T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİN TÜMÖRÜ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NARİNGİN YÜKLÜ SPANLASTİK FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. İrem BİLGİÇ

Farmasötik Teknoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA
2026

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BEYİN TÜMÖRÜ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NARİNGİN YÜKLÜ SPANLASTİK FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Ecz. İrem BİLGİÇ

Farmasötik Teknoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN

İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatoş Ayça ÖZDEMİR OLGUN

ANKARA
2026

BEYİN TÜMÖRÜ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NARİNGİN YÜKLÜ SPANLASTİK FORMÜLASYONLARININ TASARLANMASI VE İN VİTRO DEĞERLENDİRİLMESİ

Öğrenci: İrem BİLGİÇ

Danışman: Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN

İkinci Danışman: Doç. Dr. Ayça Fatoş ÖZDEMİR OLGUN

Bu tez çalışması 02.11.2026 tarihinde jürimiz tarafından "Farmasötik Teknoloji Programı"nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	*Prof. Dr. İmran VURAL* *Hacettepe Üniversitesi*
Tez Danışmanı:	*Prof. Dr. Sibel Pehlivan* *Hacettepe Üniversitesi*
Üye:	*Doç. Dr. Serdar TORT* *Gazi Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur. 03 Kasım 2026

Prof. Dr. Müge YEMİŞÇİ ÖZKAN

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA ve FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. (1)
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren .. ay ertelenmiştir.(2)
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. (3)

02.11.2026

İrem BİLGİÇ

1"Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge"

(1) Madde 6. 1. Lisansüstü tezle ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulu iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.

(2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internetten paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez danışmanının önerisi ve enstitü anabilim dalının uygun görüşü üzerine enstitü veya fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.

*(3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, tezin yapıldığı kurum tarafından verilir *. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, ilgili kurum ve kuruluşun önerisi ile enstitü veya fakültenin uygun görüşü üzerine üniversite yönetim kurulu tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir. Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir.*

** Tez **danışmanının** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü veya fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.***

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığını beyan ederim.

Ecz. İrem BİLGİÇ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında daima kıymetli bilgi ve birikimleriyle bana yol gösteren, karşılaştığım zorluklarda desteğini ve güvenini hiçbir zaman esirgemeyen, bilimsel bakış açısı ve çalışma azmiyle bana her zaman örnek olan değerli danışman hocam **Prof. Dr. Sibel PEHLİVAN'a**,

Tez çalışmalarım sırasında her türlü imkânı sağlayan başta Anabilim Dalı başkanımız **Prof. Dr. Erem BİLENSOY** olmak üzere tüm **Farmasötik Teknoloji Anabilim Dalı üyelerine**,

Tez çalışmalarım boyunca her zaman destek olan ve yol gösteren değerli hocalarım **Dr. Öğr. Üyesi Eren AYTEKİN**, **Öğr. Gör. Dr. Tuğba ÇOPUR** ve **Dr. Ecz. Şemsi MURATOĞLU'na**

Laboratuvar çalışmalarım boyunca profesyonel anlamda hem bir ekibin parçası olup hem de sıcak bir aile gibi hissettiren **SBP ekibine**,

Tüm hayatım boyunca sevgilerini ve güvenlerini eksik etmeyip her zaman bana inanıp şefkatle destekleyen sevgili aile üyelerim babam **Cem Serdar BİLGİÇ**, annem **Filiz BİLGİÇ,** abim **Onur Alp BİLGİÇ,** ablam **Ceren ŞAHİNKAYA** ve ailemizin minik üyeleri **Kutay Ege ŞAHİNKAYA** ve **Cem BİLGİÇ'e**,

Tüm süreç boyunca yanımda olup desteklerini hiç esirgemeyen **canım arkadaşlarım** ve sabırla ve şefkatle her zaman arkamda duran, yorulduğum zaman sevgiyle beni tekrar ayağa kaldırıp cesaretlendiren **Rafet BODUR'a**,

Bir kadın olarak kendi geleceğimin ve özgürlüğümün başka kimseye boyun eğmeden kendi irademin belirleyebilmesini sağlayan, ne zaman umutsuzluğa kapılsam pes etmeden devam edebilme gücünü sayesinde bulduğum **Ulu Önder Mustafa Kemal ATATÜRK'e** sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Bilgiç, İ., Beyin Tümörü Tedavisinde Kullanılmak Üzere Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonlarının Tasarlanması ve *İn Vitro* Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Teknoloji Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2026. Beyin tümörleri, özellikle glioblastom (GBM), hızlı proliferasyon ve yüksek invazyon gibi özelliklere bağlı agresif seyirleri, yüksek nüks oranları ve mevcut tedavilere karşı gelişen direnç nedeniyle önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Kan-beyin bariyeri ve kan-tümör bariyeri, terapötik maddelerin tümör dokusuna yeterli konsantrasyonda ulaşmasını güçleştirmektedir. Bu güçlüklerin aşılmasında son yıllarda spanlastikler gibi nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemler üzerinde yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Antikanser etkisi bilinen doğal bir flavanon glikoziti olan naringin (NAR)'in suda düşük çözünürlüğü ve sınırlı biyoyararlanımı nedeniyle terapötik kullanımı sınırlıdır. Bu tez çalışmasının amacı, beyin tümörlerinin tedavisinde kullanmak üzere, NAR'ın biyofarmasötik özelliklerini iyileştirmek ve uzun süreli bir salım profili sağlamak için spanlastik formülasyonlarının tasarlanmasıdır. Çalışma kapsamında etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanan ve faktöriyel tasarım ile optimize edilen NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının vezikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, elastikiyet ve *in vitro* ilaç salım özellikleri gibi kritik kalite parametreleri incelenerek karakterizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda optimum formülasyon belirlenmiş ve RG2 glioblastom hücre hattı üzerindeki sitotoksik etkinliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen optimum spanlastik formülasyonunun, serbest NAR'a kıyasla uzatılmış ilaç salımı sağlaması, etkin maddenin terapötik potansiyelini artırması ve beyin tümörlerinin tedavisinde karşılaşılan biyolojik bariyerlerin aşılmasına yönelik alternatif bir yaklaşım sunması hedeflenmektedir. Sonuç olarak, geliştirilen spanlastik formülasyonlarının beyin tümörlerinin tedavisinde antitümör etkinliğin artırılmasına katkı sağlayabilecek, yenilikçi ve umut vadeden bir ilaç taşıyıcı sistem olma potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Beyin tümörü, Glioblastom, Naringin, Spanlastik, Nanoveziküler ilaç taşıyıcı sistemler.

ABSTRACT

Bilgiç, I., Design and In Vitro Evaluation of Naringin-Loaded Spanlastic Formulations for Use in the Treatment of Brain Tumors, Master's Thesis, Graduate School of Health Sciences, Hacettepe University, Pharmaceutical Technology Program, Ankara, 2026. Brain tumors, particularly glioblastoma (GBM), pose a significant health problem due to their aggressive course—characterized by rapid proliferation and high invasiveness—as well as high recurrence rates and the development of resistance to current treatments. The blood-brain barrier and blood-tumor barrier make it difficult for therapeutic agents to reach tumor tissue at sufficient concentrations. In recent years, intensive research has been conducted on nanotechnology-based drug delivery systems, such as spanlastics, to overcome these difficulties. Naringin (NAR), a naturally occurring flavanone glycoside known for its anticancer effect, has limited therapeutic use due to its low water solubility and limited bioavailability. The aim of this thesis is to design spanlastic formulations to improve the biopharmaceutical properties of NAR and provide a long-term release profile for use in the treatment of brain tumors. In this study, characterization studies were carried out by examining critical quality parameters such as vesicle size, polydispersity index, zeta potential, encapsulation efficiency, elasticity, and in vitro drug release properties of NAR-loaded spanlastic formulations prepared by ethanol injection and optimized with factorial design. Based on the findings, the optimum formulation was determined and its cytotoxic efficacy on the RG2 glioblastoma cell line was evaluated. The aim is for the developed optimum spanlastic formulation to provide extended drug release compared to free NAR, to increase the therapeutic potential of the active substance, and to offer an alternative approach to overcoming biological barriers encountered in the treatment of brain tumors. In conclusion, it is considered that the developed spanlastic formulations have the potential to serve as an innovative and promising drug delivery system that could contribute to enhancing antitumor efficacy in the treatment of brain tumors.

Keywords: Brain tumor, Glioblastoma, Naringin, Spanlastic, Nanovesicular drug delivery systems.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI iv
ETİK BEYAN v
TEŞEKKÜR vi
ÖZET vii
ABSTRACT viii
SİMGELER VE KISALTMALAR xiii
ŞEKİLLER xvi
TABLOLAR xix
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri 4
2.1.1. Primer ve Sekonder Beyin Tümörleri ve Sınıflandırılması 6
2.1.2. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi 6
2.1.3. Beyin Tümörlerinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri 8
2.1.4. Beyin Tümörlerinde Klinik Belirtiler ve Tanı 8
2.1.5. Beyin Tümörlerinin Tedavisinde Genel Yaklaşımlar ve Karşılaşılan Güçlükler 9
2.2. Glioblastom 10
2.2.1. Glioblastomun Tedavisinde Kullanılan Yöntemler 11
2.2.2. Kan-Beyin Bariyeri 13
2.2.3. Kan-Beyin Bariyerinin Anatomik Yapısı 15
2.2.4. Kan-Tümör Bariyeri 17
2.2.5. Kan-Beyin Bariyerini Aşmak İçin Uygulanan Yöntemler 18
2.3. Nanoteknoloji 25
2.3.1. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflendirilmesi 26
2.3.2. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistem Türleri 28
2.4. Naringin 41
3. GEREÇ ve YÖNTEM 45
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler, Biyolojik Maddeler, Cihazlar ve Yazılımlar 45

3.1.1. Kimyasal Maddeler 45
3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar 46
3.2. Naringin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini 47
3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu 47
3.3.1. Doğrusallık 48
3.3.2. Doğruluk 48
3.3.3. Kesinlik 48
3.3.4. Özgüllük 49
3.3.5. Duyarlılık 49
3.3.6. Stabilite 49
3.4. Spanlastik Formülasyonlarının Geliştirilmesi 49
3.4.1. Formülasyon Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları 52
3.5. Spanlastik Formülasyonlarının Karakterizasyonu 54
3.5.1. Vezikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini 54
3.5.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi 55
3.5.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi 55
3.5.4. İlaç Yükleme Çalışmaları 56
3.5.5. *İn Vitro* Salım Çalışmaları 56
3.5.6. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları 57
3.6. Formülasyonların Sterilizasyonu 57
3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları 58
3.8. Stabilite Çalışmaları 59
4. BULGULAR 61
4.1. Naringin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini 61
4.2. Analitik Yöntem Validasyonu 61
4.2.1. Doğrusallık 62
4.2.2. Doğruluk 62
4.2.3. Kesinlik 63
4.2.4. Özgüllük 64

4.2.5. Duyarlılık (LOD ve LOQ) 65
4.2.6. Stabilite 65
4.3. Formülasyon Çalışmaları 65
4.3.1. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonlarının Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları 65
4.3.2. Morfolojik Değerlendirme 70
4.3.3. FTIR Spektroskopisi Analizi Bulguları 70
4.3.4. Naringin Yüklü Spanlasik Formülasyonlarının İlaç Yükleme Etkinliği ve *İn Vitro* İlaç Salımı 74
4.3.5. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları 76
4.4. Formülasyonların Sterilizasyonu 77
4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları 77
4.6. Stabilite Çalışmaları 80
5. TARTIŞMA 86
5.1. Analitik Yöntem Validasyonu 88
5.1.1. Naringin'in Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu 88
5.2. Formülasyon Çalışmaları 90
5.2.1. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonlarının Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları 90
5.2.2. Morfolojik Değerlendirme 96
5.2.3. FTIR Spektroskopisi 96
5.2.4. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonunun İlaç Yükleme Etkinliği ve İn Vitro İlaç Salımı 98
5.2.5. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları 102
5.3. Formülasyonun Sterilizasyonu 103
5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları 104
5.5. Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi 106
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 109
7. KAYNAKLAR 112
8. EKLER 125
Ek 1. Orijinallik Ekran Görüntüsü
Ek 2. Dijital Makbuz

Ek 3. Tez Çalışmasından Sunulan Poster

9. ÖZGEÇMİŞ 128

SİMGELER ve KISALTMALAR

°C: Santigrat Derece

µg: Mikrogram

µL: Mikrolitre

µm: Mikrometre

cm^{-1}: Dalga Sayısı

$\bar{X}$: Ortalama

AMT: Adsorpsiyon Aracılı Transsitoz

ATRX: Alfa-talasemi/zihinsel engellilik sendromu, X'e bağlı

BCRP: Meme Kanseri Direnç Proteini

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CED: Konveksiyonla güçlendirilmiş ilaç verilişi ("Convection-Enhanced Delivery")

CMT: Taşıyıcı Aracılı Taşıma

Da: Dalton

DLS: Dinamik Işık Saçılımı

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Dimetilsülfoksit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EE: Enkapsülasyon Etkinliği

EPR: Artırılmış geçirgenlik ve tutulum (Enhanced Permeability and Retention)

FBS: Fetal Bovin Serum

FUS: Odaklanmış Ultrason

FTIR: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GBM: Glioblastom

GLUT1: Glukoz Taşıyıcı 1

g/mol: Gram/Mol

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

ICH: Uluslararası Uyum Konseyi

IDH: İzositrat Dehidrojenaz

J: Birim Zamanda Ekstrüde Edilen Formülasyon Miktarı

KBB: Kan-Beyin Bariyeri

KTB: Kan-Tümör Bariyeri

LC: Yükleme Kapasitesi

LITT: Lazer İnterstisyel Termal Tedavi

LOD: Saptama Sınırı

LOQ: Tayin Sınırı

LUV: Büyük Tek Katmanlı Veziküller

MGMT: O^6-metilguanin-DNA metiltransferaz

mL: Mililitre

MLV: Çok Katmanlı Veziküller

MRG: Manyetik Rezonans Görüntüleme

MSS: Merkezi Sinir Sistemi

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür

mV: Milivolt

n: Örneklem Sayısı

NEİTS: Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistemler

NAR: Naringin

nm: Nanometre

NVU: Nörovasküler Ünite

p: İstatistiksel Anlamlılık Değeri

PBS: Fosfat Tamponu (Phosphate-Buffered Saline)

PDI: Polidispersite İndeksi

R^2: Belirlilik (Korelasyon) Katsayısı

rp: Polikarbonat Membran Filtrenin Gözenek Boyutu

rv: Ekstrüzyon Sonrası Veziküllerin Boyutu

RG2: Sıçan Glioblastom Hücre Hattı

RMT: Reseptör Aracılı Taşıma

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

S/N: Sinyal/gürültü oranı

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

SLN: Katı lipid nanopartiküller

SS: Standart Sapma

SUV: Küçük Tek Katmanlı Veziküller

TEM: Geçirimli Elektron Mikroskobu

TERT: Telomeraz Ters Transkriptaz

TJ: Sıkı Bağlantı (*tight junction*)

TMZ: Temozolamid

v/v: Hacim/Hacim

VK: Varyasyon Katsayısı

WHO CNS5: Dünya Sağlık Örgütü Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri Sınıflaması

ŞEKİLLER

Şekil **Sayfa**

2.1. Beyin ve merkezi sinir sistemi kanserlerinin dünya genelindeki yaşa standardize insidans hızları. (YSH; dünya standart nüfusuna göre, 100.000 kişide, her iki cinsiyet, 2022). ((43) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır.) 7

2.2. Kan-beyin bariyerinin şematik görünümü. 17

2.3. Kan-beyin bariyeri ve Kan-tümör bariyerinin şematik görünümü. 18

2.4. Bazı nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlere ait şematik gösterim 29

2.5. Nanoveziküler sistemlerin yapısının şematik gösterimi 31

2.6. Spanlastik yapısının şematik gösterimi. 34

2.7. Naringin'in kimyasal yapısı 42

3.1. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi. 52

4.1. Naringin'in HPLC kromatogramı (10 µg/mL). 61

4.2. Naringin'in doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği (n=6). 62

4.3. Span 60, Tween 80 ve Boş spanlastik (plasebo) formülasyonuna ait HPLC analizinde elde edilen kromatogram görüntüsü (**Yeşil çizgi:** Span 60, **kırmızı çizgi:** Tween 80 **mavi çizgi:** Boş spanlastik (plasebo) formülasyonu). 64

4.4. Faktöriyel tasarım kapsamında Tween 80 miktarının (mg) ve sonikasyon süresinin (dk) vezikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve PDI üzerindeki ana etki ve etkileşim grafikleri. 67

4.5. Spanlastik formülasyonlarına ait SEM görüntüleri (A: Boş spanlastik formülasyonu, B: NAR yüklü spanlastik formülasyonu). 70

4.6. Naringin'in FTIR spektrumu. 71

4.7. Span 60'ın FTIR spektrumu. 71

4.8. Tween 80'in FTIR spektrumu. 72

4.9. Boş spanlastik formülasyonu FTIR spektrumu. 72

4.10. Naringin yüklü spanlastik(S5) formülasyonu FTIR spektrumu. 73

4.11. Naringin, Span 60, Tween80, boş spanlastik formülasyonu ve Naringin yüklü spanlastik (S5) formülasyonunun FTIR spektrumu (**a:** Naringin, **b:** Tween80, **c:** Span60, **d:** Boş spanlastik formülasyonu, **e:** Naringin yüklü spanlastik(S5 kodlu formülasyon). 73

4.12. Naringin yüklü spanlastik formülasyonları ve etkin maddenin in vitro kümülatif salım profilleri (n=6, x ± SS). 74

4.13. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarına ve etkin maddeye ait in vitro kümülatif salım profillerinin karşılaştırmalı grafiği (n=6, x ± SS). 75

4.14. RG2 hücre hattı kullanılarak üç formülasyon grubu (Naringin çözeltisi, boş ve dolu spanlastik formülasyonları) ile gerçekleştirilen in vitro hücre canlılığı çalışması. (n=3, X̄±SS). 79

4.15. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonun ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, **p<0,01, ****p<0,0001;ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA). 81

4.16. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA). 82

4.17. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, ****p<0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA). 82

4.18. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA) 83

4.19. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA) 83

4.20. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, **p< 0,01, ***p< 0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA) 84

4.21. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, ****p< 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA) 84

4.22. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA) 85

4.23. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, *p<0,05, ****p<0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA) 85

TABLOLAR

Tablo **Sayfa**

2.1. Dünya Sağlık Örgütü'ne (2021) göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi 5

2.2. Naringin'in fizikokimyasal özellikleri 43

3.1. Kullanılan maddeler ve markaları. 45

3.2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar 46

3.3. Naringin'nin HPLC ile miktar tayinininde kullanılan kromatografik koşullar 47

3.4. Faktöriyel tasarım çalışmalarında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri. 53

3.5. Faktöriyel tasarım parametrelerine göre oluşturulan formülasyon kodları. 53

3.6. İleri karakterizasyon ve in vitro salım çalışmaları için seçilen spanlastik formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler. 54

4.1. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=6). 63

4.2. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik çalışması sonuçları (n=6). 63

4.3. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6). 64

4.4. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonunda stabilite çalışması sonuçları (n=6±SS). 65

4.5. Faktöriyel tasarım çalışmaları kapsamında hazırlanan naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının vezikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği (%EE), PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3). 66

4.6. Naringin içeren (dolu, S5) ve içermeyen (boş) spanlastik formülasyonlarına ait karakterizasyon bulguları (n=3, x ± SS). 69

4.7. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının DI değerleri. 76

4.8. Naringin çözeltisi, boş spanlastik formülasyonu (etkin madde içermeyen S5) ve optimum spanlastik formülasyonun (S5) sitotoksite bulguları (24. saat) (n=3). 78

4.9. Spanlastik formülasyonlarının farklı saklama koşullarındaki stabilite verileri (n=3). 80

1. GİRİŞ

Beyin tümörleri arasında glioblastom (GBM), çevre beyin dokusuna infiltratif yayılım göstermesi, yüksek nüks oranı ve mevcut tedavilere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle yüksek oranda mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır (1, 2). GBM, erişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörü olup primer malign beyin ve MSS tümörlerinin %51,5'ini oluşturmaktadır. GBM'nin uygulanan bütün tedavi yaklaşımlarına rağmen agresif büyüme özelliği ve olumsuz prognozu nedeniyle yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine ihtiyaç duyulan başlıca tümör türlerinden biri olduğu bildirilmiştir (1, 3, 4).

GBM, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflamasında en yüksek derece olan 4. derecede yer almakta; nekroz ve/veya mikrovasküler proliferasyon, hızlı ilerleme ve yaygın infiltrasyon ile karakterize edilmektedir (4, 5). Çevre dokudan belirli sınırlarla ayrılabilen pek çok solid tümörden farklı olarak, GBM hücreleri görüntüleme yöntemleriyle belirlenen tümör sınırlarının ötesindeki normal görünümlü beyin dokusuna infiltre olmaktadır (1, 2). Bu nedenle GBM tedavisinde tek bir yöntem yeterli olmamakta ve tedavi, cerrahi, radyoterapi ve kemoterapinin birlikte uygulandığı multidisipliner bir yaklaşıma dayanmaktadır (2, 6). Ancak bu kombine tedaviye rağmen GBM'de hastaların ortalama yaşam süresi yaklaşık 16-18 aydır ve beş yıllık sağkalım oranı %5'i geçmemektedir (4, 7).

Beyin tümörlerinin farmakolojik tedavisinde karşılaşılan temel engellerden biri, beyni dolaşımdaki maddelerden koruyan Kan-Beyin Bariyeri (KBB)'dir (8, 9). Bu engel, beyin mikrovasküler endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, taşıyıcı proteinler ve P-glikoprotein gibi dışa atım mekanizmaları birçok terapötik maddenin beyin parankimine geçişini sınırlandırmakta (10, 11) olup küçük moleküllü ilaçların %98'inden fazlası ve makromoleküler maddelerin neredeyse tamamı beyin dokusuna yeterli düzeyde ulaşamamaktadır (12, 13). Tümör gelişimiyle birlikte oluşan Kan-Tümör Bariyeri (KTB) ise bölgesel olarak değişken geçirgenlik özellikleri göstermekte ve tümör dokusunun tamamına homojen ilaç dağılımını güçleştirmektedir (14, 15). Özellikle infiltratif tümör hücrelerinin bulunduğu bölgelerde bariyer bütünlüğünün

kısmen korunması, sistemik tedavilerle yeterli antitümör etkinliğin elde edilmesini zorlaştırmaktadır (14). Bu durum, ilaçların biyolojik bariyerlerle etkileşimini düzenleyebilen ve hedef bölgeye taşınmasını iyileştirebilen yenilikçi ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini gerekli kılmaktadır (16, 17).

Son yıllarda nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemler (NEİTS), beyin tümörlerinin tedavisinde karşılaşılan sınırlamaların aşılmasına yönelik araştırılan yaklaşımlar arasında ilk sıralarda yer almaktadır (17). Bu sistemler; küçük partikül boyutları, geniş yüzey alanları, ayarlanabilir yüzey özellikleri ve farklı fizikokimyasal yapıdaki etkin maddeleri taşıyabilme kapasiteleri sayesinde ilaçların çözünürlüğünü, stabilitesini ve salım özelliklerini iyileştirme potansiyeline sahiptir (17, 18). Lipozom ve niozom gibi nanoveziküler sistemler, polimerik miseller, dendrimerler, lipit nanopartiküller ve metalik nanopartiküller gibi çeşitli nanotaşıyıcılar, ilaçların KBB'den geçişini ve tümör dokusunda birikimini artırarak beyin tümörlerinin tedavisinde etkinliği iyileştirmek amacıyla araştırılmaktadır (19-21). Ayrıca bu sistemler, etkin maddelerin biyolojik ortamda korunmasına ve uygun yüzey modifikasyonlarıyla hedef dokuya taşınmasının desteklenmesine olanak sağlayabilmektedir (18). Bununla birlikte, NEİTS'in KBB'yi geçebilmesi yalnızca partikül boyutuna bağlı olmayıp yüzey yükü, bileşimi, dolaşımdaki stabilitesi ve biyolojik bariyerlerle etkileşimi gibi çok sayıda faktörden etkilenmektedir (17, 22, 23).

Spanlastikler, esnek yapıları ve biyouyumlulukları sayesinde ilaçların biyolojik bariyerlerden geçişini ve hedef dokuya taşınmasını kolaylaştırabilen veziküler taşıyıcı sistemlerdir. Özellikle beyne ilaç taşınmasında, yüzey özellikleri ve esneme (deformasyon) yetenekleri sayesinde KBB'den esneyerek geçme potansiyeli sunarak ilaçların beyin dokusuna ulaşımını artırabilir ve sistemik yan etkileri azaltabilirler. Spanlastikler, iyonik olmayan yüzey etkin maddeler ve kenar aktivatörleri kullanılarak hazırlanmaktadır. Spanlastiklerin yapısında bulunan kenar aktivatörleri, vezikül çift tabakasının esnekliğini artırarak dar geçiş alanlarından esneyerek (deformasyona uğrayarak) ilerleyebilmesine katkı sağlayabilmektedir (24, 25). Kolesterol içeren geleneksel veziküler sistemlerden farklı olarak; yüksek elastikiyet özellikleri

göstermeleri, farklı çözünürlük özelliklerine sahip etkin maddelerin taşınmasına uygun olmaları ve ilaç salım özelliklerinin formülasyon bileşimiyle düzenlenebilmesi, bu sistemleri NEİTS arasında öne çıkarmaktadır (20, 26-29).

Son yıllarda, naringin (NAR) gibi doğal kaynaklı biyoaktif moleküller, antitümör, antioksidan ve apoptozu düzenleyici özellikleri nedeniyle beyin tümörlerine yönelik yeni tedavi sistemlerinin geliştirilmesinde dikkat çeken adaylar arasında yer almaktadır. NAR başta turunçgiller olmak üzere çeşitli bitkisel kaynaklarda bulunan, flavanon glikozit yapısında doğal bir bileşik olup antioksidan, antiinflamatuvar ve antitümör aktiviteleri nedeniyle farmakolojik araştırmalarda dikkat çekmektedir (30, 31). Literatürde NAR'ın gliom dahil farklı kanser hücrelerinde hücre proliferasyonunun baskılanması, apoptotik mekanizmaların düzenlenmesi ve oksidatif stresle ilişkili hücresel yolakların modülasyonu üzerinden antitümör etki gösterebildiği bildirilmektedir (32, 33). Bununla birlikte NAR'ın sudaki sınırlı çözünürlüğü, hidrofilik glikozit yapısı (34) ve yüksek oranda metabolizasyona uğraması biyoyararlanımını kısıtlamaktadır (33). Yapılan biyodağılım çalışmalarında oral uygulamadan sonra NAR ve metabolitlerinin KBB nedeniyle beyinde en düşük konsantrasyonlarda bulunduğunu göstermiştir (35). Bu nedenle NAR'ın NEİTS halinde formüle edilmesi çözünürlük, stabilite ve salım özelliklerinin iyileştirilmesi için uygulanacak rasyonel yaklaşımlardan biridir (30, 31).

Bu tez çalışması kapsamında, GBM'in etkin tedavisi için, NAR yüklü spanlastik formülasyonları geliştirilmiş, in vitro karakterizasyon çalışmaları (vezikül boyutu ve dağılımı, zeta potansiyeli, ilaç yükleme, elastikiyet özellikleri, morfolojik değerlendirme, *in vitro* salım özellikleri yapılmış ve RG2 sıçan glioblastom hücre hattında sitotoksisiteleri değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Merkezi Sinir Sistemi Tümörleri

Kanser, anormal hücrelerin kontrolsüz bir şekilde çoğalması, normal sınırlarını aşarak vücudun komşu bölgelerine ve/veya diğer organlara yayılması sonucu vücudun birçok farklı organında veya dokusunda farklı etkenler sonucu ortaya çıkabilen ve yüksek oranda ölüme neden olabilen bir hastalıktır (36). Kanser, dünya çapında ikinci en yaygın ölüm nedenidir; 2018 yılında dünya çapında 17 milyon insana kanser teşhisi koyulmuştur ve 9.6 milyon insan bu sebepten ötürü hayatını kaybetmiştir (37). 2024 yılında, dünya genelinde tahmini 20,6 milyon yeni kanser vakası ve 9,8 milyon ölüm meydana gelmiştir; bu, her beş kişiden birinin yaşamı boyunca kansere yakalanmasına ve her dokuz erkekten birinin, her 13 kadından birinin bu hastalıktan ölmesine denk gelmektedir (38). Demografik verilere dayalı tahminler, yıllık yeni kanser vaka sayısının 2050 yılına kadar 35 milyona ulaşacağını göstermektedir (39).

Merkezi sinir sistemi (MSS) tümörleri, beyin ve omuriliği etkileyen neoplastik oluşumlardır ve tüm tümör türlerinin %2'sini oluşturur (5, 40) . Merkezi sinir sistemi tümörleri, yerleri ve sıklıkla lokal olarak yayılma eğilimleri nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite oranlarıyla karakterize edilmektedir (1). Güncel Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sınıflaması, tümörlerin tanı ve derecelendirilmesinde histopatolojik bulguların yanı sıra moleküler belirteçleri de dikkate almaktadır. MSS tümörleri arasında glioblastom (GBM), erişkinlerde en sık görülen primer malign beyin tümörü olup yüksek invazivitesi, tedaviye dirençli yapısı ve düşük sağkalım oranları nedeniyle en agresif tümörlerden biri olarak kabul edilmektedir (4).

Tablo 2.1. Dünya Sağlık Örgütü'ne (2021) göre Merkezi Sinir Sistemi Tümörlerinin Derecelendirilmesi (5).

DSÖ Derecesi	**Örnek Tümör Tipleri**	**Genel Özellikleri**
Derece 1 (En Düşük Derece)	Pilositik astrositom, gangliogliom, disembriyoplastik nöroepitelyal tümör	• Genellikle yavaş büyüyen ve iyi huylu tümörlerdir. • Uygun vakalarda tam cerrahi rezeksiyonla uzun süreli hastalık kontrolü sağlanabilir. • Bununla birlikte klinik seyir, tümörün anatomik yerleşimine ve tam olarak çıkarılabilmesine bağlıdır.
Derece 2 (Düşük Derece)	Astrositom, IDH-mutant, CNS (derece 2), oligodendrogliom, IDH-mutant, 1p/19q-kodelesyonlu (derece 2)	• Diffüz infiltratif büyüme gösterebilen, görece yavaş seyirli tümörlerdir. • Normal beyin dokusundan kesin sınırlarla ayrılamayabilir ve zaman içerisinde progresyon gösterebilirler.
Derece 3 (Yüksek Derece)	Astrositom, IDH-mutant (derece 3) , oligodendrogliom, IDH-mutant, 1p/19q-kodelesyonlu (derece 3)	• Derece 2 tümörlere kıyasla daha yüksek proliferatif aktivite ve daha agresif klinik seyir gösterirler. • Nüks ve progresyon riskleri daha yüksektir. • Çoğunlukla kombine tedavi yaklaşımları gerektirirler.
Derece 4 (En Yüksek Derece)	GBM, IDH-wildtype, astrositom, IDH-mutant (derece 4), diffüz orta hat gliomu, H3 K27-altered	• Yüksek dereceli ve agresif tümörlerdir. • Hızlı ilerleme, yaygın infiltrasyon ve tedaviye direnç görülebilir. • GBM'de nekroz ve/veya mikrovasküler proliferasyon bulunabilir; ayrıca belirli moleküler değişiklikler de derece 4 tanısını destekleyebilir.

2.1.1. Primer ve Sekonder Beyin Tümörleri ve Sınıflandırılması

Beyin tümörleri, köken aldıkları dokuya göre primer ve sekonder (metastatik) tümörler olarak iki ana gruba ayrılmaktadır. Primer beyin tümörleri beyin parankimi, meninksler, kraniyal sinirler, hipofiz bezi ve diğer intrakraniyal yapılardan köken alırken, sekonder beyin tümörleri vücudun başka bir bölgesinde bulunan malign tümörün beyne yayılmasıyla oluşmaktadır (41). Erişkinlerde en sık karşılaşılan beyin tümörleri sistemik kanserlerin beyin metastazları, meningiomlar ve gliomlar, özellikle de GBM'dir (41). Tüm kanser hastalarının yaklaşık %20'sinde beyin metastazı geliştiği tahmin edilmekte olup beyin metastazlarının büyük bölümü akciğer kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, melanom ve renal hücreli karsinomdan kaynaklanmaktadır (42).

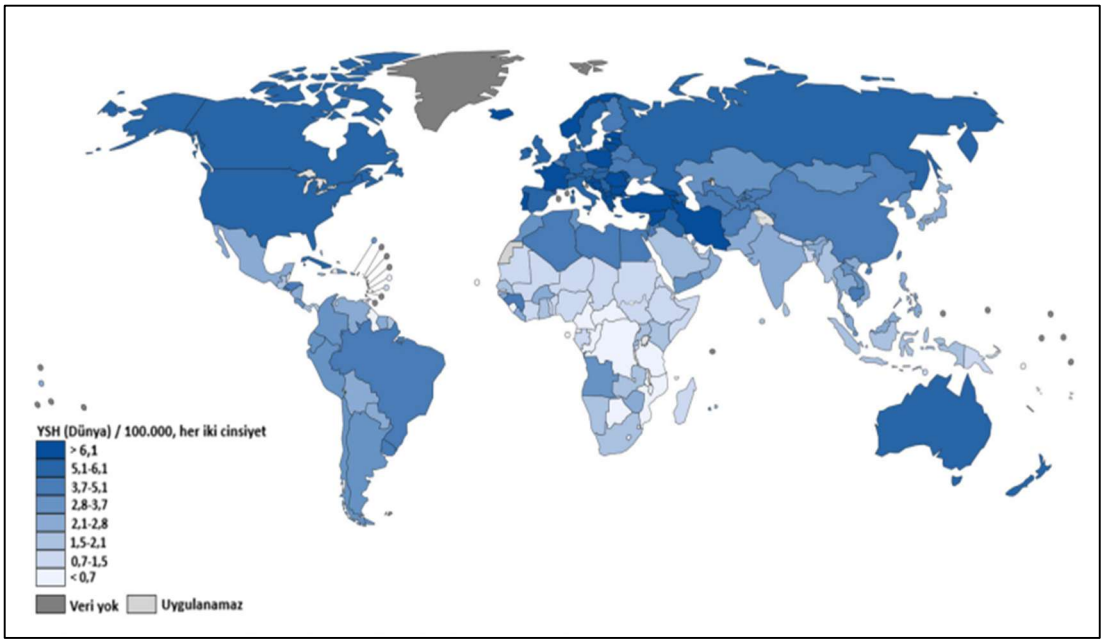
Primer MSS tümörleri, DSÖ'nün 2021 yılında yayımlanan beşinci baskı sınıflamasında (WHO CNS5) gliomlar, glionöronal ve nöronal tümörler; koroid pleksus tümörleri; embriyonal tümörler (ör. medulloblastom); pineal bölge tümörleri; kraniyal ve paraspinal sinir tümörleri; meningiomlar; mezenkimal tümörler; melanositik tümörler; hematolenfoid tümörler (ör. primer MSS lenfoması); germ hücreli tümörler ve sellar bölge tümörleri gibi farklı tümör ailelerine ayrılmaktadır (5). Bu sınıflamada tümör tipleri, histolojik özelliklerin yanı sıra IDH mutasyonu, 1p/19q kodelesyonu ve H3 K27 değişiklikleri gibi moleküler belirteçler birlikte değerlendirilerek "entegre tanı" yaklaşımıyla tanımlanmakta ve derecelendirme her tümör tipinin kendi içinde yapılmaktadır (4, 5). Bu yaklaşım doğrultusunda erişkin tip diffüz gliomlar; IDH-mutant astrositom, IDH-mutant ve 1p/19q-kodelesyonlu oligodendrogliom ve IDH-yabanıl tip GBM olmak üzere üç tipe ayrılmaktadır (Tablo 2.1) (1, 5).

2.1.2. Beyin Tümörlerinin Epidemiyolojisi

Küresel Kanser Gözlemevi (GLOBOCAN) 2022 verilerine göre dünya genelinde yılda yaklaşık 322.000 yeni beyin ve MSS kanseri vakası görüldüğü tahmin edilmekle beraber 2045 yılına gelindiğinde 474.000 yeni vaka ortaya çıkacağını; bunun da 2022 yılına kıyasla %47'lik bir artış anlamına geldiğini göstermektedir (43). Amerika Birleşik

Devletleri'nde 2017–2021 yıllarını kapsayan Merkezi Beyin Tümörü Kayıt Sistemi (CBTRUS) verilerine göre tüm primer beyin ve diğer MSS tümörlerinin yaşa göre standardize edilmiş yıllık insidansı 100.000 kişide 25,34 olup bu oran malign tümörler için 6,89, malign olmayan tümörler için ise 18,46'dır (3). Tüm primer beyin ve MSS tümörleri arasında en sık görülen histolojik tip meningiomdur (%41,7) ve malign olmayan tümörlerin %56,8'ini oluşturmaktadır. Malign tümörler arasında ise en sık GBM görülmekte olup GBM tüm primer beyin ve MSS tümörlerinin %13,9'unu, malign tümörlerin ise %51,5'ini oluşturmaktadır (3). Beyin ve MSS kanserlerinin dünya genelindeki yaşa standardize insidans hızlarının coğrafi dağılımı Şekil 2.1'de gösterilmiştir.

Beyin tümörleri yalnızca erişkinlerde değil çocukluk çağında da önemli bir sağlık sorunudur. 0–14 yaş grubundaki çocuklarda en sık görülen histolojik tip pilositik astrositom olup beyin ve diğer MSS tümörleri bu yaş grubunda kansere bağlı ölümlerin en sık nedenidir (44).



Şekil 2. 1. Beyin ve merkezi sinir sistemi kanserlerinin dünya genelindeki yaşa standardize insidans hızları. (YSH; dünya standart nüfusuna göre, 100.000 kişide, her iki cinsiyet, 2022). ((43) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır.)

2.1.3. Beyin Tümörlerinin Etiyolojisi ve Risk Faktörleri

Primer beyin tümörlerinin etiyolojisi büyük ölçüde aydınlatılamamıştır. Bu tümörlerin nadir görülmesi ve farklı histolojik tiplerin heterojen yapısı, risk faktörlerinin belirlenmesini güçleştirmektedir (45). İyonlaştırıcı radyasyona maruziyet hem çocuklarda hem de erişkinlerde beyin tümörü riskini artırdığı gösterilmiş, iyi doğrulanmış az sayıdaki risk faktöründen biridir. Buna karşılık erişkinlerde alerji öyküsünün azalmış beyin tümörü riski ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (45). Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarıyla erişkinlerde beyin tümörü riskini artıran 32 kalıtsal germ hattı varyantı tanımlanmış olup bunların 25'i gliom, 2'si meningiom, 3'ü hipofiz adenomu ve 2'si primer MSS lenfoması ile ilişkilendirilmiştir. Bunun yanı sıra nörofibromatozis tip 1 ve tip 2, Li-Fraumeni sendromu ve tüberoz skleroz gibi kalıtsal kanser sendromları da beyin tümörü riskinin arttığı nadir durumlar arasında yer almaktadır. Beyin tümörü riski ayrıca yaşa, cinsiyete ve etnik kökene göre farklılık göstermektedir (45).

2.1.4. Beyin Tümörlerinde Klinik Belirtiler ve Tanı

Beyin tümörlerinin klinik belirtileri; tümörün yerleşim yeri, büyüklüğü ve büyüme hızına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Hastalarda baş ağrısı, epileptik nöbetler, kafa içi basınç artışına bağlı bulantı ve kusma, kişilik ve bilişsel işlevlerde değişiklikler ile tümörün yerleştiği bölgeye özgü motor, duyusal, görme veya konuşma bozuklukları gibi fokal nörolojik hasarlar görülebilmektedir (1, 41). Peritümöral beyin ödemi ve nöbetler, hastalığın seyri boyunca ayrıca tedavi gerektiren önemli tıbbi komplikasyonlar arasında yer almaktadır (41).

Beyin tümörlerinin tanısında kontrastlı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) temel görüntüleme yöntemidir (1, 41). Kesin tanı ise cerrahi rezeksiyon veya biyopsi ile elde edilen doku örneğinin histopatolojik ve moleküler incelemesiyle konulmaktadır. WHO CNS5 sınıflamasıyla birlikte IDH mutasyonu, 1p/19q kodelesyonu, ATRX kaybı ve TERT promotör mutasyonu gibi moleküler belirteçler tanı ve derecelendirmenin ayrılmaz bir parçası hâline gelmiştir. MGMT promotör

metilasyonu ise özellikle GBM'de alkilleyici kemoterapiye yanıtı öngören önemli bir prognostik ve prediktif belirteç olarak kullanılmaktadır (4, 5).

2.1.5. Beyin Tümörlerinin Tedavisinde Genel Yaklaşımlar ve Karşılaşılan Güçlükler

Beyin tümörlerinin tedavisi; tümörün tipi, derecesi, moleküler özellikleri ve yerleşim yeri ile hastanın yaşı ve genel durumu dikkate alınarak planlanmakta olup çoğunlukla beyin cerrahisi, radyasyon onkolojisi ve tıbbi onkolojinin birlikte yer aldığı multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir (41). Meningiomlar gibi çoğunlukla iyi huylu seyreden tümörlerde cerrahi rezeksiyon temel tedavi yaklaşımı iken radyoterapi ve kemoterapi genellikle yüksek riskli veya tedaviye dirençli olgularda uygulanmaktadır. Beyin metastazlarında cerrahi, stereotaktik radyocerrahi, tüm beyin radyoterapisi ve sistemik tedaviler primer tümörün özellikleri ve metastazların sayısı dikkate alınarak birlikte değerlendirilmektedir (41, 42). Gliomlarda tedavinin temelini, uygun hastalarda maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonun ardından uygulanan radyoterapi ve kemoterapi oluşturmaktadır (1).

Beyin tümörlerinin tedavisi, diğer solid tümörlere kıyasla çeşitli özgün güçlükler içermektedir. Tümörün fonksiyonel açıdan kritik beyin bölgelerine yakın yerleşimi cerrahi rezeksiyonu sınırlandırmakta, özellikle diffüz gliomlarda tümör hücrelerinin görüntüleme ile belirlenen tümör sınırlarının ötesindeki beyin dokusuna infiltre olması, tümörün tamamen çıkarılmasını çoğu zaman olanaksız kılmaktadır (1). Radyoterapi ve sistemik tedaviler çevredeki sağlıklı beyin dokusunda nörotoksisiteye yol açabilmekte, kan-beyin bariyeri (KBB) ise sistemik olarak uygulanan pek çok terapötik ajanın tümör dokusuna yeterli konsantrasyonda ulaşmasını engellemektedir (1, 41). Bu güçlükler, beyin tümörlerinde etkin maddeyi hedef bölgeye yeterli konsantrasyonda ulaştırabilen yeni ilaç taşıyıcı sistemlerin geliştirilmesini önemli hale getirmektedir.

2.2. Glioblastom

Beyin tümörleri arasında en sık görülen malign primer tümör olması, infiltratif büyüme özelliği, tedaviye direnci ve kötü prognozu nedeniyle GBM, beyin tümörlerinin tedavisinde karşılaşılan güçlükleri en belirgin biçimde yansıtan tümör tipidir (1, 3).

GBM, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 4. derece merkezi sinir sistemi tümörleridir ve çoğunlukla yaşlı hastalarda (tanı anındaki ortalama yaş 65 yıl) görülmektedir (4, 6, 46)

Klinik olarak, görüntüleme ve moleküler tanıdaki ilerlemelere ve maksimum cerrahi rezeksiyon, radyoterapi ve temozolomid ile kemoterapiyi içeren entegre tedavinin uygulanmasına rağmen, GBM'de hastaların ortalama yaşam süresi yaklaşık 16-18 aydır ve beş yıllık sağkalım oranı %5'i geçmemektedir (4, 7).

GBM tedavisinin hala büyük bir zorluk teşkil etmesinin nedenleri çeşitlidir. Bunlar arasında, cerrahi olarak çıkarılma imkânlarını sınırlayan tümörün yaygın ve infiltratif yapısı; GBM malign hücrelerinin hızlı çoğalma hızı; ilk tedaviden kısa süre sonra tedaviye dirençli hücre klonlarının ortaya çıkması; sistemik ajanların beyin parankimine erişimini engelleyen kan-beyin bariyerinin neden olduğu ilgili engel; tümör içindeki çoklu sinyal iletim yolaklarının aktivasyonu ve spesifik gen mutasyonları ve beynin belirli bölgelerinin radyasyon tedavisine karşı özel duyarlılığı gibi nedenler bulunmaktadır (47).

GBM tedavisinde hastaların sağ kalım süresini artırmak için son yıllarda nanoteknoloji, immünoterapi ve gen tedavisi gibi yenilikçi yaklaşımlar araştırılmaktadır (5, 48-51).

2.2.1. Glioblastomun Tedavisinde Kullanılan Yöntemler

GBM'nin hızlı ilerleyen, infiltratif özellik gösteren ve yüksek dereceli bir beyin tümörü olması, tedavi sürecini oldukça güçleştirmektedir. Bu nedenle hastalığın yönetimi genellikle beyin cerrahisi, radyasyon onkolojisi ve tıbbi onkoloji gibi farklı disiplinlerin birlikte çalıştığı multidisipliner bir yaklaşımla yürütülmektedir. Tedavinin temel amacı; tümör yükünü mümkün olduğunca azaltmak, hastalığın ilerlemesini geciktirmek, nörolojik fonksiyonları korumak ve hastanın sağkalım süresini uzatmaktır. Standart tedavi yaklaşımı, maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve kemoterapi uygulanmasını içermektedir. Bu kombine tedavi yaklaşımı, günümüzde GBM tedavisinin temelini oluşturmaktadır (6).

Cerrahi Tedavi

Cerrahi girişim, yeni tanı konulan GBM hastalarında hem histopatolojik ve moleküler tanının doğrulanması hem de tümör yükünün azaltılması amacıyla uygulanan temel tedavi yaklaşımlarından biridir. Cerrahiye uygun hastalarda, nörolojik fonksiyonlar korunarak kontrast tutan tümör dokusunun mümkün olan en geniş ölçüde çıkarılması, diğer bir ifadeyle maksimum güvenli rezeksiyon, temel cerrahi hedef olarak kabul edilmektedir. Tümörün fonksiyonel açıdan kritik beyin bölgelerinde bulunması veya hastanın genel durumunun kapsamlı bir rezeksiyona uygun olmaması durumunda histolojik ve moleküler tanı elde etmek amacıyla stereotaktik ya da açık biyopsi uygulanabilmektedir (2, 52).

Tümör dokusunun çıkarılması, intrakraniyal kitle etkisinin ve çevre dokulardaki basının azaltılmasına katkıda bulunarak hastanın nörolojik semptomlarında iyileşme sağlayabilir. Bununla birlikte, GBM hücrelerinin görüntüleme yöntemleriyle belirlenen tümör sınırlarının ötesindeki normal görünümlü beyin dokusuna infiltre olması nedeniyle tüm tümör hücrelerinin cerrahi olarak ortadan kaldırılması çoğunlukla mümkün değildir. Bu nedenle GBM, maksimum güvenli rezeksiyonun ardından uygulanan radyoterapi ve kemoterapiye rağmen hastaların büyük bölümünde nüks etmektedir (2, 53). Uygulanacak cerrahi yöntemin kapsamı; tümörün büyüklüğü ve

lokalizasyonu, fonksiyonel beyin alanlarıyla ilişkisi, hastanın yaşı, nörolojik durumu, performans düzeyi ve eşlik eden hastalıkları dikkate alınarak belirlenmektedir. Ayrıca seçilmiş hastalarda cerrahi rezeksiyon sonrasında tümör kavitesine karmustin içeren biyobozunur implantların yerleştirilmesiyle kemoterapötik ilacın doğrudan cerrahi bölgeye uygulanması mümkün olabilmektedir (54). Ancak cerrahi girişimler kanama, enfeksiyon, nöbet, beyin ödemi ve yeni nörolojik fonksiyon kayıpları gibi komplikasyonlara neden olabileceğinden, rezeksiyonun genişliği ile nörolojik işlevlerin korunması arasında dikkatli bir denge kurulması gerekmektedir (52).

Radyoterapi

Cerrahi müdahale sonrasında radyoterapi, görüntüleme yöntemleriyle saptanamayan veya cerrahi olarak çıkarılamayan infiltratif tümör hücrelerinin kontrol altına alınması amacıyla GBM tedavisinin temel bileşenlerinden biri olarak uygulanmaktadır. Genel durumu uygun, yeni tanı konulmuş erişkin hastalarda standart yaklaşım, radyoterapinin kemoterapi ile eş zamanlı uygulanması ve ardından adjuvan kemoterapiye devam edilmesidir (2, 55). Konvansiyonel radyoterapi protokolü genellikle tümör yatağı ve çevresindeki riskli beyin dokusunu kapsayacak şekilde, günlük 2 Gy dozlarda haftada beş gün olmak üzere toplam 30 fraksiyonda 60 Gy uygulanmasını içermekte ve yaklaşık altı hafta sürmektedir (55, 56). Radyoterapiye eş zamanlı ve sonrasında kemoterapi eklenmesinin, yalnızca radyoterapi uygulanmasına kıyasla genel sağkalım ve progresyonsuz sağkalım üzerinde anlamlı bir iyileşme sağladığı gösterilmiştir (6). Bununla birlikte, iyonlaştırıcı radyasyonun tümör dokusuna tamamen özgü olmaması nedeniyle çevredeki sağlıklı beyin dokusu da tedaviden etkilenebilmektedir. Bu durum yorgunluk, saç dökülmesi, beyin ödemi, nörokognitif bozukluklar ve radyasyon nekrozu gibi erken veya geç dönem yan etkilere yol açabilmektedir (2, 56). Günümüzde üç boyutlu konformal radyoterapi, yoğunluk ayarlı radyoterapi ve görüntü kılavuzlu radyoterapi gibi gelişmiş teknikler kullanılarak hedef hacme yeterli doz uygulanırken sağlıklı beyin dokusunun maruz kaldığı radyasyon dozunun azaltılması amaçlanmaktadır (56).

Kemoterapi

Kemoterapi, GBM tedavisinde cerrahi ve radyoterapiyi tamamlayan sistemik tedavi yaklaşımlarından biridir. Genel durumu uygun, yeni tanı konulmuş erişkin hastalarda standart tedavi; radyoterapiyle eş zamanlı kemoterapi uygulanmasını ve radyoterapinin tamamlanmasının ardından adjuvan kemoterapiye devam edilmesini içermektedir (2, 6). GBM tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapötik ilaç, oral yolla uygulanan alkilleyici bir ajan olan temozolomiddir. Temozolomid, DNA üzerinde alkilasyon oluşturarak tümör hücrelerinin çoğalmasını engellemekte ve hücre ölümünü desteklemektedir (2). Radyoterapiye eş zamanlı ve sonrasında temozolomid eklenmesinin, yalnızca radyoterapi uygulanmasına kıyasla medyan genel sağkalımı 12,1 aydan 14,6 aya, iki yıllık sağkalım oranını ise %10,4'ten %26,5'e yükselttiği gösterilmiştir (6). Bununla birlikte, kemoterapinin etkinliği KBB'nin birçok antikanser ilacın tümör bölgesine yeterli konsantrasyonda ulaşmasını sınırlaması, GBM'nin moleküler heterojenliği ve tümör hücrelerinin tedaviye direnç geliştirmesi gibi nedenlerle azalabilmektedir (57, 58). Kemoterapi sırasında bulantı, kusma, yorgunluk, lenfopeni, trombositopeni ve diğer hematolojik toksisiteler görülebilmektedir (2, 6). GBM'nin infiltratif yapısı ve tedavi direnci nedeniyle kemoterapi çoğunlukla tek başına küratif bir tedavi olarak değil, cerrahi ve radyoterapiyle birlikte uygulanan kombine tedavi yaklaşımının bir parçası olarak kullanılmaktadır (2, 6).

2.2.2. Kan-Beyin Bariyeri

KBB, kan ile merkezi sinir sistemi (MSS) arasındaki madde geçişini seçici biçimde düzenleyen dinamik ve yarı geçirgen bir bariyerdir. Beyin kapillerlerinin iç yüzeyini kaplayan endotel hücreleri, birbirlerine sıkı bağlantılarla bağlanarak paraselüler madde geçişini büyük ölçüde sınırlandırmaktadır (8, 9).Bir dizi reseptör, taşıyıcı, "efflux" pompası ve diğer hücresel bileşenlerle birlikte bu bariyer, damar bölmesindeki moleküllerin beyne girişini ve beyinden atılmasını kontrol eder. Sağlam bir KBB, kan yoluyla taşınan çoğu maddenin beyne girmesini engeller. Bununla birlikte, KBB'nin bu koruyucu özelliği, küçük moleküllü ilaçların %98'den fazlasının ve makromoleküler terapötik maddelerin neredeyse tamamının beyin dokusuna yeterli

düzeyde ulaşmasını engellemektedir (12, 13). Bu sıkı bağlantı, moleküler ağırlığı 400-600 Da'dan düşük olan lipit çözünür ilaçların yalnızca pasif difüzyonuna izin verir. Terapötik ajanların lipofilikliğinin artırılması, KBB geçirgenliğini iyileştirmek için uygulanabilir bir yöntemdir (59).

KBB, merkezi sinir sisteminde normal beyin işlevlerinin sürdürülebilmesi için iyon ve besin düzeylerini dar bir aralıkta tutarak homeostazın korunmasını sağlar. Potasyum, amino asitler ve plazma proteinleri gibi maddelerin MSS'ye geçişi bu yapı tarafından sıkı biçimde düzenlenmektedir (10). Bu seçici kontrol, beyin kapiller endotel hücrelerinin kanla temas eden lüminal yüzeyinde yer alan özgül taşıma sistemleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Glukoz gibi temel besinler, endotel hücrelerinde eksprese edilen GLUT1 gibi taşıyıcı proteinler yardımıyla beyin dokusuna alınmaktadır (10, 60).

KBB'nin lüminal yüzeyinde bulunan çeşitli dışa atım ("efflux") taşıyıcıları, bazı maddeleri MSS'den yeniden kana taşıyarak beyin dokusundaki birikimlerini sınırlandırmaktadır (10). Örneğin ABCB1, diğer adıyla P-glikoprotein, çeşitli nörotoksinlerin ve ilaçların beyinden uzaklaştırılmasında görev alırken; ABCG2 veya BCRP, ilaçların yanı sıra steroidler ve folatlar gibi bazı endojen bileşiklerin dışa atılmasına katkı sağlamaktadır. Bu sistemler, MSS mikroçevresinin hızlı biçimde düzenlenmesi ve atıkların uzaklaştırılması açısından gerekli olmakla birlikte, ilaçların beyne yeterli düzeyde ulaştırılmasını güçleştirebilmektedir (11).

KBB'de hücreler arası diğer taşıma yolları da oldukça sınırlıdır. Beyin endotel hücrelerinde transsitoz aktivitesinin diğer endotel hücrelerine kıyasla daha düşük olması ve lökosit adezyon moleküllerinin düşük düzeyde eksprese edilmesi hem makromoleküllerin hem de bağışıklık hücrelerinin MSS'ye geçişini kısıtlamaktadır. KBB'nin sahip olduğu bu çok yönlü seçici mekanizmalar, yalnızca belirli moleküllerin beyin dokusuna geçmesine izin vermekte ve sistemik olarak uygulanan ilaçların MSS'ye taşınmasında önemli bir engel oluşturmaktadır (11).

2.2.3. Kan-Beyin Bariyerinin Anatomik Yapısı

KBB ilk olarak Paul Ehrlich tarafından keşfedilmiş olup Edwin Goldmann tarafından da kanıtlanmıştır (59). KBB, kandaki yabancı maddeleri merkezi sinir sisteminden (MSS) izole eden geniş, çok hücreli ve dinamik bir yarı geçirgen zardır (61). Yaklaşık yüz milyar kılcal damardan oluşan KBB, insan beyninde 20 m^2'lik bir alanı kaplar ve uzunluğu yaklaşık 600 kilometredir. Beyne oksijen taşınması ile karbondioksit ve metabolitlerin uzaklaştırılması KBB tarafından düzenlenir (61). KBB'nin varlığı, istikrarlı bir ortam sağlayarak beynin hasar görmesini önler (62, 63). Ancak aynı zamanda, nörodejeneratif hastalıklar ve beyin tümörü gibi beyin hastalıklarının tedavisi için merkezi sinir sistemine (MSS) giren ilaçları da sınırlar.

Kılcal damarlar, KBB'nin ana yerleşim yeridir. Sinir hücresi bir kılcal damara en fazla 25 µm uzaklıktadır. Bu nedenle, ilaçların beyne etkili şekilde ulaşabilmesi için KBB'yi aşmak son derece önemlidir (64).

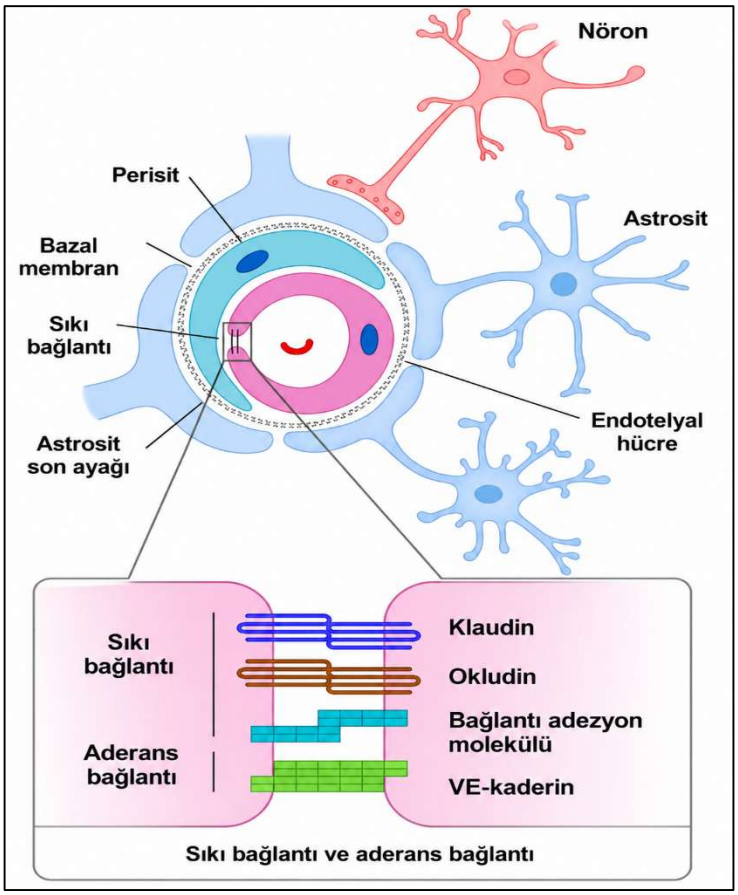
KBB'nin yapısı yalnızca beyin kapillerlerini kaplayan endotel hücrelerinden oluşmamaktadır. Endotel hücreleri; perisitler, astrositik uç ayaklar, bazal membran ve çevredeki diğer hücresel bileşenlerle birlikte nörovasküler birimi oluşturur. Bu hücresel yapı, beyin damarlarının geçirgenliğini dinamik biçimde düzenleyerek merkezi sinir sistemi homeostazının korunmasına katkı sağlamaktadır (65).

Vasküler perisitler, endotel tabakasının %30'unu çevreleyerek damarların çapını kontrol eder ve endotel hücrelerinin KBB'ye özgü gen ekspresyonunu düzenler. Endotelin dış duvarına tutunan perivasküler astrositik uç ayakları, KBB'nin özelliklerini güçlendirir ve sıkı bağlantıları pekiştirir. Bitişik vasküler endotel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, paraselüler hareketi kısıtlayarak transselüler hareketi destekler (66). (67).

Endotel hücreleri arasında bulunan sıkı bağlantılar ("tight junctions"), özellikle "claudin-5" ve "occludin" gibi proteinlerin katkısıyla KBB'nin düşük geçirgenlik özelliğinin korunmasını sağlar (68). "Claudin-5", KBB'nin omurgasını oluştururken, "occludin" sıkı bağlantı işlevini ve KBB geçirgenliğini düzenler (68, 69). Sıkı bağlantı ve

yapışkan bağlantı proteinlerinin endotel hücreleri arasındaki parasellüler yolları sıkı bir şekilde düzenlemesi nedeniyle, daha büyük ve polar moleküller KBB'den geçemez; dolayısıyla çoğu ilacın MSS'ye geçişi kısıtlanır (10). Küçük, lipofilik moleküller beyne pasif olarak difüze olurken, peptidler veya proteinler gibi daha büyük hidrofilik moleküllerin taşınması için taşıma mekanizmaları gereklidir (61).

Nörovasküler ünitedeki perisitler kan akışını düzenler ve bariyer bütünlüğünü korur, aynı zamanda komşu endotel hücrelerinde gen ifadesinin temel düzenleyicileri olarak işlev görür ve damarla ilişkili astrositlerin polarizasyonunu modüle eder. Astrosit uzantıları (astrositik uç ayakları) ise endotel hücrelerine metabolik ve yapısal destek sağlar. Astrositler ayrıca lokalize doğuştan gelen bağışıklık sisteminde de rol oynar ve bunların bozulması, zararlı otoimmün ve nörolojik sonuçlara yol açmaktadır. Mikroglia ve nöronlar nörovasküler ünitenin bir parçası değildir ancak KBB geçirgenliğini dolaylı olarak etkiler. Mikroglia, lokalize doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçasıdır ve hücresel kalıntıları temizleyerek KBB bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmaktadır. Nöronlar ise perisitler ve astrositlerle iletişim kurarak KBB'yi etkiler. Genel olarak, nörovasküler ünite ve komşu hücreleri, KBB'nin bariyer işlevselliğini ve MSS homeostazını korumada hayati öneme sahiptir (Şekil 2.2.) (11).



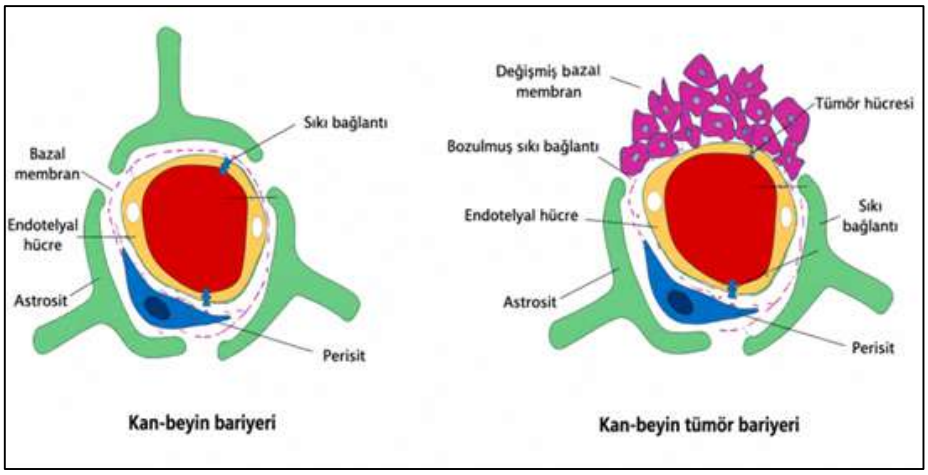
Şekil 2.2. Kan-beyin bariyerinin şematik görünümü. ((70) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır).

2.2.4. Kan-Tümör Bariyeri

Tümörlerin, KBB bütünlüğünü bozduğu ve kan-tümör bariyeri (KTB) olarak bilinen oldukça heterojen bir damar ağı oluşturduğu bilinmektedir. KTB, beyin tümörü kılcal damarlarından oluşur ve KBB'den farklıdır (Şekil 2.3.); düzensiz geçirgenlik ve moleküllerin aktif olarak dışarı akışı ile karakterize edilir. KTB, tümöre besin ve oksijen sağlayan ve hücrelerin beynin diğer bölgelerine göçünü kolaylaştıran hem mevcut hem de yeni oluşan kan damarlarını kapsar ve birçok durumda KBB'den daha "geçirgen" olarak kabul edilir (14). KBB/KTB'nin yapısal bütünlüğü, metastatik lezyonlar ve farklı primer tümör tipleri arasında heterojendir. Bu durum heterojen geçirgenliğe yol açar ve bu geçirgenliği artmış ve kısmen işlevsiz damarlar nedeniyle su ve metabolik atıklar nöro-parenkimal boşlukta tutulur, bu da interstisyel ve

intrakraniyal sıvı basıncını artırır (61). Bu heterojenlik, GBM gibi beyin tümörlerinin tedavisinde ilaca yanıtı etkileyen önemli bir faktördür (71).

Klinik ve deneysel çalışmalarda, KTB'nin ilaç geçişine olanak sağladığı, ancak bu geçirgenliğin tümör içindeki farklı bölgelerde büyük değişkenlik gösterdiği bulunmuştur (15).



Şekil 2.3. Kan-beyin bariyeri ve Kan-tümör bariyerinin şematik görünümü. ((72) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır).

2.2.5. Kan-Beyin Bariyerini Aşmak İçin Uygulanan Yöntemler

GBM gibi yaşamı tehdit eden beyin hastalıklarında terapötik ajanların etki bölgesine yeterli konsantrasyonda ulaştırılması büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle KBB'yi aşmaya veya geçici olarak modüle etmeye yönelik farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Kan-Beyin Bariyerini Girişimsel Yöntemlerle Aşma Uygulamaları

KBB'nin seçici geçirgenliği, pek çok ilacın beyin dokusuna yeterli miktarda ulaşmasını sınırlandırmaktadır. Bu engelin üstesinden gelmek amacıyla, ilaçların doğrudan merkezi sinir sistemine verilmesini veya bariyer geçirgenliğinin geçici olarak artırılmasını sağlayan çeşitli girişimsel(invaziv) yaklaşımlar geliştirilmiştir. Bu yöntemler KBB'yi doğrudan ya da dolaylı olarak geçirgenliğini artırmayı hedeflemektedir.

Doğrudan intrakraniyal ilaç uygulaması

Bu yöntemde ilaç, doğrudan tümör dokusuna veya tümörün çevresindeki beyin bölgesine uygulanmaktadır. İlacın hedef alana doğrudan verilmesi, sistemik dolaşıma bağlı ilaç kaybının ve yan etkilerin azaltılmasına, aynı zamanda uygulama bölgesinde daha yüksek ilaç konsantrasyonlarına ulaşılmasına olanak sağlar. Bununla birlikte yöntemin cerrahi girişim gerektirmesi ve ilacın dağılımının çoğunlukla uygulama bölgesiyle sınırlı kalması önemli dezavantajlardır. Bu nedenle yöntem, özellikle cerrahi sonrasında geride kalabilecek tümör hücrelerinin bulunduğu bölgelere lokal tedavi uygulanmasında değerlendirilmektedir (73).

Konveksiyonla Artırılmış İlaç Taşınması ("Convection-Enhanced Delivery"-CED)

Konveksiyonla artırılmış ilaç taşınması, terapötik maddelerin beyin dokusuna yerleştirilen mikrokateterler aracılığıyla sürekli pozitif basınç altında verilmesine dayanan girişimsel bir yöntemdir. Basınca bağlı oluşan konvektif akış sayesinde ilaçlar, yalnızca difüzyona dayalı uygulamalara göre daha geniş bir doku hacmine ve daha homojen konsantrasyonlarda ulaştırılabilmektedir. Ayrıca büyük moleküllerin dağılımı, klasik difüzyonda olduğu kadar molekül büyüklüğü ve molekül ağırlığıyla sınırlanmamaktadır.

CED, hedef bölgede yüksek terapötik ilaç düzeylerine ulaşılmasını sağlarken sistemik maruziyeti azaltma potansiyeline sahiptir. Bununla birlikte geri akış, kateter konumuna bağlı düzensiz dağılım ve ilacın doku içindeki yayılımının yeterince izlenememesi yöntemin başlıca sınırlılıklarıdır. Kateter tasarımının geliştirilmesi, uygun yerleşim ve kontrollü infüzyon hızlarının kullanılması bu sorunların azaltılmasına katkı sağlayabilir. Klinik çalışmalar yöntemin güvenli ve umut verici olduğunu göstermekle birlikte, tedavi başarısının kateter yerleşimi, infüzyon hızı, uygulanan hacim ve kullanılan terapötik maddeye bağlı olduğu belirtilmektedir (72).

Ozmotik Yöntem ile Kan Beyin Bariyerinin Açılması ve İntraarteriyel Uygulama

Ozmotik yöntem ile KBB açılması, hiperozmotik maddelerin intraarteriyel yolla uygulanarak beyin kapiller endotel hücrelerinde geri dönüşümlü dehidratasyon oluşturması ve hücreler arasındaki sıkı bağlantıların geçici olarak açılması esasına dayanır. Bu amaçla en sık intraarteriyel %25'lik mannitol çözeltisi kullanılmaktadır. Ozmotik olarak açılma, tümörü ve çevresindeki beyin dokusunu besleyen damar yatağında geçirgenliği artırabildiğinden, infiltratif gliomlar ve çok odaklı beyin tümörlerinde ilaç dağılımını iyileştirme potansiyeline sahiptir (72).

Yöntem çoğunlukla intraarteriyel ilaç uygulamasıyla birlikte kullanılmaktadır. İntraarteriyel uygulama, intravenöz uygulamaya kıyasla tümör bölgesinde daha yüksek lokal ilaç konsantrasyonları sağlayabilir ve ozmotik olarak KBB açılmasıyla birlikte kullanıldığında ilaç maruziyeti daha da artırılabilir. Kateter ve görüntüleme teknolojilerindeki gelişmeler, tümörü besleyen damarların daha seçici biçimde hedeflenmesini mümkün kılmış ve süper-seçici intraarteriyel serebral infüzyon tekniğinin geliştirilmesine katkı sağlamıştır. Bu yaklaşım, hedef dışı dokuların maruziyetini ve nörotoksisite riskini azaltırken daha yoğun lokal ilaç uygulamasına olanak tanıyabilir (72).

İntratekal/İntraventriküler Uygulama

İntratekal uygulama, ilaçların omurilik kanalına veya subaraknoid boşluğa doğrudan enjekte edilmesini içerirken, intraventriküler yöntem ilaçları doğrudan ventriküler sisteme ulaştırır (74-76). Her iki yaklaşımda da ilaç doğrudan beyin omurilik sıvısına ulaştırılmakla beraber BOS dolaşımı aracılığıyla MSS içerisinde dağılım gösterebilmektedir (74-76) .

İntraventriküler ve intratekal uygulamalar, yüzeysel yerleşimli patolojilerde ilaç konsantrasyonlarını artırabilse de bu yöntemler beyin parankimi içinde sınırlı ilaç dağılımıyla ilişkilidir; bu da derin yerleşimli tümörlerde terapötik seviyelere ulaşmayı

zorlaştırmaktadır. Sonuç olarak, bu uygulama yöntemleri ilacın beyin parankiminin daha derin bölgelerine etkili bir şekilde nüfuz etmesini sağlamayabilir (72).

Lazer İnterstisyel Termal Tedavi (LITT)

LITT, stereotaktik olarak yerleştirilen fiberoptik bir lazer kateteri aracılığıyla tümör dokusuna termal enerji uygulanmasına dayanan girişimsel bir yöntemdir. Lazer ucunun çevresindeki dokuda koagülasyon nekrozu oluşturularak ablasyon sağlanırken, çevre dokular daha düşük sıcaklıklara maruz kalmaktadır (72). İşlem sırasında sıcaklık dağılımı, uzamsal ve zamansal MR termometrisi ile gerçek zamanlı olarak izlenmekte ve böylece ablasyon alanı kontrollü biçimde sınırlandırılabilmektedir (77).

LITT sonrasında ablasyon bölgesinin çevresinde KBB geçirgenliğinin arttığı bildirilmiştir. Bu etkinin, hipertermiye bağlı olarak endotel sıkı bağlantıların bozulması ve transsitozun artmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (77-79). Bununla birlikte, LITT'nin oluşturduğu KBB açıklığının klinik açıdan anlamlı düzeyde ne kadar süre devam ettiği henüz kesin olarak belirlenmemiştir (72).

Polimerik İmplantlar

Polimerik implantlar, cerrahi rezeksiyon sonrasında tümör boşluğuna yerleştirilerek ilacın doğrudan hedef bölgede kontrollü ve uzun süreli salınmasını sağlayan lokal tedavi sistemleridir. Genellikle kemoterapötik madde içeren bu implantlar, ilacı günler veya haftalar boyunca serbest bırakarak tümör yatağında yüksek ilaç konsantrasyonlarının korunmasına yardımcı olur. Gliadel® Wafer, GBM tedavisinde kullanılan ve FDA tarafından onaylanan ilk lokal etkili polimerik implantlardan biridir. Bu yaklaşım sistemik maruziyeti ve buna bağlı toksisiteyi azaltabilse de yalnızca cerrahi rezeksiyon sırasında veya sonrasında uygulanabilmesi önemli bir sınırlılıktır (80).

Kan-Beyin Bariyerini Girişimsel Olmayan Yöntemlerle Aşma Uygulamaları

Girişimsel olmayan uygulamalar, KBB'yi aşmak amacıyla gerçekleştirilen invaziv olmayan yöntemleri içermektedir. Genel olarak kimyasal, biyolojik, ilaç taşıyıcı sistemler ve diğer alternatif yöntemler olarak sınıflandırılabilmektedir.

Kimyasal Yöntemler

Kimyasal yaklaşımlar, ilaçların yetersiz fizikokimyasal özelliklerini (çözünürlük veya membran penetrasyonu gibi) iyileştirmek ve dolayısıyla işlevselliklerini değiştirmek için ilaçların kimyasal yapı dönüşümüne dayanır (16).

Lipofilitenin Artırılması: İlacın lipofilitesinin kimyasal modifikasyon yoluyla artırılması, endotel hücrelerini pasif difüzyon aracılığıyla geçmesini kolaylaştırmakla beraber özellikle küçük moleküller için gerçekleştirilebilir bir yöntemdir (12).

Ön İlaç ("Prodrug") Yaklaşımı: Ön ilaçlar, uygulandıktan sonra metabolik veya kimyasal dönüşümle beraber aktif farmakolojik bileşik haline gelen yapılardır. Bu yaklaşımda ilacın lipofilitesi artırılarak KBB'den geçişi kolaylaştırılabilir (16). Beyin dokusunda enzimatik olarak aktif forma dönüştürülür (81). Örneğin morfinin hidroksil gruplarının asetillenmesiyle oluşan daha lipofilik türevi, KBB'yi daha kolay geçerek beyinde etkin konsantrasyonlara ulaşabilmektedir. Bununla birlikte, ön ilaç tasarımı ana ilacın doku dağılımını, etkinliğini ve toksisite profilini değiştirebileceğinden dikkatli biçimde değerlendirilmelidir (16).

Molekül Ağırlığının Azaltılması: Düşük molekül ağırlığı, bileşiklerin KBB'den pasif geçişini kolaylaştırabilen fizikokimyasal özelliklerden biridir. Bu nedenle ilaç tasarımında molekül büyüklüğünün azaltılması, diğer moleküler özelliklerle birlikte beyin penetrasyonunu artırmaya yönelik bir strateji olarak değerlendirilebilmektedir (82).

Biyolojik Yöntemler

İlaçların merkezi sinir sistemine biyolojik mekanizmalar aracılığıyla taşınmasına yönelik yaklaşımlar, KBB'nin fizyolojik ve anatomik özelliklerinin daha iyi anlaşılmasıyla geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, KBB'nin doğal taşıma sistemlerinden yararlanılarak ilaçların beyin dokusuna geçişinin artırılması amaçlanmaktadır (16).

Adsorpsiyon Aracılı Transsitoz (AMT): Albumin ve IgG gibi proteinlerin katyonik olarak modifiye edilmesi, KBB üzerindeki anyonik bölgelerle elektrostatik etkileşimlerini artırarak AMT yoluyla beyin geçişlerini kolaylaştırabilir. Nitekim KBB'yi tek başına geçemeyen β-endorfinin katyonize albuminle konjugasyonu sonrasında sıçanlarda beyin alımının arttığı bildirilmiştir (83, 84).

Taşıyıcı Aracılı Taşıma (CMT): CMT, küçük moleküllü ilaçların amino asitler, heksozlar ve vitaminler gibi endojen substratları taklit edecek şekilde tasarlanarak KBB'de bulunan özgül taşıyıcı sistemlerden yararlanmasına dayanır. Dopamin KBB'yi geçemezken, büyük nötr amino asit taşıyıcısı üzerinden taşınabilen levodopaya dönüştürülmesi bu yaklaşıma örnektir (85).

Reseptör Aracılı Taşıma (RMT): RMT, insülin, transferrin, leptin ve insülin benzeri büyüme faktörü gibi büyük endojen moleküllerin KBB üzerindeki özgül reseptörlere bağlanarak beyne taşınmasını sağlayan bir mekanizmadır. IgG moleküllerinin ise Fc reseptörleri aracılığıyla ters transsitoza uğrayarak beyinden uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir (85).

İlaç Taşıyıcı Sistemler

İlaç taşıyıcı sistemler, etkin maddenin fiziksel olarak taşıyıcı yapı içerisine alınması veya taşıyıcıya kimyasal olarak bağlanması yoluyla KBB'den geçişinin kolaylaştırılmasını ve hedef bölgeye yönlendirilmesini amaçlamaktadır. Bunlar arasında nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemler (NEİTS), ilaçların hastalıklı dokuya daha etkili ve kontrollü biçimde ulaştırılmasına katkı sağlamaları nedeniyle günümüzde yoğun olarak araştırılmaktadır (17, 22).

KBB'yi tek başına yeterli düzeyde geçemeyen ilaçların beyne taşınması, NEİTS'nin boyut, yüzey yükü, bileşim ve yüzey modifikasyonu gibi özelliklerinden yararlanılarak artırılabilir. Bu sistemlerin KBB'den geçiş mekanizmaları kullanılan taşıyıcının yapısına göre farklılık gösterebilmektedir. Özellikle polimerik NEİTS, ilacı enzimatik parçalanmaya karşı koruyabilmeleri, kontrollü salım sağlayabilmeleri ve ilacın beyin dokusundaki kalış süresini uzatabilmeleri bakımından önem taşımaktadır (17, 22). Bununla birlikte, NEİTS'nin KBB ile etkileşimi ve beyin dokusuna geçiş mekanizmaları henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Bu nedenle bu sistemlerin etkinlik ve güvenliliklerinin daha ayrıntılı çalışmalarla değerlendirilmesi gerekmektedir (17, 22).

NEİTS'nin küçük boyutları damar içi dolaşımı kolaylaştırabilirken, geniş yüzey alanları ilacın çözünürlüğünün, emiliminin, biyoyararlanımının ve stabilitesinin artırılmasına katkı sağlayabilir. Ayrıca yüzeylerinin uygun ligandlarla modifiye edilebilmesi hedefe yönelik taşımaya, kontrollü salım özellikleri ise dolaşım süresinin uzatılmasına olanak vermektedir (17, 86).

Bu sistemler, özellikle KBB geçişi sınırlı olan makromoleküllerin ve protein yapısındaki ilaçların MSS'ye taşınmasında önemli üstünlükler sunmaktadır. Proteinlerin biyolojik sıvılardaki düşük stabilitesi ve enzimatik degradasyona yatkınlığı, NEİTS'nin içine yüklenmeleriyle azaltılabilir. Ayrıca terapötik indeksi dar ilaçların taşıyıcı sistemlere yüklenmesi, hedef dışı dağılımın ve buna bağlı toksik etkilerin sınırlandırılmasına katkıda bulunabilir (17).

NEİTS'nin tasarımında biyouyumluluk, biyoparçalanabilirlik ve toksisite temel değerlendirme ölçütleridir. Hem taşıyıcı yapının hem de parçalanma ürünlerinin güvenli olması, sistemin kanda fiziksel stabilitesini koruması ve aglomerasyona uğramaması gerekmektedir. Ayrıca partikül boyutunun KBB geçişine uygun aralıkta tutulması, ilacın kimyasal stabilitesinin korunması ve istenen farmakokinetik profile uygun kontrollü salım sağlanması önemli tasarım kriterleri arasında yer almaktadır (17, 87).

<u>Diğer Girişimsel Olmayan Yöntemler</u>

Odaklanmış Ultrason (FUS): FUS, ilaçların beyne taşınmasını artırmak amacıyla KBB geçirgenliğini geçici ve geri dönüşümlü olarak artıran noninvaziv bir yaklaşımdır. Odaklanmış ultrason (FUS), özellikle intravenöz mikrobaloncuklarla birlikte uygulandığında, akustik kavitasyonun oluşturduğu mekanik etkiler aracılığıyla KBB geçirgenliğini hedeflenen bölgede geçici ve geri dönüşümlü olarak artırabilen noninvaziv bir yaklaşımdır (88).

İntranazal İlaç Taşınması: İntranazal uygulama sonrasında ilaçlar, olfaktör ve trigeminal sinirlerle ilişkili intra- veya ekstranöronal yollar aracılığıyla KBB'yi atlayarak BOS'a, olfaktör bulbusa ve diğer MSS bölgelerine ulaşabilir. Bu yaklaşımın beyin kaynaklı nörotrofik faktör gibi terapötik proteinlerin beyne iletilmesinde kullanılabileceği bildirilmiştir. Ayrıca intranazal uygulanan IGF-I'in olfaktör ve trigeminal sinirlerle ilişkili hücre dışı yollar üzerinden beyin ve omuriliğin farklı bölgelerine hızla ulaşabildiği gösterilmiştir (85).

2.3. Nanoteknoloji

Nanobilim, genel olarak 1–100 nm boyut aralığındaki yapıların fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerinin incelenmesini; **nanoteknoloji** ise bu bilgilerin yeni yapı ve sistemlerin geliştirilmesinde uygulanmasını kapsamaktadır. Maddenin atomik ve moleküler düzeyde kontrol edilebilmesi, geniş yüzey alanı/hacim oranına ve kendine özgü optik, elektriksel ve manyetik özelliklere sahip nanomateryallerin hazırlanmasına olanak sağlamaktadır (18).

Nanoteknoloji; elektronik, enerji, tarım ve sağlık gibi birçok alanda kullanılmakla birlikte, tıbbi uygulamalarda özellikle tanı, görüntüleme ve ilaç taşınması açısından önemli bir potansiyele sahiptir (89, 90).

Nanoteknolojinin tıp ve sağlık alanındaki uygulamaları **nanotıp** olarak adlandırılmaktadır. Nanotıp, hastalıkların önlenmesi, teşhisi, izlenmesi ve tedavisi amacıyla nano boyutlu yapı ve teknolojilerden yararlanmaktadır (91). Bu kapsamda

nanoteknolojik sistemler; görüntüleme ve tanı araçlarının geliştirilmesi, ilaçların hedef bölgeye taşınması, kontrollü salım sağlanması, doku mühendisliği ve implant uygulamaları gibi alanlarda araştırılmaktadır. Kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, enfeksiyonlar ve diyabet, nanotıp uygulamalarının yoğun olarak incelendiği başlıca hastalık grupları arasında yer almaktadır (18).

2.3.1. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistemlerin Hedeflendirilmesi

NEİTS'nin belirli bir hücre, doku veya organa seçici olarak yönlendirilmesi hedeflendirme olarak tanımlanmaktadır. Bu yaklaşım sayesinde etkin maddenin hedef bölgede birikiminin artırılması, sağlıklı dokular üzerindeki etkilerinin ise azaltılması amaçlanır. NEİTS'nin hedeflendirilmesinde genel olarak pasif ve aktif hedefleme olmak üzere iki temel yaklaşım bulunmaktadır.

Pasif Hedeflendirme

Pasif hedeflendirme, NEİTS'nin herhangi bir özgül hedefleme ligandı kullanılmadan, hastalıklı dokuların fizyolojik ve patolojik özelliklerinden yararlanılarak hedef bölgede biriktirilmesine dayanmaktadır. Tümör gelişimi sırasında hızlı ve düzensiz şekilde oluşan damarlar, sağlıklı dokulardaki damarlara kıyasla daha geçirgen bir yapı göstermektedir. Aynı zamanda tümör dokusundaki lenfatik drenajın yetersiz olması, damar dışına çıkan makromoleküllerin ve nanotaşıyıcıların bölgede daha uzun süre tutulmasına neden olmaktadır. Artmış damar geçirgenliği ile yetersiz lenfatik drenajın birlikte oluşturduğu bu durum, **artmış geçirgenlik ve alıkonma etkisi** (*enhanced permeability and retention*, EPR) olarak tanımlanmaktadır (92, 93).

EPR etkisinden yararlanılabilmesi, geliştirilen NEİTS'nin partikül büyüklüğü, yüzey yükü, şekli ve dolaşım süresi gibi fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Uygun boyuttaki taşıyıcı tümör damarlarındaki endotel açıklıklardan geçerek tümör mikroçevresinde birikebilir. Bununla birlikte, dolaşıma verilen NEİTS plazma proteinleriyle etkileşime girerek mononükleer fagositik sistem tarafından tanınabilir ve özellikle karaciğer ile dalakta tutulabilir. Bu durum, taşıyıcıların dolaşım süresini ve hedef dokuya ulaşan miktarını azaltabilmektedir (94).

NEİTS'nin dolaşımda daha uzun süre kalmasını sağlamak ve fagositik sistem tarafından uzaklaştırılmalarını azaltmak amacıyla yüzeyleri polietilen glikol gibi hidrofilik polimerlerle kaplanabilmektedir. PEG kaplama, taşıyıcı yüzeyindeki protein adsorpsiyonunu ve özgül olmayan hücresel etkileşimleri azaltarak sistemin tümör dokusunda pasif olarak birikme olasılığını artırabilir (95). Böbreklerden hızlı uzaklaştırılma ile fagositik sistem tarafından tutulma arasındaki denge dikkate alındığında, tümör hedeflenmesinde taşıyıcı için çoğunlukla **20–200 nm** arasındaki partikül büyüklüklerinin uygun olduğu bildirilmektedir (96).

Pasif hedeflendirmenin etkinliği her tümörde aynı değildir. Damar yoğunluğu, damar geçirgenliği, tümör içi basınç, stromal yapı ve lenfatik drenaj gibi özellikler EPR etkisinin düzeyini önemli ölçüde değiştirebilmektedir. Beyin tümörlerinde KBB ve KTB varlığı, tümör dokusundaki heterojen damar yapısı ve tümör mikroçevresinin özellikleri, NEİTS'nin hedef bölgeye ulaşmasını daha karmaşık hâle getirmektedir (97).

Aktif Hedeflendirme

Aktif hedeflendirme, NEİTS'nin belirli bir hücre, doku veya organa daha seçici biçimde yönlendirilmesini sağlamak amacıyla taşıyıcı yapısında çeşitli düzenlemelerin yapılmasına dayanmaktadır. Bu amaçla manyetik alan, ısı ve ultrason gibi fiziksel uyaranlardan, pH değişiklikleri ve enzimatik aktivite gibi kimyasal koşullardan veya hedef bölgeye özgü ligandlardan yararlanılabilmektedir (93).

KBB'nin aşılmasında da farklı aktif taşıma mekanizmaları kullanılmaktadır. Bunlar arasında transselüler difüzyon, taşıyıcı protein aracılı geçiş, reseptör aracılı endositoz, iyon taşınması ve adsorptif aracılı geçiş yer almaktadır (97).

KBB'nin hedeflenmesinde en sık değerlendirilen reseptörler arasında transferin reseptörü (TfR), insülin reseptörü (InsR) ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüyle ilişkili LRP1 reseptörü bulunmaktadır. Bununla birlikte, bu reseptörler üzerinden gerçekleştirilen taşımanın güvenliği ve etkinliği açısından bazı sınırlamalar mevcuttur. Bu nedenle, özellikle antikor esaslı hedefleme sistemleri gibi daha gelişmiş yaklaşımların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu bildirilmektedir (98).

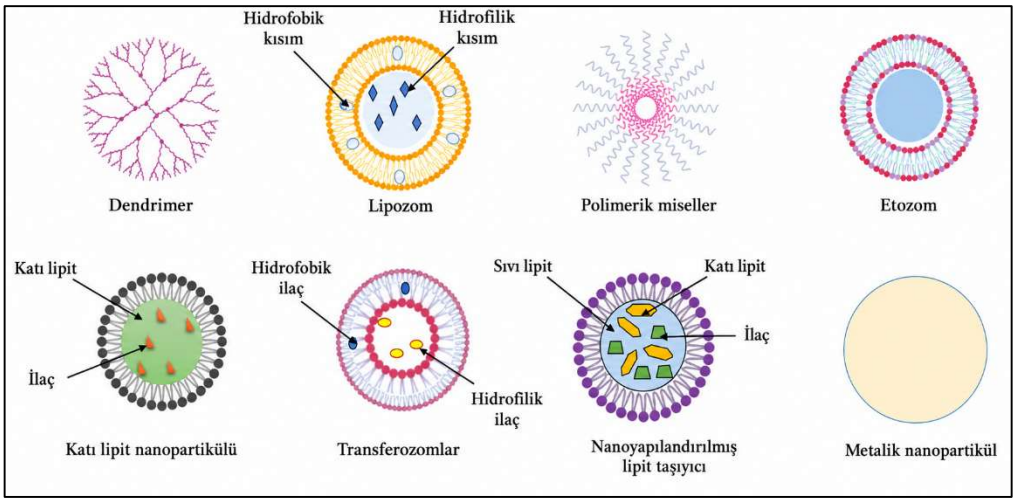
2.3.2. Nanoteknoloji Esaslı İlaç Taşıyıcı Sistem Türleri

NEİTS, etkin maddelerin hedef dokuya ulaştırılmasını, kontrollü salımını ve biyodağılımının düzenlenmesini sağlamak amacıyla geliştirilmektedir. Bu sistemlerin temel amacı, ilacın terapötik etkinliğini artırırken hedef dışı dokularda ortaya çıkabilecek yan etkileri azaltmaktır. NEİTS'nin küçük boyutları, ilaçların biyolojik bariyerlerden geçişini kolaylaştırabilmekte, çözünürlüğü düşük etkin maddelerin taşınmasına ve biyoyararlanımlarının artırılmasına katkıda bulunabilmektedir (18).

NEİTS'nin klinik kullanımına yönelik çeşitli örnekler bulunmaktadır. Doksorubisinin lipozomal formülasyonu Doxil®, paklitakselin albümin bağlı nanopartikül formülasyonu Abraxane® ve polimerik misel esaslı paklitaksel formülasyonu Genexol-PM®, kanser tedavisinde kullanılan başlıca nanomedikal ürünler arasındadır. Bu sistemler, antikanser ilaçların çözünürlüğünü ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek, dolaşım sürelerini uzatmak ve hedef dışı toksisiteyi azaltmak amacıyla geliştirilmiştir (18).

Beyne ilaç taşınması ve nörodejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla geliştirilen NEİTS'nin bazı temel özellikleri taşıması beklenmektedir. Bu sistemlerin biyouyumlu ve düşük toksisiteli olması, nöroinflamatuvar yanıt oluşturmaması, genellikle 200 nm'nin altında partikül boyutuna sahip olması ve beyin dokusunda etkili şekilde dağılabilmesi önemlidir. Ayrıca etkin maddenin stabilitesini artırması, hedeflendirme özelliği göstermesi, terapötik açıdan etkili ve üretim bakımından ekonomik olması istenmektedir (17, 99).

NEİTS'nin biyolojik davranışı; partikül boyutu, yüzey yükü, şekil, morfoloji ve yüzey işlevselliği gibi fizikokimyasal özelliklerden etkilenmektedir. Bu sistemlerin, ilaçların merkezi sinir sistemine ulaşmasını sınırlandıran biyolojik bariyerlerin aşılmasına katkı sağlayabileceği bildirilmiştir (23). Literatürde sıklıkla yer alan NEİTS'nin şematik gösterimi Şekil 2.4.'te sunulmuştur.



Şekil 2.4. Bazı nanoteknoloji esaslı ilaç taşıyıcı sistemlere ait şematik gösterim ((100) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller, kontrollü ilaç salımı sağlamaları ve yüzeylerinin hedeflendirme amacıyla işlevselleştirilebilmesi nedeniyle beyne ilaç taşınmasında yaygın olarak araştırılan sistemlerdir. Uygun yüzey özellikleri kazandırıldığında retiküloendotelyal sistem tarafından uzaklaştırılmaları azaltılabilir ve böylece etkin maddenin beyindeki konsantrasyonu artırılabilir (101).

Hayvan çalışmalarında polimerik ve polimer- lipit esaslı nanopartiküllerin tümör bölgesinde birikimi artırabildiği, tümör büyümesini baskılayabildiği ve serbest ilaç formülasyonlarına kıyasla sağkalımı iyileştirebildiği gösterilmiştir (17).

Polimerik nanopartiküllerin üretim ve ölçeklendirme süreçlerinde karşılaşılan tekrarlanabilirlik problemleri ve uzun dönem güvenliklerine dair belirsizlikler, klinik kullanımlarını sınırlandırabilmektedir (102).

Miseller

Miseller, amfifilik moleküllerin belirli konsantrasyon ve sıcaklık koşullarında sulu ortamda kendiliğinden birleşmesiyle oluşan, genellikle 5–50 nm boyutundaki

sistemlerdir. Bu yapılarda hidrofobik kısımlar iç çekirdeği, hidrofilik kısımlar ise dış kabuğu oluşturur (103). Miseller; suda az çözünen ilaçların taşınması, kontrollü salımın sağlanması, etkin maddenin stabilitesinin korunması ve biyoyararlanımın artırılması amacıyla kullanılmaktadır (104).

Miseller, gliom ve Alzheimer hastalığında kurkumin taşınması ile nöroinflamasyon ve iskemik inmenin görüntülenmesi amacıyla da değerlendirilmiştir (17).

Tüm üstünlüklerine rağmen miseller, kanda seyrelme ve proteinlerle etkileşim sonucunda parçalanarak enkapsüle ilacın ani salımına neden olabilmektedir. Bu da dolayısıyla etkin maddenin hedef bölgeye ulaşmadan erken salınmasına ve sistemik yan etkilerin artmasına yol açmaktadır (105).

Katı Lipit Nanopartiküller

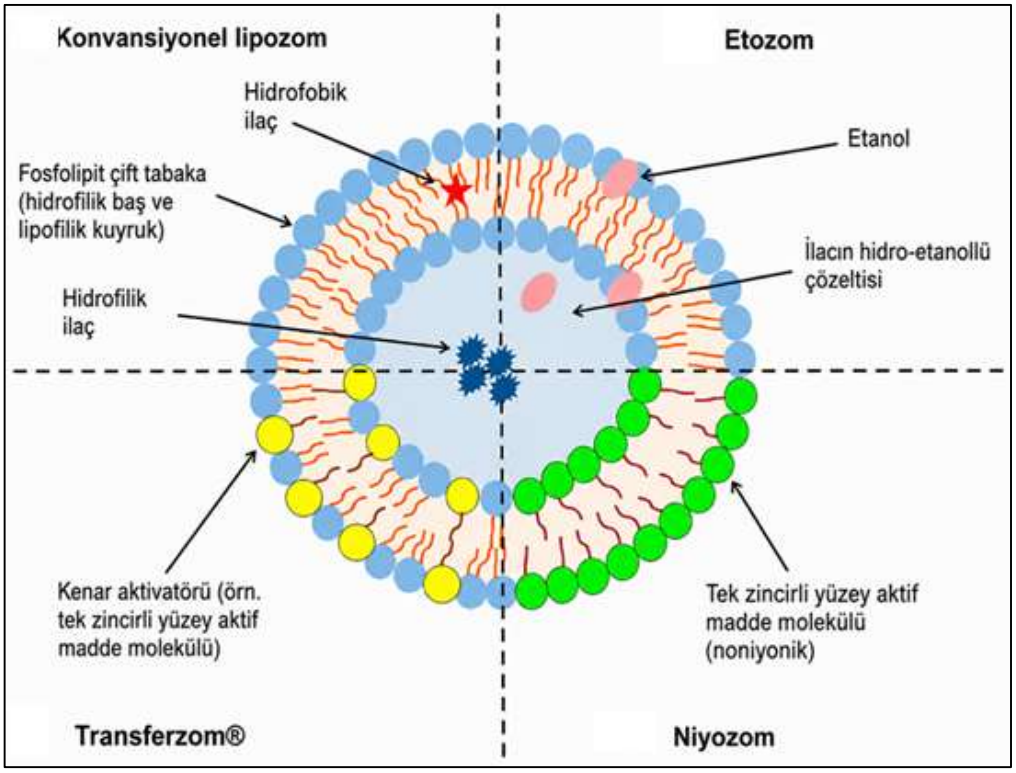
Katı lipit nanopartiküller (SLN), oda ve vücut sıcaklığında katı halde bulunan fizyolojik lipitlerin yüzey etkin maddelerle stabilize edilmesiyle oluşturulan kolloidal taşıyıcı sistemlerdir. Lipit fazında trigliseritler, gliserit karışımları, steroidler veya mumlar kullanılabilirken, bir veya birden fazla yüzey etkin maddenin kullanılması sistemin fiziksel stabilitesini artırabilmektedir (106).

SLN'nin yapısı; kullanılan lipit ve etkin maddenin çözünürlüğüne, formülasyon bileşimine ve hazırlama yöntemine bağlı olarak değişmektedir. Etkin madde, lipit matriks içerisinde homojen biçimde dağılabileceği gibi ilaççа zengin bir çekirdek veya kabuk yapısında da bulunabilmektedir. Bu yapısal farklılıklar ilaç yükleme kapasitesini ve salım profilini doğrudan etkilemektedir (106).

SLN, biyouyumlu lipitlerden hazırlanmaları, kontrollü salım sağlayabilmeleri ve farklı uygulama yollarına uygun olmaları bakımından üstündür. Bununla birlikte agregasyon, depolama sırasında fiziksel kararsızlık, kristal yapının yeniden düzenlenmesine bağlı ilaç sızıntısı ve bazı etkin maddeler için düşük yükleme kapasitesi gibi sınırlılıkları bulunmaktadır (107).

Nanoveziküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanoveziküler ilaç taşıyıcı sistemler, amfifilik yapı taşlarının su varlığında kendiliğinden düzenlenmesiyle oluşan, bir veya daha fazla eş merkezli çift tabakadan meydana gelen küresel (108) ve düzenli yapılardır (Şekil 2.5.). Bu sistemler hem hidrofilik hem de hidrofobik etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlamaktadır. Ayrıca etkin maddelerin biyoyararlanımını ve dolaşım süresini artırabilmekte, hızlı metabolizma ve eliminasyonu geciktirebilmekte, hedeflendirilmiş ve kontrollü ilaç salımı sağlayabilmektedirler. Bunun yanında, stabil olmayan etkin maddeleri dış ortam koşullarından koruyarak stabilitelerini artırabilmekte, KBB gibi biyolojik engellerin aşılmasında karşılaşılan güçlüklerin giderilmesine (19) ve bazı ilaçlara bağlı toksisitenin azaltılmasına katkıda bulunabilmektedir (109).



Şekil 2.5. Nanoveziküler sistemlerin yapısının şematik gösterimi ((110) no'lu referanstan değiştirilerek kullanılmıştır.)

Lipozomlar

Lipozomlar, bir veya daha fazla amfifilik fosfolipit çift tabakadan oluşan küresel veziküler sistemlerdir. Bu sistemler, ilaç, protein, nükleik asit ve aşı bileşenleri gibi farklı terapötik molekülleri enkapsüle edebilmeleri nedeniyle ilaç taşıyıcı sistem olarak yaygın biçimde kullanılmaktadır. Lipozomların dolaşım süresini ve KBB geçişini artırmak amacıyla yüzeyleri poli (etilen glikol), transferrin ve glikoz–C vitamini kompleksi gibi bileşenlerle modifiye edilebilmektedir (17).

Bu olumlu özelliklerine rağmen lipozomlar taşıdığı maddeleri sızdırmaya meyillidir. Bu durum, taşıdıkları ilaçların erken salınmasına yol açabilir. Aynı zamanda hidrofilik ilaçlar için enkapsülasyon verimliliği düşüktür, pahalı olmakla beraber vücuttaki yarı ömürleri kısadır (109).

Niozomlar ve Proniozomlar

Niozomlar, noniyonik yüzey aktif maddelerin kolesterol ile sulu ortamda hidrasyonu sonucu oluşan tek veya çok tabakalı veziküler sistemlerdir. Yapısal olarak lipozomlara benzemekle birlikte, fosfolipit yerine noniyonik yüzey aktif maddeler içermeleri nedeniyle daha yüksek kimyasal stabilite, düşük maliyet ve daha kolay depolama gibi üstünlükler sunabilmektedir. Kolesterol, çift tabakanın sertliğini artırarak vezikül geçirgenliğini azaltırken, yüzey aktif maddelerin türü ve oranı vezikül boyutu, yüzey yükü ve enkapsülasyon verimliliği üzerinde etkili olmaktadır (109). Proniozomlar ise kullanım öncesinde sulu ortamla hidrate edilerek niozom oluşturan kuru sistemlerdir. Niozomlara göre taşıma ve depolama sırasında daha yüksek fiziksel stabilite gösterebilir ve bazı durumlarda lipozomlara kıyasla maliyet ve kimyasal stabilite açısından üstünlük sağlayabilirler (111).

Transferzomlar

Transferzomlar, farklı molekül ağırlığına ve çözünürlüğe sahip etkin maddelerin taşınmasına olanak sağlayan ultra-esnek veziküler sistemlerdir (108). Fosfolipit çift tabaka ile bu yapının esnekliğini artıran yüzey aktif maddelerden oluşurlar (112).

Deforme olabilir yapıları sayesinde biyolojik membranlardan penetrasyonu artırabilir, kontrollü ve hedefli ilaç taşınmasına katkıda bulunabilirler (108). Bununla birlikte kimyasal kararsızlık, fosfolipit saflığına duyarlılık ve yüksek üretim maliyeti başlıca sakıncalarıdır (113).

Etozomlar ve Transetozomlar

Etozomlar, fosfolipitlerin yanı sıra yüksek oranda etanol içeren esnek veziküler taşıyıcılardır. Etanol, vezikül esnekliğini artırırken deride stratum korneumun lipit yapısını etkileyerek ilaç penetrasyonunu desteklemektedir. Transetozomlar ise lipit, etanol ve kenar aktivatörünü birlikte içeren sistemlerdir ve etkin maddelerin daha derin dokulara taşınması amacıyla kullanılmaktadır (108).

Spanlastikler

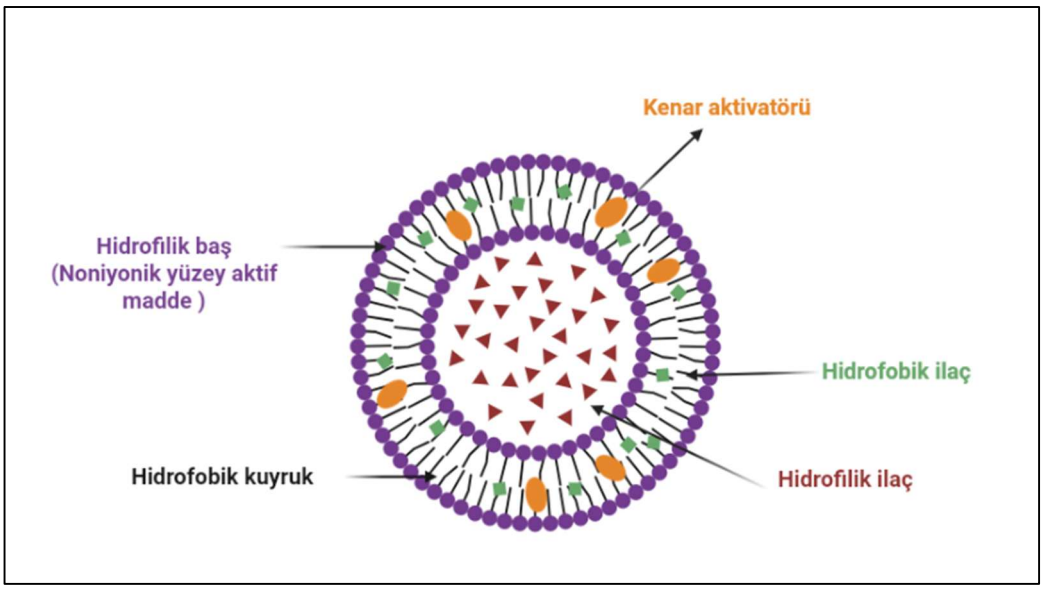
Spanlastikler, noniyonik yüzey aktif madde ve kenar aktivatörlerinden oluşan ultra-şekil değiştirebilen (“ultra-deformable”) yani çok yüksek derecede esnek özellikte veziküllerdir (114). Spanlastik (Span + Elastik) terimi ilk olarak 2011 yılında Kakkar ve Kaur tarafından kullanılmıştır (26). Bu amfifilik moleküllerin bir araya gelmesiyle oluşan küresel veziküler yapılar, etkin maddeler için enkapsülasyon matriksi görevi görmektedir. Hidrofobik etkin maddeler membranın hidrofobik bölgelerinde, hidrofilik etkin maddeler ise vezikülün sulu çekirdeğinde yer alabilmektedir. Spanlastiklerin büyüklüğünün kullanılan formülasyon ve hazırlama yöntemine bağlı olarak yaklaşık 180–450 nm arasında değişebildiği bildirilmektedir (115, 116).

Spanlastikler , niozomların modifiye edilmiş bir versiyonudur ve ultra esnek yapısını sorbitan esterleri ve Tween'ler gibi (117) kenar aktivatörlerinin kullanılması ile elde etmektedir (118). Niozomların genellikle %10-40 civarında kolesterol içermeleri, yapılarına sertlik kazandırmaktayken, spanlastiklerin kolesterol içermemesi bu sistemlere daha esnek olma, , hücreler arasından daha iyi geçebilme ve daha iyi ilaç salım profili sağlama gibi üstünlükler kazandırmıştır (26). Ayrıca

spanlastikler hedef hücrelere seçici olarak bağlanabilme ve ilacı önceden belirlenmiş bir hızda salabilme özelliklerine sahiptirler (108).

Spanlastikler, oküler, nazal, dermal, transdermal ve oral uygulamalar başta olmak üzere beyne ilaç taşınması gibi farklı uygulama yollarında çeşitli etkin maddelerin taşınması amacıyla kullanılabilmektedir (27).

Literatürde doksorubisin, insülin, aşılar ve siRNA gibi farklı yapıdaki etkin maddelerin spanlastiklere yüklenebildiği bildirilmektedir (105,106). Ayrıca, düşük toksisite, biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, görece düşük maliyet, kolay saklama ve fiziksel stabilite gibi özellikler de bu sistemlerin ilaç taşınmasındaki potansiyelini artırmaktadır. Spanlastiklerin küçük partikül büyüklükleri ve yüzeylerinin farklı bileşenlerle modifiye edilebilmesi, tümör dokusunda geçirgenliğin ve tutulma süresinin artırılmasına katkı sağlayabilir. Bu nedenle spanlastikler, antikanser ilaçların hedeflendirilmiş ve kontrollü taşınmasına yönelik umut vadeden nanoveziküler sistemler arasında değerlendirilmektedir (Şekil 2.6.) (28).



Şekil 2.6. Spanlastik yapısının şematik gösterimi.

Spanlastiklerin Üstünlükleri (20, 28) :

- Hidrofilik veya lipofilik ilaçların biyolojik bariyerlerden geçmesini kolaylaştırır.
- Bağışıklık sistemini uyarmaz ve biyolojik olarak parçalanabilir.

- İlaç moleküllerinin sistemik dolaşımdan temizlenmesini geciktirir.
- İlacı, lipit çift tabakalı bir yapı içinde saklayarak biyolojik ortamın olumsuz koşullarından korur.
- İlacın çözünürlüğünü ve biyoyararlanımını iyileştirir.
- Belirli dokuları veya hücreleri hedefleme sağlar.
- Kontrollü ilaç salımı sağlar.

Spanlastiklerin Sınıflandırılması:

Spanlastikler oluştuğu tabaka sayısına göre kategorize edilmektedir (28).

1. Çok Tabakalı Veziküller (MLV): Birçok çift tabakadan oluşan veziküllerin çapı genellikle 0,5 ila 1,0 mikron arasındadır. Üretimi kolaydır ve mekanik bütünlüğünü kaybetmeden uzun süre saklanabilmektedir (28).

2. Büyük Tek Tabakalı Veziküller (LUV): Önemli oranda su ve lipit bileşenlerine sahip olmaları nedeniyle daha büyük miktarlarda biyolojik olarak aktif maddeyi hapsederler. Boyutları 100 nanometreden 1 mikrometreye kadar değişebilir (28).

3. Küçük Tek Tabakalı Veziküller (SUV): Genel olarak boyutları 20 ile 50 nanometre arasında değişir. SUV'lar, çok tabakalı veziküllerin sonikasyonuyla üretilmektedir (28) .

Spanlastiklerin Bileşenleri

Spanlastikler, temel olarak iyonik olmayan yüzey aktif madde ve kenar aktivatöründen oluşan elastik nanoveziküler sistemlerdir (108).

İyonik Olmayan Yüzey Aktif Madde

İyonik olmayan yüzey aktif maddeler, vezikül oluşumunda yaygın olarak kullanılan temel bileşenlerdir. Bu maddelerin anyonik, katyonik ve amfoterik yüzey aktif maddelere kıyasla daha yüksek stabilite ve biyouyumluluk göstermeleri, ayrıca

daha düşük toksisiteye sahip olmaları önemli üstünlükleri arasındadır. Polar ve apolar gruplar içeren bu maddeler güçlü ara yüzey aktivitesi göstermektedir (119).

Yüzey aktif maddelerin misel yerine çift tabakalı vezikül oluşturması; hidrofilik-lipofilik denge değeri, kimyasal yapı ve kritik paketleme parametresi gibi özelliklere bağlıdır (120). Span 80 ve Span 40 ile hazırlanan veziküllerin, Span 60 içeren sistemlere kıyasla daha fazla agregasyon, bozulma ve kararsızlık gösterebildiği bildirilmiştir. Span 60'ın lipofilik yapısı lamellar çift tabakanın oluşumunu desteklemekte ve diğer iyonik olmayan yüzey aktif maddelere kıyasla daha yüksek ilaç enkapsülasyonu sağlayabilmektedir (108).

Etanol

Etanol, spanlastik formülasyonlarında penetrasyon artırıcı ve yardımcı çözücü olarak kullanılmaktadır. Vezikül büyüklüğü, enkapsülasyon verimliliği, zeta potansiyeli, stabilite ve doku geçirgenliği üzerinde etkili olabilmektedir. Bununla birlikte, etanol miktarının optimum düzeyin üzerine çıkması çift tabakanın geçirgenliğini artırarak vezikül büyüklüğünde değişime ve enkapsülasyon verimliliğinde azalmaya neden olabilmektedir. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise veziküler yapıların çözünmesi söz konusu olabilmektedir. Etanol ayrıca membran kalınlığını ve sistemin net yüzey yükünü etkileyerek vezikül büyüklüğünün ve stabilitesinin değişmesine yol açabilmektedir (121).

Kenar Aktivatörleri

Spanlastiklerin elastik ve şekil değiştirebilen yapısı, Tween 80 gibi kenar aktivatörlerinin kullanılmasıyla sağlanmaktadır. Polivinil alkol de bazı formülasyonlarda kenar aktivatörü olarak kullanılabilmektedir. Ayrıca vezikül büyüklüğünün azaltılmasına ve membran esnekliğinin artırılmasına katkı sağlayabilmektedir (122). Bu hidrofilik bileşenler, veziküler membranın düzenini değiştirerek esneme yeteneğini artırabilmektedir (121, 123).

Kenar aktivatörleri çift tabakadaki ara yüzey gerilimini azaltarak spanlastiklerin esnekliğini artırmakta ve veziküllerin kendi büyüklüklerinden daha dar biyolojik gözeneklerden geçmesini kolaylaştırmaktadır (24).

Spanlastik Hazırlama Yöntemleri

Spanlastiklerin vezikül büyüklüğü, enkapsülasyon verimliliği, yüzey yükü ve stabilitesi üzerine, kullanılan formülasyon bileşenlerinin ve hazırlama yönteminin etkisi büyüktür. Bu nedenle uygun üretim yönteminin seçilmesi, istenen özelliklere sahip spanlastik formülasyonlarının geliştirilmesinde önemli bir aşamadır (124).

Etanol Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntemde etkin madde ve noniyonik yüzey aktif madde etanol içerisinde çözülür ve elde edilen bu çözeltiye kenar aktivatörü içeren ısıtılmış sulu faza kontrollü olarak enjekte edilir. Daha sonra, karıştırma ve sonikasyon işlemleri uygulanarak spanlastik veziküller elde edilmektedir (125). Yöntem basit, tek basamaklı, tekrarlanabilir ve dar dağılımlı küçük veziküller oluşturabilmesiyle öne çıkmaktadır. Ayrıca ölçek büyütmeye diğer klasik yöntemlerden daha uygun olduğu belirtilmektedir (124).

Elle Çalkalama Yöntemi

Bu yöntemde yüzey aktif maddenin uygun bir organik çözücü içerisinde çözülmesini takiben çözücü uzaklaştırılmakta ve balon yüzeyinde ince bir tabaka oluşturulmaktadır. Bu tabakanın etkin madde içeren sulu faz ile hidrate edilmesi ve çalkalanması sonucunda veziküler yapılar meydana gelmektedir (126).

Mikroakışkanlaştırma Yöntemi

Bu yöntemde yüzey aktif madde ve etkin madde içeren iki sıvı akımı, özel mikrokanallar içerisinde yüksek hızda karşılaştırılmaktadır. Yöntem, daha küçük ve homojen veziküllerin tekrarlanabilir şekilde hazırlanmasına olanak sağlamaktadır (127).

Sonikasyon Yöntemi

Sonikasyon yönteminde etkin madde uygun bir tampon içerisinde hazırlanarak yüzey aktif madde karışımına eklenmekte ve karışım ultrasonik enerjiye maruz bırakılmaktadır. Bu işlem, vezikül büyüklüğünün azaltılmasına ve daha homojen bir dağılım elde edilmesine katkı sağlamaktadır (128, 129).

Eter Enjeksiyon Yöntemi

Bu yöntemde yüzey aktif madde eter içerisinde çözülerek ısıtılmış sulu faza kontrollü biçimde enjekte edilmektedir. Organik çözücünün uzaklaştırılması sonucunda çoğunlukla tek tabakalı veziküller oluşmaktadır (130).

İnce Film Hidrasyon Yöntemi

Bu yöntemde noniyonik yüzey aktif madde organik çözücü içerisinde çözülmekte ve çözücünün vakum altında uzaklaştırılmasıyla balon yüzeyinde ince bir film oluşturulmaktadır. Bu film, etkin madde ve kenar aktivatörü içeren sulu faz ile hidrate edilerek spanlastik dispersiyonu elde edilmektedir (117).

Spanlastiklerin Karakterizasyonu

Spanlastik formülasyonlarının değerlendirilmesinde vezikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimi, ilaç yükleme kapasitesi, morfolojik yapı, esneklik (deformasyon) yeteneği ve etkin madde salım profili gibi çeşitli parametreler incelenmektedir. Bu özellikler, formülasyonun fiziksel stabilitesini, etkin madde taşıma kapasitesini, biyolojik membranlardan geçişini ve terapötik performansını etkileyebilmektedir (29, 131, 132).

Vezikül Büyüklüğü ve Polidispersite İndeksi

Spanlastiklerin ortalama vezikül büyüklüğü ve büyüklük dağılımı genellikle dinamik ışık saçılması yöntemiyle belirlenmektedir. Bu yöntemle elde edilen hidrodinamik çap, yalnızca vezikülün fiziksel büyüklüğünü değil, yüzeyinde bulunan

hidrasyon tabakasını da kapsamaktadır. PDI değeri formülasyondaki veziküllerin büyüklük dağılımı hakkında bilgi vermektedir. Düşük PDI değerleri daha dar ve homojen bir dağılıma, yüksek değerler ise geniş bir büyüklük dağılımına veya agregasyon eğilimine işaret etmektedir (29, 131, 132).

Zeta Potansiyeli

Zeta potansiyeli, spanlastiklerin dispersiyon ortamındaki yüzey yükü ve elektrokinetik davranışının değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir parametredir. Mutlak zeta potansiyeli değerinin yüksek olması, veziküller arasındaki elektrostatik itmenin artmasına ve agregasyon eğiliminin azalmasına katkı sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, spanlastiklerin yapısında bulunan noniyonik yüzey aktif maddeler ve kenar aktivatörleri sterik stabilizasyon da sağlayabildiğinden, zeta potansiyeli tek başına formülasyon stabilitesinin göstergesi olarak değerlendirilmemelidir (131).

Morfolojik Karakterizasyon

Spanlastik formülasyonlarının morfolojik özelliklerinin değerlendirilmesinde taramalı elektron mikroskobu (SEM) yaygın olarak kullanılan görüntüleme tekniklerinden biridir. Elde edilen görüntüler, veziküllerin şekli, yüzey morfolojisi, yapısal bütünlüğü ve olası agregasyonları hakkında bilgi sağlamaktadır (115, 133, 134).

Enkapsülasyon Verimi ve İlaç Yükleme Kapasitesi

Enkapsülasyon verimi, başlangıçta formülasyona eklenen etkin maddenin ne kadarının spanlastik içerisinde tutulduğunu göstermektedir. Bu amaçla serbest etkin madde, santrifüj, diyaliz veya ultrafiltrasyon gibi yöntemlerle formülasyondan ayrılmakta ve uygun bir analitik yöntemle miktarı belirlenmektedir. İlaç yükleme kapasitesi ise belirli miktardaki taşıyıcı sisteme yüklenen etkin madde miktarını ifade

etmektedir. Her iki parametre de formülasyonun etkin madde taşıma başarısının değerlendirilmesinde önem taşımaktadır (29, 131, 132).

Esneme (Deformasyon) Yeteneği

Esneme yeteneği, spanlastikleri klasik niozomlardan ayıran temel özelliklerden biridir. Bu özellik, veziküllerin kendi çaplarından daha küçük biyolojik gözeneklerden yapısal bütünlüklerini büyük ölçüde koruyarak geçebilme kapasitesini ifade etmektedir. Esneme çalışmalarında spanlastik dispersiyonu belirli gözenek büyüklüğüne sahip membranlardan basınç altında geçirilmekte; geçen formülasyon miktarı, geçiş süresi ve işlem sonrasında vezikül büyüklüğünde meydana gelen değişiklikler değerlendirilmektedir (25).

Etkin Madde–Taşıyıcı Uyumluluğu

Etkin madde ile spanlastik bileşenleri arasındaki olası etkileşimler FTIR gibi analiz yöntemleriyle incelenebilmektedir. FTIR spektrumlarındaki karakteristik bant değişiklikleri moleküller arası etkileşimler hakkında bilgi vermektedir (29).

İn Vitro Etkin Madde Salımı

Spanlastiklerden etkin madde salımı, taşıyıcı sistemin kontrollü veya uzatılmış salım sağlama kapasitesini değerlendirmek amacıyla incelenmektedir. Bu çalışmalar genellikle diyaliz membranı veya uygun difüzyon hücreleri kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Belirli zaman aralıklarında salım ortamından alınan örneklerde etkin madde miktarı belirlenmekte ve kümülatif salım profili oluşturulmaktadır. Elde edilen veriler uygun kinetik modellere uygulanarak salım davranışı ve olası salım mekanizması değerlendirilebilmektedir (29, 131, 132).

Fiziksel Stabilite

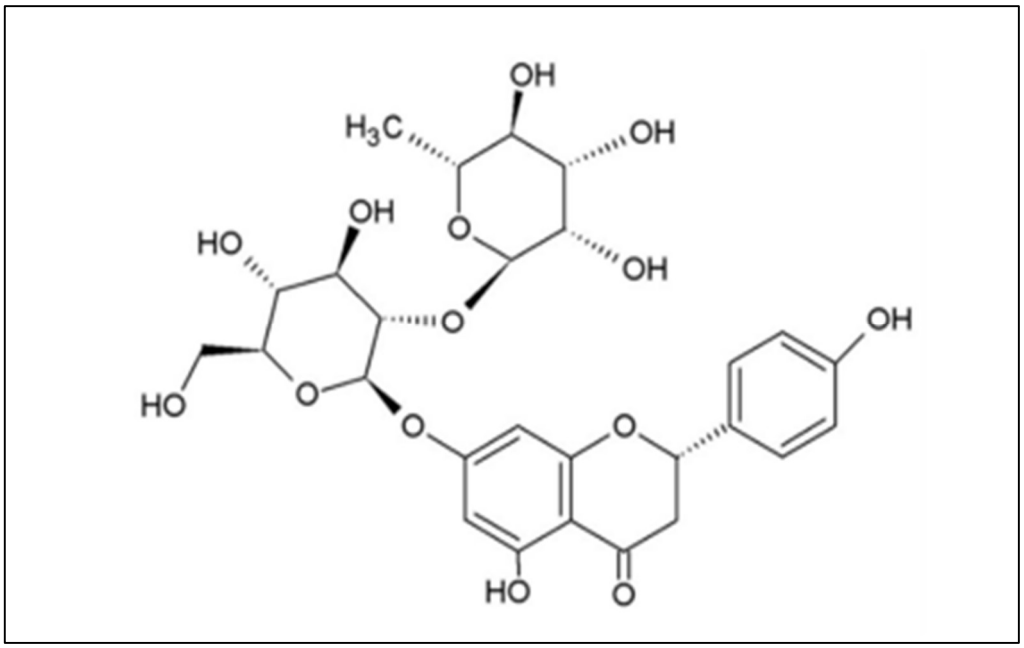
Spanlastiklerin fiziksel stabilitesi, depolama süresince vezikül büyüklüğü, PDI, zeta potansiyeli, enkapsülasyon verimi, görünüm ve etkin madde içeriğinde meydana gelen değişikliklerin izlenmesiyle değerlendirilmektedir. Vezikül büyüklüğü ve PDI

değerlerindeki artış agregasyon veya vezikül birleşmesine, enkapsülasyon verimindeki azalma ise etkin maddenin veziküllerden sızmasına işaret edebilmektedir. Bu nedenle farklı sıcaklık ve depolama koşullarında yürütülen stabilite çalışmaları, formülasyonun raf ömrü ve uygun saklama koşullarının belirlenmesi açısından önem taşımaktadır (29).

2.4. Naringin

İlk olarak 1857 yılında De Vry tarafından greyfurt çiçeklerinde keşfedilen 4',5,7-Trihidroksiflavanon 7-Ramnoglukozit olarak bilinen **naringin** (NAR) (30) (Şekil 2.7), esas olarak greyfurt ve turunçgiller gibi Rutaceae familyasına ait meyvelerinin kabuklarında ve etli kısmında olmakla beraber Fructus Aurantii, Citrus aurantium, Bergamot, Citri Grandis Exocarpium, Drynariae Rhizoma gibi bitkisel müstahzarlarda da bulunan doğal bir dihidro flavonoiddir (31) .

NAR'ın uzun zamandır bilinen antioksidan, antiinflamatuar, hipoglisemik etki sağlama, lipit düşürücü etki sağlama , kardiyovasküler koruma, nöroproteksiyon, gastrointestinal koruma, osteoporoz ve kemik hasarını önleme gibi etkilerinin yanı sıra son zamanlarda yapılan araştırmalarda, servikal kanser, prostat kanseri, meme kanseri, kolorektal kanser, osteosarkom, mesane kanseri, yumurtalık kanseri, melanom, gliom, akciğer kanseri, özofagus kanseri, tiroid kanseri, karaciğer kanseri ve daha birçok kansere karşı da etkili olduğu gösterilmiştir. NAR'ın antitümöral etkisinin esas olarak tümör hücresi döngüsünü bloke ederek olduğu bildirilmiştir (31).



Şekil 2. 7. Naringin'in kimyasal yapısı (33).

Fizikokimyasal Özellikleri

NAR'ın kimyasal yapısı bir flavonoid omurga, iki fenolik halka ve bir heterosiklik piran halkasından oluşur. Molekül başına moleküler ağırlığı 580,54 g ve kimyasal formülü $C_{27}H_{32}O_{14}$'tür (Tablo 2.2.). (135). NAR'ın erime noktası 83 °C olup, 40 °C'de sudaki çözünürlüğü 1 mg/mL'dir (136). Sıcaklığın artmasıyla birlikte, naringin ve aglikon eşdeğeri olan naringenin, çeşitli çözücülerde daha fazla çözünür hale gelir. NAR, metanol, etil asetat, n-butanol, izopropanol, petrol eteri ve heksanda çözünür. Etkin madde, 100 °C'nin üzerindeki sıcaklıklarda veya ışık varlığında bozulmaya başlar (137).

Tablo 2.2. Naringin'in fizikokimyasal özellikleri (34).

Özellik	Açıklama
IUPAC Adı	(2S)-7-[(2S,3R,4S,5S,6R)-4,5-dihidroksi-6-(hidroksimetil)-3-[(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihidroksi-6-metiloksan-2-il]oksioksan-2-il]oksi-5-hidroksi-2-(4-hidroksifenil)-2,3-dihidrokromen-4-on
Kimyasal Formül	$C_{27}H_{32}O_{14}$
Moleküler Ağırlık	580,5 g/mol
CAS Numarası	10236-47-2
Görünüm	Katı (beyaz – açık sarı toz)
Erime Noktası	83 °C (hidrat formu)
Kaynama Noktası	922 – 926 °C (760 mmHg)
Suda Çözünürlük	1 mg/mL (40 °C)
LogP (n-oktanol/su)	-0,44
pKa Değeri	≈7,5 – 8,5 (fenolik –OH grupları)
Stabilite	Işığa, oksidasyona ve asidik pH değerlerine duyarlıdır; β-glikozidaz ile enzimatik hidrolize uğrar

Farmakokinetik Özellikleri

NAR, oral uygulamadan sonra gastrointestinal sistem ve ağız boşluğu ile ince bağırsak epitel hücreleri aracılığıyla sınırlı düzeyde absorbe edilir. Emilimin ardından bağırsak mikrobiyotasında bulunan α-ramnozidaz ve β-glukozidaz enzimleri tarafından aglikon formu olan naringenine hidrolize edilmekte (35) ve daha sonra sistemik dolaşıma geçmektedir. Düşük sulu çözünürlüğü, sınırlı gastrointestinal emilimi ve yoğun ilk geçiş metabolizması nedeniyle NAR'ın oral biyoyararlanımının, aglikona eşdeğer 50 mg'lık bir dozda yaklaşık %5–9 olduğu bildirilmiştir. Oral uygulamayı takiben C_{maks} değerine kadar olan ortalama süre (T_{maks}) genelde, doz uygulandıktan sonra yaklaşık 5,5 saat olmuştur (33).

Yapılan biyodağılım çalışmaları, NAR ve metabolitlerinin akciğerler, trakea, gastrointestinal sistem, karaciğer ve böbrekler başta olmak üzere hemen hemen tüm vücut organlarına dağıldığını; en yüksek konsantrasyonların midede, en düşük konsantrasyonların ise KBB'nin sınırlayıcı etkisi nedeniyle beyinde gözlendiğini

göstermiştir (33). Ayrıca NAR'ın karaciğer ve safrada aktif taşıma mekanizmaları ile yoğunlaştığı bildirilmektedir (35).

NAR, bağırsak ve karaciğer hücrelerinde sitokrom P450 enzim sistemi aracılığıyla oksidasyon ve demetilasyonu içeren Faz I metabolizmasına (sitokrom P450 monooksijenazlar tarafından oksidasyon veya demetilasyon), ardından glukuronidasyon, sülfatlama ve metilasyon reaksiyonlarını kapsayan Faz II metabolizmasına (glukuronidasyon, sülfasyon veya metilasyon) uğramaktadır (33). Bunun yanında bağırsak mikrobiyotası tarafından çeşitli fenolik metabolitlere dönüştürülerek biyotransformasyona uğradığı da bildirilmektedir (35) .

NAR'ın eliminasyonu başlıca böbrekler yoluyla idrar ve karaciğer yoluyla safra aracılığıyla gerçekleşmektedir. İdrarla atılım oranının uygulanan doza bağlı olarak %5–57 (135) arasında değiştiği bildirilmiş olup, eliminasyon sırasında hem serbest NAR hem de metabolitleri idrar ve dışkıda tespit edilmiştir. Süt proteinleri ve hacimli diyet lifleri, NAR ve naringeninin biyoyararlanımını azaltabilmektedir. Mevcut veriler, NAR'ın genel olarak güvenli ve düşük toksisiteye sahip bir biyoaktif bileşik olduğunu göstermektedir (33).

NAR'ın düşük çözünürlüğü, sınırlı oral biyoyararlanımı ve yoğun metabolizması terapötik etkinliğini sınırlandıran başlıca faktörler arasında yer almaktadır. Bu nedenle geliştirilen nanotaşıyıcı sistemlerin NAR'ın hedefli taşınmasını sağlayabildiği, in vivo stabilitesini, hedef dokudaki ilaç konsantrasyonunu ve retansiyon süresini artırabildiği; ayrıca hedef dışı hücrelerde oluşabilecek toksik ve yan etkileri azaltabildiği bildirilmiştir. Bunun yanı sıra nanoteknolojik yaklaşımların naringinin belirli bölgelerde kontrollü salımını sağlayarak tümör dokusunda birikimini ve terapötik etkinliğini artırma potansiyeline sahip olduğu belirtilmektedir (31).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

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

3.1.1. Kimyasal Maddeler

Tablo 3. 1. Kullanılan maddeler ve markaları.

Madde	**Marka**
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Serva, Almanya
Diyaliz Membranı	Sigma, ABD
DMEM	Sigma, ABD
Etanol	Sigma, ABD
Formik asit	Merck, Almanya
Fosfat Tamponu Tuzu (pH 7,4 PBS)	Biochrom AG, Almanya
MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)	Sigma, ABD
Metanol	Merck, Almanya
Naringin	Thermo Scientific, ABD
Tween 80	Sigma, ABD
Span 60	Merck, Almanya
RG2 Hücre Hattı Amerikan Tipi Kültür	RG2 Hücre Hattı Amerikan Tipi Kültür

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Yazılımlar

Tablo 3. 2. Kullanılan Cihaz ve Yazılımlar

Cihaz/Yazılım	**Marka/Program**
Çizim Programı	Print 3D, BioRender
Çok Noktalı Manyetik Karıştırıcı	Telemodul 20C, Thermo Scientific, Almanya
Deneysel Tasarım Yazılımı	Minitab®, ABD
ELISA Mikro Plaka Okuyucu	Molecular Devices, ABD
FTIR Cihazı	Perkin Elmer FTIR System Spectrum BX, ABD
Hassas Terazi	Mettler Toledo, İsviçre
HPLC Sistemi	Agilent 1200, ABD
Isıtıcılı Manyetik Karıştırıcı	DLAB, Çin
İstatistik Yazılımı	GraphPad, Stat-Ease
Liyafilizatör	Labconco FreeZone, ABD
Mikropipetler	Eppendorf, Almanya
Partikül Büyüklüğü ve Zeta Potansiyeli Ölçüm Cihazı	Malvern Instruments, İngiltere
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, ABD
Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)	TESCAN GAIA3, Çekya
Termostatlı Yatay Çalkalayıcı	Memmert, Almanya
Ultra saf su cihazı	Millipore, ABD
Ultrasonik Banyo	Bandelin, Almanya
Vorteks	IKA, Almanya

3.2. Naringin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Tez çalışmaları kapsamında, NAR'ın miktar tayini için Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yöntemi kullanılmıştır (138) ve kromatografik koşullar Tablo 3.3'e belirtilmiştir.

Tablo 3. 3. Naringin'nin HPLC ile miktar tayinininde kullanılan kromatografik koşullar (138).

Mobil Faz	Metanol:su: formik asit (40:59,9:0,1)
Enjeksiyon hacmi	20 µL
Akış hızı	1,1 mL/dk
Dedektör	UV-Vis dedektörü
Dalga boyu	285 nm
Kolon	C18 HPLC Column, 5 µm, 250 x 4.6 mm
Sıcaklık	35 °C
Analiz Süresi	15 dk

3.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) Yönteminin Analitik Yöntem Validasyonu

Analitik yöntem validasyonu, analizi yapılacak maddenin tayininde kullanılacak olan analitik yöntemin belirlenen koşullarda doğru, tekrarlanabilir ve özgül olduğunu garanti etmek için uygulanan işlemdir (139). HPLC metodunun değerlendirilmesinde aşağıdaki parametreler incelenmiş ve sonuçlar istatiksel olarak değerlendirilmiştir:

- Doğrusallık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Özgüllük
- Duyarlılık
- Stabilite(139).

3.3.1. Doğrusallık

Doğrusallık, bir analitik yöntemin belirli bir aralıkta, analizi yapılan maddenin konsantrasyonu ile deney sonuçlarının doğrudan orantılı olmasını sağlama özelliğidir (139). 10 mg NAR hassas terazide tartılmış ve balon joje içinde hareketli fazda çözülerek stok çözelti (100 µg/mL) hazırlanmıştır. Elde edilen stok çözelti hareketli fazla seyreltilerek sırasıyla 12,5, 10, 5, 7,5, 2,5, 1, ve 0,5 µg/mL konsantrasyonlarında çözeltiler elde edilmiştir. Analiz sonucunda, çözeltilerin konsantrasyona karşı elde edilen pik alanları kullanılarak doğru denklemi hesaplanmış ve korelasyon katsayısının önem kontrolü yapılmıştır.

3.3.2. Doğruluk

Analitik yöntem ile bulunan deney sonuçlarının gerçek değerlere olan yakınlığı belirlenmiştir. Kullanılan yöntemin doğruluğunun değerlendirilmesi için hazırlanan stok çözeltiden üç farklı konsantrasyonda (düşük, orta, yüksek; 1, 5 ve 12,5 µg/mL) altı farklı örnek hazırlanıp analizler yapılarak % geri kazanılan değerler hesaplanmıştır (139).

3.3.3. Kesinlik

Bir yöntemin birbirini takip eden ölçümleri arasındaki yakınlığın derecesini ifade eden kesinlik parametresi, standart sapma (SS) veya varyasyon katsayısı (VK) ile ifade edilir. Kesinlik, normal çalışma koşullarında analitik yöntemin tekrar edilebilirlik veya tekrar elde edilebilirlik derecesinin bir göstergesidir (139).

Tekrar Edilebilirlik

Yöntemin tekrarlanabilirliğini göstermek amacıyla aynı konsantrasyonda hazırlanan örnek arka arkaya 6 kez uygulanarak elde edilen pik alanlarının $\bar{X}$, SS ve VK değerleri hesaplanmıştır (139).

3.3.4. Özgüllük

Özgüllük, bir analitik yöntemin amaçlanan maddeyi spesifik olarak tayin edebilmesidir (139). Bu amaçla formülasyon bileşeni olan yardımcı maddelerin (Tween 80, Span 60) HPLC analizleriyle kromatogramları elde edilmiş ve NAR ile benzer alıkonma süresinde absorbans piki verip vermedikleri araştırılmıştır.

3.3.5. Duyarlılık

Miktar Tayini Sınırı (*"Limit of Quantitation",* LOQ)

Analitik yöntemin belirlenen şartlarda, analizi yapılan maddenin kabul edilebilir kesinlik ve doğruluk ile kantitatif olarak tayin edilebildiği en düşük konsantrasyon olarak tanımlanır. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 10:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (139).

Saptama Sınırı *("Limit of Detection"*, LOD)

Analizi yapılan maddenin kalitatif olarak saptanabildiği en düşük konsantrasyondur. Bu değer, sinyal:gürültü oranının 3:1 olduğu konsantrasyon ile ifade edilmektedir (139).

3.3.6. Stabilite

NAR'ın deneyler süresince stabil kaldığının gösterilmesi amacıyla 10 µg/mL konsantrasyonda 6 seri olmak üzere çözeltiler hazırlanmış ve örnekler hemen, 24. ve 48. saatlerde analiz edilmiştir.

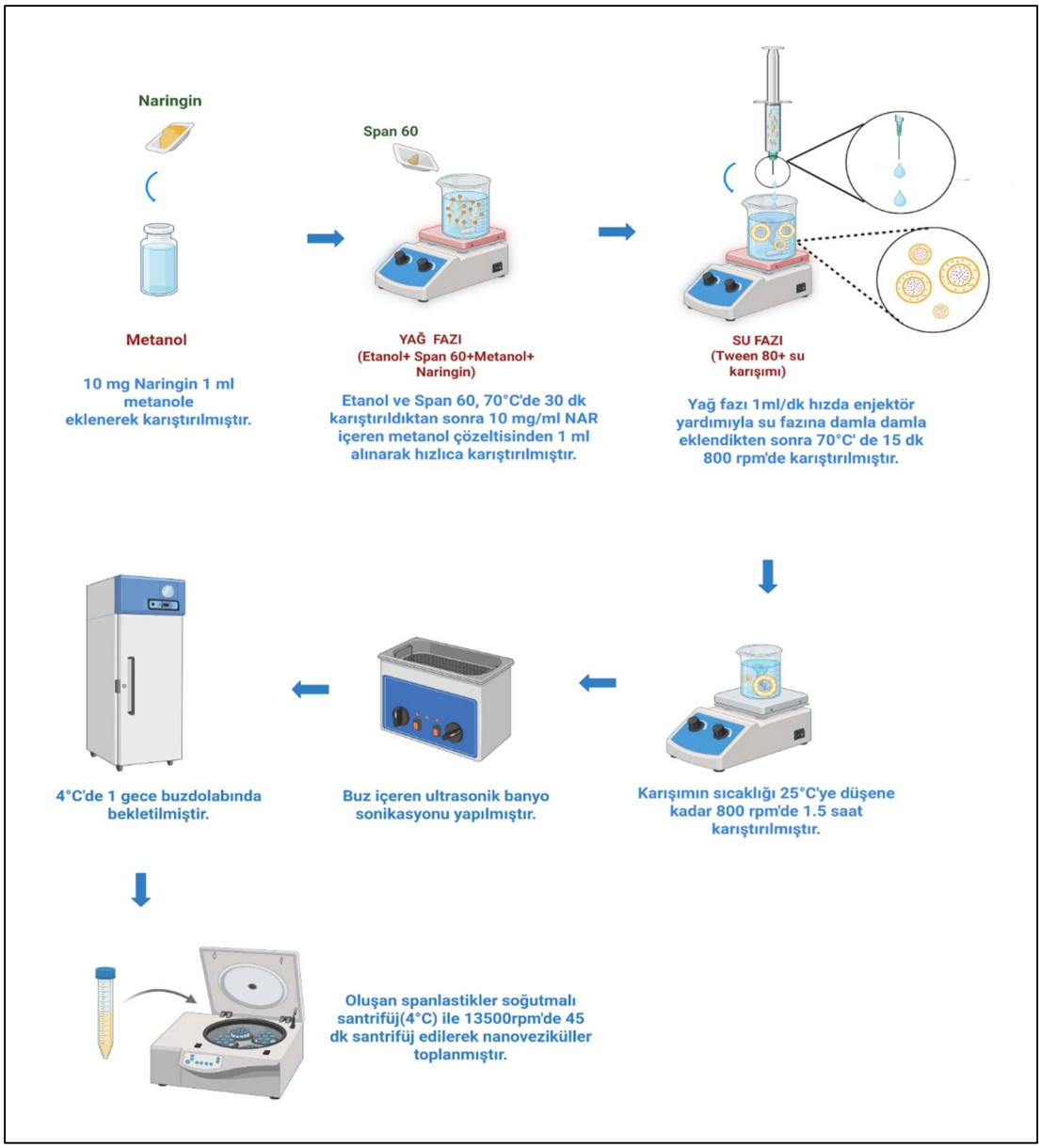
3.4. Spanlastik Formülasyonlarının Geliştirilmesi

Tez çalışması kapsamında spanlastik formülasyonlarının geliştirilmesinde etanol enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır (121). Bu metodun tercih edilmesinin ana sebebi, tek basamaklı yapısı sayesinde hazırlama kolaylığı sağlaması, yüksek tekrarlanabilirlik göstermesi ve dar boyut dağılımına sahip küçük nanoveziküllerin hazırlanmasına olanak tanımasıdır. Bu özellikleriyle yöntem ince film hidrasyonu gibi konvansiyonel vezikül hazırlama yöntemlerine göre üstünlük göstermektedir (131).

Tez çalışması kapsamında yürütülen formülasyon geliştirme süreçlerinde; spanlastiklerin membran yapısını oluşturmak üzere Span 60, veziküler membrana esneklik ve deformabilite kazandırmak üzere kenar aktivatörü olarak Tween 80 ve Span 60 ile etkin maddenin organik faz içerisinde çözülmesini sağlamak amacıyla etanol esaslı organik faz kullanılmıştır. Ayrıca, NAR'ın organik fazdaki çözünürlüğünü artırmak amacıyla formülasyon hazırlama yöntemi metanol ilavesiyle modifiye edilmiştir (140, 141). Span 60'ın spanlastik formülasyonlarında tercih edilmesinin başlıca nedenleri; noniyonik yapıda olması, düşük HLB değeri ve uzun doymuş C18 hidrokarbon zinciri sayesinde kararlı veziküler membranların oluşumuna katkı sağlamasıdır. Span 60'ın lipofilik karakterinin vezikül oluşumunu desteklediği ve farklı Span türevleriyle karşılaştırıldığında yüksek enkapsülasyon etkinliği ile fiziksel stabilite sağlayabildiği bildirilmiştir (142). Buna karşılık, yalnızca membran oluşturucu yüzey aktif maddeden meydana gelen veziküler sistemlerde membranın görece rijit olması, deformabiliteyi sınırlayabilmektedir. Bu nedenle spanlastik yapıya bir kenar aktivatörünün dahil edilmesi, klasik noniyonik veziküllerden ayrılan temel özelliklerden birini oluşturmaktadır (143). Bu amaçla formülasyona Tween 80 de kenar aktivatörü olarak dahil edilmiştir. Tween 80'in veziküler membrana yerleşmesi, yüzey aktif madde molekülleri arasındaki düzenli paketlenmeyi azaltarak membranın akışkanlığını ve elastikiyetini artırmaktadır. Böylece spanlastik veziküller, kendi çaplarından daha küçük porlardan yapısal bütünlüklerini büyük ölçüde koruyarak geçebilecek ölçüde deformasyon gösterebilmektedir. Tween 80'in ayrıca diğer bazı kenar aktivatörlerine kıyasla daha küçük ve elastik nanoveziküllerin oluşumunu destekleyebildiği bildirilmiştir (25, 142).

Tez kapsamında tasarlanan spanlastik formülasyonlarının hazırlanmasında (Şekil 3.1.), öncelikle su fazı oluşturulmuştur. Bu amaçla Tween 80 (40, 60 veya 80 mg) 8 ml ultra saf su içerisinde ısıtılarak manyetik karıştırıcıda 70 °C' de 30 dk karıştırılmıştır. Ayrı bir kapta, organik fazı oluşturmak üzere Span 60, 3 ml etanol içerisinde ısıtılarak 70 °C' de 30 dk karıştırılmıştır (etkin madde içeren gruplarda yağ

fazı su fazına eklenmeden hemen önce 10 mg/1 ml konsantrasyonda NAR içeren metanol çözeltisinden 1 ml ilave edilmiş ve hızlıca karıştırılarak yağ fazı tamamlanmıştır). Daha sonra yağ fazı, manyetik karıştırıcıda 800 rpm' de karıştırılan su fazına enjektör ile damla damla (1ml/dk hızda) ve kesintisiz bir şekilde ilave edilmiştir. Bu karışım, 70° C'de 15 dk karıştırıldıktan sonra, karışımın sıcaklığı 25°C'ye düşene kadar oda sıcaklığında 1,5 saat karıştırılarak etanolün uzaklaşması sağlanmıştır. Oda sıcaklığına gelmiş ve etanolü uzaklaştırılmış karışım, buz içeren (15 °C) ultrasonik banyoda (35 kHz, 120 W, %50 güçte) (3, 5 veya 7 dk) tutularak vezikül boyutunun ve PDI değerinin düzenlenmesi sağlanmıştır. Bu işlemin sonunda hazırlanan formülasyon 1 gece buzdolabında olgunlaşmaya bırakılmıştır. Daha sonra oluşan spanlastikler soğutmalı santrifüj (4°C) ile 13500 rpm'de 45 dk santrifüj edilerek toplanmıştır.



Şekil 3. 1. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanmasının şematik gösterimi.

3.4.1. Formülasyon Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları

Spanlastik formülasyonlarının hazırlanmasında formülasyon bileşenlerinin genel çerçevesi belirlendikten sonra boyut ve PDI değeri açısından uygun olan formülasyon/formülasyonların tespit edilmesi için faktöriyel tasarım çalışmaları **etkin madde içeren formülasyonlar üzerinde** gerçekleştirilmiştir. Bu kapsamda vezikül

boyutunu, enkapsülasyon etkinliğini (%EE), PDI ve zeta potansiyeli değerlerini doğrudan ve güçlü bir şekilde etkileme olasılığı olan iki temel bağımsız değişken seçilmiştir. Çalışmada faktöriyel tasarım 3^2 olacak şekilde toplamda 9 ayrı formülasyon (S1-S9) olarak gerçekleştirilmiştir. Bu tasarımın nedeni, formülasyon parametrelerinden Tween 80 miktarının (40, 60 ve 80 mg) ve ultrasonik banyoda kalma süresinin (3, 5 ve 7 dk) spanlastik özellikleri üzerindeki etkilerinin 3 farklı seviyede değerlendirilmesidir (Tablo 3.4.). Faktöriyel tasarım kapsamında hazırlanan tüm formülasyonlarda su fazı hacmi (8 mL), organik çözücü (Etanol 3 ml), Span 60 miktarı (100 mg) sabit tutulmuş olup, hazırlanan formülasyonlara ait kodlamalar Tablo 3.5'te verilmiştir.

Tablo 3. 4. Faktöriyel tasarım çalışmalarında kullanılan bağımsız değişkenler ve seviyeleri.

Seviyeler	Tween 80 Miktarı (mg)	Sonikasyon süresi (dk)
Düşük	40	3
Orta	60	5
Yüksek	80	7

Tablo 3. 5. Faktöriyel tasarım parametrelerine göre oluşturulan formülasyon kodları.

Tween 80 Miktarı \ Sonikasyon Süresi	3 dk	5 dk	7 dk
40 mg	S1	S2	S3
60 mg	S4	S5	S6
80 mg	S7	S8	S9

Hazırlanan 9 adet spanlastik formülasyonundan vezikül büyüklüğü, zeta potansiyeli , enkapsülasyon etkinliği ve PDI değeri açısından uygun bulunan 3 formülasyon (S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonlar) seçilerek in vitro salım, elastikiyet analizi, fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.6.). Bu değerlendirmeler sonucunda optimum formülasyon (S5 kodlu formülasyon)

belirlenmiş ve optimum formülasyon üzerinde ilave çalışma olarak FTIR analizi, morfolojik değerlendirme ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir (burada genel bilgi verilmiştir, formülasyon seçimi ile ilgili detay bilgiler ilerleyen bölümlerde sunulmuştur)**.**

Tablo 3.1. İleri karakterizasyon ve in vitro salım çalışmaları için seçilen spanlastik formülasyonlarının hazırlanmasında kullanılan parametreler.

Bileşen/İşlem	**Parametre**	**S2**	**S5**	**S9**
Su Fazı	Hacim	8 mL	8 mL	8 mL
	Tween 80 Miktarı	40 mg	60 mg	80 mg
Yağ Fazı	Span 60 Miktarı	100 mg	100 mg	100 mg
	Etkin madde Miktarı	10 mg	10 mg	10 mg
	Etanol Miktarı	3 ml	3 ml	3 ml
	Metanol Miktarı	1 ml	1 ml	1 ml
Karıştırma	Hız	800 rpm	800 rpm	800 rpm
	Süre	15 dakika 70°C + 1,5 saat 25°C	15 dakika 70°C + 1,5 saat 25°C	15 dakika 70°C + 1,5 saat 25°C
Sonikasyon	Süre	5 dk	5 dk	7 dk

3.5. Spanlastik Formülasyonlarının Karakterizasyonu

3.5.1. Vezikül Büyüklüğü, Polidispersite İndeksi ve Zeta Potansiyel Tayini

Spanlastik formülasyonlarının (S1-S9) vezikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri Malvern Zetasizer Nano Series ZS cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan formülasyonlar %10 oranında (1:10) ultra saf su ile seyreltildikten sonra polistiren küvetlere (12,5 × 12,5 × 45 mm) alınarak cihaz yardımıyla vezikül büyüklüğü ve PDI değerleri ölçülmüştür. Benzer olarak, zeta

potansiyel ölçümleri için de seyreltilme yapılmış formülasyonlardan yaklaşık 800 µL alınarak uygun zeta potansiyeli ölçüm küvetlerine (DTS1070) yerleştirilmiş ve analizler aynı cihaz ile gerçekleştirilerek ölçümler üç defa tekrar edilmiştir.

3.5.2. Morfolojik Özelliklerin Belirlenmesi

Hazırlanan optimum spanlastik formülasyonunun (S5 kodlu formülasyon) yüzey ve şekil özelliklerinin belirlenmesi için SEM cihazı kullanılmıştır. Numuneler, karbon grid üzerine tespit edilmiş ve 3 mm Au-Pd kaplama ile kaplanarak SEM fotoğrafları çekilmiştir. Görüntüleme TESCAN GAIA3 SEM cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.5.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FT-IR) Spektroskopisi

Optimum formülasyonda (S5 kodlu formülasyon) kullanılan etkin madde ve yardımcı maddeler arasında olabilecek fizikokimyasal etkileşimleri ve moleküler düzeydeki yapısal değişimleri değerlendirmek amacıyla Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) analizi gerçekleştirilmiştir (144). Sıvı dispersiyon halindeki boş ve NAR yüklü spanlastik formülasyonları, analiz öncesinde katı hale getirilmek amacıyla liyofilize edilmiştir. Bu amaçla formülasyonlar −80°C'de 24 saat süreyle dondurulmuş, ardından liyofilizatörde yaklaşık −75 °C kondenser sıcaklığında ve 0,135 Torr vakum altında 24 saat kriyoprotektan kullanılmadan kurutulmuştur. Analiz öncesinde toz haldeki saf NAR, Span 60, Tween 80 ve liyofilize edilmiş spanlastik numuneleri pres altında ince diskler haline getirilmiştir. Hazırlanan bu disklerin FTIR spektrumları, oda sıcaklığında 4000–400 cm^{-1} dalga sayısı aralığında ve 4 cm^{-1} çözünürlükte taranarak kaydedilmiştir (115). Elde edilen spektrumlarda saf etkin madde ve yardımcı maddelere ait karakteristik titreşim bantlarında meydana gelen kaymalar incelenerek NAR'ın Span 60 ve Tween 80 bileşenleri arasındaki fiziksel uyumluluğu ve nanovezikül içerisine başarılı bir şekilde hapsedilip hapsedilmediği incelenmiştir.

3.5.4. İlaç Yükleme Çalışmaları

İlaç yükleme çalışmaları ile hazırlanan tüm formülasyonların (S1-S9 kodlu formülasyonlar) enkapsülasyon etkinliği (%EE) belirlenmiştir. İleri karakterizasyon çalışmaları için seçilen S2, S5 ve S9 formülasyonlarının ise ayrıca ilaç yükleme kapasitesi (LC) belirlenmiştir. Bu amaçla formülasyonlardan 1 mL alınarak santrifüj tüplerine aktarılmıştır. Numuneler, 4° C'de 13.500 rpm'de 45 dakika süreyle santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında serbest NAR'ı içeren süpernatant faz dikkatlice ayrılmıştır. Elde edilen süpernatant, HPLC analizinde kullanılan mobil faz ile 50 kat seyreltilmiştir. Seyreltilen numuneler 0,45 µm gözenek çapına sahip uygun şırınga filtresinden geçirilerek süzülmüş ve daha önce geliştirilen HPLC yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir (145).

Enkapsülasyon etkinliği aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır:

Denklem 1. Yükleme Kapasitesi (146)

$$\%\ Y\ddot{u}kleme\ Kapasitesi(LC) = \frac{\ddot{O}l\c{c}\ddot{u}len\ naringin\ miktarı\ (\mu g)}{Toplam\ spanlastik\ miktarı\ (\mu g)} \times 100$$

Denklem 2. Enkapsülasyon Etkinliği (132)

$$\%\ \text{Enkapsülasyon Etkinliği}(\%EE) = \frac{\text{Başlangıçtaki toplam naringin miktarı(µg) - Süpernatanttaki serbest naringin miktarı(µg)}}{\text{Başlangıçtaki toplam naringin miktarı(µg)}} \times 100$$

3.5.5. *İn Vitro* Salım Çalışmaları

NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının (S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonlar) *in vitro* salım özelliklerinin değerlendirmesi için "diyaliz membran yöntemi" kullanılmıştır (147). Salım ortamı olarak; pH 7,4 fosfat tamponu ("Phosphate-buffered saline", PBS) kullanılmıştır. PBS, ticari toz tamponun (Biochrom AG, Almanya) distile suda çözülmesiyle hazırlanmış olup 8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na_2HPO_4 ve 0,2 g/L KH_2PO_4 içermektedir. Analiz için 50 mL'lik polipropilen tüplere, 50 mL pH 7,4 PBS eklenmiştir. Daha sonra hazırlanan formülasyondan 0,1 mL alınıp 0,9 mL PBS içeren

diyaliz membrana (MW 14000 cut off) ilave edilmiş ve membranın iki ucu kapatıldıktan sonra PBS içeren tüplere yerleştirilmiştir. Hazırlanan düzenek, 37±2 ºC' de 50 rpm hızında çalışmakta olan yatay çalkalayıcıya yerleştirilmiştir. Belirli zaman aralıklarında (0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24 ve 48. saat) 1 mL örnek alınmış ve ortama 1 mL taze ortam eklenmiştir. Alınan örnekler HPLC ile tayin edilmiştir.

3.5.6. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları

Spanlastik formülasyonların elastikiyetinin değerlendirilmesi amacıyla deforme olabilirlik indeksi (DI) belirlenmiştir. Bu amaçla spanlastik formülasyonu (S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonlar), 5 bar basınç altında 10 dakika süreyle 100 nm gözenek çapına sahip polikarbonat membran filtreden geçirilmiştir. Ekstrüzyon işlemi sonrasında vezikül boyutu yeniden ölçülmüş ve deforme olabilirlik indeksi aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanmıştır (115):

$$DI = J\left(\frac{rv}{rp}\right)^2$$

J, birim zamanda ekstrüde edilen formülasyon miktarını (mg/s) ; rv, ekstrüzyon sonrası veziküllerin boyutunu (nm) ; rp ise polikarbonat membran filtrenin gözeneklerin boyutunu (nm) temsil eder (115, 148).

3.6. Formülasyonların Sterilizasyonu

Hazırlanan optimum formülasyonun (S5) sterilizasyon işlemi aseptik koşullarda filtrasyon tekniği ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla formülasyon, steril laminar hava akımlı kabin içerisinde 0,22 µm por çapına sahip steril filtrelerden süzülerek önceden steril edilmiş kaplara aktarılmıştır.

Sterilizasyon etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla kılavuza uygun olarak aseptik koşullar altında sterilite testleri yürütülmüştür (149). Liyofilize sıvı tiyoglikolat besiyeri ve *tryptic soy broth* taze olarak hazırlanmış, otoklavda steril edildikten sonra steril deney tüplerine dağıtılmıştır. Her bir formülasyondan 1 mL örnek alınarak sıvı tiyoglikolat ve *tryptic soy broth* besiyerlerinin dip kısımlarına doğru inoküle edilmiştir.

Testler, her bir örnek ve besiyeri için 5 paralel olarak çalışılmıştır. Çalışmada pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşu kullanılırken, hiçbir inokülasyon yapılmayan besiyerleri negatif kontrol olarak ayrılmıştır.

İnokülasyon işleminin ardından, sıvı tiyoglikolat besiyerlerini içeren tüpler 35 °C'de, *tryptic soy broth* içeren tüpler ise 25 °C'de 14 gün boyunca inkübatörde bekletilmiştir. İnkübasyon süreci boyunca besiyerlerindeki mikrobiyal üremenin varlığına işaret eden bulanıklık günlük olarak izlenmiş ve 14 günlük sürenin sonunda nihai değerlendirme yapılmıştır.

3.7. Hücre Kültürü Çalışmaları

Hücre kültürü çalışmalarında formülasyon grubu olarak optimum formülasyon (S5 kodlu formülasyon) kullanılmıştır. Optimum olarak belirlenen S5 formülasyonu NAR içerdiği için, bu formülasyonun etkin madde içermeyen şekli S5 ile aynı hazırlama yöntemi ve parametreleri kullanılarak elde edilmiştir.

Çalışmalara NAR çözeltisi, boş spanlastik formülasyonu (etkin madde içermeyen S5) ve optimum formülasyon (S5) dahil edilmiştir. Bunun için, RG2 (sıçan GBM hücre hattı) hücreleri kullanılmış ve deneysel çalışmalar "MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür) test" protokolü uyarınca gerçekleştirilmiştir (150). MTT testi, hücre canlılığını değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan bir *in vitro* sitotoksisite testidir. Canlı hücrelerin mitokondriyal enzimleri tarafından indirgenen MTT, çeşitli organik solvanlar ile çözünen mor renkli formazan kristallerine dönüşür. Spektrofotometrik ölçümlerle elde edilen absorbans, hücre canlılığı ile doğru orantılıdır (151, 152).

RG2 hücreleri için kültür ortamı olarak, %10 fetal bovin serum (FBS) ve %1 penisilin/streptomisin (100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomisin) içeren DMEM: Ham's F12(Dulbecco's Modified Eagle Medium: Ham's F12) besiyeri kullanılmıştır. Canlı hücrelerin tripan mavisi boyası ve Thoma lamı yardımıyla sayılması sonrasında hücreler, taze kültür ortamında dağıtılarak hücre ekimi için uygun miktarda hücre süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan hücre süspansiyonu $5x10^4$ hücre/mL olacak

şekilde (100 µL) 96 kuyucuklu plakalara aktarılmış ve hücrelerin kültür kabına tutunmalarını ve çoğalmalarını sağlamak amacıyla hücreler gün aşırı (yaklaşık 16-18 saat) inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda zeminde yer alan hücrelerin üzerindeki eski kültür ortamı uzaklaştırılmıştır. Plakalara uygulanacak ilaç standartlarının hazırlanması için NAR çözeltisi, boş ve dolu spanlastik formülasyonlarının taze kültür ortamı içinde farklı konsantrasyonlarda dilüsyonları hazırlanmış ve elde edilen numuneler (100 µL) 96 kuyucuklu plakalara ekilip 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır.

Yüksek konsantrasyonlardaki toksisite sınırını yakalamak amacıyla 1000 µg/mL'den başlanarak 1 µg/mL'ye kadar inen 10 farklı konsantrasyon (1000, 500, 250, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5 ve 1 µg/mL) hücrelere uygulanmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, kuyucuklara 25 µL MTT çözeltisi (%0,5) eklenerek plakalar 3,5-4 saat kadar daha inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kuyucuların içinde oluşan formazan kristallerini çözmek için her kuyucuğa 200 µL DMSO eklenmiştir. Daha sonra plakaların mikroplaka okuyucu (Eliza-Plate reader) yardımıyla 570 nm ve 650 nm dalga boylarında absorbans değerleri okunarak kolorimetrik ölçümler kaydedilmiştir. Kontrol grubuna ait hücre canlılık absorbans değeri %100 olarak kabul edilmiştir.

Hücre kültürü çalışmalarında hücre canlılıkları, 10 farklı konsantrasyonda (azalandan artana doğru) kontrol grubuna (%100) kıyasla yüzde olarak hesaplanmış ve gruplar arası farklılıklar İki Yönlü ANOVA çoklu karşılaştırma testi ile istatiksel olarak analiz edilmiş olup; grupların kontrol grubu ile karşılaştırılmasında *Dunnett* çoklu karşılaştırma testi, formülasyonların belirli konsantrasyonlarda kendi aralarındaki karşılaştırmalarında ise *Tukey* çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır.

3.8. Stabilite Çalışmaları

Spanlastik formülasyonları (S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonlar) üzerinde fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bunun için spanlastik formülasyonlarının;

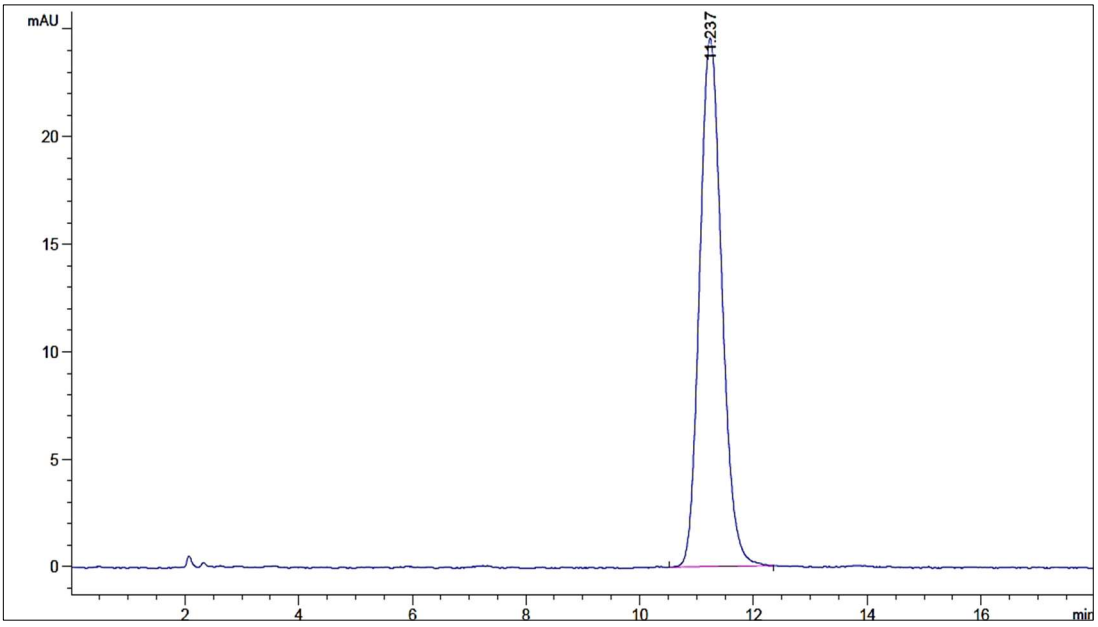
- 25 °C’de %60 ± %5 bağıl nem ve
- 4 °C’de buzdolabında

30 gün saklanması sonrasında vezikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyel değerleri ölçülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Naringin'in Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ile Miktar Tayini

Bölüm 3.2' de belirtildiği gibi NAR'ın miktar tayini HPLC yöntemi ile, metanol: su: formik asit (40:59,9:0,1) mobil fazı kullanılarak ve 285 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. NAR için alıkonma zamanı 11,2. dakika olarak bulunmuş olup analize ait HPLC kromatogramı Şekil 4.1'de verilmiştir.



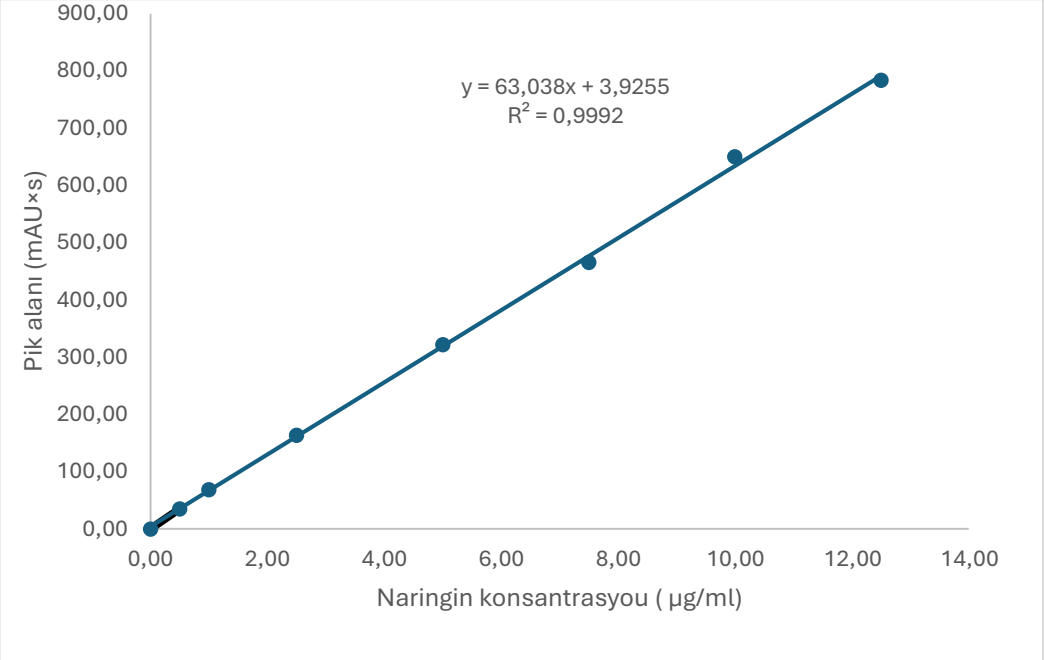
Şekil 4. 1. Naringin'in HPLC kromatogramı (10 µg/mL).

4.2. Analitik Yöntem Validasyonu

NAR için geliştirilen HPLC analiz yönteminin Bölüm 3.3'te belirtildiği gibi analitik validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş ve validasyon parametreleri belirlenmiştir.

4.2.1. Doğrusallık

NAR'ın validasyon çalışmaları doğrultusunda, doğrusallık kriterinin belirlenmesi için ICH kılavuzlarından yararlanılmıştır (139). Bunun için, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10 ve 12,5 µg/mL konsantrasyonlarında etkin madde piklerinin eğri altında kalan alanları HPLC cihazı ile tayin edilerek saptanmıştır. Elde edilen kalibrasyon doğrusu ve denklemi Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2. Naringin'in doğrusallık çalışmasından elde edilen kalibrasyon doğrusu grafiği (n=6).

Elde edilen verilerle oluşturulan grafikte kalibrasyon doğrusuna ait denklem y=63,038x+3,9255 olarak bulunmuştur. Doğrusal regresyon analizinde modelin uygunluğunu gösteren R^2 değeri 0,9992 olarak bulunmuş ve denklemin doğrusallığı doğrulanmıştır.

4.2.2. Doğruluk

NAR'ın validasyon çalışmaları kapsamında, doğruluk parametresinin belirlenmesi için, kalibrasyon çalışması içinde belirlenen konsantrasyon değerleri içinden düşük, orta ve yüksek olacak şekilde çözeltiler hazırlayarak, HPLC cihazı ile analiz yapılmıştır. Analitik validasyon rehberlerinde %VK %2'den daha küçük olması

gerektiği açıklanmıştır. Tablo 4.1'de görüldüğü üzere VK %2'nin altında bulunarak, yöntemin doğruluğu gösterilmiştir (139).

Tablo 4. 1. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait doğruluk ve geri kazanım sonuçları (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)	Varyasyon Katsayısı (%)
1	1,01	100,89	1,61
5	5,03	100,68	0,34
12,5	12,38	99,07	0,26

4.2.3. Kesinlik

NAR'ın 1, 5 ve 12,5 µg/mL konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltileri 6 ayrı kez HPLC cihazı ile ölçülmüştür. Elde edilen pik alanlarının ortalamaları, kalibrasyon doğrusu aracılığı ile hesaplanarak, hesaplanan konsantrasyon ve VK değerleri elde edilmiştir. Analitik validasyon rehberlerinde %VK'nin %2'den daha küçük olması gerektiği belirtilmiştir. Tablo 4.2'de görüldüğü üzere VK değerleri %2'nin altında bulunarak, yöntemin kesinliği gösterilmiştir (139).

Tablo 4.2**.** Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait kesinlik çalışması sonuçları (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
1	1,01	1,97
5	5,03	0,41
12,5	12,38	0,32

Tekrar Edilebilirlik

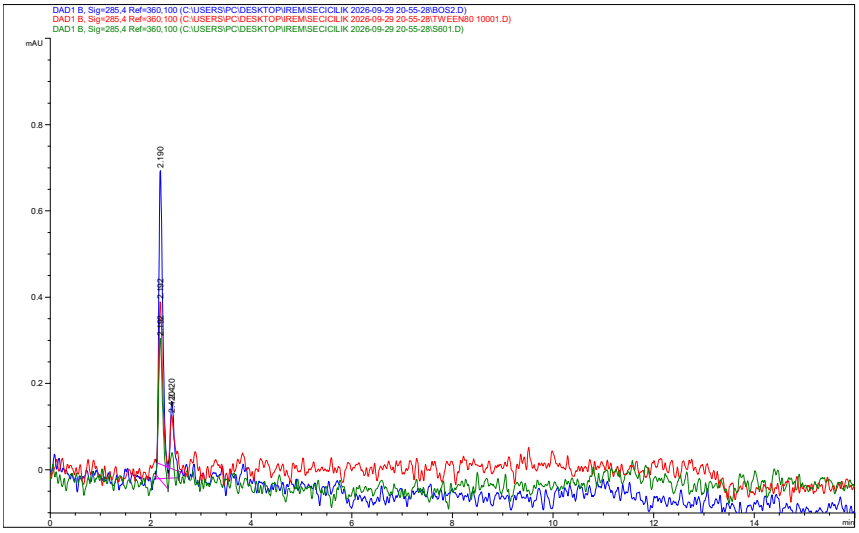
NAR'ın 1, 5 ve 12,5 µg/mL konsantrasyondaki çözeltilerinin, 3 gün boyunca arka arkaya 6 ayrı kez HPLC cihazı ile ölçülmesi elde edilen absorbans değerlerinin ortalaması kullanılarak, kalibrasyon doğrusunda gerekli hesaplamalar yapılarak, konsantrasyon ve varyasyon katsayısı değerleri elde edilmiştir. Analitik validasyon rehberlerinde %VK'nin %2'den daha küçük olması gerektiği açıklanmıştır. Tablo 4.3'te görüldüğü üzere VK değerleri %2'nin altında bulunarak, yöntemin tekrar edilebildiği gösterilmiştir (139).

Tablo 4.3. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonuna ait günler arası tekrar edilebilirlik sonuçları (n=6).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Varyasyon Katsayısı (%)
1	1,01	0,87
5	5,07	0,24
12,5	12,37	1,06

4.2.4. Özgüllük

NAR formülasyonunda kullanılan Span 60, Tween 80 gibi yardımcı maddelerin, HPLC cihazında yapılan değerlendirmelerinde, NAR'ın alıkonma zamanında (11.2. dk) herhangi bir pik vermedikleri gözlenmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Span 60, Tween 80 ve Boş spanlastik (plasebo) formülasyonuna ait HPLC analizinde elde edilen kromatogram görüntüsü (**Yeşil çizgi:** Span 60, **kırmızı çizgi:** Tween 80 **mavi çizgi:** Boş spanlastik (plasebo) formülasyonu).

4.2.5. Duyarlılık (LOD ve LOQ)

Yapılan çalışmalar sonucunda 0,5 µg/mL konsantrasyonda sinyal/gürültü oranı 27,6 olarak bulunmuştur. Saptama sınırı (LOD) için sinyal/gürültü oranı en az 3 olmalıdır. Çalışmada saptama sınırı 0,054 µg/mL olarak bulunmuştur. Miktar tayini sınırı (LOQ) için sinyal/gürültü oranı en az 10 olmalıdır. Çalışmada miktar tayini limiti 0,181 µg/mL olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgular yöntemin tespit edebileceği minimum konsantrasyonu ve yöntemin duyarlılığını göstermektedir.

4.2.6. Stabilite

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

Tablo 4.4. Naringin'in HPLC tayininde analitik yöntem validasyonunda stabilite çalışması sonuçları (n=6±SS).

Teorik Konsantrasyon (µg/mL)	Zaman (saat)	Ölçülen Konsantrasyon (µg/mL)	Geri Kazanım (%)
10	0	10,23±0,07	102,38±0,09
10	24	10,28±0,01	102,83±0,16
10	48	9,90±0,13	99,06±1,70

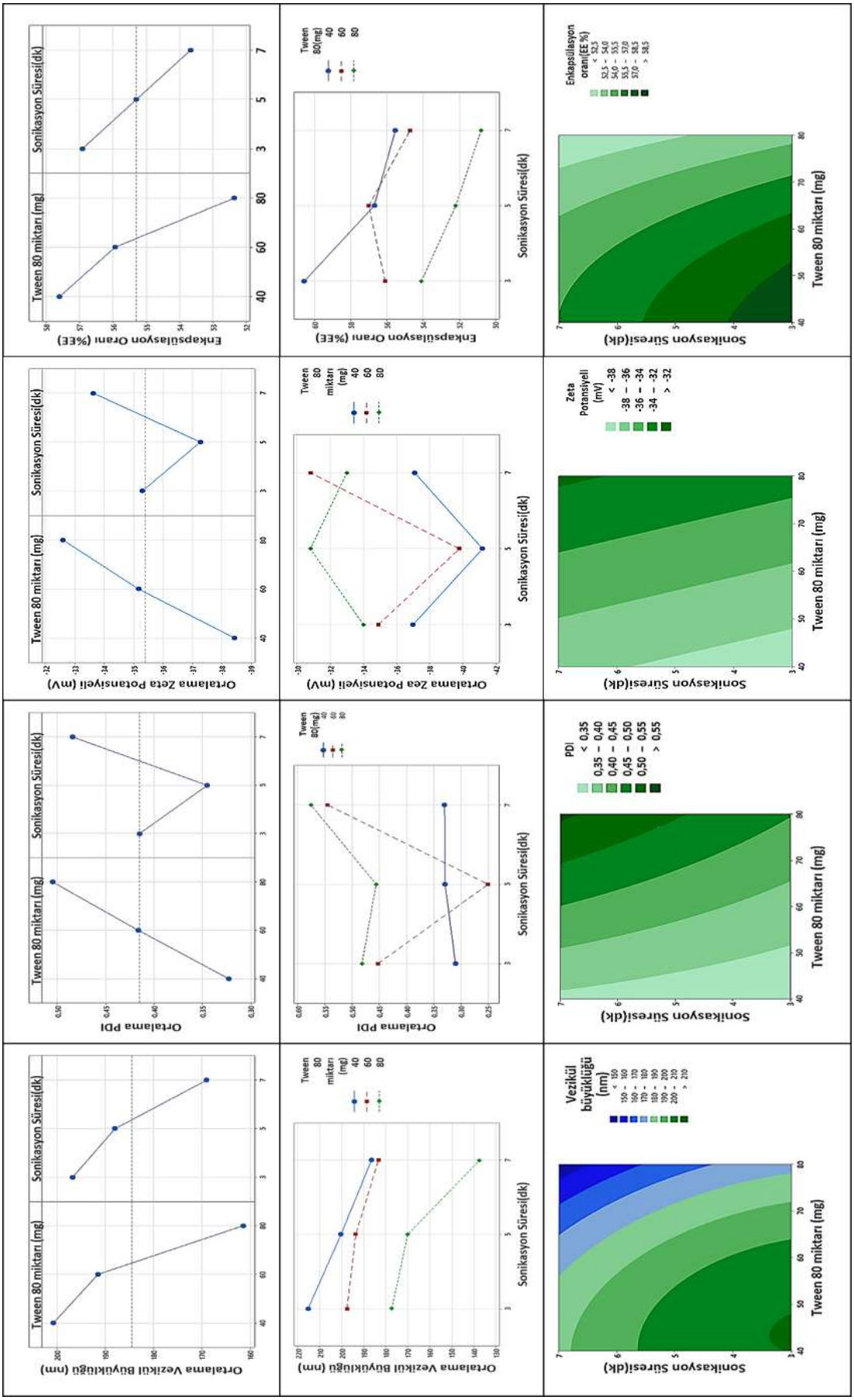
4.3. Formülasyon Çalışmaları

4.3.1. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonlarının Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları

Formülasyon değişkenlerinin NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının vezikül büyüklüğüne, zeta potansiyeline, enkapsülasyon oranına(%EE) ve PDI değerlerine etkisini belirlemek amacıyla Minitab® programı ile 9 tam faktöriyel tasarım gerçekleştirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir. Tüm gruplara ait bulgular Şekil 4.4 ve Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. Faktöriyel tasarım çalışmaları kapsamında hazırlanan naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının vezikül büyüklüğü, enkapsülasyon etkinliği (%EE), PDI ve zeta potansiyel değerleri (n=3).

Formülasyon	Vezikül Büyüklüğü (nm)	PDI	Zeta Potansiyel (mV)	%EE	Ort. %EE (Ort±SS)	Vezikül Büyüklüğü (nm) (Ort±SS)	Ort. PDI (Ort±SS)	Ort. Zeta Potansiyel (mV) (Ort±SS)
S1	212,7	0,303	-40,0	62,35	60,56±1,88	215,3±2,28	0,310±0,008	-37,0±2,79
	216,6	0,309	-36,4	58,60				
	216,7	0,319	-34,5	60,73				
S2	199,8	0,292	-41,2	57,80	56,70±1,04	200,3±1,38	0,329±0,046	-41,2±0,75
	201,9	0,315	-40,4	55,74				
	199,3	0,380	-41,9	56,56				
S3	180,8	0,316	-37,0	52,68	55,53±2,92	186,5±5,60	0,330±0,012	-37,1±1,30
	186,8	0,338	-38,4	55,40				
	192,0	0,335	-35,8	58,51				
S4	196,0	0,438	-36,4	54,89	56,10±1,26	197,6±1,43	0,453±0,023	-34,9±1,55
	198,8	0,442	-33,3	56,00				
	197,9	0,479	-35,0	57,41				
S5	199,5	0,240	-39,8	57,00	57,00±1,40	193,6±7,45	0,250±0,010	-39,8±0,65
	196,0	0,260	-40,4	58,40				
	185,2	0,250	-39,1	55,60				
S6	181,3	0,538	-31,0	52,00	54,72±3,57	183,3±2,90	0,546±0,026	-30,8±1,81
	181,9	0,575	-28,9	53,40				
	186,6	0,525	-32,5	58,76				
S7	183,5	0,355	-36,8	53,00	54,10±1,06	177,2±5,61	0,489±0,117	-34,0±2,75
	175,2	0,544	-33,8	55,12				
	172,8	0,568	-31,3	54,18				
S8	176,3	0,365	-31,4	50,23	52,20±1,72	170,0±7,17	0,456±0,151	-30,8±0,71
	171,5	0,373	-30,9	53,40				
	162,2	0,631	-30,0	52,97				
S9	139,2	0,522	-33,8	48,70	50,80±2,16	137,3±2,01	0,576±0,049	-33,0±0,71
	135,2	0,589	-32,4	50,69				
	137,6	0,618	-32,9	53,01				



Şekil 4. 4. Faktöriyel tasarım kapsamında Tween 80 miktarının (mg) ve sonikasyon süresinin (dk) vezikül boyutu, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve PDI üzerindeki ana etki ve etkileşim grafikleri.

Beyin tümörlerinin tedavisine yönelik geliştirilen NEİTS'lerin partikül büyüklüğü ve zeta potansiyeli, formülasyonların fizikokimyasal özelliklerini ve biyolojik ortamdaki davranışlarını etkileyen önemli parametreler arasında yer almaktadır. Özellikle 200 nm'nin altındaki partikül büyüklükleri, bu sistemlerin sistemik dolaşımdaki davranışları ve tümör dokusuna taşınma potansiyelleri açısından üstünlük sağlayabilmektedir. Bununla birlikte, küçük partikül büyüklüğü tek başına KBB'nin aşılmasını veya retiküloendotelyal sistem tarafından uzaklaştırılmanın önlenmesini garanti etmemekte; partikül boyutu dağılımı, yüzey özellikleri ve taşıyıcı sistemin yapısı da bu süreçlerde belirleyici rol oynamaktadır (21, 153).

Faktöriyel tasarım kapsamında geliştirilen dokuz farklı NAR yüklü spanlastik formülasyonuna ait karakterizasyon sonuçları birlikte değerlendirilmiştir. S2 kodlu formülasyon, -41,2±0,75 mV zeta potansiyeli ile geliştirilen formülasyonlar arasında mutlak değerce en yüksek yüzey yüküne sahip olması ve %56,70±1,04 ile yüksek %EE değeri göstermesi nedeniyle seçilmiştir. S9 kodlu formülasyon ise 137,3±2,013 nm vezikül büyüklüğü ile küçük boyutlu formülasyonların elde edilmesi bakımından üstünlük göstermiştir. Bununla birlikte, S9 formülasyonunun PDI değerinin 0,576±0,049 olması, vezikül boyutu dağılımının daha heterojen olduğunu ortaya koymuştur; bu formülasyonda %EE değeri de %50,80±2,16 ile dokuz formülasyon arasındaki en düşük düzeyde bulunmuştur.

S5 kodlu formülasyonda vezikül büyüklüğü 193,6±7,45 nm, PDI değeri 0,250±0,010, zeta potansiyel değeri -39,8±0,65 mV ve %EE değeri %57,00±1,40 olarak belirlenmiştir. Vezikül büyüklüğünün 200 nm'nin altında olması, dokuz formülasyon arasında en düşük PDI değerine sahip olması ve yüksek mutlak zeta potansiyeli göstermesi ve 200 nm'nin altında vezikül büyüklüğüne sahip formülasyonlar arasında en yüksek %EE değerini sunması, S5 formülasyonunun fizikokimyasal özellikler bakımından uygun bir profil sergilediğini ortaya koymuştur. Özellikle düşük PDI değeri, vezikül boyutu dağılımının daha homojen olduğunu gösterirken, yüksek mutlak zeta potansiyeli elektrostatik itme kuvvetleri aracılığıyla kolloidal stabiliteye katkı sağlayabilecek bir özellik olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle S2, S5 ve S9 kodlu

formülasyonlar seçilerek, ileri in vitro salım, elastikiyet analizi, fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda optimum formülasyon (S5 kodlu formülasyon) belirlenmiş ve optimum formülasyon üzerinde ilave çalışma olarak FTIR analizi, morfolojik değerlendirme ve hücre kültürü çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Optimum formülasyon olarak belirlenen S5 formülasyonu NAR yüklü olduğundan bu formülasyonun etkin madde içermeyen şekli (aynı yöntem ve hazırlama parametreleri ile) de hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Bu formülasyonlara ait ortalama vezikül büyüklüğü, PDI ve zeta potansiyeli değerleri ölçülmüş ve Tablo 4.6'da sunulmuştur.

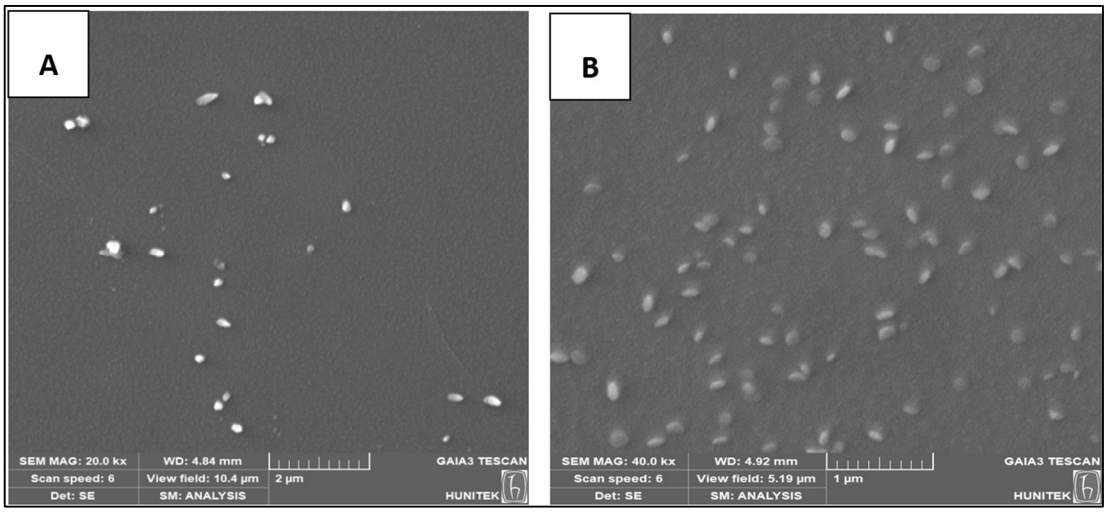
Tablo 4.6. Naringin içeren (dolu, S5) ve içermeyen (boş) spanlastik formülasyonlarına ait karakterizasyon bulguları (n=3, x ± SS).

Formülasyon	Vezikül Boyutu (nm) (Ort±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta Potansiyeli (mV) (Ort±SS)
Boş spanlastik	127±0,2646	0,305±0,012	-41,4±1,35
Dolu spanlastik	193,6±7,45	0,250±0,010	-39,8±0,65

Tablo 4.6'dan da görüleceği üzere formülasyonlara NAR eklenmemesinin vezikül büyüklüğünü istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşürerek 193,6±7,45 nm'den 127±0,2646 nm'ye düşürdüğü bağımsız örneklemler t-testi ile tespit edilmiştir ($p < 0.0001$).

4.3.2. Morfolojik Değerlendirme

Hazırlanan boş ve dolu (S5 kodlu) spanlastik formülasyonlarının yüzey ve şekil özellikleri SEM görüntüleri ile değerlendirilmiştir (Şekil 4.5.)

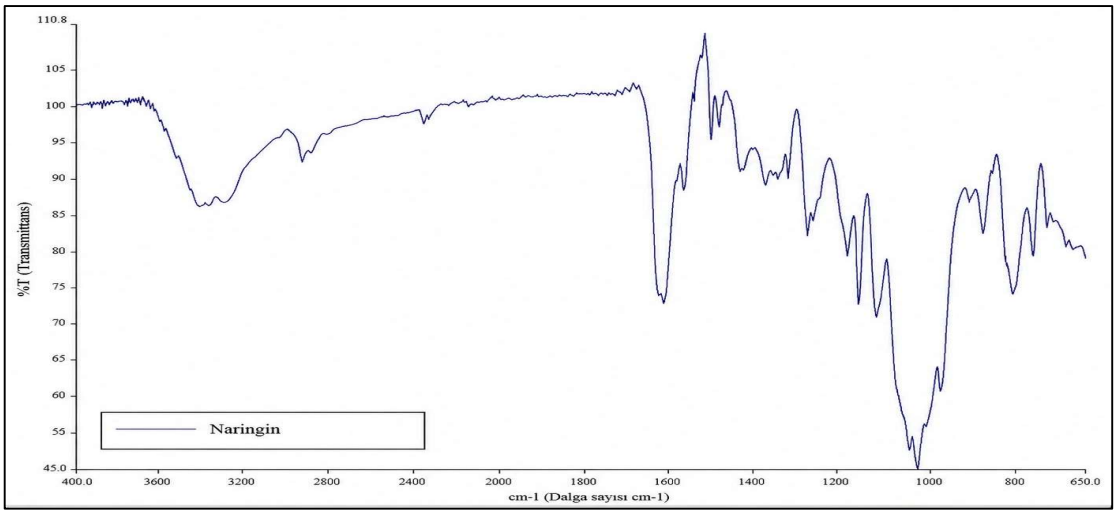


Şekil 4.5. Spanlastik formülasyonlarına ait SEM görüntüleri (A: Boş spanlastik formülasyonu, B: NAR yüklü spanlastik formülasyonu).

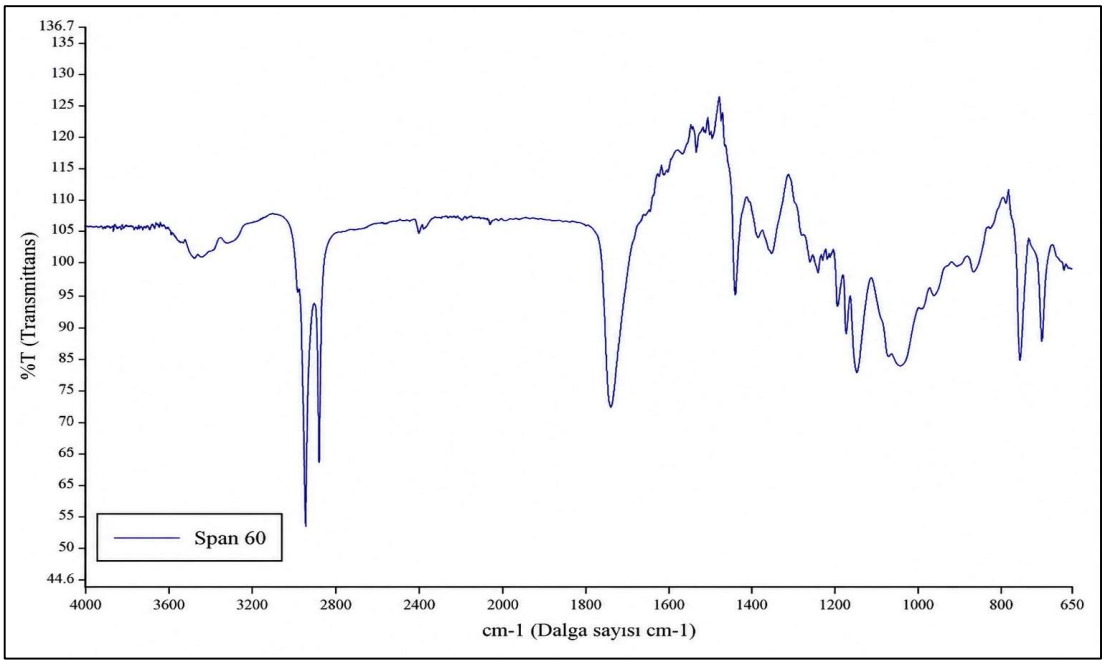
4.3.3. FTIR Spektroskopisi Analizi Bulguları

Saf NAR, Span 60, Tween 80 ile boş ve NAR yüklü spanlastik formülasyonuna (S5) ait FTIR spektrumları karşılaştırıldığında, bileşenlerin karakteristik absorbsiyon bantlarında bazı değişiklikler gözlenmiştir. Saf NAR spektrumunda yaklaşık 3200–3500 cm^{-1} aralığında O–H gerilme titreşimlerine ait geniş bant ile 1600–1650 cm^{-1}'de konjuge karbonil (C=O) gerilme titreşimleri ve 1520–1590 cm^{-1} aromatik C=C titreşimleri ile ilişkili karakteristik bantlar belirlenmiştir. Span 60 ve Tween 80 spektrumlarında ise yaklaşık 2850-2920 cm^{-1} bölgelerinde alifatik C–H gerilme

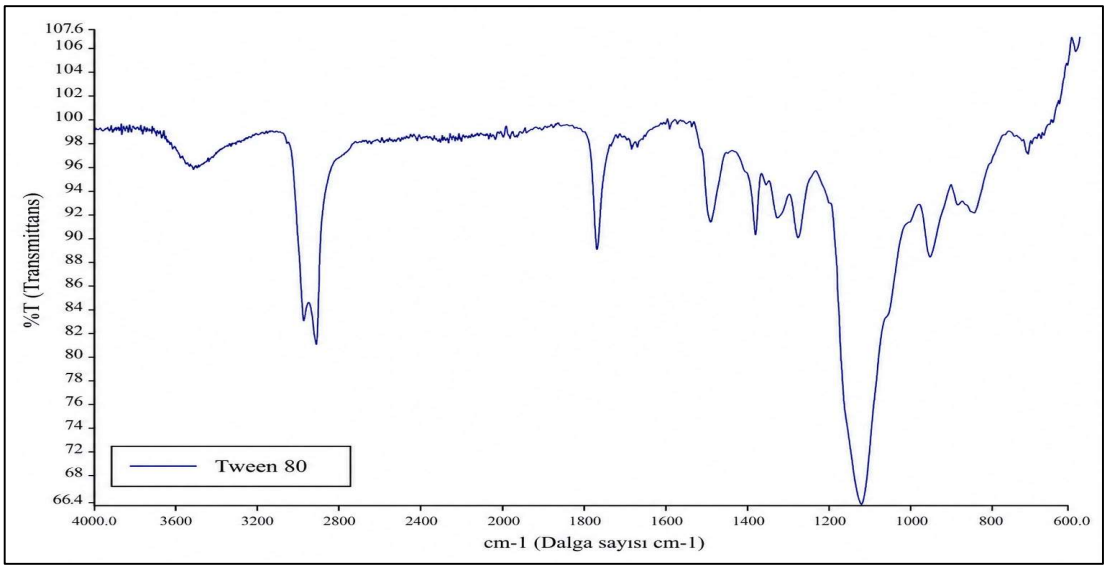
titreşimleri, 1734–1737 cm^{-1} aralığında ester gruplarına ait C=O gerilme titreşimleri gözlenmiştir (154, 155).



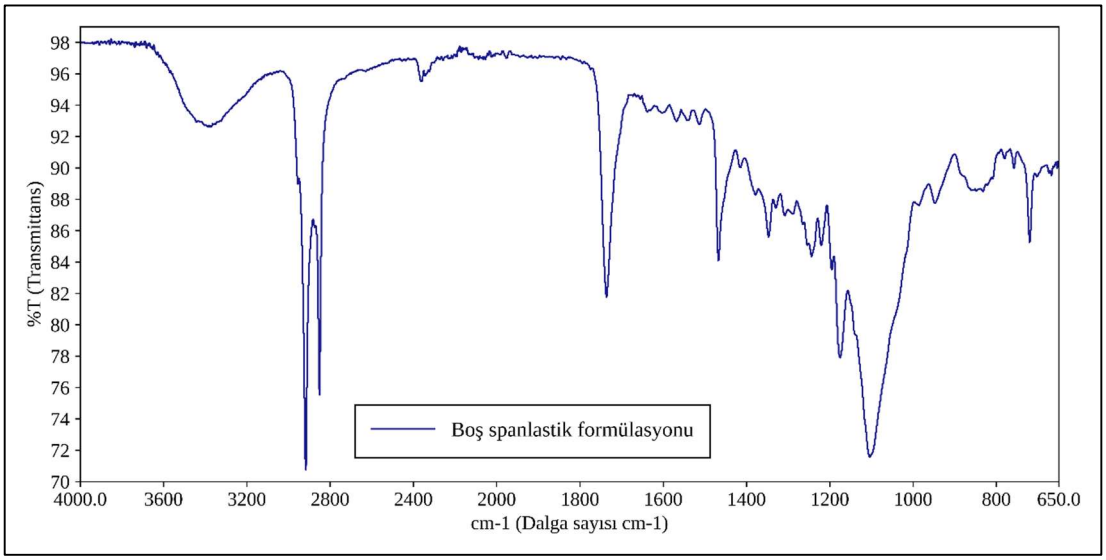
Şekil 4. 6. Naringin'in FTIR spektrumu.



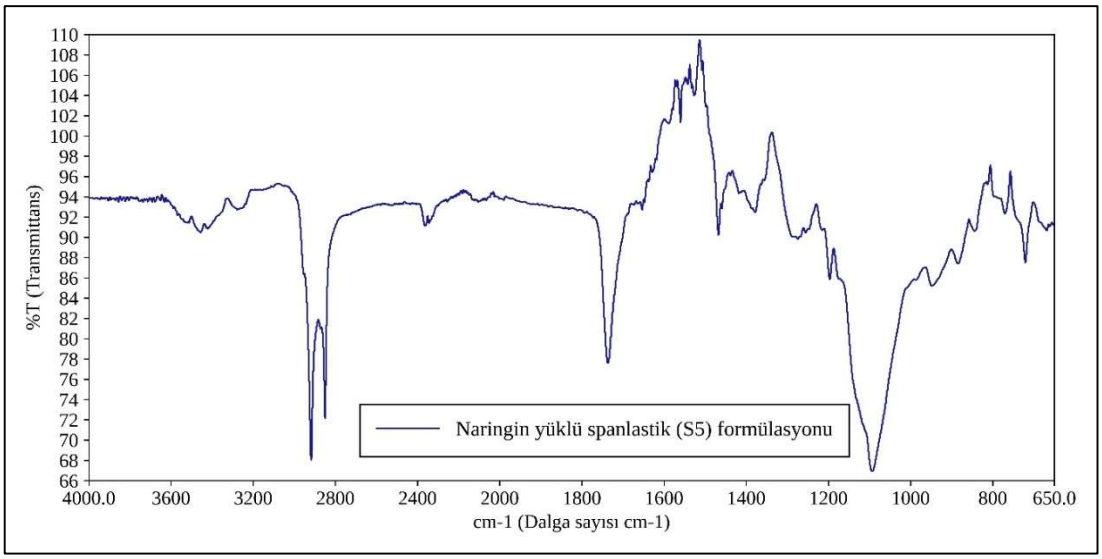
Şekil 4. 7. Span 60'ın FTIR spektrumu.



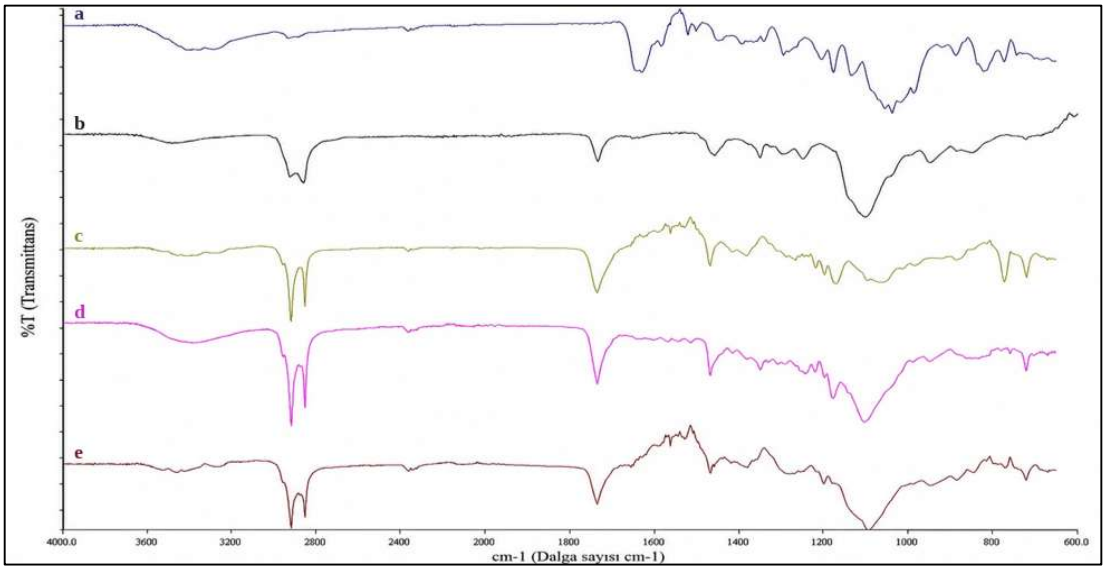
Şekil 4. 8. Tween 80'in FTIR spektrumu.



Şekil 4.9. Boş spanlastik formülasyonu FTIR spektrumu.



Şekil 4.10. Naringin yüklü spanlastik(S5) formülasyonu FTIR spektrumu.

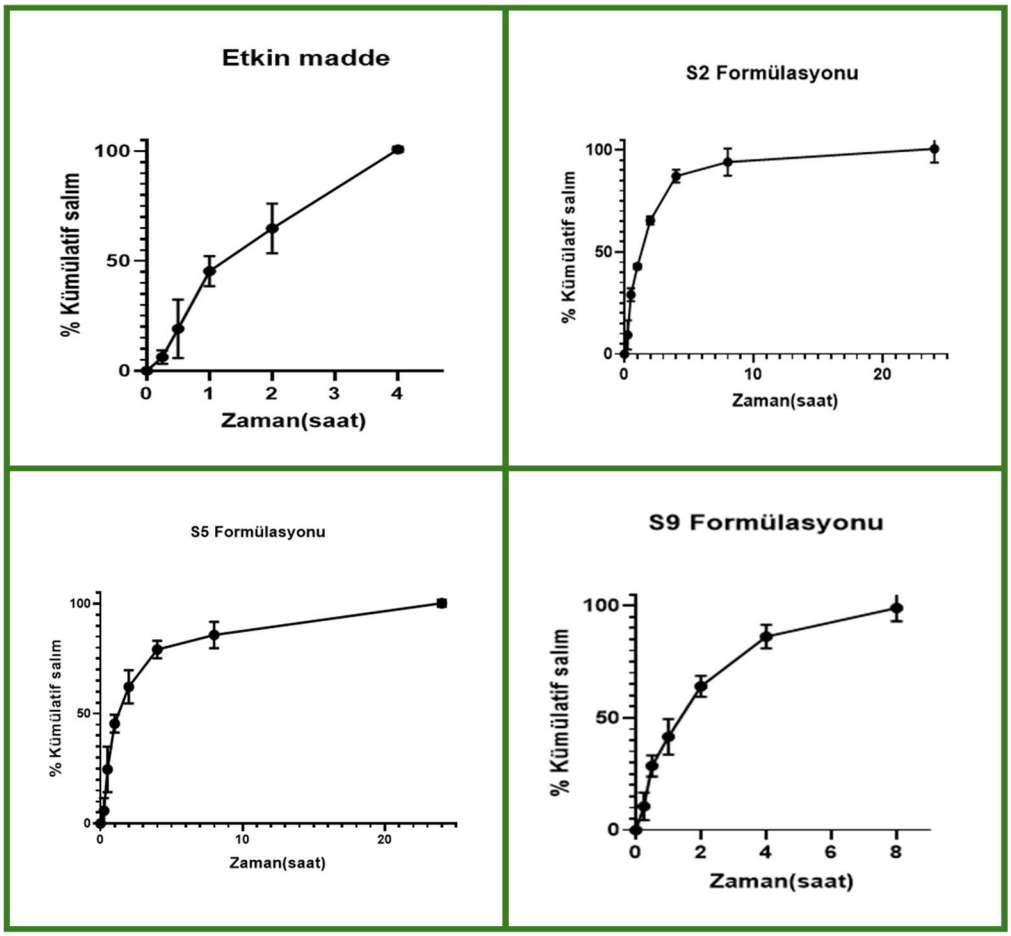


Şekil 4.11. Naringin, Span 60, Tween80, boş spanlastik formülasyonu ve Naringin yüklü spanlastik (S5) formülasyonunun FTIR spektrumu (**a:** Naringin, **b:** Tween80, **c:** Span60, **d:** Boş spanlastik formülasyonu, **e:** Naringin yüklü spanlastik(S5 kodlu formülasyon).

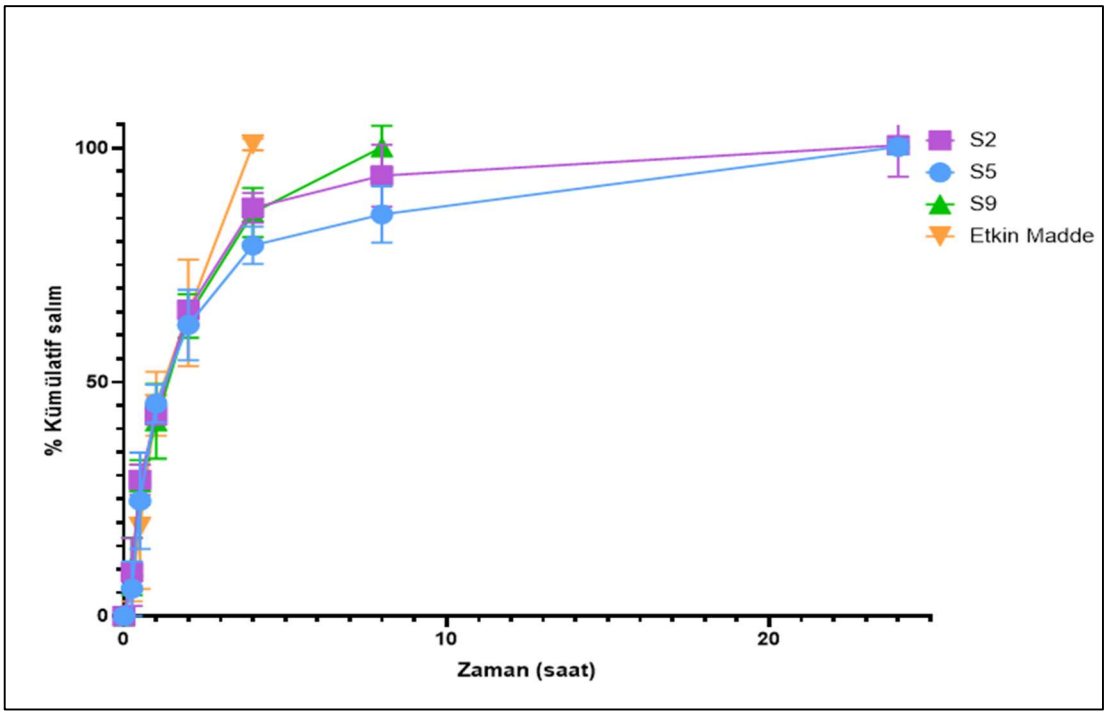
4.3.4. Naringin Yüklü Spanlasik Formülasyonlarının İlaç Yükleme Etkinliği ve *İn Vitro* İlaç Salımı

NAR yüklü spanlastik formülasyonlarına (S2, S5, S9) ait ilaç yükleme etkinliği değerleri hesaplanmıştır. Bunun sonucunda, a) S2 kodlu formülasyon için; NAR yükleme kapasitesi %3,89±0,06 ve enkapsülasyon etkinliği %56,70±1,04, b) S5 kodlu formülasyon için; NAR yükleme kapasitesi %3,44±0,17 ve enkapsülasyon etkinliği %57 ± 1,40 ve c) S9 kodlu formülasyon için; NAR yükleme kapasitesi %2,74± 0,05 ve enkapsülasyon etkinliği %50,80±2,16 olarak bulunmuştur.

Geliştirilen NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının (S2, S5, S9) in *vitro* ilaç salım profilleri, fosfat tamponunda (PBS, pH 7,4) diyaliz membranı yöntemi ile incelenmiştir (Şekil 4.12.).



Şekil 4. 12. Naringin yüklü spanlastik formülasyonları ve etkin maddenin in vitro kümülatif salım profilleri (n=6, x ± SS).



Şekil 4. 13. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarına ve etkin maddeye ait in vitro kümülatif salım profillerinin karşılaştırmalı grafiği (n=6, x ± SS).

İn vitro salım çalışmalarında, saf etkin maddenin 4. saat sonunda tamamen çözündüğü, S9 numaralı spanlastik formülasyonundan NAR salımının 8. saatte tamamlandığı görülmüştür. Buna ilaveten, S5 ve S2 numaralı spanlastik formülasyonlarında NAR salımının 24 saatte tamamlandığı tespit edilmiştir.

Vezikül büyüklüğü, polidispersite indeksi, zeta potansiyeli, enkapsülasyon etkinliği, deformabilite indeksi ve in vitro salım bulguları birlikte değerlendirildiğinde, S5 kodlu formülasyon hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere seçilmiştir.

4.3.5. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları

Spanlastik formülasyonlarının (S2, S5 ve S9) esnekliklerini ve dar gözeneklerden biçim değiştirerek geçebilme yeteneklerini değerlendirmek amacıyla deformabilite indeksleri (DI) belirlenmiş olup Tablo 4.7'de sunulmuştur.

Tablo 4.7. Naringin yüklü spanlastik formülasyonlarının DI değerleri.

Formülasyon	Span 60 Miktarı (mg)	Tween 80 miktarı (mg)	Ekstrüzyon öncesi P.B. (nm)	Ekstrüzyon sonrası P.B. (nm)	Deformabilite indeksi (DI, mg/s)
S2	100	40	200,3±1,380	128,43±2,281	2,47
S5	100	60	193,6±7,45	100,51±1,941	4,01
S9	100	80	137,3±2,013	79,78±14,65	5,22

Formülasyonların deformabilite indeksleri incelendiğinde, S2, S5 ve S9 formülasyonları için sırasıyla 2,47, 4,01 ve 5,22 mg/s değerleri elde edilmiştir. Tween 80 miktarının 40 mg'dan 80 mg'a yükselmesiyle birlikte deformabilite indeksinin arttığı ve en yüksek değerin S9 formülasyonunda elde edildiği belirlenmiştir.

Ekstrüzyon öncesinde S2, S5 ve S9 formülasyonlarının vezikül boyutları sırasıyla 200,3±1,380, 193,6±7,45 ve 137,3±2,013 olarak ölçülürken, ekstrüzyon sonrasında bu değerlerin sırasıyla 128,43 ± 2,281 nm, 100,51 ± 1,941 nm ve 79,78 ± 14,65 nm'ye düştüğü saptanmıştır.

4.4. Formülasyonların Sterilizasyonu

Beyin tümörü tedavisinde kullanım amacıyla geliştirilen optimum spanlastik formülasyonunun (S5) mikrobiyolojik açıdan uygunluğunu değerlendirmek üzere gerçekleştirilen sterilite testi sonuçları, 14 günlük inkübasyon süresinin sonunda incelenmiştir.

Testin çalışabilirliğini ve geçerliliğini doğrulamak amacıyla kurulan kontrol grupları değerlendirildiğinde; *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun inoküle edildiği pozitif kontrol tüplerinde hem sıvı tiyoglikolat hem de tryptic soy broth besiyerlerinde beklenen mikrobiyal üremeyi işaret eden hücresel çoğalma ve bulanıklık gözlenmiştir. Herhangi bir inokülasyon işleminin yapılmadığı negatif kontrol tüplerinde ise hiçbir mikrobiyal üreme veya bulanıklık saptanmamıştır.

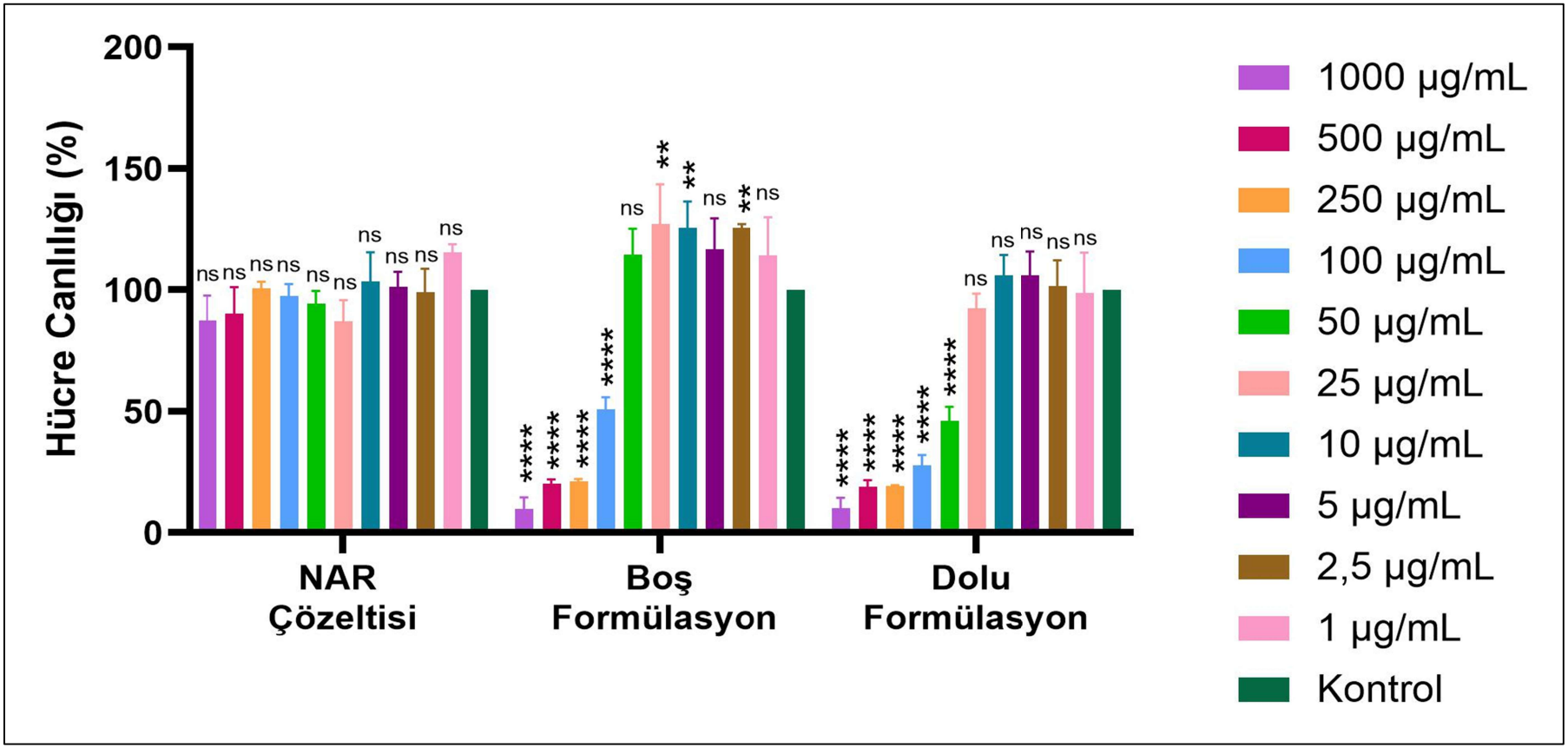
S5 formülasyonundan alınan 1 mL'lik numunelerin inoküle edildiği ve sırasıyla 35°C (sıvı tiyoglikolat) ve 25°C'de (tryptic soy broth) 14 gün boyunca inkübe edildiği test tüplerinin hiçbirinde mikrobiyal üreme belirtisine rastlanmamıştır.

4.5. Hücre Kültürü Çalışmaları

NAR çözeltisi, boş formülasyon (etkin madde içermeyen S5) ve optimum formülasyonun (S5) RG2 hücreleri üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkisini gösteren hücre canlılığı değerleri Tablo 4.8 ve Şekil 4.14'te gösterilmiştir.

Tablo 4. 8. Naringin çözeltisi, boş spanlastik formülasyonu (etkin madde içermeyen S5) ve optimum spanlastik formülasyonun (S5) sitotoksite bulguları (24. saat) (n=3).

Konsantrasyon (µg/mL)	NAR çözeltisi (% Canlılık) (Ort±SS)	Boş Spanlastik Formülasyonu (% Canlılık) (Ort±SS)	Dolu Spanlastik Formülasyonu (% Canlılık) (Ort±SS)
1	115,37 ± 3,5	114,30 ± 15,7	98,60 ± 16,68
2,5	99,19 ± 9,59	125,57 ± 1,6	101,71 ± 10,45
5	101,37 ± 6,09	116,64 ± 12,88	106,13 ± 9,66
10	103,38 ± 12,11	125,63 ± 10,86	106,12 ± 8,36
25	87,12 ± 8,7	127,16 ± 16,38	92,57± 5,89
50	94,48 ± 5,11	114,38 ± 10,85	46,24 ± 5,58
100	97,39 ± 5,11	50,95 ± 4,9	27,72 ± 4,28
250	100,50 ± 2,89	21,04 ± 1,10	19,23± 0,32
500	90,19 ± 10,94	20,08 ± 1,9	18,82 ± 2,89
1000	87,38 ± 10,31	9,85 ± 4,7	10,05±4,29



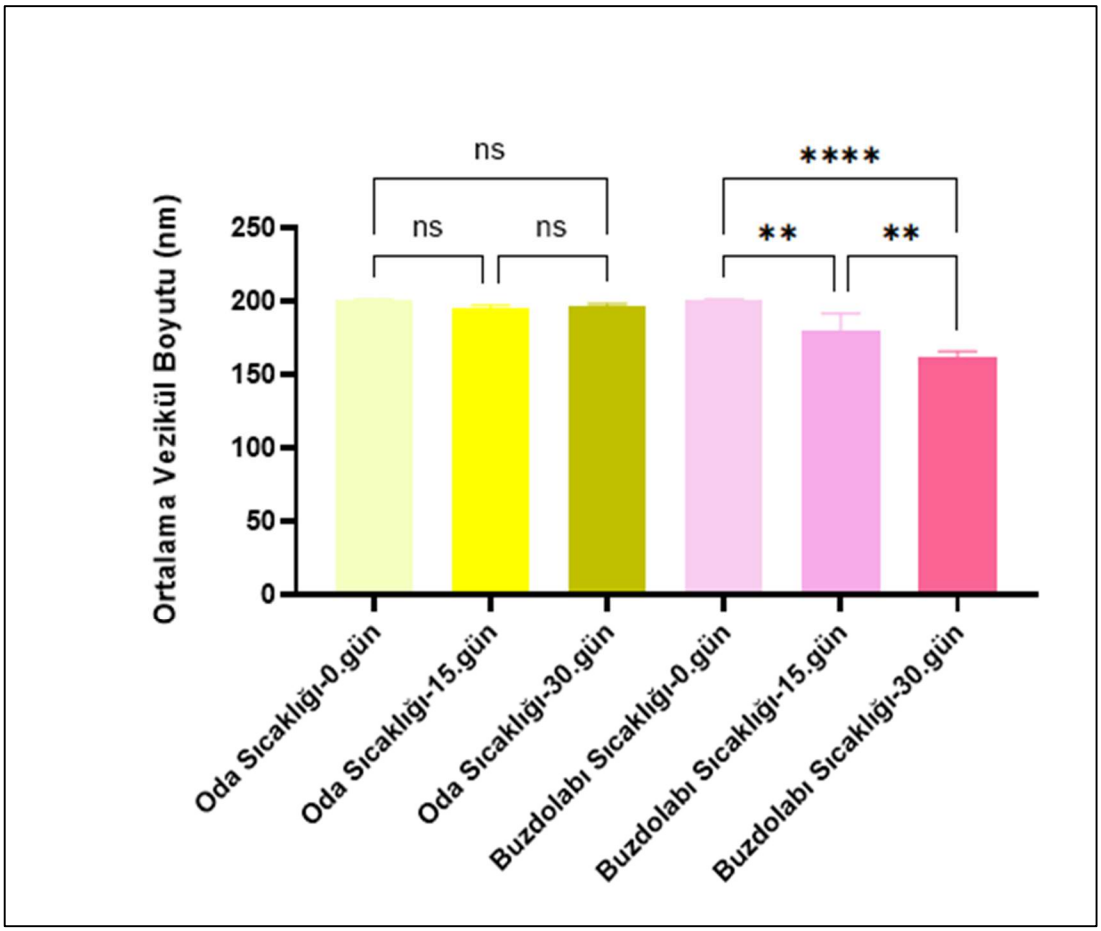
Şekil 4. 14. RG2 hücre hattı kullanılarak üç formülasyon grubu (Naringin çözeltisi, boş ve dolu spanlastik formülasyonları) ile gerçekleştirilen in vitro hücre canlılığı çalışması. (n=3, X̄±SS). *Dunnet* çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirilmiş olup anlamlılık ns=anlamlı değil, *=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 ve ****=p<0,0001 olarak gösterilmiştir.

4.6. Stabilite Çalışmaları

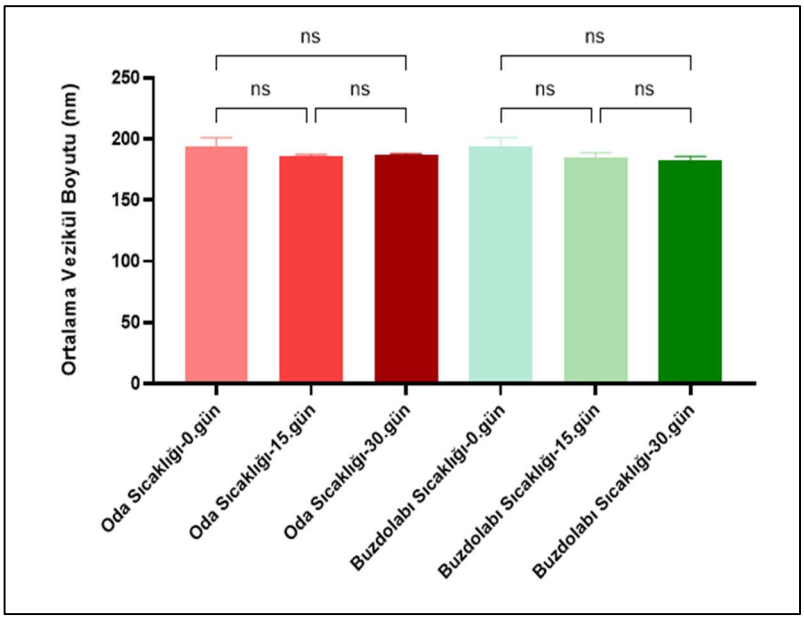
Hazırlanan spanlastik formülasyonlarının (S2, S5 ve S9) fiziksel stabilite çalışmaları, formülasyonların saklama süreçleri boyunca davranışlarını gözlemlemek üzere 25°C ± 2°C sıcaklık ve %60 ± %5 bağıl nem oda koşulları sıcaklığı ve 4 °C ± 2°C buzdolabı sıcaklığı olmak üzere iki farklı saklama koşulunda gerçekleştirilmiştir. Bir ay boyunca yürütülen stabilite çalışmasında, numunelerden 0, 15 ve 30. günlerde örnekler alınarak distile su ile 1:10 oranında olacak şekilde seyreltilerek ortalama vezikül boyutu, PDI ve zeta potansiyel değerlerinin tespiti için ölçümler yapılmıştır. Ölçüm sonuçları gösterilmiştir (Tablo 4.9.).

Tablo 4. 9. Spanlastik formülasyonlarının farklı saklama koşullarındaki stabilite verileri (n=3).

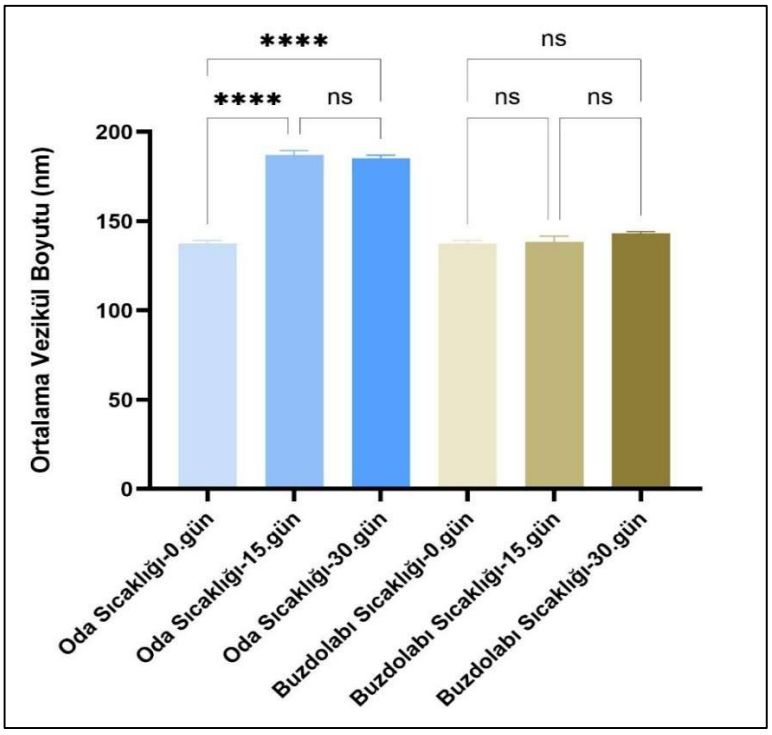
Formülasyon	Saklama Koşulu	Süre (gün)	Vezikül Boyutu (nm) (Ort±SS)	PDI (Ort±SS)	Zeta Potansiyel (mV) (Ort±SS)
S2	Başlangıç bulguları	0	200,3±1,380	0,329±0,046	-41,2±0,75
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	15	194,9±2,22	0,268±0,044	-30,1±2,76
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	30	196,6±1,861	0,310±0,043	-28±1,16
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	15	180,4±11,31	0,349±0,091	-28,9±0,954
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	30	162,4±3,496	0,347±0,046	-25,4±0,624
S5	Başlangıç bulguları	0	193,6±7,454	0,250±0,010	-39,8±0,65
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	15	185,4±1,861	0,242±0,091	-37,2±2,20
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	30	186,86±1,343	0,222±0,010	-37,2±5,13
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	15	184,63±4,140	0,228±0,102	-39,1±1,06
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	30	182,37±3,496	0,259±0,034	-39,4±1,66
S9	Başlangıç bulguları	0	137,3±2,013	0,576±0,049	-33,0±0,709
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	15	187±2,594	0,369±0,010	-30,7±0,985
	Oda Koşulları (25°C ± 2°C ve %60 ± %5 bağıl nem)	30	185,3±1,732	0,295±0,012	-15,5±0,351
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	15	138,4±3,247	0,549±0,108	-32,8±1,05
	Buzdolabı (4 °C ± 2°C)	30	143,1±1,044	0,572±0,008	-32,2±0,569



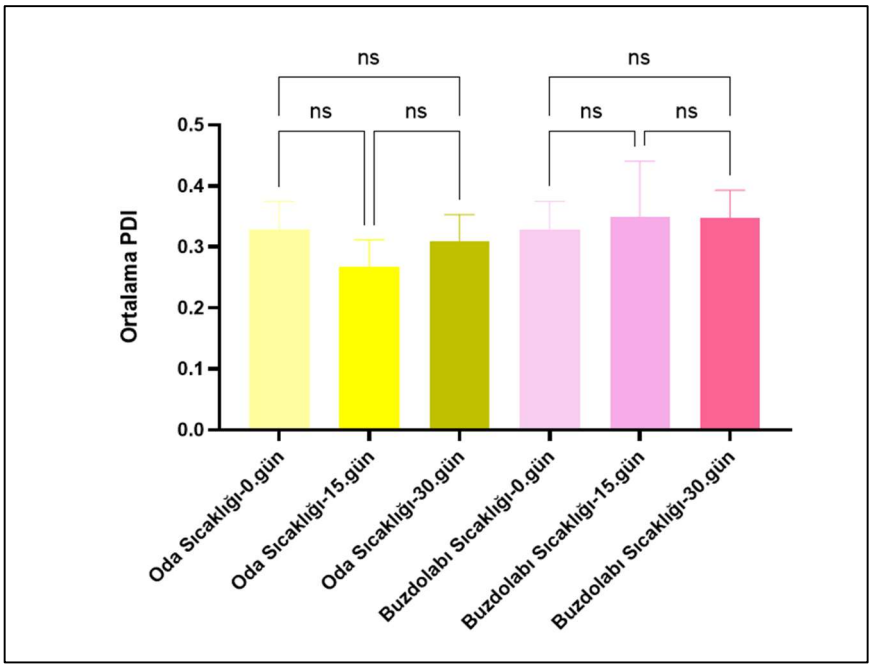
Şekil 4.15. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonun ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, **p<0,01, ****p<0,0001;ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA).



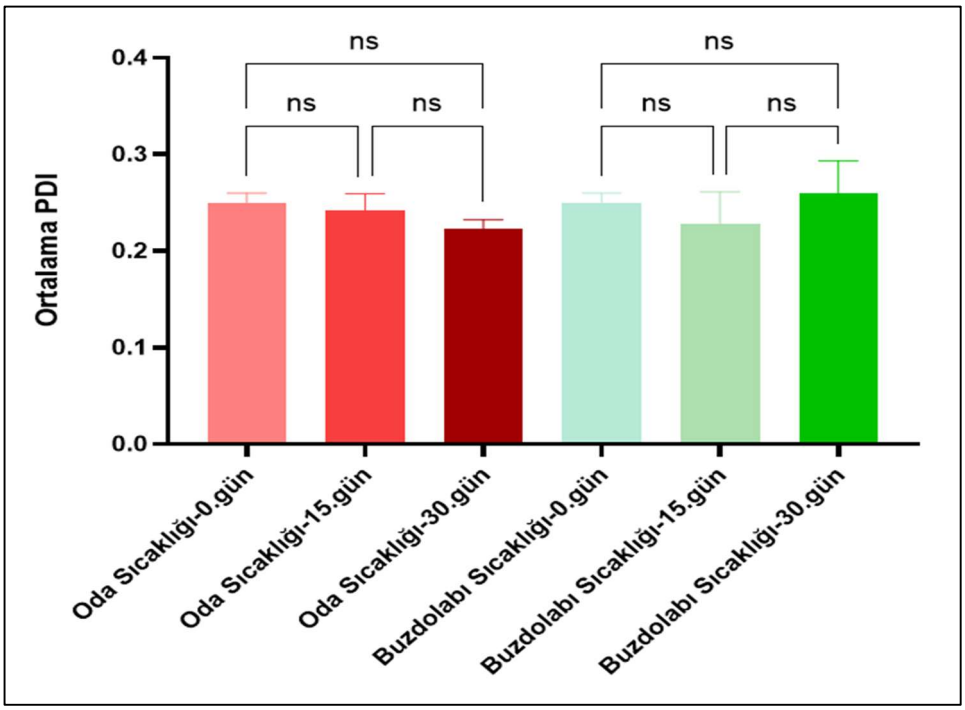
Şekil 4.16. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA).



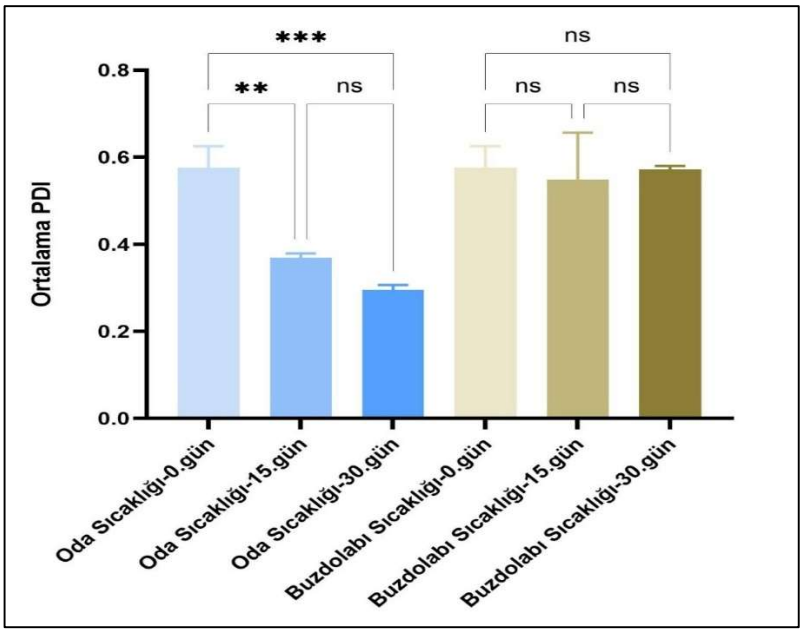
Şekil 4.1711. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının ortalama vezikül büyüklüğü değerleri (n=3, ****p<0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA).



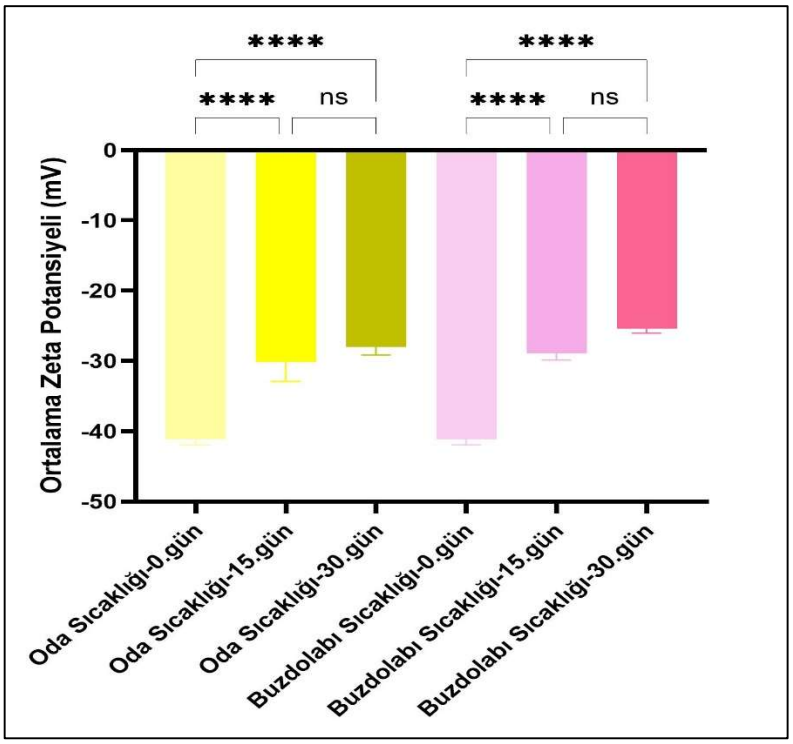
Şekil 4.1812. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA)



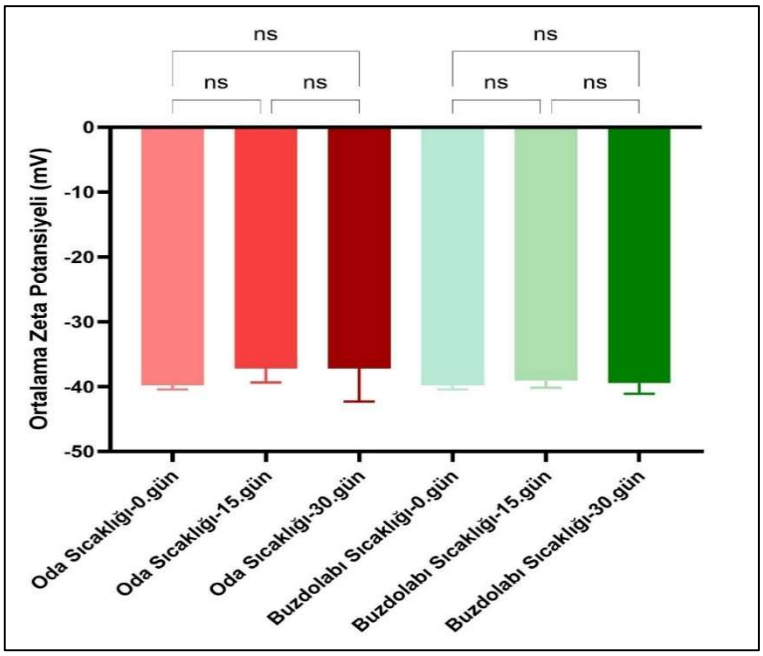
Şekil 4.19. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA)



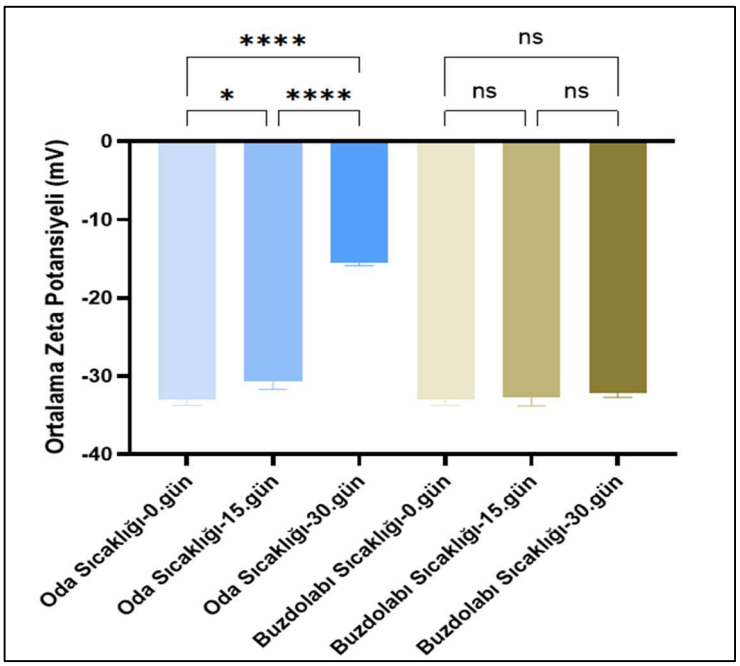
Şekil 4.20. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının PDI değerleri (n=3, **p< 0,01, ***p< 0,001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA)



Şekil 4.21. Farklı saklama koşullarında saklanan S2 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, ****p< 0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA)



Şekil 4.22. Farklı saklama koşullarında saklanan S5 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p> 0.05, Tek Yönlü ANOVA)



Şekil 4.23. Farklı saklama koşullarında saklanan S9 kodlu spanlastik formülasyonlarının zeta potansiyel değerleri (n=3, *p<0,05, ****p<0,0001; ns: istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir, p>0,05, Tek Yönlü ANOVA)

5. TARTIŞMA

Beyin tümörleri, yüksek morbidite ve mortalite oranları nedeniyle dünya genelinde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır (39). Beyin tümörleri arasında, güçlü invazivlik, yüksek nüks oranı ve kötü prognoz özelliklerine sahip olan GBM, tüm malign MSS tümörlerinin %51,5'ini oluşturarak en yaygın tür olma özelliğine sahiptir (3).

GBM tedavisinde standart yaklaşım, maksimum güvenli cerrahi rezeksiyonun ardından radyoterapi ve TMZ temelli kemoterapinin uygulanmasını içermektedir. Cerrahi, beyin tümörleri için ilk tercih edilen tedavi yöntemi olmasına karşın, tümörün invaziv yapısı ve belirsiz sınırları tümörün tamamen çıkarılmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca, ameliyat sonrası nüks oranı %90'ın üzerindedir (156). Bu nedenle, ameliyat sonrası kemoterapi ve radyoterapi uygulanması beyin tümörleri için standart tedavi haline gelmiştir. Ancak yine de tümörün infiltratif yapısı nedeniyle tamamen uzaklaştırılamaması, kemoterapötik ilaçlara karşı gelişen direnç ve sistemik toksisite tedavi başarısını önemli ölçüde sınırlandırmaktadır (156, 157). Ayrıca KBB ve KTB, terapötik maddelerin tümör bölgesine yeterli konsantrasyonlarda ulaşmasını güçleştirmektedir (158). Bu nedenlerle, mevcut tedavi yaklaşımlarına rağmen GBM hastalarında ortalama sağ kalımın yaklaşık 16–18 ay ile sınırlı kalması, daha etkili tedavi stratejilerine duyulan ihtiyacı ortaya koymaktadır (4, 7, 158).

NAR, başta turunçgil meyveleri olmak üzere çeşitli bitkisel kaynaklarda bulunan, flavanon glikozit yapısında doğal bir polifenolik bileşik olup antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser özellikleri nedeniyle son yıllarda dikkat çekmektedir. NAR'ın antitümör etkilerinin, apoptozun indüklenmesi ve kanser gelişiminde rol oynayan çeşitli hücresel sinyal yolaklarının düzenlenmesiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir (33). Bununla birlikte, NAR'ın sudaki düşük çözünürlüğü, sınırlı membran geçirgenliği ve yüksek derecede metabolizasyona uğraması, biyoyararlanımını ve terapötik potansiyelini önemli ölçüde sınırlandırmaktadır. NAR'ın oral biyoyararlanımının yaklaşık %5–9 düzeyinde olduğu bildirilmiştir (159). Ayrıca KBB'nin seçici geçirgen

yapısı, NAR'ın beyin dokusuna yeterli miktarda ulaştırılması açısından ilave bir engel oluşturmaktadır (14).

NAR'ın biyofarmasötik sınırlılıklarının aşılması ve beyin tümörlerinin tedavisine yönelik alternatif bir ilaç taşıyıcı sistem geliştirilmesi amacıyla, bu tez çalışmasında NAR yüklü spanlastik formülasyonları geliştirilmiştir. Spanlastikler, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler ve kenar aktivatörlerinden oluşan, yüksek esneme (deformasyon) kabiliyetine sahip nanoveziküler sistemlerdir. Bu sistemler, etkin maddelerin enkapsülasyonuna olanak sağlayarak çözünürlük, stabilite ve salım özelliklerinin iyileştirilmesi açısından önemli üstünlükler sunmaktadır (20, 27, 28). Spanlastiklerin yapısında kullanılan Span 60, lipofilik karakteri ve nispeten yüksek faz geçiş sıcaklığı sayesinde veziküler membranın oluşumuna ve yapısal bütünlüğünün korunmasına katkı sağlarken, kenar aktivatörü olarak kullanılan Tween 80, membranın düzenli yapısını değiştirerek esnekliğini artırmaktadır. Bu özellikleri sayesinde spanlastikler, çeşitli biyolojik bariyerlerden ilaç taşınmasının iyileştirilmesi açısından umut vadeden sistemler olarak değerlendirilmektedir (27). Literatürde Span 60 ve Tween 80 kombinasyonunun kullanıldığı çalışmalarda, uygun vezikül boyutu ve esneklik özelliklerine sahip spanlastik formülasyonların geliştirilebildiği bildirilmiştir (142). Bu doğrultuda, geliştirilen NAR yüklü spanlastik formülasyonların etkin maddenin taşınma ve biyofarmasötik özelliklerinin iyileştirilmesine katkı sağlayabileceği düşünülmektedir.

NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının ilaç taşıyıcı sistem olarak etkinliği, vezikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli gibi kritik fizikokimyasal özelliklerin optimize edilmesine bağlıdır (160). Özellikle beyin tümörlerine hedeflenen nanotaşıyıcı sistemlerde formülasyonun partikül boyutu, KBB ile etkileşimi, hücresel alımı ve biyolojik dağılımı etkileyen önemli parametrelerden biridir. Literatürde, 100–200 nm boyut aralığındaki NEİTS'in dolaşımda kalma süresi ve beyin dokusuna taşınma potansiyeli açısından önemli üstünlük sağlayabileceği bildirilmekle birlikte, KBB geçişinin yalnızca partikül boyutuna bağlı olmadığı vurgulanmaktadır (161).

NEİTS'in sahip olduğu düşük PDI değerleri, partikül boyut dağılımının homojenliğini gösterirken, zeta potansiyel değeri veziküller arasındaki elektrostatik etkileşimlerin ve kolloidal stabilitenin değerlendirilmesinde önemli rol oynamaktadır (160). Yüksek mutlak zeta potansiyeli değerleri elektrostatik itme kuvvetlerini artırarak agregasyon eğilimini azaltabilmekte, ancak iyonik olmayan yüzey aktif maddeler içeren spanlastik sistemlerde sterik stabilizasyon da kolloidal kararlılığa katkı sağlayabilmektedir. Ayrıca spanlastiklerin esnekliği, veziküllerin biyolojik bariyerlerle etkileşimini etkileyebilen önemli bir özellik olup vezikül boyutu ve yüzey özellikleriyle birlikte değerlendirilmelidir (27, 160).

Yukarıdaki bilgilerin ışığı altında, bu tez kapsamında beyin tümörlerinin tedavisine yönelik NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının geliştirilmesi ve in vitro karakterizasyon (vezikül boyutu, zeta potansiyeli, PDI, ilaç yükleme, elastikiyet özellikleri, morfolojik değerlendirme, in *vitro* salım davranışları) çalışmalarının ve RG-2 hücre hattı üzerinde hücre kültürü çalışmalarının gerçekleştirilmesidir.

5.1. Analitik Yöntem Validasyonu

5.1.1. Naringin'in Miktar Tayin Yönteminin Geliştirilmesi ve Validasyonu

Literatürde NAR miktar tayini için UV spektrofotometre, sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi farklı yöntemler bulunmaktadır (138, 162, 163). Tez kapsamındaki *in vitro* çalışmalar için, bu yöntemler arasında düşük miktarlardaki NAR'ın yüksek hassasiyet ve doğruluk ile en hassas ve özgül bir şekilde saptayabilen yöntemlerden biri olması nedeni ile HPLC yönteminin kullanılmasına karar verilmiştir. HPLC yönteminin analitik validasyonu için ICH Q2/R2 "Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology" kılavuzu esas alınmıştır (164).

NAR'ın HPLC miktar tayini Bölüm 4.1'de belirtilen şekilde metanol: su: formik asit (40:59,9:0,1) mobil fazı kullanılarak ve 285 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Doğrusallık çalışmaları için tez kapsamında yapılacak analizlere uygun olması için uygun bir konsantrasyon aralığı (0,5-12,5 µg/mL) seçilerek çalışılmıştır. Çalışılan

konsantrasyon aralığında yapılan hesaplamalar sonucunda doğrusal bir ilişki tespit edilmiştir. Kalibrasyon doğrusu ve bulguları Şekil 4.2'de verilmiştir. Kalibrasyon doğrusuna ait denklem y = 63,038x+3,9255 bulunmuştur ve R^2 değeri 0,9992 olarak tespit edilmiştir. R^2 değeri 1'e ne kadar yakın olursa yöntemin güvenilirliğinin o kadar arttığı bildirildiğinden (139) bu bulgudan hareketle 0,5-12,5 µg/mL aralığı için yöntemin güvenilirliğinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Yapılan özgüllük çalışması ile formülasyon içinde kullanılan yardımcı maddelerin NAR'ın miktar tayini üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı bulunmuştur. Yöntem validasyonu kapsamında; doğrusallık, doğruluk, kesinlik (tekrar elde edilebilirlik), LOD ve LOQ parametreleri incelenmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,054 µg/mL ve 0,181 µg/mL olarak bulunmuştur. İlgili ICH kılavuzuna göre analitik yönteme ilişkin validasyon parametrelerinin belirlenen VK değerlerinin %2'nin altında olması ve geri kazanım değerlerinin %98-102 arasında olması gerekmektedir (139). VK'nin %2'nin altında olması, yöntemin tekrarlanabilirlik ve tekrar elde edilebilirlik değerlerinin kabul edilebilir ölçüde farklılık gösterdiğini belirtmektedir. NAR için geliştirilen analitik yöntem kapsamında elde edilen tüm varyasyon katsayılarının %2'nin altında olması, ilgili yöntemin hassas ve tekrar edilebilir olduğunu göstermektedir. Analitik yöntem validasyonu için gerçekleştirilen doğruluk (geri kazanım) ve kesinlik çalışmalarında, hedef çalışma konsantrasyonlarında hedeflenen %98-102 aralığında optimum geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Sonuç olarak, geliştirilen HPLC yönteminin, NAR miktar tayini için geniş bir konsantrasyon aralığında doğru, kesin ve güvenilir olduğu kanıtlanmıştır.

5.2. Formülasyon Çalışmaları

5.2.1. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonlarının Optimizasyonu ve Faktöriyel Tasarım Çalışmaları

Beyin tümörlerinin tedavisinde etkin maddelerin hedef dokuya yeterli konsantrasyonlarda ulaştırılamaması, tedavi etkinliğini sınırlandıran önemli faktörlerden biridir. Özellikle GBM gibi infiltratif karakter gösteren malign beyin tümörlerinde, KBB ve KTB'nin heterojen geçirgenliği, ilaçların tümör dokusuna homojen şekilde dağılımını güçleştirmektedir. Primer ve metastatik beyin tümörlerinde bariyer geçirgenliğinin tümör bölgeleri arasında farklılık gösterdiğini ve bu durumun etkin madde taşınmasında önemli bir sınırlama oluşturduğu bildirilmiştir (14, 165).

Spanlastikler, yüksek esneklik (deformasyon) kabiliyetleri, hidrofilik ve hidrofobik etkin maddeleri yapılarında taşıyabilmeleri (132), biyouyumlu, biyoparçalanır ve immünojenik olmayan (27) yapıları ile membran esneklikleri nedeniyle geleneksel veziküler sistemlere üstünlük göstermektedir. Literatürde spanlastik formülasyonlarının etkin maddelerin biyoyararlanımını ve terapötik etkinliğini artırabildiği bildirilmiş olup (132) bu özellikleri, bu tez çalışmasında NAR'ın taşınma ve salım özelliklerinin iyileştirilmesi için spanlastik formülasyonlarının geliştrilmesinin temel gerekçesini oluşturmuştur. Ayrıca, literatürde spanlastiklerin esnek yapısının KBB'den geçişlerinde üstünlük sağlayacağı bildirilmiştir (132).

Formülasyon geliştirme çalışmalarında optimum spanlastik formülasyonun elde edilmesi için sistematik bir ön formülasyon çalışması faktöriyel tasarım ile yürütülmüş ve Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresi optimize edilmiştir. Formülasyonların 200 nm'nin altında vezikül boyutuna sahip olması, etkin maddenin biyolojik dağılımı ve beyin dokusuna taşınma potansiyeli açısından önemli bir formülasyon kriteri olmaktadır. Literatürde 200 nm'den büyük NEİTS'in mononükleer fagositik sistem tarafından tutulma eğilimini artırabildiği ve dalakta tutulma nedeniyle KBB'den etkili şekilde geçemediği ve daha küçük taşıyıcıların beyin parankimi

penetrasyonun artmasını sağladığı, tümör dokusuna hedeflenme açısından üstünlük sağlayabildiği bildirilmektedir (166, 167).

NAR yüklü spanlastiklerin hazırlanmasında, basit, tek basamaklı, tekrarlanabilir ve dar dağılımlı küçük veziküller oluşturabilmesiyle öne çıkan etanol enjeksiyon yöntemi kullanılmıştır (124). Etanol enjeksiyonu yönteminin temelini, amfifilik yapıdaki yüzey etkin maddelerin organik fazdan sulu faza aktarılması sırasında çözünürlük koşullarının değişmesi ve kendiliğinden veziküler yapılar meydana getirmesi oluşturmaktadır. Bu süreçte, 4,7 hidrofilik-lipofilik denge (HLB) değerine sahip Span 60'ın uzun ve doymuş hidrofobik stearat zincirleri (C18) sulu ortamla temaslarını en aza indirecek şekilde bir araya gelirken, hidrofilik baş grupları sulu faza yönelerek veziküler çift tabakaların oluşumunu desteklemektedir. HLB değeri 14,9 olan Tween 80 ise kenar aktivatörü olarak çift tabakanın moleküler paketlenme düzenini değiştirerek membran esneklik kabiliyetini artırmaktadır (142, 168). Etanolün ortamdan uzaklaştırılmasıyla veziküler yapıların oluşumu desteklenirken, ardından uygulanan sonikasyon işlemi vezikül büyüklüğünün azaltılmasını ve dağılımının düzenlenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte, sonikasyon süresinin aşırı artırılması membran bütünlüğünü etkileyerek etkin maddenin dış ortama sızmasına ve enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir (142).

Bu tez kapsamında gerçekleştirilen formülasyon geliştirme çalışmalarında, Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresinin NAR yüklü spanlastik formülasyonların vezikül büyüklüğü, polidispersite indeksi (PDI), enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve zeta potansiyeli üzerindeki etkileri, 3^2 tam faktöriyel deney tasarımı ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla Span 60 miktarı 100 mg olarak sabit tutulmuş, Tween 80 miktarı 40, 60 ve 80 mg, sonikasyon süresi ise 3, 5 ve 7 dakika olacak şekilde değiştirilerek toplam dokuz farklı formülasyon hazırlanmıştır (Tablo 3.4 ve Tablo 3.5).

Elde edilen deneysel sonuçlar, Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresinin vezikül büyüklüğü üzerinde etkili olduğunu göstermiştir. Tween 80 miktarının 40 mg olduğu S1, S2 ve S3 formülasyonlarında sonikasyon süresinin artırılmasıyla vezikül büyüklüğü 215,3±2,28 nm'den 186,5±5,605 nm'ye gerilemiştir. Benzer şekilde, 60 mg

Tween 80 içeren S4, S5 ve S6 formülasyonlarında vezikül büyüklüğü 197,6±1,429 nm ile 183,3±2,90 nm arasında değişmiştir. Bu durum, sonikasyon sırasında oluşan kavitasyon ve mekanik kuvvetlerin daha büyük veziküler yapıların parçalanmasını destekleyerek vezikül büyüklüğünün azalmasına katkıda bulunmasıyla açıklanabilir (142, 169). Bununla birlikte, sonikasyon süresindeki artışın PDI değerlerinde her zaman iyileşme sağlamadığı belirlenmiştir. Nitekim S5 formülasyonunda PDI değeri 0,250±0,010 iken sonikasyon süresinin 7 dakikaya çıkarıldığı S6 formülasyonunda bu değer 0,546±0,026'ya yükselmiştir (Tablo 4.5). Benzer şekilde, Ali MM ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada (170) spanlastik formülasyonu hazırlanmasında kullanılan sonikasyon süresindeki artışın PDI değerlerinde artışa neden olduğu bildirilmiştir.

Tween 80 miktarının 80 mg'a çıkarıldığı S7, S8 ve S9 formülasyonlarında vezikül büyüklükleri sırasıyla 177,2±5,615 nm, 170±7,17 nm ve 137,3±2,013 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, Tween 80 miktarındaki artışın genel olarak vezikül büyüklüğünün azalmasını desteklediğini göstermektedir. Bu durum, Tween 80'in yüzey aktif madde olarak ara yüzey gerilimini azaltarak veziküler membran organizasyonunu değiştirmesi ile açıklanabilir (142). Ancak aynı formülasyonların PDI değerlerinin 0,456–0,576 arasında değişmesi, daha küçük vezikül büyüklüğünün her zaman daha homojen bir dağılım göstermediğini ortaya koymuştur.

Formülasyonların %EE değerleri %50,80±2,16 ile %60,56±1,88 arasında bulunmuş olup Tween 80 miktarının artışıyla genel bir azalma eğilimi göstermiştir (Tablo 4.5, Şekil 4.4). Tween 80 miktarının 40 mg olduğu formülasyonlarda (S1–S3) %EE değerleri %55,53–60,56 aralığında iken, bu aralık 60 mg Tween 80 içeren formülasyonlarda (S4–S6) %54,72–57,00'ye, 80 mg Tween 80 içeren formülasyonlarda (S7–S9) ise %50,80–54,10'a gerilemiştir. Sonikasyon süresinin etkisi incelendiğinde, her Tween 80 seviyesinde en düşük %EE değerinin 7 dakika sonikasyon uygulanan formülasyonlarda (S3, S6 ve S9) elde edildiği görülmüştür. Söz konusu eğilimler, kenar aktivatörü miktarındaki artışa bağlı olarak membran akışkanlığının ve geçirgenliğinin artması (25, 142, 143) ve uzun süreli sonikasyon

sırasında oluşan kavitasyon kuvvetlerinin membran bütünlüğünü bozması (142) şeklindeki iki mekanizma ile açıklanabilir. Bu mekanizmalar Bölüm 5.2.4'te ayrıntılı olarak tartışılmıştır. Bölüm 5.2.4'teki değerlendirme yalnızca ileri çalışmalar için seçilen S2, S5 ve S9 formülasyonlarına dayanmaktadır. Aynı eğilimin faktöriyel tasarımdaki dokuz formülasyonun tamamında gözlenmesi, bu yorumun formülasyon seçimine bağlı olmadığını ve Tween 80 miktarı ile sonikasyon süresinin %EE üzerindeki etkisinin tasarım genelinde tutarlı olduğunu göstermektedir.

Elde edilen deneysel sonuçlar, Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresinin zeta potansiyeli üzerinde de etkili olduğunu göstermiştir. Tüm formülasyonlarda zeta potansiyeli −30,8 ile −41,2 mV arasında belirlenmiş olup, bu negatif yükün Span 60'ın hidroksil gruplarının dış faza yönelmesi ve NAR'ın kısmen iyonize fenolik hidroksil gruplarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (134, 138). Tween 80 miktarının 40 mg'dan 80 mg'a artırılmasıyla ortalama zeta potansiyeli −38,4 mV'den −32,6 mV'ye gerilemiştir. Bu durum, Tween 80'in polioksietilen zincirlerinin vezikül yüzeyindeki yükü perdelemesiyle açıklanabilir (138). Bununla birlikte, kenar aktivatörünün sağladığı sterik stabilizasyon elektrostatik itmedeki bu azalmayı kısmen dengeleyebilmektedir (171). Sonikasyon süresinin etkisi doğrusal olmayan bir eğilim göstermiştir. Nitekim 40 ve 60 mg Tween 80 içeren formülasyonlarda mutlak zeta potansiyeli en yüksek değerine 5 dakikalık sonikasyon sonrası ulaşmış (S2, −41,2±0,75 mV; S5, −39,8±0,65 mV), sürenin 7 dakikaya çıkarıldığı S3 ve S6 formülasyonlarında ise azalmıştır (−37,1±1,30 mV ve −30,8±1,81 mV).

Hazırlanan 9 adet spanlastik formülasyonundan nanovezikül grubundan vezikül büyüklüğü, zeta potansiyel , enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve PDI değeri bakımından açısından uygun bulunan 3 formülasyon (S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonlar) seçilerek ileri in vitro salım, elastikiyet analizi, fiziksel stabilite çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu değerlendirmeler sonucunda en uygun vezikül büyüklüğü-PDI, ilaç yükleme ve in vitro salım profili gösteren formülasyon optimum (S5 kodlu formülasyon) olarak belirlenmiş ve optimum formülasyon üzerinde ilave çalışma olarak FTIR analizi, morfolojik değerlendirme ve hücre kültürü çalışmaları

gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda, S2 formülasyonunun vezikül büyüklüğü 200,3±1,380 nm ve PDI 0,329±0,046 olarak belirlenirken, S5 formülasyonunda bu değerler sırasıyla 193,6±7,45 nm ve 0,250±0,010 olarak bulunmuştur. S9 formülasyonunda daha küçük vezikül büyüklüğü (137,3±2,01 nm) elde edilmesine rağmen PDI değerinin 0,576±0,049 olması, vezikül dağılımının S5'e kıyasla daha heterojen olduğunu göstermiştir.

Optimum formülasyon olarak belirlenen S5 formülasyonu NAR yüklü olduğundan bu formülasyonun etkin madde içermeyen şekli (aynı yöntem ve hazırlama parametreleri ile) de hücre kültürü çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanmıştır. Boş spanlastik formülasyonunun ortalama vezikül büyüklüğü 127±0,2646 nm iken, NAR yüklü formülasyonda bu değerin 193,6±7,45 nm'ye yükseldiği ve artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edilmiştir ($p<0,0001$). Bu artış, NAR moleküllerinin veziküler çift tabakaya ve membranın ara yüzey bölgelerine yerleşerek yüzey aktif madde moleküllerinin paketlenme düzenini değiştirmesi ve vezikül hacmini genişletmesiyle açıklanabilir. NAR'ın 580,5 g/mol molekül ağırlığı ve yapısındaki iki şeker birimi ile çok sayıda hidroksil grubu (34), molekülün çift tabakada görece büyük bir hacim kaplamasına ve ara yüzeyde su moleküllerini tutmasına yol açabilmekte; hidrodinamik çapın hidrasyon tabakasını da kapsadığı dikkate alındığında (29, 131, 132) bu etkinin de ölçülen artışa katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir. Literatürde Span 60 ve Tween 80 esaslı spanlastiklerde benzer boyut aralıkları bildirilmiştir; NAR'ın aglikon eşdeğeri naringenin ile hazırlanan formülasyonlarda vezikül büyüklüğü 119,2–214,5 nm (optimum 157,7 nm) olarak rapor edilmiş (144), piperin ve famotidin yüklü spanlastiklerde optimum değerler sırasıyla 152,4±2,98 nm ve 170,58±4,48 nm olarak belirlenmiştir (131, 132). 200 nm'den küçük vezikül büyüklüğüne sahip formülasyonun büyüklük açısından KBB'den geçiş için uygun özellikte olduğu düşünülmektedir; bununla birlikte KBB geçişinin yalnızca boyuta bağlı olmadığı dikkate alınmalıdır (21, 153).

PDI, kolloidal sistemlerin boyut dağılım homojenliğini gösteren önemli bir kalite parametresidir ve 0,3'ten küçük değerler dar, homojen ve monodispers bir

dağılıma işaret etmektedir (172). Tez çalışmasında optimum boş spanlastik formülasyonunun PDI değeri 0,305±0,012, NAR yüklü formülasyonun (S5) PDI değeri ise 0,250±0,010 olarak saptanmıştır. Etkin madde yüklenmesine rağmen formülasyonun PDI değerinin 0,3'ün altında kalması, vezikül oluşum sürecinin dengeli yürüdüğünü ve topaklanma olmaksızın homojen bir dağılım elde edildiğini ortaya koymaktadır. Literatürde spanlastik sistemlerde PDI değerlerinin famotidin yüklü formülasyonlarda 0,346–0,493, boswellik asit yüklü nanospanlastiklerde ise 0,072–0,355 aralığında bildirilmiştir (115, 131). Optimum formülasyonda elde edilen değerin faktöriyel tasarımdaki dokuz formülasyon arasında en düşük PDI olduğu (Tablo 4.5) göz önünde bulundurulduğunda, S5 kodlu formülasyonun boyut dağılımı bakımından avantajlı bir profil sergilediği değerlendirilmiştir.

Boş optimum spanlastik formülasyonu için zeta potansiyel değeri −41,4±1,35 mV, NAR yüklü spanlastik formülayonu (S5) için −39,8±0,65 mV olarak bulunmuştur. Yapıda iyonik bir bileşen ya da yük verici ajan bulunmamasına karşılık negatif yüzey yükü elde edilmesi, Span 60 moleküllerinin serbest hidroksil gruplarıyla ilişkilendirilmekte olup literatürde yük verici ajan içermeyen Span 60 esaslı spanlastiklerde de negatif zeta potansiyeli bildirilmiştir (147). Ayrıca Tween 80'in polioksietilen zincirlerinin vezikül yüzeyinde sterik bir tabaka oluşturarak kolloidal kararlılığa katkı sağlayabileceği düşünülmektedir. Mutlak zeta potansiyelinin 30 mV'un üzerinde olması elektrostatik itme kuvvetleri aracılığıyla agregasyon riskini azaltmakla birlikte, sterik stabilizasyonun da etkili olduğu noniyonik sistemlerde bu parametre tek başına yeterli değildir (171). Span 60 esaslı spanlastiklerde zeta potansiyelinin −49,56 mV'a kadar ulaşabildiği, famotidin yüklü formülasyonlarda ise −28,07 ile −39,77 mV arasında değiştiği (115, 131) dikkate alındığında, elde edilen değerlerin literatürde bildirilen aralığın üst sınırına yakın olduğu görülmektedir. NAR yüklenmesiyle gözlenen sınırlı azalma ise etkin maddenin fenolik hidroksil ve şeker gruplarının vezikül yüzeyinde kısmen yer alarak negatif yükleri bir ölçüde maskelemesiyle ilişkilendirilmiş olup, 30 günlük stabilite çalışmalarında zeta potansiyelinin yüksek negatif değerlerini koruması bu yorumu desteklemektedir.

5.2.2. Morfolojik Değerlendirme

Optimum spanlastik formülasyonu (S5) ve boş spanlastik formülasyonun morfolojik özellikleri SEM kullanılarak incelenmiştir (Şekil 4.5.). Yapılan incelemede, hem boş hem de NAR yüklü spanlastiklerin küresele yakın bir morfoloji sergilerken bir kısmının oval ve uzamış bir görünüm kazandığı gözlenmiştir. Bu farklılığın, spanlastiklerin kenar aktivatörü içeren esnek membran yapısıyla ve SEM için uygulanan kurutma işlemiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Numunenin kurutulması ve vakum altında incelenmesi sırasında su kaybeden veziküller, yüksek deformabiliteleri nedeniyle yüzeye yassılaşarak ya da çevrelerindeki boşluğa uyum sağlayarak şekil değiştirebilmektedir. Nitekim "ultradeformable" veziküllerle yapılan bir çalışmada, küresel yapının yanı sıra özellikle kurutma sonrasında farklı şekillerin gözlendiği ve bu durumun membranın yüksek deforme olabilirliğine bağlı olduğu bildirilmiştir (173). Literatürde benzer şekilde, yüzey aktif madde esaslı veziküler sistemlerde küresel yapıların yanında tübüler ve polihedral yapıların da oluşabildiği gösterilmiştir (174).

SEM ile elde edilen bulgular, formülasyonun deformabilite indeksi sonuçlarıyla da uyumludur. Bununla birlikte, elektron mikroskobuyla belirlenen vezikül büyüklüğünün numune hazırlama ve kurutma işlemleri nedeniyle hidrodinamik çaptan da farklı bulunabileceği dikkate alınmalıdır (29, 132).

5.2.3. FTIR Spektroskopisi

Tez çalışması kapsamında FTIR, formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin ve etkin maddenin fonksiyonel gruplarını belirlemek, bileşenler arasındaki moleküler düzeydeki etkileşimleri ve enkapsülasyonun başarısını değerlendirmek amacıyla kullanılmıştır (175).

Şekil 4.6'da sunulduğu üzere, saf NAR spektrumunda 3403,99 cm^{-1}'de hidroksil (O–H) gruplarına ait geniş absorbsiyon bandı, 1629,72 cm^{-1}'de konjuge karbonil (C=O) gerilme titreşimi ve 1583,75 ile 1519,03 cm^{-1}'de aromatik C=C titreşimleriyle ilişkili karakteristik bantlar gözlenmiştir. 3000–3300 cm^{-1} aralığındaki soğurma piki, benzen

halkasındaki C-H gerilme titreşiminden kaynaklanmaktadır. 2850–2950 cm^{-1} aralığındaki soğurma piki ise yapıdaki doymuş karbona ait C-H bağı gerilme titreşimine karşılık gelmektedir (176, 177). Span 60 spektrumunda 2918,16 ve 2850,79 cm^{-1}'de alifatik C–H gerilme titreşimleri ile 1736,80 cm^{-1}'de ester karbonil (C=O) bandı belirlenirken (Şekil 4.7.), Tween 80 spektrumunda 2858,90 ve 1734,12 cm^{-1}'de karakteristik bantlar tespit edilmiştir (Şekil 4.8.). Bu bulgular, Span 60 ve Tween 80'in FTIR spektrumlarında benzer fonksiyonel gruplara ait bantların bulunduğunu bildiren literatür verileriyle uyumludur (115, 125).

Boş spanlastik formülasyonunda 2916,96, 2850,09 ve 1735,83 cm^{-1}'de gözlenen karakteristik bantların (Şekil 4.9.), NAR yüklü spanlastik formülasyonunda sırasıyla 2917,27, 2850,41 ve 1735,94 cm^{-1}'de bulunması (Şekil 4.10.), taşıyıcı sistemi oluşturan yardımcı maddelerin temel fonksiyonel gruplarının korunduğunu göstermektedir. Özellikle ester karbonil bandının boş ve NAR yüklü formülasyonlarda hemen hemen aynı konumda bulunması, NAR ilavesi sonrasında belirgin bir kimyasal yapı değişikliğinin meydana gelmediğini düşündürmektedir. Benzer şekilde, literatürde Span 60 ve Tween 80 kullanılarak hazırlanan boş spanlastik formülasyonlarında yardımcı maddelere ait karakteristik bantların korunduğu ve bant şiddetlerindeki farklılıkların veziküler yapı oluşumuyla ilişkili olabileceği bildirilmiştir (115, 125).

Saf NAR'ın FTIR spektrumunda 1629,72 cm^{-1}'de gözlenen karakteristik karbonil bandının NAR yüklü spanlastik formülasyonunda belirginliğini kaybettiği, 1000–1200 cm^{-1} aralığındaki bantların ise yardımcı maddelere ait karakteristik bantlarla büyük ölçüde örtüştüğü görülmüştür (Şekil 4.11.). Ayrıca NAR yüklü formülasyonda 1560,12 ve 1527,68 cm^{-1} civarında bantlar gözlenmekle birlikte, bu değişikliklerin doğrudan yeni bir kimyasal bağ oluşumuna işaret ettiği söylenememektedir. Literatür incelendiğine, söz konusu farklılıkların, NAR'ın formülasyon içerisindeki düşük miktarına bağlı olarak karakteristik bantlarının maskelenmesi ve etkin madde ile yardımcı maddeler arasındaki hidrojen bağları, van der Waals kuvvetleri veya diğer zayıf fiziksel etkileşimlerden kaynaklanabileceği değerlendirilmiştir (115, 125).

Sonuç olarak, NAR yüklü spanlastik formülasyonunda saf NAR'a ait bazı karakteristik bantların belirginliğini kaybetmesi ve yardımcı maddelere ait temel bantların korunması, NAR'ın spanlastik taşıyıcı sistemle fiziksel olarak ilişkili olduğunu ve formülasyon bileşenleri arasında belirgin bir kimyasal uyumsuzluk bulunmadığını desteklemektedir (115, 125).

5.2.4. Naringin Yüklü Spanlastik Formülasyonunun İlaç Yükleme Etkinliği ve İn Vitro İlaç Salımı

Spanlastik formülasyonlarında enkapsülasyon etkinliği (%EE) ve ilaç yükleme kapasitesi (LC), taşıyıcının etkin madde taşıma başarısını ve formülasyonun terapötik kullanıma uygunluğunu yansıtan temel kalite kriterleri arasında yer almaktadır (29, 131, 132). Tez çalışması kapsamında, S2, S5 ve S9 formülasyonlarında %EE değerleri sırasıyla %56,70±1,04, %57,00±1,40 ve %50,80±2,16; LC değerleri sırasıyla %3,89±0,06, %3,44±0,17 ve %2,74±0,05 olarak bulunmuştur. Elde edilen bu bulgular, Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresinin enkapsülasyon etkinliği üzerinde etkisi olduğunu ortaya koymaktadır. Tween 80 miktarının 40 mg'dan 60 mg'a arttığı S2 ve S5 formülasyonları arasında %EE değerleri birbirine oldukça yakın bulunmuş (%56,70 ve %57,00), buna karşılık Tween 80 miktarının 80 mg'a çıktığı ve sonikasyon süresinin 7 dakikaya uzatıldığı S9 formülasyonunda %EE değeri %50,80'e gerilemiştir. Bu durum, kenar aktivatörü miktarının belirli bir düzeye kadar artırılmasının enkapsülasyon etkinliğini olumsuz etkilemediğini, ancak belirli bir eşiğin üzerine çıkıldığında etkin maddenin veziküler yapıda tutulmasının sınırlandığını göstermiştir. Söz konusu azalmanın iki ayrı mekanizmayla ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Birincisi, kenar aktivatörlerinin veziküler membrandaki düzenli moleküler paketlenmeyi bozarak membran akışkanlığını ve geçirgenliğini artırmasıdır (25, 142, 143).Membran esnekliğindeki artış spanlastiklerin deformabilite özelliği açısından istenen bir sonuç olmakla birlikte, aynı yapısal gevşeme etkin maddenin veziküler yapıdan dış sulu faza sızmasını da kolaylaştırabilmektedir. Nitekim S9 formülasyonunda en yüksek deformabilite indeksinin (5,22 mg/s) elde edilmesine karşılık en düşük enkapsülasyon etkinliğinin saptanması, bu iki parametre arasında bir etkileşim bulunabileceğine

işaret etmektedir. Ayrıca HLB değeri 14,9 olan Tween 80'in yüksek miktarlarda kullanılması, veziküler yapıya dahil olmayan yüzey aktif madde fraksiyonunun artmasına ve bu fraksiyonun sulu fazda etkin maddeyi çözerek vezikül dışında tutmasına yol açabilmektedir (142, 168). İkincisi mekanizma, sonikasyon süresinin uzatılmasıdır. Sonikasyon sırasında oluşan kavitasyon ve mekanik kuvvetler vezikül büyüklüğünün azaltılmasına katkı sağlamakla birlikte, sürenin artırılması membran bütünlüğünü olumsuz etkileyerek etkin maddenin dış ortama sızmasına ve enkapsülasyon etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir (142). S9 formülasyonunda hem Tween 80 miktarının hem de sonikasyon süresinin en yüksek düzeyde olması, bu iki etkinin birlikte ortaya çıkmış olabileceğini düşündürmektedir. Bu formülasyonda PDI değerinin 0,576±0,049 ile en yüksek düzeyde bulunması da veziküler popülasyonun daha heterojen bir yapı kazandığını göstermekte olup elde edilen enkapsülasyon bulgularıyla aynı yönde değerlendirilmiştir.

İlaç yükleme kapasitesi değerleri incelendiğinde, S2'den S9'a doğru belirgin bir azalma eğilimi (%3,89 → %3,44 → %2,74) gözlenmiştir. Bu eğilimin yalnızca enkapsülasyon etkinliğindeki değişimle açıklanamayacağı, LC'nin tanımı gereği taşıyıcı sistemin toplam kütlesine bağlı bir parametre olmasından kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Tez kapsamında Span 60 miktarı (100 mg) ve etkin madde miktarı (10 mg) sabit tutulurken Tween 80 miktarının 40 mg'dan 80 mg'a yükseltilmesi, formülasyondaki toplam yardımcı madde kütlesini artırmış ve dolayısıyla birim taşıyıcı kütlesine düşen etkin madde oranını azaltmıştır. Nitekim S2 ve S5 formülasyonlarında enkapsülasyon etkinlikleri birbirine çok yakın olmasına karşılık LC değerlerinin farklılık göstermesi, bu iki parametrenin farklı bilgiler sunduğunu ortaya koymaktadır. S9 formülasyonunda ise hem enkapsülasyon etkinliğinin daha düşük olması hem de taşıyıcı kütlesinin en yüksek düzeyde bulunması, en düşük LC değerinin elde edilmesiyle sonuçlanmıştır. Bu bulgular, formülasyon geliştirme sürecinde enkapsülasyon etkinliği ile ilaç yükleme kapasitesinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir.

İlaç yükleme kapasitesindeki azalmanın formülasyon açısından pratik bir karşılığı da bulunmaktadır. Birim taşıyıcı kütlesine düşen etkin madde miktarının azalması, hedeflenen dozun uygulanabilmesi için daha yüksek miktarda yardımcı madde verilmesini gerektirmektedir. Yüzey aktif madde esaslı sistemlerde yardımcı madde yükünün artması biyouyumluluk açısından dikkate alınması gereken bir husus olduğundan, görece yüksek LC değerlerinin korunması tercih edilen bir özelliktir. Bu doğrultuda ileri çalışmalar için seçilen üç formülasyon arasından S5 formülasyonunun, en yüksek enkapsülasyon etkinliğini (%57,00±1,40) kabul edilebilir bir ilaç yükleme kapasitesiyle (%3,44±0,17) birlikte sunması, formülasyonun etkin madde taşıma özellikleri bakımından dengeli bir profil sergilediğini göstermektedir.

Elde edilen enkapsülasyon etkinliği değerleri, NAR'ın fizikokimyasal özellikleri bağlamında da değerlendirilmelidir. NAR, log P değeri −0,44 olan ve sulu ortamda sınırlı çözünürlük gösteren (40 °C'de 1 mg/mL) bir flavanon glikoziti olup fenolik hidroksil gruplarına ait pKa değerinin yaklaşık 7,5–8,5 aralığında bulunması nedeniyle fizyolojik pH koşullarında kısmen iyonize yapıda bulunabilmektedir (34). Bu özellikler, etkin maddenin veziküler membranın lipofilik bölgelerine yerleşme eğilimini sınırlandırabilecek faktörler arasında değerlendirilmektedir. Nitekim tez kapsamında NAR'ın organik fazdaki çözünürlüğünün artırılabilmesi amacıyla formülasyon hazırlama yöntemi metanol ilavesiyle modifiye edilmiş ve etkin maddenin veziküler yapıya dahil edilmesi bu şekilde desteklenmiştir (140, 141). Ayrıca Span 60'ın uzun doymuş C18 alkil zincirleri ve düşük HLB değeri (4,7) sayesinde kararlı lamellar çift tabakaların oluşumuna katkı sağladığı ve diğer Span türevlerine kıyasla daha yüksek enkapsülasyon etkinliği sunabildiği bildirilmiştir (108, 142). Bu doğrultuda, çalışma kapsamında elde edilen %50–57 aralığındaki enkapsülasyon etkinliği değerlerinin, kısmen iyonize karakterde bir glikozit için uygun düzeyde olduğu değerlendirilmiştir.

Geliştirilen NAR yüklü spanlastik formülasyonlarının in vitro salım profilleri, etkin maddenin veziküler sistemlerden serbestleşme davranışını değerlendirmek ve formülasyon bileşiminin salım özellikleri üzerindeki etkilerini ortaya koymak amacıyla diyaliz membran yöntemiyle pH 7,4 PBS ortamında incelenmiştir (147). Elde edilen

bulgular değerlendirildiğinde, serbest NAR ile S2, S5 ve S9 formülasyonlarının farklı salım profilleri sergilediği belirlenmiştir. Serbest etkin madde 4. saatte %100,73 oranında tamamen çözünürken, S9 formülasyonunda etkin madde salımı 8. saatte (%100,14), S2 ve S5 formülasyonlarında ise 24. saatte tamamlanmıştır (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13)(178). Serbest NAR'ın 4. saatte tamamen çözünerek ortama geçmesi, kullanılan diyaliz membranının (MWCO 14 kDa) NAR geçişini kısıtlayan bir bariyer oluşturmadığını göstermektedir (179). Formülasyonlarda NAR salımının 8-24 saate kadar sürmesi, ilacın veziküler taşıyıcıdan kontrollü şekilde salındığına işaret etmektedir (180).

NAR salımında formülasyonlar arasındaki fark 4. saatten sonra belirginleşmiştir. S5 en yavaş salımı göstermiş (4. saatte %79, 8. saatte %86). S2 ve S9 ise 4. saatte %86-87'ye ulaşmış, 8. saatte sırasıyla %94 ve %100 olmuştur. S9'da salım 8. saatte tamamlanırken S2 ve S5'te 24. saate kadar sürmüştür. Bu farklar vezikül boyutu, boyut dağılımı, kenar aktivatörü miktarı ve enkapsülasyon etkinliğinden kaynaklanmaktadır. Vezikül boyutu küçüldükçe yüzey alanı/hacim oranı artmakta ve ilacın kat etmesi gereken difüzyon yolu kısalmaktadır (17, 29, 86, 131, 132). Vezikül boyutu S2'de 200,3±1,38 nm, S5'te 193,6±7,45 nm ve S9'da 137,3±2,01 nm olarak belirlenmiştir. En küçük boyuta sahip S9'da salımın en erken tamamlanması bu beklentiyle uyumludur. Tween 80 miktarı arttıkça (40, 60 ve 80 mg) boyutun azalması, kenar aktivatörünün ara yüzey özelliklerini değiştirerek daha küçük veziküllerin oluşumunu kolaylaştırmasıyla ilişkili olabilir (131, 132). Kenar aktivatörü membran akışkanlığını ve deformabiliteyi de artırmaktadır (25, 131, 142, 143). Bu nedenle Tween 80 miktarı ve deformabilite indeksi en yüksek olan S9'da (DI: 5,22) hızlı salım beklenen bir sonuçtur.

Boyutları birbirine çok yakın olan S2 (DI: 2,47) ve S5 (DI: 4,01) arasındaki salım miktarı farklılığı, boyutla ya da Tween 80 miktarıyla açıklanamamaktadır. Bu noktada boyut dağılımı önem kazanmaktadır. S9'un yüksek PDI değeri (0,576±0,049) heterojen bir dağılıma işaret etmektedir; bu dağılımdaki çok küçük veziküller salımı hızlandırmış

olabilir. En düşük PDI değerine (0,250±0,010) sahip S5'in homojen yapısı ise daha düzenli ve yavaş salım profiliyle uyumludur.

Şekil 4.12'den de görüleceği üzere tüm formülasyonlarda bifazik bir salım profili gözlenmiştir. İlk 2 saatte hızlı bir salım gerçekleşmiş (1. saatte %41-45, 2. saatte %62-65), ardından eğriler platoya yaklaşmıştır (29, 131, 132). Spanlastik nanoveziküllerin düşük çözünürlüklü etkin maddelerin çözünme davranışını iyileştirebildiği bildirilmiştir (131). NAR suda sınırlı çözünen bir glikozit olduğundan (34), taşıyıcının yüzey aktif madde içeriğinin ilk saatlerdeki salıma katkıda bulunmuş olabileceği düşünülmektedir. Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada spanlastik formülasyonlarında başlangıçta hızlı, ardından yavaşlayan iki aşamalı bir salım bildirmiştir (131). Başka bir çalışmada da merkezi sinir sistemine taşınmak üzere geliştirilen piperin yüklü spanlastiklerin iki aşamalı salım özelliği gösterdiği belirtilmiştir (132). Çalışmada ilk aşamanın, vezikül yüzeyinde veya membranın dış bölgelerinde bulunan etkin maddenin ortama hızla geçmesiyle ilişkili olabileceği, ikinci aşamada veziküler yapıda tutulan etkin maddenin kademeli olarak serbestleşmesi nedeniyle yavaş bir salım gözlendiği açıklanmıştır.

5.2.5. Elastikiyet Ölçüm Çalışmaları

Spanlastik formülasyonlarının elastikiyet özellikleri, veziküllerin kendilerinden daha küçük gözenek çapına sahip membranlardan esneyerek (deforme olarak) geçebilme yeteneklerinin değerlendirilmesi amacıyla incelenmiştir.

Bu çalışmada, Span 60 miktarı 100 mg'da sabit tutulurken Tween 80 miktarı arttıkça DI değeri yükselmiş; S2 (40 mg), S5 (60 mg) ve S9 (80 mg) formülasyonlarında sırasıyla 2,47, 4,01 ve 5,22 mg/s olarak bulunmuştur (Tablo 4.7). Bu sonuçlar, Tween 80 miktarındaki artışın formülasyonların deformasyon yeteneğini olumlu yönde etkilediğini düşündürmektedir. Literatürde Tween 80 içeren spanlastik sistemlerin, farklı kenar aktivatörleri içeren formülasyonlara kıyasla daha yüksek elastikiyet gösterebildiği bildirilmiş olup elde edilen bulgular bu sonuçlarla uyumludur (115, 160).

Membrandan ekstrüzyon sonrasında S2, S5 ve S9 kodlu formülasyonların vezikül boyutlarında sırasıyla yaklaşık %35,9, %48,1 ve %41,9 oranında azalma meydana gelmiştir. Benzer şekilde, literatürde, klotrimazol yüklü spanlastik formülasyonlarında yapılan bir çalışmada da ekstrüzyon öncesinde 206,20 ± 4,95 nm olan vezikül boyutunun ekstrüzyon sonrasında 176,20 ± 1,27 nm'ye düştüğü ve bu değişimin veziküler sistemin elastik özellikleriyle uyumlu olduğu bildirmiştir. Tez çalışmasında ekstrüzyon sonrasında vezikül boyutlarının azalması, formülasyonların membran geçişi sırasında boyut değişimine uğradığını göstermektedir (160). Bununla birlikte, özellikle S9 formülasyonunda ekstrüzyon sonrası vezikül boyutunun 79,78 ± 14,65 nm gibi oldukça düşük bir değer olarak belirlenmesi, bu durumun yalnızca elastik deformasyondan kaynaklı olamayabileceğini, membran geçişi sırasında veziküllerin yeniden düzenlenmesi veya küçük boyutlu veziküllerin seçici olarak geçebileceği olasılıklarını göstermektedir

Sonuç olarak, Tween 80 miktarındaki artışla birlikte deformabilite indeksinin yükselmesi, kenar aktivatörünün spanlastik formülasyonlarının elastikiyet özellikleri üzerindeki etkisini desteklemektedir (101).

5.3. Formülasyonun Sterilizasyonu

Test süresince pozitif kontrol tüplerinde beklenen mikrobiyal üremenin gerçekleşmesi ve negatif kontrollerde hiçbir üreme olmaması, uluslararası standartlara (örn: DSÖ kılavuzları) uygun olarak kullanılan besiyerlerinin ve inkübasyon şartlarının geçerliliğini kanıtlamıştır (149).

Her iki test ortamında (sıvı tiyoglikolat ve *tryptic soy broth*) 14 gün sonunda formülasyon tüplerinde hiçbir bulanıklık veya hücresel çoğalma gözlenmemesi, spanlastik formülasyonlarının steril olduğunu göstermiştir. Elde edilen başarılı sterilite sonuçları, geliştirilen spanlastik nanovezikül sistemin hücre kültürü çalışmalarında ve ileride yapılabilecek *in vivo* hayvan çalışmalarında enfeksiyona yol açmadan güvenle ve biyouyumlu bir şekilde test edilebilmesine güçlü bir zemin hazırlamaktadır.

5.4. Hücre Kültürü Çalışmaları

Veziküler ilaç taşıyıcı sistemlerin tasarımında, taşıyıcının kendisinin hücresel ölüme yol açmaması ve etkin maddenin hedef hücrelerdeki sitotoksik etkinliğinin korunması ya da artırılması istenen temel parametreler arasındadır (20, 27). Bu kapsamda NAR çözeltisi, boş spanlastik ve NAR yüklü spanlastik (S5) formülasyonlarının RG2 sıçan GBM hücre hattı üzerindeki 24 saatlik sitotoksik etkileri 1–1000 µg/mL aralığında MTT testi ile değerlendirilmiştir (Tablo 4.8., Şekil 4.14.).

Şekil 4.14'ten de görüleceği üzere, NAR çözeltisi uygulanan hiçbir konsantrasyonda hücre canlılığı kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde azalmamış ($p>0,05$), en yüksek konsantrasyonda (1000 µg/mL) dahi canlılık %87,38±10,31 düzeyinde kalmıştır. Etkin madde 100 mM'lık DMSO stok çözeltisinden seyreltilerek uygulandığından ve vehikül kontrol grubunda anlamlı bir değişiklik gözlenmediğinden, bu durumun çözünürlük sınırlamasıyla ya da çözücüye bağlı bir etkiyle olduğu düşünülmemektedir. Literatürde serbest NAR'ın sitotoksik etkinliğinin hücre hattına güçlü biçimde bağımlı olduğu bildirilmektedir: IC_{50} değeri SNU-1 mide karsinomu hücrelerinde yaklaşık 20 µg/mL (181), HepG2 hepatoselüler karsinom hücrelerinde 172±10,39 µM (~100 µg/mL) (182), SiHa serviks kanseri hücrelerinde ise 750 µM (~435 µg/mL) olarak rapor edilmiş olup son çalışmada NAR'ın düşük konsantrasyonlarda proliferasyonu hiç etkilemediği, inhibisyonun ancak 250 µM'dan itibaren başladığı gösterilmiştir (183). Yirmi kattan fazla olan bu farklılık dikkate alındığında, tedaviye dirençli ve agresif bir GBM modeli olan RG2 hattında (151, 152) elde edilen bulgunun bu dağılımın dirençli ucunda yer aldığı değerlendirilmektedir. Bununla birlikte serbest NAR'ın çözünmüş halde ve yüksek konsantrasyonlarda bulunmasına karşılık etkisiz kalması, sınırlayıcı faktörün çözünürlük değil hücresel alım olduğunu düşündürmektedir; log P değeri −0,44 olan ve kısmen iyonize yapıdaki bu flavanon glikozitinin membrandan pasif difüzyonla geçişi sınırlıdır (34).

Hücre kültürü çalışmalarında boş spanlastik formülasyonunda düşük konsantrasyonlarda (1–25 µg/mL) canlılığın kontrol grubunun üzerine çıktığı ve 25 µg/mL'de %127,16±16,38 düzeyine ulaştığı saptanmıştır. MTT testi hücre sayısını değil

mitokondriyal dehidrogenaz aktivitesini ölçtüğünden, bu değerlerin gerçek bir proliferasyon artışından mı yoksa hücre başına metabolik aktivitenin yükselmesinden mi kaynaklandığı ayırt edilememektedir; noniyonik yüzey aktif maddelerin litik olmayan konsantrasyonlarda membran geçirgenliğini artırarak MTT alımını kolaylaştırması ya da Span 60 ve Tween 80'in yapısındaki stearik ve oleik asit zincirlerinin ek lipit kaynağı oluşturması olası nedenler arasındadır. Buna karşılık canlılığın 50 µg/mL'de %114,38±10,85 iken 100 µg/mL'de %50,95±4,9 düzeyine gerilemesi, noniyonik yüzey aktif maddelerin membran bütünlüğünü bozmasına bağlı taşıyıcı toksisitesinin bu aralıkta başladığını ortaya koymaktadır.

50 ve 100 µg/mL konsantrasyonda boş ve yüklü formülasyonlar arasında önemli bir fark ortaya çıkmıştır. 50 µg/mL konsantrasyonda boş spanlastik uygulaması ile elde edilen hücre canlılığı %114,38±10,85 iken bu değer NAR yüklü spanlastik formülasyonu uygulaması ile %46,24±5,58'e düşmüştür. 100 µg/mL konsantrasyonda hücre canlılığı boş ve dolu formülasyonlar için sırasıyla %50,95±4,9 ve n %27,72±4,28 olarak bulunmuştur. Taşıyıcı bileşimi iki grupta aynı olduğundan bu farkın enkapsüle NAR'dan kaynaklandığı değerlendirilmektedir. Boş formülasyonda gözlenen metabolik aktivite artışı iki grup arasındaki farkın büyüklüğünü bir miktar artırmış olabilir; ancak yüklü formülasyonun canlılığı kontrol grubuna kıyasla da %46,24'e düşürmesi, etkinin karşılaştırma grubundan bağımsız olduğunu göstermektedir. Aynı konsantrasyonlarda serbest NAR çözeltisinin %94,48±5,11 ve %97,39±5,11 değerleri vermesi, enkapsülasyonun etkin maddenin sitotoksik etkinliğini belirgin biçimde artırdığını ortaya koymaktadır. Bu artışın, spanlastiklerin nano boyutu ve esnek membran yapısı sayesinde endositoz yoluyla hücresel alımı kolaylaştırmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (27, 132). Hücre içine taşınan NAR kaspaz-3, -8 ve -9 aktivasyonu, Bax ve Bak artışı ile Bcl-2 ve Bcl-xL azalması yoluyla mitokondriyal ve ölüm reseptörü aracılı apoptozu tetiklediği (182, 183) ve PI3K/AKT yolağını bloke ederek hücre döngüsünü G_0/G_1 fazında durdurduğu (181) bildirildiğinden, gözlenen canlılık kaybının apoptotik mekanizmalarla ilişkili olabileceği değerlendirilmektedir. Elde edilen bulgularla paralel olarak, letrozol ve kuersetin yüklü spanlastiklerle MCF-7 hücrelerinde yürütülen bir çalışmada serbest letrozol için 38,8±2,0 µM olan IC_{50}

değeri enkapsülasyon sonrasında 3,9±0,2 µM'a gerilemiş, boş spanlastiklerin IC_{50} değerleri ise 108–215 µM aralığında bulunarak artan etkinliğin taşıyıcıdan değil hücresel alımdan kaynaklandığı sonucuna varılmıştır (125).

250 µg/mL ve üzerindeki konsantrasyonlarda boş ve yüklü formülasyonların uygulanması ile elde edilen canlılık değerlerinin birbirine yakın olması (250 µg/mL'de %21,04±1,10 ve %19,23±0,32; 1000 µg/mL'de %9,85±4,7 ve %10,05±4,29), yüksek dozlarda taşıyıcıya bağlı sitotoksisitenin etkin maddeye özgü etkiyi maskelediğini düşündürmektedir. Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, geliştirilen formülasyonun 50 µg/mL'de RG2 hücreleri üzerinde serbest NAR'a kıyasla belirgin biçimde artmış ve taşıyıcı toksisitesinden bağımsız bir sitotoksik etkinlik sergilediği sonucuna varılmıştır. Benzer şekilde, literatürde NAR'ın nanotaşıyıcı sistemlere yüklenmesinin hücresel penetrasyonunu ve beyin dokusuna taşınma etkinliğini artırabildiği bildirilmiştir (184). Bununla birlikte taşıyıcının 100 µg/mL ve üzerinde sitotoksik etki göstermesi, terapötik doz aralığının bu sınır dikkate alınarak belirlenmesi gerektiğine işaret etmektedir. MTT testinin metabolik aktiviteye dayalı olması nedeniyle bulguların hücre sayımı, kristal viyole ya da LDH salımı gibi yöntemlerle teyit edilmesi; ayrıca IC_{50} değerlerinin belirlendiği, daha uzun maruziyet sürelerini ve sağlıklı hücre hatlarıyla seçicilik analizlerini kapsayan ileri çalışmalar yapılabilir.

5.5. Stabilite Bulgularının Değerlendirilmesi

Veziküler ilaç taşıyıcı sistemlerin fiziksel stabilitesi, depolama süresince vezikül boyutu, polidispersite indeksi (PDI) ve zeta potansiyeli gibi fizikokimyasal özelliklerinin korunması açısından önem taşımaktadır. Özellikle veziküler sistemlerde meydana gelebilecek agregasyon, füzyon ve vezikül boyutu dağılımındaki değişiklikler, formülasyonların fiziksel stabilitesini olumsuz etkileyebilmektedir (171, 172). Bu doğrultuda, S2, S5 ve S9 formülasyonları 25 ± 2 °C ve 4 ± 2 °C koşullarında 30 gün süreyle incelenmiştir (Tablo 4.9.).

Stabilite çalışmalarında vezikül büyüklüğü değerlendirildiğinde S5 formülasyonunun başlangıçta 193,6 ± 7,45 nm olarak belirlenen ortalama vezikül boyutu, 30. gün sonunda oda koşullarında 186,86 ± 1,34 nm, buzdolabı koşullarında ise 182,37 ± 3,50 nm olarak saptanmıştır. Vezikül boyutunun her iki depolama koşulunda da 200 nm'nin altında kalması ve başlangıç değerine yakın seyretmesi, formülasyonun depolama süresince belirgin bir vezikül büyümesi göstermediğine işaret etmiş olup anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p>0,05$). Buna karşılık S9 formülasyonunun başlangıç vezikül boyutu 137,3 ± 2,013 nm iken oda koşullarında 30. gün sonunda 185,3 ± 1,73 nm'ye yükselmiştir. Bu durum, başlangıçta daha küçük vezikül boyutuna sahip olmanın tek başına daha yüksek fiziksel stabilite neden olmayabileceğini göstermiştir. Literatürde nanotaşıyıcı sistemlerin stabilitesinin yalnızca başlangıç vezikül boyutuna değil, yüzey özelliklerine ve formülasyon bileşimine bağlı olduğu belirtilmektedir (172).

Zeta potansiyeli, kolloidal sistemlerde partiküller arası elektrostatik etkileşimlerin değerlendirilmesinde kullanılan önemli parametrelerden biridir. Literatürde mutlak zeta potansiyeli değerinin yaklaşık 30 mV ve üzerinde olmasının elektrostatik stabilizasyon açısından olumlu bir gösterge olabileceği, ancak sterik stabilizasyonun da etkili olduğu yüzey etkin madde içeren sistemlerde bu parametrenin tek başına yeterli olmadığı bildirilmektedir (171). Bu çalışmada S5 formülasyonunun başlangıç zeta potansiyeli −39,8 ± 0,65 mV iken 30. gün sonunda oda koşullarında −37,2 ± 5,13 mV, buzdolabı koşullarında ise −39,4 ± 1,66 mV olarak belirlenmiştir. Zeta potansiyelinin yüksek negatif değerlerini koruması, formülasyonun yüzey yükü açısından stabil bir profil sergilediğini düşündürmektedir. Buna karşılık S9 formülasyonunun oda koşullarındaki zeta potansiyelinin −33,0 mV'den −15,5 mV'ye değişmesi, bu formülasyonun yüzey özelliklerinde daha belirgin değişiklikler meydana geldiğini göstermiştir.

Stabilite çalışmaları süresince PDI değerlerinde meydana gelen değişiklikler değerlendirildiğinde, S5 formülasyonunun başlangıçta 0,250 ± 0,010 olan PDI değerinin 30. gün sonunda oda koşullarında 0,222 ± 0,010 ve buzdolabı koşullarında

0,259 ± 0,034 olduğu belirlenmiştir. PDI değerlerinin her iki koşulda da 0,3'ün altında kalması, formülasyonun nispeten dar vezikül boyutu dağılımını koruduğunu göstermektedir. Nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemlerde PDI değerinin partikül boyutu dağılımının homojenliğini değerlendirmek açısından önemli olduğu bilinmektedir (172). Buna karşılık S9 formülasyonunun buzdolabı koşullarında 30. gün sonunda PDI değerinin 0,572 ± 0,008 olması, vezikül boyutu dağılımının S5'e kıyasla daha heterojen olduğunu ortaya koymuştur.

Elde edilen bulgular birlikte değerlendirildiğinde, S5 formülasyonunun 30 günlük depolama süresince her iki saklama koşulunda da vezikül boyutu, PDI ve zeta potansiyeli bakımından diğer formülasyonlara kıyasla daha tutarlı fizikokimyasal özellikler sergilediği belirlenmiştir. Bu sonuçlar, başlangıç karakterizasyon verileri doğrultusunda optimum olarak seçilen S5 formülasyonunun fiziksel stabilite açısından da uygun özellikler gösterdiğini desteklemektedir. Bununla birlikte, geliştirilen NAR yüklü spanlastik formülasyonunun uzun dönem stabilitesinin ve etkin madde içeriğinin depolama süresince korunmasının değerlendirilmesi için daha uzun süreli stabilite çalışmalarına ihtiyaç bulunmaktadır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Beyin tümörü tedavisinde tedavinin etkinliğini sınırlayan en önemli nedenlerden biri, KBB ve KTB'nin etkin maddelerin tümör dokusuna yeterli konsantrasyonda ulaşmasını engellemesidir. Antioksidan, antienflamatuvar ve antikanser etkileri bilinen doğal bir flavanon glikoziti olan NAR bu açıdan ilgi çekici bir adaydır. Ancak sudaki düşük çözünürlüğü, sınırlı membran geçirgenliği ve yüksek derecede metabolizasyona uğraması nedeniyle biyoyararlanımı oldukça düşüktür. Bu tez çalışmasında, NAR'ın bahsi geçen biyofarmasötik sınırlılıklarını aşmak amacıyla Span 60 ve Tween 80'den oluşan, esnek (deforme olabilen) spanlastik formülasyonları geliştirilmiş ve in vitro olarak değerlendirilmiştir.

- Çalışmanın ilk aşamasında, NAR miktar tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiş ve ICH Q2(R2) kılavuzuna göre valide edilmiştir. 0,5–12,5 µg/mL aralığında doğrusal (R^2 = 0,9992), doğru ve kesin olduğu gösterilen yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,054 µg/mL ve 0,181 µg/mL olarak belirlenmiş; formülasyonda kullanılan yardımcı maddelerin analizde herhangi bir girişim yapmadığı saptanmıştır. Böylece tez kapsamındaki tüm miktar tayinleri güvenilir bir analitik temele oturtulmuştur.
- Spanlastik formülasyonları etanol enjeksiyon yöntemiyle hazırlanmış, Tween 80 miktarı ve sonikasyon süresinin etkisi 3^2 tam faktöriyel tasarım ile incelenmiştir. Tween 80 miktarının ve sonikasyon süresinin artışı vezikül boyutunu genel olarak küçültmüş, ancak bu küçülme her zaman daha homojen bir dağılıma neden olmamıştır. Faktöriyel tasarımda yer alan 9 formülasyon arasından seçilen S2, S5 ve S9'un birlikte değerlendirilmesi sonucunda, 100 mg Span 60, 60 mg Tween 80 ve 5 dakika sonikasyon ile hazırlanan S5 formülasyonu optimum formülasyon olarak belirlenmiştir. S5'in vezikül büyüklüğü 193,6 ± 7,45 nm, PDI değeri 0,250 ± 0,010 ve zeta potansiyeli −39,8 ± 0,65 mV olarak bulunmuştur. Partikül boyutunun 200 nm'nin altında kalması beyin tümörüne yönelik bir taşıyıcı için istenen bir özelliktir. PDI değerinin dokuz formülasyon arasındaki en düşük değer olması

ise homojen bir vezikül popülasyonu elde edildiğini göstermektedir. Daha küçük vezikül boyutuna sahip S9'un seçilmemesinin nedeni, yüksek PDI ve daha düşük enkapsülasyon etkinliğidir.

- S5 formülasyonunda %EE %57,00 ± 1,40, LC ise %3,44 ± 0,17 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, kısmen iyonize yapıda ve log P değeri negatif olan bir glikozit için uygun düzeydedir. Deformabilite indeksinin Tween 80 miktarıyla birlikte arttığı ve S5'te 4,01 mg/s olduğu görülmüş, ekstrüzyon sonrası vezikül boyutundaki azalma da sistemin elastik yapısını desteklemiştir.
- FTIR analizinde yardımcı maddelere ait karakteristik bantlar korunmuş, NAR'ın taşıyıcı sistemle fiziksel olarak ilişkili olduğu ve bileşenler arasında belirgin bir kimyasal uyumsuzluk bulunmadığı sonucuna varılmıştır.
- SEM görüntülerinde veziküllerin küresele yakın bir morfolojide olduğu ve belirgin agregasyon göstermediği görülmüştür.
- İn vitro salım çalışmalarında serbest NAR 4. saatte tamamen çözünerek ortama geçerken, S5 formülasyonunda salım 24 saate uzamıştır. Tüm formülasyonlarda in vitro salım bifazik bir profil göstermiştir: ilk 2 saatte vezikül dışındaki ve yüzeye yakın etkin madde fraksiyonuna bağlı hızlı bir salım, ardından veziküler yapıda tutulan NAR'ın kademeli serbestleşmesi gözlenmiştir.
- RG2 sıçan GBM hücreleri üzerinde yapılan MTT çalışmalarında, NAR çözeltisi, 1000 µg/mL'ye kadar hiçbir konsantrasyonda hücre canlılığını anlamlı ölçüde azaltmamıştır. Buna karşılık NAR yüklü spanlastik, 50 µg/mL'de hücre canlılığını %46,24'e, 100 µg/mL'de ise %27,72'ye düşürmüştür. Aynı konsantrasyonlarda serbest NAR çözeltisi ile canlılık %94–97 düzeyinde kalmış, boş spanlastik grubunda ise 50 µg/mL'de hücre canlılığını etkilememiştir. Taşıyıcı bileşimi iki grupta aynı olduğundan, aradaki farkın enkapsüle NAR'dan kaynaklandığı değerlendirilmiştir. Bu sonuç, serbest haldeyken RG2 hücrelerine yeterince ulaşamayan NAR'ın spanlastik veziküller içinde hücre içine daha etkin şekilde taşındığını düşündürmektedir. Öte yandan boş taşıyıcının 100 µg/mL ve

üzerinde kendi başına sitotoksik etki göstermesi, ileride terapötik doz aralığı belirlenirken bu sınırın dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

- Geliştirilen optimum formülasyon (S5) 0,22 µm filtrasyon ile steril edilmiş; 14 günlük sterilite testinde her iki besiyerinde de üreme gözlenmemiştir.
- 30 günlük stabilite çalışmasında S5 formülasyonunda hem oda koşullarında (25 ± 2 °C) hem de buzdolabı koşullarında (4 ± 2 °C) vezikül boyutu 200 nm'nin altında, PDI değerini 0,3'ün altında tespit edilmiş ve zeta potansiyelinin yüksek negatif değerleri korumuştur. Başlangıçta en küçük boyuta sahip S9 formülasyonunda ise oda koşullarında belirgin vezikül büyümesi ve zeta potansiyelinde kayda değer düşüş görülmüştür.
- Sonuç olarak; bu tez çalışmasında geliştirilen NAR yüklü spanlastik formülasyonu, uygun vezikül boyutu, homojen dağılımı, iyi kolloidal stabilitesi, esnek yapısı ve uzatılmış salım profiliyle beyin tümörüne yönelik bir ilaç taşıyıcı sistemden beklenen temel özellikleri karşılamaktadır. Serbest haldeyken RG2 hücrelerinde düşük bir sitotoksik etki gösteren NAR, spanlastik veziküllere yüklendiğinde belirgin bir sitotoksik etki göstermiştir. Bu bulgu, doğal kaynaklı ve güvenli bir molekül olan NAR'ın uygun bir nanotaşıyıcıyla GBM tedavisinde değerlendirilebilecek bir aday haline gelebileceğini göstermektedir. Gelecekte *in vivo* etkililik ve güvenlik çalışmalarının yapılarak formülasyonun etkinliği üzerinde daha detaylı bilgi elde edilmesi planlanmaktadır.

7. KAYNAKLAR

1. Weller M, Wen PY, Chang SM, Dirven L, Lim M, Monje M, et al. Glioma. Nature reviews Disease primers. 2024;10(1):33.
2. Wen PY, Weller M, Lee EQ, Touat M, Khasraw M, Rahman R, et al. Glioblastoma in adults: A Society for Neuro-Oncology (SNO) and European Society of Neuro-Oncology (EANO) consensus review on current management and future directions. Neuro-Oncology. 2025;27(11):2751–88.
3. Price M, Ballard C, Benedetti J, Neff C, Cioffi G, Waite KA, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2017-2021. Neuro-oncology. 2024;26(Supplement_6):vi1–vi85.
4. Gritsch S, Batchelor TT, Gonzalez Castro LN. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. Cancer. 2022;128(1):47–58.
5. Louis DN, Perry A, Wesseling P, Brat DJ, Cree IA, Figarella-Branger D, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. Neuro-oncology. 2021;23(8):1231–51.
6. Stupp R, Mason WP, Van Den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. New England journal of medicine. 2005;352(10):987–96.
7. Delgado-López P, Corrales-García E. Survival in glioblastoma: a review on the impact of treatment modalities. Clinical and Translational Oncology. 2016;18(11):1062–71.
8. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. Neurobiol Dis. 2004;16(1):1–13.
9. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. Neurobiol Dis. 2010;37(1):13–25.
10. Kadry H, Noorani B, Cucullo L. A blood-brain barrier overview on structure, function, impairment, and biomarkers of integrity. Fluids Barriers CNS. 2020;17(1):69.
11. Mokarram N, Case A, Hossainy NN, Lyon JG, MacDonald TJ, Bellamkonda R. Device-assisted strategies for drug delivery across the blood-brain barrier to treat glioblastoma. Communications Materials. 2025;6:5.
12. Banks WA. From blood-brain barrier to blood-brain interface: new opportunities for CNS drug delivery. Nat Rev Drug Discov. 2016;15(4):275–92.
13. Pandit R, Chen L, Götz J. The blood-brain barrier: Physiology and strategies for drug delivery. Adv Drug Deliv Rev. 2020;165-166:1–14.
14. Arvanitis CD, Ferraro GB, Jain RK. The blood-brain barrier and blood-tumour barrier in brain tumours and metastases. Nat Rev Cancer. 2020;20(1):26–41.
15. Lockman PR, Mittapalli RK, Taskar KS, Rudraraju V, Gril B, Bohn KA, et al. Heterogeneous blood-tumor barrier permeability determines drug efficacy in experimental brain metastases of breast cancer. Clin Cancer Res. 2010;16(23):5664–78.

16. Lu CT, Zhao YZ, Wong HL, Cai J, Peng L, Tian XQ. Current approaches to enhance CNS delivery of drugs across the brain barriers. Int J Nanomedicine. 2014;9:2241–57.
17. Teleanu DM, Chircov C, Grumezescu AM, Volceanov A, Teleanu RI. Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology. Pharmaceutics. 2018;10(4).
18. Sim S, Wong NK. Nanotechnology and its use in imaging and drug delivery (Review). Biomed Rep. 2021;14(5):42.
19. Limongi T, Susa F, Marini M, Allione M, Torre B, Pisano R, et al. Lipid-Based Nanovesicular Drug Delivery Systems. Nanomaterials (Basel). 2021;11(12).
20. Altemimy R, M.Ghareeb M. Spanlastics for Targeted CNS Drug Delivery. Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences. 2025;34:1–11.
21. Wang K, Sun J, Zhao H, Wang F, Zhang X, Zhao X, et al. Advances and Challenges in Nano-Delivery Systems for Glioblastoma Treatment: A Comprehensive Review. Int J Nanomedicine. 2025;20:9597–620.
22. Barbu E, Molnàr E, Tsibouklis J, Górecki DC. The potential for nanoparticle-based drug delivery to the brain: overcoming the blood-brain barrier. Expert Opin Drug Deliv. 2009;6(6):553–65.
23. Suri SS, Fenniri H, Singh B. Nanotechnology-based drug delivery systems. J Occup Med Toxicol. 2007;2:16.
24. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. Drug Deliv Transl Res. 2022;12(4):758–91.
25. Almuqbil RM, Sreeharsha N, Nair AB. Formulation-by-Design of Efinaconazole Spanlastic Nanovesicles for Transungual Delivery Using Statistical Risk Management and Multivariate Analytical Techniques. Pharmaceutics. 2022;14(7):1419.
26. Fadaei MS, Fadaei MR, Kheirieh AE, Rahmanian-Devin P, Dabbaghi MM, Nazari Tavallaei K, et al. Niosome as a promising tool for increasing the effectiveness of anti-inflammatory compounds. Excli j. 2024;23:212–63.
27. Saini H, Rapolu Y, Razdan K, Nirmala, Sinha VR. Spanlastics: a novel elastic drug delivery system with potential applications via multifarious routes of administration. J Drug Target. 2023;31(10):999–1012.
28. Khan A, Varshney C, Chaudhary T, Singh B, Nagarajan K. Spanlastics: an innovative formulation strategy in pharmaceutical drug delivery. World J Pharm Res. 2023;12(20):219–34.
29. Alharbi WS, Hareeri RH, Bazuhair M, Alfaleh MA, Alhakamy NA, Fahmy UA, et al. Spanlastics as a Potential Platform for Enhancing the Brain Delivery of Flibanserin: In Vitro Response-Surface Optimization and In Vivo Pharmacokinetics Assessment. Pharmaceutics. 2022;14(12).
30. Ravetti S, Garro AG, Gaitán A, Murature M, Galiano M, Brignone SG, et al. Naringin: nanotechnological strategies for potential pharmaceutical applications. Pharmaceutics. 2023;15(3):863.
31. He J, Zhang H-P. Research progress on the anti-tumor effect of Naringin. Frontiers in Pharmacology. 2023;Volume 14 - 2023.

32. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. J Inherit Metab Dis. 2013;36(3):437–49.
33. Stabrauskiene J, Kopustinskiene DM, Lazauskas R, Bernatoniene J. Naringin and naringenin: Their mechanisms of action and the potential anticancer activities. Biomedicines. 2022;10(7):1686.
34. Information NCfB. Naringin: National Library of Medicine (NLM); 2026 [Available from: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Naringin.
35. Bharti S, Rani N, Krishnamurthy B, Arya DS. Preclinical evidence for the pharmacological actions of naringin: a review. Planta medica. 2014;80(06):437–51.
36. Organization WH. Cancer 2026 [Available from: https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1.
37. UK CR. Worldwide cancer statistics [Available from: https://www.cancerresearchuk.org/health-professional/cancer-statistics/worldwide-cancer.
38. Sung H, Filho AM, Laversanne M, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2024: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 34 cancers in 186 countries. CA: A Cancer Journal for Clinicians. 2026;76(4):e70090.
39. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: a cancer journal for clinicians. 2024;74(3):229–63.
40. Hardwidge C, Hettige S. Tumours of the central nervous system. Surgery (Oxford). 2012;30(3):155–61.
41. McFaline-Figueroa JR, Lee EQ. Brain tumors. The American journal of medicine. 2018;131(8):874–82.
42. Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, et al. Brain metastases. Nature reviews Disease primers. 2019;5(1):5.
43. Filho AM, Znaor A, Sunguc C, Zahwe M, Marcos-Gragera R, Figueroa JD, et al. Cancers of the brain and central nervous system: global patterns and trends in incidence. Journal of neuro-oncology. 2025;172(3):567–78.
44. (CBTRUS) CBTRotUS. CBTRUS Fact Sheet 2025 2025 [Available from: https://cbtrus.org/?p=2350.
45. Ostrom QT, Adel Fahmideh M, Cote DJ, Muskens IS, Schraw JM, Scheurer ME, et al. Risk factors for childhood and adult primary brain tumors. Neuro-oncology. 2019;21(11):1357–75.
46. Królikowska K, Błaszczak K, Ławicki S, Zajkowska M, Gudowska-Sawczuk M. Glioblastoma—A Contemporary Overview of Epidemiology, Classification, Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment: A Review Article. International Journal of Molecular Sciences. 2025;26(24):12162.
47. Wong ET, Lok E, Swanson KD. An evidence-based review of alternating electric fields therapy for malignant gliomas. Current Treatment Options in Oncology. 2015;16(8):40.

48. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, et al. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. Genes & development. 2007;21(21):2683–710.
49. Grochans S, Cybulska AM, Simińska D, Korbecki J, Kojder K, Chlubek D, et al. Epidemiology of glioblastoma multiforme–literature review. Cancers. 2022;14(10):2412.
50. Zhai K, Siddiqui M, Abdellatif B, Liskova A, Kubatka P, Büsselberg D. Natural compounds in glioblastoma therapy: Preclinical insights, mechanistic pathways, and outlook. Cancers. 2021;13(10):2317.
51. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. Acta neuropathologica. 2016;131(6):803–20.
52. Weller M, van den Bent M, Preusser M, Le Rhun E, Tonn JC, Minniti G, et al. EANO guidelines on the diagnosis and treatment of diffuse gliomas of adulthood. Nature Reviews Clinical Oncology. 2021;18(3):170–86.
53. Vaz-Salgado MA, Villamayor M, Albarrán V, Alía V, Sotoca P, Chamorro J, et al. Recurrent Glioblastoma: A Review of the Treatment Options. Cancers (Basel). 2023;15(17).
54. Gallego O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. Curr Oncol. 2015;22(4):e273–81.
55. Dhermain F. Radiotherapy of high-grade gliomas: current standards and new concepts, innovations in imaging and radiotherapy, and new therapeutic approaches. Chin J Cancer. 2014;33(1):16–24.
56. Khosla D. Concurrent therapy to enhance radiotherapeutic outcomes in glioblastoma. Ann Transl Med. 2016;4(3):54.
57. Ahmed MH, Canney M, Carpentier A, Thanou M, Idbaih A. Unveiling the enigma of the blood-brain barrier in glioblastoma: current advances from preclinical and clinical studies. Curr Opin Oncol. 2023;35(6):522–8.
58. Pu J, Yuan K, Tao J, Qin Y, Li Y, Fu J, et al. Glioblastoma multiforme: an updated overview of temozolomide resistance mechanisms and strategies to overcome resistance. Discov Oncol. 2025;16(1):731.
59. Wu D, Chen Q, Chen X, Han F, Chen Z, Wang Y. The blood-brain barrier: structure, regulation, and drug delivery. Signal Transduct Target Ther. 2023;8(1):217.
60. Patel MM, Patel BM. Crossing the Blood-Brain Barrier: Recent Advances in Drug Delivery to the Brain. CNS Drugs. 2017;31(2):109–33.
61. Upton DH, Ung C, George SM, Tsoli M, Kavallaris M, Ziegler DS. Challenges and opportunities to penetrate the blood-brain barrier for brain cancer therapy. Theranostics. 2022;12(10):4734–52.
62. Harati R, Villégier AS, Banks WA, Mabondzo A. Susceptibility of juvenile and adult blood-brain barrier to endothelin-1: regulation of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein expression and transport activity. J Neuroinflammation. 2012;9:273.

63. Cai Z, Qiao PF, Wan CQ, Cai M, Zhou NK, Li Q. Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease. J Alzheimers Dis. 2018;63(4):1223–34.
64. Greene C, Campbell M. Tight junction modulation of the blood brain barrier: CNS delivery of small molecules. Tissue Barriers. 2016;4(1):e1138017.
65. Daneman R, Prat A. The blood-brain barrier. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015;7(1):a020412.
66. Pardridge WM. Drug transport across the blood-brain barrier. J Cereb Blood Flow Metab. 2012;32(11):1959–72.
67. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. Trends Neurosci. 2001;24(12):719–25.
68. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. Semin Cell Dev Biol. 2015;38:16–25.
69. Hashimoto Y, Tachibana K, Kondoh M. Tight junction modulators for drug delivery to the central nervous system. Drug Discov Today. 2020;25(8):1477–86.
70. Yu X, Ji C, Shao A. Neurovascular Unit Dysfunction and Neurodegenerative Disorders. Front Neurosci. 2020;14:334.
71. Schlageter KE, Molnar P, Lapin GD, Groothuis DR. Microvessel Organization and Structure in Experimental Brain Tumors: Microvessel Populations with Distinctive Structural and Functional Properties. Microvascular Research. 1999;58(3):312–28.
72. Pinkiewicz M, Pinkiewicz M, Walecki J, Zaczyński A, Zawadzki M. Breaking Barriers in Neuro-Oncology: A Scoping Literature Review on Invasive and Non-Invasive Techniques for Blood-Brain Barrier Disruption. Cancers (Basel). 2024;16(1).
73. Sarashina A, Sesoko S, Nakashima M, Hayashi N, Taniguchi A, Horie Y, et al. Linagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in development for the treatment of type 2 diabetes mellitus: A phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of single and multiple escalating doses in healthy adult male Japanese subjects. Clinical Therapeutics. 2010;32(6):1188–204.
74. Beauchesne P. Intrathecal chemotherapy for treatment of leptomeningeal dissemination of metastatic tumours. Lancet Oncol. 2010;11(9):871–9.
75. Kadoch C, Li J, Wong VS, Chen L, Cha S, Munster P, et al. Complement activation and intraventricular rituximab distribution in recurrent central nervous system lymphoma. Clin Cancer Res. 2014;20(4):1029–41.
76. Oberkampf F, Gutierrez M, Trabelsi Grati O, Le Rhun É, Trédan O, Turbiez I, et al. Phase II study of intrathecal administration of trastuzumab in patients with HER2-positive breast cancer with leptomeningeal metastasis. Neuro-Oncology. 2023;25(2):365–74.
77. Patel B, Yang PH, Kim AH. The effect of thermal therapy on the blood-brain barrier and blood-tumor barrier. Int J Hyperthermia. 2020;37(2):35–43.
78. Bartlett S, Nagaraja TN, Griffith B, Farmer KG, Van Harn M, Haider S, et al. Persistent Peri-Ablation Blood-Brain Barrier Opening After Laser Interstitial Thermal Therapy for Brain Tumors. Cureus. 2023;15(4):e37397.

79. Skandalakis GP, Rivera DR, Rizea CD, Bouras A, Jesu Raj JG, Bozec D, et al. Hyperthermia treatment advances for brain tumors. International Journal of Hyperthermia. 2020;37(2):3–19.
80. Brem H, Piantadosi S, Burger PC, Walker M, Selker R, Vick NA, et al. Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. Lancet. 1995;345(8956):1008–12.
81. Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. Adv Drug Deliv Rev. 2012;64(7):640–65.
82. Pardridge WM. Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain. Front Aging Neurosci. 2019;11:373.
83. Pardridge WM. New approaches to drug delivery through the blood-brain barrier. Trends Biotechnol. 1994;12(6):239–45.
84. Kang YS, Pardridge WM. Brain delivery of biotin bound to a conjugate of neutral avidin and cationized human albumin. Pharm Res. 1994;11(9):1257–64.
85. Patel MM, Goyal BR, Bhadada SV, Bhatt JS, Amin AF. Getting into the brain: approaches to enhance brain drug delivery. CNS Drugs. 2009;23(1):35–58.
86. Yohan D, Chithrani D. Applications of Nanoparticles in Nanomedicine. Journal of Biomedical Nanotechnology. 2015;10.
87. Pardridge WM. A Historical Review of Brain Drug Delivery. Pharmaceutics. 2022;14(6):1283.
88. Ndemazie NB, Inkoom A, Morfaw EF, Smith T, Aghimien M, Ebesoh D, et al. Multi-disciplinary Approach for Drug and Gene Delivery Systems to the Brain. AAPS PharmSciTech. 2021;23(1):11.
89. Kroto H, Heath J, O'brien S, Curl R, Smalley R. This week's citation classic®. Nature. 1985;318(162):22.
90. Allhoff F, Lin P, Moore D. What Is Nanotechnology and Why Does It Matter? From Science to Ethics. Oxford: Wiley-Blackwell; 2010.
91. Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities. Adv Drug Deliv Rev. 2006;58(14):1456–9.
92. Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. J Control Release. 2000;65(1-2):271–84.
93. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev. 2014;66:2–25.
94. Owens DE, 3rd, Peppas NA. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. Int J Pharm. 2006;307(1):93–102.
95. Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. Mol Pharm. 2008;5(4):505–15.
96. Fang J, Nakamura H, Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. Adv Drug Deliv Rev. 2011;63(3):136–51.

97. Saraiva C, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. J Control Release. 2016;235:34–47.
98. Abdelsalam NA, Ramadan AT, ElRakaiby MT, Aziz RK. Toxicomicrobiomics: The Human Microbiome vs. Pharmaceutical, Dietary, and Environmental Xenobiotics. Frontiers in Pharmacology. 2020;Volume 11 - 2020.
99. Agrahari V, Burnouf PA, Burnouf T, Agrahari V. Nanoformulation properties, characterization, and behavior in complex biological matrices: Challenges and opportunities for brain-targeted drug delivery applications and enhanced translational potential. Adv Drug Deliv Rev. 2019;148:146–80.
100. Mall J, Naseem N, Haider MF, Rahman MA, Khan S, Siddiqui SN. Nanostructured lipid carriers as a drug delivery system: A comprehensive review with therapeutic applications. Intelligent Pharmacy. 2025;3(4):243–55.
101. Zhang TT, Li W, Meng G, Wang P, Liao W. Strategies for transporting nanoparticles across the blood-brain barrier. Biomater Sci. 2016;4(2):219–29.
102. Beach MA, Nayanathara U, Gao Y, Zhang C, Xiong Y, Wang Y, et al. Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. Chem Rev. 2024;124(9):5505–616.
103. Wang J, Li Y, Nie G. Multifunctional biomolecule nanostructures for cancer therapy. Nature Reviews Materials. 2021;6(9):766–83.
104. Trinh H, Joseph M, Cholkar K, Mitra R, Mitra A. Emerging nanotechnologies for diagnostics, drug delivery and medical devices. Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices: Elsevier; 2017.
105. Lu Y, Zhang E, Yang J, Cao Z. Strategies to improve micelle stability for drug delivery. Nano Res. 2018;11(10):4985–98.
106. Viegas C, Patrício AB, Prata JM, Nadhman A, Chintamaneni PK, Fonte P. Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. Pharmaceutics. 2023;15(6):1593.
107. Ghasemiyeh P, Mohammadi-Samani S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. Res Pharm Sci. 2018;13(4):288–303.
108. Ansari MD, Saifi Z, Pandit J, Khan I, Solanki P, Sultana Y, et al. Spanlastics a Novel Nanovesicular Carrier: Its Potential Application and Emerging Trends in Therapeutic Delivery. AAPS PharmSciTech. 2022;23(4):112.
109. Jain S, Jain V, Mahajan SC. Lipid Based Vesicular Drug Delivery Systems. Advances in Pharmaceutics. 2014;2014(1):574673.
110. Antonara L, Triantafyllopoulou E, Chountoulesi M, Pippa N, Dallas PP, Rekkas DM. Lipid-Based Drug Delivery Systems: Concepts and Recent Advances in Transdermal Applications. Nanomaterials. 2025;15(17):1326.
111. Imam SS, Aqil M, Akhtar M, Sultana Y, Ali A. Formulation by design-based proniosome for accentuated transdermal delivery of risperidone: in vitro characterization and in vivo pharmacokinetic study. Drug delivery. 2015;22(8):1059–70.
112. Prajapati ST, Patel CG, Patel CN. Transfersomes: a vesicular carrier system for transdermal drug delivery. Asian Journal of Biochemical and Pharmaceutical Research. 2011;1(2):507–24.

113. Gavali SM, Pacharane SS, Jadhav KR, Kadam VJ. Clinical P transfersome: a new technique for transdermal drug delivery. International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry. 2011;1(3):735–40.
114. Kakkar S, Kaur IP. Spanlastics—A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery. International journal of pharmaceutics. 2011;413(1-2):202–10.
115. Badria F, Mazyed E. Formulation of nanospanlastics as a promising approach for improving the topical delivery of a natural leukotriene inhibitor (3- Acetyl-11-Keto-β-Boswellic Acid): Statistical optimization, in vitro characterization, and ex vivo permeation study. Drug design, development and therapy. 2020:3697–721.
116. Chauhan MK, Khanna G. Recent advance of nanotechnology for the treatment of ocular disease. World J Pharm Res. 2018;7(15):239–57.
117. Farghaly DA, Aboelwafa AA, Hamza MY, Mohamed MI. Topical Delivery of Fenoprofen Calcium via Elastic Nano-vesicular Spanlastics: Optimization Using Experimental Design and In Vivo Evaluation. AAPS PharmSciTech. 2017;18(8):2898–909.
118. Saleh A, Khalifa M, Shawky S, Bani-Ali A, Eassa H. Zolmitriptan Intranasal Spanlastics for Enhanced Migraine Treatment; Formulation Parameters Optimized via Quality by Design Approach. Scientia Pharmaceutica. 2021;89(2):24.
119. Gaafar PM, Abdallah OY, Farid RM, Abdelkader H. Preparation, characterization and evaluation of novel elastic nano-sized niosomes (ethoniosomes) for ocular delivery of prednisolone. Journal of liposome research. 2014;24(3):204–15.
120. ElMeshad AN, Mohsen AM. Enhanced corneal permeation and antimycotic activity of itraconazole against Candida albicans via a novel nanosystem vesicle. Drug delivery. 2016;23(7):2115–23.
121. Maiti B, Kakkar S, Kaur I, Basha M, Abd El-Alim S. Preparation of an anti-inflammatory agent in different dosage forms for topical application a thesis presented By. Int J Pharm. 2019;18(1):70–7.
122. Abdelrahman FE, Elsayed I, Gad MK, Elshafeey AH, Mohamed MI. Response surface optimization, ex vivo and in vivo investigation of nasal spanlastics for bioavailability enhancement and brain targeting of risperidone. International journal of pharmaceutics. 2017;530(1-2):1–11.
123. Shahab MS, Rizwanullah M, Alshehri S, Imam SS. Optimization to development of chitosan decorated polycaprolactone nanoparticles for improved ocular delivery of dorzolamide: In vitro, ex vivo and toxicity assessments. Int J Biol Macromol. 2020;163:2392–404.
124. Sahin S, Sarma S, Das A, Baishya B, Das AK, Deka MK. Spanlastics ocular delivery: a comprehensive review of formulation and therapeutic potential. Discover Pharmaceutical Sciences. 2025;1(1):9.
125. Mekkawy AI, Eleraky NE, Soliman GM, Elnaggar MG, Elnaggar MG. Combinatorial Therapy of Letrozole- and Quercetin-Loaded Spanlastics for Enhanced Cytotoxicity against MCF-7 Breast Cancer Cells. Pharmaceutics. 2022;14(8).

126. Allémann E, Leroux J, Gurny R. Polymeric nano- and microparticles for the oral delivery of peptides and peptidomimetics. Adv Drug Deliv Rev. 1998;34(2-3):171–89.
127. Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim JT, Kim H, et al. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2014;9(6):304–16.
128. Shahiwala A, Vyas TK, Amiji MM. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2007;1(1):1–9.
129. Lee VH. Enzymatic barriers to peptide and protein absorption. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1988;5(2):69–97.
130. Kaur IP, Rana C, Singh M, Bhushan S, Singh H, Kakkar S. Development and evaluation of novel surfactant-based elastic vesicular system for ocular delivery of fluconazole. J Ocul Pharmacol Ther. 2012;28(5):484–96.
131. Almohamady HI, Mortagi Y, Gad S, Zaitone S, Alshaman R, Alattar A, et al. Spanlastic Nano-Vesicles: A Novel Approach to Improve the Dissolution, Bioavailability, and Pharmacokinetic Behavior of Famotidine. Pharmaceuticals. 2024;17(12):1614.
132. Gupta I, Adin SN, Rashid MA, Alhamhoom Y, Aqil M, Mujeeb M. Spanlastics as a Potential Approach for Enhancing the Nose-To-Brain Delivery of Piperine: In Vitro Prospect and In Vivo Therapeutic Efficacy for the Management of Epilepsy. Pharmaceutics. 2023;15(2):641.
133. Doe E, Alabi A, Chakka LRJ, Maniruzzaman M. Fresh 3D Printing of Spanlastics Hydrogel for Drug Delivery Applications In Vitro. Pharmaceutical Research. 2026;43(7):2243–56.
134. Abdelfattah S, Mady FM, Sarhan HA, Khalifa HO, Hashem H, Hassan H, et al. Topical delivery of meropenem via spanlastic carbopol gel: in-vitro studies and in-vivo application in pressure ulcers. Frontiers in Pharmacology. 2025;Volume 16 - 2025.
135. Shilpa V, Shams R, Dash KK, Pandey VK, Dar AH, Ayaz Mukarram S, et al. Phytochemical Properties, Extraction, and Pharmacological Benefits of Naringin: A Review. Molecules. 2023;28(15):5623.
136. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. Nutrition. 2002;18(1):75–81.
137. Aron PM, Kennedy JA. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. Molecular nutrition & food research. 2008;52(1):79–104.
138. Xu F, Liu Y, Zhang Z, Yang C, Tian Y. Quasi-MSn identification of flavanone 7-glycoside isomers in Da Chengqi Tang by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Chin Med. 2009;4:15.
139. Shabir G. Step-by-step analytical methods validation and protocol in the quality system compliance industry. Journal of validation technology. 2004;10:314–24.
140. Aziz D, Mohamed SA, Tayel S, Makhlouf A. Enhanced Ocular Anti-Aspergillus Activity of Tolnaftate Employing Novel Cosolvent-Modified Spanlastics: Formulation, Statistical Optimization, Kill Kinetics, Ex Vivo Trans-Corneal Permeation, In Vivo Histopathological and Susceptibility Study. Pharmaceutics. 2022;14(8).

141. Ali A, Abdelhafez W, Saleh K, Mohammed A. PREPARATION AND EVALUATION OF DIFFERENT RUTIN LOADED SPANLASTIC SYSTEMS FOR TOPICAL TREATMENT OF BEDSORES. Al-Azhar Journal of Pharmaceutical Sciences. 2024;70:1–27.
142. Salamah M, Budai-Szűcs M, Sipos B, Volk B, Katona G, Balogh GT, et al. Development and Characterization of In Situ Gelling Nasal Cilostazol Spanlastics. Gels. 2025;11(2).
143. Rathod S, Arya S, Shukla R, Ray D, Aswal VK, Bahadur P, et al. Investigations on the role of edge activator upon structural transitions in Span vesicles. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2021;627:127246.
144. Sagare R, Souza K, Dasankoppa Fs, Akki P, Sholapur H, Sagare R. FORMULATION AND EVALUATION OF NARINGENIN-LOADED SPANLASTICS TOPICAL GEL FOR THE TREATMENT OF ACNE VULGARIS. Genetics and Molecular Research. 2026.
145. Cambraia Garms B, Poli H, Baggley D, Han F, Whittaker A, A A, et al. Evaluating the effect of synthesis, isolation, and characterisation variables on reported particle size and dispersity of drug loaded PLGA nanoparticles. Materials Advances. 2021;2.
146. Alotaibi BS, El-Masry TA, El-Bouseary MM, El Zahaby EI, Wahsh E, Saleh A, et al. Evaluation of the efficacy of rutin, rutin nanocrystals, and rutin spanlastics nanoparticles as antitumor and antioxidant drug delivery systems. Discov Nano. 2026;21(1).
147. Zaid Alkilani A, Alkhaldi R, Basheer HA, Amro BI, Alhusban MA. Fabrication of Thymoquinone and Ascorbic Acid-Loaded Spanlastics Gel for Hyperpigmentation: In Vitro Release, Cytotoxicity, and Skin Permeation Studies. Pharmaceutics. 2025;17(1).
148. Hamzah Ml, Mahal RK, Abbas IK, Fawzi HA. Spanlastics as an efficient delivery system for the enhancement of Nilotinib anticancer efficacy: Design, fabrication, and cytotoxic studies against chronic myeloid leukemia. OpenNano. 2026.
149. World Health Organization. Test for sterility. World Health Organization; 2012. Report No.: QAS/11.413.
150. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983;65(1-2):55–63.
151. Ahlstedt J, Förnvik K, Zolfaghari S, Kwak D, Hammarström LGJ, Ernfors P, et al. Evaluating vacquinol-1 in rats carrying glioblastoma models RG2 and NS1. Oncotarget. 2018;9(9):8391–9.
152. Haddad AF, Young JS, Amara D, Berger MS, Raleigh DR, Aghi MK, et al. Mouse models of glioblastoma for the evaluation of novel therapeutic strategies. Neurooncol Adv. 2021;3(1):vdab100.
153. Ramalho MJ, Loureiro JA, Coelho MAN, Pereira MC. Transferrin Receptor-Targeted Nanocarriers: Overcoming Barriers to Treat Glioblastoma. Pharmaceutics. 2022;14(2).
154. Sojan A, Ekaette I. Optimization and Characterization of Naringin-Loaded Microcapsules Prepared With Caramel Polymer via Anti-Solvent Precipitation. Food Chemistry International. 2025;1:294–307.

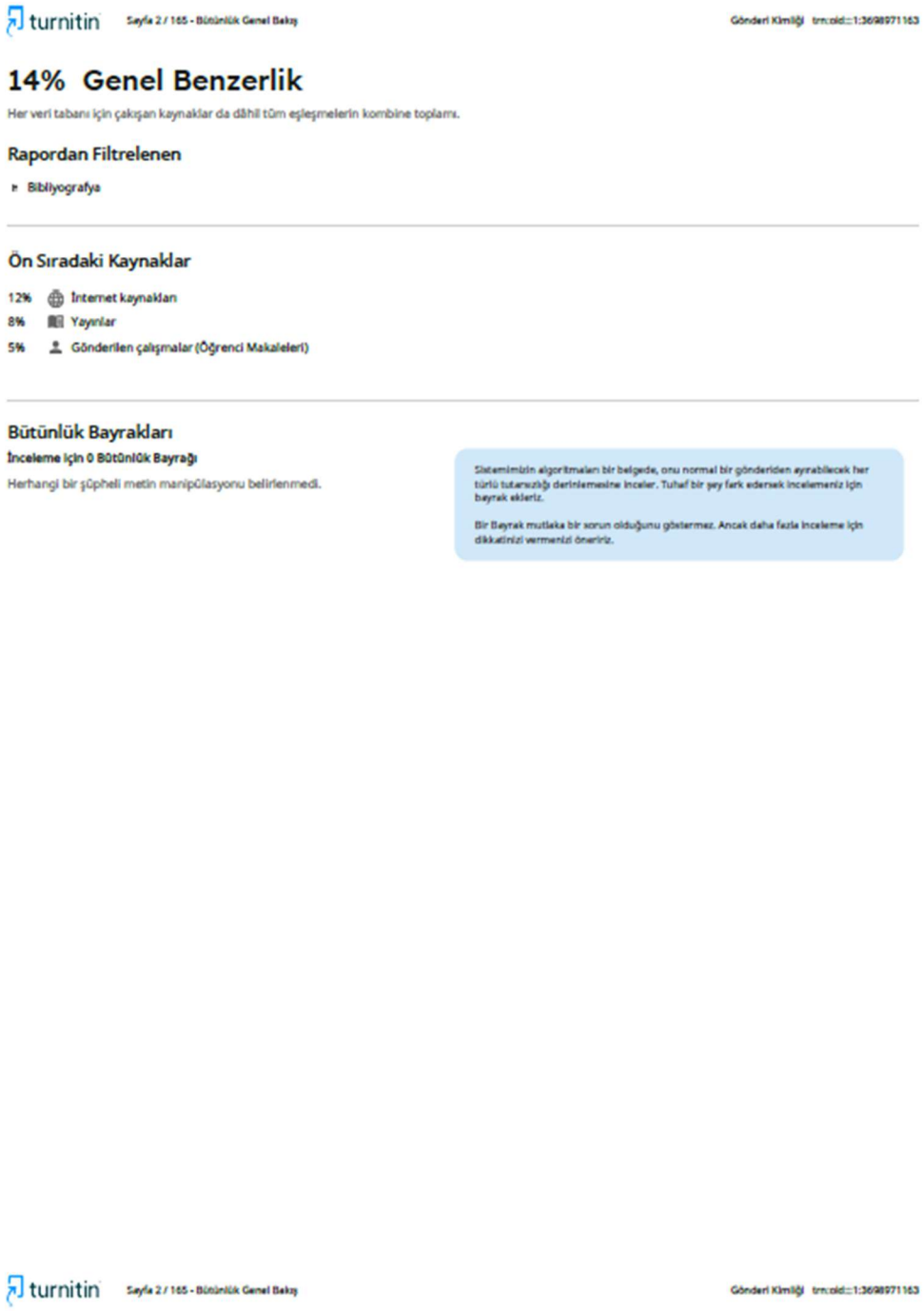
155. Mekkawy AI, Eleraky NE, Soliman GM, Elnaggar MG, Elnaggar MG. Combinatorial Therapy of Letrozole- and Quercetin-Loaded Spanlastics for Enhanced Cytotoxicity against MCF-7 Breast Cancer Cells. Pharmaceutics. 2022;14(8):1727.
156. Ganz JC. Low grade gliomas. Prog Brain Res. 2022;268(1):271–7.
157. Yan Y, Xu Z, Dai S, Qian L, Sun L, Gong Z. Targeting autophagy to sensitive glioma to temozolomide treatment. J Exp Clin Cancer Res. 2016;35:23.
158. Zhao M, van Straten D, Broekman MLD, Préat V, Schiffelers RM. Nanocarrier-based drug combination therapy for glioblastoma. Theranostics. 2020;10(3):1355–72.
159. Zeng X, Yao H, Zheng Y, He Y, He Y, Rao H, et al. Tissue distribution of naringin and derived metabolites in rats after a single oral administration. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2020;1136:121846.
160. Abdelbari MA, El-Mancy SS, Elshafeey AH, Abdelbary AA. Implementing Spanlastics for Improving the Ocular Delivery of Clotrimazole: In vitro Characterization, Ex vivo Permeability, Microbiological Assessment and In vivo Safety Study. Int J Nanomedicine. 2021;16:6249–61.
161. Annu, Sartaj A, Qamar Z, Md S, Alhakamy NA, Baboota S, et al. An Insight to Brain Targeting Utilizing Polymeric Nanoparticles: Effective Treatment Modalities for Neurological Disorders and Brain Tumor. Front Bioeng Biotechnol. 2022;10:788128.
162. Dixit S, Aggarwal K, Nagpal K. Development and Validation of UV Spectrophotometric Method for the Estimation of Naringin in Bulk Followed by Its Solubility Study. Journal of Applied Spectroscopy. 2025;92(1):183–90.
163. Zeng X, Su W, Zheng Y, He Y, He Y, Rao H, et al. Pharmacokinetics, Tissue Distribution, Metabolism, and Excretion of Naringin in Aged Rats. Front Pharmacol. 2019;10:34.
164. European Medicines Agency. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline. European Medicines Agency; 2024. Report No.: EMA/CHMP/ICH/82072/2006.
165. van Tellingen O, Yetkin-Arik B, de Gooijer MC, Wesseling P, Wurdinger T, de Vries HE. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment. Drug Resist Updat. 2015;19:1–12.
166. Caraway CA, Gaitsch H, Wicks EE, Kalluri A, Kunadi N, Tyler BM. Polymeric Nanoparticles in Brain Cancer Therapy: A Review of Current Approaches. Polymers. 2022;14(14):2963.
167. Zhao Y, Yue P, Peng Y, Sun Y, Chen X, Zhao Z, et al. Recent advances in drug delivery systems for targeting brain tumors. Drug Deliv. 2023;30(1):1–18.
168. Fahmy AM, El-Setouhy DA, Ibrahim AB, Habib BA, Tayel SA, Bayoumi NA. Penetration enhancer-containing spanlastics (PECSs) for transdermal delivery of haloperidol: in vitro characterization, ex vivo permeation and in vivo biodistribution studies. Drug Deliv. 2018;25(1):12–22.
169. Mary Dcruz CE, Bhide PJ, Kumar L, Shirodkar RK. Novel nano spanlastic carrier system for buccal delivery of lacidipine. Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2022;68:103061.

170. Ali MM, Shoukri RA, Yousry C. Thin film hydration versus modified spraying technique to fabricate intranasal spanlastic nanovesicles for rasagiline mesylate brain delivery: Characterization, statistical optimization, and in vivo pharmacokinetic evaluation. Drug Deliv Transl Res. 2023;13(4):1153–68.
171. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? J Control Release. 2016;235:337–51.
172. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. Pharmaceutics. 2018;10(2).
173. Ascenso A, Raposo S, Batista C, Cardoso P, Mendes T, Praça FG, et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: transfersomes, ethosomes, and transethosomes. Int J Nanomedicine. 2015;10:5837–51.
174. Arunothayanun P, Bernard MS, Craig DQ, Uchegbu IF, Florence AT. The effect of processing variables on the physical characteristics of non-ionic surfactant vesicles (niosomes) formed from a hexadecyl diglycerol ether. Int J Pharm. 2000;201(1):7–14.
175. Sarmento B, Ribeiro AJ, Veiga F, Ferreira DC, Neufeld RJ. Insulin-loaded nanoparticles are prepared by alginate ionotropic pre-gelation followed by chitosan polyelectrolyte complexation. J Nanosci Nanotechnol. 2007;7(8):2833–41.
176. Yu XL, Meng X, Yan YD, Han JC, Li JS, Wang H, et al. Optimisation of the Extraction Process of Naringin and Its Effect on Reducing Blood Lipid Levels In Vitro. Molecules. 2023;28(4).
177. El Naggar EE, Mohamed EA, Borg TM, El-Sheakh AR, Hamed MF. Colon Targeting of Naringin for Enhanced Cytoprotection Against Indomethacin-Induced Colitis in Rabbits. Drug Des Devel Ther. 2020;14:677–96.
178. Wei Liu HP, Caiyun Zhang, Liling Zhao, Ruixia Zhao, Yongtao Zhu, Weisan Pan. Developments in Methods for Measuring the Intestinal Absorption of Nanoparticle-Bound Drugs. International Journal of Molecular Sciences (IJMS). 2016;17(7):1171.
179. Mann J, Milsmann J, Kourentas A, Butler J, Curran D, Golden M, et al. Myth-Busting Dissolution: An IQ Consortium Perspective on Common Misunderstandings in the Practice and Science of Dissolution Testing. Dissolution Technologies. 2021;28(3):110–25.
180. James Mann JM, Alexandros Kourentas, James Butler, David Curran, Mary Golden, Hao Xu. Myth-Busting Dissolution: An IQ Consortium Perspective on Common Misunderstandings in the Practice and Science of Dissolution Testing. International Journal of Pharmaceutics. 2021;606(1280898).
181. Xu C, Huang X, Huang Y, Liu X, Wu M, Wang J, et al. Naringin induces apoptosis of gastric carcinoma cells via blocking the PI3K/AKT pathway and activating pro-death autophagy. Mol Med Rep. 2021;24(5).
182. Banjerdpongchai R, Wudtiwai B, Khawon P. Induction of Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Apoptosis by Naringin. Asian Pac J Cancer Prev. 2016;17(7):3289–94.

183. Ramesh E, Alshatwi AA. Naringin induces death receptor and mitochondria-mediated apoptosis in human cervical cancer (SiHa) cells. Food Chem Toxicol. 2013;51:97–105.
184. Nagaraja S, Basavarajappa GM, Karnati RK, Bakir EM, Pund S. Ion-Triggered In Situ Gelling Nanoemulgel as a Platform for Nose-to-Brain Delivery of Small Lipophilic Molecules. Pharmaceutics. 2021;13(8).

8. EKLER

Ek 1. Orijinallik Ekran Görüntüsü



Ek 2. Dijital Makbuz

turnitin

Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	İrem Bilgiç
Ödev başlığı:	BEYİN TÜMÖRÜ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NARİNGİ...
Gönderi Başlığı:	BEYİN TÜMÖRÜ TEDAVİSİNDE KULLANILMAK ÜZERE NARİNGİ...
Dosya adı:	SON-_REM_B_LG__TEZ_SON.pdf
Dosya boyutu:	2.95M
Sayfa sayısı:	156
Kelime sayısı:	31,608
Karakter sayısı:	207,896
Gönderim Tarihi:	02-Kas-2026 07:14ÖS (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	3078041814



Copyright 2026 Turnitin. Tüm hakları saklıdır.

Ek 3. Tez Çalışmasından Sunulan Poster

PRELIMINARY EVALUATION OF THE EFFECTS OF POST-INJECTION PROCESSING CONDITIONS ON THE PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF NARINGIN-LOADED SPANLASTIC NANOVESICLES

Bilgic I. [1]; Karacaoglu N.[1] ; Yazıcı B.[1] ; Aytekin E.[1] ; Ozel M.Z.[2]; Bozdag Pehlivan S.[1]
[1]Hacettepe University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Technology, 06100, Ankara, Turkiye, irem.bilgic06@gmail.com,nskaracaoglu@gmail.com,begumyazici2@gmail.com,erenaytekin@yahoo.com, sbozdag@hacettepe.edu.tr
[2] School of Health, Medicine and Life Sciences, University of Hertfordshire, Hatfield AL10 9AB, UK, m.ozel@herts.ac.uk

INTRODUCTION

Naringin (NAR) is a naturally occurring flavanone glycoside with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer properties; however, its poor aqueous solubility and low oral bioavailability restrict its therapeutic use (1). Incorporation into nanovesicular carriers is therefore a rational strategy to overcome these limitations. Spanlastics, elastic nanovesicles composed of a non-ionic surfactant and an edge activator, are promising carriers owing to their deformability and enhanced permeation capacity (2). Since their particle size, size distribution, and surface charge are strongly dependent on preparation conditions, post-injection processing parameters such as temperature and stirring regime require systematic evaluation. This preliminary study aimed to compare two preparation methods for NAR-loaded spanlastics (NAR-Ss) based on particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential.

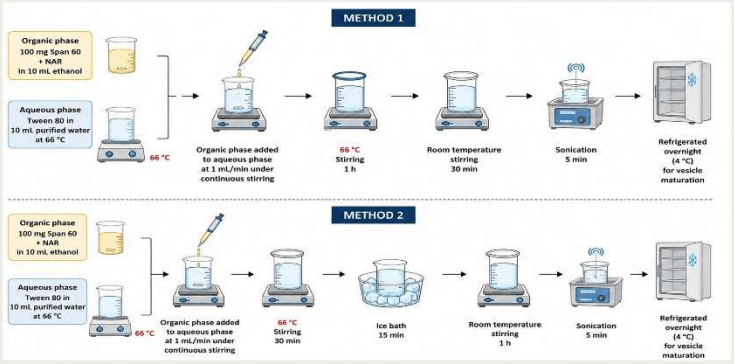


Figure 1. Preparation scheme of NAR-loaded spanlastic nanovesicles by modified ethanol injection method for Method 1 and Method 2.

MATERIALS AND METHODS

NAR-Ss were prepared by a modified ethanol injection method (2). Briefly, 100 mg of Span 60 was dissolved in 10 mL ethanol, and NAR was added to this organic phase. Tween 80 was dissolved in 10 mL purified water at 66 °C. Then, the organic phase was added to the aqueous phase at 1 mL/min under continuous stirring. In Method 1, the dispersion was stirred for 1 h at 66 °C and 30 min at room temperature. In Method 2, the dispersion was stirred for 30 min at 66 °C, 15 min in an ice bath, and 1 h at room temperature. For two methods, obtained formulations were sonicated for 5 min and refrigerated overnight for vesicle maturation.
The physicochemical characteristics of the NAR-Ss, including particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential, were determined using a Zetasizer Nano ZS.

RESULT AND DISCUSSION

NAR-S formulations produced using Method 1 exhibited a mean particle size of 99.60 nm± 0,6101 nm , a PDI of 0.200± 0,06, and a zeta potential of −18.1 mV± 0,981 mV, whereas formulations produced using Method 2 displayed a mean particle size of 109.9 nm± 3,236 nm, a PDI of 0.188± 0,021, and a zeta potential of −23.1± 2,45 mV. Overall, Method 1 resulted in spanlastics with a smaller mean particle size, while Method 2 produced formulations with a slightly lower PDI and a higher zeta potential. These preliminary findings suggest that variations in post-injection temperature and stirring conditions during preparation process influenced the physicochemical characteristics of the NAR-Ss.

Physicochemical parameter	Method 1	Method 2
Mean particle size (nm)	99.60 ± 0.61	109.9 ± 3.24
PDI	0.200 ± 0.06	0.188 ± 0.021
Zeta potential (mV)	−18.1 ± 0.98	−23.1 ± 2.45

Table 1. Physicochemical characteristics of NAR-Ss prepared using Method 1 and Method 2.

CONCLUSION

In conclusion, both methods successfully produced NAR-Ss with mean particle sizes of approximately 100 nm and relatively low PDI values, indicating the successful preparation of nanosized and homogeneous formulations. These preliminary findings provide a foundation for further optimization and reproducibility studies.

REFERENCES

1.Ghanbari-Movahed M, Jackson G, Farzaei MH, Bishayee A. A systematic review of the preventive and therapeutic effects of naringin against human malignancies. Frontiers in pharmacology. 2021;12:639840.
2.Kakkar S, Kaur IP. Spanlastics—A novel nanovesicular carrier system for ocular delivery. International journal of pharmaceutics. 2011;413(1-2):202–10.

9. ÖZGEÇMİŞ