. Aynı zamanda taşıdıkları etken maddenin toksisitesini azaltmaları ve RES kleransından kaçınabilmeleri bir diğer avantajlarından. SLN'lerin suda çözünürlüğünün az olmasından dolayı etken maddeler kontrollü bir salım grafiği vermektedir. Ayrıca uzun süreli stabiliteye sahip olmaları kullanımlarını arttırmaktadır. Bu nanoyapıların biyoyumlu, biyobozunur olması ve sentezlerinin kolay olmasından dolayı endüstriyel ölçekte üretime elverişlidirler. Tablo 2.5.'te gösterildiği gibi avantajlarının yanı sıra SLN' ler düşük kapsüllenme verimleri ve jelleşme göstermeleri gibi dezavantajlara da sahiptirler (Naseri et al., 2015; Ezzati Nazhad Dolatabadi and Omid., 2016; Tapeinos et al., 2017).

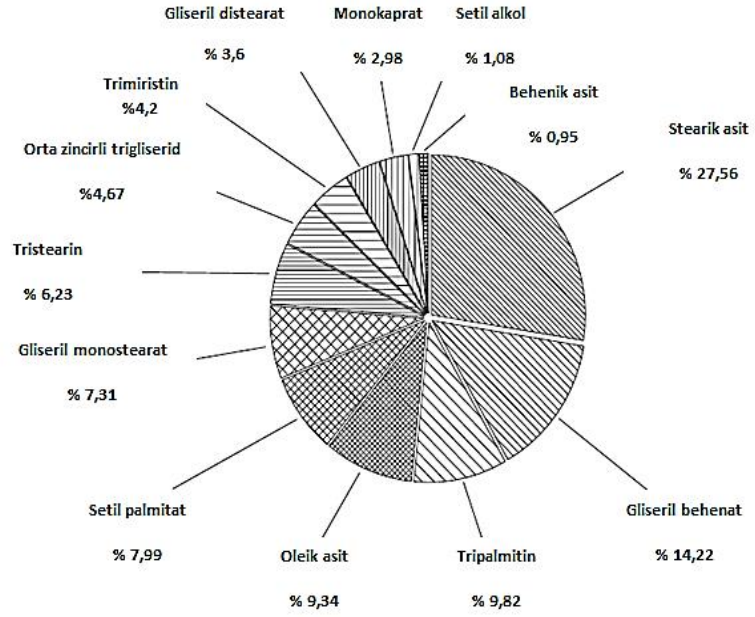
Avantajlar	Dezavantajlar
Boyutlarının kontrol edilebilir olması	Düşük etken madde yükleme kapasitesi
Stabilitesinin uzun olması	Depolanma sırasında oluşan ilaç kaybı
Biyoyumlu olması	Jelleşme eğilimi göstermeleri
Yüzey modifikasyonunun kolay olması	
Kontrollü ve sürekli salım profili	
Hidrofilik&hidrofobik ilaçların taşınabilirliği	
Düşük toksisitesi	
Düşük immünojenitesi	
Biyobozunur olması	
Endüstriyel ölçekte üretime elverişli olması	

Tablo 2.5. İlaç taşıyıcı sistem olarak kullanılan katı lipid nanopartiküllerin avantajları ve dezavantajları (Tapeinos'tan 2017)

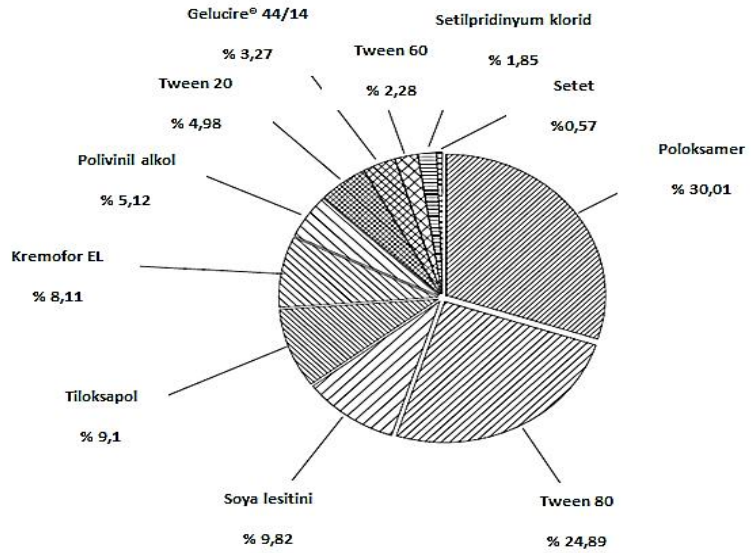
SLN sentezinde ana madde olarak lipidler kullanılmaktadır. Genel olarak, serbest yağ asitleri, gliserol esterleri, yağ alkolleri, waksar, fosfolipidler, glikolipidler ve sifingolipidler tercih edilmektedir. Ayrıca SLN sentezi sırasında ortama sürfaktanlar gibi stabilize edici ajanlar da eklenebilmektedir. Bunların görevi lipid fazı ile sulu faz arasındaki arayüzey enerjisini azaltmak ve bağlanma arayüzeyinde birikerek saklama sırasında nanoyapıların etrafında stabiliteyi etkileyen bir tabaka oluşturmaktır (Şekil 2.5.1). SLN sentezinde çoğunlukla kullanılan lipidler ve stabilize edici ajanlar sırasıyla Şekil 2.5.2 ve 2.5.3 'de verilmektedir (Kumar and Randhawa., 2013; Leonardi et al., 2014; Gordillo-Galeano and Mora-Huertas, 2018).



Şekil 2.5.1 Katı lipid nanopartikül yapısı (Lin 'den 2017)



Şekil 2.5.2. SLN hazırlanmasında çoğunlukla kullanılan lipidler ve kullanım yüzdeleri (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas'dan 2018)

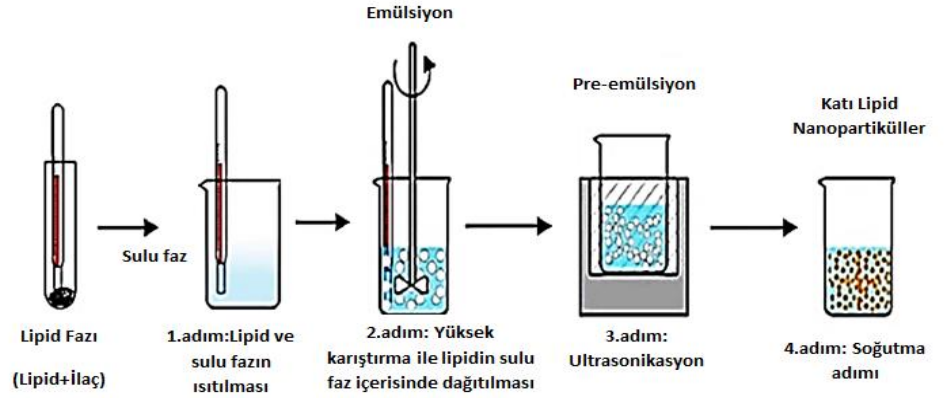


Şekil 2.5.3. SLN sentezinde çoğunlukla kullanılan stabilize edici ajanlar ve kullanım yüzdeleri (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas'dan 2018)

SLN sentezi için kullanılan yöntemler üç ana gruba ayrılmaktadır. Bunlar sentez için yüksek enerji gerektiren yöntemler, düşük enerji gerektiren yöntemler ve organik çözümlerin kullanıldığı yöntemler olmak üzere sınıflandırılmaktadır. Yüksek enerjiye bağlı yöntemler; yüksek basınçlı homojenizasyon, sıcak homojenizasyon, soğuk homojenizasyon ve yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniğinden oluşmaktadır. Düşük enerji gerektiren yöntemler; mikroemülsiyon, çift emülsiyon tekniği, faz inversiyon sıcaklığı ve membran kontaktörü tekniği olmak üzere kategorilendirilmektedir. Organik çözümler kullanılarak SLN sentezi yapımı, emülsifiye edici solvent evaporasyonu, emülsifiye edici solvent difüzyonu ve solvent enjeksiyonu olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas, 2018).

2.7.1. Yüksek Kesimli Homojenizasyon ve Ultrasonikasyon

Yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniği, katı formdaki lipidin erime noktasının 5-10 °C fazla ısıtılmasını içermektedir. Eriyen lipid, emülsiyon oluşturmak için yüksek karıştırma hızında sıcaklığı aynı olan sulu fazdaki yüzey aktif cisim çözümleri içerisinde dağıtılmaktadır. Ardından uygulanan sonikasyon işlemi boyut küçültmeyi sağlamaktadır. Elde edilen lipit nanopelletlerinin ortalama çapı 80- 800 nm aralığında olmaktadır (Şekil 2.6) (Shah et al., 2015; Ganesan and Narayanasamy., 2017; Gordillo-Galeano and Mora-Huertas, 2018; Patel et al., 2018.).



Şekil 2.6. Yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniği şematik gösterimi (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas'dan 2018)

Sentez sırasında nanoparçacıkların boyutunu etkileyen faktörler karıştırma hızı, soğutma adımı ve emülsifikasyon süresidir. Bu yöntemin dezavantajları arasında yüksek enerji kullanımı, parçacık boyutlarının dağılımının heterojenitesi, biyomoleküllere verilebilecek olası hasarlar ve sonikasyon adımıyla oluşan sıcaklık artışı ve metal kirliliği örnek verilebilmektedir. Bu sentez tekniği sırasında kullanılacak araçların temininin kolaylığı yöntemi çekici kılmaktadır (Manjunath et al., 2005; Gasco, 2012; Patel et al., 2018).

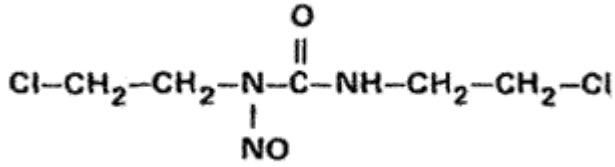
2.8. Karmustin

Yaklaşık 40 yıl önce Ulusal Kanser Enstitüsü, *in vivo* kanser çalışmalarında potansiyel etkiye sahip nitrozüre bileşiklerini kullanmaya başlamış ve ilk başarılı denemeler 1-metil-3-nitro-1-nitrozguanidin ile gerçekleştirilmiştir. Bu bileşiklerin daha aktif formlarının bulunması için yapılan denemeler sonucunda 1963'te 1,3-bis(2-kloroetil)-1-nitrozüre ya da karmustin (Carmustine-BCNU)'nin yalnızca intraperitoneal L1210 murin lösemisinde değil intraserebral olarakta kullanılabilceği bulunmuştur. 1977 yılında BCNU, FDA tarafından

beyin tümörleri, Hodgkin hastalığı ve malign hemotolojik hastalıkların tedavisi için onaylanmıştır. Malign gliomaya yönelik klinik denemelerde, BCNU yalnızca radyoterapi tedavisi uygulanan hastalara kıyasla 2 aylık ortalama sağ kalım oranı ile etkili bir tedavi sağlamıştır (Johnston et al., 1963; Schabel et al., 1963; Schepartz, 1976; Stewart, 2002; Bota et al., 2007).

1975 'te BCNU' nun katater ile tümör bölgesine direk uygulandığı çalışmalarda kemoterapötik ajanın kısıtlı yarı ömründen dolayı başarı elde edilememiştir. 1980 yılında Brem ve grubu glioma tedavisinde BCNU'nun taşınması için biyobozunur waferlar kullanmış ve in vivo çalışmalarda direk uygulamaya göre etkili sonuçlar elde edilmiştir (Yang et al., 1989; Bota et al., 2007).

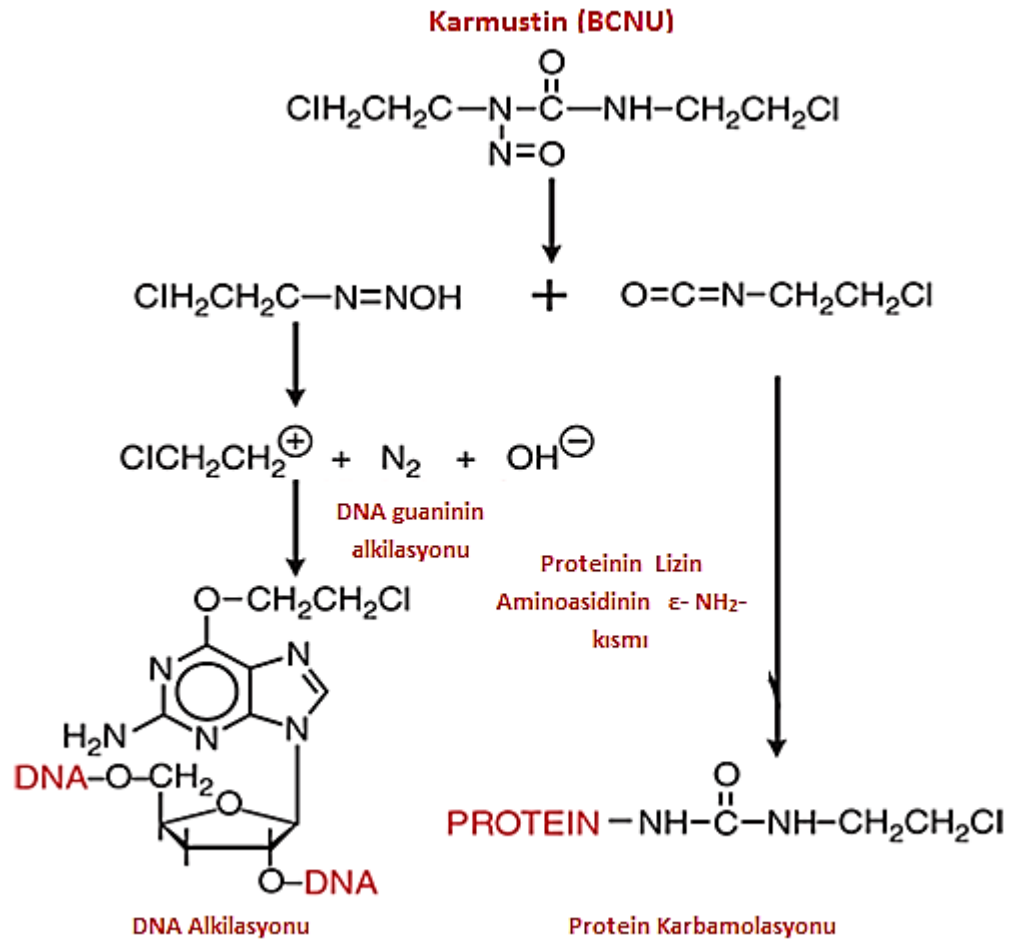
BCNU'nun lipid içerisinde çözünebilir olması ve düşük moleküler ağırlığı gibi karakteristik kimyasal özellikleri ajanın KBB' den geçişini kolaylaştırmaktadır. BCNU'nun kimyasal formülü Şekil 2.8.1 'de gösterilmektedir (Weiss and Issell., 1982).



Şekil 2.8.1 Karmustin (BCNU) kimyasal formülü (Weiss and Issell'den 1982)

Alkilleyici bir ajan olan BCNU, fizyolojik koşullarda etkileşim yeteneğine sahip karbon-klor bağının yanı sıra reaksiyon oluşturacak başka bölgelerde içermektedir (Loo et al., 1966). BCNU' nun DNA, RNA ve protein sentezi üzerindeki inhibitör etkisinin yanı sıra sitotoksik özellikleri de bulunmaktadır. BCNU, temel olarak kloroetil grupları üzerinden nükleoproteinler üzerindeki

reaktif grupları alkile etmekte ve DNA sentezi ve onarımını engellemektedir. Diğer alkilleyici ajanların aksine monofonksiyonel olan BCNU, farklı mekanizmalarla DNA çapraz bağlanmasını gerçekleştirmektedir. İki aşamada gerçekleşen DNA çapraz bağlanması, ilk adımda bir iplik üzerindeki nükleofilik alanın kloroetilasyonu ve diğer iplikteki klorür iyonu ile yer değiştirmesi sonucunda DNA çift sarmalının çözülmesini engelleyen bir etil köprüsü oluşması ile gerçekleşmektedir (Weiss and Issell., 1982). Diğer bir mekanizma da ise, nükleoprotein lisin grubu üzerinden gerçekleşen karbamolasyon ile RNA ve protein sentezinde azalma meydana gelmektedir (Şekil 2.8.2.). Ancak bu mekanizma türünün anti tümör etkisi problematiktir (Kann, 1978; Bota et al., 2007; Weiss and Issell., 1982).



Şekil 2.8.2 Karmustin etki mekanizması (Dandan and Brunton 'dan 2014)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

β -hidroksi bütirat, setil palmitat, , N-hidroksisüksinimid (NHS), karmustin ($\geq 98\%$), Sigma Aldrich' den; 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (EDC) Fluka Analytical' dan temin edildi. Çalkalamalı su banyosu Memmert, hassas terazi Denver Instrument(SI-234A), ulsantrifüj Hettich-zentrifugen mikro 120, ultratoraks-homojenizatör ISO lab markadır. Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan karbondioksit (CO₂) inkübatörü Binder CB150 ve biyolojik güvenlik kabini Esco CYT 4A1 markadır. Ayrıca hücre kültürü çalışmalarında U87-MG-luc hücre hatları kullanılmıştır.

3.1. Stearilamin (SA) ve β -Hidroksibütirat (HBA) Konjugasyonu

Konjugasyon sentezi aşaması için öncelikle 150 mg β -Hidroksibütirat 5 mL DMF'de çözüldü. Hazırlanan çözelti üzerine, sonik banyo yardımıyla 2şer mL DMF'de çözünen EDC (38mg) ve NHS (40mg) eklendi. Toplam hacmi 10 mL' ye tamamlamak için 1ml daha DMF eklendi ve oda sıcaklığında 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 100 mg stearilamin ve 500 μ L piridin eklenerek gece boyu reaksiyona bırakıldı. Reaksiyon sonunda 50 mL saf su ile çöktürme yapıldı. Çöktürülen örnek diyaliz membranlarına alınarak 3 gün boyunca saf suya karşı diyalizlendi. Diyalizin ardından por 3 nuçe hunisi yardımıyla örnek filtrelendi. Filtrenin üzerinde kalan konjugat 30°C etüvde 3-5 gün kurutuldu. Karakterizasyon için FTIR analizi yapıldı.

3.2. Katı Lipid Nanopartikül Sentezi

100 mg setil palmitat tartıldı ve 65 °C deki su banyosunda eritildi. Ardından 250 µL kloroform içerisinde çözünen 5 mg konjugat eritilen setil palmitat üzerine eklendi. 40mg Tween 80- 1860 µL su karışımı sıcaklığı 65 °C ye ulaşan su banyosunda bekletildi ve çözelti üzerine eklendi. Hazırlanan çözelti 30000 rpm hızında ultraturrax ile 2 dakika karıştırıldı ve sonra 65 °C’ deki sonik banyoda 1 dakika bekletilerek katı lipid oluşması sağlandı. Örnekler +4 °C’deki buzdolabında 30 dakika bekletildi ve sentezlenen katı lipid nanopartikülleri karışımdan ayırmak için 13000 rpm’ de 45 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Sentezlenen katı lipid nanopartiküllerin FTIR, SEM ve zeta potansiyel ve boyut analizi yapıldı.

3.2.1. Katı Lipid Nanopartiküllerde İlaç Miktarı Optimizasyonu

Su banyosunda (65 °C) gerçekleştirilen katı lipid nanopartiküllerin sentezi aşamasında, Tween 80-su karışımı eklenmeden önce optimizasyon işlemi için belirli konsantrasyondaki karmustin ilacı ortama eklendi. İlaç miktarı optimizasyonu için kullanılan karmustin konsantrasyon değerleri %0,1; 0,2; 0,3; 0,5 olacak şekilde hesaplamalar yapıldı. Setil palmitat ve ilaç karışımları eritildi ve üzerine 5 mg, 250 µL kloroformda çözünen konjugat ilave edildi. Son olarak Tween 80- su karışımı da (40 mg- 1860 µL) çözeltiye eklenerek katı lipid nanopartikül oluşumu için 30000 rpm hızında ultraturrax (2 dakika) ve 65 °C’ deki sonik banyoda (1 dakika) işlem uygulandı. Sentez sonucunda nanopartikülleri ayırmak için 13000 rpm’ de 45 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrası ayrılan üst fazda HPLC analizi yapılarak ilaç miktarları belirlendi. Nanopartiküllere yüklenen ilaç miktarı ve adsorpsiyon verimi 1 ve 2 no’lu denklemler kullanılarak hesaplandı. Optimum karmustin miktarı belirlendikten sonra FTIR, zeta potansiyel ve boyut, SEM analizleri yapıldı.

$Adsorplanan\ ila\ \text{ç}\ miktarı\ (\mu g) = Başlangı\ \text{ç}\ İla\ \text{ç}\ Miktarı(\mu g) - Adsorplanmayan\ ila\ \text{ç}\ Miktarı\ (\mu g)$ [1]

$$\% Adsorpsiyon\ Verimi = \frac{Adsorplanan\ ila\ \text{ç}\ Miktarı\ (\mu g)}{Başlangı\ \text{ç}\ ila\ \text{ç}\ Miktarı\ (\mu g)} \times 100$$
 [2]

3.3. *In vitro* İlaç salımı

In vitro ilaç salımı için 3.2.' de belirtilen yöntem ile karmustin içeren katı lipid nanopartiküller sentezlendi. Karmustin 0,1 mg/ml içeren nanopartiküller PBS' te dağıtıldı ve selüloz diyaliz membranına (MWCO 18 000 Da) alındı. Aynı zamanda 0,1 mg/ml pH 7,4 PBS'te hazırlanan serbest ilaç da diyaliz membranına alındı. Her bir örnek 10 ml PBS tamponunda 37°C'deki çalkalamalı su banyosunda salımı izlemek üzere bırakıldı. Belirlenen sürelerde reaksiyon kabındaki tüm hacim alınarak yerine 10 ml taze tampon eklendi. Alınan örneklerin karmustin içeriğini belirlemek üzere HPLC analizi yapıldı ve salınan ilaç miktarları 3 nolu formülle belirlendi.

$$Salınan\ İla\ \text{ç}\ Yüzdesi\ \% = \frac{Salınan\ İla\ \text{ç}\ Miktarı}{Başlangı\ \text{ç}\ İla\ \text{ç}\ Miktarı} \times 100$$
 [3]

3.4. Hücre Kültürü

Hücre kültürü çalışmaları lusiferaz aktiviteli insan GB kanser hücre hattı U87-MG-luc üzerinde yapıldı. Hücreler % 5 CO₂ 'li inkübatörde 37 °C de kültüre edildi. U87-MG-luc hücre hattı için % 10'luk FBS içeren EMEM besiyeri, kullanıldı.

Hücreler pasajlanıp yeterli sayıya ulaştıktan sonra 96 kuyucuklu plakalara kuyucuk başına 5000 hücre olacak şekilde ekim yapıldı ve bir gün plakaya

yapışması için beklendi. Hücreler plakaya yapıştıktan sonra serbest karmustin için 100 µg/ml ve karmustin içeren nanopartiküller için 1900 µg/ml konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı ve ½ dilüsyon oranı ile yapılan seyreltmeyle uygulandı. Örnek uygulamalarından 48 ve 72 saat sonra MTT testi için kuyucuklardan üst faz uzaklaştırılarak her kuyucuğa 100 µl sarı renkli MTT çözeltisi eklendi. MTT uygulanan hücreler 37 °C’de inkübatörde 4 saat inkübe edildi ve inkübasyon sonrası MTT çözeltisi uzaklaştırıldı. Oluşan formazon tuzu kristalleri 100 µl DMSO eklenerek çözüldü. MTT testi canlı hücrelerdeki mitokondriyal enzim aktivitesi sonucu MTT bileşiğindeki tetrazolyum tuzunun formazon tuzuna dönüştürülmesi temeline dayanmaktadır. Kuyucuklardaki mor renkli çözeltinin şiddeti hücre canlılığına bağlı olarak değişiklik gösterecektir. Oluşan mor rengin şiddeti 540 nm de görünür bölgede spektrofotometre yardımıyla ölçüldü.

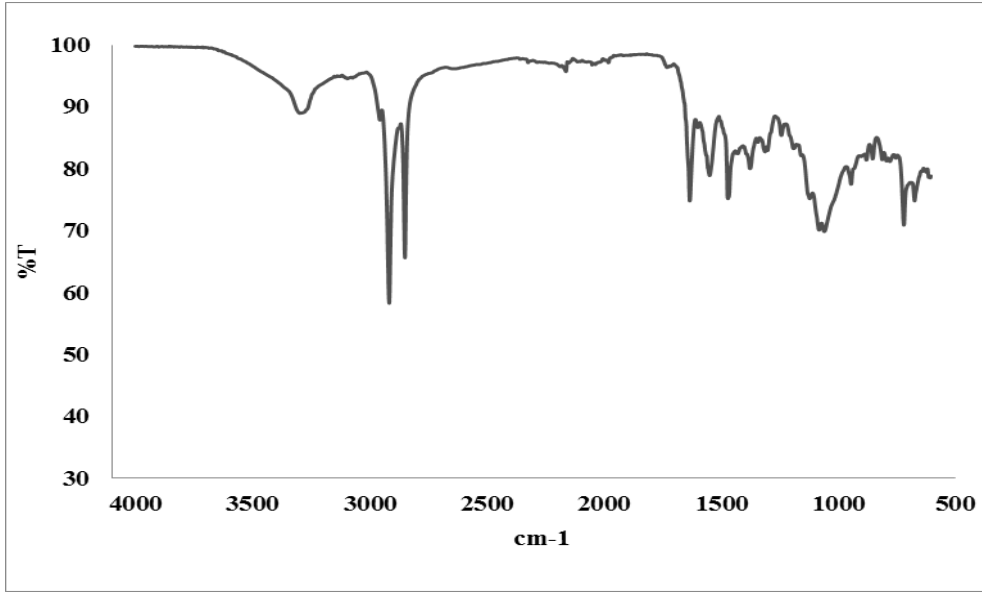
Hiçbir etken maddenin uygulanmadığı kontrol grubu baz alınarak hücrelerin her bir konsantrasyondaki etken madde için yüzde canlılık değerleri hesaplandı. Hücre hattı için IC₅₀ değerleri GraphPad yazılımı ile belirlendi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Stearilamin (SA) ve β-Hidroksibütirat (HBA) Konjugasyonu

Nanoyapının KBB’den geçişini kolaylaştırmak amacıyla sentezlenen konjugat, EDC-NHS kimyası yardımıyla sentezlendi. Suda çözünen çapraz bağlayıcı bir ajan olan EDC, karboksil ve amin grupları arasında amid bağı oluşturmaktadır. EDC, sulu ortamda sudaki oksijen atomları tarafından inaktive edilebilmektedir. Bu sebeple EDC ile konjugasyon sonrası oluşan ara ürünün stabilitesini arttırmak için NHS ile müdahale edilmekte ve kararlı bir ürün elde edilmektedir (Keleştemur et al., 2017). Bu çalışmada KBB’den MCT 1 taşıyıcıları ile geçiş sağlamakta kullanılan HBA’nın stabilitesini

arttırmak için konjugat sentezi gerçekleştirildi. SA'nın amin grubu ve HBA'nın karboksil grubu arasında EDC-NHS kimyasından yararlanarak kovalent bağ oluşturuldu. HBA hidrofilik yapıda ve SA lipofilik yapıdadır. Oluşan konjugat ise kloroform ya da DMSO'da çözülebilen ampifilik karakterdedir (Venishetty et al., 2013). Konjugatın karakterizasyonu için kullanılan FTIR analizi sonuçları Şekil 4.1'de gösterilmektedir.

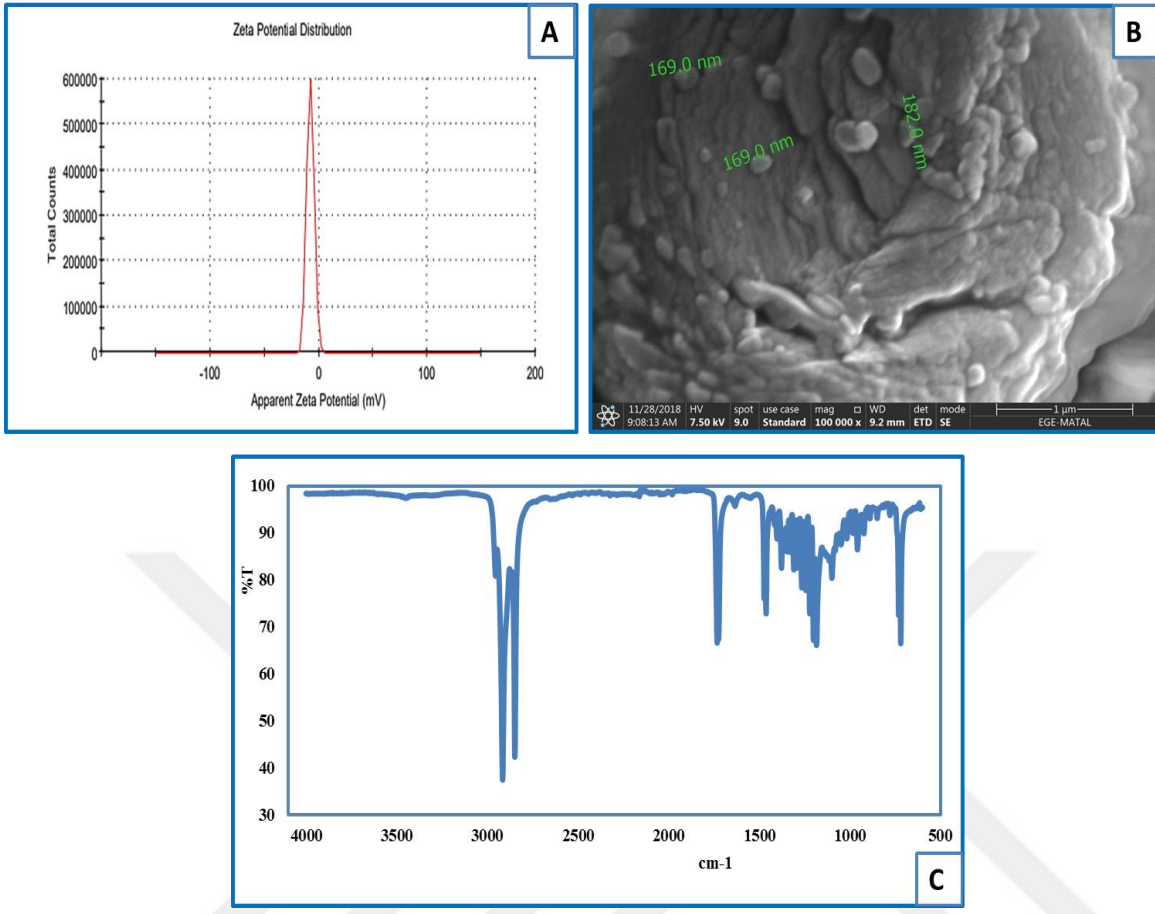


Şekil 4.1 EDC-NHS kimyası ile sentezlenen konjugatın FTIR spekturumu

Şekil 4.1' deki FTIR analiz sonuçlarına bakıldığında amid bağının karakteristik 1638 cm^{-1} 'de (C=O gerilmesi) piki, 1631 cm^{-1} 'de görülmüştür. Aynı zamanda 1553 cm^{-1} ' deki NH bükülmesi ve 1377 cm^{-1} ' deki OH'nin düzlemsel bükülmesi konjugat oluşumunu doğrulayan piklerdir. Grafiğe göre bu değerler sırasıyla 1554 cm^{-1} ve 1379 cm^{-1} ' de bulunmaktadır (Venishetty et al., 2013). Elde edilen pikler SA ve HBA ile oluşturulan konjugatın başarılı bir şekilde sentezlendiğini göstermektedir.

4.2. Katı Lipid Nanopartikül Karakterizasyonu

SLN sentezi için çok çeşitli yöntemler bulunmasına rağmen, gerekli malzemelerin temininin kolay olması ve organik solvent ve yüksek miktarda surfaktan kullanımına gerek duyulmamasından dolayı yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniği tercih edilmiştir (Patel et al., 2018; Shah et al., 2015). Bu teknikte hazırlanan lipid faz ve organik fazın yüksek karıştırma hızıyla pre emülsiyon oluşumu sağlamak ve ardından uygulanan ultrasonikasyon işlemi ile hem SLN sentezi sağlanmakta hem de partiküllerin boyut dağılımını etkilemektedir (Gordillo-Galeano and Mora-Huertas, 2018). Jose (2014) ve arkadaşları solvent buharlaştırma tekniği ile bu yöntemi birlikte kullanarak potansiyel anti kanser etkiye sahip bir ajanı içeren katı lipid nanopartiküllerin sentezini gerçekleştirmiştir. Bu çalışmada SLN kullanımının beyin dokusunda potansiyel terapötik etkiyi arttırdığı yönünde bir sonuca varılmıştır. Çalışmada da bu yöntem kullanılarak sentezlenen ilaç içermeyen SLN'lerin karakterizasyonu için FTIR, SEM ve zeta potansiyel analizleri yapılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 İlaç içermeyen SLN karakterizasyon analizi sonuçları a)SLN zeta potansiyel grafiği, b) SLN'ye ait SEM görüntüsü, c) SLN'ye ait FTIR spektrumu

Çalışmadaki Tween 80 kaplı ilaç içermeyen SLN zeta potansiyel analizi sonucunda $-7,55$ mV değeri bulunmuştur (Şekil 4.2 a). Lim ve Kim'in (2002) yaptığı Tween 80 kaplı SLN sentezinin gerçekleştirildiği çalışmada artan yüzdelerde Tween 80 kullanımına bağlı olarak zeta potansiyel değerinin -22 mV' tan -1 mV arttığı belirlenmiştir. Bu da Tween 80 kullanımının zeta potansiyel değerini azalttığı ve sınırlı flokülasyona sebep olduğunu göstermektedir.

Şekil 4.2 b'deki SEM görüntüsünde ilaç içermeyen SLN' ye ait nanoyapıların küresel bir geometri de ve boyutlarının 182 nm ile 169 nm arasında olduğu bulunmuştur. Bu şekilde sentezlenen bir diğer çalışmada da SLN

boyutlarının 172 ± 3 nm ve 231 ± 11 nm aralığında olduğu görülmektedir (Gardouh et al., 2013). Bu da sentez yönteminin özelliklerinden biri olan geniş boyut aralığını doğrulamaktadır.

Şekil 4.2 c'deki ilaç içermeyen SLN FTIR analiz grafiğine bakıldığında 2916 cm^{-1} ve 2848 cm^{-1} 'deki pikler sırasıyla CH_3 ve CH_2 gruplarını temsil etmektedir. Yapılan bir başka çalışmadaki SLN FTIR analizinde CH_3 ve CH_2 gruplarını gösteren pikler 2971 cm^{-1} ve 2851 cm^{-1} de gösterilmiştir (Tian et al., 2017). Ayrıca Tian (2017) ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada 1733 cm^{-1} de saptanan lipide ait ester grubu piki, çalışmamızda 1732 cm^{-1} de görülmektedir. FTIR analiz grafiğinde 3278 cm^{-1} de görülen pik sudaki OH grubunu göstermektedir. Bu veri Talele (2018) ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 3300 cm^{-1} de bulunmakta ve SLN'lerin polar baş grupları ile etkileşime giren su moleküllerini temsil etmektedir (Talele et al., 2018).

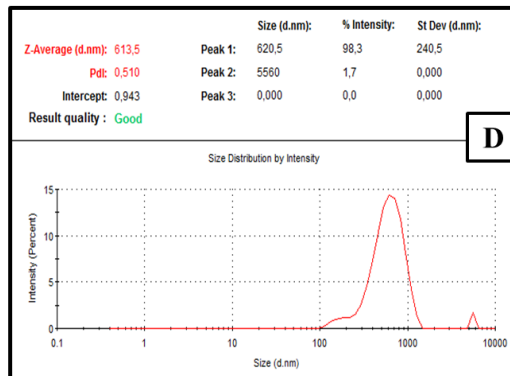
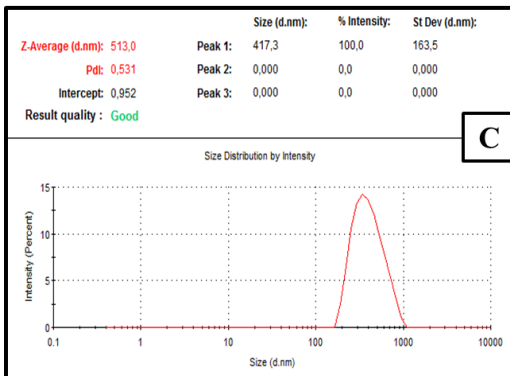
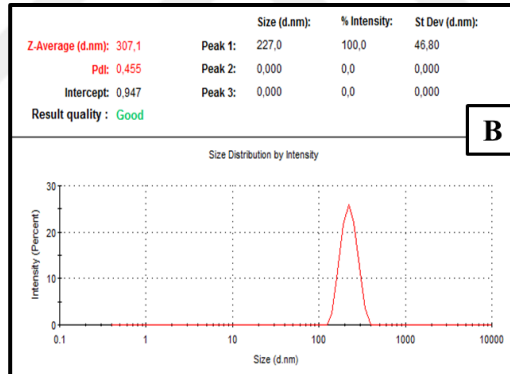
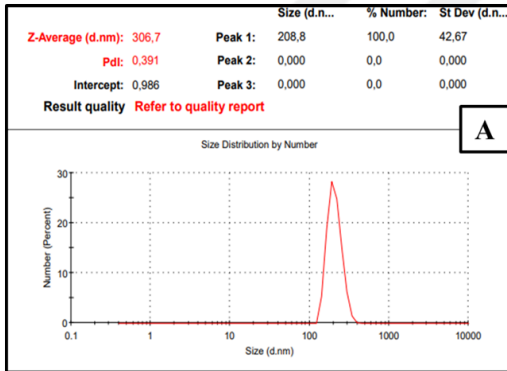
4.2.1. Katı Lipid Nanopartiküllerde İlaç Miktarı Optimizasyonu

Yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniği ile sentezlenen farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren BCNU-SLN'lerde optimum ilaç miktarını belirlemek için HPLC analizi yapıldı. SLN'lere yüklenen ilaç miktarı ve enkapsülasyon verimi hesaplandı (Tablo 4.2.1).

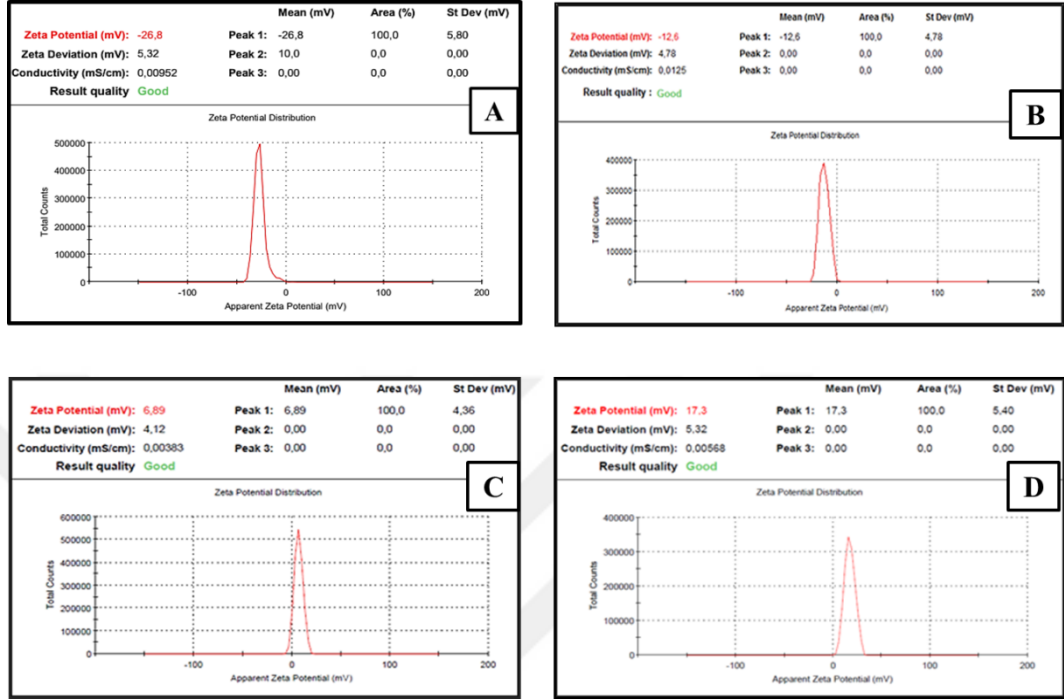
Karmustin konsantrasyon	Adsorplanan İlaç miktarları	Enkapsülasyon verimi
(%)	(μg ilaç /mg SLN)	(%)
0.1	24	78
0.2	60,4	98
0.3	91,9	99,76
0.5	152	99,02

Tablo 4.2.1. Farklı konsantrasyonlarda ilaç yüklenerek sentezlenen BCNU-SLN'lere ait adsorplanan ilaç miktarları (μg ilaç/ mg SLN) ve enkapsülasyon verimleri (%)

Ayrıca farklı konsantrasyon yüzdelerinde sentezlenen BCNU-SLN'lere yapılan SEM, zeta potansiyel ve zeta boyut analizleri de optimum ilaç konsantrasyonunu belirlemede yardımcı olmuştur. Şekil 4.2.1 ve Şekil 4.2.2' de farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren BCNU-SLN'lerin zeta potansiyel ve hidrodinamik çap verileri verilmektedir. Buna göre ilaç konsantrasyon yüzdesi % 0,2 olan SLN'nin zeta potansiyel sonucu beklendiği gibi negatif değer ve boyutu %0,1 konsantrasyon değerine sahip olan nanoyapıya yakındır. İlaç konsantrasyon değeri % 0,3 ve % 0,5 olan SLN'lerin zeta potansiyel sonuçları pozitif ve hidrodinamik çap değerleri KBB'den geçemeyecek kadar yüksek değerdedir. İlaç konsantrasyonu % 0,1 olan SLN'nin boyutunun boş SLN'lere benzer olması ve zeta potansiyel değerinin boş nanoyapıdaki gibi negatif olması tercih edilmesinde önemli rol oynamaktadır.



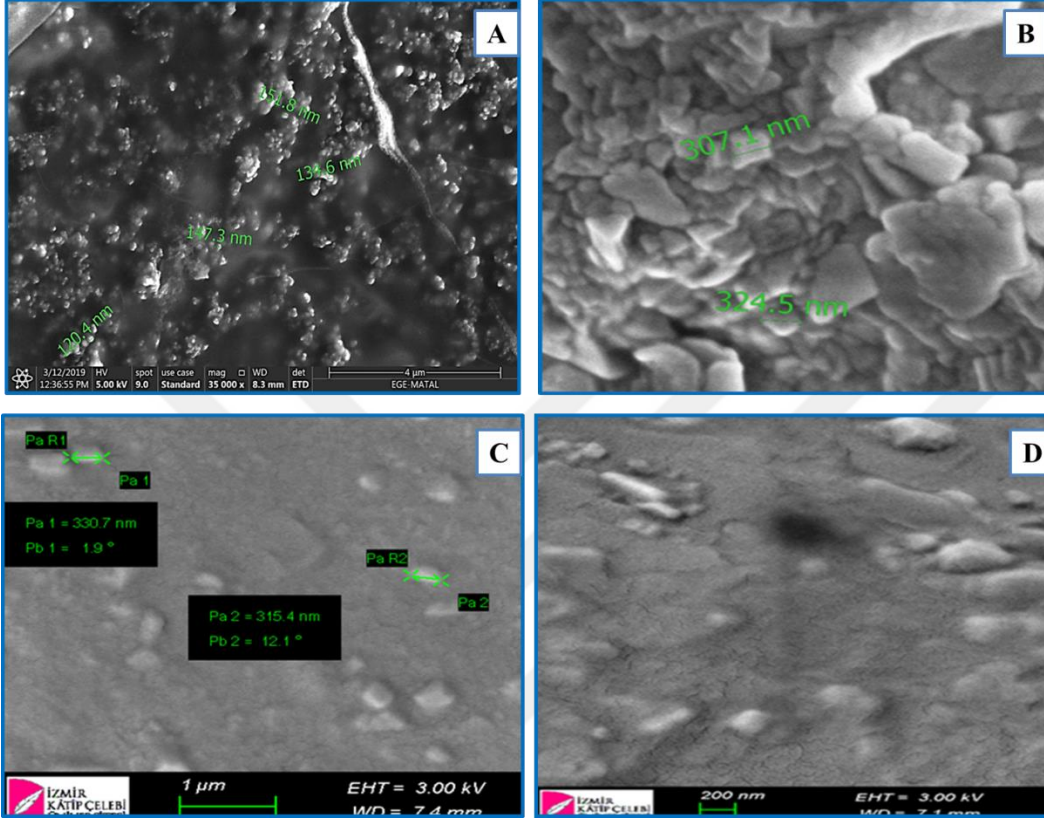
Şekil 4.2.1 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait zeta boyut analizi sonuçları a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN



Şekil 4.2.2 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait zeta potansiyel analizi sonuçları a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN

Optimizasyon çalışması için sentezlenen farklı konsantrasyonlarda ilaç içeren BCNU-SLN'lere ait SEM görüntüleri Şekil 4.2.3' te verilmektedir. Elde edilen SEM görüntülerinde %0,2 ilaç içeren SLN'ler, %0,3 ve %0,5 ilaç içeren nanoyapılar ile karşılaştırıldığında daha küresel yapıda oldukları ve ilaç konsantrasyonu arttıkça yapının küresellikten uzaklaştığı ve bozulduğu görülmektedir. Ayrıca, %0,2 ilaç içeren SLN'lerin kuru form boyutlarına bakıldığında KBB'den geçebilecek boyutta değildir. Tüm analiz verilerine bakıldığında optimum ilaç konsantrasyonu %0,1 olarak belirlenmiştir. %0,1 ilaç içeren SLN'nin enkapsülasyon verimi diğerlerine göre daha düşük olmasına rağmen hidrodinamik çapının en küçük olması, belirli küresellikte yapıların elde

edilmesi ve düşük konsantrasyonda ilaç ile tedavide etkinlik amaçlandığı için optimum değer kabul edilmiştir.



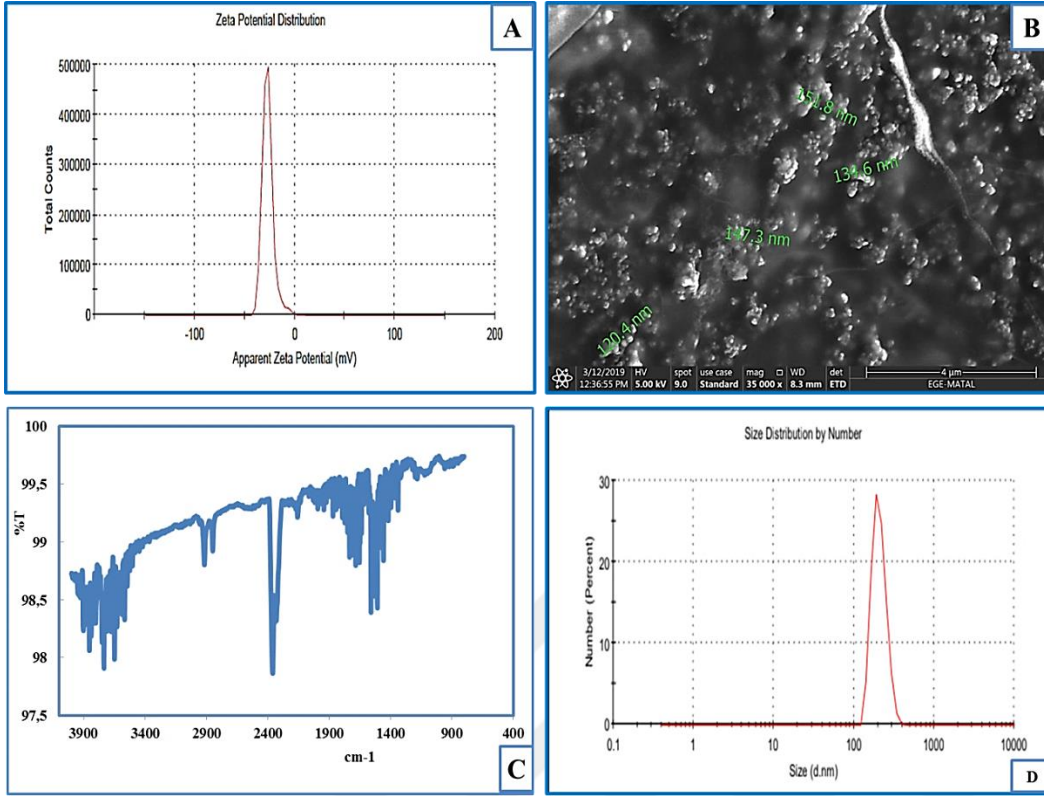
Şekil 4.2.3 Farklı konsantrasyondaki BCNU-SLN'lere ait SEM analiz görüntüleri a) %0,1 ilaç içeren SLN b) %0,2 ilaç içeren SLN c) %0,3 ilaç içeren SLN d) %0,5 ilaç içeren SLN

Optimum ilaç konsantrasyonu %0,1 olan BCNU yüklü SLN (BCNU-SLN)'ye ait karakterizasyon analizleri Şekil 4.2.4 'de verilmiştir.

Şekil 4.2.4 a'da gösterilen parçacığın stabilitesi hakkında bilgi veren zeta potansiyel grafiğine göre BCNU-SLN'lerin zeta potansiyeli -26.8 mV olarak bulundu. Parçacıkların yüzeylerinin kaplanmasında kullanılan Tween 80 negatif yüzey yükü sağlayarak aglomerasyondan kaçınmayı sağladı. BCNU-SLN'lerin sentezlendiği Kuo ve Liang (2011) ve Kuo ve Cheng (2015) 'e ait çalışmalarda da

yüzey aktif maddelerin oranı değiştirilerek parçacıkların agrege olmadığı en düşük zeta potansiyel değeri araştırılmıştır.

BCNU-SLN'lerin SEM görüntülerine bakıldığında (Şekil 4.2.4 b) boyutlarının 120.4 nm ile 151.8 nm arasında ve küresel bir geometride olduğu görülmektedir. Kuo ve Liang (2011)'in yaptığı bir çalışmada BCNU-SLN'lerin SEM analizi sonucunda yuvarlak şekilli ve düzenli boyut aralığında yapılar elde edilmiştir. Ayrıca, tamoksifen ve laktoferrin modifiye BCNU-SLN sentezi yapılan bir diğer çalışmada SLN'lerde SEM analizi sonucunda 100 ile 175 nm aralığında küresel şekilde yapılar elde edilmiştir (Kuo and Cheng., 2015). Şekil 4.2.4 c'de verilen BCNU-SLN FTIR spektrumunda SLN oluşumunu gösteren piklerden olan CH_2 VE CH_3 'e ait pikler sırasıyla 2846 cm^{-1} ve 2914 cm^{-1} 'de görüldü. Ayrıca BCNU' ya ait N=O gerilmesini belirten 1458 cm^{-1} 'de görülmesi beklenen pik bizim çalışmamızda 1456 cm^{-1} 'de görüldü (Şekil 4.2.4 c). Bu sonuç BCNU'nun SLN içerisine başarılı bir şekilde adsorpsiyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Partikül boyutunun belirlenmesi için yapılan zeta boyut analizi sonucunda elde edilen verilere göre ortalama boyut 306.7 nm olarak bulundu (Şekil 4.2.1 d). Örneklere uygulanan SEM ve zeta boyut analizi arasında belirlenen boyut farkının kurutma adımından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.



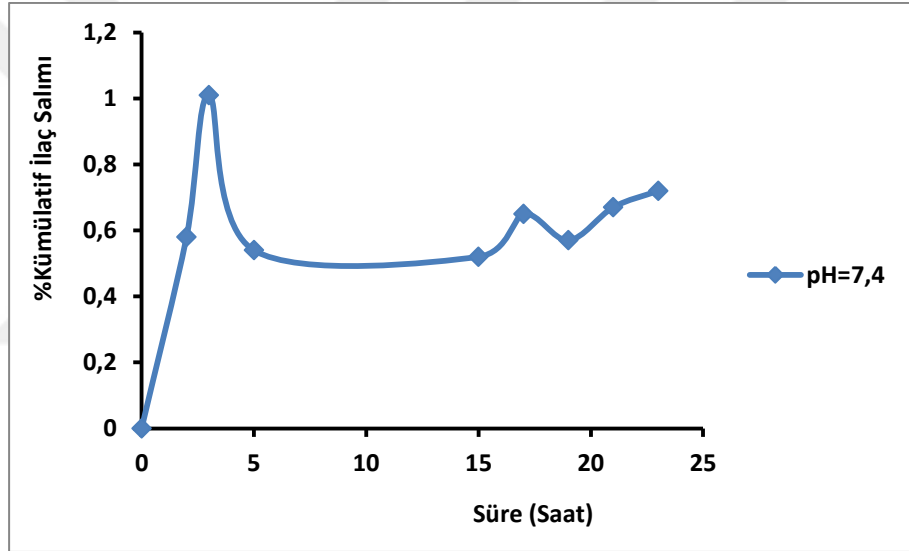
Şekil 4.2.4 BCNU-SLN karakterizasyon analizi sonuçları a)BCNU-SLN zeta potansiyel grafiği, b) BCNU-SLN'ye ait SEM görüntüsü, c) BCNU-SLN'ye ait FTIR spektrumu, d)BCNU-SLN'ye ait boyut dağılım grafiği

4.3 *In Vitro* İlaç Salımı

In vitro ilaç salımı sonucuna bakıldığında sentezlenen BCNU-SLN'lerin pH 7,4' te ilaç salımının belirli zaman dilimlerinde hızlı ancak genellikle yavaş olduğu görülmektedir. Bu sonuç bize BCNU-SLN'lerin ilacı sağlıklı dokularda salma eğiliminin az olduğu ve kontrollü olarak salımın gerçekleştiği söylenebilmektedir.

Şekil 4.3'te görüldüğü gibi SLN'lerden salınan ilaç miktarı pH 7,4' te ilk 3 saatte % 1.01 kadar iken 5. saate kadar % kümülatif ilaç salımında bir düşüş gerçekleşmektedir. Genel olarak grafiğe bakıldığında 23 saatlik ilaç salımında çok

düşük salım değerleri elde edilmiştir. Bu durumun nedeni olarak sentezlenen nanoyapının yüzeyinde bulunan surfaktanın ilacın kontrollü difüzyonuna ve ortama geçişine engel oluşturması düşünülmektedir. Kuo ve Cheng'in (2015) farklı yüzey modifikasyonları ile BCNU-SLN sentezi yaptığı bir çalışmada ilacın salım karakteristiğine bakıldığında salımın yavaş olduğu ve modifikasyonda kullanılan surfaktanların salımı yavaşlattığı görülmüştür. Aynı zamanda bu çalışmada ilaç salım denemesinin 24 saatten 48 saate uzatılması karmustinin nanoyapının merkezindeki eliminasyonun yavaş gerçekleşmesinden kaynaklı olduğu söylenmiştir.



Şekil 4.3. BCNU-SLN'ye ait *in vitro* ilaç salım grafiği

4.4 Hücre Kültürü

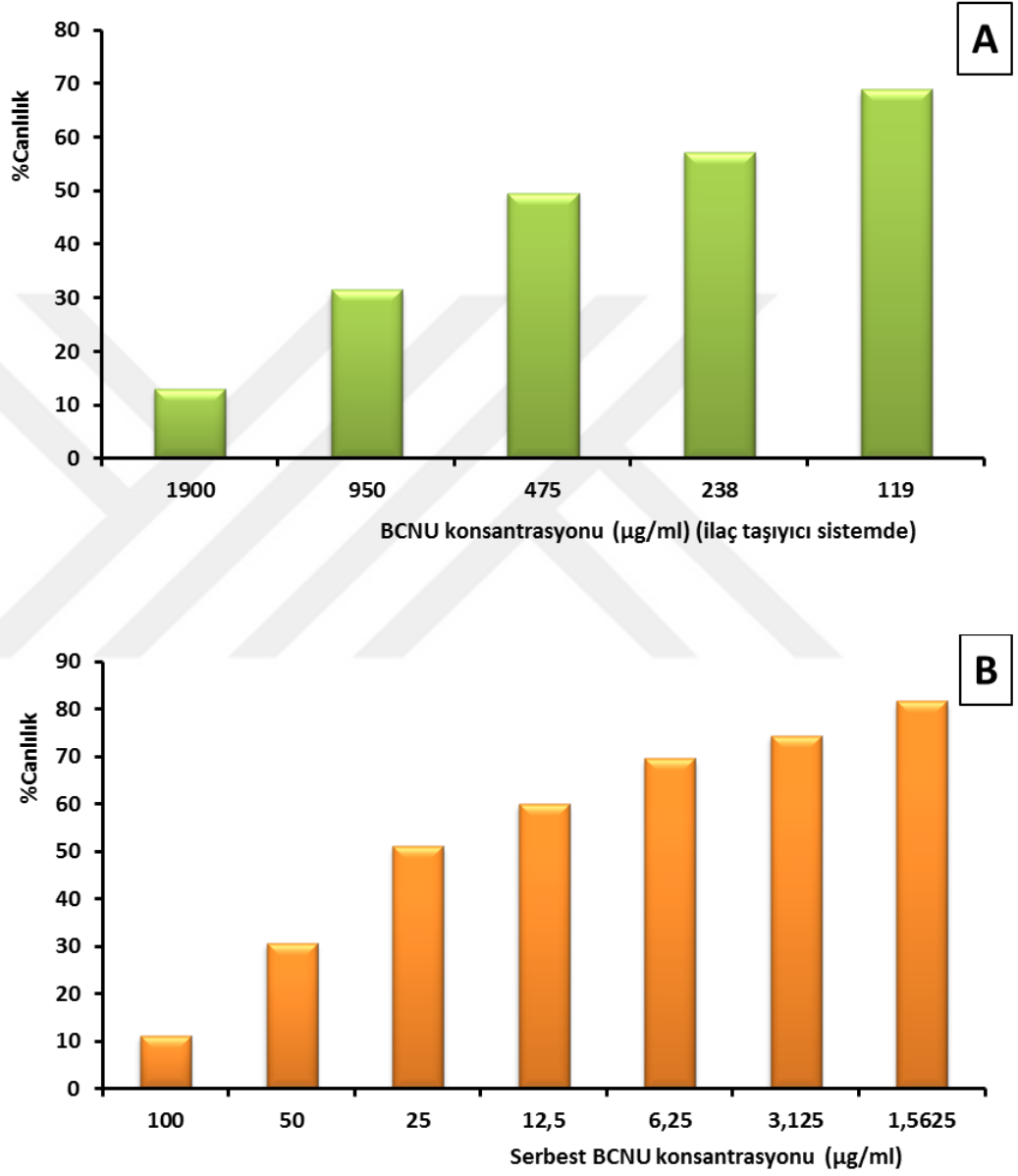
İn vitro sitotoksosite denemeleri U87-MG-luc hücre hattı üzerinde yapılan ve 48 ve 72 saatlik sürelerde elde edilen IC_{50} değerleri Tablo 4.4' te verilmektedir.

Uygulanan Maddeler	IC ₅₀ Değerleri (µg /ml)	
	48. saat	72. saat
Serbest BCNU	17,57	13,14
BCNU-SLN	353,4	442,3

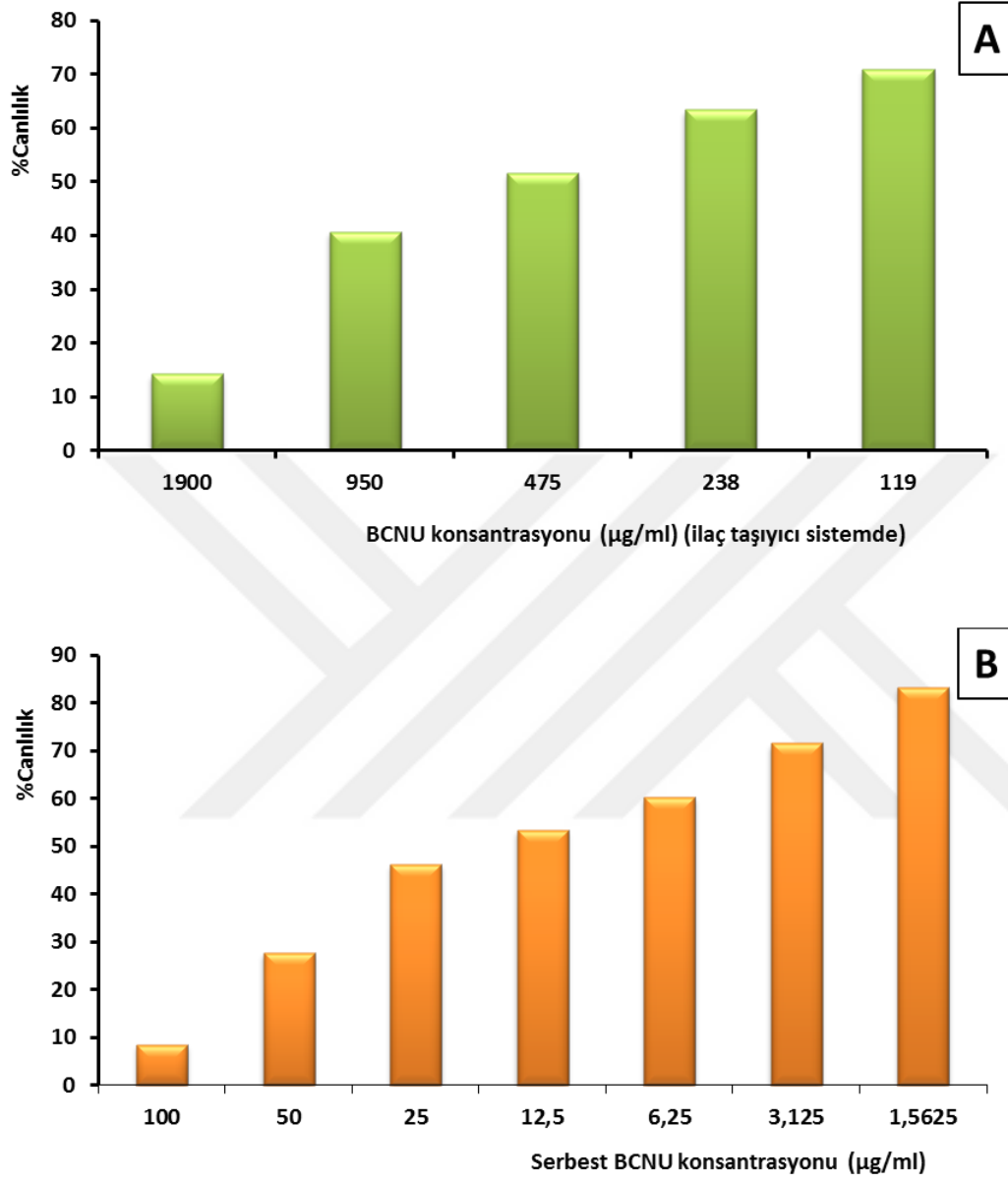
Tablo 4.4 U87-MG-luc hücre hattında 48. ve 72. Saat için serbest BCNU ve BCNU-SLN sitotoksosite testi sonucu elde edilen IC50 değerleri

Tablo 4.4. 'te gösterildiği gibi 48. ve 72. saat sonunda yapılan sitotoksosite testi sonucuna göre serbest BCNU'nun IC₅₀ değeri sırasıyla U87-MG-luc hücre hattı için 17,57 ve 13,14 µg/ml bulunmuştur. Bununla birlikte karmustin yüklü katı lipid nanopartiküllerin 48. ve 72. saat için IC₅₀ değerleri U87-MG-luc hücre hattı için 353,4 ve 442,3 µg/ml bulunmuştur. Şekil 4.4.1 ve Şekil 4.4.2'de U87-MG-luc hücre hattında serbest ve ilaç taşıyıcı sistemde yüklü karmustinin MTT sitotoksosite testine göre sırasıyla 48. saat ve 72. saat sonunda bulunan %canlılık değerleri verilmektedir. Serbest BCNU için % Canlılık değerlerinin 72.saatte 48.saate oranla etken ajana maruz kalma süresinin artmasıyla azaldığı görülmektedir. BCNU-SLN için %Canlılık değerleri kıyaslandığında 48.saat ve 72.saat arasında belirgin farklanma gözlenmemiştir. Elde edilen bulgulara göre hazırlanan ilaç yüklü katı lipid nanopartiküllerde U87-MG-luc hücre hattında ilacın kontrollü bir şekilde salımı gerçekleştirilmiştir.

Kuo ve Wang'ın (2014) yaptığı çalışmada BCNU yüklü katı lipid nanopartiküllerin sitotoksosite denemelerinde kullanılan iki hücre hattından biri olan U87-MG hücre hattının karmustin uygulamalarında daha duyarlı olduğu görülmüştür. Yang (2011) ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise U87 hücre hattı üzerinde toksisitenin, karmustin ajanının DNA çift sarmalındaki guanin alkilasyonu ile O⁶ pozisyonundan bağlanarak gerçekleştiği belirtilmektedir.



Şekil 4.4.1. MTT sitotoksosite testine göre 48. saat % canlılık grafikleri a) BCNU yüklü ilaç taşıyıcı sistem b) Serbest BCNU



Şekil 4.4.2. MTT sitotoksosite testine göre 72. saat % canlılık grafikleri a) BCNU yüklü ilaç taşıyıcı sistem b) Serbest BCNU

5. GENEL DEĞERLENDİRME

Glioblastomaya yönelik tedavi yaklaşımları arasında geleneksel yaklaşımların aksine hedefli ve etkili tedavi potansiyeline sahip ilaç taşıyıcı sistemlerin kullanımı tercih edilmiştir. İlaç taşıyıcı sistem olarak biyoyumlu, biyobozunur ve sentezlenmesi kolay olan katı lipid nanopartiküller kullanılmıştır. Lipofilik karakterde olan ve glioblastoma tedavisinde kullanılan karmustin etken ajanının yan etkilerinin azaltılması, kan beyin bariyerinden geçişini kolaylaştırmak ve hedefli olarak kanser dokusuna taşınmasını sağlamak amacıyla çeşitli modifikasyonlarda yapılarak ilaç taşıyıcı sisteme yüklenmesi çalışılmıştır. Sentezlenen sistemin glioblastoma üzerindeki etkisinin araştırılması amacıyla insan glioblastoma hücre hattı üzerinde *in vitro* sitotoksite denemeleri yapılmıştır.

Sentez yöntemi olarak sentezin kolay olması, kısa sürede gerçekleşmesi ve kullanılan malzemelerin ulaşılabilir olmasından dolayı yüksek kesimli homojenizasyon ve ultrasonikasyon tekniği seçilmiştir. Aynı zamanda kan beyin bariyerinden geçiş için reseptör aracılı geçiş yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla kan beyin bariyeri endotel hücrelerinde eksprese olan MCT1 reseptörü hedeflenmiştir. Bu reseptöre hedefli geçişi sağlamak amacıyla β -Hidroksibütirat, stearil amin ile EDC VE NHS kimyası yardımıyla konjuge edilmiş ve başarılı bir şekilde sentezi gerçekleştirilmiştir. Elde edilen konjugat nanoyapıya katılmıştır ve yine kan beyin bariyerinden geçişte yardımcı olan Tween 80 ile nanoyapının yüzeyi kaplanmış ve uygun boyut aralığında nanopartiküller elde edilmiştir.

Sentezi ve karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilen ilaç taşıyıcı sistemin *in vitro* ilaç salım çalışmasına bakıldığında ilacın fizyolojik pH'da salımının yavaş ve kontrollü olduğu söylenebilmektedir. Bu durumda sistem ilacın kan

dolaşımında salımının az olmasını sağlarken sağlıklı dokudaki toksisitesini azaltılabilecektir.

Sentezlenen katı lipid nanopartiküllerin 120-151, 8 nm aralığında boyuta sahip olması kan beyin bariyerinden geçiş için önemli bir parametredir. Ayrıca nanoyapının zeta potansiyel değerinin düşük olması da stabilitesinin artmasını sağlamıştır.

Beyin kanseri hücre hattında sitotoksik etkisi incelenen ilaç yüklü katı lipid nanopartiküllerin zamana bağlı kontrollü bir ilaç salımını sağladığı söylenebilmektedir.

Sonuç olarak hazırlanan karmustin yüklü katı lipid nanopartiküllerin kan beyin bariyerinden geçişi kolaylaştırma, hedefli tedavi seçeneği sunma, beyin kanseri hücre hattında kontrollü salım ve sağlıklı dokularda toksik etkinin azaltılmasına yönelik potansiyele sahip olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Abbott, N.J., Ronnback, L. and Hansson, E., 2006, Astrocyte-endothelial interactions at the bloodbrain barrier, Nature reviews. Neuroscience, 7: 41-53pp.

Ag Seleci, D., Seleci, M., Walter, J.G., Stahl, F. and Scheper, T., 2016, Niosomes as nanoparticulate drug carriers: fundamentals and recent applications, J. Nanomater. 2016: 1-13pp.

Aguzzi, A., Barres, B.A. and Bennett, M.L., 2013, Microglia: scapegoat, saboteur, or something else?, Science, 339: 156-161pp.

Allard, E., Passirani, C. and Benoit, J.P., 2009, Convection-enhanced delivery of nanocarriers for the treatment of brain tumors, Biomaterials, 30: 2302-2318pp.

Allen, T.M., Hansen, C., Martin, F., Redemann, C. and Yau-Young, A., 1991, Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly (ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo, Biochim. Biophys. Acta, 1066: 29-36pp.

American Brain Tumor Association, 2017, Glioblastoma and Malignant Astrocytoma, <https://www.abta.org/wp-content/uploads/2018/03/glioblastoma-brochure.pdf> (Erişim tarihi: 10 Nisan 2019).

Anjum, K., Shagufta, B.I., Abbas, S.Q., Patel, S., Khan, I., Shah,S.A.A., Akhter, N. and Hassan, S.S.U., 2017, Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review, Biomedicine & Pharmacotherapy, 92:681–689pp.

Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C., 1965, Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids, Journal of molecular biology, 13: 238-252pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Bhaskar, S., Tian, F., Stoeger, T., Kreyling, W., de la Fuente, J.M., Grazu, V., Borm, P., Estrada, G., Ntziachristos, V. and Razansky, D., 2010, Multifunctional Nanocarriers for diagnostics, drug delivery and targeted treatment across blood-brain barrier: perspectives on tracking and neuroimaging, *Particle and fibre toxicology*, 7: 3.

Borges-Walmsley M.I., McKeegan, K.S. and Walmsley, A.R., 2003, Structure and function of efflux pumps that confer resistance to drugs, *The Biochemical journal*, 376: 313-338pp.

Bota, D.A., Desjardins, A., Quinn, J.A., Affronti, M.L. and Friedman, H.S., 2007, Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas, *Ther Clin Risk Manag*, 3(5): 707-15pp.

Brighi, C., Puttick, S., Rose, S. and Whittaker, A.K., 2018, The potential for remodelling the tumour vasculature in glioblastoma, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 136–137: 49-61pp.

Brown, G.L., Eckley, M. and Wargo, K.A., 2010, A Review of Glioblastoma Multiforme, *US Pharm.(Oncol. Suppl.)*, 35: 3–10pp.

Cremer, J.E., 1982, Substrate utilization and brain development, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2: 394–407pp.

Daneman, R. and Rescigno, M., 2009, The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different?, *Immunity*, 31: 722-735pp.

Davis, M.A., 2016, Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment, *Clin J Oncol Nurs.*, 20(5): 2–8pp.

Demeule, M., Régina, A., Che, C., Poirier, J., Nguyen, T. and Gabathuler, R., 2008, Identification and design of peptides as a new drug delivery system for the brain, *J Pharmacol Exp Ther.*, 324: 1064–1072pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

DeVita, V.T. and Chu, E., 2008, A history of cancer chemotherapy, *Cancer Research*, 68(21): 8643-53pp.

Diamandis, P. and Aldape, K., 2018, World Health Organization 2016 Classification of Central Nervous System Tumors, *Neurologic Clinics*, 36: 439–447pp.

El-Bacha, R.S. and Minn, A., 1999, Drug metabolizing enzymes in cerebrovascular endothelial cells afford a metabolic protection to the brain, *Cellular and molecular biology*, 45: 15-23pp.

Ezzati Nazhad Dolatabadi, J. and Omid, Y., 2016, Solid lipid-based nanocarriers as efficient targeted drug and gene delivery systems, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 77: 100–108pp.

Fernandes, G.F.D.S., Fernandes, B.C., Valente, V. and Santos, J.L.D., 2019, Recent advances in the discovery of small molecules targeting glioblastoma, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164: 8-26pp.

Gabizon, A., Price, D.C., Huberty, J., Bresalier, R.S. and Papahadjopoulos, D., 1990, Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: biodistribution and imaging studies, *Cancer research*, 50: 6371-6378pp.

Ganesan, P. and Narayanasamy, D., 2017, Lipid nanoparticles: different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery, *Sustainable Chemistry and Pharmacy*, 6: 37–56pp.

Gardouh, A.R., Gad, S., Ghonaim, H.M. and Ghorab, M.M., 2013, Design and Characterization of Glyceryl Monostearate Solid Lipid Nanoparticles Prepared by High Shear Homogenization, *British Journal of Pharmaceutical Research*, 3(3): 326-346pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Gasco, C.M.A.P., 2012, Solid lipid nanoparticles - SLN. In B. Bhushan (Ed.), Encyclopedia of nanotechnology, Dordrecht Heidelberg New York London: Springer.

Geraldo, L.H.M., Garcia, C., da Fonseca, A.C.C., Dubois, L.G.F., de Sampaio, E., Spohr, T.C.L., Matias, D., de Camargo Magalhães, E.S., do Amaral, R.F., da Rosa, B.G., Grimaldi, I., Leser, F.S., Janeiro, J.M., Macharia, L., Wanjiru, C., Pereira, C.M., Moura-Neto, V., Freitas, C. and Lima, F.R.S., 2019, Glioblastoma Therapy in the Age of Molecular Medicine, Trends Cancer, 5(1): 46-65pp.

Gerhart, D.Z., Enerson, B.E., Zhdankina, O.Y., Leino, R.L. and Drewes, L.R., 1997, Expression of monocarboxylate transporter MCT1 by brain endothelium and glia in adult and suckling rats, American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism, 273(1): E207-13pp.

Goren, D., Horowitz, A.T., Tzemach, D., Tarshish, M., Zalipsky, S. And Gabizon, a., 2000, Nuclear delivery of doxorubicin via folate-targeted liposomes with bypass of multidrug-resistance efflux pump, Clinical Cancer Research, 6: 1949-1957pp.

Gordillo-Galeano, A. and Mora-Huertas, C.E., 2018, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 133: 285–308pp.

Groothuis, D.R., 2000, The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery, Neuro-oncology, 2: 45-59pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Hanif, F., Muzaffar, K., Perveen, K., Malhi, S.M. and Simjee, S.U., 2017, Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment, *Asian Pac J Cancer Prev.*, 18(1): 3-9pp.

Hawkins, R.A., Williamson, D.H. and Krebs, H.A., 1971, Ketone-body utilization by adult and suckling rat brain in vivo, *Biochemical Journal*, 122: 13-18pp.

Hawkins, B.T. and Davis, T.P., 2005, The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease, *Pharmacological reviews*, 57: 173-185pp.

Herve, F., Ghinea, N. and Scherrmann, J.M., 2008, CNS delivery via adsorptive transcytosis, *The AAPS journal*, 10: 455-472pp.

Iacob, G, and Dinca, E.B., 2009, Current data and strategy in glioblastoma multiforme, *Journal of Medicine and Life*, 2(4): 386-93pp.

Johnston, T.P., McCaleb, G.S. and Montgomery, J.A., 1963, The synthesis of antineoplastic agents. xxxii. N-nitrosoureas. I, *J Med Chem*, 6: 669-81pp.

Jose, S., Anju, S.S., Cinu, T.A., Aleykutty, N.A., Thomas, S. and Souto, E.B., 2014, In vivo pharmacokinetics and biodistribution of resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles for brain delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 474: 6-13pp.

Juillerat-Jeanneret, L., 2008, The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles?, *Drug Discov Today*, 13: 1099-1106.

Kann, H.E., 1978, Comparison of biochemical and biological effects of four nitrosoureas with differing carbamoylating activities, *Cancer Research*, 38: 2363-6pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Karim, R., Palazzo, C., Evrard, B. and Piel, G., 2016, Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art, *Journal of Controlled Release*, 227: 23-37pp.

Keleştemur, S., Altunbek, M. and Culha, M., 2017, Influence of EDC/NHS coupling chemistry on stability and cytotoxicity of ZnO nanoparticles modified with proteins, *Applied Surface Science*, 403: 455-463pp.

Kim, J., Manspecker, M.P. and Thomas, S.N., 2019, Augmenting the synergies of chemotherapy and immunotherapy through drug delivery, *Acta Biomaterialia*, 88: 1-14pp.

Klibanov, A.L., Maruyama, K., Beckerleg, A.M., Torchilin, V.P. and Huang, L., 1991, Activity of amphipathic poly (ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target, *Biochim. Biophys. Acta*, 1062: 142-148pp.

Koo, Y.E., Reddy, G.R., Bhojani, M., Schneider, R., Philbert, M.A., Rehemtulla, A., Ross, B.D. and Kopelman, R., 2006, Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms, *Advanced drug delivery reviews*, 58: 1556-1577pp.

Krauze, M.T., Saito, R., Noble, C., Tamas, M., Bringas, J., Park, J.W., Berger, M.S. and Bankiewicz, K., 2005, Reflux-free cannula for convection-enhanced high-speed delivery of therapeutic agents, *Journal of neurosurgery*, 103: 923-929pp.

Kumar, S. and Randhawa, J.K., 2013, High melting lipid based approach for drug delivery: solid lipid nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C*, 33: 1842–1852pp.

Kuo, Y.C. and Liang, C.T., 2011, Inhibition of human brain malignant glioblastoma cells using carmustine-loaded cationic solid lipid nanoparticles with surface anti-epithelial growth factor receptor, *Biomaterials*, 32: 3340-3350pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Kuo, Y.C. and Cheng, S.J., 2015, Brain targeted delivery of carmustine using solid lipid nanoparticles modified with tamoxifen and lectoferrin for antitumor proliferation, *International Journal of Pharmaceutics*, 499(1-2):10-19pp.

Kuo, Y.C. and Wang, C.C., 2014, Carmustine-loaded cationic solid lipid nanoparticles with serotonergic 1B receptor subtype antagonist for in vitro targeted delivery to inhibit brain cancer growth, *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 46: 1-14pp.

Leonardi, A., Bucolo, C., Romano, G.L., Platania, C.B.M., Drago, F., Puglisi, G. and Pignatello, R., 2014, Influence of different surfactants on the technological properties and in vivo ocular tolerability of lipid nanoparticles, *Int. J. Pharm.* 470: 133–140pp.

Lim, S.J. and Kim, C.K., 2002, Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid, *International Journal of Pharmaceutics*, 243: 135–146pp.

Lian, T. and Ho, R.J., 2001, Trends and developments in liposome drug delivery systems, *Journal of pharmaceutical sciences*, 90: 667-680pp.

Lin, C.H., Chen, C.H., Lin, Z.C. and Fang, J.Y., 2017, Recent advances in oral delivery of drugs and bioactive natural products using solid lipid nanoparticles as the carriers, *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2): 219-234pp.

Loo, T.L., Dion, R.L. and Dixon, R.L. and Rall, D.P., 1966, The antitumor agent, 1,3-bis 2-chloroethyl.-1-nitrosourea, *J Pharm Sci*, 55: 492–497pp.

Lu, W., Wan, J., She, Z. and Jiang, X., 2007, Brain delivery property and accelerated blood clearance of cationic albumin conjugated pegylated nanoparticle, *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 118: 38-53pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Manjunath, K., Reddy, J.S., and Venkateswarlu, V., 2005, Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27: 127-144pp.

Matter, K. and Balda, M.S., 2003, Signalling to and from tight junctions, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4: 225-236pp.

Miranda, A., Blanco-Prieto, M.J., Sousa, J., Pais, A. and Vitorino, C., 2017, Breaching barriers in glioblastoma. Part II: Targeted drug delivery and lipid nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, 531(1): 389-410pp.

Mrugala, M.M., 2013, Advances and challenges in the treatment of glioblastoma: a clinician's perspective, *Discovery Medicine*, 15(83): 221-30pp.

Naseri, N., Valizadeh, H. and Zakeri-Milani, P., 2015, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure preparation and application, *Adv. Pharm. Bull.* 5: 305–313pp.

O'Kane, R.L. and Hawkins, R.A., 2003, Na⁺-dependent transport of large neutral amino acids occurs at the abluminal membrane of the blood-brain barrier, *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 285: 1167-1173pp.

Pardridge, W.M., 1983, Brain metabolism: a perspective from the blood–brain barrier, *Physiological Reviews*, 63(4): 1481-535pp.

Pardridge, W.M., 2002, Drug and gene delivery to the brain: the vascular route, *Neuron*, 36: 555-558pp.

Pardridge, W.M., 2012, Drug transport across the blood-brain barrier, *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 32: 1959-1972pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Patel, S.G., Patel, M.D., Patel, A.J., Chougule, M.B. and Choudhury, H., 2018, Solid Lipid Nanoparticles for Targeted Brain Drug Delivery, Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors 1st Edition.

Pellerin, L., 2003, Lactate as a pivotal element in neuron-glia metabolic cooperation, *Neurochemistry International*, 43: 331–338pp.

Pellerin, L. and Magistretti, P.J., 2003, Food for thought: challenging the dogmas, *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 23: 1282–1286pp.

Pierre, K. and Pellerin, L., 2005, Monocarboxylate transporters in the central nervous system: distribution, regulation and function, *Journal of Neurochemistry*, 94: 1–14pp.

Pinel, S., Thomas, N., Boura, C. and Barberi-Heyob M., 2019, Approaches to physical stimulation of metallic nanoparticles for glioblastoma treatment, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 138: 344-357pp.

Ponka, P. and Lok, C.N., 1999, The transferrin receptor: role in health and disease. *Int J Biochem Cell B*, 31: 1111–37pp.

Pourgholi, F., Hajivalili, M., Farhadd, J.N., Kafil, H.S. and Yousefi, M., 2016, Nanoparticles: Novel vehicles in treatment of Glioblastoma, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 77: 98–107pp.

Prados, M.D., Schold, S.J.S., Fine, H.A., Jaeckle, K., Hochberg, F., Mechtler, L., Fetell, M.R., Phuphanich, S., Feun, L., Janus, T.J., Ford, K. and Graney, W., 2003, A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma, *Neuro-oncology*, 5: 96-103pp.

Prasad, G. and Haas-Kogan, D.A., 2009, Radiation-induced gliomas, *Expert Rev Neurother.*, 9(10): 1511-7. doi: 10.1002/pmic.200800802.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Qian, Z.M., Li, H.Y., Sun, H.Z. and Ho, K., 2002, Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway, *Pharmacol Rev.*, 54:561–587pp.

Rajera, R., Nagpal, K., Singh, S.K. and Mishra, D.N., 2011, Niosomes: a controlled and novel drug delivery system, *Biol. Pharm. Bull.*, 34: 945–953pp.

Saeedi, M., Eslamifar, M., Khezri, K. and Dizaj, S.M., 2019, Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 111: 666-675pp.

Salvati, M., Frati, A., Russo, N., Caroli, E., Polli, F.M., Minniti, G. and Delfini, R., 2003, Radiation-induced gliomas: report of 10 cases and review of the literature, *Surgical Neurology*, 60(1): 60-67pp.

Schabel, F.M., Johnston, T.P., McCaleb, G.S., Montgomery, J.A., Laster, W.R. and Skipper, H.E., 1963, Experimental evaluation of potential anticancer agents VIII. Effects of certain nitrosoureas on intracerebral L1210 leukemia. *Cancer Res*, 23: 725–33pp.

Schepartz, S.A., 1976, Early history and development of the nitrosoureas, *Cancer Treat Rep*, 60: 647–9pp.

Schlageter, K.E., Molnar, P., Lapin, G.D. and Groothuis, D.R., 1999, Microvessel organization and structure in experimental brain tumors: microvessel populations with distinctive structural and functional properties, *Microvascular research*, 58: 312-328pp.

Schwartzbaum, J.A., Fisher, J.L., Aldape, K.D. and Wrensch M., 2006, Epidemiology and molecular pathology of glioma, *Nat Clin Pract Neurol.*, 2(9):494-503pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Scott, J., Tsai, Y.Y., Chinnaiyan, P. and Yu, H.H., 2011, Effectiveness of radiotherapy for elderly patients with glioblastoma, *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 81(1): 206-10pp.

Senior, J., Crawley, J.C. and Gregoriadis, G., 1985, Tissue distribution of liposomes exhibiting long half-lives in the circulation after intravenous injection, *Biochimica et biophysica acta*, 839: 1-8pp.

Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E. and Harding, I., 2015, Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability. New York: Springer.

Sharma, A., Straubinger, N.L. and Straubinger, R.M., 1993, Modulation of human ovarian tumor cell sensitivity to N-(phosphonacetyl)-L-aspartate (PALA) by liposome drug carriers, *Pharmaceutical research*, 10: 1434-1441pp.

Sharom, F.J., 2011, The P-glycoprotein multidrug transporter, *Essays in biochemistry*, 50: 161-178pp.

Sheikov, N., McDannold, N., Vykhodtseva, N., Jolesz, F. and Hynynen, K., 2004, Cellular mechanisms of the blood-brain barrier opening induced by ultrasound in presence of microbubbles, *Ultrasound in medicine & biology*, 30: 979-989pp.

Squire, J.M., Chew, M., Nneji, G., Neal, C., Barry, J. and Michel, C., 2001, Quasi-periodic substructure in the microvessel endothelial glycocalyx: a possible explanation for molecular filtering?, *Journal of structural biology*, 136: 239-255pp.

Stam, R., 2010, Electromagnetic fields and the blood-brain barrier, *Brain research reviews*, 65: 80-97pp.

Stewart, L.A., 2002, Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials, *Lancet*, 359: 1011-8pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Sun, X.Y., Pang, Z.Q., Ye, H.X., Qiu, B., Guo, L.R. and Li, J.W., 2012, Co-delivery of pEGFP-hTRAIL and paclitaxel to brain glioma mediated by an angiopep-conjugated liposome, *Biomaterials.*,33: 916–924pp.

Talele, P., Sahu, S. and Mishra, A.K., 2018, Physicochemical characterization of solid lipid nanoparticles comprised of glycerol monostearate and bile salts, *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 172: 517-525pp.

Tapeinos, C., Battaglini, M. and Ciofani, G., 2017, Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases, *J Control Release*, 264: 306-332pp.

Thakkar, J.P., Dolecek, T.A., Horbinski, C., Ostrom, Q.T., Lightner, D.D., Sloan, J.S.B. and Villano, J.L., 2014, Epidemiologic and Molecular Prognostic Review of Glioblastoma, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, 23(10): 1985–1996pp.

Tian, H., Lu, Z., Li, D. and Hu, J., 2017, Preparation and characterization of citral-loaded solid lipid nanoparticles, *Food chemistry*, 248: 78-85pp.

Tildon, J.T. and Roeder, L.M., 1988, Transport of 3-hydroxy [3-14C] butyrate by dissociated cells from rat brain, *American Journal of Physiology*, 255(2 Pt 1): C133-9pp.

Torchilin, V.P., 1994, Immunoliposomes and PEGylated immunoliposomes: possible use for targeted delivery of imaging agents, *Immunomethods*, 4: 244-258pp.

van Tellingen, O., Yetkin-Arik, B., de Gooijer, M.C., Wesseling, P., Wurdinger, T. and de Vries, H.E., 2015, Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment, *Drug resistance updates*, 19: 1-12pp.

Regoli, D. And Barabe, J., 1980, Pharmacology of bradykinin and related kinins, *Pharmacological reviews*, 32: 1-46pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Venishetty, V.K., Samala, R., Komuravelli, R., Kuncha, M., Sistla, R. and Diwan, P.V., 2013, β -Hydroxybutyric acid grafted solid lipid nanoparticles: A novel strategy to improve drug delivery to brain, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 9: 388–397pp.

Vredenburgh, J.J., Desjardins, A., Herndon, J.E., Dowell, J.M., Reardon, D.A., Quinn, J.A., Rich, J.N., Sathornsumetee, S., Gururangan, S., Wagner, M., Bigner, D.D., Friedman, A.H. and Friedman, H.S., 2007, Phase II Trial of Bevacizumab and Irinotecan in Recurrent Malignant Glioma, *Clinical Cancer Research*, 13(4): 1253-1259pp.

Wang, H., Xu, K., Liu, L., Tan, J.P., Chen, Y., Li, Y., Fan, W., Wei, Z., Sheng, J.Y. and Yang, Y., 2010, The efficacy of self-assembled cationic antimicrobial peptide nanoparticles against *Cryptococcus neoformans* for the treatment of meningitis, *Biomaterials*, 31: 2874- 2881pp.

Wang, H., Xu, T., Jiang, Y., Xu, H., Yan, Y., Fu, D. and Chen, J., 2015, The Challenges and the Promise of Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas, *Neoplasia*., 17(3): 239–255pp.

Wei, X., Chen, X., Ying, M. and Lun, W., 2014, Brain tumor-targeted drug delivery strategies, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4(3): 193–201pp.

Weiss, R.B. and Issell, B.F., 1982, The nitrosoureas: carmustine BCNU and lomustine CCNU, *Cancer Treat Rev*, 9: 313–30pp.

Weller, M., Wick, W., Aldape, K., Brada, M., Berger, M., Pfister, S.M., Nishikawa, R., Rosenthal, M., Wen, P.Y., Stupp, R. and Reifenberger, G., 2015, Glioma, *Nature Reviews-Disease Primers*, doi:10.1038/nrdp.2015.17.

Wilcox, J.A., Ramakrishna, R. and Maggel, R., 2018, Immunotherapy in Glioblastoma, *World Neurosurgery*, 116: 518-528pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Wolburg, H. And Lippoldt, A., 2002, Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation, *Vascular pharmacology*, 38: 323-337pp.

Yang, M.B., Tamargo, R.J. and Brem, H., 1989, Controlled delivery of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea from ethylene-vinyl acetate copolymer, *Cancer Res*, 49: 5103–7pp.

Yang, H.W., Hua, M.Y., Liu, H.L., Huang, C.Y., Tsai, R.Y., Lu, Y.J., Chen, J.Y., Tang, H.J., Hsien, H.Y., Chang, Y.S., Yen, T.C., Chen, P.Y. and Wei, K.C., 2011, Self-protecting core-shell magnetic nanoparticles for targeted, traceable, long half-life delivery of BCNU to gliomas, *Biomaterials*, 32(27): 6523-32pp.

Yang, J., Li, Y., Zhang, T. and Zhang, X., 2016, Development of bioactive materials for glioblastoma therapy, *Bioactive Materials*, 1: 29-38pp.

Yonehara, S., Brenner, A.V., Kishikawa, M., Inskip, P.D., Preston, D.L., Ron, E., Mabuchi, K. and Tokuoka, S., 2004, Clinical and epidemiologic characteristics of first primary tumors of the central nervous system and related organs among atomic bomb survivors in Hiroshima and Nagasaki, 1958-1995, *Cancer*, 101(7): 1644-54pp.

Yuan, F., Leunig, M., Huang, S.K., Berk, D.A., Papahadjopoulos, D. and Jain, R.K., 1994, Microvascular permeability and interstitial penetration of sterically stabilized (stealth) liposomes in a human tumor xenograft, *Cancer Research*, 54: 3352-3356pp.

Yu, A.S., McCarthy, K.M., Francis, S.A., McCormack, J.M., Lai, J., Rogers, R.A., Lynch, R.D. and Schneeberger, E.E., 2005, Knockdown of occludin expression leads to diverse phenotypic alterations in epithelial cells, *American journal of physiology. Cell physiology*, 288: 1231-1241pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

Zhang, P.C., Hu, L.J., Yin, Q., Zhang, Z.W., Feng, L.Y. and Li, Y.P., 2012, Transferrin-conjugated polyphosphoester hybrid micelle loading paclitaxel for brain-targeting delivery: synthesis, preparation and *in vivo* evaluation, *Journal Control Release*, 159: 429–434pp.



TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam sűresince deneyimlerini ve bilgi birikimini benimle paylaőan sayın Prof. Dr. Őenay Őanlıer' e, her zaman yanımda olan ve en bűyűk destekilerimden biri olan, iten sevgisiyle adeta kardeő sevgisini bana tattıran çalıőma arkadaőım Eda apkın'a ve bu gűnlere gelmemde bűyűk emeėi olan aileme çok teőekkűr ederim. Bu alıőma sűresince gerekli verileri saėlayan Argefar birimine ve çalıőanlarına teőekkűrű bir borç bilirim.

Bu alıőma TŪBİTAK 1001 projesi kapsamında desteklenmiőtir.

06 / 08 / 2019

İmzası

Didem AKSU