T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK AKILLI NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE İLAÇ SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Oğuz YÜCEL

DANIŞMAN
Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ

II. DANIŞMAN
Prof. Dr. Serkan EMİK

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler, Doktora Programı

Ocak, 2026

TEZ KABUL VE ONAYI

Oğuz YÜCEL tarafından, **Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ** danışmanlığında hazırlanan **"KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK AKILLI NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE İLAÇ SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ"** başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından **07/01/2026** tarihinde yapılan sınav sonucunda **oy birliği** ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

		İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Saadet Kevser PABUCCUOĞLU İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Emine Şeküre Nazlı ARDA İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Tülin Banu İYİM İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Kimyasal Teknolojiler Anabilim Dalı		☒ Kabul ☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. İlknur KÜÇÜK Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü		☒ Kabul ☐ Ret

BÜTÇE DESTEKLERİ

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FBA-2023-36871

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi - Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: FDK-2023-37388

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

T.C.....1
KANSER TEDAVSİNDE KULLANILABİLECEK AKILLI NANOPARTİKÜLLER SENTEZİ VE İLAÇ SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ.....1
TEZ KABUL VE ONAYI.....iii
BEYAN.....iv
BÜTÇE DESTEKLERİ.....vi
TEŞEKKÜR.....vii
İÇİNDEKİLER.....ix
ŞEKİL LİSTESİ.....xii
TABLO LİSTESİ.....xix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....xxii
ÖZET.....xxiii
ABSTRACT.....xxv
1. GİRİŞ.....1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE.....3
2.1. NANOTEKNOLOJİ.....3
2.2. İLAÇ TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK NANOPARTİKÜLLER.....8
2.3. KANSER.....12
2.4. KANSER VE NANOTEKNOLOJİ.....14
2.5. KAN-BEYİN BARİYERİ.....21
2.5.1. Kan-Beyin Bariyeri Geçiş Mekanizmaları.....24
2.6. BEYİN KANSERİ.....27
2.6.1. Temozolomid.....30
2.6.2. Paklitaksel.....34
2.7. NANO LİPİT TAŞIYICI.....37
2.7.1. Yapılarına göre Nano Lipit Taşıyıcılar.....42
2.8. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN SENTEZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER.....43
2.8.1. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Yüksek Enerjili Üretim Yöntemleri.....44

2.8.2. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Düşük Enerjili Üretim Yöntemleri.....46
2.8.3. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Organik Çözücü Kullanan Yöntemler.....49
2.8.4. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Kullanılan Diğer Yöntemler.....50
2.9. BEYİN KANSERİ TEDAVİSİNDE NANO LİPİT TAŞIYICILARIN KULLANIMI 54
3. YÖNTEM 59
3.1. KİMYASAL MALZEMELER 60
3.1.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmaların Akış Şeması.....61
3.2. ETKEN MALZEMELER İÇİN GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMALARI 63
3.2.1. Katı ve Sıvı Lipitlerde Etken Madde Çözünürlük Çalışmaları 63
3.2.2. Temozolomid Stabilite Çalışmaları.....65
3.2.3. Metildiazonyum Çalışmaları 66
3.3. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN FORMÜLASYON TASARIMI VE LİPİT KOMBİNASYONLARININ SEÇİMİ.....67
3.4. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN ÜRETİM YÖNTEMLERİ.....68
3.4.1. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compitol/OA) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi 68
3.4.2. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi 70
3.4.3. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi...72
3.4.4. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi 74
3.4.5. Optimize NLT Formülasyonlarının Belirlenmesi 76
3.4.6. Optimizasyon ve Karakterizasyon İşlemlerinde Kullanılan Cihazlar ve Analiz Yöntemleri.....77
3.5. METİLDİAZONYUM YÜKLÜ NANO LİPİT TAŞIYICI SİSTEMLERİ 84
3.5.1. Metildiazonyum (MDA) Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi 85
3.5.2. Metildiazonyum Yüklü Nano Lipit Taşıyıcılar için In Vitro Salım ve Salım Kinetiklerinin Analizi.....86
3.5.3. MDA Temelli NLT'ler için İn Vitro Çalışmalar.....87
3.6. PAKLİTAKSEL YÜKLÜ NANO LİPİT TAŞIYICI SİSTEMLERİ.....92
3.6.1. Paklitaksel Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi 93
3.6.2. Paklitaksel Yüklü Nano Lipit Taşıyıcılar için In Vitro Salım ve Salım Kinetiklerinin Analizi.....95
3.6.3. PTX temelli NLT'ler için in vitro çalışmalar ve sonuçlar 96
4. BULGULAR.....98

4.1. TEMOZOLOMİD İÇİN GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMALARI 98
4.1.1. Katı Lipitler için Etken Madde Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi 98
4.1.2. Sıvı Lipitler için Temozolomid Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi...100
4.1.3. Temozolomid Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi.....102
4.1.4. Metildiazonyum Çalışmaların Değerlendirilmesi 108
4.2. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN ÜRETİM YÖNTEMLERİNE AİT BULGULAR..113
4.2.1. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi 113
4.2.2. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi.122
4.2.3. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi 132
4.2.4. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi 141
4.3. İLAÇ TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK OPTİMİZE NLT FORMÜLASYONLARININ BELİRLENMESİ.....152
4.3.1. MDA Yüklü NLT'lerin Karakterizasyonları.....164
4.3.2. MDA Yüklü NLT'lerin Enkapsülasyon Verimleri ve İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi 169
4.3.3. MDA yüklü NLT'ler için In Vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi.....171
4.3.4. PTX yüklü NLT'lerin Karakterizasyonları 177
4.3.5. PTX Yüklü NLT'lerin Enkapsülasyon Verimleri ve İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi 182
4.3.6. PTX yüklü NLT'ler için In Vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi.....184
4.4. ETKEN MALZEME YÜKLÜ NLT'LERİN IN VITRO HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞAMALARI 190
4.4.1. Optimize MDA yüklü NLT'ler için In Vitro Hücre Çalışmaları 190
4.4.2. Optimize PTX yüklü NLT'ler için In Vitro Hücre Çalışmaları.....205
5. TARTIŞMA.....206
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 228
KAYNAKLAR.....231
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 252
ETİK KURUL İZİN YAZISI 253
KURUM İZNİ YAZILARI.....254
ÖZGEÇMİŞ 255

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 2.1: Çeşitli malzemelerin nanometre ölçeğinde karşılaştırılması [2]. 4

Şekil 2.2: Nanomalzemelerin geçmişte kullanımları [2],(A) Lycurgus kupası, Au-Ag NP alaşımı içeren camdan ışık geçtiğinde parlak kırmızı görünümü, (B) Antik seramik tabaklarda AgNP'ler, (C) Orta Çağ kilise pencerelerindeki nanoparçacıklar, (D) Orta Çağ kiliselerindeki renkli pencere camlarında kullanılan AuNP ve AgNP'lerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri. 6

Şekil 2.3: Nanopartikül sentezinde kullanılan genel sentez yaklaşımları. 8

Şekil 2.4: Nanopartiküllerin sınıflandırılmasında çeşitli nanopartiküllerin şematik gösterimi [57]..... 11

Şekil 2.5: 2025 ve 2035 yıllarına ait Türkiye ve Dünya Kanser İstatistikleri, görülme sıklığı sayıları (üst), ölüm sayıları (alt), WHO, Kanser İstatistik Raporları..... 13

Şekil 2.6: Kanserin gelişim mekanizması ve çeşitli nanopartiküllerin şematik gösterimi [102]. 17

Şekil 2.7:Nanopartiküllerin hücre alım mekanizmasının şematik gösterimi [90]..... 19

Şekil 2.8: KBB'nin varlığına kanıt sunan tripan mavisi ile yapılan çalışmaya ait orijinal çizim [112]..... 22

Şekil 2.9: Kan-beyin bariyerinin temel yapısal bileşenlerinin şematik gösterimi..... 23

Şekil 2.10: KBB geçiş mekanizmalarının şematik gösterimi [122] 24

Şekil 2.11: Beyin kanserinin şematik gösterimi [150]. 28

Şekil 2.12: TMZ'nin bozunma mekanizması..... 32

Şekil 2.13: TMZ'nin KBB geçişi ve gliomalardaki etki mekanizmasının şematik gösterimi [172]..... 33

Şekil 2.14: PTX'in etki mekanizmasının şematik gösterimi..... 36

Şekil 2.15: Lipit bazlı nanopartikül taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi: (sol) yalnızca katı lipitten oluşan SLN yapısında ilacın kristalin katı lipit matrisi içerisinde sınırlı boşluklarda konumlanması; (sağ) katı–sıvı lipit karışımından oluşan NLT yapısında sıvı lipidin matrise düzensizlik kazandırarak ilacın lipit fazda daha fazla yüklenmesine olanak tanıması..... 38

Şekil 2.16: SLN ve NLT'lerin yapısal farklılıkları sonucu ilaç yüklenme ve depolama özelliklerinin şematik gösterimi [195]. 40

Şekil 2.17: NLT'lerde matriks yapısına göre üç temel yapı tipi (kusurlu, amorf ve çoklu tip) ve ilacın lipit çekirdek içindeki olası dağılımının şematik gösterimi [213]. 43

Şekil 3.1: Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara ait akış şeması. 62

Şekil 3.2: 2.5 ppm konsantrasyona sahip TMZ çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği. ... 78

Şekil 3.3: HPLC verilerinden hazırlanan TMZ kalibrasyon eğrisi. 78

Şekil 3.4: 0.5 ppm konsantrasyona sahip AIC çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği. 79

Şekil 3.5: HPLC verilerinden hazırlanan AIC kalibrasyon eğrisi. 79

Şekil 3.6: 5 ppm konsantrasyona sahip PTX çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği. 80

Şekil 3.7: HPLC verilerinden hazırlanan PTX kalibrasyon eğrisi. 80

Şekil 3.8: MDA temelli NLT'lerin T98G hücre hattı için gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaların şematik gösterimi. 88

Şekil 3.9: PTX temelli NLT'lerin U87MG hücre hattı için gerçekleştirilen in vitro çalışmaların şematik gösterimi. 96

Şekil 4.1: Katı lipit–TMZ sistemlerinde TMZ karışabilirliğin değerlendirilmesi (a) eriyik Compritol-TMZ (5 mg/ 1 g), (b) eriyik Compritol-TMZ (15 mg/1 g), (c) katı Compritol-TMZ (5 mg/1 g), (d) katı Compritol-TMZ (15 mg/1 g). 99

Şekil 4.2: Sıvı lipit–TMZ sistemlerinde TMZ karışabilirliğin değerlendirilmesi (a) TMZ eklenmemiş sıvı lipitlerin görünümü, (b) TMZ eklenmiş sıvı lipitlerin görünümü, (c) sıvı lipitlerde bozunan TMZ'nin görünümü. 101

Şekil 4.3: TMZ'nin PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM ortamlarında farklı sıcaklıklarda (4°C (a, d), 20°C (b, e), 37°C (c, f)) zamana bağlı kimyasal stabilite profillerinin grafikleri. sol sütun 0–300 dk, sağ sütun 0–72 saat. 107

Şekil 4.4: TMZ'nin PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM ortamlarında farklı sıcaklıklarda (4°C (a, d), 20°C (b, e), 37°C (c, f)) zamana bağlı bozunması ile oluşan %MDA'nın grafikleri. sol sütun 0–300 dk, sağ sütun 0–72 saat. 112

Şekil 4.5: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi. 116

Şekil 4.6: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk), PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi. 119

Şekil 4.7: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi. 122

Şekil 4.8: Compritol /OA temelli NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti %10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi. 126

Şekil 4.9: Compritol/OA NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi..... 129

Şekil 4.10: Compritol/OA NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti %10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı %0,5, 1,5 ve 2,5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi. 132

Şekil 4.11: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi. 135

Şekil 4.12: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde (Tween 80) yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve

taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi. 138

Şekil 4.13: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi. 141

Şekil 4.14: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri : (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi. 145

Şekil 4.15: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif madde oranı–süre etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi, (g–ı) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif madde oranı–şiddet etkileşimi. 148

Şekil 4.16: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif madde oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif madde oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi. 151

Şekil 4.17: İstenirlik fonksiyonuna göre optimize edilen Homojenizasyon ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 131.6 ± 5.3 nm; PDI 0.40 ± 0.07) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −20.9 ± 1.6 mV). 153

Şekil 4.18: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Ultrasonikasyon ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 119.1 ± 6.2 nm; PDI 0.22 ± 0.03) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −27.8 ± 2.1 mV). 154

Şekil 4.19: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Homojenizasyon ile üretilmiş Precirol/Hint yağı temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen

partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 167.9 ± 8.2 nm; 0.228 ± 0.08) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −24.3 ± 1.9 mV). 155

Şekil 4.20: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Ultrasonikasyon ile üretilmiş Precirol/Hint yağı temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 146.6 ± 6.8 nm; PDI 0.267 ± 0.04) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli 27.2 ± 2.8 mV). 156

Şekil 4.21: Optimize NLT'lere ait TEM görüntüleri (negatif boyama: %2 (w/v) fosfotungstik asit; 1dk). 158

Şekil 4.22: Compritol/OA bazlı NLT'lerde sıvı lipit/toplam lipit oranına (%0, %10, %30, %50, %70 ve %90) bağlı partikül boyutu dağılımları ve PDI değerleri..... 160

Şekil 4.23: Compritol/OA bazlı NLT'lerde sıvı lipit/toplam lipit oranına (%0, %10, %30, %50, %70 ve %90) bağlı DSC termogramları ve ana erime geçişine ait erime entalpisi (ΔH, mJ/mg) değerleri. 160

Şekil 4.24: Compritol, oleik asit ve Tween 80'e ait DSC termogramları ile bu bileşenlerin fiziksel karışımlarının (Compritol–oleik asit ve Compritol–oleik asit–Tween 80) ve NLT-50 (%50 sıvı lipit içeren NLT) formülasyonunun DSC profillerinin karşılaştırılması (sıcaklık aralığı: −45°C – 80 °C; ısıtma hızı: 2 °C/dk). 162

Şekil 4.25: Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lerin (NLT 50, NLT 0) XRD difraktogramları. 163

Şekil 4.26: Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin (NLT 50, NLT 0) XRD difraktogramları. 164

Şekil 4.27: Compritol, Oleik Asit ve Tween 80 ile üretilen NLT'ye (NLT 50: % 50 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi. 165

Şekil 4.28: Compritol, Tween 80 ile üretilen NLT 0'a (NLT 0: % 0 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi. 166

Şekil 4.29: NLT 50 (Compritol-OA), MDA, MDA-NLT'lere ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi. 167

Şekil 4.30: MDA yüklü NLT'lerin kolloidal karakterizasyonu: (a) DLS ile belirlenen partikül boyutu dağılımı ortalama hidrodinamik partikül boyutu ve PDI grafiği, (b) zeta potansiyeli dağılımı. 169

Şekil 4.31: Serbest MDA ve MDA yüklü NLT formülasyonlarının (MDA-NLT 70, MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 0) in vitro kümülatif salım profilleri (a) 0–960 dk aralığındaki % salım davranışı, (b) 0–3000 dk aralığındaki % salım davranışı. 174

Şekil 4.32: Precirol ATO 5, Hint yağı ve Tween 80 ile üretilen NLT'ye (NLT 50: % 50 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi..... 178

Şekil 4.33: Precirol ATO 5, Tween 80 ile üretilen NLT 0'a (NLT 0: % 0 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi. 179

Şekil 4.34: NLT 50 (Precirol-Hint Yağı), Hint Yağı-PTX, PTX-NLT'lere ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi. 180

Şekil 4.35: PTX yüklü NLT'lerin kolloidal karakterizasyonu: (a) DLS ile belirlenen partikül boyutu dağılımı, ortalama hidrodinamik partikül boyutu ve PDI grafiği, (b) zeta potansiyeli dağılımı. 182

Şekil 4.36: Serbest PTX ve PTX yüklü NLT formülasyonlarının (PTX-NLT 50 ve PTX-NLT 10) in vitro kümülatif salım profilleri: (a) 0–960 dk aralığındaki % salım davranışı, (b) 0–3000 dk aralığındaki % salım davranışı. 187

Şekil 4.37: MTT analizlerine göre 0 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM ve 1600 µM dozlarındaki TMZ ve MDA'nın T98G hücreleri üzerinde sitotoksisite açısından kıyaslanması, 24 saat (a) ve 48 saat (b) sonunda, ilgili dozların TMZ ve MDA için IC75 hesaplanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 eşlenik dozlara kıyasla. 191

Şekil 4.38: 0 (Kontrol) ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250ppm konsantrasyonlarda sentezlenen optimize NLT'lerin T98G hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin MTT analizleri ile gösterilmesi. 192

Şekil 4.39: Sentezlenen 0 (Kontrol) ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarda Coumarin-6 ile işaretlenmiş NLT'lerin T98G hücreleri içerisine alımlarının floresan mikroskobu ile incelenmesi. Hücre nükleusları DAPI ile mavi renk işaretlenmiştir. NLT'ler Coumarin-6 dolayısıyla yeşil renk ile işaretlenmiştir. Ölçüm barı: 20 µm. 193

Şekil 4.40: Kurgulanan Kontrol, 250µM MDA 62.5 ppm NLT ve 250µM MDA yüklü NLT (250µM MDA+62.5ppm NLT) deney gruplarının 24 ve 48 saat sonunda invert mikroskop ile çekilmiş temsili mikrografları (a), ilgili grupların 24 ve 48 saatleri sonunda MTT analizleri ile kıyaslanması (b). *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001; ^{aaa}p<0.001 24s Kontrol grubuna kıyasla, ^{bb}p < 0.01, ^{bbb}p < 0.001 24s 250 µM MDA grubuna kıyasla, ^{c}p<0.05, ^{cc}p<0.01 62.5 ppm NLT grubuna kıyasla, ^{ddd}p<0.001 250 µM MDA+62.5 ppm NLT grubuna kıyasla. 195

Şekil 4.41. Hücrelerde ekprese edilen Anexin V+ ve PI+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05. PI:propidyum iyodür. Ölçüm barı: 20 µM. 197

Şekil 4.42: İmmünofloresan yöntemi Hücrelerde ekprese edilen Anexin V+ ve PI+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05. PI: propidyum iyodür. Ölçüm barı: 20 µM. 198

Şekil 4.43: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen Beclin 1+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; ^{aa}p<0.01 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, ^{c}p<0.05 24 saat NLT grubuna kıyasla, ^{d}p<0.05 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM. 199

Şekil 4.44: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GPX4+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; ^{a}p<0.05 24 saat Kontrol grubuna kıyasla,

$^{bb}p<0.01$ 24 saat MDA grubuna kıyasla, $^{d}p<0.05$ ve $^{dd}p<0.01$ 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM.....200

Şekil 4.45: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; $^{aa}p<0.01$ 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, $^{ccc}p<0.001$ 24 saat NLT grubuna kıyasla, $^{dd}p<0.01$ 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM.....201

Şekil 4.46: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar(a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; $^{a}p<0.05$ ve $^{aa}p<0.01$ 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, $^{dd}p<0.01$ 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM.....202

Şekil 4.47: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar(a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01. Ölçüm barı: 20 µM.....204

Şekil 4.48. Kurgulanan Kontrol, PTX, NLT, PTX+NLT (0.5, 1, 2.5, 5, 10 µM) deney gruplarının 48 saat MTT analizleri ile kıyaslanması. 205

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 2.1: SLN ve NLT'lerin özelliklerinin karşılaştırılması. 40

Tablo 2.2: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre etken maddelerin sınıflandırılması. 41

Tablo 2.3: NLT sentez yöntemlerinin detayları, yöntemlerin avantajları ve dezavantajları. ... 51

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Listesi 60

Tablo 3.2: Compitol/OA formülasyonu için Sıcak Homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu. 70

Tablo 3.3: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için Sıcak Homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu. 72

Tablo 3.4: Compritol/OA formülasyonu için Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu. 74

Tablo 3.5: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu. 76

Tablo 3.6: Otofaji, ferroptoz, piroptoz ve nekroptoz, apoptoz ve nekroz ölüm yolaklarında kullanılan primer antikorlar. 91

Tablo 4.1: Katı lipit–TMZ sistemlerinde, 5/1, 10/1 ve 15/1 (mg TMZ / g Katı Lipit) oranlarında TMZ'nin katı lipit matrisiyle karışabilirliğinin görsel değerlendirme ile sınıflandırılması (sınıflandırma türleri: homojen/kısmi faz ayrımı/belirgin faz ayrımı). 99

Tablo 4.2: Sıvı lipit–TMZ sistemlerinde, 5/1, 10/1 ve 15/1 (mg TMZ / g Sıvı Lipit) oranlarında TMZ'nin sıvı lipit matrisiyle karışabilirliğinin görsel değerlendirme ile sınıflandırılması (sınıflandırma türleri: homojen/kısmi faz ayrımı/belirgin faz ayrımı). 101

Tablo 4.3: PBS 7.4 ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 103

Tablo 4.4: PBS 5.8 ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 104

Tablo 4.5: DMEM ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 105

Tablo 4.6: PBS 7.4 ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 109

Tablo 4.7: PBS 5.8 ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 110

Tablo 4.8: DMEM ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ). 111

Tablo 4.9: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi sonuçları. 114

Tablo 4.10: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C). 115

Tablo 4.11: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi sonuçları. 117

Tablo 4.12: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C). 118

Tablo 4.13: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi sonuçları. 120

Tablo 4.14: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C). 121

Tablo 4.15: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi sonuçları. 124

Tablo 4.16. Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu. 125

Tablo 4.17: Compritol - OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi sonuçları. 127

Tablo 4.18: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu. 128

Tablo 4.19: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi sonuçları. 130

Tablo 4.20: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu. 131

Tablo 4.21: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi Sonuçları. 133

Tablo 4.22: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu. 134

Tablo 4.23: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi Sonuçları. 136

Tablo 4.24: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu. 137

Tablo 4.25: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları. 139

Tablo 4.26: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu. 140

Tablo 4.27: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi Sonuçları. 142

Tablo 4.28: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu. 143

Tablo 4.29: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi Sonuçları. 146

Tablo 4.30: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu. 147

Tablo 4.31: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları. 149

Tablo 4.32: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu. 150

Tablo 4.33: Sıvı lipit/toplam lipit oranına bağlı olarak Compritol/OA NLT'lerin DLS (partikül boyutu, PDI) ve DSC (T, ΔH) parametreleri ile göreli kristalin indeksi (KI) sonuçları. 161

Tablo 4.34: MDA yüklü NLT formülasyonlarının enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) sonuçları. 170

Tablo 4.35: MDA yüklü NLT formülasyonlarının in vitro salım profili, zamana bağlı MDA salım verileri. 172

Tablo 4.36: MDA-NLT 0, MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 70 formülasyonlarının In Vitro Salım Verilerinin Kinetik Modeller ile Uyum Analizi (k, n ve R^2 Değerleri). 177

Tablo 4.37: PTX yüklü NLT formülasyonlarının enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) sonuçları. 183

Tablo 4.38: PTX yüklü NLT formülasyonlarının in vitro salım profili, zamana bağlı PTX salım verileri. 186

Tablo 4.39: PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 Formülasyonlarının In Vitro Salım Verilerinin Kinetik Modeller ile Uyum Analizi (k, n ve R^2 Değerleri). 189

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Kısaltmalar	Açıklama
AIC	: 5-aminoimidazole-4-carboxamide
ATCC	: American Type Culture Collection
DAD	: HPLC Dedektörü
DAPI	: 4',6-diamid ino-2-phenylindole
DLC	: İlaç yükleme kapasitesi
DLS	: Dinamik ışık saçılımı
DMEM	: Hücre Kültür Besiyeri
DSC	: Diferansiyel taramalı kalorimetri
EE	: Enkapsülasyon verimi
FTIR	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
HPH	: Yüksek basınçlı homojenizasyon
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IC_{50}	: Hücre canlılığı değeri
KBB	: Kan-Beyin Bariyeri
MDA	: Metildiazonyum
MGMT	: O6-metilylguanine-DNA metiltransferaz
MTIC	: 5-(3-methyltriazen-1-yl)imidazole-4-carboxamide
MTT	: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromür
MWCO	: Molekül ağırlığı kesim değeri
NLT	: Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar
PBS	: PBS (tampon ortam; pH 7.4 - pH 5.8 koşullarında)
PDI	: Polidispersite indeksi
PI	: Propidyum iyodür
PTX	: Paklitaksel
SLN	: Katı lipit nanopartikülleri
SL/TL	: Sıvı Lipit / Toplam Lipit
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TMZ	: Temozolomid
XRD	: X-ışını difraktometresi

ÖZET

DOKTORA TEZİ

KANSER TEDAVİSİNDE KULLANILABİLECEK AKILLI NANOPARTİKÜLLERİN SENTEZİ VE İLAÇ SALIM ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Oğuz YÜCEL

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Kimyasal Teknolojiler, Doktora Programı

Danışman : Prof. Dr. Gülten GÜRDAĞ
II. Danışman : Prof. Dr. Serkan EMİK

Glioblastoma, invaziv yapısı ve özellikle Kan-Beyin Bariyeri'nin (KBB) seçici geçirgenliği nedeniyle tedavisi güç, agresif bir primer beyin tümörüdür. Klinikte standart yaklaşımda kullanılan temozolomid (TMZ) ise hedef bölgede kontrol edilebilir düzeylerde bulunmayı zorlaştıran farmakokinetik kısıtlar nedeniyle tedavi etkinliğinde sınırlılıklar taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, glioblastoma tedavisine yönelik yeni ilaç taşıma stratejilerinin geliştirilmesi amacıyla nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT) sistemleri tasarlanmış; TMZ'nin farklı lipit fazlardaki çözünürlüğü ve bozunma davranışı incelenmiş, ardından TMZ'nin bozunma ürünü olan metildiazonyumun (MDA) NLT'ler aracılığıyla glioblastoma tedavisinde taşınım potansiyelini değerlendirmek üzere üretim parametreleri sistematik olarak incelenmiştir. NLT'lerin glioblastoma uygulamalarına uygun biçimde geliştirilebilmesi için farklı sentez yaklaşımları ve lipit kombinasyonları değerlendirilmiş; formülasyonlar karakterize edilerek optimize edilmiştir. Fiziksel karakterizasyonlar için partikül boyutu dağılımları, PDI değerleri, zeta potansiyelleri DLS analizleri ile gerçekleştirilmiş, nanopartiküller TEM analizi ile doğrulanmıştır. FTIR, DSC ve XRD analizleri ile kimyasal karakterizasyonları değerlendirilmiştir. NLT'lerde MDA ve paklitaksel (PTX) için yükleme çalışmaları, in vitro salım ve kinetik analizleri ile kapsamlı hücre kültürü çalışmaları yürütülmüştür. Bulgular, NLT

tabanlı sistemlerin glioblastoma tedavisinde umut vaat eden bir taşıma platformu potansiyeli sunmaktadır.

Ocak 2026 , 282 sayfa.

Anahtar kelimeler: Nanopartikül, Nano Lipit Taşıyıcı, Optimizasyon, Glioblastoma, Temozolomid, Kanser.

ABSTRACT

Ph.D. THESIS

THE SYNTHESIS AND THE INVESTIGATION OF DRUG RELEASE PROPERTIES OF SMART NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF CANCER

Oguz YUCEL

İstanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Chemical Engineering

Chemical Technologies, Doctorate Program

Supervisor : Prof. Dr. Gulten GURDAG
Co-Supervisor: Prof. Dr. Serkan EMIK

Glioblastoma is an aggressive primary brain tumor that is difficult to treat due to its invasive nature and, in particular, its selective permeability across the Blood-Brain Barrier (BBB). Temozolomide (TMZ), the standard approach used in clinical practice, has limitations in its therapeutic efficacy due to pharmacokinetic constraints that make it challenging to achieve controllable levels in the target region. In this thesis study, nanostructured lipid carrier (NLT) systems were designed to develop novel drug delivery strategies for glioblastoma treatment. The solubility and degradation behavior of TMZ in different lipid phases were investigated, and the production parameters were subsequently systematically examined to evaluate the transport potential of methyldiazonium (MDA), TMZ's degradation product, for glioblastoma treatment via NLTs. Different synthesis approaches and lipid combinations were evaluated to develop NLTs suitable for glioblastoma applications; formulations were characterized and optimized. For physical characterizations, particle size, PDI values, and zeta potentials were determined by DLS, and TEM validated the nanoparticles. Chemical characterizations were evaluated using FTIR,

DSC, and XRD analyses. Loading studies, in vitro release and kinetic analyses, and comprehensive cell culture studies were conducted for MDA and paclitaxel (PTX) in NLTs.]

January 2026, [282] pages.
Keywords: [Nanoparticle, Nano Lipid Carrier, Optimization, Glioblastoma, Temozolomide, Cancer]

1. GİRİŞ

Glioblastoma, merkezi sinir sistemi kökenli malign beyin tümörleri içinde en agresif klinik seyirle ilişkilendirilen hastalık gruplarından biridir. Standart tedavi yaklaşımlarına karşın klinik sonuçları sınırlayan temel etmenler; tümörün heterojen biyolojisi, invaziv büyüme karakteri ve özellikle Kan-Beyin Bariyeri'nin (KBB) beyne taşınacak terapötiklerin etkin konsantrasyonlara ulaşmasını güçleştiren seçici geçirgen yapısıdır. Bu bağlamda glioblastoma tedavisinde kullanılan başlıca kemoterapötiklerden Temozolomid (TMZ), klinikte yaygın uygulama alanı bulmuş olmakla birlikte; hem sistemik dolaşım–beyin dağılımı eksenindeki farmakokinetik kısıtlar hem de fizyolojik koşullarda gerçekleşen bozunma süreçleri, hedef bölgede istenen düzeylerde ve kontrol edilebilir biçimde bulunmasını güçleştirebilmektedir.

İlaç taşıma sistemleri, terapötiklerin çözünürlük, stabilite, biyoyararlanım ve hedef bölgeye erişim gibi performans parametrelerini iyileştirmek amacıyla geliştirilen platformlardır. Bu platformların bir üyesi olan nanotaşıyıcılar ise yüzey alanı/hacim oranı, fonksiyonelleştirmeye açıklık ve biyolojik bariyerlerle etkileşim kurabilme potansiyelleri nedeniyle bu alanda öne çıkmaktadır. Nanotaşıyıcıların önemli bir türü olan lipit temelli nanopartiküller içinde yer alan Nanoyapılı Lipit Taşıyıcılar (NLT), biyouyumlu ve biyobozunur lipit bileşenlerle oluşturulmaları ve hem hidrofilik hem lipofilik etken maddeleri taşıyabilmeleri sayesinde farmasötik uygulamalarda potansiyeli olan önemli bir seçenek sunmaktadır. NLT'ler katı lipit matrise belirli oranlarda sıvı lipit eklenmesiyle "kontrollü kusurlu" bir çekirdek yapısı oluşturması, özellikle ilaç yükleme kapasitesi ve depolama sırasında etken maddenin matristen dışlanması gibi katı lipit kaynaklı sınırlılıkların azaltılması açısından belirleyici bir avantaj sağlamaktadır.

Bununla birlikte NLT sistemlerinin uygulama başarısı, yalnızca uygun lipit bileşenlerin seçimine değil; formülasyon kompozisyonu ile üretim prosesinin birlikte optimize edilmesine bağlıdır. Partikül boyutu ve dağılım genişliği (PDI), kolloidal kararlılık, biyolojik ortamlarda davranış ve hedef dokuya erişim üzerinde doğrudan belirleyici olmaktadır. Bu doğrultuda NLT geliştirme sürecinde düşük boyut ve dağılım dengesinin sağlanması ve kolloidal kararlılığı

destekleyecek düzeyde ile ilaç enkapsüle etme ve enkapsüle ettiği ilacın salım karakteristiği taşınım sistemi olarak kullanılması için önem arz etmektedir.

Tez kapsamında glioblastoma bağlamında KBB'yi geçebilecek beyin odaklı taşıma ihtiyacından hareketle sentezlenen NLT'lerin formülasyon ve üretim parametrelerinin partikül boyutu başta olmak üzere karakterizasyon işlemleri gerçekleştirilerek, sentezlenen NLT'lerin özellikleri üzerindeki etkilerini sistematik biçimde incelenmekte; TMZ'nin kolay bozunan yapısı dolayısıyla oluşan MDA'nın ve NLT'ler sayesinde KBB'yi geçebilme potansiyeli barındıran PTX gibi etken maddelerin lipit matrislerdeki davranışını gözeten rasyonel bir tasarım–optimizasyon çerçevesini sunmayı amaçlamaktadır. Bu çerçevede elde edilen bulguların, hem NLT tabanlı taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesine hem de beyin odaklı nanotaşıyıcı tasarımında katkı sağlaması beklenmektedir.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. NANOTEKNOLOJİ

Nanoteknoloji, atomik ve moleküler düzeyde malzemelerin tasarımı ve kontrollü sentezi yoluyla yeni fonksiyonel özellikler kazandırılmasını sağlayan çok disiplinli bir bilim alanıdır. Nanometre ölçeğinde gerçekleştirilen bu mühendislik yaklaşımları malzemelerin fiziksel, kimyasal, optik ve biyolojik özelliklerini makro boyutlu halleriyle kıyaslandığında önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Yüzey alanı/hacim oranının artırılması, kuantum etkileri ve moleküler düzeydeki etkileşimlerin optimize edilmesi gibi avantajları sayesinde nanoteknoloji, mühendislik, biyomedikal, elektronik ve enerji üretimine kadar birçok alanda stratejik bir teknoloji haline gelmiştir. Günümüzde nanoteknoloji ilaç taşıma sistemlerinden akıllı malzemelere, çevre dostu enerji çözümlerinden gelişmiş sensör teknolojilerine kadar geniş uygulama alanlarında en güncel araştırmaların konusunu oluşturmaktadır. Bu bağlamda, özellikle lipit nanopartiküller gibi nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıyıcı sistemlerin, farmasötik ve biyoteknolojik araştırmalarda yenilikçi çözümler sunarak günlük hayatta genel kullanımların bir parçası haline gelmesi beklenmektedir.

Nanoteknoloji kelime olarak incelendiğinde “nano” ön eki, eski Yunan dilindeki “nanos” kelimesinden türetilmiştir ve “çok küçük” anlamına gelmektedir. Bu terim parçacıklar ve malzemeler için belirli bir fiziksel eşik olan boyutu (1–100 nm) tanımlamaktadır [1,2] Genel olarak, bir malzemenin nanomalzeme olarak sınıflandırılması için boyutunun 1–100 nm arasında olması ve bu boyut aralığında kütle formuna kıyasla farklı ya da geliştirilmiş özelliklere sahip olması beklenir [2,3]. Karşılaştırılma yapılabilmesi adına bir insan saçı yaklaşık 60.000–100.000 nm kalınlığındadır, bir kırmızı kan hücresi yaklaşık 7000 nm çapındadır, kağıt yaklaşık 75.000 nm kalınlığındadır ve DNA çift sarmalının yarıçapı ise yaklaşık 1 nm’dir (Şekil 2.1).

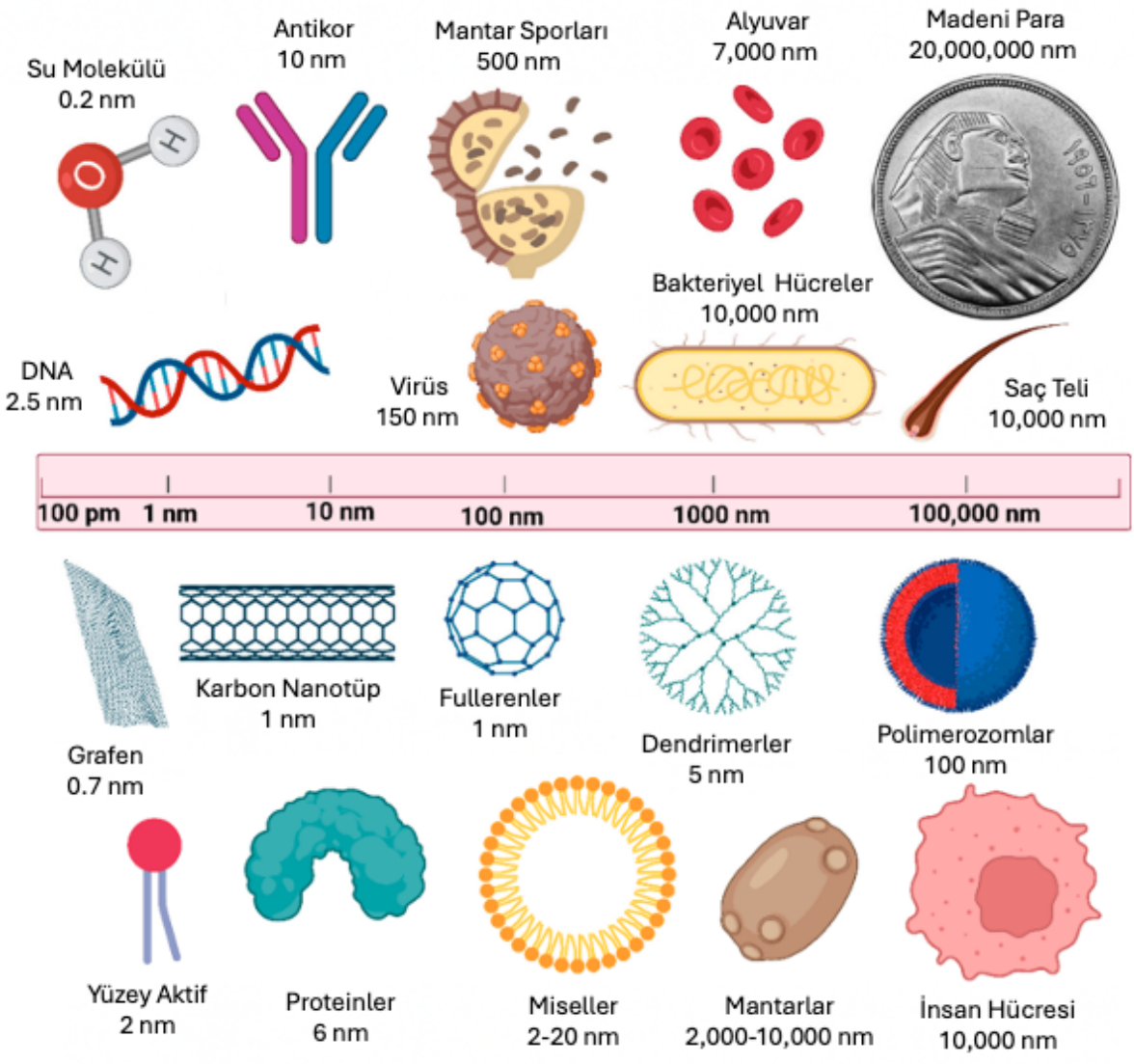
Nanoteknoloji ile ilgili bugüne kadar çeşitli kurumlar ve düzenleyici komiteler, “nanopartiküller”, “nanomalzemeler”, “nanoyapılı malzemeler”, “nanoteknoloji”, “nanobilim” gibi bilimsel terimleri ve bunların tanımlarını sağlamıştır. Amerikan Ulusal Standartlar Enstitüsü (ANSI) tarafından oluşturulan Nanoteknoloji Standartlar Paneline göre aşağıdaki standardizasyon öncelikleri belirlenmiştir:

(i) nanobilim ve nanoteknolojiden türeyen malzemelerin yapı ve özelliklerini tanımlayan terminolojilerin oluşturulması,

(ii) (ii) metroloji araştırmalarının ve standart test yöntemlerinin geliştirilmesi,

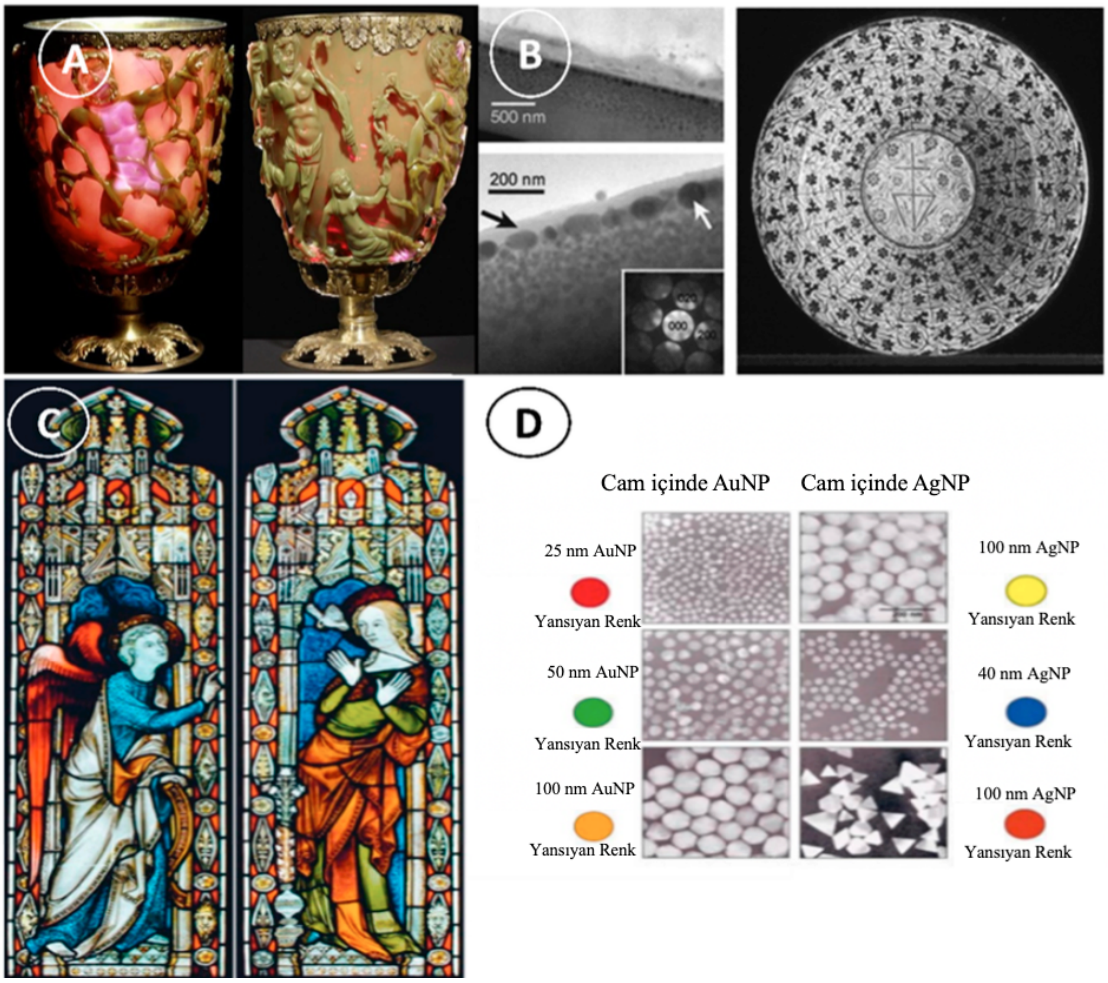
(iii) (iii) bu yeni malzemelerin toksisite, çevresel etkiler ve risk değerlendirmelerinin yapılması gerektiği bildirilmiştir [2].

ISO/TS 80004 standardına göre ise nanomalzemeler; dış boyutları 1–100 nm arasında olan ya da iç veya yüzeyde nano ölçekte yapısal özelliklere sahip malzemeler olarak tanımlanmaktadır. Bu tanım, belirli malzeme bileşenlerine sahip nano-nesneler ile yüzey veya iç yapısal özelliklere sahip nanoyapılı malzemeleri kapsamaktadır. 2011 yılında Avrupa Komisyonu tarafından yapılan tanımlamaya göre ise nanomalzemeler; bağlanmamış, agregat ya da aglomere olmuş parçacıklardan oluşan ve %50'den fazlası 1–100 nm boyut aralığında bulunan doğal veya üretilmiş malzemeler olarak belirlenmiştir. Çevresel, sağlık veya güvenlik endişeleri ya da rekabetçilik gibi durumlarda bu %50 eşik değeri %1–50 aralığına da değerlendirilebilmektedir [2].



Şekil 2.1: Çeşitli malzemelerin nanometre ölçeğinde karşılaştırılması [2].

Nanoteknolojinin tarihçesi insanlığın tarih öncesi çağlardan bu yana malzemeleri atomik ve moleküler düzeyde, bilinçli ya da bilinçsiz olarak kullanmasına kadar uzanmaktadır. İlk nanomalzemeler doğal süreçlerle oluşmuş olaylar sonucu nanoyapıları meydana getirmiştir. Ancak tarihi sürecin erken dönemlerinde insanlar, nanomalzemeleri farkında olmadan kullanmışlardır. Endonezya'daki Sulawesi mağara resimlerinde (M.Ö. 40.000) yağ, kömür ve bitki pigmentlerinden oluşan nanopartikül içeren boyalar kullanılmıştır. Benzer şekilde Antik Mısır'da, yağ lambalarının islerinden elde edilen karbon nanomalzemeler, papirüs üzerine yazı yazmak için kullanılmıştır [2]. Nanoteknolojinin tarihsel gelişiminde en dikkat çekici örneklerden biri Roma dönemine ait Lycurgus Kupası'dır (Şekil 2.2). M.S. 4. yüzyıla tarihlenen bu cam kupa, altın ve gümüş nanopartikülleri sayesinde ışık açısına bağlı olarak renk değiştirmektedir. Bu durum, nanoteknolojinin optik özelliklere etkisinin önemli tarihsel örneklerindendir [4]. Orta Çağ'da çeşitli vitray ve seramiklerde de rastlanan nano yapılar, bilimsel anlamda ilk defa 19. yüzyılda Michael Faraday'ın altın nanopartikülleri üzerine yaptığı sistematik çalışmalarla incelenmiştir [5].



Şekil 2.2: Nanomalzemelerin geçmişte kullanımları [2],(A) Lycurgus kupası, Au-Ag NP alaşımı içeren camdan ışık geçtiğinde parlak kırmızı görünümü, (B) Antik seramik tabaklarda AgNP'ler, (C) Orta Çağ kilise pencerelerindeki nanoparçacıklar, (D) Orta Çağ kiliselerindeki renkli pencere camlarında kullanılan AuNP ve AgNP'lerin geçirimli elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri.

Nanoteknolojinin gelişiminde hem teorik hem de pratik açıdan önemli dönüm noktaları yaşanmıştır. Maddenin yapısına ilişkin ilk temel sorular M.Ö. 5. yüzyılda Demokritos tarafından ortaya atılmış, maddenin küçük, bölünemez ve yok edilemez parçacıklardan (atomlar) oluşup oluşmadığı tartışılmıştır [1]. Bu temel kavramdan sonra teknolojik gelişmeler dolayısıyla modern nanoteknolojinin temelleri ancak 20. yüzyılda atılabilmitir. Einstein 1905'te Brown hareketini açıklayarak atomların varlığına güçlü bir teorik kanıt sunmuştur. Bu teorik kanıt, daha sonra Jean Perrin'in deneyleriyle bilimsel olarak doğrulanmıştır [6,7]. 1931 yılında ise Ruska'nın elektron mikroskobunu geliştirmesiyle atomik düzeyde yapılar ilk kez doğrudan gözlemlenebilmiştir [8,9]. Richard Feynman'ın 1959 yılında verdiği "There's Plenty of Room at the Bottom" başlıklı konferansı, nanoteknolojinin vizyonunu ortaya koymuş ve alanın gelişimine öncülük etmiştir [10]. Feynman'ın ardından, 1974 yılında Norio Taniguchi ilk kez "nanoteknoloji" terimini kullanarak malzemelerin atom/molekül düzeyinde işlenmesini tanımlamıştır [11]. Ruska'nın geliştirdiği elektron mikroskobunun ardından Transmission Electron Microscopy (TEM), atomik düzeyde görüntüleme imkânını geliştirerek nanobilimin temelini

güçlendirmiştir. Bu alandaki önemli bir diğer gelişme ise 1986'da geliştirilen Atomic Force Microscopy (AFM) ile yüzeylerin yalnızca incelenmesini değil, aynı zamanda kontrollü bir şekilde değiştirilmesini mümkün kılarak nanoteknolojiyi uygulamalı bir mühendislik alanına dönüştürmüştür [12].

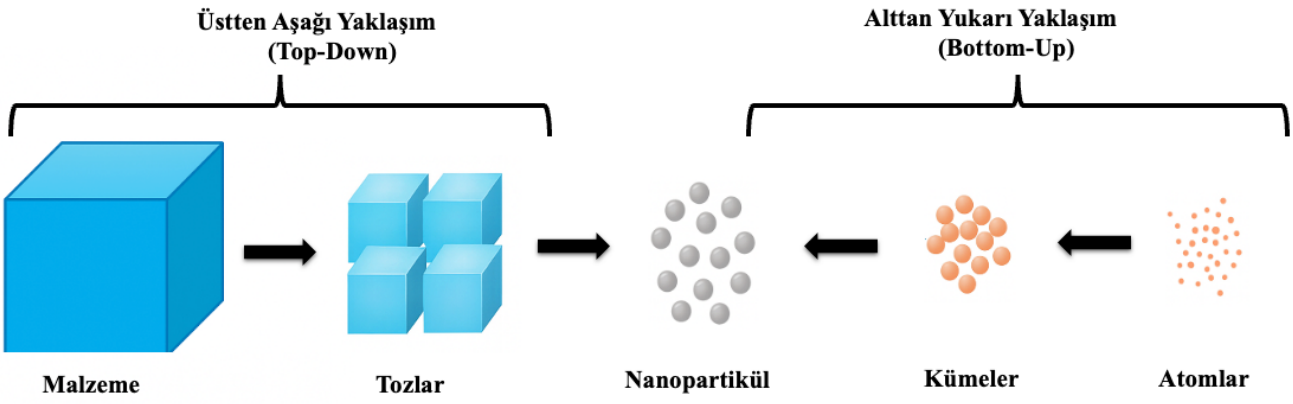
Nanoteknoloji kavramı tıp ve ilaç geliştirme çalışmalarında 1980'lerden itibaren kullanılmaya başlanmış; polimerik nanopartiküller, lipit bazlı taşıyıcı sistemler ve nanolipitler gibi yapıların geliştirilmesiyle kontrollü ilaç salımı, hedefe yönelik tedavi ve dolaylı olarak biyoyararlanım artışı sağlanmıştır. 1995 yılında onaylanan Doxil® (lipozomal doksorubisin), ilk FDA onaylı nanoilaç olarak nanoteknolojinin klinik alandaki başarısını göstermiştir [13]. Son yıllarda ise özellikle COVID-19 pandemisi sırasında geliştirilen mRNA aşıları (Pfizer-BioNTech ve Moderna), lipit nanopartiküller kullanılarak genetik materyalin vücuda güvenli ve etkili bir şekilde taşınmasını sağlamış ve nanoteknolojinin küresel sağlık krizlerinin çözümünde oynayabileceği kritik rolü açıkça ortaya koymuştur [14,15].

Nanopartiküller, sahip oldukları fiziksel ve kimyasal özellikler doğrultusunda çeşitli sınıflandırmalara tabi tutulmaktadır. Bu sınıflandırmalar genellikle boyutları, şekilsel morfolojileri ve yapısal düzenleri ile kimyasal bileşimleri gibi temel kriterlere dayanmaktadır. Bu sistematik sınıflandırma yaklaşımı temelde, farklı nanoparçacık türlerinin özgün özelliklerinin daha iyi anlaşılmasını sağlayarak nanopartiküllerin doğal özelliklerine en uygun uygulamalarda verimli biçimde kullanılmasını sağlamayı amaçlamaktadır. Yapısal özelliklerine göre yapılan sınıflandırma, nanoparçacıkları genellikle üç ana kategoriye ayırmaktadır. Bunlar:

- tekil yapılı,
- nano boyutta düzensiz şekilli (nanoteller, nanorodlar vb.),
- çoklu yapı taşlarına sahip (iç içe geçmiş veya katmanlı morfoloji sergileyen yapılar (nanokompozitler, çekirdek-kabuk yapıları, metal organik kafes yapıları vb.)

olarak ayrılarak yapısal sınıflandırmanın temelini oluşturmaktadır [16]. Bir diğer sınıflandırma çeşidi olarak sentezlenmiş nanopartikülün kimyasal yapısı dolayısıyla yapılan sınıflandırma kapsamında nanopartiküller; organik veya inorganik temelli yapılar başlığında metalik, metal oksit, seramik, polimerik, lipit veya karbon bazlı veya her iki temel grubu içeren kompleks yapılardan oluşabilmektedir [17,18]. Bu sınıflandırmalar, nanoparçacıkların fiziksel ve kimyasal davranışlarını anlamada temel bir referans çerçevesi sunarken, uygulama alanlarının belirlenmesi açısından da yol gösterici olmaktadır. Bu gruplandırmalar hem sentez yöntemlerinin seçiminde hem de uygulama

alanlarının belirlenmesinde kritik rol oynamaktadır. Örneğin, metalik nanoparçacıklar çoğunlukla üretim süreçlerinde kataliz veya antimikrobiyal etkilerin gözlemlenebildiği uygulamalarda tercih edilirken, polimerik ve lipit bazlı nanoparçacıklar daha çok biyomedikal alanda, özellikle ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [19,20]. Bu bağlamda, sınıflandırma kriterlerinin doğru anlaşılması, yalnızca sentez yöntemlerinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda uygulamaya yönelik nanomalzeme tasarımının rasyonel biçimde yönlendirilmesinde temel bir rol oynamaktadır [17,21].



Şekil 2.3: Nanopartikül sentezinde kullanılan genel sentez yaklaşımları.

Nanopartiküllerin sentezinde kullanılan yöntemler genel olarak top-down (üstten alta) ve bottom-up (alttan üste) olarak (Şekil 2.3) iki ana gruba ayrılır: Top-down yaklaşımı, büyük yapıların fiziksel veya mekanik yollarla küçültülmesini ifade ederken; bottom-up yöntemi, atom ve moleküllerin bir araya gelerek nanoyapıları oluşturduğu süreçleri açıklamaktadır [17,22]. Top-down tekniklerden biri olan mekanik öğütme, yüksek enerjili darbe ve sürtünme ile partikül boyutunu nanometre ölçeğine indirmektedir [17]. Öte yandan bottom-up yaklaşımlar arasında yer alan kimyasal indirgeme yöntemi, metal iyonlarının uygun indirgeme ajanları ile metalik nanoparçacıklara dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır ve bu sayede parçacık boyutu, şekli ve dağılımı kontrollü bir şekilde elde edilebilmektedir [18,23] Bu iki strateji temelinde farklı nanopartiküllerin eldesi için çok sayıda farklı sentez metodu bulunmaktadır [22,24–33].

2.2. İLAÇ TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK NANOPARTİKÜLLER

Nanopartiküller, en az bir boyutu yaklaşık 1–100 nm aralığında olan ve bu boyut nedeniyle kütle halindeki aynı malzemeye kıyasla belirgin şekilde farklı fizikokimyasal özellikler sergileyen yapılar olarak kabul edilmektedir. Bu ölçekte yüzey alanı/hacim oranının artması, yüzey enerjisinin yükselmesi ve kuantum ölçekli etkileşimlerin belirginleşmesi; nanopartiküllerin çözünürlük, mekanik dayanım, optik cevap, manyetik davranış ve kimyasal reaktivite gibi temel özelliklerini kökten değiştirebilmektedir. Bu özgün özellikler sayesinde ilaç taşıma sistemleri, biyogörüntüleme, tanı

kitleri, kataliz, enerji depolama ve gıda teknolojisi gibi çok farklı alanlarda stratejik platformlar olarak değerlendirilmektedir [34–37].

Nanopartiküllerin sınıflandırılması pek çok faktöre bağlıdır. Boyut, şekil, morfoloji, yüzey kimyası ve kimyasal bileşim vb. gibi kriterler bu alanda belirleyici rol oynamaktadır. Bu sınıflandırma ayrımları, malzemenin fonksiyonel performansının ve potansiyel uygulama alanlarının sınırlarının tanımlanması bakımından önemli bir referans çerçevesi sunmaktadır. Güncel çalışmalarda nanopartiküller (Şekil 2.4), genel olarak inorganik ve organik sistemler olmak üzere iki ana grupta ele alınmaktadır. Bu sınıflandırma, nanotaşıyıcıların biyouyumluluğu, bozunma davranışı, hedefleme stratejileri ve yüklenebilen etken madde türleri üzerinde doğrudan belirleyici olmaktadır [38,39].

İnorganik nanopartiküller, metal ve metal oksitler, silika ya da yarı iletken çekirdekler gibi inorganik kristal fazlardan oluşan yapılardır. Bu çekirdekler genellikle güçlü kovalent veya metalik bağlarla stabilize olan kristal bir ağ yapısı sergilemektedir [40,41]. Bu yüksek kristalinlik, nanopartiküllere kimyasal ve termal kararlılık kazandırırken, yüzeyde kullanılan ligandlar sayesinde çözünürlük, hedefleme yeteneği ve biyolojik etkileşimler kontrol edilebilmektedir.

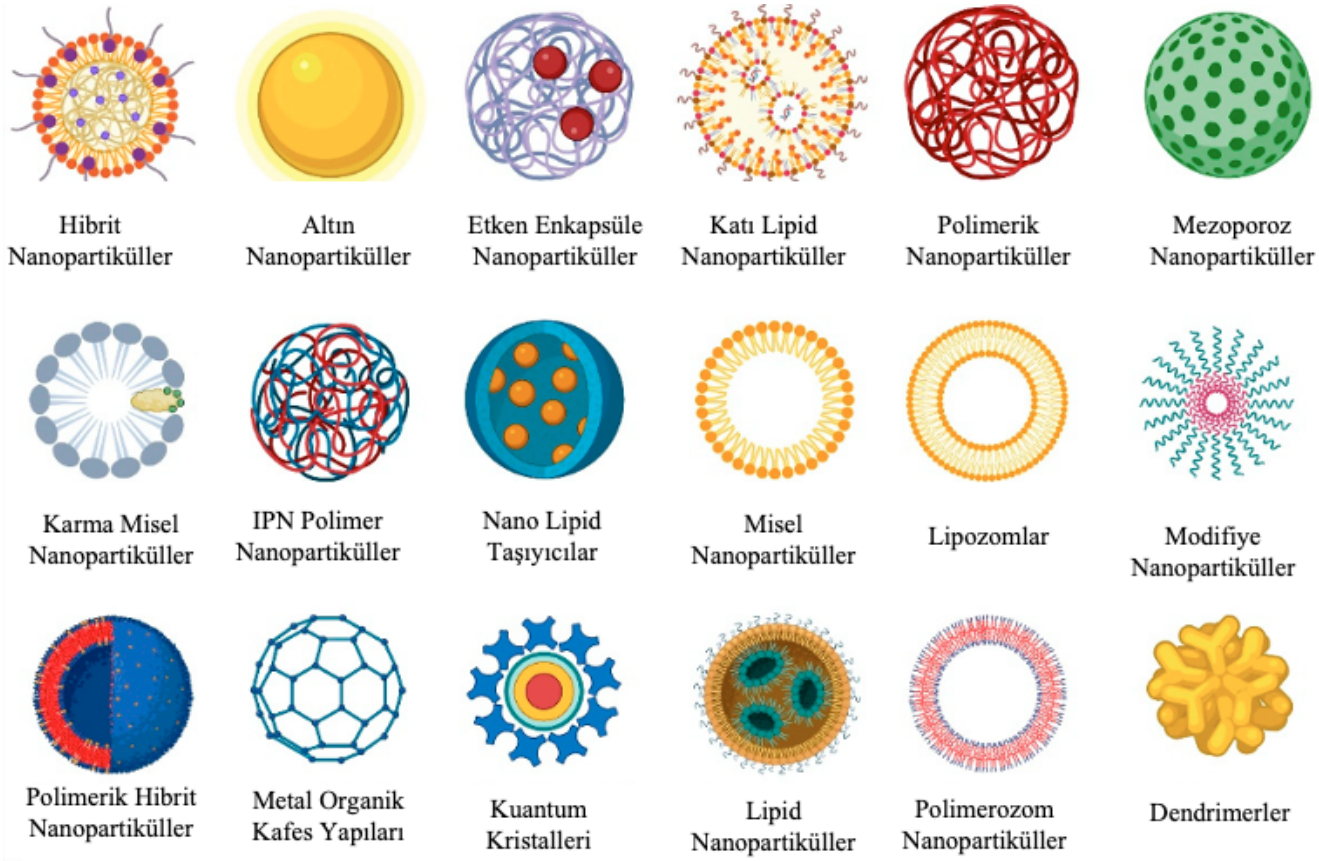
İnorganik sınıf içinde manyetik nanopartiküller, kuantum noktaları, seramik/silika nanopartiküller ve altın nanopartikülleri öne çıkmaktadır. Demir oksit temelli manyetik nanopartiküller, süperparamanyetik davranışları sayesinde manyetik rezonans görüntüleme (MRI), manyetik hipertermi ve manyetik alanla yönlendirilen ilaç taşıma sistemlerinde yoğun biçimde kullanılmaktadır. Yarı iletken kuantum nanokristalleri ise dar ve ayarlanabilir emisyon spektrumları ile yüksek fotolüminesans kuantum verimliliği sayesinde floresan görüntüleme, biyosensörler ve fotodinamik tedavi gibi uygulamalarda tercih edilmektedir. Silika ve diğer seramik nanopartiküller, yüksek porozite ve kimyasal kararlılıkları sayesinde kontrollü ilaç salımı, enzim ve protein immobilizasyonu gibi alanlarda taşıyıcı matris görevi görmektedir [16]. Altın nanopartikülleri ise güçlü yüzey plazmon rezonansı özellikleri sayesinde optik biyosensörler, fototermal tümör ablasyonu ve hedefli ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak değerlendirilmektedir [42–47].

Organik nanopartiküller; polimerler, lipitler, proteinler gibi organik makromoleküllerden oluşan ve çoğunlukla biyouyumlu ve/veya biyobozunur, fonksiyonel gruplarla zenginleştirilebilen yapılardır. Organik nanopartiküller çoğunlukla nanokapsül, nanoküre, misel, lipozom, polimerozom ve nano lipit taşıyıcı gibi morfolojik alt sınıfları içermektedir. Organik yapı taşlarının toksisite açısından görece güvenli olması, vücut sıvılarıyla uyumlu dinamik yüzeyler sunmaları ve hem hidrofilik hem de hidrofobik etken maddeleri enkapsüle edebilmeleri nedeniyle, özellikle ilaç taşıma,

gen teslimi, kontrast madde taşınımı ve biyogörüntüleme uygulamalarında ön plana çıkmaktadırlar [48–50].

Polimerik nanopartiküller; doğal (kitosan, aljinat) veya sentetik (PLA, PLGA vb.) polimerlerden oluşan, nanoküre ya da nanokapsül morfolojisinde bulunabilen sistemlerdir. Monomer bileşimi, zincir uzunluğu, dallanma derecesi ve çapraz bağlanma yoğunluğu gibi parametreler ayarlanarak parçacık boyutu, yüzey yükü, bozunma hızı ve ilaç salım profili istenen aralığa çekilebilmektedir. PLGA temelli nanopartiküller; kemoterapötik ilaçların kontrollü salımı, oral insülin formülasyonları, rejeneratif tıp uygulamaları ve yara iyileşmesi gibi pek çok alanda kullanıma girmiştir. Kitosan ve türevleri ise katyonik yapıları sayesinde mukozal yapışma, gen taşıma ve antimikrobiyal kaplamalarda tercih edilmektedir. Bu grup, geniş kimyasal modifikasyon imkânı ve çok yönlü salım profilleri nedeniyle sıklıkla tercih edilen nanotaşıyıcı platformlarıdır [51–54].

Lipit temelli nanopartiküller (LBNP'ler), özellikle farmasötik alanda önemi giderek artan organik nanopartikül sınıfıdır ve çoğunlukla lipozomlar, katı lipit nanopartikülleri (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT) gibi alt grupları içermektedir. LBNP'ler; biyouyumlu ve biyobozunur lipit bileşenlerinden oluşmaları, biyolojik membranları taklit edebilmeleri ve hem hidrofilik hem de lipofilik etken maddeleri taşıyabilmeleri sayesinde, kanser tedavisi, enfeksiyon hastalıkları, aşı formülasyonları, gen tedavisi ve dermo-kozmetik uygulamalarda yoğun olarak kullanılmaktadır [55,56].



Şekil 2.4: Nanopartiküllerin sınıflandırılmasında çeşitli nanopartiküllerin şematik gösterimi [57].

Lipozomlar, fosfolipit çift tabakalarından oluşan veziküler yapılardır ve iç sulu fazlarında hidrofilik, lipit fazlarında ise lipofilik molekülleri enkapsüle edebilmeleri nedeniyle, hedefli ilaç taşıma ve kontrollü salım açısından klasik bir model sistem kabul edilmektedir. Tek veya çok katmanlı vezikül morfolojisi, fosfolipit bileşimi ve kolesterol içeriği ayarlanarak parçacık boyutu, membran akışkanlığı, stabilite ve yüklenebilen ilaç miktarı kontrol edilebilmektedir. Yüzeyin poli(etilen glikol) (PEG) gibi polimerlerle kaplanması, dolaşım süresini uzatarak pasif tümör hedeflemesini güçlendirirken; ligand veya antikor konjugasyonu aktif hedeflemeye olanak tanır [58,59].

Katı lipit nanopartikülleri, oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan lipit çekirdeklerin yüzey aktif maddelerle stabilize edildiği küresel yapılardır ve 50–1000 nm boyut aralığında kolloidal süspansiyonlar olarak formüle edilmektedirler. Fiziksel stabilite, ışık ve oksidasyona duyarlı ilaçların korunması, yüksek taşınabilirlik ve görece düşük maliyet gibi avantajları sayesinde peptid/protein taşınımı, kemoterapi, dermal ve kozmetik ürünlerde yaygın kullanım alanı bulmuşlardır. Bununla birlikte kristalin çekirdeğin faz dönüşümleri nedeniyle ilaç yükleme kapasitesinin sınırlı olması ve depolama sırasında ilaç dışlanması gibi dezavantajlar da literatürde sıklıkla vurgulanmaktadır [60–62].

Nanoyapılı lipit taşıyıcılar ise SLN'lerin ikinci kuşak formu olarak, katı lipit faza belirli oranlarda sıvı lipit eklenmesiyle oluşturulan ve kristal örgüsü kontrollü derecede bozulmuş sistemlerdir. Bu sayede lipit matriste düzensiz boşluklar oluşur, ilaç molekülleri için daha fazla yer açılır ve kristal yeniden düzenlenmesi sırasında meydana gelen ilaç dışlanması büyük ölçüde engellenir. NLT'ler; oral, dermal ve parenteral yollardan uygulanan pek çok antikanser ilaç, antiinflamatuvar ajan ve kozmetik aktif için yüksek yükleme kapasitesi, uzun süreli ve kontrollü salım profili sağlamaları nedeniyle güncel literatürde öne çıkan lipit nanopartikül sınıfıdır [55,63,64].

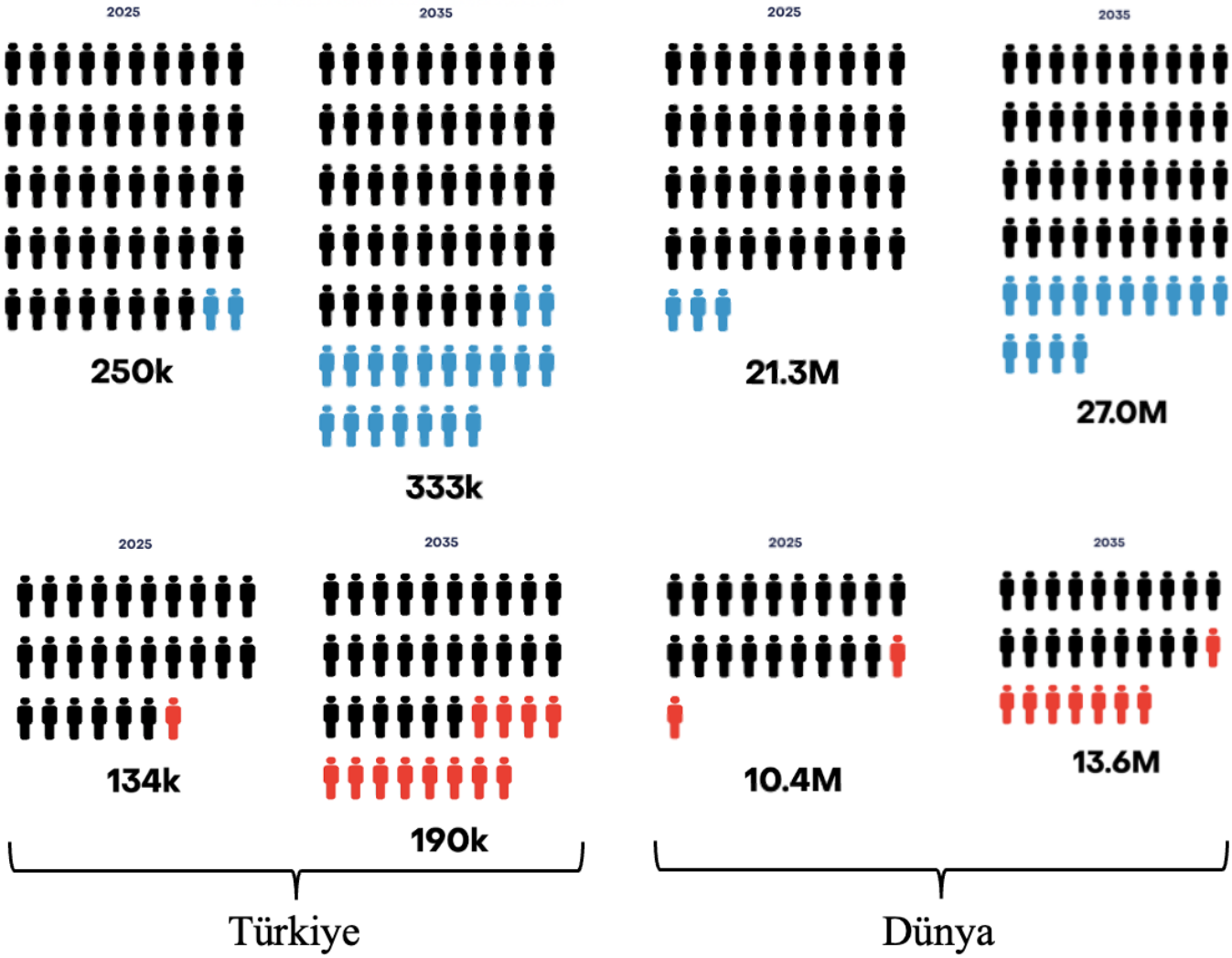
2.3. KANSER

Kanser tanım olarak hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesi ve çevre dokulara yayılmasıyla oluşan, oldukça karmaşık ve çok faktörlü bir hastalık grubudur. Küresel olarak kabul edilen tanımlamalara göre, Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization-WHO) kanseri, "anormal hücrelerin kontrolsüz büyüyerek vücudun diğer bölgelerine yayılmasına neden olan, genetik mutasyonlar sonucu gelişen malign bir hastalık" olarak tanımlamaktadır [65]. Bu konuda oldukça etkin bir başka kuruluş olan Amerikan Kanser Derneği (American Cancer Society - ACS), kanseri "normal hücrelerin denetim dışına çıkarak sınırsız büyüme ve bölünme kabiliyetine sahip hale gelmesiyle oluşan bir hastalıklar grubu" olarak tanımlamaktadır [66]. Sigara kullanımı [67] zararlı kimyasal maddelere maruz kalma [68] radyasyon [69], bazı viral enfeksiyonlar (HPV veya Hepatit B/C) [70], obezite [71]ve genetik yatkınlığın [72] kanseri tetikleyen başlıca faktörler arasında yer aldığı düşünülmektedir. Birçok doku ve/veya organda oluşabilen kanser için yapılan sınıflandırma, tümörlerin köken aldığı doku veya hücre tipine dayalı olarak yapılmaktadır. Klinik onkolojide en yaygın görülen kanser türleri arasında karsinomlar (epitel hücrelerinden), sarkomlar (mezenkimal doku), lösemiler (hematopoetik sistemdeki hücrelerin malign transformasyonu), lenfomalar (lenfoid dokuların neoplastik proliferasyonu) ve merkezi sinir sistemi tümörleri (nöronal ya da glial köken) yer almaktadır. Bugüne kadar tanımlanmış 200'ün üzerinde kanser türü bulunmaktadır [73–75].

Kanser, günümüzde küresel düzeyde başlıca ölüm nedenlerinden biri olarak öne çıkmaktadır. [76,77] Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre 2020 yılında dünya çapında yaklaşık 10 milyon insan bu hastalık nedeniyle hayatını kaybetmiştir [65]. 2022 verilerine göre Avrupa'da yılda yaklaşık 4,47 milyon yeni vaka ve 1,99 milyon ölüm kaydedilmiştir. ABD'de ise, 2025 yılı için 2 milyondan fazla yeni kanser vakası ve 600 bini aşkın ölüm öngörülmektedir [78–80].

Türkiye'de ise GLOBOCAN 2025 verilerine göre (Şekil 2.5) yılda yaklaşık 250.000 yeni kanser vakası ve 134.000 kanser kaynaklı ölüm görülmektedir. Yaş etkisinden arındırılmış görülme oranı

100.000 kişide 225.6; ölüm oranı ise 119.9 olarak kaydedilmiştir [81]. Sağlık Bakanlığı bünyesinde Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünün 2020 yılında yayınlamış olduğu "Türkiye Kanser İstatistikleri 2020" raporuna göre ise, Türkiye'de cinsiyete bağlı olarak görülen başlıca kanser türleri içinde erkekler için ilk üç sıra akciğer (%29.5), prostat (%12.8) ve kolorektal (%9.0) kanseri iken, kadınlarda meme kanseri (%24.8), tiroid (%14.6) ve kolorektal (%9.3) kanser yer almaktadır. 2020 yılında 0–14 yaş arası çocuklarda en sık görülen kanser türü lösemi (%29.1), 15–19 yaş aralığında ise lenfomalar (%22.9) yer alırken, 20 – 44 yaş aralığında kadınlarda meme kanseri, erkeklerde testis kanseri öne çıkarken; 45 yaş ve üzerindeki bireylerde kolorektal, akciğer ve prostat kanseri gibi türlerin sıklığın arttığı raporlanmıştır [82].



Şekil 2.5: 2025 ve 2035 yıllarına ait Türkiye ve Dünya Kanser İstatistikleri, görülme sıklığı sayıları (üst), ölüm sayıları (alt), WHO, Kanser İstatistik Raporları.

ABD için elde edilmiş istatistiki bilgilere göre teknolojik gelişmeler ile erken teşhis yöntemlerinin gelişmesi, halk sağlığı politikaları ve tedavi yaklaşımlarındaki ilerlemeler sayesinde ölüm oranlarında kademeli bir azalma kaydedilmiştir. 1991'den bu yana sadece ABD'de 4,5 milyondan

fazla kanser ölümü önlenmiştir [74]. Ancak ortalama yaşam süresinin uzaması, sanayileşmenin artışı ve bazı çevresel risklerin devam etmesi gibi nedenlerle, küresel kanser yükünün önümüzdeki 20 yıl içinde daha da artacağı öngörülmektedir [65].

Birçok ülke için önde gelen ölüm sebeplerinden olan kanser, toplum ve aileler için yarattığı manevi etkisinin yanı sıra ülkelerin sağlık sistemleri ile aynı zamanda küresel ve ulusal ekonomiler üzerinde de büyük bir ekonomik yük oluşturmaktadır. OECD'nin 2020 tarihli raporuna göre Avrupa'da kanserin yıllık ekonomik maliyeti yaklaşık 200 milyar avro düzeyindedir. Bu miktar doğrudan sağlık harcamaları, ilaç giderleri, erken ölümler nedeniyle üretkenlik kaybı ve hasta bakımı gibi dolaylı maliyetleri de içermektedir. Gelişen tanı ve tedavi teknolojilerinin yüksek maliyeti, uzun süreli tedavi gereksinimi ve artan vaka sayısı göz önüne alındığında, ekonomik yükün daha da artacağı düşünülmektedir [83–85].

2.4. KANSER VE NANOTEKNOLOJİ

Kanser tedavisinde uygulanan yaklaşımlar, hastalığın türünü, evresini ve hastanın genel sağlık durumunu göz önüne alarak şekillenmektedir. Geleneksel yöntemler arasında cerrahi müdahaleler, kemoterapi ve radyoterapi öne çıkmaktadır. Cerrahi tedavi, tümörün fiziksel olarak vücuttan çıkarılmasını (kanser türüne bağlı olarak) hedefler ve genellikle erken evre kanserlerde tercih edilmektedir. Kemoterapi, hızlı bölünen hücreleri hedef alarak sistemik etki gösteren ilaçların kullanımı ile gerçekleştirilmektedir. Bu yöntem, tümör hücrelerini yok etmek ve hastalığı geriletmek için tek başına ya da diğer yöntemlerle birlikte uygulanabilmektedir. Radyoterapi ise genellikle lokalize kanserlerde etkili olabilen yüksek enerjili ışınlar aracılığıyla tümör hücrelerinin DNA'sının hasarlanarak hücre bölünmesini engelleyen hem küratif hem de palyatif amaçlarla kullanılabilen tedavi yöntemidir [86–89].

Geleneksel kanser tedavi yöntemleri arasında cerrahi girişimler, radyoterapi ve kemoterapi yer almakta olup, bu yöntemler birçok hastada yaşam sürelerini uzatmada başarılı olsa da ileri evre metastatik kanserlerde sınırlı etki göstermektedir [90]. Bu konvansiyonel tedaviler sağlıklı hücreleri kanserli hücrelerden ayırt edemeyen, sadece hedefe yönelik olmayan yaklaşımlar barındırmakta ve bu nedenle ciddi yan etkilere yol açabilmektedir [90,91]. Son yıllarda gelişen teknoloji ile birlikte konvansiyonel tedavilerde de önemli ilerlemeler kaydedilmiş olsa da bu tedavilerin hasta yanıt oranları birçok kanser türü için hala beklenen seviyenin çok altındadır [90,92]. Bu durum, kanserle mücadelede seçici ve yenilikçi stratejilere acil bir ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

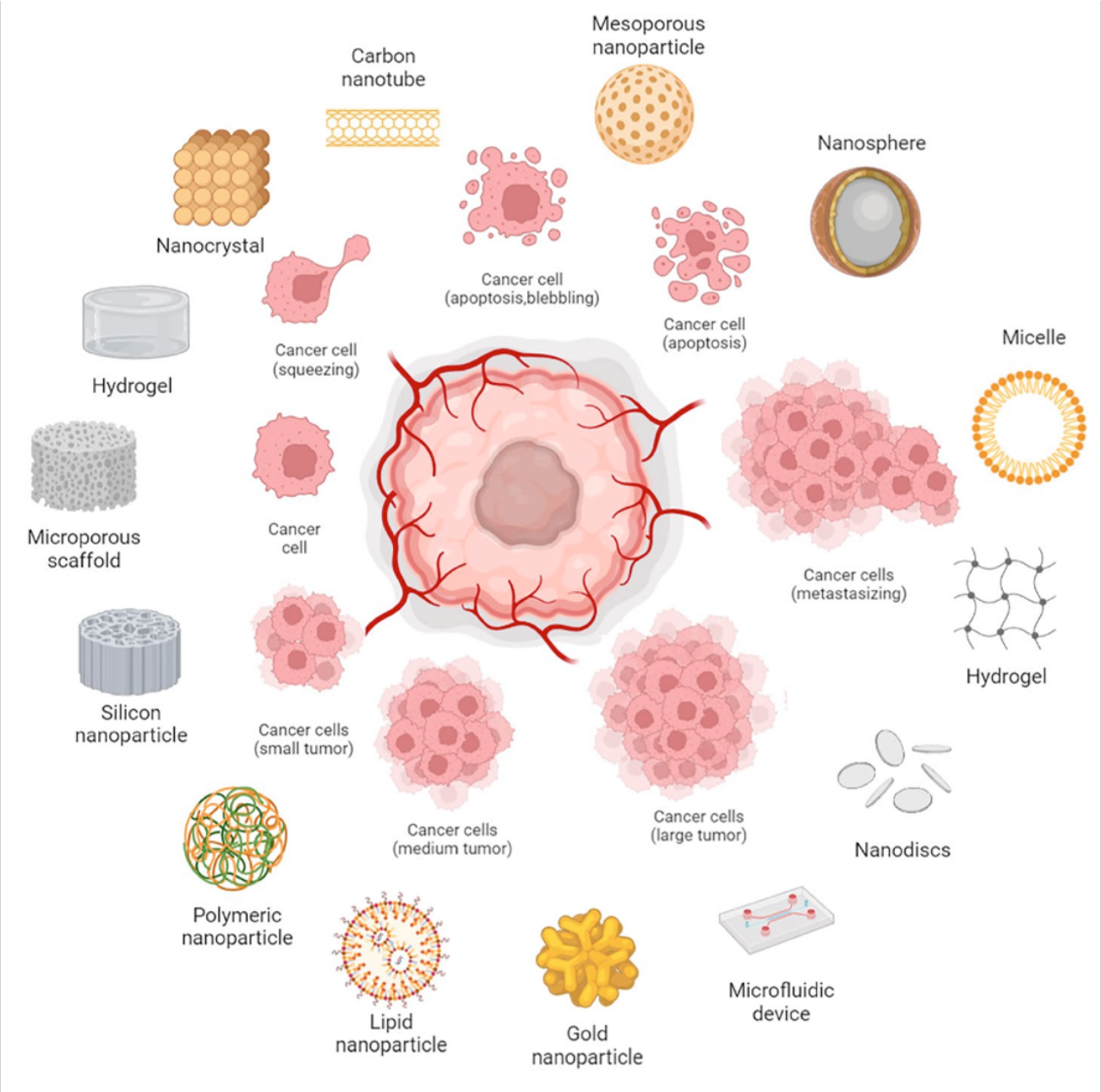
Nanoteknoloji, tam bu noktada kanser araştırmalarında tartışmasız bir seçenek olarak ortaya çıkmıştır. Kanserde nanoteknolojinin kullanımı, mühendislik, malzeme bilimi, kimya, biyoloji gibi çok disiplinli alanların kesişiminde yer alan, bu multidisipliner yaklaşım sayesinde nanoölçekte cihaz ile taşıyıcı sistemler geliştirerek kanserin tanı ve tedavisinde umut verici devrimsel yaklaşımlar sunan yeni bir alan olarak tedavi seçeneklerine dahil olmuştur [93]. Nanoteknolojinin sağladığı özgün avantajlar sayesinde gerek tanı ve görüntülemede gerekse tedavide yeni olanaklar ortaya çıkmıştır (Şekil 2.6). Nanopartiküller; erken dönemde tümör belirteçlerini yüksek hassasiyetle saptayabilen tanı platformları, kanser hücrelerini hedef alabilen kontrollü ilaç taşıyıcıları, hatta doğası gereği terapötik etkilerde bulunabilir nanomalzemeler şeklinde kullanılabilmektedir [93,94]. Nanoteknolojik yaklaşımlar, konvansiyonel tedavilerin en büyük sorunlarından biri olan sağlıklı dokulara zarar verme ve sistemik toksisite problemini azaltma potansiyeline sahiptir [95,96]. Nanopartiküller, kemoterapötik ilaçların doğrudan tümöre yönlendirilmesi, biyolojik bariyerlerin aşılması ve vücuttaki dolaşım sürelerinin uzatılması konularında çarpıcı iyileştirmeler sağlayabilme potansiyeline sahiptir [97,98]. Nitekim günümüzde nanoteknoloji ürünü bazı taşıyıcı sistemler, hidrofobik antikanser ilaçların hücre içine etkin şekilde iletimini mümkün kılarak ve yan etki profilini iyileştirerek klinik pratiğe girmiştir [99].

Kanserde erken tanı koymak ve tümörleri henüz küçük boyutlardayken saptayabilmek, başarılı bir tedavi için kritik öneme sahiptir. Ancak klasik görüntüleme yöntemlerinin (ör. CT, MRI, PET) çözünürlük sınırları, milimetrik boyutun altındaki lezyonların veya mikrometastatik odakların tespitinde çoğunlukla yetersiz kalmaktadır. Nanoteknoloji, bu alandaki boşluğu doldurarak çok daha yüksek hassasiyet ve çözünürlükle tümör görüntüleme ve biyobelirteç saptama imkânı sunabilecek potansiyele sahiptir. Nanopartikül temelli görüntüleme (kontrast) ajanları**,** tıbbi görüntüleme prosedürlerine entegre edilerek tümör dokusunun daha seçici ve net bir şekilde görünür kılınmasını sağlayabilmektedir [100].

Kuantum noktalar, görünür veya yakın-kızılötesi bölgede parlak ve stabil floresan yayarak kanser hücrelerinin veya tümör dokusunun optik görüntülemesini mümkün kılmaktadır [101]. Benzer şekilde altın nanopartiküller, benzersiz elektron yoğunlukları sayesinde güçlü birer kontrast ajanı olarak görev yapabilme potansiyeline sahiptir. Ayrıca biyouyumlu olmaları ve yüzey modifikasyonlarına olanak tanıyabilmeleri nedeniyle X-ışını ve fototermal görüntüleme tekniklerinde kullanılmaktadırlar [101]. Nanoteknolojinin kanser tedavisinde sunduğu bir diğer olanak, çok özellikli (bir nanoformülasyonun birden fazla görüntüleme yeteneği barındırabilmesi) görüntüleme ajanlarının geliştirilmesidir [93].

Nanopartiküller yalnızca görüntüleme cihazlarına destek olmakla kalmaz, aynı zamanda moleküler tanı alanında da kullanılmaktadır. Özellikle kanda veya diğer vücut sıvılarında dolaşan tümör biyobelirteçlerinin saptanması için nanoteknolojik sensörler ve nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Nanorodlar veya nanopartikül tabanlı sensörler, hastalığa özgü DNA, RNA veya protein biyobelirteçlerini düşük konsantrasyonlarda dahi algılayabilen son derece hassas tanı araçlarıdır [93,101]. Artan sayıda araştırmanın konusu olan bu yapılar sayesinde, ilgili belirtecin etkinliği dolayısıyla gelecekte girişim gerektirmeyen yöntemler (non-invaziv) bir erken teşhis imkanının, birçok kanser tedavisinde ileri düzeyde fayda sağlaması beklenmektedir [100,101].

Nanopartikül teknolojisinin sağladığı bir diğer yaklaşım ise tanı-tedavi bütünleşik (theranostic) kavramı ile ifade edilmektedir. Terapi (therapy) ve tanı (diagnostic) kelimelerinin birleşiminden oluşan bu kavram aynı platformun hem tanısal hem de tedavi edici amaçla kullanılmasını ifade etmektedir. Nanoteknolojinin bu alanda sunduğu imkanlar sayesinde, farklı özelliklere sahip çeşitli nanopartiküllerden oluşturulmuş yapılar ve/veya farklı özelliklerdeki moleküller, hem tedavi edici etken maddeleri hem de görüntüleme ajanlarını birlikte taşıyarak, kanserin hem tedavisine katkı sağlamakta hem de görüntülenmesine olanak tanıyabilmekt [93]. Teranostik yaklaşımların başarısı, nanomalzemelerin yüzeylerinin fonksiyonalitesinin uygun olması ve yüksek yüzey alanı sayesinde mümkün olmaktadır. Tek bir nanopartikül, geniş yüzey alanına uygun nispeten çok sayıda molekül bağlayabildiği için, aynı anda birden fazla görevi yerine getirebilir şeklinde konumlandırılabilmektedir. Bu tür yaklaşımlar ile aynı platformun, tümör sınırlarının belirlenmesi ile cerrahi yaklaşımlara kolaylık ve aynı zamanda hastalığın geriletilmesine olanak tanıyabilecek tedavi amaçlı olarak da kullanılabilmesi mümkündür [91].



Şekil 2.6: Kanserin gelişim mekanizması ve çeşitli nanopartiküllerin şematik gösterimi [102].

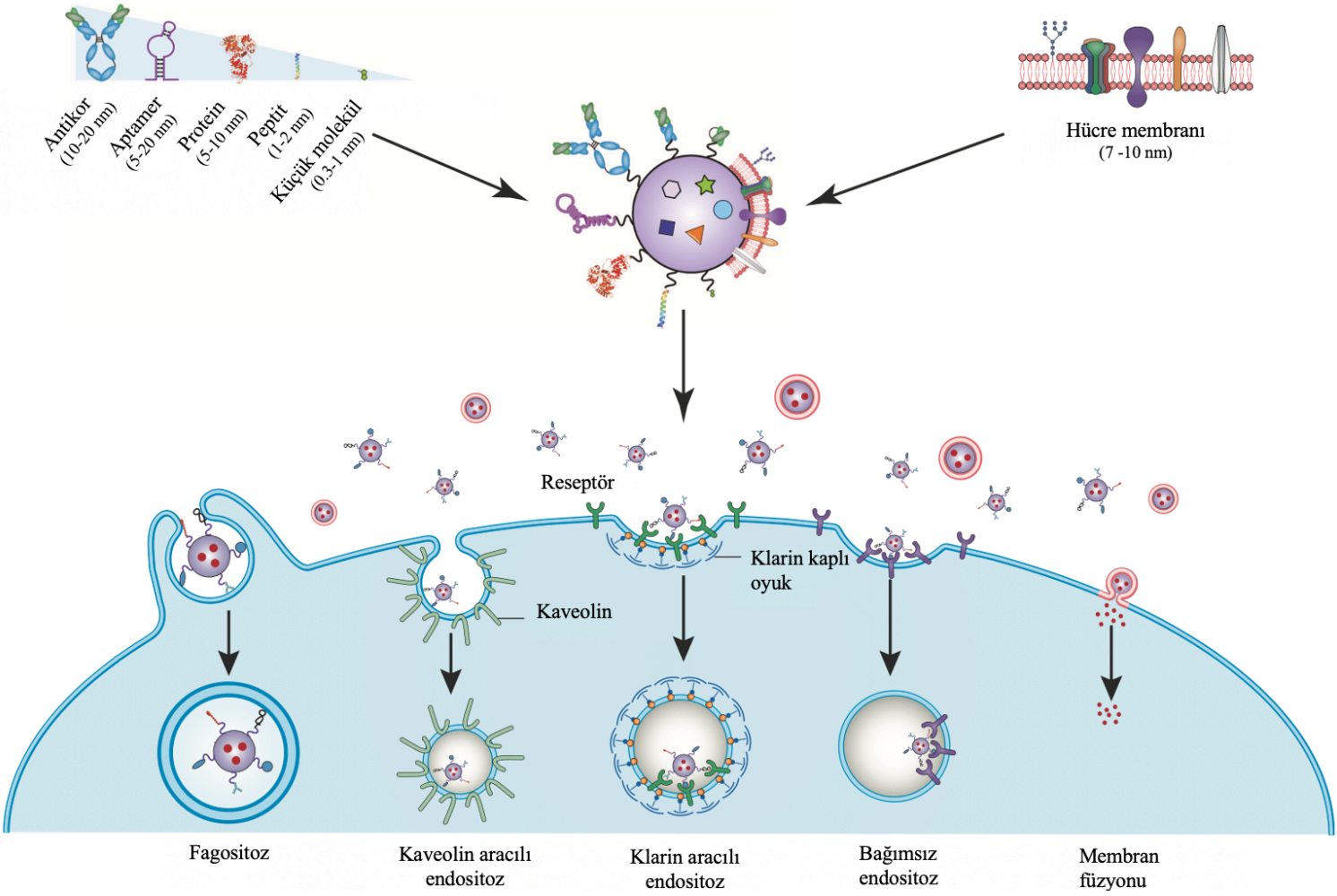
Kemoterapi, kanser tedavisinin temel taşlarından biri olsa da klasik kemoterapötik ilaçlar genellikle tüm vücuda dağıldıkları için tümör bölgesinde yeterli derişime ulaşması adına yüksek dozlarda kullanım gerektirir ki bu durum da sağlıklı dokularda ciddi toksisite yaratmaktadır. Gelişen teknoloji sayesinde nanopartiküller, ilaçların farmakodinamik özelliklerini iyileştirerek, tümör dokusuna nüfuzunu artırırken sağlıklı dokuların maruziyetini azaltmayı hedeflemektedir [98].

Nanotaşıyıcıların tümöre yönlendirilmesinde (Şekil 2.7), pasif hedefleme ve aktif hedefleme olarak adlandırılan başlıca iki farklı mekanizmadan yararlanılmaktadır. Pasif hedefleme, katı tümörlerin olağan dışı damarlanma yapısından kaynaklanan EPR (Arttırılmış Geçirgenlik ve Tutulum

etkisi, Enhanced Permeability and Retention) efektine dayanmaktadır. Katı tümörlerin kılcal damarları, sağlıklı dokuya kıyasla daha fazla sızıntıya olanak verebilecek yapıya sahiptir ve ayrıca tümör içi lenfatik drenaj yetersizdir. Bu durum, belirli boyuttaki nanopartiküllerin damarlardan sızarak tümör dokusu içi hücreler arası boşluklarında birikmesine yol açabilmektedir [103]. Boyut olarak < ~200 nm çapındaki partiküllerin EPR etkisiyle tümör dokuda birikebildiği, daha büyük partiküllerin ise kılcal damarlardan geçişinin zor olduğu belirtilmiştir [103]. 1980'lerde keşfedilen EPR olgusu, kanser alanında nano ilaçlarının geliştirilmesinde önemli bir adım olmuş ve pasif hedeflemeli ilk nesil nanoterapötiklere ilham vermiştir [90]. Doxil adıyla bilinen PEG ile lipozomal doksorubisin, 1995 yılında FDA onayı alarak ilk nanoteknoloji tabanlı kanser ilacı olarak tarihe geçmiştir; Doxil'in etkinliği büyük ölçüde EPR etkisiyle lipozomların tümör dokuda birikmesine dayanmaktadır. Bunu takip eden yıllarda, paklitaksel ilacının insan serum albüminine nanokompleksi olan Abraxane gibi ilaçlar ile çeşitli polimer bilimindeki gelişmelerle paralel polimerik misel yapılı nano-ilaç formları klinik kullanıma girmiştir. Günümüzde sayıları zaman zaman değişmekle birlikte dünya genelinde farklı mercilerden onaylı ~15 adet nanofarmasötik kanser ilacı rutin klinik kullanımda olup, tümör bölgesine pasif hedeflenme (EPR) prensibiyle etki gösteren formülasyonlardır [90].

Nanoteknolojinin onkoloji alanına yaptığı en önemli katkılarından biri, hedefe yönelik ilaç taşıyıcı sistemler geliştirerek antikanser ilaçların etkin ve seçici bir şekilde tümörlere ulaştırılmasını sağlamaktır. Bu sistemler, geleneksel tedavilere kıyasla kanser hücrelerine neredeyse moleküler ölçekte hedef alarak "nokta atışı" tedavi imkanı sunmaktadır. Böylece tedavinin kanserli hücrelerde yoğunlaşması, sağlıklı hücrelerin ise negatif etkilenmesinin minimum düzeyde kalması sağlanmaktadır. Nitekim uygun nanopartiküller ile gerçekleştirilen ilaç taşınımı, ilacın tümör dokusunda daha yüksek birikimi, sağlıklı organlarda daha az hasar ve dolayısıyla artmış terapötik indeks ile sonuçlanabilmektedir [98]. Kısaca "aktif hedefleme" olarak adlandırılan bu stratejide, nanopartikül taşıyıcıların yüzeyine kanser hücrelerinin yüzeyinde bol miktarda bulunan spesifik biyomoleküllere (reseptörlere) bağlanabilecek hedefleyici ligandlar modifiye edilmektedir [103]. Bu ligand/ligandlar, bir tümör antijenine spesifik antikor veya peptit veya büyüme faktörü molekülü gibi moleküllerden oluşabilmektedir. Sentezlenmiş nanopartikül, dolaşımdan tümör bölgesine ulaştıktan sonra ligand-reseptör anahtar kilit mekanizması sayesinde doğrudan kanser hücresinin içine alınmaktadır. Böylece taşıdığı kemoterapötik ilacı tümör hücresinin içinde kendine özgü mekanizmalar ile serbest bırakarak etki göstermektedir [98,103]. Aktif hedeflemenin başarılı olabilmesi için, kullanılan ligandın hedef reseptöre yüksek özgüllük ve afinite ile bağlanması gerekmekte ayrıca hedef reseptörün kanser hücrelerinde bol miktarda, sağlıklı hücrelerde ise mümkün mertebe düşük düzeyde eksprese edilmesi beklenmektedir [103]. Bu sayede aktif hedefleme yoluyla taşınımı sağlanan ilaç,

kanser hücresine seçici olarak alındığından, sağlıklı hücrelerdeki yan etkiler minimuma indirilmiş olmaktadır.



Şekil 2.7: Nanopartiküllerin hücre alım mekanizmasının şematik gösterimi [90].

Nanotaşıyıcıların başarısı, kendisini oluşturan yapının fizikokimyasal özellikleri ile doğrudan ilişkilendirilmektedir. Partikül boyutu, yüzey yükü, yüzeydeki kaplama ve hedefleyici gruplar, nanopartikül biçimi ve esnekliği gibi parametreler, vücutta dolaşım süresi ve dağılım paternini önemli ölçüde etkilemektedir [94]. PEG kaplaması yapılmış nanopartiküller PEG dolayısıyla bağışıklık sisteminin kontrol mekanizmasından kaçabilmekle birlikte kanda dolaşım sürelerinin belirgin biçimde uzamasına yardımcı olabilmektedir [104]. Bunun yanında, nanopartiküllerin sentezinde kullanılan malzemelerin biyouyumlu ve/veya biyobozunur olması bir başka değerlendirme konusudur. Biyouyumlu malzemelerden sentezlenmiş yapıların vücut için ciddi toksik etki göstermemesi tedavinin seyri açısından önem arz eden bir durumdur. Biyobozunur polimerler (PLA, PLGA vb.) kullanılarak hazırlanmış nanokapsüller ve nanotaşıyıcılar, taşıdıkları ilaçları saldıktan sonra vücutta zararlı atık

bırakmadan doğal metabolik yollarla parçalanıp vücuttan atılabilmektedirler. Bu özellik, uzun vadede kronik toksisite risklerini azaltması açısından da önemli görülmektedir [99].

Nanopartikül temelli ilaç taşıyıcılar geleneksel ilaç formlarının çözünürlük veya stabilite problemlerini de aşmaya yardımcı olmaktadır. Hidrofobik kemoterapi ilaçları, suyu seven iç kısma sahip lipozomlar veya polimerik miseller içinde çözülebilir hale getirilerek etkin bir şekilde taşınabilmektedir Günümüzde Doksorubisin, Cisplatin, Paklitaksel, Kamptotesin ve türevleri gibi pek çok kemoterapi ilacı için lipozomal, polimerik misel, albümin-nanopartikül veya polimer-ilaç konjugatı şeklinde nanoformülasyonlar geliştirilmiş ve bazılarının klinik kullanımı onaylanmıştır [94,99,105].

Öte yandan halen kanser tedavisinde nanopartiküller ile tam anlamıyla istenen başarılara ulaşmasının önünde bazı engeller bulunmaktadır. Özellikle katı tümörlerin heterojen yapısı, EPR etkisinin hasta ve tümör tipine göre değişkenlik göstermesi ve çok hücreli karmaşık tümör mikro çevresi gibi konular her hastada standart bir nanoterapötik etkinlik sağlanmasını zorlaştırabilmektedir. Ayrıca nanopartiküllerin kanda proteinlerle kaplanarak (korona oluşumu) etkinliklerinin değişmesi, tümör bariyerlerini aşarak her kanser hücresine nüfuz etme gerekliliği gibi aşılması güç zorluklar da söz konusudur [94,106].

Hali hazırda onaylanmış nanofarmasötiklerin çoğu pasif hedefleme prensibiyle etkinlik göstermekte olup, yeni kuşak yaklaşımların çoğunluğu tümör mikro çevresini ve tümör hücrelerini hedef alarak kanser tedavisinde etkinliği daha da artırmayı amaçlamaktadır. Bu özellikleri ile kullanılabilme potansiyeline sahip birçok nanotaşıyıcı adayının da yoğun şekilde preklinik ve klinik değerlendirme çalışmaları sürdürülmektedir [105]. Nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıma sistemleri, kemoterapinin etkinliğini ve tümörlere seçiciliğini çarpıcı biçimde arttırma potansiyeli göstermiş ve kanser tedavisinde yeni bir çağın kapılarını aralamıştır. Önümüzdeki yıllarda çok sayıda aktif hedefleme özelliği barındıran çok işlevli akıllı nanotaşıyıcıların da klinik onay alarak mevcut kemoterapi taşıyıcı cephaneliğe katılması beklenmektedir.

Nanoteknolojinin ilaç taşınım sistemlerinde sağladığı bir diğer avantaj uyarıya duyarlı nanotaşıyıcılardır. Akıllı nanopartiküller olarak da adlandırılabilen bu yapılar, ortam koşullarına duyarlı olarak, tepki verebilen ve kontrollü bir şekilde davranışlarını değiştirebilen gelişmiş ilaç taşıma sistemleridir. Geleneksel nanopartiküller ilacı hedefe taşımakla yetinirken, akıllı nanopartiküller hassas tetikleyicilere yanıt verecek şekilde tasarlanmaktadır. Bu tetikleyiciler, tümör mikroçevresine özgü düşük pH, yüksek enzim düzeyleri, redoks potansiyeli gibi içsel faktörler olabileceği gibi, haricen

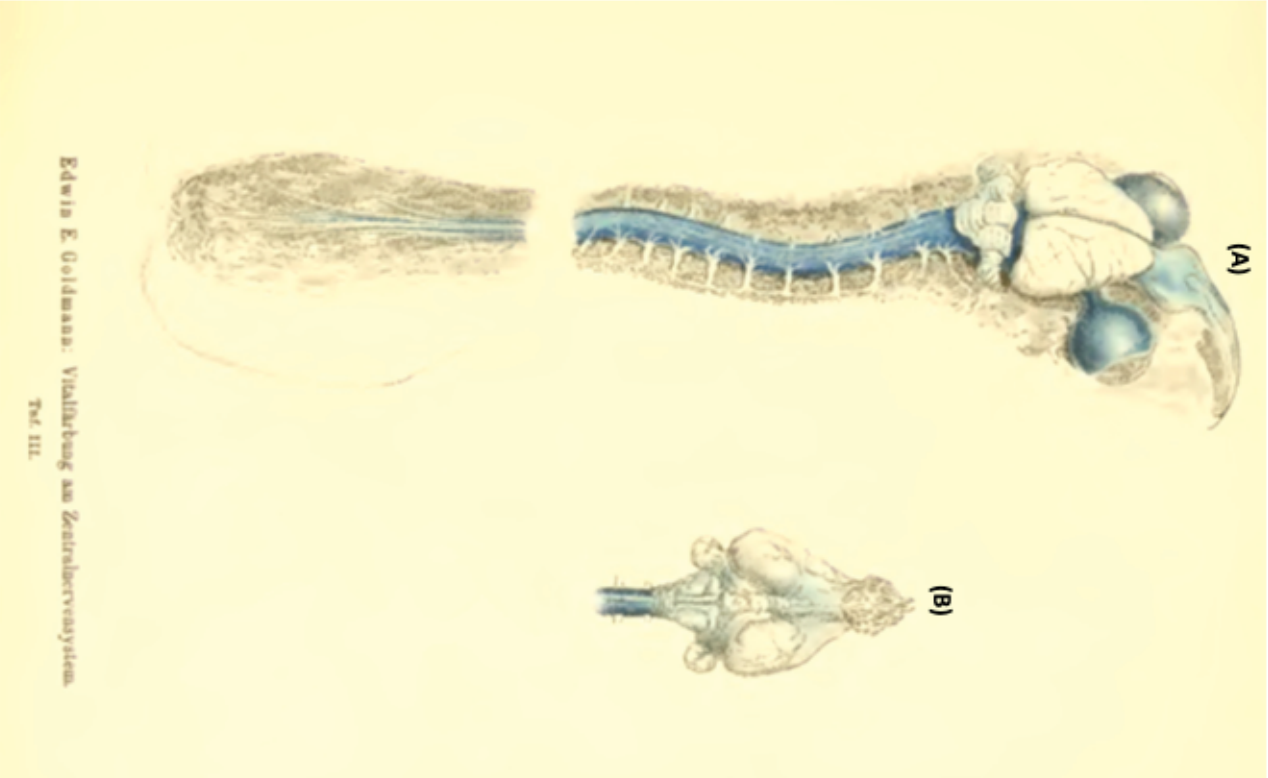
uygulanan ışık, ısı, manyetik alan, ultrason gibi uyarılar da olabilmektedir [107]. Günümüzde polimerik nanopartiküller, dendrimerler, miseller, lipozomlar, hücre zarı kaplı biyonanopartiküller, mezoporöz silika nanoformülasyonları, altın ve demir oksit nanomalzemeleri, kuantum noktalar, karbon nanotüpler, metal-organik kafes (MOF'lar) yapıları gibi çok çeşitli "akıllı" nanopartikül platformları geliştirilmektedir. Akıllı nanotaşıyıcıların bir diğer önemli yönü, hedefleme stratejilerinin detaylandırılabilmesine olanak tanımasıdır**.** Geleneksel nanopartiküller çoğunlukla sadece doku seviyesinde (tümör dokusuna) pasif hedeflenirken, akıllı sistemler hücre düzeyinde ve hatta organel düzeyinde hedeflemeyi mümkün kılmaktadır. Bu tür çok aşamalı hedefleme yaklaşımları, ilacın hücre içinde optimum etki göstereceği yere dek ulaştırılmasını (korunmasını) sağlayarak terapötik etkinliği çok daha fazla arttırabilmektedir. Literatürde, kanser tedavisine yönelik nanotaşıyıcı yapılar tümör doku hedeflemesinin yanı sıra tümör hücresi ve organel hedeflemesine de entegre edilmesinin, geleneksel tek aşamalı hedeflemeye kıyasla çok daha yüksek tedavi verimi sağladığı belirtilmektedir [90]. Teknolojik ilerlemeler sayesinde "akıllı özellikler, uyarıya duyarlı fonksiyonlar ve modifiye edilebilirlik" gibi niteliklere sahip çok sayıda nanotaşıyıcı malzeme adayı ortaya çıkmıştır. Çok çeşitli özelliklere sahip olabilen bu malzemeler içinde akıllı nanopartiküller gelecekte kanser ile mücadelede ön safta yer alacak olup, ilaç salımının zamanlaması ve lokasyonunda tam kontrol sunabilmesi hedeflenmektedir [97].

2.5. KAN-BEYİN BARİYERİ

Merkezi sinir sistemi tümörleri ve nörodejeneratif hastalıklar, günümüzde tedavisi en zor sağlık sorunları arasındadır. Kötü huylu beyin tümörleri dünya çapında her yıl yüz binlerce yeni vaka ve yüksek ölüm oranlarına neden olmaktadır. Özellikle agresif bir beyin tümörü olan glioblastoma multiforme olgularında, standart tedavilere rağmen ortalama sağkalım süresi ~15 ay kadar olup prognoz (hastalığın seyri) olumsuzdur [108]. Beyin kaynaklı olduğu düşünülen merkezi sinir sistemi tümörleri ve nörodejeneratif hastalıklarda temel patolojik mekanizmaların tam olarak anlaşılmasına yönelik sürdürülen çalışmaların yanında, etkin tedavilerin geliştirilmesindeki en büyük engellerin başında Kan-Beyin Bariyeri (KBB) gelmektedir [108].

KBB'nin varlığı ilk olarak Paul Ehrlich ve Edwin Goldmann tarafından kanıtlanmıştır (Şekil 2.8) [109]. KBB, beyin kılcal damarlarının endotel hücrelerinden oluşan, beyin ile sistemik kan dolaşımı arasındaki madde alışverişini son derece seçici şekilde düzenleyen aynı zamanda koruyucu bir bariyer görevi gören özel bir yapıdır. Endotelyal hücrelerin sıkı bağlantılar (tight junctions) ile birbirine bağlandığı bu bariyer, beyin dokusu için kararlı bir kimyasal ortam sağlayarak toksin/patojen girişini engellemektedir [110,111]. Bu yapısı sayesinde KBB, büyük moleküllerin neredeyse

tamamının ve küçük moleküllerin ~%98'inin beyin parankimine geçişini engelleyerek nörolojik hastalıkların tedavisinde ciddi engel oluşturmaktadır. KBB'nin, beyin hastalıklarına yönelik sistemik tedavilerde ilacın hedefe ulaşmasını büyük oranda engellediği için, bu bariyeri geçmeye yönelik stratejiler kritik önemdedir.

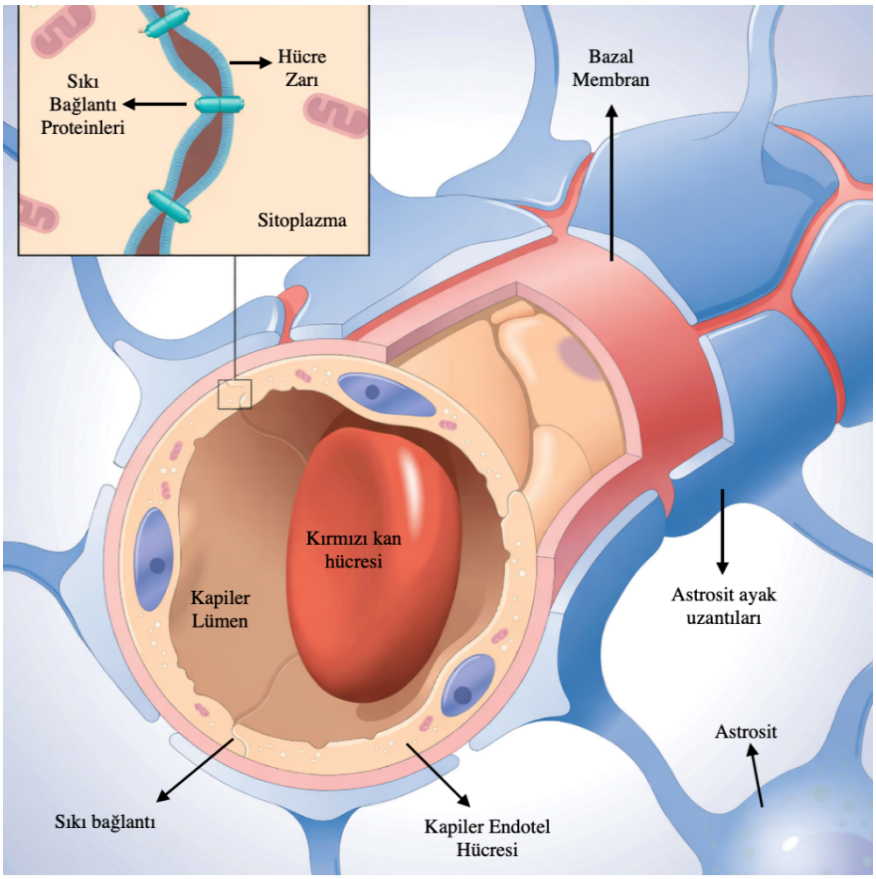


Şekil 2.8: KBB'nin varlığına kanıt sunan tripan mavisi ile yapılan çalışmaya ait orijinal çizim [112]**.**

KBB temelde mikrodamarsal endotel hücreleri, perisitler, ve astrositler ve astrositlerin ayak uzantılarından oluşan, beynin kan dolaşımından sıkı şekilde korunmasını sağlayan özel bir yapıdır. KBB'nin bir kısmını oluşturan endotel hücreleri, yüksek mitokondri içeriği, gözenekliliğin (fenestrasyon) eksikliği ve düşük pinositoz aktivitesiyle vücuttaki diğer kapiller endotel hücrelerinden ayrılmakta ve enerjiye bağlı aktif taşıma sistemleriyle beyne seçici madde geçişini sağlamaktadır. Perisitler, damar duvarında yer alan ve kısmen bazal membran içine gömülü bulunan özel hücrelerdir. Endotel hücreleriyle aralarında peg-soket adı verilen yapılarla doğrudan temas kurarak kan damarlarının yapısal bütünlüğüne katkı sağlamaktadırlar [113]. Bu bağlantılar sayesinde damar duvarının dayanıklılığı artar ve kan akışına karşı direnç sağlamaktadır [114,115]. Ayrıca perisitler TGF-β gibi sinyallerle sıkı bağlantı proteinlerinin ekspresyonunu artırarak KBB bütünlüğünün korunmasına katkıda bulunmaktadır [116]. Bu durumun yanı sıra, perisitler kan akışının düzenlenmesi, yeni damar oluşumunun kontrolü ve inflamatuar yanıtlarda da önemli roller üstlenmektedir. Astrositler ise merkezi sinir sistemindeki en bol glial hücre türüdür ve morfolojik yapıları yıldız şeklindedir. Bu

hücrelerin uzantılarının uçlarında yer alan "ayak yapıları" (foot processes), endotel hücrelerini dışarıdan sararak destek sağlamaktadırlar. Astrositler sadece fiziksel destek sunmakla kalmayıp; aynı zamanda nöronlara besin sağlanması, iyon dengesi, sinyallerin düzenlenmesi ve hasar durumunda onarım süreçlerinde de görev almaktadırlar. Ayrıca astrositlerin sıkı bağlantıların oluşumunu teşvik eden sinyaller göndererek KBB'nin işlevselliğinin korunmasında da önemli rol oynamakta olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.9) [117,118].

Oldukça kompleks ve karmaşık yapısı dolayısıyla KBB'yi aşabilmek için mannitol infüzyonu, çeşitli analoglarla bariyer gevşetilmesi gibi invaziv/farmakolojik yöntemler, odaklanmış ultrason uygulaması, intranasal ilaç verme, P-glikoprotein gibi efluks pompası inhibitörleri kullanma, viral vektörler veya taşıyıcı proteinlere bağlı ilaçlar gibi çeşitli yaklaşımlara ait araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Ne var ki bu girişimlerin birçoğu klinik uygulamada sınırlı başarı elde edebilmiştir [111,119]. Son yıllarda, özellikle nanoteknoloji tabanlı ilaç taşıyıcı sistemler KBB engelini aşmak için en umut verici çözümlerden biri olarak öne çıkmıştır [120]. Nanopartikül formundaki taşıyıcılar, küçük boyutları sayesinde kılcal damarlardan sızabilme ve yüzeylerinin kolayca fonksiyonelleştirilebilmesi sayesinde istenen hedeflere yönelik özelleştirilebilme gibi avantajlarıyla dikkat çekmektedir [108].



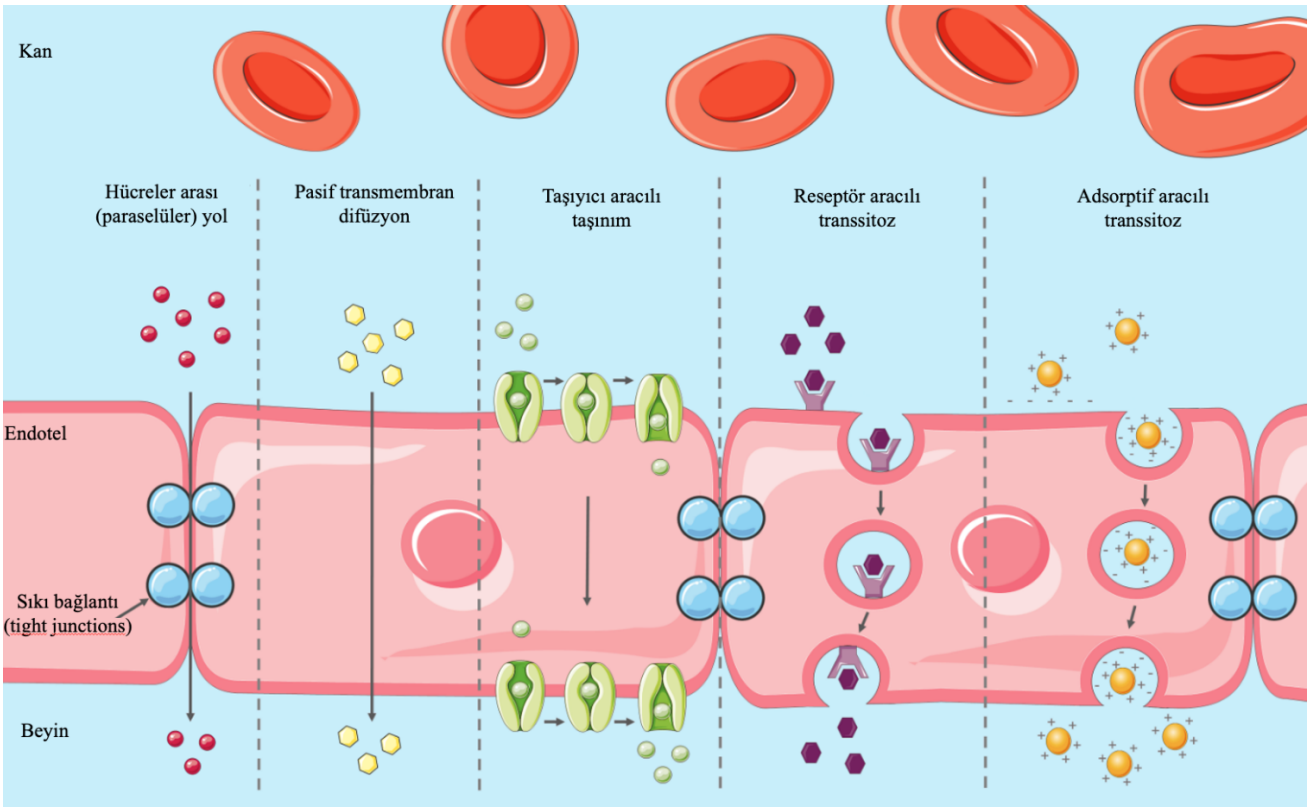
Şekil 2.9: Kan-beyin bariyerinin temel yapısal bileşenlerinin şematik gösterimi.

2.5.1. Kan-Beyin Bariyeri Geçiş Mekanizmaları

KBB'den geçiş için küçük, yağda çözünen moleküller, KBB boyunca konsantrasyon gradyanı dolayısıyla pasif olarak difüze olabilmektedir ancak pasif difüzyonun sınırlayıcı faktörleri arasında 400 Da'dan büyük molekül ağırlıkları (MW), yüksek polar yüzey alanları, elektrostatik yük gibi sınırlayıcı parametreler olduğu düşünülmektedir. Küçük moleküllerin ise %2'sinden daha azının KBB'den pasif olarak beyin parenkimine geçebileceğine inanılmaktadır [108].

KBB boyunca oldukça kısıtlayıcı şartlarda taşınım gerçekleşmesine rağmen, beynin besin ve enerjiye önemli ölçüde ihtiyacı bulunmaktadır. Bu nedenle, çeşitli mekanizmalar (Şekil 2.10), belirli endojen maddelerin pasif veya aktif taşıma yolları aracılığıyla beyin tarafından alınmasını sağlamaktadır. Genel olarak, maddeler fizyolojik koşullar altında KBB'yi;

(i) pasif difüzyon ile taşınım,
(ii) taşıyıcı aracılı taşınım,
(iii) adsorptiv aracılı taşınım,
(iv) reseptör aracılı taşınım,
(v) dışarı akış pompaları yoluyla geçebilmektedir [111,121].



Şekil 2.10: KBB geçiş mekanizmalarının şematik gösterimi [122] .

2.5.1.1. Pasif Difüzyon ile Taşınım

Pasif taşıma mekanizması, enerji gerektirmeksizin ve spesifik taşıyıcı proteinlere ihtiyaç duymaksızın, genellikle küçük moleküllerin konsantrasyon gradyanı doğrultusunda taşınmasını ifade etmektedir. Kan-beyin bariyerinde bulunan sıkı bağlantılar, hücreler arası boşluğu son derece daraltarak, paraselüler (iki hücre arasındaki boşluk sayesinde) geçişi fiziksel olarak kısıtlamaktadır. Bununla birlikte, molekül ağırlığı ~400 Dalton'un altında olan ve hidrojen bağı oluşturma kapasitesi az olan küçük lipofilik moleküller, lipit çift tabaka üzerinden pasif difüzyon yoluyla beyin parankimine geçebilmektedir. Ayrıca, bu mekanizma ile oksijen (O_2) ve karbondioksit (CO_2) gibi küçük gaz molekülleri, kan ile beyin parankimi arasında hızla ve serbestçe yayılabilmektedir [123,124].

2.5.1.2. Taşıyıcı Aracılı Taşınım

Taşıyıcı aracılı taşıma mekanizması, glikoz, amino asitler ve nükleozitler gibi besin maddelerinin taşındığı KBB boyunca en yaygın taşıma mekanizmalarından biri kabul edilmektedir [125]. Bu sistem, enerji gerektirmeyen kolaylaştırılmış difüzyon ve enerjiye dolaylı olarak ihtiyaç duyan sekonder aktif taşınım olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Taşıyıcı proteinler, hücre zarının belirli bölgelerine yerleşmiş olup, bazıları yalnızca lüminal (kan tarafı) ya da ablüminal (beyin tarafı) yüzeyde bulunurken bazıları her iki yüzde de yer almaktadır. Bu taşıyıcılar çözünen madde taşıyıcıları (Solute Carrier- SLC)) gen ailesi tarafından kodlanır ve amino asitler, karbonhidratlar, yağ asitleri, hormonlar, vitaminler ve organik anyonlar gibi çok çeşitli moleküllerin endotel hücreleri aracılığıyla hücre içinden geçerek (transselüler) taşınmasını sağlamaktadır. Bu sistemler sayesinde, normalde hücre zarından geçemeyen büyük ve polar moleküller kontrollü biçimde beyin dokusuna ulaştırılabilmektedir [114,126–129].

2.5.1.3. Adsorptif Aracılı Taşınım

Adsorptif aracılı taşıma (AMT), KBB geçişinde reseptörden bağımsız, ancak elektrostatik olarak yönlendirilen bir taşınım mekanizmasıdır. Bu süreç, pozitif yüklü katyonik makromoleküllerin veya nanoparçacıkların, endotel hücre zarının negatif yüklü glikokaliks yapısıyla elektrostatik etkileşime girmesiyle başlamaktadır. Endotel hücreleri, yüzeylerinde heparan sülfat proteoglikanları (HSPG'ler), siyaloglikoproteinler ve siyaloglikolipitler gibi yoğun negatif yüklü yapılar taşmakta olup; bu durum dolayısıyla lüminal yüzeyde belirgin bir anyonik karakter oluşmaktadır. Bu yapı, fizyolojik pH'ta pozitif yüke sahip katyonik moleküllerle etkileşime girerek endositozla sonuçlanan invajinasyonlara ve vezikül oluşumuna zemin hazırlamaktadır. AMT, büyük moleküllü

biyofarmasötiklerin beyne taşınmasında alternatif bir yol sunarak özellikle pozitif yüklü ilaç taşıyıcı sistemlerle desteklendiğinde, KBB'yi geçmede etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu mekanizma, spesifik bir yüzey reseptörüne bağlı olmaksızın işlediği için taşıyıcıların endotel hücrelere bağlanma afinitesi düşüktür ve hedef dışı dokularda birikim riski taşımaktadır. Ayrıca, pozitif yüklü yapılarla yapılan modifikasyonlar, ilacın biyolojik aktivitesini ve stabilitesini olumsuz etkileyebileceği ve dolayısıyla düşük etkinliğe neden olabileceği ihtimali barındırmaktadır. Bu nedenle, AMT yoluyla ilaç taşınımı, terapötik etkinliğin artırılması açısından umut verici bir strateji olsa da, özgüllük ve güvenlik açısından optimize edilmesi gereken yönler barındırmaktadır [125,130–134].

2.5.1.4. Reseptör Aracılı Taşınım

Reseptör Aracılı Taşıma (RMT), yenilikçi tedavi yaklaşımlarında, nanoterapötik sistemlerin KBB'yi geçerek merkezi sinir sistemine taşınmasında en sık araştırılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemde, nanopartiküller, transferrin, insülin veya H-ferritin gibi belirli reseptörlerle etkileşebilecek ligandlarla kaplanmaktadır. Bu ligandlar, endotel hücrelerinin lüminal yüzeyindeki hedef reseptörlere bağlanarak klatrin-kaplı çukurlar veya kaveoller aracılığıyla endositozu başlatmakta olup, oluşan veziküller sitoplazma boyunca taşınarak ablüminal tarafta ekzositoz ile beyin dokusuna bırakılmaktadır [111,132,135]. Ancak tüm sistemin işlevselliği, NP'nin yüzey ligandı ile hedef reseptör arasındaki özgüllük, taşıma sırasında maruz kalınan pH değişikliklerine karşı stabilite ve konjugasyonun biyolojik aktiviteyi bozmayacak şekilde tasarlanması ile bağlantılıdır. Bu nedenlerle, RMT tabanlı beyin hedefli taşıma sistemleri, hem farmasötik mühendislik hem de biyolojik özgüllük açısından dikkatle optimize edilmelidir. RMT ile yapılan çalışmalar, enjeksiyon dozunun beyne %3,5'e kadar ulaşabildiğini göstermekte ve bu yöntem, lipozomlar, polimerik taşıyıcılar, monoklonal antikorlar ve diğer protein sistemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır [136].

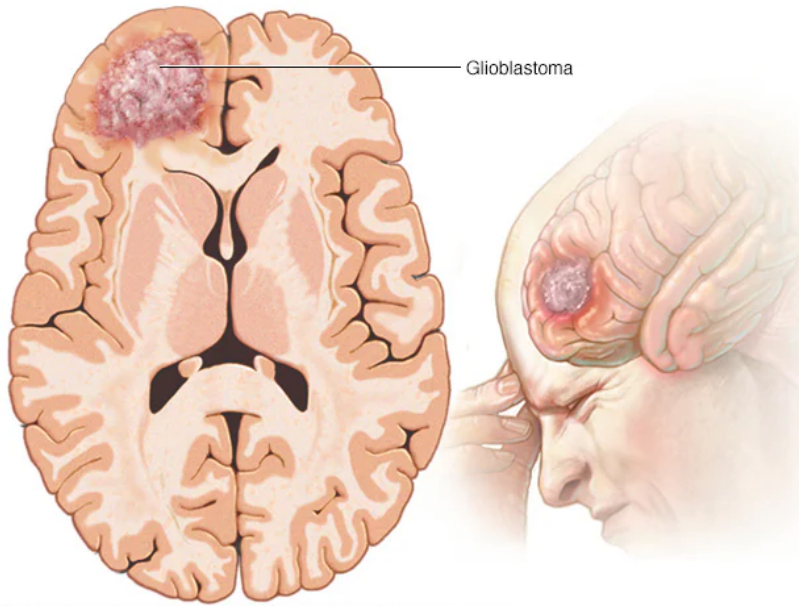
2.5.1.5. Dış Akış Pompaları

Dışa akış pompaları, KBB'nin seçici geçirgenliğini sağlayan temel savunma mekanizmalarından birini oluşturmaktadır. Bu protein yapılar, endotel hücre zarında konumlanmış olup, ATP hidroliziyle enerji sağlayarak çeşitli çözünen maddelerin hücre dışına taşınmasını gerçekleştirmektedirler. Bu sayede, toksik maddeler ya da istenmeyen farmakolojik ajanlar beyin parankimine girmeden damar lümenine geri gönderilmektedir [111]. En iyi bilinen dışa akış pompaları arasında P-glikoprotein (P-gp/ABCB1), meme kanseri direnç proteini (BCRP/ABCG2) ve çoklu ilaç direnç proteinleri (MRP ailesi) yer almaktadır [137]. Bu pompalar, özellikle lipofilik ve terapötik ajanların beyne ulaşmasını sınırlandırarak KBB'nin koruyucu rolünü güçlendirmeyi esas almaktadır. Ancak, bu durum merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisinde ilaç etkinliğini kısıtlayan önemli bir

engel oluşturmaktadır. Bu nedenle, dışa akış pompalarının farmakolojik olarak inhibe edilmesi veya bypass edilmesi, terapötik ajanların KBB'yi geçişini artırmak amacıyla araştırılan potansiyel stratejiler arasındadır. P-gp inhibitörleri gibi modülatörlerin geçici olarak kullanılması, özellikle nörodejeneratif hastalıklar veya beyin tümörleri gibi durumlarda ilaçların hedef dokulara etkin şekilde ulaştırılmasını kolaylaştırabileceği düşünülmektedir [138,139].

2.6. BEYİN KANSERİ

Beyin kanseri terimi genellikle beynin içerisindeki birincil (primer) kötü huylu tümörleri tanımlamak için kullanılmaktadır (Şekil 2.11). Birincil beyin tümörleri merkezi sinir sistemi hücrelerinden kaynaklanan heterojen bir tümör grubudur ve iyi huylu (benign) veya kötü huylu (malign) olabilmektedir [140]. Kötü huylu beyin tümörleri (glioblastoma), vücuttaki en zor tedavi edilebilen kanserler arasında yer almaktadır. Beyin tümörleri, kafatası içinde yer alarak ve çevre sinir dokusuna sızarak ciddi nörolojik belirtilere yol açmakta olup, hastalığın prognozu yüksek mortalite ile seyretmektedir [141]. İleri yaşlardaki hastalarda, en iyi destekleyici bakımla ortalama sağkalım 4 aydan daha azdır [142]. Ancak, izositrat dehidrogenaz 1 (IDH-1) ve IDH-2 mutasyonu ve MGMT metilasyonu gibi moleküler özelliklerin tedaviye olumlu bir prognoz sağladığı düşünülmektedir [143–145]. Geçmişten günümüze tedavilerdeki gelişmeler sayesinde tedavi gören hastalarda ortalama sağ kalım 15 ayın üzerine çıkmıştır [146]. Genel olarak, 2000 ile 2014 yılları arasında ABD'de teşhis konulan hastalar için 1 yıllık göreceli sağ kalım oranı %41.4 iken, 2000-2004 ve 2005-2014 dönemlerinde sırasıyla %34.4'ten %44.6'ya bir artış görülmüştür. İlgili dönemi kapsayan kısa süreli sağ kalım oranlarındaki bu kademeli iyileşmelere rağmen, 5 yıllık sağ kalım oranı aynı zaman dilimi için nispeten sabit kalmış ve teşhisten sonraki 5 yılda yalnızca %5.8'lik bir sağ kalım oranına ulaşılabilmiştir [147–149].



Şekil 2.11: Beyin kanserinin şematik gösterimi [150].

Beyin tümörleri kaynaklarına göre genel olarak birincil (primer) ve ikincil (sekonder, metastatik) olmak üzere iki ana gruba ayrılmaktadır. Birincil beyin tümörleri, doğrudan beyindeki hücrelerden kaynaklanmakta olup, gliomalar (glioblastom, astrositom vb.) ya da meningiom gibi sınıflandırmalara ayrılmaktadır [151]. Bu tümörler, genetik ve moleküler düzeyde hücre içi kontrol mekanizmalarının bozulmasıyla ortaya çıkmakta ve zamanla çevre dokulara yayılım göstermektedir [152]. Öte yandan, İkincil beyin tümörleri ya da metastatik tümörler, vücudun başka bir bölgesindeki malignitelerin beyne ulaşarak burada yeni bir tümör odağı oluşturmasıyla gelişmektedir [145]. Bu tür metastatik tümörler genellikle birden fazla odakta görülmekte olup, birincil tümörden farklı olarak orijinal dokuya ait biyolojik özellikleri kısmen koruyabilmektedirler [152,153]. Klinik ve radyolojik açıdan değerlendirildiğinde, sekonder tümörler sıklıkla çoklu lezyonlar şeklinde saptanırken, birincil tümörler daha sınırlı bölgesel gelişim göstermektedir [153]. Her iki tümör türünün yapısal farklılığı dolayısıyla, tedavi stratejileri, prognoz ve sağ kalım oranları önemli farklar gösterdiğinden, doğru sınıflandırma klinik yönetim açısından kritik önem arz etmektedir [151]. Birincil beyin tümörleri arasında en yaygın görülenler türler gliomalar ve menenjiyomlardır. Gliomalar, tüm primer beyin tümörlerinin yaklaşık %30'unu oluştururken, malign primer beyin tümörlerinin %80'ini oluşturmakta ve primer beyin tümörlerinden kaynaklanan ölümlerin büyük kısmından sorumludurlar [141]. Özellikle glioblastoma multiforme (GBM) en agresif ve en yaygın malign beyin tümörüdü. Bu nedenle "beyin kanseri" ifadesi sıklıkla GBM gibi yüksek dereceli gliomlar yerine kullanılmaktadır. Bununla birlikte, beyin içerisinde gelişen iyi huylu tümörler de (meningiom, hipofiz adenomu vb.) bulunmakta ve teknik olarak beyin tümörü kapsamına girmekte ancak malign davranış göstermedikleri için beyin kanseri

olarak adlandırılmamaktadırlar [151]. Beyinde görülen tümörlerin önemli bir kısmı temelde metastatik tümörlerdir. Beyindeki yeni oluşan doku büyümelerinin çoğu bu metastatik tümörlerden oluşmakta olup, sıklıkları primer beyin tümörlerinden 5-10 kat daha fazladır. Özel bir sınıflandırmaya tabi olmayıp orijin aldıkları organın "akciğer kanserinin beyin metastazı" tümörü olarak adlandırılmaktadır [141].

Beyin tümörleri, köken aldıkları hücre tipi, histolojik görünüm ve moleküler özellikler temelinde çeşitli türlere ayrılmaktadır. WHO sınıflandırma sistemi, merkezi sinir sistemi tümörlerini histopatolojik türlerine ve malignite derecelerine göre düzenlemektedir. Histolojik sınıflandırma, tümörün mikroskobik görünümde hangi normal hücre tipine benzediğine dayanmaktadır. Birincil beyin tümörlerinin en yaygın grubu olan gliomlar, destekleyici glial hücrelerden çıktıkları düşünülen ve histolojik görünümlerine göre alt gruplara ayrılan tümörlerdir. Astrositomlar**,** oligodendrogliomlar**,** oligoastrositom (karışık gliyom) ve ependimomlar bu gruba dahildir [141]. Diğer yandan başka bir sınıf olan menenjiyomlar; meninks (beyin zarı) hücrelerinden kaynaklanan, schwannomlar sinir kılıfı (schwann) hücrelerinden gelişen, hipofiz adenomları ise hipofiz bezinden kaynaklanan tümör türüdür. WHO 2016 yılında histolojik sınıflamaya ek moleküler biyo-belirteçler de (IDH, 1p/19q, ATRX, TP53) dahil edilmiştir ve "Astrositoma, IDH-mutant" benzeri tanımlamalar kullanılmaya başlamıştır [154]. 2021 yılında bir güncelleme daha yapılarak daha kapsamlı moleküle sınıflama sistemi belirlenmiştir ("Astrositoma, IDH-mutant, CNS WHO Grade 2") [155].

2021 öncesi WHO sınıflandırmasına göre; malignite derecesi (grade)**,** tümörün davranış agresifliğini yansıtmakta olup, WHO tarafından I ile IV arasında derecelendirilmiştir. WHO Grade I tümörler görece iyi huylu seyirli olup yavaş büyüyen ve çevre dokuları istila etmeyen bir davranış sergilerken; Grade IV ise en malign davranışlı, hızlı büyüyen ve invaziv tümörleri tanımlamaktadır. Histopatolojik incelemede anaplazi özellikleri (yüksek mitoz aktivitesi, mikrodamar çoğalması, nekroz alanları vb.) saptanması durumunda tümöre Grade II (düşük malign), Grade III (yüksek malign) veya Grade IV (yüksek malign, glioblastom) tanısı konmaktadır [141]. Geleneksel sınıflandırmadaki genel sorun, farklı biyolojik özelliklere sahip tümör tipleri belirli derecelerle eşleştirilip, tümörlerin klinik gidişatları arasında önemli farklar olmasına rağmen benzer prognostik beklentilere yol açmaktadır. Bu durumdan ötürü 2021 yılında yayımlanan "WHO CNS5" sınıflandırmasıyla birlikte derecelendirme sisteminde önemli bazı değişiklikler yapılmıştır. Yapılan değişiklikler ile; tümör derecelendirmesi farklı tümör tipleri arasında değil, her tümör tipi içinde yapılmaktadır. 2021 öncesi sistemde bir "anaplastik astrositom" doğrudan WHO Grade III olarak tanımlanırken, 2021 sonrası sistemde aynı tümör tipi Grade 2, 3 ya da 4 olarak farklı dereceler alabilmektedir. Bu yaklaşım, aynı tümör tipi içindeki biyolojik çeşitliliği daha iyi yansıtarak klinik karar süreçlerini daha esnek ve doğru hale

getirmeyi amaçlamaktadır. Ayrıca yazım hatalarını azaltmak, kafa karışıklığını önlemek ve diğer organ tümörleriyle tutarlılığı sağlamak amacıyla Romen rakamları yerine Arap rakamlarının kullanılmasına karar verilmiştir. Bu sayede hem nöro-onkoloji uygulamalarında güvenilirliği arttırmayı hem de tümör sınıflandırmasında evrensel bir standart oluşturarak daha bütüncül bir değerlendirme sağlanması hedeflenmiştir [155] .

Beyin kanseri tedavisi, multidisipliner bir yaklaşımla gerçekleştirilmekte ve temel olarak cerrahi, radyoterapi ve kemoterapi yöntemleri ile bunların bütünleşik kullanımlarına dayanmaktadır. İlaç tedavileri (kemoterapi ve hedefe yönelik tedaviler) özellikle yüksek dereceli beyin tümörlerinde, cerrahi rezeksiyon ve radyoterapiye ek olarak hayati öneme sahiptir [145].

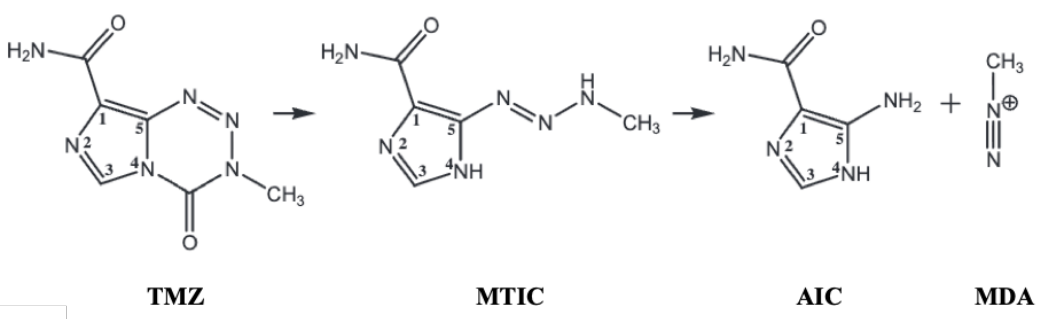
2.6.1. Temozolomid

Glioblastomada etkili sistemik kemoterapinin önündeki başlıca engeller, ilacın zayıf çözünürlüğü/hidrofilikliği, molekül boyutu ve yüzey yükü gibi fiziko-kimyasal özellikler ile KBB'yi ve tümör mikro çevresinin oluşturduğu anatomik/fizyolojik bariyerlerdir [156]. Sistemik uygulamalarda da düşük biyoyararlanım, karaciğerde tutulma/birikim ve böbreklerden hızlı atılım, tümör içinde yeterli ilaç derişimi oluşmasını engelleyebilmektedir [157]. Özellikle molekül kütlesi >500 Da olan kemoterapötikler, yeterli lipofilisiteye sahip değilse veya taşıyıcı aracılı geçişi yoksa KBB'yi etkin biçimde geçememektedir [158]; geçebilenler de çoğunlukla beyin kılcal damarlarındaki efluks taşıyıcıları (P-gp/ABCB1, MRP ailesi) tarafından kana geri pompalanmaktadır [159]. Bu durumun yanı sıra seçicilik/özgüllük düşüklüğü dolayısıyla hedef dışı dokularda istenmeyen etkilere yol açabilmekte; hızlı bölünen sağlıklı hücrelerin etkilenmesi, kemik iliği baskılanmasına ve çeşitli organ fonksiyon bozukluklarına neden olabilmektedir [160]. Ayrıca kemoterapi kaynaklı sinir sistemi etkileri ile bilişsel etkilenme, beyaz madde hasarı (lökoensefalopati), periferik sinir hasarı (nöropati) ve nöbetler pratik uygulamalar için kemoterapik dozunu sınırlayabilmektedir [161,162]. Tüm bu nedenler dolayısıyla yan etkileri azaltabilecek aynı zamanda tümör içi etkin dozu yükseltebilecek ve hem aktif hem de uykuda hücreleri hedefleyebilecek yeni taşıyıcı sistemlere; özellikle nanoteknolojik ilaç taşıyıcılarına ivedilikle gereksinim vardır [156,163].

Glioblastoma tedavisinde sistemik kemoterapötiklerin klinik kullanımında, KBB geçirgenliği göz önüne alınarak tarihsel olarak yağda çözünebilen nitrozüreler, carmustin ve lomustinin ilk nesil sistemik alkilleyiciler olarak sınıflandırılmıştır. 1960'lar–1970'lerde yağda çözünebilen carmustin ve lomustin KBB'yi aşabildikleri için ilk tercih edilen ajanlar olmuş; 1980'ler–1990'larda prokarbazin, lomustin, vinkristin kombinasyonu özellikle oligodendroglial alt tiplerde kullanılmıştır[164,165]. 1999'da TMZ tekrarlayan anaplastik astrositom için onay almış, 2005'te radyoterapiyle eşzamanlı ve

adjuvan kullanımını içeren “Stupp protokolü” ile glioblastomada standart tedavinin parçası hâline gelmiştir [164,166]. Güncel uygulamada, nüks veya TMZ direnci gelişen olgularda lomustin başta olmak üzere nitrozüreler seçilmiş hastalarda hâlâ yer bulurken; KBB’yi geçebilen küçük, lipofilik moleküller ve oral uygulanabilirlik klinik seçimde belirleyici olmaya devam etmektedir.

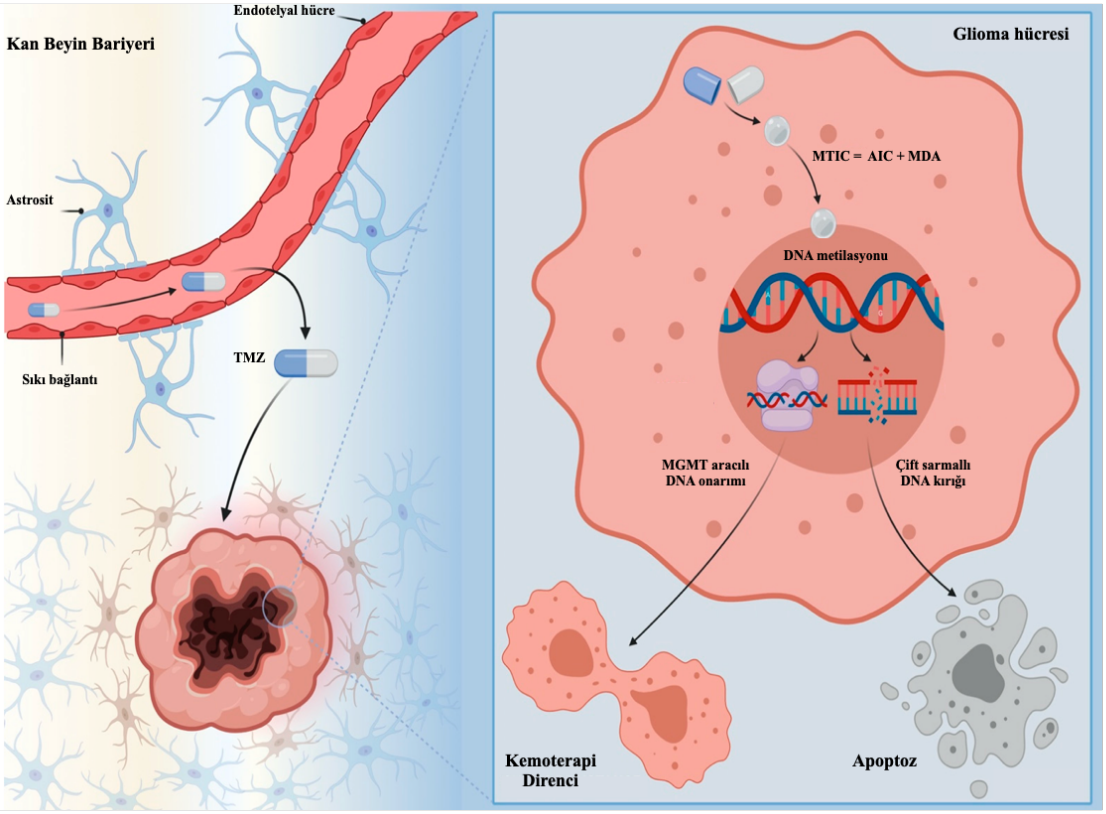
TMZ düşük molekül ağırlıklı, halkalı bir imidazotetrazin türevidir ve oral yoldan uygulanan bir alkilleyici ajan olarak glioblastoma gibi beyin tümörlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Kimyasal sınıflandırma açısından triazen grubu alkilleyiciler içinde yer almakta olup başlangıçta 1970’lerde geliştirilen mitozolomid molekülünden türetilmiştir. Mitozolomidin alkilleyici grubundaki 2-kloroetil biriminin metil ile ikame edilmesiyle, mitozolomide göre daha stabil ve sistemik uygulamaya uygun bir öncül tasarım üzerinden temozolomid 1987’de Stevens ve arkadaşları tarafından sentezlenmiştir [167,168]. 1999 yılında Avrupa İlaç Ajansı (EMA) Temodal için ruhsatlandırma onayı vermiş, aynı yıl FDA’de nüks/dirençli anaplastik astrositomlarda oral temozolomid için hızlandırılmış onay vermiştir. 2005 yılında yayımlanan faz III bir çalışma, radyoterapi ile eşzamanlı ve adjuvan TMZ kullanımının medyan genel sağkalımı 12.1 aydan 14.6 aya yükselttiğini göstermiştir (Stupp et al., 2005). Günümüzde de tedavi için hazırlanan güncel kılavuzlarda özellikle glioblastoma multiforme gibi agresif ve tedaviye dirençli yüksek dereceli gliomların sistemik tedavisinde birinci basamak kemoterapötik ajan olarak, monofonksiyonel alkilleyici TMZ önerilmektedir [164,166,169]. TMZ'nin terapötik etkinliği, DNA’ya metil grubu transferi ile hücre proliferasyonunun baskılanmasına dayanmaktadır [168]. Klinikte radyoterapi ile eşzamanlı ve ardından adjuvan olarak uygulanması sağkalımı anlamlı şekilde artırmıştır [166]. Oral uygulanabilirliği, KBB’yi aşabilmesi ve göreceli olarak öngörülebilir toksisite profili TMZ’yi benzer kemoterapiklere kıyasla avantajlı kılmaktadır. TMZ, sistemik dolaşıma girdikten sonra fizyolojik pH (~7.4) koşullarında enzimatik bir etki gerektirmeksizin molekülün halka yapısının açılması ile kendiliğinden parçalanarak aktif ara ürünü olan 5-(3-metiltriazen-1-yl)imidazol-4-karbosiamid (MTIC) bileşiğine dönüşmektedir [168]. MTIC’in kısa süreli kararsız yapısı, hızlıca 5-aminoimidazol-4-karboksiamid (AIC) ve metildiazonyum iyonunu (MDA) oluşturmaktadır (Şekil 2.12). Bu iyon, elektrofilik karakteri nedeniyle DNA zincirindeki bazı bölgelerle nükleofilik etkileşime girerek metilasyon reaksiyonlarına yol açmaktadır. Bu reaksiyonlar, DNA bazları üzerinde özellikle Guanin’in N7 pozisyonuna (~%70), Adenin’in N3 pozisyonuna (~%9) ve daha düşük oranla da olsa Guanin’in O6 pozisyonuna (~%6) metil grubu bağlanması şeklinde gerçekleştirmektedir [168]. Bu üç pozisyonda gerçekleşen modifikasyonlar arasında Guanin O6 pozisyonundaki metilasyonu, TMZ’nin terapötik etkisi açısından kritik önemdedir.



Şekil 2.12: TMZ'nin bozunma mekanizması.

DNA replikasyonu sırasında bu modifiye guanin bazları, karşı zincirde hatalı olarak timin ile eşleşir ve böylece genetik kodlama hataları oluşmaktadır. Bu tür yapısal uyumsuzluklar hücresel tamir sistemleri tarafından tanınmakta ve düzeltilmeye çalışılmaktadır. Ancak O6 pozisyonundaki metil grubunun çıkarılması, yalnızca özel bir onarım enzimi olan O6-metilguanin-DNA metiltransferaz (MGMT) tarafından mümkün olmaktadır. Temel olarak hücre MGMT vasıtasıyla onaracağı Guanin hasarını gideremememesi durumunda, hücre fonksiyon kaybına uğrayarak yaşlanma adımına girer veya programlı ölüm sürecine yönlenmektedir. Bu enzimin hücrede bulunmadığı ya da aktivitesinin baskılandığı durumlarda da hata kalıcı hale gelmektedir. Bu kalıcı hata zinciri dolayısıyla da hücre döngüsünde duraksamalar, DNA zincirinde kırıklar ve sonuç olarak hücrenin kontrolsüz çoğalmasının engellenmesi sağlanmaktadır (Şekil 2.13). TMZ'nin etkisi, tümör hücresinin MGMT aktivitesinin düşük olması ve DNA yanlış eşleşme onarım mekanizmalarının (Mismatch Repair, MMR) işlevsiz olması durumlarında en yüksektir [168,170].

TMZ'nin tedavisinin başarısı, O6-metilguanin (O6-MeG) oluşumunu izleyen MMR döngülerinin birikimli stres yaratması ve sonuçta hücre ölümüne yol açmasıyla ilişkilidir. Ancak klinikte çoğu olguda tümör ilerlemesi ve yeniden büyüme gözlenmektedir. Glioblastoma hastalarının büyük bölümünde nüksün, TMZ'ye karşı gelişen çoklu direnç mekanizmaları ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Başlıca etkenler arasında; MGMT aşırı ekspresyonu, MMR aksaklıkları ve çoklu ilaç direnci proteinlerinin (P-gp/MDR, MRP ailesi vb.) artmış ekspresyonu yer almaktadır [171].



Şekil 2.13: TMZ'nin KBB geçişi ve gliomalardaki etki mekanizmasının şematik gösterimi [172].

TMZ'nin plazma yarı ömrü fizyolojik pH'da kısadır (~1,8 saat) ve uygulamadan yaklaşık 8 saat sonra plazmadan büyük ölçüde temizlenmektedir [171,173]. Tümör dokusuna nüfuzun sınırlı olması ve KBB'yi geçen fraksiyonun (glioblastoma tedavisindeki diğer kemoterapiklere göre görece yüksek olsa da) tedavi için etkin doza göre düşük kalması ve etkin konsantrasyonları sürdürmenin güçlüğü dolayısıyla tedavilerde beklenen büyük etkiler sınırlı kalabilmektedir. Tümörde direnç mekanizması gelişmeden sağlanmak istenen ilerleme için yüksek doz gereksinimi doğabilmekte; ancak yüksek doz uygulamalarda kusma, yorgunluk, nötropeni, lenfopeni gibi yaygın yan etkilerin yanı sıra kardiyomiyopati, hepatotoksisite, oral ülserasyon ve hematolojik toksisite gibi etkilerle sonuçlanabilmektedir [171,173]. Doz sınırlayıcı etkiler ve MGMT mekanizmasının yarattığı direnç, terapötik kazanımı sınırlamakta; bu nedenle elde edilen marjinal tedavi faydası beklenenden daha düşük kalmaktadır.

TMZ, fizyolojik koşullar altında kendiliğinden hidrolize uğrayarak aktif metilleyici bileşik olan MTIC'yi oluşturan bir ön ilaç (prodrug) olarak değerlendirilmektedir. MTIC daha sonra parçalanarak metil diazonyum (MDA) salınımı ile; DNA üzerinde metilasyon hasarlarına neden olarak tümör hücrelerinde sitotoksik etki göstermektedir. TMZ kana geçtiğinde (pH ~7.4) yalnızca sınırlı bir kararlılık göstererek ve kısa sürede MTIC'ye dönüşmektedir. Literatürde TMZ'nin görece küçük

moleküler yapısı (194 Da) ve görece lipofilik olması dolayısıyla yüksek oral biyoyararlanım ile KBB'yi geçebilme özelliği ilişkilendirilmiştir. Hızla hidrolizlenen TMZ'nin beyne MTIC'ye dönüşmeden önce ulaşabilmesi kritik öneme sahiptir; çünkü yalnızca beyin dokusuna girdikten sonra MTIC'yi serbest bırakarak tümör DNA'sında metilasyon hasarları oluşturabilmektedir.

Literatürde glioblastoma, KBB geçiş mekanizmaları ve TMZ temelli yapılan çalışmalar ile MTIC'nin bağımsız olarak KBB'yi geçip geçmediğine dair çeşitli deneysel sonuçlar, tartışmalar ile çıkarımlar mevcuttur. Buna göre yapılan bir çalışmada TMZ'nin öncülü olan dakarbazinin (DTIC) KBB'yi geçemediği ve MTIC'yi karaciğer metabolizması yoluyla oluşturduğu bilinmekte olup, DTIC'nin klinikteki sınırlı etkinliğini aktif metabolit olan MTIC'in beyne zayıf dağılımı ile ilişkilendirmiştir [174,175]. Agarwala temozolomidin beyin ve beyin omurilik sıvısındaki düzeyinin plazma seviyelerinin %30–40'ına ulaştığı, ancak metabolit MTIC'nin merkezi sinir sistemine etkin biçimde nüfuz etmediğini raporlamıştır [176]. Aynı şekilde, sıçan ve rhesus maymunlarında yapılan farmakokinetik çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş; MTIC'nin kendisinin KBB'yi geçemediği, beyinde gözlenen metilasyon etkilerinin ise doğrudan TMZ'nin beyne geçip orada MTIC oluşturmasıyla ilişkili olduğu belirlenmiştir [177]. Yapılan diğer çalışmalarda da benzer açıklamalar ile [178], glioma hastalarının plazma ve beyin omurilik sıvısında sadece TMZ tespit edilmiş ve MTIC'ye ait herhangi bir iz bulunamamıştır [179–181].

2.6.2. Paklitaksel

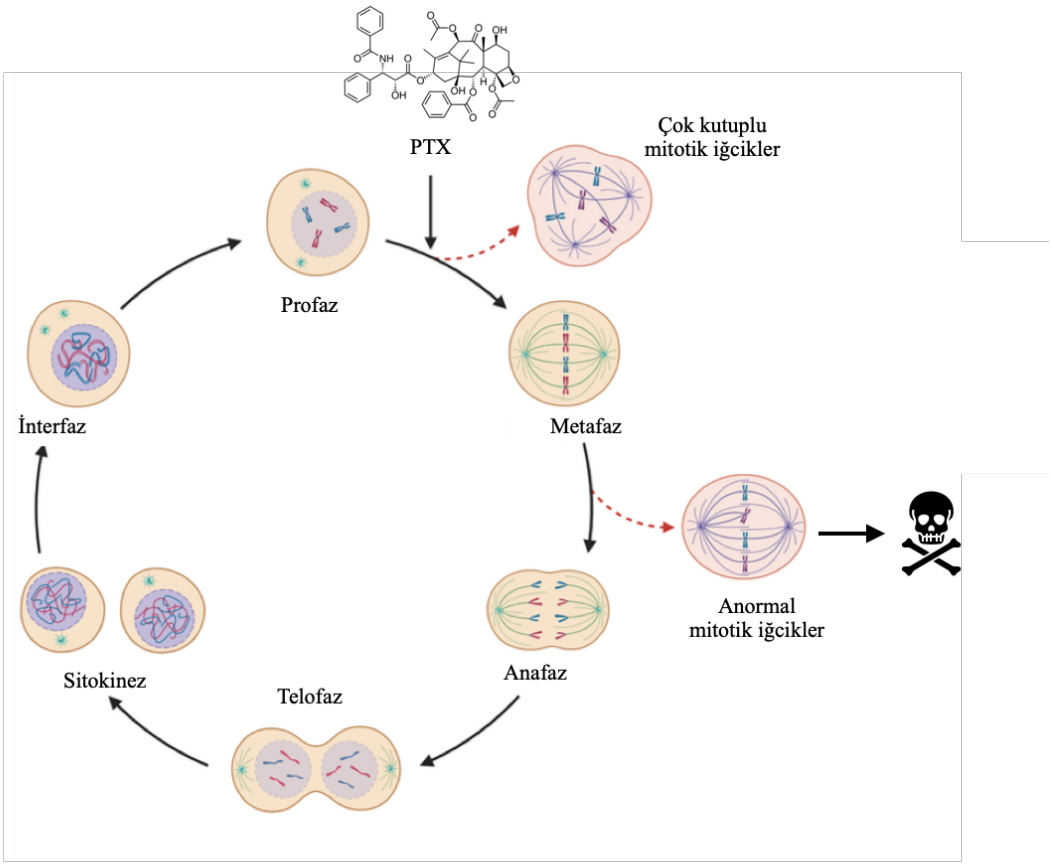
Paklitaksel (PTX), Pasifik porsuğu (*Taxus brevifolia*) kabuğundan izole edilen, tetrasiklik diterpen yapısında doğal bir antimitotik ajandır ve günümüzde klinik kullanımda en önemli taksan türevlerinden biridir. Molekül ilk olarak Wani ve arkadaşları tarafından 1971 yılında *T. brevifolia* kabuğundan izole edilmiş ve yapısı aydınlatılmıştır. Doğal kaynakta son derece düşük miktarlarda bulunması (kabukta yaklaşık %0.01–0.05) endüstriyel maliyet açısından önemli kısıtlar yaratmıştır. Artan klinik talep nedeniyle günümüzde PTX, 10-deasetilbakkatin III gibi öncüllerden yarı sentetik olarak ve bitki hücre kültürü ile endofitik mantar temelli alternatif platformlardan üretilmektedir [182–184].

Farmakolojik açıdan PTX, geniş spektrumlu antitümör aktiviteye sahip olup meme, yumurtalık, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, Kaposi sarkomu ve pankreas kanseri gibi birçok katı tümörün tedavisinde klinik uygulamada yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötiktir. İlk klinik çalışmalarda özellikle platin türevleriyle kombinasyon rejimlerinde yüksek yanıt oranları elde edilmiş; bunu takiben ileri evre yumurtalık ve metastatik meme kanserinde FDA onayları gelmiştir [185]. Buna rağmen, KBB'yi etkin biçimde geçememesi ve merkezi sinir sisteminde toksisite profilinin öngörülemezliği

nedeniyle klasik formülasyonu ile primer beyin tümörlerinde standart sistemik ajanlar arasına girememiştir [186,187]. Son yıllarda, PTX'in nano-taşıyıcılarla beyin dokusuna hedefli taşınmasına yönelik preklinik ve erken faz klinik çalışmalar, glioblastoma tedavisinde yeniden gündeme gelmesini sağlamıştır [187–191].

Kimyasal olarak PTX, siklik taksan çekirdeğine kovalent bağlı bir oksetan halkası ve C13 pozisyonunda yan zincir taşıyan, yüksek derecede lipofilik bir moleküldür. Suda pratik olarak çözünmemesi nedeniyle klasik intravenöz formülasyonunda polioksietilen hint yağı türevi ve etanol içeren bir çözelti sistemi ile kullanılır; ancak bu sistem, dozla ilişkili hipersensitivite reaksiyonları gibi ek sorunlar doğurmaktadır. PTX plazma proteinlerine güçlü biçimde bağlanır, yaygın doku dağılımı gösterir ve başlıca karaciğerde CYP2C8 ve CYP3A4 tarafından metabolize edilir; metabolitleri safra yoluyla atılmaktadır [182,184,185,192].

PTX antitümör etkisinin merkezinde, mikrotübül dinamiklerinin özgün biçimde modülasyonu yer almaktadır. Normal koşullarda mikrotübüller, α/β-tübülin heterodimerlerinin GTP bağımlı polimerizasyonu ve depolimerizasyonu ile "dinamik kararsızlık" gösterir; bu özellik mitotik iğcik oluşumu ve kromozom ayrılmasının doğru şekilde gerçekleşmesi için zorunludur [193]. PTX, β-tübülin üzerinde yer alan spesifik bağlanma bölgesine yüksek afiniteyle bağlanarak mikrotübül polimerlerini stabilize eder; depolimerizasyonu baskılar ve mikrotübüllerin yeniden normal örgütlenmesini engellemektedir [185,193]. Mitozun metafaz-anafaz geçişi için gerekli mikrotübül kısalması ve iğcik kinetiği bozularak; hücreler G2/M kontrol noktasında uzamış bir mitotik blok yaşamaktadır (Şekil 2.14). Mitotik iğ kontrol noktası uzun süre aktive kaldığında, siklin B1 ve siklin bağımlı kinaz 1 (CDK1) başta olmak üzere hücre döngüsü düzenleyicilerinin dengesiz aktivasyonu, kromozomal dengesizlik ve nihayetinde mitotik çöküş ile sonuçlanmaktadır [194].



Şekil 2.14: PTX'in etki mekanizmasının şematik gösterimi.

PTX'in merkezi sinir sistemi tümörlerinde sınırlı kullanımının en kritik nedenlerinden biri, KBB endotelinde yüksek düzeyde eksprese edilen P-gp ve diğer efluks taşıyıcıları tarafından etkin şekilde dışarı pompalanmasıdır. Fellner ve arkadaşları, hem in vitro KBB modellerinde hem de in vivo rat çalışmalarında PTX'in, P-gp substratı olduğunu ve taşıyıcının inhibisyonu durumunda beyin parankimindeki ilaca maruziyetin anlamlı derecede arttığını göstermişlerdir. Bu bulgu, tek başına sistemik PTX'in glioblastoma tedavisinde yetersiz kalmasının farmakokinetik temelini oluşturmakta; aynı zamanda P-gp inhibitörleri veya taşıyıcı sistemlerle kombine yaklaşımların rasyonelini desteklemektedir. Ancak sistemik P-gp inhibisyonu klinikte kabul edilebilir bir güvenlik profili sunmadığından, güncel araştırmalar daha çok KBB'yi aşabilen ve lokal olarak yüksek PTX konsantrasyonu sağlayan nano-taşıyıcı sistemlere odaklanmaktadır. Glioblastoma tedavisinde, PTX'in farmakolojik potansiyelinden yararlanmak amacıyla geliştirilen nano-taşıyıcı sistemler son yıllarda öne çıkmıştır. Rahman ve arkadaşları, glioblastoma için geliştirilen nanopartikül bazlı ilaç taşıyıcı sistemleri derledikleri çalışmalarında; özellikle lipit bazlı nanopartiküller, polimerik nanopartiküller, dendrimerler ve inorganik nano-taşıyıcıların, PTX gibi suda çözünmeyen ilaçların KBB'yi aşarak tümör dokusuna taşınmasında önemli avantajlar sunduğunu vurgulamaktadır. Nance ve arkadaşları,

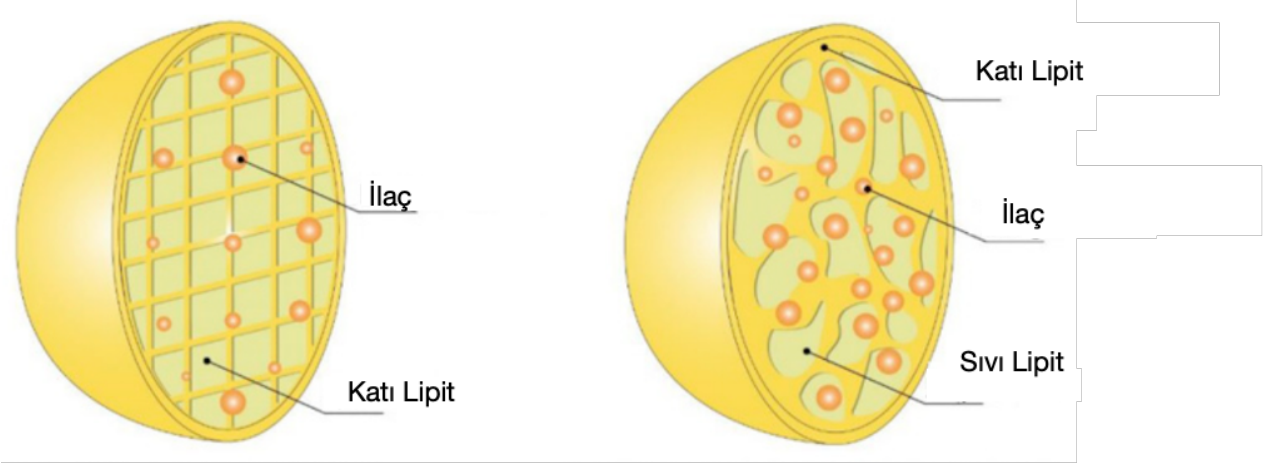
beyin doku matriksine daha iyi penetre olabilen ve PTX yüklü nanopartiküller geliştirmiş; bu sistemlerin glioma modellerinde konvansiyonel formülasyona kıyasla daha homojen dağılım ve anlamlı tümör küçülmesi sağladığını göstermiştir. AbdEl-Haq ve arkadaşları, PTX yüklü PLGA nanopartiküllerinin intranazal ve intravenöz yolla uygulanması sonucu hem beyin hem de periferik organlarda ölçülebilir ilaç birikimi elde edildiğini; toksisite profilinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Ullah ve arkadaşları, nazal yoldan uygulanan tümör-hedefli PTX yüklü nanopartiküllerin glioblastoma modellerinde antitümör etkinliği belirgin şekilde artırdığını ve intranazal taşınım stratejisinin umut verici olduğunu ortaya koymuştur [186–190]. Bu bulgular, PTX'in KBB engelini aşmak ve glioblastoma tedavisinde klinik olarak anlamlı bir rol üstlenmesini sağlamak için nano-taşıyıcı temelli yaklaşımların rasyonel bir strateji olduğunu göstermektedir.

2.7. NANO LİPİT TAŞIYICI

Nanoteknoloji ve nanotıp alanlarında son yıllarda kaydedilen hızlı ilerlemeler, klasik ilaç taşıyıcı platformların sınırlılıklarını aşabilecek yeni nesil sistemlerin geliştirilmesine zemin hazırlamıştır [195]. Bu bağlamda, polimer temelli nanotaşıyıcılar (polimerik nanokapsüller ve nanolifler vb.) ile lipit bazlı taşıyıcı yapılar (örneğin lipozomlar, niozomlar, katı lipit nanopartiküller ve nano yapılı lipit taşıyıcılar) çeşitli farmasötik problemlere yönelik yenilikçi çözümler olarak öne çıkmıştır [195]. Özellikle lipit nanopartiküller, 1990'lı yıllarda Katı Lipit Nanopartiküller (Solid Lipit Nanoparticles, SLN) ilk kez tasarlanmış; biyouyumlu ve biyobozunur yapıları sayesinde kısa sürede bilimsel çevrelerin dikkatini çekmiştir [195,196]. Söz konusu yapılar, emülsiyonlar ve polimerik taşıyıcılar gibi geleneksel sistemlere kıyasla daha üstün stabilite, kontrollü salım kapasitesi ve geliştirilmiş biyoyararlanım sağlamaları nedeniyle ilaç teknolojileri literatüründe güçlü bir alternatif olarak konumlanmıştır.

İlk nesil lipit nanopartiküller olan SLN'ler ilaç taşınım sistemi olarak Müller ve arkadaşları tarafından geliştirilmişlerdir [197–201]. SLN'ler su-içinde yağ nano emülsiyonlarının iç fazındaki lipit bölümünde, oda koşullarında katı formda lipidin bulunduğu yüzey aktif ile çevrelenmiş ortalama partikül boyutları 50–1000 nm olan partiküllerden oluşmaktadır. Çoğu sentez süreci için organik çözücü kullanımı gerektirmemesi, hidrolitik bozunmaya karşı kararlılık ve depolama sırasında stabilite gibi önemli avantajlar sunmaktadır [196]. SLN'ler tamamen katı lipitten oluşan, ilacı bu kristal yapı içerisinde barındıran sistemlerdir. Ancak katı lipitlerin yüksek düzenlilikte kristal kafes oluşturması, formülasyonda sınırlı ilaç yükleme kapasitesi, depolama sırasında ilacın matristen dışarı itilmesi (drug expulsion), partikül büyümesi ve jel oluşumu eğilimi gibi sorunlara yol açmaktadır [196,202,203].

Nano Lipit Taşıtıcılar (NLT), oda sıcaklığında katı halde bulunabilen bir katı lipit ile sıvı lipitin karışımından oluşan ve ortalama boyutu 10–500 nm civarında olan ikinci nesil SLN sistemleridir [195]. Bu yeni nesil nanopartiküller, sunduğu avantajlar ve uygulama seçenekleri sayesinde ilaç taşıma ve hedefleme alanında büyük ilgi görmüş ve geniş bir kullanım potansiyeline ulaşmıştır [196]. NLT'ler, katı ve sıvı lipitlerin bir karışımından oluşan ve kısmen kristalleşmiş bir çekirdeğe sahip nano ölçekli ilaç taşıyıcı sistemlerdir [204].



Şekil 2.15: Lipit bazlı nanopartikül taşıyıcı sistemlerin şematik gösterimi: (sol) yalnızca katı lipitten oluşan SLN yapısında ilacın kristalin katı lipit matrisi içerisinde sınırlı boşluklarda konumlanması; (sağ) katı–sıvı lipit karışımından oluşan NLT yapısında sıvı lipidin matrise düzensizlik kazandırarak ilacın lipit fazda daha fazla yüklenmesine olanak tanıması.

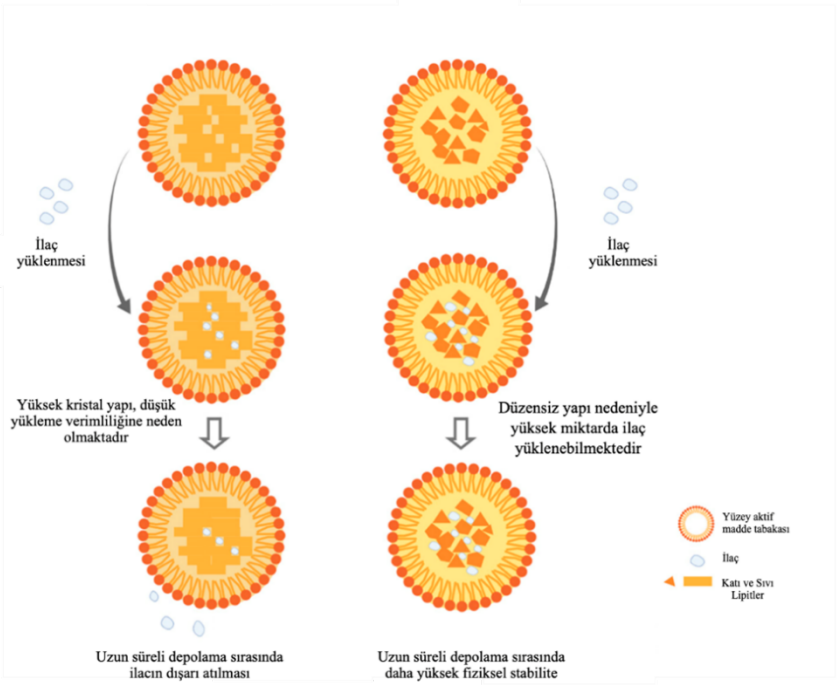
NLT sistemleri, SLN'lerle ilişkili birçok probleme çözüm sunarak daha yüksek ilaç yükleme kapasitesi, kararlı salım profili ve depolamada görece ilaç itiliminin engellenmesi gibi iyileştirmeler sağlamıştır (Şekil 2.15) [195,205]. Genellikle literatürde kullanılan NLT formülasyonlarında lipit fazın %70'ini katı, %30'unu sıvı lipit oluşturacak şekilde (katı:sıvı; 99.9:0.1 gibi ileri değerlere de sahip olabilmektedir) karışım oranları kullanılmaktadır [195,196]. Bu katı ve sıvı lipit kombinasyonu, oda sıcaklığında katı halde kalan düzensiz (amorf/kısmi amorf) bir matris meydana getirmektedir. Sıvı lipit katkısı dolayısıyla katı lipitlerin kristal yapısında "kasıtlı kusurlar" yaratarak ilacın yerleşebileceği boşlukları arttırıp [196], aynı oranlarda formüle edilmiş bir SLN'ye kıyasla çok daha yüksek ilaç tutma kapasitesi ve enkapsülasyon verimi sergilemektedir. Ayrıca genel olarak NLT'ler, Generally Recognized As Safe (GRAS) statüsünde kabul edilen biyouyumlu ve biyobozunur lipitlerden üretildikleri için toksikolojik açıdan daha güvenli profiller sergilemekte; lipit bileşenlerin biyouyumlu ve biyobozunur olması nedeniyle de geleneksel nanopartiküllere kıyasla daha düşük toksisite ve immünojenisite avantajları ile nanopartiküllere kıyasla vücutta daha iyi tolere edilebilmektedirler [195,197,204]. Dolayısıyla bu durum in vivo uygulamalarda düşük sitotoksisite ve uzun dönem biyouyumluluk açısından NLT sistemlerini avantajlı kılmaktadır [196]. NLT'lerin etken malzemenin

oksidasyon ve enzimatik bozunmasını engelleyerek etken maddeyi koruduğu ve böylece ilacın biyoyararlanımını artırdığı çok sayıda çalışmada gösterilmiştir [206,207]. NLT'lerin bir diğer önemli avantajı, formülasyon ve ölçeklendirme kolaylığıdır. Yüksek basınçlı homojenizasyon ve mikroemülsiyon gibi yöntemlerle büyük ölçekli üretimleri nispeten kolay olup endüstriyel üretime uygunluk göstermektedir [195]. Nitekim SLN/NLT sistemlerinin geniş ölçekli üretim potansiyeli, bu sistemlerin en baştan beri endüstri tarafından ilgi görmesinin başlıca nedenlerindendir. Kolay ölçeklenebilirlik, yeni bir ilaç taşıyıcı sistemin klinik ve ticari başarıya ulaşması için kritik bir faktördür ve NLT'ler bu konuda diğer pek çok nanotaşıyıcı sisteme kıyasla üstün durumdadır. Lipit nanopartikül sistemleri, ilacı sadece taşımakla kalmayıp salım profilini kontrol etme olanağı da sunmaktadır. NLT formülasyonları uygun şekilde tasarlandığında, ilacın kontrollü salımı ile uzun süreli etki ve dengeli plazma düzeyleri sağlanabilmektedir [195]. Örneğin, NLT'ler içine yüklenen etken maddenin matriks içerisindeki difüzyonu ve dış ortama salımı, kullanılan lipitlerin erime noktası ve matristeki dağılımına göre ayarlanabilmektedir. Bu durum özellikle kronik hastalıkların tedavisinde istenen, ilacın sürekli ve kontrollü salınması hedefine katkı sunmaktadır. Bunun yanında, NLT'lerin raf ömrü ve kimyasal stabilitesi de yüksektir. İçerdikleri katı lipit matriks, ilacı dış etkenlerden (ışık, oksijen, nem gibi) koruyarak formülasyonun bozulmadan uzun süre depolanabilmesine imkan tanımaktadır [196]. Bu konuda yapılan literatür çalışmaları incelendiğinde NLT sistemlerinin raf ömrü boyunca ilacın etkinliğini büyük oranda koruyabildiğini, ilacın bozunma veya etkinlik kaybı yaşamadığını göstermektedir [196]. Tablo 2.1'de verilen SLN ve NLT'lere ait özellikleri içeren tablodan da görülebileceği üzere NLT'ler yapılarına kısmen sıvı lipit fazı dahil ederek SLN'lerin dezavantajlarını büyük ölçüde aşmayı başarmıştır (Şekil 2.16). Bu sayede yüksek doymamışlık veya lipofiliklik nedeniyle suda çözünürlüğü zayıf olan pek çok ilaç molekülü de NLT sistemlerinde başarılı biçimde taşınabilmektedir [204]. NLT'ler hem terapötik performans kriterleri bakımından hem de büyük ölçekli üretimler ve formülasyon geliştirme çalışmaları ile yakın gelecekte son derece değerli taşıyıcı sistemlerden olmaya adaydır.

Tablo 2.1: SLN ve NLT'lerin özelliklerinin karşılaştırılması.

Özellik	SLN (Birinci nesil)	NLT (İkinci nesil)
Lipit matrisi	Tamamen katı lipit	Katı + sıvı lipit karışımı
Kristal yapısı	Düzenli, yüksek kristallik	Düzensiz, kusurlu veya amorf
İlaç yükleme kapasitesi	Düşük – sınırlı boşluk	Yüksek – artmış boşluk
İlaç dışa atılımı (depolama sırasında)	Yüksek olasılık	Düşük olasılık
Stabilite (kararlılık)	Görece düşük (jel oluşumu vb.)	Daha yüksek (daha az kristalizasyon)

İlaç moleküllerinin emilim ve çözünürlük özelliklerini değerlendirmek amacıyla geliştirilen Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemi (BCS), etkin maddeleri sulu çözünürlükleri ve intestinal membran geçirgenlikleri temelinde dört sınıfa ayırır [208].



Şekil 2.16: SLN ve NLT'lerin yapısal farklılıkları sonucu ilaç yüklenme ve depolama özelliklerinin şematik gösterimi [195].

Tablo 2.2: Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre etken maddelerin sınıflandırılması.

BCS Sınıfı	Suda Çözünürlük	Geçirgenlik	Tipik Özellikler / Örnekler
Sınıf I	Yüksek	Yüksek	Emilimleri genellikle hızlı ve tamdır; formülasyona bağlı kısıtlar minimumdur.
Sınıf II	Düşük	Yüksek	Emilim hızını çözünme (dissolüsyon) adımı sınırlar; çözünürlüğü artırmaya yönelik formülasyonlar ön plana çıkmaktadır.
Sınıf III	Yüksek	Düşük	Emilim oranı geçişkenlikle sınırlıdır; geçirgenlik arttırıcı stratejiler ön plana çıkmaktadır.
Sınıf IV	Düşük	Düşük	Biyoyararlanımları genellikle düşüktür; hem çözünürlük hem de geçirgenlik sorunları mevcuttur.

Bu sınıflandırmaya göre Sınıf I ilaçlar yüksek çözünürlük ve yüksek geçirgenliğe sahip olduklarından genellikle oral uygulamada emilim sorunu yaşamamaktadırlar. Buna karşılık, Sınıf II ilaçlarda düşük çözünürlük çözünme hızına bağlı emilim kısıtına yol açarken; Sınıf III ilaçlar yüksek çözünürlük ancak düşük geçirgenlik nedeniyle membran geçişinde sınırlılık göstermektedir. Sınıf IV ilaçlar ise hem çözünürlük hem de geçirgenlik bakımından yetersiz özelliklere sahip olduklarından biyoyararlanımları genellikle düşüktür [208]. Tablo 2.2'de verilen Biyofarmasötik Sınıflandırma Sistemine göre en sık karşılaşılan problem Sınıf II (düşük çözünürlük/yüksek geçirgenlik) ve Sınıf IV (düşük çözünürlük/düşük geçirgenlik) olarak sınıflandırılan etken maddelerin çözünürlük ve emilim güçlükleridir [204]. Nanoyapılı lipit taşıyıcılar, bu tür ilaçların farmasötik etkinlik ve güvenlik profillerini iyileştirmede öne çıkmaktadır. Özellikle gastrointestinal sıvılarda çözünmekte zorlanan ve bu nedenle yüksek dozlarda uygulanmak zorunda kalan lipofilik ilaçların, NLT sistemleri içerisinde enkapsüle edilmesi çözünürlüğü ve kararlılığı artırmaktadır. Böylece daha düşük dozlarla benzer terapötik etkinin sağlanmasına ve hedef dokulara ulaşan efektif ilaç miktarının artmasına imkân vermektedir [197,204,206].

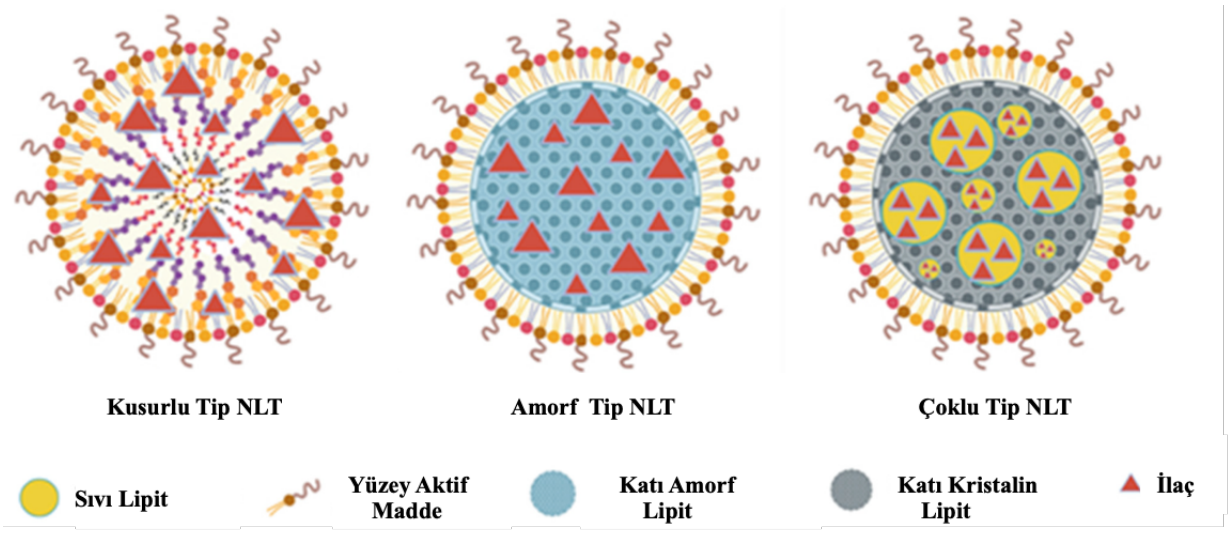
2.7.1. Yapılarına göre Nano Lipit Taşıyıcılar

NLT sentezinde formülasyonda kullanılan katı ve sıvı lipitlerin türü ile oranlarındaki farklılıklar, NLT'lerin yapısal özelliklerini ve ilaç salım davranışlarını önemli ölçüde etkilemektedir. Bu doğrultuda, NLT sistemleri içerdiği lipit fazlarının düzenine ve fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak Kusurlu NLT**,** Amorf NLT ve Multiple NLT olarak üç alt tipe ayrılmaktadır. Her alt tip, ilacın türüne ve matristeki dağılım biçimine göre değerlendirilip, hedeflenen salım profili ve yükleme kapasitesinin optimize edilmesini amaçlamaktadır [209].

- **Kusurlu NLT (Kusurlu Kristal Yapı):** Bu tür NLT, farklı uzunluk ve doygunlukta yağ asitleri içeren çeşitli gliserit türlerinde olduğu gibi, yapısal açıdan birbirinden farklı lipitlerin karıştırılmasıyla elde edilir. Katı lipit içerisine bir miktar sıvı yağ eklenmesiyle oluşan heterojen yapı, kristal örgüde çok sayıda kusur meydana getirerek matris içinde ilacın yerleşebileceği boşlukları arttırmaktadır [209]. Kusurlu tip NLT'lerde kristal yapı mükemmel değildir. Bu sayede ilacın matrise yüklenme kapasitesi yükselir ve depolama süresince ilacın dışarı itilmesi büyük ölçüde engellenmektedir [204]. Ayrıca yapılan son çalışmalar, kusurlu tip NLT'lerin özellikle hidrofobik antikanser ilaçların enkapsülasyon verimini artırmada etkili olduğunu ve salım profillerinde daha öngörülebilir sonuçlar sağladığını göstermektedir [210].
- **Amorf NLT (Amorf Yapı):** Bu grupta yer alan NLT'ler, katı lipit ile birlikte özel amorf edici lipitler kullanılarak tamamen amorf yapılı bir matris elde edilmektedir. Katılaşınca kristalize olmayan mum yapıdaki lipitler kullanıldığında, normalde katılaşma sonrası oluşacak kristal düzenin yerine amorf bir yapı oluşmasını sağlamaktadır. Lipit matris katı halde olmakla birlikte kristal formda değildir; dolayısıyla depolama sırasında meydana gelebilecek β-polimorf dönüşümleri engellenerek ilacın yapıyı terk etmesi önlenmektedir [209]. Amorf tip NLT'lerde ilaç itimi sorunu minimal olup kararlılık yüksektir. Ancak kullanılan özel lipitler nedeniyle her etken madde için kullanılırlığı sınırlı olup kullanılabilir etken malzemeler için de formülasyon optimizasyonları gerekmektedir. Ek olarak, amorf tip NLT'lerin biyomoleküller (örn. siRNA ve peptitler) için koruyucu bir ortam sağlayarak biyolojik aktivitenin korunmasına katkı sunduğu rapor edilmiştir [211].
- **Multiple NLT (Çoklu Model, O/F/W Tipi):** "Oil-in-fat-in-water" (O/F/W) olarak da adlandırılan bu modelde, yüksek oranda sıvı yağ içeren bir karışım kullanılmaktadır [209]. Üretim esnasında eritilmiş halde karıştırılıp hızla soğutulan katı+sıvı lipit karışımında, bazı durumlarda lipit fazlar tam olarak tekdüze bir matrise dönüşmez ve matris içinde nanometre boyutlarında küçük yağ damlacıkları hapsolmaktadır [204]. Bu multiple yapıda (çok fazlı NLT), ilacın özellikle sıvı yağ fazında çözünürlüğü yüksekse, bu nanogözenek içindeki yağ

damlacıklarında çözünen ilaç miktarı artmaktadır. Katı matris içinde dağılmış sayısız mini yağ cepleri ilacı tutarken, çevreleri katı lipit ile sarılı olduğundan ilacın difüzyonu yavaşlayarak salım hızı uzamaktadır [209]. Multiple tip NLT'ler özellikle yağa eğilimi yüksek (lipofilik) etken maddelerin yüklenmesinde tercih edilmekte ve uzun süreli salım için avantaj sağlamaktadır. Yapılan çalışmalara göre, multiple tip NLT'lerin özellikle uzun süreli antibiyotik salımı ve kronik hastalıkların tedavisinde terapötik konsantrasyonların sürdürülmesine olanak tanıdığını ortaya koymaktadır [212].

Yapısal açıdan NLT'ler, içerdiği lipitlerin türü ve oranlarına bağlı olarak üç ana alt tipe ayrılmaktadır (Şekil 2.17): kusurlu tip (Tip I), multiple tip (Tip II) ve amorfu tip (Tip III) NLT. Kusurlu tip NLT'lerde farklı yapıda lipitlerin karıştırılmasıyla kristal örgüde boşluklar (kusurlar) oluşturulur; multiple tip NLT'lerde yüksek oranda sıvı lipit fazı nedeniyle katı matris içinde nanoskobik yağ cepleri meydana gelir; amorf tip NLT'lerde ise özel lipit kombinasyonlarıyla matrisin kristalize olması tamamen engellenerek ilaç dışlanmasının önüne geçilir [196]. Bu farklı alt tipler, ilacın matriste dağılım biçimine göre tasarlanmakta olup istenen salım hızını ve yükleme kapasitesini optimize etmek amacıyla geliştirilmiştir.



Şekil 2.17: NLT'lerde matriks yapısına göre üç temel yapı tipi (kusurlu, amorf ve çoklu tip) ve ilacın lipit çekirdek içindeki olası dağılımının şematik gösterimi [213].

2.8. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN SENTEZİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT'ler), katı ve sıvı lipitlerin bir arada kullanıldığı ikinci nesil lipit nanopartiküller olup özellikle ilaç taşıma kapasitesi, kararlılık ve kontrollü salım gibi avantajlarıyla dikkat çekmektedir [214,215]. NLT'lerin etkili bir şekilde formüle edilebilmesi için

uygun üretim yönteminin seçimi kritik önemdedir. Literatürde NLT hazırlama teknikleri genellikle yüksek enerji gerektiren yöntemler, düşük enerji gerektiren yöntemler ve organik çözücü kullanılan yöntemler olarak üç ana kategoriye ayrılmaktadır [195,216]. Her bir yöntem, sentez süreçlerinde uygulanan enerji türü ve düzeyi ile solvent kullanımına göre farklılık göstermekle birlikte ve kullanılacak yöntemin seçimi, taşınacak etken maddenin özelliklerine ve elde edilmek istenen nanopartikül özelliklerine bağlıdır (Tablo 2.3) [215–217].

2.8.1. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Yüksek Enerjili Üretim Yöntemleri

Yüksek enerjili yöntemler, NLT üretiminde oluşturulan çözeltinin parçalanması veya nanometrik boyuta elde edilmesi için harici mekanik enerji uygulanan teknikleri kapsamaktadır. Yüksek Enerjili Üretim Yöntemleri içinde en yaygın kullanılan yöntemler yüksek basınçlı homojenizasyon ile yüksek kesme homojenizasyonu/ultrasonikasyon yöntemleridir [214,216,217]. Genellikle endüstriyel ölçekte de uygulanabilirlikleri ve kısa sürede stabil nanosüspansiyonlar eldesine olanak tanımaları nedeniyle tercih edilmektedirler [214–216]. Ancak yüksek sıcaklık, basınç veya şiddetli kesme kuvvetleri gerektirdiklerinden, ısıya duyarlı etken maddelerin bozulması gibi dezavantajlı durumlarda dikkat edilmesi gerekmektedir [217,218].

2.8.1.1. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon

Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH), katı ve sıvı lipitlerin karışımına yüksek basınç altında yoğun bir makaslama kuvveti uygulayarak nanopartiküller oluşturan güvenilir ve yaygın bir tekniktir [214–216]. Yüksek Basınçlı Homojenizasyon sıcak (sıcak HPH) veya soğuk (soğuk HPH) olarak uygulanabilmektedir. Ancak tercih edilecek protokol, taşınacak ilacın ısıya duyarlılığına bağlıdır [214,216]. Sıcak HPH sürecinde katı lipit önce erime noktasının üzerinde bir sıcaklıkta eritilir ve etken madde ile birlikte sıvı lipit de eklenerek homojen bir lipit eriyiği hazırlanmaktadır. Bu eriyik, aynı sıcaklığa ısıtılmış yüzey aktif madde (emülgatör) çözeltisi ile karıştırılarak ön-emülsiyon elde edilir. Ardından karışım, yüksek basınçlı homojenizatörden (genellikle ~500 bar) geçiş yapacak şekilde geçirilerek nanoemülsiyon oluşturulur. Son aşamada oda sıcaklığında soğutularak lipit damlacıklarının katılaşmasıyla NLT partikülleri elde edilmektedir [204,215,219]. Soğuk HPH ise ısıya duyarlı veya hidrofilik ilaçlar için geliştirilmiştir. Burada ilaçlı lipit eriyiği hızla dondurulur (sıvı azot vb.) ve elde edilen katı kütle öğütülerek mikropartiküllere dönüştürülür. Sonrasında bu partiküller soğuk bir yüzey aktif çözelti içinde süspanse edilip tekrar yüksek basınç altında homojenize edilerek NLT'lerin sentezi sağlanmaktadır [196,220,221].

HPH yönteminin önemli avantajları, çözücü kullanılmaması ve kolay ölçek büyütülebilmesidir; farmasötik endüstride halihazırda mevcut yüksek basınçlı homojenizatör ekipmanları sayesinde büyük ölçekli üretime uygundur [216]. Ayrıca, yüksek sıcaklıkların lipit viskozitesini düşürmesiyle daha küçük partikül boyutlarına ulaşılması mümkündür. Nitekim bu sentez yöntemi ile dar bir boyut dağılımına sahip (düşük PDI değeri) stabil nano süspansiyonlar üretilebilmektedir [205,222]. Sıcak işlem sırasında bazı etken maddelerin sulu faza geçme riski de mevcut olup, etken madde yükleme kapasitesinin düşmesi meydana gelebilmektedir [214,216]. Çok sayıda homojenizasyon döngüsü veya çok yüksek basınç uygulanması ise parçacıklar arasında çarpışmaları artırarak istenmeyen yeniden birleşmeler (koagülasyon) sonucu boyut artışına neden olabilmektedir [222]. Soğuk HPH ile sistem üzerindeki termal yük azaltılsa da bu yöntemde elde edilen partikül boyutları genelde daha büyük olup ve sentez süreçleri daha fazla adım içermektedir. Yine de, soğuk protokol sayesinde lipit matrisinden sulu ortama ilaç sızması en aza indirilerek hidrofobik ilaçların yüklenmesinin yanı sıra hidrofilik ilaçlar da görece verimli biçimde yüklenebilmektedir [196,215].

2.8.1.2. Homojenizasyon ve Ultrasonikasyon

NLT sentezinde kullanılan yüksek enerjili üretim yöntemlerinden bir diğeri, yüksek kesme hızları ile gerçekleştirilen homojenizasyon ve ultrasonik enerji kullanılarak uygulanan yöntemdir. NLT üretiminde bu yöntem görece daha basit ekipmanla çalışmayı sağlamaktadır [205,214,216]. Sentez süreçlerinde çeşitli oranlarda katı ve sıvı lipit, katı lipidin erime sıcaklığının 5–10°C kadar üstünde bir sıcaklığa getirilerek eritilir ve etken maddeyle karıştırılmaktadır. Etken madde-lipit eriyiğinin üzerine aynı sıcaklığa kadar ısıtılmış yüzey aktif madde çözeltisi eklenerek homojenizatör ile ön-emülsiyon hazırlanmaktadır. Bu yöntemde genel olarak, karışım önce klasik bir homojenizatör ile yüksek devirde karıştırılarak öncü bir emülsiyon oluşturulur, ardından bu emülsiyon bir ultrasonik prob ile işlenerek damlacık boyutları nanoboyutlu forma dönüşmektedir ve son olarak karışımın oda sıcaklığına soğutulmasıyla lipit partikülleri katılaşarak NLT süspansiyonu elde edilmektedir. Homojenizasyon/ultrasonikasyon yöntemi, HPH'ye kıyasla daha kısa işlem süresi ve daha basit ekipmana ihtiyaç duyduğu için laboratuvar ölçekli çalışmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca herhangi bir organik çözücü kullanılmadığı için çözücü kalıntısı riski bulunmaması önemli bir avantajıdır [205,215,222,223].

Bu tekniğin verimliliği uygulanan güç ve süreye bağlıdır. Daha yüksek ultrasonik güç ve daha uzun sonikasyon süreleri genellikle daha küçük parçacık boyutları sağlamaktadır [224]. Bununla birlikte, ultrasonik prob kullanımı formülasyonda metal mikropartikül kontaminasyonuna yol açabilmekte, ayrıca yüksek enerjiye maruz kalan nanoemülsiyonlar depolama sırasında yeniden

birleşme eğilimi göstererek uzun vadede kararlılık sorunları yaratabilmektedir [223]. Ultrasonikasyonla üretilen NLT'lerin bazı çalışmalarında depolama süresince parçacıkların aglomere olma eğilimi ve daha düşük stabilite gösterdiği raporlanmıştır [205]. Ayrıca ultrasonik işlem sırasında oluşan ısı, formülasyondaki ısıya karşı duyarlı bileşenleri olumsuz etkilediği durumlarda proses parametrelerinin optimizasyonu gerekmektedir [215,223]. Uygun koşullar altında, ultrasonikasyon yöntemi ile farklı polariteye sahip (hem hidrofilik hem hidrofobik) etken maddeler için başarılı NLT formülasyonları elde edilebilmektedir [214,216,224,225].

2.8.2. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Düşük Enerjili Üretim Yöntemleri

Düşük enerjili yöntemler, nanopartikül oluşturmak için harici mekanik güç yerine sistemin termodinamik veya kimyasal özelliklerinden yararlanan sentez yöntemleridir [218,226]. Bu yöntemlerde genellikle lipit fazın uygun koşullarda kendi kendine nano damlacıklar oluşturması sağlanır ya da kimyasal reaksiyonlarla çöktürme yapılmaktadır [215,216]. Mikroemülsiyon oluşturma, faz çevrilme (inversiyon) ve kimyasal koaservasyon gibi yaklaşımlar düşük enerjili üretim yöntemleri sınıfındadır [205,214]. Ayrıca W/O/W çift emülsiyon gibi ara basamaklı yöntemler de bu grupta değerlendirilebilmektedir [196,222]. Düşük enerjili proseslerin avantajı, yüksek sıcaklık veya basınç gerektirmemeleri dolayısıyla basit ekipmanla gerçekleştirilebilmeleri ve ısıya duyarlı maddelere daha uygun olmalarıdır [223]. Bununla birlikte, bazı tekniklerde yüksek oranda yüzey aktif madde kullanım ihtiyacı veya işlem sonunda seyreltik süspansiyon elde edilmesi gibi sınırlamalar bulunmaktadır [224].

2.8.2.1. Mikroemülsiyon ile NLT Üretimi

Mikroemülsiyon yöntemi ile NLT üretimine göre, uygun bileşen oranlarında kendiliğinden oluşan termodinamik olarak kararlı bir nano-boyutlu emülsiyon fazının, ani soğutma ile katı nanopartiküllere dönüştürülmesi esasına dayanmaktadır [214,226]. İlk adımda katı lipit, erime noktasının hemen üzerinde bir sıcaklıkta eritilerek içerisine sıvı lipit ve etken madde eklenmektedir. Ayrı bir çözelti kabında, su fazı uygun yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktiflerle birlikte aynı sıcaklığa kadar ısıtılmaktadır. Sıcak lipit faz, sıcak yüzey aktif madde çözeltisi karıştırılarak şeffaf bir mikroemülsiyon elde edilmektedir [215,216]. Bu yapı, o/w tipinde tek fazlı bir nano-emülsiyon olup yüksek derişimde yüzey aktif içerdiğinden görece kararlı haldedir. Ardından mikroemülsiyon karışımı hızlıca soğuk saf suya hızlı bir şekilde seyreltilerek lipit damlacıklarının hızla katılaşması sağlanarak NLT partiküllerinin oluşumu tetiklenmektedir [205].

Mikroemülsiyon yönteminin avantajı, proses basitliği ve sıcaklığa hassas maddelere uygunluğudur. Zira yüksek bir dış enerji girdisi olmaksızın, sadece sıcaklık farkı kullanarak

nanopartiküller oluşturulmaktadır [222]. Bununla birlikte, önemli bir dezavantaj olarak stabil bir mikroemülsiyon elde etmek için genellikle yüksek oranda yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif kullanılması gerekir ki bu, biyouyumluluk ve toksisite açısından istenmeyen bir durum yaratabilmektedir. Ayrıca mikroemülsiyonun soğuk su ile seyreltilmesi sonrasında sistem büyük hacimde su barındıran seyreltik bir süspansiyon elde edilmektedir. Bu durumda pratik uygulamalarda etken maddenin düşük derişimde olması dolayısıyla ultrafiltrasyon veya liyofilizasyon gibi ek adımlar gerektirebilmektedir. Mikroemülsiyon oluşumu için gereken belirli bileşen oranlarının hassasiyeti de yöntem açısından bir başka olumsuz durum yaratmaktadır. İstenen faz ancak uygun oranda lipit, su, yüzey aktif madde ve kosurfaktant bir araya geldiğinde oluşturulabilmektedir [219,220].

2.8.2.2. Faz Değişim Sıcaklığı Yöntemi

Faz değişim sıcaklığı tekniği (PIT), noniyonik emülsifiyanların belirli bir sıcaklıkta faz tercihini değiştirmesi prensibine dayanmaktadır [227]. Bu yöntemde yüzey aktif maddelerin hidrofilik-lipofilik dengesi (HLB) değerinin sıcaklıkla değişmesi kullanılarak, sistemde o/w türü emülsiyonun w/o türüne dönüşmesi sağlanmaktadır. Uygun oranlarda katı ve sıvı lipitler, yüzey aktif madde ve su karıştırılarak oda sıcaklığından başlayıp hedef sıcaklığa kadar ısıtılmaktadır. Bu ısıtma sırasında noniyonik yüzey aktiflerin hidrofilik kısımları kademeli olarak dehidrasyona uğramaktadır. HLB değeri sıcaklık arttıkça düşerek ve yüzey aktif molekülün yağ fazına ilgisini artması sağlanmaktadır. Faz değişim sıcaklığı noktasında yüzey aktif, su ve yağ fazına eşit oranda ilgi duyar hale gelmektedir. Bu kritik sıcaklığın üzerine çıkıldığında sistem w/o (su-yağ) emülsiyona dönüşür; tersine, sıcaklık faz değişim sıcaklığı altına düşürüldüğünde tekrar o/w emülsiyon oluşmaktadır. Uygulamada, karışım çoklu kez ısıtma-soğutma döngüsüne tabi tutulduktan sonra karışım hızlıca soğuk su ile seyreltilmektedir. Bu ani soğutma ve seyreltilme, sistemde geri dönüşümsüz bir şok etkisi yaratarak emülsiyon fazının kalıcı olarak o/w tipine çevrilmesini ve neticede NLT partiküllerinin oluşmasını sağlamaktadır. Yöntemin dezavantajları, parametrelerinin optimizasyonunun zaman alıcı olması ve özellikle içerdiği çoklu ısıtma/soğutma adımlarının bazı bileşenlerin yapısına etki edebilmesidir. Sentez yöntemi uygun şartlarda uygulandığında faz çevrim tekniği ile oldukça düşük PDI'lı parçacıklar elde edilebilmektedir [205,215,227–229].

2.8.2.3. Membran Kontaktör Yöntemi

Membran kontaktör tekniği, eritilmiş lipit fazın porlu bir membran aracılığıyla disperse edilmesi ilkesine dayanan NLT üretim tekniğidir. Bu yöntemde lipit faz kontrollü bir basınç altında, erime sıcaklığının biraz üzerindeki bir sıcaklıkta tutulur ve silindirik bir modül içindeki mikro/nano gözenekli membranın bir yüzeyine iletilmektedir. Eriyik halindeki lipit, membran gözeneklerinden

geçerken ufak damlacıklar şeklinde parçalanır; aynı anda membran modülünün iç kanalından dolaştırılan sulu faz (yüzey aktif madde içeren) bu damlacıkları gözenek çıkışlarından süpürerek sistem akışıyla birlikte membranı terk ederek soğutulmaktadır. Soğuma ile birlikte lipit nanoparçacıkları katılaşarak NLT'ler meydana getirmektedir.

Membran kontaktör yönteminin en önemli avantajı, parçacık boyutunun membran gözenek çapına ve akış koşullarına göre ayarlanabilmesidir. Böylece istenen boyutta NLT'ler üretmek mümkün olmaktadır. Ayrıca işlem sürekli akış altında gerçekleştiği için ölçek büyütme kontrol olabilmektedir. Bu teknikle partikül boyutunu etkileyen başlıca parametreler, lipit ve su fazının sıcaklığı, membran gözeneğinin çapı, lipit fazına uygulanan basınç ve sulu fazın akış hızıdır. Bu değişkenler kontrol edilerek süreç sonunda oldukça dar dağılımlı partiküller elde edilebilmektedir. Öte yandan, membranlı sistemlerde görülebilen en önemli sorun, gözeneklerin tıkanması problemidir. Yüksek lipit derişimleri veya uyumsuz formülasyonlar membran üzerinde birikime yol açarak akışı engelleyebilmektedir. Bu nedenle uzun süreli veya büyük hacimli üretimde membranın periyodik temizliği ve uygun operasyonel koşulların sürdürülmesi gerekmektedir [218,230].

2.8.2.4. Koaservasyon Yöntemi

Koaservasyon tekniği, çözünmeyen nano lipit partiküllerinin kimyasal bir reaksiyon yoluyla çöktürülmesi esasına dayanan, çözücüsüz NLT üretim yöntemlerinden biridir. Bu yöntem, özellikle ısıya duyarlı etken maddelerin enkapsülasyonu için uygun bulunmakta ve zararlı organik çözücülerin veya yüksek maliyetli ekipmanların kullanılmasını gerektirmemektedir. Süreç genellikle, yağ asidi sodyum tuzu içeren misellar bir çözeltinin kontrollü biçimde asitleştirilmesi prensibine dayandırılmaktadır. Uygulamada, yağ asidi sodyum tuzu içeren çözeltiler uygun bir polimerik stabilize edici ajan eşliğinde hazırlanmakta ve karışıma asitleştirme solüsyonu (koaservasyon çözeltisi) yavaşça ilave edilmektedir. Ortamın pH değerinin düşürülmesiyle birlikte, başlangıçta çözünmüş halde bulunan yağ asidi tuzları protonlanarak yağ asidine dönüştürülmekte, böylece lipit faz çözeltiden ayrılarak mikroskobik koaservat damlacıkları şeklinde çökmektedir. Bu işlem sırasında karışımın sürekli karıştırılması, çöken lipitlerin agregasyon eğilimi göstermeden ayrı partiküller halinde kalmasını sağlamaktadır. Sürecin son aşamasında karışım, soğuk su banyosunda soğutularak tam katı nanolipit partiküllerinin oluşumu tamamlanmaktadır. Koaservasyon sürecinin etkinliği, çözeltide uygun bir amfifilik polimer stabilizörün bulunmasına bağlı olarak artmaktadır. Stabilizatör, oluşan lipit nanodamlacıklarının yüzeyini sararak birleşme ve çökme eğilimlerini engellemekte ve bu sayede kolloidal olarak stabil süspansiyonların oluşumuna katkı sağlamaktadır. Yöntemin en önemli avantajı, organik çözücü kullanılmaması nedeniyle solvent kalıntısı riskinin ortadan kaldırılması ve çevresel

açıdan daha sürdürülebilir bir üretim süreci sunmasıdır. Ayrıca yöntemin, ısıya duyarlı farmasötik etken maddelerin formülasyona dahil edilmesinde yüksek verimlilik gösterdiği bildirilmektedir. Bu durum ile birlikte, kullanılan polimerik stabilizatörler ile asit reaktiflerinin kimyasal uyumluluklarının dikkatle optimize edilmesi gerekmekted.ir aksi takdirde istenen partikül boyutu dağılımı ve kolloidal stabilite sağlanamamaktadır. Süreç boyunca pH değişiminin kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesi, özellikle asit ilavesi hızının (titrasyon hızının) doğru ayarlanması açısından kritik önem taşımaktadır [231–234].

2.8.2.5. Çift Emülsiyon Tekniği

Çift emülsiyon (W/O/W) tekniği, özellikle hidrofobik ve hidrofilik etken maddelerin lipit partiküller içerisine etkin bir şekilde enkapsülasyonu için geniş uygulama potansiyeline sahip bir yöntem olarak tanımlanmaktadır. Süreç, öncelikle su içinde yağ (W/O) tipinde bir birincil emülsiyonun hazırlanarak, hidrofılik ilaç sulu fazda çözündürülerek erimiş lipit faz içerisine uygun bir lipofilik emülgatör yardımıyla emülsifiye edilmektedir. Ardından, elde edilen birincil emülsiyonun ikinci bir dış su fazı içerisinde yeniden işlenmesiyle su/yağ/su (W/O/W) tipi çift emülsiyon elde edilmektedir. Bu yapı sayesinde, iç fazdaki ilaç damlacıkları lipit matrisi tarafından korunmakta ve dış ortamla doğrudan teması önlenmektedir. Çift emülsiyon yönteminin en önemli avantajları arasında, yüksek enkapsülasyon verimliliği ve biyofarmasötik bileşiklerin stabil şekilde korunabilmesi yer almaktadır. Bu özelliklerinden dolayı teknik, özellikle peptit ve protein bazlı ilaçların NLT'lere etkin biçimde aktarılmasında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, emülsiyonun stabilitesi kullanılan lipit içeriği ile doğrudan ilişkilidir. Yüksek lipit oranına sahip formülasyonlarda faz ayrılması ve kararsızlık gibi problemler gözlenebilmektedir. Uygun optimizasyonların yapılması durumunda ise, çift emülsiyon tekniğinin kemoterapötik ilaçlar ve biyomoleküllerin etkili biçimde taşınmasında başarılı sonuçlar sağladığı bildirilmektedir [231,235–237].

2.8.3. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Organik Çözücü Kullanan Yöntemler

NLT sentezinde organik çözücü kullanılan yöntemlerde lipit ve etken madde önce uygun organik çözücülerde çözündürülür, ardından çözücünün buharlaştırılması veya sulu ortama difüzyonu ile lipitler katılaşıp nanopartiküller halinde çöktürülmesine dayanmaktadır. Bu yaklaşımın nispeten düşük sıcaklıklarda uygulanabilmesi ve kimi durumlarda yüksek verim sağlanmasıyla öne çıkarken, çözücü kalıntısı riski nedeniyle ek saflaştırma adımları gerektirebilmektedir [238].

NLT sentezinde kullanılan emülsifikasyon–buharlaştırma yönteminde etken madde ve lipitler suyla karışmayan bir organik çözücüde çözülür. Bu organik faz, yüzey aktif madde içeren su fazına

emülsifiye edilerek o/w emülsiyon oluşturulur. Ardından çözücü, genellikle vakum altında ve düşük sıcaklıkta buharlaştırılarak uzaklaştırılır. Lipit damlacıkları katılaşarak NLT partiküllerini oluşturmaktadır. Yöntem, sıcaklığa duyarlı etken maddelerin korunması ve basit ekipmanla uygulanabilirlik açısından avantajlıdır. Ancak çözücü kalıntısı riski ve genellikle seyreltik süspansiyonların elde edilmesi gibi sınırlılıkları mevcuttur [239,240].

NLT sentezinde kullanılan diğer bir yöntem olan emülsifikasyon–difüzyon yönteminde kısmen suyla karışabilen organik çözücü (etil asetat, benzil alkol, THF vb.) lipit ve etken maddeyi çözerek, yüzey aktif madde içeren su fazına emülsifiye edilir ve sonrasında sisteme fazladan su eklenerek çözücünün hızla sürekli faza difüzlenmesi sağlanır. Çözücü su fazına geçtikçe lipitler çözünürlüğünü yitirip katı nanopartiküller halinde çökerler. Yöntem yüksek sıcaklık gerektirmeyip ve parçacık özellikleri üzerinde belirli bir kontrol sunabilmektedir. Buna karşın çözücü kalıntısı riski ve seyreltik dispersiyon oluşması yöntemin olumsuz taraflarındandır [241–243].

NLT sentezinde solvent enjeksiyonu yönteminde lipit faz, suyla karışabilir bir organik çözücüde çözülerek, yüzey aktif madde içeren su fazına ince bir iğne veya ekipmanla hızla enjekte edilmektedir. Çözücü suyla seyrelirken lipitler çözünmez hale gelmekte ve nanoboyutta katı tanecikler olarak çökmektedir. Bu sentez yöntemi ile fazla çözücü sonrasında vakum altında karıştırma veya filtrasyonla uzaklaştırılabilmektedir. Yöntem basit, hızlı ve ekipman gereksinimi düşüktür. Ancak partikül boyutu seçilen çözücünün polaritesine duyarlı olup, çözücü kalıntısının tamamen giderilmesi kritik önemdedir [244,245].

NLT üretiminde kullanılan ince film ultrasonikasyon yönteminde lipitler ve etken madde uçucu bir organik çözücüde çözündürülmektedir. Hazırlanan çözeltideki çözücü, vakum altında uzaklaştırılarak kap yüzeyinde ince bir lipit–etken madde tabakası bırakılır. Yüzey aktif madde içeren ve uygun sıcaklığa ısıtılmış su fazı film üzerine eklenerek; ultrasonik banyo veya prob ile sonikasyon yardımıyla filmin nano boyutlu lipit parçacıklarına dağılır. Karışım soğutularak stabil NLT süspansiyonu elde edilmektedir. Bu yöntem sayesinde lipofilik etken maddelerin homojen dağılımı kolaylaşmaktadır buna karşılık çok basamaklı süreç, ölçek büyütmede verimlilik zorlukları ve çözücü kalıntısı riski yöntemin olumsuzluklarındandır [246,247].

2.8.4. Nano Lipit Taşıyıcıların Sentezinde Kullanılan Diğer Yöntemler

NLT sentezinde kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise süperkritik akışkan ile (çoğunlukla CO_2 ile) organik solvent kullanımını en aza indiren çevreci bir yöntem olan süperkritik akışkan yöntemi ile NLT üretimidir. Bu yöntemde lipitler ve etken madde, uygun bir organik çözücüde çözülür ve

süperkritik CO_2 ile karıştırılır. Nozuldan geniş bir hazneye püskürtme sırasında CO_2 hızla uzaklaşır ve lipit–etken madde karışımı nano-parçacıklar halinde çökmektedir. Yöntem kuru toz elde edilmesine ve çözücü uzaklaştırılmasına olanak vermektedir ancak yüksek basınçlı ekipman gereksinimi ve her lipit ve etken madde kombinasyonun CO_2'de yeterince çözünmemesi gibi sınırlılıkları mevcuttur [218,248].

NLT üretiminde sıcak eriyik ekstrüzyonu, sürekli üretime uygun bir yöntem olup katı ve sıvı lipitler ile etken madde farklı besleme noktalarından sisteme beslenir. Ekstrüderin daha ileriki bölgelerinde yüzey aktif madde içeren su fazı eklenir. Ekstrüder çıkışında çıkışta kalıptan geçirilen sıcak emülsiyon hızla soğutularak NLT'ler elde edilmektedir. Organik çözücü kullanılmaması, daha az proses basamağı ve yüksek kararlılık gibi avantajlar mevcut iken, yüksek sıcaklık gereksinimi, malzeme akış özelliklerine duyarlılık, ekipman maliyeti ve enerji tüketimi bu yöntem için önemli kısıtlar olarak belirtilmektedir [249–251].

Tablo 2.3: NLT sentez yöntemlerinin detayları, yöntemlerin avantajları ve dezavantajları.

	Sentez Yöntemi	Sentez Detayı	Avantajları	Dezavantajları	Kaynaklar
Yüksek Enerjili Yöntemler	**Yüksek basınçlı homojenizasyon (HPH)**	Erimiş lipitler, sıcak yüzey aktif madde çözeltisi içinde yüksek basınç altında dağıtılarak NLT'ler elde edilir.	Ölçeklenebilir; çözücüsüz, tekrarlanabilir sonuçlar vermektedir, küçük partikül boyutu sağlamaktadır.	Yüksek basınç gerektirir; ısıya duyarlı ilaçlar bozulabilir, geniş PDI görülebilmektedir.	[216,252,253]
	Ultrasonikasyon / Yüksek kesme homojenizasyonu	Mekanik kesme kuvveti veya ultrasonik enerji kullanılarak erimiş lipit dispersiyonlarının partikül boyutu küçültülür.	Basit, düşük maliyetli, çözücüsüz, küçük ölçekli üretimler için uygundur.	Metal kirliliği riski mevcuttur, PDI geniştir; homojenlik kontrolü zayıftır.	[254–256]
Düşük Enerjili Yöntem	**Mikroemülsiyon yöntemi**	Lipit, yüzey aktif madde ve yardımcı yüzey aktif madde içeren sıcak mikroemülsiyon, karıştırma altında soğuk suya ilave edilerek nanopartiküller çöktürülür.	Basit işlem koşulları ile görece küçük partikül boyutu; yüksek ilaç yükleme kapasitesi sağlamaktadır.	Yüksek miktarda yüzey aktif madde gerektirir, seyreltme adımı zorunludur, endüstriyel ölçekte uygulanması sınırlıdır.	[224,257]
	Faz değişim sıcaklığı (PIT) yöntemi	Noniyonik yüzey aktif maddelerin sıcaklığa bağlı	Düşük PDI değerine sahip partiküller elde	Parametre optimizasyonu zaman alıcıdır;	[258]

		olarak hidrofilik–lipofilik denge (HLB) değerinin değişimi esasına dayanır. Faz dönüşümü sağlanarak ani soğutma ve seyreltme sonrası o/w tipi emülsiyon ile NLT'ler oluşturulur.	edilebilir; solvent gerektirmez; ısıya duyarlı olmayan bileşenler için uygundur.	çoklu ısıtma/soğutma adımları bazı bileşenlerin yapısına etki edebilmektedir.	
Düşük Enerjili Yöntemler	**Membran Kontaktör Yöntemi**	Eritilmiş lipit faz, mikro/nano gözenekli bir membran üzerinden basınç altında geçirilerek sulu faza disperse edilmektedir. Sulu faz, çıkan lipit damlacıklarını akış yönüyle süpürür ve soğutma sonucu lipitler katılaşarak NLT'ler oluşturur.	Parçacık boyutu membran gözenek çapı ve akış parametrelerine göre ayarlanabilir; dar partikül dağılımı sağlamaktadır.	Gözenek tıkanması riski yüksektir; yüksek lipit derişimleri akışı engelleyebilir; uzun süreli üretimde membran temizliği gerekmektedir.	[259]
	Koaservasyon Yöntemi	Çözünmeyen nanolipit partiküllerinin kimyasal bir reaksiyon yoluyla çöktürülmesi esasına dayanmaktadır. Yağ asidi sodyum tuzu içeren misellar çözeltinin kontrollü biçimde asitleştirilmesiyle lipit faz ayrılarak mikroskobik damlacıklar halinde çöker ve soğutularak katılaşır.	Organik çözücü kullanılmaz; solvent kalıntısı riski yoktur; çevre dostu bir süreçtir; ısıya duyarlı bileşenler için uygundur.	pH kontrolü ve asit ilavesi hızının optimize edilmesi gerekir; stabilite ve partikül boyutu dağılımı polimer–asit uyumuna bağlıdır.	[260,261]
	Çift emülsiyon (W/O/W)	Hidrofilik ilaç içteki sulu faza hapsedilir;	Hidrofilik ilaçlar için uygundur; yüksek	Çok aşamalı ve karmaşık bir süreçtir; stabilite	[262,263]

		ardından sistem ikinci bir sulu faza emülsifiye edilerek çift emülsiyon oluşturulur.	enkapsülasyon verimi sağlamaktadır.	sorunları ve geniş partikül boyutu dağılımı görülebilmektedir.	
Organik Çözücülü Yöntemler	**Çözücü emülsifikasyon – buharlaştırma Yöntemi**	Lipit ve ilaç suyla karışmayan bir organik çözücüde çözülür; bu karışım sulu faza emülsifiye edilir ve çözücü buharlaştırılarak katı partiküller oluşturulur.	Düşük sıcaklıkta uygulanabilir, ısıya duyarlı ilaçlar için uygundur.	Organik çözücü kullanımı gerektirir, çözücü uzaklaştırılması gerekir, organik çözücü toksisitesi riski taşımaktadır.	[239,240]
	Çözücü emülsifikasyon – difüzyon Yöntemi	Lipit ve ilaç, kısmen suyla karışabilir organik çözücüde çözülür; çözücü sulu faza difüze olarak lipitlerin çökelmesini sağlanmaktadır.	Hafif proses koşulları partikül boyutu üzerinde kontrol imkânı sağlamaktadır.	Organik çözücü gerektirmektedir, endüstriyel ölçeğe uyarlaması sınırlıdır.	[241,242]
	Çözücü enjeksiyonu (yer değiştirme) Yöntemi	Lipit/ilaç çözeltisi, suyla karışabilir organik çözücü içinde hazırlanır ve yüzey aktif madde içeren sulu faza hızla enjekte edilerek nanopartikül çökelmesi sağlanır.	Basit, hızlı ve tekrarlanabilir bir yöntemdir, karmaşık ekipman gerektirmez.	Çözücü uzaklaştırılması gerekir, organik çözücü kalıntısı riski mevcuttur, büyük ölçekli üretime uygun değildir.	[244,245]
	İnce film Ultrasonikasyon Yöntemi	Lipitler ve etken madde uçucu bir organik çözücüde çözülür ve vakum altında uzaklaştırılarak kap yüzeyinde ince bir lipit–etken madde tabakası oluşturulur. Bu film, yüzey aktif madde içeren ve uygun sıcaklığa ısıtılmış su fazı ile stabil NLT	Lipofilik etken maddelerin homojen dağılımı kolaylaşır; partikül boyutu kontrol edilebilir, farklı lipit bileşimleriyle uyumludur.	Çok basamaklı bir süreçtir; ölçek büyütmede verimlilik azalabilir, çözücü kalıntısı riski bulunmaktadır.	[246,264]

		süspansiyonu elde edilmektedir.			
Diğer Yöntemler	**Süperkritik Akışkan Teknolojisi**	Lipit–ilaç karışımı süperkritik CO_2 ile işlenir; dekompresyon sırasında partiküller aniden çökebilmektedir.	Çözücüsüz veya çok az çözücü kullanılmaktadır, kuru toz formda ürün elde edilir.	Yüksek basınçlı ve pahalı ekipman gerektirir; lipitlerin CO_2 içinde çözünürlüğü sınırlı olabilmektedir.	[218,248]
	Sıcak eriyik ekstrüzyonu (HME)	Lipit karışımı ile etken madde, ekstrüder sistemine farklı besleme noktalarından verilerek ısı ve mekanik kesme kuvveti altında eritilir; yüzey aktif madde içeren su fazı sistemin ilerleyen kısmında eklenir ve çıkıştaki kalıptan geçirilen sıcak emülsiyon hızla soğutularak NLT'ler elde edilmektedir.	Organik çözücü kullanılmaz; daha az proses basamağı içermektedir, yüksek kararlılık sağlar, sürekli üretime uygundur.	Yüksek sıcaklık gereksinimi, malzeme akış özelliklerine duyarlılık, yüksek ekipman maliyeti ve enerji tüketimi önemli kısıtlardır.	[250,252]

2.9. BEYİN KANSERİ TEDAVİSİNDE NANO LİPİT TAŞIYICILARIN KULLANIMI

Beyin kanseri tedavisinde literatürde yapılan çeşitli akademik çalışmaları detaylandırılmıştır. Buna göre; Wu ve ekibinin yapılan çalışmada TMZ için glioma tedavisinde etkinliği artırmak amacıyla SLN ve NLT üzerinde tek ve vincristine (VCR) ile çift yüklemeli nano-taşıyıcılar geliştirilmiş ve karşılaştırılmıştır. Solvent-yer değiştirme ve solvent-difüzyon yöntemleriyle üretilen taşıyıcılarda sırasıyla TMZ yüklü SLN ve TMZ yüklü NLT'ler sentezlenmiştir. Sentezlenen nanopartikül boyutları yaklaşık 181 ve 120 nm, zeta potansiyelleri +26.5 , +21.1 mV; %EE 81.2 ± 3.5 ve 89.6 ± 3.3; %DL 11.2 ± 1.4 ve 7.5 ± 0.8 olarak rapor edilmiştir; U87MG glioma hücrelerinde TMZ'nin sitotoksik potansiyeli sıralaması serbest TMZ (IC50 = 19.75 μM) > TMZ-SLN (5.26 μM) > TMZ-NLT (0.55 μM) olarak belirlenmiştir. Subkutan U87MG ksenogreft modelinde tümör inhibisyonu TMZ-NLT %70.26, TMZ-SLN %42.94 ve serbest TMZ %26.34 olarak bulunmuştur. TMZ için NLT ile taşınım, SLN'e kıyasla daha yüksek EE% ve üstün in-vitro/in-vivo etkinlik göstermiştir [265].

Dana ve ark. yaptığı çalışmada sarımsak yağı için beyin tümörlerinde etkinliği artırmak ve KBB'yi aşmayı sağlamak amacıyla sentezlenmiş NLT'ler sıcak-yüksek basınçlı homojenizasyonla geliştirilmiş ve in-vitro olarak değerlendirilmiştir. DLS ile ölçülen partikül boyutu 136.8 ± 0.56 nm, zeta potansiyeli −36.27 ± 0.96 mV ve PDI 0.163 ± 0.03 olup, <−30 mV'luk yüzey yükü ve 3 ay çoklu sıcaklık koşullarında formülasyonunun stabil kalması yüksek kolloidal kararlılığı göstermiştir. %EE verimi 83.26 ± 6.13 bulunmuş; pH 7.4'te 37 °C'de salım 8 saatte %8.60 ± 1.15 ve 72 saatte %27.95 ± 5.57'ye ulaşırken serbest sarımsak yağı 72 saatte %15.68 ± 1.89 salım gerçekleştirmiştir. U87 glioma hücrelerinde MTT'de sarımsak yağı-NLT için %11.9'a düşerken serbest yağ %90.2 ve ilaç yüklenmemiş NLT %74.3 kalmıştır; 3D sferoitlerde de canlılık anlamlı biçimde azalmıştır. Ko-kültür intralaboratuvar KBB modelinde (TEER > 150 Ω·cm²) luminal tarafa uygulanan sarımsak yağı-NLT 24 saatte U87 canlılığını %73.8'e indirirken serbest yağ %95.2 ve ilaç yüklenmemiş NLT %94.1'de kalmış; bu bulgular NLT'nin KBB'yi aşabildiğini ve glioma karşı etkinliği artırdığını göstermektedir [266].

Bu konuda yapılan bir başka çalışmada DTX taşınmasını artırmak ve beyin hedeflemesini sağlamak amacıyla bevacizumab (BVZ) ile fonksiyonelleştirilmiş BVZ-NLT-DTX formülasyonu geliştirilmiş ve in-vitro/in-vivo olarak değerlendirilmiştir. Emülsifikasyon-ultrasonikasyon yöntemiyle elde edilen NLT'ler için BVZ-NLT-DTX yaklaşık 130 nm; ZP −20.8 mV; PDI değeri ≤0.38 olarak ölçülmüştür. DTX %EE verimi NLT-DTX'te %93.2, BVZ-NLT-DTX'te %90.3 olarak belirlenmiştir. DSC analizine göre DTX yüklemesi ve BVZ fonksiyonelleştirmenin amorf bir matris oluşturduğunu; in-vitro salımın 84 saate uzadığını ve BVZ-NLT-DTX'te daha yavaş gerçekleştiğini göstermiştir. U87MG/A172 hücrelerinde BVZ-NLT-DTX, serbest DTX ve NLT-DTX'e kıyasla sitotoksisiteyi artırmış ve DTX içeren yapı 72 saatte >%70 apoptoz indüklemiştir. Hücresel alımda BVZ modifikasyonu internalizasyonu engellememiştir. Ortotopik C6 rat glioblastoma modelinde intravenöz BVZ-NLT-DTX 15 günde tümör hacmini ≈%70 azaltırken serbest DTX etkisiz kalmış; biyokimyasal göstergelerde belirgin karaciğer/böbrek toksisitesi belirlenmemiştir [267].

NLT'ler ile yapılan bir başka çalışmaya göre glioblastoma tedavisi için pitavastatin yüklü nanoyapılı lipit taşıyıcılar (PT-NLT) sıcak-yüksek basınçlı homojenizasyonla üretilmiş ve optimize edilmiştir. Üretilen nanopartiküller 95–115 nm partikül boyutunda, 0.17–0.24 aralığındaki PDI değerine sahip ve -19 mV Zeta potansiyeli değerleri ile hedeflenen kalite özellikleri ile uyumlu kolloidal özellikler sergilemiş; %EE 97.5, %DL 3.24 olarak belirlenmiş ve 6 aya kadar 4 °C'de stabil kaldığı teyit edilmiştir. Karakterizasyonlar için yapılan DSC ve XRD analizleri, β-polimorfik yarı-kristalin matris içinde PT'nin amorf/moleküler dağılımını desteklemiştir. SentezIn-vitro salım 72 saate kadar kontrollü gerçekleşmiş; pH 7.4'te Korsmeyer–Peppas (n≈0.653, anormal difüzyon),

pH 5.5'te Higuchi (Fickyen difüzyon) modeliyle uyum göstermiş, Weibull tüm profil için en iyi istatistiksel uyumu vermiştir. U87MG, U373 ve A172 hücrelerinde PT-NLT'ler düşük mikromolar aralıkta belirgin sitotoksisite göstermiş ve eşit molar serbest pitavastatin bu düzeylerde daha zayıf kalmış; aynı koşullarda TMZ ise etki göstermemiştir. Coumarin-6 yüklü NLT'lerin hücre içine alımı serbest boya karşısında 5.8–12 kat artmış ve ilk 3 saatte plato gözlenmiştir [268] .

NLT ile yapılan bir diğer çalışmada akciğer kanseri tedavisi için doxorubicin (DOX) ve pEGFP plazmidinin birlikte taşınmasını sağlayan, transferrin (Tf) ile yüzey-hedeflendirilmiş nanoyapılı lipit taşıyıcılar (Tf-NLT) geliştirilmiş ve katı lipit nanopartiküllerle (Tf-SLN) karşılaştırılmıştır; NLT lipit fazı PrecirolATO-5:zeytinyağı:LipoidS100= 3:1:1(w/w/w) olarak hazırlanıp pEGFP-N1/Tween-80/DDAB içeren sulu faza 30 °C'de 800 rpm'de enjekte edilerek çözücü uzaklaştırma yöntemi ile nanopartiküller elde edilmiştir. Tf-PEG-PE ligandıyla modifikasyonda en uygun ligand:taşıyıcı oranı NLT için 3:10 belirlenmiştir; böylece Tf-NLT'nin ortalama boyutu 198 nm, zeta potansiyeli +19 mV, pEGFP gen-yükleme verimi ≈%91–93, DOX enkapsülasyon verimi (EE%) Tf-NLT'de %87 olarak tayin edilmiştir. A549 hücrelerinde MTT ile konsantrasyona bağlı sitotoksisite gözlenmiş ve IC50 değerleri serbest DOX 1.88 µg/mL > SLN 1.36 µg/mL > NLT 1.04 µg/mL > Tf-SLN 1.12 µg/mL > Tf-NLT 0.75 µg/mL sıralamasını vererek hedefli NLT'nin üstünlüğünü göstermiştir; in-vivo A549 tümörlü C57BL/6 fare modelinde 48–72 saatte gen transfeksiyon verimi Tf-NLT'de en yüksek bulunmuş, 15. günde antitümör etkinlik tümör inhibisyonu Tf-NLT %66 > NLT %47 > Tf-SLN %39 > serbest DOX %17 olarak raporlanmıştır; sonuç olarak Tf-PEG-PE ile hedeflendirilmiş NLT, DOX ve DNA'nın eş-taşınmasında SLN ve modifiye edilmemiş karşıtlarına üstün gelerek reseptör-aracılı alım, yüksek yükleme ve artmış in-vivo etkinlikle dikkat çeken çok işlevli bir platform olarak raporlanmıştır [269].

TMZ-NLT intranazal (burun-beyin) yoldan beyin hedeflemesini artırmak amacıyla Box–Behnken tasarımıyla optimize edilmiş nanoyapılı lipit taşıyıcılar geliştirilmiş; bağımsız değişkenler katı lipit miktarı, sıvı lipit/total lipit, yüzey aktif miktarı ve sonikasyon süresi, yanıtlar ise partikül boyutu, salım ve yükleme olarak belirlenmiştir. Yüksek basınçlı homojenizasyon, ultrasonikasyon hazırlanan optimize formülün partikül boyutları 131.6 nm, PDI değeri 0.177, Zeta Potansiyeli +15.2 mV, % EE 81.6 ve %DL 8.71 olarak belirlenmiştir. Ex-vivo domuz nazal mukozasında TMZ-NLT için akı 9.815 $\mu g \cdot cm^{-2} \cdot s^{-1}$ olup, TMZ dispersiyonuna göre 2.3 kat yüksek olarak tayin edilmiştir. Sıçanlarda intranazal TMZ-NLT, plazma ve beyin derişim-zaman profillerinde beyin/plazma oranını artırmış; beyinde belirlenen miktarlar ile TMZ-NLT (i.n.)> TMZ dispersiyonu (i.n.) > TMZ dispersiyonu (i.v.) olarak sıralanmıştır. Çalışmada yapılan analizlerle intranazal taşınmada doğrudan taşımayı ve beyin hedeflemede %457'ye varan artışı sağlamıştır [270] .

Yapılan bir diğer çalışmada Alzheimer hastalığına yönelik nöroprotektif kuersetin'in beyne iletimini artırmak amacıyla transferrin (Tf) ile fonksiyonelleştirilmiş katı lipit nanopartiküller (SLN) ve nanoyapılı lipit taşıyıcılar (NLT) geliştirilmiş ve karşılaştırılmıştır; sıcak homojenizasyon + ultrasonikasyonla hazırlanan sistemlerde Tf konjugasyonu KBB geçişi değerlendirilmiştir. Yapılan karakterizasyonlar ile nanopartiküllere ait farmülasyonlarda dar dağılım (PDI < 0.2) sağlanmış; boyut, Zeta potansiyeli ve enkapsülasyon verimi (EE%) sırasıyla, 195±4 nm, −31±5 mV, EE% 81±12 (SLN); 170±5 nm, −28±2 mV, EE% 97±10 (NLT); 234±18 nm, −32±8 mV, EE% 77±11 (Tf-SLN); 219±13 nm, −28±2 mV, EE% 81±6 (Tf-NLT) olarak raporlanmıştır. Fotostabilite testinde serbest kuersetin 6 saat UV maruziyette %55 bozunurken, SLN/NLT içinde yaklaşık %10 seviyesinde kalmıştır. hCMEC/D3 monolayer modelinde (TEER ~100–150 Ω·cm²) sitotoksisite 4 saat/30 µM'de <%30 olup güvenli aralıkta bulunmuş; geçirgenlikte NLT'ler SLN'lere göre anlamlı derecede daha yüksek permeasyon göstermiş, ancak Tf fonksiyonelleştirmesi (olası reseptör satürasyonu nedeniyle) ilave permeabilite kazandıramamıştır. Aβ(1–42) fibrilasyonunda boş SLN/NLT'ler agregasyonu artırma eğilimindeyken, kuersetin-yüklü NLT (ve Tf-NLT) ThT floresansını belirgin düşürerek fibril oluşumunu baskılamıştır. Tf-NLT'nin kuersetini fotodegradasyondan korunması, yüksek yükleme, KBB modelinde iyileşmiş permeasyon ile Alzheimer tedavisine dönük beyin hedefli iletim için potansiyel bir aday olarak değerlendirmişlerdir [271] .

Yapılan çalışmada PTX için beyne hedefli iletimi artırmak amacıyla transferrin (Tf) ile fonksiyonelleştirilmiş nanoyapılı NLT'lerin Box–Behnken tasarımıyla geliştirilmesini ve optimizasyonunu rapor edilmiştir. Emülsifikasyon-çözücü buharlaştırma yöntemi ile sentez sürecinde optimum partikül boyutu 205 ± 11 nm, ZP $+25.7 \pm 6.2$ mV, %EE 91.8 ± 0.5 ve %DL 5.38 ± 0.03 sağlanmıştır; 72 saate kadar kademeli salım >%77 gerçekleşmiştir. Tf yüzey konjugasyonu ile U-87 glioma hücrelerinde Tf-PTX-NLT'ler serbest PTX ve ilaç yüklenmemiş NLT'lere göre belirgin olarak daha yüksek hücre inhibisyonu sağladığı raporlanmıştır [272].

PTX ile yapılan insan ve fare kolon kanseri ile fare deri kanseri üzerinde yapılan çalışmada hyaluronik asit (HA) ile modifiye (HA-NLT) nanolipit taşıyıcıların, CD44'ü aşırı eksprese eden tümörlere seçici taşınmasını sağlamak üzere hyaluronik asitle kaplanmış bir taşıyıcı bir sistem olarak tasarlanmıştır. HA kaplaması ile nanopartikül yüzey yükünün pozitiften belirgin biçimde negatife çevrildiği, bunun dolaşımda stabiliteyi artırdığı ve CD44 aracılı hücresel alımı kolaylaştırdığı gösterilmiştir; ayrıca NLT yapısı dolayısıyla ilacın salımının yavaşlatıldığı ve saf ilaca göre kıyasla daha uzun süreli ve dengeli bir salım profili elde edildiği raporlanmıştır. Bu doğrultuda HA-NLT'nin, hücre kültürü ve tümörlü hayvan modellerinde eş doz saf ilaca kıyasla anlamlı derecede daha güçlü

antitümör etki gösterdiği ve daha iyi tolere edildiği; farmakokinetik olarak daha uzun dolaşım süresi ve tümörde daha yüksek birikim sağladığı belirlenmiştir [273].

İlaç taşıyıcı sistemler içinde birçok açıdan büyük potansiyel taşıyan NLT'lerin üretim süreçlerinde farklı sentez yöntemlerinin ve bu sentez yöntemlerinde senteze etki eden parametrelerin incelenmesi ile bu parametrelerin birbirleri ile olan ilişkileri aydınlatılmıştır. Bu durumun yanı sıra NLT'lerin stabilite çalışmaları ile stabil bir taşıyıcı olarak NLT sisteminin üretilebilmesi için gereken koşullar detaylandırılmıştır. Sentez detayları belirlenmiş NLT'ler için optimum deney parametreleri ile deney şartların belirlenmesi için Design Expert programı ile analizler yapılmış ve sentezlenmiş NP'ler için fiziksel (DLS, Zeta Potansiyeli, PDI değeri, TEM) ve kimyasal karakterizasyon (FTIR, DSC, XRD) işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Gerçekleştirilen tez çalışmasında glioma tedavisinde sıklıkla kullanılan ve ön ilaç olarak değerlendirilen TMZ'nin klinik ve literatürce kabul görmüş etkinliğinin beklenen tedavi çıktılarına göre görece düşük kalması dolayısıyla, KBB geçişine uygun taşıyıcı bir sistem ile hedef dokuya etken maddenin iletimi tedavi için yeni perspektif sunmaktadır. Nitekim TMZ'nin glioma tedavisindeki temel işlevi KBB geçişinde kolaylık sağlayıp DNA replikasyonundaki guanin eşleşmelerini bloke edebilecek MDA iyonun tümör dokusuna iletimin sağlanmasıdır. Ancak ön plana çıkan özelliği olarak KBB'yi geçebilen TMZ'nin çoğunlukla oral yolla alınıp fizyolojik pH'larda kolaylıkla hidrolize olması durumu dolayısıyla TMZ'nin sistemik tedavilerde hastaya çok yüksek miktarda verilmesi gerekmektedir. Bu yol ile beyindeki MTIC konsantrasyonun arttırılması hedeflenirken, yapılan ilaç yüklemesi dolayısıyla birçok yan etkinin önüne geçilmesi güçleşmektedir. Bu amaçla KBB geçişinde KBB'nin lipofilik yapısı ile uyumu olabilecek NLT'lerin TMZ işlevi görerek KBB geçişinde taşıyıcı olması ve DNA replikasyonunda metilasyon adımını sağlayan MDA'nın etken madde olarak NLT'lere yüklenerek in vitro hücre kültür etkinliğinin incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Bunun yanı sıra tek başına KBB geçiş potansiyeli mümkün olmayan PTX'in NLT sistemleri ile taşınabilmesine olanak tanıma potansiyeli barındıran NLT'lerin sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentezlenmiş etken malzeme yüklü NLT'lerin in vitro ortamda etken madde salım çalışmaları ile salım kinetikleri değerlendirilmiştir. PTX yüklü NLT'lerin U87MG hücre hattında sitotoksisite çalışmaları ile MDA yüklü NLT'ler için T98G hücre hattında sitotoksisite, immünositokimya ve hücre alım çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3. YÖNTEM

Kanser, dünya genelinde başlıca ölüm nedenlerinden biri olup, tedavisi en güç kanser türlerinden biri de beyin tümörleridir. Beyin kanserinin tedavisini güçleştiren temel etkenlerden biri, tümör hücrelerinin hızlı ve kontrolsüz çoğalma eğilimi göstermesi; diğeri ise tedavi için gerekli olan etken maddelerin beyin dokusuna sınırlı düzeyde ulaşabilmesidir. Bu sınırlamanın temelinde, merkezi sinir sistemini korumak üzere özelleşmiş bir yapı olan kan-beyin bariyeri yer almakta olup; birçok küçük molekül ve kemoterapötik ajanın beyin parankimine geçişini büyük ölçüde kısıtlamaktadır. Dolayısıyla KBB'nin varlığı, günümüzde ve gelecekte, beyin tümörlerine yönelik etkin ve güvenli ilaç taşıma stratejilerinin geliştirilmesini zorunlu kılan temel engellerden biri olmaya devam etmektedir. KBB'nin seçici geçirgenliği, fizyolojik açıdan beyni toksik maddelere ve ani kimyasal değişimlere karşı korurken, beyin dokusunda istenmeyen bir kontrolsüz çoğalma durumunda tedavi sürecinde tümör bölgesine yeterli düzeyde ilaç iletilmesini engelleyebilmektedir. Bu durum, sistemik dolaşıma verilen antitümör ilaçların yalnızca sınırlı bir kısmının beyin dokusuna erişmesine, dolayısıyla terapötik etkinliğin azalmasına ve tedavinin daha yüksek dozlara ya da kombine rejimlere ihtiyaç duymasına yol açmaktadır.

Bu tez çalışmasında, glioblastoma tedavisine yönelik yeni ilaç taşıma stratejilerinin geliştirilmesi; bu kapsamda tasarlanan taşıyıcı sistemlerin özelliklerinin belirlenmesi, gelecekte potansiyel olarak kullanılabilecek yaklaşımların tartışılması ve in vitro düzeydeki uygulamalarının detaylı olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Glioblastoma, moleküler ve histopatolojik özellikleri bakımından çeşitli alt tiplere ayrılabilen, son derece heterojen bir beyin tümörüdür. Güncel klinik uygulamada, cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ile eşzamanlı ve devam eden TMZ tedavisini içeren Stupp protokolü, kemoterapide standart yaklaşım olarak kabul edilmektedir. TMZ bu nedenle, uluslararası otoriteler tarafından onaylanmış, glioblastoma tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir alkilleyici ajan konumundadır. Bu tez kapsamında, kan-beyin bariyerini geçme potansiyeli de göz önünde bulundurularak, standart tedavi seçeneklerinden biri olan TMZ'nin nanopartikül sistemler aracılığıyla taşınabilirliği araştırılmıştır. Bu amaçla, KBB geçiş mekanizmaları ile uyumlu özellikler sergileyebilecek lipit yapıların seçimi ve formülasyonu tez kapsamında ayrıntılı biçimde değerlendirilmiş; lipit nanopartiküllerin sentez süreçleri ile bu süreçlere etki eden formülasyon ve proses parametreleri incelenmiştir. Elde edilen optimize formülasyonlarla hazırlanan nanopartikül sistemlerin karakterizasyonu, in vitro salım özellikleri ve hücre kültür çalışmaları detaylandırılmıştır.

3.1. KİMYASAL MALZEMELER

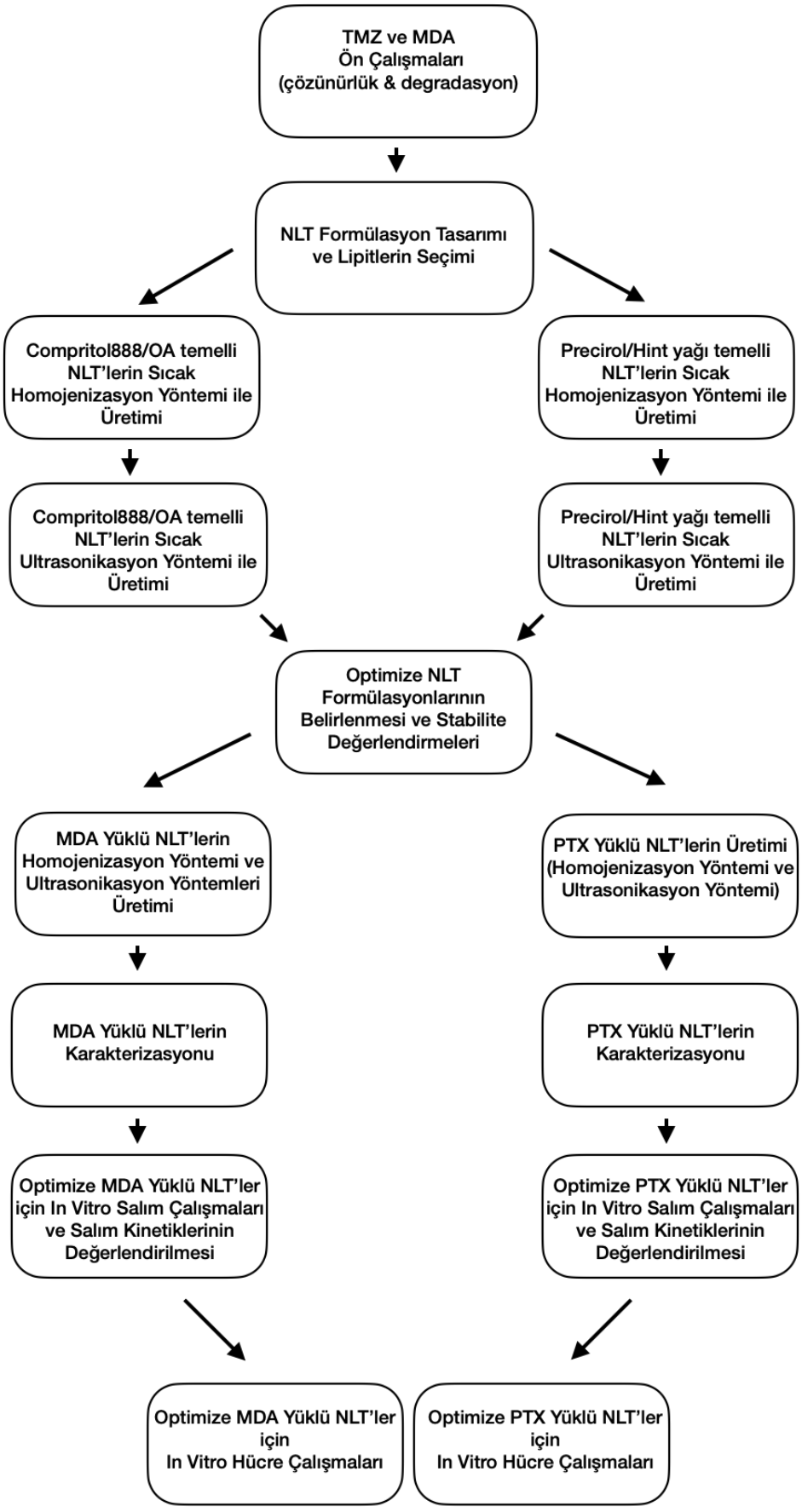
Tez çalışması kapsamında gerçekleştirilen sentez, optimizasyon karakterizasyon ve in vitro çalışmalarda kullanılan kimyasal malzemelerin listesi Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddelerin Listesi

Kimyasal Madde	Üretici
Compritol ATO 888	Gattefosse
Precirol ATO 5	Gattefosse
Gelucire 44/14	Gattefosse
Gelucire 59/14	Gattefosse
Labrasol ALF	Gattefosse
Capryol 90	Gattefosse
Oleik Asit	Sigma Aldrich
Hint Yağı	Sigma Aldrich
Tween 80	Sigma Aldrich
Coumarin-6	Sigma Aldirch
Temozolomide	Sigma Aldrich
Paklitaksel	Onko İlaç

3.1.1. Tez Kapsamında Gerçekleştirilen Çalışmaların Akış Şeması

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneysel çalışmaların genel akışı Şekil 3.1'de özetlenmiştir. Çalışmada öncelikle TMZ farklı lipit fazlardaki çözünürlüğünün belirlenmesine yönelik çözünürlük çalışmaları yürütülmüş, bunu takiben TMZ'nin bozunma davranışı detaylı olarak incelenmiştir. Bozunma çalışmalarının ardından, glioblastoma tedavisinde DNA alkilleyici ajan olan molekül olarak değerlendirilen MDA'nın lipit fazlardaki çözünürlüğü araştırılmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda, Compritol/Oleik Asit ve Precirol/Hint yağı içeren nano lipit taşıyıcı sistemleri için sıcak homojenizasyon basamağında kullanılan sıvı lipit/ toplam lipit oranı, yüzey aktif madde ve süre gibi homojenizasyon parametreleri ile ultrasonikasyon basamağına ait yüzey aktif madde, süre ve şiddet parametreler sistematik olarak değerlendirilmiş ve optimize NLT'lerin üretiminde kullanılacak parametreler belirlenmiştir. Optimize NLT'lerin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli analizleri ile DSC, XRD ve FTIR analizleri gerçekleştirilmiştir. MDA ve PTX etken maddelerinin belirlenmiş ayrı formülasyonlar için NLT'lere etken madde yüklenmeleri gerçekleştirilmiş, %EE ve %DLC değerleri ile etken madde salım davranışları ve salım kinetikleri değerlendirilmiştir. Akabinde etken malzeme yüklü NLT'ler için detaylı in vitro hücre çalışmaları ile NLT sistemlerinin glioblastoma üzerindeki etkileri araştırılmış ve tüm bulgular bütüncül olarak yorumlanmıştır.



Şekil 3.1: Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalara ait akış şeması.

3.2. ETKEN MALZEMELER İÇİN GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMALARI

3.2.1. Katı ve Sıvı Lipitlerde Etken Madde Çözünürlük Çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen çalışmalarda TMZ ve PTX için çözünürlük verileri, NLT formülasyonlarında kullanılacak lipit faz bileşenlerinin belirlenmesi amacıyla yürütülmüştür. Bu kapsamda TMZ v PTX için katı lipit fazını oluşturan Compritol ATO 888 ve Precirol ATO 5, Gelucire 44/14, Gelucire 59/14 gibi katı lipitler ile sıvı lipit fazını oluşturan Oleik Asit ve Hint Yağı, Capyol 90, Labrasol ALF sıvı lipitleri içindeki çözünürlüğü ayrı ayrı araştırılmıştır. Çalışmada literatürde yaygın olarak kullanılan doygunluk çözünürlüğü yaklaşımı temel alınarak her bir lipit faza fazla miktarda TMZ eklenerek sabit sıcaklıkta belirli bir süre boyunca karıştırılmış dengeye ulaşan karışımlarda katı lipitler için çökme davranışı gözlemlenmiş, sıvı lipit süspansiyonlar ise santrifüjlenmiştir. Elde edilen üst faz, metanol ile seyreltilerek HPLC'de ilgili metot yardımıyla analiz edilmiştir. Böylece TMZ'nin farklı katı ve sıvı lipit fazlardaki çözünürlük düzeyleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş ve en yüksek çözünürlük sağlayan katı lipit/sıvı lipit kombinasyonları, NLT formülasyonlarının tasarımında temel girdilerden biri olarak kullanılmıştır.

3.2.1.1. Katı Lipitler için Etken Madde Çözünürlük Çalışmaları

Tez kapsamında seçilmiş ve yapısal özellikleri birbirinden farklı olan katı lipitler (Compritol ATO 888 ve Precirol ATO 5, Gelucire 44/14, Gelucire 59/14) için hazırlanmış Katı lipit–TMZ sistemlerine ait deneysel prosedürde, cam test tüpleri içerisine önceden tartılmış miktarda katı lipit eklenmiş ve üzerine hedeflenen TMZ:katı lipit oranına karşılık gelecek miktarda TMZ ilave edilmiştir. Katı lipit ve TMZ içeren test tüpleri, ısıtıcılı su banyosuna alınarak katı lipidin erime noktasının yaklaşık 10 °C üzerindeki sıcaklığa kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta tutulurken manyetik karıştırıcı yardımıyla 4 saat karıştırılmıştır. Bu sayede TMZ'nin erimiş katı lipit matrisi içerisinde çözünmesi ve mümkün olduğunca homojen bir dağılım göstermesi amaçlanmıştır. Isıtma ve karıştırma işlemlerinin tamamlanmasının ardından test tüpleri oda sıcaklığına alınmış, sistemlerin yeniden katılaşmasına izin verilmiştir.

Elde edilen katılaştırılmış katı lipit–TMZ karışımları, görsel inceleme ile TMZ'ye ait faz ayrımı olup olmadığı kontrol edilmiştir. Bu kapsamda; belirgin faz ayrımı ve iki fazlı görünüm sergileyen sistemler not edilerek uygun karışım oranlarına ait sonuçlar irdelenmiştir. Faz ayrımı ve/veya katı matriste heterojenlik gösteren formülasyonlar, ilgili TMZ:katı lipit oranında karışabilirliğin ve çözünürlüğün yetersiz olduğu sistemler olarak değerlendirilmiştir. Buna karşılık homojen görünüme

sahip karışımlar, TMZ'nin ilgili katı lipit içerisinde daha görece yüksek oranda çözünebildiğini ve NLT formülasyon çalışmalarında kullanılabilecek potansiyel TMZ:katı lipit oranlarını değerlendirmeye olanak tanımıştır. Ön değerlendirmeler sonucunda, potansiyel katı lipitler için seçilerek ilaç yükleme potansiyeli olan katı lipitler daraltılmış ve gerektiğinde daha detaylı nicel çözünürlük çalışmalarının yürütüleceği bileşim aralıkları tanımlanmıştır. Bu durum sayesinde NLT formülasyonlarında kullanılacak katı lipit–TMZ oranlarının hem karışabilirlik hem de potansiyel yükleme kapasitesi açısından rasyonel bir temele dayandırılması hedeflenmiştir.

PTX için katı lipitlerde çözünürlük çalışmaları benzer yaklaşımla yürütülmüştür. Ancak çalışmada kullanılan PTX'in, ticari bir preparat olan Taxatu (Onko İlaç) formundan temin edilmesi ve bu preparatta PTX'in etanol–hint yağı karışımı içinde çözünmüş sıvı bir fazda bulunması nedeniyle, katı lipit ortamında kolay ayırt edilebilir bir faz ayrımı gözlenmemiştir. Bu durum, katı lipit seçiminin PTX'in doğrudan katı lipitte çözünürlüğünden ziyade, preparatta taşıyıcı olarak yer alan hint yağı ile lipit fazın uyumluluğu dikkate alınarak yapılmasını gerektirmiştir. Bu kapsamda, hint yağı ile uyumluluğu yüksek olduğu değerlendirilen Precirol ATO 5'in, PTX yüklü formülasyonlarda katı lipit olarak kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2.1.1. Sıvı Lipitler için Etken Madde Çözünürlük Çalışmaları

NLT sentezinin bir diğer bileşeni olarak kullanılacak sıvı lipit fazları için de TMZ ile çözünürlük çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında yapılan çalışmanın temel amacı, farklı yapısal özelliklere sahip sıvı lipitler içerisinde TMZ'nin çözünürlük davranışını karşılaştırmalı olarak değerlendirmek ve NLT formülasyonlarında kullanılabilecek uygun sıvı lipitler ile TMZ:sıvı lipit oranlarının belirlenmesidir. Bu kapsamda, seçilen sıvı lipitlerin her biri için farklı TMZ:sıvı lipit oranlarında ön çözünürlük testleri uygulanmıştır.

Deneysel prosedürde, cam test tüpleri içerisine önceden belirlenmiş miktarda sıvı lipit eklenmiş ve üzerine bilinen miktarda TMZ ilave edilmiştir. Sıvı lipit ve TMZ içeren test tüpleri, kontrollü sıcaklıkta bir su banyosuna alınarak belirli bir sıcaklığa kadar ısıtılmış ve bu koşullarda manyetik karıştırıcı kullanılarak tanımlanan süre boyunca karıştırılmıştır. Böylece TMZ'nin sıvı lipit fazı içerisinde çözünmesi ve homojen bir dağılım göstermesi hedeflenmiştir. Karıştırma sürecinin tamamlanmasının ardından tüpler oda sıcaklığına alınmış ve sistemlerin dengeye ulaşması için belirli bir süre bekletilmiştir. Dengeye ulaşan sıvı lipit–TMZ karışımları, katı lipitlerdeki TMZ çözünürlük çalışmalarına benzer şekilde fiziksel olarak değerlendirilerek faz ayrımı, bulanıklık veya homojen görünüm açısından görsel incelemeye tabi tutulmuştur. Görsel değerlendirme sonrasında, çözelti santrifüj edilerek çözünmeyen faz uzaklaştırılmıştır. Elde edilen süzüntüden alınan numuneler, saf

metanol çözeltisinde seyreltilmiş ve TMZ için belirlenmiş yöntem kullanılarak HPLC'de analiz edilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda, sıvı lipitler için tercih edilecek TMZ:sıvı lipit oranları daraltılmış ve çözünürlük açısından daha avantajlı olan sıvı lipitler ön plana çıkarılmıştır. Seçilen bu sıvı lipitler ve bu lipitlerde elde edilen nicel TMZ çözünürlük verileri, NLT sentezinde kullanılacak sıvı lipit–TMZ oranlarının belirlenmesinde temel alınmıştır.

PTX için tez kapsamında yürütülen çalışmalarda, ticari bir preparat olan Taxatu (Onko İlaç) formundan temin edilmesi ve preparatta PTX'in etanol–hint yağı karışımı içinde çözünmüş halde bulunması nedeniyle, sıvı lipit seçimi değerlendirilirken preparatın taşıyıcı fazı ile formülasyon uyumu önceliklendirilmiştir. Bu doğrultuda, NLT formülasyonlarında sıvı lipit olarak hint yağının kullanılmasına karar verilmiştir.

3.2.2. Temozolomid Stabilite Çalışmaları

TMZ'nin çeşitli katı ve sıvı lipit fazlarındaki çözünürlük çalışmalarından elde edilen veriler, etken maddenin pek çok lipit sistemi içerisinde yer almasına rağmen hidrolitik bozunmaya oldukça yatkın olduğunu ortaya koymuştur. Farklı yapıdaki lipitlerde, değişen sıcaklık ve bekletme sürelerinde yürütülen deneyler sonucunda, özellikle nötr ve hafif bazik koşullarda TMZ'nin zamanla belirgin düzeyde bozunmaya uğradığı belirlenmiştir. Lipit matrisi ile çevrili olmasına rağmen TMZ'nin hidrolitik bozunmasının tam olarak engellenememesi, formülasyon geliştirme sürecinde stabilite parametresini kritik bir sınırlayıcı olarak öne çıkarmıştır. Bu ön bulgular doğrultusunda, TMZ'nin farklı ortam ve koşullardaki kimyasal stabilitesini daha ayrıntılı ve nicel olarak değerlendirmek amacıyla stabilite çalışmaları yürütülmüştür.

Sistemik tedavide uygulanan görece yüksek TMZ dozlarının bir nedeni olarak ilacın hidrolitik bozunmaya yatkın olması gösterilse de, literatürde vücut sıvıları ve TMZ'nin görece stabil çözeltilerdeki davranışının sistematik olarak değerlendirilmesine ilişkin verilerin sınırlı olduğu görülmektedir. Olası formülasyon ve uygulama stratejilerinde nasıl bir yol izlenebileceğine yönelik çıkarımlar yapabilmek amacıyla, TMZ'nin farklı ortam ve koşullarda bozunma davranışını incelemeye yönelik çeşitli deneysel çalışmalar yürütülmüştür. Bu kapsamda, özellikle klinik uygulamalarda bozunmanın şiddetinin ve hızının nicel olarak belirlenebilmesi için, farklı asidik, nötr ve bazik koşulları temsil eden pH aralıklarında TMZ içeren sulu çözeltilerin zamana bağlı davranışı değerlendirilmiştir. Ek olarak, hidrolitik bozunmanın farklı sıcaklıklarda ve çözelti ortamlarında nasıl seyrettiği de karşılaştırmalı olarak incelenmiştir.

TMZ'nin sulu ortamlarda, özellikle nötr ve hafif bazik pH aralıklarında hidrolize uğrayarak MTIC ve devamında AIC ve MDA gibi bozunma ürünlerine dönüştüğü bilinmektedir. NLT formülasyonlarının geliştirilmesi kapsamında, TMZ'nin farklı pH ve sıcaklık koşulları (+4 ºC, 25ºC ve 37ºC) altında stabilitesinin değerlendirilmesi ile TMZ'yi kimyasal bozunmaya karşı ne ölçüde korunabildiğinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu doğrultuda, TMZ içeren çeşitli çözeltiler (PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM (hücre kütür besiyeri)) fizyolojik koşulları ve olası depolama koşullarını temsil eden uygun tampon sistemleri ve sıcaklık aralıklarında belirlenen süreler (15 dk, 30 dk, 45dk, 1s, 1.5s, 2s, 3s, 4s, 5s, 24s, 48s, 72s) boyunca üç tekrarlı deneyler ile inkübe edildikten sonra alınan örneklerde, TMZ ve başlıca bozunma ürünleri, HPLC analizleri ile nicel olarak belirlenmiştir. Elde edilen veriler kullanılarak, TMZ'nin bozunma eğilimleri karşılaştırılmıştır.

3.2.3. Metildiazonyum Çalışmaları

TMZ'nin hidrolitik bozunması sonucunda oluşan başlıca ürünlerden biri de MDA'dır. Bu ürünün kimyasal davranışı, hem TMZ bozunma mekanizmasının anlaşılması hem de olası farmakolojik ve toksikolojik etkilerin değerlendirilmesi açısından önem taşımaktadır. TMZ stabilite çalışmalarında farklı pH, sıcaklık ve çözelti ortamlarında zamana bağlı olarak izlenen bozunma profilleri, yalnızca TMZ derişimindeki azalma üzerinden değil, aynı zamanda oluşan MDA miktarındaki değişim üzerinden de değerlendirilmiştir. Böylece, TMZ'nin bozunma süreci ve ilgili ortam koşullarında MDA'nın görece stabilitesi birlikte ele alınmıştır.

Bu amaçla, TMZ içeren PBS pH 5.8, PBS pH 7.4 ve DMEM çözeltilerinin +4 °C, 25 °C ve 37 °C'de inkübasyonu sırasında, önceden belirlenen zaman noktalarında (15 dk–72 s aralığı) alınan örneklerde MDA derişimleri valide edilmiş HPLC yöntemi kullanılarak nicel olarak belirlenmiştir. Her bir koşul için elde edilen MDA profilleri, aynı örneklerde ölçülen TMZ derişimleri ile değerlendirilerek, farklı pH ve sıcaklık ortamlarında MDA oluşumunun zamana bağlı seyri ortaya konmuştur.

MDA'nın literatürde tanımlanmış biyolojik rolü, uygun koşullarda kanser hücrelerinde DNA metilasyon basamaklarına katılarak hücre döngüsünü baskılayabilmesi ve kontrolsüz proliferasyonu sınırlayabilmesidir. Bu bağlamda TMZ, KBB'yi geçebilen ve hedef dokuda MDA oluşumuna aracılık eden bir ön-ilaç olarak kabul edilmektedir. Böylece MDA'nın hücre bölünmesinin aktif olduğu aşamalarda tümör hücrelerine iletilmesini sağlamaktadır. Ancak bir önceki bölümde de deneysel olarak ortaya konulduğu üzere, TMZ'nin sulu ortamlarda hidrolitik bozunmaya son derece yatkın olması ve KBB'nin yapısal olarak zorlu karakteri, bu yaklaşımın beklenen düzeyde ve sürdürülebilir bir antitümör etkinlik sağlamasını güçleştirmektedir. Bu nedenle, MDA'nın KBB geçişini

kolaylaştırabilecek, aynı zamanda bileşiği dolaşım ve doku mikroçevresinde etkilere karşı koruyabilecek nanotaşıyıcı sistemler aracılığıyla doğrudan taşınmasına yönelik yenilikçi bir formülasyon stratejisinin geliştirilmesi fikri ortaya çıkmıştır.

3.3. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN FORMÜLASYON TASARIMI VE LİPİT KOMBİNASYONLARININ SEÇİMİ

TMZ ve bozunma ürünlerinden MDA'nın KBB'yi geçebilen, hedef dokuya yönlendirilebilir ve kimyasal olarak görece stabil bir formda taşınabilmesi için geliştirilen NLT sistemlerinde, formülasyon tasarımı çok bileşenli ve çok hedefli bir optimizasyon problemi olarak ele alınmıştır. Bu kapsamda, seçilen katı ve sıvı lipitlerin kimyasal yapısı, erime davranışları ve MDA ile olan etkileşimleri; kullanılacak yüzey aktif madde ve yardımcı bileşenlerin KBB geçişi, biyouyumluluk ve kolloidal stabilite üzerindeki etkileri üretim sırasında uygulanacak üretim yöntemi (homojenizasyon ve ultrasonikasyon) koşullarının partikül boyutunu, dağılım genişliğini ve fiziksel stabiliteyi nasıl şekillendirdiği birlikte değerlendirilmiştir.

NLT tasarımında temel hedef, bir yandan taşıyıcı partiküllerin beyin hedefli uygulamalar için uygun boyut aralığında, dar dağılımlı ve uzun süreli kolloidal stabilite gösterecek şekilde hazırlanması; diğer yandan da etken malzemenin lipit matrisi içerisinde yeterli oranda yüklenebilmesi, depolama ve dolaşım koşullarında korunabilmesi ve tümör mikroçevresinde kontrollü bir salım profili sergilemesidir. Bu doğrultuda, formülasyon tasarım prensipleri;

(i) lipit fazının seçimi ve katı:sıvı lipit oranlarının belirlenmesi,
(ii) yüzey aktif madde ve yardımcı faz bileşenlerinin optimizasyonu,
(iii) üretim sürecine ilişkin çeşitli proses parametrelerinin sistematik olarak incelenmesi gerçekleştirilmiştir.

Lipit fazının bileşimi belirlenirken, öncelikle etken maddenin katı ve sıvı lipitler içerisindeki çözünürlük verileri ile önceki bölümlerde sunulan ön formülasyon bulguları birlikte değerlendirilmiştir. Seçilecek katı lipitler; vücut sıcaklığında bozunmayan, oda sıcaklığında katı formda kalarak uzun dönem depolamada fiziksel stabilite sağlayan, ayrıca farmasötik kullanım için kabul görmüş maddeler arasından seçilmiştir. Sıvı lipitler ise hem etken maddenin çözünürlüğünü artıracak hem de katı lipit matrisi içerisinde kontrollü kristal kusurları oluşturarak yükleme kapasitesini yükseltecek şekilde tercih edilmiştir.

Bu doğrultuda, farklı katı ve sıvı lipit çiftleri için karışabilirlik, faz ayrımı eğilimi, oda sıcaklığında yapılarını koruma yetenekleri görsel incelemeler ile karşılaştırılmış; homojen, faz ayrımı göstermeyen ve etken maddenin çözünebildiği kombinasyonlar (MDA için Compritol/OA çifti, PTX için Precirol/Hint Yağı çifti) aday formülasyonlar olarak belirlenmiştir. Ayrıca, seçilen lipit kombinasyonlarının beyin hedefli uygulamalar açısından biyouyumluluğu, literatürdeki kullanım geçmişi ve kabul edilebilirliği de dikkate alınmıştır.

3.4. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN ÜRETİM YÖNTEMLERİ

Bu tez kapsamında tasarlanan NLT sistemlerinin üretiminde, önceki alt bölümlerde ayrıntılı olarak sunulan TMZ'nin katı ve sıvı lipitlerdeki çözünürlük profilleri, TMZ bozunması ve TMZ bozunma ürünü olan MDA'nın çözünürlük çalışmalarından elde edilen bulgular ve NLT formülasyon tasarımı sırasında seçilen lipit kombinasyonları birlikte değerlendirilmiştir. NLT sentezinde temel amaç, seçilen lipit faz içerisinde etkin maddelerin homojen olarak dağılmasını sağlarken, partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve Zeta potansiyeli gibi kritik kalite özelliklerini kontrol edilebilir sınırlar içinde tutmaktır. Bu doğrultuda, Compritol ATO 888/Oleik Asit ve Precirol ATO 5/Hint yağı lipit çiftleri için sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon temelli olmak üzere iki farklı üretim yaklaşımı değerlendirilmiştir. Bu bölümde tanımlanan üretim stratejileri, izleyen bölümlerde ayrıntılandırılan NLT formülasyonlarının stabilite değerlendirmesi ile etken madde yüklü NLT sistemlerinin hazırlanması, karakterizasyonu ve in vitro salım çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

Sıcak homojenizasyon yaklaşımında, lipit faz eriyik haldeyken sulu faz ile yüksek kesme kuvvetleri altında karıştırılarak emülsiyon oluşturulmaktadır. Ultrasonikasyon yönteminde ise ultrasonikasyon yoluyla damlacıklarının daha küçük ve daha dar dağılımlı partiküller oluşturulması hedeflemektedir. NLT üretiminde kullanılan homojenizasyon hızı, işlem süresi, sıcaklık ve ultrasonikasyon koşulları gibi proses parametreleri sistematik olarak incelenmiş ve her iki lipit sistemi için de optimize edilmiştir.

3.4.1. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compitol/OA) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi

Compritol ATO 888/Oleik Asit (Compitol/OA) sistemlerinde, etken maddenin hem katı hem de sıvı lipit fazdaki çözünürlük profilleri ve NLT formülasyon tasarımı kapsamında yapılan değerlendirmeler sonucunda, katı lipit olarak Compritol ATO 888 ve sıvı lipit olarak oleik asit içeren kombinasyon temel NLT taşıyıcı sistemi olarak tercih edilmiştir. Compritol ATO 888'in yüksek erime sıcaklığına sahip gliserit yapısı ile oleik asidin tekli doymamış yağ asidi içeriği, etken maddenin lipit faza alınmasını kolaylaştırarak kolloidal ölçekte kararlı partikül oluşumuna imkân tanımaktadır.

Çözünürlük verileri ve ön formülasyon çalışmaları birlikte değerlendirildiğinde, Compitol/OA sisteminin ilaç taşınımında kullanılmaya elverişli bir NLT taşıyıcı adayı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle formülasyon ve proses parametrelerinin sistematik olarak incelenmesi ve optimize edilmesine yönelik çalışmalar planlanmıştır (Tablo 3.2).

Compitol/OA NLT sistemlerinin hazırlanmasında, sentez yöntemlerinden biri olarak seçilen sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, Compritol ATO 888 ve oleik asit uygun oranlarda tartılarak birlikte ısıtılmış; Compritol'ün erime sıcaklığının yaklaşık 10 °C üzerinde, 85 °C'de sabit tutularak homojen bir lipit faz elde edilmiştir. Aynı sıcaklığa getirilen, yüzey aktif madde içeren sulu faz, eriyik lipit fazın üzerine kontrollü olarak ilave edilmiş ve eş zamanlı olarak yüksek kesme kuvveti (25000 rpm) uygulanarak lipit damlacıklarının sulu ortamda dağılması sağlanmıştır. Bu aşamada karıştırma hızı, işlem süresi ve sıvı lipit/toplam lipit oranı gibi proses parametreleri, ön denemeler ile etken maddenin Compitol/OA sistemindeki çözünürlüğü ve NLT formülasyon tasarımı kapsamında yapılan değerlendirmeler doğrultusunda belirlenmiştir. Sıcak homojenizasyon adımının ardından elde edilen sıcak emülsiyon, kontrollü biçimde soğutularak Compritol ATO 888'in yeniden katı faza geçmesi sağlanarak oleik asit ile birlikte nanoyapılı katı/sıvı lipit matrisi oluşturan NLT partikülleri elde edilmiştir. Üretim süreci boyunca toplam lipit miktarı ve sulu faz oranı sabit tutularak, Compritol/OA sistemlerinde partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkilerin öncelikle proses koşulları üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

NLT sentezine etki eden formülasyon ve proses parametrelerinin istatistiksel olarak modellenmesi ve optimizasyonu için Design-Expert yazılımı kullanılarak üç faktörlü, üç seviyeli bir Box–Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Tasarımda bağımsız değişkenler olarak sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı, yüzey aktif madde yüzdesi ve işlem süresi seçilmiş; sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı için %10, %30 ve %50 oranları belirlenmiş, yüzey aktif madde yüzdesi %0.5, %1.5 ve %2.5, işlem süresi için ise 1, 3 ve 5 dakikalık süreler değerlendirilmiştir. Bu değişkenler dışında kalan tüm deney koşulları sabit tutulmuş; formülasyonlar sıcaklık kontrollü koşullar altında, homojenizatör kullanılarak sıcak homojenizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Üç faktörlü Box–Behnken tasarımı toplam 17 deney koşulundan oluşmuş, bunların 12'si faktör seviyelerinin farklı kombinasyonlarını, 5'i ise sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı % 30, yüzey aktif madde yüzdesi %1,5 ve işlem süresi 3 dakika olacak şekilde merkez noktası tekrarlarını içermiştir. Merkez noktaları, deneysel hatanın ve sistemin tekrarlanabilirliğinin belirlenmesi amacıyla tasarıma dâhil edilmiştir. Her bir deney koşulunda partikül boyutu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) olmak üzere üç farklı yanıt değişkeni ölçülmüş ve elde edilen veriler yanıt yüzey yöntemi kapsamında istatistiksel olarak

değerlendirilmiştir. Böylece Compitol/OA temelli NLT sistemlerinin kritik kalite özellikleri ile formülasyon/proses parametreleri arasındaki ilişkilerin nicel olarak ortaya konması hedeflenmiştir.

Tablo 3.2: Compitol/OA formülasyonu için Sıcak Homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)
Com/OA 1	30	1.5	3
Com/OA 2	30	1.5	3
Com/OA 3	30	1.5	3
Com/OA 4	30	2.5	1
Com/OA 5	30	1.5	3
Com/OA 6	10	1.5	5
Com/OA 7	10	2.5	3
Com/OA 8	50	1.5	5
Com/OA 9	10	0.5	3
Com/OA 10	30	2.5	5
Com/OA 11	30	0.5	5
Com/OA 12	50	2.5	3
Com/OA 13	10	1.5	1
Com/OA 14	50	0.5	3
Com/OA 15	30	1.5	3
Com/OA 16	30	0.5	1
Com/OA 17	50	1.5	1

3.4.2. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi

Precirol ATO 5/Hint yağı (Precirol/Hint Yağı) sistemlerinde etken maddenin sıvı ve katı lipitlerdeki çözünürlük profilleri ile NLT formülasyon tasarımı kapsamında yapılan değerlendirmeler sonucunda, katı lipit olarak Precirol ATO 5 ve sıvı lipit olarak Hint yağı içeren sistemler alternatif bir NLT taşıyıcı matrisi olarak seçilmiştir. Precirol ATO 5'in farklı zincir uzunluklarına sahip yağ asitleri içeren yapısı ile Hint yağının sıvı lipit fazda sağladığı hem etkin maddenin lipit fazdaki çözünürlüğünü

artırma hem de partikül iç morfolojisini istenen şekilde düzenleme potansiyeli nedeniyle tercih edilmiştir. Böylece, Compritol ATO 888/oleik asit sistemine kıyasla farklı bir katı/sıvı lipit organizasyonu üzerinden NLT yapılarının karşılaştırmalı olarak incelenmesi amaçlanmıştır (Tablo 3.3).

Precirol ATO 5/Hint yağı sistemlerinin hazırlanmasında sıcak homojenizasyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla, Precirol ATO 5 ve Hint yağı uygun oranlarda tartılarak birlikte ısıtılmış ve Precirol ATO 5'in erime sıcaklığının yaklaşık 10 °C üzerinde, 75 °C'de sabit tutularak homojen bir lipit faz elde edilmiştir. Aynı sıcaklığa getirilen, yüzey aktif madde içeren sulu faz, eriyik lipit fazın üzerine kontrollü olarak ilave edilmiş ve eş zamanlı olarak yüksek kesme kuvveti uygulanarak lipit damlacıklarının sulu ortamda dağılması sağlanmıştır. Bu aşamada, karıştırma hızı, işlem süresi ve sıvı lipit/ toplam lipit oranı gibi proses parametreleri, ön denemeler sonucu yapılan değerlendirmeler ve Compritol/OA sistemi ile benzerlik gösterebilecek şekilde planlanmıştır. Sıcak homojenizasyon adımının ardından elde edilen sıcak emülsiyon, kontrollü bir şekilde soğutularak Precirol ATO 5'in yeniden katı faza geçmesi sağlanarak Hint yağı ile birlikte nanoyapılı katı/sıvı lipit matrisi oluşturan NLT partikülleri elde edilmiştir. Üretim boyunca, toplam lipit miktarı ve sulu faz oranları sabit tutularak, Precirol/Hint yağı sistemlerinde partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli üzerindeki etkilerin öncelikle proses koşulları üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu başlık altında tanımlanan üretim koşulları, izleyen bölümlerde ayrıntılı olarak sunulan Precirol/Hint yağı bazlı NLT formülasyonlarının stabilite ve etken madde yükleme çalışmalarının temelini oluşturmaktadır.

Precirol ATO 5/Hint yağı sistemlerinde formülasyon ve proses parametrelerinin optimizasyonu için, Compritol/OA sistemine benzer şekilde Design-Expert yazılımı kullanılarak üç faktörlü, üç seviyeli bir Box–Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Tasarımda bağımsız değişkenler olarak sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı, yüzey aktif madde yüzdesi ve işlem süresi seçilmiş; sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı için %10, %30 ve %50 oranları belirlenmiş, yüzey aktif madde yüzdesi için %0.5, %1.5 ve %2.5, işlem süresi için ise 1, 3 ve 5 dakikalık süreler değerlendirilmiştir. Bu değişkenler dışında kalan tüm deney koşulları sabit tutulmuş; formülasyonlar sıcaklık kontrollü koşullar altında, homojenizatör kullanılarak sıcak homojenizasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Tasarım toplam 17 deney koşulundan oluşmakta olup, bunların 12'si faktör seviyelerinin farklı kombinasyonlarını, 5'i ise Precirol/Hint yağı sisteminin seçilen referans bileşimi, yüzey aktif madde yüzdesi ve işlem süresini temsil eden merkez noktası tekrarlarını içermektedir. Her bir deney koşuluna karşılık hazırlanan NLT süspansiyonlarında partikül boyutu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) yanıt değişkenleri olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler yanıt yüzey yöntemi kapsamında analiz edilerek, Precirol/Hint yağı içeren optimize NLT formülasyonları için uygun çalışma aralığı belirlenmiştir.

Tablo 3.3: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için Sıcak Homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)
Pre/Hint 1	50	1.5	5
Pre/Hint 2	50	2.5	3
Pre/Hint 3	30	0.5	1
Pre/Hint 4	30	1.5	3
Pre/Hint 5	30	2.5	1
Pre/Hint 6	10	1.5	1
Pre/Hint 7	50	0.5	3
Pre/Hint 8	30	0.5	5
Pre/Hint 9	30	1.5	3
Pre/Hint 10	10	1.5	5
Pre/Hint 11	30	2.5	5
Pre/Hint 12	50	1.5	1
Pre/Hint 13	30	1.5	3
Pre/Hint 14	10	2.5	3
Pre/Hint 15	30	1.5	3
Pre/Hint 16	30	1.5	3
Pre/Hint 17	10	0,5	3

3.4.3. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi

Compitol/OA sistemlerinde, etken maddenin katı ve sıvı lipit fazdaki çözünürlük profilleri ile NLT formülasyon tasarımı kapsamında yapılan değerlendirmeler sonucunda, katı lipit olarak Compritol ATO 888 ve sıvı lipit olarak oleik asit içeren kombinasyon temel NLT taşıyıcı matrisi olarak benimsenmiştir. Compritol ATO 888'in yüksek erime sıcaklığına sahip gliserit yapısı ile oleik asidin tekli doymamış yağ asidi içeriğinin birlikte sağladığı lipofilik ortam, etken maddenin lipit faza alınmasını kolaylaştırmakta ve kolloidal ölçekte kararlı partikül oluşumunu desteklemektedir. Bu doğrultuda, Compritol/OA bazlı NLT sistemlerinde ultrasonikasyon temelli üretim koşullarının,

partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır (Tablo 3.4).

Compitol/OA sistemlerinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanmasında, sıcak homojenizasyon sonrasında uygulanan alternatif bir nanopartikül üretim basamağı olarak prob tipi ultrasonikasyon kullanılarak NLT süspansiyonları elde edilmiştir. Bu amaçla, Compritol ve oleik asit içeren lipit faz, önce Compritol'ün erime sıcaklığının yaklaşık 10 °C üzerinde, 85 °C'de sulu faz ile birlikte kaba bir emülsiyon oluşturacak şekilde karıştırılmış, ardından aynı sıcaklık aralığı korunarak ultrasonik işlem uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi, ısınmayı sınırlamak ve enerji girişini kontrollü hâle getirmek amacıyla darbeli modda, 2 saniyelik ultrasonik darbe ve ardından 4 saniyelik bekleme sürelerinden oluşan çevrimler şeklinde yürütülmüştür. Bu süreçte yüzey aktif madde % 'si, toplam ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti, NLT süspansiyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkilerini inceleyebilmek üzere sistematik olarak değiştirilmiştir. Üretim boyunca sıvı lipit miktarı (%50), toplam lipit miktarı ve sulu faz oranı sabit tutulmuş, Compritol/OA sistemlerinde gözlenen farklılıkların öncelikle ultrasonikasyon parametrelerinden kaynaklanmasının sağlanması amaçlanmıştır.

Compritol/OA ultrasonikasyon işlemi ile NLT sentezine etki eden formülasyon ve proses parametrelerinin istatistiksel olarak modellenmesi ve optimizasyonu için Design-Expert yazılımı kullanılarak üç faktörlü, üç seviyeli bir Box–Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Bu tasarımda bağımsız değişkenler olarak yüzey aktif madde %'si, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti seçilmiş; yüzey aktif madde %'si %0.5, %1.5 ve %2.5 olarak belirlenmiş olup, ultrasonikasyon süresi için 1, 3 ve 5 dakikalık seviyeler ve ultrasonikasyon şiddeti için ise %10, %25 ve %40 olmak üzere üç farklı seviye olarak değerlendirilmiştir. Bu değişkenler dışında kalan tüm deney koşulları sabit tutularak formülasyonlar sıcaklık kontrollü koşullar altında, prob tipi ultasonikatör kullanılarak darbeli ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Üç faktörlü Box–Behnken tasarımı toplam 17 deney koşulundan oluşmuş, bunların 12'si faktör seviyelerinin farklı kombinasyonlarını, 5'i ise seçilen referans sıvı lipit/toplam lipit oranı, ultrasonikasyon süresi ve şiddetini temsil eden merkez noktası tekrarlarını içermiştir. Her bir deney koşulunda partikül boyutu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) yanıt değişkenleri olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler yanıt yüzey yöntemi kapsamında istatistiksel olarak değerlendirilerek, Compritol/OA temelli NLT sistemlerinin ultrasonikasyon koşulları ile kritik kalite özellikleri arasındaki ilişkilerin nicel olarak ortaya konması hedeflenmiştir.

Tablo 3.4: Compritol/OA formülasyonu için Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)
Com/OA 1	1.5	3	10
Com/OA 2	2.5	2	40
Com/OA 3	0.5	1	25
Com/OA 4	1.5	1	40
Com/OA 5	1.5	2	25
Com/OA 6	2.5	3	25
Com/OA 7	1.5	2	25
Com/OA 8	1.5	2	25
Com/OA 9	0.5	3	25
Com/OA 10	2.5	2	10
Com/OA 11	1.5	1	10
Com/OA 12	1.5	3	40
Com/OA 13	1.5	2	25
Com/OA 14	2.5	1	25
Com/OA 15	0.5	2	10
Com/OA 16	1.5	2	25
Com/OA 17	0.5	2	40

3.4.4. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi

Precirol/Hint yağı sistemlerinde etken maddenin sıvı ve katı lipitlerdeki çözünürlük profilleri ile NLT formülasyon tasarımı kapsamında yapılan değerlendirmeler sonucunda, katı lipit olarak Precirol ATO 5 ve sıvı lipit olarak Hint yağı içeren kombinasyon, Compritol/Oleik Asit sistemine alternatif bir NLT taşıyıcı matrisi olarak belirlenmiştir. Precirol'ün farklı zincir uzunluklarına sahip yağ asitleri içeren gliserit yapısı ile Hint yağının sıvı lipit fazda sağladığı, etken maddenin lipit fazdaki çözünürlüğünü artırma ve partikül iç morfolojisini istenen şekilde düzenleme potansiyeli, bu kombinasyonun tercih edilmesinde belirleyici olmuştur. Bu doğrultuda, Precirol/Hint yağı bazlı NLT sistemlerinde ultrasonikasyon temelli üretim koşullarının, partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır (Tablo 3.5).

Precirol/Hint yağı sistemlerinin ultrasonikasyon yöntemi ile hazırlanmasında, sıcak homojenizasyon sonrasında uygulanan tamamlayıcı bir partikül küçültme basamağı olarak prob tipi ultrasonikasyon kullanılmıştır. Bu amaçla, Precirol ve Hint yağı içeren lipit faz, önce Precirol'ün erime sıcaklığının yaklaşık 10 °C üzerinde, 75 °C'de, yüzey aktif madde içeren sulu faz ile birlikte kaba bir emülsiyon oluşturacak şekilde karıştırılmış, ardından aynı sıcaklık aralığı korunarak ultrasonik işlem uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi, sistemde aşırı ısınmayı sınırlamak ve enerji girişini kontrollü hâle getirmek amacıyla darbeli modda, 2 saniyelik ultrasonik darbe ve 4 saniyelik bekleme sürelerinden oluşan çevrimler hâlinde yürütülmüştür. Bu süreçte yüzey aktif madde %'si, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti, Precirol/Hint yağı bazlı NLT süspansiyonlarının partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkilerini inceleyebilmek üzere sistematik olarak değiştirilmiştir. Üretim boyunca toplam lipit miktarı, sulu faz oranı sabit tutularak gözlenen farklılıkların öncelikle ultrasonikasyon parametrelerinden kaynaklanması hedeflenmiştir.

Precirol/Hint yağı ultrasonikasyonunda NLT sentezine etki eden formülasyon ve proses parametrelerinin istatistiksel olarak modellenmesi ve optimizasyonu için Design-Expert yazılımı kullanılarak üç faktörlü, üç seviyeli bir Box–Behnken deney tasarımı uygulanmıştır. Bu tasarımda bağımsız değişkenler olarak sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti seçilmiş; sıvı lipit miktarı/toplam lipit miktarı için %10, %30 ve %50 oranları belirlenmiş, ultrasonikasyon süresi için 1, 3 ve 5 dakika ve ultrasonikasyon şiddeti için ise %10, %20 ve %30 olmak üzere üç farklı seviye değerlendirilmiştir. Bu değişkenler dışında kalan tüm deney koşulları (sıvı lipit miktarı (%50), toplam lipit miktarı ve sulu faz oranı) sabit tutulmuş; formülasyonlar sıcaklık kontrollü koşullar altında, prob tipi ultrasonik homojenizatör kullanılarak darbeli ultrasonikasyon yöntemiyle hazırlanmıştır. Üç faktörlü Box–Behnken tasarımı toplam 17 deney koşulundan oluşmuş, bunların 12'si faktör seviyelerinin farklı kombinasyonlarını, 5'i ise Precirol/Hint yağı sisteminin seçilen referans sıvı lipit/toplam lipit oranı, ultrasonikasyon süresi ve şiddetini temsil eden merkez noktası tekrarlarını içermiştir. Her bir deney koşulunda partikül boyutu (nm), PDI ve zeta potansiyeli (mV) yanıt değişkenleri olarak ölçülmüş ve elde edilen veriler yanıt yüzey yöntemi kapsamında istatistiksel olarak değerlendirilerek, Precirol/Hint yağı temelli NLT sistemlerinin ultrasonikasyon koşulları ile kritik kalite özellikleri arasındaki ilişkilerin nicel olarak ortaya konması hedeflenmiştir.

Tablo 3.5: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin üretim parametrelerine ait Design Expert çalışması tablosu.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)
Pre/Hint 1	1.5	3	10
Pre/Hint 2	2.5	2	40
Pre/Hint 3	0.5	1	25
Pre/Hint 4	1.5	1	40
Pre/Hint 5	1.5	2	25
Pre/Hint 6	2.5	3	25
Pre/Hint 7	1.5	2	25
Pre/Hint 8	1.5	2	25
Pre/Hint 9	0.5	3	25
Pre/Hint 10	2.5	2	10
Pre/Hint 11	1.5	1	10
Pre/Hint 12	1.5	3	40
Pre/Hint 13	1.5	2	25
Pre/Hint 14	2.5	1	25
Pre/Hint 15	0.5	2	10
Pre/Hint 16	1.5	2	25
Pre/Hint 17	0.5	2	40

3.4.5. Optimize NLT Formülasyonlarının Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen taşıyıcı sistemler için optimize NLT formülasyonlarının belirlenmesi ve stabilite değerlendirmeleri adına Bölüm 3.4.1–3.4.4 alt başlıklarında gerçekleştirilen çalışmalar ile, Compritol/Oleik Asit ve Precirol/Hint yağı lipit çiftleri için sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon temelli üretim yaklaşımları kapsamında yürütülen Box–Behnken deney gerçekleştirilmiştir. Tasarımlardan elde edilen partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli yanıtları, yanıt yüzey yöntemi kullanılarak Design-Expert yazılımında birlikte değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sürecinde, NLT'lerin üretim süreçlerine dair öngörüler ile kalite özelliklerini iyileştirmeye yönelik olarak düşük partikül boyutu ve PDI'nin minimize edilmesi, zeta potansiyelinin ise kolloidal stabiliteyi destekleyecek özelliklerde olması yanı sıra deneysel tekrarlar üzerinden modelin tekrarlanabilirliği ve

hata payı dikkate alınmıştır. Çoklu-yanıt optimizasyonu sonucunda, her bir lipit sistemi ve üretim yaklaşımı için en uygun formülasyon/proses parametre kombinasyonları optimum koşullar olarak belirlenmiş ve seçilen bu koşullar doğrulama deneyleri ile test edilmiştir. Elde edilen optimum sentez süreçlerine ait parametreler ilaç yükleme çalışmalarının (MDA ve PTX) temelini oluşturmaktadır.

3.4.6. Optimizasyon ve Karakterizasyon İşlemlerinde Kullanılan Cihazlar ve Analiz Yöntemleri

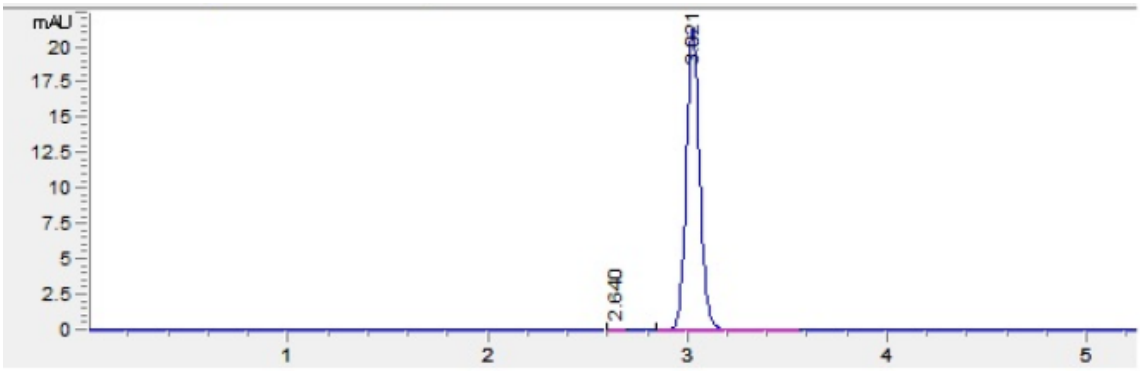
3.4.6.1. Dinamik Işık Saçılımı Yöntemi ile Sentezlenmiş NLT'lerin Partikül Boyutu, PDI ve Zeta Potansiyeli Analizleri

Sentezlenen NLT dispersiyonlarının hidrodinamik partikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve Zeta Potansiyeli değerleri dinamik ışık saçılım (DLS, Malvern Nano ZS90, Birleşik Krallık) cihazında analiz edilmiştir. Ölçüm öncesinde NLT örneklerine ait çözeltiler ultra saf su ile 1/50 oranında seyreltilmiştir. Hazırlanan örnekler tek kullanımlık polistiren küvetlere aktarılmış ve ölçümler 20 °C'de gerçekleştirilmiştir. Partikül boyutu sonuçları Z-ortalama hidrodinamik çap (nm) ve boyut dağılımı üzerinden değerlendirilmiştir. PDI değerleri kümülan analiz yaklaşımı ile hesaplanmıştır. Zeta potansiyeli ölçümleri için numuneler elektroforetik hareketlilik verilerinden zeta potansiyeli değerleri Smoluchowski yaklaşımı kullanılarak (mV) hesaplanmıştır. Her numune için en az üç tekrar ölçüm yapılmış ve sonuçlar ortalama ± standart sapma olarak ifade edilmiştir.

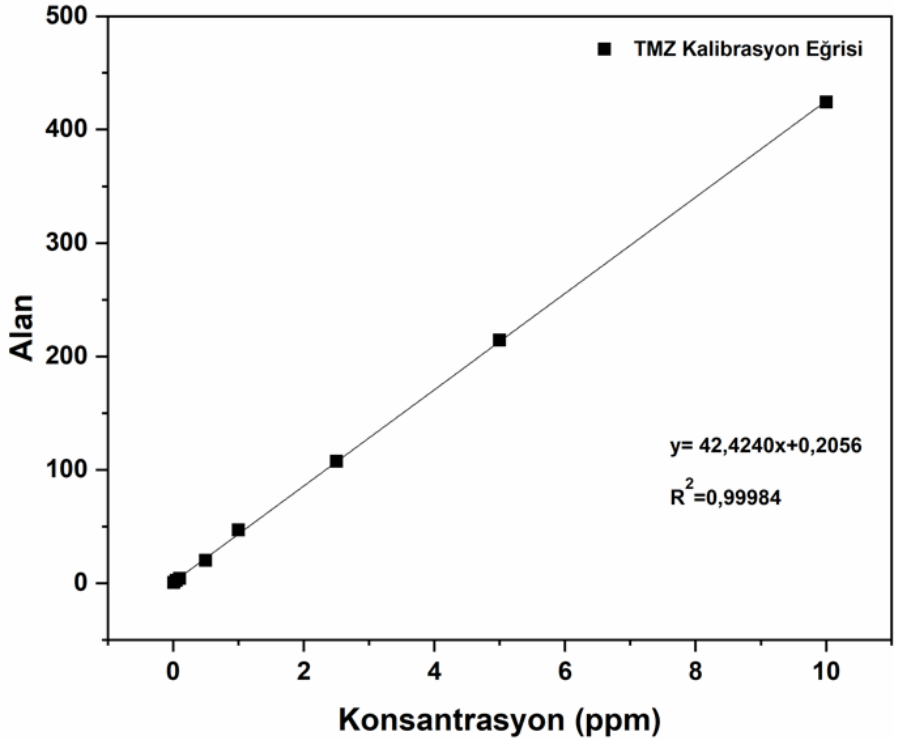
3.4.6.2. Tedavide Kullanılan Etken Maddeler için Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Analizleri

Tez kapsamında kullanılan etken maddelerin miktar tayini ve kromatografik saflıklarının değerlendirilmesi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC, Agilent 1260 Infinity, ABD) yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Analizlerde C18 (Thermo Fisher Scientific, ABD) ters faz kolon üzerinde yürütülmüş; etken maddelere ait kromatografik pikler DAD dedektör ile her bir etken maddenin maksimum absorbans verdiği dalga boyunda izlenmiştir. Yöntem geliştirme sürecinde; etken madde pikinin simetrisi, alıkonma zamanı, pik ayrımı ve baz çizgisi kararlılığı dikkate alınarak mobil faz bileşimi, pH, akış hızı ve kolon sıcaklığı gibi parametreler optimize edilmiştir.

TMZ'nin kalitatif ve kantitatif analizleri için geliştirilen metoda göre mobil faz 30:70 (metanol: su (%0.5 asetik asit, v/v)) olarak belirlenmiş; akış hızı 1.0 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C ve dedektör dalga boyu 330 nm olarak uygulanmıştır. Kromatogramda TMZ piki yaklaşık 3 dk alıkonma süresi sonunda kolonu terk etmiştir (Şekil 3.2). Kantifikasyon için, çeşitli TMZ konsantrasyonlarına (0.01 ppm; 0.05 ppm; 0.1 ppm; 0.5 ppm; 1 ppm; 2.5 ppm; 5 ppm; 10 ppm) karşılık elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş; her konsantrasyon düzeyine ait tekrarların ortalama ve standart sapmaları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi Şekil 3.3'te sunulmuştur.

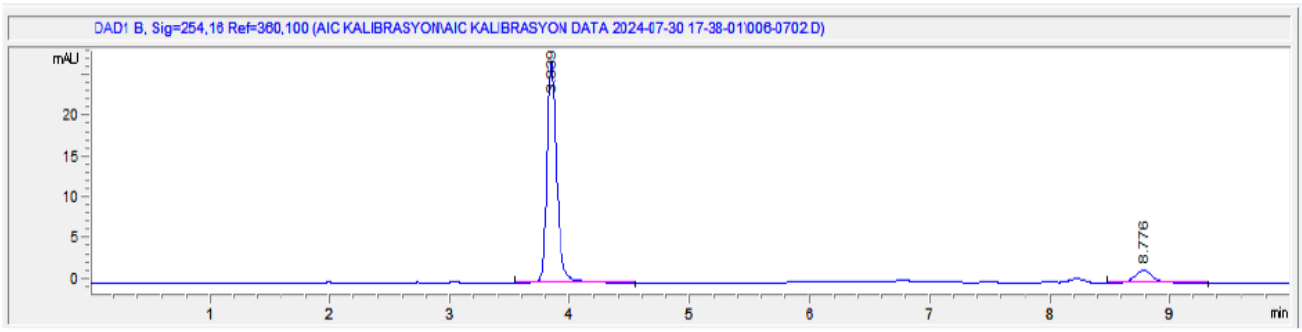


Şekil 3.2: 2.5 ppm konsantrasyona sahip TMZ çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği.

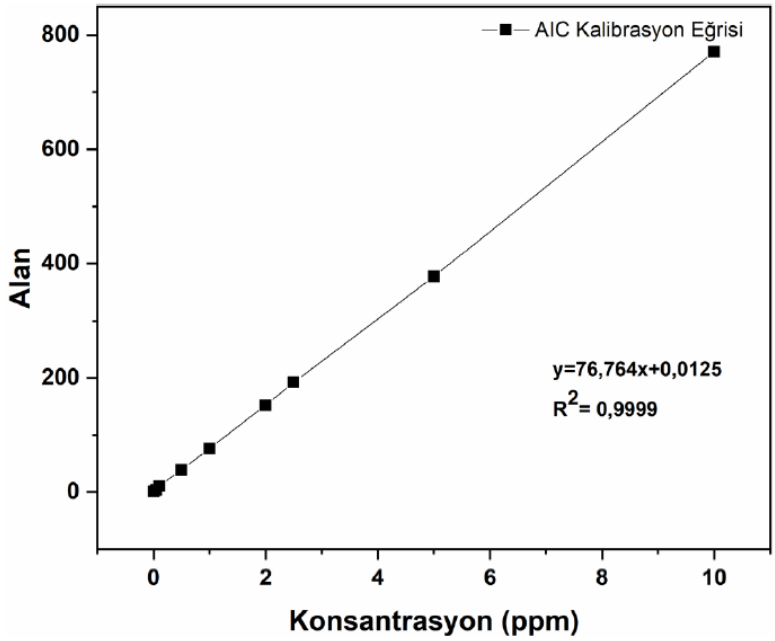


Şekil 3.3: HPLC verilerinden hazırlanan TMZ kalibrasyon eğrisi.

TMZ'nin bozunma ürünü olan AIC'nin (5-aminoimidazole-4-carboxamide) için oluşturulan HPLC metodunda mobil faz 30:70 (metanol: su (%0.5 asetik asit, v/v)) olarak belirlenmiş; akış hızı 1.0 mL/dk, kolon sıcaklığı 35 °C ve dedektör dalga boyu 254 nm olarak uygulanmıştır. Kromatogramda AIC piki yaklaşık 3.8 dk alıkonma süresi sonunda kolondan ayrılmıştır (Şekil 3.4). Çeşitli AIC konsatrasyonlarına (0.01 ppm; 0.05 ppm; 0.1 ppm; 0.5 ppm; 1 ppm; 2.5 ppm; 5 ppm; 10 ppm) karşılık pik alanlarından kalibrasyon eğrisi (Şekil 3.5) oluşturulmuş ve MDA tayininde referans olarak kullanılmıştır.

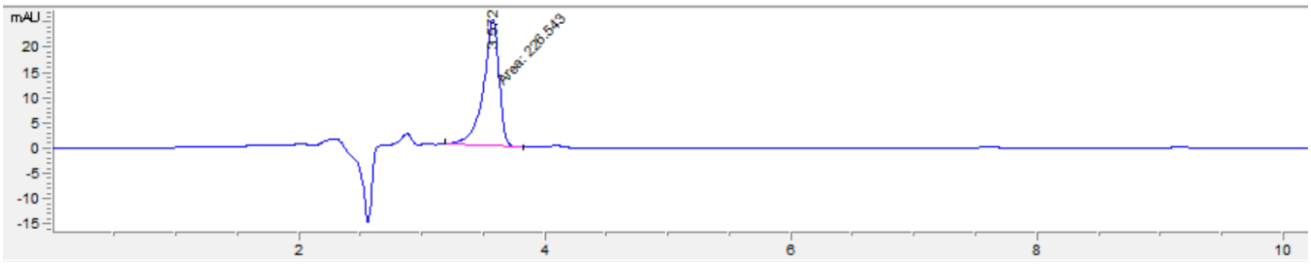


Şekil 3.4: 0.5 ppm konsantrasyona sahip AIC çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği.

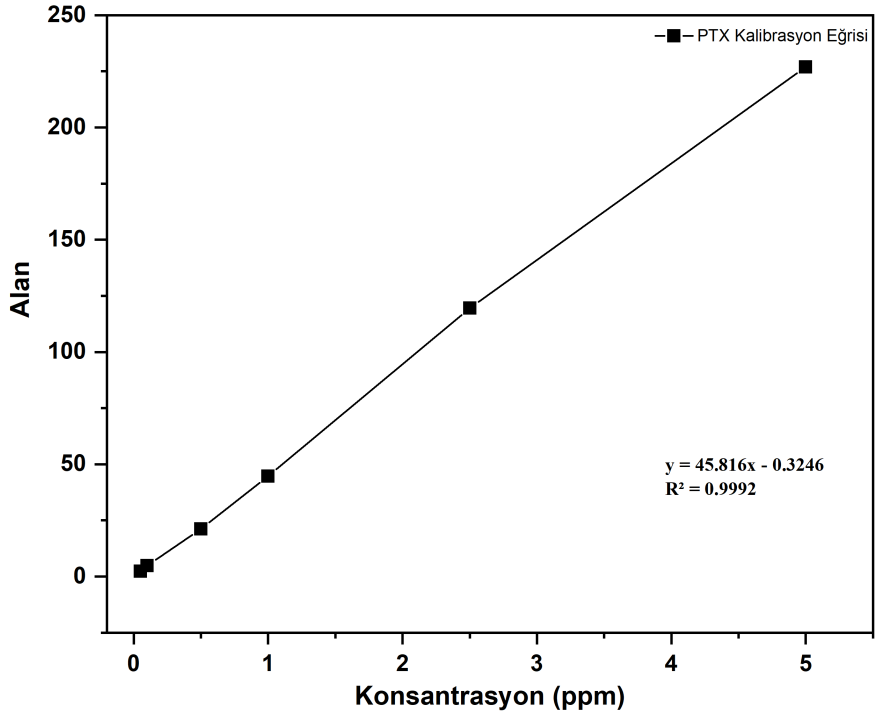


Şekil 3.5: HPLC verilerinden hazırlanan AIC kalibrasyon eğrisi.

PTX'in kalitatif ve kantitatif analizleri için geliştirilen metoda göre mobil faz 70:30 (asetonitril: su (%0.1 asetik asit, v/v)) olarak belirlenmiş; akış hızı 1.0 mL/dk, kolon sıcaklığı 40 °C ve dedektör dalga boyu 228 nm olarak uygulanmıştır. Kromatogramda PTX piki yaklaşık 3.2 dk alıkonma süresi sonunda kolondan ayrılmıştır (Şekil 3.6). Miktar belirlemek için, çeşitli PTX konsantrasyonlarına (0.05 ppm; 0.1 ppm; 0.5 ppm; 1 ppm; 2.5 ppm; 5 ppm) karşılık elde edilen pik alanlarından kalibrasyon eğrisi oluşturulmuş; her konsantrasyon düzeyine ait tekrarların ortalama ve standart sapmaları hesaplanarak kalibrasyon eğrisi ve eğri denklemi Şekil 3.7'e sunulmuştur.



Şekil 3.6: 5 ppm konsantrasyona sahip PTX çözeltisine ait HPLC kromatografi grafiği.



Şekil 3.7: HPLC verilerinden hazırlanan PTX kalibrasyon eğrisi.

3.4.6.3. NLT'ler için Diferansiyel Taramalı Kalorimetri (DSC) Analizleri

NLT'lerin termal davranışının ve lipit matrisinin kristallenme/erime özelliklerinin değerlendirilmesi amacıyla diferansiyel taramalı kalorimetri (DSC, Nexta200, Hitachi, Japonya) analizleri gerçekleştirilmiştir. DSC ölçümleri ile formülasyonlarda yer alan katı lipidin erime geçiş sıcaklığı (Tm), olası polimorfik geçişler ve erime entalpisi (ΔH) belirlenerek; NLT yapısının katı lipit matrisindeki kristalinlik derecesi ve formülasyon bileşenlerinin termal özelliklere etkisi incelenmiştir.

Bilinen miktarda alınan örnekler referans krozeye karşı inert atmosfer altında belirlenen sıcaklık aralığında (-45 °C - 80 °C) ve sabit ısıtma hızında (2 °C/dk) analiz edilmiştir. Termogramlardan erime entalpileri hesaplanmış; NLT örneklerinin kristallilik düzeyi, uygun bir referans üzerinden (formülasyondaki sıvı lipit olmayan katı lipit fraksiyonu dikkate alınarak) göreli kristallilik-partikül boyutu ilişkisi sunulmuştur.

3.4.6.4. Sentezlenen NLT'lerin Kimyasal Karakterizasyonları (FTIR)

NLT formülasyonlarının kimyasal bileşimini doğrulamak, bileşenlere ait karakteristik bantları incelemek ve etken maddelerin lipit matrisi ile olası etkileşimlerini değerlendirmek amacıyla FTIR (Jasco, FTIR 4700, Japonya) analizi yapılmıştır. Bu kapsamda katı/sıvı lipitler, yüzey aktif madde, etken maddeler ile blank ve etken madde yüklü NLT örneklerine ait spektrumlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. FTIR ölçümleri ATR modunda gerçekleştirilmiş; örnekler analiz öncesinde 0,5 mBar basınç altında −50 °C'de 24 saat kurutulmuştur.

3.4.6.5. İlaç Yüklü NLT'lerin Etken Malzeme Yükleme Kapasitesini Belirlenmesi

Tez kapsamında sentezlenen yapıları içerisine etken malzemenin ne ölçüde dahil edilebildiğinin nicel olarak ortaya konulması amacıyla, İlaç yüklü NLT formülasyonları için enkapsülasyon etkinliği (%EE) **ve** ilaç yükleme kapasitesi (% DLC) hesaplanmıştır. %EE, hazırlama sürecinde formülasyona eklenen toplam ilaç miktarının hangi oranının nanopartikül matrisi içerisinde tutulabildiğini ifade ederken; %DLC, nanopartikülün toplam kütlesi içerisinde MDA'nın ağırlıkça payını göstermektedir. Bu iki parametre, hem formülasyonun taşıma kapasitesini hem de salım hızını ve plato davranışını yorumlayabilmek açısından kritik önemdedir.

Enkapsüle olmayan ilaç miktarını belirlemek üzere ilaç yüklü NLT dispersiyonun alınan örnek 12000 Da gözenek çapına sahip Amicon (Sigma Aldrich) filtrede 7500 rpm hızda 20 dk santrifüj edilerek filtre altında kalan serbest faz ayrıştırılmış ve serbest ilaç miktarı HPLC ile nicel olarak tayin edilmiştir. Bu kapsamda, başlangıçta formülasyona eklenen toplam ilaç miktarı ve santrifüj sonrası sulu fazda bulunan serbest ilaç miktarı olarak tanımlanmış; nanopartikül içinde tutulduğu kabul edilen ilaç miktarı ise analiz edildikten sonra %EE ve %DLC değerleri aşağıdaki eşitliklerle belirlenmiştir:

$$\%EE = \left(\frac{M_{\text{toplam}} - M_{\text{serbest}}}{M_{\text{toplam}}}\right) \times 100$$

$$\%DLC = \left(\frac{M_{\text{toplam}} - M_{\text{serbest}}}{M_{\text{lipit}} + (M_{\text{toplam}} - M_{\text{serbest}})}\right) \times 100$$

3.4.6.6. Optimize NLT'ler için TEM Analizi

Optimize NLT formülasyonlarının morfolojisinin, partikül şeklinin ve birincil partikül boyutunun doğrudan gözlemlenebilmesi amacıyla transmisyon (geçirimli) elektron mikroskobu (TEM) analizi gerçekleştirilmiştir. TEM görüntüleri ile NLT'lerin görünümleri, olası aglomerasyon eğilimi ve

partikül boyut dağılımının nitel değerlendirmesi yapılmış; elde edilen boyutlar DLS ile belirlenen hidrodinamik boyut sonuçları ile karşılaştırmalı olarak yorumlanmıştır.

TEM analizi öncesinde sentezlenen optimize NLT dispersiyonları, görüntü kalitesini artırmak ve istenmeyen üst üste binmeleri azaltmak amacıyla ultra saf su ile 1/1000 oranında seyreltilmiştir. Seyreltilmiş numune TEM gridlerine aktarılmış ve gridler oda koşullarında kurutulmuştur. Kontrast artırımı amacıyla negatif boyama basamağında, kuruyan gridler %2 (w/v) fosfotungstik asit çözeltisi içerisinde 1 dk bekletilmiş; ardından boya uzaklaştırılarak gridler tekrar oda koşullarında kurutulmuş ve TEM (JEOL, JEM-1011, Japonya) cihazında incelenmiştir.

3.4.6.7. NLT'ler için X-ışını Difraktometresi (XRD) Analizi

NLT formülasyonlarının kristalin özelliklerinin ve olası polimorfik dönüşümlerin değerlendirilmesi amacıyla X-ışını difraksiyonu (XRD; Explorer, GNR, İtalya) analizleri gerçekleştirilmiştir. Numuneler XRD ölçümleri öncesinde 0.5 mbar basınç altında −50 °C'de liyofilize edilerek toz formda hazırlanmıştır. Ölçümler, Cu-Kα ışını (λ = 1.5418 Å) kullanan X-ışını difraktometresi ile oda sıcaklığında yürütülmüştür.

Difraktogramlar 2°–50° aralığında 2θ kırınım açılarında kaydedilmiş ve tarama adımı 0.1° olarak ayarlanmıştır. Elde edilen kırınım desenleri değerlendirilmiş; gözlenen karakteristik pik konumları ve şiddetleri karşılaştırılarak NLT matrisi içerisindeki kristal düzenlilikteki olası değişimler yorumlanmıştır.

3.4.6.8. İstatistiksel Değerlendirmeler

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS v29 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası olası istatistiksel farkların analizinde öncelikle verilerin normallik dağılımı incelenmiştir. Normal dağılım sergileyen verilerde ise varyans homojenliği kontrol edilmiştir. Parametrik varsayımları karşılayan (normal dağılım gösteren ve homojen varyansa sahip olan) verilerin analizinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve tukey post-hoc testi uygulanmıştır. Normallik veya homojenlik ($p < 0.05$) şartını sağlamayan veriler ise non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş, anlamlı farklılıkların kaynağını belirlemek amacıyla Dunn'un post-hoc testi kullanılmıştır. İki bağımsız grubun kıyaslanmasında ise bağımsız örneklem t-testi tercih edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi IBM SPSS v29 yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Gruplar arası olası istatistiksel farkların analizinde öncelikle verilerin normallik dağılımı incelenmiştir. Normal dağılım sergileyen verilerde ise varyans homojenliği kontrol edilmiştir. Parametrik varsayımları karşılayan (normal dağılım gösteren ve homojen varyansa sahip

olan) verilerin analizinde tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve tukey post-hoc testi uygulanmıştır. Normallik veya homojenlik ($p < 0.05$) şartını sağlamayan veriler ise non-parametrik bir test olan Kruskal-Wallis testi ile analiz edilmiş, anlamlı farklılıkların kaynağını belirlemek amacıyla Dunn'un post-hoc testi kullanılmıştır. İki bağımsız grubun kıyaslanmasında ise bağımsız örneklem t-testi tercih edilmiştir. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak belirlenmiştir.

3.5. METİLDİAZONYUM YÜKLÜ NANO LİPİT TAŞIYICI SİSTEMLERİ

Glioblastoma tedavisinde standart kemoterapötik ajanlardan biri olan TMZ, kan-beyin bariyerini geçebilme yeteneği ve klinik uygulamada etkinliğinin kanıtlanmış olması nedeniyle ön-ilaç niteliğinde tasarlanmış bir moleküldür. Ancak daha önceki bölümlerde de ayrıntılı olarak tartışıldığı üzere, TMZ *in vivo* ortamda hedef bölgesine ulaşamadan önce dahi hızla ve kapsamlı biçimde bozunmaya uğramaktadır. Bu özelliği dolayısıyla klinik uygulamada görece yüksek dozlarda TMZ kullanılmasını gerektirmektedir. Buna ek olarak, TMZ'nin tedavideki sitotoksik etkisi hücresel düzeyde metilasyon etkin metaboliti MDA üzerinden ortaya çıkmaktadır. Tedavide beklenen biyolojik yanıtın esasen MDA'nın DNA metilasyonu yoluyla yürütülen mekanizmasına bağlı olması, klasik yaklaşımla KBB'yi geçen molekülün TMZ, hücre bölünme döngüsünde etkiyi ortaya koyan esas türün ise MDA olması gibi ikili bir rol dağılımı ortaya çıkarmaktadır. Bu çerçevede, KBB'yi geçme işlevinin doğrudan NLT sistemleri tarafından üstlenilmesi ve TMZ yerine MDA'nın etken madde olarak NLT'lere yüklenmesi, tümör bölgesinde MDA maruziyetini artırmaya ve tedaviye yeni bir perspektif kazandırabileceği değerlendirilmiştir. Bu yaklaşımla, daha düşük dozlarda karşılaştırılabilir düzeyde hücresel ölümün sağlanabileceği ve MDA'nın etkinliğine eşdeğer farmakodinamik sonuçlar elde edebilmek amacıyla uygulanması gereken yüksek doz TMZ kullanımının beraberinde getirebileceği ikincil yan etkilerin en aza indirilebileceği öngörülmüştür.

Bu bağlamda, çalışma kapsamında Compritol/OA temel lipit matrisine dayalı NLT formülasyonları, MDA'nın lipit fazında enkapsülasyonunu sağlayacak şekilde tasarlanmış ve seçilen formülasyonlar daha önceki bölümlerde detaylı olarak incelenen proses parametrelerine dayandırılarak optimize edilmiştir. MDA yüklü NLT sistemlerinin geliştirilmesinde, kullanılan lipit kombinasyonlarının etken maddenin lipit fazdaki çözünürlüğü ve ilaç yükleme kapasitesi ile partikül boyutu, PDI, zeta potansiyeli ve etken madde yükleme verimi gibi kritik kalite özellikleriyle birlikte bütüncül bir yaklaşımla değerlendirilmiştir. İzleyen alt başlıklarda, MDA yüklü NLT formülasyonlarının hazırlanmasına ilişkin çalışmalar ve optimizasyon süreçleri ile, fizikokimyasal karakterizasyon sonuçları ile stabilite ve salım özellikleri ile salım kinetikleri incelenmiştir. Elde edilen bulgular, glioblastoma tedavisinde MDA temelli nanolipit taşıyıcı sistemlerin potansiyel kullanım alanlarının belirlenmesi ve glioblastoma hücrelerinde gerçekleştirilen in vitro çalışmalar aracılığıyla bu sistemlerin uygulanabilirliğinin ortaya konulması amacıyla değerlendirilmiştir.

3.5.1. Metildiazonyum (MDA) Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

MDA yüklü NLT sistemlerinin üretiminde, daha önce taşıyıcılar için optimize edilen Compritol/OA temelli formülasyon ve proses parametreleri temel alınmış; böylece MDA yüklenmesinin partikül özellikleri üzerindeki etkilerinin, mümkün olduğunca sabit tutulan üretim koşulları altında incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, hem sıcak homojenizasyon hem de prob tipi ultrasonikasyon yöntemleri, MDA'nın NLT sistemlerine enkapsülasyonu için uyarlanmıştır. Üretim sırasında toplam lipit miktarı, sulu faz oranı ve yüzey aktif madde konsantrasyonları, ilgili taşıyıcı sistemler için belirlenen optimum değerlerde sabit tutulmuş; yalnızca MDA miktarı ve yükleme düzeyi, hedeflenen teorik ilaç miktarına göre düzenlenmiştir.

3.5.1.1. Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile MDA Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

Sıcak homojenizasyon ile MDA yüklü NLT üretiminde, Compritol/OA sistemi için daha önce tanımlanan lipit faz hazırlama adımları MDA'nın varlığına uyarlanarak sürdürülmüştür. Bu amaçla, Compritol ve oleik asit formülasyonda tanımlanan oranlarda tartılarak, Compritol'ün erime sıcaklığının 10 °C üzerinde 85 °C homojen bir lipit faz elde edilinceye kadar ısıtılmıştır. MDA, çözünürlük profili ve formülasyonda öngörülen dağılımına bağlı olarak ya doğrudan lipit faza ilave edilerek çözündürülmüş ya da yüzey aktif madde içeren sulu fazda çözündürülerek sisteme dâhil edilmiştir. Aynı sıcaklığa getirilen sulu faz, lipit faz üzerine kontrollü olarak ilave edilmiş ve eş zamanlı olarak yüksek kesme kuvveti uygulanarak NLT öncülü sıcak emülsiyon elde edilmiştir. Bu aşamada, karıştırma hızı ve homojenizasyon süresi, boş NLT sistemleri için belirlenmiş optimum değerlerle uyumlu olacak şekilde sabit tutulmuş; böylece MDA'nın varlığının partikül oluşumu ve boyut dağılımı üzerindeki etkisinin izole biçimde değerlendirilebilmesi hedeflenmiştir. Sıcak emülsiyon, ardından kontrollü şekilde oda sıcaklığına soğutularak katı/sıvı lipit çekirdek matrisini içeren MDA yüklü NLT süspansiyonları elde edilmiş ve ileri karakterizasyon çalışmaları için uygun koşullarda saklanmıştır.

3.5.1.2. Ultrasonikasyon Yöntemi ile MDA Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

Ultrasonikasyon yöntemi ile MDA yüklü NLT üretiminde, Compritol ve oleik asit içeren lipit faz ile MDA'yı içeren yüzey aktif madde çözeltisi, formülasyonda tanımlanan oranlarda ayrı ayrı yaklaşık 85 °C'ye kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta birleştirilerek kaba bir ön emülsiyon elde edilmiştir. Bunu takiben, partikül boyutunun azaltılması ve dağılımın daraltılması amacıyla doğrudan prob tipi ultrasonikasyon uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi, sistemde aşırı ısınmayı sınırlamak ve enerji girişini kontrollü hâle getirmek amacıyla darbeli modda, 2 saniyelik ultrasonik darbe ve 4 saniyelik bekleme sürelerinden oluşan çevrimler hâlinde yürütülmüştür. Uygulanan toplam ultrasonikasyon

süresi ve ultrasonikasyon şiddeti, daha önce boş Compritol/OA formülasyonları için belirlenen optimum değerlerle uyumlu olacak şekilde seçilmiş; böylece MDA yüklenmesinin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkisi, taşıyıcı sisteme özgü ultrasonikasyon parametrelerinden bağımsız olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ultrasonik işlem sonrasında, süspansiyonlar oda sıcaklığına soğutularak nihai MDA yüklü NLT sistemleri elde edilmiş ve ileri karakterizasyon çalışmaları için uygun koşullarda saklanmıştır.

3.5.2. Metildiazonyum Yüklü Nano Lipit Taşıyıcılar için In Vitro Salım ve Salım Kinetiklerinin Analizi

MDA yüklü NLT sistemlerinde in vitro salım profillerinin ve salım mekanizmasının belirlenmesi amacıyla, Compritol/OA temelli ve MDA ile yüklenmiş NLT süspansiyonları kullanılarak membran aracılı difüzyon ile gerçekleştirilen salım deneyi yürütülmüştür. Çalışmada, farklı formülasyonlarla hazırlanmış (sıvı lipit/toplam lipit oranı %0 %30 ve %70 olan) MDA yüklü NLT'lerin ve MDA çözeltisinin üç tekrarlı salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, daha önce tanımlanan formülasyon ve üretim koşulları altında hazırlanan MDA yüklü NLT süspansiyonlarından, belirli miktarda MDA içerecek şekilde hesaplanan hacimlerde örnekler alınmış ve 12.000 Da (MWCO 12 kDa) olan diyaliz membranlarının içerisine yerleştirilmiştir. MDA yüklü NLT içeren diyaliz membranlar, hacmi 25 mL olarak belirlenmiş PBS 7.4 salım ortamında 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta termostatlı inkübatörde tutulmuş; önceden tanımlanmış zaman noktalarında ortamdan numuneler alınarak salım profilleri izlenmiştir.

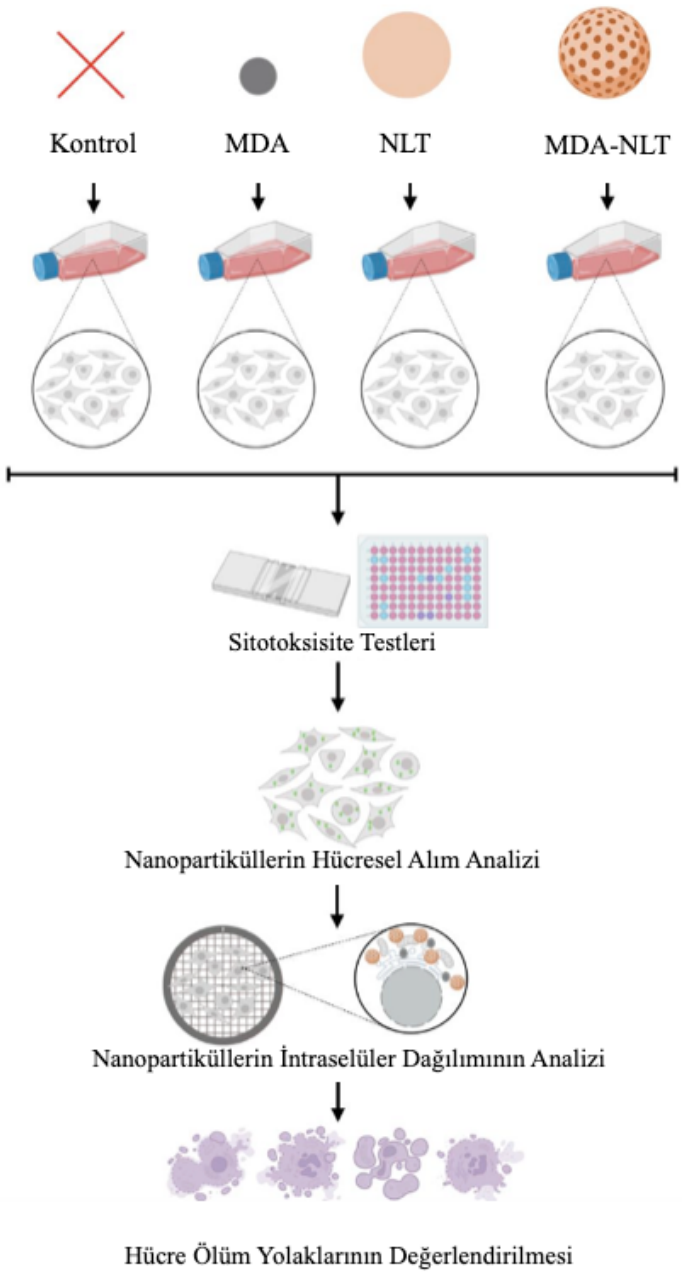
MDA için sink koşullarının (çözünen maddenin doygunluğa ulaşmadığı, derişimin düşük tutulduğu koşulların) sağlandığı salım ortamında, belirlenen zaman noktalarında (15., 30., 45., 60., 90., 120., 150., 180., 240., 300. ve 360. dakikalar ile 24. ve 48. saatlerde) 250 µL hacminde örnek alınmış ve örnek alınan hacme eşit hacimde taze salım ortamı ilave edilmiştir. Alınan örneklerin üzerine 1250 µL mobil faz ilave edilerek uygun oranda seyreltilmiş ve seyreltilen çözeltilerdeki MDA derişimi, HPLC ile nicel olarak belirlenmiştir. MDA'nın in vitro salım verileri, her formülasyon için üç tekrarlı deneylerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler için ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bu veriler üzerinden zamana bağlı kümülatif salınan MDA miktarı ve yüzdesi hesaplanmıştır. Karşılaştırma amacıyla, aynı koşullar altında serbest MDA içeren çözeltilerden salım deneyleri de gerçekleştirilmiş ve NLT formülasyonlarının salım profilleri ile birlikte değerlendirilmiştir.

Elde edilen kümülatif salım verileri, salım kinetiğinin matematiksel olarak tanımlanabilmesi için farklı kinetik modeller ile analiz edilmiştir. Bu kapsamda, sırasıyla sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson–Crowell ve Korsmeyer–Peppas modellerine ait doğrusal formülasyonlar kullanılarak zamana karşı uygun dönüşümler yapılmış ve her bir model için kinetik sabitleri ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

3.5.3. MDA Temelli NLT'ler için İn Vitro Çalışmalar

MDA temelli NLT'ler için gerçekleştirilen *in vitro* çalışmalarda; Kontrol, MDA, NLT ve MDA-NLT olmak üzere dört farklı deney grubu hücre kültürüne uygulanmış ve ilgili formülasyonların kanser hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 3.8'de sunulan akış şemasına göre, her bir grubun hücrelerle zamana ve doza bağlı etkileşimini takiben, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole (MTT) temelli hücre canlılığı analizi ile sitotoksisite değerlendirilmiş ve hücre canlılığı üzerindeki etkiler nicel olarak belirlenmiştir. Akabinde NLT'ler için ideal formülasyonun hücre içine alım etkinliğini ortaya koymak amacıyla, sitotoksisite testlerinden elde edilen sonuçlara göre belirlenmiş dozları da kapsayacak şekilde zamana ve doza bağlı nanopartiküllerin hücresel alım düzeyi için çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Son aşamada ise nanopartiküllerin hücreler üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek amacıyla immünositokimya analizleri gerçekleştirilerek, hücrelerin olası çeşitli hücre ölüm yolakları üzerindeki yanıtları incelenmek amaçlanmıştır. Bu nedenle apoptoz, nekroz, otofaji, ferroptoz, piroptoz ve nekroptoza ait özgül biyobelirteçler histolojik yöntemler ile araştırılmış ve elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

.



Şekil 3.8: MDA temelli NLT'lerin T98G hücre hattı için gerçekleştirilen *in vitro* çalışmaların şematik gösterimi.

3.5.3.1. T98G Hücre Soyunun Kültüre Edilmesi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda geliştirilen MDA yüklü NLT formülasyonlarının glioblastoma üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek amacıyla, insan kökenli glioblastoma hücre hattı olan T98G kullanılmıştır. İlgili hücre hattı American Type Culture Collection (ATCC) stoklarından temin edilmiş ve İÜC Cerrahpaşa, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında kültüre edilmiştir. Hücreler, %10 fetal bovin serumu (FBS) ve %1 (v/v) penisilin-

streptomisin içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37 °C ve %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında monolayer kültür koşullarında çoğaltılmıştır.

T98G hücreleri yaklaşık %80–90 hücre yoğunluğuna ulaştığında kültür besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile kısaca yıkandıktan sonra yüzeyden ayrılmaları için %0,25 tripsin-EDTA çözeltisi ile muamele edilmiştir. Tripsinizasyonun tamamlanmasının ardından hücreler besiyeri ile nötralize edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre pelletleri uygun hacimde besiyeri ile yeniden süspanse edilerek yaklaşık 1:3 oranında yeni kültür kaplarına dağıtılmıştır.

3.5.3.2. T98G Hücrelerinde MDA ve TMZ için Sitotoksisite Çalışmaları

Glioblastoma hücrelerinde TMZ'ye yönelik duyarlılık düzeyinin, hücre soyuna ve deney koşullarına bağlı olarak değişiklik gösterebildiği ve literatürde raporlanan IC_{50} değerleri arasında belirgin farklılıklar bulunduğu bilinmektedir. Bu nedenle, çalışmada kullanılan glioblastoma hücrelerinin çalışmada kullanılan etken madde olan MDA ve TMZ'ye karşı özgül duyarlılığını değerlendirebilmek ve sonraki *in vitro* deneylerde kullanılacak referans dozları belirleyebilmek amacıyla, hücre hatlarına özgü IC_{75} ve IC_{50} değerleri hesaplanmıştır.

Bu amaçla, hücreler 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa yaklaşık 5×10^3 adet hücre gelecek şekilde 100 µL besiyeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat boyunca 37°C, %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında tutunmalarına izin verilmiştir. Ardından mevcut besiyeri uzaklaştırılarak, 0 µM (kontrol), 12.5 µM, 25, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM, 1000 µM, 1200 µM, 1400 µM ve 1600 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda MDA ve TMZ içeren taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler, MDA ve TMZ içeren besiyerinde 24 ve 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra, hücre canlılığı için MTT (Elabscience Bionovation Inc.) kullanılarak analiz edilmiştir.

İnkübasyon sonunda her kuyucuğa MTT çözeltisi ilave edilmiş, belirlenen süre sonunda formazan kristalleri uygun çözücü ile çözülmüş ve 570 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak, MDA ve TMZ konsantrasyonu ile hücre canlılığı arasındaki ilişkiyi gösteren doz-cevap eğrileri oluşturulmuş ve her bir inkübasyon süresi için IC_{50} değerleri bu eğrilerden hesaplanmıştır. Böylece ilerleyen deneylerde karşılaştırma grubu olarak kullanılacak MDA ve TMZ doz ve inkübasyon süresi, hesaplanan IC_{75} ve IC_{50} değerleri esas alınarak seçilmiştir.

3.5.3.3. T98G Hücre hattında MDA-NLT'lerin Hücre Görüntüleme Çalışmaları

MDA yüklü NLT formülasyonlarının T98G hücreleri tarafından hücre içine alınma durumları incelemek amacıyla floresan görüntüleme temelli hücre içi alım analizleri yapılmıştır. Bu doğrultuda NLT'lerin lipit fazı, hücre içi izlenebilirliği sağlamak üzere lipofilik floresan boya olan Coumarin-6 ile işaretlenmiş ve elde edilen işaretli NLT'ler T98G hücrelerine 0 (Kontrol) ppm, 15.56 ppm, 31.25 ppm, 62.5 ppm, 125 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından yıkanmış, sabitlenmiş ve 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile çekirdek boyaması yapılmıştır, elde edilen görüntüler üzerinden hücre içi alımları değerlendirilmiştir.

3.5.3.4. T98G Hücre hattında MDA-NLT'lerin İmmünositokimya Çalışmaları

MDA yüklü NLT formülasyonlarının T98G hücreleri tarafından hücre içine alınma durumları incelemek amacıyla floresan görüntüleme temelli hücre içi alım analizleri yapılmıştır (Tablo 3.6). Bu doğrultuda NLT'lerin lipit fazı, hücre içi izlenebilirliği sağlamak üzere lipofilik floresan boya olan Coumarin-6 ile işaretlenmiş ve elde edilen işaretli NLT'ler T98G hücrelerine 0 (Kontrol) ppm, 15.56 ppm, 31.25 ppm, 62.5 ppm, 125 ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Hücreler 24 ve 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından yıkanmış, sabitlenmiş ve 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) ile nükleus boyaması yapılmıştır, elde edilen görüntüler üzerinden hücre içi alımları değerlendirilmiştir.

Tablo 3.6: Otofaji, ferroptoz, piroptoz ve nekroptoz, apoptoz ve nekroz ölüm yolaklarında kullanılan primer antikorlar.

Hücre Ölüm Yolağı	İmmünositokimya Yöntemi
Otofaji	Anti-Beclin-1 (Beclin-1) primer antikoru
Ferroptoz	Anti- Glutatyon Peroksidaz 4 (GPX4) primer antikoru
Ferroptoz	Anti-Malondialdehit (MDA) primer antikoru
Piroptoz	Anti-Gasdermin D (GSDMD) primer antikoru
Nekroptoz	Anti-Mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL) primer antikoru
Apoptoz	Anexin V pozitif, PI negatif hücreler (annexin V-FITC, apoptoz)
Nekroz	Anexin V pozitif, PI pozitif hücreler (annexin V-FITC nekroz)

Bu amaç ile hücreler üzerinde immunofloresan yöntemiyle Anexin V ve propidyum iyodür (PI) işaretlenmesi hedeflenirken, immunoperoksidaz yöntemiyle Beclin-1, glutatyon peroksidaz 4 (GPX4), gasdermin-D (GSDMD), melondihaldehit ve *mixed lineage* kinaz domain benzeri (MLKL) antijenlerinin işaretlenmesi hedeflenmiştir. Anexin V pozitif, PI negatif hücreler erken apoptozu göstermektedir [274]. Bu nedenle Anexin V sinyali, apoptozun hücrelerde meydana gelip gelmediğinin belirlenmesinde temel gösterge olarak değerlendirilmiştir. PI yalnızca membranı hasar görmüş hücrelere girebildiğinden, PI pozitiflik nekrotik hücrelerin seçici olarak belirlenmesine olanak sağlamaktadır. Beclin-1, otofajinin başlamasında görev alan temel bir protein olup hücrelerin stres koşullarına verdiği yanıtın değerlendirilmesinde önemli bir işaret sunmaktadır [275]. GPX4, lipit peroksitlerinin detoksifikasyonunda görev alan ve hücreleri ferroptoz kaynaklı hasara karşı koruyan temel bir enzimdir. GPX4 düzeylerindeki değişimler, ferroptozun hücrelerde aktif hale gelip gelmediğinin değerlendirilmesinde önemli bir biyolojik işaret sunmaktadır [276]. GSDMD, inflamatuvar kaspazlar tarafından kesilerek aktif hale gelen ve hücre membranında por oluşturarak piroptotik hücre ölümünü başlatan temel bir proteindir. Bu nedenle GSDMD düzeylerindeki değişimler, hücrelerde piroptozun meydana gelip gelmediğinin değerlendirilmesinde önemli bir biyolojik işaret sunmaktadır [277]. MDA, oksidatif stresin ve özellikle ferroptoz sürecinin önemli bir biyobelirteci olarak kabul edilmektedir. MDA düzeylerindeki artış, hücrelerde lipit peroksidasyonunun meydana gelip gelmediğinin anlaşılmasında önemli bir işaret sunmaktadır [276]. MLKL RIPK3

tarafından fosforile edildikten sonra membrana transloke olan ve nekroptotik hücre ölümünün son basamağını başlatan temel efektör proteindir [278]. Bu nedenle MLKL düzeylerindeki ve lokalizasyonundaki değişimler, hücrelerde nekroptozun meydana gelip gelmediğinin değerlendirilmesinde önemli bir biyolojik işaret sunmaktadır.

İlgili işaretlemelerin yapılabilmesi için 24 kuyucuklu deney kaplarında, her bir kuyucukta bulunan yuvarlak lameller üzerine $3x10^4$ sayıda hücre 30 µL medyum içerisinde ekilerek inkübatör ortamında 40 dk hücrelerin yüzeye yapışması sağlanmıştır. Ardından medyumlar 500 µL'ye tamamlanarak 24 saat boyunca hücrelerin yeterli sayıda konfluensiye gelmesi sağlanmıştır. Daha sonra kuyucuklara 62.5 ppm NLT, 250µM MDA ve 250µM MDA+62.5ppm NLT uygulanarak deney grupları kurulmuştur. Deneyler 24 ve 48 saat sonunda sonlandırılmıştır. İmmunofloresan yöntemi için ticari kitin yönergeleri dikkate alınarak hücreler fikse edilmeden bağlayıcı tampon (binding-buffer) ile yıkanmış ardından Anexin V ve PI antikorları bağlayıcı tampon içerisinde hücrelere 5 dk oda sıcaklığında olacak şekilde uygulanmıştır. Daha sonra bağlayıcı tampon ile yıkanan hücreler, %4 formaldehittte fikse edilmiştir. Destile su ile yıkandıktan sonra hücreler DAPI içeren kapama medyumu ile kapatılarak incelenmeye hazır hale getirilmiştir. İmmunoperoksidaz yöntemi için deney sonlandırıldıktan sonra hücreler PBS ile yıkanmış ardından %4 paraformaldehit kullanılarak 20 dk oda sıcaklığında fikse edilmiştir. Aralarda PBS ile yıkanacak şekilde hücrelere, hücre içi epitoplara erişimi sağlamak amacıyla %0,1 Triton X-100 içeren PBS ile permeabilizasyon uygulanmıştır. Daha sonra özgül olmayan antikor bağlanmalarını azaltmak ve arka plan boyanmasının önüne geçmek için hücreler serum ve H_2O_2 kullanılarak bloklanmıştır. Hücreler üzerine primer anti-Beclin-1 (1:300), primer anti-GPX4 (1:300), primer anti-GSDMD (1:300), primer anti-melondihaldehit (1:200) ve primer anti-MLKL (1:500) antikorları damlatılarak 1 saat oda sıcaklığında beklenmiştir. Ardından sırasıyla primer antikorlara uygun biyotin konjuge sekonder antikor ve streptavidin horseradish peroksidaz (HRP) kullanılarak 3,3' diaminobenzidin (DAB) ile işaretleme yapılmıştır. Zıt boyama olarak Mayer'in hematoksileni kullanılmış ve hücreler su bazlı bir medyum kullanılarak kapatılmıştır.

3.6. PAKLİTAKSEL YÜKLÜ NANO LİPİT TAŞIYICI SİSTEMLERİ

Glioblastoma tedavisine yönelik olarak bu tez kapsamında yürütülen çalışmalarda, öncelikle klinik uygulamada sıklıkla tercih edilen bir etken madde olan TMZ'nin farmakodinamik etkisinin esasen metilasyon etkin metaboliti MDA üzerinden gerçekleştiği gösterilmiş ve NLT sistemleri aracılığıyla MDA'nın doğrudan taşınmasına ilişkin ayrıntılı bir yaklaşım geliştirilmiştir. Bu sayede, KBB geçme işlevinin TMZ molekülünün kendisinden ziyade NLT sistemleri tarafından üstlenildiği;

MDA'nın ise bu taşıyıcıların lipit fazında stabilize edilerek tümör dokusuna iletildiği alternatif bir kemoterapötik strateji tanımlanmıştır. Söz konusu stratejinin temelinde, KBB'yi aşabilme potansiyeline sahip nanotaşıyıcıların kullanımıyla glioblastoma tedavisinde daha etkin ve potansiyel olarak daha az toksik tedavi şemalarının geliştirilebilmesi hedefi yer almaktadır.

Bu kavramsal çerçeve, NLT sistemlerinin yalnızca TMZ/MDA ekseninde değil, glioblastoma tedavisinde standart protokoller içinde yer almayan ancak farklı solid tümörlerin tedavisinde klinik etkinliği kanıtlanmış diğer antineoplastik ajanlar için de yeni olanaklar sunabileceği düşüncesini beraberinde getirmiştir. Bu bağlamda, mikrotübül dinamiğini inhibe ederek hücre bölünmesini durduran ve klinik uygulamada çeşitli solid tümörlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan PTX, NLT sistemleri aracılığıyla glioblastoma dokusuna taşınabilecek potansiyel bir aday olarak değerlendirilmiştir. Özellikle santral sinir sistemi tümörleri ve gliomlar söz konusu olduğunda, KBB'nin yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin PTX'in beyin parankimine etkin düzeylerde taşınmasını güçleştirmesi, bu ilacın glioblastoma tedavisinde doğrudan kullanımını sınırlayan başlıca faktörlerden biri olarak öne çıkmaktadır. Bununla birlikte, PTX'in son derece düşük suda çözünürlüğe sahip olması, belirgin lipofilik karakteri ve konvansiyonel dozaj formlarında sıklıkla çözücü kaynaklı toksisite ile ilişkilendirilmesi, ilacın terapötik indeksini daraltan ilave kısıtlayıcı unsurlar olarak değerlendirilmektedir. Bu nedenle, PTX'in uygun bir nanotaşıyıcı sistem içerisinde enkapsüle edilerek çözünürlüğünün artırılması, sistemik ve lokal toksisiteyi azaltacak şekilde kontrollü salımının sağlanması ve mümkünse KBB'yi aşan alternatif ilaç taşıma stratejileriyle birleştirilmesi, farmasötik gelişim açısından önemli ve gerekli bir araştırma alanı olarak ortaya çıkmaktadır.

Bu bağlamda, çalışma kapsamında Precirol/Hint yağı temelli NLT sistemleri, PTX'in lipit çekirdek fazında enkapsülasyonunu mümkün kılacak şekilde tasarlanmış ve daha önce optimize edilen formülasyon–proses parametreleri ışığında geliştirilmiştir. İzleyen alt bölümlerde, PTX yüklü NLT formülasyonlarının sıcak homojenizasyon ve prob tipi ultrasonikasyon yöntemleri ile üretimine ilişkin deneysel stratejiler, fizikokimyasal ve kolloidal karakterizasyon sonuçları ile stabilite profilleri ayrıntılı olarak sunulmuş; elde edilen bulgular, glioblastoma tedavisinde PTX temelli NLT sistemlerinin potansiyel kullanım alanları çerçevesinde tartışılmıştır.

3.6.1. Paklitaksel Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

PTX yüklü NLT sistemlerinin üretiminde, daha önce taşıyıcılar için optimize edilen Precirol/Hint yağı temelli formülasyon ve proses parametreleri temel alınmış; böylece PTX yüklenmesinin partikül özellikleri üzerindeki etkilerinin, mümkün olduğunca sabit tutulan üretim

koşulları altında incelenmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda, hem sıcak homojenizasyon hem de prob tipi ultrasonikasyon yöntemleri, paklitaksel (PTX)'in NLT sistemlerine enkapsülasyonu için uyarlanmıştır. Üretim sırasında toplam lipit miktarı, sulu faz oranı ve yüzey aktif madde konsantrasyonları, ilgili taşıyıcı sistem için belirlenen optimum değerlerde sabit tutulmuş; yalnızca PTX miktarı ve yükleme düzeyi, hedeflenen teorik ilaç miktarına göre düzenlenmiştir.

3.6.1.1. Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile PTX Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

Sıcak homojenizasyon ile PTX yüklü NLT üretiminde, Precirol/Hint yağı sistemi için daha önce tanımlanan lipit faz hazırlama adımları PTX'in varlığına uyarlanarak sürdürülmüştür. Bu amaçla, Precirol ve Hint yağı formülasyonda tanımlanan oranlarda tartılarak, Precirol'ün erime sıcaklığının yaklaşık 10 °C üzerinde seçilen proses sıcaklığında (75 °C) homojen bir lipit faz elde edilinceye kadar ısıtılmıştır. Yüksek lipofilik karakteri nedeniyle PTX, öncelikli olarak lipit faz içerisinde çözündürülerek sisteme dâhil edilmiş; gerekli görülen durumlarda lipit faza yardımcı çözücü eklenmesi yoluyla çözünürlüğün artırılması sağlanmıştır. Aynı sıcaklığa getirilen, yüzey aktif madde içeren sulu faz, lipit faz üzerine kontrollü olarak ilave edilmiş ve eş zamanlı olarak yüksek kesme kuvveti uygulanarak PTX içeren NLT öncülü sıcak emülsiyon elde edilmiştir. Bu aşamada, karıştırma hızı ve homojenizasyon süresi, boş NLT sistemleri için belirlenmiş optimum değerlerle uyumlu olacak şekilde sabit tutulmuş; böylece PTX'in varlığının partikül oluşumu ve boyut dağılımı üzerindeki etkisinin izole biçimde değerlendirilebilmesi hedeflenmiştir. Sıcak emülsiyon, ardından kontrollü şekilde oda sıcaklığına soğutularak katı/sıvı lipit çekirdek matrisini içeren PTX yüklü NLT süspansiyonları elde edilmiş ve ileri karakterizasyon çalışmaları için uygun koşullarda saklanmıştır.

3.6.1.2. Ultrasonikasyon Yöntemi ile PTX Yüklü Nano Lipit Taşıyıcıların Üretimi

Ultrasonikasyon yöntemi ile PTX yüklü NLT üretiminde, Precirol ve Hint yağı içeren lipit faz ile PTX'i içeren yüzey aktif madde çözeltisi, formülasyonda tanımlanan oranlarda ayrı ayrı yaklaşık 75 °C'ye kadar ısıtılmış ve bu sıcaklıkta birleştirilerek kaba bir ön emülsiyon elde edilmiştir. Bunu takiben, partikül boyutunun azaltılması ve dağılımın daraltılması amacıyla doğrudan prob tipi ultrasonikasyon uygulanmıştır. Ultrasonikasyon işlemi, sistemde aşırı ısınmayı sınırlamak ve enerji girişini kontrollü hâle getirmek amacıyla darbeli modda, 2 saniyelik ultrasonik darbe ve 4 saniyelik bekleme sürelerinden oluşan çevrimler hâlinde yürütülmüştür. Uygulanan toplam ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti, daha önce boş Precirol/ Hint Yağı formülasyonları için belirlenen optimum değerlerle uyumlu olacak şekilde seçilmiş; böylece PTX yüklenmesinin partikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkisi, taşıyıcı sisteme özgü ultrasonikasyon

parametrelerinden bağımsız olarak değerlendirilmeye çalışılmıştır. Ultrasonik işlem sonrasında, süspansiyonlar oda sıcaklığına soğutularak nihai PTX yüklü NLT sistemleri elde edilmiş ve ileri karakterizasyon çalışmaları için uygun koşullarda saklanmıştır.

3.6.2. Paklitaksel Yüklü Nano Lipit Taşıyıcılar için In Vitro Salım ve Salım Kinetiklerinin Analizi

PTX yüklü NLT sistemlerinde in vitro salım profillerinin ve salım mekanizmasının belirlenmesi amacıyla, Precirol/Hint yağı temelli ve PTX ile yüklenmiş NLT süspansiyonları kullanılarak membran aracılı difüzyona dayalı bir salım deneyi yürütülmüştür. Çalışmada, farklı formülasyonlarla hazırlanmış (sıvı lipit/toplam lipit oranı %0 ve %50 olan) PTX yüklü NLT'lerin ve PTX çözeltisinin üç tekrarlı salım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Daha önce tanımlanan formülasyon ve üretim koşulları altında hazırlanan PTX yüklü NLT süspansiyonlarından, belirli miktarda PTX içerecek şekilde hesaplanan hacimlerde örnekler alınmış ve molekül ağırlığı kesim değeri 12.000 Da (MWCO 12 kDa) olan diyaliz membranlarının içerisine yerleştirilmiştir. PTX yüklü NLT içeren bu diyaliz membranlar, hacmi 25 mL olarak belirlenmiş PBS 7.4 salım ortamında 37 ± 0,5 °C sıcaklıkta termostatlı inkübatörde tutulmuş; önceden tanımlanmış zaman noktalarında ortamdan numuneler alınarak salım profilleri izlenmiştir.

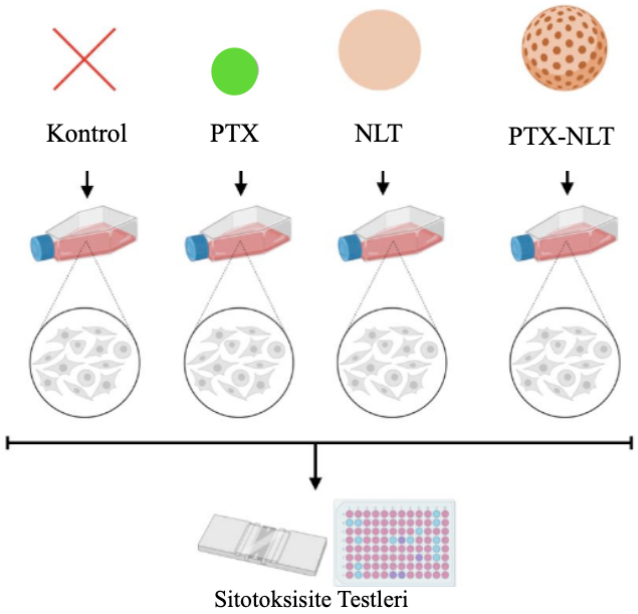
PTX için sink koşullarının korunabilmesi amacıyla salım ortamının bileşimi ve hacmi, PTX'in doygunluk çözünürlüğü dikkate alınarak belirlenmiş ve deney süresince sabit tutulmuştur. Belirlenen zaman noktalarında (15., 30., 45., 60., 90., 120., 180., 240. ve 300. dakikalar ile 24. ve 48. saatlerde) salım ortamından 250 µL hacminde örnek alınmış ve örnek alınan hacme eşit hacimde taze salım ortamı ilave edilerek toplam hacmin sabit kalması sağlanmıştır. Alınan örneklerin üzerine valide edilen HPLC yöntemi ile uyumlu olacak şekilde 1250 µL mobil faz ilave edilerek uygun oranda seyreltilmiş ve seyreltilen çözeltilerdeki PTX derişimi, HPLC ile nicel olarak belirlenmiştir. PTX'in in vitro salım verileri, her formülasyon için üç tekrarlı deneylerle gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler için ANOVA analizleri gerçekleştirilmiş ve $p<0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Karşılaştırma amacıyla, aynı koşullar altında serbest PTX içeren çözeltiler için de salım deneyleri gerçekleştirilmiş ve PTX yüklü NLT formülasyonlarının salım profilleri ile birlikte değerlendirilmiştir.

Elde edilen kümülatif salım verileri, salım kinetiğinin matematiksel olarak tanımlanabilmesi için farklı kinetik modeller ile analiz edilmiştir. Bu kapsamda, sırasıyla sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson–Crowell ve Korsmeyer–Peppas modellerine ait doğrusal formülasyonlar kullanılarak

zamana karşı uygun dönüşümler yapılmış ve her bir model için kinetik sabitleri ve R^2 değerleri hesaplanmıştır.

3.6.3. PTX temelli NLT'ler için in vitro çalışmalar ve sonuçlar

PTX temelli NLT'ler için gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda; kontrol, PTZ, NLT ve PTX-NLT olmak üzere dört farklı deney grubu hücre kültürüne uygulanmış ve ilgili formülasyonların kanser hücrelerindeki etkileri incelenmiştir. Şekil 3.9'da sunulan akış şemasına göre, her bir grubun hücrelerle zamana ve doza bağlı etkileşimini takiben, MTT temelli hücre canlılığı analizi ile sitotoksisite değerlendirilmiş ve hücre canlılığı üzerindeki etkiler nicel olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.9: PTX temelli NLT'lerin U87MG hücre hattı için gerçekleştirilen in vitro çalışmaların şematik gösterimi.

3.6.3.1. U87MG Hücre Soyunun Kültüre Edilmesi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda geliştirilen PTX yüklü NLT formülasyonlarının glioblastoma üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek amacıyla, insan kökenli glioblastoma hücre hattı olan U87MG kullanılmıştır. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Hücre Kültürü koleksiyonunda bulunan kültüre edilmiştir. Hücreler, %10 FBS ve %1 (v/v) penisilin-streptomisin içeren DMEM-F12 besiyerinde, 37 °C ve %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında monolayer kültür koşullarında büyütülmüştür.

U87MG hücreleri yaklaşık %80–90 hücre yoğunluğuna ulaştığında kültür besiyeri uzaklaştırılmış, hücreler PBS ile kısaca yıkandıktan sonra yüzeyden ayrılmaları için %0.25 tripsin-

EDTA çözeltisi ile muamele edilmiştir. Tripsinizasyonun tamamlanmasının ardından hücreler besiyeri ile nötralize edilerek 1200 rpm'de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Elde edilen hücre pelletleri uygun hacimde besiyeri ile yeniden süspanse edilerek yaklaşık 1:3 oranında yeni kültür kaplarına dağıtılmıştır.

3.6.3.2. U87MG Hücrelerinde PTX ve PTX-NLT için Sitotoksisite Çalışmaları

Tez kapsamında gerçekleştirilen deneylerde U87MG glioblastoma hücrelerinde PTX'e karşı özgül duyarlılığını değerlendirebilmek ve sonraki in vitro deneylerde kullanılacak referans dozları belirleyebilmek amacıyla hücreler 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyucuğa yaklaşık 5×10^3 hücre gelecek şekilde 100 µL besiyeri içerisinde ekilmiş ve 24 saat boyunca 37 °C, %5 CO_2 içeren inkübatör ortamında tutunmalarına izin verilmiştir. Ardından mevcut besiyeri uzaklaştırılarak, 0 µM (Kontrol), 0.5 µM, 1 µM, 2.5 µM, 5 µM, 10 µM olacak şekilde artan konsantrasyonlarda PTX içeren taze besiyeri ile değiştirilmiştir. Hücreler, PTX içeren besiyerinde 4 saat hücre üzerinde tutulmuş ve 4 saat sonunda PTX içeren besiyeri ortamdan uzaklaştırılarak taze besiyeri ile 48 saat süreyle inkübe edildikten sonra, hücre canlılığı analiz edilmiştir. İnkübasyon sonunda her kuyucuğa MTT çözeltisi ilave edilmiş, belirlenen süre sonunda formazan kristalleri uygun çözücü ile çözülmüş ve 540 nm dalga boyunda absorbans değerleri okunmuştur. Elde edilen absorbans verileri kullanılarak, PTX konsantrasyonu ile hücre canlılığı arasındaki ilişkiyi gösteren doz-cevap eğrileri oluşturulmuş ve IC_{75} değerleri esas alınarak seçilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. TEMOZOLOMİD İÇİN GERÇEKLEŞTİRİLEN ÇÖZÜNÜRLÜK ÇALIŞMALARI

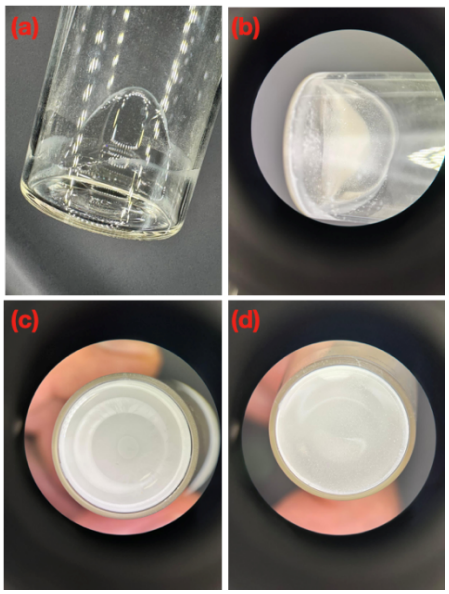
4.1.1. Katı Lipitler için Etken Madde Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda seçilen katı lipitlerde (Compritol ATO 888, Precirol ATO 5, Gelucire 44/14 ve Gelucire 59/14) TMZ eriyik lipit fazındaki çözünürlüğü, hazırlanan katı lipit–TMZ sistemlerinin yeniden katılaştırılmasını takiben görsel homojenlik ve faz ayrımı kriterleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu ön tarama yaklaşımında, katılaşma sonrası tek fazlı, homojen ve belirgin partikül/kristal içermeyen karışımlar TMZ'nin ilgili katı lipit matrisi içerisinde görece daha yüksek oranda taşınabildiğine işaret eden sistemler olarak yorumlanmıştır. Buna karşılık, katılaşma sonrası bulanıklık, heterojen bölge, yüzeyde ve/veya alt fazda birikim ve belirgin iki fazlı görünüm gözlenen numuneler, ilgili TMZ:katı lipit oranında karışabilirliğin sınırlı olduğuna ve TMZ'nin matriste çözünürlük limitinin aşılarak ayrışma eğilimi gösterebildiğine işaret eden sistemler olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.1).

Genel eğilim, TMZ oranı arttıkça bazı sistemlerde homojenliğin bozulması ve faz ayrımı riskinin yükselmesi yönünde olmuştur. Bu durum, eriyik fazda çözünen TMZ'nin soğuma sırasında çözünürlük limitinin aşılmasıyla yeniden ayrışması ile ilişkilendirilmiştir. Dolayısıyla her bir katı lipit için, faz ayrımı gözlenmeyen oran aralığı, NLT formülasyon çalışmalarında hedeflenebilecek potansiyel etken madde yükleme aralığının belirlenmesi açısından temel bir ön gösterge sağlamıştır (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Katı lipit–TMZ sistemlerinde, 5/1, 10/1 ve 15/1 (mg TMZ / g Katı Lipit) oranlarında TMZ'nin katı lipit matrisiyle karışabilirliğinin görsel değerlendirme ile sınıflandırılması (sınıflandırma türleri: homojen/kısmi faz ayrımı/belirgin faz ayrımı).

Katı Lipit	**TMZ: Katı lipit oranı (5 mg / 1g)**	**TMZ: Katı lipit oranı (10 mg / 1g)**	**TMZ: Katı lipit oranı (15 mg / 1g)**
Compritol	Homojen	Kısmi faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
Precirol	Kısmi faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
Gelucire 44/14	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
Gelucire 59/14	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı



Şekil 4.1: Katı lipit–TMZ sistemlerinde TMZ karışabilirliğin değerlendirilmesi (a) eriyik Compritol-TMZ (5 mg/ 1 g), (b) eriyik Compritol-TMZ (15 mg/1 g), (c) katı Compritol-TMZ (5 mg/1 g), (d) katı Compritol-TMZ (15 mg/1 g).

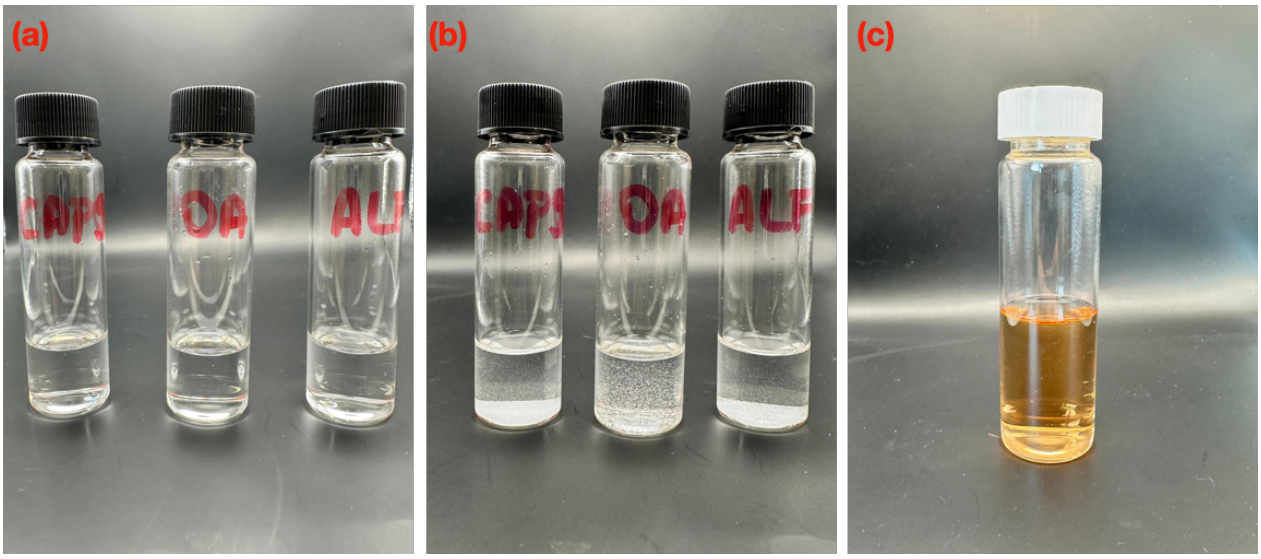
4.1.2. Sıvı Lipitler için Temozolomid Çözünürlük Çalışmalarının Değerlendirilmesi

Tez kapsamında yapılan çalışmalarda sıvı lipitlerde TMZ'nin çözünürlük/karışabilirlik davranışı, katı lipitlerde yürütülen ön tarama yaklaşımına benzer şekilde, hazırlanan TMZ–sıvı lipit karışımlarının görsel görünümü değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, farklı TMZ:sıvı lipit oranlarında hazırlanan sistemlerde TMZ'nin sıvı faz içerisinde homojen biçimde dağılabilmesi; homojen, kısmi faz ayrımı, belirgin faz ayrımı gözlemleri ile sınıflandırılmıştır. Bu görsel değerlendirme, NLT formülasyon çalışmalarında sıvı lipit bileşeninin seçimi için, TMZ'yi daha yüksek oranda taşıyabilme potansiyeline sahip adayların hızlı biçimde seçilmesine olanak sağlamıştır (Tablo 4.2).

Genel eğilim olarak, düşük TMZ yükleme oranlarında bazı sıvı lipitlerde sistemin tek fazlı ve homojen görünümünü koruduğu; TMZ oranı artırıldığında ise belirli lipitlerde bulanık görünüm ve/veya çökelti oluşumu ile uyumlu faz davranışlarının ortaya çıkabildiği izlenmiştir. Deney süresince çökelme gözlemlenen sıvı lipitler için karıştırma süresinin arttırılması ve sıvı lipit-TMZ karışımlarının ısıtılması ile zamanla numunelerde renk değişimi gözlemlenmiştir (Şekil 4.2). Bu durum literatürde detaylı olarak incelendiğinde TMZ'nin hızla bozunan yapısı dolayısıyla TMZ'nin bozunma davranışının detaylı çalışmalar ile aydınlatılması gerektiği kanaatine varılmıştır.

Tablo 4.2: Sıvı lipit–TMZ sistemlerinde, 5/1, 10/1 ve 15/1 (mg TMZ / g Sıvı Lipit) oranlarında TMZ'nin sıvı lipit matrisiyle karışabilirliğinin görsel değerlendirme ile sınıflandırılması (sınıflandırma türleri: homojen/kısmi faz ayrımı/belirgin faz ayrımı).

Sıvı Lipit	**TMZ: Katı lipit oranı (5 mg / 1g)**	**TMZ: Katı lipit oranı (10 mg / 1g)**	**TMZ: Katı lipit oranı (15 mg / 1g)**
Oleik asit	Kısmi faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
Hint yağı	Kısmi faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
Capryol	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı
ALF	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı	Belirgin faz ayrımı



Şekil 4.2: Sıvı lipit–TMZ sistemlerinde TMZ karışabilirliğin değerlendirilmesi (a) TMZ eklenmemiş sıvı lipitlerin görünümü, (b) TMZ eklenmiş sıvı lipitlerin görünümü, (c) sıvı lipitlerde bozunan TMZ'nin görünümü.

"4.1.3. Temozolomid Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi" bölümünde detayları verilen TMZ'nin bozunma davranışı sonrası ortaya çıkan MDA'nın OA içinde çözünürlük çalışmalarına göre 243 ± 8.1 mg MDA / 1 g OA değeri belirlenmiş olup bu değer MDA yüklü NLT çalışmalarına temel oluşturmaktadır.

4.1.3. Temozolomid Stabilite Çalışmalarının Değerlendirilmesi

TMZ'nin PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM ortamlarında +4 °C, 20 °C ve 37 °C koşullarında zamana bağlı kalan miktarı (%TMZ), Şekil 4.3'te kısa zaman aralığı (0–300 dk) ve uzun zaman aralığı (0–72 saat) için karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Elde edilen profiller, TMZ stabilitesinin belirgin biçimde ortam pH'ına ve sıcaklığa bağımlı olduğunu; özellikle nötr pH ve fizyolojik sıcaklık koşullarında hidrolitik bozunmanın hızlandığını göstermiştir.

PBS 7.4 ortamında elde edilen verilere göre (Şekil 4.3, Tablo 4.3), TMZ'nin stabilitesi sıcaklığa güçlü biçimde bağımlı olup bu etki özellikle 37 °C'de belirginleşmiştir. 37 °C koşulunda TMZ miktarı ilk saatler içerisinde hızlı şekilde azalmış; 15 dk'da %92.04 ± 1.85 olan TMZ, 60 dk'da %56.64 ± 7.30'a, 180 dk'da %11.50 ± 0.75'e ve 300 dk sonunda %2.21 ± 0.17 düzeyine düşmüştür. Uzun zaman aralığında 24 saat itibarıyla TMZ'nin kalan yüzdesi %0.44 ± 0.02 olarak saptanmış; 48 ve 72 saat zaman noktalarında ölçülen değerlerin de çok düşük seviyelerde seyrettiği görülmüştür (48 saat: %0.88 ± 0.02; 72 saat: %1.33 ± 0.06). Buna karşılık 20 °C'de bozunma daha yavaş seyretmiş; 15 dk'da %99.08 ± 1.44 olan TMZ 60 dk'da %93.29 ± 4.03'e ve 300 dk sonunda %62.54 ± 3.17'ye gerilemiştir. Uzun dönemde TMZ'nin kalan yüzdesi 24 saatte %15.93 ± 9.85, 48 saatte %3.54 ± 7.69 ve 72 saatte %0.88 ± 3.90 olarak ölçülmüş; böylece oda sıcaklığında dahi zaman uzadıkça TMZ'nin belirgin ölçüde azaldığı izlenmiştir. 4 °C koşulunda TMZ kısa zaman penceresinde büyük ölçüde korunmuş (15 dk: %98.24 ± 3.75; 300 dk: %98.68 ± 1.54); uzun zaman penceresinde azalma daha sınırlı olmakla birlikte devam etmiş ve 24, 48 ve 72 saat sonunda TMZ sırasıyla %92.48 ± 0.31, %89.38 ± 4.81 ve %83.19 ± 3.75 düzeyinde saptanmıştır. Bu bulgular, PBS 7.4'te sıcaklık arttıkça TMZ'nin hidrolitik bozunmasının hızlandığını ve özellikle 37 °C'de kısa süreli inkübasyonlarda dahi kimyasal stabilitenin belirgin şekilde azaldığını göstermektedir.

Tablo 4.3: PBS 7.4 ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ).

PBS 7.4			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	92.04 ± 1.85	99.08 ± 1.44	98.24 ± 3.75
30	80.09 ± 5.50	97.74 ± 3.75	96.04 ± 5.39
45	73.01 ± 6.90	94.63 ± 2.51	97.80 ± 2.69
60	56.64 ± 7.30	93.29 ± 4.03	96.92 ± 0.36
90	38.05 ± 4.31	88.84 ± 1.35	98.24 ± 4.08
120	25.22 ± 2.44	85.71 ± 2.38	97.36 ± 0.75
180	11.50 ± 0.75	75.93 ± 3.81	98.68 ± 0.36
240	4.87 ± 0.25	71.00 ± 1.54	98.24 ± 1.55
300	2.21 ± 0.17	62.54 ± 3.17	98.68 ± 1.54
1440	0.44 ± 0.02	15.93 ± 9.85	92.48 ± 0.31
2880	0.88 ± 0.02	3.54 ± 7.69	89.38 ± 4.81
4320	1.33 ± 0.06	0.88 ± 3.90	83.19 ± 3.75

PBS 5.8 ortamında elde edilen veriler (Şekil 4.3, Tablo 4.4), TMZ'nin PBS 7.4'e kıyasla belirgin düzeyde daha stabil seyrettiğini göstermiştir. 37 °C koşulunda 15–90 dk aralığında TMZ'nin kalan yüzdesi yaklaşık %100 düzeyinde korunmuş; 120 dk'da %96.46 ± 1.65'e, 180 dk'da %92.48 ± 4.29'a ve 300 dk sonunda %88.05 ± 0.56'ya gerilemiştir. Uzun zaman aralığında ise TMZ miktarı 24 saat sonunda %53.10 ± 1.97, 48 saat sonunda %26.55 ± 1.12 ve 72 saat sonunda %14.60 ± 1.51 olarak belirlenmiş; böylece PBS 5.8'de dahi fizyolojik sıcaklıkta zaman uzadıkça bozunmanın kademeli olarak ilerlediği görülmüştür. 20 °C koşulunda PBS 5.8'de TMZ kısa zaman penceresinde büyük ölçüde korunmuş (15–240 dk: %100; 300 dk: %97.78 ± 5.21). Uzun dönemde 24, 48 ve 72 saat sonunda TMZ sırasıyla %97.35 ± 2.63, %94.69 ± 2.10 ve %86.28 ± 5.92 olarak ölçülmüş; oda sıcaklığında bozunmanın daha yavaş seyrettiği, ancak uzun zaman ölçeğinde azalma eğiliminin başladığı

izlenmiştir. 4 °C koşulunda TMZ tüm zaman noktalarında yaklaşık başlangıç düzeyinde kalmış (15 dk: %100.00 ± 1.05; 300 dk: %100.44 ± 0.81; 24 saat: %102.65 ± 3.96; 48 saat: %101.33 ± 3.84; 72 saat: %100.88 ± 1.67). Bu durum, düşük sıcaklık ve daha asidik ortamın TMZ'nin hidrolitik bozunmasını belirgin biçimde yavaşlattığını; Nitekim 37 °C'de 300 dk sonunda PBS 5.8'de TMZ %88.05 düzeyinde kalırken, PBS 7.4'te aynı sürede TMZ'nin %2.21'e gerilemesi pH etkisini açıkça olarak ortaya koymaktadır.

Tablo 4.4: PBS 5.8 ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ).

PBS 5.8			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	100.00 ± 2.80	100.00 ± 0.32	100.00 ± 1.05
30	100.00 ± 0.96	100.00 ± 4.07	99.68 ± 1.80
45	100.00 ± 3.25	100.00 ± 0.67	100.00 ± 4.80
60	100.00 ± 2.33	100.00 ± 1.20	99.12 ± 1.51
90	100.00 ± 3.37	100.00 ± 1.42	100.00 ± 1.70
120	96.46 ± 1.65	100.00 ± 3.37	100.44 ± 2.63
180	92.48 ± 4.29	100.00 ± 1.06	100.00 ± 2.77
240	91.15 ± 0.85	100.00 ± 5.14	99.56 ± 2.17
300	88.05 ± 0.56	97.78 ± 5.21	100.44 ± 0.81
1440	53.10 ± 1.97	97.35 ± 2.63	102.65 ± 3.96
2880	26.55 ± 1.12	94.69 ± 2.10	101.33 ± 3.84
4320	14.60 ± 1.51	86.28 ± 5.92	100.88 ± 1.67

DMEM ortamında elde edilen veriler (Şekil 4.3, Tablo 4.5), TMZ'nin tampon sistemlere kıyasla belirgin düzeyde daha hızlı bozunduğunu ve ortam kompozisyonunun da stabilite üzerinde kritik bir belirleyici olduğunu göstermiştir. 37 °C koşulunda TMZ'nin kalan yüzdesi kısa zaman

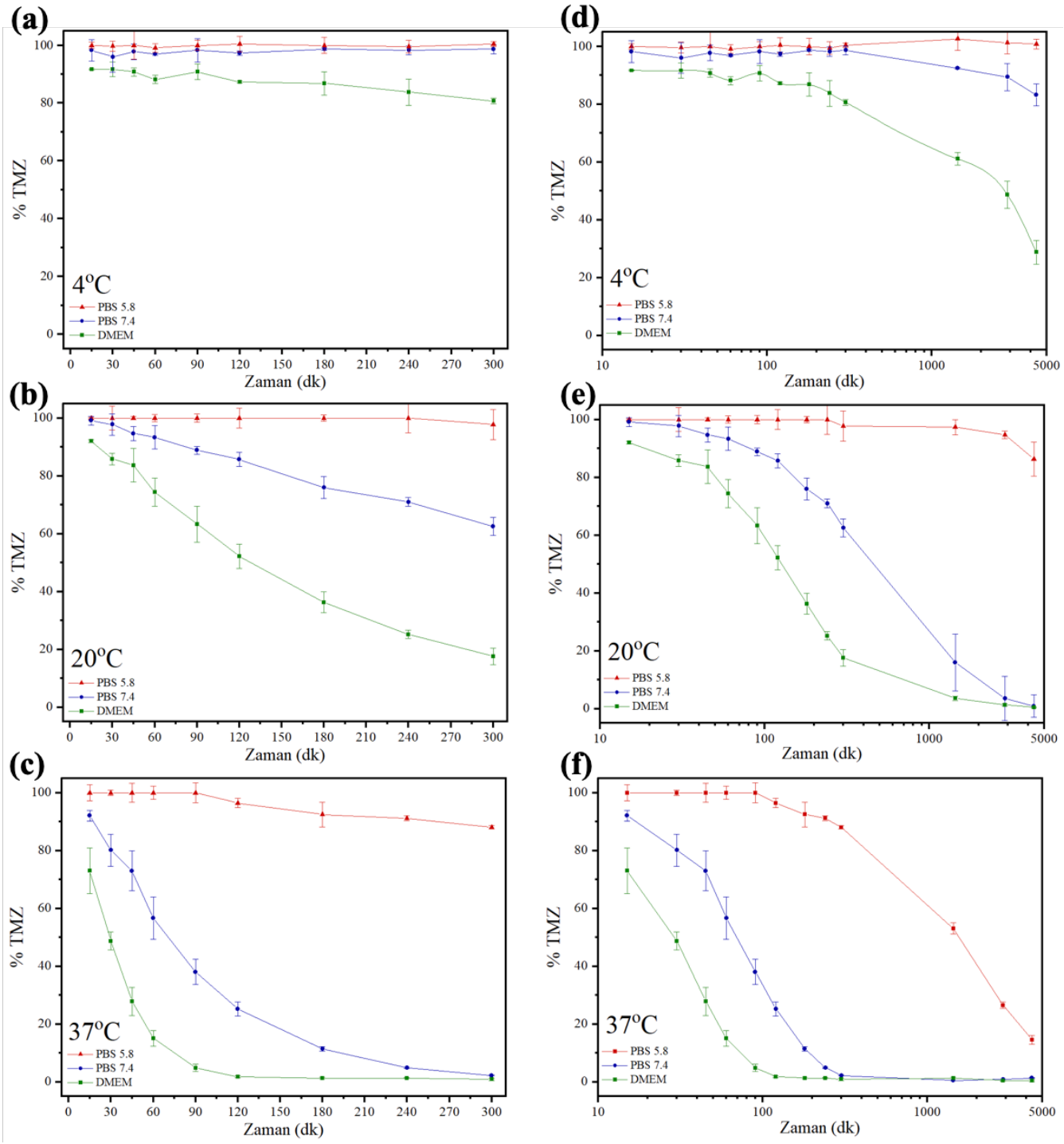
penceresinde çok hızlı azalmış; 15 dk'da %73.01 ± 7.85 olan TMZ, 30 dk'da %48.67 ± 3.11'e, 60 dk'da %15.04 ± 2.62'ye ve 120 dk'da %1.77 ± 0.26'ya gerilemiş; 300 dk sonunda %0.88 ± 0.40 düzeyine düşmüştür. Uzun zaman penceresinde TMZ'nin çok düşük seviyelerde seyrettiği izlenmiş (24 saat: %1.33 ± 0.20; 48 saat: %0.44 ± 0.15; 72 saat: %0.44 ± 0.32); 24 saat zaman noktasındaki sınırlı artış, iz düzey ölçümlerde analitik varyasyon kapsamında değerlendirilmiştir. 20 °C koşulunda DMEM'de bozunma daha yavaş olmakla birlikte belirgin bir azalma eğilimi sürmüştür. 15 dk'da %92.03 ± 0.49 olan TMZ, 60 dk'da %74.35 ± 4.89'a, 180 dk'da %36.29 ± 3.59'a ve 300 dk sonunda %17.61 ± 2.87'ye gerilemiş; uzun dönemde 24, 48 ve 72 saat sonunda TMZ sırasıyla %3.54 ± 0.70, %1.33 ± 0.34 ve %0.44 ± 0.20 olarak ölçülmüştür. 4 °C koşulunda dahi DMEM'de TMZ'nin kademeli olarak azaldığı görülmüştür (15 dk: %91.63 ± 0.17; 300 dk: %80.62 ± 1.02). Uzun zaman penceresinde azalma belirginleşmiş ve 24, 48 ve 72 saat sonunda TMZ sırasıyla %61.06 ± 2.15, %48.67 ± 4.76 ve %28.76 ± 4.17 düzeyinde saptanmıştır. Bu bulgular, DMEM'in bileşenlerinin TMZ'nin hidrolitik bozunmasını yalnızca sıcaklık ve pH üzerinden değil, ortam kompozisyonu üzerinden de hızlandırabildiğini düşündürmektedir.

Tablo 4.5: DMEM ortamında TMZ'nin farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) kalan miktarı (%TMZ).

DMEM			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	73.01 ± 7.85	92.03 ± 0.49	91.63 ± 0.17
30	48.67 ± 3.11	85.84 ± 2.00	91.63 ± 2.58
45	27.88 ± 4.85	83.62 ± 5.79	90.75 ± 1.47
60	15.04 ± 2.62	74.35 ± 4.89	88.11 ± 1.44
90	4.87 ± 1.33	63.29 ± 6.26	90.75 ± 2.75
120	1.77 ± 0.26	52.23 ± 4.23	87.22 ± 0.35
180	1.33 ± 0.30	36.29 ± 3.59	86.78 ± 4.05
240	1.33 ± 0.12	25.18 ± 1.42	83.70 ± 4.48
300	0.88 ± 0.40	17.61 ± 2.87	80.62 ± 1.02
1440	1.33 ± 0.20	3.54 ± 0.70	61.06 ± 2.15

2880	0.44 ± 0.15	1.33 ± 0.34	48.67 ± 4.76
4320	0.44 ± 0.32	0.44 ± 0.20	28.76 ± 4.17

Genel olarak bu sonuçlar, TMZ için daha asidik pH ve düşük sıcaklık koşullarının stabilite açısından avantaj sağladığını; nötr pH ve fizyolojik sıcaklıkta ise bozunmanın hızlandığını göstermektedir. Yapılan çalışmadan elde edilen bulgulara göre DMEM için $t_{1/2}$ değeri yaklaşık 0.75 saat PBS 7.4 için ise t1/2 değeri yaklaşık 1 saat olarak belirlenmiştir. Ortamlar birlikte değerlendirildiğinde stabilite eğilimi genel olarak PBS 5.8 > PBS 7.4 > DMEM şeklinde izlenmiş; özellikle DMEM'de 4 °C'de dahi anlamlı azalma gözlenmesi, literatürde mevcut tutarsız in vitro sonuçlarının bir sebebi olabileceği, deneysel prosedürlerde taze hazırlanmamış TMZ besiyeri çözeltilerinde bozunmadan kaynaklanan durumlar dolayısıyla aynı hücre hatlarında tutarsız IC50 değerlerine sebebiyet verebileceğini düşündürmüştür.



Şekil 4.3: TMZ'nin PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM ortamlarında farklı sıcaklıklarda (4°C (a, d), 20°C (b, e), 37°C (c, f)) zamana bağlı kimyasal stabilite profillerinin grafikleri. sol sütun 0–300 dk, sağ sütun 0–72 saat.

4.1.4. Metildiazonyum Çalışmaların Değerlendirilmesi

TMZ'nin hidrolitik bozunması sonucunda oluşan başlıca ürünlerden biri olan MDA'nın farklı ortam ve sıcaklık koşullarında hangi oluştuğu değerlendirilmiştir. MDA derişimleri PBS pH 5.8, PBS pH 7.4 ve DMEM ortamlarında 4 °C, 20 °C ve 37 °C'de belirlenen zaman noktalarında TMZ'nin bir diğer bozunma ürünü olan AIC ile HPLC'de nicel olarak izlenmiş; elde edilen verilerden eşdeğer oluşan MDA miktarı belirlenmiştir. MDA profilleri aynı örneklerde ölçülen TMZ profilleri ile birlikte yorumlanmıştır (Şekil 4.4). TMZ bozunmasının bir çıktısı olarak MDA'nın hangi koşullarda oluştuğunun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Genel olarak MDA profilleri, TMZ'nin azalmasına eşlik eden tipik bir ürün oluşum davranışı sergilemiş; ancak MDA'nın oluşum hızı 300 dk sonunda ulaşılan düzey ve 24–72 saat aralığındaki net miktarı koşullara göre belirgin biçimde değişmiştir. Bu farklılıklar, TMZ'den MDA oluşumunun pH ve sıcaklık tarafından kontrol edilen hidroliz kinetiğine duyarlı olduğunu; ayrıca DMEM gibi in vitro deneylerde sıklıkla kullanıla kompleks bir besiyeri ortamlarında dönüşümün zaman ölçeğini ve birikim düzeyini anlamlı ölçüde değiştirebildiğini göstermiştir.

PBS pH 7.4 ortamında MDA oluşumu sıcaklıkla belirgin biçimde hızlanmıştır (Şekil 4.4, Tablo 4.6). Bu ortamda 30 dk sonunda MDA düzeyi 37 °C, 20 °C ve 4 °C'de sırasıyla 20.46 ± 2.21; 8.09 ± 3.75 ve 5.21 ± 1.69 olarak belirlenmiştir. 90 dk sonunda aynı sıcaklıklarda MDA düzeyi sırasıyla 53.46 ± 11.43; 11.33 ± 1.35 ve 6.51 ± 4.08'e yükselmiştir. 300 dk sonunda MDA düzeyi ise sırasıyla 83.42 ± 8.52; 35.28 ± 3.17 ve 7.17 ± 1.54 olarak ölçülmüş; 72 saat sonunda ise sırasıyla 90.55 ± 2.57; 83.50 ± 3.90 ve 18.57 ± 3.75'e ulaşmıştır.

Tablo 4.6: PBS 7.4 ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) oluşan miktarı (%MDA).

PBS 7.4			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	12.10 ± 4.35	6.47 ± 1.15	4.89 ± 0.92
30	20.46 ± 2.21	8.09 ± 3.75	5.21 ± 1.69
45	32.03 ± 10.34	8.09 ± 2.51	6.19 ± 2.69
60	40.83 ± 4.77	10.68 ± 4.03	5.86 ± 0.36
90	53.46 ± 11.43	11.33 ± 1.35	6.51 ± 4.08
120	59.58 ± 4.42	14.89 ± 2.38	6.84 ± 0.75
180	73.64 ± 5.93	24.60 ± 3.81	6.51 ± 0.36
240	79.95 ± 6.86	29.77 ± 1.54	6.84 ± 1.55
300	83.42 ± 8.52	35.28 ± 3.17	7.17 ± 1.54
1440	84.39 ± 9.64	63.75 ± 9.85	8.14 ± 0.31
2880	89.61 ± 3.48	74.43 ± 7.69	12.38 ± 4.81
4320	90.55 ± 2.57	83.50 ± 3.90	18.57 ± 3.75

PBS pH 5.8 ortamında ise MDA oluşumu PBS pH 7.4'e kıyasla daha gecikmeli seyretmiştir (Şekil 4.4, Tablo 4.7). Bu ortamda 30 dk sonunda MDA düzeyi 37 °C, 20 °C ve 4 °C'de sırasıyla 5.84 ± 0.25; 6.15 ± 1.15 ve 4.89 ± 1.57 olarak belirlenmiştir. 90 dk sonunda MDA düzeyi sırasıyla 7.14 ± 1.19; 5.83 ± 0.49 ve 4.89 ± 1.56'dır. 300 dk sonunda MDA düzeyi sırasıyla 13.96 ± 1.03; 5.83 ± 0.95 ve 4.56 ± 0.76 olarak ölçülmüş; 72 saat sonunda ise sırasıyla 78.25 ± 6.13; 14.56 ± 1.04 ve 4.56 ± 1.01'dir.

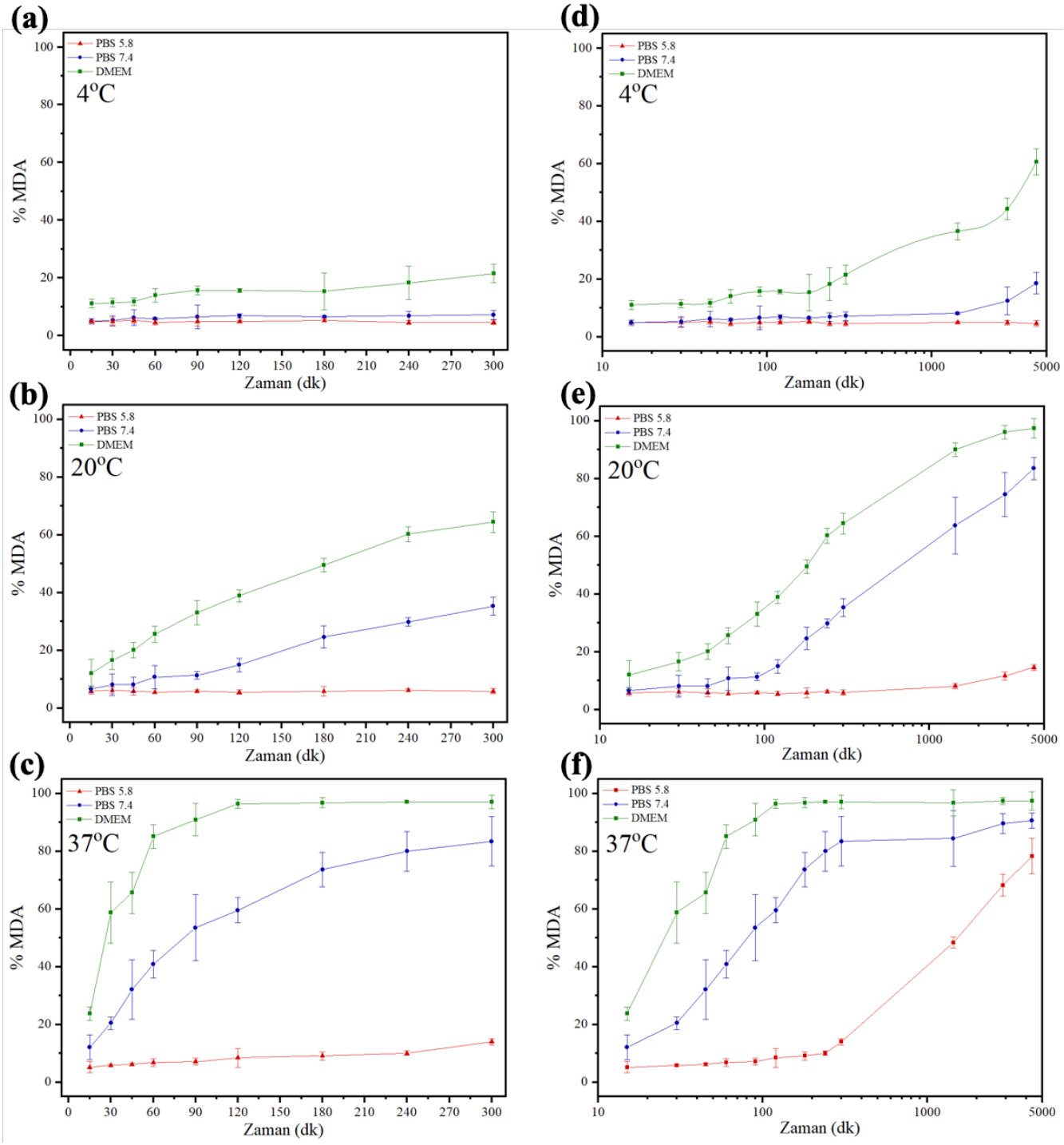
Tablo 4.7: PBS 5.8 ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) oluşan miktarı (%MDA).

PBS 5.8			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	5.19 ± 1.93	5.83 ± 1.08	4.89 ± 0.32
30	5.84 ± 0.25	6.15 ± 1.15	4.89 ± 1.57
45	6.17 ± 0.49	5.83 ± 1.40	5.21 ± 0.81
60	6.82 ± 1.27	5.50 ± 0.00	4.56 ± 0.86
90	7.14 ± 1.19	5.83 ± 0.49	4.89 ± 1.56
120	8.44 ± 3.27	5.50 ± 0.76	4.89 ± 0.36
180	9.09 ± 1.40	5.83 ± 1.70	5.21 ± 0.56
240	10.06 ± 0.71	6.15 ± 0.57	4.56 ± 0.72
300	13.96 ± 1.03	5.83 ± 0.95	4.56 ± 0.76
1440	48.38 ± 1.91	8.09 ± 0.91	4.89 ± 0.45
2880	68.18 ± 3.76	11.65 ± 1.42	4.89 ± 0.76
4320	78.25 ± 6.13	14.56 ± 1.04	4.56 ± 1.01

DMEM ortamında MDA oluşumu PBS tamponlarına kıyasla daha erken belirginleşmiş ve daha yüksek düzeylerde seyretmiştir (Şekil 4.4, Tablo 4.8). Bu ortamda 30 dk sonunda MDA düzeyi 37 °C, 20 °C ve 4 °C'de sırasıyla 58.77 ± 10.61; 16.50 ± 3.21 ve 11.40 ± 1.46 olarak belirlenmiştir. 90 dk sonunda MDA düzeyi sırasıyla 90.91 ± 5.69; 33.01 ± 4.24 ve 15.64 ± 1.57'ye yükselmiştir. 300 dk sonunda MDA düzeyi sırasıyla 97.08 ± 2.35; 64.40 ± 3.61 ve 21.50 ± 3.21 olarak ölçülmüş; 72 saat sonunda ise sırasıyla 97.40 ± 3.25; 97.41 ± 3.33 ve 60.59 ± 4.60'a ulaşmıştır. Bu bulgular, ortam kompozisyonunun ve sıcaklık değerlerinin TMZ'nin MDA'ya dönüşümünün zaman ölçeğini ve tampon çözeltiler ve deneysel olarak sıklıkla kullanılan biyolojik sıvılardaki davranışını belirgin biçimde etkileyebildiğini göstermiştir.

Tablo 4.8: DMEM ortamında MDA'nın farklı sıcaklıklarda (+4 °C, 20 °C ve 37 °C) zamana bağlı (15dk – 72 saat) oluşan miktarı (%MDA).

DMEM			
Zaman (dk)	**37 °C**	**20 °C**	**4 °C**
15	23.70 ± 2.19	11.97 ± 4.95	11.07 ± 1.52
30	58.77 ± 10.61	16.50 ± 3.21	11.40 ± 1.46
45	65.58 ± 7.14	20.06 ± 2.65	11.73 ± 1.35
60	85.06 ± 4.16	25.57 ± 2.80	14.01 ± 2.35
90	90.91 ± 5.69	33.01 ± 4.24	15.64 ± 1.57
120	96.43 ± 1.53	38.83 ± 2.12	15.64 ± 0.68
180	96.75 ± 1.74	49.51 ± 2.31	15.31 ± 6.32
240	97.08 ± 0.35	60.19 ± 2.65	18.24 ± 5.75
300	97.08 ± 2.35	64.40 ± 3.61	21.50 ± 3.21
1440	96.75 ± 4.57	89.97 ± 2.31	36.48 ± 2.95
2880	97.40 ± 1.21	96.12 ± 2.35	44.30 ± 3.73
4320	97.40 ± 3.25	97.41 ± 3.33	60.59 ± 4.60



Şekil 4.4: TMZ'nin PBS 5.8, PBS 7.4 ve DMEM ortamlarında farklı sıcaklıklarda (4ºC (a, d), 20ºC (b, e), 37ºC (c, f)) zamana bağlı bozunması ile oluşan %MDA'nın grafikleri. sol sütun 0–300 dk, sağ sütun 0–72 saat.

4.2. NANO LİPİT TAŞIYICILARIN ÜRETİM YÖNTEMLERİNE AİT BULGULAR

4.2.1. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi

Tez kapsamında sentezlenen Compritol/OA içeren NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretiminde, formülasyon ve proses değişkenlerinin nanopartiküllerin ürün özellikleri üzerindeki etkilerinin nicel olarak ortaya konulması amaçlanmıştır (Şekil 4.5). Bu kapsamda sıvı lipit/toplam lipit oranı**,** yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; elde edilen yanıtlar Design-Expert yazılımında ardışık model karşılaştırmaları ve ANOVA ile değerlendirilerek en uygun istatistiksel modeller belirlenmiştir (Tablo 4.9).

Yapılan çalışmalar sonucu sentezlenen nanopartiküllerin DLS analizleri ile ölçülen partikül boyutları için model seçiminde Design-Expert tarafından gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda en uygun modelin ikinci dereceden (kuadratik) model olduğu belirlenmiştir. Bu modelin ardışık p-değeri ($p < 0.001$), modelin istatistiksel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir. Kuadratik model için hesaplanan Düzeltilmiş R^2 değeri 0.97, Tahmin Edilen R^2 değeri ise 0.82 olup, bu iki değer arasındaki uyum modelin yüksek uygunluk ve güçlü öngörü performansına sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Uyumsuzluk değeri ($p < 0.01$) anlamlı bulunmuş olup bu durum modelin tüm varyasyonunu açıklamadığını işaret ederken tasarım çıktıları incelendiğinde saf hata düşük olması ve tasarımda sınırlı replikasyon bulunması sonucunda modelin uygunluğu tanısal grafiklerle ayrıca değerlendirilmiş ve uygunluk açısından olumsuz bir durum belirlenmemiştir. Modelde bağımsız değişkenler sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C) olarak kodlanmıştır.

İkinci dereceden modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.10), partikül boyutu yanıtının açıklanmasında modelin istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana faktörler değerlendirildiğinde, yüzey aktif madde yüzdesi ile homojenizasyon süresinin yüksek derecede anlamlı etkiye sahip olduğu görülmüştür (her ikisi için, $p < 0.001$). Sıvı lipit/toplam lipit oranı ise $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı bulunmuş ve partikül boyutuna daha sınırlı fakat istatistiksel olarak geçerli bir katkı sağlamıştır. Etkileşim terimleri incelendiğinde, yalnızca yüzey aktif madde yüzdesi ile homojenizasyon süresi arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). İkinci dereceden terimler incelendiğinde, yüzey aktif madde yüzdesinin karesel terimi $p < 0.001$ düzeyinde, homojenizasyon süresinin karesel terimi ise $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı bulunmuştur. Bu durum, partikül boyutunun yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi ile doğrusal olmayan bir ilişki gösterdiğini ortaya koymaktadır. Uyumsuzluk teriminin $p < 0.01$ seviyesinde anlamlı çıkmasına rağmen, tanısal

değerlendirmeler modelin genel olarak tutarlı olduğunu göstermiştir; hata terimlerinin normal dağılım varsayımını karşıladığı, varyansın homojen seyrettiği ve modeli orantısız biçimde etkileyen herhangi bir gözlem bulunmadığı doğrulanmıştır. Tüm bu sonuçlar, ikinci dereceden modelin Compritol-OA sisteminde partikül boyutunu yüksek doğrulukla temsil ettiğini ve formülasyon optimizasyonunda kullanılabileceğini göstermektedir.

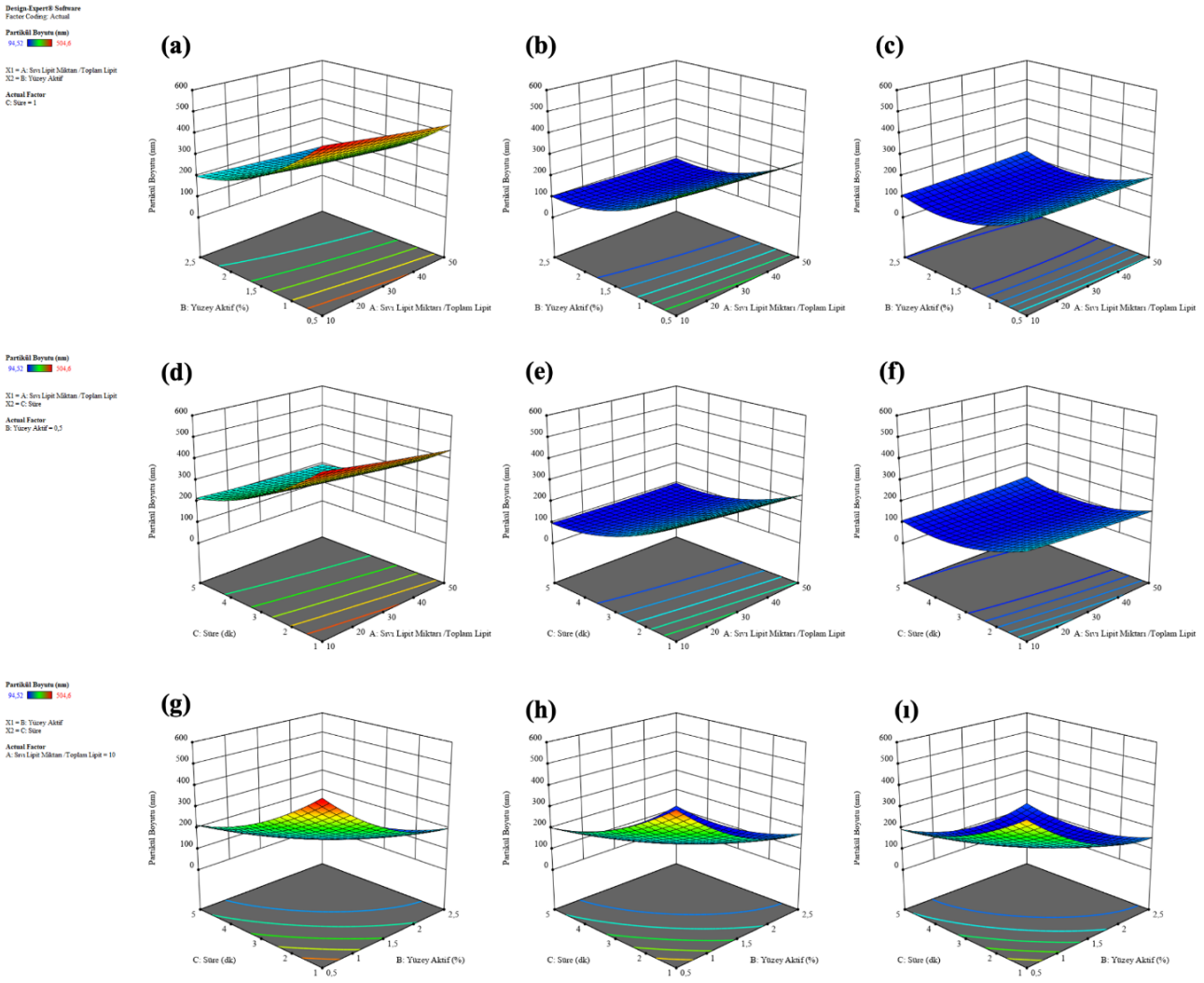
Tablo 4.9: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi sonuçları.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu Ortalama (nm)
1	30	1.5	3	123.6	128.1	128	126.6 ± 2.6
2	30	1.5	3	124.0	128.3	126.7	126.3 ± 2.2
3	30	1.5	3	129.2	132.4	133.3	131.6 ± 2.2
4	30	2.5	1	178.2	177.2	180.4	178.6 ± 1.6
5	30	1.5	3	131.6	133.8	136.0	133.8 ± 2.2
6	10	1.5	5	104.4	103.9	108.1	105.5 ± 2.3
7	10	2.5	3	114.3	119.6	116.6	116.8 ± 2.7
8	50	1.5	5	111.6	114.4	114.4	113.5 ± 1.6
9	10	0.5	3	318.8	317.1	317.9	317.9 ± 20.9
10	30	2.5	5	93.4	93.2	96.8	94.52 ± 2.0
11	30	0.5	5	193.8	201.9	201.9	199.2 ± 4.7
12	50	2.5	3	97.0	98.6	98.3	97.9 ± 0.9
13	10	1.5	1	279.1	287.4	278.1	281.5 ± 5.1
14	50	0.5	3	252.4	253.3	261.0	255.5 ± 4.7
15	30	1.5	3	117.3	119.2	121.7	119.4 ± 2.2
16	30	0.5	1	487.7	525.7	560.3	504.6 ± 36.3

17	50	1.5	1	239.0	210.8	220.8	223.5 ± 14.3

Tablo 4.10: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C).

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	182050.69	9	20227.85	63.41	$p < 0.001$
A – Sıvı Lipit Miktarı	2154.96	1	2154.96	6.76	$p < 0.05$
B – Yüzey Aktif	77890.10	1	77890.10	244.17	$p < 0.001$
C – Süre	57034.15	1	57034.15	178.79	$p < 0.001$
AB	473.06	1	473.06	1.48	$p > 0.05$
AC	1089.00	1	1089.00	3.41	$p > 0.05$
BC	12245.64	1	12245.64	38.39	$p < 0.001$
A^2	41.18	1	41.18	0.13	$p > 0.05$
B^2	18540.29	1	18540.29	58.12	$p < 0.001$
C^2	10666.78	1	10666.78	33.44	$p < 0.01$
Hata Terimleri	2232.97	7	318.99	—	—
Uyumsuzluk	2108.62	3	702.87	22.61	$p < 0.01$
Saf Hata	124.35	4	31.09	—	—
Toplam	184283.65	16	—	—	—



Şekil 4.5: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi**.**

PDI yanıtı için model seçiminde Design-Expert tarafından (Şekil 4.6) gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları incelendiğinde, en uygun modelin iki faktörlü etkileşim modeli (2FI) olduğu belirlenmiştir. Ardışık p-değeri ($p < 0.05$), 2FI modelinin doğrusal modele kıyasla anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermiştir. Model için hesaplanan Düzeltilmiş R^2 değeri 0.86, Tahmin Edilen R^2 değeri ise 0.60'olarak belirlenmiştir. Tahmin Edilen R^2'nin daha düşük olması, modelin öngörü performansının sınırlı olabileceğine işaret etmekle birlikte, uyumsuzluk teriminin anlamsız bulunması

($p > 0.05$) modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu ve PDI yanıtını temsil etmede yeterli uyumu sağladığını göstermektedir. Bu nedenle PDI'ın modellenmesinde 2FI modelinin uygun olduğu kabul edilmiştir (Tablo 4.11).

2FI modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.12), modelin anlamlı olduğunu göstermektedir ($p < 0.001$). Ana faktörler değerlendirildiğinde, yüzey aktif madde yüzdesi ile homojenizasyon süresinin PDI üzerinde çok yüksek derecede anlamlı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir (her ikisi için, $p < 0.001$). Buna karşın sıvı lipit/toplam lipit oranı PDI açısından anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Etkileşim terimleri incelendiğinde, yalnızca sıvı lipit/toplam lipit oranı ile homojenizasyon süresi arasındaki etkileşim anlamlı bulunmuş ($p < 0.05$), diğer etkileşim terimleri ise anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Tanısal değerlendirmeler, modelin temel varsayımları karşıladığını doğrularken; hata terimlerinin normal dağılıma uygun olduğu, tahmin değerleri boyunca belirgin bir değişen varyans yapısı gözlenmediği ve modeli orantısız biçimde etkileyen uç gözlem bulunmadığı belirlenmiştir.

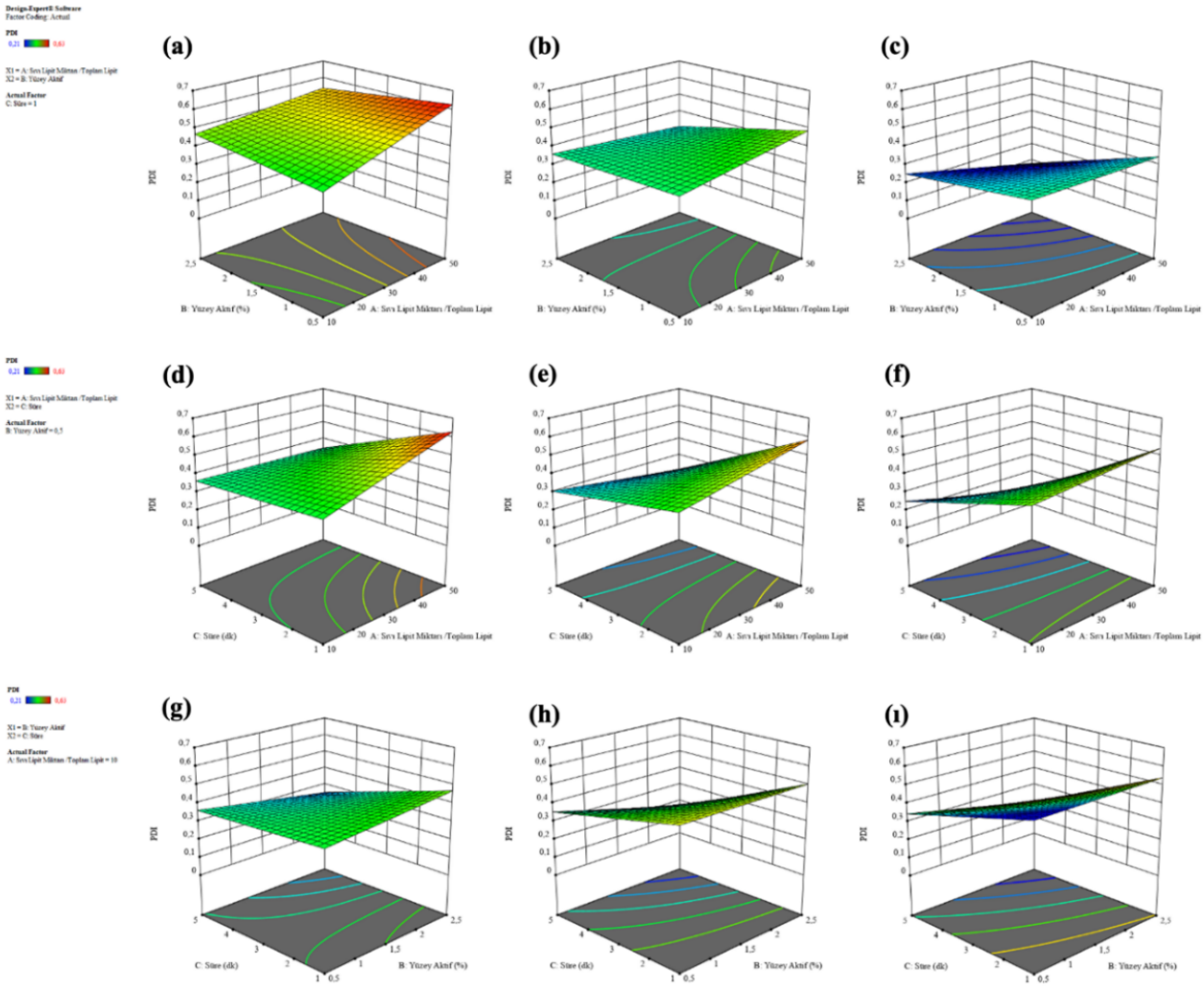
Tablo 4.11: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi sonuçları.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	PDI	PDI	PDI	PDI Ortalama
1	30	1.5	3	0.386	0.406	0.393	0.395 ± 0.01
2	30	1.5	3	0.386	0.287	0.366	0.341 ± 0.05
3	30	1.5	3	0.392	0.402	0.428	0.407 ± 0.02
4	30	2.5	1	0.502	0.512	0.543	0.519 ± 0.02
5	30	1.5	3	0.383	0.384	0.372	0.380 ± 0.01
6	10	1.5	5	0.274	0.331	0.282	0.295 ± 0.03
7	10	2.5	3	0.335	0.282	0.344	0.321 ± 0.03
8	50	1.5	5	0.201	0.211	0.218	0.210 ± 0.01
9	10	0.5	3	0.314	0.359	0.429	0.367 ± 0.06
10	30	2.5	5	0.223	0.247	0.220	0.230 ± 0.01

11	30	0.5	5	0.385	0.425	0.372	0.394 ± 0.03
12	50	2.5	3	0.266	0.274	0.244	0.262 ± 0.02
13	10	1.5	1	0.512	0.465	0.440	0.472 ± 0.04
14	50	0.5	3	0.452	0.470	0.466	0.462 ± 0.01
15	30	1.5	3	0.364	0.371	0.349	0.361 ± 0.01
16	30	0.5	1	0.462	0.538	0.516	0.505 ± 0.04
17	50	1.5	1	0.510	0.728	0.653	0.630 ± 0.11

Tablo 4.12: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C).

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	0.1740	6	0.0290	16.64	$p < 0.001$
A – Sıvı Lipit Miktarı	0.0015	1	0.0015	0.85	$p > 0.05$
B – Yüzey Aktif	0.0196	1	0.0196	11.25	$p < 0.01$
C – Süre	0.1243	1	0.1243	71.00	$p < 0.001$
AB	0.0059	1	0.0059	3.40	$p > 0.05$
AC	0.0109	1	0.0109	6.85	$p < 0.05$
BC	0.0079	1	0.0079	4.55	$p > 0.05$
Hata Terimleri	0.0174	10	0.0017	—	—
Uyumsuzluk	0.0146	4	0.0037	3.51	$p > 0.05$
Saf Hata	0.0028	6	0.0007	—	—
Toplam	0.1914	16	—	—	—



Şekil 4.6: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk), PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi.

Zeta potansiyeli yanıtı için Design-Expert tarafından gerçekleştirilen (Şekil 4.7) ardışık model karşılaştırmaları incelendiğinde, en uygun modelin doğrusal model olduğu belirlenmiştir. Ardışık p-değeri ($p < 0.001$), doğrusal modelin ortalama modele kıyasla anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermiştir. Model için hesaplanan Düzeltilmiş R^2 değeri 0.79 ve Tahmin Edilen R^2 değeri 0.72 olup, iki değer arasındaki farkın 0.2'nin altında olması modelin öngörü performansının tatmin edici olduğunu ve zeta potansiyelindeki değişimleri yeterli doğrulukla açıklayabildiğini göstermektedir.

Uyumsuzluk teriminin anlamsız bulunması ($p > 0.05$) ise modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu ve doğrusal modelin zeta potansiyeli yanıtı için uygun olduğunu doğrulamaktadır (Tablo 4.13).

Doğrusal modele ait ANOVA sonuçları, modelin genel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana faktörler incelendiğinde, sıvı lipit/toplam lipit oranı ile yüzey aktif madde yüzdesi zeta potansiyeli üzerinde $p < 0.01$ düzeyinde anlamlı etki göstermiştir. Buna karşın homojenizasyon süresi $p > 0.05$ düzeyinde anlamsız bulunmuş; süre değişimlerinin zeta potansiyeli üzerinde belirgin bir etkisi olmadığı değerlendirilmiştir. Tanısal değerlendirmeler, hata terimlerinin normal dağılım varsayımını karşıladığını; tahmin edilen değerlere karşı çizilen hata grafiklerinin ise varyansın homojen seyrettiğini ve belirgin bir sistematik sapma bulunmadığını göstermektedir (Tablo 4.14). Bu sonuçlar, doğrusal modelin zeta potansiyelini temsil etmede istatistiksel olarak güvenilir olduğunu desteklemektedir.

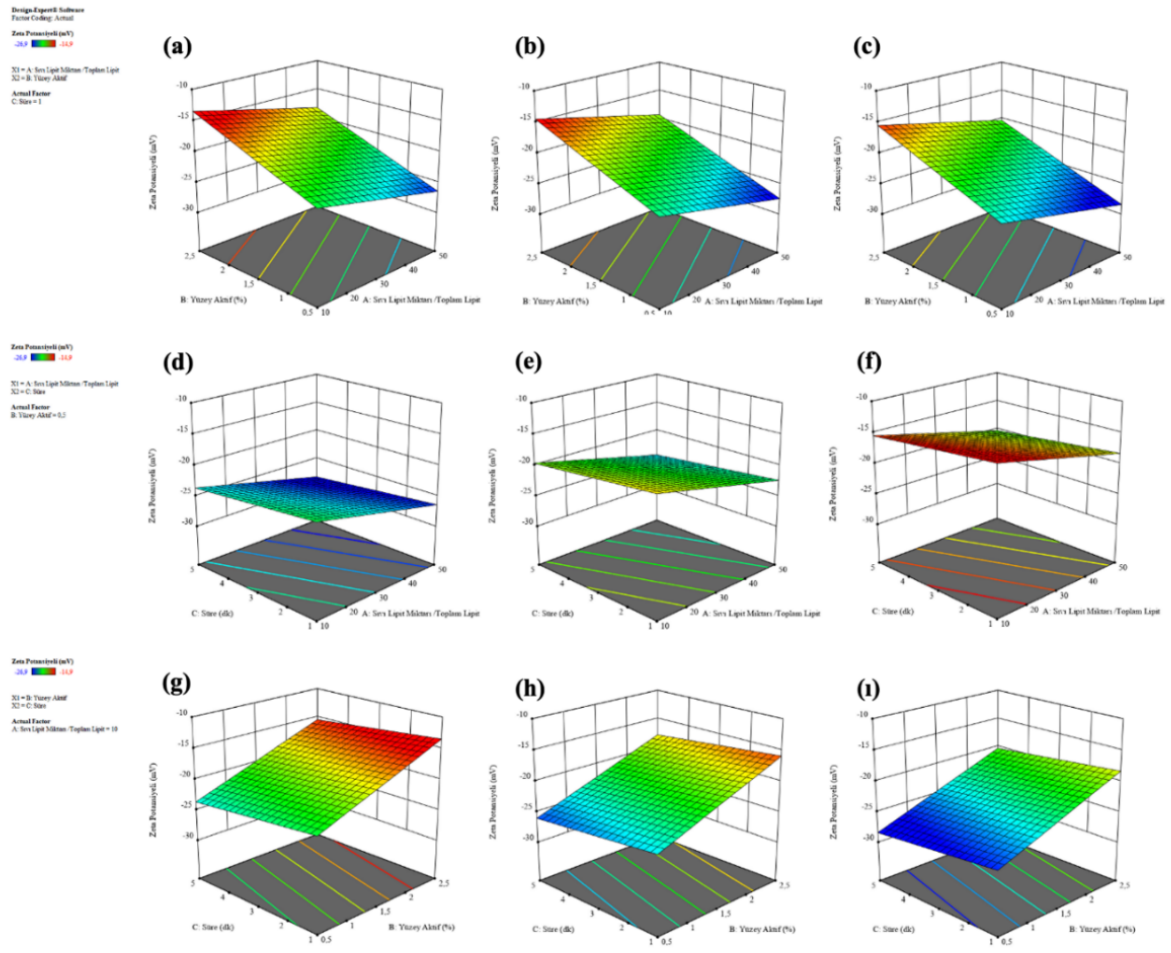
Tablo 4.13: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi sonuçları**.**

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli Ortalama (mV)
1	30	1.5	3	-23.8	-23.6	-23.1	-23.5 ± 0.36
2	30	1.5	3	-24.3	-24.5	-22.8	-23.9 ± 0.93
3	30	1.5	3	-21.3	-20.7	-20.8	-20.9 ± 0.32
4	30	2.5	1	-16.0	-15.9	-16.5	-16.1 ± 0.32
5	30	1.5	3	-20.5	-19.3	-20.3	-20.1 ± 0.64
6	10	1.5	5	-18.9	-18.4	-17.5	-18.3 ± 0.71
7	10	2.5	3	-15.3	-16.5	-15.3	-15.7 ± 0.69
8	50	1.5	5	-23.7	-24.4	-24.6	-24.2 ± 0.47
9	10	0.5	3	-22.9	-24.3	-23.5	-23.6 ± 0.70
10	30	2.5	5	-16.1	-16.4	-15.8	-16.1 ± 0.30
11	30	0.5	5	-27.5	-26.8	-26.5	-26.9 ± 0.51

12	50	2.5	3	-19.8	-20.4	20.5	-20.2 ± 0.42
13	10	1.5	1	-14.8	-15.0	-14.8	-14.9 ± 0.14
14	50	0.5	3	-26.2	-25.1	-25.2	-25.5 ± 0.78
15	30	1.5	3	-19.5	-20.0	-19.5	-19.6 ± 0.29
16	30	0.5	1	-24.3	-24.3	-25.6	-24.7 ± 0.75
17	50	1.5	1	-22.9	-20.4	-22.2	-21.8 ± 1.29

Tablo 4.14: Compritol/OA formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu, sıvı lipit/toplam lipit oranı (A), yüzey aktif madde yüzdesi (B) ve homojenizasyon süresi (C).

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	186.92	3	62.31	21.26	$p < 0.001$
A – Sıvı Lipit Miktarı	46.08	1	46.08	15.72	$p < 0.01$
B – Yüzey Aktif	132.84	1	132.84	45.33	$p < 0.001$
C – Süre	8.00	1	8.00	2.73	$p > 0.05$
Hata Terimleri	38.10	13	2.93	—	—
Uyumsuzluk	22.46	9	2.50	0.64	$p > 0.05$
Saf Hata	15.64	4	3.91	—	—
Toplam	225.02	16	—	—	—



Şekil 4.7: Compritol/OA temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi**.**

4.2.2. Nano Lipit Taşıyıcıların (Compritol/OA) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi

Compritol/OA içeren NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemi ile üretiminde, formülasyon ve proses değişkenlerinin ürün özellikleri üzerindeki etkilerinin nicel olarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda (Şekil 4.8) yüzey aktif madde yüzdesi (A), ultrasonikasyon süresi (B) ve ultrasonikasyon şiddeti (C) bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; elde edilen yanıtlar Design-Expert yazılımında ardışık model karşılaştırmaları ve ANOVA ile değerlendirilerek en uygun istatistiksel modeller belirlenmiştir (Tablo 4.15).

Partikül boyutu yanıtı için gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda, en uygun modelin ikinci dereceden (kuadratik) model olduğu belirlenmiştir. Kuadratik modele geçişin istatistiksel olarak anlamlı olması ($p < 0.001$) ve kuadratik model için Düzeltilmiş $R^2 = 0.99$ ile Tahmin Edilen $R^2 = 0.97$ değerlerinin birbirine yakın bulunması, modelin hem yüksek uyum hem de güçlü öngörü performansına sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca kuadratik modelde uyumsuzluk anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$); bu bulgu, modelin partikül boyutu yanıtını temsil etmede yeterli uyumu sağladığını desteklemektedir. İkinci dereceden modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.16), modelin genel olarak son derece anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana faktörler değerlendirildiğinde yüzey aktif madde yüzdesi, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti değişkenlerinin her birinin partikül boyutu üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu görülmüştür (her biri için $p < 0.001$).

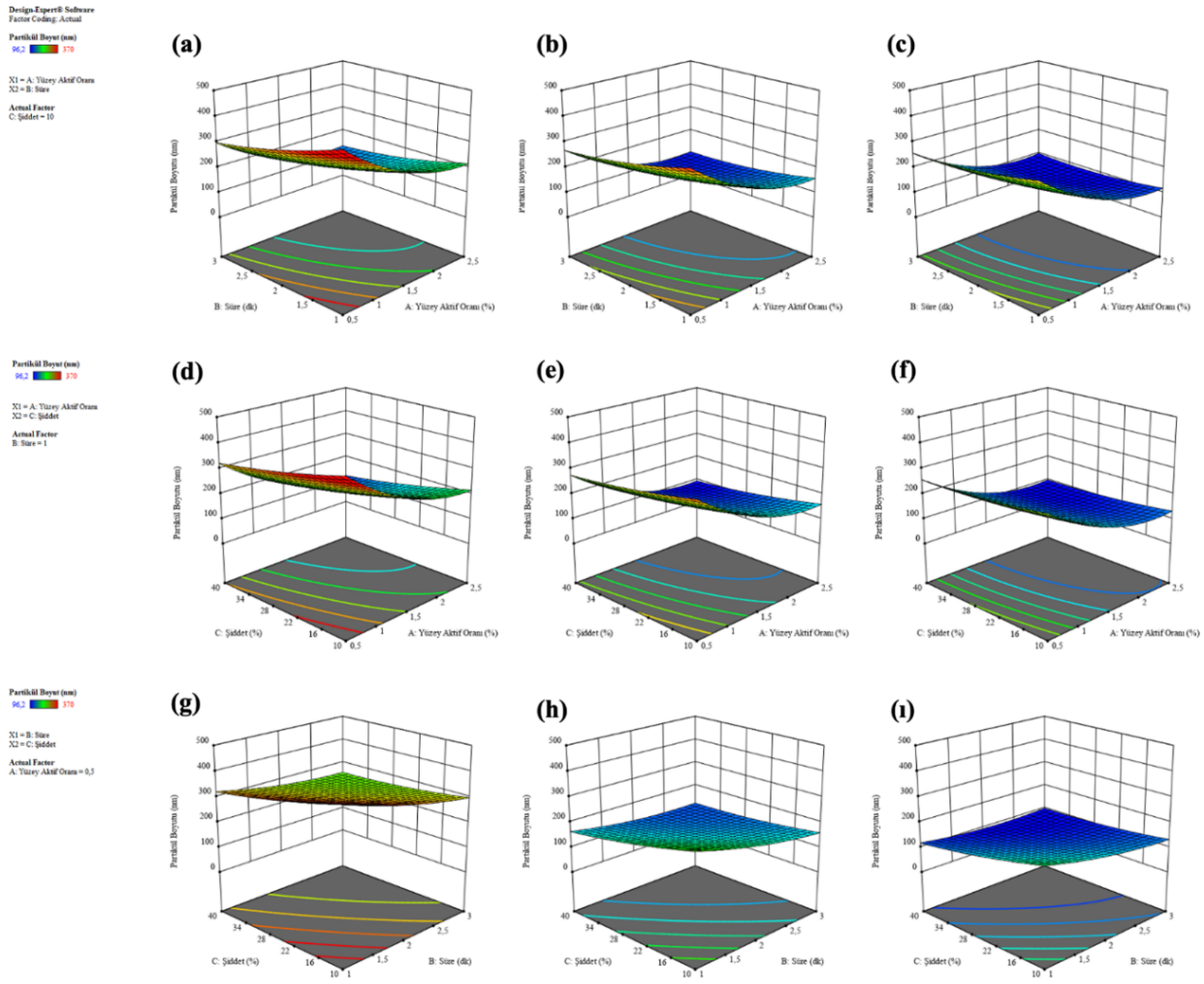
Etkileşim terimleri incelendiğinde, yüzey aktif madde yüzdesi ile ultrasonikasyon süresi etkileşimi anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Ayrıca ultrasonikasyon süresi ile ultrasonikasyon şiddeti etkileşiminin daha yüksek anlamlılık düzeyinde anlamlı olması ($p < 0.01$), proses parametrelerinin birlikte ayarlanmasının partikül boyutunu belirgin biçimde etkileyebildiğini göstermektedir. Buna karşın yüzey aktif madde yüzdesi ile ultrasonikasyon şiddeti etkileşimi anlamlı bulunmamıştır. Kuadratik terimler değerlendirildiğinde, yüzey aktif madde yüzdesine ait karesel terimin yüksek derecede anlamlı olması ($p < 0.001$), partikül boyutunun yüzey aktif madde yüzdesi ile doğrusal olmayan (eğrisel) bir ilişki sergilediğini göstermektedir. Benzer şekilde, ultrasonikasyon süresine ait karesel terimin ($p < 0.01$) ve ultrasonikasyon şiddetine ait karesel terimin ($p < 0.05$) anlamlı bulunması, partikül boyutunun ultrasonikasyon parametreleri ile de doğrusal olmayan bir karakter taşıdığını desteklemektedir. Model yeterliliği açısından uyumsuzluk teriminin anlamlı olmaması ($p > 0.05$), kuadratik modelin deneysel veriye yeterli uyum sağladığını desteklemektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, kuadratik modelin Compritol/OA NLT sisteminde partikül boyutunu güvenilir biçimde temsil ettiği ve formülasyon optimizasyonunda kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.15: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi sonuçları.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu Ortalama (nm)
1	1.5	3	10	168.9	167.8	162.5	166.4 ± 3.42
2	2.5	2	40	96.8	96.3	95.4	96.2 ± 0.71
3	0.5	1	25	359.4	372.9	377.9	370.0 ± 9.57
4	1.5	1	40	154.0	155.3	161.9	157.1 ± 4.24
5	1.5	2	25	149.9	149.8	151.5	150.4 ± 0.95
6	2.5	3	25	103.0	102.9	101.4	102.4 ± 0.90
7	1.5	2	25	152.7	152.6	151.4	152.3 ± 0.72
8	1.5	2	25	144.9	143.9	149.5	146.1 ± 2.99
9	0.5	3	25	268.0	266.3	259.3	264.5 ± 4.61
10	2.5	2	10	161.3	159.0	149.6	156.7 ± 6.20
11	1.5	1	10	260.2	262.4	273.5	265.4 ± 7.13
12	1.5	3	40	124.1	121.7	124.2	123.3 ± 1.42
13	1.5	2	25	164.1	163.5	162.7	163.4 ± 0.70
14	2.5	1	25	162.6	166.0	159.2	162.6 ± 3.40
15	0.5	2	10	344.2	345.9	350.4	346.9 ± 3.20
16	1.5	2	25	160.5	157.0	156.3	158.0 ± 2.25
17	0.5	2	40	277.8	281.2	278.3	279.0 ± 1.84

Tablo 4.16. Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	1.068E+05	9	11 866.82	215.44	$p < 0.001$
A – Yüzey Aktif	68 913.28	1	68 913.28	1 251.12	$p < 0.001$
B – Süre	11 137.78	1	11 137.78	202.21	$p < 0.001$
C – Şiddet	9 786.01	1	9 786.01	177.66	$p < 0.001$
AB	513.02	1	513.02	9.31	$p < 0.05$
AC	13.69	1	13.69	0.25	$p > 0.05$
BC	1 062.76	1	1 062.76	19.29	$p < 0.01$
A^2	13 318.82	1	13 318.82	241.80	$p < 0.001$
B^2	896.59	1	896.59	16.28	$p < 0.01$
C^2	373.43	1	373.43	6.78	$p < 0.05$
Hata Terimleri	385.57	7	55.08	—	—
Uyumsuzluk	202.96	3	67.65	1.48	$p > 0.05$
Saf Hata	182.61	4	45.65	—	—
Toplam	1.072E+05	16	—	—	—



Şekil 4.8: Compritol /OA temelli NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti %10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi.

Design-Expert yazılımında gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları (Şekil 4.9) sonucunda PDI yanıtı için en uygun modelin ikinci dereceden (kuadratik) model olduğu belirlenmiştir. Kuadratik modelin ardışık p-değerinin $p < 0.05$ olması, modele eklenen ikinci dereceden terimlerin PDI yanıtını açıklama gücünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artırdığını göstermektedir. Ayrıca kuadratik model için uyumsuzluk anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Bu bulgu, modelin deneysel veriye yeterli uyum sağladığını desteklemektedir (Tablo 4.17).

Kuadratik modele ait uyum istatistikleri incelendiğinde, modelin açıklayıcılığının yüksek olduğu görülmüştür. Düzeltilmiş $R^2 = 0.89$ ve Tahmin Edilen $R^2 = 0.50$ değerinin düzeltilmiş R^2'ye kıyasla belirgin biçimde daha düşük olması, modelin öngörü performansının sınırlı olabileceğine ve gereksiz terimlerin azaltılması/ek doğrulama koşularının yapılmasının yararlı olacağına işaret etmektedir. Kuadratik modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.18), modelin genel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana etkiler değerlendirildiğinde yüzey aktif madde yüzdesi ($p < 0.01$), ultrasonikasyon süresi ($p < 0.001$) ve ultrasonikasyon şiddeti ($p < 0.001$) PDI üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Etkileşim terimleri incelendiğinde, yüzey aktif madde yüzdesi ile ultrasonikasyon süresi, yüzey aktif madde yüzdesi ile ultrasonikasyon şiddeti ve ultrasonikasyon süresi ile ultrasonikasyon şiddeti arasındaki etkileşimlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmüştür. Bu bulgu, PDI yanıtında söz konusu değişkenlerin birlikte değiştirilmesinin, ana etkilerin ötesinde belirgin bir ek katkı oluşturmadığını düşündürmektedir. Kuadratik terimler değerlendirildiğinde, yüzey aktif madde yüzdesine ait karesel terimin anlamlı bulunması ($p < 0.05$), PDI'nin yüzey aktif madde yüzdesi ile doğrusal olmayan (eğrisel) bir ilişki sergileyebileceğini göstermektedir. Buna karşın ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddetine ait karesel terimler anlamlı bulunmamıştır.

Tablo 4.17: Compritol - OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi sonuçları.

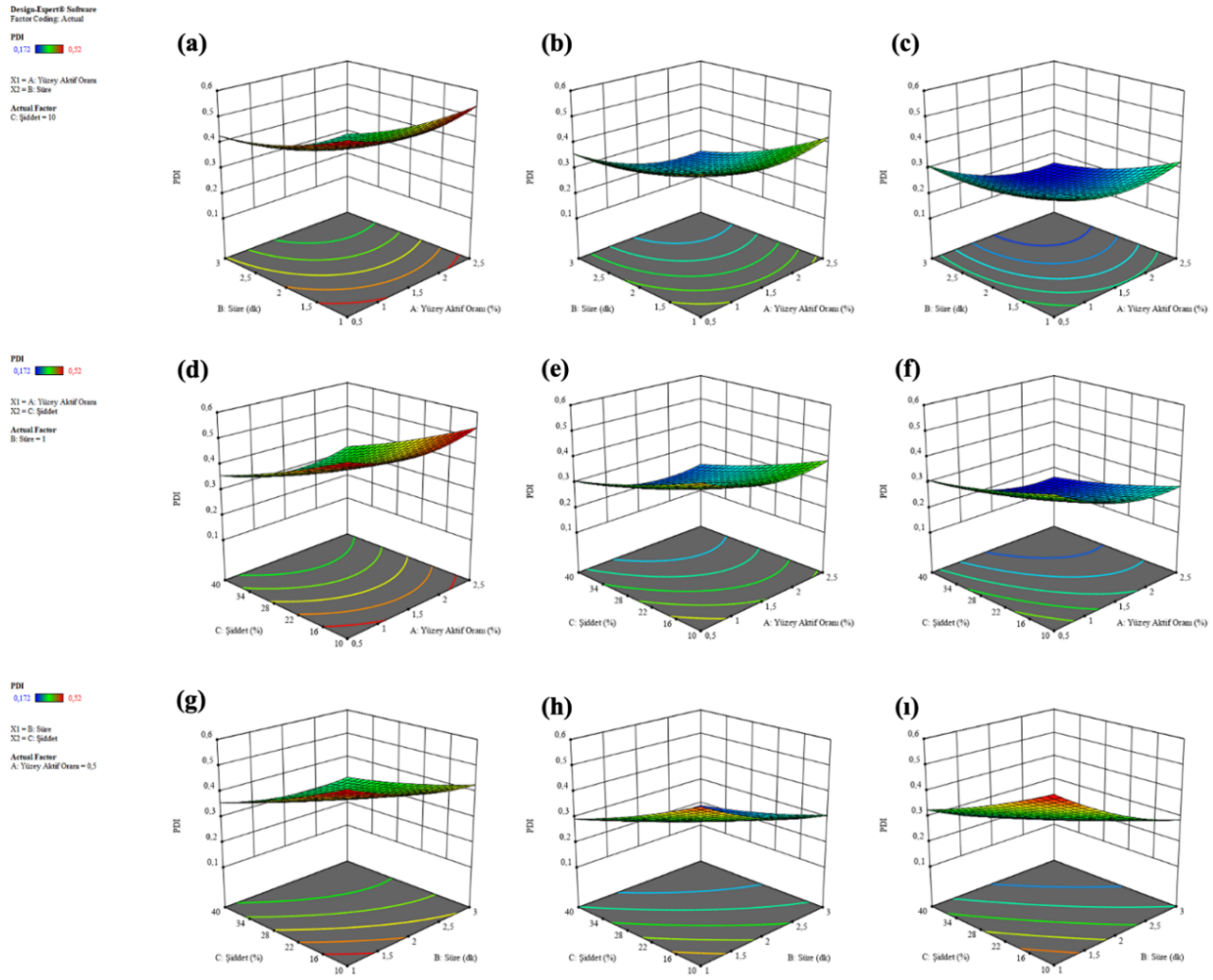
Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	PDI	PDI	PDI	PDI Ortalama
1	1.5	3	10	0.280	0.297	0.270	0.282 ± 0.01
2	2.5	2	40	0.219	0.202	0.209	0.210 ± 0.01
3	0.5	1	25	0.462	0.396	0.419	0.426 ± 0.03
4	1.5	1	40	0.334	0.353	0.282	0.323 ± 0.04
5	1.5	2	25	0.250	0.239	0.274	0.254 ± 0.02
6	2.5	3	25	0.229	0.239	0.235	0.234 ± 0.01
7	1.5	2	25	0.326	0.352	0.291	0.323 ± 0.03
8	1.5	2	25	0.320	0.327	0.259	0.302 ± 0.04

9	0.5	3	25	0.345	0.345	0.450	0.380 ± 0.06
10	2.5	2	10	0.412	0.404	0.366	0.394 ± 0.02
11	1.5	1	10	0.503	0.521	0.535	0.520 ± 0.02
12	1.5	3	40	0.174	0.185	0.156	0.172 ± 0.01
13	1.5	2	25	0.275	0.271	0.266	0.271 ± 0.01
14	2.5	1	25	0.391	0.410	0.404	0.401 ± 0.01
15	0.5	2	10	0.462	0.479	0.482	0.474 ± 0.01
16	1.5	2	25	0.253	0.276	0.297	0.275 ± 0.02
17	0.5	2	40	0.328	0.261	0.376	0.302 ± 0.06

Tablo 4.18: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	0.1351	9	0.0150	14.67	$p < 0.001$
A – Yüzey Aktif	0.0147	1	0.0147	14.37	$p < 0.01$
B – Süre	0.0453	1	0.0453	44.27	$p < 0.01$
C – Şiddet	0.0549	1	0.0549	53.70	$p < 0.001$
AB	0.0037	1	0.0037	3.58	$p > 0.05$
AC	0.0000	1	0.0000	0.0352	$p > 0.05$
BC	0.0019	1	0.0019	1.85	$p > 0.05$
A^2	0.0097	1	0.0097	9.48	$p < 0.05$
B^2	0.0031	1	0.0031	3.06	$p > 0.05$
C^2	0.0006	1	0.0006	0.5926	$p > 0.05$

Hata Terimleri	0.0072	7	0.0010	—	—
Uyumsuzluk	0.0042	3	0.0014	1.86	p > 0.05
Saf Hata	0.0030	4	0.0007	—	—
Toplam	0.1423	16	—	—	—



Şekil 4.9: Compritol/OA NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi.

Zeta potansiyeli yanıtının (Şekil 4.10) modellenmesinde gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda zeta potansiyeli yanıtı için en uygun modelin doğrusal model olduğu belirlenmiştir. Doğrusal modelin anlamlı bulunması ($p < 0.05$) ve daha yüksek dereceden modellere geçişin anlamlı bir iyileşme sağlamaması, zeta potansiyelinin incelenen aralıkta ağırlıklı olarak doğrusal bir eğilimle açıklanabildiğini göstermektedir. Doğrusal model için Düzeltilmiş $R^2 = 0.47$ ve Tahmin Edilen $R^2 = 0.33$ olup, bu değerler modelin açıklayıcılığının sınırlı/orta düzeyde olduğunu; ancak öngörü performansının düzeltilmiş R^2 ile uyumlu bir düzeyde seyrettiğini düşündürmektedir (Tablo 4.19).

Doğrusal modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.20), modelin genel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.05$). Ana faktörler değerlendirildiğinde, yüzey aktif madde oranının zeta potansiyeli üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu görülmüştür ($p <0.01$). Buna karşın ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti değişkenleri zeta potansiyeli yanıtında anlamlı bulunmamıştır.

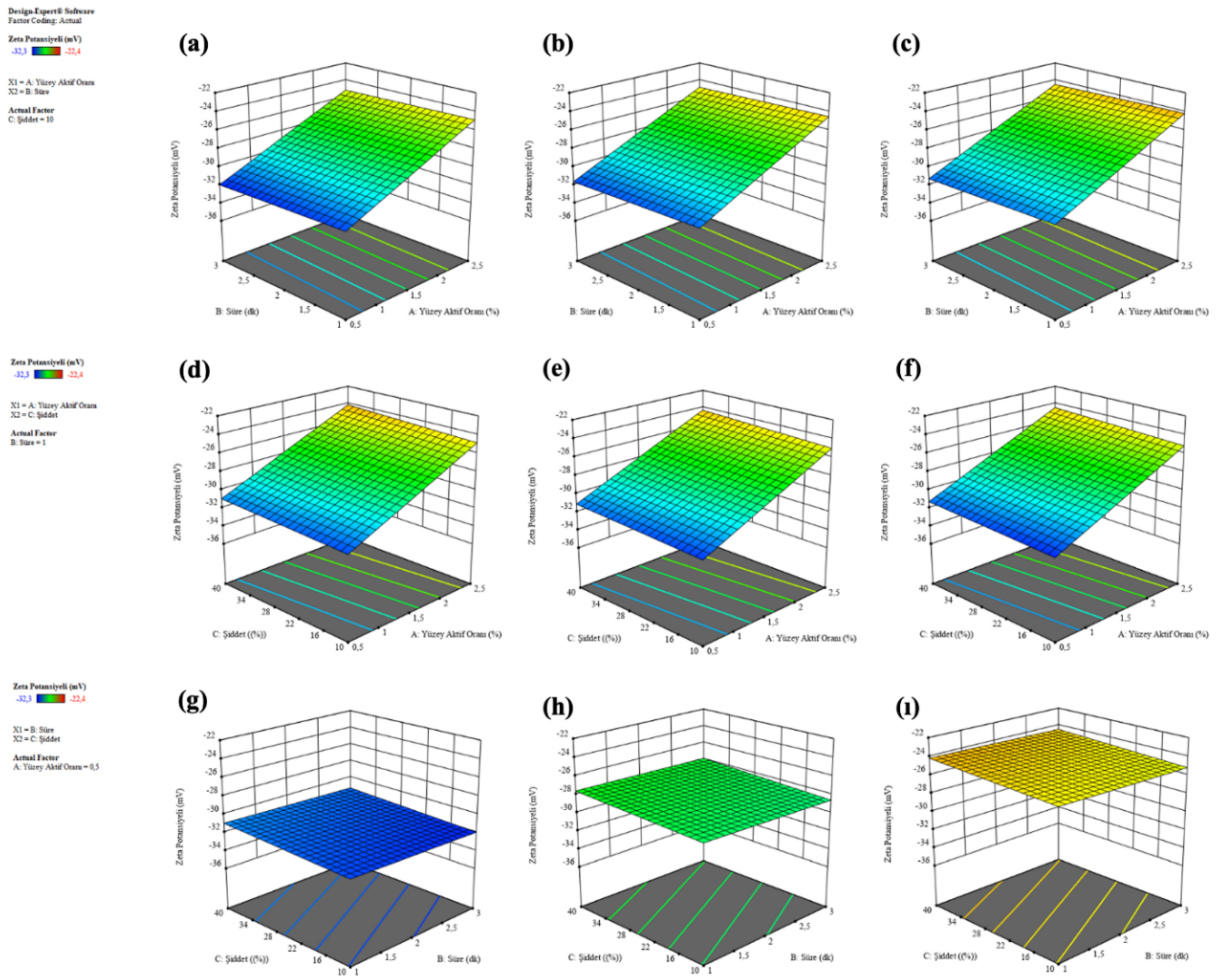
Tablo 4.19: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi sonuçları.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli Ortalama (mV)
1	1.5	3	10	-28.3	-26.8	-27.7	-27.6 ± 0.75
2	2.5	2	40	-21.7	-23.9	-22.3	-22.6 ± 1.14
3	0.5	1	25	-30.1	-29.5	-29.0	-29.5 ± 0.55
4	1.5	1	40	-29.7	-29.4	-28.4	-29.2 ± 0.68
5	1.5	2	25	-27.9	-26.8	-27.8	-27.5 ± 0.61
6	2.5	3	25	-22.1	-22.1	-23.1	-22.4 ± 0.58
7	1.5	2	25	-25.3	-25.8	-26.6	-25.9 ± 0.66
8	1.5	2	25	-31.9	-30.4	-30.1	-30.8 ± 0.96
9	0.5	3	25	-22.9	-29.6	-30.9	-30.1 ± 4.29
10	2.5	2	10	-26.1	-27.5	-25.8	-26.5 ± 0.91

11	1.5	1	10	-27.5	-26.8	-26.5	-27.1 ± 0.51
12	1.5	3	40	-26.6	-27.6	-27.0	-29.7 ± 0.50
13	1.5	2	25	-31.8	-32.3	-31.4	-31.8 ± 0.45
14	2.5	1	25	-22.8	-22.7	-22.5	-22.7 ± 0.15
15	0.5	2	10	-32.7	-32.5	-31.7	-32.3 ± 0.53
16	1.5	2	25	-31.8	-31.1	-32.4	-31.8 ± 0.65
17	0.5	2	40	-29.4	-29.5	-29.1	-29.3 ± 0.21

Tablo 4.20: Compritol/OA formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	92.25	3	30.75	5.54	$p < 0.05$
A – Yüzey Aktif	91.12	1	91.12	16.43	$p < 0.001$
B – Süre	0.2113	1	0.2113	0.0381	$p > 0.05$
C – Şiddet	0.9113	1	0.9113	0.1643	$p > 0.05$
Hata Terimleri	72.09	13	5.55	—	—
Uyumsuzluk	42.88	9	4.76	0.6524	$p > 0.05$
Saf Hata	29.21	4	7.30	—	—
Toplam	164.34	16	—	—	—



Şekil 4.10: Compritol/OA NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti %10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı %0,5, 1,5 ve 2,5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi.

4.2.3. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Sıcak Homojenizasyon Yöntemi ile Üretimi

Partikül boyutu yanıtı için Precirol/Hint yağı içeren formülasyonlarda (Şekil 4.11) Design-Expert yazılımı ile gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda en uygun modelin ikinci dereceden (kuadratik) model olduğu belirlenmiştir. Ardışık model p-değeri ($p < 0.001$), kuadratik modelin doğrusal ve iki faktörlü etkileşim (2FI) modellere kıyasla yanıtı açıklama gücünde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermektedir. Kuadratik model için hesaplanan Düzeltilmiş R^2 değeri 0.97 ve Tahmin Edilen R^2 değeri 0.87 olup, bu iki değer arasındaki farkın 0.1'de kalması modelin hem açıklayıcılığının hem de öngörü performansının yüksek olduğunu göstermektedir. Ayrıca

uyumsuzluk teriminin anlamsız bulunması ($p > 0.05$), modelden kaynaklanan sistematik bir hata olmadığını ve seçilen kuadratik modelin deneysel verilerle uyumlu olduğunu doğrulamaktadır (Tablo 4.21).

İkinci dereceden modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.22), modelin partikül boyutunu açıklamada genel olarak çok yüksek derecede anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana etkiler değerlendirildiğinde, homojenizasyon süresinin partikül boyutu üzerinde belirgin bir etkiye sahip olduğu belirlenmiş ($p < 0.001$), buna karşılık sıvı lipit/toplam lipit oranı ile yüzey aktif madde yüzdesi tek başlarına anlamlı bulunmamıştır (her ikisi için, $p > 0.05$). Etkileşim terimleri incelendiğinde, sıvı lipit/toplam lipit oranı ile yüzey aktif madde yüzdesi arasındaki etkileşim ($p < 0.05$) ile yüzey aktif madde yüzdesi ile homojenizasyon süresi arasındaki etkileşim ($p < 0.01$) anlamlı bulunmuştur. Karesel terimler açısından ise yüzey aktif madde yüzdesinin ve homojenizasyon süresinin karesel terimlerinin her ikisinin de anlamlı olması ($p < 0.001$), partikül boyutunun bu iki parametre ile doğrusal olmayan bir ilişki gösterdiğini ve deney alanı içinde optimum bir çalışma aralığı bulunduğunu desteklemektedir.

Tanısal grafikler birlikte değerlendirildiğinde, hata terimlerinin yaklaşık normal dağılım gösterdiği, varyansın deney alanı boyunca homojen seyrettiği ve model katsayılarını orantısız biçimde etkileyen uç gözlemler bulunmadığı görülmüştür. Bu bulgular, kuadratik modelin Precirol–Hint yağı içeren NLT formülasyonlarında partikül boyutunun modellenmesi ve optimizasyon çalışmalarında kullanılabileceğini göstermektedir.

Tablo 4.21: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi Sonuçları.

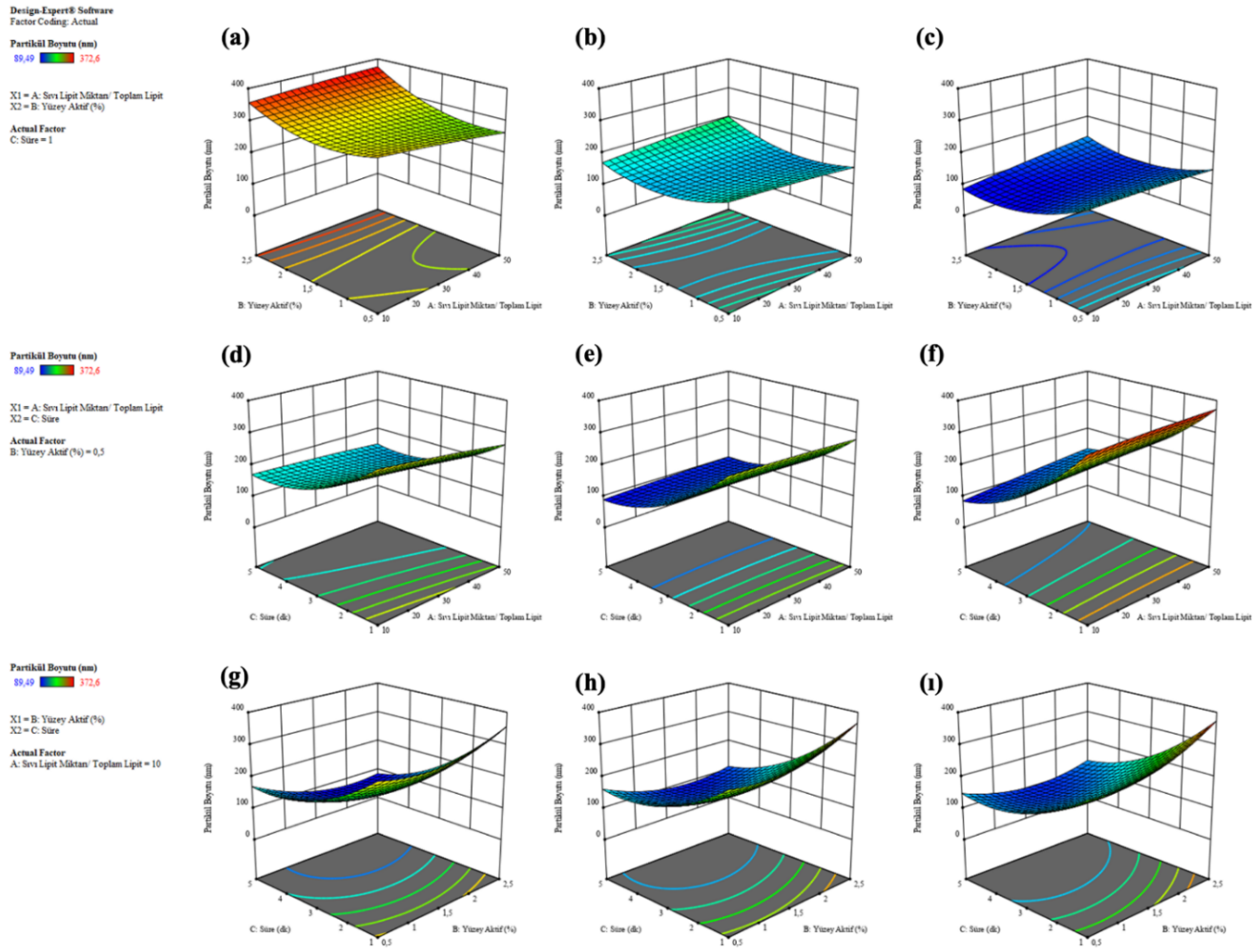
Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu Ortalama (nm)
1	50	1.5	5	96.0	95.9	95.8	95.9 ± 0.1
2	50	2.5	3	197.4	198.0	195.5	197.0 ± 1.3
3	30	0.5	1	286.4	277.1	280.3	281.3 ± 4.7
4	30	1.5	3	145.4	148.2	147.4	147.0 ± 1.4
5	30	2.5	1	360.4	377.4	380	372.6 ± 10.6
6	10	1.5	1	309.3	300.4	305.1	305.0 ± 4.4

7	50	0.5	3	166.8	166.7	170.3	167.9 ± 2.0
8	30	0.5	5	154.9	161.1	156.0	157.4 ± 3.3
9	30	1.5	3	147.9	149.0	149.5	148.8 ± 0.8
10	10	1.5	5	89.4	90.1	88.9	89.4 ± 0.6
11	30	2.5	5	123.0	122.8	125.9	123.9 ± 1.7
12	50	1.5	1	275.2	275.6	293.6	281.5 ± 10.5
13	30	1.5	3	142.8	143.9	149.4	145.3 ± 3.5
14	10	2.5	3	150.1	159.5	167.5	159.1 ± 8.7
15	30	1.5	3	155.6	150.6	154.5	153.6 ± 2.6
16	30	1.5	3	128.5	129.1	130.5	129.4 ± 1.0
17	10	0.5	3	197.5	201.2	198.5	199.0 ± 1.9

Tablo 4.22: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	98341.54	9	10926.84	69.75	$p < 0.001$
A – Sıvı Lipit Miktarı	13.18	1	13.18	0.84	$p \geq 0.05$
B – Yüzey Aktif	276.13	1	276.13	1.76	$p \geq 0.05$
C – Süre	74824.53	1	74824.53	477.63	$p < 0.001$
AB	1190.25	1	1190.25	7.60	$p < 0.05$
AC	223.95	1	223.95	1.43	$p \geq 0.05$
BC	3893.76	1	3893.76	24.85	$p < 0.01$
A^2	25.20	1	25.20	0.16	$p \geq 0.05$

B^2	621.01	1	621.01	3.97	$p \geq 0.05$
C^2	10782.06	1	10782.06	68.82	$p < 0.001$
Hata Terimleri	1096.62	7	156.66	—	—
Uyumsuzluk	760.93	3	253.64	3.02	$p \geq 0.05$
Saf Hata	335.69	4	83.92	—	—
Toplam	99438.16	16	—	—	—



Şekil 4.11: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c)

homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi.

Precirol–Hint yağı içeren formülasyonlarda (Şekil 4.12) PDI yanıtı için Design-Expert yazılımı ile yapılan ardışık model karşılaştırmaları sonucunda en uygun modelin doğrusal model olduğu belirlenmiştir. Ardışık model p-değerinin 0.01'in altında olması ($p < 0.01$), doğrusal modelin ortalama modele kıyasla yanıtı açıklama gücünde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermektedir. Doğrusal model için hesaplanan, Düzeltilmiş R^2 değeri 0.62 ve Tahmin Edilen R^2 değeri 0.43 olup, düzeltilmiş ve tahmin edilen R^2 değerleri arasındaki farkın 0.2'nin altında kalması modelin öngörü performansının kabul edilebilir düzeyde olduğuna işaret etmektedir. PDI yanıtının 0.23–0.62 aralığında nispeten sınırlı bir değişim göstermesi dikkate alındığında, doğrusal model bu sınırlı varyasyonun temsil edilmesi için yeterli bir yaklaşım sunmaktadır (Tablo 4.23).

Doğrusal modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.24), modelin genel olarak istatistiksel açıdan anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.01$). Ana faktörler incelendiğinde, yüzey aktif madde yüzdesi PDI üzerinde oldukça anlamlı, homojenizasyon süresi ise anlamlı etkiye sahiptir (her ikisi için, $p < 0.01$). Buna karşılık, sıvı lipit/toplam lipit oranı PDI açısından anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). Tanısal değerlendirmeler, hata terimlerinin yaklaşık normal dağılım gösterdiğini; tahmin edilen değerlere karşı çizilen artık/hata grafiklerinin ise belirgin bir değişen varyans yapısı ve sistematik sapma işaret etmediğini göstermektedir. Bu bulgular, doğrusal modelin Precirol–Hint yağı içeren formülasyonlarda PDI yanıtını istatistiksel olarak güvenilir biçimde temsil ettiğini desteklemektedir.

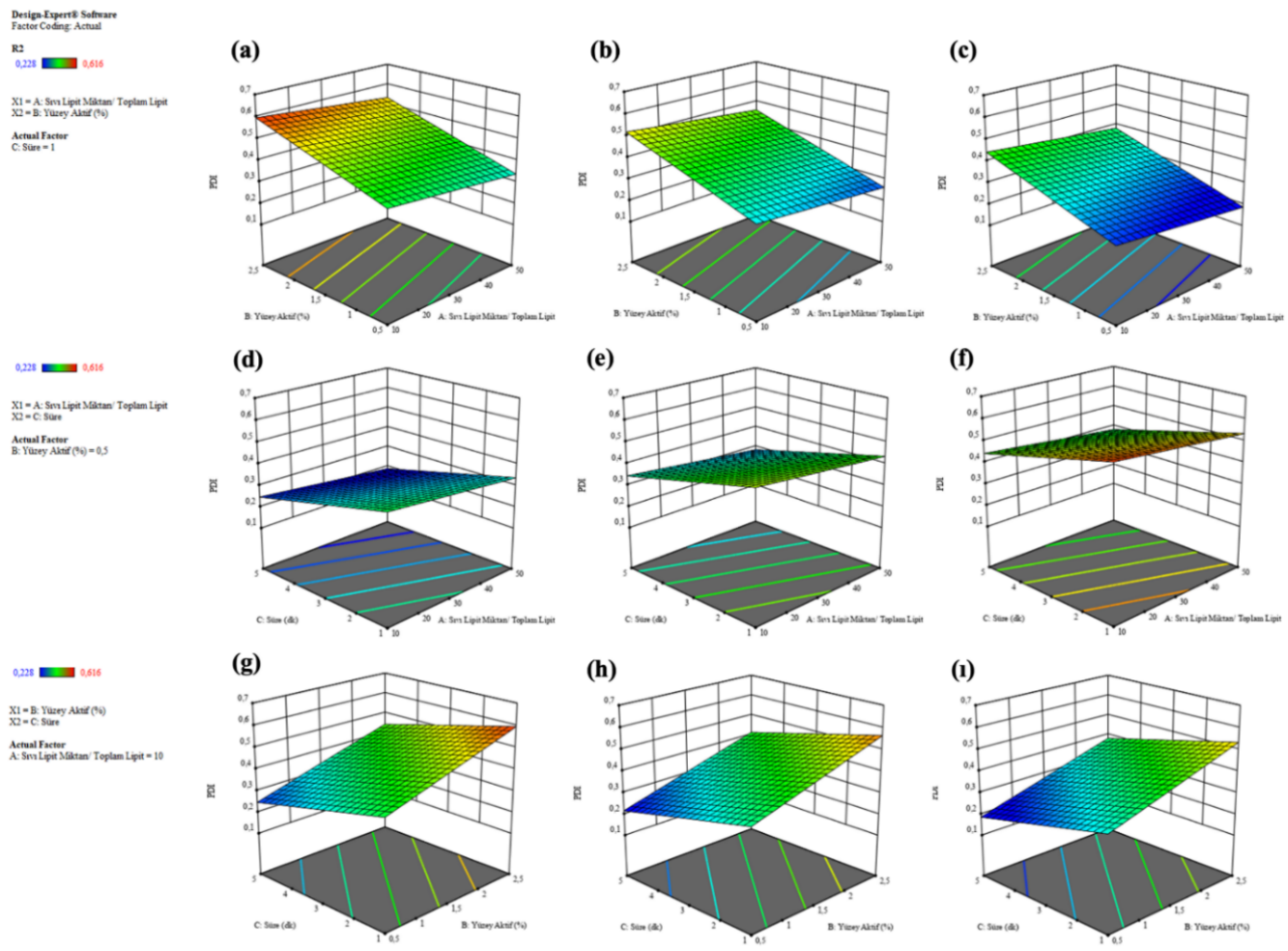
Tablo 4.23: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi Sonuçları.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	PDI	PDI	PDI	PDI Ortalama
1	50	1.5	5	0.269	0.258	0.277	0.268 ± 0.01
2	50	2.5	3	0.475	0.494	0.502	0.490 ± 0.01
3	30	0.5	1	0.302	0.352	0.404	0.353 ± 0.05
4	30	1.5	3	0.449	0.425	0.439	0.438 ± 0.01
5	30	2.5	1	0.424	0.477	0.437	0.446 ± 0.03

6	10	1.5	1	0.479	0.507	0.486	0.491 ± 0.01
7	50	0.5	3	0.229	0.227	0.229	0.228 ± 0.01
8	30	0.5	5	0.239	0.249	0.230	0.239 ± 0.01
9	30	1.5	3	0.455	0.454	0.456	0.455 ± 0.01
10	10	1.5	5	0.232	0.228	0.243	0.234 ± 0.01
11	30	2.5	5	0.321	0.366	0.379	0.355 ± 0.03
12	50	1.5	1	0.379	0.414	0.450	0.414 ± 0.04
13	30	1.5	3	0.400	0.439	0.409	0.416 ± 0.02
14	10	2.5	3	0.686	0.618	0.544	0.616 ± 0.07
15	30	1.5	3	0.434	0.458	0.449	0.447 ± 0.01
16	30	1.5	3	0.452	0.440	0.487	0.460 ± 0.02
17	10	0.5	3	0.295	0.291	0.326	0.304 ± 0.02

Tablo 4.24: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	0.1303	3	0.0434	9.70	$p < 0.01$
A – Sıvı Lipit Miktarı	0.0075	1	0.0075	1.68	$p \geq 0.05$
B – Yüzey Aktif	0.0766	1	0.0766	17.11	$p < 0.01$
C – Süre	0.0462	1	0.0462	10.32	$p < 0.01$
Hata Terimleri	0.0582	13	0.0045	—	—
Uyumsuzluk	0.0570	9	0.0063	21.07	$p < 0.01$
Saf Hata	0.0012	4	0.0003	—	—
Toplam	0.1886	16	—	—	—



Şekil 4.12: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde (Tween 80) yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi.

Precirol–Hint yağı içeren formülasyonlarda (Şekil 4.13) zeta potansiyeli yanıtı için Design-Expert yazılımı ile gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda en uygun modelin doğrusal model olduğu belirlenmiştir. Ardışık model p-değeri 0.0092 olup ($p < 0.01$), doğrusal modelin ortalama modele kıyasla yanıtı açıklama gücünde istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağladığını göstermektedir. Doğrusal model için hesaplanan Düzeltilmiş R^2 değeri 0.48 ve Tahmin Edilen R^2 değeri 0.23'tür. Tahmin edilen R^2'nin düzeltilmiş R^2'ye göre belirgin düzeyde düşük olması (farkın

0.2’nin üzerinde olması), modelin açıklayıcılığının orta düzeyde olduğunu ve özellikle öngörü performansının sınırlı kalabileceğini göstermektedir (Tablo 4.25).

Doğrusal modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.26), modelin genel olarak anlamlı olduğunu ortaya koymuştur. Ana faktörler incelendiğinde, yalnızca yüzey aktif madde yüzdesinin zeta potansiyeli üzerinde anlamlı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ($p < 0.01$). Buna karşılık, sıvı lipit/toplam lipit oranı ile homojenizasyon süresi zeta potansiyeli üzerinde anlamlı bulunmamıştır (her ikisi için, $p > 0.05$). Bu bulgular, Precirol–Hint yağı sisteminde zeta potansiyelindeki değişimlerin temel olarak yüzey aktif madde yüzdesi tarafından açıklandığını göstermektedir.

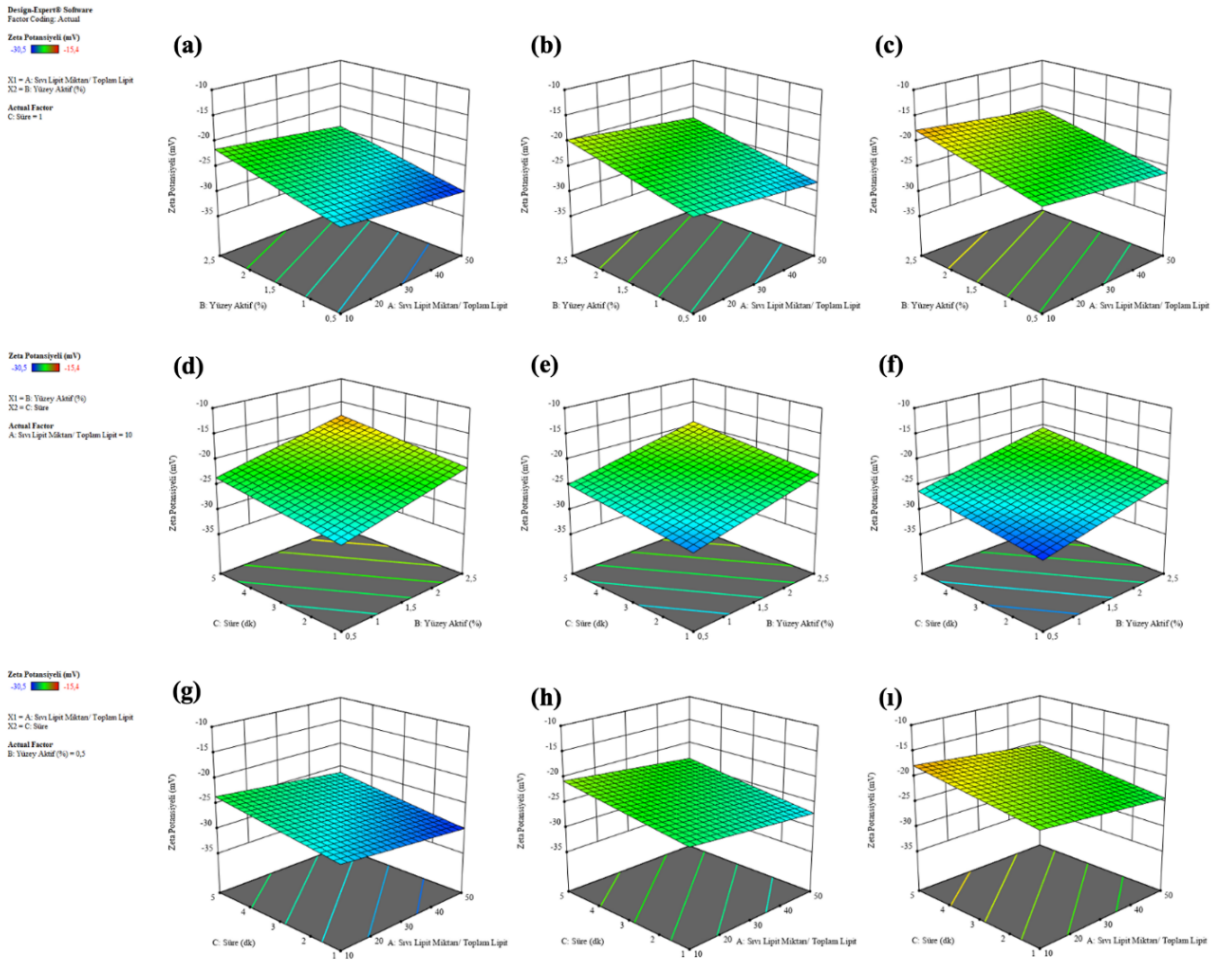
Tablo 4.25: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları.

Deney Kodu	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	Yüzey Aktif (%)	Süre (dk)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)
1	50	1.5	5	-23.8	-26.4	-24.3	-24.8 ± 1.38
2	50	2.5	3	-24.8	-25.2	-24.7	-24.9 ± 0.26
3	30	0.5	1	-31.1	-31.5	-28.7	-30.5 ± 1.51
4	30	1.5	3	-22.2	-22.2	-23.4	-22.6 ± 0.69
5	30	2.5	1	-20.8	-20.6	-21.5	-20.9 ± 0.47
6	10	1.5	1	-21.8	-21.6	-21.9	-21.8 ± 0.15
7	50	0.5	3	-24.7	-22.7	-25.6	-24.3 ± 1.48
8	30	0.5	5	-25.4	-24.2	-25.3	-25 ± 0.67
9	30	1.5	3	-28.1	-25.6	-26.7	-26.8 ± 1.25
10	10	1.5	5	-21.3	-19.1	-19.0	-19.8 ± 1.30
11	30	2.5	5	-16.0	-15.8	-14.4	-15.4 ± 0.87
12	50	1.5	1	-26.5	-26.2	-27.3	-26.7 ± 0.57
13	30	1.5	3	-23.4	-23.4	-22.3	-23 ± 0.64

14	10	2.5	3	-21.9	-21.6	-22.5	-22 ± 0.46
15	30	1.5	3	-24.2	-24.1	-23.2	-23.8 ± 0.55
16	30	1.5	3	-27.7	-26.1	-27.5	-27.1 ± 0.87
17	10	0.5	3	-25.3	-26.3	-27.2	-26.3 ± 0.95

Tablo 4.26: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için sıcak homojenizasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	107.88	3	35.96	5.87	$p < 0.01$
A – Sıvı Lipit Miktarı	14.58	1	14.58	2.38	$p \geq 0.05$
B – Yüzey Aktif	65.55	1	65.55	10.70	$p < 0.01$
C – Süre	27.75	1	27.75	4.53	$p \geq 0.05$
Hata Terimleri	79.68	13	6.13	—	—
Uyumsuzluk	61.40	9	6.82	1.49	$p \geq 0.05$
Saf Hata	18.27	4	4.57	—	—
Toplam	187.56	16	—	—	—



Şekil 4.13: Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyon yöntemiyle üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı (%), yüzey aktif madde yüzdesi (%) ve homojenizasyon süresinin (dk) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) homojenizasyon süresi 1, 3 ve 5 dk koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–yüzey aktif etkileşimi, (d–f) sıvı lipit/toplam lipit oranı % 10, 30 ve 50 koşullarında yüzey aktif–homojenizasyon süresi etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde yüzdesi % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında sıvı lipit/toplam lipit oranı–homojenizasyon süresi etkileşimi.

4.2.4. Nano Lipit Taşıyıcıların (Precirol/Hint Yağı) Ultrasonikasyon Yöntemi ile Üretimi

Precirol–Hint yağı içeren NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemi (Şekil 4.14) ile üretiminde, formülasyon ve proses değişkenlerinin ürün özellikleri üzerindeki etkilerinin nicel olarak ortaya konulması amaçlanmıştır. Bu kapsamda yüzey aktif oranı (A), ultrasonikasyon süresi (B) ve ultrasonikasyon şiddeti (C) bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; elde edilen yanıtlar Design-Expert yazılımında ardışık model karşılaştırmaları ve ANOVA ile değerlendirilerek en uygun istatistiksel modeller belirlenmiştir.

Partikül boyutu yanıtı için gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda, en uygun modelin ikinci dereceden (kuadratik) model olduğu belirlenmiştir. Kuadratik modele geçişin istatistiksel olarak anlamlı olması ($p < 0.001$) ve doğrusal/2FI modellerde uyumsuzluk teriminin anlamlı bulunmasına karşın ($p < 0.05$), kuadratik modelde uyumsuzluğun anlamlı bulunmaması ($p > 0.05$), kuadratik modelin partikül boyutu yanıtını temsil etmede daha yeterli bir çerçeve sunduğunu göstermektedir. Kuadratik model için Düzeltilmiş $R^2 = 0.97$ ve Tahmin Edilen $R^2 = 0.86$ değerlerinin birbirine yakın olması, modelin yüksek uyumunun yanı sıra öngörü performansının da güçlü olduğunu desteklemektedir (Tablo 4.27).

Kuadratik modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.28), modelin genel olarak son derece anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.001$). Ana faktörler değerlendirildiğinde ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti değişkenlerinin partikül boyutu üzerinde yüksek derecede anlamlı etkiye sahip olduğu görülmüştür (her ikisi için $p < 0.001$). Yüzey aktif oranı da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). Etkileşim terimleri incelendiğinde, ultrasonikasyon süresi ile ultrasonikasyon şiddeti etkileşiminin anlamlı olması ($p < 0.01$), proses parametrelerinin birlikte ayarlanmasının partikül boyutunu belirgin biçimde etkileyebildiğini göstermektedir. Buna karşın yüzey aktif oranı ile ultrasonikasyon süresi ve yüzey aktif oranı ile ultrasonikasyon şiddeti etkileşimleri anlamlı bulunmamıştır. Kuadratik terimler değerlendirildiğinde, yüzey aktif oranına ait karesel terim, ultrasonikasyon süresine ait karesel terim ve ultrasonikasyon şiddetine ait karesel terim terimlerinin anlamlı bulunması (her biri için $p < 0.01$), partikül boyutunun incelenen değişkenlerle doğrusal olmayan bir ilişki sergilediğini göstermektedir. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, kuadratik modelin Precirol–Hint yağı NLT sisteminde partikül boyutunu güvenilir biçimde temsil ettiği ve optimizasyon çalışmalarında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Tablo 4.27: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi Sonuçları.

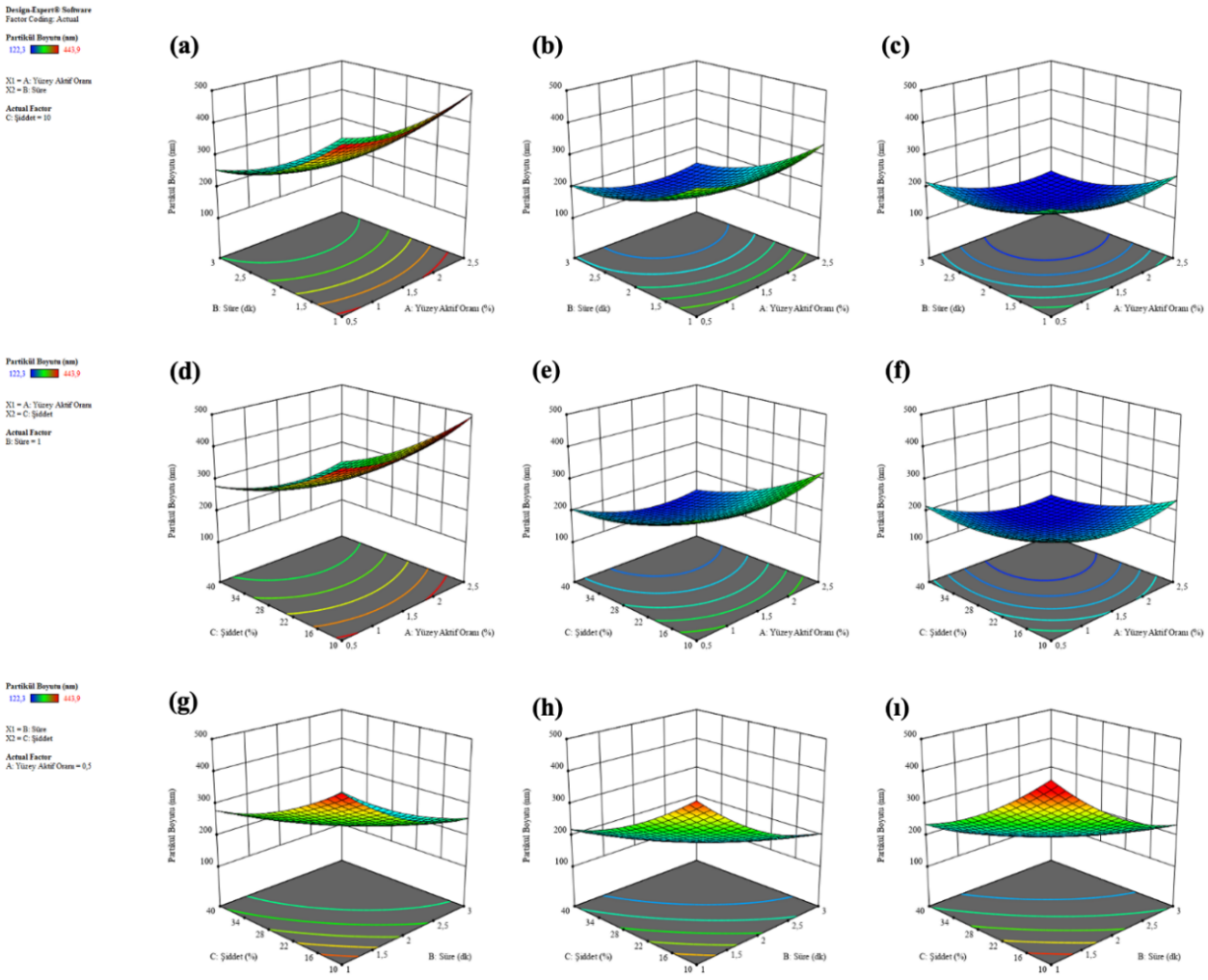
Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu (nm)	Partikül Boyutu Ortalama (nm)
1	1.5	3	10	190.6	194.3	194.0	193 ± 2.06
2	2.5	2	40	126.4	131.1	133.5	130.3 ± 3.61
3	0.5	1	25	309.2	329.4	344.1	327.6 ± 17.52

4	1.5	1	40	226.3	234.7	241.1	233.7 ± 7.42
5	1.5	2	25	183.1	181.3	182.5	182.3 ± 0.92
6	2.5	3	25	157.9	158.5	162.1	159.5 ± 2.27
7	1.5	2	25	170.0	171.7	175.8	172.5 ± 2.98
8	1.5	2	25	174.7	164.5	176.2	171.8 ± 6.37
9	0.5	3	25	210.4	215.7	216.4	214.2 ± 3.28
10	2.5	2	10	327.7	327.7	317.3	324.2 ± 6.00
11	1.5	1	10	426.8	442.3	462.6	443.9 ± 17.95
12	1.5	3	40	122.9	120.8	123.3	122.3 ± 1.34
13	1.5	2	25	157.0	160.9	164.3	160.7 ± 3.65
14	2.5	1	25	320.4	329.5	332.8	327.6 ± 6.42
15	0.5	2	10	318.4	320.1	328.1	322.2 ± 5.18
16	1.5	2	25	199.7	196.4	214.7	203.6 ± 9.75
17	0.5	2	40	208.4	205.9	204.1	206.1 ± 2.16

Tablo 4.28: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Partikül Boyutu Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	1.233E+05	9	13704.34	47.75	$p < 0.001$
A – Yüzey Aktif	2064.03	1	2064.03	7.19	$p < 0.05$
B – Süre	51809.80	1	51809.80	180.50	$p < 0.001$
C – Şiddet	43645.35	1	43645.35	152.06	$p < 0.001$
AB	748.02	1	748.02	2.61	$p > 0.05$

AC	1513.21	1	1513.21	5.27	$p > 0.05$
BC	4865.06	1	4865.06	16.95	$p < 0.01$
A^2	6163.8	1	6163.48	21.47	$p < 0.01$
B^2	7003.86	1	7003.86	24.40	$p < 0.01$
C^2	3604.83	1	3604.83	12.56	$p < 0.01$
Hata Terimleri	2009.20	7	287.03	—	—
Uyumsuzluk	967.53	3	322.51	1.24	$p > 0.05$
Saf Hata	1041.67	4	260.42	—	—
Toplam	1,253E+05	16	—	—	—



Şekil 4.14: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) partikül boyutu (nm) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri : (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi.

Precirol/Hint Yağı içeren NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemi ile üretiminde PDI yanıtının (Şekil 4.15) modellenmesinde bağımsız değişkenler; yüzey aktif oranı, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti olarak tanımlanmıştır. Design-Expert yazılımında gerçekleştirilen ardışık model karşılaştırmaları sonucunda PDI yanıtı için en uygun modelin doğrusal model olduğu belirlenmiştir. Doğrusal modelin anlamlı bulunması ($p < 0.01$) ve daha yüksek dereceden modellere geçişte ek terimlerin istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme sağlamaması, PDI'ın incelenen çalışma aralığında ağırlıklı olarak doğrusal bir eğilimle açıklanabildiğini göstermektedir.

Doğrusal modele ait uyum istatistikleri incelendiğinde Düzeltilmiş $R^2 = 0.48$ ve Tahmin Edilen $R^2 = 0.35$ olup, bu değerlerin birbirine yakın olması modelin öngörü performansının düzeltilmiş R^2 ile uyumlu olduğunu düşündürmektedir (Tablo 4.29).

Doğrusal modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.30), modelin genel olarak anlamlı olduğunu göstermiştir ($p < 0.01$). Ana faktörler değerlendirildiğinde, ultrasonikasyon süresi PDI üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bulunmuştur ($p < 0.01$). Buna karşın yüzey aktif oranı ve ultrasonikasyon şiddeti değişkenleri PDI yanıtında anlamlı bulunmamıştır.

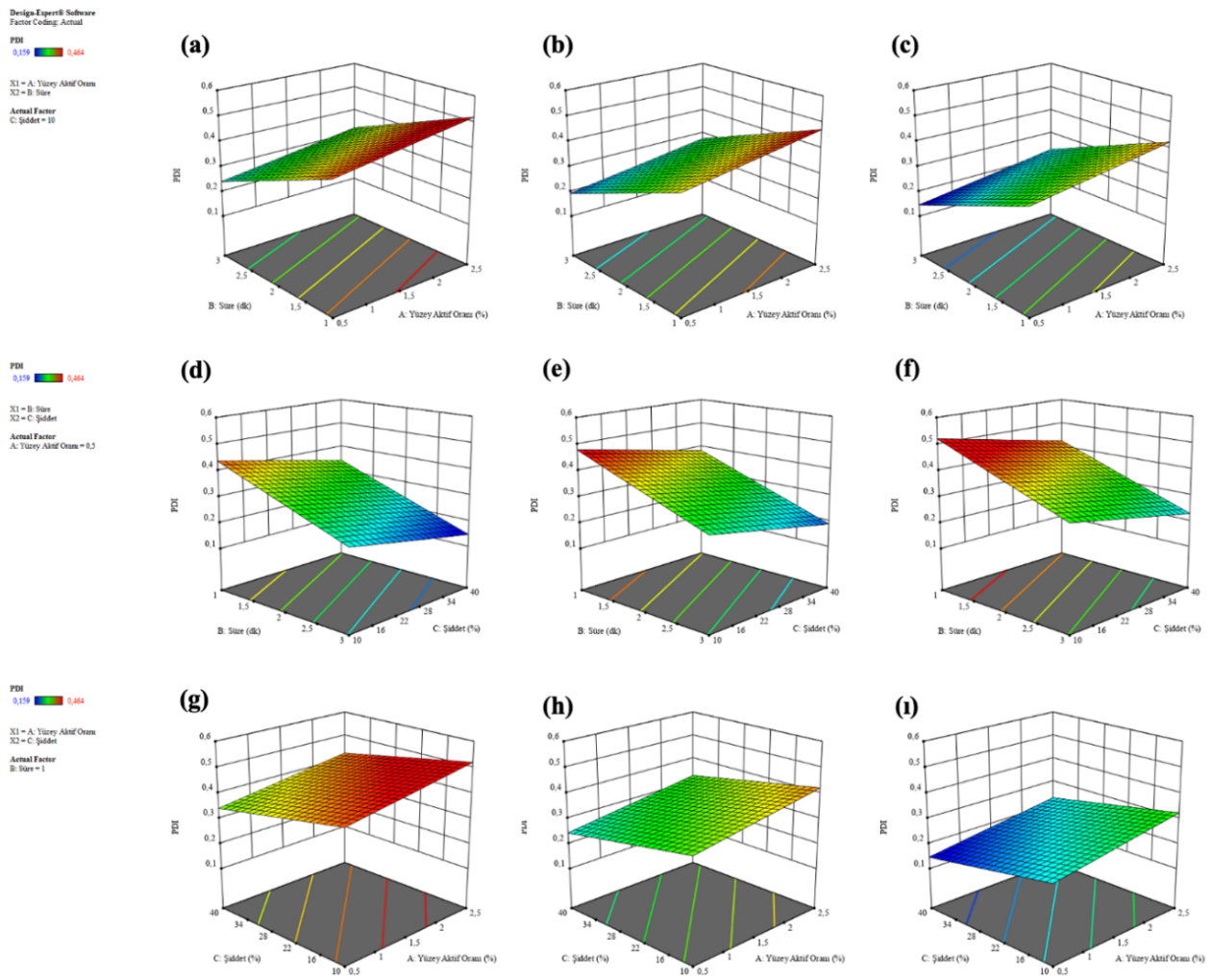
Tablo 4.29: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi Sonuçları.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	PDI	PDI	PDI	PDI Ortalama
1	1.5	3	10	0.316	0.437	0.275	0.343 ± 0.08
2	2.5	2	40	0.282	0.274	0.289	0.282 ± 0.01
3	0.5	1	25	0.353	0.303	0.341	0.332 ± 0.03
4	1.5	1	40	0.466	0.451	0.457	0.458 ± 0.01
5	1.5	2	25	0.498	0.402	0.403	0.441 ± 0.06
6	2.5	3	25	0.199	0.141	0.184	0.175 ± 0.03
7	1.5	2	25	0.426	0.427	0.397	0.417 ± 0.02
8	1.5	2	25	0.370	0.469	0.415	0.418 ± 0.05
9	0.5	3	25	0.221	0.214	0.197	0.211 ± 0.01
10	2.5	2	10	0.456	0.443	0.466	0.455 ± 0.01
11	1.5	1	10	0.485	0.318	0.452	0.418 ± 0.09
12	1.5	3	40	0.182	0.115	0.181	0.159 ± 0.04
13	1.5	2	25	0.177	0.226	0.226	0.21 ± 0.03
14	2.5	1	25	0.446	0.470	0.476	0.464 ± 0.02

15	0.5	2	10	0.275	0.360	0.213	0.283 ± 0.07
16	1.5	2	25	0.399	0.388	0.364	0.384 ± 0.02
17	0.5	2	40	0.204	0.238	0.215	0.219 ± 0.02

Tablo 4.30: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin PDI Analizi ANOVA tablosu.

	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	0.1087	3	0.0362	6.02	$p < 0.01$
A – Yüzey Aktif	0.0137	1	0.0137	2.28	$p > 0.05$
B – Süre	0.0768	1	0.0768	12.77	$p < 0.01$
C – Şiddet	0.0181	1	0.0181	3.02	$p > 0.05$
Hata Terimleri	0.0782	13	0.0060	—	—
Uyumsuzluk	0.0429	9	0.0048	0.5412	$p > 0.05$
Saf Hata	0.0353	4	0.0088	—	—
Toplam	0.1869	16	—	—	—



Şekil 4.15: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) PDI üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif madde oranı–süre etkileşimi, (d–f) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi, (g–ı) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif madde oranı–şiddet etkileşimi.

Precirol–Hint yağı içeren NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemi ile üretiminde zeta potansiyeli (Şekil 4.16) yanıtının modellenmesinde bağımsız değişkenler; yüzey aktif oranı, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti olarak tanımlanmıştır (Tablo 4.31). Kuadratik modele ait uyum istatistikleri incelendiğinde, Düzeltilmiş R^2 değerinin 0.3913 ile modelin açıklayıcılığının düşük/orta düzeyde kaldığı görülmüştür. Kuadratik modele ait ANOVA sonuçları (Tablo 4.32), modelin genel olarak anlamlı bulunmadığını göstermiştir. Ana etkiler değerlendirildiğinde yalnızca ultrasonikasyon şiddeti zeta potansiyeli üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip bulunmuştur ($p < 0.05$). Buna karşın yüzey aktif oranı ve ultrasonikasyon süresi değişkenleri, etkileşim terimleri ile karesel terimler anlamlı

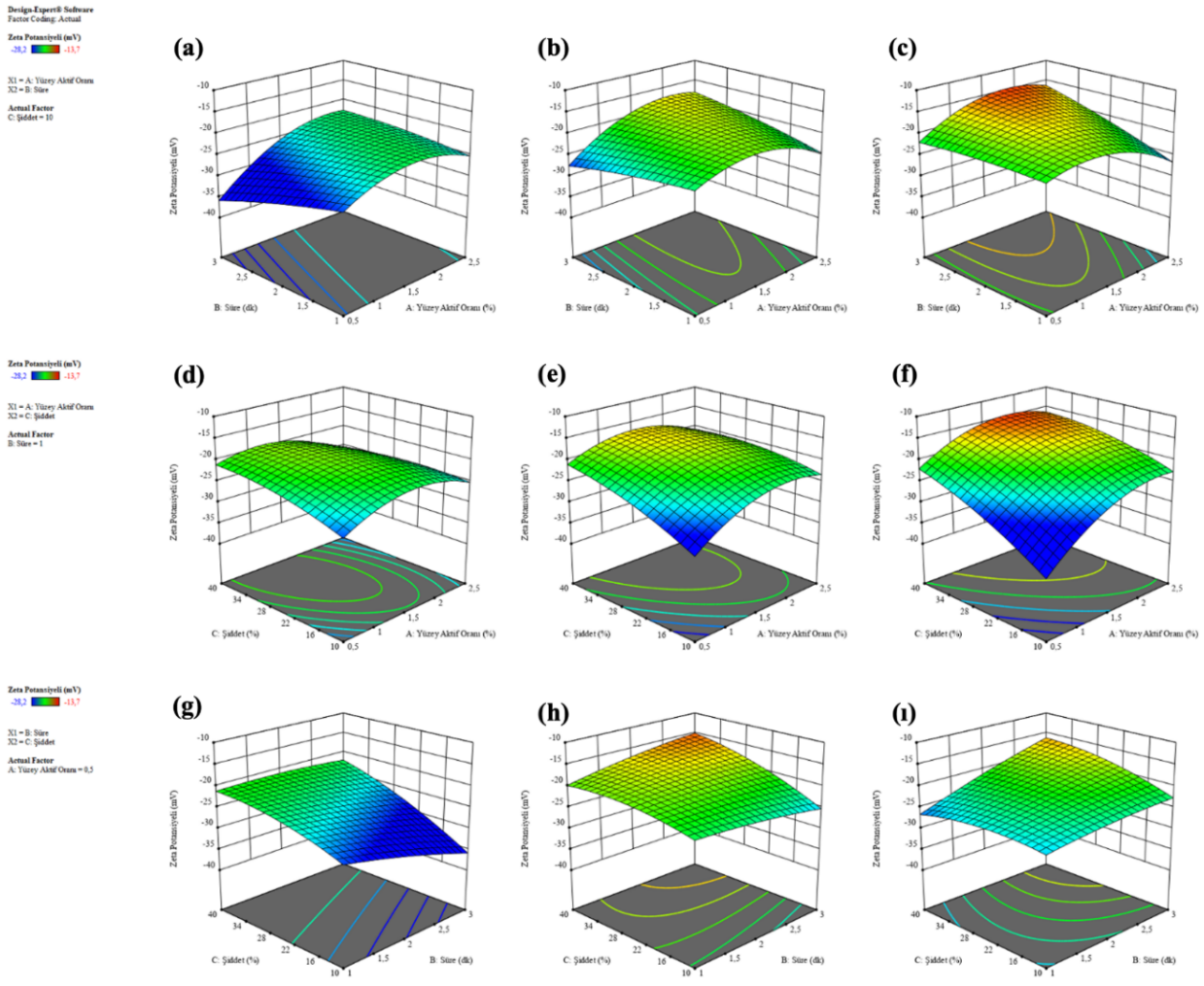
bulunmamıştır. Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, Precirol–Hint yağı sisteminde zeta potansiyelinin incelenen değişkenlerle güçlü biçimde modellenemediği; yalnızca ultrasonikasyon şiddetinin sınırlı bir etki gösterdiği görülmektedir.

Tablo 4.31: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi Sonuçları.

Deney Kodu	Yüzey Aktif Madde (%)	Süre (dk)	Şiddet (%)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli (mV)	Zeta Potansiyeli Ortalama (mV)
1	1.5	3	10	-21.6	-22.0	-21.5	-27.6 ± 0.26
2	2.5	2	40	-20.3	-18.6	-18.4	-24 ± 1.04
3	0.5	1	25	-27.9	-28.1	-27.5	-24.4 ± 0.31
4	1.5	1	40	-23.8	-24.8	-22.9	-17.4 ± 0.95
5	1.5	2	25	-23.4	-22.1	-21.8	-14.1 ± 0.85
6	2.5	3	25	-13.7	-13.6	-13.9	-16.3 ± 0.15
7	1.5	2	25	-23.4	-23.5	-23.6	-21.2 ± 0.10
8	1.5	2	25	-23.1	-22.3	-22.8	-15.9 ± 0.40
9	0.5	3	25	-29.1	-27.8	-27.5	-28.2 ± 0.85
10	2.5	2	10	-16.3	-16.0	-15.4	-22.7 ± 0.46
11	1.5	1	10	-21.5	-21.6	-20.4	-23.5 ± 0.67
12	1.5	3	40	-17.5	-16.2	-15.3	-13.7 ± 1.11
13	1.5	2	25	-15.3	-13.3	-13.6	-22.5 ± 1.08
14	2.5	1	25	-17.8	-16.6	-17.9	-23.7 ± 0.72
15	0.5	2	10	-26.2	-23.6	-23.4	-27.9 ± 1.56
16	1.5	2	25	-23.9	-23.7	-24.3	-19.1 ± 0.31
17	0.5	2	40	-26.5	-28.1	-28.3	-21.7 ± 0.99

Tablo 4.32: Precirol/Hint Yağı formülasyonu için ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT'lerin Zeta Potansiyeli Analizi ANOVA tablosu.

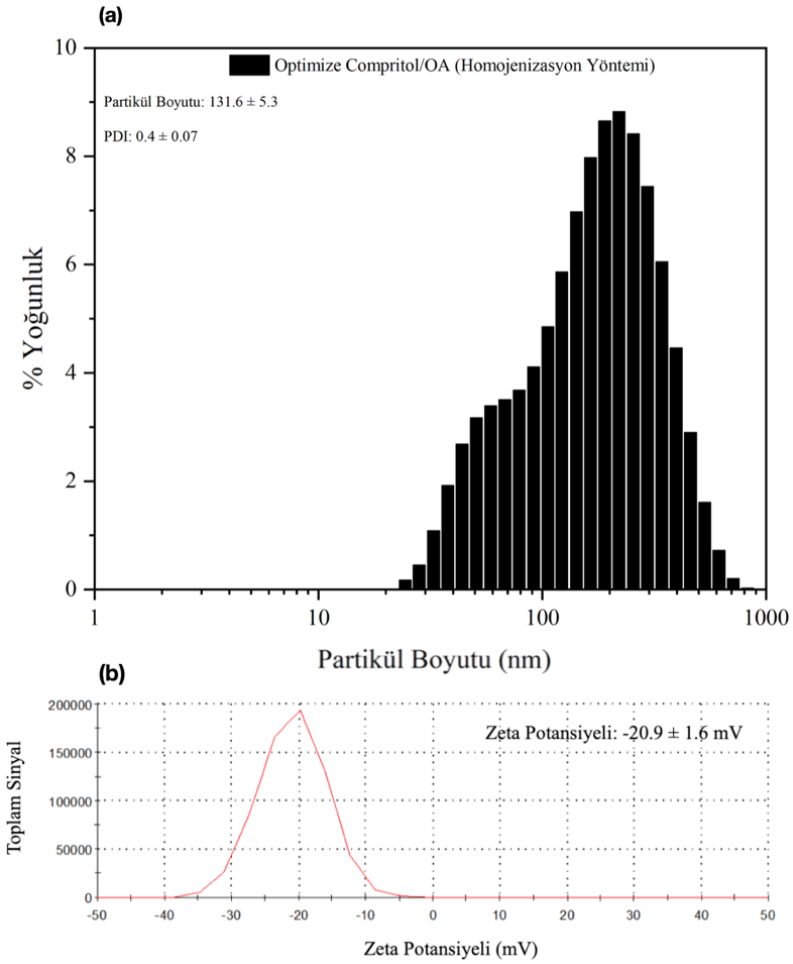
	Kareler Toplamı	**Serbestlik Derecesi**	**Ortalama Kare**	**F-değeri**	**p-değeri**
Model	253.53	9	28.17	2.14	$p > 0.05$
A – Yüzey Aktif	30.03	1	30.03	2.28	$p > 0.05$
B – Süre	1.28	1	1.28	0.0974	$p > 0.05$
C – Şiddet	77.50	1	77.50	5.90	$p < 0.05$
AB	31.36	1	31.36	2.39	$p > 0.05$
AC	14.06	1	14.06	1.07	$p > 0.05$
BC	15.21	1	15.21	1.16	$p > 0.05$
A^2	69.32	1	69.32	5.27	$p > 0.05$
B^2	1.19	1	1.19	0.0908	$p > 0.05$
C^2	8.94	1	8.94	0.6804	$p > 0.05$
Hata Terimleri	92.01	7	13.14	—	$p > 0.05$
Uyumsuzluk	42.26	3	14.09	1.13	$p > 0.05$
Saf Hata	49.75	4	12.44	—	$p > 0.05$
Toplam	345.55	16	—	—	$p > 0.05$



Şekil 4.16: Precirol/Hint Yağı temelli sistemde ultrasonikasyon koşullarında, yüzey aktif madde oranı (%), ultrasonikasyon süresi (dk) ve ultrasonikasyon şiddetinin (%) zeta potansiyeli (mV) üzerindeki etkisini gösteren üç boyutlu yanıt yüzeyi ve taban kontur grafikleri: (a–c) ultrasonikasyon şiddeti % 10, 25 ve 40 koşullarında yüzey aktif madde oranı–süre etkileşimi, (d–f) ultrasonikasyon süresi 1, 2 ve 3 dk koşullarında yüzey aktif madde oranı–şiddet etkileşimi, (g–ı) yüzey aktif madde oranı % 0.5, 1.5 ve 2.5 koşullarında süre–şiddet etkileşimi.

4.3. İLAÇ TAŞINIM SİSTEMİ OLARAK OPTİMİZE NLT FORMÜLASYONLARININ BELİRLENMESİ

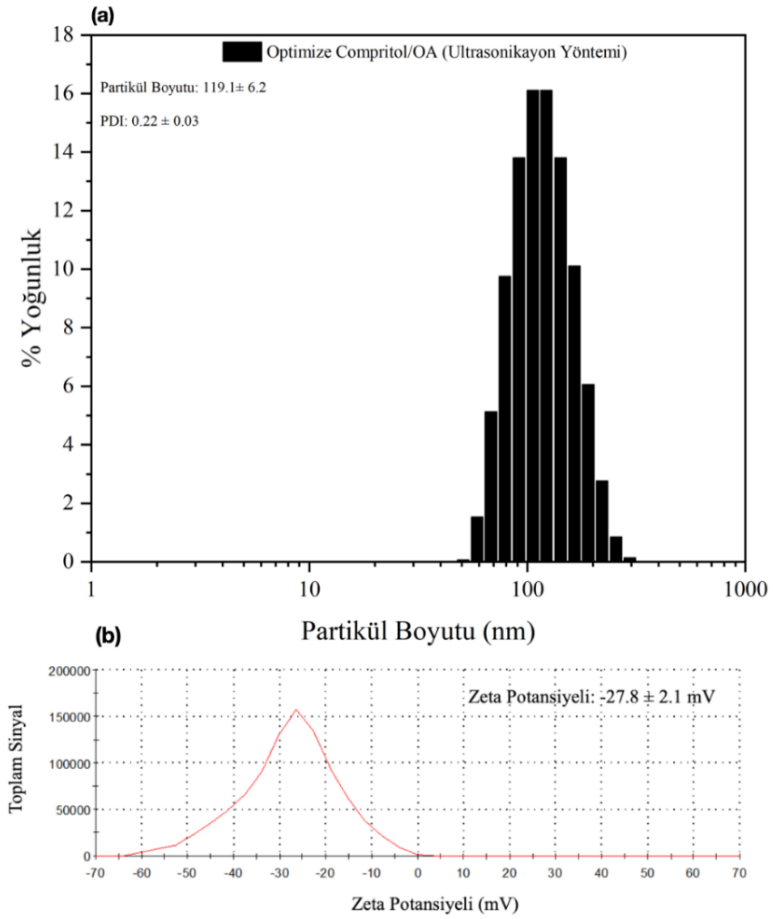
Compritol/OA temelli NLT'ler için homojenizasyon yöntemine göre optimum üretim koşulları, Design-Expert yazılımının sayısal optimizasyon modülünde çok amaçlı istenirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Optimizasyon senaryosunda sıvı lipit/toplam lipit oranı deneysel çalışma aralıkları içinde maksimize edilerek formülasyonda mümkün olan en yüksek sıvı lipit içeriği hedeflenmiş (maksimum ilaç yüklenmesi amacıyla); buna eş zamanlı olarak ürün kalite özelliklerini temsil eden yanıtlar arasında partikül boyutu ve PDI değerleri minimize edilmiştir. Yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi ise deneysel çalışma aralıkları içinde tutulmuştur. Bu yaklaşım ile, sıvı lipit oranı yükseltilse dahi partikül boyutu ve dağılım genişliğinin düşük tutulabildiği bir çalışma bölgesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Sayısal optimizasyon çıktısı ile elde edilen en yüksek istenirlik değerine karşılık gelen bileşimler, hedeflenen maksimum sıvı lipit/toplam lipit oranı–minimum partikül boyutu–minimum PDI dengesini sağlayacak şekilde seçilmiştir. Önerilen optimum koşulların deneysel geçerliliği, seçilen parametre kombinasyonu ile gerçekleştirilen doğrulama deneyi ile kontrol edilmiştir. İstenirlik fonksiyonuna dayalı optimizasyon değerlendirmeleri sonucunda sıvı lipit/toplam lipit oranı %38.6, yüzey aktif madde yüzdesi %1.77 ve homojenizasyon süresi 2.15 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında üretilen NLT'lerin DLS analizlerinde partikül boyutu dağılımının görece homojen bir dağılım karakteri sergilediği ve ortalama partikül boyutunun 131.6 ± 5.3 nm, PDI değerinin ise 0.40 ± 0.07 olduğu belirlenmiştir. Aynı optimum koşullar için sentezlenmiş NLT'lerin zeta potansiyeli −20.9 ± 1.6 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.17, a-b).



Şekil 4.17: İstenirlik fonksiyonuna göre optimize edilen Homojenizasyon ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 131.6 ± 5.3 nm; PDI 0.40 ± 0.07) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −20.9 ± 1.6 mV**).**

Compritol/OA temelli NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde optimum koşullar, Design-Expert yazılımının sayısal optimizasyon modülünde çok amaçlı istenirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Bu kapsamda yüzey aktif madde yüzdesi, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; her bir değişken, deneysel tasarımda belirlenen çalışma aralığı içinde tutulmuştur. Bu çalışmada, sıcak homojenizasyon yönteminden farklı olarak sıvı lipit miktarı NLT formülasyonunda yüksek oranda (%50) sabitlenerek maksimum etken madde taşınımının sağlanması amaçlanmıştır. Sonuç olarak sayısal optimizasyon çıktılarında hedefler minimum partikül boyutu ve minimum PDI değerleri olarak tanımlanırken; optimizasyon kısıtları, değişkenlerin çalışma aralığında kalması ve zeta potansiyelinin uygun (-20<) aralıkta seyretmesi şeklinde belirlenmiştir. İstenirlik fonksiyonuna dayalı optimizasyon değerlendirmeleri sonucunda sonikasyon şiddeti %36.1, yüzey aktif madde yüzdesi %1.5 ve sonikasyon süresi 2 dk olarak

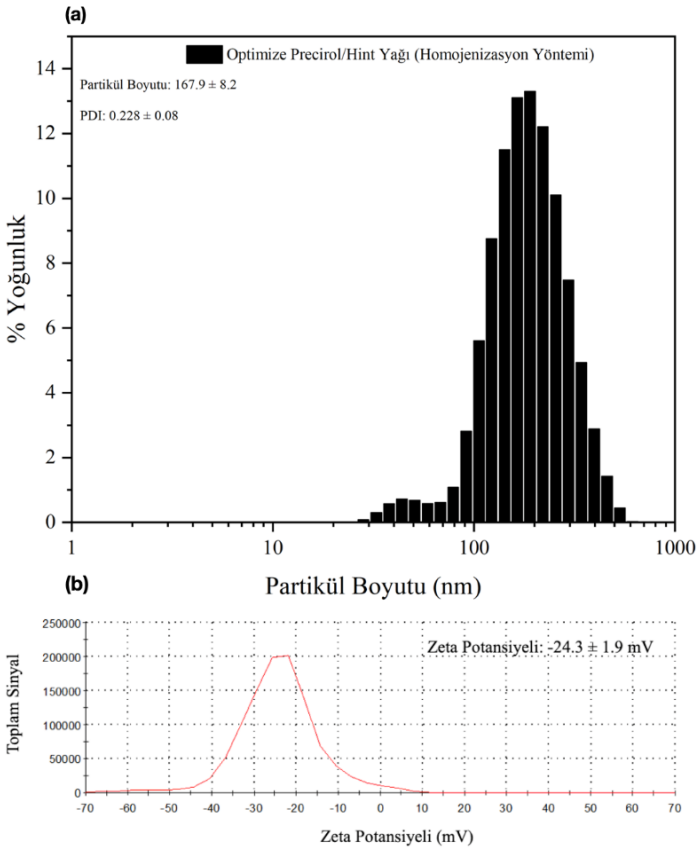
belirlenmiştir. Doğrulama koşullarında üretilen NLT'lerin ortalama partikül boyutu 119.1 ± 6.2 nm, PDI değeri 0.22 ± 0.03 ve zeta potansiyeli −27.8 ± 2.1 mV olarak belirlenmiştir (Şekil 4.18, a-b).



Şekil 4.18: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Ultrasonikasyon ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 119.1 ± 6.2 nm; PDI 0.22 ± 0.03) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −27.8 ± 2.1 mV).

Homojenizasyon yöntemi Precirol/Hint yağı temelli NLT'ler için optimum üretim koşulları, Design-Expert yazılımının sayısal optimizasyon modülünde çok amaçlı istenirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Optimizasyon senaryosunda sıvı lipit/toplam lipit oranı, yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; her bir değişken deneysel tasarımda belirlenen çalışma aralığı içinde tutulmuştur. Maksimum ilaç yüklenmesi amacıyla sıvı lipit/toplam lipit oranı) deneysel çalışma aralıkları içinde maksimize edilerek formülasyonda mümkün olan en yüksek sıvı lipit içeriği hedeflenmiş; buna eş zamanlı olarak partikül boyutu ve PDI değerleri minimize edilmiştir. Yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi ise deneysel çalışma aralıkları içinde tutulmuştur. Bu yaklaşım ile, sıvı lipit oranı yükseltilse dahi partikül boyutu ve dağılım genişliğinin düşük tutulabildiği bir çalışma bölgesinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

İstenirlik fonksiyonuna dayalı optimizasyon değerlendirmeleri sonucunda sıvı lipit/toplam lipit oranı %35.7, yüzey aktif madde yüzdesi %0.69 ve homojenizasyon süresi 5 dk olarak belirlenmiştir. Bu koşullar altında üretilen NLT'lerin DLS analizlerinde partikül boyutu dağılımının tek modlu bir karakter sergilediği ve ortalama partikül boyutunun 167.9 ± 8.2 nm, PDI değerinin ise 0.228 ± 0.08 olduğu belirlenmiştir. Aynı optimum koşulda zeta potansiyeli −24.3 ± 1.9 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.19, a-b).

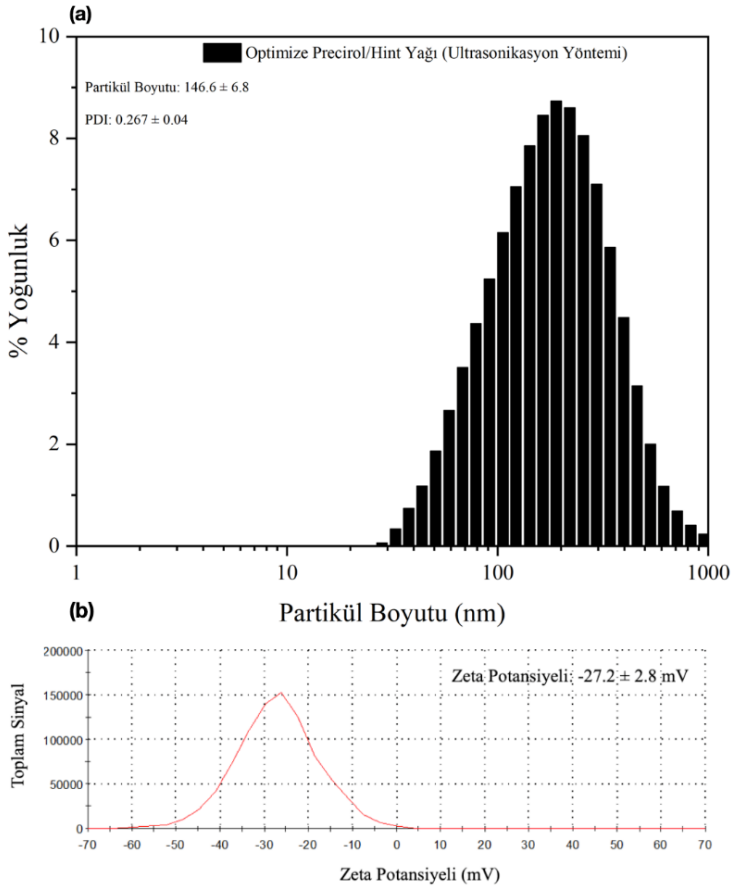


Şekil 4.19: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Homojenizasyon ile üretilmiş Precirol/Hint yağı temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 167.9 ± 8.2 nm; 0.228 ± 0.08) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli −24.3 ± 1.9 mV).

Precirol/Hint yağı temelli NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde optimum koşullar, Design-Expert yazılımının sayısal optimizasyon modülünde çok amaçlı istenirlik fonksiyonu kullanılarak belirlenmiştir. Bu kapsamda yüzey aktif madde yüzdesi, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti bağımsız değişkenler olarak tanımlanmış; her bir değişken, deneysel tasarımda belirlenen çalışma aralığı içinde tutulmuştur. Bu çalışmada, sıcak homojenizasyon yönteminden farklı olarak sıvı lipit miktarı NLT formülasyonunda yüksek oranda (%50) sabitlenerek maksimum etken madde taşınımının sağlanması amaçlanmıştır. Sonuç olarak sayısal optimizasyon çıktılarında hedefler

minimum partikül boyutu ve minimum PDI değerleri olarak tanımlanırken; optimizasyon kısıtları, değişkenlerin çalışma aralığında kalması ve zeta potansiyelinin −30 mV'a (kolloidal stabil kabul edilen bölgeye) yakın seyretmesi şeklinde belirlenmiştir.

İstenirlik değeri en yüksek olan çözümler arasından optimum kombinasyon seçilecek şekilde optimizasyon kurgulanmış; seçilen optimum koşulların deneysel geçerliliği, partikül boyutu–PDI–zeta potansiyeli ölçümleri ile doğrulama deneyi kapsamında test edilmiştir. İstenirlik fonksiyonuna dayalı optimizasyon değerlendirmeleri sonucunda yüzey aktif madde yüzdesi (A) %1, ultrasonikasyon süresi (B) 3 dk ve ultrasonikasyon şiddeti (C) %25 olarak belirlenmiştir. Doğrulama koşullarında üretilen NLT'lerin ortalama partikül boyutu 146.6 ± 6.8 nm, PDI değeri 0.267 ± 0.04 ve zeta potansiyeli −27.2 ± 2.8 mV olarak ölçülmüştür (Şekil 4.20, a-b).



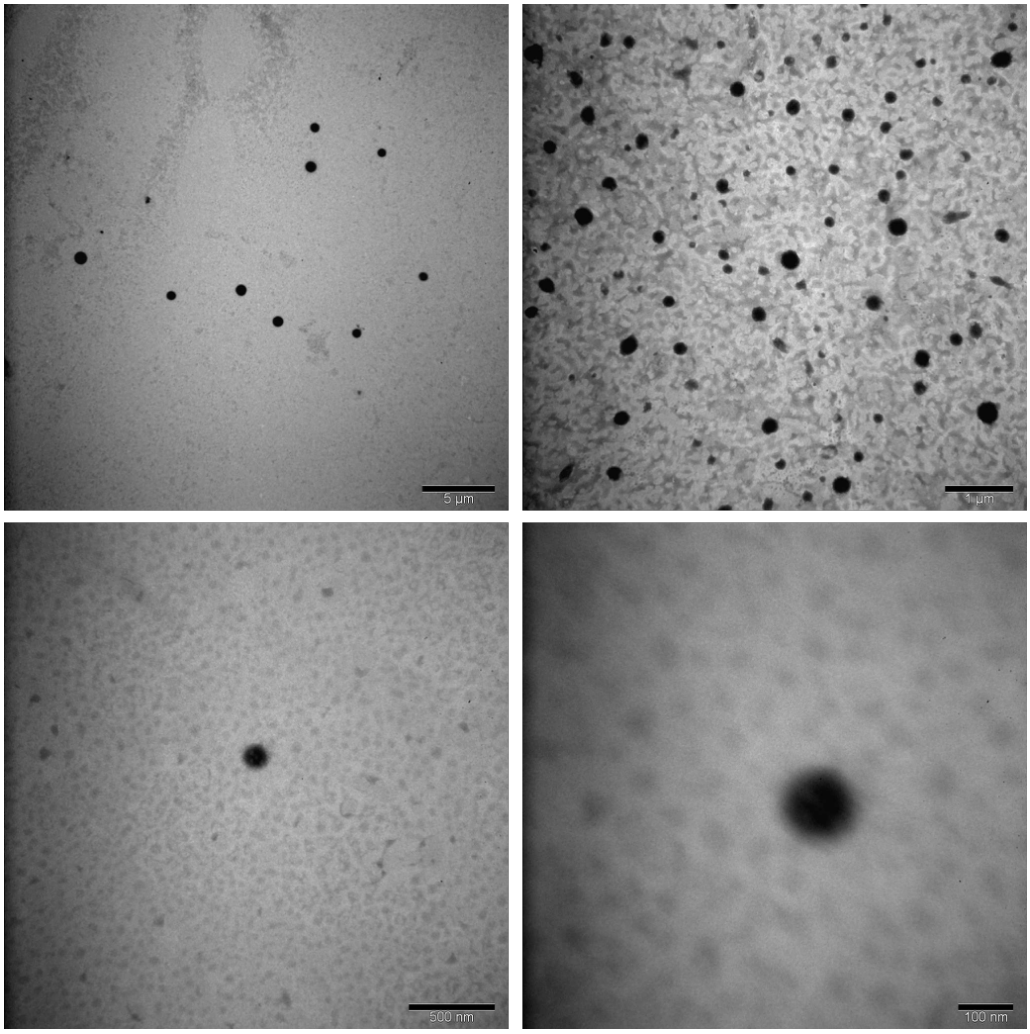
Şekil 4.20: Optimizasyonda istenirlik şartlarına göre optimize edilen Ultrasonikasyon ile üretilmiş Precirol/Hint yağı temelli NLT'lere ait optimizasyon çıktıları: (a) DLS ile ölçülen partikül boyutu dağılımı (% yoğunluk) (ortalama partikül boyutu 146.6 ± 6.8 nm; PDI 0.267 ± 0.04) ve (b) zeta potansiyeli dağılımı (zeta potansiyeli 27.2 ± 2.8 mV).

Optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen bulgulara göre istenen optimize nanopartikül formülasyonlarının geliştirilmesinde temel kriterler düşük partikül boyutu ve PDI değerleri ile

kolloidal stabilitesinin yüksek olmasıdır. Bunun yanında taşıyıcı sistemler olarak kullanılacak bu nanopartiküllerin maksimum ilaç yükleme kapasitesi dolayısıyla farklı üretim yöntemleri ile üretilen optimize nanopartiküllerden NLT bazılarının seçilerek etken malzemeler ile yapılan çalışmaların bu yöntemler üzerinden devam etmesi kararı verilmiştir. Buna göre Compritol/OA çifti için iki üretim yöntemi karşılaştırıldığında optimize formülasyonlarda ile etapta göze çarpan fark üretim yöntemlerinde kullanılan sıvı lipit miktarlarının farklı olmasıdır. Temel istençlerden olan sıvı lipit maksimizasyonu dolayısıyla ultasonikasyon yöntemi ön plana çıkmaktadır. Bu durumun yanı sıra ultasonikasyon yöntemi ile üretilmiş optimize NLT'lerin homojenizasyon yöntemine göre üretilmiş optimize NLT'lere göre hem partikül boyutunun hem de PDI değerinin düşük olması dolayısıyla, ayrıca her iki yöntemin zeta potansiyelleri değerlendirildiğinde ultrasonikasyon yönteminin koloidal stabilitesinin daha kararlı olması nedeniyle MDA yüklemelerinde kullanılan Compritol/OA temelli NLT için ultrasonikasyon yöntemi ile üretim yapılmasına karar verilmiştir.

Benzer şekilde bir diğer çalışma grubu olarak Precirol/Hint yağı için sentezlenen optimize NLT'ler için ultasonikasyon yönteminde üretilen optimize NLT'lerin hem partikül boyutu hem de zeta potansiyeli istenen kriterlere daha uygun olduğu için PTX yüklemelerinde kullanılan Precirol/Hint yağı temelli NLT'ler için de ultasonikasyon yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir.

Optimize NLT örneklerinin TEM görüntüleri (Şekil 4.21) boyama (fosfotungstik asit) sonrasında nanopartiküllerin elektron yoğun (koyu kontrastlı) yapılar olarak seçilebildiğini göstermiştir. Düşük büyütmede partiküllerin grid yüzeyi üzerinde genel olarak homojen dağıldığı ve belirgin, yaygın bir aglomerasyon/kümelenme eğiliminin olmadığı görülmüştür. Daha yüksek büyütmelerde (1 μm ve 500 nm ölçek çubukları), partiküllerin çoğunlukla küresel morfolojiye sahip olduğu ve boyutların birbirine yakın bir dağılım sergilediği izlenmiştir. En yüksek büyütmede elde edilen görüntüde (ölçek çubuğu: 100 nm) tekil bir partikül üzerinden yapılan yaklaşık boyut okuması, partikül çapının ~100-150 nm mertebesinde homojen dağılıma sahip olduğunu göstermiştir. Bu bulgu, aynı optimize NLT örneği için DLS ile belirlenen hidrodinamik partikül boyutu (NLT-50 için 126.3 ± 1.7 nm) ile genel olarak uyumlu olup, sistemin nano boyutta ve çoğunlukla küresel morfolojide partiküller oluşturduğunu desteklemektedir.



Şekil 4.21: Optimize NLT'lere ait TEM görüntüleri (negatif boyama: %2 (w/v) fosfotungstik asit; 1dk).

Compritol/Oleik Asit bazlı optimize NLT formülasyonlarında, formülasyon bileşenlerinin (sıvı lipit/katı lipit oranı (%0, %10, %30, %50, %70, %90) değiştirilerek kolloidal özellikler için DLS, lipit matrisinin termal davranışı için ise DSC analizleri ile değerlendirilmiştir. DLS ölçümlerine göre tüm formülasyonlarda dağılımlar için ortalama hidrodinamik partikül çapları 99.0 ± 3.0 – 170.1 ± 3.2 nm aralığında, PDI değerleri ise 0.18 ± 0.01 – 0.23 ± 0.02 aralığında bulunmuştur (Şekil 4.22). Sıvı lipit/katı lipit oranının artması ile partikül boyutunun genel olarak arttığı gözlenmiştir: %0 ve %10 oranlarında boyutlar ~100 nm seviyesinde kalırken, %30'da 111.6 ± 2.2 nm'ye yükselmiş; %50 ve üzerindeki oranlarda 126.3 ± 1.7 nm (%50), 153.4 ± 0.6 nm (%70) ve 170.1 ± 3.2 nm (%90) değerlerine ulaşmıştır. PDI değerlerinin tüm seride 0.25'in altında kalması, formülasyonların kolloidal olarak dar dağılımlı bir boyut dağılımına sahip olduğunu göstermektedir.

DSC termogramlarında sadece katı lipit ile üretilen (SLN) nanopartiküle ait ana erime piki ~75 °C'da izlenirken, sıvı lipit/toplam lipit oranının yükselmesi ile ana erime geçişinin belirgin biçimde

daha düşük sıcaklıklara kaydığı görülmüştür (Şekil 4.23). Buna göre ana erime pik sıcaklığı sırasıyla %0, %10, %30, %50, %70 ve %90 koşullarında 74.9; 74.1; 72.2; 45.8; 45.0 ve 42.0 °C olarak belirlenmiştir. Bu sıcaklık kayması, OA fraksiyonunun katı lipit matrisinde kristal düzeni bozarak daha az düzenli bir yapı oluşturduğunu ve/veya düşük erime noktalı bir karışım fazının oluştuğunu düşündürmektedir.

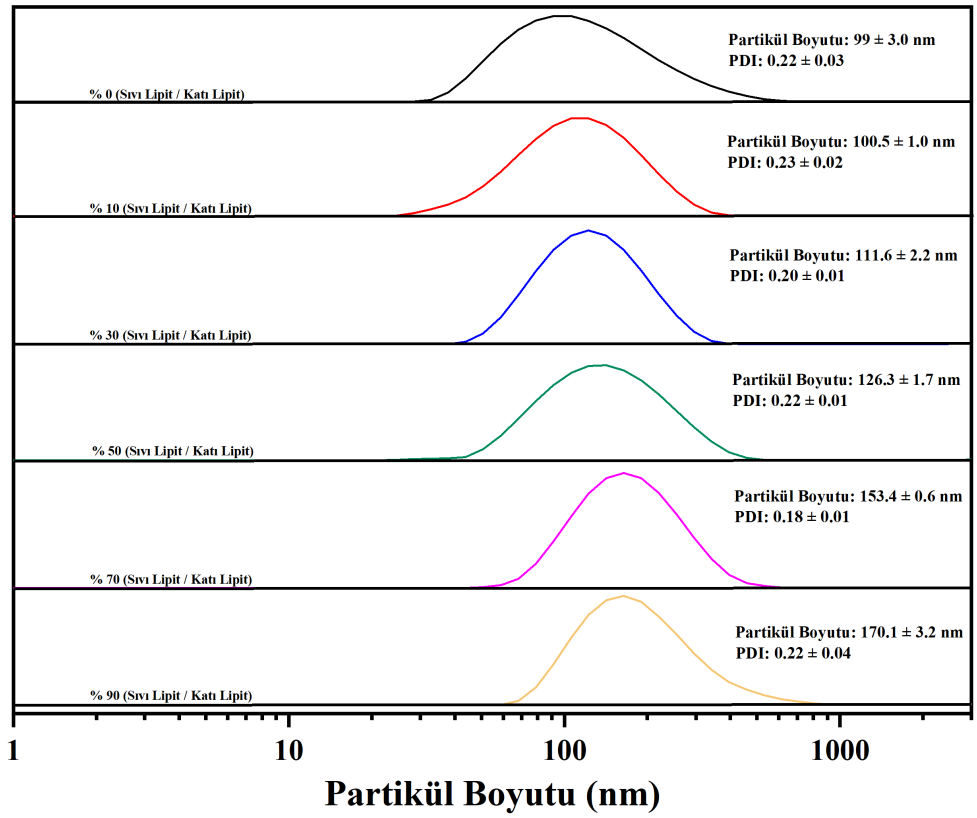
Erime entalpisi (ΔH) verileri de bu gözlemi desteklemiştir. Saf Compritol için ΔH 140 mJ/mg, SLN için ΔH değeri 79.4 mJ/mg iken, sıvı lipit/toplam lipit oranı %10, %30, %50, %70 ve %90 koşullarında ΔH sırasıyla 68.7; 55.5; 44.0; 38.5 ve 30.9 mJ/mg olarak belirlenmiştir. Saf Compritol ΔH'ı ile SLN için ΔH değeri arasındaki fark SLN üretiminde formülasyonda kullanılan yüzey aktifin varlığından kaynaklanmaktadır. Bu durumun yanı sıra %90 oranında sıvı lipit içeren formülasyonun ΔH'ının SLN'ye kıyasla yaklaşık %61 oranında azaldığı hesaplanmıştır. Erime pikinin genişlemesi, erime sıcaklığında yaşanan bu düşüş ve ΔH değerindeki kademeli azalma birlikte değerlendirildiğinde, OA fraksiyonunun katı lipit matrisinde kristal kusurlarını artırarak daha amorf bir yapı meydana getirdiği anlaşılmaktadır (Şekil 4.23).

Sıvı lipit/toplam lipit oranının katı lipide göre yüzde şeklinde ifade edilmesi nedeniyle, katı lipit fraksiyonu $W_{NLT\,0}$ aşağıdaki gibi tanımlanmış ve göreli kristalinlik (KI, %) buna göre hesaplanmıştır:

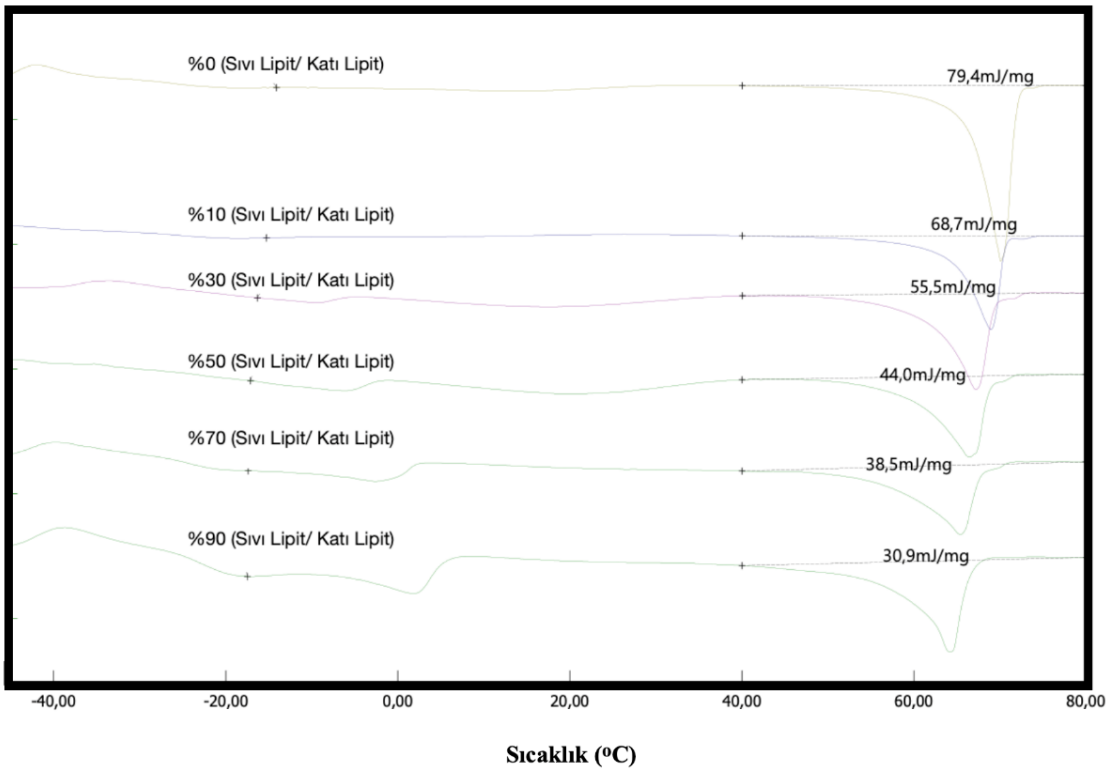
$$w_{katı} = 1 / (1 + \frac{\%\ sıvı\ lipit\ oranı}{100})$$

$$KI(\%) = (\frac{\Delta H_{NLT\,\%}}{(\Delta H_{NLT\,0} \times w_{katı})} \times 100$$

Bu yaklaşımla % KI değerlerinin sıvı lipit oranı arttıkça azaldığı görülmüştür (Tablo 4.33). Başka bir ifadeyle, ΔH'daki azalma yalnızca karışımdaki katı lipit miktarının düşmesine bağlı olmayıp, katı lipit fraksiyonu dikkate alındığında kristal düzenin zayıfladığına işaret etmektedir. DLS verileri ile birlikte değerlendirildiğinde, daha yüksek OA oranlarının lipit çekirdeği daha akışkan hâle getirirken katı lipit kristallenmesini baskıladığı; bununla eş zamanlı olarak soğuma aşamasında yeniden düzenlenme eğilimi nedeniyle ortalama partikül boyutunun artmasına katkı sağlayabileceği değerlendirilmiştir. Dolayısıyla Compritol/OA sisteminde sıvı lipit oranı, pozitif taraftan lipit matrisin kristal kusur düzeyini (dolayısıyla potansiyel yükleme boşluklarını) artırırken, olumsuz açıdan partikül boyutu üzerinde artırıcı bir etki gösterebilmektedir. Nitelikli NLT temelli bir nanotaşıyıcı sistem için iki durum (ilaç yükleme miktarı-partikül boyutu) arasındaki dengenin sağlanması önem arz etmektedir



Şekil 4.22: Compritol/OA bazlı NLT'lerde sıvı lipit/toplam lipit oranına (%0, %10, %30, %50, %70 ve %90) bağlı partikül boyutu dağılımları ve PDI değerleri.



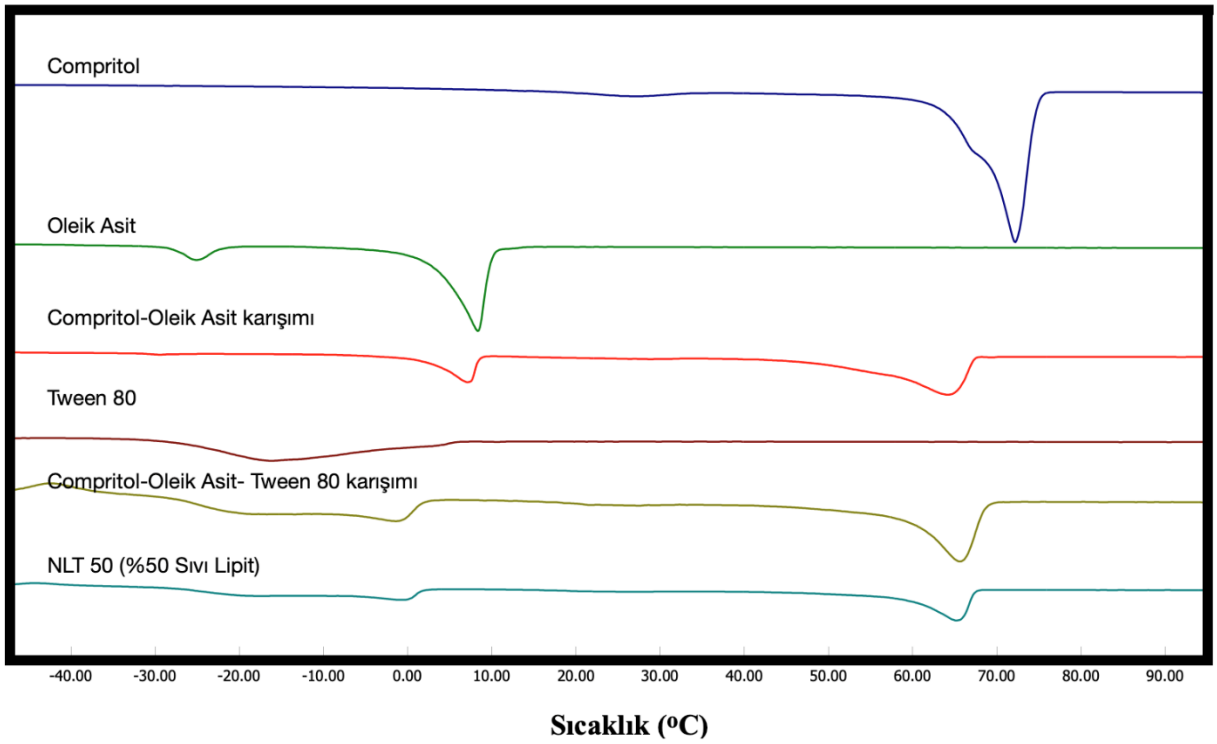
Şekil 4.23: Compritol/OA bazlı NLT'lerde sıvı lipit/toplam lipit oranına (%0, %10, %30, %50, %70 ve %90) bağlı DSC termogramları ve ana erime geçişine ait erime entalpisi (ΔH, mJ/mg) değerleri.

Tablo 4.33: Sıvı lipit/toplam lipit oranına bağlı olarak Compritol/OA NLT'lerin DLS (partikül boyutu, PDI) ve DSC (T, ΔH) parametreleri ile göreli kristalin indeksi (KI) sonuçları.

Sıvı Lipit/Toplam Lipit oranı (%)	Partikül boyutu (nm)	PDI	T (°C)	ΔH (mJ/mg)	KI (%)
0	99.0 ± 3.0	0.22 ± 0.03	74.9	79.4	100.0
10	100.5 ± 1.0	0.23 ± 0.02	74.1	68.7	95.2
30	111.6 ± 2.2	0.20 ± 0.01	72.2	55.5	90.9
50	126.3 ± 1.7	0.22 ± 0.01	45.8	44.0	83.1
70	153.4 ± 0.6	0.18 ± 0.01	45.0	38.5	82.4
90	170.1 ± 3.2	0.22 ± 0.04	42.0	30.9	73.9

DSC termogramlarındaki faz geçişlerinin daha net açıklanabilmesi için Şekil 4.24'te NLT üretiminde kullanılan saf maddeler, bunların fiziki karışımları ve NLT-50 ürününe ait termogramlar verilmiştir. Her bir saf madde ve fiziki karışıma ait eğrilerde gözlenen endotermler ilgili bileşenlerin karakteristik erime süreçleri ile ilgilidir. Örneğin yalnız katı lipit (Compritol) örneğinde yüksek sıcaklık bölgesinde keskin bir endotermik erime piki gözlenirken, oleik asit örneğinde düşük sıcaklık bölgesinde daha düşük sıcaklıkta gerçekleşen bir geçiş izlenmektedir. Katı lipit–oleik asit fiziksel karışımında her iki bileşene ait geçişlerin birlikte görülmesi ve katı lipit erime pikinde sınırlı kayma ve genişleme meydana gelmesi, bileşenler arasında karışım etkisiyle katı lipidde bozulan/yeni oluşan kristal düzen ile uyumludur.

Buna karşılık, aynı maddelerden üretilmiş NLT-50 termogramında ana erime geçişinin daha düşük sıcaklıklara kayması ve erime pikinin belirgin biçimde genişleyerek entalpinin azalması, yalnızca bileşenlerin varlığıyla açıklanamayacak düzeyde bir yapısal değişime işaret etmektedir. Bu profil, üretim sürecinin katı lipit kristal örgüsünü zayıflattığını; oleik asidin katı lipit matrisi içinde kusur bölgeleri oluşturarak katının kristal organizasyonunu azalttığını ve yüzey aktif maddenin arayüzeyde yerleşimiyle birlikte daha az düzenli bir lipit çekirdeğin oluştuğunu desteklemektedir. Bu nedenle, fiziksel karışım termogramları bileşenlerin referans davranışı olarak kullanılabilirken, NLT-50 termogramındaki kayma ve entalpi azalması nanopartikül mimarisine özgü daha düşük kristallenme derecesinin göstergesi olarak değerlendirilirmiştir.

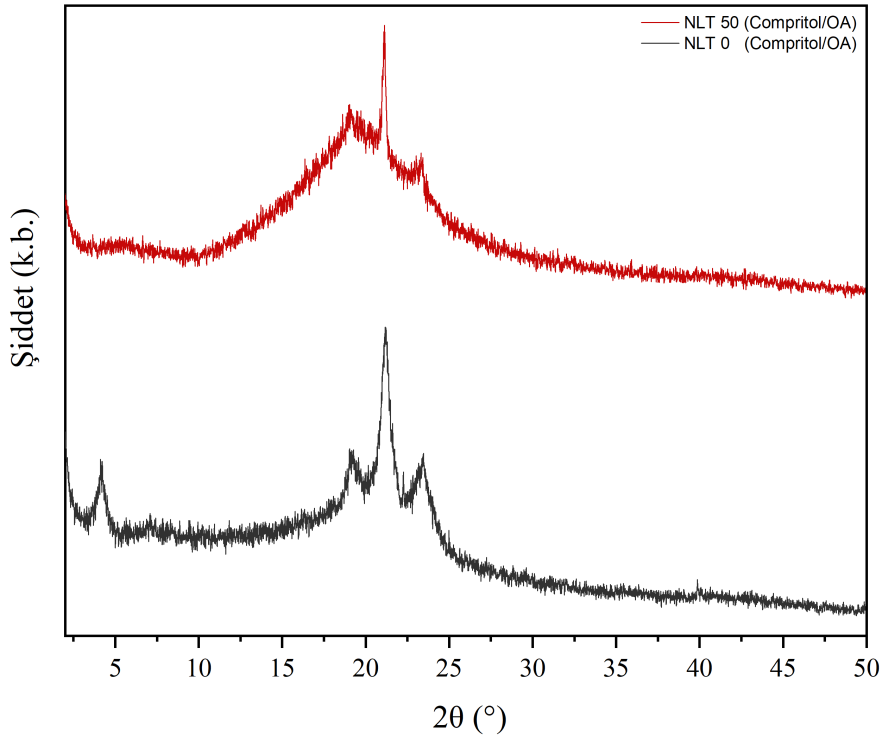


Şekil 4.24: Compritol, oleik asit ve Tween 80'e ait DSC termogramları ile bu bileşenlerin fiziksel karışımlarının (Compritol–oleik asit ve Compritol–oleik asit–Tween 80) ve NLT-50 (%50 sıvı lipit içeren NLT) formülasyonunun DSC profillerinin karşılaştırılması (sıcaklık aralığı: −45°C – 80 °C; ısıtma hızı: 2 °C/dk).

Şekil 4.25'te verilen ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'ler için yapılan XRD analizlerinde NLT 0 ve NLT 50 numunelerine ait difraktogramlar karşılaştırılmıştır. NLT 0 örneğinde düşük açılı bölgede $2\theta \approx 4.2°$ civarında bir yansıma ile birlikte $2\theta \approx 19.0°$, 21.0° ve 23.2° civarında belirgin ve keskin kırınım pikleri gözlenmiştir. NLT 50 örneğinde ise $2\theta \approx 4.2°$ civarındaki düşük açılı yansımanın şiddetinin azaldığı; ana yansımanın $2\theta \approx 20.9°$ civarında korunmakla birlikte pik şiddetinde azalma meydana geldiği izlenmiştir. Ayrıca NLT 50 difraktogramında $2\theta \approx 15°–25°$ aralığında belirlenmiş piklerin daha yayvan bir şekilde yükselmesi dikkat çekmiştir.

Düşük açılı bölgede izlenen $2\theta \approx 4,2°$ civarındaki yansıma, gliseril behenat sistemlerinde raporlanan düşük açılı bölgede görülen ve literatürde lipit katmanlar arası periyodu yansıtan (uzun aralık) yansımalarla uyumlu olup, lipitlerin katmanlar halinde belirli bir aralıkla düzenli biçimde dizildiğini düşündürmektedir [279–281]. Literatürde saf Compritol' e ait difraktogramındaki kristal yapının yapıdaki yüzey aktife bağlı olarak sıvı lipit içermeyen formülasyonlara göre de bir miktar değişiklik gösterdiği ancak özellikle sıvı lipit ilavesi sonrası yapıda oluşan kusurlu bölgeler dolayısıyla amorfluk derecesinin arttığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar DSC analizlerinde gözlemlenen analiz sonuçları ile uyumlu olup sıvı içermeyen NLT yapısının sıvı lipit içeren formülasyonlar için referans olarak değerlendirilebileceği kanaatine varılmıştır.

NLT 50'de bu yansımanın zayıflaması ve genişlemesi, oleik asit ilavesiyle katmanlı yapının düzenli tekrarının kısmen azalmasına işaret etmektedir. Benzer biçimde, geniş açı bölgesinde pik şiddetinin azalması ve piklerin genişlemesi kristal örgü düzenliliğinin zayıflaması ve matristeki düzensizliğin artmasıyla uyumludur. NLT 50 numunesinde NLT 0'a kıyasla sıvı lipit dolayısıyla oluşan kusurlu bölgeler dışında yeni ve belirgin ek piklerin ortaya çıkmaması istenilen kusurlu yapının oluştuğunu göstermektedir. XRD ile izlenen bu eğilim, sıvı lipit/toplam lipit oranının artmasıyla termal davranışta izlenen değişimleri destekleyen DSC bulgularıyla (Tm ve ΔH'de azalma) uyumludur.

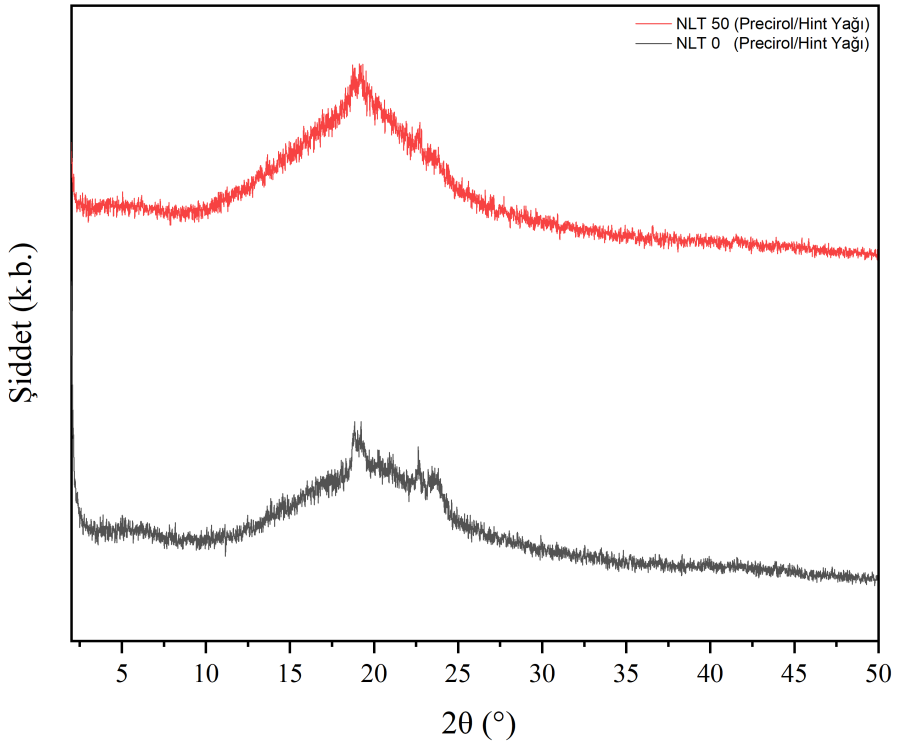


Şekil 4.25: Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Compritol/OA temelli NLT'lerin (NLT 50, NLT 0) XRD difraktogramları.

Şekil 4.26'da verilen Precirol/Hint yağı temelli NLT 0 ve NLT 50 numunelerine ait XRD difraktogramları karşılaştırıldığında, her iki örnekte de 2θ ≈ 15°–25° aralığında geniş bir kırınım bandı gözlenmektedir. NLT 0 difraktogramında bu bandın tepe noktası 2θ ≈ 19°–20° civarında yer almakta ve 2θ ≈ 22°–24° aralığında omuz görünümü izlenmektedir. NLT 50 difraktogramında ise ana bandın 2θ ≈ 19°–20° civarında korunduğu, ancak pik profilinin daha yayvan hale geldiği ve 2θ ≈ 22°–24° bölgesindeki omuzlanmanın belirginliğinin azaldığı görülmektedir.

Bu bulgular, her iki numunede de nanoyapılı lipit matrisin yüksek derecede düzenli bir kristal örgü yerine daha sınırlı/heterojen kristal bölgeler içerdiğini; Hint yağı ilavesiyle (NLT 50) ise kristal düzenliliğin daha da azalabildiğini düşündürmektedir. NLT 50'de piklerin belirginliğinin azalması ve

profilin genişlemesi, sıvı lipitin katı lipit matriste kusur oluşturması ve kristallenmeyi kısıtlaması ile uyumlu olup, NLT yapısının tipik olarak "kusurlu kristal" karakter kazanmasına katkıda bulunduğu kanaatine varılmıştır. Ayrıca NLT 50'de NLT 0'a kıyasla yeni ve belirgin ek piklerin ortaya çıkmaması, sıvı lipitin ayrı bir kristal faz oluşturmaksızın matrise dahil olduğuna işaret etmektedir.

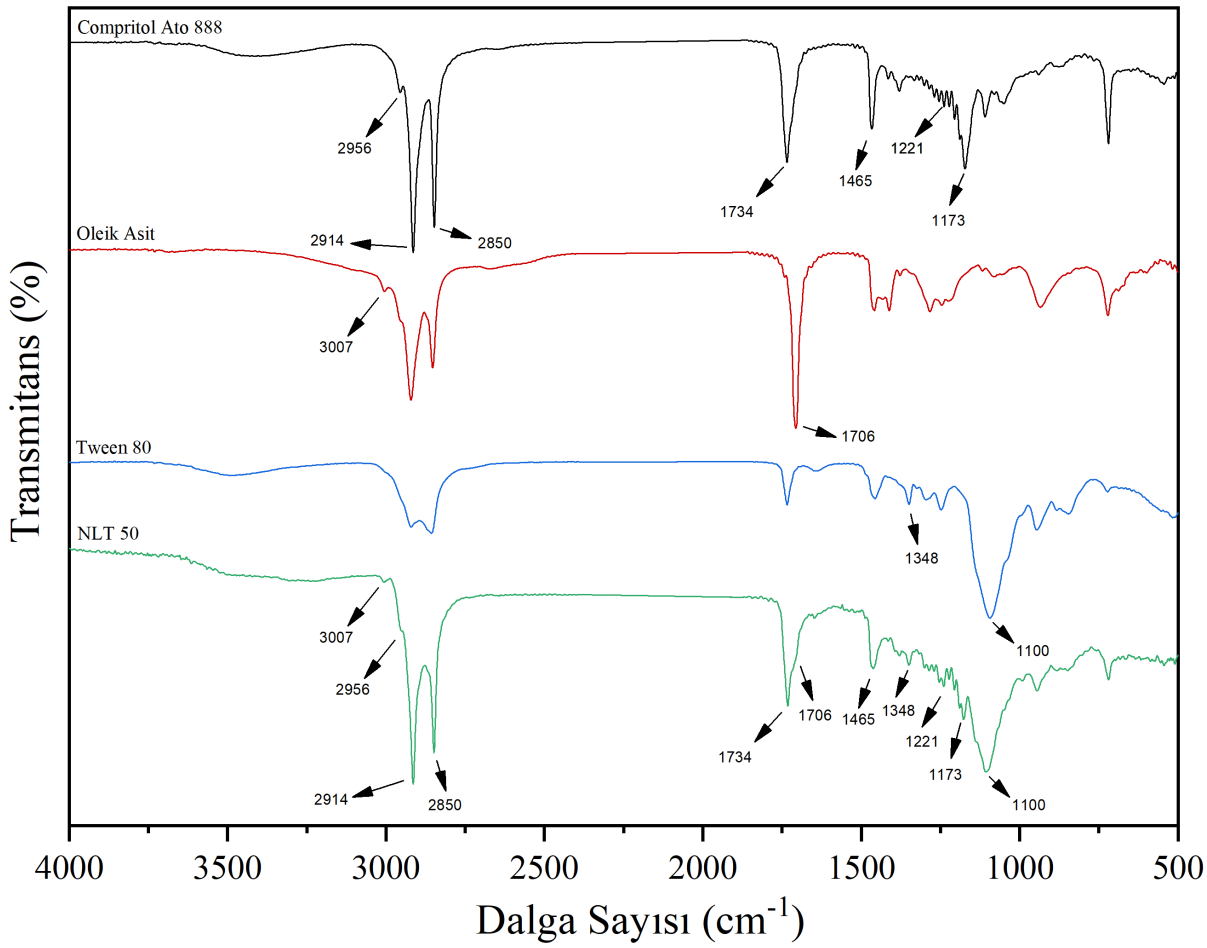


Şekil 4.26: Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Precirol/Hint Yağı temelli NLT'lerin (NLT 50, NLT 0) XRD difraktogramları.

4.3.1. MDA Yüklü NLT'lerin Karakterizasyonları

Tez kapsamında sentezlen NLT'ler için (Şekil 4.27) verilen FTIR analizlerine göre; Compritol spektrumu incelendiğinde; 2956 cm^{-1} bandı terminal $–CH_3$ gruplarının, 2914 ve 2850 cm^{-1} bantları ise uzun alifatik zincirlerdeki $–CH_2–$ gruplarının sırasıyla asimetrik ve simetrik C–H gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. 1734 cm^{-1}'de gözlenen güçlü bant ester karbonil (C=O) gerilmesine atfedilirken, 1465 cm^{-1} bandı metilen gruplarının bükülme titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. 1221 ve 1173 cm^{-1} bantları ise ester bağlarına ait C–O gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. Oleik asit spektrumu incelendiğinde 3007 cm^{-1} bandı olefinik =C–H gerilme titreşimleriyle, 1706 cm^{-1} bandı ise karboksilik asit grubuna ait C=O gerilme titreşimleriyle uyumlu olup doymamış yağ asidi karakterini yansıtmaktadır. Tween 80 spektrumunda 1100 cm^{-1} civarındaki belirgin bandın polioksietilen segmentine ait C–O–C/C–O gerilme titreşimlerine, 1348 cm^{-1} bandının ise alifatik C–H bükülme deformasyonlarına atfedilmiştir.

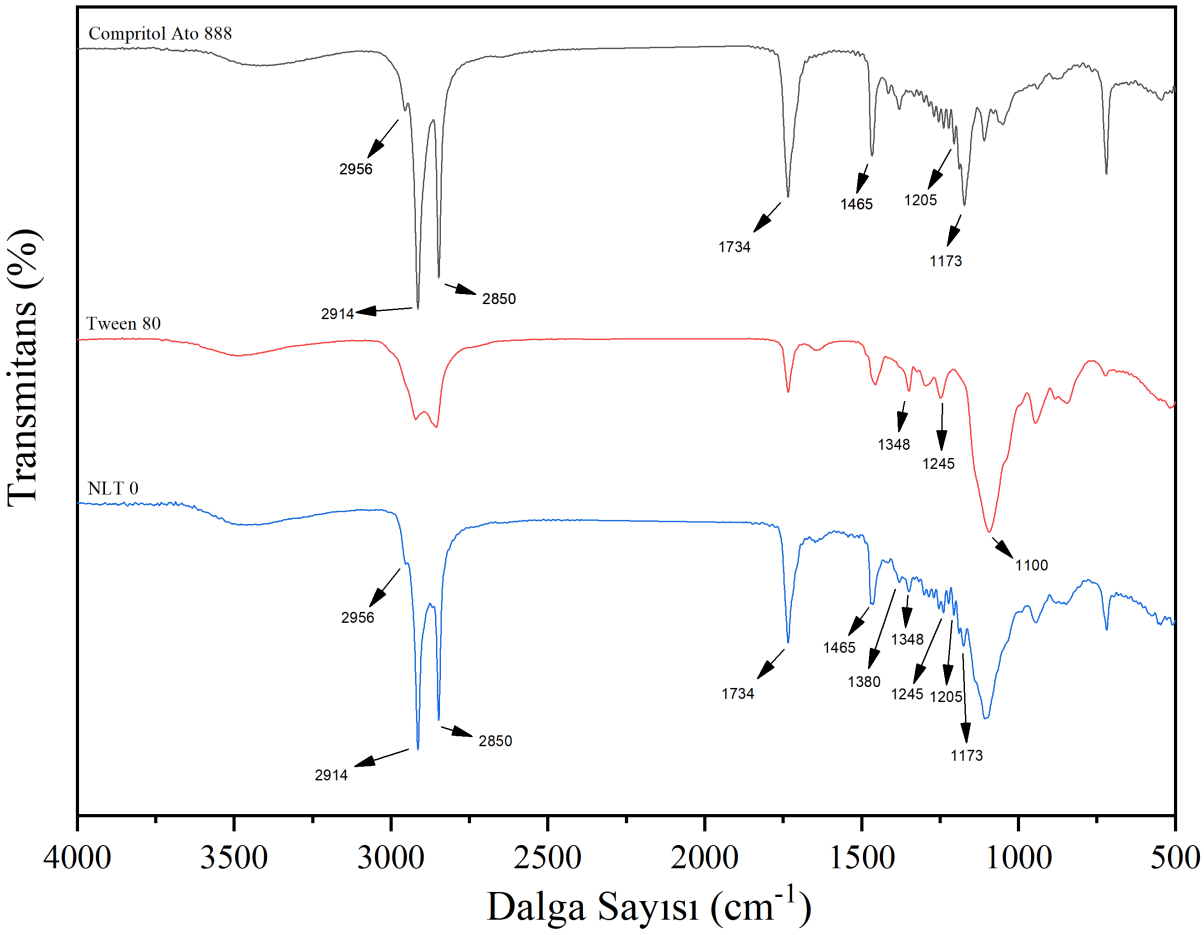
Bu bileşenlerle üretilen Compritol/Oleik asit/Tween 80 ile üretilmiş NLT spektrumu incelendiğinde 3007 cm^{-1} bandının oleik asit kaynaklı =CH–H titreşimleri, 2956–2914–2850 cm^{-1} bantlarının lipit matrise ait alifatik C–H gerilmeleri, 1734 cm^{-1} bandının Compritol kaynaklı ester karbonili ve 1706 cm^{-1} bandının oleik asidin karboksilik karbonili ile birlikte izlendiği görülmektedir. Parmak izi bölgesinde 1465, 1348, 1221, 1173 ve 1100 cm^{-1} bantlarının korunması, uzun zincirli alifatik iskelet ile ester/eter karakterli bağların NLT matrisi içinde sürdüğünü göstermektedir. İşaretli bantların büyük ölçüde yapıyı oluşturan bileşen spektrumları ile örtüşmesi ve yeni, ayırt edici bantların belirgin şekilde ortaya çıkmaması; beklenildiği gibi sistemde yeni kovalent bağ oluşumundan ziyade fiziksel birleşimin oluştuğunu işaret etmektedir [279,281,282].



Şekil 4.27: Compritol, Oleik Asit ve Tween 80 ile üretilen NLT'ye (NLT 50: % 50 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Compritol, Tween 80 ve NLT 0 örneğine ait FTIR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 4.28); Compritol spektrumunda 2956 cm^{-1} bandının terminal $–CH_3$, 2914 ve 2850 cm^{-1} bantlarının uzun alifatik zincirlerdeki $–CH_2$ gruplarının sırasıyla asimetrik ve simetrik C–H gerilme titreşimlerine karşılık geldiği, 1734 cm^{-1}'deki bandın ester karbonil (C=O) gerilmesiyle ve 1465 cm^{-1}

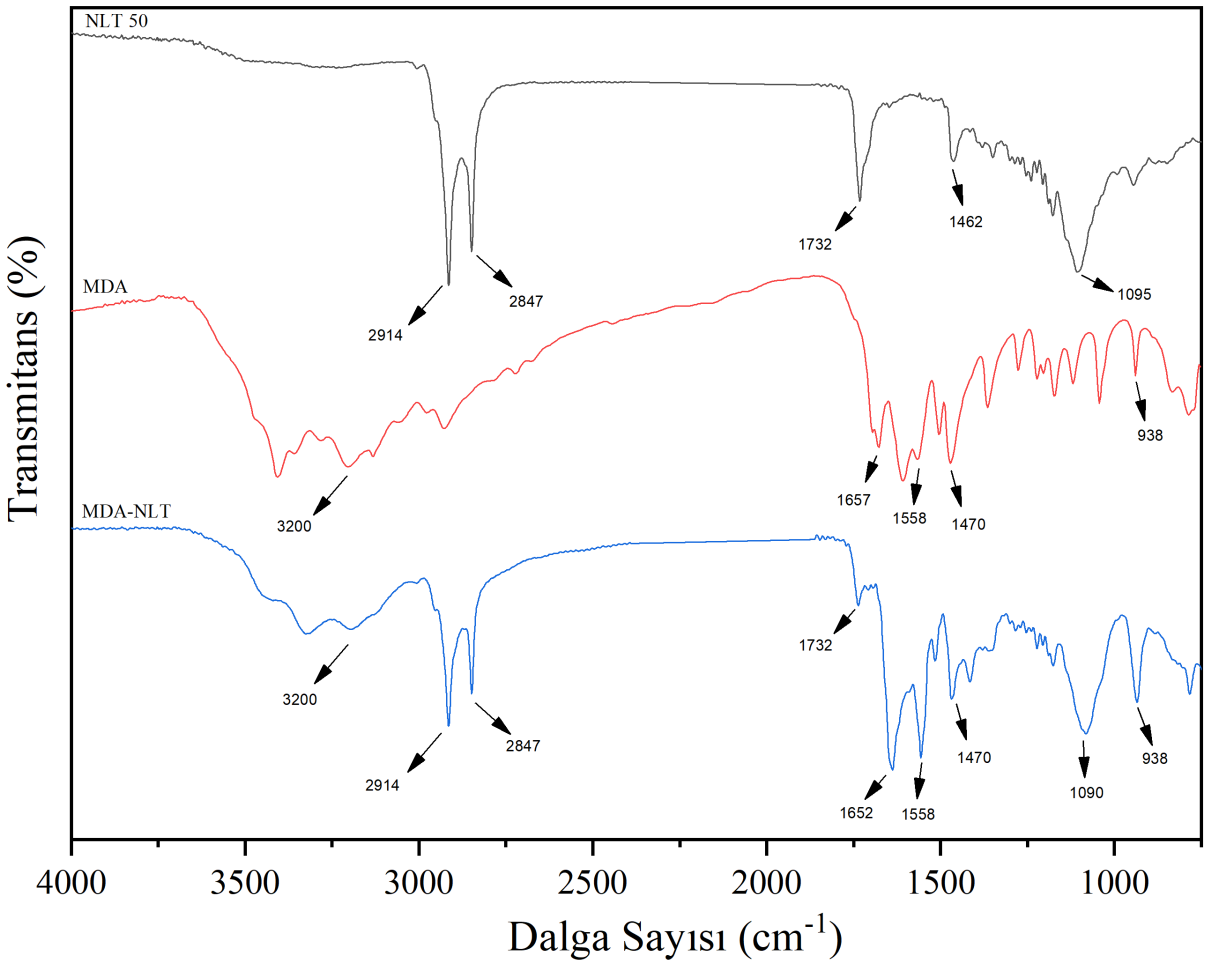
bandının CH_2 bükülme titreşimleriyle ilişkisine; 1205 ve 1173 cm^{-1} bantları ise gliserit/ester yapıya ait C–O gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. Tween 80 spektrumunda 1100 cm^{-1} civarındaki belirgin bandın polioksietilen segmentine ait C–O–C/C–O gerilme titreşimleriyle, 1245 cm^{-1} bandının ester/eter karakterli C–O titreşimleriyle ve 1348 cm^{-1} bandının alifatik C–H deformasyon titreşimlerine atfedilmiştir. NLT 0 spektrumunda Compritol'e ait 2956–2914–2850 cm^{-1}, 1734 cm^{-1} ve 1465 cm^{-1} bantlarının belirgin biçimde korunması katı lipit matriksin yapısal bütünlüğünü doğrulamakta; buna ek olarak 1348 ve 1245 cm^{-1} bantlarının NLT 0'da izlenmesi Tween 80'nin formülasyonda bulunduğunu ve Compritol matriksi ile Tween 80 arasında fiziksel etkileşimler dolayısıyla yapının oluştuğu kanaatine varılmıştır.



Şekil 4.28: Compritol, Tween 80 ile üretilen NLT 0'a (NLT 0: % 0 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

TMZ bozunma ürünü olarak değerlendirilen MDA, NLT50 ve MDA ilavesiyle hazırlanan MDA-NLT örneklerine ait FTIR spektrumları birlikte değerlendirildiğinde (Şekil 55); NLT50 spektrumunda 2914 ve 2847 cm^{-1} bantlarının lipit matrise ait uzun alifatik zincirlerdeki $–CH_2–$ gruplarının sırasıyla asimetrik ve simetrik C–H gerilme titreşimlerine, 1732 cm^{-1}'deki güçlü bandın

ester bağlarına ait C=O gerilmesiyle, 1462 cm^{-1} bandının metilen gruplarının bükülme titreşimlerine, 1095 cm^{-1} civarındaki bandın ester/eter karakterli C–O/C–O–C gerilme titreşimlerine atfedilmiştir. MDA'ya ait spektrum incelendiğinde 3200 cm^{-1} civarında gözlenen geniş bant O–H/N–H gerilme titreşimleriyle ilişkilendirilirken, 1657 cm^{-1} ve 1558 cm^{-1} bantları azot içeren fonksiyonel gruplara ait N–H bükülmesi ve C–N gerilmesine atfedilmiştir. Aynı spektrumda 1470 cm^{-1} bandı C–H deformasyon titreşimlerine, 938 cm^{-1} bandı ise dış-düzlem bükülmeleri ile ilişkilendirilmiştir. MDA-NLT spektrumunda NLT50'ye ait lipit bantlarının (2914–2847, 1732, 1462 ve ~1090–1095 cm^{-1}) belirgin biçimde korunmasına ek olarak MDA'ya atfedilen bantların 3200, 1652, 1558, 1470 ve 938 cm^{-1}'de birlikte izlenmesi, MDA'nın lipit matrisi içinde varlığını sürdürdüğünü göstermektedir [280,284].

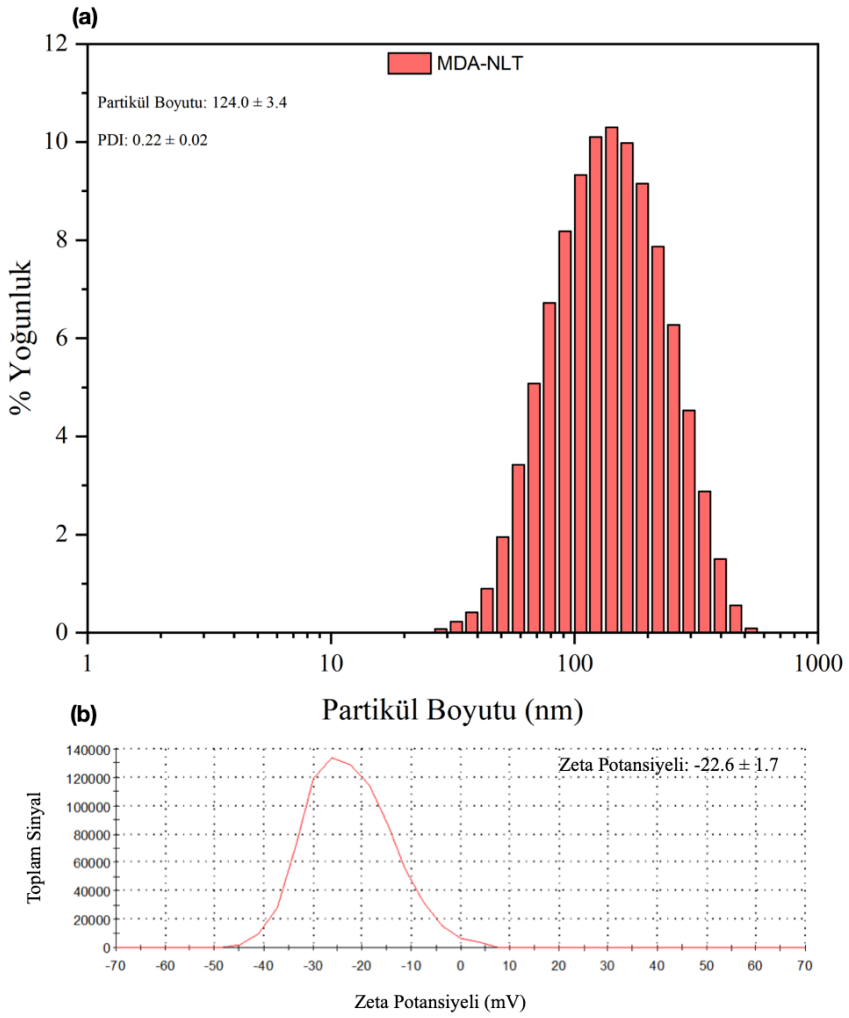


Şekil 4.29: NLT 50 (Compritol-OA), MDA, MDA-NLT'lere ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Şekil 4.30'da MDA yüklü NLT'lerin kolloidal özellikleri DLS ve zeta potansiyeli ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Buna göre MDA-NLT'lerin ortalama hidrodinamik partikül boyutu 124.0 ± 3.4 nm, PDI değeri 0.22 ± 0.02 ve zeta potansiyeli −22.6 ± 1.7 mV olarak belirlenmiştir. Boyut dağılım

histogramında (Şekil 4.30,a) popülasyonun ağırlıklı olarak ~100–200 nm bandında toplandığı ve homojen bir dağılım sergilediği görülmektedir. 0.22 olarak belirlenen PDI değeri de bu dağılımın nispeten dar olduğunu göstermektedir. Zeta potansiyeli dağılım eğrisi (Şekil 4.30,b) negatif bölgede partiküller arasında elektrostatik itmeye bağlı olarak kolloidal stabiliteye katkı sağlarken; mutlak değerin ~20–25 mV bandında olması elektrostatik stabilizasyonun yüksek düzeyde olduğunu işaret etmektedir.

MDA yüklü NLT'lerin boyut ve PDI değerleri, sistemin nanoboyutta ve nispeten dar dağılımlı bir partikül oluşturduğunu göstermektedir. MDA taşınımı için KBB geçişinde kullanılma potansiyeli taşıyan NLT sistemlerinde noniyonik yüzey aktif maddelerin sağlayabildiği sterik stabilizasyon ile birlikte değerlendirildiğinde, MDA-NLT dispersiyonunun partikül boyutu PDI değeri ve fiziksel kararlılığının desteklendiği ve formülasyonun tekrarlanabilir kolloidal özellikler sergilediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.30: MDA yüklü NLT'lerin kolloidal karakterizasyonu: (a) DLS ile belirlenen partikül boyutu dağılımı ortalama hidrodinamik partikül boyutu ve PDI grafiği, (b) zeta potansiyeli dağılımı.

4.3.2. MDA Yüklü NLT'lerin Enkapsülasyon Verimleri ve İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Compritol/OA temelli MDA NLT formülasyonlarına MDA yüklenme performansı, enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu kapsamda Compritol ve OA içinde çözünmüş MDA'nın farklı oranlarda NLT formülasyonlarına dahil edilmesi ile NLT'lerdeki ilaç yüklemesi ve enkapsülasyon değerleri belirlenmiştir. Üç tekrarlı deneylerle MDA-NLT 0, MDA-NLT 10, MDA-NLT 30, MDA-NLT 50, MDA-NLT 70 ve MDA-NLT 90 formülasyonları için serbest MDA miktarı 12000 Da gözenek çapına sahip membran ile santrifüj edilerek ayrılmış ve serbest MDA miktarı HPLC analizi ile belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre formülasyonların %EE ve %DLC değerleri Tablo 4.34'te özetlenmiştir.

Tablo 4.34: MDA yüklü NLT formülasyonlarının enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) sonuçları.

Formülasyon	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	%EE	%DLC
MDA-NLT 0	0	80.0 ± 3.0	0.28 ± 0.03
MDA-NLT 10	10	92.5 ± 1.6	0.95 ± 0.15
MDA-NLT 30	30	90.3 ± 4.1	2.73 ± 0.32
MDA-NLT 50	50	95.1 ± 1.2	4.93 ± 0.45
MDA-NLT 70	70	92.4 ± 3.2	6.78 ± 0.71
MDA-NLT 90	90	91.8 ± 4.3	8.13 ± 0.63

Genel eğilim değerlendirildiğinde, sıvı lipit içeren tüm NLT formülasyonlarında %EE'nin %90'ın üzerinde seyrettiği ve sıvı lipit içermeyen MDA-NLT 0'a kıyasla daha yüksek enkapsülasyon verimi elde edildiği görülmüştür. MDA-NLT 0 formülasyonunda %EE değeri 80.0 ± 3.0 olarak belirlenmiştir. MDA-NLT 10, MDA-NLT 30, MDA-NLT 50, MDA-NLT 70 ve MDA-NLT 90 formülasyonları için %EE değerleri sırasıyla 92.5 ± 1.6; 90.3 ± 4.1; 95.1 ± 1.2; 92.4 ± 3.2 ve 91.8 ± 4.3 olarak hesaplanmıştır. Benzer şekilde %DLC değerleri MDA-NLT 0, MDA-NLT 10, MDA-NLT 30, MDA-NLT 50, MDA-NLT 70 ve MDA-NLT 90 için sırasıyla 0.28 ± 0.03; 0.95 ± 0.15; 2.73 ± 0.32; 4.93 ± 0.45; 6.78 ± 0.71 ve 8.13 ± 0.63 olarak hesaplanmıştır. Bu bulgular, formülasyon bileşimindeki sıvı lipit oranının MDA'nın lipit matrise dağılımı ve/veya matriste tutulma kapasitesi üzerinde belirleyici olabildiğini göstermektedir.

%EE ve %DLC sonuçları salım profilleri ile birlikte yorumlandığında, yükleme parametrelerinin yalnızca sistemin taşıyabildiği etken madde miktarını değil, aynı zamanda matristeki dağılım biçimini de yansıttığı değerlendirilmektedir. Sıvı lipit oranının artmasıyla (Sıvı Lipit / Toplam Lipit, SL/TL: %0 - %90) lipit matrisin daha düzensiz bir iç yapıya yönelmesi ve MDA'nın daha

erişilebilir mikro-bölgelerde konumlanması, salımın daha hızlı ve daha yüksek kümülatif salım değerlerine ulaşmasına katkı sağlayabilmektedir. Buna karşın daha düşük SL/TL koşullarında matrisin nispeten daha düzenli bir yapı sergilemesi, MDA'nın tutulma eğilimini artırarak salımın daha yavaş bir karaktere kaymasına yol açabilmektedir. Bu nedenle, %EE–%DLC bulguları salım bölümü ile birlikte ele alındığında, formülasyon bileşimi ile hem yükleme performansı hem de kontrollü salım davranışı arasında tutarlı bir ilişki kurulabilmektedir.

4.3.3. MDA yüklü NLT'ler için In Vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

MDA salımının değerlendirilmesine yönelik olarak gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda, farklı sıvı lipit/toplam lipit oranlarına sahip NLT formülasyonlarından açığa çıkan MDA'ya ait salım profilleri nicel olarak belirlenmiş ve formülasyonlar arasında karşılaştırmalı biçimde analiz edilmiştir. Diyaliz membranı üzerinden geçişin uygunluğunu ve sistemin sink koşullarında işletildiğini doğrulamak amacıyla, MDA'nın serbest çözelti formu da referans grup olarak salım deneylerine dahil edilmiştir. Bu kapsamda, sıvı lipit içermeyen (MDA-NLT 0) ve farklı oranlarda sıvı lipit içeren (MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 70, sıvı lipit etkisini incelemek amacıyla geniş bir sıvı lipit çalışma aralığındaki etkileri gözlemleyebilmek amacıyla) taşıyıcı sistemler için zamanla değişen kümülatif salım yüzdeleri hesaplanmıştır. Formülasyonun salım hızı, salım süresi ve ulaşılan plato değerleri üzerindeki etkisi ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir.

Sentezlenmiş nanopartiküllerin salım davranışını incelemek için öncelikle referans sistem olarak MDA'nın serbest çözelti formundan elde edilen salım profili incelenmiştir. Şekil 4.31 ve Tablo 4.35'de özetlenen veriler doğrultusunda, serbest MDA çözeltisinde salımın 60. dakikasında kümülatif salım yüzdesinin yaklaşık %33 düzeyine ulaştığı, 300. dakikada ise salımın %90'ın üzerine çıkarak % 93.81 değerine eriştiği belirlenmiştir. Bunu izleyen zaman noktalarında salım eğrisinin belirgin bir plato davranışı sergilediği ve 48. saatte kümülatif salımın %98 düzeyine ulaşarak MDA'nın neredeyse tamamının membran dışına geçtiği saptanmıştır. Bu hızlı ve tam salım profili, diyaliz membranının geçirgenliğinin ve deney koşullarında sink şartlarının sağlandığının bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

MDA yüklü NLT formülasyonlarında ise zamana yayılmış, başlangıçta daha düşük hızlarda seyreden ve ilerleyen dönemde plato eğilimine ulaşan kontrollü bir salım davranışı belirlenmiştir. Sıvı lipit içermeyen MDA-NLT 0 formülasyonunda (%EE: 80.0, %DLC: 0.28) (NLT 0 formülasyonunun yalnızca katı lipit fazı içermesi, bu sistemi SLN sistemlerinin bir karşılığı olarak tanımlamaktadır) 60.

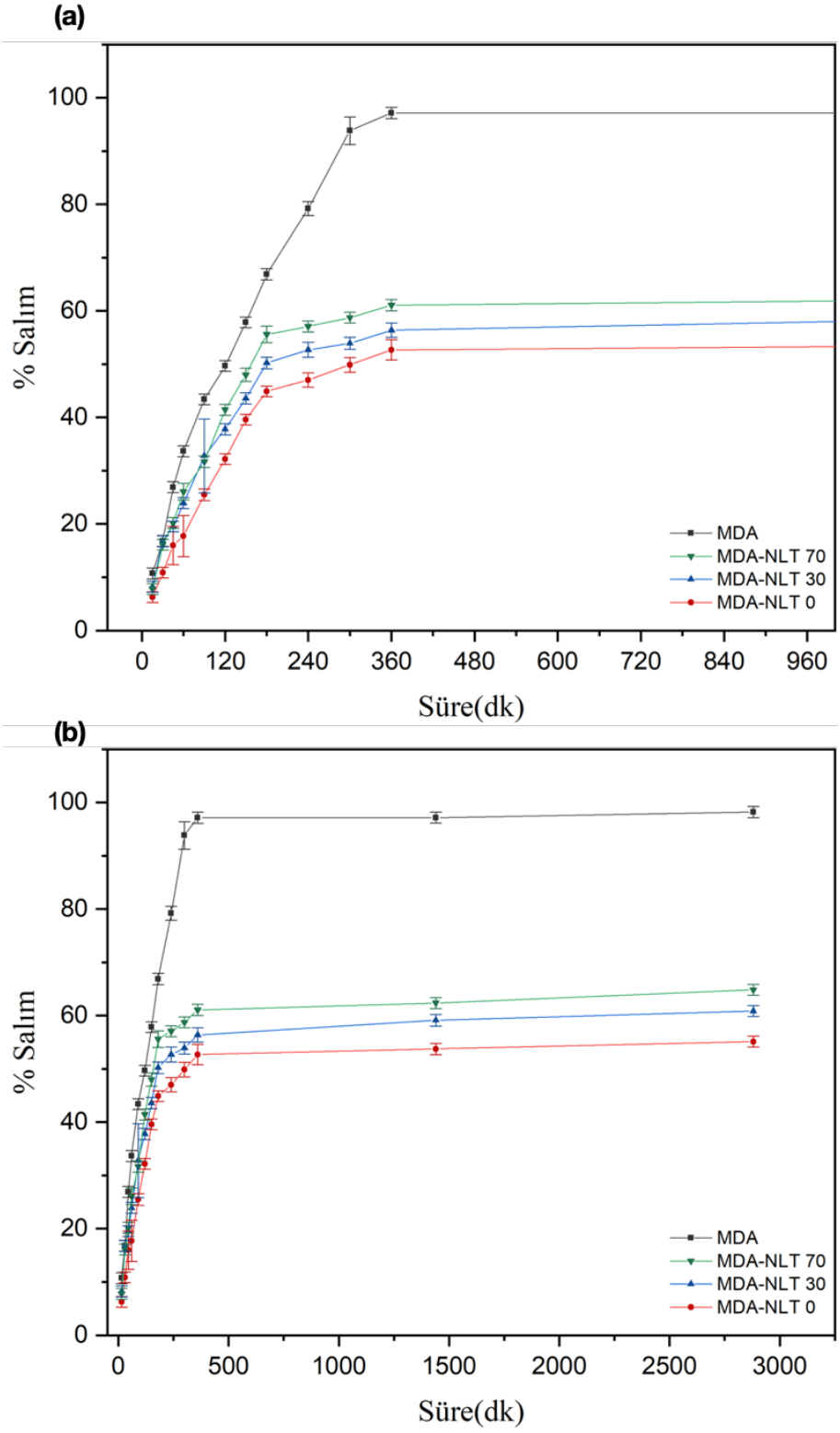
dakikadaki kümülatif salımın % 17.75 düzeyinde kaldığı, 360. dakikada ise salımın yalnızca %52.69 seviyesine ulaştığı görülmüştür. 60. ve 360. dakikalar arasındaki zaman aralığında MDA-NL T0 salım eğrisinde nispeten yavaş ancak sürekli bir artış izlendiği; 360. dakikadan sonra ise salım artışının giderek azaldığı belirlenmiştir. 360. dakika ve 48. saat arasında gerçekleşen ek salım miktarının oldukça sınırlı kaldığı ve eğrinin yaklaşık 24. saatten itibaren plato eğilimine geçtiği; 48. saatte ise toplam salımın yalnızca %55.12'lik değere ulaşarak 360. dakikada gözlenen düzeye oldukça yakın bir seviyede seyrettiği belirlenmiştir.

Benzer zaman noktalarında, sıvı lipit içeren MDA-NLT 30 (%EE: 90.3, %DLC: 2.73) ve MDA-NLT 70 (%EE: 92.4, %DLC: 6.78) formülasyonlarında 60. dakikadaki kümülatif salım yüzdelerinin sırasıyla % 23.91 ve % 26.06 olduğu, dolayısıyla erken fazda MDA-NLT 0'a kıyasla daha yüksek salım düzeylerine ulaşıldığı belirlenmiştir. 60. ve 360. dakikalar arasındaki dönemde NLT 30 ve NLT 70 salım eğrilerinin NLT 0'a benzer şekilde nispeten yavaş ancak sürekli bir artış gösterdiği ve bu süreçte nanopartiküllerin sistematik olarak MDA-NLT 0 < MDA-NLT 30 < MDA-NLT 70 sıralaması ile kümülatif salım değerleri sergilediği gözlenmiştir. Sıvı lipit içeren MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 70 formülasyonları için geç dönem profilleri de benzer nitelikte olup; 48. saatte kümülatif salım yüzdeleri sırasıyla % 60.84 ve % 64.84 olarak hesaplanmış, bu formülasyonlarda da 24. ve 48. saatler arasında yalnızca minimal düzeyde ek salım gerçekleşmiş ve salım eğrileri belirgin şekilde denge değerine ulaşmıştır.

Tablo 4.35: MDA yüklü NLT formülasyonlarının in vitro salım profili, zamana bağlı MDA salım verileri.

Zaman (dk)	**MDA**	**MDA NLT 0 (%0 Sıvı Lipit/Toplam Lipit)**	**MDA NLT 30 (%30 Sıvı Lipit/Toplam Lipit)**	**MDA NLT 70 (%70 Sıvı Lipit/Toplam Lipit)**
15	10.75 ± 1.03	6.28 ± 1.02	8.23 ± 1.03	7.80 ± 1.04
30	16.80 ± 1.02	10.87 ± 1.00	16.78 ± 1.02	16.10 ± 1.01
45	26.90 ± 1.01	15.96 ± 3.59	19.53 ± 1.01	20.17 ± 1.02

60	33.63 ± 1.01	17.75 ± 3.85	23.91 ± 1.02	26.06 ± 1.57
90	43.39 ± 1.01	25.49 ± 1.09	32.76 ± 6.92	31.67 ± 1.03
120	49.69 ± 1.02	32.15 ± 1.01	37.77 ± 1.08	41.44 ± 1.03
150	57.87 ± 1.00	39.58 ± 1.01	43.57 ± 1.06	48.01 ± 1.26
180	66.87 ± 1.07	44.91 ± 1.02	50.22 ± 1.08	55.59 ± 1.56
240	79.20 ± 1.28	47.04 ± 1.33	52.68 ± 1.40	57.09 ± 1.03
300	93.81 ± 2.58	49.90 ± 1.38	53.93 ± 1.10	58.74 ± 1.03
360	97.15 ± 1.05	52.69 ± 1.90	56.38 ± 1.33	61.07 ± 1.06
1440	97.15 ± 1.04	53.75 ± 1.07	59.13 ± 1.11	62.38 ± 1.03
2880	98.19 ± 1.05	55.12 ± 1.03	60.84 ± 1.03	64.84 ± 1.02



Şekil 4.31: Serbest MDA ve MDA yüklü NLT formülasyonlarının (MDA-NLT 70, MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 0) in vitro kümülatif salım profilleri (a) 0–960 dk aralığındaki % salım davranışı, (b) 0–3000 dk aralığındaki % salım davranışı.

Yapılan iki yönlü varyans analizi (ANOVA), MDA salımı üzerinde hem kullanılan formülasyon tipinin hem de zaman-faktör etkileşiminin istatistiksel olarak anlamlı etkiler yarattığını

ortaya koymaktadır ($p<0.05$). Devamında formülasyonlar arası yapılan ikili karşılaştırmalar, tüm zaman noktalarında serbest MDA ile NLT grupları arasında anlamlı fark bulunduğunu ortaya koymuştur. NLT formülasyonları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise, özellikle 90. dakikadan sonra sıvı lipit oranı en yüksek olan NLT 70 formülasyonunun, NLT 0 ve NLT 30'e kıyasla daha yüksek MDA salımı sağladığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlar, formülasyonda sıvı lipit oranının artırılmasının MDA salım hızını anlamlı düzeyde yükselttiğini ve sıvı lipit oranı arttıkça daha hızlı salım profili sunan taşıyıcı sistemlerin üretilmiş olduğunu göstermektedir.

Literatürde sunulan çeşitli NLT davranışları incelendiğinde, saf katı lipit fazıyla hazırlanan SLN sistemlerinin genellikle ilacı NLT'lere kıyasla daha yavaş saldığı ve formülasyonda toplam lipit içindeki sıvı lipit oranının artmasıyla ilacın salım hızının belirgin şekilde yükseldiği bildirilmiştir. NLT salım profilleri ile ilgili bilgi edinmek adına literatür incelendiğinde Clotrimazol yüklü lipit nanopartikülleriyle yapılan bir karşılaştırmada, NLT formülasyonunun 80. saat sonunda yaklaşık %56.6 salım ile eş formülasyonlu SLN'den (%42.5) nispeten daha yüksek bir kümülatif salım sağladığını belirtilmiştir. Benzer şekilde yapılan bir başka çalışmada nisoldipin yüklü oleik asit ve Dynasan 114 içeren bir NLT formülasyonunun in vitro kontrollü salım profilinde, karşılaştırmalı en iyi SLN formülasyonuna kıyasla üstün özellikler sergilediği vurgulanmıştır. MDA ve TMZ özelinde sunulan bir başka çalışmada TMZ-NLT sistemlerinde yaklaşık 48 saate uzayan sürekli bir ilaç salımı elde edildiği ve bu nedenle SLN temelli sistemlere kıyasla glioblastoma tedavisinde daha avantajlı bir seçenek olarak değerlendirilebileceği belirtilmektedir. Benzer bir başka çalışmada da TMZ-NLT sistemlerinden 72 saate kadar uzayan, kontrollü bir salım profili sergilediği belirtilmiştir [285–288].

Elde edilen bulgular ve literatür değerlendirmeleri ile NLT sistemlerinde sıvı yağ fazının bulunmasının lipit matrisin kristal yapısını bozarak ilacın difüzyonunu hızlandırabileceği ve genel olarak salım hızını artırabileceğini desteklemektedir. Öte yandan, tamamen katı lipit içeren SLN'lerin daha düzenli kristal yapıya sahip olması nedeniyle yüklenmiş ilacın matriksten difüzyonu görece yavaşlayabilmektedir. Lipit temelli nanopartiküllerin in vitro ilaç salım profilleri genellikle iki aşamalı bir karakter sergilemektedir: ilk aşamada, formülasyonda yüzeye yakın konumdaki ilacın hızla ortamdaki çözeltiye difüze olmasıyla açıklanan bir ani başlangıç salımı görülmekte, bunu takiben matriksin derinliklerinde hapsolmuş ilacın yavaş ve kontrollü şekilde salındığı uzun süreli bir plato evresi izlemektedir.

MDA salımının kinetiğini daha ayrıntılı olarak incelemek amacıyla, elde edilen salım verileri sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson–Crowell ve Korsmeyer–Peppas modellerine göre analiz edilmiş; her bir model için hesaplanan hız sabitleri (k) ve korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 4.36'da özetlenmiştir. Sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson–Crowell modelleri için elde edilen R^2 değerlerinin tüm formülasyonlar açısından yaklaşık 0.30–0.70 aralığında kaldığı, buna karşılık Korsmeyer–Peppas modeline ait R^2 değerlerinin tüm MDA yüklü NLT formülasyonlarında 0.96'nın üzerinde olduğu görülmüştür. Bu bulgu, özellikle salımın matris tipi sistemlere özgü difüzyon kontrollü bir mekanizma ile daha iyi açıklandığını düşündürmektedir. Korsmeyer–Peppas modeline göre belirlenen *n* değerlerinin 0.5–1 aralığında yer alması, polimer/lipit matriksli sistemlerde non-Fickian difüzyon davranışı ile ilişkilendirilmektedir. Dolayısıyla MDA salımında taşıyıcı matrisin yalnızca bir difüzyon ortamı değil, aynı zamanda yapısal gevşeme veya erozyon süreçleriyle de MDA salımını gerçekleştirdiğini göstermektedir.

Elde edilen bulgular, MDA'nın NLT yapıları içerisinde enkapsülasyonu ile salım profilinin zamana yayılmış, kademeli ve zaman içinde denge eğilimi gösteren bir davranış sergilediğini ve sıvı lipit/toplam lipit oranındaki değişimin bu profil üzerinde belirgin etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Bu kapsamda NLT sistemlerinin, formülasyon bileşimine duyarlı bir şekilde MDA için kontrollü ve sürdürülebilir salım sağlayabilen potansiyel ilaç taşıyıcı platformlar olarak nitelendirilebileceği düşünülmektedir.

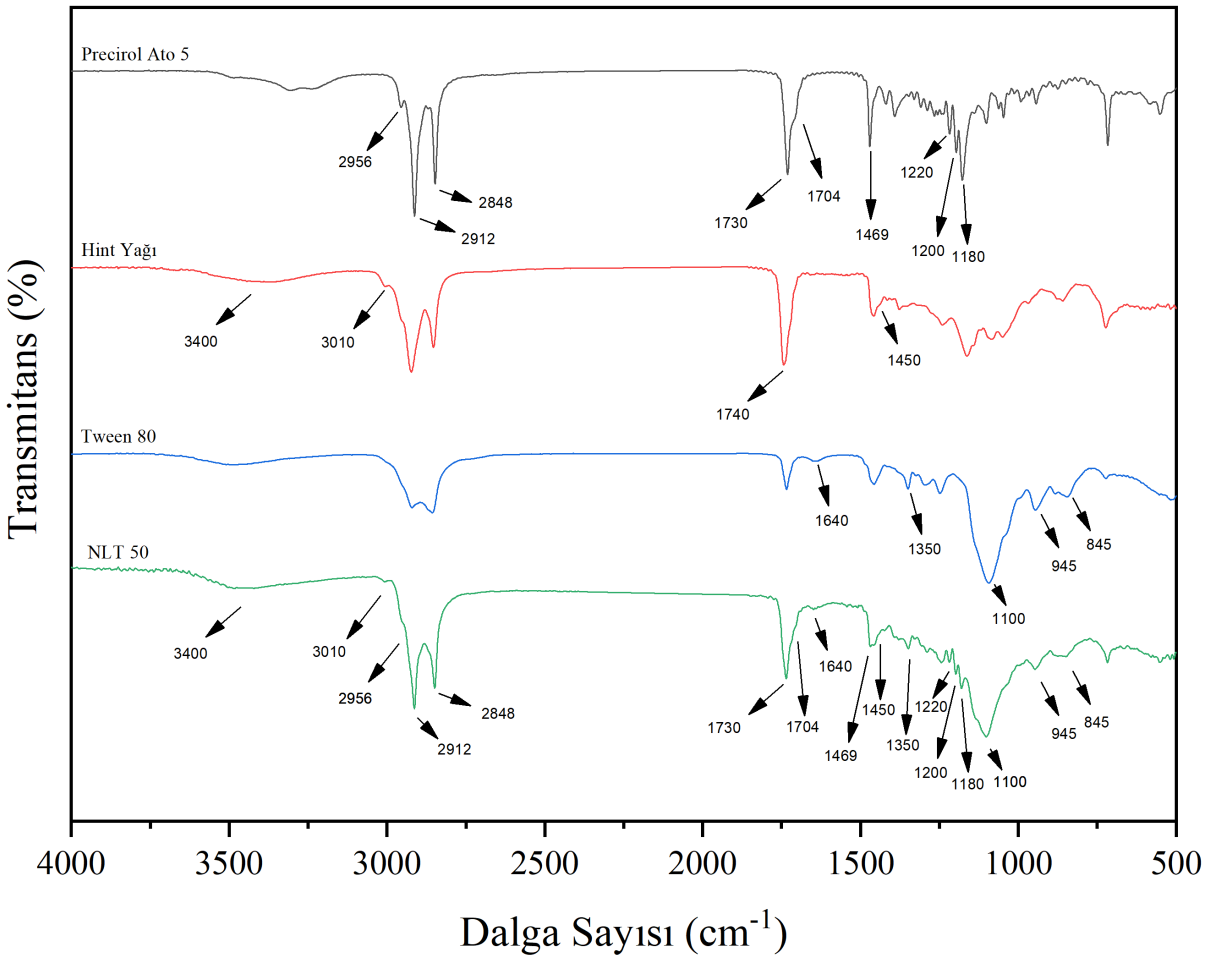
Tablo 4.36: MDA-NLT 0, MDA-NLT 30 ve MDA-NLT 70 formülasyonlarının In Vitro Salım Verilerinin Kinetik Modeller ile Uyum Analizi (k, n ve R^2 Değerleri).

Kinetik Model	Model Denklemi	MDA-NLT 0	MDA NLT 30	MDA NLT 70
Sıfırıncı Derece	$M_t = M_0 + k_0 \cdot t$	k_0 = 0.013 R^2 = 0.324	k_0 = 0.013 R^2 = 0.332	k_0 = 0.014 R^2 = 0.305
Birinci Derece	$\frac{dMt}{dt} = k_1 \cdot (M_\infty - M_t)$	k_1 = 0.002 R^2 = 0.652	k_1= 0.002 R^2 = 0.698	k_1 = 0.002 R^2 = 0.571
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot t^{\frac{1}{2}}$	k_H= 0.910 R^2 = 0.536	k_H = 0.930 R^2 = 0.544	k_H= 1.000 R^2 = 0.513
Hixson – Crowell	$M_\infty{}^{\frac{1}{3}} - (M_\infty - M_t)^{\frac{1}{3}} = k_{HC} \cdot t$	k_{HC} = 0.002 R^2 = 0.539	k_{HC} = 0.002 R^2 = 0.563	k_{HC} = 0.002 R^2 = 0.477
Korsmeyer – Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP} = 0.014 n = 0.778 R^2 = 0.996	k_{KP} = 0.019 n = 0.743 R^2 = 0.978	k_{KP} = 0.016 n = 0.783 R^2 = 0.979

4.3.4. PTX yüklü NLT'lerin Karakterizasyonları

PTX taşınımı için sentezlenmiş NLT'lere ait FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.32), 2956 cm^{-1} ($–CH_3$) ile 2912-2848 cm^{-1} ($–CH_2$) bantları yapıdaki alifatik gruplara, gliserit yapısına ait 1730 cm^{-1}'deki güçlü bant ester C=O gerilmesine) ve 1704 cm^{-1} civarındaki omuz karbonil bölgesindeki titreşimlere atfedilmiştir. Spektrumda yer alan 1469 cm^{-1} (CH_2 bükülmesi) ile 1220–1180 cm^{-1} aralığı yapıdaki C–O/C–O–C bantları ester/eter yapıları ile ilişkilendirilmiştir. Hint yağına ait FTIR spektrumu incelendiğinde 3400 cm^{-1} civarında izlenen geniş bant O–H gerilmesine, 3010 cm^{-1} bandı olefinik (=C–H) gerilmesine, 1740 cm^{-1} bandı trigliserit esterlerine ait C=O gerilmesine ve 1450 cm^{-1} bandı CH_2 deformasyon titreşimlerine atfedilmiştir. Tween 80'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde 1640 cm^{-1} bandı hidrofilik karaktere bağlı H–O–H bükülmesine, 1350 cm^{-1} bandı C–H deformasyon titreşimlerine, 1100 cm^{-1}'deki güçlü bant polietilenoksit segmentlere ait C–O–C gerilmesine ve 945-845 cm^{-1} bantları parmak izi bölgesinde etoksillenmiş yapı ile ilişkilendirilmiştir. Bu bileşenler ile üretilmiş NLT'ye ait FTIR spektrumu incelendiğinde 3400 cm^{-1} (O–H), 3010 cm^{-1} (=C–H), 2956-2912-2848 cm^{-1} (alifatik C–H), 1730 cm^{-1} (ester C=O), 1704 cm^{-1}bantları ile birlikte gözlenmesi, NLT yapısında Precirol, Hint yağı ve Tween 80'in karakteristik fonksiyonel gruplarının korunduğunu işaret etmektedir. Bunun yanı sıra 1220cm^{-1}, 1180 cm^{-1} ve 1100 cm^{-1} bantları ester/eter ve 945–845 cm^{-1} bantları parmak izi bölgesinde yüzey aktif ve doymamış zincir katkılarının sürdüğüne atfedilmiştir

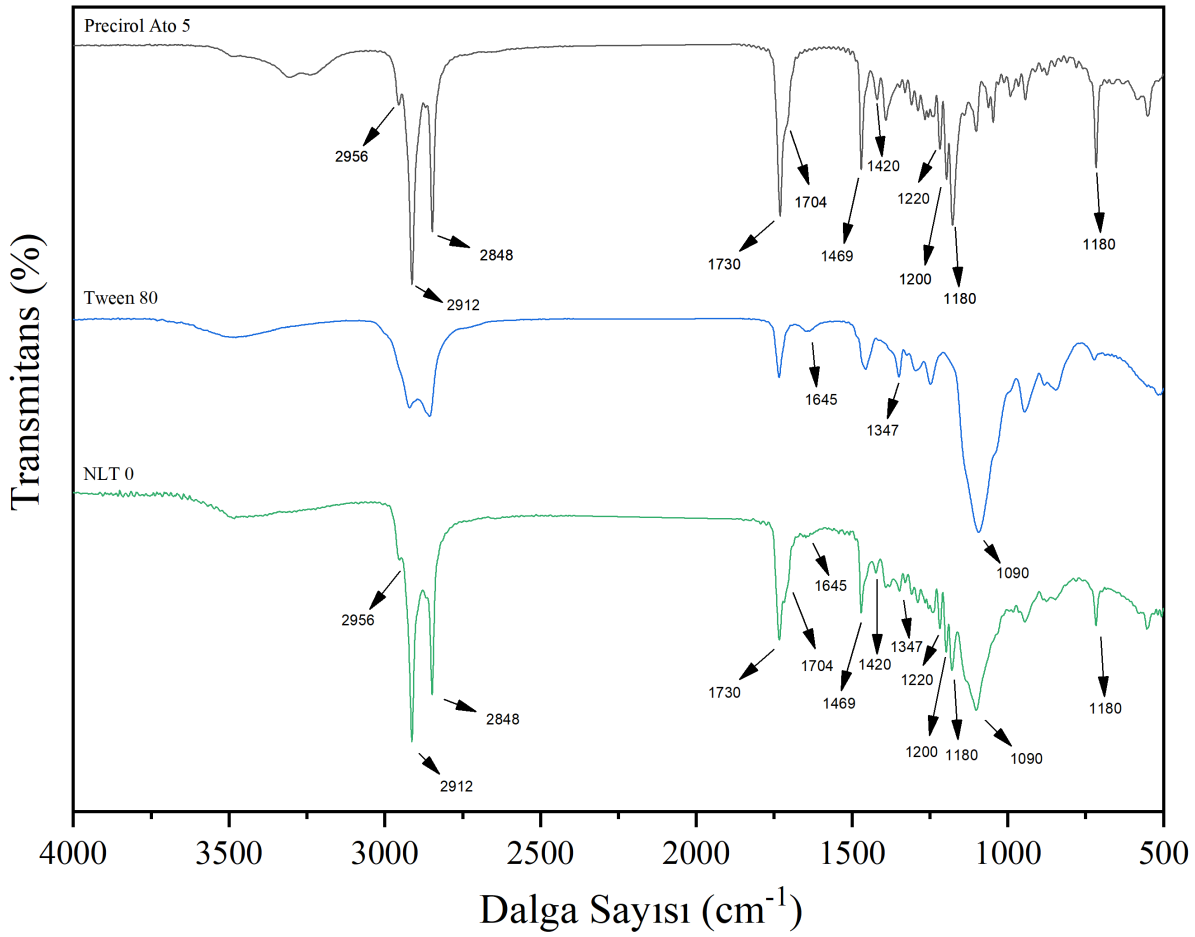
[289–291]. NLT yapısında bileşenlere ait karakteristik bantların birlikte izlenmesi formülasyonda katı lipid, sıvı lipid ve yüzey aktif bileşenlerinin yapısal bütünlüklerini koruduklarını göstermiştir.



Şekil 4.32: Precirol ATO 5, Hint yağı ve Tween 80 ile üretilen NLT'ye (NLT 50: % 50 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Tez kapsamında sıvı lipit yüklenmemiş nanopartiküllerin üretimi için gerçekleştirilen çalışmalarda Precirol ATO 5'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.33), 2956 cm^{-1} ile 2912–2848 cm^{-1} bantlarının alifatik C–H gerilmelerini; 1730 cm^{-1} bandının ester C=O gerilmesini temsil ettiği, 1704 cm^{-1} civarındaki omuzun ise karbonil gruplarına atfedilmiştir. Spektrumda 1469 cm^{-1} bandı CH_2 bükülmesine, 1220–1180 cm^{-1} aralığı ise ester/eter yapılarıyla ilişkili C–O/C–O–C titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. Tween 80'e ait FTIR spektrumu incelendiğinde 1645 cm^{-1} bandı hidrofilik karaktere bağlı H–O–H bükülmesiyle örtüşebilen bölgeye, 1347 cm^{-1} bandı C–H deformasyon titreşimlerine, 1090 cm^{-1}'deki güçlü bant polioksietilen segmentlere ait C–O–C gerilmesine atfedilmiştir. Precirol ATO 5 esaslı solid lipit nanopartiküllerine ait FTIR spektrumu incelendiğinde, 2956 cm^{-1} ($–CH_3$) ile 2912–2848 cm^{-1} ($–CH_2$) bantları alifatik zincirlerin C–H gerilme titreşimlerine, 1730 cm^{-1}'deki bant ester yapısına ait C=O gerilmesine ve 1704 cm^{-1} civarındaki omuz

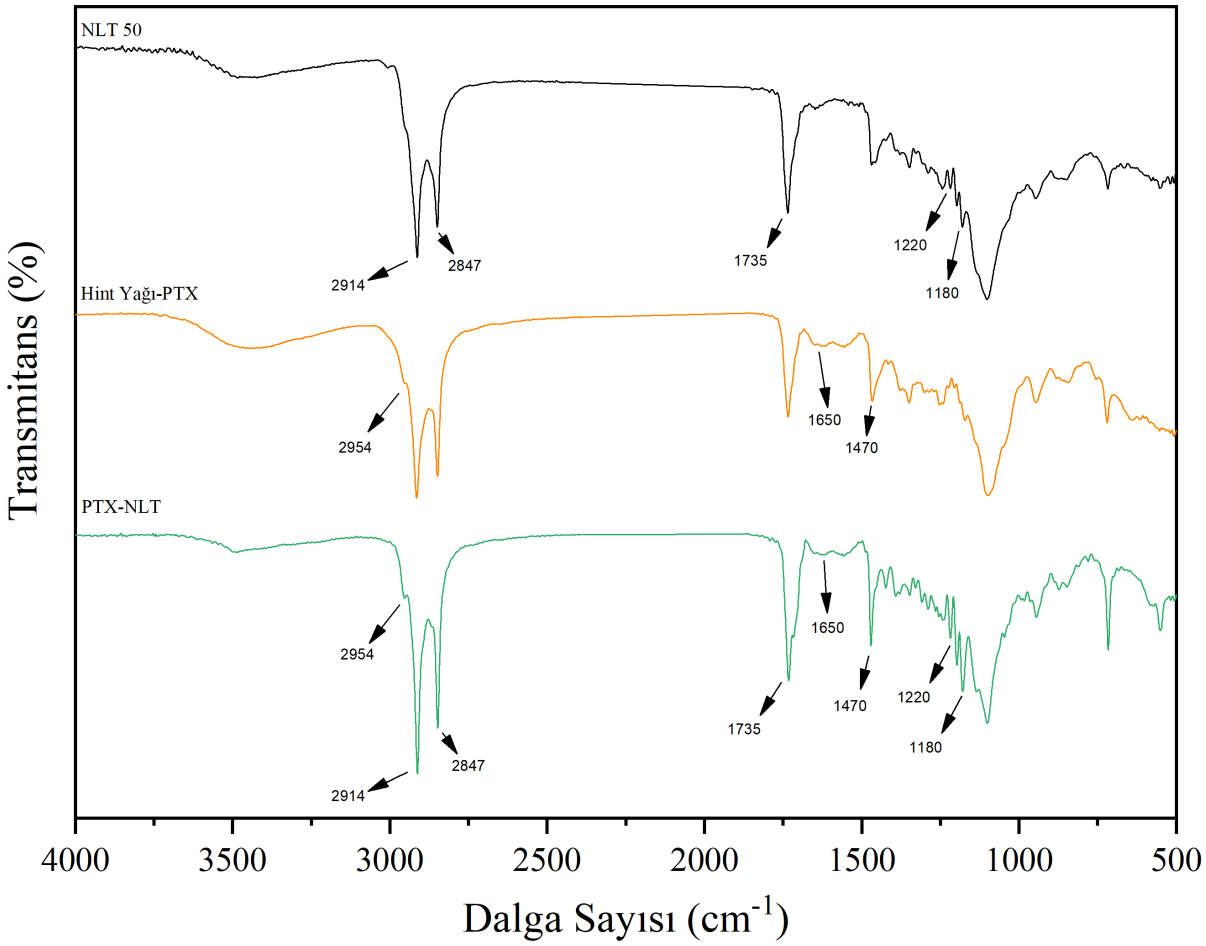
karbonil bölgesindeki titreşimlere atfedilmiştir. Spektrumda 1469 cm^{-1} bandı CH_2 bükülmesine, 1220–1180 cm^{-1} aralığı ise ester/eter yapılarıyla ilişkili C–O/C–O–C titreşimleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu bileşenler ile üretilmiş SLN spektrumunda bileşimi oluşturan piklerinin birlikte izlenmesi, formülasyonda katı lipit ve yüzey aktif bileşenlerinin karakteristik fonksiyonel gruplarını koruduğunu göstermiştir.



Şekil 4.33: Precirol ATO 5, Tween 80 ile üretilen NLT 0'a (NLT 0: % 0 Sıvı Lipit/ Toplam Lipit oranı) ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Bu bileşenler ile üretilmiş NLT50'ye ait FTIR spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.34) 2914 cm^{-1} ve 2847 cm^{-1} bantları uzun alifatik zincirlere ait sırasıyla $–CH_2$ asimetrik ve simetrik C–H gerilme titreşimlerine, 1735 cm^{-1}'de gözlenen güçlü bant ester yapısındaki C=O gerilme titreşimine atfedilmiştir. Parmak izi bölgesinde yer alan 1220 cm^{-1} ve 1180 cm^{-1} bantları ise ester bağlarına ait C–O gerilme titreşimleri ve polioksietilen yapısından kaynaklanan C–O–C titreşimleriyle ilişkilendirilmiştir. Hint yağı–PTX spektrumu incelendiğinde 2954 cm^{-1} bandı alifatik C–H gerilme titreşimleri ile ilişkilendirilmiş, 1650 cm^{-1} civarındaki bant ise saf PTX için karbonil bölgesi titreşimlerine atfedilmiştir; 1470 cm^{-1} bandı da CH_2 deformasyon/bükülme titreşimleri kapsamında

değerlendirilmiştir. Bu bulgularla uyumlu olarak PTX-NLT spektrumu incelendiğinde 2954–2914–2847 cm^{-1} bantlarının alifatik C–H gerilmelerini, 1735 cm^{-1} bandının ester C=O gerilmesini, 1650 cm^{-1} bandının PTX'e ait karbonil bölgesi titreşimlerini ve 1470 cm^{-1} bandının CH_2 deformasyon/bükülmelerini yansıtarak lipid matrise ait yapısal bantların korunduğunu; 1220 ve 1180 cm^{-1} bantlarının da aynı şekilde ester/eter yapılarının varlığını sürdürdüğünü göstermiştir. Buna göre PTX ile ilişkili bantların PTX-NLT spektrumunda da birlikte takip edilebilmesi, PTX içeren sıvı lipid fazının NLT matrisi içine başarıyla aktarıldığını ve formülasyon bileşenlerinin temel fonksiyonel gruplarının korunduğunu desteklemektedir [292,293].

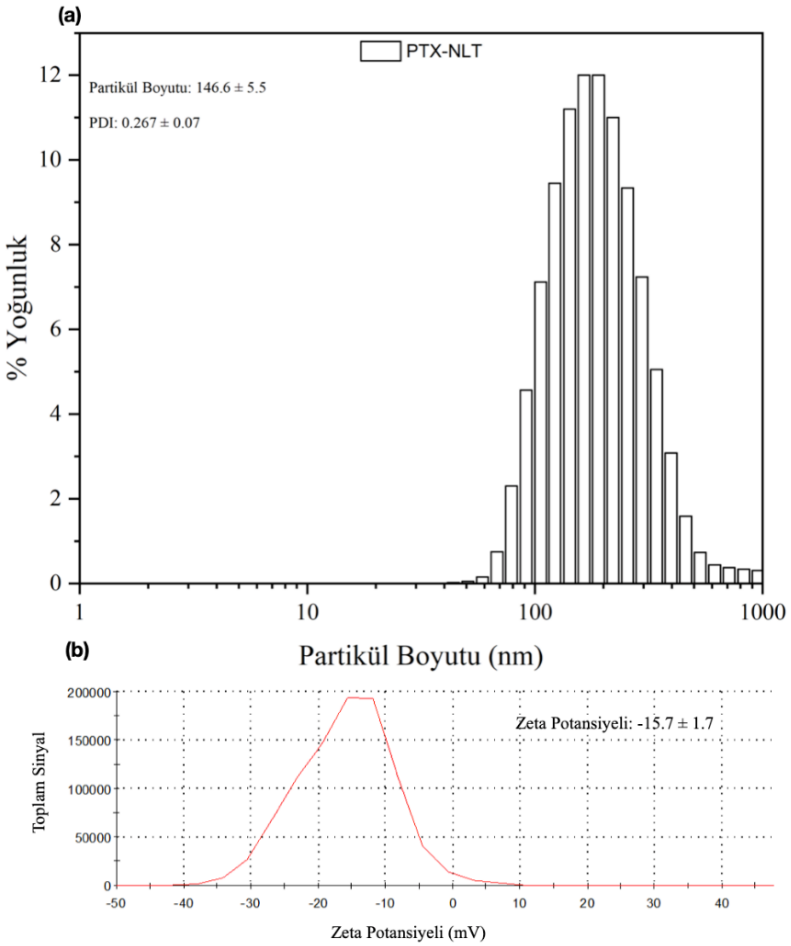


Şekil 4.34: NLT 50 (Precirol-Hint Yağı), Hint Yağı-PTX, PTX-NLT'lere ait FTIR spektrumlarının değerlendirilmesi.

Şekil 4.35'te PTX yüklü NLT'lerin kolloidal özellikleri DLS ve zeta potansiyeli ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Buna göre PTX-NLT'lerin ortalama hidrodinamik partikül boyutu 146.6 ± 5.5 nm, PDI değeri 0.267 ± 0.07 ve zeta potansiyeli −15.7 ± 1.7 mV olarak belirlenmiştir. Boyut dağılım histogramında (Şekil 4.35, a) popülasyonun ağırlıklı olarak ~100–250 nm bandında toplandığı ve homojen bir dağılım sergilediği görülmektedir. PDI değerinin 0.25'in üzerinde ve standart sapmasının

görece yüksek olması, dağılımın MDA-NLT'ye kıyasla daha geniş olabileceğini ve sistemde homojenliğin orta düzeyde seyrettiğini düşündürmektedir. Zeta potansiyeli dağılım eğrisi (Şekil 4.35, b) partiküllerin net yüzey yükünün negatif olduğunu göstermekte; −15.7 ± 1.7 mV düzeyi ise PTX yüklü nanopartiküllerin elektrostatik itmeye dayalı stabilizasyonun sınırlı olabileceğine işaret etmektedir.

PTX yüklü NLT'lerin ~150 nm mertebesindeki partikül boyutu, formülasyonun nanoboyutta ve kolloidal dispersiyon halinde üretildiğini doğrulamaktadır. Bununla birlikte PDI'nin 0.267 düzeyinde olması, partikül popülasyonunun nispeten daha geniş bir dağılım sergilediğini ve üretim/formülasyon parametrelerindeki küçük değişimlere duyarlı olabileceğini göstermektedir. Negatif zeta potansiyeli, partiküller arasında elektrostatik itmeye bağlı olarak stabiliteye katkı sağlamakla birlikte, mutlak değerin ~15 mV bandında kalması nedeniyle bu katkının MDA-NLT'ye göre daha sınırlı olması beklenir. Bu sınırlılık zamanla partiküllerde aglomerasyon eğilimini tetikleyebileceği için PTX-NLT formülasyonlarında uzun süreli raf ömrü için planlamaların ve formülasyonların geliştirilmesi beklenmektedir.



Şekil 4.35: PTX yüklü NLT'lerin kolloidal karakterizasyonu: (a) DLS ile belirlenen partikül boyutu dağılımı, ortalama hidrodinamik partikül boyutu ve PDI grafiği, (b) zeta potansiyeli dağılımı.

4.3.5. PTX Yüklü NLT'lerin Enkapsülasyon Verimleri ve İlaç Yükleme Kapasitelerinin Belirlenmesi

Ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş Precirol/Hint Yağı temelli PTX NLT formülasyonlarına PTX'in ilaç yüklenme performansı, enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) parametreleri üzerinden değerlendirilmiştir. Bu kapsamda, PTX'in lipit fazına dahil edilmesiyle hazırlanan PTX-NLT 10, PTX-NLT 30 ve PTX-NLT 50 formülasyonlarında nanopartikül yapısında tutulan PTX miktarı belirlenerek %EE ve %DLC değerleri hesaplanmıştır. Üç tekrarlı üretilen PTX yüklü NLT'ler için, serbest PTX miktarı 12000 Da gözenek çapına sahip membran kullanılarak santrifüj ile ayrılmış ve serbest PTX miktarı HPLC ile tayin edilmiştir. Elde edilen serbest PTX verileri kullanılarak formülasyonlara ait %EE ve %DLC değerleri hesaplanmış ve sonuçlar Tablo 4.37'de özetlenmiştir.

Tablo 4.37: PTX yüklü NLT formülasyonlarının enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) sonuçları.

Formülasyon	Sıvı Lipit / Toplam Lipit (%)	%EE	%DLC
PTX-NLT 10	10	87.3 ± 2.6	3.6 ± 1.15
PTX-NLT 30	30	89.2 ± 3.4	6.8 ± 0.25
PTX-NLT 50	50	86.5 ± 4.2	8.3 ± 0.85

Genel eğilim değerlendirildiğinde, PTX-NLT 10, PTX-NLT 30 ve PTX-NLT 50 formülasyonlarında enkapsülasyon veriminin sırasıyla %87.3 ± 2.6; %89.2 ± 3.4 ve %86.5 ± 4.2 düzeylerinde gerçekleştiği görülmüştür. Aynı formülasyonlar için %DLC değerleri sırasıyla 3.6 ± 1.15; 6.8 ± 0.25 ve 8.3 ± 0.85 olarak hesaplanmış; sıvı lipit/toplam lipit oranının %10'dan %50'ye yükselmesiyle ilaç yükleme kapasitesinin artış eğiliminde olduğu belirlenmiştir. Bu değerler, incelenen sıvı lipit/toplam lipit oranı aralığında (%10, %30, %50) PTX'in lipit çekirdek içerisinde yüksek oranda tutulabildiğini ve formülasyon bileşimine bağlı değişimlerin sınırlı bir bantta seyrettiğini göstermektedir. PTX gibi yüksek hidrofobiklik gösteren etken maddelerde, sıvı lipit bileşeninin oluşturduğu daha amorf bölgelerin, PTX'in lipit çekirdek içinde çözünmüş halde bulunmasına ve yeniden kristallenme sırasında dış faza itilme eğiliminin azalmasına katkı sağlayabildiği değerlendirilmektedir. Bu nedenle, %EE ve %DLC çıktıları yalnızca sistemin taşıyabildiği toplam etken madde miktarını değil, aynı zamanda PTX'in matriks içindeki dağılım biçimini ve olası salım davranışını da dolaylı olarak yansıtmaktadır.

%EE–%DLC sonuçları, PTX salım profilleri ile birlikte ele alındığında; sıvı lipit oranının artmasıyla (Sıvı Lipit /Toplam Lipit : %10 - %50) matriks düzenliliğinin azalmasına bağlı olarak PTX'in daha erişilebilir mikro-bölgelerde konumlanmasının, daha yüksek kümülatif salım değerlerine ve/veya daha hızlı bir salım rejimine katkı sağlayabileceği değerlendirilmektedir. Buna karşın daha düşük sıvı lipit/toplam lipit oranına sahip PTX-NLT 10 formülasyonunda matriksin görece daha düzenli/kompakt bir karakter sergilemesi, PTX'in matriks içinde daha güçlü tutulmasına ve salımın daha yavaş bir karaktere kaymasına yol açabilmektedir. Dolayısıyla, formülasyon bileşimi ile hem

yükleme performansı hem de kontrollü salım davranışı arasında tutarlı bir ilişki kurulabileceği düşünülmektedir.

4.3.6. PTX yüklü NLT'ler için In Vitro Salım Çalışmaları ve Salım Kinetiklerinin Değerlendirilmesi

NLT formülasyonları ile hazırlanmış PTX salımının değerlendirilmesine yönelik olarak gerçekleştirilen in vitro çalışmalarda, serbest PTX çözeltisi ile PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 formülasyonlarından açığa çıkan PTX'e ait salım profilleri nicel olarak belirlenmiş ve bu profiller formülasyonlar arasında karşılaştırmalı biçimde analiz edilmiştir. Bu kapsamda, düşük miktarda sıvı lipit içeren PTX-NLT 10 formülasyonu ile daha yüksek miktarda sıvı lipit içeren PTX-NLT 50 formülasyonu karşılaştırılarak, sıvı lipit oranının PTX salım hızı ve salım süresi üzerindeki etkisinin ortaya konması amaçlanmıştır. Serbest PTX çözeltisi ise, diyaliz membranı üzerinden geçişin uygunluğunu ve deneylerin sink koşullarında yürütüldüğünü doğrulamak amacıyla referans grup olarak çalışmalara dahil edilmiştir (Şekil 4.36, Tablo 4.38).

Serbest PTX çözeltisine ait salım profili incelendiğinde, kümülatif salım yüzdesinin hızlı bir artış gösterdiği ve kısa süre içerisinde yüksek oranlarda PTX'in membran dışına geçtiği görülmüştür. İlk 15. dakikada kümülatif salımın yaklaşık % 12.24 düzeyine ulaştığı, 60. dakikada ise bu değerin % 32.38 'e yükseldiği belirlenmiştir. Salım süreci ilerledikçe, 300. dakikada kümülatif salımın % 76.87 düzeyine çıkarak PTX'in büyük bir kısmının salım ortamına geçtiği; 24. saatte bu oranın % 94.64 'e 48. saatte ise % 96.00 seviyesinde gerçekleştiği saptanmıştır. Bu hızlı ve neredeyse tam salım profili, diyaliz membranının PTX için yeterli geçirgenliğe sahip olduğunu ve deney koşullarında sink şartlarının sağlandığını desteklemektedir.

PTX yüklü NLT formülasyonları değerlendirildiğinde, serbest PTX çözeltisine kıyasla zamana yayılmış, başlangıçta daha düşük hızlarda seyreden ve ilerleyen dönemde plato eğilimine ulaşan kontrollü bir salım davranışı gözlenmiştir. PTX-NLT 10 formülasyonunda, 15. dakikadaki kümülatif salımın % 6.92 düzeyinde kaldığı, 60. dakikada ise salımın yalnızca % 19.79 'a ulaştığı görülmüştür. Salım süreci ilerledikçe, 300. dakikada elde edilen kümülatif salımın % 51.10 olduğu; 24. ve 48. saatlerde ise bu değerin sırasıyla % 52.56 ve % 53.31 seviyelerine yükselerek dengeye ulaştığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, PTX'in lipit matriksi içerisinde daha uzun süre tutulduğunu ve matriksten difüzyonun serbest çözelti formuna kıyasla belirgin şekilde yavaşladığını düşündürmektedir.

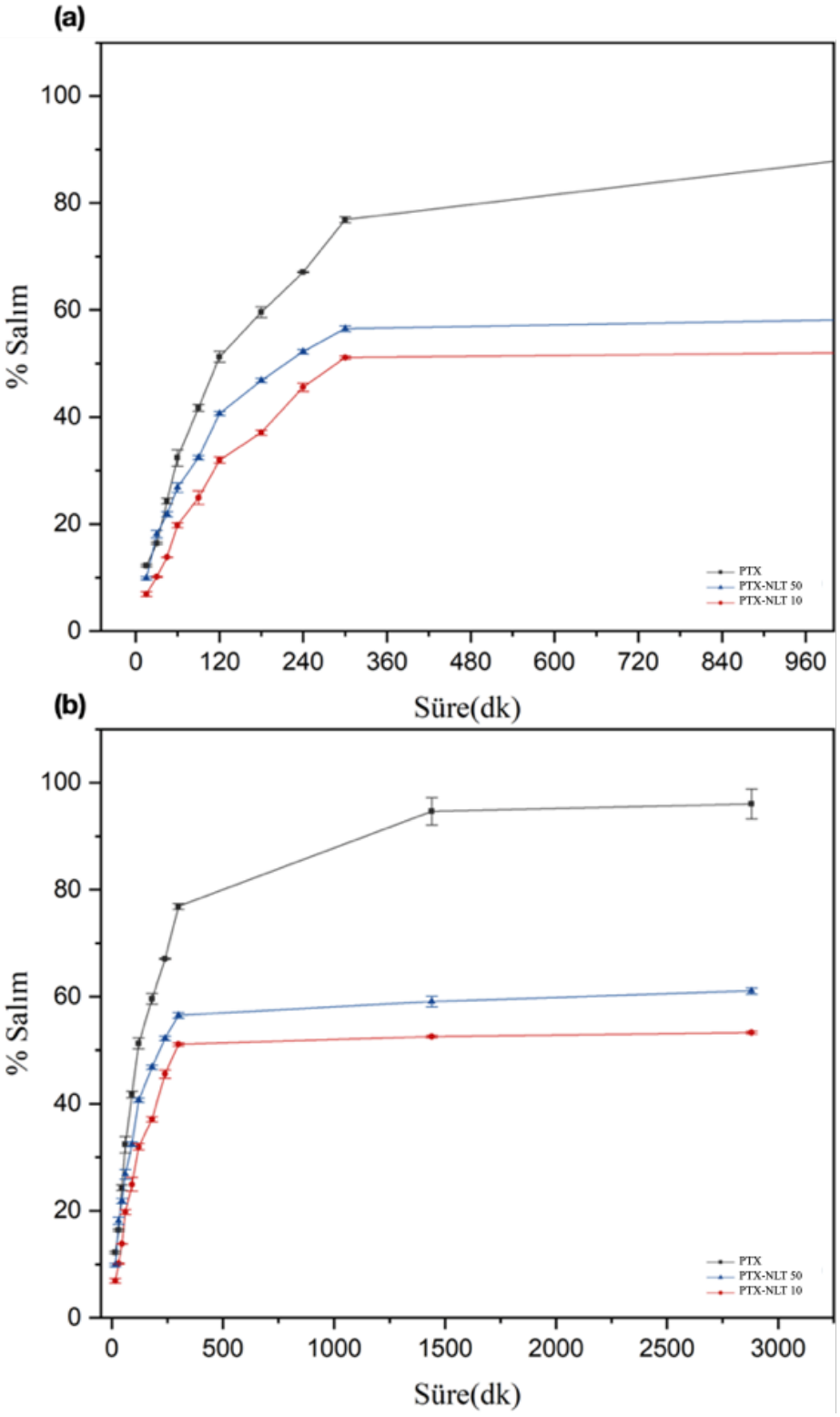
Daha yüksek miktarda sıvı lipit içeren PTX-NLT 50 formülasyonunda ise, çalışılan tüm zaman noktalarında PTX-NLT 10'a kıyasla daha yüksek kümülatif salım yüzdelerine ulaşıldığı görülmüştür. Deney başlangıcında 15. dakikadaki kümülatif salımın %9.88 düzeyinde olduğu, 60. dakikada ise bu değerin %26.83 'e yükseldiği belirlenmiştir. 300. dakikada kümülatif salımın % 56.52 düzeyine ulaştığı; 24. ve 48. saatlerde ise sırasıyla %59.12 ve %61.07 seviyelerinde seyrettiği ve plato seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Elde edilen veriler, PTX-NLT 50 formülasyonunun serbest PTX çözeltisine göre daha yavaş, PTX-NLT 10'a göre ise daha hızlı bir salım profili sunduğunu ve salımın zaman içinde kademeli olarak denge değerine ulaştığını göstermektedir. Bu gözlemler, formülasyonda sıvı lipit oranının artırılmasının lipit matriksin kristal düzenini bozarak PTX'in difüzyonunu kolaylaştırdığını ve genel salım hızını yükselttiğini düşündürmektedir.

Literatürde PTX yüklü NLT sistemlerine ilişkin salım çalışmaları incelendiğinde, Capryol 90 veya oleik asit içeren PTX-NLT formülasyonlarında gerçekleştirilen salım çalışmalarında, Taxol® ile karşılaştırıldığında PTX'in lipit çekirdek içinde tutulmasına bağlı olarak daha yavaş ve zamana bağlı bir salım profili elde ettiklerini; salımın difüzyon kontrollü olduğunu bildirmişlerdir. Bu konuda yapılan bir başka çalışmada ise, farklı oranlarda oleik asit içeren stearik asit bazlı PTX-NLT'lerde serbest PTX'e kıyasla iki fazlı bir salım profili gözlenmiş; oleik asit oranı arttıkça ilk saatlerdeki kümülatif salımın ve toplam salım miktarının anlamlı biçimde yükseldiği gösterilerek, sıvı lipit içeriğinin PTX salım hızını belirgin şekilde modüle ettiği ortaya konmuştur [294,295].

Gerçekleştirilen salım deneylerine yapılan iki yönlü ANOVA, hem zamanın hem de formülasyon tipinin PTX salımı üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkiye sahip olduğunu ve bu iki faktör arasında anlamlı etkileşim bulunduğunu ortaya koymuştur ($p<0.05$). PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 formülasyonları karşılaştırıldığında, tüm zaman noktalarında PTX-NLT 50'nin PTX-NLT 10'a kıyasla anlamlı derecede daha yüksek salım sağladığı belirlenmiştir ($p<0.05$). Bu bulgular, NLT yapısının PTX için belirgin bir kontrollü salım profili oluşturduğunu ve formülasyondaki sıvı lipit oranının artırılmasının PTX salım hızını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yükselttiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 4.38: PTX yüklü NLT formülasyonlarının in vitro salım profili, zamana bağlı PTX salım verileri.

Zaman (dk)	PTX	PTX-NLT 10 (%10 Sıvı Lipit/Toplam Lipit)	PTX-NLT 50 (%50 Sıvı Lipit/Toplam Lipit)
15	12.24 ± 0.20	6.92 ± 0.43	9.88 ± 0.27
30	16.40 ± 0.22	10.14 ± 0.08	18.13 ± 0.69
45	24.32 ± 0.55	13.81 ± 0.05	21.84 ± 0.49
60	32.38 ± 1.52	19.79 ± 0.48	26.83 ± 0.89
90	41.71 ± 0.61	24.94 ± 1.28	32.42 ± 0.42
120	51.27 ± 1.04	31.98 ± 0.60	40.65 ± 0.36
180	59.57 ± 1.00	37.11 ± 0.47	46.85 ± 0.38
240	67.09 ± 0.08	45.57 ± 0.78	52.23 ± 0.41
300	76.87 ± 0.54	51.10 ± 0.29	56.52 ± 0.52
1440	94.64 ± 2.54	52.56 ± 0.24	59.12 ± 1.00
2880	96.00 ± 2.80	53.31 ± 0.25	61.07 ± 0.60



Şekil 4.36: Serbest PTX ve PTX yüklü NLT formülasyonlarının (PTX-NLT 50 ve PTX-NLT 10) in vitro kümülatif salım profilleri: (a) 0–960 dk aralığındaki % salım davranışı, (b) 0–3000 dk aralığındaki % salım davranışı.

PTX salımının kinetiğini daha ayrıntılı olarak incelemek amacıyla, PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 formülasyonlarından elde edilen kümülatif salım verileri sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi, Hixson–Crowell ve Korsmeyer–Peppas modellerine göre analiz edilmiş; bu analizler sonucunda hesaplanan hız sabitleri (k) ve korelasyon katsayıları (R^2) Tablo 4.39'da özetlenmiştir. Her iki formülasyon için de sıfırıncı derece modeline ait R^2 değerlerinin 0.324 (PTX-NLT 10), 0.332 (PTX-NLT 50) olduğu, birinci derece model için ise bu değerlerin sırasıyla 0.652 (PTX-NLT 10) ve 0.698 (PTX-NLT 50) olduğu belirlenmiştir. Higuchi ve Hixson–Crowell modelleri incelendiğinde, R^2 değerlerinin sırasıyla 0.536 ve 0.563 olduğu ve bu modellerin incelenen formülasyonların salım davranışını tam olarak açıklayamadığı kanaatine varılmıştır. Buna karşılık, Korsmeyer–Peppas modeline ait R^2 değerlerinin PTX-NLT 10 için 0.996, PTX-NLT 50 için ise 0.978 olarak hesaplanması, bu modelin her iki formülasyon için de salım profilini en iyi açıklayan model olduğunu ortaya koymaktadır.

Korsmeyer–Peppas modeline göre elde edilen hız sabitleri ve n değerleri incelendiğinde, k_{KP} değerlerinin PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 formülasyonları için sırasıyla 0.014 ve 0.019 olduğu, n değerlerinin ise 0.778 ve 0.743 olarak 0.5–1 aralığında yer aldığı görülmüştür. Literatürde bu aralığa karşılık gelen n değerleri, polimerik veya lipit matriksli sistemlerde non-Fickian taşıma davranışı ile ilişkilendirilmekte; difüzyon temelli kütle transferine ek olarak matrisin şişme, gevşeme veya erozyon süreçlerinin de salım mekanizmasına katkıda bulunduğu kabul edilmektedir. Bu bağlamda, PTX yüklü NLT formülasyonlarında PTX salımının yalnızca pasif difüzyonla sınırlı olmadığı, lipit matriksin zamanla yeniden düzenlenmesi ve kısmi yapısal gevşemenin de salım kinetiğini etkileyen önemli basamaklar olduğu düşünülmektedir.

Genel olarak değerlendirildiğinde, PTX'in NLT yapıları içerisinde enkapsülasyonu ile serbest çözelti formuna kıyasla zamana yayılmış, kontrollü ve formülasyon bileşimine duyarlı bir salım profili elde edildiği söylenebilmektedir. Özellikle NLT formülasyonlarında daha fazla miktarda sıvı lipit dolayısıyla amorf düzendeki artış, PTX-NLT 10'a göre daha hızlı ancak hâlâ kontrollü nitelikte bir salım sağlayarak, daha yüksek miktarlarda salım yapılmasına olanak tanıyabilmesi açısından avantaj sunmaktadır. Bu yönleriyle PTX yüklü NLT sistemlerinin, PTX'in konvansiyonel dozaj formlarına kıyasla daha dengeli ve ayarlanabilir bir in vitro salım profili sunan potansiyel ilaç taşıyıcı platformlar olarak değerlendirilebileceği düşünülmektedir.

Tablo 4.39: PTX-NLT 10 ve PTX-NLT 50 Formülasyonlarının In Vitro Salım Verilerinin Kinetik Modeller ile Uyum Analizi (k, n ve R^2 Değerleri).

Kinetik Model	**Model Denklemi**	**PTX-NLT 10**	**PTX-NLT 50**
Sıfırıncı Derece	$M_t = M_0 + k_0 \cdot t$	k_0 = 0.013 R^2 = 0.324	k_0 = 0.013 R^2 = 0.332
Birinci Derece	$\frac{dMt}{dt} = k_1 \cdot (M_\infty - M_t)$	k_1 = 0.002 R^2 = 0.652	k_1 = 0.002 R^2 = 0.698
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_H \cdot t^{\frac{1}{2}}$	k_H= 0.910 R^2 = 0.536	k_H = 0.930 R^2 = 0.544
Hixson – Crowell	$M_\infty^{\frac{1}{3}} - (M_\infty - M_t)^{\frac{1}{3}} = k_{HC} \cdot t$	k_{HC} = 0.002 R^2 = 0.539	k_{HC} = 0.002 R^2 = 0.563
Korsmeyer – Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_{KP} \cdot t^n$	k_{KP} = 0.014 n = 0.778 R^2 = 0.996	k_{KP} = 0.019 n = 0.743 R^2 = 0.978

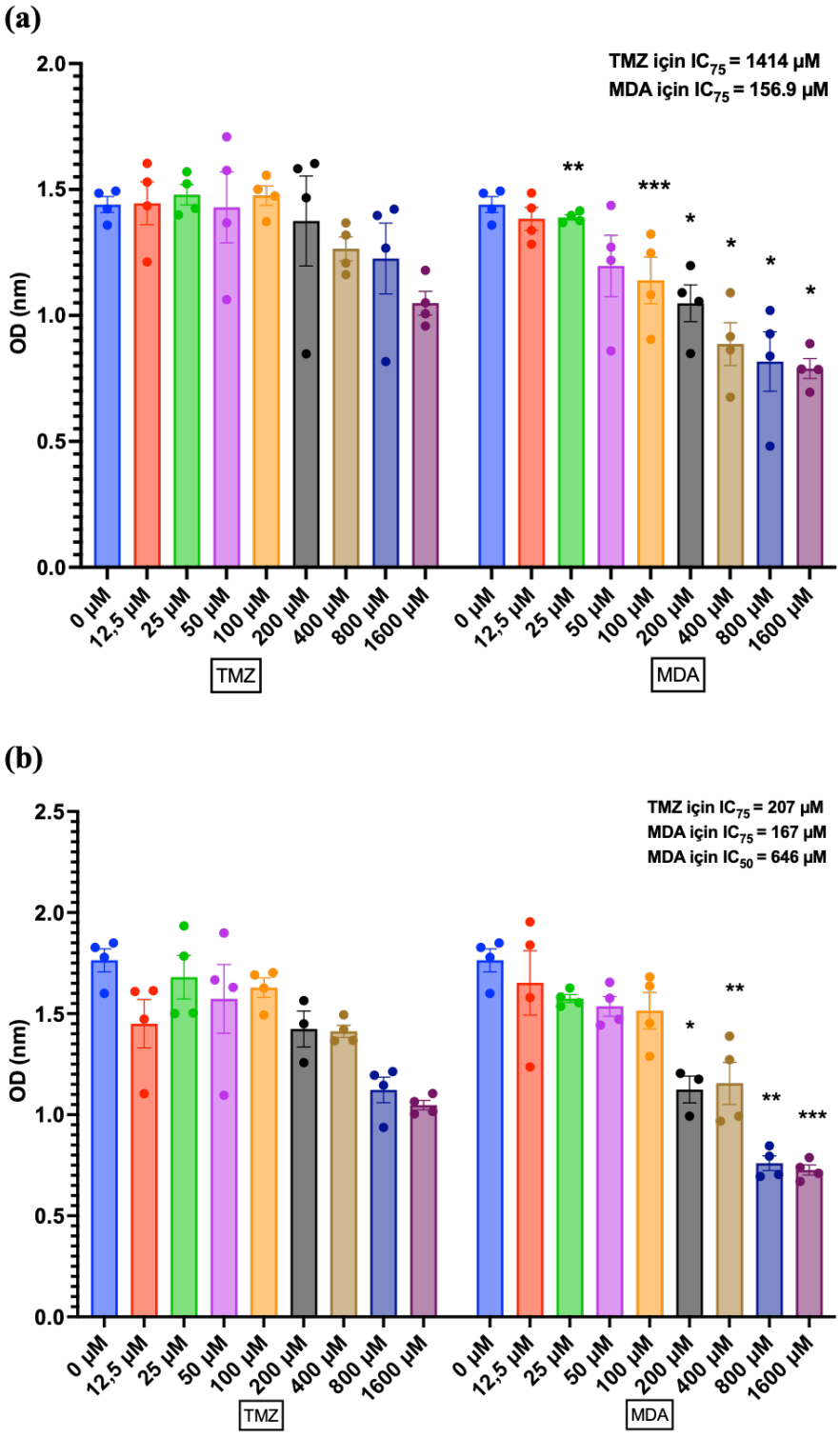
4.4. ETKEN MALZEME YÜKLÜ NLT'LERİN IN VITRO HÜCRE KÜLTÜR ÇALIŞAMALARI

4.4.1. Optimize MDA yüklü NLT'ler için In Vitro Hücre Çalışmaları

4.4.1.1. TMZ ve MDA'nın T98G Hücreleri Üzerinde Sitotoksisite Açısından Kıyaslanması

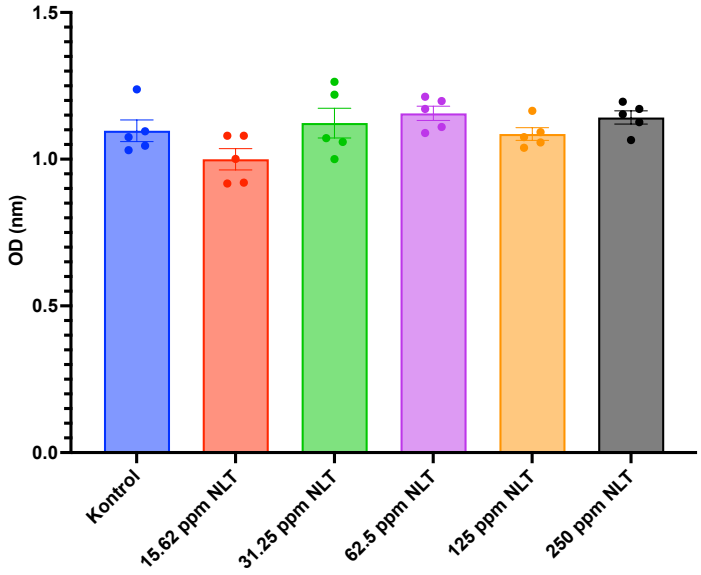
Tez çalışmasında gerçekleştirilen analizlere MTT analizlerine göre; 0µM (Kontrol), 12.5µM, 25µM, 50µM, 100µM, 200µM, 400µM, 800µM ve 1600µM dozlarda TMZ hem de MDA için 24 saat ve 48 saatlik sürelerde sitotoksik etkileri incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre hem TMZ hem de MDA için her iki saat diliminde de doz bağlı olarak T98G hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerin arttığı görülmüştür. 24 saat sonunda TMZ için IC75 değeri 1414uM olarak belirlenirken, MDA için IC_{75} değeri anlamlı bir şekilde düşerek 156.9µM olarak bulunmuştur. Ancak IC_{50} değeri deney koşullarında uygulanan 1600µM sitotoksik değerinin %50 den düşük sınırlı kaldığı için hesaplanamamıştır. 24 saat sonunda MDA ve TMZ'nin eşlenik dozları birbirleri arasında kıyaslandığına istatistiksel olarak farklılık gözlemlenmemiştir. Buna göre sırasıyla 25mM, 100µM, 200µM,400µM, 800µM ve 1600µM MDA dozları için eşdeğer TMZ dozlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma görülmüştür (sırasıyla $p < 0.01$, $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$ ve $p < 0.05$) (Şekil 4.37, (a)).

48 saat sonunda TMZ için IC_{75} değeri 207µM olarak belirlenmiş, MDA için IC_{75} değeri 167 µM olarak IC_{50} değeri 646 µM olarak bulunmuştur. 48 saat sonunda MDA ve TMZ'nin eşlenik dozları birbirleri arasında kıyaslandığına sırasıyla 200µM,400µM, 800µM ve 1600µM MDA dozları için eşdeğer TMZ dozlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalma görülmüştür (sırasıyla $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.01$, $p < 0.001$) (Şekil 4.37, (b)). Bu verilere göre sentezlenecek olan NLT formülasyonlarında hem 24 hem de 48 saat IC_{75} ve IC_{50} değerleri göz önünde bulundurularak kullanılacak MDA dozunun 250 µM olarak belirlenmiştir.



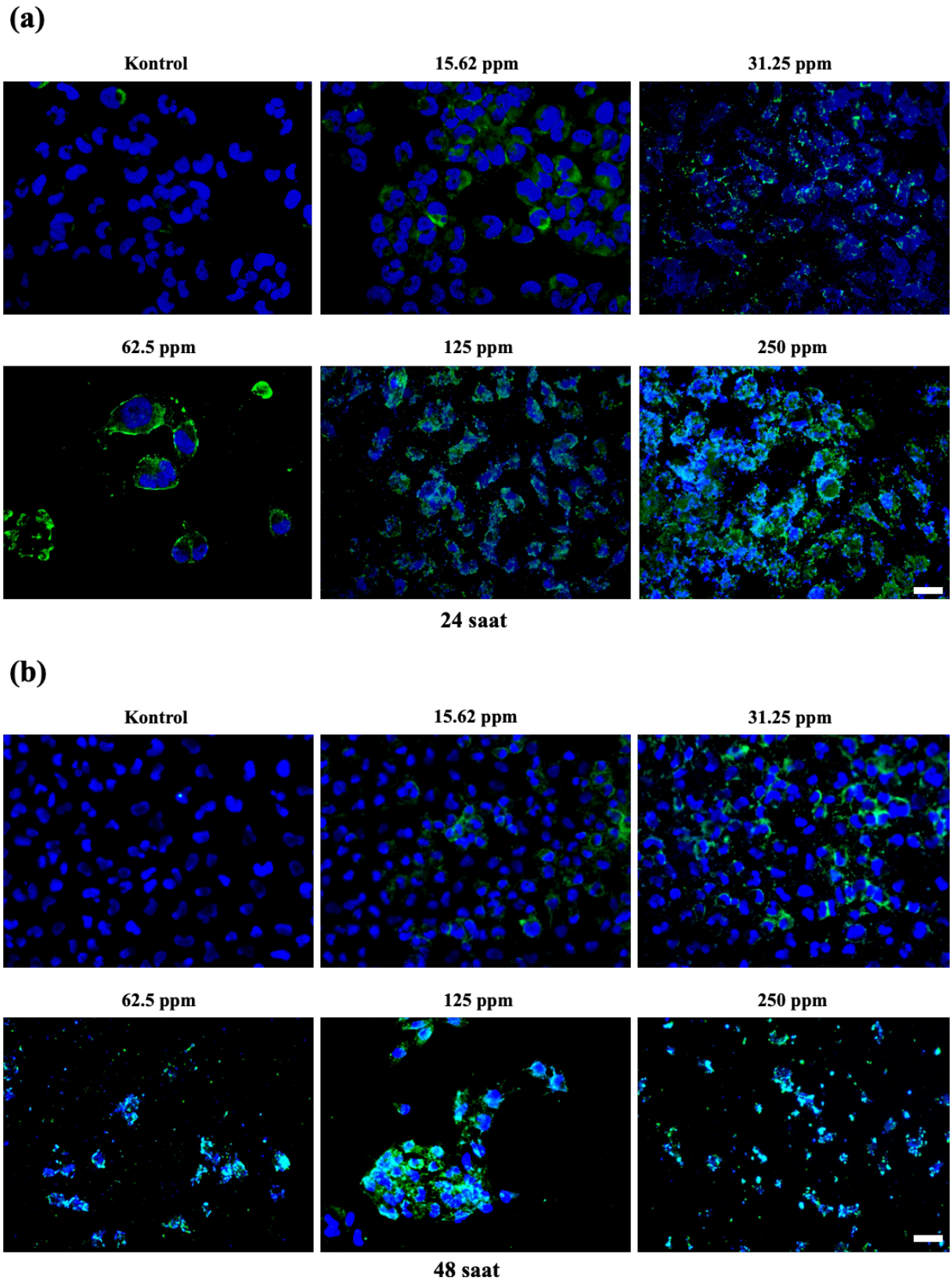
Şekil 4.37: MTT analizlerine göre 0 µM, 12.5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 800 µM ve 1600 µM dozlarındaki TMZ ve MDA'nın T98G hücreleri üzerinde sitotoksisite açısından kıyaslanması, 24 saat (a) ve 48 saat (b) sonunda, ilgili dozların TMZ ve MDA için IC75 hesaplanması ve istatistiksel olarak değerlendirilmesi. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 eşlenik dozlara kıyasla.

4.4.1.2. NLT Formülasyonun T98G Hücreleri Üzerinde Olası Sitotoksik Etkilerinin Değerlendirilmesi ve Hücre Alım Analizleri



Şekil 4.38: 0 (Kontrol) ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250ppm konsantrasyonlarda sentezlenen optimize NLT'lerin T98G hücreleri üzerinde sitotoksik etkisinin MTT analizleri ile gösterilmesi.

Tez kapsamında sentezlenen optimize NLT'lerin olası sitotoksik etkilerinin incelenebilmesi ve tez çalışmasında güvenli bir doz aralığının seçilebilesi için 0 (Kontrol)ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250ppm konsantrasyonlarda boş NLT'ler 48 saat süresinde T98G hücrelerinde maruz bırakılmıştır. MTT analizlerine göre hücre canlılıkları incelendiğinde ilgili dozlar için 48 saat sonunda hücre canlılıkları sırayısla; %100, %91.12, %102.37, %105.4, %98.96 ve %104.12 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ve MDA için yapılan MTT çalışmalarına göre T98G hücreleri için optimum MDA dozu ile birlikte boş nanopartikülün sitotoksik göstermediği konsantrasyonlar için 62.5 ppm konsantrasyonlarda MDA yüklü NLT'lerin kullanılmasına karar verilmiştir (Şekil 4.38).

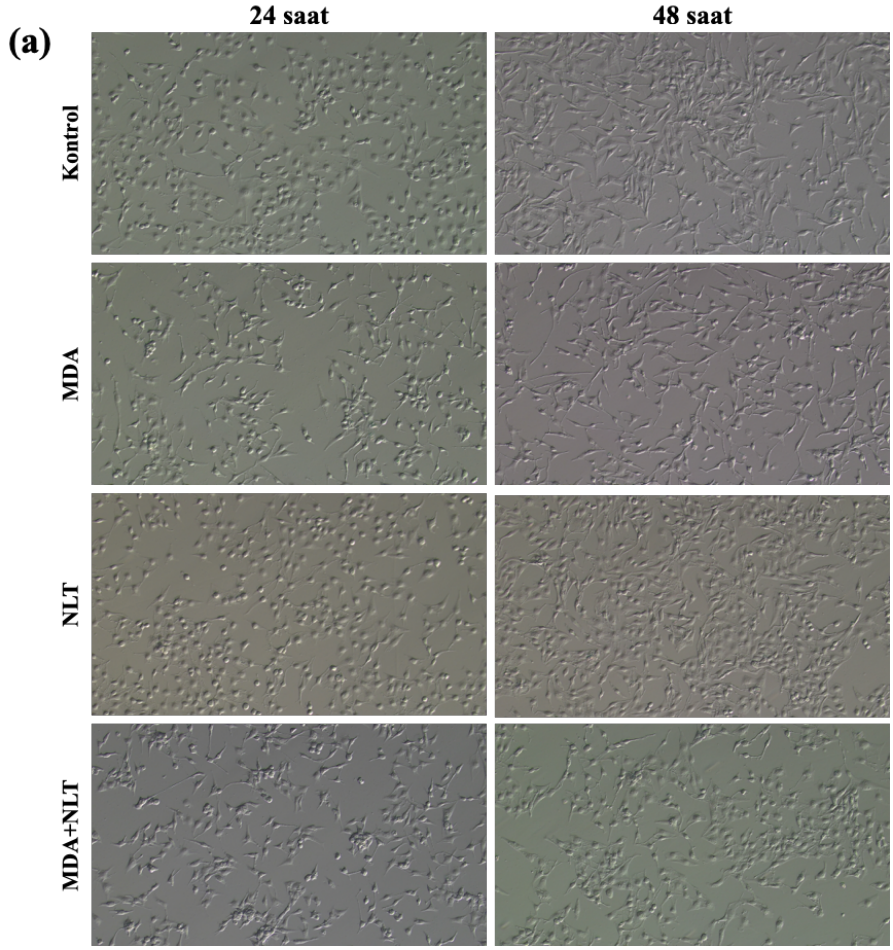


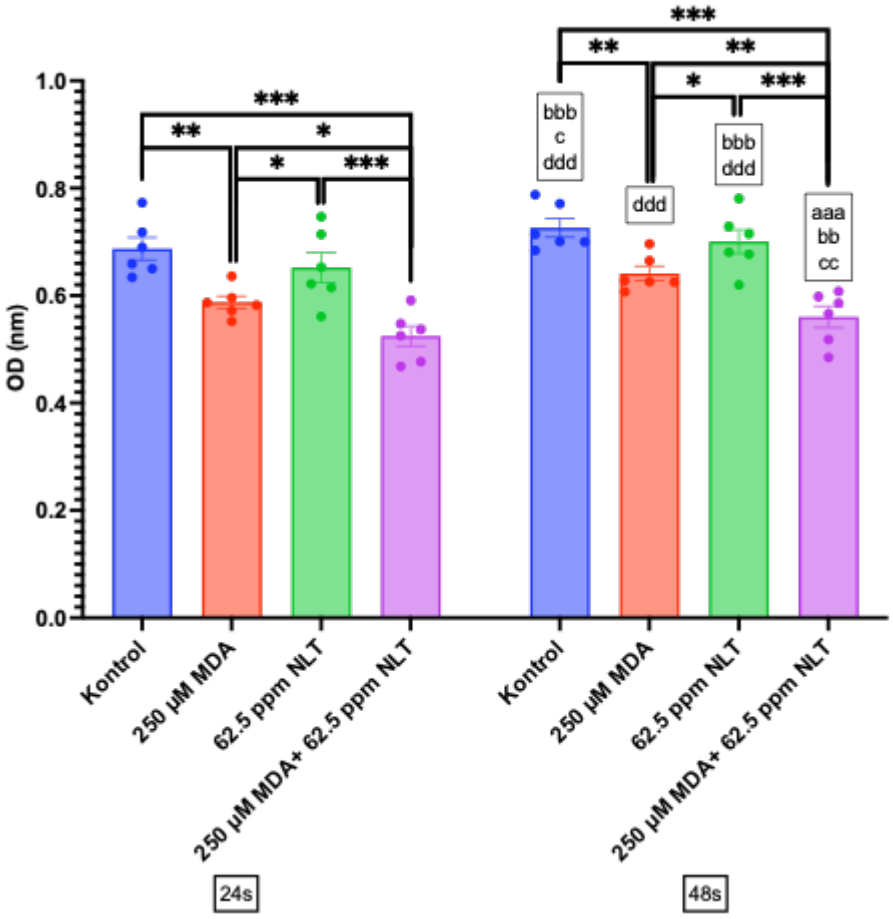
Şekil 4.39: Sentezlenen 0 (Kontrol) ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250 ppm konsantrasyonlarda Coumarin-6 ile işaretlenmiş NLT'lerin T98G hücreleri içerisine alımlarının floresan

mikroskobu ile incelenmesi. Hücre nükleusları DAPI ile mavi renk işaretlenmiştir. NLT'ler Coumarin-6 dolayısıyla yeşil renk ile işaretlenmiştir. Ölçüm barı: 20 μm.

İlaç taşımını için sentezlene NLT'lerin T98G hücrelerin içerisine alımının kanıtlanabilmesi için 0(Kontrol)ppm, 15.56ppm, 31.25ppm, 62.5ppm, 125ppm ve 250ppm konsantrasyonlarda Coumarin-6 ile işaretlenmiş NLT'ler hücrelere 24 ve 48 saatlik sürelerde uygulandıktan sonra floresan mikroskop altında görüntülenmiştir. Buna göre Kontrol gruplarında beklendiği üzere herhangi bir ışıma görülmezken doza bağlı olarak her iki süre sonunda da hücre sitoplazmalarında artan oranda ışıma görülmüştür. Böylece NLT'lerin hücre içerisine 24 ve 48 saatte alındığı kanıtlanmıştır (Şekil 4.39).

4.4.1.3. MDA Yüklü NLT'lerin T98G Hücreleri Üzerinde Sitotoksisite Açısından Kıyaslanması





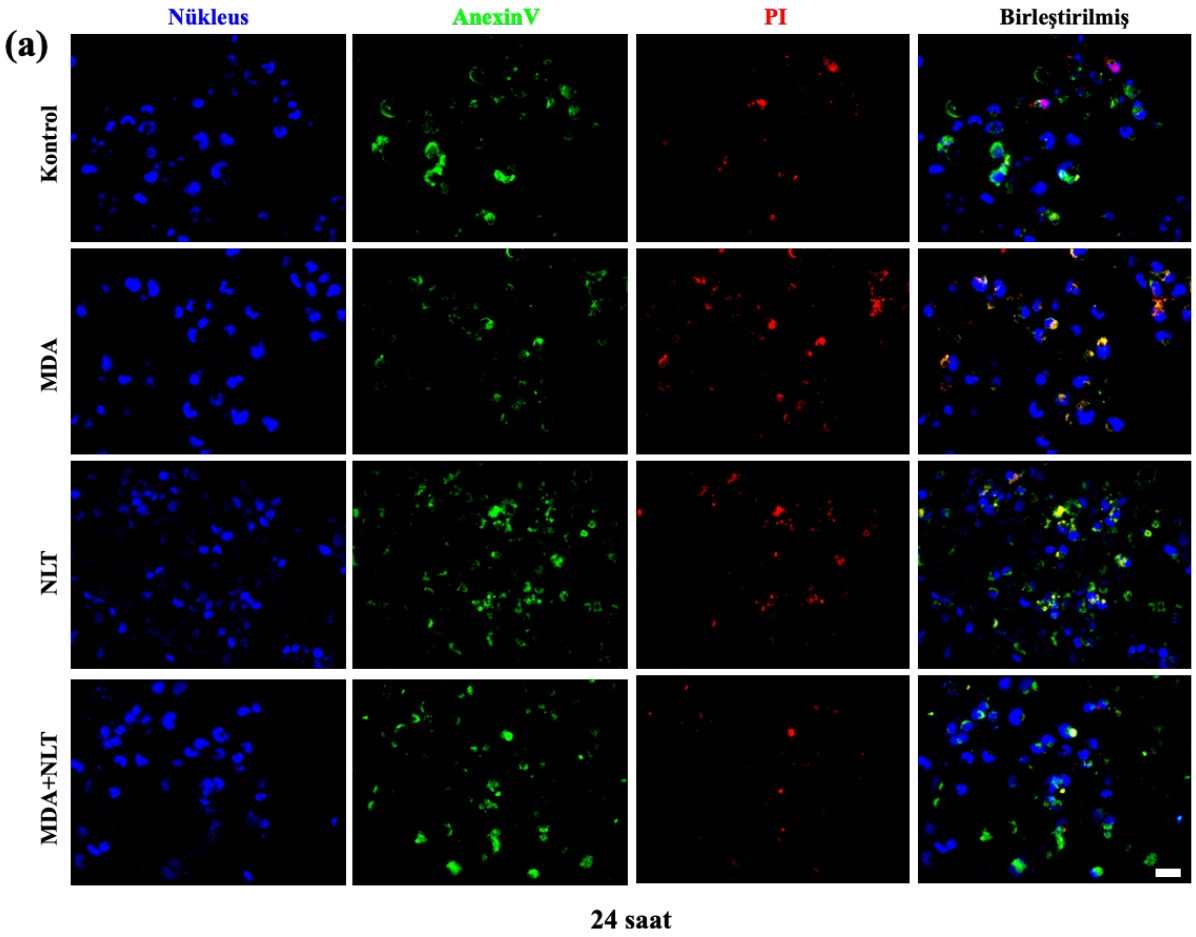
Şekil 4.40: Kurgulanan Kontrol, 250µM MDA 62.5 ppm NLT ve 250µM MDA yüklü NLT (250µM MDA+62.5ppm NLT) deney gruplarının 24 ve 48 saat sonunda invert mikroskop ile çekilmiş temsili mikrografları (a), ilgili grupların 24 ve 48 saatleri sonunda MTT analizleri ile kıyaslanması (b). *p<0.05, **p<0.01 ***p<0.001; ^{aaa}p<0.001 24s Kontrol grubuna kıyasla, ^{bb}p < 0.01, ^{bbb}p < 0.001 24s 250 µM MDA grubuna kıyasla, ^{c}p<0.05, ^{cc}p<0.01 62.5 ppm NLT grubuna kıyasla, ^{ddd}p<0.001 250 µM MDA+62.5 ppm NLT grubuna kıyasla.

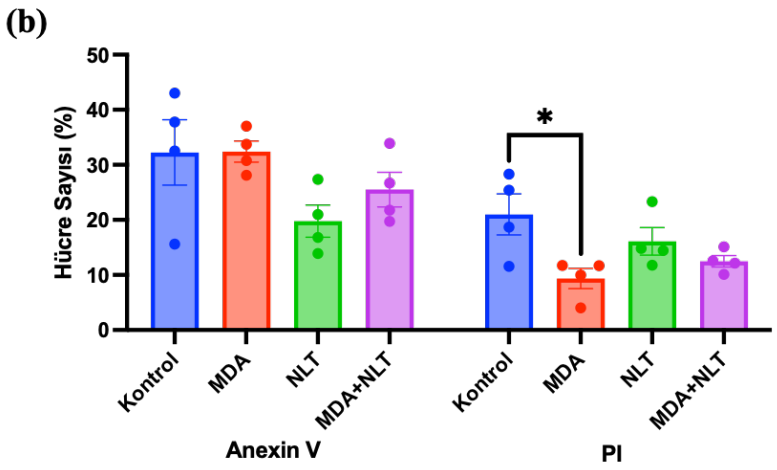
Belirlenmiş MDA dozu ve NLT konsantrasyonu göz önünde bulundurularak (4.3.1.MDA Yüklü NLT'lerin Karakterizasyonları) T98G hücreleri için Kontrol, 250µM MDA 62.5 ppm NLT ve MDA yüklü NLT (250µM MDA+62.5ppm NLT) grupları kurgulanmıştır. 24 ve 48 saatlik MDA-NLT formülasyonları uygulandıktan sonra hücreler öncelikle mikroskop altında incelenmiştir (Şekil 4.40, (a)). Bu bulgulara göre 24 ve 48 saat sonunda MDA ve MDA yüklü NLT gruplarında belirgin morfolojik farklılıklar ile beraber besiyerinde yüzen hücrelerin sayısında artış belirlenmiştir. Bu nedenle grupların sitotoksisitesi bakımından değerlendirilebilmesi için MTT analizleri yapılmıştır. Buna göre 24 ve 48 saat sonunda benzer sitotoksik bulgular elde edilmiştir. İlgili süreler sonunda 250µM MDA'nın (sırasıyla %85.48 ve %88.27) Kontrol ve NLT gruplarına kıyasla (24s için sırasıyla %100 ve %94.86, 48s için sırasıyla %100 ve %96.44) hücre sayısını istatistiksel açıdan anlamlı olarak azalttığı gözlemlenmiştir (24s için sırasıyla p=0.001 ve p=0.025 ve 48s için sırasıyla p<0.001 ve

p=0.039). İlgili süreler sonunda 250µM MDA yüklü NLT'lerin ise (sırasıyla %76.29 ve % 77.12) hücre sayılarını Kontrol, MDA ve NLT gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde azaldığı belirlenmiştir (24 saat için sırasıyla $p < 0.001$, $p=0.028$ ve $p<0.001$ ve 48 saat için sırasıyla $p<0.001$, $p=0.006$ ve $p<0.001$). Bunun yanı sıra NLT gruplarının daha önce yapılan MTT analizlerini doğrular şekilde Kontrol gruplarına kıyasla sitotoksik olarak hücrelere herhangi bir etkisi olmadığı doğrulanmıştır (Şekil 4.40, (b)).

4.4.1.4. İmmünositokimya Yöntemi ile T98G Hücrelerinde Hücre Ölüm Yolaklarının Araştırılması

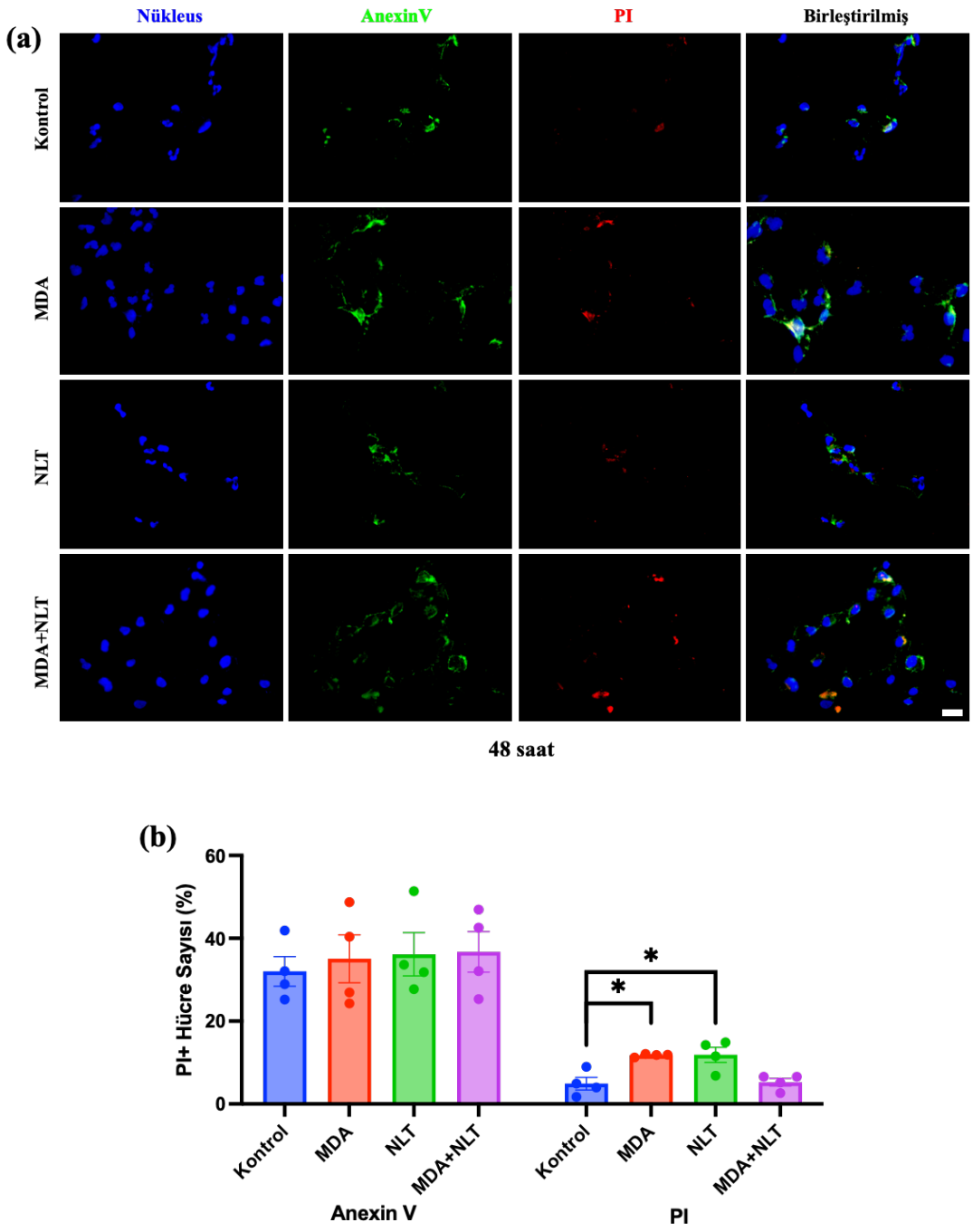
Tez kapsamında yapılan çalışmalarda immünositokimya yöntemi ile hücre içi protein ekspresyonlarının yüksek özgüllükle görüntüleme olanağı sunarak apopitoz, nekroz, otofaji, ferroptoz, piroptoz ve nekroptoz gibi farklı ölüm mekanizmalarını, sentezlenmiş MDA yüklü NLT formülasyonlarının histolojik olarak değerlendirilmesi gerçekleştirilmiştir.





Şekil 4.41. Hücrelerde ekprese edilen Anexin V+ ve PI+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05. PI:propidyum iyodür. Ölçüm barı: 20 µM

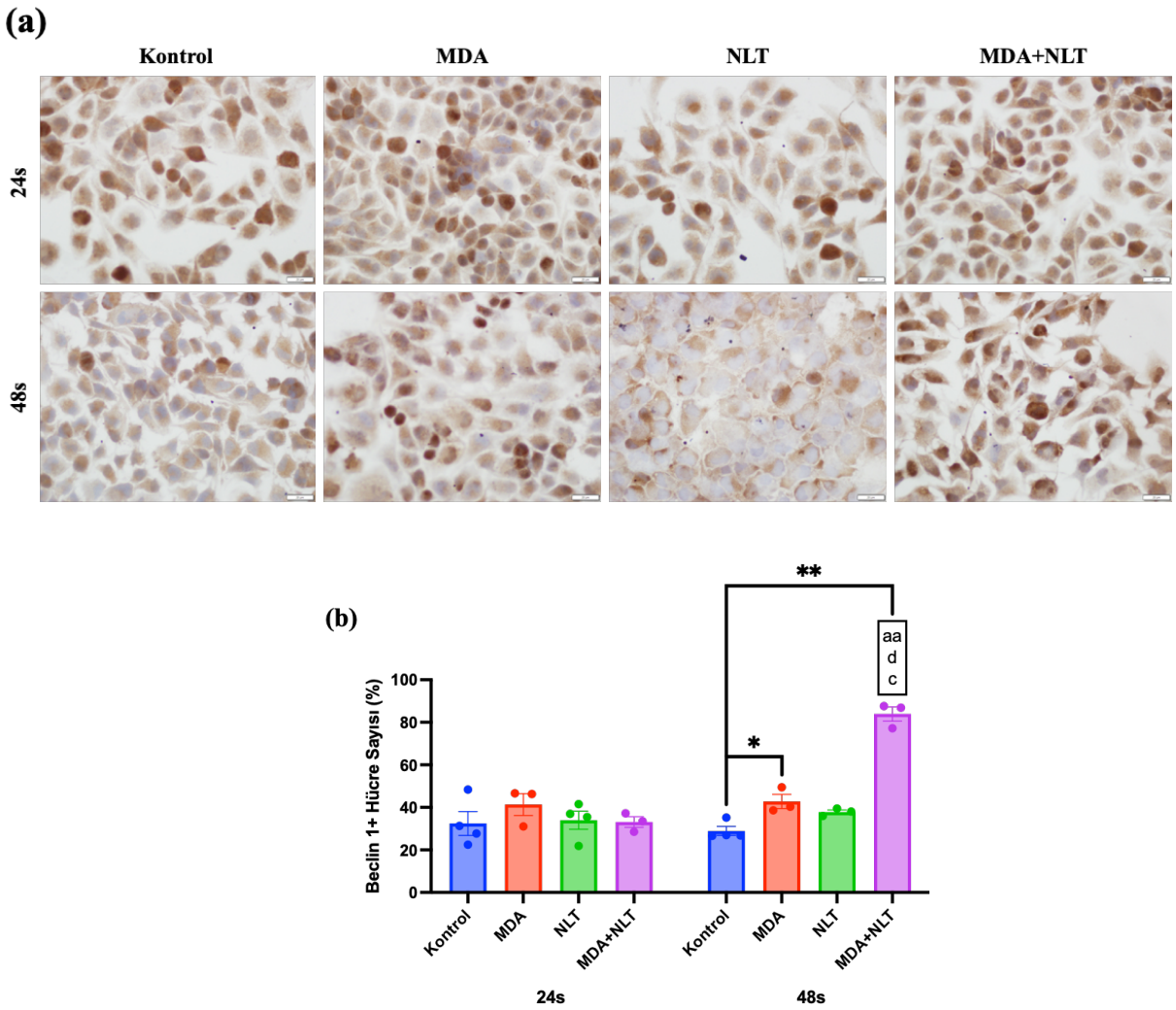
24 saat sonunda Anexin V+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 32.24 ± 11.88, MDA grubunda 32.40 ± 3.83, NLT grubunda 19.77 ± 5.84 ve MDA-NLT grubunda 25.52 ± 6.3 olarak bulunmuştur. 24 saat sonunda PI+ hücre yüzdesi ise; Kontrol grubunda 26.32 ± 8.77, MDA grubunda 8.96 ± 4.91, NLT grubunda 18.06 ± 8.97 ve MDA-NLT grubunda 19.01 ± 7.29 olarak belirlenmiştir. MDA grubunun Kontrol grubuna göre PI hücre yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük olduğu görülmüştür (p=0.026) (Şekil 4.41).



Şekil 4.42: İmmünofloresan yöntemi Hücrelerde ekprese edilen Anexin V+ ve PI+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05. PI: propidyum iyodür. Ölçüm barı: 20 µM.

48 saat sonunda Anexin V+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 32.02 ± 7.15, MDA grubunda 35.06 ± 11.51, NLT grubunda 36.15 ± 10.46 ve MDA-NLT grubunda 36.71 ± 9.83 olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda PI+ hücre yüzdesi ise; Kontrol grubunda 4.90 ± 3.02, MDA grubunda 11.76 ± 0.37, NLT grubunda 11.87 ± 3.65 ve MDA-NLT grubunda 5.25 ± 1.87 olarak bulunmuştur.

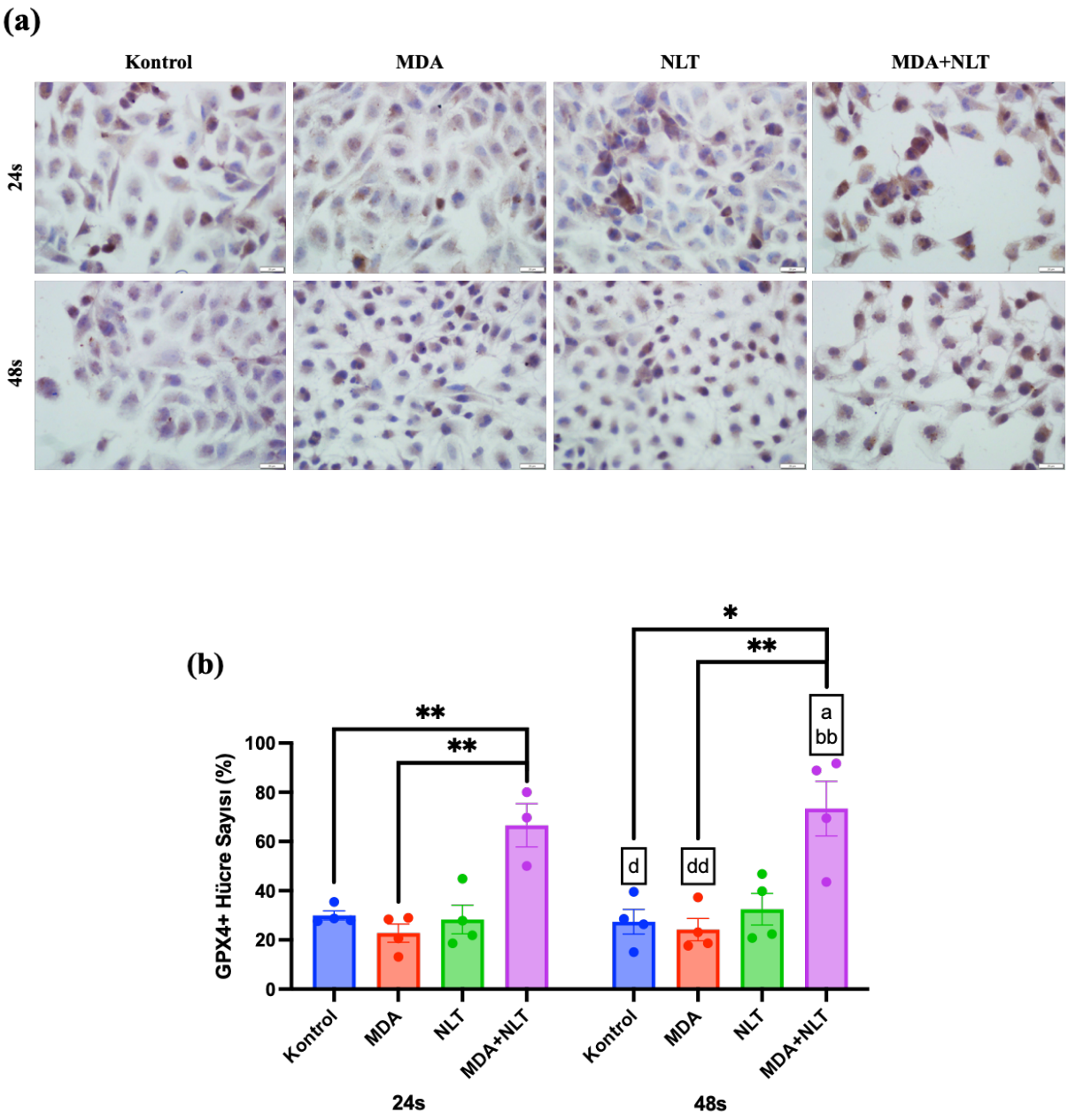
PI+ hücre yüzdesinin MDA ve NLT gruplarında Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla, p=0.042 ve p=0.038) (Şekil 4.42).



Şekil 4.43: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen Beclin 1+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; ^{aa}p<0.01 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, ^{c}p<0.05 24 saat NLT grubuna kıyasla, ^{d}p<0.05 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM.

Gruplar için 24 saat sonunda Beclin-1+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 32.45 ± 11.25, MDA grubunda 41.34 ± 8.88, NLT grubunda 33.97 ± 8.46 ve MDA-NLT grubunda 33.09 ± 4.34 olarak bulunmuştur. 48 saat sonunda Beclin-1+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 28.91 ± 4.19, MDA grubunda 42.79 ± 5.82, NLT grubunda 37.79 ± 1.77 ve MDA-NLT grubunda 83.92 ± 5.80 olarak belirlenmiştir. MDA grubunda Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artış görülmüştür (p = 0.019). Ayrıca MDA-NLT grubunun hücre yüzdesinin Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak

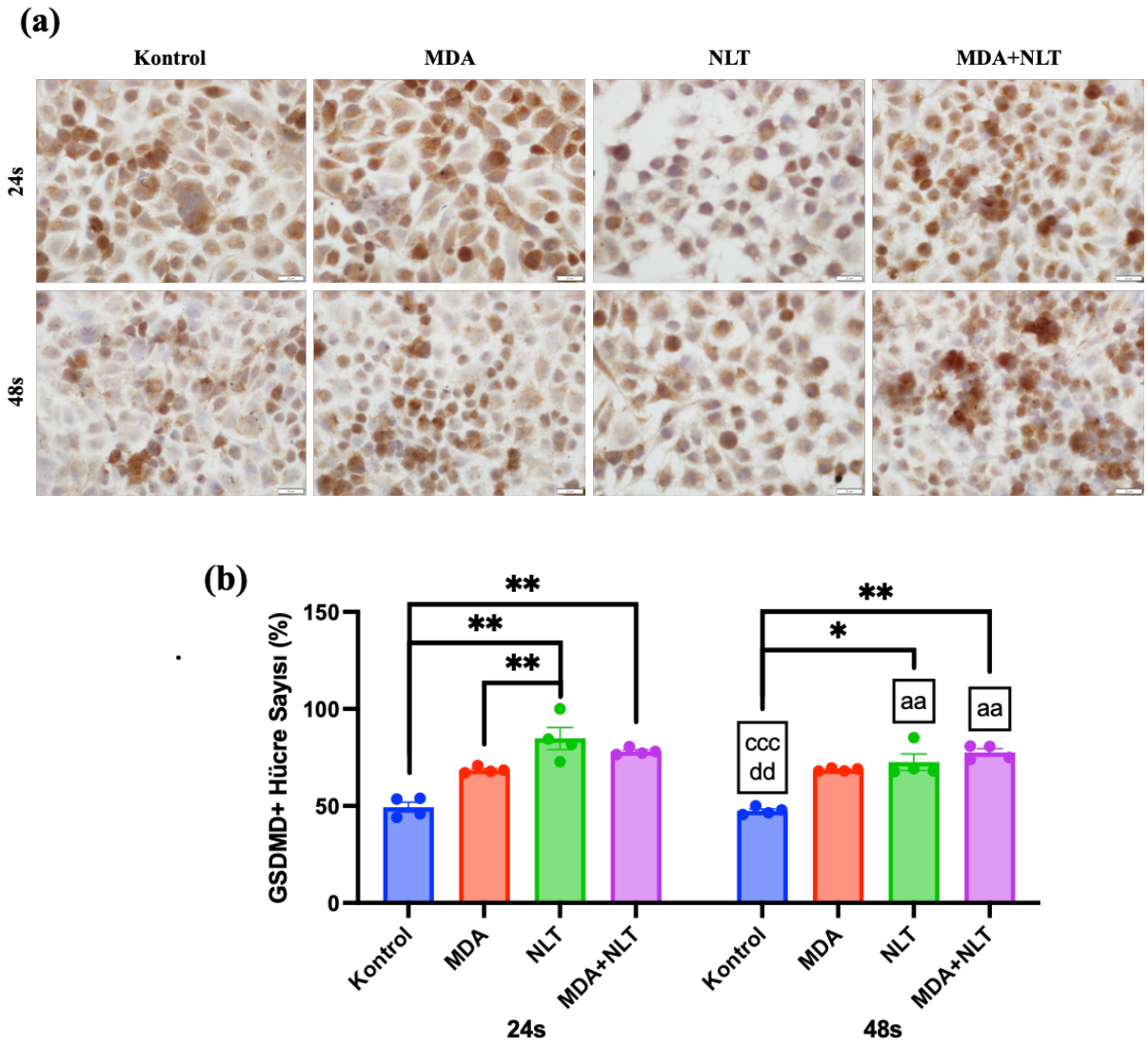
anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (p =0.01). MDA-NLT grubunda 48. saatte Beclin-1+ hücre yüzdesi 24 saatlik değere kıyasla anlamlı artış göstermiştir (p= 0.018) (Şekil 4.43).



Şekil 4.44: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GPX4+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; [a]p<0.05 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, [bb]p<0.01 24 saat MDA grubuna kıyasla, [d]p<0.05 ve [dd]p<0.01 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM

Gruplar için 24 saat sonunda GPX4+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 29.94 ± 3.70, MDA grubunda 22.76 ± 7.45, NLT grubunda 28.29 ± 11.71 ve MDA-NLT grubunda 66.57 ± 15.24 olarak bulunmuştur. 24 saat sonunda MDA-NLT grubunun GPX4+ hücre yüzdesinin hem Kontrol grubuna

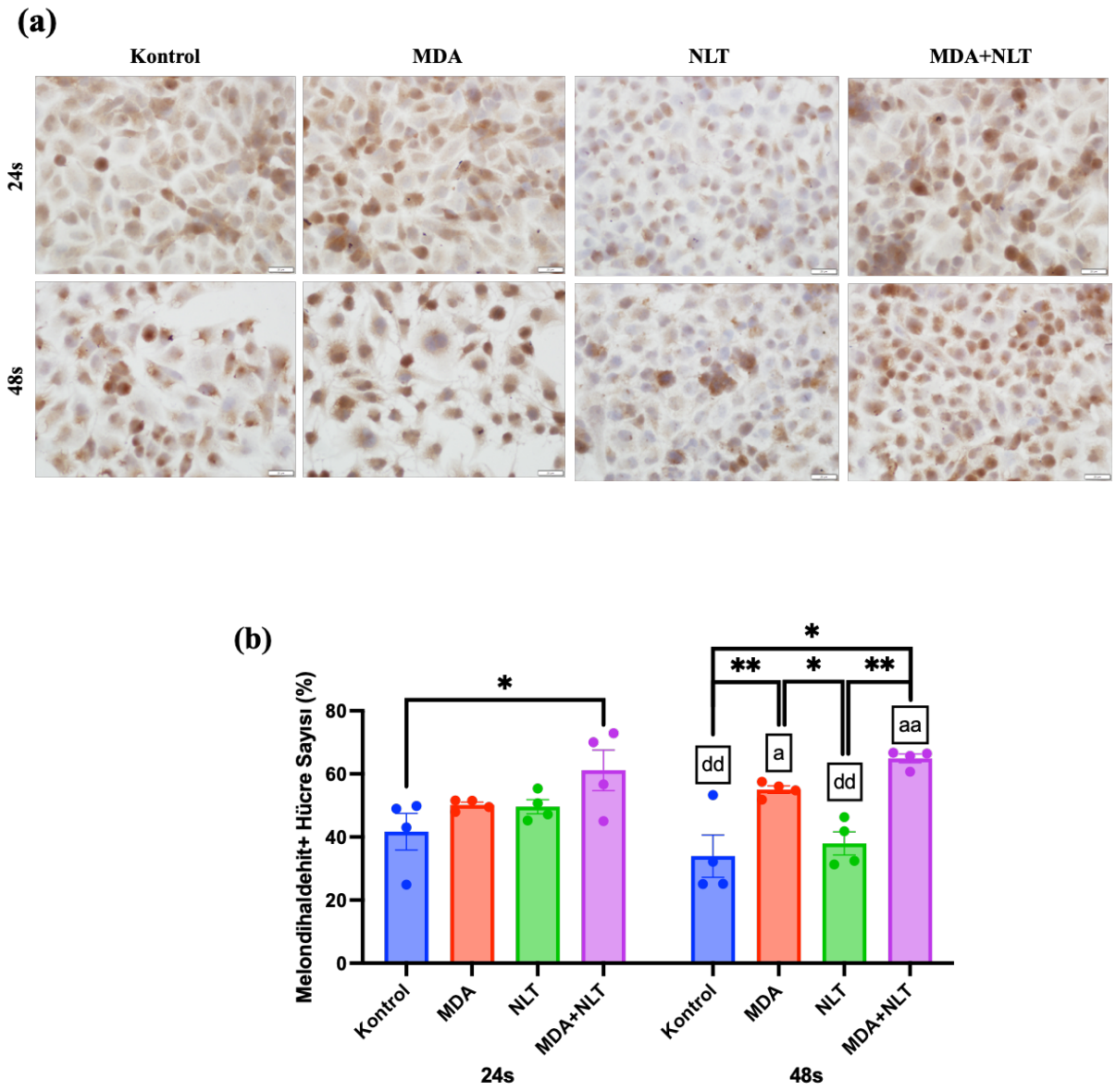
hem de MDA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla, p=0.019, p=0.005). 48 saat sonunda GPX4+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 27.38 ± 10.07, MDA grubunda 24.17 ± 9.07, NLT grubunda 32.45 ± 12.86 ve MDA-NLT grubunda 73.38 ± 22.22 olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda da MDA-NLT grubunun GPX4+ hücre yüzdesinin Kontrol grubuna kıyasla ve MDA grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır. (sırasıyla, p= 0.019, p=0.005) (Şekil 4.44).



Şekil 4.45: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar (a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; ^{aa}p<0.01 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, ^{ccc}p<0.001 24 saat NLT grubuna kıyasla, ^{dd}p<0.01 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM

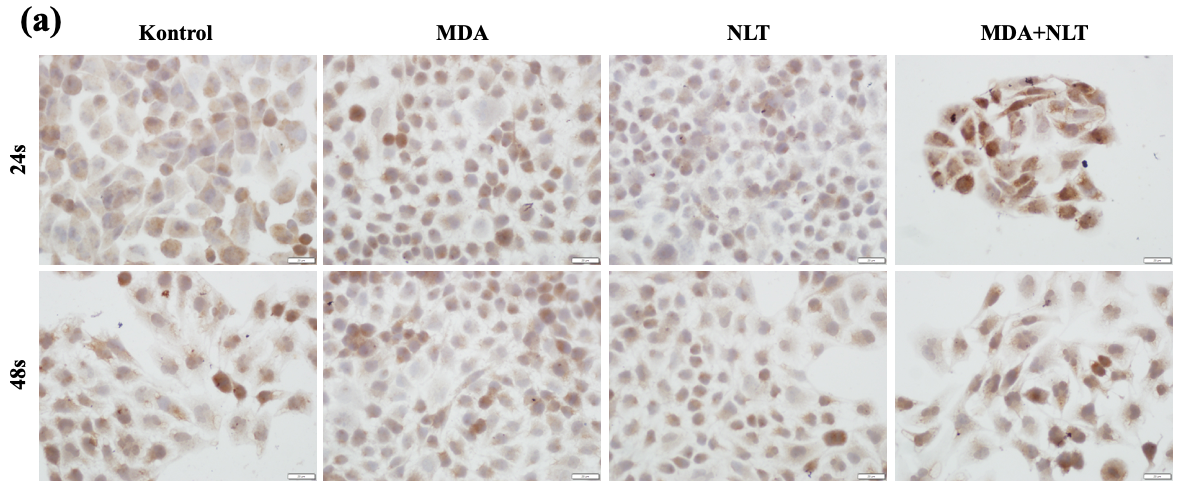
Gruplar için 24 saat sonunda GSDMD+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 49.35 ± 5.15, MDA grubunda 68.53 ± 1.61, NLT grubunda 84.76 ± 11.31 ve MDA-NLT grubunda 78.05 ± 1.82 olarak

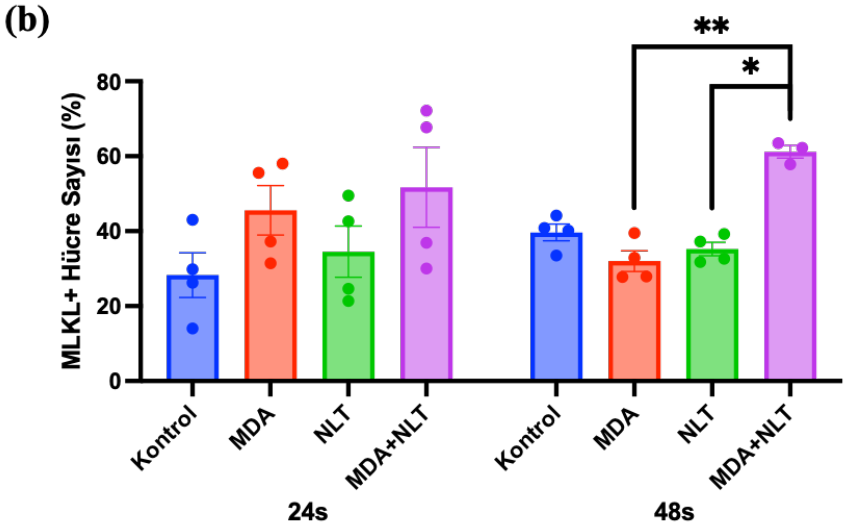
bulunmuştur. MDA, NLT ve MDA+NLT gruplarının Kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek GSDMD+ hücre yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, p=0.001, p=0.001 ve p=0.003). 48 saat sonunda GSDMD+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 47.46 ± 1.97, MDA grubunda 68.70 ± 0.79, NLT grubunda 72.53 ± 8.46 ve MDA-NLT grubunda 77.58 ± 3.71 olarak belirlenmiştir. Bu süre sonunda NLT ve MDA-NLT grubunun Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek GSDMD+ hücre yüzdesine sahip olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, p=0.038 ve p=0.002) (Şekil 4.45).



Şekil 4.46: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar(a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01; ^{a}p<0.05 ve ^{aa}p<0.01 24 saat Kontrol grubuna kıyasla, ^{dd}p<0.01 24 saat MDA+NLT grubuna kıyasla. Ölçüm barı: 20 µM

Gruplar için 24 saat sonunda malondialdehit+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 41.70 ± 11.59, MDA grubunda 50.14 ± 1.75, NLT grubunda 49.62 ± 4.45 ve MDA-NLT grubunda 61.14 ± 12.87 olarak bulunmuştur. MDA-NLT grubunun Kontrol grubuna göre malondialdehit+ hücre yüzdesinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (p=0.029). 48 saat sonunda malondialdehit+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 33.93 ± 13.35, MDA grubunda 55.03 ± 2.41, NLT grubunda 37.97 ± 7.28 ve MDA-NLT grubunda 64.88 ± 2.81 olarak belirlenmiştir. MDA grubunun Kontrol ve NLT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek malondialdehit+ hücre yüzdesine sahip olduğu saptanmıştır (sırasıyla, p=0.022 ve p=0.016). MDA-NLT grubunun benzer şekilde Kontrol ve NLT gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu belirlenmiştir (sırasıyla, p=0.002 ve p=0.001) (Şekil 4.46).



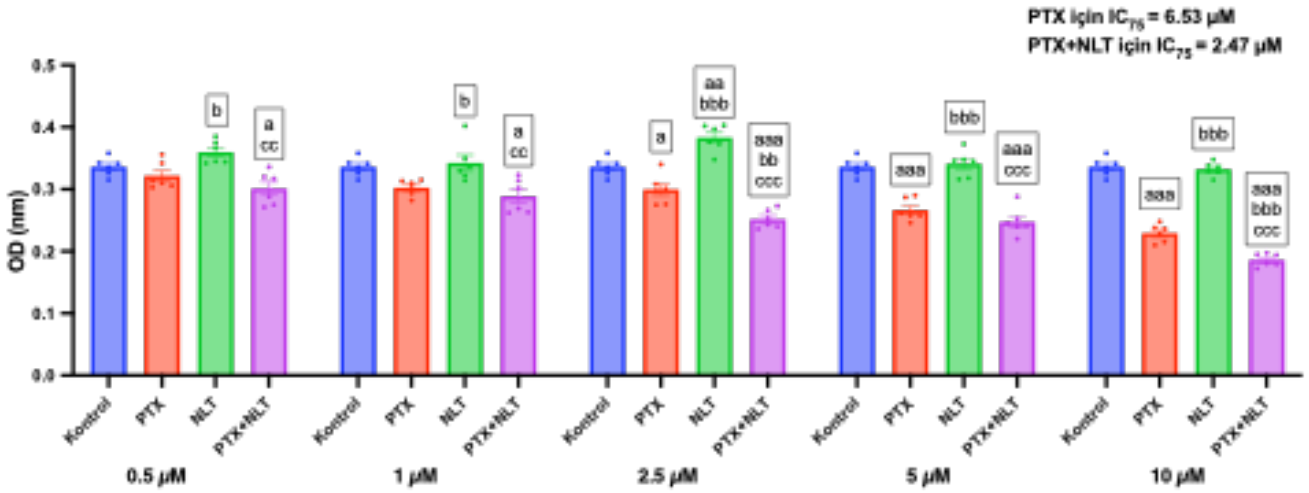


Şekil 4.47: İmmünositokimya yöntemi ile hücrelerde eksprese edilen GSDMD+ hücre sayısı yüzdelerinin deney grupları arasında 24 ve 48 saat sonunda kıyaslandığını gösteren temsili mikrograflar(a), ve grafiği (b). *p<0.05, **p<0.01. Ölçüm barı: 20 µM

Gruplar için 24 saat sonunda MLKL+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 31.44 ± 7.90, MDA grubunda 42.23 ± 14.01, NLT grubunda 34.53 ± 13.66 ve MDA-NLT grubunda 51.69 ± 21.32 olarak bulunmuştur. 48 saat sonunda MLKL+ hücre yüzdesi; Kontrol grubunda 41.74 ± 5.36, MDA grubunda 32.02 ± 5.54, NLT grubunda 35.21 ± 3.58 ve MDA-NLT grubunda 61.18 ± 2.95 olarak belirlenmiştir. 48 saat sonunda MDA-NLT grubunun MLKL+ hücre yüzdesinin MDA ve NLT gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla, p=0.004 ve p=0.013) (Şekil 4.47).

4.4.2. Optimize PTX yüklü NLT'ler için In Vitro Hücre Çalışmaları

4.4.2.1. PTX Yüklü NLT'lerin U87MG Hücreleri Üzerinde Sitotoksisite Açısından Kıyaslanması



Şekil 4.48. Kurgulanan Kontrol, PTX, NLT, PTX+NLT (0.5, 1, 2.5, 5, 10 µM) deney gruplarının 48 saat MTT analizleri ile kıyaslanması.

Tez çalışmasında gerçekleştirilen analizlere MTT analizlerine göre; 0.5µM, 1 µM, 2.5 µM, 5µM, 10µM dozlarında kullanılan PTX, NLT ve PTX+NLT için 48 saatlik periyotta sitotoksik etkileri incelendi. Elde edilen bulgulara göre PTX için doza bağlı olarak U87MG hücreleri üzerinde sitotoksik etkilerin arttığı görüldü. 48 saat sonunda PTX için IC_{75} değeri 6.53 µM olarak belirlenmiş, PTX+NLT için IC_{75} değeri anlamlı bir şekilde düşerek 2.47µM olarak bulunmuştur. Ancak IC_{50} değeri deney koşullarında uygulanan 10µM değerinin %50'den düşük olmaması dolayısıyla hesaplanamamıştır.

Sitotoksik açıdan 0.5 µM ve 1 µM doz uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında NLT gruplarının PTX gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gösterdiği anlaşılmıştır (sırasıyla p=0.024 ve p=0.035). PTX+NLT gruplarının ise Kontrol ve NLT gruplarına göre istatistiksel olarak azaldığı görülmüştür (0.5 µM için sırasıyla, p=0.041 ve p=0.001 ve 1 µM için sırasıyla p=0.01. ve p=0.004).

Sitotoksik açıdan 2.5 µM uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında PTX grubuna ait hücre canlılığının Kontrol grubuna göre istatistiksel olarak azaldığı görülmüştür (p=0.017). PTX+NLT grubunun ise canlılık oranları Kontrol, PTX ve NLT gruplarına göre istatistiksel bir şekilde azalmıştır (sırasıyla p<0.001, p=0.002 ve p<0.001). NLT grubunun hücre canlılığının Kontrol grubuna göre artması da ayrıca dikkat çekici bir bulgu olarak görülmüştür (p=0.002).Sitotoksik açıdan 5 µM ve 10 µM doz uygulanan gruplar kendi arasında kıyaslandığında PTX gruplarının Kontrol gruplarına göre

istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde hücre canlılıklarında azalma meydana gelmiştir (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.001$). Benzer şekilde PTX+NLT gruplarındaki azalma da Kontrol ve NLT gruplarına göre göre istatistiksel olarak azalmış olarak görülse de (sırasıyla $p<0.001$ ve $p<0.001$) yalnızca 10 μM dozunda PTX+NLT grubunda gözlemlenen bu azalışın ayrıca PTX grubuna göre de istatistiksel olarak anlamlı olması bulgular arasında yer almıştır ($p<0.001$) (Şekil 4.48).

5. TARTIŞMA

Katı lipit fazında etken maddenin taşınabilirliği, NLT/SLN tasarımında belirleyici bir parametredir; bu çalışmada kullanılan görsel homojenlik–faz ayrımı temelli ön tarama, katılaşma sonrası matriks içinde stabil tutulmasına işaret eden nitel bir uygunluk göstergesi olarak değerlendirilmiştir. TMZ yükü arttıkça bazı sistemlerde homojenliğin bozulması ve faz ayrımının belirginleşmesi, soğuma sırasında lipit matrisinin kristalize olup TMZ'nin matris içi çözünürlük limitinin aşılmasıyla açıklanabilmektedir. Bu nedenle, faz ayrımı gözlenmeyen oran aralığı formülasyon çalışmalarında hedeflenebilecek etken madde yükleme üst sınırı için pratik bir başlangıç noktası sunmuştur.

Lipit tipleri arasında gözlenen farklılıklar, Compritol ATO 888'in diğer katı lipitlere (Precirol ATO 5, Gelucire 44/14 ve Gelucire 59/14) kıyasla TMZ ile daha iyi karışabildiğini göstermiştir. Bu çalışma kapsamında katı lipit olarak seçilen Compritol® 888 ATO (gliseril behenat), behenik asidin (C22) mono-, di- ve trigliseritlerinden oluşan; düşük HLB (~1–2) ve ~65–77 °C erime aralığı sayesinde fizyolojik sıcaklıkta katı bir çekirdek oluşturabilen farmasötik bir lipit maddedir. Ayrıca TMZ'nin Compritol® 888 ATO içeren nanoyapılı lipit taşıyıcılarda kullanılabildiği literatürde raporlanmıştır [296–298]. Bu gerekçeler doğrultusunda Compritol 888 ATO, TMZ yüklü sistemin fiziksel stabilitesini ve salım kontrolünü destekleyebilecek uygun bir katı lipit matrisi olarak değerlendirilmiştir.

PTX gibi lipofilik ve düşük suda çözünürlük gösteren etken maddeler için katı lipit seçiminde eriyik fazda karışabilirlik yaklaşımı rasyonel bir başlangıç noktasıdır; ancak bu çalışmada kullanılan PTX'in etanol–hint yağı karışımı içinde çözünmüş ticari preparat formunda temin edilmesi, katı lipit–etken madde etkileşimini doğrudan gözlemlemeyi metodolojik olarak sınırlamaktadır. Zira sistemde PTX'ten bağımsız olarak mevcut bulunan etanol ve özellikle hint yağı, eriyik fazda bir yardımcı çözücü gibi davranarak hem PTX'in görünür biçimde ayrışmasını geciktirebilir hem de katı lipit fazına geçişte

oluşabilecek faz davranışlarını maskeleyebilir. Bu metodoloji dikkate alındığında, katı lipit seçimi PTX'in doğrudan katı lipitte çözünürlüğünden ziyade, preparatta taşıyıcı olarak yer alan hint yağı ile lipit fazın uyumluluğu temel alınarak yapılmıştır. Nitekim katı lipit ortamında belirgin faz ayrımı gözlenmemesi, preparattaki etanol–hint yağı fazının ayrışma davranışını maskelemesiyle de ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Literatürde birçok çalışmada bu ikilinin kullanımı raporlanmış olup, başlangıç homojenliğine ek olarak NLT'lerin uzun dönem fiziksel stabilitesini destekleyebilmesi nedeniyle Precirol ATO 5 tercih edilmiştir [299].

Sıvı lipitlerde TMZ'nin karışabilirliğinin taranması için gerçekleştirilen çalışmalarda, Tablo 4.12'de Oleik asit ve Hint yağı için düşük miktarda dahi yalnızca kısmi faz ayrımı gözlenmesi, TMZ'nin hidrofobik sıvı lipit fazıyla sınırlı bir afinite sergilediğini; Capryol ve ALF'de ise tüm oranlarda belirgin faz ayrımı görülmesi, bu lipitlerin TMZ'yi matris içinde taşımaya elverişli bir çözücü faz oluşturamadığını göstermiştir.

Deney süresince çökelme görülen numunelerde karıştırma süresinin uzatılması ve ısıtma uygulanmasıyla renk değişiminin gözlenmesi, TMZ'nin yalnızca fiziksel olarak ayrışmadığı; aynı zamanda işlem koşullarında kimyasal bozunma olasılığının da dikkate alınması gerektiğini ortaya koymaktadır. Nitekim yapılan HPLC analizler ile de TMZ'nin bozunması belirlenmiş olup bu konuda literatürdeki sınırlı bilgi kaynakları ile değerlendirildiğinde kapsamlı bir TMZ bozunma çalışması gerçekleştirilmiştir.

TMZ'nin fizyolojik pH koşullarında MTIC'ye dönüşen pH-bağımlı hidroliz mekanizması, sulu ortamlarda etken maddenin kimyasal stabilitesini formülasyon tasarımının merkezine yerleştirmektedir; bu bağlamda, sıvı lipit taramalarında çökelme eğilimi gösteren numunelerde karıştırma süresinin uzatılması ve ısıtma uygulanmasıyla ortaya çıkan renk değişimi, yalnızca fiziksel uyumsuzluğa değil, işlem koşullarının TMZ'nin bozunma kinetiğini hızlandırarak karışım görünümünü ikincil biçimde değiştirebilmesine de işaret etmiştir. Bozunma davranışının ayrıntılı aydınlatılması ve bozunmanın şiddetinin belirlenmesi sistemin hedef kimyasal türünü belirlemek için kritik bir karar noktasını oluşturmuştur.

TMZ'nin PBS 7.4, PBS 5.8 ve DMEM'de elde edilen profiller birlikte değerlendirildiğinde, TMZ'nin kimyasal stabilitesinin belirleyici olarak pH ve sıcaklığa duyarlı olduğu; buna ek olarak ortam kompozisyonunun bozunma kinetiğini anlamlı ölçüde hızlandırabildiği belirlenmiştir. Nötr pH ve fizyolojik sıcaklık koşullarında TMZ'nin hızlı kaybı, hidrolitik dönüşümün bu koşullarda belirgin biçimde hızlandığını göstermektedir. Nitekim PBS 7.4'te 37 °C'de TMZ'nin kısa zaman ölçeğinde keskin biçimde azalması (300 dk sonunda ~%98), fizyolojik koşullarda TMZ'nin uzun süre stabil kalan

bir molekül olarak ele alınmasının uygun olmadığını ortaya koymaktadır. Buna karşılık 4 °C'de aynı ortamda 300 dk'ya kadar TMZ'nin büyük ölçüde korunması, sıcaklığın hidroliz hızını baskılamada birincil rol oynadığını ve örnek hazırlama adımlarında sıcaklık kontrolünün analitik ve biyolojik deneylerde kritik bir değişken olduğunu desteklemektedir. pH etkisi daha çarpıcı biçimde PBS 5.8 verilerinde gözlenmektedir. 37 °C'de dahi TMZ'nin 300 dk sonunda yüksek oranda korunması (yaklaşık %88 düzeyi), daha asidik koşulların hidrolitik bozunmayı belirgin biçimde yavaşlattığına işaret etmektedir. Bu bulgu, TMZ'nin stabilite süresinin yalnızca sadece sıcaklık ile değil, aynı zamanda pH yönetimi ile de genişletilebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte PBS 5.8'te uzun zaman ölçeğinde (24–72 saat) kademeli azalmanın sürmesi, asidik pH'ın bozunmayı tamamen durdurmadığını; sadece zaman ölçeğini ötelediğini göstermiştir. DMEM'de 37 °C'de TMZ'nin çok kısa sürede düşük seviyelere inmesi (120 dk sonunda ~%1), ortam bileşenlerinin (iyonik güç, farklı tamponlama sistemi, amino asit/organik bileşenler gibi) hidrolitik dönüşümün zaman ölçeğini kısaltabildiğini düşündürmektedir. Bu noktada, DMEM'de 4 °C'de dahi anlamlı bir azalma eğiliminin görülmesi, stabilite tartışmasını özellikle hücre kültürü deneyleri açısından önemli kılmaktadır.

Tüm deney ortamları birlikte değerlendirildiğinde PBS 5.8 > PBS 7.4 > DMEM şeklinde izlenen stabilite eğilimi, aynı etken madde konsantrasyonuyla çalışılsa dahi farklı medyumlarda ve inkübasyon prosedürlerinde farklı maruziyet profillerinin oluşabileceğini göstermektedir. Bu çerçevede, literatürde bildirilen ve geniş bir öldürücü doz penceresi sunan in vitro sonuçların bir bölümünün, taze hazırlanmamış TMZ çözeltilerinin bozunması sonucu gerçek maruziyetin değişmesinden kaynaklanabileceği kanaatine varılmıştır [300,301].

MDA profillerinin TMZ azalmasına eşlik eden tipik bir ürün oluşum davranışı göstermesi, bozunma mekanizmasının beklenen biçimde ilerlediğini desteklerken; oluşum hızının ve plato seviyelerinin ortam ve sıcaklığa göre belirgin biçimde değişmesi, dönüşüm kinetiğinin çevresel koşullara yüksek duyarlılığını ortaya koymaktadır. TMZ bozunmasının tersi şeklinde gerçekleşen MDA oluşumunda PBS 7.4'te sıcaklık artışıyla MDA'nın hızlı yükselmesi ve kısa zaman ölçeğinde yüksek değerlere ulaşması, nötr pH ve fizyolojik sıcaklıkta TMZ'nin sadece azalmakla kalmayıp hızlı biçimde bozunma ürünlerine dönüştüğünü göstermektedir. PBS 5.8'te ise MDA oluşumunun gecikmesi ve kısa zaman ölçeğinde düşük seviyelerde kalması, asidik pH'ın dönüşüm basamaklarını yavaşlattığına işaret eder; ancak uzun zaman ölçeğinde 37 °C'de MDA birikiminin belirginleşmesi, süreçlerin tamamen baskılanmadığını doğrulamaktadır

DMEM'de MDA oluşumunun erken dönemde belirginleşmesi ve yüksek seviyelerde seyretmesi, stabilite tartışmasının biyolojik deneyler açısından en kritik sonucudur. DMEM'de 37

°C’de çok kısa sürede yüksek MDA düzeylerine ulaşılması ve 20 °C’de dahi uzun sürede yüksek değerlere yaklaşılması, hücre kültürü koşullarında TMZ’nin maruziyet profilinin kısa sürede “bozunma ürünleri ağırlıklı” hale gelebileceğini düşündürmektedir. Bu durum, hücresel etkinin TMZ’den ziyade dönüşüm ürünleriyle ilişkili olabileceği; dolayısıyla IC50 gibi parametrelerin, kullanılan medyum ve inkübasyon koşullarına duyarlılığının artabileceği kanaatine varılmıştır.

TMZ'nin bir ön ilaç olarak işlev görmesi (tedavi edici molekül TMZ'nin bozunma ürünü olan MDA'nın DNA'ya bağlanması sonucu hücrede apoptotik süreçlere neden olmaktadır) ve KBB'yi görece geçebilmesi dolayısıyla tercih edilirken hızla bozunan yapısı nedeniyle etkin tedavi faydasının kısıtlı kalmasına neden olmaktadır. Bu durum dolayısıyla TMZ'nin bozunmasının detaylandırılması ve TMZ’nin bozunmasıyla oluşan ürünlerin lipit fazlarla etkileşimi, bozunma ürünlerinin olası bir taşıma hedefi olarak değerlendirilmesi açısından ele alınmıştır. Bu durum sonraki aşamalarda MDA-yüklü sistem tasarımına temel oluşturabilecek bulgular, NLT formülasyonlarında temel oluşturmaktadır.

Compritol/OA temelli NLT’lerin sıcak homojenizasyonla üretiminde formülasyon (sıvı lipit/toplam lipit oranı ve yüzey aktif madde yüzdesi) ile proses (homojenizasyon süresi) değişkenlerinin ürün özelliklerini belirgin biçimde yönlendirdiği görülmüştür. Yanıtların modellenmesi ve karşılaştırılmasında uygun istatistiksel yaklaşımlar kullanılmış; tartışma bölümünde yalnızca istatistiksel açıdan anlamlı bulunan etkiler ve bu etkilerin olası mekanistik karşılıkları dikkate alınmıştır. Genel olarak, partikül boyutu ve dağılım genişliği üzerinde en baskın kontrolün yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresi ile sağlandığı; sıvı lipit/toplam lipit oranının ise özellikle düşük yüzey aktif koşullarında daha görünür hale gelen ikincil bir modülasyon etkisi sunduğu anlaşılmaktadır.

İlgili bölümde sunulan tüm grafikler bağımsız değişkenlerini bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini açıklamak üzere değerlendirilmiştir. Buna göre;

- Yüzey aktif madde yüzdesindeki artışın partikül boyutunu belirgin biçimde düşürdüğü; buna karşılık sıvı lipit/toplam lipit oranındaki artışın özellikle düşük yüzey aktif koşullarında boyutu artırma eğilimi sergilediği izlenmektedir. Bu davranış, sıcak homojenizasyon sürecinde oluşan eriyik lipit damlacıklarının küçülmesi ve stabilizasyonunun, bir yandan uygulanan enerji girdisine (homojenizasyon süresi), diğer yandan arayüzey gerilimini azaltıp yeniden birleşmeyi baskılayan yüzey aktif madde varlığına yüksek duyarlılık göstermesiyle uyumludur. Yüzey aktif madde yüzdesi arttıkça yüzeylerin daha düşük boyut rejimine taşınması, damlacık stabilizasyonunun güçlenmesi dolayısıyladır. Buna karşın sıvı lipit/toplam lipit oranının

yükselmesinin belirli koşullarda boyutu artırması, lipit fazın viskozite dengesindeki değişimlerin ve arayüzey stabilizasyon gereksiniminin artmasının (özellikle düşük yüzey aktif seviyelerinde) enerji girdisinin etkinliğini sınırlayabilmesiyle ilişkilendirilmiştir (Şekil 4.5,(a)-(ı)).

- PDI sonuçları, yalnızca ortalama boyuta değil, dağılımın homojenliğine odaklanmanın gerekliliğini göstermiştir. Genel eğilim, homojenizasyon süresi uzadıkça PDI'nin düşmesi ve dağılımın daralması yönündedir; bu bulgu, enerji girdisinin artmasının yalnızca damlacık boyutunu küçültmekle kalmayıp popülasyonun daha tekdüze hale gelmesine de katkı sağlayabildiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, partikül boyutunu küçültme amacıyla yüzey aktif madde yüzdesinin artırılması, bazı parametre kombinasyonlarında PDI'nin yükselmesiyle sonuçlanabilmiştir. Bu durum; çok düşük sürelerde yeterli dispersiyon sağlanmadan yüzey aktif miktarının artmasının heterojen bir arayüzey kaplamasına, farklı agregasyon durumlarının bir arada görülmesi ile açıklanmıştır (Şekil 4.6 ,(a)-(ı)).
- Yüzey aktif madde yüzdesinin artışıyla zeta potansiyelinin mutlak değerinin azalması, iyonik olmayan yüzey aktif maddenin partikül yüzeyinde oluşturduğu sterik tabakanın hareketliliği kısmen maskeleyebilmesiyle uyumludur. Buna karşılık sıvı lipit/toplam lipit oranındaki artışın zeta potansiyelini daha negatif değerlere yöneltme eğilimi, oleik asit gibi serbest yağ asidi bileşenlerinin yüzeyde daha yüksek oranda bulunabilmesi ve ortam koşullarına bağlı olarak yüzeydeki iyonlaşabilir grupların katkısının artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Homojenizasyon süresinin zeta potansiyeli üzerindeki etkisinin sınırlı kalması ise, bu yanıtın daha çok yüzey kimyası ve arayüzeydeki adsorpsiyon dengeleri tarafından belirlendiğini düşündürmektedir (Şekil 4.7 ,(a)-(ı)).

Sonuç olarak Compritol/OA sisteminde sıcak homojenizasyonla elde edilen bulgular, hedeflenen kalite profiline (küçük boyut, dar dağılım ve sterik stabilizasyon) ulaşmak için yüzey aktif madde yüzdesi ve homojenizasyon süresinin birincil tasarım kaldıraçları olduğunu; sıvı lipit/toplam lipit oranının ise özellikle düşük yüzey aktif koşullarında sistemin stabilizasyon gereksinimini artırarak boyut ve PDI üzerinde daha belirgin bir rol üstlenebildiğini göstermektedir. Dolayısıyla küçük boyut hedefi için, yüksek yüzey aktif madde yüzdesi ile yeterli homojenizasyon süresinin birlikte sağlanması kritik görünmektedir. Bu nedenle optimizasyon yaklaşımında "düşük boyut" hedefi tek başına yeterli bir kalite kriteri olmayıp, düşük boyut–düşük PDI dengesini sağlayacak çalışma aralığının eş zamanlı olarak belirlenmesi ve kritik faktör kombinasyonlarının bu çerçevede optimize edilmesi gerektiği değerlendirilmiştir.

Compritol/OA temelli NLT'lerin ultrasonikasyon yöntemiyle üretiminde, yüzey aktif madde yüzdesi, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddeti; sisteme aktarılan enerji yoğunluğunu ve arayüzey stabilizasyon kapasitesini birlikte belirleyen temel parametrelerdir. Genel çerçevede ultrasonikasyon, kavitasyonun oluşturduğu mikrojetler, lipit damlacıklarını hızla parçalayarak boyutu düşürebilmekte; ancak bu parçalanma mekanizmasının kalıcı bir partikül popülasyonuna dönüşebilmesi, oluşan yeni yüzey alanının yeterli düzeyde yüzey aktif madde ile hızlı biçimde stabilize edilmesine ve prosesin yeterli süre/şiddet kombinasyonunda yürütülmesine bağlı görünmektedir.

İlgili bölümde sunulan tüm grafikler bağımsız değişkenlerini bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini açıklamak üzere değerlendirilmiştir. Buna göre;

- Yüzey aktif madde oranının artırılmasının ve ultrasonikasyon süresinin uzatılmasının boyutu düşürücü yönde güçlü bir kaldıraç oluşturduğu; ultrasonikasyon şiddetindeki artışın ise sisteme aktarılan enerji girdisini yükselterek parçalanmayı hızlandırdığı anlaşılmaktadır. Özellikle düşük yüzey aktif–kısa süre–düşük şiddet kombinasyonlarında yüksek boyut bölgesinin yoğunlaşması, parçalanan damlacıkların yeterince stabilize edilemediği ve yeniden birleşme/eğiliminin baskınlaşabildiği bir rejime işaret etmektedir. Buna karşılık, yüksek yüzey aktif oranı ile daha uzun süre ve daha yüksek şiddetin bir arada kullanıldığı koşullarda minimum boyut bölgesinin oluşması; parçalanma hızının artmasıyla eş zamanlı olarak yeni yüzeylerin hızlı stabilize edilmesi sayesinde daha ince ve kararlı bir kolloidal popülasyon elde edilebildiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte yüzeylerin bazı bölgelerde eğrisel karakter göstermesi, ultrasonikasyon parametrelerinin "eşik" davranışı sergileyebileceğini; belirli bir enerji düzeyinin üzerinde ilave süre/şiddet artışlarının boyut kazanımını sınırlı ölçüde iyileştirebileceğini ve optimizasyonun verimlilik açısında dengelenmesi gerektiğini göstermektedir (Şekil 4.8,(a)-(ı)).
- Genel eğilim, ultrasonikasyon şiddeti ve süresi arttıkça PDI'nin düşmesi ve daha dar dağılım bölgesinin genişlemesi yönündedir; bu durum, enerji girdisinin artırılmasının parçalanma sürecini daha eş boyutlu hale getirerek heterojen alt popülasyonların oluşumunu azaltabildiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, yüzey aktif madde oranının yükselmesinin özellikle kısa süre/düşük şiddet koşullarında PDI'yi artırabilmesi; sistemin yeterli enerjiyle "tek rejime" taşınamadığı durumlarda arayüzey kaplanmasının heterojenleşmesi, geçici agregasyonların varlığı veya birden fazla kolloidal popülasyonun eş zamanlı oluşması ile uyumlu bir tablo sunmaktadır. Bu nedenle, partikül boyutunu küçültme hedefi ile dağılımın daraltılması hedefi

birlikte ele alınmalı; ultrasonikasyon parametrelerinin seçimi PDI yanıtının aynı sistemde elde edilen partikül boyutu bulguları ile birlikte optimize edilmelidir (Şekil 4.9,(a)-(ı)).

- Yüzey aktif madde oranının artmasıyla zeta potansiyelinin daha az negatif değerlere kayması, iyonik olmayan yüzey aktif maddenin partikül yüzeyinde oluşturduğu tabakanın hareketliliği kısmen maskeleyebilmesiyle uyumludur; buna karşın ultrasonikasyon süresi ve şiddetinin incelenen aralıkta daha sınırlı etki göstermesi, yüzey yükünün esas belirleyicisinin proses enerjisinden ziyade yüzeydeki bileşen kompozisyonu ve kaplanma dinamiği olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda, daha yüksek yüzey aktif düzeylerinde zeta potansiyelinin mutlak değerinin azalması "elektrostatik" katkıyı görece zayıflatabilirken, aynı anda artan sterik bariyerin kolloidal stabiliteyi koruyucu yönde telafi edebileceği değerlendirilmelidir; dolayısıyla stabilite yorumu zeta potansiyeli ile birlikte boyut/PDI hedefleri ve yüzey aktif kaynaklı sterik stabilizasyon yaklaşımı üzerinden bütüncül biçimde yapılmalıdır (Şekil 4.10,(a)-(ı)).

Sonuç olarak ultrasonikasyonla üretimde düşük partikül boyutu ve düşük PDI hedefleri açısından, yeterli yüzey aktif madde düzeyinin; uygun süre ve şiddet kombinasyonlarıyla birlikte ele alınması kritik görünmektedir. Bu çerçeve, "düşük boyut" hedefinin tek başına yeterli bir kalite kriteri olmadığına; düşük boyut–düşük PDI dengesini sağlayacak çalışma aralığının eş zamanlı belirlenmesi ve zeta potansiyeli/sterik stabilizasyon çıktılarının da gözetilerek kritik faktör kombinasyonlarının optimize edilmesi gerektiğini işaret etmektedir.

Precirol/Hint yağı temelli NLT'lerin sıcak homojenizasyonla üretiminde, sıvı lipit/toplam lipit oranı ve yüzey aktif madde yüzdesi ile homojenizasyon süresi; eriyik lipit damlacıklarının parçalanması, yeniden birleşme eğilimi ve arayüzey stabilizasyon kapasitesi üzerinden ürün özelliklerini birlikte şekillendiren temel kaldıraçlar olarak değerlendirilmiştir.

İlgili bölümde sunulan tüm grafikler bağımsız değişkenlerini bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini açıklamak üzere değerlendirilmiştir. Buna göre;

- Partikül boyutu yanıtında, homojenizasyon süresinin uzamasıyla boyut rejiminin belirgin biçimde daha düşük değerlere kayması; enerji girdisinin artmasına bağlı olarak eriyik damlacıkların daha etkin parçalanması ve yeterli süre sağlandığında yeniden birleşmenin baskılanması ile uyumludur. Buna karşılık, yüzey aktif madde yüzdesi ile sıvı lipit/toplam lipit oranının etkisinin "süreye bağlı" görünüm sergilemesi; kısa süre koşullarında arayüzey

stabilizasyon gereksiniminin artması ve kaplanma dengesinin tam kurulamadığı durumlarda daha yüksek boyut bölgelerinin genişleyebilmesiyle ilişkilendirilmiştir. Bu çerçevede, özellikle kısa sürelerde yüksek yüzey aktif düzeyi ve/veya yüksek sıvı lipit oranının boyutu artırıcı yönde bir davranış sergileyebilmesi; sistemin viskozite/arayüzey gerilimi dengesinin değişmesi, geçici agregasyonların tam baskılanamaması gibi çoklu mekanizmaların birlikte devreye girebileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, düşük boyut hedefi açısından "yeterli homojenizasyon süresi" kritik bir eşik parametresi olarak öne çıkmakta; yüzey aktif ve sıvı lipit oranı seçimlerinin ise bu eşik sağlandıktan sonra boyutu daha kontrollü biçimde modüle eden ikincil tasarım değişkenleri olarak ele alınması daha rasyonel (Şekil 4.11,(a)-(ı)).

- PDI yanıtı, yalnızca ortalama boyutun değil dağılım homojenliğinin de proses tarafından güçlü biçimde yönlendirildiğini göstermiştir. Homojenizasyon süresi uzadıkça PDI'nin genel olarak düşmesi, daha uzun sürelerde enerji girdisinin artmasına bağlı olarak dağılımın daralması ve daha tekdüze bir partikül popülasyonuna yaklaşılmasıyla tutarlı biçimde değerlendirilmiştir. Bununla birlikte, yüzey aktif madde yüzdesinin artışıyla PDI'nin artma eğilimi sergileyebildiği bölgeler; arayüzey kaplanmasının heterojenleşmesi, farklı büyüklük popülasyonlarının eş zamanlı oluşması veya kısa sürelerde yeterli parçalanma sağlanmadan artan yüzey aktif miktarının mikroyapıda geçici kümelenmelere zemin hazırlaması gibi senaryolarla uyumlu bir tablo sunmaktadır (Şekil 4.12,(a)-(ı)).

- Zeta potansiyelinin tüm çalışma alanında negatif değerlere sahip olması, sistemin net yüzey yükünün korunduğunu; ancak mutlak değerlerin formülasyon bileşen kompozisyonu ve yüzeydeki kaplanma dinamikleriyle modüle edilebildiğini düşündürmektedir. Sıvı lipit/toplam lipit oranındaki artışla daha negatif değerlere yönelme eğilimi, yüzeydeki lipit kompozisyonunun değişmesine bağlı olarak iyonlaşabilir grupların ve adsorpsiyon dengesinin yeniden düzenlenmesi ile ilişkilendirilebilirken; yüzey aktif madde yüzdesinin artmasıyla zeta potansiyelinin daha az negatif değerlere kayması, iyonik olmayan yüzey aktif tabakanın hareketliliği kısmen maskeleyebilmesi ve ölçülen mutlak değeri azaltabilmesiyle uyumludur. Homojenizasyon süresine bağlı değişimlerin daha sınırlı kalması ise, bu yanıtın esas belirleyicisinin proses enerjisinden ziyade arayüzeydeki kaplanma dengesi olabileceğine işaret etmektedir (Şekil 4.13,(a)-(ı)).

Genel olarak Precirol/Hint yağı sisteminde sıcak homojenizasyonla elde edilen bulgular, "yeterli süreyle sağlanan enerji girdisinin düşük boyut ve düşük PDI hedefleri açısından temel belirleyici olduğunu; yüzey aktif madde yüzdesi ile sıvı lipit/toplam lipit oranının ise özellikle kısa süre

koşullarında boyut ve dağılım üzerinde belirginleşebilen, etkileşimli ve denge gerektiren etkiler sunduğunu göstermektedir.

Precirol/Hint yağı temelli NLT'lerin ultrasonikasyonla üretiminde, ultrasonikasyon süresi ve şiddeti sisteme aktarılan enerji yoğunluğunu belirleyerek eriyik lipit damlacıklarının parçalanmasını yönlendirmektedir. Bu süreçte yüzey aktif madde oranı ise, parçalanma ile ortaya çıkan yeni ara yüzey alanının ne hızda ve ne ölçüde kaplandığını belirleyerek yeniden birleşmenin baskılanması ve kolloidal popülasyonun dağılım genişliği üzerinde kritik rol oynamaktadır.

İlgili bölümde sunulan tüm grafikler, bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerindeki etkisini açıklamak üzere değerlendirilmiştir. Buna göre;

- Partikül boyutu yanıtında, istatistiksel açıdan anlamlı bulunan etkiler birlikte değerlendirildiğinde; ultrasonikasyon süresi ve şiddetinin artırılması ile boyutun genel olarak daha düşük bir rejime kayması, kavitasyon etkinliğinin artmasına bağlı olarak damlacık parçalanma veriminin yükselmesiyle uyumlu bir tablo sunmaktadır. Buna karşılık yüzey aktif madde oranının bazı parametre alanlarında boyutu artırma eğilimi gösterebilmesi, yüksek yüzey aktif düzeylerinde ortamın farklılaşması, ara yüzeyde yoğun kaplanmanın ve kısa süre/düşük şiddet koşullarında yeniden birleşmenin baskın kalması gibi mekanizmalarla yorumlanmıştır. Dolayısıyla yüzey aktif oranı yükseltildiğinde, boyut kazanımının sürdürülebilir olabilmesi için aynı anda yeterli süre–şiddet kombinasyonu ile enerji eşiğinin aşılması kritik görünmektedir (Şekil 4.14,(a)-(ı)).
- PDI yanıtı, ortalama boyutun yanı sıra popülasyon homojenliğinin de ultrasonikasyon koşullarına duyarlı olduğunu göstermiştir. Genel eğilim, süre uzadıkça (ve uygun koşullarda şiddet arttıkça) PDI'nin düşmesi yönünde olup, bu durum parçalanma sürecinin daha tekdüze hale gelmesi ve heterojen alt popülasyonların azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, yüksek yüzey aktif düzeylerinde özellikle yetersiz süre/şiddet koşullarında PDI'nin yükselmesi, ara yüzey kaplanmasının heterojenleşmesi ve çoklu popülasyon oluşumu olasılığını düşündürmektedir. Bu nedenle, boyutu küçültme hedefi PDI hedefinden bağımsız ele alınmamalı; parametre kombinasyonları boyut–PDI dengesi üzerinden birlikte optimize edilmelidir (Şekil 4.15,(a)-(ı)).
- Zeta potansiyeli tüm koşullarda negatif bölgede kalarak sistemin net yüzey yükünü koruduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, yanıtın değişkenlerle güçlü ve tutarlı biçimde modellenememesi; bu parametrenin incelenen aralıkta süreç enerjisinden ziyade yüzey

kompozisyonu gibi ek faktörlere duyarlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu bağlamda stabilite yorumu, zeta potansiyelinin tek başına mutlak değeri üzerinden değil; sterik stabilizasyon yaklaşımı ve eş zamanlı boyut–PDI hedefleri ile birlikte bütüncül biçimde yapılmalıdır (Şekil 4.16,(a)-(ı)).

Sonuç olarak ultrasonikasyonla üretimde, küçük boyut hedefi için yüksek yüzey aktif madde yüzdesi ile yeterli ultrasonikasyon süresi ve şiddetinin birlikte sağlanması kritik görünmektedir. Bu nedenle optimizasyon yaklaşımında "düşük boyut" hedefi tek başına yeterli bir kalite kriteri olmayıp, düşük boyut–düşük PDI dengesini sağlayacak çalışma aralığının eş zamanlı olarak belirlenmesi ve kritik faktör kombinasyonlarının bu çerçevede optimize edilmesi gerektiği değerlendirilmektedir.

Tez çalışmasında farklı lipit matriksleri (Compritol/OA ve Precirol/Hint yağı) ile farklı üretim yöntemleri (sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon) kullanılarak geliştirilen NLT'lerin ilaç taşınım sistemi olarak kullanılabilirliğini destekleyecek optimum formülasyon–proses kombinasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. Optimizasyon çalışmaları Design-Expert yazılımının sayısal optimizasyon modülünde çok amaçlı istenirlik fonksiyonu kullanılarak yürütülmüş; her sistemin deneysel kısıtları gözetilerek hedef fonksiyonlar partikül boyutu ve PDI yanıtlarının minimize edilmesi üzerine kurulmuştur. Zeta potansiyeli ise kolloidal stabiliteyi destekleyecek bölgede kalacak şekilde kısıt kriteri olarak ele alınmıştır.

Sıcak homojenizasyon koşullarında her iki lipit matriksi için optimizasyon senaryosu, maksimum etken madde taşınım potansiyelini desteklemek üzere sıvı lipit/toplam lipit oranının tasarım aralığında maksimize edilmesi; buna eş zamanlı olarak partikül boyutu ve PDI'nin minimize edilmesi prensibine dayandırılmıştır. Compritol/OA temelli NLT'lerde optimum koşullar sıvı lipit/toplam lipit oranı %38.6, yüzey aktif madde %1.77 ve homojenizasyon süresi 2.15 dk olarak belirlenmiş; bu koşullarda DLS ile ortalama partikül boyutu 131.6 ± 5.3 nm ve PDI 0.40 ± 0.07 ölçülmüş, zeta potansiyeli −20.9 ± 1.6 mV bulunmuştur. Precirol/Hint yağı temelli NLT'lerde ise optimum koşullar sıvı lipit/toplam lipit oranı %35.7, yüzey aktif madde %0.69 ve homojenizasyon süresi 5 dk olarak saptanmış; partikül boyutu dağılımının tek modlu karakter sergilediği belirlenirken ortalama partikül boyutu 167.9 ± 8.2 nm ve PDI 0.228 ± 0.08 olarak ölçülmüş, zeta potansiyeli −24.3 ± 1.9 mV olarak kaydedilmiştir.

Ultrasonikasyon koşullarında optimizasyon; yüzey aktif madde yüzdesi, ultrasonikasyon süresi ve ultrasonikasyon şiddetinin bağımsız değişkenler olarak tanımlandığı ve tüm değişkenlerin deneysel çalışma aralığı içinde tutulduğu sayısal bir senaryo ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde, etken madde

taşınım potansiyelinin korunması amacıyla sıvı lipit miktarı formülasyonda yüksek oranda (%50) sabitlenmiş; optimizasyon hedefleri minimum partikül boyutu ve minimum PDI olarak belirlenirken zeta potansiyelinin kolloidal stabiliteyi destekleyecek biçimde negatif bölgede kısıt kriteri olarak gözetilmiştir. Compritol/OA temelli NLT'lerde optimum koşullar ultrasonikasyon şiddeti %36.1, yüzey aktif madde %1.5 ve ultrasonikasyon süresi 2 dk olarak belirlenmiş; doğrulama deneylerinde ortalama partikül boyutu 119.1 ± 6.2 nm, PDI 0.22 ± 0.03 ve zeta potansiyeli −27.8 ± 2.1 mV olarak ölçülmüştür. Precirol/Hint yağı temelli NLT'lerde optimum koşullar yüzey aktif madde %1, ultrasonikasyon süresi 3 dk ve ultrasonikasyon şiddeti %25 olarak saptanmış; doğrulama koşullarında ortalama partikül boyutu 146.6 ± 6.8 nm, PDI 0.267 ± 0.04 ve zeta potansiyeli −27.2 ± 2.8 mV değerlerine ulaşılmıştır .

Her iki lipit matriksi için sıcak homojenizasyon koşullarının çok amaçlı istenirlik fonksiyonuyla optimize edilmesi, partikül boyutu ve dağılım genişliğinin (PDI) eş zamanlı kontrolünde yüzey aktif madde oranı ile homojenizasyon süresi (enerji girdisi) arasında belirgin bir denge bulunduğunu göstermiştir. Compritol/OA sisteminde optimum nokta, nispeten kısa bir homojenizasyon süresi (2.15 dk) ile elde edilirken bunun, arayüz stabilizasyonunu güçlendirecek şekilde daha yüksek yüzey aktif madde oranı (%1.77) ile telafi edildiği; böylece ortalama boyutun 131.6 nm seviyesine indirilebildiği görülmüştür. Buna karşın Precirol/Hint yağı sisteminde optimum koşulda yüzey aktif madde ihtiyacının daha düşük (%0.69) düzeyde kaldığı, ancak tek modlu dağılım ve daha düşük PDI (0.228) elde edilebilmesi için daha uzun homojenizasyon süresinin (5 dk) gerektiği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, iki matriksin damlacık kırılması–yeniden birleşme dinamiklerinin farklı olduğunu ve optimum koşulların, bir sistemde arayüzün hızlı stabilize edilmesi (surfaktan baskın yaklaşım), diğerinde ise yeterli mekanik kırma/yeniden kırma (enerji baskın yaklaşım) üzerinden şekillendiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, Compritol/OA optimumunda daha düşük boyut elde edilmesine rağmen PDI'ın nispeten yüksek kalması, yalnızca düşük boyut hedefinin yeterli olmadığını; düşük boyut–düşük PDI dengesinin proses parametreleri birlikte değerlendirilerek kurulması gerektiğini göstermektedir [302,303].

Ultrasonikasyon yöntemiyle üretimde her iki sistemde de sıvı lipit/toplam lipit oranının %50'de sabitlenmesi, boyut ve PDI üzerinde gözlenen farklılıkların esas olarak lipit matriksi özellikleri ile ultrasonikasyon parametrelerinin (şiddet–süre) ve yüzey aktif madde düzeyinin birlikte belirlediği enerji girdisi–arayüz stabilizasyonu dengesinden kaynaklandığını göstermektedir. Compritol/OA sisteminde optimum koşullar, daha yüksek ultrasonikasyon şiddeti (%36.1) ve daha kısa süre (2 dk) ile belirlenmiş; bu daha yoğun kavitasyon etkisinin oluşturduğu yeni arayüzün hızlı stabilize edilmesi

amacıyla daha yüksek yüzey aktif madde oranı (%1.5) ile desteklenmiştir. Bu kombinasyon doğrulama deneylerinde 119.1 nm ortalama partikül boyutu ve 0.22 PDI ile daha dar dağılımlı bir popülasyon elde edilmesini sağlamıştır. Buna karşın Precirol/Hint yağı sisteminde optimum nokta daha düşük şiddet (%25) ve daha uzun süre (3 dk) ile oluşmuş, yüzey aktif madde oranı %1 düzeyinde kalmıştır; bu koşullarda ortalama boyut 146.6 nm ve PDI 0.267 olarak ölçülmüştür. Her iki sistemde de zeta potansiyelin yaklaşık −27 mV seviyesinde seyretmesi, kolloidal stabiliteyi destekleyen yeterince negatif bir bölgenin korunabildiğini; dolayısıyla optimum noktaların temel ayrışmasının zeta potansiyelden ziyade parçalanma–koalesans dengesi üzerinden şekillendiğini düşündürmektedir.
Optimizasyon çıktıları birlikte değerlendirildiğinde, ilaç taşınım sistemi olarak kullanılacak nanopartiküllerin geliştirilmesinde temel kriterlerin düşük partikül boyutu, düşük PDI ve yeterli kolloidal stabilite olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, maksimum etken madde yükleme kapasitesine yaklaşmak açısından sıvı lipit içeriğinin artırılabilmesi de seçim kararında belirleyici bir parametre olarak ele alınmıştır. Bu çerçevede, Compritol/OA çifti için iki üretim yöntemi karşılaştırıldığında ultrasonikasyon yaklaşımında sıvı lipit içeriğinin %50 düzeyinde sabitlenebilmesi ve aynı anda boyut ile PDI yanıtlarının daha düşük rejimde elde edilebilmesi, ileri çalışmalar için bu yöntemi öne çıkarmıştır. Zeta potansiyelinin daha negatif bölgede seyretmesi de stabilite açısından destekleyici bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle, MDA yükleme çalışmalarında Compritol/OA temelli sistem için ultrasonikasyon yöntemiyle üretim yapılmasına karar verilmiştir.

Benzer şekilde Precirol/Hint yağı temelli sistemde de ultrasonikasyon koşullarında elde edilen optimize NLT'lerin boyut–PDI profili ve zeta potansiyelinin daha negatif bölgede konumlanması birlikte değerlendirildiğinde, PTX yükleme çalışmalarında Precirol/Hint yağı temelli sistem için ultrasonikasyon yaklaşımının tercih edilmesi uygun görülmüştür.

NLT'lere ait Compritol/OA temelli ultrasonikasyon yöntemi ile üretilmiş NLT örneklerinin TEM görüntüleri DLS ile belirlenen hidrodinamik partikül boyutu ile genel olarak uyumlu olup, sistemin nano boyutta ve çoğunlukla küresel morfolojide partiküller oluşturduğunu desteklemektedir.

Compritol/OA bazlı NLT serisinde sıvı lipit/katı lipit oranının %0–%90 aralığında değiştirilmesi, kolloidal ölçekte (DLS) ve lipit matrisin düzenlilik düzeyinde (DSC ve XRD) belirgin ve tutarlı bir yapı–özellik ilişkisine işaret etmiştir. DLS verileri, tüm formülasyonlarda ortalama hidrodinamik partikül çaplarının ~99–170 nm aralığında ve PDI'nin 0.25'in altında seyrettiğini göstermiştir (Şekil 4.22; Tablo 4.33). Bununla birlikte sıvı lipit oranı arttıkça partikül boyutunun kademeli yükselmesi, OA fraksiyonunun çekirdeği daha akışkan hâle getirmesiyle birlikte soğuma

sırasında yeniden düzenlenme/koalesans eğilimini artırabilmesi ve daha düşük viskoziteli bir iç fazın damlacık kırılmasına farklı yanıt vermesiyle açıklanmıştır. Bu çerçevede, seri genelinde PDI'nin düşük kalması dağılımın nispeten dar tutulabildiğini; ancak yüksek OA oranlarının ortalama boyutu artırma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir.

Termal analiz bulguları, kolloidal ölçekte gözlenen bu eğilimin matrisin kristal organizasyonundaki zayıflamayla eş zamanlı geliştiğini ortaya koymuştur. DSC termogramlarında ana erime geçişinin düşük OA düzeylerinde ~75 °C civarında izlenmesine karşın, sıvı lipit/toplam lipit oranının yükselmesiyle erime pikinin belirgin şekilde daha düşük sıcaklıklara kayması (özellikle %50 ve üzeri) ve erime pikinin genişlemesi; OA'nın katı lipit kristal örgüsünde kusur bölgeleri oluşturarak daha az düzenli bir çekirdek mimarisi oluşturduğunu düşündürmektedir (Şekil 4.23). ΔH değerlerindeki kademeli azalma (SLN'de 79.4 mJ/mg, %90'da 30.9 mJ/mg) bu yorumu desteklemekte; katı lipit fraksiyonuna göre yapılan düzeltmeyle hesaplanan göreli kristalinlik (KI, %) değerlerinin de sıvı lipit oranı arttıkça düşmesi, yalnızca katı lipit miktarının azalması ile açıklanamayacak ölçüde bir kristal düzen zayıflamasına işaret etmektedir (Tablo 4.33). Bu durum, sıvı lipit ilavesinin bir yandan kristal kusur düzeyini artırarak etken madde yüklenmesi için potansiyel boşluk bölgeleri oluşturabileceğini; diğer yandan ise partikül boyutu üzerinde artırıcı bir eğilim yaratabildiğini göstermekte ve nitelikli bir nanotaşıyıcı tasarımında "yükleme potansiyeli–partikül boyutu" dengesinin kritik olduğunu vurgulamaktadır.

Bileşenlerin fiziksel karışımlarına ait DSC eğrilerinin, büyük ölçüde bileşenlerin karakteristik erime geçişlerini yansıtması; buna karşın aynı bileşenlerle üretilen NLT-50 termogramında ana erime geçişinin daha düşük sıcaklıklara kayması, pik genişlemesi ve entalpinin belirgin azalması, nanopartikül mimarisine özgü bir yeniden yapılanmayı işaret etmektedir (Şekil 4.24). Başka bir ifadeyle, fiziksel karışımlar referans davranışı temsil ederken; NLT üretim süreci, katı lipit kristal örgüsünü zayıflatan ve OA'nın matrise "kusur oluşturucu" biçimde entegre olmasını kolaylaştıran bir kusurlu bir yapı üretim sürecine neden olmakta olup, bu da DSC'de gözlenen erime entalpisi azalma profilini desteklemektedir.

XRD sonuçları, DSC'de izlenen kristallenme azalmasını yapısal düzeyde desteklemiştir. Ultrasonikasyonla üretilen Compritol/OA numunelerinde NLT 0 örneğinde düşük açılı bölgede $2\theta \approx 4.2°$ civarındaki yansıma ile birlikte $2\theta \approx 19.0°$, 21.0° ve 23.2° civarında keskin kırınım piklerinin gözlenmesi, gliseril behenat sistemlerinde raporlanan katmanlı düzenlilik ve daha yüksek kristal organizasyonla uyumludur (Şekil 4.25). NLT 50'de düşük açılı yansımanın zayıflaması ve genişlemesi ile geniş açılı bölgede pik şiddetinin azalması/pik genişliğinin artması, OA ilavesiyle katmanlı düzenin

ve kristal örgü düzenliliğinin azaldığını göstermektedir. Ayrıca NLT 50'de yeni ve belirgin ek piklerin ortaya çıkmaması, sıvı lipitin ayrı bir kristal faz oluşturmaksızın lipit matrise dahil olduğunu ve faz ayrışmasına dayalı yeni bir kristalin faz oluşturmadığını göstermektedir.

Precirol/Hint yağı temelli sistemde NLT 0 ve NLT 50 difraktogramlarında $2\theta \approx 15°–25°$ aralığındaki geniş kırınım bandının baskın olması, bu matriste başlangıçtan itibaren daha sınırlı/heterojen kristal bölgeler ve daha yüksek düzensizlik düzeyine işaret etmektedir (Şekil 4.26). NLT 50'de pik profilinin daha yayvan hale gelmesi ve $2\theta \approx 22°–24°$ bölgesindeki omuzlanmanın belirginliğinin azalması, Hint yağı ilavesiyle kristal düzenliliğin daha da zayıflayabildiğini; sistemin tipik "kusurlu kristal" karakterinin güçlendiğini düşündürmektedir.

Genel olarak DLS–DSC–XRD bulguları birlikte değerlendirildiğinde, sıvı lipit fraksiyonunun artırılmasının lipit çekirdekte kristal kusurlarını yükselterek daha düşük kristallenme dereceli, potansiyel olarak daha yüksek etken madde barındırma kapasitesine sahip bir mimariyi desteklediği; ancak belirli bir eşik üzerinde partikül boyutunu artırma eğilimi doğurabildiği anlaşılmaktadır. Bu nedenle, optimize NLT tasarımında sıvı lipit oranı seçimi; hedeflenen etken madde taşınım kapasitesi ile istenen boyut aralığı ve dağılım darlığı (düşük PDI) birlikte gözetilerek dengelenmelidir.

Tez kapsamında sentezlenen NLT'lerin bileşen bütünlüğü ve MDA'nın matristeki varlığı FTIR ile doğrulanmıştır (Şekil 4.27). Compritol'e özgü alifatik C–H gerilmeleri (2956; 2914/2850 cm^{-1}) ve ester C=O bandı (1734 cm^{-1}) ile oleik aside ait =C–H (3007 cm^{-1}) ve karboksilik C=O (1706 cm^{-1}) bantlarının birlikte izlenmesi, lipit matriste beklenen fonksiyonel grupların korunduğunu göstermektedir. Yüzey aktif maddeye ait ~1100 cm^{-1} (C–O–C/C–O) ve 1348 cm^{-1} bantlarının korunması da formülasyon bileşenlerinin NLT yapısında yer aldığını desteklemektedir. NLT spektrumlarında yeni bantların ortaya çıkmaması, sistemin yeni kovalent bağ oluşumu yerine fiziksel birleşim ve arayüzey yerleşimi ile organize olduğunu düşündürmektedir. MDA-NLT'de lipit bantlarının korunmasıyla birlikte MDA'ya atfedilen 3200 cm^{-1} civarındaki geniş bant ve 1650–1560 cm^{-1} bölgesindeki bantların eşzamanlı izlenmesi, MDA'nın matrise başarılı biçimde dahil olduğunu göstermektedir [280,284]

Kolloidal karakterizasyon sonuçları, MDA-NLT sisteminin nano boyutta ve dar dağılımlı bir popülasyon oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.30). MDA-NLT'lerin ortalama hidrodinamik partikül boyutu 124.0 ± 3.4 nm ve PDI 0.22 ± 0.02 olarak belirlenmiş; zeta potansiyeli −22.6 ± 1.7 mV bulunmuştur. Zeta potansiyelinin negatif bölgede seyretmesi elektrostatik itmeye dayalı stabilite katkısını işaret ederken, sistemde kullanılan noniyonik yüzey aktif maddenin sağlayabileceği sterik

stabilizasyonla birlikte değerlendirildiğinde dispersiyonun fiziksel kararlılığının desteklendiği kanaatine varılmıştır.

Etken maddenin matrise yüklenme performansı, enkapsülasyon verimi (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (%DLC) parametreleri ile nicel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.34). Sıvı lipit içermeyen MDA-NLT 0 formülasyonunda %EE 80.0 ± 3.0 iken, sıvı lipit içeren tüm formülasyonlarda %EE'nin genel olarak %90'ın üzerinde seyrettiği ve en yüksek değerin MDA-NLT 50'de (95.1 ± 1.2) elde edildiği görülmüştür. %DLC değerleri ise sıvı lipit/toplam lipit oranı arttıkça belirgin biçimde yükselmiş (0.28 ± 0.03-8.13 ± 0.63), böylece sıvı lipit fraksiyonunun MDA'nın lipit fazda dağılım kapasitesini artırarak matriste tutulabilen etken madde miktarını arttırdığı değerlendirilmiştir. Bu eğilim, NLT'lerin kusurlu kristal yapısının (sıvı lipit eklenmesiyle artan düzensizlik) etken madde için daha fazla yerleşim bölgesi oluşturabileceği yönündeki diğer analizler ile de gösterilmiş olan genel NLT yaklaşımıyla uyumludur.

In vitro salım deneyleri, serbest MDA'nın hızlı ve neredeyse tam bir geçiş sergilediğini; MDA yüklü NLT'lerin ise zamana yayılmış, kontrollü ve plato eğilimine ulaşan bir salım profili oluşturduğunu göstermiştir (Şekil 4.31; Tablo 4.35). Serbest MDA'da 300. dakikada kümülatif salımın %90'ın üzerine çıkması ve 48. saatte ~%98'e ulaşması, diyaliz membranın geçirgenliğinin ve sink koşullarının sağlandığının dolaylı göstergesi olarak değerlendirilmiştir. NLT sistemlerinde ise erken faz salım düzeyleri belirgin biçimde daha düşük kalmış (60. dakikada NLT 0: %17.75; NLT 30: %23.91; NLT 70: %26.06) ve geç fazda plato davranışı güçlenmiştir (48. saatte NLT 0: %55.12; NLT 30: %60.84; NLT 70: %64.84). Bu bulgu, lipit matrise hapsolmuş etken maddenin difüzyonunun, matriksin iç düzenliliği ve etken maddenin matristeki konumlanma biçimi tarafından sınırlandığını; sıvı lipit oranı arttıkça matristeki düzensizliğin artması ve daha erişilebilir mikro-bölgelerin oluşmasıyla salım hızının yükseldiğini düşündürmektedir. Yapılan iki yönlü ANOVA, formülasyon tipi ve zaman-faktör etkileşiminin salım üzerinde anlamlı etkiler oluşturduğunu göstermiş; ikili karşılaştırmalar serbest MDA ile tüm NLT grupları arasında tüm zaman noktalarında anlamlı fark bulunduğunu ortaya koymuştur ($p<0.05$). NLT grupları kendi içinde değerlendirildiğinde özellikle 90. dakikadan sonra sıvı lipit oranı daha yüksek olan NLT 70'in, NLT 0 ve NLT 30'a kıyasla daha yüksek salım düzeyleri sergilediği ve farkın anlamlı olduğu belirlenmiştir.

Salım verilerinin kinetik modellere uyumu, serbest MDA'ya kıyasla NLT sistemlerinde mekanizmanın matriks kontrollü bir karakter kazandığını desteklemiştir (Tablo 4.36). Sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson–Crowell modellerinde R^2 değerleri görece sınırlı kalırken (yaklaşık 0.30–0.70), Korsmeyer–Peppas modelinin tüm NLT formülasyonlarında yüksek uyum vermesi ($R^2 \geq$

0.978) salımın en iyi bu çerçevede açıklandığını göstermektedir. Korsmeyer–Peppas n değerlerinin 0.5–1 aralığında yer alması, lipit matriksli sistemlerde difüzyonun tek başına yeterli olmadığı; matriks gevşemesi/yeniden düzenlenme ve olası erozyon katkılarının da devreye girdiği non-Fickian bir salım davranışını düşündürmektedir. Bu sonuçlar birlikte ele alındığında, MDA-NLT sistemlerinin sıvı lipit/toplam lipit oranına duyarlı biçimde yükleme performansı ve kontrollü salım profili tasarlanabilen; nanoboyutta ve kolloidal açıdan stabiliteyi destekleyen özellikler sergileyen bir ilaç taşınım platformu sunduğu değerlendirilmektedir.

Precirol/Hint yağı temelli PTX yüklü NLT'lerde bileşen bütünlüğü FTIR ile doğrulanmıştır (Şekil 4.32–4.34). Lipit matrise ait alifatik C–H gerilmeleri (~2956–2912–2848 cm^{-1}) ile ester karbonil bölgesi (~1730–1735 cm^{-1}) korunurken; Hint yağının doymamış zincirlerine ilişkin ~3010 cm^{-1} bandı ve yüzey aktif maddenin polioksietilen segmentine ait ~1100 cm^{-1} bandı NLT spektrumlarında izlenmiştir. PTX'e atfedilen ~1650 cm^{-1} civarındaki bant/PTX kaynaklı karbonil bölgesi titreşimlerinin PTX-NLT spektrumunda da takip edilebilmesi, PTX'in sıvı lipit fazı üzerinden lipit çekirdeğe başarılı biçimde aktarıldığını; yeni ve ayırt edici bantların ortaya çıkmaması ise sistemin yeni kovalent bağ oluşumundan ziyade fiziksel birleşim temelli bir mimari sergilediğini düşündürmektedir [289,304]

Kolloidal karakterizasyon sonuçları, PTX-NLT'lerin nanoboyutta üretildiğini ancak dağılım darlığının orta düzeyde kaldığını göstermiştir (Şekil 4.35). Ortalama hidrodinamik partikül boyutu 146.6 ± 5.5 nm ve PDI 0.267 ± 0.07 olarak belirlenmiş; zeta potansiyeli −15.7 ± 1.7 mV bulunmuştur. Negatif zeta potansiyel elektrostatik itmeye dayalı bir stabilite katkısı sağlamakla birlikte, sistemde elektrostatik stabilizasyonun sınırlı olabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle uzun süreli fiziksel stabilitenin sürdürülmesinde sterik stabilizasyonun rolü ile formülasyon ve proses optimizasyonunun önemini arttırmaktadır.

Yükleme performansı değerlendirildiğinde, PTX-NLT 10–30–50 formülasyonlarında %EE'nin dar bir bantta kaldığı (~%86.5–89.2) ve sıvı lipit/toplam lipit oranına bağlı belirgin bir artış eğilimi göstermediği; buna karşın %DLC'nin sıvı lipit oranıyla birlikte anlamlı biçimde yükseldiği (3.6 ± 1.15 - 8.3 ± 0.85) görülmüştür (Tablo 4.37). Bu profil, PTX gibi yüksek hidrofobik etken maddelerde sıvı lipit fraksiyonunun çekirdekte daha amorf mikro-bölgeler oluşturarak etken maddenin lipit fazda çözünmüş biçimde tutulmasına ve toplam yükleme kapasitesinin artmasına katkı sağlayabileceğini düşündürmektedir.

In vitro salım deneyleri, serbest PTX'in hızlı ve neredeyse tam salım sergilediğini (48. saatte ~%96) buna karşılık PTX yüklü NLT'lerde zamana yayılmış ve plato davranışı gösteren kontrollü bir salım profili oluştuğunu göstermiştir (Şekil 4.36; Tablo 4.38). PTX-NLT 10 formülasyonunda 48.

saatte kümülatif salım %53.31'de plato yaparken, daha yüksek sıvı lipit içeren PTX-NLT 50'de salım daha yüksek bir plato düzeyine ulaşmıştır (%61.07). Bu eğilim, sıvı lipit fraksiyonunun matriks düzenliliğini azaltarak PTX'in difüzyonunu kolaylaştırması ve daha erişilebilir mikro-bölgelerde konumlanma olasılığını artırmasıyla ilişkilendirilebilir. İstatistiksel değerlendirmelerde anlamlı bulunan etkiler dikkate alınarak, PTX-NLT 50'nin PTX-NLT 10'a kıyasla tüm zaman noktalarında daha yüksek salım sergilediği ortaya konmuştur ($p<0.05$).

Kinetik model uyumu, PTX salımının NLT sistemlerinde matriks kontrollü bir karakter kazandığını desteklemiştir (Tablo 4.39). Sıfırıncı derece, birinci derece, Higuchi ve Hixson–Crowell modellerinde uyum sınırlı kalırken, Korsmeyer–Peppas modeli her iki formülasyon için en yüksek uyumu vermiştir ($R^2 = 0.996$ ve 0.978). n değerlerinin 0.5–1 aralığında yer alması ($n = 0.778$ ve 0.743), salımın yalnızca Fickian difüzyonla açıklanmadığını; lipit matriksin zamanla yeniden düzenlenmesi gibi süreçlerin de mekanizmaya katkı verdiğini düşündürmektedir. Genel olarak bulgular, PTX'in NLT yapıları içinde yüksek oranda tutulabildiğini, serbest çözeltiye kıyasla kontrollü bir salım profili elde edildiğini ve sıvı lipit oranının salım hızını anlamlı biçimde değiştirebildiğini göstermektedir.

Bu tez çalışmasında, öncelikle T98G glioblastoma hücre hattında TMZ ve MDA'nın sitotoksik etkileri karşılaştırılmıştır. MTT analizleri, TMZ ve MDA'nın 24 ve 48 saat sonunda doz artışı ile birlikte sitotoksik etkilerinin belirginleştiğini ortaya koymuştur. Özellikle 24 saatlik sürede MDA'nın IC_{75} değerinin TMZ'ye kıyasla anlamlı düzeyde daha düşük bulunması, MDA'nın TMZ'e kıyasla T98G hücreleri üzerinde daha güçlü bir erken sitotoksik etki oluşturduğunu düşündürmektedir. Bununla birlikte 48 saat sonunda her iki ajan için IC_{75} değerlerinin düşmesi, zaman uzadıkça sitotoksik etkinin arttığını ve hücrelerin maruziyet süresine duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu durum, glioblastoma hücrelerinin uzun süreli alkilleyici ajanlara karşı artan hassasiyeti ile ilişkilendirilmiştir [305].

Sonraki aşamada MDA yüklü NLT formülasyonlarının T98G hücre canlılığı, hücre alımı ve hücre ölüm mekanizmaları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, MDA yüklü NLT formülasyonlarının T98G hücreleri üzerinde zaman ve doz bağımlı sitotoksik etkiler oluşturduğunu ve nanopartikül temelli taşımanın bu etkiyi artırabileceğini göstermektedir. Ayrıca boş NLT'lerin farklı konsantrasyonlarda hücre canlılığı üzerinde anlamlı bir sitotoksik etki oluşturmaması, kullanılan nanotaşıyıcı sistemin biyouyumlu olduğunu ve gözlenen sitotoksisitenin esas olarak yüklü etkin maddeye bağlı geliştiğini göstermektedir. Bu bulgu, MDA yüklü NLT'lerin değerlendirilmesinde taşıyıcı kaynaklı bir yan etkinin sınırlı olduğunu desteklemektedir. Coumarin-6 ile işaretlenmiş

NLT'lerin 24 ve 48 saat sonunda hücre sitoplazmasında doza bağlı artan floresan ışıma göstermesi, NLT'lerin T98G hücreleri tarafından etkin bir şekilde internalize edildiğini ortaya koymuştur. MDA yüklü NLT'lerin serbest MDA'ya kıyasla hücre canlılığını daha belirgin şekilde azaltması, nanopartikül aracılı ilaç taşınımının sitotoksik etkinliği artırabileceğini düşündürmektedir. Bu artış, NLT'lerin hücre içine alımı kolaylaştırması, hücre içi etken madde konsantrasyonunu artırması ve MDA'nın hücre içi hedeflerle daha etken etkileşime girmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [196,306].

Apopitozis, hücrenin kontrollü bir şekilde ölmesiyle karakterize edilen bir süreçtir ve hücre küçülmesi, membran kabarcıklaşması, kromatin yoğunlaşması ve DNA parçalanması gibi belirgin değişikliklerle neden olmaktadır. Apopitozisin erken evrelerinin tespiti, bu sürecin mekanizmalarını anlamak açısından önemlidir. Sağlıklı hücrelerde fosfatidilserin hücre zarının iç yüzeyinde bulunmaktadır. Ancak apoptozis sırasında fosfatidilserin hücre yüzeyine taşınmaktadır. Bu durum, ölen hücrelerin çevredeki hücreler veya makrofajlar tarafından inflamasyon oluşturmadan tanınmasını ve uzaklaştırılmasını sağlamaktadır. Hücre yüzeyine çıkan fosfatidilserin, kalsiyum varlığında fosfatidilserine özgül olarak bağlanan floresan işaretli Anexin V ile tespit edilebilmektedir. Anexin V genellikle propidyum iyodür (PI) gibi boyalarla birlikte kullanılmaktadır; bu sayede erken apoptotik hücreler, geç apoptotik veya nekrotik hücrelerden ayırt edilebilmektedir. Çünkü PI yalnızca zar bütünlüğü bozulmuş hücrelere girebilmektedir [307,308].

Bulgulara göre, ilginç olarak Anexin V düzeyinin 24 ve 48 saatlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde değişmediği görülmüştür. Ancak 48 saat sonunda hücrelerde yalnızca MDA ve NLT uygulandıktan sonra nekroz oranının arttığı görülmüştür. MDA+NLT grubunda ise bir artış görülmemiştir. Sitotoksite analizleri göz önüne alındığında, T98G hücrelerinin ölümüne nekroz yolağının yalnızca MDA uygulamasının katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Buna rağmen MDA+NLT grubu için nekroz ile hücre ölümünün sitotoksisite düzeyine katkıda bulunmadığı anlaşılmaktadır. T98G hücrelerindeki NLT'ye bağlı ölüm oranları MTT analizlerinde sitotoksik düzeyde olmadığını gösterilse de boş NLT'lerin hücreleri nekroz yoluyla bir miktar öldürdüğü belirlenmiştir.

Beclin 1, anti-apopitotik proteinler olan Bcl-2 ve Bcl-XL ile etkileşen bir protein olarak tanımlanmış olup, bu etkileşim aracılığıyla otofaji ve hücre ölümü arasındaki dengeyi düzenlemede kritik bir rol oynamaktadır. Beclin 1'in BH3 domeninin Bcl-2 veya Bcl-XL'e bağlanması otofajiyi baskılarken, bu inhibisyon fosforilasyon veya ubikuitinasyon gibi post-translasyonel

modifikasyonlarla ortadan kaldırılabilmektedir. Ayrıca, kaspazlar tarafından Beclin 1'in parçalanması, otofajinin baskılanmasına ve apoptotik sinyallerin güçlenmesine yol açarak otofaji ile apoptoz arasında doğrudan bir moleküler çapraz konuşma mekanizması oluşturmaktadır. Bu bağlamda Beclin 1, hücresel stres koşullarında hücre sağkalımı ile programlı hücre ölümü arasındaki kader kararını belirleyen temel bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir [309–312].

Bulgulara göre Beclin-1 ekspresyonundaki artış, zamana bağlı olarak yalnızca 48 saat sonunda MDA'nın yanı sıra MDA yüklü NLT grubunda otofajinin belirgin şekilde aktive olduğunu ortaya koymuştur. Bu sonuçlar, nanopartikül temelli MDA uygulamasının hücrelerde otofaji yanıtını güçlendirdiğini düşündürmektedir.

GPX4, lipid oksidasyonunu güçlü bir şekilde inhibe eden, hem yapısal protein hem de antioksidan enzim olarak görev yapan çok işlevli bir proteindir. Son yıllarda GPX4; lipid ve amino asit metabolizmasında rol alan ve hücresel yaşlanma, onkogenez ve hücre ölümü süreçlerini etkileyen ferroptozisin temel düzenleyicilerinden biri olarak kabul edilmektedir. GPX4 hedeflenerek ferroptozisin indüklenmesinin, özellikle kanser tedavisi açısından umut vadeden bir terapötik strateji olduğunu göstermektedir. Onkogenler ile tümör baskılayıcı genler arasındaki dengenin bozulması, kontrolsüz hücre proliferasyonu ve karsinogeneze yol açarken, ferroptozis öncü kanser hücrelerinin elimine edilmesi ve proliferasyonun baskılanması yoluyla etkili bir antitümör mekanizma olarak tanımlanmıştır. Bu bağlamda GPX4, ferroptozis ile kanser arasındaki ilişkiyi yönlendiren, çok sayıda yukarı ve aşağı akım sinyal yolunu entegre eden merkezi bir düzenleyici olarak öne çıkmaktadır[313].

Elde edilen bulgulara göre GPX4 ekspresyonunun 24 ve 48 saatler sonunda yalnızca MDA yüklü NLT grubunda anlamlı artış göstermesi, hücrelerin oksidatif stres ve lipid peroksidasyonuna karşı bir yanıt geliştirdiğini işaret etmektedir. Bu etkinin MDA grubunda ortaya çıkmaması, MDA'nın yalnızca NLT taşıma sistemi ile uygulandığında T98G hücrelerindeki GPX4 ekspresyonunu arttırdığını ve farklı bir yolak üzerinden hücrelere etki ettiğini göstermektedir. Bu durum yalnızca MDA+NLT uygulamasının T98G hücrelerinde ferroptoz ile hücre ölümünün artış olduğunu gösteren önemli bir bulgu olarak raporlanmıştır.

GSDMD, kaspazlar tarafından kesildikten sonra hücre membranında porlar oluşturan ve böylece piroptozu başlatan temel bir efektör protein olarak tanımlanmaktadır. GSDMD'nin kaspaz aracılı kesimi sonucunda ortaya çıkan N-terminal fragman (GSDMD-NT), oligomerize olarak hücre membranına yerleşir ve büyük porlar oluşturmaktadırlar. Bu süreç hem hücre lizisine yol açar hem de proinflamatuvar sitokinlerin hücre dışına salınmasını kolaylaştırmaktadır. GSDMD, kanonik ve non-

kanonik inflammazom sinyal yollarında sırasıyla kaspaz-1 ve kaspaz-11/4/5 tarafından kesilerek aktive edilen, piroptozun yürütücü proteinidir. GSDMD, kaspaz-1 tarafından aktive edildikten sonra plazma membranına transloke olur ve burada oligomerize olarak nanoporlardan oluşan yapılar meydana getirmektedir. Bu porların oluşumu hücre membran bütünlüğünün bozulmasına ve nihayetinde hücre lizisine neden olmakatadır. Bundan dolayı GSDMD piroptozun gerçekleşmesinde kritik bir role sahiptir [314–316].

Elde edilen bulgulara göre, 24 ve 48 saat sonunda GSDMD'nin yalnızca NLT ve MDA+NLT gruplarında istatistiksel olarak görülen artışı NLT'nin de tek başına hücrelerde bir miktar por oluşumuna bağlı piroptoz yolağı ile ölüme sürükleyebileceği anlaşılmıştır. Her ne kadar T98G hücrelerindeki NLT'ye bağlı ölüm oranları MTT analizlerinde sitotoksik düzeyde olmadığını gösterse de boş NLT'lerin hücreleri piroptoz gibi seçici olarak öldürmesi daha ileri düzeyde araştırılmalı ve farklı doz/formülasyonları ile bu ölümün azaltılması hedeflenmelidir. Böylelikle sentezlenen bu nanopartikül formülasyonunun normal hücreler üzerindeki sitotoksik potansiyeli azaltılarak ve *in vivo* çalışmalarda yan etkisi daha düşük sonuçlar elde edilme potansiyeline sahiptir.

Ferroptoz, demire bağımlı lipid peroksit birikimiyle karakterize edilen, apopitoz, nekroptoz ve piroptozdan moleküler ve morfolojik olarak ayrılan özgün bir düzenlenmiş hücre ölümü türüdür. İlk kez 2003 yılında gözlemlenmiş, ancak "ferroptoz" terimi 2012 yılında tanımlanmıştır. Ferroptozun temel biyokimyasal özelliği, hücre membranlarında özellikle çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidatif hasara uğraması ve toksik lipid peroksitlerinin birikmesidir. Oksidatif stres koşullarında lipid hidroperoksitlerin birikimi ferroptozun ayırt edici bir göstergesi olarak ortaya çıkar. Bu süreçte demir içeren araşidonat lipoksijenazlar (ALOX5, ALOX12, ALOX15, ALOX15B ve ALOXE3) enzimatik lipid peroksidasyonunu katalize ederek ferroptotik hücre ölümünü desteklemektedir. Lipid peroksidasyonu sonucunda ortaya çıkan malondialdehit ve 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi reaktif aldehitler, hücre membranı bütünlüğünü bozmanın yanı sıra protein ve DNA yapılarında değişikliklere yol açarak hücresel hasarı derinleştirmektedir. Özellikle MDA, serbest radikallerin lipidlerle etkileşimi sonucu oluşan stabil bir son ürün olup oksidatif lipid hasarının yaygın bir biyokimyasal göstergesi olarak kabul edilmektedir. Dolayısıyla ferroptozun değerlendirilmesinde lipid reaktif oksijen türlerinin ölçümü, malondihaldehit ve 4-HNE düzeylerinin analizi, ferroptozla ilişkili enzimlerin ekspresyonu ve okside fosfolipitlerin LC-MS/MS temelli lipidomik analizleri yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir [317,318].

Bulgularımıza göre T98G hücrelerindeki malondialdehit pozitif hücre yüzdelerindeki artış, özellikle MDA ve MDA-NLT gruplarında lipid peroksidasyonunun belirginleştiğini göstermektedir. Bu artışın ise zamana bağlı olarak 24 saatte önce MDA+NLT uygulamasından sonra ortaya çıktığını göstermektedir. Bu durum MDA'nın T98G hücrelerini ferroptoz ile ilişkili süreçler öldürebileceğini düşündürmekte ve NLT taşıma sisteminin kullanılmasının bu süreci daha da hızlandırabileceğini göstermektedir.

MLKL, tümör nekroz faktörü (TNF) aracılı hücre ölümünü nekroptoz yoluyla başlatan çok proteinli bir kompleks olan nekrozomun temel bir bileşenidir. Nekroptoz, apopitotik yolakların ve kaspaz aktivitesinin baskılandığı durumlarda ortaya çıkan, programlanmış bir nekroz formu olup, özellikle klasik apoptozu engelleyebilen hücre içi patojenlere karşı önemli bir savunma mekanizması olarak kabul edilmektedir. Nekroptozun yürütülmesi, yalancı kinaz (pseudokinaz) özelliğine sahip MLKL'nin, protein kinaz RIPK3 tarafından fosforilasyonu ile aktive olmasıyla gerçekleşir. Aktive olan MLKL, hücre zarına transloke olarak membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur; bu süreç hücresel membranların yırtılması ve hücre içi bileşenlerin ekstrasellüler ortama salınması ile sonuçlanmaktadır. Bu özellikleriyle MLKL, nekroptozun terminal efektörü olarak görev yapar ve inflamatuvar hücre ölümü süreçlerinde kilit bir rol üstlenmektedir [319,320].

Bu araştırma sonucunda MLKL proteinin yalnızca 48 saat sonunda MDA+NLT uygulaması ile beraber T98G hücrelerinde artması NLT taşıma sisteminin MDA'nın hücreler üzerindeki sitotoksik etkisinin nekroptoz yolağı ile katkıda bulunabileceği anlaşılmaktadır. Yalnızca MDA uygulamasının ise hücreler üzerinde 24 veya 48 saat sonunda nekroptoz ile hücreleri öldürmediği raporlanmıştır.

Sonuç olarak, bu çalışma MDA'nın T98G glioblastoma hücreleri üzerinde TMZ'ye kıyasla güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğunu ve NLT aracılığıyla taşınmasının bu etkiyi artırarak çoklu hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebildiğini göstermektedir. Elde edilen bulgular, nanopartikül temelli yaklaşımların glioblastoma tedavisinde alternatif ve tamamlayıcı stratejiler sunabileceğine işaret etmekte olup, ileri çalışmalar ve in vivo modellerle desteklenmesi gerekmektedir.

Klinikte kabul görmüş tedavi seçeneklerinden olan TMZ'nin detayları tez kapsamında da incelenmiş bozunmaya yatkın yapısı dolayısıyla tedavi etkinliği düşük olup hücrelerde direnç oluşması durumunda sağ kalım sürelerinde beklenen ilerlemelere katkı sunamamaktadır. Nitekim ön ilaç olarak kullanılan TMZ'nin bozunma ürünü MDA'nın DNA'ya bağlanarak ölüm yolaklarını aktive eden bileşik olarak KBB'yi geçemediği göz önünde bulundurulduğunda, KBB'yi geçme potansiyeli barındıran ve bu konuda gelecek yıllarda da birçok çalışmanın konusu olabilecek NLT'ler [321]

vasıtasıyla beyne taşınması, beklenen tedavi etkinliğini yaratmayan TMZ tedavisine yeni bir perspektif sunması açısından önemli olduğu düşünülmektedir. Nitekim bu durumda NLT'lerin KBB geçişi üzerine yapılacak çalışmaların artması potansiyel olarak KBB'yi geçmesi beklenmeyen kemoterapilerin de glioma tedavisi için bir seçenek sunabileceği kanaatiyle PTX yüklü NLT'ler için de tasarım ve optimizasyon süreçleri ile hücre kültür çalışmaları gerçekleştirilmiştir. U87MG hücrelerinde gerçekleştirilen bu çalışmalarda standart bir PTX dozuna göre 4 saatlik uygulama ile 48 saat sonunda IC_{75} değerinin PTX-NLT (2.47 μM) formülasyonlarının PTX'e (6.53 μM) göre 2.6 kat daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez kapsamında glioblastoma bağlamında beyin odaklı ilaç taşınımını destekleyecek nanoyapılı lipit taşıyıcı (NLT) sistemlerinin rasyonel biçimde tasarlanması hedeflenmiş; iki farklı lipit matriksi (Compritol/Oleik Asit ve Precirol/Hint Yağı) üzerinden, üretim proses parametrelerinin partikül boyutu, dağılım genişliği (PDI) ve zeta potansiyeli gibi kritik kalite özellikleri üzerindeki etkileri deney tasarımı yaklaşımıyla sistematik olarak değerlendirilmiştir. NLT'lerin sıcak homojenizasyon ve ultrasonikasyon yöntemleriyle üretilebildiği; ancak hedeflenen düşük boyut–düşük PDI dengesinin kurulmasında prosesin enerji girdisi ile arayüz stabilizasyonu arasındaki etkileşimin belirleyici olduğu gösterilmiştir.

Elde edilen bulgular, yalnızca minimum partikül boyutuna odaklanmanın yeterli olmadığını; düşük boyutun, düşük PDI ve kolloidal stabiliteyi destekleyecek zeta potansiyeli ile birlikte ele alınması gerektiğini ortaya koymuştur. Bu kapsamda belirlenen optimum koşullar doğrulama deneyleriyle desteklenmiş ve her bir matriks için yöntem–parametre kombinasyonlarının yanıtlarını farklı biçimlerde şekillendirdiği görülmüştür.

Üretim Yöntemlerine ait temel sonuçlar

Sıcak homojenizasyon:

- Compritol/OA sisteminde optimum koşullar (SL/TL %38.6; yüzey aktif madde %1.77; süre 2.15 dk) ile 131.6 ± 5.3 nm partikül boyutu, 0.40 ± 0.07 PDI ve −20.9 ± 1.6 mV zeta potansiyeli elde edilmiştir.
- Precirol/Hint Yağı sisteminde optimum koşullar (SL/TL %35.7; yüzey aktif madde %0.69; süre 5 dk) ile 167.9 ± 8.2 nm partikül boyutu, 0.228 ± 0.08 PDI ve −24.3 ± 1.9 mV zeta potansiyeli elde edilmiştir.

Ultrasonikasyon:

- Compritol/OA sisteminde (SL/TL %50 sabit) optimum koşullar (şiddet %36.1; yüzey aktif madde %1.5; süre 2 dk) ile 119.1 ± 6.2 nm partikül boyutu, 0.22 ± 0.03 PDI ve −27.8 ± 2.1 mV zeta potansiyeli elde edilmiştir.

- Precirol/Hint Yağı sisteminde (SL/TL %50 sabit) optimum koşullar (şiddet %25; süre 3 dk; yüzey aktif madde %1) ile 146.6 ± 6.8 nm partikül boyutu, 0.267 ± 0.04 PDI ve −27.2 ± 2.8 mV zeta potansiyeli elde edilmiştir.

TMZ'nin fizyolojik koşullarda bozunmasıyla oluşan MDA'nın farklı sıcaklık–ortam koşullarında değişen oluşum profilleri, taşıyıcı sistemlerin tasarımında "bozunma ürünü dinamiklerinin" dikkate alınması gerektiğini göstermiştir. Bu yaklaşım, TMZ için hem hücre kültürü deney tasarımlarında doz ve deney süreçlerinin hem de MDA-NLT sistemlerinin yükleme–salım kurgusunun değerlendirilmesine olanak tanımıştır. Etken madde (MDA ve PTX) yüklü NLT'lerin karakterizasyon sonuçları, formülasyonların ilaç taşınım sistemine uygun fiziksel özellikler sergilediğini ve kolloidal açıdan değerlendirilebilir bir stabilite profiline sahip olduğunu göstermiştir.

Bu nanopartiküller ile geçekleştirilen in vitro çalışmalarla;

- MDA-NLT: Sıvı lipit/toplam lipit oranının artırılmasıyla yükleme kapasitesinin yükseltilebildiği; NLT formülasyonlarının serbest MDA'ya kıyasla daha kontrollü bir salım profili sergilediği gösterilmiştir. Hücre çalışmalarında Coumarin-6 ile işaretlenen NLT'lerin T98G hücrelerinde doza bağlı hücre içi alımı gözlenmiş; MDA yüklü NLT'lerin serbest MDA'ya kıyasla hücre canlılığını daha belirgin azaltabildiği ve hücre ölüm mekanizmaları açısından otofaji/ferroptozis ilişkili yolaklara işaret eden bulgular sunduğu değerlendirilmiştir.
- PTX-NLT: Precirol/Hint Yağı temelli PTX yüklü NLT'lerde yüksek enkapsülasyon ve kontrollü salım davranışı ile birlikte, U87MG hücrelerinde PTX'nin NLT ile taşınmasının sitotoksik etkinliği artırabildiği gösterilmiştir. Bu sayede gelecekte de yapılacak çalışmalarda NLT'ler sayesinde çok daha düşük dozlarda etken malzemeler ile gliomalarda etkili tedavi seçeneği sunabileceği kanaatine varılmıştır.

Gelecek perspektifleri ve öneriler;

- Nanopartikül ailesi içinde endüstriyel ölçeğe yatkınlığı nedeniyle NLT'lerin sentez parametrelerinin ayrıntılandırılarak pilot ölçek üretim süreçlerine taşınması; bu aşamada kritik proses parametrelerinin (enerji girdisi/enerji yoğunluğu, karıştırma–kesme profili, sıcaklık kontrolü, süre, şiddet ve yüzey aktif madde düzeyi) proses penceresi yaklaşımıyla yeniden tanımlanması ve tekrarlanabilirlik analizlerinin gerçekleştirilmesi önerilmektedir. Bu kapsamda, laboratuvar ölçeğinde belirlenen optimum koşulların ekipman bağımlılığının değerlendirilmesi, ölçek büyütmeye uygun

eşdeğerlik kriterlerinin kurulması ve kalite-odaklı üretim (QbD) perspektifiyle kritik kalite özelliklerinin (boyut–PDI–zeta) proses boyunca izlenmesi önem taşımaktadır.

- Klinik uygulamada kabul görmüş tedavi seçeneklerinden TMZ'nin beklenen etkinliğinin her zaman sağlanamaması, ilacın fizyolojik koşullarda bozunmaya yatkın doğası ve aktif türlerin hedef bölgede kontrol edilebilir düzeylerde tutulmasındaki güçlüklerle ilişkilidir. Bu nedenle, TMZ'nin bozunma ürünü olarak glioma hücre proliferasyonunu kısıtlayıcı potansiyel taşıyan MDA'nın NLT'ler aracılığıyla taşınmasına yönelik yaklaşımın translasyonel değer kazanabilmesi için, seçilen NLT formülasyonlarının KBB'yi aşma mekanizmalarının ayrıntılı olarak ortaya konması kritik önemdedir. İleri çalışmalarda in vitro KBB modellerinde (Transwell temelli endotel/astrosit-kokültür sistemleri) taşınım kinetiğinin nicel olarak belirlenmesi; reseptör/aracılı transsitoz, adsorptif transsitoz ve hücre içi trafiklenme gibi olası yolların mekanistik doğrulamalarla değerlendirilmesi önerilmektedir.

- KBB geçişinde avantaj sağlayabilecek nanoplatformların geliştirilmesi, tez kapsamında belirli ölçüde değerlendirilen MDA gibi adayların ötesinde, gliomalarda henüz yerleşik kemoterapötik uygulaması bulunmayan veya klinik kullanımı sınırlı etken maddeler için de yeni bir translasyonel değerlendirme çerçevesi sunmaktadır. Bu doğrultuda, NLT platformunun farklı etken madde sınıflarıyla (hidrofilik/lipofilik, farklı kimyasal stabilite profilleri) uyumluluğunun sistematik olarak taranması; uygun adayların KBB geçişi, beyin dokusu dağılımı ve tümör mikroçevresinde etkin konsantrasyonlara ulaşma potansiyeli açısından karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi önerilmektedir.

- Bu tez kapsamında geliştirilen üretim ve kapsamlı formülasyon stratejilerinin, uygun in vivo modellerde biyodağılım/KBB geçişi, etkinlik ve güvenlilik (akut–subkronik toksisite, hedef-dışı doku maruziyeti ve olası immün yanıtlar) parametreleri üzerinden doğrulanması ve elde edilecek veriler ışığında klinik araştırmalara geçiş fizibilitesinin planlanması ve değerlendirilmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

[1] S. Bayda, M. Adeel, T. Tuccinardi, M. Cordani, F. Rizzolio, The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical–physical applications to nanomedicine, Molecules 25 (2019) 112.

[2] A. Barhoum, M.L. García-Betancourt, J. Jeevanandam, E.A. Hussien, S.A. Mekkawy, M. Mostafa, M.M. Omran, M.S. Abdalla, M. Bechelany, Review on Natural, Incidental, Bioinspired, and Engineered Nanomaterials: History, Definitions, Classifications, Synthesis, Properties, Market, Toxicities, Risks, and Regulations, Nanomaterials 12 (2022). https://doi.org/10.3390/nano12020177.

[3] F. Babick, J. Mielke, W. Wohlleben, S. Weigel, V.-D. Hodoroaba, How reliably can a material be classified as a nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work, Journal of Nanoparticle Research 18 (2016) 1–40.

[4] I. Freestone, N. Meeks, M. Sax, C. Higgitt, The Lycurgus cup—a roman nanotechnology, Gold Bull 40 (2007) 270–277.

[5] M. Faraday, X. The Bakerian Lecture.—Experimental relations of gold (and other metals) to light, Philos Trans R Soc Lond (1857) 145–181.

[6] A. Einstein, Über die von der molekularkinetischen Theorie der Wärme geforderte Bewegung von in ruhenden Flüssigkeiten suspendierten Teilchen, Ann Phys 4 (1905).

[7] J. Perrin, Mouvement brownien et réalité moléculaire, (1909).

[8] E. Ruska, The development of the electron microscope and of electron microscopy (Nobel Lecture), Angewandte Chemie International Edition in English 26 (1987) 595–605.

[9] M. Knoll, E. Ruska, Das elektronenmikroskop, Zeitschrift Für Physik 78 (1932) 318–339.

[10] R.P. Feynman, B There's plenty of room at the bottom, (1959).

[11] N. Taniguchi, On the basic concept of'nano-technology', in: Proc. Intl. Conf. Prod. Eng. Tokyo, Part II, 1974, Japan Society of Precision Engineering, 1974.

[12] G. Binnig, C.F. Quate, C. Gerber, Atomic force microscope, Phys Rev Lett 56 (1986) 930.

[13] Y.C. Barenholz, Doxil®—The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned, Journal of Controlled Release 160 (2012) 117–134.

[14] N. Pardi, M.J. Hogan, F.W. Porter, D. Weissman, mRNA vaccines—a new era in vaccinology, Nat Rev Drug Discov 17 (2018) 261–279.

[15] L. Schoenmaker, D. Witzigmann, J.A. Kulkarni, R. Verbeke, G. Kersten, W. Jiskoot, D.J.A. Crommelin, mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability, Int J Pharm 601 (2021) 120586.

[16] R. Abbasi, G. Shineh, M. Mobaraki, S. Doughty, L. Tayebi, Structural parameters of nanoparticles affecting their toxicity for biomedical applications: a review, Journal of Nanoparticle Research 25 (2023). https://doi.org/10.1007/s11051-023-05690-w.

[17] N. Abid, A.M. Khan, S. Shujait, K. Chaudhary, M. Ikram, M. Imran, J. Haider, M. Khan, Q. Khan, M. Maqbool, Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review, Adv Colloid Interface Sci 300 (2022). https://doi.org/10.1016/j.cis.2021.102597.

[18] P. Szczyglewska, A. Feliczak-Guzik, I. Nowak, Nanotechnology–General Aspects: A Chemical Reduction Approach to the Synthesis of Nanoparticles, Molecules 28 (2023). https://doi.org/10.3390/molecules28134932.
[19] R.A. Petros, J.M. Desimone, Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, Nat Rev Drug Discov 9 (2010) 615–627. https://doi.org/10.1038/nrd2591.
[20] S. Mura, J. Nicolas, P. Couvreur, Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery, Nat Mater 12 (2013) 991–1003. https://doi.org/10.1038/nmat3776.
[21] N. Joudeh, D. Linke, Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists, J Nanobiotechnology 20 (2022). https://doi.org/10.1186/s12951-022-01477-8.
[22] S. Kumari, S. Raturi, S. Kulshrestha, K. Chauhan, S. Dhingra, K. András, K. Thu, R. Khargotra, T. Singh, A comprehensive review on various techniques used for synthesizing nanoparticles, Journal of Materials Research and Technology 27 (2023) 1739–1763. https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2023.09.291.
[23] Y. Khan, H. Sadia, S.Z. Ali Shah, M.N. Khan, A.A. Shah, N. Ullah, M.F. Ullah, H. Bibi, O.T. Bafakeeh, N. Ben Khedher, S.M. Eldin, B.M. Fadhl, M.I. Khan, Classification, Synthetic, and Characterization Approaches to Nanoparticles, and Their Applications in Various Fields of Nanotechnology: A Review, Catalysts 12 (2022). https://doi.org/10.3390/catal12111386.
[24] T. Xing, J. Sunarso, W. Yang, Y. Yin, A.M. Glushenkov, L.H. Li, P.C. Howlett, Y. Chen, Ball milling: A green mechanochemical approach for synthesis of nitrogen doped carbon nanoparticles, Nanoscale 5 (2013) 7970–7976. https://doi.org/10.1039/c3nr02328a.
[25] M. 1 Divya, K. Vaykos, M. 2 Monika, R. Lingayat, R. Mohan, A Review on Nanoparticles synthesis, classification and it's applications, 2023. www.ijnrd.org.
[26] B. Mekuye, B. Abera, Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications, Nano Select 4 (2023) 486–501. https://doi.org/10.1002/nano.202300038.
[27] A. Vinukonda, N. Bolledla, R.K. Jadi, R. Chinthala, V.R. Devadasu, Synthesis of nanoparticles using advanced techniques, Next Nanotechnology 8 (2025). https://doi.org/10.1016/j.nxnano.2025.100169.
[28] D. Bokov, A. Turki Jalil, S. Chupradit, W. Suksatan, M. Javed Ansari, I.H. Shewael, G.H. Valiev, E. Kianfar, Nanomaterial by Sol-Gel Method: Synthesis and Application, Advances in Materials Science and Engineering 2021 (2021). https://doi.org/10.1155/2021/5102014.
[29] O. Gazil, D. Alonso Cerrón-Infantes, N. Virgilio, M.M. Unterlass, Hydrothermal synthesis of metal nanoparticles@hydrogels and statistical evaluation of reaction conditions' effects on nanoparticle morphologies, Nanoscale 16 (2024) 17778–17792. https://doi.org/10.1039/d4nr00581c.
[30] Y.M. Manawi, Ihsanullah, A. Samara, T. Al-Ansari, M.A. Atieh, A review of carbon nanomaterials' synthesis via the chemical vapor deposition (CVD) method, Materials 11 (2018). https://doi.org/10.3390/ma11050822.
[31] S. Roy, R. Kumar, A. Acooli, S. Roy, A. Chatterjee, S. Chattaraj, J. Nayak, B.H. Jeon, A. Basu, S. Banerjee, S. Chakrabortty, S.K. Tripathy, Transforming Nanomaterial Synthesis through Advanced Microfluidic Approaches: A Review on Accessing Unrestricted Possibilities, Journal of Composites Science 8 (2024). https://doi.org/10.3390/jcs8100386.
[32] A. Balachandran, S.P. Sreenilayam, K. Madanan, S. Thomas, D. Brabazon, Nanoparticle production via laser ablation synthesis in solution method and printed electronic

application - A brief review, Results in Engineering 16 (2022). https://doi.org/10.1016/j.rineng.2022.100646.
[33] N. Baig, I. Kammakakam, W. Falath, I. Kammakakam, Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges, Mater Adv 2 (2021) 1821–1871. https://doi.org/10.1039/d0ma00807a.
[34] S. Link, M.A. El-Sayed, Spectral properties and relaxation dynamics of surface plasmon electronic oscillations in gold and silver nanodots and nanorods, J Phys Chem B 103 (1999) 8410–8426.
[35] W.J. Stark, P.R. Stoessel, W. Wohlleben, A. Hafner, Industrial applications of nanoparticles, Chem Soc Rev 44 (2015) 5793–5805.
[36] W. Najahi-Missaoui, R.D. Arnold, B.S. Cummings, Safe nanoparticles: are we there yet?, Int J Mol Sci 22 (2020) 385.
[37] M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley, M.E. Wechsler, N.A. Peppas, R. Langer, Engineering precision nanoparticles for drug delivery, Nat Rev Drug Discov 20 (2021) 101–124.
[38] M. Gisbert-Garzarán, M. Manzano, M. Vallet-Regí, Mesoporous silica nanoparticles for the treatment of complex bone diseases: Bone cancer, bone infection and osteoporosis, Pharmaceutics 12 (2020) 83.
[39] G. Chen, I. Roy, C. Yang, P.N. Prasad, Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy, Chem Rev 116 (2016) 2826–2885.
[40] S. Anjum, S. Ishaque, H. Fatima, W. Farooq, C. Hano, B.H. Abbasi, I. Anjum, Emerging applications of nanotechnology in healthcare systems: Grand challenges and perspectives, Pharmaceuticals 14 (2021) 707.
[41] A. Rastogi, M. Zivcak, O. Sytar, H.M. Kalaji, X. He, S. Mbarki, M. Brestic, Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: a critical review, Front Chem 5 (2017) 78.
[42] M.-C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, Chem Rev 104 (2004) 293–346.
[43] F. Tang, L. Li, D. Chen, Mesoporous silica nanoparticles: synthesis, biocompatibility and drug delivery, Advanced Materials 24 (2012) 1504–1534.
[44] B. Issa, I.M. Obaidat, B.A. Albiss, Y. Haik, Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications, Int J Mol Sci 14 (2013) 21266–21305.
[45] W.R. Algar, M. Massey, K. Rees, R. Higgins, K.D. Krause, G.H. Darwish, W.J. Peveler, Z. Xiao, H.-Y. Tsai, R. Gupta, Photoluminescent nanoparticles for chemical and biological analysis and imaging, Chem Rev 121 (2021) 9243–9358.
[46] M. Colombo, S. Carregal-Romero, M.F. Casula, L. Gutiérrez, M.P. Morales, I.B. Böhm, J.T. Heverhagen, D. Prosperi, W.J. Parak, Biological applications of magnetic nanoparticles, Chem Soc Rev 41 (2012) 4306–4334.
[47] T. Kim, T. Hyeon, Applications of inorganic nanoparticles as therapeutic agents, Nanotechnology 25 (2013) 012001.
[48] S. Mitragotri, P. Stayton, Organic nanoparticles for drug delivery and imaging, MRS Bull 39 (2014) 219–223.
[49] R. Kumar, S. Lal, Synthesis of organic nanoparticles and their applications in drug delivery and food nanotechnology: a review. J Nanomater Mol Nanotechnol 3: 4, Of 11 (2014) 2.
[50] S.A. Dilliard, D.J. Siegwart, Passive, active and endogenous organ-targeted lipid and polymer nanoparticles for delivery of genetic drugs, Nat Rev Mater 8 (2023) 282–300.

[51] T. Casalini, F. Rossi, A. Castrovinci, G. Perale, A perspective on polylactic acid-based polymers use for nanoparticles synthesis and applications, Front Bioeng Biotechnol 7 (2019) 259.
[52] M. Elmowafy, K. Shalaby, M.H. Elkomy, O.A. Alsaidan, H.A.M. Gomaa, M.A. Abdelgawad, E.M. Mostafa, Polymeric nanoparticles for delivery of natural bioactive agents: recent advances and challenges, Polymers (Basel) 15 (2023) 1123.
[53] K. Divya, M.S. Jisha, Chitosan nanoparticles preparation and applications, Environ Chem Lett 16 (2018) 101–112.
[54] K.K. Chereddy, G. Vandermeulen, V. Préat, PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity, Wound Repair and Regeneration 24 (2016) 223–236.
[55] B. García-Pinel, C. Porras-Alcalá, A. Ortega-Rodríguez, F. Sarabia, J. Prados, C. Melguizo, J.M. López-Romero, Lipid-based nanoparticles: application and recent advances in cancer treatment, Nanomaterials 9 (2019) 638.
[56] L. Bayón-Cordero, I. Alkorta, L. Arana, Application of solid lipid nanoparticles to improve the efficiency of anticancer drugs, Nanomaterials 9 (2019) 474.
[57] M.A. Rahman, M. Jalouli, M.K. Yadab, M. Al-Zharani, Progress in drug delivery systems based on nanoparticles for improved glioblastoma therapy: addressing challenges and investigating opportunities, Cancers (Basel) 17 (2025) 701.
[58] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, A. Akbarzadeh, Application of liposomes in medicine and drug delivery, Artif Cells Nanomed Biotechnol 44 (2016) 381–391.
[59] K.S. Ahmed, S.A. Hussein, A.H. Ali, S.A. Korma, Q. Lipeng, C. Jinghua, Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications, J Drug Target 27 (2019) 742–761.
[60] A.J. Almeida, E. Souto, Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins, Adv Drug Deliv Rev 59 (2007) 478–490.
[61] V.J. Lingayat, N.S. Zarekar, R.S. Shendge, Solid lipid nanoparticles: a review, Nanosci. Nanotechnol. Res 4 (2017) 67–72.
[62] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, Res Pharm Sci 13 (2018) 288–303.
[63] C. Viegas, A.B. Patrício, J.M. Prata, A. Nadhman, P.K. Chintamaneni, P. Fonte, Solid lipid nanoparticles vs. nanostructured lipid carriers: a comparative review, Pharmaceutics 15 (2023) 1593.
[64] R.H. Müller, R.D. Petersen, A. Hommoss, J. Pardeike, Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products, Adv Drug Deliv Rev 59 (2007) 522–530.
[65] World Health Organization, Cancer, 2025. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer (accessed July 12, 2025).
[66] American Cancer Society, What Is Cancer?, 2025. https://www.cancer.org/cancer/understanding-cancer/what-is-cancer.html (accessed July 12, 2025).
[67] L.M. O'Keeffe, G. Taylor, R.R. Huxley, P. Mitchell, M. Woodward, S.A.E. Peters, Smoking as a risk factor for lung cancer in women and men: A systematic review and meta-analysis, BMJ Open 8 (2018). https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-021611.
[68] A. Khalade, M.S. Jaakkola, E. Pukkala, J.J.K. Jaakkola, Exposure to benzene at work and the risk of leukemia: a systematic review and meta-analysis, Environmental Health 9 (2010) 31.

[69] M.L. Iglesias, A. Schmidt, A. Al Ghuzlan, L. Lacroix, F. de Vathaire, S. Chevillard, M. Schlumberger, Radiation exposure and thyroid cancer: a review, Arch Endocrinol Metab 61 (2017) 180–187.
[70] S. Pathak, J.R. Wilczyński, E. Paradowska, Factors in oncogenesis: viral infections in ovarian cancer, Cancers (Basel) 12 (2020) 561.
[71] H. Cui, J. Zhang, X. Lang, C. Huang, S. Yang, Exploring the causal relationship between obesity, immune cell characteristics and cervical cancer risk using Mendelian randomization, Discover Oncology 16 (2025) 1268. https://doi.org/10.1007/s12672-025-03111-z.
[72] C.R. Boland, S.N. Thibodeau, S.R. Hamilton, D. Sidransky, J.R. Eshleman, R.W. Burt, S.J. Meltzer, M.A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G.N. Ranzani, A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer, Cancer Res 58 (1998) 5248–5257.
[73] D. Hanahan, Hallmarks of Cancer: New Dimensions, Cancer Discov 12 (2022) 31–46. https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
[74] R.L. Siegel, K.D. Miller, N.S. Wagle, A. Jemal, Cancer statistics, 2023, CA Cancer J Clin 73 (2023) 17–48. https://doi.org/10.3322/caac.21763.
[75] D. Sonkin, A. Thomas, B.A. Teicher, Cancer treatments: Past, present, and future, Cancer Genet 286–287 (2024) 18–24. https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2024.06.002.
[76] O. Yücel, A. Şengelen, S. Emik, E. Önay-Uçar, N. Arda, G. Gürdağ, Folic acid-modified methotrexate-conjugated gold nanoparticles as nano-sized trojans for drug delivery to folate receptor-positive cancer cells, Nanotechnology 31 (2020) 355101.
[77] B.A. Chabner, T.G. Roberts Jr, Chemotherapy and the war on cancer, Nat Rev Cancer 5 (2005) 65–72.
[78] American Cancer Society, Cancer Facts and Statistics, 2025. https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics.html (accessed July 12, 2025).
[79] International Agency for Research on Cancer, Global Cancer Observatory, (2025). https://gco.iarc.who.int/en (accessed July 12, 2025).
[80] Eurostat, Cancer Statistics, 2025. https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Cancer_statistics (accessed July 12, 2025).
[81] International Agency for Research on Cancer, Global Cancer Observatory-Türkiye Statistics, 2025. https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/populations/792-turkiye-fact-sheet.pdf (accessed July 12, 2025).
[82] Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Turkiye Kanser Istatistikleri-2020, (2020). https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/kanser-istatistikleri.html (accessed July 12, 2025).
[83] OECD, Tackling the Impact of Cancer on Health, the Economy and Society, OECD, 2024. https://doi.org/10.1787/85e7c3ba-en.
[84] T. Hofmarcher, P. Lindgren, N. Wilking, B. Jönsson, The cost of cancer in Europe 2018, Eur J Cancer 129 (2020) 41–49. https://doi.org/10.1016/j.ejca.2020.01.011.
[85] A. Kontsevaya, J. Farrington, M. Balcılar, T. Ergüder, Prevention and control of noncommunicable diseases in Turkey, World Health Organization (2018).
[86] B. Liu, H. Zhou, L. Tan, K.T.H. Siu, X.Y. Guan, Exploring treatment options in cancer: Tumor treatment strategies, Signal Transduct Target Ther 9 (2024). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01856-7.
[87] U. Anand, A. Dey, A.K.S. Chandel, R. Sanyal, A. Mishra, D.K. Pandey, V. De Falco, A. Upadhyay, R. Kandimalla, A. Chaudhary, J.K. Dhanjal, S. Dewanjee, J. Vallamkondu, J.M. Pérez de la Lastra, Cancer chemotherapy and beyond: Current status, drug

candidates, associated risks and progress in targeted therapeutics, Genes Dis 10 (2023) 1367–1401. https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.02.007.

[88] K. Spencer, R. Parrish, R. Barton, A. Henry, Palliative radiotherapy, BMJ (Online) 360 (2018). https://doi.org/10.1136/bmj.k821.

[89] S. Fisher, H. Gao, Y. Yasui, K. Dabbs, M. Winget, Survival in stage I-III breast cancer patients by surgical treatment in a publicly funded health care system, Annals of Oncology 26 (2015) 1161–1169. https://doi.org/10.1093/annonc/mdv107.

[90] D. Fan, Y. Cao, M. Cao, Y. Wang, Y. Cao, T. Gong, Nanomedicine in cancer therapy, Signal Transduct Target Ther 8 (2023). https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y.

[91] B.K. Kashyap, V.V. Singh, M.K. Solanki, A. Kumar, J. Ruokolainen, K.K. Kesari, Smart Nanomaterials in Cancer Theranostics: Challenges and Opportunities, ACS Omega 8 (2023) 14290–14320. https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07840.

[92] P. Zhang, Y. Xiao, X. Sun, X. Lin, S. Koo, A. V. Yaremenko, D. Qin, N. Kong, O.C. Farokhzad, W. Tao, Cancer nanomedicine toward clinical translation: Obstacles, opportunities, and future prospects, Med 4 (2023) 147–167. https://doi.org/10.1016/j.medj.2022.12.001.

[93] M. Ferrari, Cancer nanotechnology: Opportunities and challenges, Nat Rev Cancer 5 (2005) 161–171. https://doi.org/10.1038/nrc1566.

[94] J. Shi, P.W. Kantoff, R. Wooster, O.C. Farokhzad, Cancer nanomedicine: Progress, challenges and opportunities, Nat Rev Cancer 17 (2017) 20–37. https://doi.org/10.1038/nrc.2016.108.

[95] S. Setua, M. Ouberai, S.G. Piccirillo, C. Watts, M. Welland, Cisplatin-tethered gold nanospheres for multimodal chemo-radiotherapy of glioblastoma, Nanoscale 6 (2014) 10865–10873.

[96] E. Agostinelli, F. Vianello, G. Magliulo, T. Thomas, T.J. Thomas, Nanoparticle strategies for cancer therapeutics: Nucleic acids, polyamines, bovine serum amine oxidase and iron oxide nanoparticles, Int J Oncol 46 (2014) 5–16.

[97] R. Kaur, A. Bhardwaj, S. Gupta, Cancer treatment therapies: traditional to modern approaches to combat cancers, Mol Biol Rep 50 (2023) 9663–9676. https://doi.org/10.1007/s11033-023-08809-3.

[98] M. Chehelgerdi, M. Chehelgerdi, O.Q.B. Allela, R.D.C. Pecho, N. Jayasankar, D.P. Rao, T. Thamaraikani, M. Vasanthan, P. Viktor, N. Lakshmaiya, M.J. Saadh, A. Amajd, M.A. Abo-Zaid, R.Y. Castillo-Acobo, A.H. Ismail, A.H. Amin, R. Akhavan-Sigari, Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation, Mol Cancer 22 (2023). https://doi.org/10.1186/s12943-023-01865-0.

[99] A. Yusuf, A.R.Z. Almotairy, H. Henidi, O.Y. Alshehri, M.S. Aldughaim, Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the Implication of Nanoparticles' Physicochemical Properties on Responses in Biological Systems, Polymers (Basel) 15 (2023). https://doi.org/10.3390/polym15071596.

[100] B. Wang, S. Hu, Y. Teng, J. Chen, H. Wang, Y. Xu, K. Wang, J. Xu, Y. Cheng, X. Gao, Current advance of nanotechnology in diagnosis and treatment for malignant tumors, Signal Transduct Target Ther 9 (2024). https://doi.org/10.1038/s41392-024-01889-y.

[101] A. Pulumati, A. Pulumati, B.S. Dwarakanath, A. Verma, R.V.L. Papineni, Technological advancements in cancer diagnostics: Improvements and limitations, Cancer Rep 6 (2023). https://doi.org/10.1002/cnr2.1764.

[102] M. Chehelgerdi, M. Chehelgerdi, O.Q.B. Allela, R.D.C. Pecho, N. Jayasankar, D.P. Rao, T. Thamaraikani, M. Vasanthan, P. Viktor, N. Lakshmaiya, Progressing nanotechnology

to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation, Mol Cancer 22 (2023) 169.
[103] D. Peer, J.M. KarP, S. Hong, oMiD C. faroKHzaD, riMona Margalit, robert langer, Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy, 2007. www.nature.com/naturenanotechnology.
[104] S. Wang, Y. Chen, J. Guo, Q. Huang, Liposomes for Tumor Targeted Therapy: A Review, Int J Mol Sci 24 (2023). https://doi.org/10.3390/ijms24032643.
[105] F. Rodríguez, P. Caruana, N. De la Fuente, P. Español, M. Gámez, J. Balart, E. Llurba, R. Rovira, R. Ruiz, C. Martín-Lorente, J.L. Corchero, M.V. Céspedes, Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges, Biomolecules 12 (2022). https://doi.org/10.3390/biom12060784.
[106] J. Li, D.J. Burgess, Nanomedicine-based drug delivery towards tumor biological and immunological microenvironment, Acta Pharm Sin B 10 (2020) 2110–2124.
[107] L. Sun, H. Liu, Y. Ye, Y. Lei, R. Islam, S. Tan, R. Tong, Y.B. Miao, L. Cai, Smart nanoparticles for cancer therapy, Signal Transduct Target Ther 8 (2023). https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x.
[108] E. Haro-Martínez, E. Muscolino, N. Moral, J. Duran, C. Fornaguera, Crossing the blood–brain barrier: nanoparticle-based strategies for neurodegenerative disease therapy, Drug Deliv Transl Res (2025). https://doi.org/10.1007/s13346-025-01887-9.
[109] M. Bentivoglio, K. Kristensson, Tryps and trips: Cell trafficking across the 100-year-old blood-brain barrier, Trends Neurosci 37 (2014) 325–333. https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.03.007.
[110] R. Daneman, A. Prat, The blood–brain barrier, Cold Spring Harb Perspect Biol 7 (2015). https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020412.
[111] S. Zha, H. Liu, H. Li, H. Li, K.L. Wong, A.H. All, Functionalized Nanomaterials Capable of Crossing the Blood-Brain Barrier, ACS Nano 18 (2024) 1820–1845. https://doi.org/10.1021/acsnano.3c10674.
[112] E.E. Goldmann, Vitalfärbung am Zentralnervensystem: Beitrag zur Physio-Pathologie des Plexux Chorioideus und der Hirnhäute, (No Title) (1913).
[113] M.D. Sweeney, Z. Zhao, A. Montagne, A.R. Nelson, B. V Zlokovic, Blood-brain barrier: from physiology to disease and back, Physiol Rev (2018).
[114] H. Kadry, B. Noorani, L. Cucullo, A blood–brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity, Fluids Barriers CNS 17 (2020). https://doi.org/10.1186/s12987-020-00230-3.
[115] S.J. Pfau, U.H. Langen, T.M. Fisher, I. Prakash, F. Nagpurwala, R.A. Lozoya, W.C.A. Lee, Z. Wu, C. Gu, Characteristics of blood–brain barrier heterogeneity between brain regions revealed by profiling vascular and perivascular cells, Nat Neurosci 27 (2024) 1892–1903. https://doi.org/10.1038/s41593-024-01743-y.
[116] S. Dohgu, F. Takata, A. Yamauchi, S. Nakagawa, T. Egawa, M. Naito, T. Tsuruo, Y. Sawada, M. Niwa, Y. Kataoka, Brain pericytes contribute to the induction and up-regulation of blood-brain barrier functions through transforming growth factor-β production, Brain Res 1038 (2005) 208–215. https://doi.org/10.1016/j.brainres.2005.01.027.
[117] R. Haddad-Tóvolli, N.R. V Dragano, A.F.S. Ramalho, L.A. Velloso, Development and function of the blood-brain barrier in the context of metabolic control, Front Neurosci 11 (2017) 224.
[118] B.P. Heithoff, K.K. George, A.N. Phares, I.A. Zuidhoek, C. Munoz-Ballester, S. Robel, Astrocytes are necessary for blood–brain barrier maintenance in the adult mouse brain, Glia 69 (2021) 436–472.

[119] S. Wohlfart, S. Gelperina, J. Kreuter, Transport of drugs across the blood-brain barrier by nanoparticles, Journal of Controlled Release 161 (2012) 264–273. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.08.017.
[120] A.M. Hersh, S. Alomari, B.M. Tyler, Crossing the Blood-Brain Barrier: Advances in Nanoparticle Technology for Drug Delivery in Neuro-Oncology, Int J Mol Sci 23 (2022). https://doi.org/10.3390/ijms23084153.
[121] L.M. Herda, E. Polo, P.M. Kelly, L. Rocks, D. Hudecz, K.A. Dawson, Designing the future of nanomedicine: Current barriers to targeted brain therapeutics, Eur J Nanomed 6 (2014) 127–139. https://doi.org/10.1515/ejnm-2014-0022.
[122] S.M. Lombardo, M. Schneider, A.E. Türeli, N.G. Türeli, Key for crossing the BBB with nanoparticles: the rational design, Beilstein Journal of Nanotechnology 11 (2020) 866–883.
[123] R. Pandit, L. Chen, J. Götz, The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery, Adv Drug Deliv Rev 165 (2020) 1–14.
[124] E.G. Knox, M.R. Aburto, G. Clarke, J.F. Cryan, C.M. O'Driscoll, The blood-brain barrier in aging and neurodegeneration, Mol Psychiatry 27 (2022) 2659–2673.
[125] A. Lalatsa, A.M. Butt, Physiology of the blood–brain barrier and mechanisms of transport across the BBB, in: Nanotechnology-Based Targeted Drug Delivery Systems for Brain Tumors, Elsevier, 2018: pp. 49–74.
[126] S. Latif, Y.S. Kang, Blood–Brain Barrier Solute Carrier Transporters and Motor Neuron Disease, Pharmaceutics 14 (2022). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102167.
[127] L.L. Sun, H.Y. He, W. Li, W.L. Jin, Y.J. Wei, The solute carrier transporters (SLCs) family in nutrient metabolism and ferroptosis, Biomark Res 12 (2024). https://doi.org/10.1186/s40364-024-00645-2.
[128] R. Zaragozá, Transport of Amino Acids Across the Blood-Brain Barrier, Front Physiol 11 (2020). https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00973.
[129] N.J. Abbott, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood–brain barrier, Neurobiol Dis 37 (2010) 13–25.
[130] J. Song, C. Lu, J. Leszek, J. Zhang, Design and development of nanomaterial-based drug carriers to overcome the blood–brain barrier by using different transport mechanisms, Int J Mol Sci 22 (2021) 10118.
[131] F. Zhao, L. Zhong, Y. Luo, Endothelial glycocalyx as an important factor in composition of blood-brain barrier, CNS Neurosci Ther 27 (2021) 26–35.
[132] S.L. van den Broek, V. Shalgunov, M.M. Herth, Transport of nanomedicines across the blood-brain barrier: Challenges and opportunities for imaging and therapy, Biomaterials Advances 141 (2022). https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213125.
[133] F. Hervé, N. Ghinea, J.M. Scherrmann, CNS delivery via adsorptive transcytosis, AAPS Journal 10 (2008) 455–472. https://doi.org/10.1208/s12248-008-9055-2.
[134] S. Ding, A.I. Khan, X. Cai, Y. Song, Z. Lyu, D. Du, P. Dutta, Y. Lin, Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies, Materials Today 37 (2020) 112–125. https://doi.org/10.1016/j.mattod.2020.02.001.
[135] A.S. Haqqani, K. Bélanger, D.B. Stanimirovic, Receptor-mediated transcytosis for brain delivery of therapeutics: receptor classes and criteria, Frontiers in Drug Delivery 4 (2024). https://doi.org/10.3389/fddev.2024.1360302.
[136] Y. Li, R. Liu, Z. Zhao, Targeting Brain Drug Delivery with Macromolecules Through Receptor-Mediated Transcytosis, Pharmaceutics 17 (2025). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics17010109.

[137] V. Balzer, P. Poc, E. Puris, S. Martin, M. Aliasgari, S. Auriola, G. Fricker, Re-evaluation of the hCMEC/D3 based in vitro BBB model for ABC transporter studies, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 173 (2022) 12–21.
[138] J.C.S. Chaves, S.J. Dando, A.R. White, L.E. Oikari, Blood-brain barrier transporters: An overview of function, dysfunction in Alzheimer's disease and strategies for treatment, Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis 1870 (2024). https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2023.166967.
[139] A. Lentzas, M.C. de Gooijer, S. Zuidema, A. Meurs, C.H. Çitirikkaya, N. Venekamp, J.H. Beijnen, O. van Tellingen, ATP-binding cassette transporter inhibitor potency and substrate drug affinity are critical determinants of successful drug delivery enhancement to the brain, Fluids Barriers CNS 21 (2024). https://doi.org/10.1186/s12987-024-00562-4.
[140] S. Lapointe, A. Perry, N.A. Butowski, Primary brain tumours in adults, The Lancet 392 (2018) 432–446. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)30990-5.
[141] M. Weller, W. Wick, K. Aldape, M. Brada, M. Berger, S.M. Pfister, R. Nishikawa, M. Rosenthal, P.Y. Wen, R. Stupp, G. Reifenberger, Glioma, Nat Rev Dis Primers 1 (2015). https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.17.
[142] F. Keime-Guibert, O. Chinot, L. Taillandier, S. Cartalat-Carel, M. Frenay, G. Kantor, J.-S. Guillamo, E. Jadaud, P. Colin, P.-Y. Bondiau, Radiotherapy for glioblastoma in the elderly, New England Journal of Medicine 356 (2007) 1527–1535.
[143] J.E. Eckel-Passow, D.H. Lachance, A.M. Molinaro, K.M. Walsh, P.A. Decker, H. Sicotte, M. Pekmezci, T. Rice, M.L. Kosel, I. V Smirnov, Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors, New England Journal of Medicine 372 (2015) 2499–2508.
[144] M.E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. De Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, New England Journal of Medicine 352 (2005) 997–1003.
[145] A.C. Tan, D.M. Ashley, G.Y. López, M. Malinzak, H.S. Friedman, M. Khasraw, Management of glioblastoma: State of the art and future directions, CA Cancer J Clin 70 (2020) 299–312. https://doi.org/10.3322/caac.21613.
[146] D.R. Johnson, B.P. O'Neill, Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era, J Neurooncol 107 (2012) 359–364.
[147] Q.T. Ostrom, D.J. Cote, M. Ascha, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, Adult glioma incidence and survival by race or ethnicity in the United States from 2000 to 2014, JAMA Oncol 4 (2018) 1254–1262.
[148] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, G. Truitt, A. Boscia, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2011–2015, Neuro Oncol 20 (2018) iv1–iv86.
[149] Q.T. Ostrom, H. Gittleman, P. Farah, A. Ondracek, Y. Chen, Y. Wolinsky, N.E. Stroup, C. Kruchko, J.S. Barnholtz-Sloan, CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010, Neuro Oncol 15 (2013) ii1–ii56.
[150] D.E. Larson, Mayo clinic family health book: the ultimate home medical reference, (2003).
[151] G.S. Tandel, M. Biswas, O.G. Kakde, A. Tiwari, H.S. Suri, M. Turk, J.R. Laird, C.K. Asare, A.A. Ankrah, N.N. Khanna, B.K. Madhusudhan, L. Saba, J.S. Suri, A review on a deep learning perspective in brain cancer classification, Cancers (Basel) 11 (2019). https://doi.org/10.3390/cancers11010111.

[152] J.D. Lathia, S.C. Mack, E.E. Mulkearns-Hubert, C.L.L. Valentim, J.N. Rich, Cancer stem cells in glioblastoma, (2015). https://doi.org/10.1101/gad.261982.
[153] M.E. Davis, Glioblastoma: Overview of disease and treatment, Clin J Oncol Nurs 20 (2016) 1–8. https://doi.org/10.1188/16.CJON.S1.2-8.
[154] D.N. Louis, A. Perry, G. Reifenberger, A. Von Deimling, D. Figarella-Branger, W.K. Cavenee, H. Ohgaki, O.D. Wiestler, P. Kleihues, D.W. Ellison, The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary, Acta Neuropathol 131 (2016) 803–820.
[155] D.N. Louis, A. Perry, P. Wesseling, D.J. Brat, I.A. Cree, D. Figarella-Branger, C. Hawkins, H.K. Ng, S.M. Pfister, G. Reifenberger, The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary, Neuro Oncol 23 (2021) 1231–1251.
[156] L.P. Ganipineni, F. Danhier, V. Préat, Drug delivery challenges and future of chemotherapeutic nanomedicine for glioblastoma treatment, Journal of Controlled Release 281 (2018) 42–57.
[157] M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi, Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats, Nanomedicine 3 (2008) 703–717.
[158] H. Gao, Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery, Acta Pharm Sin B 6 (2016) 268–286.
[159] N.J. Abbott, A.A.K. Patabendige, D.E.M. Dolman, S.R. Yusof, D.J. Begley, Structure and function of the blood–brain barrier, Neurobiol Dis 37 (2010) 13–25.
[160] B.A. Chabner, T.G. Roberts Jr, Chemotherapy and the war on cancer, Nat Rev Cancer 5 (2005) 65–72.
[161] M. Yang, C. Moon, Neurotoxicity of cancer chemotherapy☆, Neural Regen Res 8 (2013) 1606–1614.
[162] A.S. Jaggi, N. Singh, Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy, Toxicology 291 (2012) 1–9.
[163] H. Liu, L. Lv, K. Yang, Chemotherapy targeting cancer stem cells, Am J Cancer Res 5 (2015) 880.
[164] M. Weller, M. Van Den Bent, K. Hopkins, J.C. Tonn, R. Stupp, A. Falini, E. Cohen-Jonathan-Moyal, D. Frappaz, R. Henriksson, C. Balana, EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma, Lancet Oncol 15 (2014) e395–e403.
[165] J.G. Cairncross, M. Wang, R.B. Jenkins, E.G. Shaw, C. Giannini, D.G. Brachman, J.C. Buckner, K.L. Fink, L. Souhami, N.J. Laperriere, Benefit from procarbazine, lomustine, and vincristine in oligodendroglial tumors is associated with mutation of IDH, Journal of Clinical Oncology 32 (2014) 783–790.
[166] R. Stupp, W.P. Mason, M.J. Van Den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J.B. Taphoorn, K. Belanger, A.A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, New England Journal of Medicine 352 (2005) 987–996.
[167] M.F.G. Stevens, J.A. Hickman, S.P. Langdon, D. Chubb, L. Vickers, R. Stone, G. Baig, C. Goddard, N.W. Gibson, J.A. Slack, Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo [5, 1-d]-1, 2, 3, 5-tetrazin-4 (3 H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine, Cancer Res 47 (1987) 5846–5852.
[168] H. Strobel, T. Baisch, R. Fitzel, K. Schilberg, M.D. Siegelin, G. Karpel-Massler, K.-M. Debatin, M.-A. Westhoff, Temozolomide and other alkylating agents in glioblastoma therapy, Biomedicines 7 (2019) 69.

[169] M.E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. De Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, New England Journal of Medicine 352 (2005) 997–1003.
[170] M.E. Hegi, A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. De Tribolet, M. Weller, J.M. Kros, J.A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma, New England Journal of Medicine 352 (2005) 997–1003.
[171] R. Ortiz, G. Perazzoli, L. Cabeza, C. Jiménez-Luna, R. Luque, J. Prados, C. Melguizo, Temozolomide: an updated overview of resistance mechanisms, nanotechnology advances and clinical applications, Curr Neuropharmacol 19 (2021) 513–537.
[172] A. Giotta Lucifero, S. Luzzi, Against the resilience of high-grade gliomas: the immunotherapeutic approach (Part I), Brain Sci 11 (2021) 386.
[173] L.D. Di Filippo, J.H. Azambuja, J.A.P. Dutra, M.T. Luiz, J.L. Duarte, L.R. Nicoleti, S.T.O. Saad, M. Chorilli, Improving temozolomide biopharmaceutical properties in glioblastoma multiforme (GBM) treatment using GBM-targeting nanocarriers, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 168 (2021) 76–89.
[174] E.S. Newlands, M.F.G. Stevens, S.R. Wedge, R.T. Wheelhouse, C. Brock, Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials, Cancer Treat Rev 23 (1997) 35–61.
[175] L. Meer, R.C. Janzer, P. Kleihues, G.F. Kolar, In vivo metabolism and reaction with DNA of the cytostatic agent, 5-(3, 3-dimethyl-1-triazeno) imidazole-4-carboxamide (DTIC), Biochem Pharmacol 35 (1986) 3243–3247.
[176] S.S. Agarwala, J.M. Kirkwood, Temozolomide, a novel alkylating agent with activity in the central nervous system, may improve the treatment of advanced metastatic melanoma, Oncologist 5 (2000) 144–151.
[177] C.L. Moody, R.T. Wheelhouse, The medicinal chemistry of imidazotetrazine prodrugs, Pharmaceuticals 7 (2014) 797–838.
[178] D. Petrenko, V. Chubarev, N. Syzrantsev, N. Ismail, V. Merkulov, S. Sologova, E. Grigorevskikh, E. Smolyarchuk, R. Alyautdin, Temozolomide efficacy and metabolism: the implicit relevance of nanoscale delivery systems, Molecules 27 (2022) 3507.
[179] S. Ostermann, C. Csajka, T. Buclin, S. Leyvraz, F. Lejeune, L.A. Decosterd, R. Stupp, Plasma and cerebrospinal fluid population pharmacokinetics of temozolomide in malignant glioma patients, Clinical Cancer Research 10 (2004) 3728–3736.
[180] A. Belter, J. Barciszewski, A.-M. Barciszewska, Revealing the epigenetic effect of temozolomide on glioblastoma cell lines in therapeutic conditions, PLoS One 15 (2020) e0229534.
[181] J. Portnow, B. Badie, M. Chen, A. Liu, S. Blanchard, T.W. Synold, The neuropharmacokinetics of temozolomide in patients with resectable brain tumors: potential implications for the current approach to chemoradiation, Clinical Cancer Research 15 (2009) 7092–7098.
[182] Y. Yan-Hua, M.A.O. Jia-Wang, T.A.N. Xiao-Li, Research progress on the source, production, and anti-cancer mechanisms of paclitaxel, Chin J Nat Med 18 (2020) 890–897.
[183] S. Fellner, B. Bauer, D.S. Miller, M. Schaffrik, M. Fankhänel, T. Spruß, G. Bernhardt, C. Graeff, L. Färber, H. Gschaidmeier, Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo, J Clin Invest 110 (2002) 1309–1318.
[184] M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, A.T. McPhail, Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from Taxus brevifolia, J Am Chem Soc 93 (1971) 2325–2327.

[185] T.M. Abu Samaan, M. Samec, A. Liskova, P. Kubatka, D. Büsselberg, Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer, Biomolecules 9 (2019) 789.
[186] S. Fellner, B. Bauer, D.S. Miller, M. Schaffrik, M. Fankhänel, T. Spruß, G. Bernhardt, C. Graeff, L. Färber, H. Gschaidmeier, Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo, J Clin Invest 110 (2002) 1309–1318.
[187] M.A. Rahman, M. Jalouli, M.K. Yadab, M. Al-Zharani, Progress in drug delivery systems based on nanoparticles for improved glioblastoma therapy: addressing challenges and investigating opportunities, Cancers (Basel) 17 (2025) 701.
[188] M. AbdEl-Haq, A. Kumar, F. Ait Mohand, N. Kravchenko-Balasha, Y. Rottenberg, A.J. Domb, Paclitaxel delivery to the brain for glioblastoma treatment, Int J Mol Sci 24 (2023) 11722.
[189] E. Nance, C. Zhang, T.-Y. Shih, Q. Xu, B.S. Schuster, J. Hanes, Brain-penetrating nanoparticles improve paclitaxel efficacy in malignant glioma following local administration, ACS Nano 8 (2014) 10655–10664.
[190] I. Ullah, K. Chung, S. Bae, Y. Li, C. Kim, B. Choi, H.Y. Nam, S.H. Kim, C.-O. Yun, K.Y. Lee, Nose-to-brain delivery of cancer-targeting paclitaxel-loaded nanoparticles potentiates antitumor effects in malignant glioblastoma, Mol Pharm 17 (2020) 1193–1204.
[191] S. Park, G.-L. Lu, Y.-C. Zheng, E.K. Davison, Y. Li, Nanoparticle-based delivery strategies for combating drug resistance in cancer therapeutics, Cancers (Basel) 17 (2025) 2628.
[192] E. Gornstein, T.L. Schwarz, The paradox of paclitaxel neurotoxicity: Mechanisms and unanswered questions, Neuropharmacology 76 (2014) 175–183.
[193] B.A. Weaver, How Taxol/paclitaxel kills cancer cells, Mol Biol Cell 25 (2014) 2677–2681.
[194] T. Wang, H. Wang, Y. Soong, Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together, Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society 88 (2000) 2619–2628.
[195] S. Javed, B. Mangla, Y. Almoshari, M.H. Sultan, W. Ahsan, Nanostructured lipid carrier system: A compendium of their formulation development approaches, optimization strategies by quality by design, and recent applications in drug delivery, Nanotechnol Rev 11 (2022) 1744–1777. https://doi.org/10.1515/ntrev-2022-0109.
[196] J. Garg, K. Pathania, S.P. Sah, S. V. Pawar, Nanostructured lipid carriers: a promising drug carrier for targeting brain tumours, Futur J Pharm Sci 8 (2022). https://doi.org/10.1186/s43094-022-00414-8.
[197] M.C. Teixeira, C. Carbone, E.B. Souto, Beyond liposomes: Recent advances on lipid based nanostructures for poorly soluble/poorly permeable drug delivery, Prog Lipid Res 68 (2017) 1–11. https://doi.org/10.1016/j.plipres.2017.07.001.
[198] R. H Muller, R. Shegokar, C. M Keck, 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications, Curr Drug Discov Technol 8 (2011) 207–227.
[199] M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, (1993).
[200] C. Schwarz, W. Mehnert, J.S. Lucks, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization, Journal of Controlled Release 30 (1994) 83–96.
[201] S. Lucks, R. Muller, Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres-SLN), (1996).

[202] P. Ghasemiyeh, S. Mohammadi-Samani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages, 2018.
[203] S. Selvamuthukumar, R. Velmurugan, Nanostructured Lipid Carriers: A potential drug carrier for cancer chemotherapy, Lipids Health Dis 11 (2012). https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-159.
[204] V.R. Salvi, P. Pawar, Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier, J Drug Deliv Sci Technol 51 (2019) 255–267. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.02.017.
[205] A. Beloqui, M.Á. Solinís, A. Rodríguez-Gascón, A.J. Almeida, V. Préat, Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics, Nanomedicine 12 (2016) 143–161. https://doi.org/10.1016/j.nano.2015.09.004.
[206] M. Amiri, S. Jafari, M. Kurd, H. Mohamadpour, M. Khayati, F. Ghobadinezhad, O. Tavallaei, H. Derakhshankhah, S. Sadegh Malvajerd, Z. Izadi, Engineered Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as New Generations of Blood–Brain Barrier Transmitters, ACS Chem Neurosci 12 (2021) 4475–4490. https://doi.org/10.1021/acschemneuro.1c00540.
[207] M. Rawat, D. Singh, S. Saraf, S. Saraf, Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs, Biol Pharm Bull 29 (2006) 1790–1798.
[208] G.L. Amidon, H. Lennernäs, V.P. Shah, J.R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability, Pharm Res 12 (1995) 413–420.
[209] A. Khosa, S. Reddi, R.N. Saha, Nanostructured lipid carriers for site-specific drug delivery, Biomedicine & Pharmacotherapy 103 (2018) 598–613.
[210] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo, I. Harding, Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability, Springer, 2015.
[211] R. H Muller, R. Shegokar, C. M Keck, 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications, Curr Drug Discov Technol 8 (2011) 207–227.
[212] A. Youssef, N. Dudhipala, S. Majumdar, Ciprofloxacin loaded nanostructured lipid carriers incorporated into in-situ gels to improve management of bacterial endophthalmitis, Pharmaceutics 12 (2020) 1–19. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060572.
[213] N. Dhiman, R. Awasthi, B. Sharma, H. Kharkwal, G.T. Kulkarni, Lipid nanoparticles as carriers for bioactive delivery, Front Chem 9 (2021) 580118.
[214] P. Jaiswal, B. Gidwani, A. Vyas, Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery, Artif Cells Nanomed Biotechnol 44 (2016) 27–40. https://doi.org/10.3109/21691401.2014.909822.
[215] M. Elmowafy, M.M. Al-Sanea, Nanostructured lipid carriers (NLCs) as drug delivery platform: Advances in formulation and delivery strategies, Saudi Pharmaceutical Journal 29 (2021) 999–1012. https://doi.org/10.1016/j.jsps.2021.07.015.
[216] M. Agrawal, S. Saraf, S. Saraf, S.K. Dubey, A. Puri, R.J. Patel, Ajazuddin, V. Ravichandiran, U.S. Murty, A. Alexander, Recent strategies and advances in the fabrication of nano lipid carriers and their application towards brain targeting, Journal of Controlled Release 321 (2020) 372–415. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.02.020.
[217] M.A. Iqbal, S. Md, J.K. Sahni, S. Baboota, S. Dang, J. Ali, Nanostructured lipid carriers system: Recent advances in drug delivery, J Drug Target 20 (2012) 813–830. https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845.

[218] P. Ganesan, D. Narayanasamy, Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery, Sustain Chem Pharm 6 (2017) 37–56. https://doi.org/10.1016/j.scp.2017.07.002.
[219] W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, Adv Drug Deliv Rev 64 (2012) 83–101. https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.021.
[220] R.H. Müller, K. Mäder, S. Gohla, Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery–a review of the state of the art, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 50 (2000) 161–177.
[221] M.R. Gasco, Method for producing solid lipid microspheres having a narrow size distribution, (1993).
[222] N. Naseri, H. Valizadeh, P. Zakeri-Milani, Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application, Adv Pharm Bull 5 (2015) 305.
[223] M. Üner, G. Yener, International Journal of Nanomedicine Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives, (2007). https://doi.org/10.2147/IJN.S2.3.289.
[224] N. Yadav, S. Khatak, U.V.S. Sara, Solid lipid nanoparticles-a review, Int. J. Appl. Pharm 5 (2013) 8–18.
[225] S. Mukherjee, S. Ray, R.S. Thakur, Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system, Indian J Pharm Sci 71 (2009) 349.
[226] S.P. Moulik, B.K. Paul, Structure, dynamics and transport properties of microemulsions, Adv Colloid Interface Sci 78 (1998) 99–195.
[227] C. Solans, I. Solé, Nano-emulsions: Formation by low-energy methods, Curr Opin Colloid Interface Sci 17 (2012) 246–254. https://doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.003.
[228] C. Pierlot, J.F. Ontiveros, M. Catte, J.-L. Salager, J.-M. Aubry, Cone–plate rheometer as reactor and viscosity probe for the detection of transitional phase inversion of Brij30–isopropyl myristate–water model emulsion, Ind Eng Chem Res 55 (2016) 3990–3999.
[229] H. Chen, D. Wang, X. Wang, Z. Ye, L. Han, Q. Xu, Triple phase inversion of emulsions stabilized by amphiphilic graphene oxide and cationic surfactants, ACS Omega 5 (2020) 23524–23532.
[230] H. Svilenov, C. Tzachev, Solid lipid nanoparticles—a promising drug delivery system, Nanomedicine 2 (2014) 187–237.
[231] A.S. Shirazi, R. Varshochian, M. Rezaei, Y.H. Ardakani, R. Dinarvand, SN38 Loaded Nanostructured Lipid Carriers (NLCs); Preparation and in Vitro Evaluations Against Glioblastoma, J Mater Sci Mater Med 32 (2021). https://doi.org/10.1007/s10856-021-06538-2.
[232] L. Talarico, M. Consumi, G. Leone, G. Tamasi, A. Magnani, Solid Lipid Nanoparticles Produced via a Coacervation Method as Promising Carriers for Controlled Release of Quercetin, Molecules 26 (2021) 2694. https://doi.org/10.3390/molecules26092694.
[233] A.C. Ortiz, O. Yáñez, E. Salas-Huenuleo, J. Morales, Development of a Nanostructured Lipid Carrier (NLC) by a Low-Energy Method, Comparison of Release Kinetics and Molecular Dynamics Simulation, Pharmaceutics 13 (2021) 531. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040531.
[234] J.G. Galvão, R.L. Santos, A.A.M. Lira, R.C.K. Kaminski, V.H.V. Sarmento, P. Severino, S.S. Dolabella, R. Scher, E.B. Souto, R. de S. Nunes, Stearic Acid, Beeswax and Carnauba Wax as Green Raw Materials for the Loading of Carvacrol Into Nanostructured Lipid Carriers, Applied Sciences 10 (2020) 6267. https://doi.org/10.3390/app10186267.

[235] I. Shahzadi, A. Fürst, P. Knoll, A. Bernkop-Schnürch, Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) for Oral Peptide Drug Delivery: About the Impact of Surface Decoration, Pharmaceutics 13 (2021) 1312. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081312.
[236] Y. Chen, X. Feng, Y. Zhao, X. Zhao, X. Zhang, Mussel-inspired polydopamine coating enhances the intracutaneous drug delivery from nanostructured lipid carriers dependently on a follicular pathway, Mol Pharm 17 (2020) 1215–1225.
[237] Y.-J. Jo, H.P. Karbstein, U.S. van der Schaaf, Collagen peptide-loaded W 1/O single emulsions and W 1/O/W 2 double emulsions: influence of collagen peptide and salt concentration, dispersed phase fraction and type of hydrophilic emulsifier on droplet stability and encapsulation efficiency, Food Funct 10 (2019) 3312–3323.
[238] S. Taymouri, M. Minaiyan, F. Ebrahimi, N. Tavakoli, In-vitro and in-vivo evaluation of chitosan-based thermosensitive gel containing lorazepam NLCs for the treatment of status epilepticus, IET Nanobiotechnol 14 (2020) 148–154.
[239] L. Jia, D. Zhang, Z. Li, C. Duan, Y. Wang, F. Feng, F. Wang, Y. Liu, Q. Zhang, Nanostructured lipid carriers for parenteral delivery of silybin: Biodistribution and pharmacokinetic studies, Colloids Surf B Biointerfaces 80 (2010) 213–218.
[240] W. Dai, D. Zhang, C. Duan, L. Jia, Y. Wang, F. Feng, Q. Zhang, Preparation and characteristics of oridonin-loaded nanostructured lipid carriers as a controlled-release delivery system, J Microencapsul 27 (2010) 234–241.
[241] A. Anand, M. Arya, G. Singh, G. Kaithwas, S. A. Saraf, Design and development of resveratrol NLCs and their role in synaptic transmission of acetylcholine in C. elegans model, Curr Drug Ther 12 (2017) 134–148.
[242] J. Emami, M. Rezazadeh, J. Varshosaz, M. Tabbakhian, A. Aslani, Formulation of LDL targeted nanostructured lipid carriers loaded with paclitaxel: a detailed study of preparation, freeze drying condition, and in vitro cytotoxicity, J Nanomater 2012 (2012) 358782.
[243] A. Gordillo-Galeano, A. Ponce, C.E. Mora-Huertas, In vitro release behavior of SLN, NLC, and NE: An explanation based on the particle structure and carried molecule location, J Drug Deliv Sci Technol 76 (2022) 103768.
[244] S. Kaur, U. Nautiyal, P.A. Chawla, V. Chawla, Nanostructured lipid carriers for intranasal administration of olanzapine in the management of schizophrenia, Curr Mol Pharmacol 14 (2021) 439–447.
[245] R. Tiwari, K. Pathak, Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake, Int J Pharm 415 (2011) 232–243.
[246] M. Li, Y. Zheng, F. Shan, J. Zhou, T. Gong, Z. Zhang, Development of ionic-complex-based nanostructured lipid carriers to improve the pharmacokinetic profiles of breviscapine, Acta Pharmacol Sin 34 (2013) 1108–1115.
[247] S.M.A. Ghani, N.Z.I. Roslan, R. Muda, A. Abdul-Aziz, Encapsulation of Ficus deltoidea extract in nanostructured lipid carrier for anti-melanogenic activity, Bionanoscience 11 (2021) 8–20.
[248] P. Chattopadhyay, B.Y. Shekunov, D. Yim, D. Cipolla, B. Boyd, S. Farr, Production of solid lipid nanoparticle suspensions using supercritical fluid extraction of emulsions (SFEE) for pulmonary delivery using the AERx system, Adv Drug Deliv Rev 59 (2007) 444–453.
[249] G. Shadambikar, S. Marathe, N. Ji, M. Almutairi, S. Bandari, F. Zhang, M. Chougule, M. Repka, Formulation development of itraconazole PEGylated nano-lipid carriers for pulmonary aspergillosis using hot-melt extrusion technology, Int J Pharm X 3 (2021) 100074.

[250] D. Muhindo, E.A. Ashour, M. Almutairi, P.H. Joshi, M.A. Repka, Continuous production of raloxifene hydrochloride loaded nanostructured lipid carriers using hot-melt extrusion technology, J Drug Deliv Sci Technol 65 (2021) 102673.
[251] A.M. Bhagurkar, M.A. Repka, S.N. Murthy, A novel approach for the development of a nanostructured lipid carrier formulation by hot-melt extrusion technology, J Pharm Sci 106 (2017) 1085–1091.
[252] D.K. Mishra, V. Dhote, P. Bhatnagar, P.K. Mishra, Engineering solid lipid nanoparticles for improved drug delivery: promises and challenges of translational research, Drug Deliv Transl Res 2 (2012) 238–253.
[253] J. Huang, Q. Wang, T. Li, N. Xia, Q. Xia, Nanostructured lipid carrier (NLC) as a strategy for encapsulation of quercetin and linseed oil: Preparation and in vitro characterization studies, J Food Eng 215 (2017) 1–12.
[254] H. Almeida, P. Lobão, C. Frigerio, J. Fonseca, R. Silva, J.M. Sousa Lobo, M.H. Amaral, Preparation, characterization and biocompatibility studies of thermoresponsive eyedrops based on the combination of nanostructured lipid carriers (NLC) and the polymer Pluronic F-127 for controlled delivery of ibuprofen, Pharm Dev Technol 22 (2017) 336–349.
[255] M. Cirri, N. Mennini, F. Maestrelli, P. Mura, C. Ghelardini, L.D.C. Mannelli, Development and in vivo evaluation of an innovative "Hydrochlorothiazide-in Cyclodextrins-in Solid Lipid Nanoparticles" formulation with sustained release and enhanced oral bioavailability for potential hypertension treatment in pediatrics, Int J Pharm 521 (2017) 73–83.
[256] M.F. Pinto, C.C. Moura, C. Nunes, M.A. Segundo, S.A.C. Lima, S. Reis, A new topical formulation for psoriasis: development of methotrexate-loaded nanostructured lipid carriers, Int J Pharm 477 (2014) 519–526.
[257] K. Raza, M.A. Shareef, P. Singal, G. Sharma, P. Negi, O.P. Katare, Lipid-based capsaicin-loaded nano-colloidal biocompatible topical carriers with enhanced analgesic potential and decreased dermal irritation, J Liposome Res 24 (2014) 290–296.
[258] A.R. Neves, M. Lúcio, S. Martins, J.L.C. Lima, S. Reis, Novel resveratrol nanodelivery systems based on lipid nanoparticles to enhance its oral bioavailability, Int J Nanomedicine (2013) 177–187.
[259] C. Charcosset, A. El-Harati, H. Fessi, Preparation of solid lipid nanoparticles using a membrane contactor, Journal of Controlled Release 108 (2005) 112–120.
[260] R. Shah, D. Eldridge, E. Palombo, I. Harding, Lipid nanoparticles: Production, characterization and stability, Springer, 2015.
[261] M.A. Bianco, M. Gallarate, M. Trotta, L.S. Battaglia, Amphotericin B loaded SLN prepared with the coacervation technique, J Drug Deliv Sci Technol 20 (2010) 187–191.
[262] E. Binazir, B. Ghanbarzadeh, S. Hanifian, M. Gharekhani, H.S. Kafil, P.M. Falcone, Development and optimization of thyme-pennyroyal essential oils based active nanostructured lipid carrier (NLC) containing saffron extract with antioxidant and antimicrobial properties, Food Biosci 61 (2024) 104992.
[263] H.-J. Lee, M. Jeong, Y.-G. Na, S.-J. Kim, H.-K. Lee, C.-W. Cho, An EGF-and curcumin-co-encapsulated nanostructured lipid carrier accelerates chronic-wound healing in diabetic rats, Molecules 25 (2020) 4610.
[264] M. Mehta, T.A. Bui, X. Yang, Y. Aksoy, E.M. Goldys, W. Deng, Lipid-based nanoparticles for drug/gene delivery: an overview of the production techniques and difficulties encountered in their industrial development, ACS Materials Au 3 (2023) 600–619.

[265] M. Wu, Y. Fan, S. Lv, B. Xiao, M. Ye, X. Zhu, Vincristine and temozolomide combined chemotherapy for the treatment of glioma: a comparison of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for dual drugs delivery, Drug Deliv 23 (2016) 2720–2725.
[266] P. Dana, J. Yostawonkul, W. Chonniyom, O. Unger, S. Sakulwech, S. Sathornsumetee, N. Saengkrit, Nanostructured lipid base carrier for specific delivery of garlic oil through blood brain barrier against aggressiveness of glioma, J Drug Deliv Sci Technol 64 (2021) 102651.
[267] L.D. Di Filippo, J.L. Duarte, J.H. Azambuja, R.I. Mancuso, M.T. Luiz, V.H.S. Araújo, I.D. Figueiredo, L. Barretto-de-Souza, R.M. Sabio, E. Sasso-Cerri, Glioblastoma multiforme targeted delivery of docetaxel using bevacizumab-modified nanostructured lipid carriers impair in vitro cell growth and in vivo tumor progression, Int J Pharm 618 (2022) 121682.
[268] J. Basso, A. Fortuna, R. Vitorino, C. Vitorino, Old drugs, new tricks: Delivering pitavastatin-loaded nanostructured lipid carriers for glioblastoma treatment, Colloids Surf B Biointerfaces 245 (2025). https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2024.114253.
[269] Y. Han, Y. Zhang, D. Li, Y. Chen, J. Sun, F. Kong, Transferrin-modified nanostructured lipid carriers as multifunctional nanomedicine for codelivery of DNA and doxorubicin, Int J Nanomedicine 9 (2014) 4107–4116. https://doi.org/10.2147/IJN.S67770.
[270] A. Khan, S.S. Imam, M. Aqil, A. Ahad, Y. Sultana, A. Ali, K. Khan, Brain Targeting of Temozolomide via the Intranasal Route Using Lipid-Based Nanoparticles: Brain Pharmacokinetic and Scintigraphic Analyses, Mol Pharm 13 (2016) 3773–3782. https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b00586.
[271] R.G.R. Pinheiro, A. Granja, J.A. Loureiro, M.C. Pereira, M. Pinheiro, A.R. Neves, S. Reis, Quercetin lipid nanoparticles functionalized with transferrin for Alzheimer's disease, European Journal of Pharmaceutical Sciences 148 (2020). https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105314.
[272] J. Emami, M. Rezazadeh, H. Sadeghi, K. Khadivar, Development and optimization of transferrin-conjugated nanostructured lipid carriers for brain delivery of paclitaxel using Box–Behnken design, Pharm Dev Technol 22 (2017) 370–382.
[273] X. yan Yang, Y. xia Li, M. Li, L. Zhang, L. xia Feng, N. Zhang, Hyaluronic acid-coated nanostructured lipid carriers for targeting paclitaxel to cancer, Cancer Lett 334 (2013) 338–345. https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.07.002.
[274] D.C. Arruda, L.C.P. Santos, F.M. Melo, F. V Pereira, C.R. Figueiredo, A.L. Matsuo, R.A. Mortara, M.A. Juliano, E.G. Rodrigues, A.S. Dobroff, β-Actin-binding complementarity-determining region 2 of variable heavy chain from monoclonal antibody C7 induces apoptosis in several human tumor cells and is protective against metastatic melanoma, Journal of Biological Chemistry 287 (2012) 14912–14922.
[275] R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, Cell Death Differ 18 (2011) 571–580.
[276] X. Chen, P.B. Comish, D. Tang, R. Kang, Characteristics and biomarkers of ferroptosis, Front Cell Dev Biol 9 (2021) 637162.
[277] B.E. Burdette, A.N. Esparza, H. Zhu, S. Wang, Gasdermin D in pyroptosis, Acta Pharm Sin B 11 (2021) 2768–2782.
[278] S. Yoon, A. Kovalenko, K. Bogdanov, D. Wallach, MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation, Immunity 47 (2017) 51–65.
[279] S.M. Ghazani, A.G. Marangoni, Molecular origins of polymorphism in cocoa butter, Annu Rev Food Sci Technol 12 (2021) 567–590.

[280] J.B. Brubach, V. Jannin, B. Mahler, C. Bourgaux, P. Lessieur, P. Roy, M. Ollivon, Structural and thermal characterization of glyceryl behenate by X-ray diffraction coupled to differential calorimetry and infrared spectroscopy, Int J Pharm 336 (2007) 248–256.
[281] J. Seilert, M. Holdstock, Y. Pratama, A. Sadeghpour, E. Flöter, M. Rappolt, Polymorphic Structures and Transitions of Triglycerides and Complex Fats: A Guide to X-Ray Scattering Approaches, Compr Rev Food Sci Food Saf 24 (2025) e70271.
[282] H. Rao, S. Ahmad, A. Madni, I. Rao, M. Ghazwani, U. Hani, M. Umair, I. Ahmad, N. Rai, M. Ahmed, Compritol-based alprazolam solid lipid nanoparticles for sustained release of alprazolam: Preparation by hot melt encapsulation, Molecules 27 (2022) 8894.
[283] C. Singh, K. Rao, N. Yadav, N. Bansal, Y. Vashist, S. Kumari, P. Chugh, A review: Drug excipient iincompatiblity by ftir spectroscopy, Curr Pharm Anal 19 (2023) 371–378.
[284] D. Usoltsev, V. Sitnikova, A. Kajava, M. Uspenskaya, Systematic FTIR spectroscopy study of the secondary structure changes in human serum albumin under various denaturation conditions, Biomolecules 9 (2019) 359.
[285] D. Petrenko, V. Chubarev, N. Syzrantsev, N. Ismail, V. Merkulov, S. Sologova, E. Grigorevskikh, E. Smolyarchuk, R. Alyautdin, Temozolomide efficacy and metabolism: the implicit relevance of nanoscale delivery systems, Molecules 27 (2022) 3507.
[286] J. Qu, L. Zhang, Z. Chen, G. Mao, Z. Gao, X. Lai, X. Zhu, J. Zhu, Nanostructured lipid carriers, solid lipid nanoparticles, and polymeric nanoparticles: which kind of drug delivery system is better for glioblastoma chemotherapy?, Drug Deliv 23 (2016) 3408–3416.
[287] S. Das, W.K. Ng, P. Kanaujia, S. Kim, R.B.H. Tan, Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables, Colloids Surf B Biointerfaces 88 (2011) 483–489.
[288] N. Dudhipala, K.Y. Janga, T. Gorre, Comparative study of nisoldipine-loaded nanostructured lipid carriers and solid lipid nanoparticles for oral delivery: preparation, characterization, permeation and pharmacokinetic evaluation, Artif Cells Nanomed Biotechnol 46 (2018) 616–625.
[289] Y. Bide, M.A. Fashapoyeh, S. Shokrollahzadeh, Structural investigation and application of Tween 80-choline chloride self-assemblies as osmotic agent for water desalination, Sci Rep 11 (2021) 17068.
[290] A. Youssef, N. Dudhipala, S. Majumdar, Ciprofloxacin loaded nanostructured lipid carriers incorporated into in-situ gels to improve management of bacterial endophthalmitis, Pharmaceutics 12 (2020) 572.
[291] Y. Liu, J. Gu, J. Zhang, F. Yu, J. Wang, N. Nie, W. Li, LiFePO 4 nanoparticles growth with preferential (010) face modulated by Tween-80, RSC Adv 5 (2015) 9745–9751.
[292] M. Irani, S.M. Nodeh, PVA/κ-carrageenan/Au/camptothecin/pegylated-polyurethane/paclitaxel nanofibers against lung cancer treatment, RSC Adv 12 (2022) 16310–16318.
[293] L.M. Ngema, S. Acter, S.A. Adeyemi, T. Marimuthu, M. Govender, W. Ngwa, Y.E. Choonara, Mesoporous Polydopamine Nano-Bowls Demonstrate a High Entrapment Efficiency and pH-Responsive Release of Paclitaxel for Suppressing A549 Lung Cancer Cell Proliferation In Vitro, Pharmaceutics 16 (2024) 1536.
[294] A.M. Arti Majumdar, N.D. Nidhi Dubey, Formulation of paclitaxel loaded nanostructured lipid carriers to study the effect of concentration of liquid lipids on drug release., (2017).

[295] S.A. Swidan, H.M. Ghonaim, A.M. Samy, M.M. Ghorab, Efficacy and in vitro cytotoxicity of nanostructured lipid carriers for paclitaxel delivery, J Appl Pharm Sci 6 (2016) 18–26.
[296] F. Ducray, C. Ramirez, M. Robert, M. Fontanilles, C. Bronnimann, O. Chinot, F. Estrade, X. Durando, S. Cartalat, J. Bastid, A Multicenter Randomized Bioequivalence Study of a Novel Ready-to-Use Temozolomide Oral Suspension vs. Temozolomide Capsules, Pharmaceutics 15 (2023) 2664.
[297] J. Zhang, X. Xiao, J. Zhu, Z. Gao, X. Lai, X. Zhu, G. Mao, Lactoferrin-and RGD-comodified, temozolomide and vincristine-coloaded nanostructured lipid carriers for gliomatosis cerebri combination therapy, Int J Nanomedicine (2018) 3039–3051.
[298] M. Haider, S.M. Abdin, L. Kamal, G. Orive, Nanostructured lipid carriers for delivery of chemotherapeutics: A review, Pharmaceutics 12 (2020) 288.
[299] G.I. Sakellari, I. Zafeiri, H. Batchelor, F. Spyropoulos, Formulation design, production and characterisation of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for the encapsulation of a model hydrophobic active, Food Hydrocolloids for Health 1 (2021) 100024.
[300] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, y M.R. Mozafari, Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems, Pharmaceutics 10 (2018) 57.
[301] A. Ali, A. Madni, H. Shah, T. Jamshaid, N. Jan, S. Khan, M.M. Khan, M.A. Mahmood, Solid lipid-based nanoparticulate system for sustained release and enhanced in-vitro cytotoxic effect of 5-fluorouracil on skin Melanoma and squamous cell carcinoma, PLoS One 18 (2023) e0281004.
[302] A. Youssef, N. Dudhipala, S. Majumdar, Ciprofloxacin loaded nanostructured lipid carriers incorporated into in-situ gels to improve management of bacterial endophthalmitis, Pharmaceutics 12 (2020) 1–19. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12060572.
[303] S. Hombach-Klonisch, M. Mehrpour, S. Shojaei, C. Harlos, M. Pitz, A. Hamai, K. Siemianowicz, W. Likus, E. Wiechec, B.D. Toyota, Glioblastoma and chemoresistance to alkylating agents: Involvement of apoptosis, autophagy, and unfolded protein response, Pharmacol Ther 184 (2018) 13–41.
[304] J. Mall, N. Naseem, M.F. Haider, M.A. Rahman, S. Khan, S.N. Siddiqui, Nanostructured lipid carriers as a drug delivery system: A comprehensive review with therapeutic applications, Intelligent Pharmacy (2024).
[305] L.C. Crowley, B.J. Marfell, A.P. Scott, N.J. Waterhouse, Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry, Cold Spring Harb Protoc 2016 (2016) pdb-prot087288.
[306] E. Bossy-Wetzel, D.R. Green, Detection of apoptosis by annexin V labeling, in: Methods Enzymol, Elsevier, 2000: pp. 15–18.
[307] M.A. Hayat, Overview of autophagy, in: Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging, Elsevier, 2017: pp. 1–122.
[308] J.C.M. Pareja, X. Li, N. Gandham, K.K. Wang, L. Lautenslager, M.C. Pareja, P. Shanmugham, S. Faulkinberry, S. Ghosh, M. Kerrigan, Biomarkers in moderate to severe pediatric traumatic brain injury: a review of the literature, Pediatr Neurol 130 (2022) 60–68.
[309] R. Kang, H.J. Zeh, M.T. Lotze, D. Tang, The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis, Cell Death Differ 18 (2011) 571–580.
[310] S. Tran, W.D. Fairlie, E.F. Lee, BECLIN1: protein structure, function and regulation, Cells 10 (2021) 1522.

[311] Y. Liu, Y. Wan, Y. Jiang, L. Zhang, W. Cheng, GPX4: The hub of lipid oxidation, ferroptosis, disease and treatment, Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 1878 (2023) 188890.
[312] D. Nandi, N.S.S. Farid, H.A.R. Karuppiah, A. Kulkarni, Imaging approaches to monitor inflammasome activation, J Mol Biol 434 (2022) 167251.
[313] D. Nandi, N.S.S. Farid, H.A.R. Karuppiah, A. Kulkarni, Imaging approaches to monitor inflammasome activation, J Mol Biol 434 (2022) 167251.
[314] S. Feng, D. Fox, S.M. Man, Mechanisms of gasdermin family members in inflammasome signaling and cell death, J Mol Biol 430 (2018) 3068–3080.
[315] X. Chen, P.B. Comish, D. Tang, R. Kang, Characteristics and biomarkers of ferroptosis, Front Cell Dev Biol 9 (2021) 637162.
[316] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, Oxid Med Cell Longev 2014 (2014) 360438.
[317] J.M. Murphy, P.E. Czabotar, J.M. Hildebrand, I.S. Lucet, J.-G. Zhang, S. Alvarez-Diaz, R. Lewis, N. Lalaoui, D. Metcalf, A.I. Webb, The pseudokinase MLKL mediates necroptosis via a molecular switch mechanism, Immunity 39 (2013) 443–453.
[318] S. Yoon, A. Kovalenko, K. Bogdanov, D. Wallach, MLKL, the protein that mediates necroptosis, also regulates endosomal trafficking and extracellular vesicle generation, Immunity 47 (2017) 51–65.

OGUZ YUCEL DOKTORA TEZI.pdf

ORİJİNALLİK RAPORU

%3	%3	%2	%1
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%1
2	Submitted to Ataturk Universitesi Öğrenci Ödevi	<%1
3	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	<%1
4	Submitted to Karadeniz Teknik University Öğrenci Ödevi	<%1
5	Submitted to Ege Üniversitesi Öğrenci Ödevi	<%1
6	Tekelioğlu, Kübra. "Portakal Kabuğu Karotenoidlerinin su ile Ekstraksiyonu", Inonu University (Turkey), 2025 Yayın	<%1
7	Tamer H. Hassan, Shymaa S. Salman, Mahmoud M. Elkhoudary, Shadeed. Gad. "Refinement of Simvastatin and Nifedipine combined delivery through multivariate conceptualization and optimization of the	<%1