



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

STRATEJİK GEREKLİLİK: MOLEKÜLDEN İLACA


FROM MOLECULE TO DRUG

EDİTÖRLER

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ

2024



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

AB Proje Adı:

Evrensel Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça

"Erasmus+ Programı kapsamında Avrupa Komisyonu tarafından desteklenmektedir. Ancak burada yer alan görüşlerden Avrupa Komisyonu ve Türkiye Ulusal Ajansı sorumlu tutulamaz."

Proje Koordinatörü:

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Proje Numarası:

2022-1-TR01-KA220-VET-000088373

Editörler:

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN

Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ

Kitap Adı: Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça

Proje Web Sayfası: <https://frommoleculetodrug.com/>

Kapak ve Bölüm Resimleri:

"Bu kitabın kapak görselleri, bir yapay zeka modeli olan DALL-E uygulamasına verilen prompt (metin istemleri) ile tasarlanmıştır"

ISBN: 978-625-6211-05-6

Grafik Tasarım:

Bir Medya

Yeni yol Mh. 12. Gazi Sk. No: 9/13 ÇORUM

Tel: +90 364 225 66 64

www.birmedya.net

Yayınevi:

ANADOLU KİTAPEVİ

Anadolu Kitabevi Basım Yayın Medikal Turizm Kırtasiye Tic.Ltd.Şti.

Sağlık 1 Sokak No: 26/A Çankaya/ANKARA

www.anadolutipkitabevi.com

Sertifika No: 52319

Baskı&Cilt:

Salamat Basım Yayım Ambalaj San. ve Tic. Ltd. Şti.

Büyük Sanayi 1. Cadde 95/1 İskitler/Altındağ/ANKARA

Tel: +90 312 341 10 20 - www.salamat.com.tr



Avrupa Birliği tarafından
finanse edilmektedir

"Evrensel Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlacı " başlıklı projemiz Türkiye Ulusal Ajansı Erasmus+ Mesleki Eğitim Programı kapsamında 400.000 Avro ile desteklenmiştir.

Projemize ve ekibimize bu desteği sağlayan Türkiye Ulusal Ajansı'na teşekkür ederiz. Ayrıca her daim bilimsel çalışmalarımızı destekleyen sayın Ankara Üniversitesi Rektörü **Prof. Dr. Necdet ÜNÜVAR**'a minnettarlığımızı sunarız.

ULUSAL ORTAKLAR



ANKARA ÜNİVERSİTESİ

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN
Prof. Dr. Gülçin SALTAN İŞCAN
Doç. Dr. Açelya YILMAZER AKTUNA
Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR
Blm. Uzm. Mine ENSOY
Araş. Gör. Ayşe Hale ALKAN



**DOKUZ EYLÜL
ÜNİVERSİTESİ**

Prof. Dr. Hülya AYAR KAYALI



**TOBB EKONOMİ VE
TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ**

Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN



KOBAY A.Ş.

Begüm BUĞDAYCI

Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ



**ANKARA HACI BAYRAM VELİ
ÜNİVERSİTESİ**

Prof. Dr. Emine ÖNER KAYA

ULUSLARARASI ORTAKLAR



**PADOVA
ÜNİVERSİTESİ**

Doç. Dr. Lucia Gemma DELOGU



TRANSMISSIBLE BV

Dr. Arnold BOSMAN



**MINHO
ÜNİVERSİTESİ**

Universidade do Minho

Prof. Dr. Nuno S. OSÓRIO

Sevgili kızım Melis Duman'a ithafen....

İÇİNDEKİLER

BÖLÜM 1

MOLEKÜL 9 - 48

Mine ENSOY, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 2

İLAÇ KEŞFİ VE GELİŞTİRMEDE BİLGİSAYAR TEMELLİ YAKLAŞIMLAR 49 - 66

Nuno S. OSÓRIO

BÖLÜM 3

KLİNİK ÖNCESİ İLAÇ ARAŞTIRMALARI 67 - 106

Ayşe Hale ALKAN, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 4

YENİLİKÇİ İLAÇ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ 107 - 148

Şeyma ÖZGÜR, Demet CANSARAN DUMAN

BÖLÜM 5

**REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE
KARAKTERİZASYONU** 149 - 168

Hülya AYAR KAYALI, Elçin ÇAĞATAY, Mariam J.M. GHUNAIM

BÖLÜM 6

**BİYOİNFORMATİK VE OMİK: İLAÇ GELİŞTİRMENİN FARMAKOGENOMİK
DEVİRİMİNDE İTİCİ BİR GÜÇ** 169 - 188

Nuno S. OSÓRIO

BÖLÜM 7

İLAÇ DAĞITIMI İÇİN 2B NANOMALZEMELER 189 - 212

Damla ALKAYA, Lucia Gemma DELOGU, Açelya YILMAZER

BÖLÜM 8

**BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN NANO İLAÇ TAŞIMA
SİSTEMLERİ** 213 - 262

Damla Nur PARILTI, Nehir ARIK, Pelin MUTLU

BÖLÜM 9

**İLAÇ ARAŞTIRMALARINDA IN VIVO TESTLER VE
İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARI** 263 - 278

Begüm BUĞDAYCI

BÖLÜM 10

İYİ KLİNİK UYGULAMALAR (GCP) VE GÖNÜLLÜLERDE KLİNİK

ARAŞTIRMALAR 279 - 298

M. Kürşat DERİCİ

BÖLÜM 11

İLAC RUHSAT VE PATENTLENME SÜREÇLERİ 299 - 318

M. Kürşat DERİCİ

BÖLÜM 12

MOLEKÜLDEN İLACA GİDEN YOLDA LABORATUVAR GÜVENLİĞİ

VE EMNİYETİ 319 - 340

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Parisa SHARAFI

BÖLÜM 13

İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI (GMP) ÜRETİMDE KALİTE VE

GÜVENLİĞİN SAĞLANMASI 341- 358

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN, Parisa SHARAFI

BÖLÜM 14

İLACLARIN YAYGIN KULLANIMI VE FARMAKOVİJİLANS 359- 372

M. Kürşat DERİCİ

ÖNSÖZ

Ülkelerin ekonomik ve sosyal açıdan gelişebilmesi için öncelikle sağlıklı bir topluma ihtiyacı vardır. Sağlıklı bir toplum yaratılması ve sağlıklı bir yaşamın sürdürülebilmesinde en önemli faktörlerden biri olan hastalıklara karşı tedavi sürecinde kullanılan farmasötik ürünlerden birisi olan ilaçların regülasyonlara uygun olarak üretilmesidir. Dünya da ortalama yaşam süresinin uzaması ve nüfusun yaşlanmasına bağlı olarak hastalıklar artmıştır. Değişen sağlık profili nedeniyle ilaç üreticileri hastalıkların tedavisi için yeni ilaçlar geliştirmeye odaklanmıştır.

2020 yılında Covid-19 pandemisi sürecinin aniden ve beklenmedik bir etki düzeyi ile tüm dünyayı etkisi altına alması ile beraber, hastalıklara karşı geliştirilecek ilaç araştırma ve üretim çalışmalarında standardize çalışma yöntemleri ile yetişmiş ve pratik uygulamalarda tecrübe kazanmış personele çok fazla ihtiyaç olduğu ortaya çıkmıştır. Covid-19 pandemisi sonrası değişen dünya düzeninde pandemi sayısının daha sık ortaya çıkacağı öngörülmektedir. Bu duruma karşı farkındalığı artan ülkeler ilaç araştırma ve üretim tesislerinin sayısını artırma stratejisini geliştirmektedirler. Bu kapsamda hızla artan üretim tesisine karşı nitelikli yetişmiş insan gücünü sağlamak oldukça stratejik bir önem arz etmektedir. Ayrıca global rekabetin giderek güçlenmekte olduğu günümüzde, artan ilaç talebinin ne kadarının mevcut insan kaynağı ile üretilerek karşılanabileceği hem stratejik açıdan hem de ülkelerin cari açık değerlendirmeleri açısından çok önemli bir konudur.

Bir ilacın araştırma ve geliştirme sürecini, molekül keşfi (hedef tanımlama, hedef doğrulama, öncü molekül tanımlama ve lider molekül tanımlama), klinik öncesi çalışmalar, klinik denemeleri içeren uygulamalar ve İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP), İyi Üretim Uygulamaları (GMP), patent ve ruhsatlandırma gibi regülasyona bağlı düzenleyici baskıyı gerekliliklerinin sağlanması oluşturmaktadır.

İlaç araştırma ve geliştirme merkezlerinde (kamu, üniversite ve özel sektör) yer alan personeller farklı disiplinlerden mezun olarak çalışmaya başlamaktadırlar. Bu alanda çalışan personel genellikle tıp, biyoloji, moleküler biyoloji ve genetik, eczacılık, biyoteknoloji, kimya, kimya mühendisi vb. lisans bölümlerinden mezun olmaktadır. Ancak global düzeyde bu bölümlerin her birinin müfredatında bütünsel ve standardize olarak yeterli ölçüde ilaç araştırma ve üretim basamakları, pratik uygulamalar ve regülasyonlara ait bilgilendirmeler mevcut değildir. Bu durumda stratejik önemi yüksek olan alanda çalışacak personelin bilgi birikim seviyesi farklı düzeyde olduğunda senkronize olarak çalışmaları oldukça zor ve zaman alıcı bir süreç oluşturmaktadır.

Günümüz ilaç ve biyoteknoloji endüstrisinde ilaç araştırma ve geliştirme aşamalarında biyoteknoloji ve nanoteknoloji uygulamaları oldukça önemli teknolojiler olarak yer almaya başlamıştır. Önümüzdeki 20 yılda, kişiselleştirilmiş tedavilerde önemli bir mesafe alınacağını, bunun doğal sonucu olarak da kişiselleştirilmiş ilaç üretiminin önem kazanacağını ve çok sayıda 3D yazıcı ve yapay zeka kontrolünde kişiye özel üretim yapılabileceği mini üretim merkezleri uluslararası boyutta yaygınlaşacaktır.

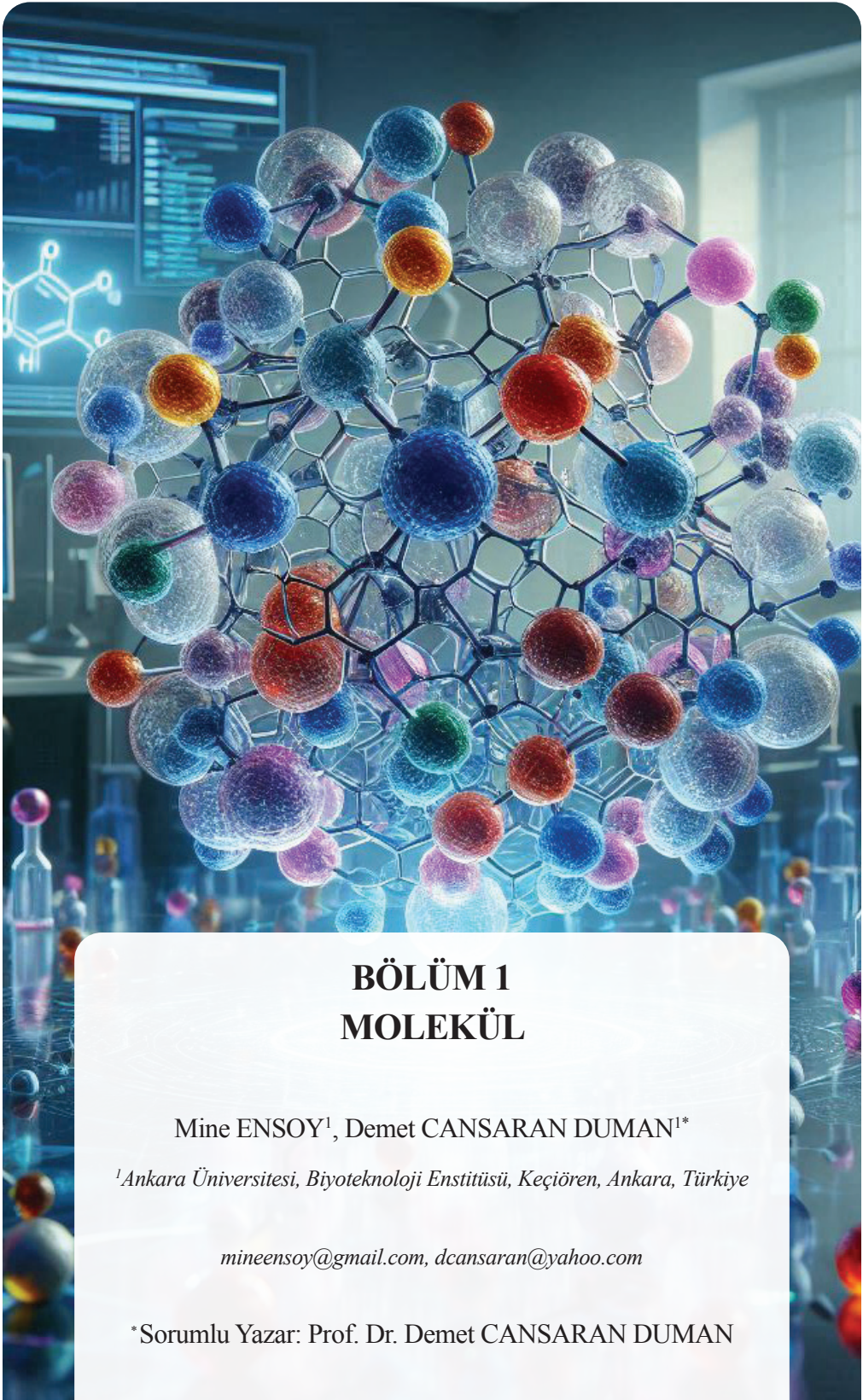
Bu kapsamda, yukarıda bahsedilen hem günümüzde hem de gelecekteki yıllarda ilaç araştırma ve geliştirme alanında bilgi ve uygulama eksikliklerinin tamamlanması oldukça önemlidir. Avrupa Birliği Erasmus+ Mesleki Eğitim programı tarafından finanse edilen, 'A Universal Strategic Necessity: From Molecule to Drug' (2022-1-TR01-KA220-VET-000088373) projesi kapsamında elde edilen ulusal ve uluslararası boyutta bilgi ve tecrübenin stratejik önemi olan ilaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında çalışacak personelin bütünsel olarak süreç hakkında bilgi edinebilmesi amaçlı yenilikçi yöntem ve bilgiler ile Türkçe ve İngilizce olarak kitap hazırlanmıştır.

Kitap ilaç araştırmalarında temel araştırmadan tedavi için kullanılacak ürüne dönüştürülmesine kadar süreçler, bu alanda uluslararası boyutta sağlık sisteminin ihtiyaçlarının karşılanması ve ülkelerin dışa bağımlılığın azaltılması sağlayacak yenilikçi uygulamalarla eğitim ve uygulama imkanı sunmaktadır. Hedef kitlemiz için biyoteknolojik, biyoinformatik ve nanoteknolojik uygulamaları kullanarak hastalıkların tedavisinde yeni ilaç hedeflerinin ve bu hedeflere yönelik yeni ilaç adayları moleküllerin belirlenmesi, mevcut bir ilacın başka bir hastalıkta kullanıma potansiyelinin belirlenmesi amaçlı çalışmaları farklı disiplinlerden gelen araştırmacılar ile geliştirmesi kitabın yenilikçi yaklaşımlarından biridir. Lisans eğitimi sürecinde ilaç üretim konusunda farklı disiplinlerde eğitim gören hedef kitlenin pratik deneyimi kısıtlı olmaktadır. Kitap kapsamına yenilikçi ve pratik uygulamaların videolar ile de eklenmesi ile hedef kitle bütünsel olarak ilaç araştırma ve üretim sürecine ait teorik ve uygulama deneyimi artacaktır. Böylece ülkelerin ilaç araştırmalarında ve üretim süreçlerinde sürdürülebilirliğinin mümkün kılınmasına katkı sağlanacaktır.

'Stratejik Gereklik: Molekülden İlaç' başlıklı kitaba katkılarından dolayı Ulusal Ajans, Ankara Üniversitesi Rektörlüğü ve Biyoteknoloji Enstitüsü'ne teşekkürlerimizi sunarız.

Saygılarımla,

Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN
Proje Koordinatörü



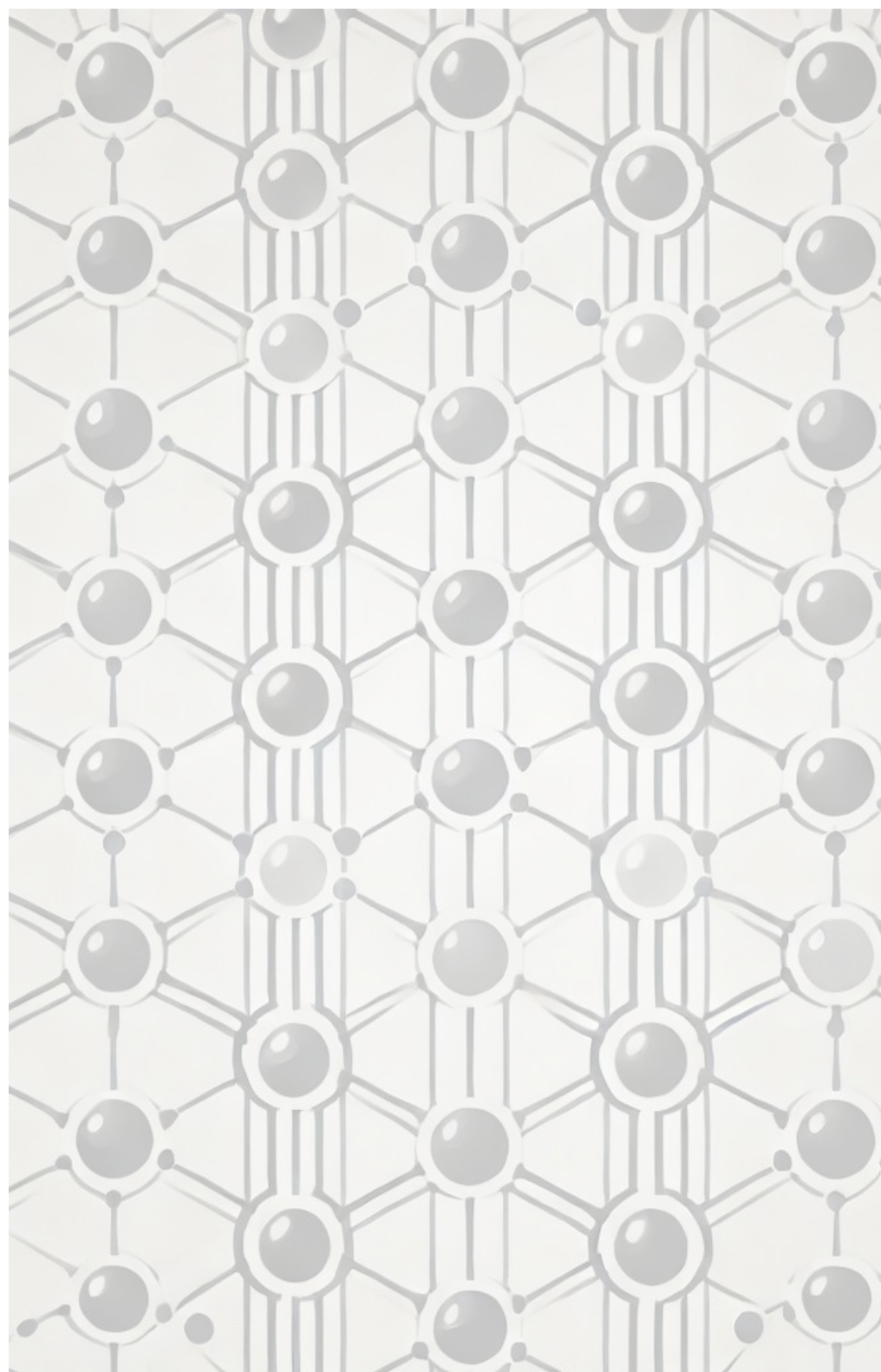
BÖLÜM 1 MOLEKÜL

Mine ENSOY¹, Demet CANSARAN DUMAN^{1*}

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye

mineensoy@gmail.com, dcansaran@yahoo.com

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN





1. GİRİŞ: SAĞLIK SEKTÖRÜNDE İLAÇ GELİŞTİRMENİN STRATEJİK ÖNEMİ

İlaç geliştirme, sağlık hizmetlerinin temel bileşenlerinden biridir ve dünya çapında insanların ve toplumların çeşitli sağlık taleplerini karşılamak için gereklidir (Berdigaliyev ve ark., 2020). Çeşitli hastalıkların ve rahatsızlıkların tedavisine yönelik yeni terapötik ilaçların tanımlanması, değerlendirilmesi ve onaylanması insan sağlığı için oldukça önemlidir. Yeni ilaçların geliştirilmesi veya mevcut ilaçların iyileştirilmesi, tıbbi bilgiyi geliştiren, tedavi sonuçlarını ve tıbbi uygulamaları iyileştiren ayrıca bir bütün olarak sağlık hizmeti standardını yükselten kritik bir süreçtir (Berdigaliyev ve ark., 2020; Chopra ve ark., 2021).

İlaç geliştirme halk sağlığı, ekonomik büyüme, küresel rekabet avantajı, bilimsel ilerleme ve gelişme, ekonomik ve sosyal etki, ortaya çıkan sağlık tehditlerinin giderilmesi ve uzun vadeli sürdürülebilirlik gibi birçok nedenlerden dolayı stratejik öneme sahiptir. Sağlık sektöründe ilaç geliştirmede aktif rol alan ülkeler sağlık sistemlerinin mevcut ve gelecekteki zorluklara karşı dayanıklılığını artırır.

1.1. Kronik ve Nadir Hastalıklar Odaklı İlaç Araştırmalarının Önemi

Etkin tedavisi bulunmayan hastalıklara yönelik ilaç geliştirme, hastaların tıbbi ihtiyaçlarının karşılanmasında önemli bir role sahiptir (Garattini ve ark., 2014). İlaç endüstrisi, yaşam kalitesini artırabilen ve kronik hastalıklardan nadir hastalıklara kadar çok çeşitli rahatsızlıkları tedavi edebilen ilaçları araştırmaya ve geliştirmeye odaklanmıştır (Pushpakom ve ark., 2019). Sağlık hizmetlerindeki bu alandaki boşluğu doldurmaya yönelik yapılan ilaç geliştirme çalışmaları, tedavisi mümkün olmayan hastalıklar için umut verici tedavi seçenekleri oluşturması açısından büyük öneme sahiptir. Karşılanmayan tıbbi ihtiyaçlar arasında çeşitli kanser türleri ve otoimmün hastalıklar gibi karmaşık kronik hastalıklar da yer almaktadır (Yang ve ark., 2022). Bu alandaki ilaç geliştirme çalışmalarının amacı, tedavi süreçlerini iyileştirebilecek, semptomları kontrol altına alabilecek ve hastalığın yayılmasını engelleyebilecek ilaçların keşfedilmesi üzerinedir. Örneğin bağışıklık kontrol noktası inhibitörlerinin geliştirilmesi, metastatik veya ilerlemiş maligniteleri olan hastalara yeni terapötik seçenekler sunarak, onkolojide karşılanmayan tıbbi gereksinimleri karşılanmasına ve kanser hastaları için yeni tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına katkı sağlamaktadır (Dong ve ark., 2022).

Sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle nadir hastalıklarda hastaların karşılanmamış tıbbi ihtiyaçları arasında yer almaktadır (Kidwell ve ark., 2022). Bu alanda gerçekleştirilen ilaç geliştirme çalışmaları, hastalığın altında yatan genetik nedenleri belirlemek ve tedavi etmek için hedefe yönelik tedavi stratejileri geliştirme üzerine odaklanmıştır. Örneğin nadir hastalıklardan biri olan belirli bir gendeki mutasyonun neden olduğu kalıtsal retina hastalıkları için Luxturna gibi gen tedavileri geliştirilmiş ve böylece daha önce tedavi edilemeyen genetik bozuklukları olan hastalar için etkili tedavi seçenekleri oluşturulmaya başlanmıştır (Prado ve ark., 2020). İlaç geliştirme, yalnızca belirli hastalıklara yönelik tedavi sağlamanın yanında hastaların genel olarak yaşam kalitesini arttırmayı da amaçlamaktadır. Bu amaçla destekleyici bakıma yönelik ilaçlar, semptomları kontrol altına

almaya yönelik tedaviler ve hastaların tedaviye uyumunu artıran yenilikçi ilaç dağıtım sistemlerini geliştirilmektedir (Liu ve ark., 2022). Örneğin, şizofreni gibi kronik rahatsızlıklara yönelik uzun süre etkili ilaç formülasyonlarının geliştirilmesiyle hastaların sürekli ilaç kullanım yükü azaltılmış, tedaviye uyumu artırmış ve sonuçta hastaların genel yaşam kalitesini iyileştirmiştir (Bülbül ve ark., 2020).

Özetle, kronik ve nadir hastalıklar ile hastaların genel yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için ilaç geliştirme araştırmaları sağlık hizmetleri alanında oldukça önemli bir role sahiptir.

1.2. İnovasyon ve Bilimsel Gelişmeler

Yeni ilaçların geliştirilmesi için yapılan araştırmalar hastalıkların mekanizmalarının, moleküler yollarının ve genel olarak insan vücudunun karmaşıklığının anlaşılmasına yardımcı olarak sağlık biliminin ve teknolojisinin ilerlemesine katkı sağlamaktadır. Teşhis, tedavi ve önleme çalışmalarında ilerlemelere olanak tanıyan yeni keşfedilen bilgiler daha geniş bilimsel topluluklara fayda sağlaması açısından önemlidir. İlaç araştırmalarının artması ve kapsamının genişletilmesi sağlık hizmetlerinin de sürekli olarak gelişmesine ve ilerlemesine yardımcı olmaktadır (Kusnitz ve ark., 2017; Mirsadeghi ve ark., 2017).

Hastalığın ilerlemesinde rol oynayan moleküler hedeflerin ve yolların belirlenmesi de dahil olmak üzere hastalıkların temel nedenlerinin araştırılması, hastalıkların patofizyolojisine katkıda bulunan yeni biyobelirteçlerin ve genetik mutasyonların tespit edilmesi ilaç geliştirme sürecinin çok önemli bir parçasıdır. Tümör büyümesini ve ilerlemesini hızlandıran moleküler değişikliklere ilişkin ayrıntılı bilgi elde edilmesi belirli kanser türleri için özel tedavilerin oluşturulmasını hızlandırmakta ve bu da ilaç geliştirme için terapötik hedeflerin belirlenmesine yol açmaktadır (Wang ve ark., 2005). Ayrıca ilaç geliştirmeye yönelik araştırmalar genellikle hastalıklara yönelik alternatif yöntemlerinin de gelişmesine katkı sağlamaktadır. Bu gelişmeler, erken teşhis yapılabilmesini, hastalık karakterizasyonunun belirlenmesini ve kişiselleştirilmiş tedavi seçeneklerinin oluşturulmasını kolaylaştırarak tedavi sonuçlarını ve prognozunu iyileştirmektedir (Brodniewicz ve ark., 2010). İlaç geliştirme süreci ve bu süreçte yapılan detaylı araştırmalar hedefe yönelik tedaviler, kombinasyon rejimleri ve yeni ilaç dağıtım sistemleri gibi yenilikçi tedavi yöntemlerinin oluşturulmasına yardımcı olmaktadır (Berdigaliyev ve ark., 2020). İlaçların belirli doku veya hücrelere hedefli şekilde verilmesini sağlayan ve terapötik etkinliği artıran nanoteknolojiye dayalı ilaç dağıtım sistemlerinin ve kanser tedavisinde vücutun bağışıklık sistemini kanser hücrelerini hedeflemeye ve yok etmeye yönlendiren immünoterapötik stratejilerin oluşturulması ilaç araştırmaları sayesinde ortaya çıkarılan yenilikçi tedavi yöntemlerine örneklerdir (Liang ve ark., 2020; Yan ve ark., 2020).

Sonuç olarak, ilaç geliştirme araştırması, hastalığın altında yatan mekanizmaları aydınlatarak, risk faktörlerini belirleyerek, teşhis ve tedavi yöntemlerinin gelişmesine katkı sağlayarak ve hastalığın ilerleme hızını belirleyerek yaşam tarzı müdahaleleri ve nüfusa dayalı tarama programları gibi önleyici tedbirlerin oluşturulmasına yardımcı olur.

1.3. Hasta Sonuçlarının İyileştirilmesi

İlaç geliştirme çalışmaları daha etkili, daha güvenli ve daha az yan etkiye sahip ilaçların ve tedavi yöntemlerinin oluşturulmasıyla hasta sonuçlarının iyileştirilmesinde ve yaşam kalitesinin artırılmasında önemli bir role sahiptir (Berdigaliyev ve ark., 2020). Terapötik etkinliği artırılmış ilaçların geliştirilmesi, ilaç araştırmalarının hasta sonuçlarını iyileştirmesinin ana amaçlarından biridir (Trajanoska ve ark., 2023). Bu amaçla, tedavi sonuçlarını ve hastalık kontrolünü iyileştirmek hedefli hastalığın altında yatan mekanizmayı spesifik olarak hedef alan özel tedavilerin oluşturulmasını içerir. Tirozin kinaz inhibitörlerinin, özellikle tümör gelişimi ve metastazla bağlantılı moleküler yolları düzenleyerek çeşitli kanser türlerinin tedavisinde etkili olması ve kanseri kontrol altına alarak hasta sonuçlarını iyileştirmesi yenilikçi tedavi yöntemlerinin önemli örneklerinden biridir (Shyam Sunder ve ark., 2023). İlaç geliştirme çalışmaları aynı zamanda daha az yan etkiye ve daha iyi güvenlik profiline sahip terapötikleri oluşturmaya ve böylece hastalar üzerindeki tedaviye bağlı olumsuz yan etkilerin yükünü hafifletmeye odaklanmaktadır. Bu amaçla otoimmün hastalıklara yönelik geliştirilen biyolojik tedaviler ile geleneksel immünosupresif ilaçlarla ilişkilendirilen yan etkiler azaltılmış, hedef spesifik tedavi olanakları oluşturulmuş ve böylece hastaların tolere edilebilirliği ve tedaviye uyumu artırılarak tedavi sonuçlarının iyileşmesi sağlanmıştır (Zhao, 2020; Dong ve ark., 2022). İlaç araştırmalarının ilerlemesi, genetik yapı, biyobelirteç profili ve hastalık alt tipi gibi hastaya özgü özellikleri dikkate alarak kişiye özgü tedavilerin oluşturulmasını içeren kişiselleştirilmiş tedavi yöntemi gelişmesine katkı sağlamıştır (Mirsadeghi ve ark., 2017). Hastaların özel ihtiyaçlarına uygun olarak belirlenmiş tedavi almalarına olanak tanıyan kişiselleştirilmiş tedavi yaklaşımları daha iyi tedavi yanıtı ve daha iyi tedavi sonucu elde edilmesini sağlamaktadır.

Sonuç olarak, ilaç araştırma ve geliştirme süreçlerinin iyileşmesi, daha yüksek terapötik etkinliğe ve daha düşük yan etkiye sahip ilaçlar sağlayarak, hedefe yönelik tedavileri ve kişiselleştirilmiş tıbbi geliştirerek, kronik rahatsızlığa sahip bireylerin genel yaşam kalitesini artırarak hasta sonuçlarının iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır.

1.4. Ekonomik ve Sosyal Etki

İlaç geliştirme çalışmaları ve ilaç endüstrisi yalnızca sağlık işletmelere katkı sağlamakla kalmayıp istihdam yaratarak ve ekonomik büyümeyi teşvik ederek önemli bir ekonomik ve sosyal etkilere de sahiptir (Wouters ve ark., 2020; Annett, 2021). Ayrıca yeni ilaçlarla sağlık problemlerinin azaltılması daha sağlıklı iş gücünün ortaya çıkmasına, hastalıkların hem bireyler hem de toplum üzerindeki ekonomik yükünün azaltılmasına ve toplumun genel refahına katkı sağlamaktadır. Bunun sonucu olarak daha sağlıklı hale gelen bir nüfus daha üretken olmakta ve olumlu sosyal ve ekonomik etkilere yol açmaktadır (Annett, 2021).

İlaç endüstrisi, yenilikçi ilaçların araştırılması ve geliştirilmesi, üretimi ve ticarileştirilmesi yoluyla küresel ekonomiye önemli ölçüde katkıda bulunmaktadır. İlaç sektörünün sağladığı ekonomik katkı araştırma ve geliştirmeye yapılan doğrudan yatırımların yanı sıra biyoteknoloji, sağlık hizmetleri ve tıbbi teknoloji gibi yan endüstrilere yapılan dolaylı katkıları da kapsamaktadır (Moridani ve ark., 2014; Annett, 2021). Uluslararası İlaç Üreticileri ve Dernekleri Federasyonu (IFPMA) tarafından 2022 yılında yayınlanan raporda biyofarmasötik endüstrisinin doğrudan ve dolaylı olarak ekonomiye katkısının 1.838 milyar ABD doları olduğu ve küresel satışların her geçen yıl daha da artacağı tahmin edildiği belirtilmiştir (IFPMA, 2022). İlaç endüstrisi istihdam yaratarak ve altyapıyı iyileştirerek de ekonomik büyümeyi desteklemektedir. IFPMA'nın 2022 verilerine göre

biyofarmasötik endüstrisinin, jenerik ilaçların üretimi de dahil dünya çapında yaklaşık 5.5 milyon kişiye iş imkânı sağladığı belirtilmektedir (IFPMA, 2022). Refah düzeyi yüksek iş olanaklarının oluşturulması, yerel ve ulusal ekonomilere katkıda bulunarak yenilikçiliği teşvik etmekte ve ekonomik gelişmeyi artırmaktadır.

İlaç sektörünün ekonomik katkılarının yanı sıra toplum üzerinde önemli bir sosyal etkisi de bulunmaktadır (Daubner ve ark., 2021; Koss ve ark., 2021). Regülasyonlara uygun olarak gerçekleştirilen araştırma ve geliştirme çalışmaları ile üretilen yeni ilaçlar, tedavisi olmayan hastalıklara umut olarak, hasta sonuçlarını iyileştirerek daha sağlıklı bir nüfusun oluşmasına yol açar. Hastalığın bireyler, aileler ve topluluklar üzerindeki yükünü azaltarak olumlu bir toplumsal etki sağlamaktadır. İlaç geliştirmenin ilerlemesi ortalama yaşam ömründe ve yaşam kalitesinde kayda değer bir artışa neden olmaktadır (Daubner ve ark., 2021). Ayrıca etkili ilaca erişilebilirlik daha sağlıklı bir iş gücünü de katkıda bulunarak üretkenliğin artmasına yol açmaktadır. Gerçekleştirilen araştırmalar kronik hastalıklara yönelik ilaçlara erişimin kolaylaşmasının hastalık yönetimini iyileştirdiği böylece kayıp iş günü sayısını azalttığı ve etkilenen bireylerin üretkenliğinin arttığı gösterilmiştir (van Haarst ve ark., 2019; Daubner ve ark., 2021).

Sonuç olarak ilaç araştırmaları ile daha sağlıklı ve daha üretken bir iş gücünü oluşturarak topluma ve ekonomiye büyük ölçüde katkı sağlamaktadır. İlaç geliştirme, yalnızca yatırımlar, istihdam sağlama ve gelir yaratma yoluyla ekonomik büyümeyi desteklemekle kalmaz, aynı zamanda daha sağlıklı bir nüfusa da katkıda bulunarak üretkenliğin artmasına ve ekonomik hastalık yükünün azalmasına yol açar. İlaç sektörünün gelişmesi ve yenilikçi ilaçlar üretmeye devam etmesi küresel çapta toplum ve ekonomi üzerindeki olumlu etkisini artıracaktır.

1.5. Sağlık Tehdit Eden Riskleri Önlemek İçin İlaç Geliştirme

İlaç geliştirme, bulaşıcı hastalık salgınları gibi halk sağlığıyla ilgili acil durumların öngörülmesinde ve bunlara yanıt verilmesinde kritik bir role sahiptir. Halen etkisini sürdüren COVID-19 pandemisi, aşılardan ve anti-viral ilaçların mümkün olan en kısa sürede üretilmesinin, salgınların kontrol altına alınmasındaki önemini gösteren güncel örneklerden biridir (Asselah ve ark., 2021; Forchette ve ark., 2021). Etkili ilaç üretiminin hızlı bir şekilde üretilmesi ve süreçten etkilenen bölgelere dağıtımlarının zamanında gerçekleştirilmesi, bulaşıcı hastalıkların ve diğer acil durumların kontrol edilmesi ve etkilerinin azaltılması açısından kritik öneme sahiptir.

Anti-viral ilaçların geliştirilmesi de halk sağlığı krizlerinin etkilerinin azaltılmasında kritik bir role sahiptir (Asselah ve ark., 2021). Anti-viral ilaçlar semptomların süresini kısaltmaya, hastalığın şiddetini azaltmaya ve bulaşıcı hastalıkların yayılmasını durdurmaya yardımcı olması açısından oldukça önemlidir. Anti-viral ilaçların geliştirilmesiyle grip ve HIV gibi viral hastalıklarla mücadele süreçlerinin büyük ölçüde iyileştiği ve bu hastalıkların halk sağlığı üzerindeki yükünün azaldığı görülmektedir (Kausar ve ark., 2021). İlaç geliştirme aynı zamanda halk sağlığı açısından acil durumlarda ilaçlara dünya çapında erişimin ve dağıtımın sağlanmasına yönelik çalışmaları da kapsamaktadır. İlaç şirketleri, hükümetler ve uluslararası kuruluşlar arasındaki işbirlikleri ile ilaçların hızlı bir şekilde üretilmesi ve hastalıktan etkilenen bölgelere kısa sürelerde dağıtılması kolaylaşmaktadır (Dănescu ve ark., 2020). Geçmiş deneyimler, acil durumlar karşısında ilaçların oluşturulmasının ve düzenleyici kurumlar tarafından onaylanmasının hızlandırılmasına ve Ar-Ge çalışmalarını hızlandırmak için dünya çapında iş birliği ve veri paylaşımı çerçevelerinin oluşturulmasına yönelik stratejilere bilgi sağlamaktadır.

Sonuç olarak, geçmişte yaşanan salgınlar ve halen etkisini gösteren COVID-19 pandemisi ortaya çıkan sağlık risklerini engellemek için ilaç geliştirmeye yönelik yenilikçi yaklaşımların kullanmanın önemini ortaya koymaktadır. İlaç endüstrisi, bilimsel gelişmelerden, küresel işbirliklerinden ve geçmiş krizlerden alınan derslerden yararlanarak hazırlık ve müdahale çabalarına katkıda bulunmayı ve halk sağlığını ve refahını korumayı hedeflemektedir (Dănescu ve ark., 2020; Daubner ve ark., 2021).

1.6. Bilimsel İş Birliğinin Teşvik Edilmesi

İlaç geliştirme genellikle bilim adamlarının, araştırmacıların, sağlık çalışanlarının ve düzenleyici kurumların katılımını gerektiren oldukça karmaşık bir süreçtir. Bu işbirlikçi çaba, fikir ve bilgi alışverişini destekleyerek karmaşık sağlık sorunlarının çözümüne yönelik multidisipliner bir yaklaşımın gerçekleşmesini sağlar (Yıldırım ve ark., 2016; Davis ve ark., 2021). Farklı paydaşlar arasındaki iş birliği, sağlık sorunlarına daha eksiksiz ve kapsamlı çözümler üretilmesi açısından önemlidir. Çalışmalar, ilaç geliştirmede bilimsel işbirliğinin öneminin altını çizmekte, bunun yeni terapötik hedefler bulmada ve yenilikçi tedavi yöntemlerini oluşturmaya katkı sağladığını, tıbbi bilgiyi geliştirdiğini ve hasta sonuçlarını iyileştirdiğini göstermektedir (Garattini ve ark., 2014; Yıldırım ve ark., 2016; Davis ve ark., 2021). Akademi, endüstri ve düzenleyici kurumlar arasındaki işbirliğinin yeni ilaçların güvenliğini ve etkinliğini sağlamada önemli avantajlar sağladığını ayrıca işbirlikçi stratejinin bilimsel keşifleri klinik uygulamalara dönüştürülmesini kolaylaştırmakla kalmadığını aynı zamanda düzenleyici onay sürecini de kolaylaştırarak hastalar için yeni tedavilerin kullanılabilirliğini hızlandırdığı da bilinmektedir (Hughes ve ark., 2011; Garattini ve ark., 2014; Davis ve ark., 2021). İlaç geliştirmede uluslararası işbirliği, halk sağlığı açısından kriz dönemleri ile mücadelede ilaç ile tedavi sürecinin geliştirilmesi ve dağıtımının hızlandırılmasında küresel ortaklıkların gerekliliğini ve ortaya çıkan sağlık tehditlerine yanıt verme ve sağlık araştırmalarının ilerlemesinde uluslararası boyutta işbirlikçi çalışmalar yapma açısından da önemlidir (Manor ve ark., 1994; Garattini ve ark., 2014).

Edinilen deneyimler ve yapılan araştırmalar ilaç geliştirmede bilimsel iş birliğinin önemli olduğunu ve yenilikçiliği teşvik etme, araştırmaların klinik uygulamaya dönüştürülmesini hızlandırma ve karşılanmayan tıbbi ihtiyaçları giderme açısından da gerekli olduğunu göstermektedir. İlaç geliştirmedeki işbirlikçi çalışmada, çok disiplinli ortaklıkları geliştirerek ve farklı paydaşların uzmanlığından yararlanarak sağlık araştırmalarının ilerlemesine ve hastalar için daha etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlaması açısından oldukça önemlidir (Manor ve ark., 1994; Garattini ve ark., 2014). İlaç araştırma ve geliştirme süreçlerinde tıp, biyoloji, moleküler biyoloji, biyoteknoloji, eczacılık, kimya, kimya mühendisi vb. gibi farklı disiplinlerden araştırmacıların bütünsel bir yaklaşım ile bir arada çalışması ile molekülden ilaca giden yolda başarı sağlanması mümkün olabilecektir.

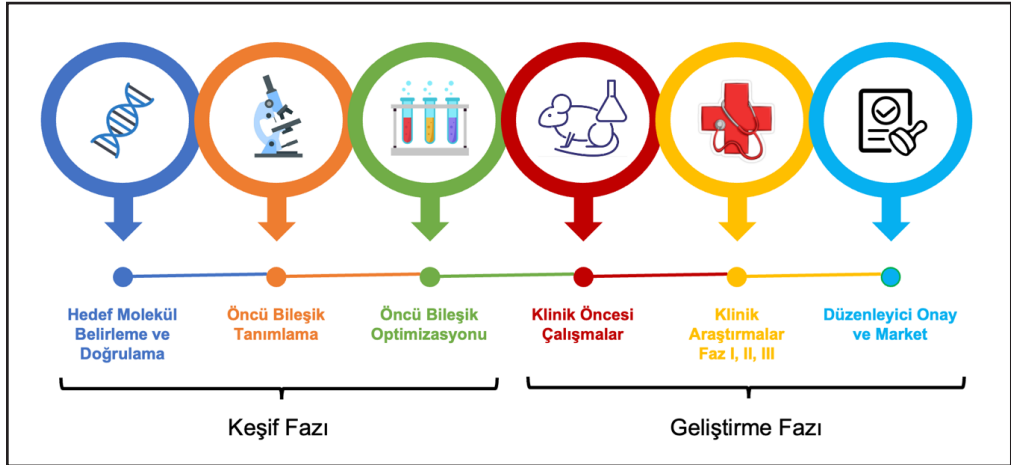
Sonuç olarak, ilaç geliştirme sağlık hizmetlerinin ilerlemesinin, küresel olarak bireylerin refahını iyileştirmesinin en temel unsurlarından biridir. İlaç geliştirmeye yönelik süregelen bağlılık, dünya çapında bireylerin ve toplulukların karşılaştığı çeşitli sağlık sorunlarına yeni olanaklar ve çözümler sunarak sağlık hizmetlerinin ilerlemeye devam etmesine ve buna bağlı olarak toplumsal ve ekonomik refahın iyileşmesine katkı sağlar.

2. İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİ: MOLEKÜLDEN İLACA

İlaç keşfi, hastalıkları kontrol altına alma ve etkili bir şekilde tedavi etme potansiyeline sahip ilaçları geliştirmek için terapötik molekülleri tanımlama ve karakterize etme sürecidir (Bateman, 2022). Hastaların yaşamlarını iyileştirebilecek yeni ilaçların geliştirilmesini amaçlayan, potansiyel ilaç adaylarının pazara ulaşana kadar ki etkinlik testlerinin ve kalite değerlendirmelerinin gerçekleştirildiği ilaç keşfi çeşitli disiplinler arasında iş birliği gerektiren, uzun ve maliyetli bir süreçtir (Khurshid Ahmad, 2014). İlaç endüstrisi ve araştırmacılar, uygun ilaç adaylarının kısa sürede ve etkili bir şekilde belirlenerek seçilmesinin ilaç üretim maliyetini büyük ölçüde etkilemesi nedeniyle ilaç keşif sürecinin optimize edilmesi üzerinde odaklanmıştır.

İlaç geliştirme süreci genel olarak aşağıdaki basamaklardan oluşur (Şekil 1).

- Keşif
- Geliştirme
- Tescil / Ruhsatlandırma
- Kalite / Üretim
- Dağıtım

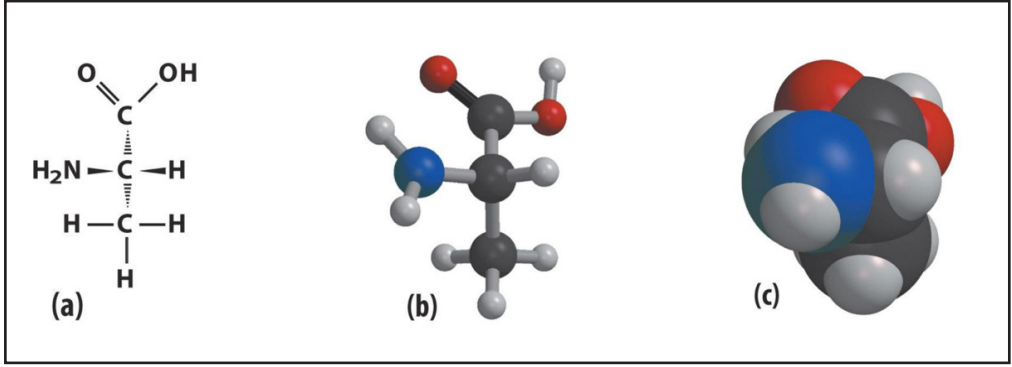


Şekil 1. İlaç keşfi ve geliştirilmesi basamakları

3. MOLEKÜL

İlaç geliştirme sürecinin ilk aşaması olan molekül keşfinden önce molekülün yapısı üzerine araştırmacıların bilgi sahibi olması molekülün terapötik etkinliğinin belirlenmesinde kritik öneme sahiptir. Benzer molekül yapılarına sahip öncü moleküllerin bazı biyolojik etkileri ortak iken, yapılarındaki küçük farklılıklar farmakolojik özelliklerinde önemli değişikliklere yol açabilir. İlaç şirketleri, ters (advers) reaksiyonları en aza indirmek ve spesifik terapötik etki elde etmek için molekül yapısını optimize etmek amacıyla titiz çalışmalar yürütmektedir. Bu nedenle molekül yapısı ve konfigürasyonları hakkında ilaç araştırmalarına başlamadan bilgi sahibi olunmalıdır (Şekil 2).

Molekül yapısı, stereokimya; molekülü oluşturan atomların üç boyutlu uzaydaki dizilişidir. Kovalent bağlar ve fonksiyonel gruplar bir molekülün işlevi için önemlidir.



Şekil 2. Molekül yapılarının farklı gösterimi (Nelson ve ark., 2024)

Alanin amino asidinin yapısı (burada nötr pH'daki iyonik yapı gösterilmiştir) üç şekilde gösterilebilir;

- Yapısal formül: kalın ok (\blacktriangleright) geniş uç tarafındaki atomun kâğıt düzleminin dışına (okuyucuya doğru) yöneldiği bir bağı gösterir. Kesikli ok (\cdots) kâğıt düzleminin arkasına doğru yönlendirilmiş bir bağı gösterir.
- Bağlı bağ uzunluklarını ve bağ açılarını gösteren top ve çubuk modeli.
- Her atomun tam göreceli van der Waals yarıçapını gösteren üç boyutlu uzay dolgu modeli (Nelson ve ark., 2024).

Stereokimya (bir moleküldeki atomların uzamsal düzeni), kiral (bir moleküldeki asimetrik merkezlerin varlığı) ve izomer gibi faktörler bir ilacın etkinliğini değiştirebilir. Molekülün yapısı, fonksiyonel gruplar, stereoizomer, substituent, enantiyomer, rasemik karışım, kiral merkez ve kiral bileşik gibi terimler ile tanımlanmaktadır. Molekülün potansiyel kimyasal ve biyolojik aktivitesini belirleyecek bu parametreler;

İzomer: İki veya daha çok maddenin kapalı formülleri aynı, yapı ve özellikleri farklıdır (Şekil 3). Örneğin; Glikoz, Mannoz ve Fruktoz ($C_6H_{12}O_6$). İzomerler 2'ye ayrılır:

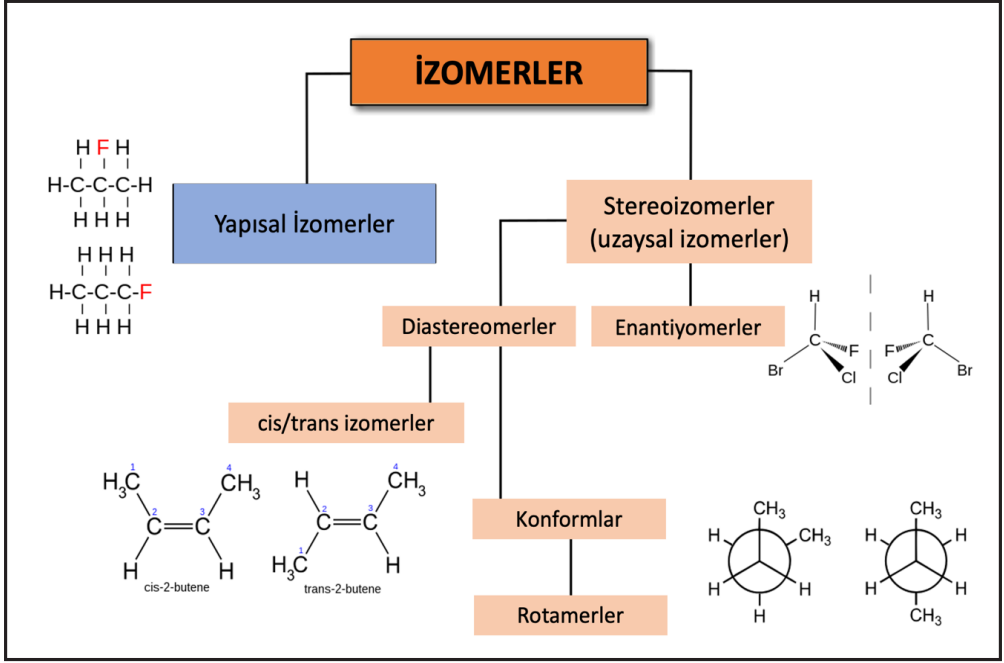
- Yapı izomerleri: Aynı tür ve sayıda atomlar içeren, fakat yapısal formülleri farklı olan bileşiklerdir.
- Stereoizomerler: Atomların bağlanma düzeni aynı, fakat uzaydaki düzenlenmesi farklı olan izomerlerdir. Stereoizomerlerde kendi içinde 2'ye ayrılır:

2A. Enantiyomerler: Birbirinin çakışmayan ayna görüntüsü olan stereoizomerler.

2B. Diastereomerler: Birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerler.

Süstitüent (R): Yer değiştiren grup

Rasemik karışım (Rasemat): Optik aktivite gösteren bileşiklerin D- (asimetrik karbonun sağında yer alıyorsa) ve L- (asimetrik karbonun solunda yer alıyorsa) stereoizomerlerinin eşit olarak karışımı olarak tanımlanır (Nelson ve ark., 2024).



Şekil 3. İzomer yapıları (Nelson ve ark., 2024)

3.1. Kiral ve Akiral Moleküller

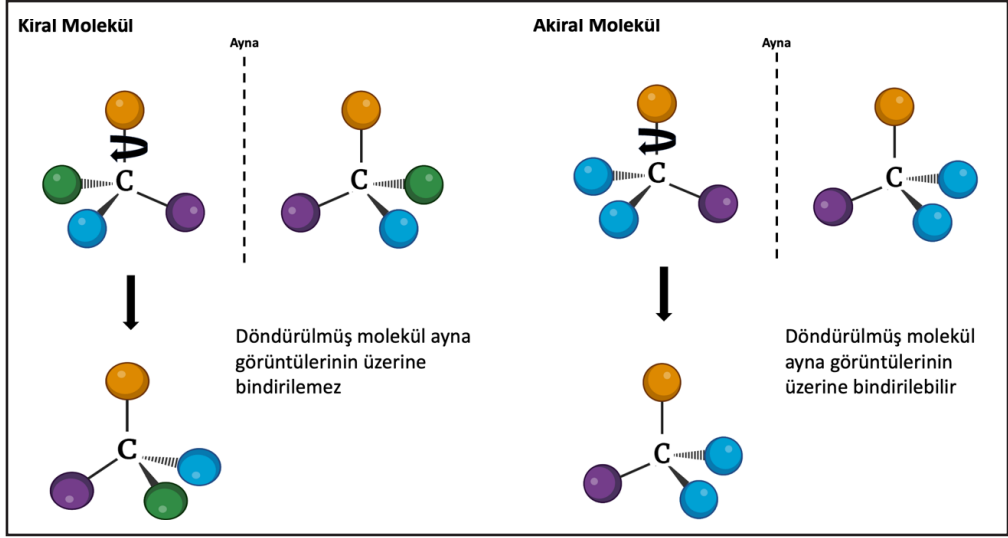
Kiral merkez: Orijinal bileşimdeki atomların başka atomlarla yer değiştirdiği düzenleme sonucunda molekülün ayna görüntüsünün simetrik olmadığı bir atom olarak tanımlanır.

Kiral bileşik: Asimetrik bir merkez (kiral atom-kiral merkez) içeren ve bu nedenle simetrik olmayan iki ayna görüntüsü şeklinde görünen bileşik olarak tanımlanır.

Bir karbon atomu dört farklı süstitüent grubu içerir ve bu gruplar iki farklı şekilde düzenlenebilir. Bu iki yapı birbirinin üst üste bindirilemeyen ayna görüntüleridir (enantiyomerler). Bu asimetrik karbon atomuna kiral atom veya kiral merkez denir (Şekil 4).

Dört yüzlü bir karbon atomu sadece üç farklı süstitüent içerdiğinde (örneğin, aynı gruptan iki tane varsa), sadece tek bir konfigürasyon mümkündür ve oluşturduğu molekül asimetrik veya akiraldir. Bu durumda, molekül ayna görüntüsü üzerine bindirilebilir: soldaki molekül saat yönünün tersine döndürüldüğünde, molekülün ayna görüntüsü elde edilir.

Kiral merkezler ve stereoizomerizm bir ilacın aktivitesi üzerinde oldukça fazla bir etkiye sahip olabilir. Örneğin molekül enantiyomerler, kiral reseptörlerle etkileşimleri nedeniyle farklı farmakolojik özellikler sergileyebilir. Stereokimyayı anlamak ve kontrol etmek ilaç tasarımında hayati önem taşır (Nelson ve ark., 2024).

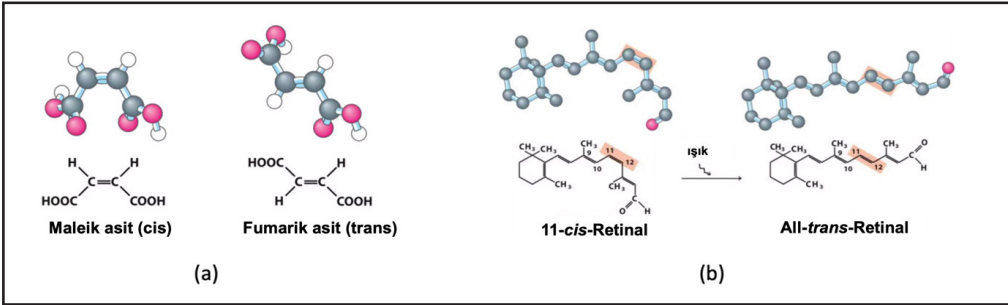


Şekil 4. Kiral ve akiral moleküller (Nelson ve ark., 2024).

3.2. Geometrik İzomerler veya *Cis-Trans* İzomerler

Geometrik izomerlerin konfigürasyonları (Şekil 5).

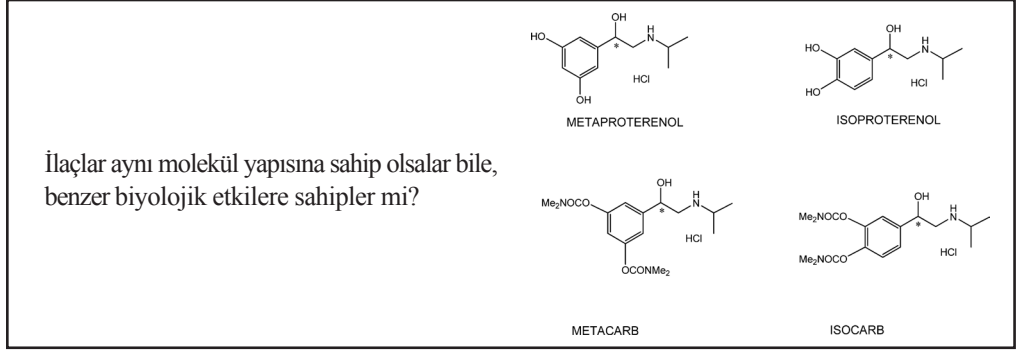
- (a) Maleik asit (pH 7'de malat) ve fumarik asit (fumarat) gibi izomerler kovalent bağlar koparılmadan birbirlerine dönüştürülemez. Bunun için moleküllerin fizyolojik sıcaklıklardaki ortalama kinetik enerjisinden çok daha fazla enerji verilmesi gerekir.
- (b) Omurgalı retinasında, ışığın algılanması sırasındaki ilk olay, görünür bölgedeki ışığın 11-*cis*-retinal tarafından emilmesidir. Soğurulan ışığın enerjisi (yaklaşık 250 kJ/mol) 11-*cis*-retinali *trans*-retinal haline dönüştürür. Bu olay retina hücresinde elektriksel değişikliklere neden olur ve bir sinir impulsu oluşur (Nelson ve ark., 2024).



Şekil 5. Geometrik izomerlerin konfigürasyonları (Nelson ve ark., 2024)

Aynı molekül yapısına sahip iki ilaç aynı gibi görünse de kimyasal yapılarındaki küçük farklılıklar biyolojik etkilerinde önemli değişikliklere yol açabilir (Şekil 6). Atomların veya fonksiyonel grupların düzenlenmesindeki küçük değişiklikler bile bir ilacın farmakokinetik parametrelerini (vücudun ilacı nasıl emdiği, dağıttığı, metabolize ettiği ve attığı) ve farmakodinamisini (ilacın hedef reseptörleri veya

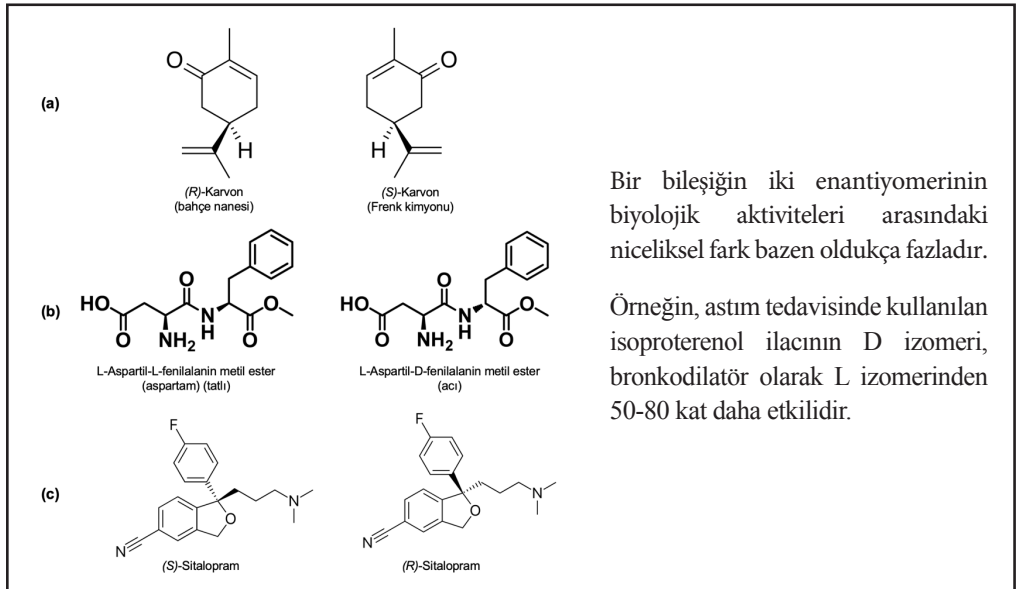
enzimleriyle nasıl etkileşime girdiği) etkileyebilir. Bir ilacın biyolojik etkisi genellikle vücuttaki belirli reseptörler, enzimler veya diğer moleküler hedeflerle etkileşimi ile belirlenir. Bir ilacın yapısındaki küçük değişiklikler bile bu hedeflere bağlanma afinitesini değiştirebilir ve potansiyel olarak etkinlik, etki ve yan etkilerde farklılıklara yol açabilir (Nelson ve ark., 2024).



Şekil 6. Aynı yapısal formüle sahip moleküller (Nelson ve ark., 2024)

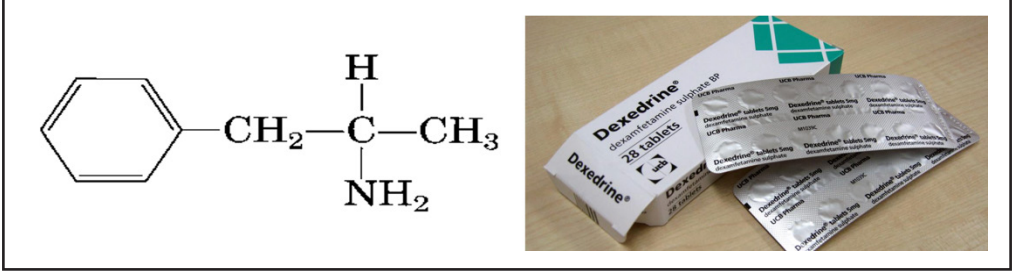
3.3. İlaç Etkinliği ve Stereokimya

Stereoizomerlerin insanlar üzerinde farklı etkileri vardır. Bir protein üzerindeki bağlanma bölgesi, kiral bir molekülün bir izomeri için tamamlayıcı ise, diğeri için tamamlayıcı olamaz. Örneğin; bir eldivenin sol tarafını sağ ele giyememeye benzer Karvonun iki izomeri: (R)-karvon: nane yağından izole edilir; (S)-karvon kimyon tohumu yağından elde edilir (Şekil 7a). Aspartam (yapay tatlandırıcı): İki kiral karbon atomundan birinin konfigürasyonundaki farklılık bulunmaktadır ve tat reseptörleri aracılığıyla stereoizomerinden ayırt edilebilir (Şekil 7b), Sitalopram (antidepresan): İki stereoizomerin rasemik bir karışımı olarak bulunur. Ancak sadece (S)-sitaloplam terapötik etkiye sahiptir (Şekil 7c) (Nelson ve ark., 2024).



Şekil 7. Stereoizomerlerin farklı etkileri (Nelson ve ark., 2024)

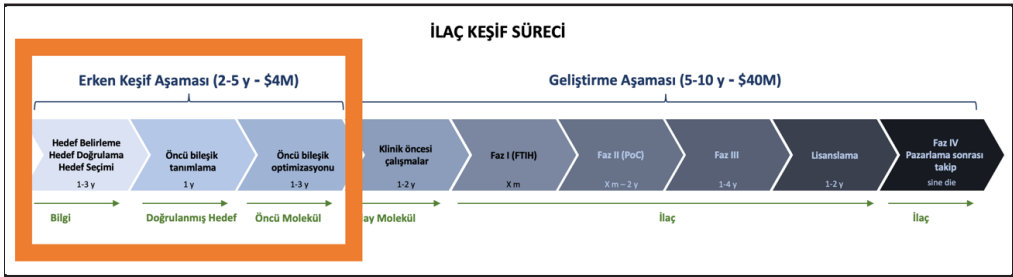
Amfetamin (alfa-metil-fenetilamin) narkolepsi, dikkat eksikliği ve hiperaktivite bozukluğu gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan sentetik bir uyarıcıdır. Dexedrin (d-amfetamin) ve Benzedrin (dl-amfetamin) fiziksel özellikleri (C, H ve N analizi, erime noktası, çözünürlük vb.) aynı olan amfetamin enantiyomerleridir (Şekil 8). Dexedrin, tek enantiyomerden oluşuyorken Benzedrin, rasemik bir karışım halindedir. Amfetamin'in sadece bir enantiyomeri fizyolojik olarak aktiftir. Tedavi amaçlı önerilen oral Dexedrin dozu (hala mevcut olan) 5 mg/gün iken önerilen Benzedrin dozu (artık piyasada mevcut değil) iki katı kadardır. Bu nedenle aynı fizyolojik tepkiyi vermek için Dexedrin'den çok daha fazla Benzedrin gerekmektedir (Nelson ve ark., 2024).



Şekil 8. Amfetamin'in moleküler yapısı ve tedavi amaçlı kullanılan enantiyomeri Dexedrin (Nelson ve ark., 2024)

4. İLAÇ GELİŞTİRME SÜRECİ: KEŞİF

Terapötik potansiyele sahip moleküllerin tanımlanması ve geliştirilmesi, ilaç keşfi ve geliştirilmesi sürecinin en önemli unsurlarındandır. Bu süreç, moleküllerin onaylı ilaçlar haline gelmeden önce güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için kapsamlı araştırmalar, klinik öncesi testler ve klinik denemeler dahil üzere bir dizi aşamadan oluşmaktadır (Şekil 9) (Khurshid Ahmad, 2014; Bateman, 2022).



Şekil 9. İlaç keşif sürecinde erken keşif aşaması

İlaç keşfinin amacı bir hastalığa neden olduğu bilinen spesifik bir hedefe bağlanabilen ve hedefin işlevini değiştirebilen yeni ilaç moleküllerinin belirlenmesi ve/veya geliştirilmesidir (Khurshid Ahmad, 2014). İlaç keşfi bir ilacın tasarlanma sürecidir ve buradaki ilk ve en önemli adım uygun bir hedefin belirlenmesidir. Bu hedefler bir hastalık durumu veya genleri, nükleik asitleri ve proteinleri (reseptörler, taşıyıcılar, enzimler ve iyon kanalları gibi) içeren biyomoleküller olabilir (Shan ve ark., 2011). Hedef belirleme aşamasında, bir hedefi bulmak, izole etmek, işlevleri hakkında

kapsamlı bilgi edinmek ve bu işlevlerin hastalıklara nasıl etki ettiğini anlamak için çeşitli teknikler kullanılmaktadır.

İlaç keşif aşaması;

- Hedef tanımlama
- Hedef doğrulama
- Öncü molekül seçim
- Öncü molekülden Lider Moleküle alt başlıklarından oluşmaktadır.

Hedef Tanımlama

Birçok terapötik molekül, proteinlere, enzimlere, reseptörlere veya genetik materyal gibi belirli biyolojik hedeflerle etkileşime girecek şekilde tasarlanmıştır. Bu özgülük, yan etkileri en aza indirirken istenen terapötik etkiyi elde etmek için önemlidir. Terapötik moleküllerin etki şekli büyük farklılıklar gösterir. Bazı moleküller biyokimyasal yolları modüle edebilir, bazıları ise spesifik proteinleri inhibe edebilir veya aktive edebilir ve bazıları da gen ekspresyonunu etkileyebilir. Moleküllerin etki yolunu anlamak, terapötik sonuçları optimize etmek için çok önemlidir. İlaç hedefleri etkili, güvenli, kullanılabilir, klinik ve ticari gereklilikleri karşılayabilir olmalıdır.

a. Hastalık Mekanizmalarını Anlamak: Araştırmacılar belirli bir hastalığın altında yatan moleküller ve hücresel mekanizmaları anlamayı amaçlamaktadır. Genetik çalışmalar, epidemiyolojik veriler ve biyobelirteç analizleri potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olur.

b. Genomik ve Proteomik Analiz: Genomik ve proteomik analizlerdeki gelişmeler, araştırmacıların potansiyel ilaç hedefleri için tüm genomu ve proteom profilini keşfetmelerine olanak tanır. Hastalık patogenezi ile ilişkili genlerin veya proteinlerin tanımlanması kilit bir odak noktasıdır.

c. Biyoinformatik ve Sistem Biyolojisi: Biyolojik verileri analiz etmek için hesaplama araçlarının kullanılması, potansiyel hedeflerin ve bunların etkileşimlerinin belirlenmesine yardımcı olur. Sistem biyolojisi yaklaşımları, hücreler içindeki moleküller etkileşim ağını dikkate alır.

Hedef Doğrulama

Hedef doğrulama safhasında, yeni ilaçların geliştirilmesinde yararlı olabilecek hedefleri seçmek için, her bir ilaç hedefi, potansiyel ilişkilerine dayanarak analiz edilmeli ve karşılaştırılmalıdır. Bu aşama farmakokinetik (PK), farmakodinamik (PD), toksikoloji, dozaj ve optimizasyon çalışmalarını da kapsayan deneysel süreçler ile gerçekleşir (Terstappen ve ark., 2001). Deneysel, ilaç hedefi ile hastalıklı hücrelerin davranışında istenen bir değişiklik arasındaki etkileşimi doğrulamak için gerçekleştirilmektedir (Ratti ve ark., 2001). Hedef doğrulama aşamasından sonra, bu hedefe yönelik inhibitörler, modülatörler veya antagonistler gibi etkili bileşiklerin tanımlanması gerekir.

Hedefleri doğrulamak için araştırmacılar Literatür Taraması, Genomik (Mikrodizin analizi ve Yeni nesil dizileme analizi, CRISPR) ve Proteomik Analiz, Biyoinformatik Araçlar (BLAST, NCBI Gene ve UniProt), Yolak Analizi (Biyolojik ağ veri tabanları ve STRING veya Cytoscape), Fonksiyonel Analiz (Gen Ontolojisi (GO) analizi ve DAVID veya Reactome), İfade Profili Analizi (Mikrodizin

veya RNA-dizileme), Klinik Veri Analizi, Deneysel Doğrulama (PCR, qRT-PCR, western blot ve immünohistokimya), Genetik İlişkilendirme Çalışmaları (GWAS), İşbirliği ve Veri Paylaşımı, İlaç Hedefi Veri tabanları (DrugBank, Therapeutic Target Database) gibi modern araç ve teknikleri kullanmaktadır.

Öncü Molekül Seçimi (Yüksek Verimli Tarama)

Bir hedef doğrulandıktan sonra, potansiyel ilaç adaylarını belirlemek için yüksek verimli tarama teknikleri kullanılır. Bu taramalar, istenen biyolojik aktiviteyi sergileyen molekülleri belirlemek için binlerce bileşiğin test edilmesini içerir. Bu aşamada umut vaat eden bileşikler öncü molekül olarak adlandırılır. Birçok terapötik molekül, proteinler, enzimler, reseptörler veya genetik materyal gibi spesifik biyolojik hedeflerle etkileşime girecek şekilde tasarlanmıştır. Bu özgülük, yan etkileri en aza indirirken istenen terapötik etkiyi elde etmek için önemlidir. Hedef tanımlama ve doğrulama, daha sonraki ilaç geliştirme süreçlerinin sağlam temellere dayanmasını sağlamak için oldukça önemlidir.

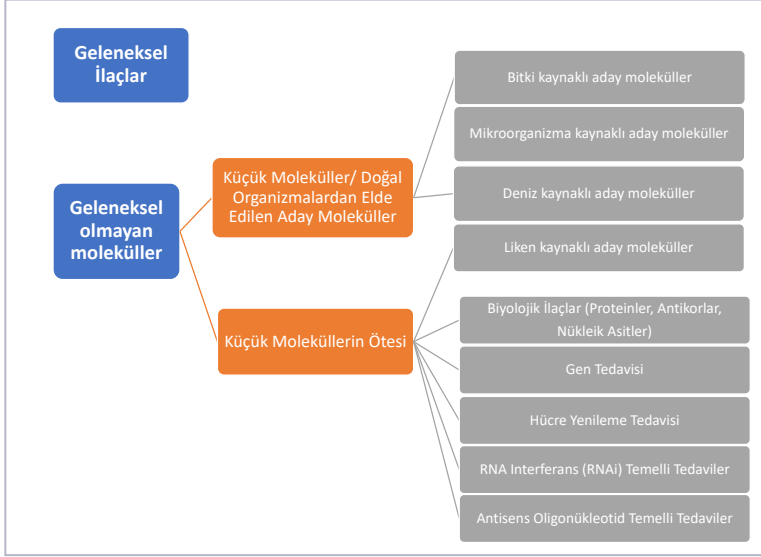
Lider Molekül Tanımlama

Öncü molekül havuzundan, lider moleküller etkinlik, güvenlik profillerine ve diğer ilgili kriterlere göre seçilir. Bu lider bileşikler, ilaç geliştirme aşamasındaki daha ileri süreçler için başlangıç noktası olarak hizmet eder. Lider molekülün tanımlanması olarak adlandırılan bu aşamada, belirlenen hedef üzerindeki etkiyi izlemek için uygun analizlerin tasarlanması ve geliştirilmesi gerçekleştirilir. Lider moleküller doğal kaynaklardan elde edilen moleküller ve modifikasyonları, yapıya yönelik moleküller tasarımlar veya sentetik bileşiklerin taranması yoluyla elde edilebilir (Ekins ve ark., 2014). Sanal tarama veya yüksek verimli tarama (HTS) yöntemleri ile doza bağlı hedef modülasyonu gösteren lider moleküller olarak belirlenir (Ekins ve ark., 2014). Ardından moleküller *in vivo* modeller üzerinde incelenerek etki ve seçicilik açısından optimize edilir ve moleküllerin fizikokimyasal, farmakokinetik ve güvenlik özellikleri değerlendirilir (Smith, 2003; Michelini ve ark., 2010). Lider moleküllerin optimizasyonu sürecinde yapı aktivite ilişkilerini (SARs) geliştirmek için moleküllerin türevlerinin sentezi ve test edilmesiyle lider molekülün tanımlanması, fizikokimyasal özelliklerin hesaplanması ve kantitatif yapı aktivite ilişkileri (QSAR) gibi tekniklerin lider moleküllerin seçimi için kullanılması aşamaları yer almaktadır (Smith, 2003; Green ve ark., 2013).

Keşif aşamasının ardından *in vitro* ilaç formülasyon deneyleri, *in vivo* çalışmalar, güvenlik ve ilaç metabolizması analizler ve büyük ölçekli sentez çalışmaları ile klinik öncesi öncü molekül geliştirme aşaması tamamlanır. Klinik araştırmalar (Faz 1; sağlıklı, gönüllü insanlarda küçük ölçekli güvenlik ve doz aralığı testi, Faz 2; hastalar üzerinde klinik araştırmalar, Faz 3; hastalar üzerinde karşılaştırmalı çift kör çalışmaları) ile lider molekülü insanlar üzerindeki güvenliğini ve etkinliğini belirlenir (Aronson, 2010; Butte ve ark., 2012). Doğrulanmış terapötik bileşik ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici kurumlar tarafından klinik kullanıma onay verilmeden önce güvenlik ve etkinlik açısından değerlendirilir. Onaylanan ve ruhsatlanarak piyasaya çıkan ilaç, ortaya çıkan güvenlik endişelerini belirlemek ve gidermek için sürekli olarak takip edilmektedir. Pazarlama sonrası izleme olarak adlandırılan bu aşama, klinik araştırmalar sırasında tespit edilemeyen nadir yan etkilerin veya öngörülemez risklerin belirlenmesine yardımcı olur (Saikia ve ark., 2019; Hassan ve ark., 2020). İlaç yaşam döngüsü yönetimi aşaması, ilaca yönelik yeni formülasyonlar, dozaj formları ve endikasyonların geliştirilmesine yönelik devam eden araştırmaları kapsar ayrıca faz 4 klinik deneylerini de içerebilir. Bu süreç ilacın pazar ömrünü uzatmaya ve tedavi edici değerini artırmaya yardımcı olur (Berger ve ark., 2016; Omidian ve ark., 2022).

5. İLAÇ ADAY MOLEKÜL

İlaç keşfi çeşitli terapötik ajanları araştırmak ve geliştirmek için sürekli gelişen dinamik bir süreçtir. İlaç aday molekülleri farklı özelliklere ve olası terapötik kullanımlara sahip olan, küçük kimyasal moleküllerden biyolojik organizmalardan elde edilen moleküllere kadar değişen oldukça geniş bir çeşitliliğe sahiptir (Eder ve ark., 2015). Hastalık mekanizmalarının ve moleküler hedeflerin anlaşılması ilerledikçe, potansiyel ilaç adaylarının spektrumu, çeşitliliği genişleyecek ve yenilikçi terapötiklerin geliştirilmesi için yeni fırsatlar sunacaktır (Şekil 10).



Şekil 10. İlaç aday moleküllerin çeşitliliği

5.1. Küçük Moleküller

Küçük moleküller, nispeten düşük moleküler ağırlığa (50-500 Da) sahip, etkili emilim, dağılım ve metabolizma özellikleri gösteren organik bileşiklerdir ve ilaç endüstrisinin en büyük ilaç aday molekül kaynağını oluşturmaktadır. Küçük moleküller, proteinler veya enzimler gibi spesifik biyolojik hedeflerle etkileşime girme yeteneğine sahiptir (Yang ve ark., 2021). Bunların çeşitliliği, hedeflerini modüle etmek için tasarlanabilen ve sentezlenebilen çok çeşitli kimyasal yapılardan kaynaklanmaktadır. Küçük moleküller biyokimyasal yolları modüle etme ve hastalık süreçlerinde yer alan spesifik moleküler hedefleri etkileme yetenekleri ile ilaç geliştirme süreçlerinde sıklıkla kullanılırlar (Berdigaliyev ve ark., 2020). Küçük moleküllerin ilaç geliştirmedeki bir diğer önemli özelliği farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin belirlenebilir olmasıdır. Farmakokinetik (PK), vücudun bir ilacı nasıl işlediğini, emilimi, dağıtımını, metabolizmayı ve atılımını (ADME) kapsayan çalışmaları ifade ederken, farmakodinamik (PD) ise ilacın vücut üzerindeki etkilerine ve etki mekanizmasına odaklanır (Bateman, 2022). Bir ilacın PK profilinin optimize edilmesi, uygulanan dozun sistemik dolaşıma ulaşan kısmını ifade eden biyoyararlanımının artırılmasını içerir. Ek olarak, uygun metabolik stabiliteye ve uygun dağılım özelliklerine sahip moleküllerin tasarlanması, aday moleküllerin etkinliğini artırabilir ve olumsuz etki riskini azaltabilir. Küçük moleküller etkili biyoyararlanıma sahiptir ve oral olarak uygulanabilir olmaları sayesinde hastaların

tedaviye uyumunu kolaylaştırır (Bateman, 2022). Küçük moleküller yüksek hedef özgüllüğüne sahiptir ve akılcı ilaç tasarımı yoluyla belirli moleküler hedeflerle seçici olarak etkileşime girecek şekilde tasarlanabilir böylece hedef dışı etkiler en aza indirilebilir. Ayrıca küçük moleküllü ilaçların saflaştırma, karakterizasyon ve üretim süreçleri makromoleküllere kıyasla düşük maliyet ve yüksek verimlilikle daha kolay bir şekilde gerçekleşmektedir bu da tedavinin erişilebilirliğe katkıda bulunur (Ngo ve ark., 2018; Sun ve ark., 2021; Zhong ve ark., 2021). Küçük moleküllü ilaçlar, her biri farklı etki mekanizmalarına ve terapötik uygulamalara sahip çok sayıda ilacı içermektedir. Tablo 1’de son yıllarında tedavi amaçlı kullanımı onaylanmış küçük moleküllü ilaçlar yer almaktadır.

Tablo 1. 2023 ve 2024 yıllarında FDA tarafından onaylanan küçük moleküllü ilaçlar (FDA, 2023; FDA, 2024).

	Onay Tarihi	Marka Adı	Jenerik Adı	Özet
1	13/2/2024	Aurlumyn	Iloprost	Yetişkinlerde şiddetli donma tedavisinde parmak amputasyonu riskini azaltan bir prostasiklin mimetikidir.
2	12/2/2024	Eohilia	Budesonide	Eozinofilik özofajit tedavisinde kullanılan onaylanmış kortikosteroid budesonidin mukoadherent bir formülasyonudur.
3	5/1/2024	Zelsuvmi	Berdazimer sodium	Yetişkinlerde ve 1 yaş ve üzeri pediatrik hastalarda molluscum contagiosum'un (MC) topikal tedavisi için endike olan nitrik oksit salgılayan bir ajandır.
4	19/12/2023	Filsuvez	Birch bark extract	Yetişkin 6 aylık ve daha büyük pediatrik hastalarda distrofik epidermolizis büllöza ve jonksiyonel epidermolizis büllöza ile ilişkili yaraların tedavisi için endike olan topikal bir huş ağacı kabuğu özütüdür.
5	13/12/2023	Iwilfin	Eflomithine	Yüksek riskli nöroblastomlu (HRNB) yetişkin ve pediatrik hastalarda nüks etme riskini azaltmak için kullanılan bir ornitin dekarboksilaz inhibitörüdür.
6	13/12/2023	iDose TR	Travoprost	Açık açılı glokom (OAG) veya oküler hipertansiyon (OHT) olan hastalarda göz içi basıncının (GİB) azaltılması için endike olan uzun süreli bir prostaglandin analogudur.
7	5/12/2023	Fabhalta	Iptacopan	Paroksizmal gece hemoglobülinürisi tedavi etmek için kullanılmaktadır.
8	27/11/2023	Ogsiveo	Nirogacestat	Desmoid tümörleri tedavi etmek için onaylanmıştır
9	16/11/2023	Truqap	Capivasertib	Belirli hastalık kriterlerini karşılayan meme kanserini tedavi etmek için onaylanmıştır
10	15/11/2023	Augtyro	Repotrectinib	ROS1-pozitif küçük hücreli dışı akciğer kanserini tedavi etmek için onaylanmıştır
11	15/11/2023	Defencath	Taurolidine, Heparin	Santral venöz kateter kullanan diyaliz hastalarında kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonunu önlemek için kullanılmaktadır
12	8/11/2023	Fruzaqla	Fruquintinib	Dirençli metastatik kolorektal kanseri tedavi etmek için kullanılmaktadır
13	26/10/2023	Agamree	Vamorolone	Duchenne kas distrofisini tedavi etmek için kullanılmaktadır
14	17/10/2023	Zilbrysq	Zilucoplan	Genelleştirilmiş miyastenia gravis tedavisinde kullanılmaktadır
15	12/10/2023	Velsipity	Etrasimod	Orta dereceden şiddetliye kadar aktif ülseratif koliti tedavi etmek için kullanılmaktadır
16	22/9/2023	Exxua	Gepirone	Majör depresif bozukluğu tedavi etmek için kullanılmaktadır
17	15/9/2023	Ojjaara	Momelotinib	Orta veya yüksek riskli miyelofibrozu tedavi etmek için kullanılmaktadır
18	8/9/2023	Aphexda	Motixafortide	Multipl miyelomlu hastalarda hematopoietik kök hücrelerin toplanması ve ardından ologog transplantasyon için periferik kana mobilize edilmesi amacıyla filgrastim ile birlikte kullanılması amacıyla onaylanmıştır

19	16/8/2023	Sohonos	Palovaroten	Fibrodisplazi ossifikans progresivasında yeni heterotopik ossifikasyonun hacmini azaltmak için kullanılmaktadır
20	4/8/2023	Zurzuvae	Zuranolon	Doğum sonrası depresyonu tedavi etmek için kullanılan nöroaktif bir steroid ilaçtır.
21	24/7/2023	Xdemvy	Lotilaner	Demodex blefaritini tedavi etmek için kullanılmaktadır
22	20/7/2023	Vanflyta	Quizartinib	Belirli kriterleri karşılayan yeni teşhis edilmiş akut miyeloid lösemi tedavisinde kullanılmaktadır
23	23/6/2023	Litfulo	Ritlecitinib	Şiddetli alopesi areata'yı tedavi etmek için kullanılmaktadır
24	26/5/2023	Inpefa	Sotagliflozin	Kardiyovasküler ölüm riskini, kalp yetmezliği nedeniyle hastaneye yatmayı ve acil kalp yetmezliği problemlerini azaltmak için kullanılmaktadır
25	26/5/2023	Inpefa	Sotagliflozin	Kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan bir sodyum-glikoz kotransporter 2 (SGLT2) inhibitörüdür.
26	25/5/2023	Paxlovid	Nirmatrelvir, Ritonavir	Şiddetli COVID-19'a ilerleme riski yüksek olan hafif-orta şiddetli COVID-19'u tedavi etmek için kullanılmaktadır
27	25/5/2023	Posluma	Flotufolastat F18	Prostat kanseri görüntülemesinde pozitron emisyon tomografisi ile birlikte kullanılmak üzere onaylanmıştır
28	23/5/2023	Xacduro	Sulbactam, Durlibactam	Acinetobacter baumannii-calcoaceticus kompleksinin duyarlı izolatlarının neden olduğu hastane kökenli bakteriyel pnömone ve ventilatörle ilişkili bakteriyel pnömoneyi tedavi etmek için kullanılmaktadır
29	22/5/2023	Opvee	Nalmefene hydrochloride	Opioid doz aşımının tedavisinde kullanılmak üzere onaylanmış opioid antagonisti nalmefen hidroklorürün burun spreyi formülasyonudur.
30	21/5/2023	Ycanth	Cantharidin	Yumuşakça contagiosum'u tedavi etmek için belirtilen doğal bir üründür.
31	18/5/2023	Miebo	Perfluorohexyloctane	Kuru göz hastalığının belirti ve semptomlarını tedavi etmek için kullanılmaktadır
32	12/5/2023	Veozah	Fezolinetant	Menopozun neden olduğu orta ila şiddetli sıcak basmalarını tedavi etmek için kullanılmaktadır
33	1/5/2023	Lumryz	Sodium oxybate	Narkolepsi ile ilişkili katapleksi ve aşım gündüz uykululuğunu (EDS) tedavi etmek için kullanılan merkezi sinir sistemi depresanıdır.
34	24/3/2023	Joenja	Leniolisib	Aktive edilmiş fosfoinositid 3-kinaz delta sendromunu tedavi etmek için kullanılmaktadır
35	22/3/2023	Rezzayo	Rezafungin	Kandidemi ve invaziv kandidiyazı tedavi etmek için kullanılmaktadır
36	10/3/2023	Daybue	Trofinetide	Rett sendromunu tedavi etmek için kullanılmaktadır
37	9/3/2023	Zavzpret	Zavegepant	Migreni tedavi etmek için kullanılmaktadır
38	28/2/2023	Skyclarys	Omaveloxolone	Friedrich ataksisini tedavi etmek için kullanılmaktadır
39	17/2/2023	Filspari	Sparsentan	Hızlı hastalık ilerlemesi riski taşıyan primer immünoglobulin A nefropatisindeki proteinüriyi azaltmak amacıyla kullanılmaktadır
40	1/2/2023	Jesduvroq	Daprodustat	Kronik böbrek hastalığının neden olduğu anemiyi tedavi etmek için kullanılmaktadır
41	27/1/2023	Jaypirca	Pirtobrutinib	Bir BTK inhibitörü de dahil olmak üzere en az iki basamaklı sistemik tedaviden sonra tekrarlayan veya dirençli mantle hücreli lenfomayı tedavi etmek için kullanılmaktadır
42	27/1/2023	Orserdu	Elacestrant	En az bir basamak endokrin tedavisini takiben hastalık ilerlemesi gösteren bazı ilerlemiş veya metastatik meme kanseri türlerini tedavi etmek için kullanılmaktadır
43	23/1/2023	Rykindo	Risperidone	Yetişkinlerde şizofreni ve bipolar I bozukluğunun tedavisi için onaylanmış atipik antipsikotik risperidonun uzun etkili enjeksiyon formülasyonudur.
44	20/1/2023	Brenzavvy	Bexagliflozin	Diyet ve egzersize ek olarak tip 2 diyabette glisemik kontrolü iyileştirmek amacıyla kullanılmaktadır

Antibiyotikler

Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler önemli küçük molekülü ilaçlardır (Lepore ve ark., 2019; Bergkessel ve ark., 2023). Antibiyotikler, hücre duvarı sentezi veya protein sentezi gibi temel bakteriyel süreçleri hedef alır ve bulaşıcı hastalıklarla mücadelede kritik bir rol oynamaktadır. Küçük molekülü antibiyotiklere örnek olarak penisilin, tetrasiklin ve eritromisin verilebilir. Penisilin, 1944 yılında klinik kullanımı onaylanmış, orijinal olarak *P. chrysogenum* ve *P. Rubens* gibi çeşitli *Penicillium* küflerinden elde edilen, genellikle gram pozitif organizmaların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan, β -laktam grubuna ait bir antibiyotiktir (Solensky, 2018; Ramsey ve ark., 2020). Tetrasiklin, *Streptomyces* tarafından üretilen geniş spektrumlu, küçük molekül yapıları bir poliketid antibiyotiktir ve 1954 yılında FDA tarafından tıbbi kullanımı onaylanmıştır (Platt ve ark., 2021). Tetrasiklin bakteriyel 30S ribozomal alt birimine geri dönüşümlü olarak bağlanarak ve gelen aminoasil tRNA'nın ribozom alıcı bölgesine bağlanmasını bloke ederek translasyonu engeller böylece bakteriyostatik bir etkiye neden olur (Li ve ark., 2023). 2000 yılında FDA tarafından onaylanmış diğeri bir ilaç olan Eritromisin, *Saccharopolyspora erythraea* tarafından üretilen, solunum yolu enfeksiyonları, cilt enfeksiyonları ve frengi gibi gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin neden olduğu çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan küçük molekül yapıları bir antibiyotiktir (Brittain, 1987; Latare ve ark., 1989).

Antiviral İlaçlar

Diğeri bir küçük molekülü ilaç grubu olan antiviraller, viral replikasyonları ve enfeksiyonları engellemek üzere tasarlanmıştır. Viral yaşam döngüsünde yer alan spesifik enzimleri veya proteinleri hedef alır, böylece viral enfeksiyonların vücutta yayılmasını önler (Hermann, 2016). 1981 yılında tıbbi kullanım için onaylanmış küçük molekül yapıları antivirallerden biri olan asiklovir, DNA virüslerinin herpes grubu üyelerine karşı *in vitro* antiviral aktivite göstermektedir (O'Brien ve ark., 1989; Wei ve ark., 2021). Oseltamivir ise influenza A ve B ile ilgili enfeksiyonları tedavi etmek ve önlemek için kullanılan küçük molekülü bir antiviral ilaçtır. 1999 yılında FDA tarafından onaylanan oseltamivir, viral nöraminidaz enziminin aktivitesini inhibe ederek antiviral aktivite göstermektedir (Tagarro ve ark., 2019). Ribavirin, kronik hepatit C virüsü enfeksiyonunun tedavisi için 2002 yılında FDA tarafından onaylanan antiviral ilaçtır. Ribavirin viral RNA ve protein sentezinin inhibisyonuna yol açarak çeşitli RNA ve DNA virüslerine karşı geniş spektrumlu bir aktivite göstermektedir (Shields ve ark., 2009; Beaucourt ve ark., 2014).

Kemoterapötikler

Küçük moleküller, sağlıklı dokulara verilen zararı en aza indirerek kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyip öldürmek üzere tasarlanmış anti-kanser ajanların geliştirilmesinde de etkilidir (Maniam ve ark., 2021). Bu küçük molekülü ilaçlar sıklıkla hücre proliferasyonu, anjiyogenez veya DNA onarımında rol oynayan yolları modüle ederek anti-kanser ve anti-tümör etkinlik göstermektedir (Wong ve ark., 2019). Küçük molekülü anti-kanser ajanlarının iyi bilinen örnekleri arasında çeşitli kanser türlerinin tedavi sonuçlarını önemli ölçüde iyileştiren imatinib, paklitaksel ve sisplatin yer almaktadır. İlk kez 2001 yılında bir tirozin kinaz inhibitörü olan imatinib küçük molekülü, hedefli anti-tümör ilaç olarak FDA tarafından onaylanmıştır. İmatinib, lösemi, miyelodisplastik/miyeloproliferatif hastalıklar, sistemik mastositoz, hipereozinofilik sendromu, dermatofibrosarkom protuberans ve gastrointestinal stromal tümörlerin tedavisinde kullanılan, kanser hücrelerinde CSF1R, ABL, c-KIT, FLT3 ve PDGFR- β gibi çoklu tirozin kinazları hedef alan küçük molekülü bir inhibitördür (Green ve ark., 2020). Paklitaksel, tanımlanan ilk mikrotübül stabilize edici ajandır

ve 1992 yılında yumurtalık kanseri, 1994 yılında ise meme kanseri tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Alqahtani ve ark., 2019). Küçük molekül yapısına sahip olan paklitaksel yumurtalık kanseri, meme kanseri, küçük hücreli dışı akciğer kanseri, mesane kanseri ve rahim ağzı karsinomu dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Weaver, 2014; Yu ve ark., 2022). İlk platin-bazlı anti-kanser ilacı olan sisplatin 1978 yılında ilerlemiş yumurtalık ve mesane kanseri tedavisi için FDA onayı almıştır (Dasari ve ark., 2014). Sisplatin kanser hücrelerinde DNA onarım mekanizmalarına etki ederek DNA hasarı oluşumunu ve hücre ölüm yollarının aktivasyonunu indükler. Alkilleyici ajanlar sınıfına ait bir antineoplastik olan sisplatin çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Qi ve ark., 2019; Dasari ve ark., 2022).

5.1.1. Biyolojik Organizmalardan Elde Edilen Sentetik ve Yarı-Sentetik Analoglar

Doğa yüzyıllardır ilaç adayları için verimli bir kaynak olmuştur. Biyolojik organizmalardan elde edilen moleküllerin geniş çeşitliliği, potansiyel terapötik ajanların araştırılması ve geliştirilmesi için zengin bir kütüphane sağlamaktadır (Chopra ve ark., 2021). Bitkilerden, mantarlardan veya mikroorganizmalar gibi biyolojik organizmalar çok sayıda ilaç aday molekülün elde edilmesine olanak tanıyarak ilaç geliştirme çalışmalarına önemli bir rol oynamaktadır. Tarihsel olarak, doğal moleküllerin farmakoterapinin temelini oluşturmaktadır; söğüt bitkisinden elde edilen bir ilaç olan aspirin (asetilsalisilik asit) (Desborough ve ark., 2017) ve *Penicillium* cinsi mantardan elde edilen penisilin gibi antibiyotikler (Gaynes, 2017) doğal kaynakların tedavi edici potansiyelinin başlıca örneklerindedir. Doğal moleküllerin çeşitliliği ve yapısal karmaşıklığı, farmakolojik olarak aday terapötik bileşiklerin geniş bir yelpazesini oluşturmakta ve bu da onları ilaç keşfi ve geliştirilmesi için değerli kaynaklar haline getirmektedir (Chopra ve ark., 2021). Teknolojik ve analitik tekniklerin gelişmesi ile doğal kaynaklardan biyolojik aktivitelere sahip bileşiklerin tanımlanmasını ve izolasyonunu kolaylaştırmıştır. Yüksek verimli tarama yöntemleri, kombinatoriyal kimya ve biyoinformatik araçlar, potansiyel ilaç aday moleküller için kütüphanelerin verimli bir şekilde taramasına ve analiz etmesine olanak tanımaktadır. Ayrıca gelişen teknikler ile deniz ve yağmur ormanları gibi ekstrem habitatların ve ekosistemlerin araştırılmasına, çeşitli kimyasal yapılara ve biyoaktif özelliklere sahip yeni doğal kaynaklı moleküllerin keşfedilmesine yol açmaktadır.

Çeşitli bitki, mantar ve liken türlerinden, deniz organizmalarından ve mikroorganizmalardan elde edilen doğal kaynaklı moleküller daha düşük yan etkiye, daha yüksek terapötik etkinliğe ve daha yüksek afiniteye sahip ana bileşiğin analogları olan yenilikçi moleküler grupların geliştirilmesine öncülük edebilmektedir (Chopra ve ark., 2021). Doğal kaynaklı moleküllerin yapısal modifikasyonu ile gelişmiş farmakolojik özelliklere sahip sentetik türevlerinin ve analoglarının geliştirilmesi, ilaç keşif süreçlerinde doğal kaynaklı moleküllerin kullanım potansiyelini artırmaktadır. Ayrıca doğal kaynaklı moleküllerin kanser, bulaşıcı hastalıklar ve nörolojik bozukluklar da dahil olmak üzere karmaşık terapötik hedefleri modüle etme yetenekleri, ilaç araştırmalarında doğal kaynaklı moleküllerin yönelik olan ilginin artmasına neden olmaktadır.

a) Bitki Kaynaklı Terapötik Moleküller

Bitkiler çevresel stres faktörlerine uyum sağlama, otçullara karşı savunma ve tozlaşmayı kolaylaştırma gibi çeşitli ekolojik işlevlerde görev alan alkaloitler ve terpenoidlerden fenolikler ve flavonoidlere kadar çok sayıda ikincil metabolit üretebilirler (Seca ve ark., 2018). Bitkilerden elde

edilen metabolitler sahip oldukları önemli terapötik aktiviteleri nedeniyle ilaç keşfi ve geliştirilmesi süreçlerinde önemli bir role sahiptir. Bitkilerden elde edilen önemli terapötik moleküllerden biri morfindir. Morfin, haşhaş bitkisi *Papaver somniferum*'da bulunan morfinan çerçeveli alkaloid molekülüdür (Christrup, 1997). Küçük molekül yapısına sahip olan morfin'in terapötik amaçlı kullanımı 1941 yılında FDA tarafından onaylanmıştır. Bir diğer örnek orijinal olarak *Atropa belladonna* bitkisinden sentezlenen bir küçük molekül olan atropin'dir (Kwakye ve ark., 2018). Anti-kolinergik bir molekül olan atropin, asetilkolin ve diğer kolin esterlerinin etkilerini bloke eden muskarinik reseptörlerin bir antagonistidir ve çeşitli muskarinik ajanların neden olduğu zehirlenmeleri tedavi etmek için kullanılmaktadır (Buels ve ark., 2012). Digoksin ise *Digitalis lanata* bitkisinden elde edilen bir kardiyak glikozittir (Patocka ve ark., 2020). Küçük molekül yapısına sahip bir bileşik olan digoksin, en eski kardiyovasküler ilaçlardan biridir ve kronik atriyal fibrilasyon, atriyal flutter ve kalp yetmezliği gibi çeşitli kalp hastalıklarının tedavisinde kullanılmak üzere 1954 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Ziff ve ark., 2016). Bitki kaynaklı terapötik moleküllerden bir diğeri *Colchicum autumnale*'den elde edilen küçük molekül yapılı bir alkaloid olan kolşisin'dir (Deftereos ve ark., 2022). Kolşisin'in mikrotübül polimerizasyonunu düzenleyerek önemli bir anti-inflamatuvar etkiye sahip olduğu ayrıca kardiyovasküler hastalıklar üzerinde tedavi edici etki gösterdiği çok sayıda çalışma ile kanıtlanmıştır (Imazio ve ark., 2021). Klinik kullanımı ilk kez 1961 yılında onaylanan kolşisin, günümüzde gut, Ailesel Akdeniz Ateşi ve çeşitli kardiyovasküler rahatsızlıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Dalbeth ve ark., 2014). *Capsicum annuum* ve *Capsicum frutescens* türü biberlerde bulunan küçük molekül yapısına sahip bir organik bileşik olan kapsaisin, birçok hastalığın tedavisinde potansiyel bir doğal kökenli ilaç olarak uzun yıllardır araştırılmaktadır (Musolino ve ark., 2024). Kapsaisin'in sistemik pleiotropik bir etki göstererek nöropatik ağrı, rinit, kaşıntı ve kronik inflamasyon gibi çeşitli patolojik durumlara karşı terapötik aktiviteye sahip olan tropikal bir analjezik olduğu bilinmektedir (Arora ve ark., 2021). 1996 yılında lokal ilerlemiş veya metastatik meme kanseri tedavisine için FDA tarafından onaylanmış bir antineoplastik ajan olan dosetaksel, orijinal olarak porsuk ağacı *Taxus baccata*'nın iğnelerinden elde edilen kompleks bir diterpenoid moleküldür ve paklitakselin yarı sentetik bir analogudur (Kintzel ve ark., 2006). Mikrotübül dinamiklerini inhibe ederek ve hücre ölümünü indükleyerek anti-kanser etkinlik gösteren dosetaksel, meme, yumurtalık, prostat, mide ve baş-boyun kanseri gibi çeşitli kanser türlerinin tedavisinde anti-mitotik bir ajan olarak kullanılmaktadır (Assi ve ark., 2020).

b) Mikroorganizma Kaynaklı Terapötik Moleküller

Bakteriler, mantarlar ve aktinomisetler gibi mikroorganizmalar farklı kimyasal yapılara ve farmakolojik aktivitelere sahip çok çeşitli biyoaktif bileşikler üretme yeteneğine sahiptir (Katz ve ark., 2016). Mikroorganizmalardan elde edilen doğal bileşikler, ilaç keşfi ve geliştirilmesi süreçlerinde önemli bir role sahiptir. Mikroorganizmalar asidik ve bazik topraklardan, tatlı ve tuzlu sulara ve kutup bölgeleri gibi ekstrem koşullara kadar çok çeşitli ortamlarda yaşayabilmektedir. Sahip olunan geniş mikrobiyal çeşitlilik ilaç araştırmaları için önemli bir kaynak sağlamaktadır. Ayrıca sentetik biyoloji, mikroorganizma kaynaklı ürünlerden daha gelişmiş özelliklere sahip karmaşık moleküller üretilmesine olanak sağlayarak kişiye özgü ilaç geliştirme çalışmalarına katkıda bulunmaktadır (Zhang ve ark., 2020). Mikroorganizma kaynaklı terapötik moleküllere bir örnek olan vankomisin, *Streptomyces orientalis*'den elde edilen bir trisiklik glikopeptid antibiyotik olarak 1958 yılında onaylanmıştır ve *Enterococcus* türleri, *Staphylococcus aureus* ve *Clostridium difficile* gibi gram-pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır

(Stogios ve ark., 2020). Gentamisin ise 1963 yılında *Micromonospora purpurea* bakterisinden izole edilen bir aminoglikozit antibiyotiktir. Terapötik kullanımı 1966'da FDA tarafından onaylanmıştır ve hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar gibi çok çeşitli aerobik enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (Hodiamont ve ark., 2022). *Beauveria nivea* ve *Tolyocladium inflatum* gibi mantar türlerinden elde edilen immünoşüpresif bir ilaç olan siklosporin ilk kez 1983 yılında organ nakli sonrası organ reddini tedavi etmek için klinik kullanım onayını almıştır. Siklosporin, organ nakli reddini önleyen ve inflamatuvar ve otoimmün reaksiyonları engelleyen immünomodülatör özelliğe sahip bir kalsinörin inhibitörüdür (Smith, 2017; Parlakpınar ve ark., 2021). Bir diğer terapötik molekül immünoşüpresif ajan olan takrolimus, 1984 yılında *Streptomyces tsukubaensis* bakterisinden elde edilmiş ve 1994'de FDA tarafından onaylanmıştır. Takrolimus (FK-506 veya Fujimisin), özellikle böbrek, karaciğer ve kalp nakli yapılan alıcılarda organ nakli reddini önlemek ve orta ila şiddetli atopik dermatiti tedavi etmek için kullanılmaktadır (Schutte-Nutgen ve ark., 2018; Yu ve ark., 2018).

c) Deniz Kaynaklı Terapötik Moleküller

Okyanuslar ve deniz ortamları terapötik potansiyeli bulunan çok sayıda biyoaktif bileşiğin önemli bir kaynağıdır (Barreca ve ark., 2020). İlaç geliştirme süreçlerinde umut vaat eden, mikroskobik alglerden büyük deniz organizmalarına kadar uzanan çok çeşitli doğal kökenli terapötik moleküller barındıran bu ekosistemler, halen büyük ölçüde keşfedilmemiştir. Deniz organizmaları, zorlu şartlara uyum sağlamak için benzersiz biyokimyasal yollar geliştirerek yeni biyoaktif bileşikler üretebilmektedir (Barreca ve ark., 2020). Deniz kaynaklı ilaçların keşfi, deniz süngerlerinden spongin ve spongouridin gibi bileşiklerin izolasyonu başlamıştır (El-Demerdash ve ark., 2018). Günümüzde bakteriler, algler, mercanlar, süngerler ve yumuşakçalar dahil olmak üzere çeşitli deniz organizmalarından, anti-mikrobiyal, anti-kanser, anti-inflamatuvar ve antiviral gibi önemli biyolojik özelliklere sahip çok sayıda terapötik molekül keşfedilmiştir (Chopra ve ark., 2021). Örneğin deniz süngeri *Halichondria okadaï*'den izole edilen halichondrin B'nin sentetik bir analogu olan eribulin'in mikrotübül dinamiklerini bozarak güçlü anti-kanser aktivite gösterdiği belirlenmiştir (Jain ve ark., 2011). Bir mikrotübül inhibitörü olan eribulin, geç evre meme kanseri ve metastatik liposarkomu tedavisi için FDA tarafından 2010 yılında onaylanmıştır (Perry, 2011). Deniz organizmaları kaynaklı terapötik moleküllerin bir diğer örneği olan ziconotide, koni salyangozu *Conus magus*'un zehrinden elde edilen ω -konopeptidin bir analogudur ve 2004 yılında şiddetli kronik ağrıların tedavisi için FDA tarafından onaylanmıştır (Deer ve ark., 2019). Ziconotide, nöronlardaki N tipi kalsiyum kanallarını bloke ederek güçlü bir analjezik olarak çalışır (E. Brookes ve ark., 2017). Trabectedin orijinal olarak Karayip deniz fiskiyesi *Ecteinascidia turbinata*'dan elde edilen, yumuşak doku sarkomu ve yumurtalık kanserinin tedavisi için 2015'de FDA tarafından onaylanmış bir alkileyici ajandır (Nakamura ve ark., 2022). Trabectedin, DNA bağlanması, DNA onarım yollarının düzenlenmesi, transkripsiyonun ve tümör mikro-çevresinin düzenlenmesi gibi çeşitli moleküler mekanizmaların modülasyonu ile anti-kanser aktivite gösteren onaylanmış ilk deniz antineoplastik ajanıdır (Wang ve ark., 2022).

d) Liken Kaynaklı Terapötik Moleküller

Likenler, fotoototrofik algler veya siyanobakterler ile mantarlar arasındaki simbiyotik birliktelik sonucunda oluşan organizmalardır (Ranković ve ark., 2021; Dar ve ark., 2022). Liken sekonder metabolitleri anti-mikrobiyal, anti-oksidan, anti-tümör, anti-kanser, anti-invazif, anti-proliferatif,

anti-viral, anti-diyabetik ve nöro-protektif gibi çok sayıda biyoaktif özelliğe sahip olan bileşiklerdir (Devashree ve ark., 2021; Goodenough ve ark., 2021; Ranković ve ark., 2021; Dar ve ark., 2022). Şu ana kadar 1000'den fazla liken sekonder metaboliti belirlenmiş ve bunların büyük çoğunluğunun sadece likenlere özgü olduğu tespit edilmiştir (Ranković ve ark., 2021). Çalışmalar sekonder metabolitlerin kanser gelişiminde rol alan çok sayıda sinyal yolağını hedefleyerek anti-karsinojenik etkinliğe sahip olduğunu göstermiştir (Abotaleb ve ark., 2018). Liken sekonder metabolitleri hücrelerde oksidatif hasar elemanlarını inhibe ederek, hücresel enerji metabolizmasını düzenleyerek, tümör büyümesini ve genom kararsızlığını baskılayarak, immün cevabı aktive ederek, hücre döngüsünü modüle ederek, anjiyogenez, invazyon ve metastazı baskılayarak kanser önleyici özellik göstermektedir (Cansaran-Duman ve ark., 2021; Ranković ve ark., 2021; Dar ve ark., 2022). Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar liken sekonder metabolitlerinin kodlamayan RNA'ları düzenleyerek anti-kanser etkinlik başta olmak üzere önemli terapötik özellikler sergilediğini göstermiştir (Kiliç ve ark., 2019; Alkan ve ark., 2023; Ensoy ve ark., 2023). Usnik asit, *Usnea*, *Lecanora*, *Cladonia*, *Evernia*, *Parmelia*, *Alectoria* ve *Ramalina* gibi liken türlerinden izole edilen önemli bir sekonder metabolittir. Usnik asit ve türevlerinin meme kanseri, yumurtalık kanseri gibi kanser türlerinde üzerinde anti-proliferatif ve anti-kanser özelliklere sahip olduğu birçok çalışma ile kanıtlanmıştır (Kiliç ve ark., 2019; Cansaran-Duman ve ark., 2020; Tanman ve ark., 2020; Çolak ve ark., 2022). Diğer bir liken sekonder metaboliti olan vulpinik asit birçok liken türünden izole edilebilmektedir ve anti-mikrobiyal, anti-fungal, anti-kanser gibi önemli biyoaktif özelliklere sahiptir. Yapılan çalışmalar vulpinik asidin meme kanseri ve prostat kanseri gibi çeşitli kanser türlerinde hücre ölüm yollarını indükleyerek anti-proliferatif etki gösterdiği belirlenmiştir (Kiliç ve ark., 2018; Cansaran-Duman ve ark., 2021; Yangın ve ark., 2022). Atranorin, Lecanoraceae, Streocaulaceae, Parmeliaceae ve Cladoniaceae gibi liken familyalarında bulunan diğer bir liken sekonder metabolitidir. Atranorinin anti-bakteriyel, anti-oksidan, pro-oksidan, anti-proliferatif ve anti-tümör gibi çok sayıda önemli biyolojik aktiviteye sahip olduğu *in vitro*, *in silico* ve *in vivo* çalışmalar ile gösterilmiştir (Melo ve ark., 2011; Kosanić ve ark., 2014). Ayrıca atranorin, kanser hücrelerinin yaşaması için önemli olan hücresel yolları modüle ederek ve ferroptoz gibi hücre ölüm yollarını düzenleyerek anti-kanser etkinlik göstermektedir (Ensoy, 2024).

5.2. Küçük Moleküllerin Ötesi

5.2.1. Biyolojik İlaçlar

Biyolojikler canlı organizmalardan ve bunların bileşenlerinden elde edilen veya biyoteknoloji yöntemlerle üretilen büyük ve kompleks yapılara sahip moleküllerdir (Katz ve ark., 2016; Chopra ve ark., 2021). Proteinler, antikorlar, aşular, gen terapileri ve hücresel terapiler dahil olmak üzere çok çeşitli terapötik ajanları kapsayan biyolojikler, vücudun doğal biyolojik süreçlerini taklit etmek veya güçlendirmek için tasarlanmıştır ve genellikle hastalıkla ilgili spesifik moleküler yolları hedef alır. Biyolojik moleküllerin bağışıklık sistemini modüle etme, hücresel süreçleri düzenleme ve spesifik terapötik etkiler sağlama konusundaki avantajları yenilikçi ilaç geliştirme süreçlerine önemli katkılar sağlamaktadır.

a) Rekombinant Proteinler ve Monoklonal Antikorlar

Rekombinant proteinler, genetik mühendisliği teknikleriyle üretilen ve amino asit dizilerine sahip terapötik proteinlerin sentezine olanak tanıyan önemli biyolojiklerden biridir. Rekombinant proteinler, büyüme faktörleri veya enzimler gibi endojen molekülleri taklit

edebilmekte ve diyabet, büyüme bozuklukları ve hemofili gibi durumların tedavisinde kullanılmaktadır (Ferrer-Miralles ve ark., 2015). İnsan insülini 1982 yılında FDA tarafından onaylanarak tedavide kullanılan ilk rekombinant protein olmuştur (Ladisch ve ark., 1992). Klinikte kullanımı onaylanmış rekombinant proteinler arasında rekombinant hormonlar, büyüme faktörleri, interlökinler, interferonlar, kan pıhtılaşma faktörleri, tümör nekroz faktörleri, trombolitik ilaçlar ve birçok hastalığın tedavisine yönelik kullanılan enzimler bulunmaktadır (Buerger ve ark., 2003; Jefferis, 2017). Büyüme hormonu eksikliği ve zayıflık gibi bazı hastalık durumlarında çocuklarda ve yetişkinlerde replasman tedavisi olarak kullanılan somatropin bir rekombinant insan büyüme hormondur (Deal ve ark., 2022). Somatropinin yetişkinlerde kullanımı 1997’de ve çocuklarda kullanımı 2000’de FDA tarafından onaylanmıştır (Richmond ve ark., 2016). Bir diğer tıbbi kullanımı onaylanmış rekombinant protein ise etanersept’tir ve 1998 yılında romatoid artrit tedavisi için onaylanmıştır (Zhao ve ark., 2018). Spesifik olarak tümör nekroz faktörüne (TNF) bağlanarak TNF tarafından indüklenen biyolojik süreçleri düzenleyen etanersept romatoid artrit, poliyartiküler juvenil idiyopatik artrit, ankilozan spondilit ve plak sedef hastalığı gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Puig ve ark., 2015; Burness ve ark., 2016).

Monoklonal antikorlar ilaç geliştirme süreçlerinde kullanılan önemli biyolojiklerden biridir ve hücre yüzeyi reseptörleri veya çözümlü proteinler gibi spesifik hedeflere yüksek afinite ve spesiflikle bağlanacak şekilde tasarlanmaktadır (Lu ve ark., 2020). Monoklonal antikorlar, bağışıklık yanıtlarını modüle edebilir, sinyal yollarını bloke edebilir veya hedeflenen hücrelere sitotoksik ajanlar sunabilir ve bu sayede kanser, otoimmün bozukluklar ve bulaşıcı hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisinde etkili terapötik özellik gösterirler (Buss ve ark., 2012). İlk kez 1986 yılında akut transplant reddinin tedavisinde kullanılmak üzere, immün baskılayıcı olarak işlev gören, T hücresinde eksprese edilen CD3’e karşı bir fare antikorunu içeren bir monoklonal antikor, muromonab-CD3, FDA tarafından onaylanmıştır (Lu ve ark., 2020). Programlanmış hücre ölümü 1 (PD-1) reseptörünü hedef alan bir bağışıklık kontrol noktası inhibitörü olan monoklonal antikor dostarlimab ise 2021 yılında endometriyal kanser tedavisi için FDA onayı almıştır (Mirza ve ark., 2023). PD-1 inhibitörleri olan diğer monoklonal antikorlardan nivolumab ve pembrolizumab ise 2014 yılında FDA tarafından onaylanarak melanom, küçük hücreli olmayan akciğer kanseri, baş-boyun kanseri gibi kanserlerin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Patel ve ark., 2023; Provencio ve ark., 2023; Stark ve ark., 2023)the most frequently used ICIs targeting the PD-1/PD-L1 checkpoint include monoclonal antibodies (mAbs. Tablo 2’de 2023-2024 yıllarında tedavi amaçlı kullanımı onaylanmış biyoteknolojik ilaçlar yer almaktadır.

Tablo 2. 2023 ve 2024 yıllarında FDA tarafından onaylanan biyoteknolojik ilaçlar (FDA, 2023; FDA, 2024).

	Onay Tarihi	Marka Adı	Jenerik Adı	Özet
1	19/2/2024	Amtagvi	Lifileucel	Rezeke edilemeyen veya metastatik melanomlu yetişkin hastaların tedavi etmek için kullanılan, tümör kaynaklı bir otolog T hücreli immünoterapisi.
2	21/12/2023	Wainua	Eplontersen	Yetişkinlerde kalıtsal transtiretin aracılı amiloidozun polinöropatisinin tedavisi için endike olan bir transtiretin yönelimli antisens oligonükleotididir.
3	15/12/2023	Alyglo	Human immunoglobulin G	Yetişkinlerde primer humoral immün yetmezliğin (PI) tedavisi için endike olan intravenöz enjeksiyona yönelik %10 immün globulin sıvısıdır.
4	8/12/2023	Casgevy	Exagamglogene autotemcel	Orak hücre hastalığı ve transfüzyona bağlı beta-talasemi tedavisine yönelik bir CRISPR/Cas9 genomu düzenlenmiş hücre terapisi.
5	8/12/2023	Lyfgenia	Lovotibeglogene autotemcel	Beta-globin geninin işlevsel bir kopyasını sağlayarak orak hücre hastalığını tedavi etmek için kullanılan otolog bir CD34+ hücre terapisi.
6	22/11/2023	Ryzneuta	Efbemalenograstim alfa	Kemoterapiye bağlı nötropeni önlemek için kullanılan granülosit koloni uyandırıcıdır.
7	9/11/2023	Adzyna	Apadamtafe alfa	Konjenital trombotik trombositopenik purpuralı hastalarda enzim replasman tedavisi için rekombinant insan ADAMTS13'tür.
8	27/10/2023	Loqtorzi	Toripalimab-tpzi	Nazofaringeal karsinomun tedavisinde kullanılan programlanmış bir ölüm reseptörü-1 (PD-1) bloke edici antikorudur.
9	26/10/2023	Omvo	Mirikizumab-mrkz	Yetişkinlerde orta ila şiddetli aktif ülseratif kolitin tedavisinde endike olan bir interlökin-23 antagonistidir.
10	17/10/2023	Bimzelx	Bimekizumab-bkzx	Sistemik tedavi veya fototerapiye aday yetişkinlerde orta ila şiddetli plak sedef hastalığının tedavisi için hümanize bir interlökin-17A ve interlökin-17F antagonistidir.
11	29/9/2023	Rivfloza	Nedosiran	Primer hiperoksalüri tip 1 (PH1) hastalarında idrar oksalat düzeylerini düşürmek için kullanılan laktat dehidrojenaz A (LDHA) yönlendirilmiş siRNA molekülüdür.
12	28/9/2023	Pombiliti	Cipaglucosidase alfa-atga	Geç başlangıçlı Pompe hastalığı olan yetişkinlerin tedavisinde Opfolda (miglustat) ile kombinasyon halinde kullanılan hidrolik lizozomal glikojene özgü bir enzimdir.
13	8/9/2023	Aphexda	Motixafortide	Multipl miyelom hastalarında hematopoietik kök hücrelerin toplanması ve otolog transplantasyon öncesinde mobilize edilmesi için kullanılan bir CXCR4 peptid inhibitörüdür.
14	24/8/2023	Tyruko	Natalizumab-sztn	Multipl skleroz ve Crohn hastalığının tedavisi için onaylanmış, Tysabri'ye biyobenzer bir integrin reseptör antagonistidir.
15	18/8/2023	Veopoz	Pozelimab-bbfg	CD55 eksikliği olan protein kaybettiren enteropati (PLE) veya CHAPLE hastalığının tedavisi için kullanılan bir insan monoklonal IgG4 antikorudur.
16	14/8/2023	Elrefxio	Elranatamab	Yetişkinleri tekrarlayan veya dirençli multipl miyelomu tedavi etmek için kullanılan bispesifik bir antikorudur.
17	9/8/2023	Talvey	Talquetamab	Yetişkinleri tekrarlayan veya dirençli multipl miyelomu tedavi etmek için kullanılan bispesifik bir antikorudur.
18	4/8/2023	Izervay	Avacincaptad pegol	Yaşa bağlı makula dejenerasyonuna (AMD) ikincil coğrafi atrofimin (GA) tedavisi için belirtilen bir kompleman C5 protein inhibitörüdür.
19	28/6/2023	Lantidra	Donislecel	Tip 1 diyabetin tedavisinde endike olan allojenik pankreatik adacık hücreli tedavisidir.
20	27/6/2023	Ngenla	Somatrogon-ghla	Pediyatrik büyüme hormonu eksikliğinin tedavisinde kullanılan uzun etkili bir insan büyüme hormonu analogudur.

21	26/6/2023	Rystiggo	Rozanolixizumab	Genelleştirilmiş miyastenia gravis'i tedavi etmek için kullanılan insan neonatal Fc reseptörünü (FcRn) hedef alan hümanize bir monoklonal antikorudur.
22	17/6/2023	Beyfortus	Nirsevimab-alip	Yenidoğanlarda ve bebeklerde RSV alt solunum yolu hastalığının önlenmesi için kullanılan bir solunum sinistyal virüsü (RSV) F proteinine yönelik füzyon inhibitörüdür.
23	15/6/2023	Columvi	Glofitamab	Tekrarlayan veya dirençli diffüz büyük B hücreli lenfomanın tedavisinde kullanılan, CD20 ve CD3'e yönelik bispesifik bir monoklonal antikorudur.
24	25/5/2023	Posluma	Flotufolastat F-18	Prostat kanserli erkeklerde prostat spesifik membran antijeni (PSMA) pozitif lezyonların pozitron emisyon tomografisinde (PET) kullanılan radyoaktif bir teşhis ajanıdır.
25	19/5/2023	Vyjuvek	Beremagene geperpavec	Distrofik epidermolizis büllöza ile ilişkili yaralanma tedavisi için kullanılan gen terapisi.
26	19/5/2023	Epkinly	Epcoritamab	Yetişkinlerde tekrarlayan veya dirençli diffüz büyük B hücreli lenfomayı (DLBCL) tedavi etmek için kullanılan bispesifik CD20'ye yönelik CD3 T hücre bağlayıcıdır.
27	9/5/2023	Elfabrio	Pegunigalsidase alfa	Fabry hastalığı olan hastalarda uzun süreli enzim replasman tedavisi için endike olan insan α -galaktosidaz-A'nın rekombinant bir formudur.
28	26/4/2023	Vowst	Fecal microbiota	Clostridioides difficile enfeksiyonunun tekrarı önlemek için kullanılan insan dışkılarından üretilen bakteriyel bir süspansiyondur.
29	25/4/2023	Qalsody	Tofersen	Süperoksit dismutaz 1 (SOD1) geninde mutasyona sahip yetişkinlerde amiyotrofik lateral sklerozun (ALS) tedavisi için belirtilen bir antisens oligonükleotididir.
30	17/4/2023	Omisirge	Omidubicel	Kök hücre transplantasyonunu takiben enfeksiyon riskini azaltmak için hematolojik malignitesi olan hastalarda kullanıma yönelik, nikotinamid (NAM) ile modifiye edilmiş allojenik hematopoietik progenitor hücre tedavisidir.
31	22/3/2023	Zynyz	Retifanlimab	Merkel hücreli karsinom tedavisine yönelik programlanmış bir ölüm reseptörü-1 (PD-1) bloke edici antikorudur.
32	22/2/2023	Altuviio	Efanesoctocog alfa	Hemofili A hastalarında kullanılmak üzere endike olan, rekombinant DNA türevi, faktör VIII konsantresidir.
33	17/2/2023	Syfovre	Pegcetacoplan	Yaşa bağlı makula dejenerasyonuna (AMD) ikincil coğrafi atrofinin (GA) tedavisi için endike olan bir kompleman inhibitörüdür.
34	16/2/2023	Lamzede	Velmanase alfa	Alfa-mannosidozun merkezi sinir sistemi dışı belirtilerinin tedavisinde endike olan rekombinant insan lizozomal alfa-mannosidazdır.
35	6/1/2023	Leqembi	Lecanemab	Bilinen bir amiloid beta patolojisi olan hafif bilişsel bozukluğu veya hafif demansı olan hastalarda Alzheimer Hastalığını tedavi etmek için kullanılan bir amiloid beta hedefleme antikorudur.

Gen Tedavisi

Gen tedavileri hastalıkları genetik kökenlerine inerek tedavi etmeyi amaçlayan, yenilikçi ilaç geliştirme yöntemlerinden biridir (Naso ve ark., 2017). Bu tedaviler, hastalığı tedavi etmek veya önlemek için temelde hastanın hücrelerine genetik materyalin yerleştirilmesini, çıkarılmasını veya değiştirilmesini içerir. ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) gen tedavisi, “aktarılan genetik materyalin transkripsiyonu ve/veya translasyonu ve/veya konakçı genomuna entegrasyonu ile etkilerine aracılık eden ve nükleik asitler, virüsler veya genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar olarak uygulanan ürünlerdir. Bu ürünler, hücreleri *in vivo* olarak değiştirmek için kullanılabilir veya alıcıya uygulanmadan önce *ex vivo* hücrelere aktarılabilir” şeklinde tanımlamaktadır (Wirth ve ark., 2013). Avrupa İlaç Ajansı (EMA) ise gen tedavisi ürününü “genetik bir diziyi düzenlemek, onarmak, değiştirmek, eklemek veya silmek amacıyla insanlarda kullanılan veya insanlara uygulanan bir rekombinant nükleik asit içeren veya bundan oluşan bir aktif madde içeren ayrıca terapötik,

profilaktik veya diagnostik etkisi doğrudan içerdiği rekombinant nükleik asit dizisiyle veya bu dizinin genetik ifadesinin ürünüyle ilişkili olan” biyolojik bir tıbbi ürün olarak tanımlanmaktadır (Wirth ve ark., 2013). Bu yenilikçi alan, gen değişimi, gen düzenleme ve RNA interferans dahil olmak üzere çok çeşitli yaklaşımları kapsamakta ve genetik bozuklukların, nadir hastalıkların ve belirli kanser türlerinin tedavisi için umut verici yollar sunmaktadır.

Hücre Yenileme Tedavisi

Hücre yenileme tedavisi, normal gen fonksiyonunu yeniden sağlamak için kusurlu bir genin işlevsel kopyalarının hastanın genomuna yerleştirilmesi çalışmalarıdır (Pandey ve ark., 2018). Bu yaklaşım, tek bir gen mutasyonunun hastalık fenotipinin ortaya çıkmasına yol açtığı kistik fibroz, kas distrofisi ve bazı kalıtsal körlük türleri gibi monogenik bozuklukların tedavisinde önemli bir potansiyele sahiptir. Klinik kullanımı onaylanmış gen replasman tedavilerinden bazıları şunlardır; Voretigene neparvovec (Luxturna), RPE65 genindeki mutasyonla ilişkili olan ve körlüğe yol açabilen kalıtsal retina distrofisini tedavi etmek için kullanılan, 2017 yılında FDA tarafından onaylanmış, adeno-ilişkili virüs vektörü bazlı bir hücre yenileme tedavisidir (Maguire ve ark., 2021). Onasemnogene abeparvovec (Zolgensma), 2 yaşın altındaki çocuklarda survival motor nöron 1 (SMN1) genindeki bi-alelik mutasyonların neden olduğu spinal müsküler atrofi (SMA) tedavisinde kullanılan bir gen tedavisidir (Ogbonmide ve ark., 2023). Hastalığın ilerlemesini yavaşlatan, motor fonksiyonunu iyileştiren ve semptomları düzenleyen bir ajan olan Onasemnogene abeparvovec, adeno-ilişkili virüs vektörü bazlı bir gen terapisi olarak 2019 yılında FDA tarafından onaylanmıştır (Mendell ve ark., 2021). Atidarsagene autotemcel (Libmeldy), insan arilsülfataz A (ARSA) genini kodlayan otolog CD34+ ile zenginleştirilmiş hematopoietik kök hücrelerden ve progenitör hücrelerden oluşan, sinir sistemini etkileyen nadir bir genetik bozukluk olan metakromatik lökodistrofiyi (MLD) tedavi etmek için kullanılan, 2020 yılında onaylanan hücre yenileme tedavisidir (Messina ve ark., 2023).

RNA İnterferans (RNAi) Temelli Tedavi

RNA interferans (RNAi), çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) mRNA'yı hedefleyerek degrade ettiği ve böylece spesifik bir şekilde gen susturmasını indüklediği biyolojik bir süreçtir (Han, 2018). RNAi bazlı tedaviler, spesifik hastalığa neden olan genleri hedeflemek ve bu genlerin ekspresyonunu düzenlemek için sentetik miRNA veya siRNA gibi küçük RNA moleküllerinin kullanımını içerir. Yüksek spesifliğe ve düşük yan etkiye sahip olan bu yaklaşım ilaç geliştirme süreçlerinde etkili ve yenilikçi tedavilerin geliştirilmesinde büyük potansiyele sahiptir. Terapötik kullanımı onaylanmış ilk RNAi tedavisi patisiran (Onpattro)'dır (FDA tarafından 2018'de onaylanmıştır) (Hoy, 2018). Patisiran, kalıtsal transtiretin aracılı amiloidozu (hATTR) olan bireylerde periferik sinirlerde hasara veya disfonksiyona bağlı olarak ortaya çıkan bir sinir hastalığı olan polinöropatiyi tedavi etmek için kullanılan transtiretine yönelik bir siRNA molekülüdür (Hoy, 2018). Givosiran (Givlaari), sinir sistemini ve diğer organları etkileyen potansiyel ataklar ve kronik belirtilerle karakterize edilen nadir bir genetik bozukluk olan akut hepatik porfiriyi tedavi etmek için hem biyosentez yolunda görevli bir enzim olan aminolevulinat sentaz 1 (ALAS1)'i hedefleyen siRNA molekülüdür, 2019'da FDA tarafından onaylanmıştır (Scott, 2020). Klinik kullanımı onaylanmış RNAi tedavilerinden bir diğeri de 2020 yılında onaylanan, primer hipoksaliüri tip 1'in (PH1) tedavisi için hidroksiasit oksidaz 1'i susturan sentetik bir siRNA molekülü olan lumasiran'dır (Scott ve ark., 2021). Lumasiran, glikolat oksidazı kodlayan geni susturarak PH1'in klinik belirtileriyle doğrudan ilişkili toksik metabolit olan oksalatın sentezini inhibe etme yeteneğine sahiptir (Scott ve ark., 2021).

Antisens Oligonükleotid Temelli Tedaviler

Antisens oligonükleotid tedavisi RNA seviyesinde gen ekspresyonunu modüle etmek için kısa, tek sarmallı DNA veya RNA moleküllerini kullanan bir gen tedavi yöntemidir (Takakusa ve ark., 2023). Bu moleküller mRNA'yı hedefleyerek ve transkripsiyon sürecini modüle ederek gen ifadesini düzenlemek için nükleik asitlerin özgüllüğünden yararlanır (Bennett ve ark., 2019; Weng ve ark., 2019). Nükleik asit bazlı tedaviler, genetik bozuklukların, nörodejeneratif hastalıkların ve viral enfeksiyonların tedavisi için yüksek potansiyele sahip yöntemler arasındadır. FDA tarafından onaylanmış ilk antisens ilaç 1998'de onaylanan ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda sitomegalovirüs retinitinin (CMV) tedavisinde kullanılan fomivirsen'dir (2006 yılında geri çekilmiştir) (Perry ve ark., 1999). Vitolarsen 2020 yılında Duchenne kas distrofininin (DMD) tedavisi için onaylanmış bir fosforodiamidat morfolino antisens oligonükleotididir (Dhillon, 2020). Vitolarsen distorfinin mRNA öncesi birleştirme sırasında 53. eksonun atlanmasını indükleyerek DMD birincil transkriptinin okuma çerçevesini eski haline getirebilir ve bu durum temel fonksiyonel kısımları içeren kısaltılmış bir distrofin proteininin üretilmesine neden olur (Roshmi, R ve ark., 2019).

Sonuç olarak, ilaç adayı moleküllerin çeşitliliği, ilaç endüstrisinde tıbbi ihtiyaçları karşılanması ve hasta sonuçlarını iyileştirilmesi konusunda çok yönlü bir yaklaşım yansıtmaktadır. Her biri benzersiz avantajlar ve terapötik potansiyel sunan küçük moleküllerin, biyolojiklerin, gen tedavilerinin ve doğal kökenli terapötik moleküllerin kullanımını içeren yaklaşım, farklı ilaç aday sınıfları arasındaki etkileşimler ile birlikte ilaç geliştirme süreçlerini iyileştirmek için umut verici bir potansiyele sahiptir.

6. İLAÇ ADAY OLMA KRİTERLERİ

İlaç geliştirme, potansiyel bir ilacın halka sunulmadan önce kapsamlı ve detaylı bir şekilde araştırılması, değerlendirilmesi ve test edilmesi aşamalarını içeren karmaşık ve zaman alıcı bir süreçtir (Kwong, 2015). Bu süreçteki en önemli aşamalardan biri potansiyel ilaç adaylarının belirlenmesi ve belirlenen adayın çeşitli kriterleri kapsayan bir değerlendirme sürecinden geçirilerek seçilmesidir. Biyolojik aktivite, farmakokinetik, farmakodinamik, güvenlik profili, etkinlik ve üretilebilirlik gibi kriterler, ilaç adayının klinik deneylerdeki potansiyel başarısının belirlenmesinde ve piyasaya sürülme onayının alınmasında büyük öneme sahiptir (Wang ve ark., 2008; Waring ve ark., 2015).

6.1. Biyolojik Aktivite

Bir ilaç adayı için ilk ve en önemli kriter sahip olduğu biyolojik aktivitesidir. Biyolojik aktivite, ilaç geliştirme sürecinde bir molekülün belirlenen hedef üzerinde spesifik olarak proteinler, enzimler, reseptörler veya hedeflenen hastalıkla ilişkili diğer moleküllerle etkileşime girerek istenen etkiyi gösterme yeteneğini ifade eder. Bir ilaç adayının biyolojik aktivitesi, terapötik etkinliği, etki mekanizması, spesifik moleküler hedeflerle etkileşimi ve potansiyel yan etkileri çeşitli *in vitro* ve *in vivo* analizler ile belirlenebilir (Moridani ve ark., 2014; Ziegler ve ark., 2021).

6.2. Güvenlik Profili

İlaç geliştirme sürecinde ilaç adayının güvenlik profilinin belirlenmesi, klinik araştırmalar sırasında hasta güvenliğinin ve hasta refahının sağlanması ve ruhsatlandırma aşamasında düzenleyici onayının alınması açısından büyük öneme sahiptir (Bateman, 2022). Aday bileşiğin toksisitesi (akut toksisite, kronik altı toksisite, kronik toksisite, spesifik organ toksisitesi), alerjik reaksiyonlara ve/veya bağışıklık sistemi tepkilerine neden olması gibi potansiyel yan etkileri ayrıca reseptörler, enzimler, sinyal yolları gibi hücresel sistemlerle etkileşme girmesi gibi normal hücresel işlevler üzerindeki etkileri kapsamlı bir şekilde değerlendirmelidir (Yıldırım ve ark., 2016). Klinik öncesi çalışmalarda gerçekleştirilen *in vivo* deneyler de ilacın insanlarda test edilmesinden önce hayvan modellerinde değerlendirilerek, canlı organizmalar üzerindeki potansiyel güvenlik endişelerinin belirlenmesine yardımcı olması açısından önemlidir (Yıldırım ve ark., 2016).

6.3. Farmakokinetik (PK) ve Farmakodinamik (PD)

Farmakokinetik (PK) ve Farmakodinamik (PD), ilaç geliştirme ve uygulamasının temel bileşenleridir. PK, bir ilacın vücutta nasıl emildiği, dağıtıldığı, metabolize edildiği ve atıldığına ilişkin çalışmayı ifade ederken, PD ilacın zaman içinde vücut üzerindeki etkilerini anlamayı içerir. Bu çalışmalar uygun dozajın ve uygulama sıklığının belirlenmesi, uygulama rejimlerinin optimize edilmesi ve ilacın genel etkinliğinin değerlendirilmesi açısından çok önemlidir (Bateman, 2022).

Emilim, dağıtım, metabolizma ve atılım (ADME), farmakokinetikte yer alan anahtar süreçlerdir (Khurshid Ahmad, 2014; Bateman, 2022). Emilim, bir ilacın uygulandığı yerden kan dolaşımına hareketini ifade eder. Uygulama şekli, ilaç formülasyonu ve ilacın fizikokimyasal özellikleri gibi faktörler ilacın emilimini etkileyebilir. Dağıtım, ilacın vücutta kan dolaşımı yoluyla hedef dokulara taşınmasıdır. İlacın kan-beyin bariyeri gibi biyolojik engelleri geçme yeteneği ve plazma proteinlerine bağlanması ilacın dağılımını etkilemektedir. Metabolizma, ilacın kimyasal olarak vücuttan daha kolay uzaklaştırılabilen metabolitlere dönüştürülmesidir ve genellikle karaciğerde gerçekleşir. Atılım ise ilacın ve metabolitlerinin böbrekler ve gastrointestinal sistem aracılığıyla vücuttan atılmasını ifade eder. Farmakodinamik ise ilacın vücut üzerindeki etkilerine ve ilaç konsantrasyonu ile ilacın etki mekanizmasını, reseptörler veya enzimlerle etkileşimlerini ve bunun sonucunda ortaya çıkan fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri içeren farmakolojik etkileri arasındaki ilişkiye odaklanır (Khurshid Ahmad, 2014; Bateman, 2022). İlacın adayının farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesi dozaj rejiminin optimize edilmesine, dozajın uygulama sıklığının veya dağıtım yolunun ayarlanmasına yardımcı olarak ilaçların genel etkinliğini değerlendirmesine ve istenen terapötik sonuçlara ulaşılmasına katkı sağlamaktadır.

6.4. Seçicilik ve Özgüllük

İlaç geliştirme sürecinde seçicilik ve özgüllük, bir ilaç adayının, ilgisiz hedefler üzerindeki istenmeyen etkileri en aza indiren, hastalıkla ilişkili spesifik molekülleri veya yolları hedefleme yeteneğini belirleyen ayrıca potansiyel ilaç adaylarının güvenliğini ve etkinliğini etkileyen temel faktörlerdir (Shan ve ark., 2011). Hücre bazlı analizler, *in vivo* çalışmalar ve hesaplamalı modelleme ile yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları bir ilaç adayının bağlandığı hedeflerle etkileşimlerini değerlendirmek ve bileşiğin seçiciliğinin ve özgüllüğünün altında yatan moleküler etkileşimlerin belirlemek için kullanılabilir. Yüksek seçiciliğe sahip ilaçların hedef dışı etkilere neden olma olasılığı daha düşüktür,

bu da hastalarda advers reaksiyonların meydana gelme riskini azaltır. Ayrıca hastalıkla ilişkili moleküllerin veya yolakların spesifik olarak hedeflenmesi, ilacın terapötik etkinliğini artırarak tedavi sonuçlarının iyileşmesine yol açar (Smith, 2003; Shan ve ark., 2011). Bu nedenle seçicilik ve özgüllüğün kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesi güvenli ve etkili ilaç adaylarının belirlenmesi için gereklidir.

6.5. Formülasyon ve Stabilite

İlacın formülasyonunun ve stabilitesinin düzenlenmesi ilaç geliştirme sürecinin kritik basamaklarından biridir. Bir ilacın formülasyonu, ilacın uygulama için sunulduğu spesifik bileşimi ve fiziksel formudur ve yardımcı maddelerin ve dozaj formunun seçimini ile ilacın genel tasarımını içermektedir (Terstappen ve ark., 2001; Bateman, 2022). Stabilite ise ilacın kimyasal, fiziksel ve mikrobiyolojik özelliklerini raf ömrü boyunca ve öngörülen depolama ve taşıma koşulları altında kabul edilebilir sınırlar içinde koruyabilmesi durumudur (Terstappen ve ark., 2001). Son dozaj formunda aktif farmasötik bileşen için ortam görevi gören inaktif maddeler yardımcı maddeler olarak adlandırılır ve bu maddelerin seçimi ilacın stabilitesini, çözünürlüğünü, biyoyararlanımını etkilemektedir (Khurshid Ahmad, 2014; Bateman, 2022). Formülasyon geliştirme sürecinde dozaj formunun ve yardımcı bileşenlerin seçilmesinin yanında ilacın uygulama şeklinin belirlenmesi de uygulama kolaylığı açısından önemlidir, örneğin ilacın fiziksel formu (tablet, kapsül, sıvı) uygulama kolaylığını büyük ölçüde etkilemektedir. Diğer taraftan sıcaklık, nem, ışık ve pH gibi çevresel faktörler ilacın kimyasal stabilitesini değiştiren etkenlerdir (Bateman, 2022). Bu nedenle ilacın stabilitesinin artırılması için uygun ambalaj malzemelerinin kullanımı, anti-oksidanların eklenmesi ve üretim süreçlerinin optimizasyonu önemli olmaktadır.

6.6. Biyoyararlanım

Biyoyararlanım, uygulanan ilacın sistemik dolaşıma ulaşan oranını ifade eden ve bileşiğin etkinliğini ve terapötik potansiyelini doğrudan etkileyen, ilaç geliştirme sürecinin önemli faktörlerinden biridir. İlacın uygun biyoyararlanıma sahip olması için çözünürlük ve geçirgenlik gibi çeşitli faktörler dikkate alınarak vücutta emilimi ve dağılımını kolaylaştıracak şekilde tasarlanması gerekir (Bateman, 2022). Biyoyararlanımın önemli belirleyicilerinden biri olan çözünürlük, ilaç emiliminin hızını ve kapsamını etkilemektedir. Geçirgenlik ise bir ilacın bağırsak epiteli gibi biyolojik membranlardan sistemik dolaşıma geçme yeteneği olarak adlandırılır. Biyoyararlanımın artırılması için ilaç tasarımında formülasyon optimizasyonu aşamasında yüksek çözünürlük ve yüksek geçirgenlik özelliklerine sahip ilaçların geliştirilmesi üzerine odaklanılmaktadır (Green ve ark., 2013).

6.7. Mevzuata Uygunluk

Mevzuata uygunluk, ilaç geliştirme sürecinin kritik basamaklarından biridir. İlaç adaylarının ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici kurumlar tarafından belirlenen standartları karşılama gereklidir. Düzenleyici yönergelerle bağlılık, klinik öncesi ve klinik verilerin titizlikle belgelenmesini, etik standartlara bağlılığı ve İyi Üretim Uygulamaları (GMP) yönergelerine uyumu içermektedir (Green ve ark., 2013; Bateman, 2022; Liu ve ark., 2022).

Klinik öncesi veri dokümantasyonu, ilaç adayının farmakokinetiği, farmakodinamiği ve toksikolojisinin kapsamlı kayıtlarını içerir ve ilacın klinik deneylere geçmeden önce güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için çok önemlidir. Klinik veri dokümantasyonu ise klinik araştırmaların tüm aşamalarından elde edilen sonuçların kaydedilmesini kapsar ve ilacın güvenliği ve etkinliğinin yanında gözlemlenen olumsuz olaylar veya yan etkilere ilişkin verileri de içerir. Ayrıca mevzuata uygunluk, katılımcılardan bilgilendirilmiş onam alınması ve araştırma boyunca haklarının, güvenliklerinin ve refahlarının korunmasını sağlamak da dahil olmak üzere, klinik araştırmaların yürütülmesinde etik standartlara bağlı kalınmasını sağlamaktadır (Bateman, 2022). İlaç üretim sürecinin kalitesini ve tutarlılığını sağlamak için potansiyel riskleri en aza indirmek için tasarlanmıştır GMP yönergelerine uygunluk gereklidir. Bu standartların sağlanması, geliştirme sürecinde ilaç adaylarının güvenliğinin, etkililiğinin ve kalitesinin korunması açısından önemlidir.

7. İLAÇ GELİŞTİRMEDE AŞAMASINDAKİ ZORLUKLAR

Yeni ilaçların geliştirilmesi sağlık hizmetlerinin gelişmesi ve hasta sonuçlarının iyileştirilmesi açısından büyük öneme sahip süreçtir. Ancak ilaç aday molekülün keşfinden ilacın piyasa çıkana kadar olan yolculuğu oldukça karmaşık, uzun ve zorlu bir süreçtir. Yeni bir ilacın pazara sunulmasıyla ilgili en önemli zorluklardan biri yüksek maliyettir (Green ve ark., 2013; Zagotto ve ark., 2021). Tufts İlaç Geliştirme Araştırma Merkezi tarafından hazırlanan bir rapora göre; Ar-Ge süreci, klinik araştırmalar, düzenleyici onay ve onay sonrası izleme süreçlerindeki masraflarla birlikte yeni bir reçeteli ilaç geliştirmenin ortalama maliyetinin 2,6 milyar dolar civarında olduğu tahmin edilmektedir (Impact Reports-Tufts CSDD, 2023). Ayrıca ilaç geliştirme süreci zaman alıcıdır ve genellikle ilk keşiften pazara sunulmasına kadar on yıldan fazla zaman almaktadır. Diğer bir zorluk ise ilaç adaylarının yüksek başarısızlık oranıdır (Green ve ark., 2013; Bateman, 2022). Bu durum ilaç geliştirme maliyetinin artmasına ve hastalar için yeni tedavilerin ulaşılabilirliğin gecikmesine neden olmaktadır.

7.1. Bilimsel Karmaşıklık ve Belirsizlik

İnsan biyolojisi ve hastalığının karmaşıklığı, hastalık mekanizmalarının anlaşılmasında ve uygun ilaç hedeflerinin belirlenmesinde bazı zorlukların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Hastalığın duyarlılığı ve ilerlemesi genetik ve çevresel çeşitli faktörlere bağlıdır (Brodiewicz ve ark., 2010). Hastalıkların mekanizmasının tam olarak anlaşılmasına engel olan bu durum etkili ilaç hedeflerinin tanımlanmasını da zorlaştırmaktadır. Ayrıca insan vücudu gibi karmaşık biyolojik sistemlerde ilaç davranışının öngörülemezliği söz konusudur ve ilaç uygulamalarına karşı advers ilaç reaksiyonları gibi beklenmedik yanıtların oluşması gözlenmektedir. Karmaşıklık ve belirsizlik gibi zorlukların üstesinden gelmek ve potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek amacıyla sistem biyolojisi, hesaplamalı modelleme ve yüksek verimli tarama dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Sistem biyolojisi hastalık süreçler ile ilişkili olan genlerin, proteinlerin ve metabolitlerin birbirine bağlı ağlarını aydınlatmayı amaçlayarak biyolojik sistemlerin karmaşıklığı aydınlatmaya çalışırken, hesaplamalı modelleme biyolojik sistemlerin davranışını simüle etmeye ve ilaç uygulamalarının etkilerini tahmin etmeye yarayan, insan vücudundaki ilaç davranışıyla ilişkili belirsizliğin yönetilmesine katkı sağlar (Terstappen ve ark., 2001; Khurshid Ahmad, 2014). Yüksek verimli tarama teknolojileri ise potansiyel ilaç

adaylarını belirlemek için çok sayıda bileşiğin hızlı bir şekilde test edilmesine olanak tanıyarak biyolojik karmaşıklık ve belirsizlik karşısında ilaç keşfine sistematik bir yaklaşım sunar (Khurshid Ahmad, 2014).

7.2. Yüksek Geliştirme Maliyetleri

İlaç geliştirme, bir ilacın güvenliğini ve etkinliğini belirlemek için gerekli olan kapsamlı araştırma ve geliştirme faaliyetleri, klinik öncesi çalışmalar, klinik araştırmalar ve düzenleyici onay süreçleri nedeniyle oldukça masraflı ve yoğun kaynak gerektiren bir süreçtir (Omidian ve ark., 2022). Yüksek maliyetin ortaya çıkmasındaki başlıca etkenlerden biri klinik araştırmalardır. Yeni bir ilaç adayının ticari kullanım için onaylanmadan önce güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için klinik araştırmalar önemlidir ve araştırmalar insan denekler üzerinde yapılan testler de dahil olmak üzere birçok aşamayı içerir (Hughes ve ark., 2011). Ayrıca hasta güvenliğini ve toplanan verilerin güvenilirliğini sağlamak için hasta alımı, izleme, veri yönetimi ve mevzuata uygunlukla gibi sıkı düzenlemelere tabidir. Büyük örneklem boyutları ve uzun vadeli takip ihtiyacı da klinik araştırmaların mali yükünü artırmaktadır. İlaç geliştirme sürecinin karmaşıklığı ve düzenleyici kurumların gereklilikleri de ilaç geliştirme maliyetinin artmasına katkı sağlamaktadır (Bateman, 2022).

7.3. Uzun Zaman Gereksinimi

Yeni bir ilacı pazara sunulması ilk keşif, klinik öncesi araştırma, klinik denemeler ve düzenleyici onay dahil olmak üzere birçok aşamayı içeren, ortalama süresi on yıldan fazla süren uzun bir süreçtir. Kapsamlı araştırma ve deneyler ile potansiyel bir ilaç adayının belirlenmesini içeren ilk keşif aşaması ile belirlenen bileşiklerin potansiyel terapötik etkilerinin, güvenliğinin ve etkinliğinin değerlendirilmesini içeren klinik öncesi araştırmalar genellikle 3-5 yıl kadar sürmektedir. Faz I, II, III aşamalarını içeren klinik deneyler ise 5-6 yıllık bir zaman içerisinde yapılmaktadır. Klinik denemelerin başarıyla tamamlanmasının ardından ilacın FDA ve EMA gibi kurumlar tarafından düzenleyici incelemeden geçmesi gerekir ve ruhsat için gerekli olan bu süreç gerekli standartları karşılanıp karşılanmadığına bağlı olarak 6 ay ila 2 yıl arasında sürmektedir. İlaç geliştirme sürecinin uzun zaman gereksiniminin maliyetleri artırmasına ve acil tıbbi ihtiyaçları karşılamasını etkilemesine rağmen yeni ilaçların halka sunulmadan önce güvenliğinin ve etkinliğinin sağlanması nedeniyle gerekli olduğu da bilinmektedir (Zagotto ve ark., 2021; Bateman, 2022).

7.4. Yüksek Kayıp Oranları

İlaç geliştirme süreçleri yüksek kayıp oranı ile karakterize edilir; birçok potansiyel ilaç adayı, güvenlik endişeleri, etkinlik eksikliği veya öngörülemeyen yan etkiler gibi çeşitli nedenlerden dolayı klinik öncesi ve klinik geliştirme sırasında başarısız olur. Bu yüksek başarısızlık oranı, ilaç endüstrisi için önemli zorluklar oluşturmakta, önemli mali kayıplara ve yeni ilaçların pazara sunulmasında gecikmelere yol açmaktadır (Zagotto ve ark., 2021; Bateman, 2022). İlaç geliştirmedeki yüksek başarısızlık oranlarının temel nedenlerinden biri insan biyolojisinin ve hastalık süreçlerinin karmaşıklığıdır. Laboratuvar ortamlarında ve hayvan modellerinde yü-

rütülen klinik öncesi çalışmalar, ilaçların insanlardaki tepkilerini ve potansiyel toksisitelerini her zaman doğru şekilde yansıtmayabilir. Bu durum, ilaç adaylarının, insan denekler üzerinde güvenlik ve etkililiğinin değerlendirildiği klinik araştırmalar sırasında başarısız olmasına neden olmaktadır. Ayrıca mevcut klinik öncesi ve klinik test yöntemlerinin sınırlamaları da ilaç geliştirmedeki yüksek başarısızlık oranına katkı sağlamaktadır (Brodiewicz ve ark., 2010; Schneider, 2018). Bu yöntemler, ilaç adaylarının güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için gerekli olsa da daha geniş hasta popülasyonlarında ortaya çıkabilecek tüm potansiyel sorunları her zaman yansıtamayabilir.

Sonuç olarak ilaç geliştirmedeki zorlukların üstesinden gelmek, araştırmacılar, ilaç şirketleri, düzenleyici kurumlar ve diğer ilgili taraflar dahil olmak üzere çeşitli paydaşların ortak çabasını gerektirmektedir. İlaç geliştirmenin bilimsel, düzenleyici ve mali yönleri de dahil olmak üzere karmaşıklıkları, bunların etkili bir şekilde ele alınması için çok yönlü bir yaklaşıma ihtiyaç vardır. İşbirlikçi ilişkileri teşvik ederek, ileri teknolojilerden yararlanarak ve düzenleme süreçlerini düzene koyarak ilaç geliştirme ortamı, ihtiyacı olan hastalara yenilikçi ve uygun maliyetli tedaviler sunacak şekilde geliştirilebilir. Bu ortak çaba, ilaç geliştirme süreçlerini ilerletmek ve sonuçta hasta sonuçlarını iyileştirmek için oldukça önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abotaleb, M., Kubatka, P., Caprnda, M., Varghese, E., Zolakova, B., Zubor, P., Opatrilova, R., Kruzliak, P., Stefanicka, P., Büsselberg, D. Chemotherapeutic agents for the treatment of metastatic breast cancer: An update. *Biomed. Pharmacother.* 101, 458–477. (2018)
- Alkan, A. H., Ensoy, M., Cansaran-Duman, D. Strategic and Innovative Roles of lncRNAs Regulated by Naturally-Derived Small Molecules in Cancer Therapy. *Curr. Med. Chem.* 31, (2023)
- Alqahtani, F. Y., Aleanizy, F. S., El Tahir, E., Alkahtani, H. M., AlQuadeib, B. T. Paclitaxel, ss. 205–238 (2019)
- Annett, S. Pharmaceutical drug development: high drug prices and the hidden role of public funding. *Biol. Futur.* 72, 129–138. (2021)
- Aronson, J. K. Clinical pharmacology and therapeutics in the UK – a great instauration. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 69, 111–117. (2010)
- Arora, V., Campbell, J. N., Chung, M. K. Fight fire with fire: Neurobiology of capsaicin-induced analgesia for chronic pain. *Pharmacol. Ther.* 220, 107743. (2021)
- Asselah, T., Durantel, D., Pasmant, E., Lau, G., Schinazi, R. F. COVID-19: Discovery, diagnostics and drug development. *J. Hepatol.* 74, 168–184. (2021)
- Assi, T., Rassy, E., Farhat, F., Kattan, C., Kattan, J. Docetaxel Rechallenge in Patients with Metastatic Prostate Cancer: A Comprehensive Review. *Oncol. Res. Treat.* 43, 299–306. (2020)
- Barreca, M., Spanò, V., Montalbano, A., Cueto, M., Díaz Marrero, A. R., Deniz, I., Erdoğan, A., Lukić Bilela, L., Moulin, C., Taffin-de-Givenchy, E., Spriano, F., Perale, G., Mehiri, M., Rotter, A., P. Thomas, O., Barraja, P., Gaudêncio, S. P., Bertoni, F. Marine Anticancer Agents: An Overview with a Particular Focus on Their Chemical Classes. *Mar. Drugs* 18, 619. (2020)
- Bateman, T. J. Drug discovery. *Atkinson’s Princ. Clin. Pharmacol.* Elsevier , ss. 563–572 (2022)
- Beaucourt, S., Vignuzzi, M. Ribavirin: a drug active against many viruses with multiple effects on virus replication and propagation. Molecular basis of ribavirin resistance. *Curr. Opin. Virol.* 8, 10–15. (2014)

- Bennett, C. F., Krainer, A. R., Cleveland, D. W. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu. Rev. Neurosci.* 42, 385–406. (2019)
- Berdigaliyev, N., Aljofan, M. An overview of drug discovery and development. *Future Med. Chem.* 12, 939–947. (2020)
- Berger, J., Dunn, J. D., Johnson, M. M., Karst, K. R., Shear, W. C. How drug life-cycle management patent strategies may impact formulary management. *Am. J. Manag. Care* 22, S487–S495. (2016)
- Bergkessel, M., Forte, B., Gilbert, I. H. Small-Molecule Antibiotic Drug Development: Need and Challenges. *ACS Infect. Dis.* 9, 2062–2071. (2023)
- Brittain, D. C. Erythromycin. *Med. Clin. North Am.* 71, 1147–1154. (1987)
- Brodniewicz, T., Gryniewicz, G. Preclinical drug development. *Acta Pol. Pharm.* 67, 578–585. (2010)
- Buels, K. S., Fryer, A. D. Muscarinic Receptor Antagonists: Effects on Pulmonary Function, ss. 317–341 (2012)
- Buerger, C., Groner, B. Bifunctional recombinant proteins in cancer therapy: cell penetrating peptide aptamers as inhibitors of growth factor signaling. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129, 669–675. (2003)
- Bülbül, E. Ö., Karantas, I. D., Okur, M. E., Sifaka, P. I., Okur, N. Ü. Schizophrenia; A Review on Promising Drug Delivery Systems. *Curr. Pharm. Des.* 26, 3871–3883. (2020)
- Burness, C. B., Duggan, S. T. Etanercept (SB4): A Review in Autoimmune Inflammatory Diseases 30, 371–378. (2016)
- Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., de Haan, L. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr. Opin. Pharmacol.* 12, 615–622. (2012)
- Butte, A. J., Ito, S. Translational Bioinformatics: Data-driven Drug Discovery and Development. *Clin. Pharmacol. Ther.* 91, 949–952. (2012)
- Cansaran-Duman, D., Tanman, Ü., Yangin, S., Atakol, O. The comparison of miRNAs that respond to anti-breast cancer drugs and usnic acid for the treatment of breast cancer. *Cytotechnology* 72, 855–872. (2020)
- Cansaran-Duman, D., Yangin, S., Çolak, B. The role of vulpinic acid as a natural compound in the regulation of breast cancer-associated miRNAs. *Biol. Res.* 54, 37. (2021)
- Chopra, B., Dhingra, A. K. Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phyther. Res.* 35, 4660–4702. (2021)
- CHRISTRUP, L. L. Morphine metabolites. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 41, 116–122. (1997)
- Çolak, B., Cansaran-Duman, D., Guney Eskiler, G., Földes, K., Yangin, S. Usnic acid-induced programmed cell death in ovarian cancer cells. *Rend. Lincei. Sci. Fis. e Nat.* 33, 143–152. (2022)
- Dalbeth, N., Lauterio, T. J., Wolfe, H. R. Mechanism of Action of Colchicine in the Treatment of Gout. *Clin. Ther.* 36, 1465–1479. (2014)
- Dănescu, T., Popa, M. A. Public health and corporate social responsibility: exploratory study on pharmaceutical companies in an emerging market. *Global. Health* 16, 117. (2020)
- Dar, T. U. H., Dar, S. A., Islam, S. U., Mangral, Z. A., Dar, R., Singh, B. P., Verma, P., Haque, S. Lichens as a repository of bioactive compounds: an open window for green therapy against diverse cancers. *Semin. Cancer Biol.* 86, 1120–1137. (2022)
- Dasari, S., Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *Eur. J. Pharmacol.* 740, 364–378. (2014)
- Dasari, S., Njiki, S., Mbemi, A., Yedjou, C. G., Tchounwou, P. B. Pharmacological Effects of Cisplatin Combination with Natural Products in Cancer Chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 1532. (2022)
- Daubner, J., Arshaad, M. I., Henseler, C., Hescheler, J., Ehninger, D., Broich, K., Rawashdeh, O., Papazoglou, A., Weiergräber, M. Pharmacological Neuroenhancement: Current Aspects of Categorization, Epidemiology, Pharmacology, Drug Development, Ethics, and Future Perspectives. *Neural Plast.* 2021, 8823383. (2021)
- Davis, A. M., Engkvist, O., Fairclough, R. J., Feierberg, I., Freeman, A., Iyer, P. Public-Private Partnerships: Compound and Data Sharing in Drug Discovery and Development. *SLAS Discov. Adv. life Sci. R D* 26, 604–619. (2021)
- Deal, C. L., Steelman, J., Vlachopapadopoulou, E., Stawerska, R., Silverman, L. A., Phillip, M., Kim, H. S., Ko, C., Malievskiy, O., Cara, J. F., Roland, C. L., Taylor, C. T., Valluri, S. R., Wajnrajch, M. P., Pastrak, A., Miller, B. S. Efficacy and Safety of Weekly Somatogron vs Daily Somatropin in Children With Growth Hormone Deficiency: A Phase 3 Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 107, e2717–e2728. (2022)
- Deer, T. R., Pope, J. E., Hanes, M. C., McDowell, G. C. Intrathecal Therapy for Chronic Pain: A Review of Morphine and Ziconotide as Firstline Options. *Pain Med.* 20, 784–798. (2019)
- Deftereos, S. G., Beerkens, F. J., Shah, B., Giannopoulos, G., Vrachatis, D. A., Giotaki, S. G., Siasos, G., Nicolas, J., Arnott, C., Patel, S., Parsons, M., Tardif, J. C., Kovacic, J. C., Dangas, G. D. Colchicine in Cardiovascular Disease: In-Depth Review. *Circulation* 145, 61–78. (2022)

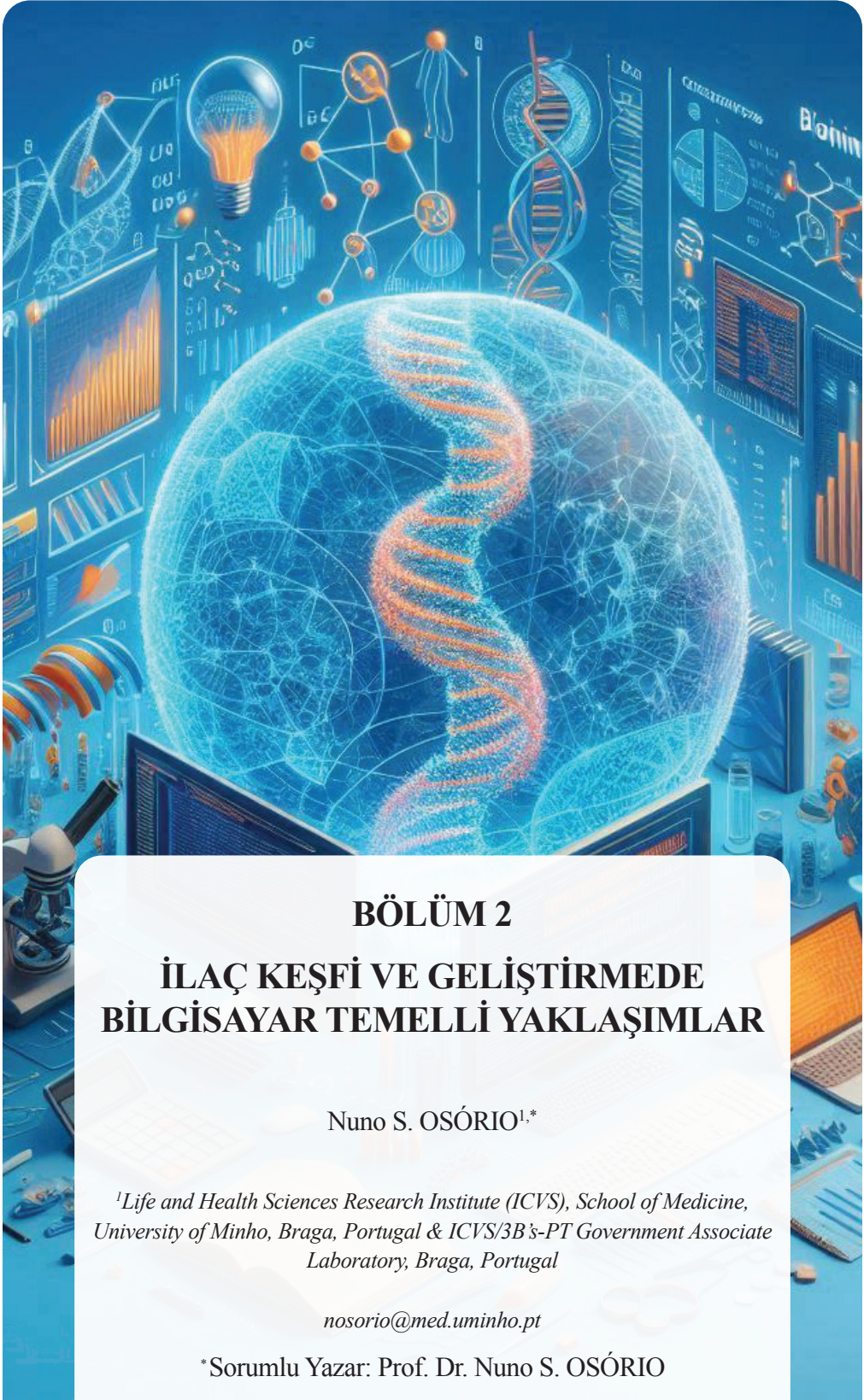
- Desborough, M. J. R., Keeling, D. M. The aspirin story – from willow to wonder drug. *Br. J. Haematol.* 177, 674–683. (2017)
- Devashree, Pandey, A., Dikshit, A. Lichens: Fungal symbionts and their secondary metabolites. *New Futur. Dev. Microb. Biotechnol. Bioeng. Elsevier*, ss. 107–115 (2021)
- Dhillon, S. Viltolarsen: First Approval. *Drugs* 80, 1027–1031. (2020)
- Dong, S., Guo, X., Han, F., He, Z., Wang, Y. Emerging role of natural products in cancer immunotherapy. *Acta Pharm. Sin. B* 12, 1163–1185. (2022)
- Drugs | FDA Web. <https://www.fda.gov/drugs> (2023)
- Drugs | FDA Web. <https://www.fda.gov/drugs> (2024)
- E. Brookes, M., Eldabe, S., Batterham, A. Ziconotide Monotherapy: A Systematic Review of Randomised Controlled Trials. *Curr. Neuropharmacol.* 15, 217–231. (2017)
- Eder, J., Herling, P. L. Trends in Modern Drug Discovery, ss. 3–22 (2015)
- Ekins, S., Freundlich, J. S., Hobrath, J. V., Lucile White, E., Reynolds, R. C. Combining Computational Methods for Hit to Lead Optimization in Mycobacterium Tuberculosis Drug Discovery. *Pharm. Res.* 31, 414–435. (2014)
- El-Demerdash, A., Tammam, M., Atanasov, A., Hooper, J., Al-Mourabit, A., Kijjoo, A. Chemistry and Biological Activities of the Marine Sponges of the Genera Mycale (Arenochalina), Bienna and Clathria. *Mar. Drugs* 16, 214. (2018)
- Ensoy, M., Bumin, Z. S., Jama, H. A., Cansaran-Duman, D. The Regulation Role of Ferroptosis Mechanism of Anti-Cancer Drugs and Noncoding RNAs. *Curr. Med. Chem.* 30, 1638–1656. (2023)
- Ensoy, M. *Meme Kanserinde Atranorin'in Ferroptoz Yolağı ile ilişkili Terapötik Etkinliğinin Belirlenmesi* Ankara University (2024)
- Facts and Figures 2022: The Pharmaceutical Industry and Global Health - IFPMA Web. <https://www.ifpma.org/> (2022)
- Ferrer-Miralles, N., Saccardo, P., Corchero, J. L., Xu, Z., Garcia-Fruitós, E. General Introduction: Recombinant Protein Production and Purification of Insoluble Proteins, ss. 1–24 (2015)
- Forchette, L., Sebastian, W., Liu, T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr. Med. Sci.* 41, 1037–1051. (2021)
- Garattini, S., Perico, N. Drug development: how academia, industry and authorities interact. *Nat. Rev. Nephrol.* 10, 602–610. (2014)
- Gaynes, R. The Discovery of Penicillin—New Insights After More Than 75 Years of Clinical Use. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 849–853. (2017)
- Goodenough, U., Roth, R. Lichen 2. Constituents. *Algal Res.* 58, 102356. (2021)
- Green, D. V. S., Segall, M. CHEMOINFORMATICS IN LEAD OPTIMIZATION. *Cheminformatics Drug Discov. Wiley*, ss. 149–178 (2013)
- Green, K. N., Crapser, J. D., Hohsfield, L. A. To Kill a Microglia: A Case for CSF1R Inhibitors. *Trends Immunol.* 41, 771–784. (2020)
- Han, H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression, ss. 293–302 (2018)
- Hassan, I. A., Adegbola, A. J., Soyinka, J. O., Onyeji, C. O., Bolaji, O. O. Post-Marketing Surveillance of Quality of Artemether Injection Marketed in Southwest Nigeria. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 103, 1258–1265. (2020)
- Hermann, T. Small molecules targeting viral <sc>RNA</sc>. *WIREs RNA* 7, 726–743. (2016)
- Hodiamont, C. J., van den Broek, A. K., de Vroom, S. L., Prins, J. M., Mathôt, R. A. A., van Hest, R. M. Clinical Pharmacokinetics of Gentamicin in Various Patient Populations and Consequences for Optimal Dosing for Gram-Negative Infections: An Updated Review. *Clin. Pharmacokinet.* 61, 1075–1094. (2022)
- Hoy, S. M. Patisiran: First Global Approval. *Drugs* 78, 1625–1631. (2018)
- Hughes, J., Rees, S., Kalindjian, S., Philpott, K. Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* 162, 1239–1249. (2011)
- Imazio, M., Nidorf, M. Colchicine and the heart. *Eur. Heart J.* 42, 2745–2760. (2021)
- Impact Reports — Tufts CSDD Web. <https://csdd.tufts.edu/impact-reports> (2023)
- Jain, S., Vahdat, L. T. Eribulin Mesylate. *Clin. Cancer Res.* 17, 6615–6622. (2011)
- Jefferis, R. Recombinant Proteins and Monoclonal Antibodies, ss. 281–318 (2017)
- Katz, L., Baltz, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 43, 155–176. (2016)
- Kausar, S., Said Khan, F., Ishaq Mujeeb Ur Rehman, M., Akram, M., Riaz, M., Rasool, G., Hamid Khan, A., Saleem, I., Shamim, S., Malik, A. A review: Mechanism of action of antiviral drugs. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 35, 20587384211002620. (2021)

- Khurshid Ahmad, M. H. Drug Discovery and In Silico Techniques: A Mini-Review. *Enzym. Eng.* 04., (2014)
- Kidwell, K. M., Roychoudhury, S., Wendelberger, B., Scott, J., Moroz, T., Yin, S., Majumder, M., Zhong, J., Huml, R. A., Miller, V. Application of Bayesian methods to accelerate rare disease drug development: scopes and hurdles. *Orphanet J. Rare Dis.* 17, 186. (2022)
- Kiliç, N., Derici, M. K., Büyük, I., Aydın, S. S., Aras, S., Cansaran-Duman, D. Evaluation of in vitro anticancer activity of vulpinic acid and its apoptotic potential using gene expression and protein analysis. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 52., (2018)
- Kiliç, N., Islakoğlu, Y. Ö., Büyük, İ., Gür-Dedeoğlu, B., Cansaran-Duman, D. Determination of Usnic Acid Responsive miRNAs in Breast Cancer Cell Lines. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 19, 1463–1472. (2019)
- Kintzel, P. E., Michaud, L. B., Lange, M. K. Docetaxel-Associated Epiphora. *Pharmacotherapy* 26, 853–867. (2006)
- Kosanić, M., Ranković, B., Stanojković, T., Rančić, A., Manojlović, N. Cladonia lichens and their major metabolites as possible natural antioxidant, antimicrobial and anticancer agents. *LWT - Food Sci. Technol.* 59, 518–525. (2014)
- Koss, J., Rheinlaender, A., Truebel, H., Bohnet-Joschko, S. Social media mining in drug development-Fundamentals and use cases. *Drug Discov. Today* 26, 2871–2880. (2021)
- Kusnitz, M., Braunstein, E., Wilson, C. A. Advancing Public Health Using Regulatory Science to Enhance Development and Regulation of Medical Products: Food and Drug Administration Research at the Center for Biologics Evaluation and Research. *Front. Med.* 4, 71. (2017)
- Kwakye, G. F., Jiménez, J., Jiménez, J. A., Aschner, M. Atropa belladonna neurotoxicity: Implications to neurological disorders. *Food Chem. Toxicol.* 116, 346–353. (2018)
- Kwong, E. Advancing Drug Discovery: A Pharmaceuticals Perspective. *J. Pharm. Sci.* 104, 865–871. (2015)
- Ladisch, M. R., Kohlmann, K. L. Recombinant Human Insulin. *Biotechnol. Prog.* 8, 469–478. (1992)
- Latare, P. A., Setness, P. A. Using erythromycin. *Postgrad. Med.* 86, 55–63. (1989)
- Lepore, C., Silver, L., Theuretzbacher, U., Thomas, J., Visi, D. The small-molecule antibiotics pipeline: 2014–2018. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 739–739. (2019)
- Li, A., Tan, Z., He, S., Chu, H. In vitro susceptibility testing of tetracycline-class antibiotics against slowly growing non-tuberculous mycobacteria. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 50, 604–609. (2023)
- Liang, X., Li, D., Leng, S., Zhu, X. RNA-based pharmacotherapy for tumors: From bench to clinic and back. *Biomed. Pharmacother.* 125, 109997. (2020)
- Liu, P., Chen, G., Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 27., (2022)
- Lu, R. M., Hwang, Y. C., Liu, I. J., Lee, C. C., Tsai, H. Z., Li, H. J., Wu, H. C. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* 27, 1. (2020)
- Maguire, A. M., Bennett, J., Aleman, E. M., Leroy, B. P., Aleman, T. S. Clinical Perspective: Treating RPE65-Associated Retinal Dystrophy. *Mol. Ther.* 29, 442–463. (2021)
- Maniam, S., Maniam, S. Small Molecules Targeting Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 22, 9722. (2021)
- Manor, D., Williams, S., Ator, R., Bryant, K., Scheel, K. W. Reduced collateral perfusion is a direct consequence of elevated right atrial pressure. *Am. J. Physiol.* 267, H1151-6. (1994)
- Melo, M. G. D., dos Santos, J. P. A., Serafini, M. R., Caregnato, F. F., Pasquali, M. A. de B., Rabelo, T. K., da Rocha, R. F., Quintans, L., Araújo, A. A. de S., da Silva, F. A., Moreira, J. C. F., Gelain, D. P. Redox properties and cytoprotective actions of atranorin, a lichen secondary metabolite. *Toxicol. In Vitro* 25, 462–468. (2011)
- Mendell, J. R., Al-Zaidy, S. A., Rodino-Klapac, L. R., Goodspeed, K., Gray, S. J., Kay, C. N., Boye, S. L., Boye, S. E., George, L. A., Salabarria, S., Corti, M., Byrne, B. J., Tremblay, J. P. Current Clinical Applications of In Vivo Gene Therapy with AAVs. *Mol. Ther.* 29, 464–488. (2021)
- Messina, M., Gissen, P. Atidarsagene autotemcel for metachromatic leukodystrophy 59, 63–70. (2023)
- Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A., Roda, A. Cell-based assays: fuelling drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 227–238. (2010)
- Mirsadeghi, S., Larijani, B. Personalized Medicine: Pharmacogenomics and Drug Development. *Acta Med. Iran.* 55, 150–165. (2017)
- Mirza, M. R., Chase, D. M., Slomovitz, B. M., dePont Christensen, R., Novák, Z., Black, D., Gilbert, L., Sharma, S., Valabrega, G., Landrum, L. M., Hanker, L. C., Stuckey, A., Boere, I., Gold, M. A., Auranen, A., Pothuri, B., Cibula, D., McCourt, C., Raspagliesi, F. vd. Dostarlimab for Primary Advanced or Recurrent Endometrial Cancer. *N. Engl. J. Med.* 388, 2145–2158. (2023)

- Moridani, M., Harirforoosh, S. Drug development and discovery: challenges and opportunities. *Drug Discov. Today* 19, 1679–1681. (2014)
- Musolino, M., D'Agostino, M., Zicarelli, M., Andreucci, M., Coppolino, G., Bolignano, D. Spice Up Your Kidney: A Review on the Effects of Capsaicin in Renal Physiology and Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 25, 791. (2024)
- Nakamura, T., Sudo, A. The Role of Trabectedin in Soft Tissue Sarcoma. *Front. Pharmacol.* 13, (2022)
- Naso, M. F., Tomkowicz, B., Perry, W. L., Strohl, W. R. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy 31, 317–334. (2017)
- Nelson, D. L., Cox, M. M. *Lehninger principles of biochemistry* 7. baskı W.H. Freeman, New York, NY (2024)
- Ngo, H. X., Garneau-Tsodikova, S. What are the drugs of the future? *Medchemcomm* 9, 757–758. (2018)
- Ogbonmide, T., Rathore, R., Rangrej, S. B., Hutchinson, S., Lewis, M., Ojilere, S., Carvalho, V., Kelly, I. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy (SMA): A Review of Current Challenges and Safety Considerations for Onasemnogene Apeparvovec (Zolgensma) (2023)
- Omidian, H., Omid, Y. Blockchain in pharmaceutical life cycle management. *Drug Discov. Today* 27, 935–938. (2022)
- O'Brien, J. J., Campoli-Richards, D. M. Acyclovir. *Drugs* 37, 233–309. (1989)
- Pandey, P., Balekar, N. Target-specific delivery. *Drug Target. Stimuli Sensitive Drug Deliv. Syst.* Elsevier, ss. 117–154 (2018)
- Parlakpınar, H., Gunata, M. Transplantation and immunosuppression: a review of novel transplant-related immunosuppressant drugs. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 43, 651–665. (2021)
- Patel, S. P., Othus, M., Chen, Y., Wright, G. P., Yost, K. J., Hyngstrom, J. R., Hu-Lieskovan, S., Lao, C. D., Fecher, L. A., Truong, T. G., Eisenstein, J. L., Chandra, S., Sosman, J. A., Kendra, K. L., Wu, R. C., Devoe, C. E., Deutsch, G. B., Hegde, A., Khalil, M. vd. Neoadjuvant–Adjuvant or Adjuvant-Only Pembrolizumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 388, 813–823. (2023)
- Patočka, J., Nepovimova, E., Wu, W., Kuca, K. Digoxin: Pharmacology and toxicology—A review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 79, 103400. (2020)
- Perry, C. M., Barman Balfour, J. A. Fomivirsen. *Drugs* 57, 375–380. (1999)
- Perry, C. M. Eribulin. *Drugs* 71, 1321–1331. (2011)
- Platt, B. N., Jacobs, C. A., Conley, C. E. W., Stone, A. V. Tetracycline use in treating osteoarthritis: a systematic review. *Inflamm. Res.* 70, 249–259. (2021)
- Prado, D. A., Acosta-Acero, M., Maldonado, R. S. Gene therapy beyond luxturna: a new horizon of the treatment for inherited retinal disease. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 31, 147–154. (2020)
- Provencio, M., Nadal, E., González-Larriba, J. L., Martínez-Martí, A., Bernabé, R., Bosch-Barrera, J., Casal-Rubio, J., Calvo, V., Insa, A., Ponce, S., Reguart, N., de Castro, J., Mosquera, J., Cobo, M., Aguilar, A., López Vivanco, G., Camps, C., López-Castro, R., Morán, T. vd. Perioperative Nivolumab and Chemotherapy in Stage III Non-Small-Cell Lung Cancer. *N. Engl. J. Med.* 389, 504–513. (2023)
- Puig, L., López-Ferrer, A., Laiz, A. Etanercept en el tratamiento de la artritis psoriásica. *Actas Dermosifiliogr.* 106, 252–259. (2015)
- Pushpakom, S., Iorio, F., Eyers, P. A., Escott, K. J., Hopper, S., Wells, A., Doig, A., Guilliams, T., Latimer, J., McNamee, C., Norris, A., Sanseau, P., Cavalla, D., Pirmohamed, M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat. Rev. Drug Discov.* 18, 41–58. (2019)
- Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., Wang, F. Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. *Chem. Res. Toxicol.* 32, 1469–1486. (2019)
- Ramsey, A., Greenberger, P. A. Penicillin Skin Testing: A Major Role for the Minor Determinant and Amoxicillin? *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.* 8, 1987–1988. (2020)
- Ranković, B., Kosanić, M. Biotechnological substances in lichens. *Nat. Bioact. Compd.* Elsevier, ss. 249–265 (2021)
- Ratti, E., Trist, D. The continuing evolution of the drug discovery process in the pharmaceutical industry. *Farm.* 56, 13–19. (2001)
- Richmond, E., Rogol, A. D. Treatment of growth hormone deficiency in children, adolescents and at the transitional age. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 30, 749–755. (2016)
- Roshmi, R. R., Yokota, T. Viltolarsen for the treatment of Duchenne muscular dystrophy 55, 627. (2019)
- Saikia, S., Bordoloi, M. Molecular Docking: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. *Curr. Drug Targets* 20, 501–521. (2019)
- Schneider, G. Automating drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 17, 97–113. (2018)
- Schutte-Nutgen, K., Tholking, G., Suwelack, B., Reuter, S. Tacrolimus - Pharmacokinetic Considerations for Clinicians. *Curr. Drug Metab.* 19, 342–350. (2018)

- Scott, L. J. Givosiran: First Approval. *Drugs* 80, 335–339. (2020)
- Scott, L. J., Keam, S. J. Lumasiran: First Approval. *Drugs* 81, 277–282. (2021)
- Seca, A., Pinto, D. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 263. (2018)
- Shan, Y., Kim, E. T., Eastwood, M. P., Dror, R. O., Seeliger, M. A., Shaw, D. E. How Does a Drug Molecule Find Its Target Binding Site? *J. Am. Chem. Soc.* 133, 9181–9183. (2011)
- Shields, W. W., Pockros, P. J. Ribavirin Analogs. *Clin. Liver Dis.* 13, 419–427. (2009)
- Shyam Sunder, S., Sharma, U. C., Pokharel, S. Adverse effects of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy: pathophysiology, mechanisms and clinical management. *Signal Transduct. Target. Ther.* 8, 262. (2023)
- Smith, C. Drug target validation: Hitting the target. *Nature* 422, 342–345. (2003)
- Smith, W. M. Cyclosporine: A Historical Perspective on Its Role in the Treatment of Noninfectious Uveitis. *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 33, 247–262. (2017)
- Solensky, R. Penicillin allergy and the law. *Ann. Allergy, Asthma Immunol.* 121, 517–518. (2018)
- Stark, M. C., Joubert, A. M., Visagie, M. H. Molecular Farming of Pembrolizumab and Nivolumab. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 10045. (2023)
- Stogios, P. J., Savchenko, A. Molecular mechanisms of vancomycin resistance. *Protein Sci.* 29, 654–669. (2020)
- Sun, G., Rong, D., Li, Z., Sun, G., Wu, F., Li, X., Cao, H., Cheng, Y., Tang, W., Sun, Y. Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges. *Front. Cell Dev. Biol.* 9, 2043. (2021)
- Tagarro, A., Cruz-Cañete, M., Otheo, E., Launes, C., Couceiro, J. A., Pérez, C., Alfayate, S., Calvo, C., de Liria, C. R. G. Oseltamivir para el tratamiento de la gripe en niños y adolescentes. *An. Pediatría* 90, 317.e1-317.e8. (2019)
- Takakusa, H., Iwazaki, N., Nishikawa, M., Yoshida, T., Obika, S., Inoue, T. Drug Metabolism and Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotide Therapeutics: Typical Profiles, Evaluation Approaches, and Points to Consider Compared with Small Molecule Drugs. *Nucleic Acid Ther.* 33, 83–94. (2023)
- Tanman, Ü., Yangin, S., Cansaran-Duman, D. Determination of Dysregulated miRNA Expression Levels by qRT-PCR after the Application of Usnic Acid to Breast Cancer. *Anticancer. Agents Med. Chem.* 20, 548–558. (2020)
- Terstappen, G. C., Reggiani, A. In silico research in drug discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 23–26. (2001)
- Trajanoska, K., Bhérec, C., Taliu, D., Zhou, S., Richards, J. B., Mooser, V. From target discovery to clinical drug development with human genetics. *Nature* 620, 737–745. (2023)
- van Haarst, A., McGarvey, L., Paglialunga, S. Review of Drug Development Guidance to Treat Chronic Obstructive Pulmonary Disease: US and EU Perspectives. *Clin. Pharmacol. Ther.* 106, 1222–1235. (2019)
- Wang, D., Lippard, S. J. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 307–320. (2005)
- Wang, J., Wang, P., Zeng, Z., Lin, C., Lin, Y., Cao, D., Ma, W., Xu, W., Xiang, Q., Luo, L., Wang, W., Shi, Y., Gao, Z., Zhao, Y., Liu, H., Liu, S. L. Trabectedin in Cancers: Mechanisms and Clinical Applications. *Curr. Pharm. Des.* 28, 1949–1965. (2022)
- Wang, J. F., Wei, D. Q., Chou, K. C. Drug Candidates from Traditional Chinese Medicines. *Curr. Top. Med. Chem.* 8, 1656–1665. (2008)
- Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., Pairaudeau, G., Pennie, W. D., Pickett, S. D., Wang, J., Wallace, O., Weir, A. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 475–486. (2015)
- Weaver, B. A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. (Bement, W., Ed.) *Mol. Biol. Cell* 25, 2677–2681. (2014)
- Wei, Y. P., Yao, L. Y., Wu, Y. Y., Liu, X., Peng, L. H., Tian, Y. L., Ding, J. H., Li, K. H., He, Q. G. Critical Review of Synthesis, Toxicology and Detection of Acyclovir 26, 6566. (2021)
- Weng, Y., Xiao, H., Zhang, J., Liang, X. J., Huang, Y. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. *Biotechnol. Adv.* 37, 801–825. (2019)
- Wirth, T., Parker, N., Ylä-Herttuala, S. History of gene therapy. *Gene* 525, 162–169. (2013)
- Wong, K. M., Song, J., Saini, V., Wong, Y. H. Small Molecules as Drugs to Upregulate Metastasis Suppressors in Cancer Cells. *Curr. Med. Chem.* 26, 5876–5899. (2019)
- Wouters, O. J., McKee, M., Luyten, J. Estimated Research and Development Investment Needed to Bring a New Medicine to Market, 2009-2018. *323*, 844–853. (2020)
- Yan, L., Shen, J., Wang, J., Yang, X., Dong, S., Lu, S. Nanoparticle-Based Drug Delivery System: A Patient-Friendly Chemotherapy for Oncology 18, 155932582093616. (2020)
- Yang, F., Darsey, J. A., Ghosh, A., Li, H. Y., Yang, M. Q., Wang, S. Artificial Intelligence and Cancer Drug Development. *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 17, 2–8. (2022)

- Yang, W., Bhattachar, S. N., Patel, P. J., Landis, M., Patel, D., Reid, D. L., Duvnjak Romic, M. Modulating target engagement of small molecules via drug delivery: approaches and applications in drug discovery and development. *Drug Discov. Today* 26, 713–723. (2021)
- Yangın, S., Cansaran-Duman, D., Eskiler, G. G., Aras, S. The molecular mechanisms of vulpinic acid induced programmed cell death in melanoma. *Mol. Biol. Rep.* 49, 8273–8280. (2022)
- Yildirim, O., Gottwald, M., Schüler, P., Michel, M. C. Opportunities and Challenges for Drug Development: Public-Private Partnerships, Adaptive Designs and Big Data. *Front. Pharmacol.* 7, 461. (2016)
- Yu, D. L., Lou, Z. P., Ma, F. Y., Najafi, M. The interactions of paclitaxel with tumour microenvironment. *Int. Immunopharmacol.* 105, 108555. (2022)
- Yu, M., Liu, M., Zhang, W., Ming, Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation. *Curr. Drug Metab.* 19, 513–522. (2018)
- Zagotto, G., Bortoli, M. Drug Design: Where We Are and Future Prospects 26, 7061. (2021)
- Zhang, L., Song, J., Kong, L., Yuan, T., Li, W., Zhang, W., Hou, B., Lu, Y., Du, G. The strategies and techniques of drug discovery from natural products. *Pharmacol. Ther.* 216, 107686. (2020)
- Zhao, Q. Bispecific Antibodies for Autoimmune and Inflammatory Diseases: Clinical Progress to Date. *BioDrugs* 34, 111–119. (2020)
- Zhao, S., Mysler, E., Moots, R. J. Etanercept for the treatment of rheumatoid arthritis. *Immunotherapy* 10, 433–445. (2018)
- Zhong, L., Li, Y., Xiong, L., Wang, W., Wu, M., Yuan, T., Yang, W., Tian, C., Miao, Z., Wang, T., Yang, S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct. Target. Ther.* 6, 201. (2021)
- Ziegler, S., Sievers, S., Waldmann, H. Morphological profiling of small molecules. *Cell Chem. Biol.* 28, 300–319. (2021)
- Ziff, O. J., Kotecha, D. Digoxin: The good and the bad. *Trends Cardiovasc. Med.* 26, 585–595. (2016)



BÖLÜM 2

İLAÇ KEŞFİ VE GELİŞTİRMEDE BİLGİSAYAR TEMELLİ YAKLAŞIMLAR

Nuno S. OSÓRIO^{1,*}

*¹Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine,
University of Minho, Braga, Portugal & ICVS/3B's-PT Government Associate
Laboratory, Braga, Portugal*

nosorio@med.uminho.pt

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Nuno S. OSÓRIO





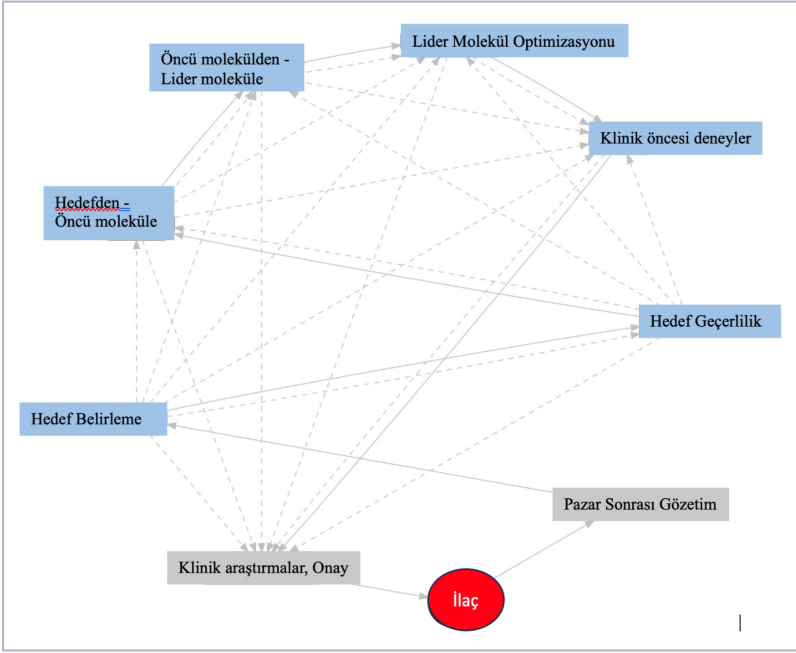
1. GİRİŞ

Yeni ilaçların geliştirilmesi, birden fazla disiplin ve teknolojinin entegrasyonunu gerektiren karmaşık, maliyetli ve riskli bir süreçtir. Araştırma sonuçlarına göre, yeni bir ilaç geliştirmenin ortalama maliyeti 4 milyar dolar civarındadır ve geliştirilmeye başlayan ilaç adaylarının yalnızca küçük bir kısmı ticari bir ürün haline gelmektedir (Kolluri ve ark., 2022). Bu kadar yüksek ilaca dönüşememe oranının ana nedenleri arasında etkinlik, güvenlik ve toksikoloji, farmakoloji, ticari ve malzeme maliyeti yer alır (Winkler, 2021). Bu sorunların çoğu, kullanılan üretim ve dağıtım stratejilerine ek olarak, ilaç adaylarının tasarımı ve moleküler özellikleri ile ilgilidir. Yapay zeka (AI) ve makine öğrenimi (ML), *in silico* ve *in vitro* analizler kullanılarak biyoaktif bileşiklerin keşfine veya optimizasyonuna yardımcı olabilecek hesaplama yöntemleri ve araçlarıdır (Bleicher ve ark., 2022). Yapay zeka ve makine öğrenimi, hedef belirleme, öncü molekül belirleme, lider molekül optimizasyonu ve klinik öncesi değerlendirme gibi bilgisayar destekli ilaç tasarımının (CADD) çeşitli yönlerine uygulanabilir (Patel ve ark., 2020). Yapay zeka ve makine öğrenimi, molekül yapılar, özellikler, aktiviteler, etkileşimler, yolaklar, fenotipler ve klinik sonuçlar gibi ilaç adaylarını oluşturmak veya değerlendirmek için farklı veri ve temsil türlerini kullanabilir (Patel ve ark., 2020). Yapay zeka ve makine öğrenimi, verilerden öğrenmek ve tahminlerde bulunmak için denetimli öğrenme, denetimsiz öğrenme, pekiştirmeli öğrenme, derin öğrenme ve üretken modeller gibi farklı türde algoritmalar ve teknikler de kullanılabilir (Patel ve ark., 2020). Yapay zeka ve makine öğrenimi, ürün üretimi, güvenlik, teslimat ve etkinlik konularıyla ilgili klinik öncesi ve klinik aşamalarda potansiyel kayıp nedenlerinin belirlenmesine ve ele alınmasına yardımcı olabilir (Bleicher ve ark., 2022). Bununla birlikte, AI ve ML, ilaç geliştirmenin başarısını garanti edebilecek sihirli güçleri değildir. Yapay zeka ve makine öğrenimi hala birçok zorluk ve sınırlamayla karşı karşıyadır. Örneğin, hesaplama modellerinin ve tahminlerinin doğruluğu ve güvenilirliği hala bir endişe kaynağıdır (Deng ve ark., 2022). Deneysel verilerin mevcudiyeti ve kalitesi ayrıca biyolojik sistemlerin karmaşıklığı ve çeşitliliği başka bir zorluk etmenidir. Ayrıca, ilaç keşfinde yapay zeka ve makine öğrenimi kullanmanın etik ve yasal sonuçları vardır (Deng ve ark., 2022). Bu nedenle, AI ve ML, deneysel yöntemler ve klinik deneyler kullanılarak sonuçlarının kapsamlı bir şekilde validasyon (geçerlilik) ve verifikasyon (doğrulanma) gerektirir. Yapay zeka/makine öğrenimi teknikleri, otomatikleştirilmiş yapıları, öngörü yetenekleri ve bunun sonucunda beklenen verimlilik artışı nedeniyle ilaç endüstrisi için oldukça önemlidir (Kolluri ve ark., 2022). Yapay zeka/makine öğrenimi yaklaşımları, son 15 ila 20 yılda artan karmaşıklıkla ilaç keşfinde kullanılmıştır. Yapay zeka/makine öğreniminden kaynaklanan olumlu bozulmanın meydana gelmeye başladığı ilaç geliştirmenin en son yönü, klinik deney tasarımı, yürütülmesi, analizi (Kolluri ve ark., 2022) ve ayrıca ihmal edilen tropikal hastalıklar için ilaçların keşfidir (Winkler, 2021). AI/ML'nin Ar-Ge'ye artan bir entegrasyonunun olduğu bir dünyaya doğru ilerlerken, ilgili trend yaklaşımları aşmak çok önemlidir. Veriler hakkında çıkarımlar yaparken bilimsel yöntemin eski yol olmadığını kabul etmek de aynı derecede önemlidir. Bunu yapmak, ilaç geliştirmede yapay zeka/makine öğreniminin optimal kullanımı konusunda bilinçli karar vermeye yol açacaktır (Kolluri ve ark., 2022).

2. YENİ BİR İLAÇA GİDEN BORU HATLARI

Yeni ilaçları keşfetme ve geliştirme süreci doğrusal veya standartlaştırılmış bir süreç değil, daha çok sayıda adım, yöntem ve disiplini içeren karmaşık ve dinamik bir süreçtir (Deng ve ark., 2022). Farklı ilaçlar, hastalığın doğasına, hedefe, bileşiğe ve mevcut kaynaklara bağlı olarak farklı yollar ve stratejiler izleyebilir. Yeni bir ilaca ulaşmak için tek bir “doğru” boru hattı yoktur, daha ziyade ilaç geliştiriminin sonucunu ve başarısını etkileyebilecek çok çeşitli olasılıklar ve seçenekler vardır (Şekil 1).

İlaç boru hatları arasındaki temel farklardan biri, keşif aşamasının başlangıç noktasıdır. Keşif aşaması, potansiyel ilaç adaylarının biyolojik aktivitelerine, kimyasal özelliklerine ve güvenlik profillerine göre tanımlandığı ve seçildiği aşamadır. Keşif aşaması, hedef ve fenotipik tabanlı veya tesadüf temelli gibi farklı yaklaşımlarla başlatılabilir. Hedefe dayalı ilaç keşfi, bir hastalığın patofizyolojisinde yer alan belirli bir molekülün hedefinin tanımlanması ve doğrulanması ile başlayan bir yaklaşımdır. Bir hedef, biyolojik bir süreci veya yolu modüle eden bir enzim, bir reseptör, bir kanal vb. içindeki herhangi bir biyomolekül olabilir. Hedef tabanlı ilaç keşfi, hedefle etkileşime girebilen ve işlevini istenen şekilde modüle edebilen bileşikler bulmayı amaçlar. Bu yaklaşım, hedefle ilgili yapısal ve işlevsel bilgilerin mevcudiyetinin yanı sıra, büyük bileşik kütüphanelerini hedefe karşı test edebilen yüksek verimli tarama tekniklerine dayanır (Moffat ve ark., 2017). Fenotipik temelli ilaç keşfi, bir hastalıkla ilgili biyolojik bir fenotipin veya etkinin gözlemlenmesiyle başlayan bir yaklaşımdır. Bir fenotipik yaklaşım, patolojik bir durumu veya mekanizmayı yansıtan hücre, doku, organ veya organizma yanıtı olabilir. Fenotipik tabanlı ilaç keşfi, moleküler hedef veya mekanizma hakkında önceden bilgi sahibi olmaksızın, ilgilenilen fenotipi indükleyebilen veya tersine çevirebilen bileşikler bulmayı amaçlar. Bu yaklaşım, fenotipi *in vitro* veya *in vivo* olarak ölçebilen sağlam ve güvenilir tahlillerin mevcudiyetine dayanır (Moffat ve ark., 2017). Tesadüfe dayalı ilaç keşfi, yeni bir ilacın keşfine yol açan kazara veya beklenmedik bir bulguyla başlayan yapılandırılmamış bir yaklaşımdır. Tesadüfe dayalı ilaç keşfi, rasyonel veya sistematik bir planı takip etmez, bunun yerine yeni biyolojik aktiviteleri veya bileşiklerin etkilerini ortaya çıkaran tesadüfi olaylardan veya gözlemlerden yararlanır. Bu yaklaşım, tesadüfi keşifleri tanıyabilen ve takip edebilen araştırmacıların merakına ve yaratıcılığına dayanır (Ban, 2006). Tüm bu yaklaşımların avantajları ve dezavantajları vardır ve bunların hiçbiri ilaç geliştiriminin başarısını garanti edemez (Moffat ve ark., 2017). Aslında, birçok ilaç, gelişimin farklı aşamalarında farklı yaklaşımların birleştirilmesi veya bunlar arasında geçiş yapılması yoluyla keşfedilmiştir (Tablo 1). Örneğin, bazı ilaçlar fenotipik tarama ile keşfedilmiş ve daha sonra hedefleri ters farmakoloji ile belirlenmiştir (metformin ve sildenafil gibi). Bazı ilaçlar hedef tarama ile keşfedilmiş ve daha sonra fenotipleri ileri farmakoloji deneyleri (imatinitib ve rapamisin) ile araştırılmıştır. Bazı ilaçlar tesadüfen keşfedilmiş ve daha sonra hedefleri açıklanmıştır (penisilin ve aspirin).



Şekil 1. İlaç keşif ve geliştirme boru hatları. Tipik aşamalar şunlardır: terapötik potansiyele sahip bir biyolojik hedefin tanımlandığı hedef kimliği; hedefin ilişki düzeyi ve ilaç olarak kullanılabilirliğinin onaylandığı hedef geçerliliği; hedefi etkileyen bir molekülün (“öncü molekül”) keşfedildiği hedeften öncü moleküle; “öncü molekül”ün daha iyi özelliklere sahip bir “lider molekül” bileşiği olarak optimize edildiği öncü molekülden-lider moleküle; lider molekülün daha da rafine edildiği lider molekül optimizasyonu; ilaç adayının güvenlik ve etkinlik açısından insan olmayan modellerde test edildiği klinik öncesi; ve klinik deneyler, İlacın insanlarda test edildiği ve güvenli ve etkili olması durumunda düzenleyiciler tarafından onaylandığı “Onay”. Sürekli çizgi, keşiften pazara kadar ortak bir yol gösterir, ancak farklı ilaçlar çeşitli faktörlere bağlı olarak farklı yollar ve stratejiler izleyebilir. Tek bir “doğru” boru hattı yoktur, bunun yerine çok çeşitli seçenekler vardır. Kırmızı daire onaylanmış “İlaç”tır ve diğer gri kutu, ilacı pazarlandıktan sonra izleyen “Pazar Sonrası Gözetim”dir. Kesikli çizgiler, ilaç geliştirme sürecinde izlenebilecek olası alternatif yolları göstererek, ilaç geliştiriminin her zaman doğrusal olmadığını ve yeni bilgilere veya stratejik değerlendirmelere dayalı olarak aşamaların yeniden gözden geçirilmesini veya atlanmasını içerebileceğini vurgulamaktadır. Şekil 1, Python’daki graphviz kütüphanesinden Digraph modülü kullanılarak oluşturulmuştur.

Tablo 1. Farklı yaklaşımların birleştirilmesiyle veya bunlar arasında geçiş yapılmasıyla keşfedilen başarılı ilaçların bir özeti.

İlaç	Tanımlama
Metformin	Mitochondriyal solunum zincirinin kompleks I’i inhibe ederek kan şekerini düşüren bir ilaç. Hedefi daha sonra ters farmakoloji ile belirlendi (Owen ve ark., 2000).
Sildenafil (Viagra)	Fosfodiesteraz tip 5’i (PDE5) inhibe ederek erektil disfonksiyonu tedavi eden bir ilaç. Başlangıçta kardiyovasküler problemler için geliştirilmiş ve fenotipik tarama ile keşfedilmiştir (Boolell ve ark., 1996).
Imatinib (Gleevec)	BCR-ABL tirozin kinazını inhibe ederek kronik miyeloid lösemiye tedavi eden bir ilaç. Hedef tarama ile tasarlanmış ve fenotipleri daha sonra ileri farmakoloji ile araştırılmıştır (Druker, 2004).
Rapamisin	mTOR yolunu inhibe eden ve immünosupresyon ve yaşlanma karşıtı gibi çeşitli klinik uygulamalara sahip bir ilaç. Bir toprak örneğinde ortaya çıkarıldı ve antifungal özelliklere sahip olduğu bulundu (Vezina, ve ark., 1975; Seto, 2012).
Penisilin	Hücre duvarı sentezine müdahale ederek bakterileri öldüren bir antibiyotik. Alexander Fleming, bir küfün bakteri kültürlerini kirlettiğini fark ettiğinde tesadüfen fark edildi (Fleming, 1955).
Aspirin	Siklooksijenaz (COX) enzimlerini inhibe ederek ağrı ve ateşi hafifleten bir ilaç. Etken bileşen olan salisilik asit, tıbbi özellikleri ile biliniyordu ve aspirin daha sonra asetil grubu eklenerek sentezlendi (McKee ve ark., 2002).

Son yıllarda, yapay zeka (AI) ve makine öğrenimi (ML), ilaç keşfinde giderek daha önemli araçlar haline geldi.

Tablo 2. İlaç keşfindeki zorluklar.

Aşama	Yöntem	Zorluk
Hedef Belirleme	AI/ML, omik veri, literatür	Biyolojik sistemlerin karmaşıklığı ve çeşitliliği
Hedef Geçerlilik	AI/ML, omik veri, literatür	Hedef uygunluğunun ve ilaç olabile potansiyelinin geçerliliği
Hedefden - Öncü Moleküle	AI/ML, yüksek verimli tarama, sanal tarama	Geniş kimyasal uzayın keşfi ve navigasyonu
Öncü Molekülden - Lider Moleküle	AI/ML, yapı tabanlı veya ligand tabanlı ilaç tasarımı	İsabet potansiyeli, seçicilik ve ADME özelliklerinin optimizasyonu
İlaç adayı molekül optimizasyonu	AI/ML, yapı tabanlı veya ligand tabanlı ilaç tasarımı	Lider molekül verimliliği, güvenliği ve geliştirilebilirliğinin optimizasyonu
Klinik öncesi analizler	AI/ML, in vitro ve in vivo deneyler	Farmakokinetik, farmakodinamik ve toksisitenin belirlenmesi ve değerlendirilmesi

Yapay zeka/makine öğrenimi teknikleri, otomatikleştirilmiş yapıları, öngörü yetenekleri ve bunun sonucunda beklenen verimlilik artışı nedeniyle ilaç endüstrisi için caziptir (Kolluri ve ark., 2022). Hedef belirleme, Öncü molekül belirleme, Lider molekül optimizasyonu, klinik öncesi değerlendirme, klinik deney tasarımı, davranış analizi (Kolluri ve ark., 2022) dahil olmak üzere ilaç geliştiriminin çeşitli aşamalarında ve ayrıca ihmal edilen tropikal hastalıklar için ilaçların keşfedilmesinde (FDA, 2023) kullanılmaktadır.

Geliştirme aşaması ilacın seçildiği aşamadır, bu aşamada aday moleküller klinik öncesi ve klinik çalışmalarda etkinlik, güvenlik, farmakokinetik, farmakodinamik ve üretilebilirlikleri açısından test edilir (Scannell ve ark., 2012). Geliştirme aşaması, pazarlama onayından önce ulaşılması gereken yasal gerekliliklere ve kilometre taşlarına göre farklı aşamalara ayrılabilir. Geliştirme aşamasından önce, tipik bir ilaç keşif hattı beş aşamaya ayrılabilir: hedef tanımlama, hedef doğrulama, hedeften-öncü moleküle, öncü molekülden-lider moleküle ve lider molekül optimizasyonu (Scannell ve ark., 2012). Bununla birlikte, ilaç keşfi ve geliştirilmesi ile ilaç keşfi ve geliştirme boru hattını oluşturan adımlar arasındaki bu ayrım sabit veya evrensel değildir ve farklı ilaçlarda farklı süre, maliyetler, riskler ve sonuçlar olabilir. İlaç boru hatlarının çeşitliliği, ilaç keşfi ve geliştirilmesinin karmaşıklığını ve belirsizliğini yansıtmaktadır (Tablo 2). Yeni ilaçlar üretmek için basit bir formül veya reçete yoktur, daha ziyade ilaç geliştirme sürecini ve sonucunu etkileyen çeşitli bilimsel, teknolojik, yönetsel, düzenleyici, etik ve ekonomik faktörler vardır (Scannell ve ark., 2012). Bu nedenle, her bir yaklaşımın, yöntemin ve aşamanın güçlü yönlerini ve sınırlamalarını anlamak ve ilaç geliştiriminin verimliliğini ve etkinliğini optimize edebilecek esnek ve uyarlanabilir bir strateji benimsemek önemlidir (Scannell ve ark., 2012). Keşiften onaya kadar olan tüm süreç ortalama 10-15 yıl sürebilmektedir (Brown ve ark., 2022). Biyolojik sistemlerin anlaşılmasındaki ilerlemelere ve en son teknolojilerin geliştirilmesine rağmen, süreç hala uzun ve yüksek yıpranma oranıyla maliyetlidir (Brown ve ark., 2022).

3. YAPAY ZEKA (AI) İLE GELİŞTİRİLMİŞ HEDEFTANIMLAMA

Hedef tanımlama, bir ilacın tasarlanabileceği belirli bir biyolojik hedefin seçildiği çoğu modern ilaç keşif sürecinin ilk adımıdır. Bir hedef, bir hastalığın patofizyolojisinde yer alan biyolojik bir süreç veya yol ile etkileşime giren ve onları modüle eden herhangi bir biyomolekül olabilir. Bir hastalık, hastalık alt tipi veya hasta alt kümesi için mümkün olan en iyi hedefi bulmak, başarısızlık riskini azaltabileceği ve ilaç adaylarının etkinliğini ve güvenliğini artırabileceği için günümüzde ilaç geliştirmenin başarısını en üst düzeye çıkarmak için kritik olarak kabul edilmektedir (Kim ve ark., 2020). Bununla birlikte, literatür (araştırma makaleleri, hastalık sınıflandırma belgeleri, semptom açıklamaları, düzenlemeler, patentler vb.), deneysel veriler (omik veriler, yolak analiz verileri, sistem biyolojisi verileri, bileşik özellikler vb.) gibi çok modüllü verilerin büyük ve çeşitli veri kümelerinin entegrasyonunu ve analizini gerektirdiğinden hedef belirleme kolay bir aşama değildir. (Kim ve ark., 2020). Bu veri kümeleri genellikle farklı kaynaklara ve biçimlere dağılmıştır ve çeşitli türlerde gürültü (karmaşık veri) ve tam olmayan veri içerir. Bu nedenle, bu veri kümelerinden ilgili ve güvenilir bilgileri çıkarmak ve yeni hedefler belirlemek zordur (Kim ve ark., 2020). Yapay Zeka (AI) teknikleri, otomatikleştirilmiş yapıları, tahmin yetenekleri ve bunun sonucunda beklenen verimlilik artışı nedeniyle ilaç endüstrisi için oldukça caziptir (Savage, 2021). Hedef belirleme de dahil olmak üzere ilaç geliştirmenin çeşitli aşamalarında kullanılmaktadırlar. Yapay zeka, klinik deneyler için nihai ilaç adayını seçmeden önce laboratuvar deneylerinde sentezlemek, test etmek ve optimize etmek için milyonlarca potansiyel küçük molekülün çeşitli özelliklerini hesaplamalı olarak sıralayabilir ve karşılaştırabilir (Savage, 2021). Karşılanmamış tıbbi ihtiyaçları karşılayabilecek ilaçlanabilir hedeflerin belirlenmesi, ilaç keşfinde önemli bir zorluktur (Rasul ve ark., 2022). Biyolojik sistemlerin karmaşıklığı, hastalıkların çeşitliliği ve doğrulanmış hedeflerin azlığı, etkili ve güvenli ilaç adayları bulmayı zorlaştırmaktadır (Rasul ve ark., 2022). Bu zorlukların üstesinden gelmek için, gelişmekte olan iki teknoloji, hedef belirleme için büyük potansiyel göstermektedir: bilgi grafikleri (KG'ler) ve büyük dil modelleri (LLM'ler) (Pan ve ark., 2024; Pan ve ark., 2023). KG'leri ve LLM'leri bir araya getirerek, her iki teknolojinin tamamlayıcı güçlerinden yararlanmak ve hedef belirleme için sinerjik bir etki elde etmek mümkündür. KG'ler, LLM'ler için yapılandırılmış bilgi ve mantıksal akıl yürütme sağlayabilirken, LLM'ler KG'ler için doğal dil anlayışı ve üretimi sağlayabilir. Dahası, klinik başarıya sahip olma olasılığı daha yüksek olan hedef belirleme için rasyonel ve bütüncüsel bir yaklaşım da sağlanabilir (Pan ve ark., 2024; Pan ve ark., 2023).

3.1 Bilgi Grafikleri

Bilgi grafikleri (KG'ler), nesnelere ve bunların ilişkilerini düğümler ve kenarlar aracılığıyla somutlaştıran, yapılandırılmış bilgilerin grafiksel temsilleridir (Pan ve ark., 2024). KG'ler, çeşitli kaynaklardan ve etki alanlarından gelen çok modlu verileri, zengin olgusal bilgileri yakalayabilen birleşik ve tutarlı bir yapıya entegre edebilir. KG'ler, çıkarım ve yorumlanabilirlik için harici bilgi sağlayarak hedef tanımlamayı geliştirebilir. Örneğin, KG'ler, onları hastalıklara, yolaklara, fenotiplere, bileşiklere vb. bağlayarak ve grafik yapısı üzerinde akıl yürütme ve sorgulama yaparak potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilir.

3.2 Büyük Dil Modelleri

Büyük dil modelleri (LLM'ler), doğal dilin istatistiksel kalıplarını ve anlamsal temsillerini öğrenmek için büyük miktarda metin verisi üzerinde eğitilen sinir ağı modelleridir (Pan ve ark., 2024). LM'ler, farklı girdi veya görev türlerine dayalı olarak doğal dil metinleri oluşturabilir veya değerlendirebilir. LLM'ler, metin analizi ve üretimi için doğal dil işleme yetenekleri sağlayarak hedef tanımlamayı geliştirebilir (Pan ve ark., 2024). Örneğin, LLM'ler literatürden, patentlerden vb. ilgili bilgileri çıkararak ve hedeflerin doğal dil özetleri veya açıklamalarını oluşturarak potansiyel hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilir (Pan ve ark., 2023).

4. VERİTABANLARININ HEDEFTEN - ÖNCÜ MOLEKÜLE VE ÖNCÜ MOLEKÜLDEN - LİDER MOLEKÜLADIMLARINDAKİ ROLÜ

Hedeften-öncü moleküle ve öncü molekülden-lider moleküle aşamaları, potansiyel ilaç adaylarının belirli bir biyolojik hedefle etkileşimlerine dayalı olarak tanımlandığı ve optimize edildiği ilaç keşif sürecinde iki önemli adımdır. Bu aşamalar, kimyasal bileşikler, biyolojik hedefler, deneysel sonuçlar vb. hakkında bilgi içeren veri tabanlarının kapsamlı kullanımını içerir (Kiriiri ve ark., 2020). Bu veri tabanları, potansiyel öncü moleküllerin aranmasını, özelliklerinin ve etkinliklerinin değerlendirilmesini, gelecek vaat eden ilaç adaylarının seçimini ve yapılarının ve formülasyonlarının optimizasyonunu kolaylaştırmada çok önemli bir rol oynar. Örneğin, **PubChem** (Kim ve ark., 2023), **ChEMBL** (Mendez ve ark., 2019), **DrugBank** (Wishart ve ark., 2017) gibi veri tabanları, yapıları, özellikleri, aktiviteleri, toksisite profilleri vb. dahil olmak üzere kimyasal bileşikler hakkında çok miktarda veri sağlar. Benzer şekilde, **UniProt** (Bateman ve ark., 2023) veya **RCSB PDB** (Berman ve ark., 2000) gibi veri tabanları, hedef belirleme sürecinde çok önemli olan protein dizileri ve yapıları hakkında kapsamlı bilgi sağlar. Bu nedenle, veri tabanları, modern bilgisayarla geliştirilmiş ilaç keşif sürecini beslemenin ayrılmaz bir parçasıdır (Kim ve ark., 2020).

Tanım 1: Hedef

Hedef, bir DNA, RNA, protein veya bir lipid gibi bir hastalığın patofizyolojisinde yer alan bir biyomoleküldür.

Tanım 2: Öncü molekül

Bir öncü molekül, hedefe karşı bazı biyolojik aktiviteler gösteren ve genellikle bir *in vitro* analiz ile ölçülen bir bileşiktir.

Tanım 3: Lider molekül

Kurşun, isabete kıyasla gelişmiş biyolojik aktiviteye, seçiciliğe ve güvenlik profiline sahip bir bileşiktir ve genellikle *in vivo* analiz ile ölçülür.

Hedeften - öncü moleküle ve öncü molekülden - lider moleküle aşamaları zordur çünkü doğal kaynaklardan sentezlenebilecek veya izole edilebilecek tüm olası küçük moleküllerin geniş kimyasal alanın araştırılmasını gerektirir. Kimyasal uzayın, onları tanımlamak için kullanılan kriterlere bağlı olarak 10^{60} ila 10^{200} molekül içerdiği tahmin edilmektedir (Lipinski ve Hopkins, 2004). Bununla birlikte, şimdiye kadar bu alanın sadece küçük bir kısmı keşfedilmiştir, çünkü sadece yaklaşık 10^7 molekül sentezlenmiş veya izole edilmiştir ve sadece yaklaşık 10^2 molekül ilaç olarak test edilmiştir (Lipinski ve Hopkins, 2004). Kimyasal alanı öncü molekülleri ve potansiyel ilaçları verimli bir

şekilde aramak için, kimyasal alanın karmaşıklığını azaltabilecek ve çeşitliliğini artırabilecek çeşitli stratejiler ve yöntemler uygulamak gerekir. Bu strateji ve yöntemlerden bazıları şunlardır:

- Kombinatorial kimya veya doğal ürünleri çeşitli bileşiklerin kaynağı olarak kullanmak;
- Hedefe karşı büyük bileşik kütüphanelerini test etmek için yüksek verimli tarama veya sanal tarama teknikleri kullanmak;
- Hedef veya bilinen aktif ligandlara dayalı bileşikler tasarlamak veya optimize etmek için yapı tabanlı veya ilaç temelli tasarım yaklaşımlarını kullanmak;
- Verilere ve modellere dayalı bileşikler oluşturmak veya değerlendirmek için AI veya ML araçlarını kullanma (Lipinski ve Hopkins, 2004).

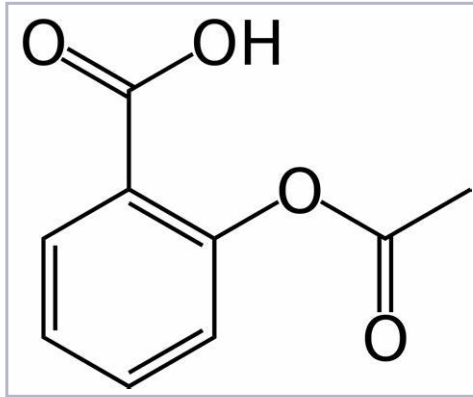
Hedeften-öncü moleküle ve öncü molekülden-lider moleküle aşamalarının bir diğer önemli yönü, bir ilaç adayının suda ve lipitlerde çözünürlük, biyoyararlanım, stabilite, geçirgenlik, metabolizma, toksisite vb. gibi sahip olması gereken arzu edilen özellikleri dikkate almaktır. Bu özellikler genellikle bir bileşiğin ilaca benzerliği veya geliştirilebilirliği olarak adlandırılır ve ilacın farmakokinetik (“vücudun ilaca ne yaptığı”) ve farmakodinamik (“ilacın vücuda ne yaptığı”) açıdan etkileyebilir (Lipinski ve Hopkins, 2004). En önemli özelliklerden biri, bir bileşiğin sulu veya organik ortamda ne kadar iyi çözünebileceğini belirlediği için su ve lipitlerdeki çözünürlüktür. Sudaki çözünürlük, bir bileşiğin gastrointestinal sistemden kan dolaşımına ne kadar iyi emilebileceğini etkilediği için oral uygulama için gereklidir. Lipitlerdeki çözünürlük, kan-beyin bariyeri veya hücre zarı gibi biyolojik zarları geçmek için gereklidir. Bir bileşik, sudaki çözünürlük ile lipitler arasında bir dengeye sahip olmalıdır, çünkü her ikisinin de çok fazla veya çok azı biyoyararlanımını (uygulanan dozun sistemik dolaşıma ulaşan kısmı) veya etkinliğini (istenen bir etkiyi üretme yeteneği) tehlikeye atabilir (Lipinski ve Hopkins, 2004). Kimyasal alanın keşfini ve gezinmesini kolaylaştırmak için, milyonlarca bileşik ve biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi depolayan ve sağlayan çeşitli kamu veri tabanları geliştirilmiştir. En popüler veritabanlarından ikisi **PubChem** ve **ChEMBL**'dir. PubChem, çok sayıda analizde küçük moleküllerin biyolojik aktiviteleri hakkında bilgi sağlarken, ChEMBL, bilimsel literatürden çıkarılan manuel olarak seçilmiş biyoaktivite verileri sağlar (Kar ve Leszczynski, 2023). Bu veri tabanları, sanal tarama, veri madenciliği ve makine öğrenimi gibi çeşitli amaçlar için kullanılacak büyük miktarda veriye erişim sağladıkları için ilaç keşfinde yer alan araştırmacılar için paha biçilmez kaynaklardır (Rifaioğlu ve ark., 2019). Bu veritabanlarına ek olarak, belirli veri türlerine odaklanan özel veritabanları da vardır. Örneğin, **BindingDB**, özellikle enzim inhibitörlerinin ölçülen bağlanma afinitelerine odaklanır (Liu ve ark., 2006) ve **ZINC**, özellikle ilaç keşif uygulamaları için sanal tarama için ticari olarak mevcut bileşikler sağlamaya odaklanan ücretsiz bir araçtır (Irwin ve ark., 2012). **TTD**, ayrıntılı ilaç verilerini kapsamlı ilaç hedef bilgileriyle birleştirir (Zhou ve ark., 2021). Bu ve diğer bazı veri tabanları, araştırma ihtiyaçlarına bağlı olarak çok yararlı olabilecek daha spesifik bilgiler sağlar.

Ayrıca, yapay zeka (AI) teknolojilerindeki gelişmelerle birlikte, ilaç keşfi için AI algoritmalarının kullanımında bir artış olmuştur. Yapay zeka, bu veri tabanlarında bulunan büyük veri kümelerini analiz ederek hedef belirlemeden ilaç adayı optimizasyonuna kadar çeşitli aşamalarda yardımcı olabilir (Kim ve ark., 2020). Yapay zeka algoritmaları, diğer parametrelerin yanı sıra, ilaçlar için potansiyel hedefleri tahmin edebilir, bilinen hedefler için potansiyel ilaçları belirleyebilir ve ilaç yan etkilerini tahmin edebilir (Kim ve ark., 2020). Bu nedenle, veri tabanları modern ilaç keşif sürecinde ayrılmaz bir rol oynamaktadır.

4.1. ChEMBL ve PubChem

ChEMBL, bilimsel literatürden derlenmiş, ilaç benzeri özelliklere sahip biyoaktif moleküllerden oluşan bir veritabanıdır (Mendez ve ark., 2019). PubChem, patentler, dergiler veya web sayfaları gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen kimyasal yapıların ve bunlarla ilişkili biyolojik aktivitelerin bir veri tabanıdır (Bolton ve ark., 2023). Hem ChEMBL hem de PubChem, kullanıcıların bileşikleri aramasına, filtrelemesine, analiz etmesine ve karşılaştırmasına olanak tanıyan çeşitli araçlar ve özellikler sağlayarak öncü molekülü taramak ve potansiyel ilaçları bulmak için kullanılabilir. Örneğin, kullanıcılar bileşikleri ada, yapıya, altyapıya, benzerliğe veya hedefe göre arayabilir; bileşikleri aktiviteye, özelliğe, kaynağa veya ek açıklamaya göre filtrelemek; bileşikleri kümeleme, çeşitlilik veya zenginleştirme yoluyla analiz etmek; bileşikleri yapı-aktivite ilişkisi (SAR), farmakofor veya yerleştirme ile karşılaştırılabilir (O'Boyle ve ark., 2011) (Kim ve ark., 2023). ChEMBL, PubChem ve diğer veritabanlarındaki bileşikleri temsil etmenin en yaygın ve uygun yollarından biri SMILES (Basitleştirilmiş Moleküler Giriş Hattı Giriş Sistemi) kullanmaktır. SMILES, bir bileşiğin yapısını doğrusal bir sembol dizisi olarak kodlayan bir notasyon sistemidir. SMILES, bir bileşiğin atomlarını, bağlarını, dallarını, halkalarını, stereokimyasını ve izotoplarını kompakt ve insan tarafından okunabilir bir şekilde temsil edebilir (Weininger, 1988). SMILES ayrıca moleküler grafikler, parmak izleri veya görüntüler gibi diğer biçimlere veya temsillere kolayca dönüştürülebilir. Örneğin CC(=O)OC1=CC=CC=C1C(=O)O, aspirin için SMILES dizisidir ve aşağıdaki gibi parçalanabilir: CC birbirine bağlı iki karbon atomunu temsil eder, (=O) bir oksijen atomuna çift bağlı bir karbon atomunu temsil eder, OC1=CC=CC=C1, C1 konumuna bağlı bir karbonil grubuna sahip bir benzen halkasını temsil eder ve C(=O)O bir karbonil grubunu temsil eder. SMILES dizisi, Şekil 2'deki gibi bir Kekule diyagramı oluşturmak için gerekli bilgilere sahiptir.

ChEMBL ve PubChem, bileşikler ve biyolojik aktiviteleri hakkında ilgili ve güvenilir bilgiler içeren kimyasal alanın geniş ve çeşitli bir alt kümesine erişim sağlayabildikleri için, ilaç keşfinde öncü molekül belirleme aşamalarına hedefin uyması için değerli kaynaklardır (Bolton ve ark., 2008) (Mendez ve ark., 2019). ChEMBL ve PubChem'i daha önce bahsedilen diğer stratejiler ve yöntemlerle birlikte kullanarak, ilaç geliştirmenin sonraki aşamalarına geçme olasılığı daha yüksek olan öncü molekülleri ve potansiyel ilaçları belirlemek ve optimize etmek mümkündür.



Şekil 2. Asetil ve salisilik asit gruplarını gösteren aspirinin Kekule diyagramı. Aspirin, sodyum salisilat gibi bazlarla tuzlar oluşturabilen zayıf bir asittir. Aspirin ayrıca asetik ve salisilik asitler üretmek için hidrolize uğrayabilen bir esterdir. Aspirin, sülfürik asit gibi bir katalizörün varlığında salisilik asidin asetik anhidrit ile reaksiyona sokulmasıyla sentezlenir.

5. YAPAY ZEKA (AI) İLE GELİŞTİRİLMİŞ İLAÇ ADAYI OPTİMİZASYONU

Yapay Zeka (AI), ilaç keşfi ve lider molekül optimizasyonu dahil olmak üzere çeşitli alanlara ve sorunlara uygulanmıştır (Deng ve ark., 2022). Yapay zeka, bileşiklerin ve etkinliklerinin büyük ve karmaşık veri kümelerini işleyebilen ve istenen özelliklere sahip yeni bileşikler üretebilen veya değerlendirebilen gelişmiş araçlar ve yöntemler sağlayarak ilaç aday optimizasyonunu geliştirebilir (Bleicher ve ark., 2022). Sinir ağları, ilaç aday optimizasyonu için kullanılan en son ve başarılı yapay zeka modeli türlerinden biridir. Sinir ağları, biyolojik nöronların yapısından ve işlevinden ilham alan hesaplama modelleridir. Sinir ağları, bağlantıların gücünü temsil eden ağırlıklarla birbirine bağlanan yapay nöron katmanlarından oluşur. Sinir ağları, tahmin edilen ve gerçek çıktılar arasındaki hatayı ölçen bir kayıp fonksiyonunu en aza indiren bir öğrenme algoritmasına göre ağırlıkları ayarlayarak verilerden öğrenebilir. Sinir ağları, girdiler ve çıktılar arasındaki herhangi bir karmaşık işlevi veya ilişkiyi yaklaşık olarak tahmin edebilir, bu da onları Yapı-Etkinlik İlişkisi (SAR) ve Nicel Yapı-Etkinlik İlişkisi (QSAR) modellemek için uygun hale getirir (Deng ve ark., 2022). Sinir ağları, QSAR problemlerine ilk kez uygulandıkları 1990'ların başlarına kadar uzanan, hesaplamalı kimyada onlarca yıllık bir geçmişe sahiptir (Deng ve ark., 2022). O zamandan beri, sinir ağları farklı aşamalar, teknikler ve uygulamalar dahil edilerek geliştirildi ve çeşitlendirildi. Potansiyel ilaç optimizasyonu için kullanılan en yaygın sinir ağı türlerinden bazıları şunlardır:

- **İleri beslemeli sinir ağları (FFNN'ler):** FFNN'ler, bilginin giriş katmanından çıktı katmanına bir veya daha fazla gizli katmandan ileri yönde aktığı basit ve en temel sinir ağı türüdür. FFNN'ler, molekül tanımlayıcılarına veya parmak izlerine dayalı olarak bileşiklerin aktivitesini veya toksisitesini tahmin etmek gibi regresyon veya sınıflandırma görevleri için kullanılabilir (Deng ve ark., 2022).
- **Tekrarlayan sinir ağları (RNN'ler):** RNN'ler, bilgilerin sonraki katmanlardan önceki katmanlara geriye doğru akmasına izin veren geri bildirim döngülerine veya bağlantılara sahip bir tür sinir ağıdır. RNN'ler, metin veya konuşma gibi verilerden zamansal veya sıralı bilgileri yakalayabilir. RNN'ler, istenen özelliklerine göre bileşiklerin SMILES dizilerini oluşturmak veya optimize etmek gibi dizi oluşturma veya analiz görevleri için kullanılabilir (Deng ve ark., 2022).
- **Uzun kısa süreli bellek (LSTM) ağları:** LSTM'ler, bilgileri uzun süreler boyunca depolayabilen veya unutabilen bellek hücrelerine veya birimlerine sahip özel bir RNN türüdür. LSTM ağları, uzun dizilerle uğraşırken RNN'leri etkileyen kaybolan veya patlayan gradyanlar sorununun üstesinden gelebilir. LSTM ağları, istenen özelliklerine göre bileşiklerin SMILES dizilerini oluşturmak veya optimize etmek gibi dizi oluşturma veya analiz görevleri için kullanılabilir (Deng ve ark., 2022).
- **Transformatörler:** İlişki düzeylerine veya önemlerine bağlı olarak giriş veya çıkış dizilerinin farklı bölümlerine odaklanmak için dikkat mekanizmalarını kullanan bir tür sinir ağıdır. Transformatörler tekrarlayan veya evrişimli katmanlar kullanmazlar, bunun yerine dizileri kodlama ve kodunu çözmek için kendi kendine dikkat ve çapraz dikkat katmanlarına güven esaslı çalışırlar. Transformatörler, istenen özelliklerine göre bileşiklerin SMILES dizilerini oluşturmak veya optimize etmek gibi dizi oluşturma veya analiz görevleri için kullanılabilir (Deng ve ark., 2022).

Yapay zeka ile geliştirilmiş lider molekül optimizasyonu, küçük moleküllerin basit 2D tabanlı kimyasal temsilleri ile yapı-özellik tahmini için yeni ve verimli yöntemler sağlayarak ilaç keşif

sürecini hızlandırabilen ve iyileştirebilen, gelişmekte olan ve gelecek vaat eden bir alandır (Bleicher ve ark., 2022). Ayrıca, ilaç keşfinde yapay zeka/makine öğrenimi yöntemleri olgunlaşmaktadır ve bunların faydaları ve etkileri, lider molekül bulma ve lider molekül optimizasyonu dahil olmak üzere ilaç keşfinin birçok yönüne nüfuz etmesi muhtemeldir (Bleicher ve ark., 2022).

5.1. Sinir Ağları

İlaç yeniden profillemeye olarak da bilinen ilaç yeniden kullanımı, mevcut ilaçlar için yeni kullanımlar bulma sürecidir. Bu durum onaylanmış ilaçlar için yeni endikasyonları keşfederek, mevcut ilaçların yeni formülasyonlarını veya ilaç kombinasyonlarını geliştirerek veya mevcut ilaçları etkinliklerini artırmak, yan etkileri azaltmak veya farmakokinetik özelliklerini değiştirmek için yapılarını değiştirerek optimize ederek yapılabilir (Jarada ve ark., 2020). Bu süreç, geleneksel de novo ilaç keşif süreçlerine kıyasla zamandan ve maliyetten tasarruf sağlayarak yeni ilaç geliştirmenin klinik öncesi sürecini optimize etmede önemli bir rol oynamaktadır (Jarada ve ark., 2020). Yapay zeka modelleri gelişmeye devam ettikçe ve daha fazla veri elde edildikçe, ilaç keşfi üzerindeki etkilerinin artması muhtemeldir (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Makine öğreniminin bir alt kümesi olan sinir ağları, tıbbi kimya alanında kapsamlı uygulamalar bulmuştur. Moleküler özellikleri tahmin etmek, yeni ilaç adayları oluşturmak ve karmaşık biyolojik sistemleri modellemek gibi görevler için kullanılırlar (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Sinir ağları, insan beyninden ilham alan hesaplama modelleridir. Karmaşık kalıpları öğrenme ve bu kalıplara dayalı tahminlerde bulunma yeteneğine sahiptirler. Tıbbi kimyada, çeşitli kimyasal ve biyolojik olayları modellemek ve tahmin etmek için kullanılırlar (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Sinir ağlarının tıbbi kimyadaki en önemli uygulamalarından biri moleküler özellikleri tahmin etmektir. Bu özellikler çözünürlük, toksisite ve bağlanma afinitesi gibi özellikleri içerir. Bu özelliklerin doğru tahmini, ilaç keşfi ve geliştirilmesi için çok önemlidir (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Sinir ağları, yeni ilaç adayları oluşturmak için de kullanılabilir. Bu, ağı bilinen ilaçlardan oluşan geniş bir veri seti üzerinde eğiterek ve ardından bunu arzu edilen özelliklere sahip olması muhtemel yeni moleküller üretmek için kullanarak yapılır (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Son olarak, sinir ağları karmaşık biyolojik sistemleri modellemek için kullanılabilir ve protein katlanması, metabolik yollar ve hücre sinyal ağları gibi yönleri içerir. Bu modeller, bilim insanlarının bu sistemlerin nasıl çalıştığını ve terapötik amaçlar için nasıl manipüle edilebileceğini anlamalarına yardımcı olabilir (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022). Sinir ağları, tahmin, üretim ve modelleme için güçlü araçlar sağlayarak tıbbi kimyada devrim yaratma potansiyeline sahiptir. Bu ağlara ilişkin anlayışımız geliştikçe ve daha fazla veri elde edildikçe, tıbbi kimya üzerindeki etkilerinin artması muhtemeldir (Karthikeyan ve Priyakumar, 2022).

5.1.1. Transformatör Tabanlı Modeller ve Kemoinformatik

Olası tüm küçük organik molekülleri kapsayan geniş kimyasal alanın 10^{60} 'a kadar benzersiz yapı içerdiği tahmin edilmektedir. Bu o kadar büyük bir sayıdır ki, gözlemlenebilir evrendeki atom sayısını çok küçük yapar (Lipinski ve Hopkins, 2004). Biyolojik sistemleri modüle edebilecek bileşikler aramak için bu alanda gezinmek, biyoloji ve tıptaki en büyük zorluklardan biridir (Lipinski ve Hopkins, 2004). Kemoinformatik, kimyasal alanda gezinmek için araçlar ve yöntemler geliştiren alandır. Moleküllerin yapısını, aktivitesini ve özelliklerini tahmin etmek için hesaplama

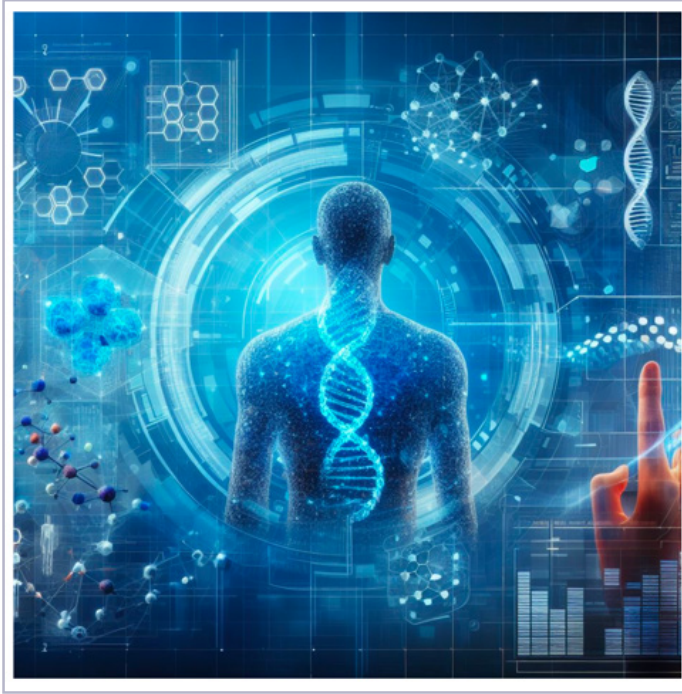
tekniklerini kullanır (Lipinski ve Hopkins, 2004). **Yüksek verimli tarama (HTS)**, özellikle ilaç keşfinde kullanılan bilimsel deneyler için bir yöntemdir. Biyolojik hedeflere karşı aktivite için çok sayıda potansiyel ilaç bileşiğinin test edilmesini içerir (Lipinski ve Hopkins, 2004). **BERT** (Transformatörlerden Çift Yönlü Kodlayıcı Temsilleri) ve **GPT** (Üretken Önceden Eğitilmiş Transformator) gibi transformator tabanlı modellerin ortaya çıkışı, kemoinformatik de dahil olmak üzere birçok alanda devrim yarattı (Wang ve ark., 2022). Bu modeller, ilaç-hedef etkileşimlerini tahmin ederek, yeni ilaç adayları üretmek ve mevcut ilaçları optimize ederek ilaç keşif sürecini önemli ölçüde hızlandırma potansiyeline sahiptir (Wang ve ark., 2022). İlaç keşfinde transformator tabanlı modellerin temel uygulamalarından biri, ilaç-hedef etkileşimlerini tahmin etmektir. Bu modeller, verilerdeki karmaşık kalıpları öğrenebilir ve bir ilacın vücuttaki çeşitli hedeflerle nasıl etkileşime gireceğini tahmin edebilir (Wang ve ark., 2022). Transformator tabanlı modeller, de novo ilaç tasarımı için de kullanılabilir. Böylece, sıfırdan yeni ilaç adayları oluşturmayı mümkün kılar. Modeller, ilaç benzeri bileşiklerin kimyasal dilini öğrenebilir ve istenen özelliklere sahip olması muhtemel yeni bileşikler üretebilir (Wang ve ark., 2022).

6. SONUÇ

Sonuç olarak, bu bölüm bizi, ilaç geliştirmede ilk boru hatlarından klinik öncesi deneylere kadar, ilaç keşfinin karmaşık ve büyüleyici dünyasında bir yolculuğa çıkardı. Bilgisayar tabanlı metodolojilerin hedef tanımlamayı geliştirmede, kurşun bileşiklerini optimize etmede ve geniş kimyasal alanda gezinmede nasıl önemli roller oynadığını araştırıldı (Savage, 2021). “Yeni Bir İlaç Giden Boru Hatları”nda, ilaç keşfi ve geliştirmede yer alan karmaşık süreçler incelendi. Bu süreçlerin doğrusal olmadığı, daha ziyade dikkatli planlama ve yürütme gerektiren birbirine bağlı bir dizi adım olduğu fikrini vurguladı (Savage, 2021). “Yapay Zeka ile Geliştirilmiş Hedef Tanımlama” ve “Hedeften - Öncü Moleküle ve Lider Molekülden - Optimizasyon Adımlarında Veri tabanlarının Rolü” bölümleri, modern ilaç keşfinde makine öğrenimi/yapay zeka ve veri tabanlarının önemini göstermektedir. Karşılaştırma algoritmaları, potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek için büyük miktarda veriyi gözden geçirebilirken, veri tabanları, öncü molekülden lider molekül optimizasyon sürecine rehberlik edebilecek çok sayıda bilgi sağlar (Savage, 2021). “Yapay Zeka Destekli Lider Molekül Optimizasyonu”nda, yapay zeka teknolojilerinin klinik deneylere başarılı bir şekilde girmek için özel olarak tasarlanmış bileşikler nasıl üretebileceği bilgisi sunuldu (Savage, 2021). Yapay zeka, ilaç adayı optimizasyon sürecini kolaylaştırarak ilaç keşfi alanında devrim yaratmaktadır. Yapay zeka, potansiyel ilaç adaylarının özelliklerini tahmin ederek, araştırmacılara yalnızca daha etkili değil, aynı zamanda daha güvenli ilaçlar tasarlamada yardımcı olabilir (Savage, 2021). Büyük miktarda veriyi analiz edebilen ve yardımsız insanların gözden kaçıracağı kalıpları belirleyebilen makine öğrenimi algoritmalarının kullanılmasıyla elde edilebilir. Kimyasal yaklaşımı anlamak, ilaç keşfi alanında oldukça önemlidir (Lipinski ve Hopkins, 2004). Mümkün olan tüm küçük organik molekülleri içeren bu geniş alan, biyolojik sistemleri modüle edebilen bileşikler bulmanın anahtarıdır. Ancak, bu alanda araştırma yapmak, boyutu ve karmaşıklığı nedeniyle karmaşık bir iştir. Bu bölümde sunulan bilgiler gibi gelişmiş yapay zeka modelleri, ilaç keşfinde büyük umut vaat etmektedir. Modeller, ilaç hedeflerini tahmin etmek, yeni ilaç adayları oluşturmak ve karmaşık biyolojik sistemlerdeki etkileşimleri modellemek için sinir ağlarından ve transformator tabanlı süreçlerden yararlanmaktadır. Gelecekte kimyasal alan, yeni bileşiklerin sürekli sentezi ile ilerlemeye ve genişlemeye devam edecektir. Bu genişleme, yeni ilaçlar bulmak için daha fazla fırsat sağlayacak ancak aynı zamanda analiz açısından da zorluklar yaratacaktır. Gelişmiş hesaplama algoritmaları,

genişleyen bu alanı verimli bir şekilde ortaya çıkarmak için çok önemli olacaktır. Bu modeller daha karmaşık hale geldikçe, tahminleri daha doğru ve güvenilir hale gelecektir. Bu iyileştirme, hedef belirlemeden lider molekül optimizasyonuna ve ilaç geliştirmeye kadar yeni bir ilaca giden boru hattının tüm aşamalarında görülecektir (Deng ve ark., 2022). Transformatör tabanlı modeller ve bunların müteakip geliştirmelerinin gelecekteki ilerlemelere yol açması muhtemeldir. Islak laboratuvarlarda, çoklu omik verilerin (genomik, proteomik, metabolomik, vb.) tek hücre ölçeğinde entegrasyonu, biyolojik sistemlere daha bütünsel bir bakış sağlayacaktır. Hastalık mekanizmalarının bu şekilde daha iyi anlaşılması, yeni ilaç hedeflerinin belirlenmesine yardımcı olacak ve daha etkili ve hedefe yönelik tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. Hesaplama algoritmalarındaki ilerlemeler ve kişinin genetik yapısının, çevre ve diğer biyomlarla olan etkileşimlerinin daha iyi anlaşılmasıyla, kişiselleştirilmiş tıba doğru ilerlemenin yolunu açmaktadır (Şekil 3). İlaçların benzersiz biyolojik sistemlerine, genetik ve biyokimyasal yapılarına dayalı olarak bireylere göre uyarlanabileceği, etkinliği artırabileceği ve yan etkileri azaltabileceği mümkün olabilecektir. İlaç keşfi, biyoloji, kimya, bilişim ve diğer birçok bilimi kapsayan çok disiplinli bir alandır. Gelecekte disiplinler arasında daha da entegre ve verimli ilaç keşif boru hatlarına yol açan daha da büyük bir iş birliği gerecektir (Kim ve ark., 2020).

Sonuç olarak, ilaç keşfinin geleceği, ortaya çıkan hesaplama teknolojilerinin entegrasyonu ile umut verici görünmektedir. Bununla birlikte, sürekli araştırma ve yenilik yoluyla ele alınması gereken yeni zorluklar da ortaya çıkarmaktadır. Yeni ilaçlar bulma yolculuğu karmaşık ve oldukça zordur ancak bu gelişmelerle araştırmacıların hedefine ulaşmasına her geçen gün daha da yaklaştırmaktadır.



Şekil 3. Hesaplama algoritmalarını, genetik yapıyı ve çevre ve biyomlarla etkileşimleri temsil eden unsurlarla kişiselleştirilmiş tıp kavramını gösteren fütüristik görüntü. Şekil bir metin isteminden bir yapay zeka modeli (DALL-E) tarafından oluşturulmuştur.

7. KISALTMALAR SÖZLÜĞÜ

ADME: farmakokinetiği ve farmakolojide Absorpsiyon, Dağıtım, Metabolizma ve Boşaltım kelimelerinin kısaltmasıdır. Bunlar, bileşiğin bir ilaç olarak performansını ve farmakolojik aktivitesini büyük ölçüde etkileyen dört kriterdir.

Yapay Zeka (AI): Akıl yürütme, öğrenme ve karar verme gibi normalde insan zekası gerektiren görevleri yerine getirebilen makineler veya sistemler oluşturmakla ilgilenen bilgisayar bilimi dalı.

Dikkat mekanizması: Bir sinir ağının, alaka düzeylerine veya önemlerine bağlı olarak girdi veya çıktı dizilerinin farklı bölümlerine odaklanmasına izin veren bir teknik.

Biyomolekül: Proteinler, nükleik asitler, lipitler veya karbonhidratlar gibi canlı organizmaların yapısında veya işlevinde yer alan molekül.

Kimyasal uzay: Doğal kaynaklardan sentezlenebilen veya izole edilebilen tüm olası küçük organik moleküllerin kümesi.

Klinik araştırma: Genellikle önceden tanımlanmış bir protokol ve düzenlemeleri izleyerek, insan gönüllülerde yeni bir ilacın veya müdahalenin güvenliğini ve etkinliğini test eden araştırma çalışması.

Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD): Moleküler özellikleri, etkileşimleri ve aktiviteleri tahmin etmek gibi yeni ilaçların ayrıştırılmasına ve optimizasyonuna yardımcı olmak için hesaplamalı yöntemlerin ve araçların kullanılması.

Veritabanı: Bilgisayar programları tarafından erişilebilen, manipüle edilebilen ve güncellenebilen düzenli ve yapılandırılmış veriler topluluğu.

İlaç adayı olamama: Bir ilaç adayının, etkinlik eksikliği, güvenlik sorunları veya ticari uygulanabilirlik gibi çeşitli nedenlerden dolayı geliştirme aşamalarında ilerleyememesidir.

İlaç keşfi: Hastalıkları tedavi edebilecek veya önleyebilecek yeni ilaçlar bulma ve geliştirme süreci.

İlaca benzerlik: Bir bileşiğin, çözünürlük, biyoyararlanım, stabilite vb. faktörlere dayalı olarak ne kadar başarılı bir ilaç olabileceğini gösteren özelliği.

Üretken model: Belirli kriterlere uyan yeni ilaç adayları oluşturmak gibi, mevcut verilere dayalı olarak yeni veriler veya örnekler oluşturabilen bir tür makine öğrenimi modeli.

Öncü molekülden-Lider moleküle (Lider moleküle ulaşma): Potansiyel ilaç adaylarının biyolojik aktivitelerine, seçiciliklerine ve güvenlik profillerine göre optimize edildiği ilaç keşfi aşaması.

Bilgi grafiği (KG): Varlıklardan, ilişkilerden ve özniteliklerden oluşan bilginin grafik tabanlı bir gösterimi.

Büyük dil modeli (LLM): Doğal dili işleyebilen ve büyük miktarda veriye dayalı metin oluşturabilen bir tür derin sinir ağı.

Kurşun bileşiği: Bazı arzu edilen biyolojik aktiviteye sahip olan ve bir ilaç adayı olmak için daha da optimize edilebilen kimyasal bir bileşik.

Kurşun optimizasyonu: Potansiyel ilaç adaylarının biyolojik aktivitelerine, seçiciliklerine, güvenliklerine ve ilaca benzerliklerine dayalı olarak geliştirildiği ilaç keşfi aşaması.

Çoklu omik veriler: Genler, proteinler, metabolitler vb. gibi farklı biyolojik organizasyon seviyelerinden gelen bilgileri bütünleştiren veriler.

İhmal edilen tropikal hastalıklar (NTD'ler): Düşük ve orta gelirli ülkelerde bir milyardan fazla insanı etkileyen, genellikle kronik sakatlık ve yoksulluğa neden olan bulaşıcı hastalıklar grubu. Diğer hastalıklara göre daha az kullanımve fon aldıkları için ihmal edilirler.

Sinir ağı: Verilerden öğrenebilen ve karmaşık görevleri yerine getirebilen yapay nöron katmanlarından oluşan bir makine öğrenimi modeli türüdür.

Omik veriler: Genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik vb. gibi farklı biyolojik organizasyon seviyelerinden bilgi toplayan verilerdir.

Kişiselleştirilmiş tıp: Her hastanın genetik yapısı, yaşam tarzı ve çevresi gibi bireysel özelliklerini dikkate alan bir tıp yaklaşımıdır.

KantitatifYapı-Aktivite İlişkisi (QSAR): Değişken olarak moleküler tanımlayıcılar veya özellikler ve bağımlı değişken olarak biyolojik aktivite kullanılarak SAR'ın matematiksel ifadesi.

SMILES: Bir dizi sembol kullanarak bir molekülün yapısını temsil eden bir notasyon sistemi.

Yapı-Aktivite İlişkisi (SAR): Bir bileşiğin veya bir dizi bileşiğin kimyasal yapısı ile biyolojik aktivitesi arasındaki ilişki.

Hedef belirleme: Bir ilacın tasarlanabileceği belirli bir biyolojik hedefin seçildiği çoğu modern ilaç keşif sürecinin ilk adımı.

Hedeften isabete: Potansiyel ilaç adaylarının belirli bir biyolojik hedefle etkileşimlerine dayalı olarak tanımlandığı ilaç keşfi aşaması.

Transformatör tabanlı model: Sözcükler veya moleküller gibi bir girdi dizisinin farklı bölümleri arasındaki ilişkileri öğrenmek için dikkat mekanizmalarını kullanan bir tür derin sinir ağı.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile "Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça" projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ban, T.A. The role of serendipity in drug discovery. *Dialogues Clin Neurosci.* 8, 335-344. (2006)
- Bateman, A., Martin, M.J., Orchard, S., Magrane, M., Ahmad, S., Alpi, E., Bowler-Barnett, E.H., Britto, R., Bye-A-Jee, H., Cukura, A., Denny, P., Dogan, T., Ebenezer, T.G., Fan, J., Garmiri, P., da Costa Gonzales, L.J., Hatton-Ellis, E., Hussein, A., Ignatchenko, A., Insana, G., Ishtiaq, R., Joshi, V., Jyothi, D., Kandasaamy, S., Lock, A., Luciani, A., Lugaric, M., Luo, J., Lussi, Y., MacDougall, A., Madeira, F., Mahmoudy, M., Mishra, A., Moulang, K., Nightingale, A., Pundir, S., Qi, G., Raj, S., Raposo, P., Rice, D.L., Saidi, R., Santos, R., Speretta, E., Stephenson, J., Totoo, P., Turner, E., Tyagi, N., Vasudev, P., Warner, K., Watkins, X., Zaru, R., Zellner, H., Bridge, A.J., Aimo, L., Argoud-Puy, G., Auchincloss, A.H., Axelsen, K.B., Bansal, P., Baratin, D., Batista Neto, T.M., Blatter, M.C., Bolleman, J.T., Boutet, E., Breuza, L., Gil, B.C., Casals-Casas, C., Echioukh, K.C., Coudert, E., Cuhe, B., de Castro, E., Estreicher, A., Famiglietti, M.L., Feuermann, M., Gasteiger, E., Gaudet, P., Gehant, S., Gerritsen, V., Gos, A., Gruaz, N., Hulo, C., Hyka-Nouspikel, N., Jungo, F., Kerhornou, A., Le Mercier, P., Lieberherr, D., Masson, P., Morgat, A., Muthukrishnan, V., Paesano, S., Pedruzzi, I., Pilbout, S., Pourcel, L., Poux, S., Pozzato, M., Pruess, M., Redaschi, N., Rivoire, C., Sigrist, C.J.A., Sonesson, K., Sundaram, S., Wu, C.H., Arighi, C.N., Arminski, L., Chen, C., Chen, Y., Huang, H., Laiho, K., McGarvey, P., Natale, D.A., Ross, K., Vinayaka, C.R., Wang, Q., Wang, Y., Zhang, J. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Res.* 51, 523-531. (2023)
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242. (2000)
- Bleicher, L.S., van Daelen, T., Honeycutt, J.D., Hassan, M., Chandrasekhar, J., Shirley, W., Tsui, V., Schmitz, U. Enhanced utility of AI/ML methods during lead optimization by inclusion of 3D ligand information. *Front Drug Discov.* 2, 1-12. (2022)
- Bolton, E.E., Wang, Y., Thiessen, P.A., Bryant, S.H. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. *Annu Rep Comput Chem.* 4, 217-241. (2008)
- Boolell, M., Allen, M.J., Ballard, S.A., Gepi-Attee, S., Muirhead, G.J., Naylor, A.M., Osterloh, I.H., Gingell, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. *Int J Impot Res.* 8, 47-52. (1996)
- Brown, D.G., Wobst, H.J., Kapoor, A., Kenna, L.A., Southall, N. Clinical development times for innovative drugs, *Nat Rev Drug Discov.* 21, 793-794. (2022)
- Deng, J., Yang, Z., Ojima, I., Samaras, D., Wang, F. Artificial intelligence in drug discovery: Applications and techniques, *Brief Bioinform.* 23, 1-19. (2022)
- Druker, B.J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. *Adv Cancer Res.* 91, 1-30. (2004)
- FDA. Artificial Intelligence and Machine Learning (AI/ML) for Drug Development. U.S.FDA. 167973, 1-31. (2023)
- Fleming, A. THE DISCOVERY of penicillin. *Br Med J.* 4915, 711. (1955)
- Irwin, J.J., Sterling, T., Mysinger, M.M., Bolstad, E.S., Coleman, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology, *J. Chem. Inf. Model.* 52, 1757-1768. (2012)
- Jarada, T.N., Rokne, J.G., Alhaji, R. A review of computational drug repositioning: Strategies, approaches, opportunities, challenges, and directions. *J Cheminform.* 12, 1-23. (2020)
- Kar, S., Leszczynski, J. Databases for Drug Discovery and Development. *Trends Comput. Model. Drug Discov.* 35, 269-298. (2023)
- Karthikeyan, A., Priyakumar, U.D. Artificial intelligence: machine learning for chemical sciences. *J. Chem. Sci.* 134, 1-20. (2022)
- Kim, H., Kim, E., Lee, I., Bae, B., Park, M., Nam, H. Artificial Intelligence in Drug Discovery: A Comprehensive Review of Data-driven and Machine Learning Approaches. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 25, 895-930 (2020).
- Kim, S., Chen, J., Cheng, T., Gindulyte, A., He, J., He, S., Li, Q., Shoemaker, B.A., Thiessen, P.A., Yu, B., Zaslavsky, L., Zhang, J., Bolton, E.E. PubChem 2023 update. *Nucleic Acids Res.* 51, D1373-D1380. (2023)
- Kiriiri, G.K., Njogu, P.M., Mwangi, A.N. Exploring different approaches to improve the success of drug discovery and development projects: a review. *Futur J Pharm Sci.* 6, 1-12. (2020)
- Kolluri, S., Lin, J., Liu, R., Zhang, Y., Zhang, W. Machine Learning and Artificial Intelligence in Pharmaceutical Research and Development: a Review. *AAPS J.* 24, 1-10. (2022)
- Lipinski, C., Hopkins, A. Navigating chemical space for biology and medicine. *Nature.* 432, 855-861. (2004)

- Liu, T., Lin, Y., Wen, X., Jorissen, R.N., Gilson, M.K. BindingDB: A web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. *Nucleic Acids Res.* 35, D198–D201. (2007)
- McKee, S.A., Sane, D.C., Deliaroyis, E.N. Aspirin resistance in cardiovascular disease: A review of prevalence, mechanisms, and clinical significance. *Thromb Haemost.* 88, 711–715. (2002)
- Mendez, D., Gaulton, A., Bento, A.P., Chambers, J., De Veij, M., Félix, E., Magariños, M.P., Mosquera, J.F., Mutowo, P., Nowotka, M., Gordillo-Marañón, M., Hunter, F., Junco, L., Mugumbate, G., Rodriguez-Lopez, M., Atkinson, F., Bosc, N., Radoux, C.J., Segura-Cabrera, A., Hersey, A., Leach, A.R. ChEMBL: Towards direct deposition of bioassay data. *Nucleic Acids Res.* 47, D930–D940. (2019)
- Moffat, J.G., Vincent, F., Lee, J.A., Eder, J., Prunotto, M. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: An industry perspective. *Nat Rev Drug Discov.* 16, 531–543. (2017)
- O’Boyle, N.M., Guha, R., Willighagen, E.L., Adams, S.E., Alvarsson, J., Bradley, J.C., Filippov, I. V., Hanson, R.M., Hanwell, M.D., Hutchison, G.R., James, C.A., Jeliaskova, N., Lang, A.S.I.D., Langner, K.M., Lonie, D.C., Lowe, D.M., Pansanel, J., Pavlov, D., Spjuth, O., Steinbeck, C., Tenderholt, A.L., Theisen, K.J., Murray-Rust, P. Open Data, Open Source and Open Standards in chemistry: The Blue Obelisk five years on. *J Cheminform.* 3, 1–16. (2011)
- Owen, M.R., Doran, E., Halestrap, A.P. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *Biochem J.* 348, 607–614. (2000)
- Pan, J.Z., Razniewski, S., Kalo, J.-C., Singhanian, S., Chen, J., Dietze, S., Jabeen, H., Omeliyanenko, J., Zhang, W., Lissandrini, M., Biswas, R., De Melo, G., Bonifati, A., Vakaj, E., Dragoni, M., Kessler, B., Graux, D., Hogan, A., Horrocks, I., Hotho, A., Kagal, L. Large Language Models and Knowledge Graphs: Opportunities and Challenges. *TGDK.* 1, 1–38. (2023)
- Pan, S., Luo, L., Wang, Y., Chen, C., Wang, J., Wu, X. Unifying Large Language Models and Knowledge Graphs: A Roadmap. *TKDE.* 36, 3580–3599. (2024)
- Patel, L., Shukla, T., Huang, X., Ussery, D.W., Wang, S. Machine Learning Methods in Drug Discovery. *Molecules.* 25, 1–17. (2020)
- Rasul, A., Riaz, A., Sarfraz, I., Khan, S.G., Hussain, G., Zara, R., Sadiqa, A., Bushra, G., Riaz, S., Iqbal, M.J., Hassan, M., Khorsandi, K. Target identification approaches in drug discovery. *Drug Target Select Valid.* 5, 41–59. (2022)
- Rifaioğlu, A.S., Atas, H., Martin, M.J., Cetin-Atalay, R., Atalay, V., Doğan, T. Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: Methods, tools and databases. *Brief Bioinform.* 27, 1878–1912. (2019)
- Savage, N. Tapping into the drug discovery potential of AI. *Biopharma Dealmakers.* 6, B37–B39. (2021)
- Scannell, J.W., Blanckley, A., Boldon, H., Warrington, B. Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat Rev Drug Discov.* 11, 191–200. (2012)
- Seto, B. Rapamycin and mTOR: a serendipitous discovery and implications for breast cancer. *Clin Trans Med.* 1, 29. (2012)
- Vézina, C., Kudelski, A. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 28, 721–726. (1975)
- Wang, Y., Zhao, H., Sciabola, S., Wang, W. cMolGPT: A Conditional Generative Pre-Trained Transformer for Target-Specific De Novo Molecular Generation. *Molecules.* 28, 1–14. (2023)
- Weininger, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. *J Chem Inf Comput Sci.* 28, 31–36. (1988)
- Winkler, D.A. Use of Artificial Intelligence and Machine Learning for Discovery of Drugs for Neglected Tropical Diseases. *Front Chem.* 15, 1–15. (2021)
- Wishart, D.S., Feunang, Y.D., Guo, A.C., Lo, E.J., Marcu, A., Grant, J.R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maclejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., Pon, A., Knox, C., Wilson, M. DrugBank 5.0: A major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Res.* 46, D1074–D1082. (2018)
- Zhou, Y., Zhang, Y., Lian, X., Li, F., Wang, C., Zhu, F., Qiu, Y., Chen, Y. Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents. *Nucleic Acids Res.* 50, D1398–D1407. (2022)



BÖLÜM 3

KLİNİK ÖNCESİ İLAÇ ARAŞTIRMALARI

Ayşe Hale ALKAN¹, Demet CANSARAN DUMAN^{1,*}

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye

aysehaleguckr@gmail.com, dcansaran@yahoo.com

* Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN



Video için
QR kodu okutunuz.



Apoptoz Analizi - 1



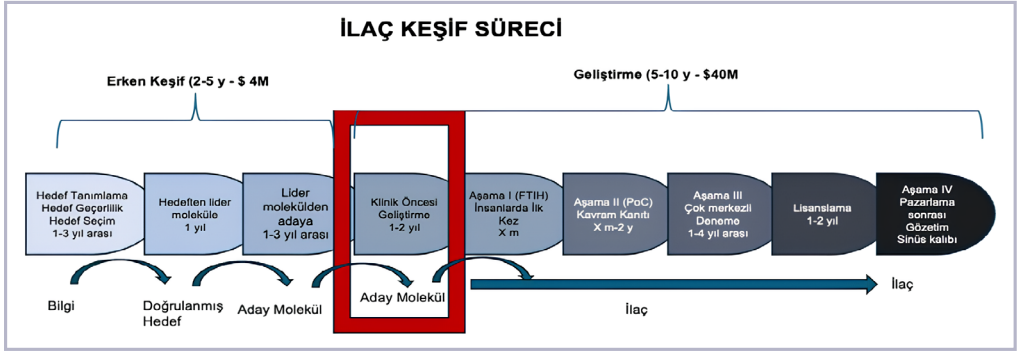
Apoptoz Analizi - 2



Invazyon Deneyi

1. GİRİŞ

Klinik öncesi araştırma, ilaç keşif yolunda insan testi klinik araştırmalardan önce bir ilaç veya hastalık tedavisinin herhangi bir çalışmasını tanımlamak için kullanılan terimdir. Umut verici ilaç adaylarının farmakolojik profilinin tespiti için klinik öncesi çalışmalar yapılır (Şekil 1).



Şekil 1. İlaç keşif sürecinin şematik özeti (Duelen et al., 2019)

Klinik öncesi araştırmalar, ilacın farmakokinetik, farmakodinamik, etkinlik ve toksik etki profilini ortaya çıkarabilir (Biala et al., 2023; Osakwe, 2016). Bilim insanları, bu yöntemi kullanarak neredeyse sınırsız olası ilaç molekül havuzunu klinik testler için bir aday ilaca indirgeyebilirler. Bir ilacın klinik deneylere hazır olup olmadığını belirlemek için etkinlik, toksisite, farmakokinetik ve güvenlik analizleri hakkında ön veriler üreten kapsamlı klinik öncesi araştırmalar gereklidir (Bradley, 2021; Steinmetz and Spack, 2009). İlaç geliştirmenin klinik öncesi aşamalarında, hücreler ve hayvanlar, bir ilacın dozunu, etkinliğini, güvenliğini ve hedef dışı moleküllerle potansiyel etkileşimlerini değerlendirmek için yaygın olarak kullanılır. Bir ilacın kanserojen veya hücre büyümesi ve farklılaşması üzerindeki etkisini belirleyen analizler için ilk adım genellikle genetiği 'karakterize edilmiş hücre kültürleri ile gerçekleştirilen *in vitro* analizlerdir (Biala ve ark., 2023; Bradley, 2021). İlaç analizleri sonucunda güvenlik sorunları veya etkinlik eksikliği nedeniyle moleküllerin yaklaşık %95'i geri çekilir. Sonuç olarak, ilaçların "tezgahtan başucuna" çevrilmesinde bir dengesizlik vardır. Klinik öncesi çalışmaların geliştirilmesi ve iyileştirilmesi, arzu edilen farmakolojik profilleri korurken klinik araştırmalar için moleküllerin optimize edilmesine izin vermelidir (Biala ve ark., 2023; Osakwe, 2016; Steinmetz ve Spack, 2009).

İnsanlar üzerinde test edilen herhangi bir ilacın önce kapsamlı bir klinik öncesi çalışmaya tabi tutulması çok önemlidir. *In vitro* ve *in vivo* analiz sistemlerinin kullanılması, biyolojik aktiviteyi kısıtlayan ve insanlarda kullanılamayan yeni terapötik adaylarla ilgili finansal ve zaman endişelerinin azaltılmasına yardımcı olur. Tedavide kullanılan ilaç adaylarının performansı, güvenliği ve etkinliği hakkında hayati bilgiler sunarlar (Capula ve ark., 2019; National Research Council, 2000). Klinik

araştırmalar, katılımcıları deneme yerlerine seyahat etmeye, diğer olası tedavilerden ve bazen de invaziv prosedürlerden vazgeçmeye ve plasebo alma şansını kabul etmeye zorlar. Klinik öncesi *in vitro* çalışmalar, katılımcıların sahip olduğu bu zorluğu azaltmaya yardımcı olur. Ayrıca *in vivo* farmakokinetik analiz profillerinin belirlenmesinde, *in vitro-in vivo* analiz korelasyonların oluşturulmasında ve daha iyi performans için ilaç formülasyonlarının optimize edilmesinde çok önemli bir rol oynarlar (Huskin ve ark., 2023; Szymański ve ark., 2012; Yadav ve ark., 2021). Ayrıca, *in vitro* ve *in vivo* analiz korelasyonları belirlemek, *in vivo* farmakokinetik profilleri tahmin etmek ve optimal etkinlik için ilaç formülasyonlarını rafine etmek için gereklidirler. İlaç keşfinde klinik öncesi testlerin birincil amacı, yeni bir ilacın güvenliği, etkinliği ve potansiyel toksik etkileri hakkında temel bilgileri toplamaktır. Güvenlik farmakoloji analizleri, ilaç geliştirme için önemli bir parçasıdır. Klinik araştırma prosedürlerini oluşturmak için temel amaç, potansiyel riskleri ve erken toksisite belirteçlerini değerlendirmektir (Capula ve ark., 2019; National Research Council, 2000; Yadav ve ark., 2021). Faz I klinik çalışmalar için başlangıç dozunun belirlenmesi, klinik öncesi farmakoloji çalışmalarının birincil amacıdır. Ayrıca *in vitro* modeller, değişken sonuçları azaltarak daha kontrollü ve standartlaştırılmış bir ortam sağlar. Önemli sayıda molekülün taranmasını sağlayan yüksek verimli tarama testleri (HTS), ilaç keşfi ve geliştirilmesinde zaman kazandırır ve ayrıca *in vitro* modellere uyarlanabilir. Ek olarak, ilaç keşfine değerli anlayışlar sağlayan ilaçların etki mekanizmaları *in vitro* modellerle ortaya çıkarılabilir (Capula ve ark., 2019; Osakwe, 2016; Szymański ve ark., 2012).

Genel olarak, klinik öncesi *in vitro* testler, ilaç adayının performansı, güvenliği ve etkinliği hakkında önemli bilgiler sunarak ilaç geliştirmede önemli bir rol oynamaktadır. İlaç salınım ve biyoyararlanım profiline anlamak, anti-enfektif teknolojileri değerlendirmek, yeni antikanser ajanları taramak ve farklı moleküllerin biyoyoumluluğunu belirlemek için bu testler esastır. Ayrıca *in vivo* farmakokinetik profillerin tahmini, *in vitro-in vivo* korelasyonların kurulması ve ilaç formülasyonlarının performans optimizasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptirler (Capula ve ark., 2019; Huskin ve ark., 2023; Szymański ve ark., 2012).

Gelecek vaat eden ilaç adaylarının erken belirlenmesini destekleme ihtiyacı ve 3R'lere (araştırmalarda hayvanların kullanımını değiştirmek, azaltmak ve iyileştirmek için tasarlanmış bir dizi kılavuz) uyumu gerektiren mevzuat, ilaç endüstrisinin yeni *in vitro* analizler geliştirmeye olan ilgisini artırmıştır (Foglizzo ve ark., 2022; Hu ve Yang, 2023; Jacobsen ve ark., 2023). Son otuz yılda, *in vitro* testlerin miktarında ve kalitesinde sürekli bir büyüme olmuştur. Goh ve ark. 1980 ve 2013 yılları arasında, ilaç şirketleri ve sözleşmeli araştırma kuruluşları tarafından genotoksisite, güvenlik, farmakoloji ve ADME (emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) dahil olmak üzere tüm alanlarda *in vitro* testlerin kullanımında önemli ve artan bir eğilim olduğunu bildirmektedir (Burden ve ark., 2021; Goh ve ark., 2015; Hu ve Yang, 2023). Ayrıca, *in vitro* test kullanımının 2012 yılında yılda 190000'den fazla test ile zirveye ulaştığı bildirilmiştir. ADME, genotoksisite ve güvenlik farmakoloji analizlerinin kullanımının %99'undan fazlasını oluşturmuştur (Goh ve ark., 2015).

2. IN VİTRO KLİNİK ÖNCESİ TESTLERİN TANIMI

Aşağıdaki sunulacak tanımlamaların anlaşılması, birçok farklı alanlardan bilim insanları arasındaki iletişimi kolaylaştıracak ve ilaç geliştirme aşamasında kullanılan verilerin ve tarama mekanizmalarının anlaşılmasını artıracaktır. Bu nedenle, ilaç keşfi için *in vitro* klinik öncesi testler sırasında bazı tanımların bilinmesi gerekir.

2.1. Molekül Erken Tarama Yöntemleri

Yüksek verimli tarama ve *in vitro* tarama yöntemleri, ilaç keşif sürecinin temel bileşenleridir. *In vitro* analizler, araştırmacıların çok sayıda molekülü hızlı ve uygun maliyet ile taramasına olanak tanır. Tarama süreci, ilaç geliştirme sürecinin sonraki aşamalarında daha fazla değerlendirilebilecek umut verici ilaç adaylarının belirlenmesine yardımcı olur (Capula ve ark., 2019; Wei ve ark., 2021). *In vitro* tarama teknikleri sayesinde, yirmi birinci yüzyılın başında her gün yüzlerce ila binlerce molekül hakkında veri üretmek, biyolojik veri toplama süreçlerini önemli ölçüde iyileştirmiştir. 2D hücre kültürü modelleri *in vitro* ilaç tarama analizleri için kabul edilen standart olmaya devam ettiğinden, ilaç keşfinde hücresel tarama analizleri tipik olarak 2D tarama içermektedir. 2D taramanın yanı sıra, 2D hücre tabanlı tarama yaklaşımlarından daha fazla ilaç geliştirme potansiyeli sunan yaklaşım 3D modellerin yakın zamanda geliştirilmesi olmuştur (Cardoso ve ark., 2023; Lage ve ark., 2018; Wei ve ark., 2021).

2.2. Etki mekanizması

Bir ilacın etki mekanizmasını anlamak için *in vitro* araştırmalar ilaç geliştirme sürecinde önemlidir. Araştırmacılar, bir ilacın belirli hücresel bileşenler, reseptörler veya yolaklar ile nasıl etkileşime girdiğini anlamak için *in vitro* analizleri kullanır. Elde edilen bilgi, ilacın terapötik etkilerini optimize etmek için gerekli olan etki mekanizmasını aydınlatmak için çok önemlidir (Capula ve ark., 2019; Chung ve ark., 2004). İlaç etkileşimleri, inhibitör mekanizmalar ve farmasötiklerin metabolik profili *in vitro* araştırmalarla belirlenebilir. Ayrıca bir ilacın moleküler hedefinin belirlenmesine yardımcı olarak ilaç keşfini de desteklerler. Hangi moleküllerin en etkili olduğunu belirlemek için, ilaç adaylarının etki mekanizması araştırmaları, çok çeşitli verimli ve ekonomik metodolojiler kullanılarak *in vitro* olarak gerçekleştirilir (Blass, 2021; Chung ve ark., 2004).

2.3. Farmakokinetik

Bir ilacın dağılımı, metabolizması, atılımı ve emilimi dahil olmak üzere farmakokinetik özellikleri *in vitro* analizler ile değerlendirilir. Analizler, *in vitro* deneylerden *in vivo* analizler ile moleküllerin davranışını belirlemeye yardımcı olduklarından, yeni ilaçların geliştirilmesi için gereklidir (Meibohm ve Derendorf, 2002; L. Zhang ve ark., 2008). Farmakokinetik / Farmakodinamik (PK / PD) modelleme ve simülasyon, ilaç geliştirme sürecinin etkinliğini artırmak ve bir ilacın etkinliği hakkında önceden bilgi alımını mümkün kılıp karar alınmasına yardımcı olmak için kullanılan yenilikçi yöntemlerden biridir. PK / PD modellemesi ve simülasyonu, bireyler arası değişkenlik ve ölçüm belirsizliği dahil olmak üzere bağımsız klirens, güç, biyoyararlanım ve güvenlik ölçümlerini birleştirmek, güvenli ve etkili doz rejimlerini iyileştirmek ve başarı beklentileri açısından çeşitli tedavi algoritmalarını ve deneme tasarımını araştırmak için klinik öncesi ve klinik analizlerde kullanılabilir (Meibohm ve Derendorf, 2002; Suryawanshi ve ark., 2010). Aday moleküllerin ilaç benzeri özelliklerini değerlendirmek için *in vitro* ADME (absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım) ve *in vivo* olarak yürütülen farmakokinetik çalışmalar yapılır. Bu çalışmalar, kullanılan yöntemlerin tutarlılığını ve *in vitro* ve *in vivo* davranış arasındaki korelasyonu belirlemeye yardımcı olur (Meibohm ve Derendorf, 2002; Wang ve ark., 2021; Zhang ve ark., 2008).

2.4. Toksikite Taraması

İlaç geliştirmenin farklı aşamalarında ilaç adaylarının güvenlik profilini değerlendirirken, *in vitro* toksisite taraması esastır. Bir molekülün olası ters etkisini değerlendirmek için, *in vitro* toksisite testi, hücrelerin veya dokuların değişen dozlarda moleküle maruz bırakılmasını gerektirir (Johansson ve ark., 2019; Roggen, 2011). Yeni ilaç adaylarının erken değerlendirilmesi, etki potansiyeli düşük adayları elimine ederek ve güvenli olanları belirleyerek ilaç geliştirme sürecini geliştirebilecek sağlam bir *in vitro* toksisite tarama planının oluşturulmasını gerektirir. Toksikolojik uç noktaların altında yatan fizyolojik mekanizmaların tam olarak kavranması, toksisiteye neden olan başlıca değişkenleri tanımlamayı amaçlayan *in vitro* toksisite testinin temeli olmalıdır (Madorran ve ark., 2020). *In vitro* toksisite modellerinde, özellikle hücresel analizlere dayalı olanlarda devam eden ilerlemeler, bazı engellere rağmen, klinik öncesi ve klinik çalışmalar arasındaki boşluğu kapatmak ve insanlarda ilaç toksisitesi tahmininin doğruluğunu artırmak için umut vermektedir (Johansson ve ark., 2019; Roggen, 2011).

2.5. Seçicilik ve Özgüllük

In vitro analizler, araştırmacıların bir ilacın hedefi için seçiciliğini ve özgüllüğünü değerlendirmelerine olanak tanır. Analizler sonrası elde edilen bilgi, minimum yan etki ile istenen terapötik etkilere sahip ilaçların tasarlanması için kritik öneme sahiptir. Yeni ilaç geliştirme sürecinde, seçicilik, özellikle hücre popülasyonlarını hedefleyen, yan etki olasılığını azaltan ve terapötik etkinlik olasılığını artıran ilaçların üretilmesini mümkün kıldığı için arzu edilen bir nitelik (Currie, 2018; T. Wang ve ark., 2022). Bununla birlikte, özgüllük, bir ilacın hedeflenen terapötik etkiyi üretirken yan etkileri ne kadar iyi en aza indirdiğini açıklar. Örneğin, tam etki özgüllüğüne sahip bir ilaç, tek bir hücre popülasyonu üzerindeki belirli bir etkiyi artırabilir veya azaltabilir ve bu popülasyon, ilacın etkisine diğer yanıt veren sistemlerden daha düşük bir dozajda daha duyarlı olabilir (Mencher ve Wang, 2005; Wang ve ark., 2022).

2.6. Doz-Yanıt İlişkileri

In vitro analizler, doz-yanıt ilişkilerini belirlemek için hücreleri veya dokuları farklı ilaç konsantrasyonlarına maruz bırakır. Maruziyet (doz) ve etki (yanıt) arasındaki ilişkiyi anlamak, klinik öncesi *in vitro* araştırmanın amacıdır. Bu bilgi, çeşitli ilaçların amaçlanan etkilerinin elde edilmesine, ideal terapötik dozun belirlenmesine ve toksisiteye neden olabilecek konsantrasyon aralığının anlaşılmasına yardımcı olur (Currie, 2018; Meibohm and Derendorf, 2002). Doz-yanıt bağlantılarını anlamak, ilaç kombinasyonlarının kantitatif modellemesini ve yolak ağlarına dayalı doz yanıtını kullanmayı gerektirir. Hesaplamalı modelleme, klinik çalışmalardan önce terapötik etkinliği değerlendirmek için yararlı bir yöntemdir ve bir ilacın bir sistem (protein, biyolojik süreç, hücre, doku, organ veya organizma) için etkinliğini tahmin etmede yardımcı olabilir. Özetle, *in vitro* analizler, ilaç geliştirme için kritik olan doz-yanıt ilişkilerini değerlendirmek için oldukça yararlı araçlardır (W. Wang et al., 2021).

2.7. Formülasyon Geliştirme

In vitro analizler, bir ilacın formülasyonunu optimize etmek, stabilite, çözünürlük ve dağıtım sistemleriyle uyumluluğunu sağlamak için önemlidir. Formülasyon geliştirmedeki en büyük sorunlardan biri, ilaç keşfi sırasında ortaya çıkan birçok molekülün zayıf çözünürlüğüdür. İlacın davranışını çeşitli koşullar altında değerlendirerek ve formülasyon geliştirme sırasında ortaya çıkabilecek olası sorunları tespit edilmesi ile *in vitro* çalışmalar bu parametrelerin optimizasyonuna yardımcı olabilir (Dezfooli et al., 2019; Stewart et al., 2016). Hastalara etkili bir şekilde uygulanabilecek bir ilaç geliştirme açısından önemlidir. *In vitro* salım modelleri, ilaç maddesinin potansiyel hızını, taşınmasını ve denge süreçlerini değerlendirmek için de kullanılabilir. Elde edilen sonuç, parenteral depo formülasyonu geliştirme ve kalite kontrol için yararlıdır (Abarca Lachén et al., 2021; Stewart et al., 2016). Ayrıca, yeni formülasyonların, yeni malzemelerin geliştirilmesi ve hızlandırılmış geliştirme sürelerinin tümü, makine öğrenimine yönelik ilaç formülasyonu geliştirme ile mümkün olmaktadır. Bu yöntem, formülasyon geliştirmeye yardımcı olmak için tahmine dayalı modelleme ve veriye dayalı olasılıkları kullanır (Y. Yang et al., 2019).

2.8. Biyobelirteç Tanımlanması

In vitro analizler, ilacın etkinlik veya toksik etkisi ile ilişkili biyobelirteçlerin belirlenmesine yardımcı olabilir. Bir ilacın klinik etkinliği ve hasta güvenliği büyük ölçüde klinik olarak ilgili biyobelirteçlerin tanımlanmasına ve güvenilir değerlendirme tekniklerinin geliştirilmesine dayanır. Biyoinformatik ve doğrulama analizlerini kullanan *in vitro* tarama çalışmaları, biyobelirteç tanımlaması için yüksek verimli bir yöntem olma olanağı sağlar (Gromova et al., 2020; X. Yang et al., 2020). Biyobelirteçler, daha sonraki klinik çalışmalarda gösterge görevi görebilir ve tedavi yanıtının ve güvenliğinin izlenmesini kolaylaştırır. Genomik ve proteomik analiz profillerin oluşturulması, bir ilaç adayı molekül ile uygulama yapılması ve daha sonra ilaç adayı moleküle cevap veren ve doğrulaması yapılan örnek profillerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması, *in vitro* tarama çalışmalarının ilk adımlarıdır (Serelli-Lee et al., 2022; Xicota et al., 2022). Alternatif olarak, genomik profiller, yeterli hücre için *in vitro* etkinlik okumaları ile ilişkilendirilebilir. Klinik çalışmaların tasarımında hastaların seçimi ve ilaçların dozu, yeni keşfedilen biyobelirteçlerden etki profili kararlarının alınmasına örnektir. İlaç geliştirme sürecinde erken biyobelirteç tanımlaması, hastalığın ilerlemesi, ilaç yanıtı, toksik etki ve hedef yollar üzerine etkinliği, biyobelirteç olarak klinikte kullanım potansiyelinin belirlenmesine destek olur (Gromova et al., 2020; Serelli-Lee et al., 2022).

3. IN VITRO KLİNİK ÖNCESİ TESTLER

In vitro klinik öncesi testler, canlı organizmanın dışında, tipik olarak kontrollü bir laboratuvar ortamında gerçekleştirilen deneyleri içerir (Şekil 2).



Şekil 2. *In vitro* klinik öncesi testler.

3.1. Hücre Canlılığı ve Sitotoksosite Analizi

İlaç taraması sıklıkla *in vitro* olarak yetiştirilen hücreler kullanılarak hücre canlılığı ve sitotoksosite deneylerini içerir. Bir ilaç adayının başarısı, klinik öncesi araştırmalar için çok önemli olan *in vitro* sitotoksosite test yöntemlerinden elde edilen verilerin doğruluğuna bağlıdır. Son zamanlarda, bu analizlerin uygulanmasına artan bir ilgi olmuştur. *In vitro* canlılık ve/veya sitotoksosite profilini belirlemek için yapılan analizin hem zaman hem de maliyet açısından ekonomik, hızlı, güvenli ve etkili olmalıdır (Aslantürk, 2018; Terry Riss et al., 2019). Etkileşim türünü belirlemek için doğru test yönteminin seçilmesi esastır. Analiz, molekül etkileşiminin belirlenmesi ile elde edilecek sonuçları değiştirebilir. Bu nedenle, analiz şekli molekülün etki şekli göz önünde bulundurularak seçilmelidir. Hücrelerin sitotoksitesini ve canlılığını belirlemek için yöntemde çeşitli parametreler kullanılır (Adan et al., 2016; Kamiloglu et al., 2020). Bu özellikler arasında hücre zarının bütünlüğü, fizyolojik durum (örneğin, enzim aktivitesi), bozulmamış hücre bölmeleri boyunca elektrokimyasal gradyan ve çoğalma yeteneği yer alır. Canlı hücrelerde bölünen DNA moleküllerini etiketlemek, hücre proliferasyonunu ve dolaylı olarak hücre canlılığını değerlendirmenin farklı bir yoludur (Adan et al., 2016; Aslantürk, 2018; Terry Riss et al., 2019). Akış sitometrisi, kolorimetrik, florometrik, luminometrik ve boyaya dayalı analizler araştırma laboratuvarlarında en yaygın kullanılan hücre canlılığı testleridir. Hücre canlılığı veya sitotoksosite ölçümleri genellikle maruz kalma süresini takiben gerçekleştirilir. Analiz protokolleri arasında farklılıklar vardır. Örneğin, bazılarının ölçülebilir bir sinyal (ATP ölçümü veya LDH salınım analizleri) üretmek için yalnızca birkaç dakikaya ihtiyacı vardır bu durum zaman içinde bir anlık görüntüyü temsil eder; bir diğer yöntem ise inkübasyonun bir sinyal üretmesi için dört saate kadar ihtiyaç duyabilir (örneğin, MTS veya resazurin); ve bazıları, birden fazla zaman noktasında sitotoksik ajanlara yanıt olarak hücre bağlanması, morfolojisi ve büyüme özelliklerindeki değişikliklerin (örneğin, xCELLigence cihazı) gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlar (Adan et al., 2016; Aslantürk, 2018; Engel, 2016; Terry Riss et al., 2019). Hücre ölümü mekanizması, maruz kalma süresi, toksik doz ve toksik etki sağlayan moleküle maruz kalan hücreler gibi bir dizi değişkene bağlı olarak birkaç saat veya gün boyunca reaksiyona girebilir (Aslantürk, 2018; Sun et al., 2020). Bununla birlikte, seçilen analizden bağımsız olarak, hassas ve tekrarlanabilir ölçümler için temel unsurlar şunlardır: (a) tutarlı ve kontrollü bir hücre kaynağı kullanarak deneyler yapmak ve (b) her deneysel model sistemi için reaktif konsantrasyonunu ve inkübasyon süresini uygun şekilde karakterize etmek. Sonuç olarak, analizler, ilaçların veya diğer maddelerin canlı hücreler üzerindeki etkilerine ilişkin uygun veriler sunar ve araştırmacılara bir ilaç adayının klinik deneylerde ilerlemek için yeterince güvenli ve etkili olup olmadığını belirlemede yardımcı olur (Larsson et al., 2020; Terry Riss et al., 2019).

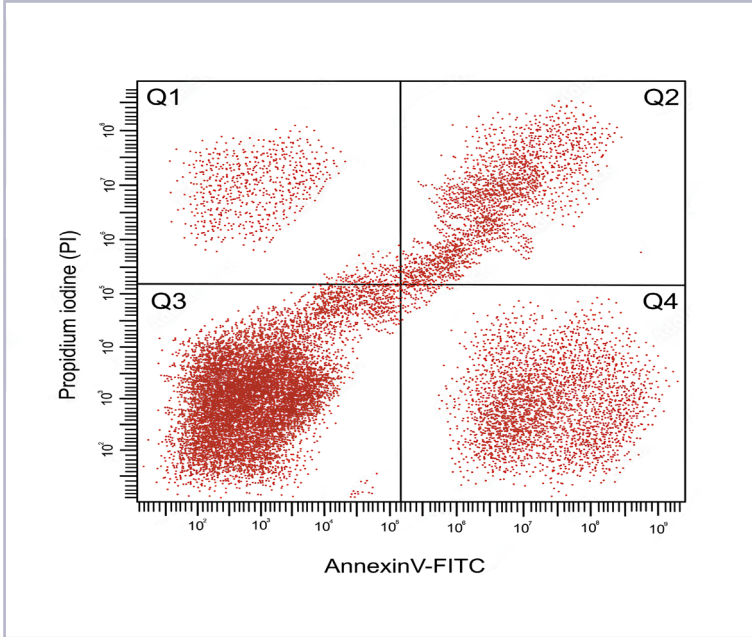
3.2. Hücre Proliferasyon Analizi

Hücre proliferasyon deneyleri, hücre büyümesi ve farklılaşması üzerine araştırmalar için gereklidir ve her molekülün toksik etkisini değerlendirmek için ilaç geliştirmede sıklıkla kullanılır. “Hücre proliferasyonu” terimi, tipik olarak hücre döngüsünün mitotik fazı sırasında hücre büyümesi ve bölünmesinden kaynaklanan hücre sayısındaki artışı ifade eder. Hücre canlılık testleri, hareketsiz ve yaşlanmış olanlar da dahil olmak üzere tüm canlı hücreleri sayarken, hücre proliferasyon testleri, aktif olarak çoğalan bir popülasyondaki hücre sayısını sayar (Romar et al., 2016; Soman et al., 2013). Sadece canlı hücreler çoğalabildiğinden, proliferasyon deneyleri de bir hücrenin canlılığı hakkında bilgi verebilir. Hücre proliferasyonu ve proliferasyon inhibisyonu ölçümleri, ilaç geliştirme ve klinik

değerlendirme için çok önemlidir. Büyüme faktörleri, sitokinler ve sitotoksinler dahil olmak üzere bir dizi hücresele uyaran, hücrelerin çoğalmasını kontrol eder (Martin et al., 2014). Farklı sinyal iletim yolları, ilaç tedavisinin hücrenin proliferatif yanıtını nasıl etkilediğidir. Hücre proliferasyonu için *in vitro* testler ve *in vivo* büyüme testleri, temel araştırmalar ve klinik öncesi ilaç değerlendirme araştırmaları için laboratuvar ortamlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Huyck et al., 2012; Rui et al., 2020). Yeni geliştirilen ilaçların hedef özgüllüğünün doğrulanması için önemli bir araç, moleküler mekanizmalara dayanan hücre proliferasyon testidir. Proliferasyon ölçümleri tipik olarak hücrelerin ortalama DNA içeriğine veya metabolizmasına dayanır (Martin et al., 2014; Soman et al., 2013). Analizler, tek bir hücredeki DNA sentezini ölçebilir veya canlı hücreler de dahil olmak üzere toplam hücre sayısını rapor edebilir. Hücre proliferasyon testlerinin dört ana kategorisi, hücre proliferasyon belirteci, metabolik aktivite, ATP konsantrasyonu ve DNA sentezi testleridir. Özetle, *in vitro* hücre proliferasyonu ve *in vivo* büyüme testleri, temel araştırma ve klinik öncesi ilaç tarama projeleri için laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır (Huyck et al., 2012; Martin et al., 2014; Romar et al., 2016; Rui et al., 2020).

3.3. Apoptoz ve Nekroz Analizi

Nekroz ve apoptoz, birçok klinik öncesi farmasötik ilaç keşfi ve validasyonu sürecinde önemli hücre ölüm tiplerindedir. İlacın uygulama sonrası etkisi, hücre ölümüne neden olma, metabolizmayı engelleme ve büyümeyi önleme kapasitesini içermektedir. Tüm ilaç keşif çalışmaları, öncelikle bir ilacın güvenliğini ve tolere edilebilirliğini belirlemeyi amaçlayan Faz I Klinik araştırmasına yol açan hücre ölümü ve toksisite ile ilgili endişeleri dikkate almalıdır (Maes et al., 2015; Sazonova et al., 2022).



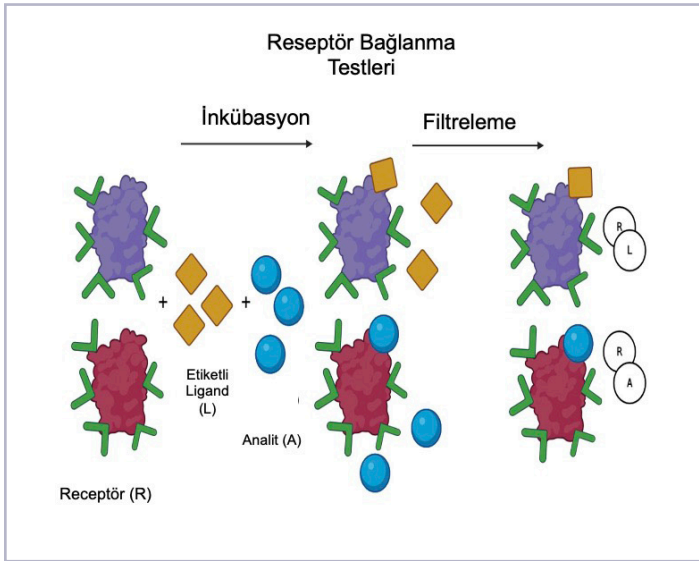
Şekil 3. Annexin V/FITC akış sitometrisi kullanılarak hücre apoptozu/nekroz oranı belirleme

Sitotoksik ilaçlara maruz kalmak, farklı hücre ölümü modellerine yol açabilir. Apoptoz ve nekroz, hücre ölümünün iki ana türüdür (X. M. Hu et al., 2021). Apoptoz, substrattan hücre ayrılması, hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması ve nükleer parçalanma ve son olarak canlı organizmalarda fagositik hücreler tarafından temizlenebilen küçük apoptotik cisimlere hücre parçalanması ile kendini gösteren programlanmış bir hücre ölümü şeklindedir (Lekshmi et al., 2017; Maes et al., 2015). Apoptoza, sitoplazmik ve nükleer substratları hedef alan hücre ölümü efektör proteazlarının (kaspazlar) aktivasyonu, DNA'nın kaspaz ile aktive olan endonükleazlar tarafından nükleozom boyutunda ve daha büyük parçalara bölünmesi ve plazma zarının fosfolipidlerinin fosfatidilserin dışsallaştırması ile modifikasyonu eşlik eder. Bu süreçler, bu tip hücre ölümü için morfolojik belirteçler olarak kabul edilir (Brauchle et al., 2014; Kari et al., 2022; Rieger et al., 2011). Öte yandan nekroz, hücrenin fiziksel yaralanmasından kaynaklanır ve hücre ve mitokondrinin şişmesi, dağınık kromatin yoğunlaşması ve plazma zarı bütünlüğünün kaybı ile karakterizedir. Nekrozu genellikle hücrenin salınan içeriğine enflamatuvar bir yanıt izler ve bu da genellikle dokuda daha fazla hasara yol açar. Apoptoz, kaspaz efektörlerinin aktivasyonuna yol açan bir intrinsik veya mitokondriyal yol ve bir dışsal veya yüzey reseptörü aracılı yol olmak üzere iki yol tarafından indüklenir (Brauchle et al., 2014; Elmore et al., 2016; Sazonova et al., 2022). Apoptoz deneyleri, immünohistolojik testler, kaspaz aktivitesi için biyokimyasal testler ve spesifik apoptotik belirteçleri hedefleyen floresan problemlerin ve boyaların kullanımı dahil olmak üzere *in vitro* apoptozu tespit etmek ve ölçmek için kullanılır. Kaspaz-3'ün aktivasyonu ve hücre yüzeyinde fosfatidilserin varlığı ve ardından hücre zarının tahrip edilmesi, apoptozun belirlenebilir iki parametresidir. Morfolojik ve biyokimyasal işaretlere dayalı olarak apoptozu tespit etmek için membran geçirgenliği/hasar tespit yöntemleri, mitokondriyal hasar/değişiklik tespit yöntemleri, kaspaz aktivite tespit yöntemleri, p53 aktivite tespit yöntemleri ve DNA parçalanma/denatürasyon/yoğunlaşma tespit yöntemleri dahil olmak üzere beş farklı yöntem vardır (Kari et al., 2022; Lekshmi et al., 2017; Rieger et al., 2011). Nekroz analizleri genellikle, propidyum iyodür (PI) ve floresein izotiyosiyanat (FITC) konjuge Annexin V gibi riskli zarlara sahip hücrelere nüfuz edebilen boyaların kullanımını içerir. Nekroz ve apoptozu ayırtmak için en yaygın kullanılan analiz Annexin-V/PI boyama yöntemidir. Apoptotik hücrelerin yüzeyinde fosfatidil serin (PS) açığa çıkararak çalışır, bu daha sonra PS'yi bağlamak için güçlü bir afiniteye sahip floresan konjuge Annexin-V kullanılarak tanımlanır (Bezabeh et al., 2001; Chan et al., 2011; Kepp et al., 2011; Maes et al., 2015; Sazonova et al., 2022) (Şekil 3). Özetle, apoptoz ve nekroz testleri, hücre ölümünün arkasındaki süreçleri anlamak ve ilaçların ve diğer maddelerin hücrelerin canlılığını ve hayatta kalmasını nasıl etkilediğini değerlendirmek için oldukça önemlidir. Gerçekleştirilen analizler ile nekroz ve apoptozu tanımlayarak ve ayırt ederek, belirli ilaçların veya maddelerin hücrelerin gelişimini ve bölünmesini nasıl etkilediğine dair önemli bilgiler elde edilebilir.

3.4. Reseptör Bağlanma Analizi

İlaç keşfi, büyük ölçüde, bir test ajanının bir reseptör hedefindeki seçiciliğinin ve afinitesinin hızlı bir şekilde değerlendirilmesine izin veren reseptör bağlanma testlerine dayanır (Şekil 4). Reseptör bağlanma analizi, bir ilaç adayının bir reseptör hedefindeki seçiciliği ve afinitesi hakkında anlayışlı bilgiler sunarak güvenli ve etkili tedavilerin geliştirilmesine yardımcı olur. Reseptör bağlanma analizi ilk olarak 1970'lerde ortaya çıkarılmıştır (Bylund and Enna, 2018; Weissman et al., 2006; R. Zhang and Xie, 2012). Ligand ve reseptör arasındaki bağlanma etkileşimleri, genellikle kontrollü, *in*

vitro bir ortamda gerçekleştirilen bu analizler kullanılarak araştırılabilir. Bir test ajanının seçiciliğini ve afinitesini bir reseptör hedefinde hızlı bir şekilde değerlendirmeyi mümkün kılar ve ilaç geliştirme için gereken süreyi önemli ölçüde azaltır. Analiz ayrıca, dokulardaki veya hücrelerdeki reseptörün yoğunluğu, ligandların reseptöre içsel afinitesi ve birleşme / ayrışma oranları dahil olmak üzere reseptör ve ligandları arasındaki etkileşimin özelliklerini tanımlamak için kullanılır. Ligand tipik olarak ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, vb. gibi bir radyoaktif izotop ile etiketlenir ancak bir floresan parçası da diğer seçenektir (Kato, 1980; Ma et al., 2018). Reseptörün lokalizasyonu, homojenize dokuda ve ayrıca reseptörü endojen olarak ifade eden veya klonlanmış bir reseptör geni ile transfekte edilen kültürlenmiş hücrelerde meydana gelebilir. Amaçlanan reseptör için bol miktarda bağlı bir ligand etiketlenir ve doku örnekleri ile tedavi edilir. Doku bağlanmasını takiben, etiketli ligand toplanır ve çeşitli yöntemler kullanılarak tespit edilir (Auld et al., 2004; Bylund and Enna, 2018). Radyoaktif ligandlar için bu yöntemler arasında sintilasyon yakınlık analizi ve otoradyografi; floresan ligandlar için, zamana bağlı floresan rezonans enerji transferi (TR-FRET) veya güçlendirilmiş ışıldayan yakınlık homojen testi (AlphaScreen); kemoluminesan veya floresan problemlerle etiketlenmiş ligandlar için bu yöntemler kullanılır. Bu yöntemler ya *ex vivo* ya da *in vitro* olarak kullanılır. Pozitron emisyon tomografisi (PET) ve tek foton emisyon bilgisayarlı tomografi (SPECT) görüntüleme, *in vivo* reseptör bağlanmasını incelemek için kullanılabilir (Kato, 1980; Leysen et al., 2015; Weissman et al., 2006). Bağlanma analizleri için deneysel protokol genellikle aşağıdaki aşamaları içerir: bir membran fraksiyonu gibi reseptörü içeren biyolojik bir numunenin hazırlanması, uygun şekilde etiketlenmiş bir ligandın seçimi, reseptör preparatının etiketli ligandın seçilmiş konsantrasyonları ile inkübasyonu ve son olarak bağlı ve serbest ligand konsantrasyonunun ölçülmesi (Auld et al., 2004; Bylund and Enna, 2018). Reseptör bağlayıcı deneyler yaklaşık 40 yıldır ana tarama yöntemi olarak kullanılmıştır ve bu süre zarfında, araştırma araçları olarak farmasötiklerden daha fazla yeni ligand üretmişlerdir. Özetle, reseptör bağlanma deneyleri, ilaç keşif sürecinde çok önemli bir araçtır çünkü bir ilaç adayının bir reseptör hedefindeki afinitesi ve seçiciliği hakkında önemli bilgiler sunarlar ve bu da güvenli ve verimli tedavilerin oluşturulmasına yardımcı olur (Bylund and Enna, 2018; Kato, 1980).



Şekil 4. İlaç seçiciliğini ve afinitesini test etmek için reseptör bağlanma analizleri (De Jong et al., 2005)

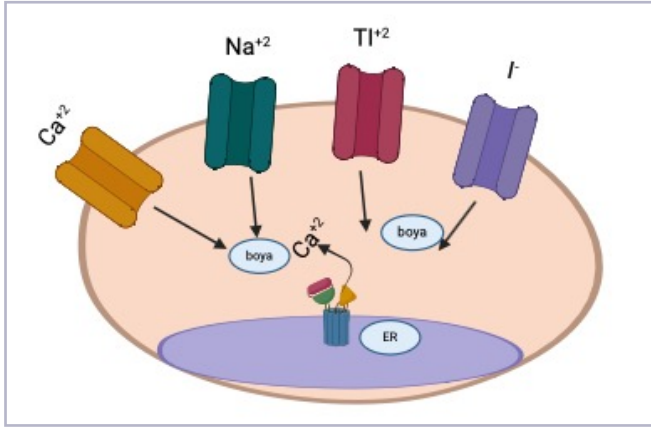
3.5. Enzim İnhibisyon Analizi

Bir ilacın ilaç metabolize edici enzimleri bloke etme yeteneğinin ölçülmesi ve insan hastalıklarını önlemek ve tedavi etmek için etki mekanizmalarının anlaşılması, enzim inhibisyon analizlerini ilaç araştırmalarında değerli bir araç haline getirir. Enzim inhibisyon deneyleri, küçük molekül kütüphanelerini taramak için birincil veya doğrulayıcı teknikler olarak kullanılabilir. Bir ilacın belirli enzimleri inhibe etme kapasitesini değerlendirerek, gelecekteki ilaçlar için iyi hedefler bulmak için kullanılırlar. Ayrıca hastalığın arkasındaki mekanizmalar hakkındaki bilgimizi de geliştirirler (Auld et al., 2004). Bir aktif bileşenin işlev görmesi için en uygun yolu belirlemeyi mümkün kıldıkları için ilaç taraması için çok önemlidirler. Analizler, ilaç adayının enzimleri doğrudan inhibe etme yeteneğini değerlendirmek ve ilacın spesifik enzimler tarafından bozunmasını belirlemek için kullanılır. Bir ilacın etki mekanizmasını bulmak, onu belirli bir enzimin inhibitörü olarak değerlendirmenin temel amacıdır çünkü ilaç keşif ve geliştirmenin erken aşamalarında önemlidir (Geronikaki, 2021; D. Iqbal et al., 2021; Shoaib et al., 2015). Erken ilaç keşfi ve geliştirilmesinde, hedef enzimin etki mekanizmasını (MOA) anlamak kritik öneme sahiptir. Enzim inhibisyon deneyleri, uygulanabilirlikleri nedeniyle çok fazla gelişme konusu olmuştur. Bu yöntemler genellikle, enzim, substrat ve inhibitörün reaksiyon kuyucuklarında karıştırıldığı, reaksiyonlara izin verildiği ve enzim aktivitesinin bir ölçüsü olarak substrat tüketiminin veya ürün oluşumunun ölçüldüğü kuyu dizilerine veya mikrotitre plakalarına dayanır (A. Chen et al., 2014; Dudda and Kuerzel, 2013; Holdgate et al., 2018). Bununla birlikte, mevcut tekniklerin çoğu, inhibitör dozlarının seyreltilmesine ve enzim aktivitesinin ayrı reaksiyon odalarında sırayla ölçülmesine ihtiyaç duyar, bu da yüksek verimli uygulamalar için uygunluklarını kısıtlar. Enzim inhibisyon deneyleri, potansiyel adayları taramak ve toksisiteyi değerlendirmek için ilaç keşfinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Sitokrom P450 (CYP'ler) enzim sınıfının inhibisyonunun izlenmesi, bir ilaç adayının güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için kullanılan yaygın bir klinik öncesi toksisite tarama tekniğidir (Dmitriev et al., 2019; Geronikaki, 2021). CYP'lerin bir ilaç tarafından *in vitro* olarak baskılanması, bu enzimler ilaç biyoyararlanımının belirlenmesinde önemli bir rol oynadığından, *in vivo* olarak olumsuz ilaç etkileşimleri üretme potansiyeline işaret edebilir. Ayrıca, hastalıkta rol oynayan belirli hedef enzimleri bloke eden terapötik adaylar, enzim inhibisyon deneyleri kullanılarak bulunur (A. Chen et al., 2014; D. Iqbal et al., 2021; Shoaib et al., 2015). Bu ilaçlar günümüzde monoamin oksidaz inhibitörleri ve HIV proteaz inhibitörlerini içermektedir. Özetle, enzim inhibisyon analizleri, ilaçlar için olası hedeflerin belirlenmesine yardımcı oldukları, özel tedaviye izin verdikleri ve biyolojik süreçlere ışık tuttıkları için ilaç keşfi için yararlı araçlardır. Analizler, güvenli ve etkili tedavi yöntemleri geliştirmenin yanı sıra ilacın etki mekanizmasını anlamak için oldukça önemlidir (A. Chen et al., 2014; Dmitriev et al., 2019; Geronikaki, 2021; Shoaib et al., 2015).

3.6. İyon Kanalı Analizleri

İyon kanalı analizleri, bir ilacın iyon kanallarını değiştirme potansiyelinin değerlendirilmesine izin verdiği için ilaç keşif süreci için gereklidir (Şekil 5). İyon kanalları birçok temel fizyolojik süreçte anahtar rol oynar ve birçok insan hastalığına işlev bozuklukları neden olur. Bu nedenle, iyon kanalları, *in vitro* farmakolojik profillemeye için önemli bir hedef dışı sınıfın yanı sıra umut verici terapötik hedeflerin bir sınıfını oluşturur (Dunlop et al., 2008; Kaczorowski et al., 2008). Yüksek verimli iyon kanalı taraması, otomatik elektrofizyoloji, biyokimyasal sensörler ve plaka okuyuculardaki mevcut gelişmelerle mümkün olmuştur. İyon kanalları elektrofizyolojik ve elektrofizyolojik olmayan olarak iki farklı yaklaşım kullanılarak incelenir. Kalsiyum mobilizasyon testi, oosit bazlı iki elektrotlu voltaj kelepçesi ve manuel ve otomatik yama kelepçesi gibi elektrofizyolojik teknikler

kullanılarak yüksek verimli iyon kanalı taraması elde edilebilir. Elektrofizyolojik olmayan teknikler arasında ligand bağlama deneyleri, akı bazlı testler ve floresan bazlı testler bulunur (Duan et al., 2021; Enkvetchakul et al., 2004; Yu et al., 2016). Küçük molekül kütüphanelerinde genellikle nadir görülen izlenebilir lider molekül yapılarını bulmak için yeni fonksiyonel yüksek verimli tarama (HTS) tekniklerinin geliştirilmesi de umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Yüksek yoğunluklu formatlı plaka okuyucular, otomatik hücre bazlı HTS testlerinde hücre içi kalsiyum veya membran potansiyelindeki değişiklikleri izlemek için kullanılabilir (Dunlop et al., 2008; Holloway, 1973; Su et al., 2016; S. Wang et al., 2019; Yu et al., 2016). Floresan teknikleri, çok çeşitli iyon kanalı tipleri için uyarlanabilir. İkincil ekranlar, kanal düzeyinde isabet aktivitesini doğrulamak, iyon kanalı arasında seçiciliği değerlendirmek ve etki mekanizmalarını aydınlatmak için kullanılabilen yeni otomatik yama kelepçesi teknolojileri tarafından sunulmaktadır. Elektrofizyolojik teknikler, kanal geçitini ve iyon geçirgenliğini yöneten mekanizmaları tanımlamak için en etkili olanlardır ve yıkama çözeltisinin bileşiminde ve membran potansiyelinde hızlı ayarlamaların yanı sıra iyon akışının doğrudan izlenmesini sağlarlar (Holloway, 1973; Kaczorowski et al., 2008; Yu et al., 2016). Bu nedenle, iyon kanalı ilaç keşfi ve analiz geliştirmenin erken aşamaları, kanal geçitini yöneten parametreleri tanımlamak ve iyon seçiciliğini belirlemek için sıklıkla geleneksel voltaj kelepçesi yöntemlerini kullanır. Daha sonra, daha az esneklik, kontrol ve çözünürlük pahasına daha iyi verim sağlayan daha yüksek yoğunluklu formatlardaki analizler bu bilgiler kullanılarak tasarlanabilir. Geleneksel ilaç geliştirme yöntemleriyle birleştirildiğinde, analizler iyon kanalı terapötik adaylarının potansiyelini belirleme ve en üst düzeye çıkarma şansı sunar (Dunlop et al., 2008; Kaczorowski et al., 2008; McManus et al., 2012; Su et al., 2016; Yu et al., 2016). Özetle, iyon kanalı analizleri, ilaç adaylarının iyon kanallarını nasıl değiştirdiği hakkında önemli bilgiler sundukları için ilaç keşif sürecinde çok önemli bir araçtır ve bu da sonunda güvenli ve etkili tedavilerin oluşturulmasına yardımcı olur.

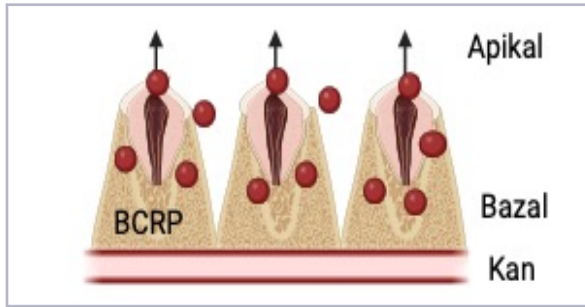


Şekil 5. Bir ilacın iyon kanallarını değiştirme potansiyelinin değerlendirilmesine izin veren iyon kanalı testleri (McManus et al., 2012)

3.7. Taşıyıcı Analizleri

Potansiyel tedavilerin taşıyıcılarla nasıl etkileşime girdiği hakkında önemli bilgiler sağlayan *in vitro* taşıyıcı analizler, yeni ilaçların geliştirilmesinde temel araçlardır (Şekil 6). İlaç geçirgenliği, hücre zarları yoluyla ilaç taşınmasında, kan beyin bariyeri (BBB) penetrasyonunda ve oral emilimde çok

önemli bir rol oynar. Hem pasif geçirgenlik hem de ilacın aktif akış veya ilaç taşıyıcı proteinler tarafından absorpsiyon eğilimi, bir ilacın bir zar boyunca geçirgenliğini belirler (Giacomini et al., 2010; Volpe, 2016). İlaç taşıyıcıları olarak adlandırılan transmembran proteinler, kimyasalların hücrelere girip çıkmasına yardımcı olur ve ilaç emilimi, dağıtımı ve atılımı için önemlidir. Genel olarak, substrat ve inhibitör özgülükleri geniştir ve örtüşür. Bazı substratların ve inhibitörlerin bulunması zordur. Bu nedenle, ilaç geliştirme sürecindeki önemli bir adım, taşıyıcı protein kaynağı olarak heterolog ekspresyon sistemlerinden yararlanan *in vitro* tekniklerin kullanılmasını içerir (Giacomini et al., 2010; Jani and Krajcsi, 2014). İlaç taşıyıcı proteinler farmakolojik bariyer dokulara bağlanır ve birçok ilacın ADME özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Uygun bir hücre modeli mevcutsa, farmakolojik engeller gibi daha karmaşık yapıları temsil etmek için *in vitro* yöntemler de kullanılabilir. İlaç taşıyıcıları için optimize edilmiş *in vitro* analizler, moleküler düzeyde etkileşimlerin belirlenmesinin yanı sıra sistem düzeyinde bariyer penetrasyonu ve farmakokinetiğin belirlenmesi için rutin araçlar haline gelmiştir (Brouwer et al., 2013; Volpe, 2016). Bu nedenle, hem moleküler düzeyde bireysel etkileşimleri karakterize etmede hem de doku düzeyindeki olaylara ilişkin içgörü sağlamada, yani model bağırsak emilimini sağlamada, *in vitro* araçlar güçlü olabilir. Bu araçlar, farmakokinetik modelleme tek moleküllü etkileşimlerin tanımlanması ve sistemik ilaç taşıma olaylarının tahmin edilmesi için gerekli olmaya devam edecektir. Membran bazlı analizler, hücre bazlı sistemler ve alım-akış analizleri dahil olmak üzere, her biri benzersiz avantajlar ve uygulamalar sunan farklı taşıyıcı analiz türleri vardır (Giacomini et al., 2010; Volpe, 2016). İlaç taşınması, akış taşıyıcılarının konumunu kullanan membran bazlı testler ve fonksiyonel taşıyıcı analizler ile hücre zarı boyunca ilaç geçişini değerlendiren hücre bazlı teknikler kullanılarak ölçülebilir. Akış taşıyıcı analizleri, ATP bağlayıcı kaset (ABC) taşıyıcı ailelerini potansiyel ilaç-ilaç etkileşimleri açısından değerlendirirken, alım taşıyıcı analizleri, ilaç adayı substrat olarak kullanıldığında çözünen taşıyıcı (SLC) taşıyıcı ailelerini değerlendirir (Brouwer et al., 2013; Giacomini et al., 2010; Kaczorowski et al., 2008). Bu analizler, ilaç adaylarının ilaç taşıyıcıları ile etkileşimlerini ve bunların substrat ve inhibisyon potansiyellerini değerlendirmek için kullanılır. Özetle, *in vitro* taşıyıcı testleri, ilaç emilimi, dağıtımı ve atılımı bilgisine yardımcı olur ve sonuçta ilaç adaylarının taşıyıcılarla etkileşimlerine ilişkin içgörüler sunarak güvenli ve etkili tedavilerin oluşturulmasına katkıda bulunur (Brouwer et al., 2013; Volpe, 2016).

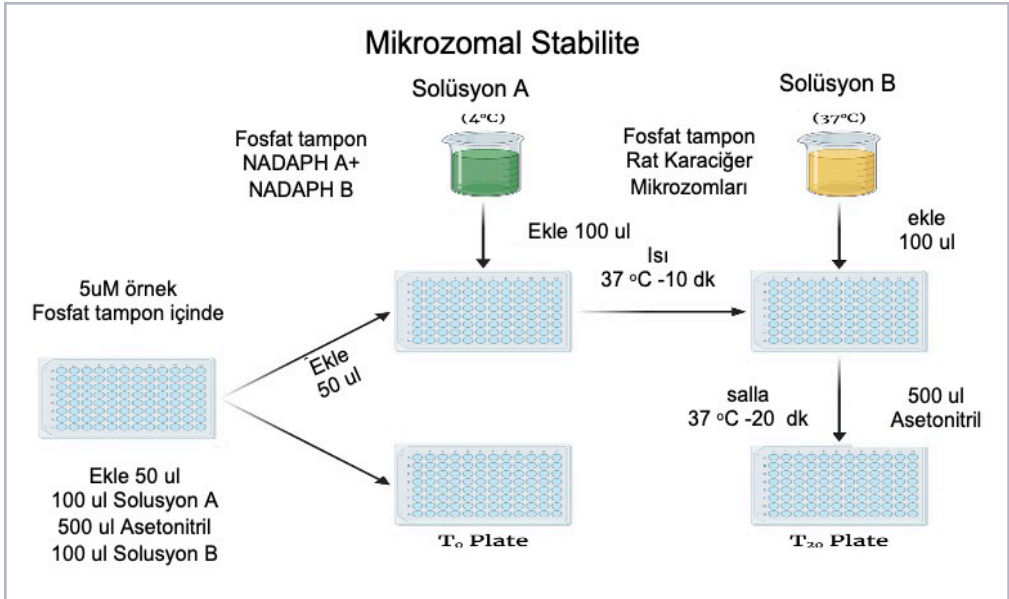


Şekil 6. Potansiyel tedavilerin taşıyıcılarla nasıl etkileşime girdiği hakkında önemli bilgiler sağlayan *in vitro* taşıyıcı analizler (2023 ReadyCell, 2023)

3.8. Metabolizma Analizleri

Belirli bir ilacın olası metabolitlerinin tanımlanması, karakterizasyonu ve miktarının belirlenmesi yoluyla, *in vitro* metabolizma çalışmaları, ilaç geliştirme sırasında ilacın metabolik yolunun

belirlenmesinde önemli ölçüde katkıda bulunur. İlaçlar, zararlı metabolitler haline gelmek veya inaktif formlardan aktif formlara geçmek için metabolizmaya uğrayabilir (Kumar and Surapaneni, 2001; Z. Zhang and Tang, 2018). Bu nedenle, yeni bir ilacın varlığının metabolizmasını anlamak oldukça önemlidir ve ilaç geliştirme ve keşif çalışmalarında çok önemli bir optimizasyon parametresidir (D. Zhang et al., 2012). Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), 2016 yılında ilaç metabolitlerinin klinik olmayan türlerdeki toksisitesinin ve bunların güvenliğinin değerlendirilmesini yöneten düzenlemeler yayınladı. İlaç metabolitlerinin tanımlanması ve karakterize edilmesi için bir öneri de bu kılavuzlarda yer almaktadır (Luffer-Atlas and Atrakchi, 2017; Services, 2008). *In vitro* ilaç metabolizması çalışmaları, insan metabolik profilini belirlemek için insan karaciğer mikrozomlarını (HLM), insan hepatositlerini (taze veya kriyoprezervasyon) ve sitokrom P450 enzimlerinin (süperzomlar) rekombinant ifadesini kullanırken, *in vivo* klinik metabolizma çalışmaları, metabolitlerin tanımlanması için serum, idrar, dışkı ve saç gibi biyolojik matrisleri tarar (Jia and Liu, 2007; Yengi et al., 2007; D. Zhang et al., 2012; Z. Zhang and Tang, 2018). İçsel klirensi belirlemek için, bir test maddesinin hepatosit veya mikrozomal inkübasyonlarda zamanla kaybolma hızı, metabolik stabilite deneyleri kullanılarak ölçülebilir. Hepatosit testleri, test ilacının tüm hücrel metabolizmasını (faz I ve faz II enzim yolları) daha geniş bir şekilde değerlendirirken, mikrozomal testler ağırlıklı olarak sitokrom P450 sistemi (faz I enzimleri) ile metabolizmayı değerlendirir (Kumar and Surapaneni, 2001; Z. Zhang and Tang, 2018) (Şekil 7). Bu araştırmalar, klirensin metabolik yollarını anlamak ve bir ilacın metabolizmasında önemli bir rol oynayan enzimleri belirlemek için kritik öneme sahiptir. İçsel klirensi belirlemek için, bir test maddesinin hepatosit veya mikrozomal inkübasyonlarda zamanla kaybolma hızı, metabolik stabilite deneyleri kullanılarak ölçülebilir. İlacın metabolik klirensini belirleme, metabolik stabilite dozaj ve uygulama sıklığının belirlenmesine yardımcı olur (Geldof et al., 2016; Jia and Liu, 2007; Yuan et al., 2022). Sonuç olarak, *in vitro* ilaç metabolizması çalışmaları, terapötik adayların metabolizması hakkında önemli bilgiler sunar ve ilaç keşfi ve geliştirilmesinde hayati bir araçtır. Bu çalışmalar verimli ve ekonomiktir ve ilaç metabolitlerini karakterize etmek için yeterli bir tarama yöntemi sağlar, bu da sonunda güvenli ve etkili tedavilerin keşfedilmesine yardımcı olur (Jia and Liu, 2007; Z. Zhang and Tang, 2018).



Şekil 7. Metabolik Stabilite Testi prosedürünün akış şeması (Shave and Alden, 2023)

3.9. İnflamatuvar Yanıt Analizi

İlaçların immün ve inflamatuvar sistemler üzerindeki etkileri, inflamatuvar yanıt testleri kullanılarak *in vitro* klinik öncesi çalışmalar değerlendirilmelidir. İnflamatuvar yanıt analizi, ilaç adaylarının olası pro- veya anti-inflamatuvar özellikleri hakkında önemli bilgiler sunar. Bu testler, *in vivo* kabul edilebilirliğin klinik öncesi göstergelerini verebilir ve ilaçların pro- ve anti-inflamatuvar sitokinler gibi farklı inflamatuvar belirteçler üzerindeki etkilerini değerlendirmek için kullanılır. Yeni materyallere veya ilaç adaylarına maruz kalan bağışıklık hücreleri tarafından üretilen büyüme faktörlerinin, kemokinlerin ve inflamatuvar sitokinlerin ölçümü, testlerin bir parçasını oluşturur. İnflamatuvar yanıtı kontrol eden önemli bir transkripsiyon faktörü, nükleer faktör kappa B'dir (NF- κ B) (Dorrington and Fraser, 2019; Lock et al., 2019).

TNF- α , IL-1 β ve IL-1 α gibi proinflamatuvar sitokinler de dahil olmak üzere çok sayıda uyarıcı, inflamatuvar yanıtı aktive edebilir. Bu nedenle, bu testlerde IL-1 β , TNF- α ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinler sıklıkla ölçülür. Sitokin salınım testi (CRA), bir antijenin veya kimyasalın insan hücrelerini kullanarak bağışıklık hücrelerinden önemli miktarda sitokin salınımına neden olma olasılığını değerlendiren bir *in vitro* testtir. İlaç geliştirme sürecinde, düzenleyici kılavuzlar, terapötik moleküllere yanıt olarak sitokin salınımının değerlendirilmesini önermektedir (Lock et al., 2019; Pacienza et al., 2019). Analizler, bağışıklık hücrelerinin, ilaçlar veya alışılmadık materyaller de dahil olmak üzere uyarıcılara tepki olarak saldırdığı sitokin miktarlarını ölçer. Sonuçlar, hem olumlu hem de olumsuz, belirlenmiş etki biçimlerine sahip tıbbi maddelerle doğrudan karşılaştırılır. Süpernatant bölümü, molekülün inkübasyonunu takiben toplanır ve korunur. İnsan sitokin dizisi multiplaks teknolojisi, tüm test formatları için sık incelenen sitokinleri (IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ ve TNF α) analiz etmek için kullanılır (Pacienza et al., 2019; Pérez-Salas et al., 2023). CRA'ları kullanmak, aday peptit sunan hücreler tarafından uyarılan T hücrelerinin aktive olup olmadığını değerlendirmenin hızlı ve basit bir yoludur. Mutant virüs suşlarına ve sitokin salınım sendromuna (CRS) karşı savunmasız kişilerde sitokin fırtınası olasılığını tahmin etmek için de kullanılabilirler. Tüm CRA'ların hafif ve orta derecede sitokin salınımı arasında ayırım yapamayacağını ve değerlendirilen antikor türlerinin CRA'ların ne kadar doğru olduğunu etkilediğini hatırlamak çok önemlidir (Pacienza et al., 2019; Pérez-Salas et al., 2023; Vessillier et al., 2015). Sonuç olarak, inflamatuvar yanıt testleri, ilaçların bağışıklık sistemi ve inflamatuvar süreçler üzerindeki etkileri hakkında değerli veriler sundukları için ilaç geliştirme sürecinde önemli araçlardır. Antiinflamatuvar ilaçların geliştirilmesi, immünomodülatör etkilerinin anlaşılması, güvenliliğin değerlendirilmesi ve klinik kullanım için ilaç adaylarının iyileştirilmesi bu bilgilere bağlıdır (Lock et al., 2019; Pacienza et al., 2019).

3.10. Hücre Sinyal Yolu Analizi

Hücre sinyal yolu analizi, ilaç geliştirme sürecinin son on yılında klinik öncesi testlerin temel haline gelmiştir. Sonuç olarak, hedef tanımlama, etki mekanizmasının belirlenmesi, lider molekül optimizasyonu, biyobelirteç keşfi, güvenlik değerlendirmesi ve mevzuata uygunluk için önemli bilgiler sunarak ilaç geliştirme programlarının genel başarısına katkıda bulunur (Kabir et al., 2018; Wu et al., 2022). İlaç keşfi için yolak analizinin yararlılığı, hastalıklar ve sinyal yolları arasındaki bağlantı ile önerilmektedir. Bir sinyal sistemindeki zayıf noktaları bulmak, bu yoldaki anormallikleri düzeltmek için farmakolojik uygulamalar oluşturmaya yardımcı olabilir. Hedeflenen hücre sinyalinden elde edilen okumalar hem lider molekül tanımlama ve değerlendirme hem de

hedef tanımlama ve doğrulama için kullanılabilirdiğinden bu yöntemin sonuçlarının izlenmesi ilaç keşif sürecinde çok önemli hale gelir (Kabir et al., 2018; Westwick and Lamerdin, 2011). Sinyal yolu aktivitelerinin hücresel değerlendirmeleri, terapötik adayların iyileştirilmesi ve etki mekanizmalarının kapsamlı analizi için de gereklidir. Sinyal algılama tekniklerinin seçilmesi, ilaç keşfi sırasında süreç için çok önemli hale gelir. Hücre sinyal yollarını hedefleyen teknolojiler, doğru analiz verimine, otomasyon yeteneklerine, hassasiyete, sağlamlığa ve satın alınabilirliğe sahip olmalıdır (Abhyankar et al., 2018; Westwick and Lamerdin, 2011). Teknik zorluk, her rota okuması için en iyi analiz koşullarının belirlenmesinde ve ölçümlerin tekrarlanmasında olabilmektedir. Geçtiğimiz birkaç yıl boyunca, araştırmacılar, kanser sinyal yollarının her önemli olayı için hücresel analizleri iyileştirmek için yenilikçi teknolojilerin kullanıldığı hücre sinyal yollarının panellerini oluşturmaya başladılar (Abhyankar et al., 2018; Schweizer and Zhang, 2013). İlaç geliştirmede, hücre sinyal yollarını analiz etmek için immüno-presipitasyon, kinaz aktivite deneyleri, western blot, yüksek içerikli tarama (HCS) teknikleri ve proteomik analitik analizler dahil üzere çeşitli teknikler kullanır. Yüksek içerikli tarama (HCS) ve yüksek verimli akış sitometrisi (HTFC) gibi hücresel biyoloji teknolojisindeki gelişmeler, sinyalin western blot analizinden veya diğer düşük verimli analiz formatlarından daha kapsamlı şekillerde okunmasını mümkün kılmıştır (Abhyankar et al., 2018; Kabir et al., 2018; Westwick and Lamerdin, 2011; Wu et al., 2022). Özetle, ilaçların belirli hücresel yollar ve sinyal ağları ile nasıl etkileşime girdiğini anlamak, *in vitro* klinik öncesi çalışmalarda hücre sinyal yollarının araştırılmasına bağlıdır. Bir ilacın etkilerinin altında yatan moleküler süreçler hakkında kapsamlı bilgiler sunan analizler ilaç gelişimine yardımcı olmaktadır (Abhyankar et al., 2018; Kabir et al., 2018; Wu et al., 2022).

3.11. Hücre Göçü ve Invazyon Analizleri

Tümör hücrelerinin moleküler yolları ve göç, adezyon ve invazyon özelliklerini anlamak, kanser tanısı, prognozu, ilaç geliştirme ve tedavisinde yenilikçi klinik yaklaşımlar geliştirmek için gerekmektedir. Kanser hücre hatlarında *in vitro* migrasyon ve invazyon süreçlerinin hızlandırılmış mikroskopi ölçümü, yeni moleküler metastatik yolların ve yeni terapötik antikanser ilaçlarının araştırılmasında önemli bir araç olabilir (Pijuan et al., 2019; Stoellinger and Alexanian, 2022). Hücre göçü ve istila deneyleri, bir hücrenin kemoatraktanlar veya olası ilaçlar gibi farklı uyarılara yanıt olarak hareket etme ve istila etme kapasitesini ölçer. Bu testler, diğer süreçlerin yanı sıra bağışıklık tepkisini, inflamasyonu ve kanser metastazını anlamak için kritik öneme sahiptir. Transwell migrasyon ve invazyon deneyi, yara çizik testi ve hücre dışı matris kullanan hücre invazyonu yaygın kullanılan analizlerdir. Örneğin, transwell analizi, bir hücrenin gözenekli bir zardan geçme kapasitesini ölçerken, invazyon testi, bir hücrenin hücre dışı bir matrisi istila etme kapasitesini değerlendirir (Bobadilla et al., 2019; Justus et al., 2023; Pijuan et al., 2019). Analizler, lider molekülün tanımlaması ve yan etkileri belirlemek için kullanılır. Kanser hastalığında metastaz sıklıkla görüldüğünden, matriks metalloproteinaz inhibitörleri gibi migrasyon ve invazyonu sınırlayan ilaçların kullanımı kemopreventif olarak etkili olabilir (Hulkower and Herber, 2011). Hücre motilitesi ve invazyonu, kanser tedavisi için yeni hedeflerin potansiyel kaynakları olarak daha yaygın olarak kabul edilen araçlardır. Ayrıca doğru inhibitörlerin hem neoanjiyogenezi hem de metastazı sınırlayabildiğine inanılmaktadır. Bu yeni paradigma ışığında, hücre hareketliliğini ve fizyolojik engelleri hızlı ve nicel olarak geçme kapasitesini ölçebilen tarama testleri gereklidir (Eccles et al., 2005; X. Wang et al., 2019). Bununla birlikte, mevcut teknikler, moleküler metastatik kaskad kompleksini karakterize etmek ve küçük moleküllerin yüksek verimli *in vitro* taraması

için yeterince etkili değildir. Çoğu hücre göçü araştırmasının bir dezavantajı, öncelikle son nokta analizlerine bağımlı olmalarıdır. Araştırmacılar, yeni *in vitro* hızlandırılmış görüntüleme teknikleri, karmaşık metrik analiz ve motilite verilerinin aşağı yönde yorumlanması şeklinde zor ama gerekli bir zorlukla karşı karşıyadır (Eccles et al., 2005; Hulkower and Herber, 2011). Birçok analiz, kanser hücrelerinin göç davranışını çeşitli açılardan tam olarak karakterize edebilen nicel ölçümler üretir. Bu çalışmaların uygun kantitatif tekniklerle birlikte eklenmesinin, kanserin yayılmasını önlemeyi amaçlayan klinik öncesi ilaç keşfine ve kanser metastatik prognozunun karakterizasyonuna katkı sağlamaktadır. Özetle, analizler, hücre davranışı hakkında önemli bir anlayış sunar ve ilaç geliştirme ve biyolojik araştırmalarda sıklıkla kullanılır (Bobadilla et al., 2019; Hulkower and Herber, 2011; Justus et al., 2023).

3.12 Anjiyogenez Analizi

Anjiyogenez analizi, olası terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olan ilaçların pro- veya anti-anjiyojenik etkilerinin değerlendirilmesini mümkün kılar. Anjiyogenez, tümörlerin büyümesini ve metastazlarını uyaran bir süreçtir ve birçok klinik öncesi modelde, anjiyogenezin inhibe edilmesinin terapötik faydaları vardır (Phung and Dass, 2010; Upadhyay et al., 2021). Tümör anjiyogenezini düzenleyen mekanizmaların, özellikle VEGF'lerin ve reseptörlerinin tanımlanması, anti-tümör ajanları olarak işlev gören antianjiyojenik ilaçların klinik gelişimi için oldukça önemlidir. 50 yıldan daha uzun bir süre önce, anjiyogenezi terapötik bir hedef olarak kullanma fikri önerildi. 2004 yılında, spesifik olarak vasküler endotelial büyüme faktörünü (VEGF) hedef alan ilk iki ilaç, bevacizumab ve pegaptanib, sırasıyla neovasküler oftalmik hastalıkların ve kanserin tedavisi için onaylandı (Folkman, 2007; Mousseau et al., 2014). Anjiyogenez testleri, endotel hücreleri üzerindeki pro- veya anti-proliferatif, göç ve tüp oluşumu etkilerinin analizi yoluyla, endojen veya eksojen maddelerin (uyaran veya inhibitörler) pro- veya anti-anjiyojenik aktivitesinin değerlendirilmesini sağlar. Şu anda, anjiyogenez sürecini ve biyomoleküllerin bu süreç üzerindeki etkilerini incelemek için hem *in vitro* hem de *in vivo* analizler kullanılmaktadır (Phung and Dass, 2010; Stryker et al., 2019; Upadhyay et al., 2021). Kollajen jeli ve Matrigel, kültürlenmiş endotel hücreleri veya aort halkaları tarafından tübül oluşumuna izin verdikleri için *in vitro* 3D anjiyogenez deneylerinde hücre dışı matris (ECM) amaçlı kullanılırlar. *In vitro* analizlerin en yüksek değeri sağlaması için çok sayıda test yapılması gerekmektedir. Endotel hücre kemokinezi, kemotaksis, proliferasyon ve tüp oluşumu gibi tamamlayıcı testler *in vivo* doğrulama gerektirir (Folkman, 2007; Mousseau et al., 2014; Phung and Dass, 2010). Organ kültürleri, aort halkası ve aortik ark deneylerinde gösterildiği gibi, endotel hücreleri ve çevrelerindeki heterotipik ortamlar arasındaki etkileşimlere izin vererek, hücre kültürlerinden elde edilemeyen temel bilgileri sağlar. Anjiyogenez deneyleri, yeni kan damarı üretiminin karmaşık sürecini anlamak için gerekli yöntemlerdir. Ek olarak, mikro ortamların ve diğer dış faktörlerin neden olduğu olumsuzlukları ortadan kaldırılması için ileri değerlendirme tekniklerinin geliştirilmesi esastır (Auerbach et al., 2003; Cao et al., 2023; Stryker et al., 2019). Sonuç olarak, analizler, araştırmacıların, kanser ve neoplastik olmayan durumlar da dahil olmak üzere bir dizi hastalığın tedavisinde önemli bir süreç olan anjiyogenezin modülasyonu için olası terapötik hedefleri belirlemelerine ve değerlendirmelerine olanak tanır (Cao et al., 2023).

3.13. 3D Hücre Kültürü Modelleri

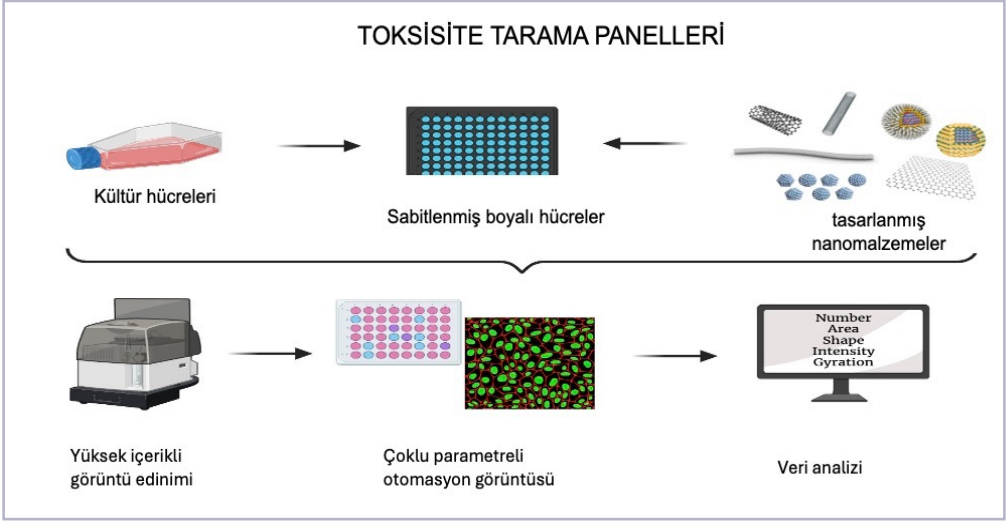
Araştırmacılar, ilaç yanıtına karşı insan duyarlılığını daha iyi yansıttak ve ilaç güvenliği ve etkinliğinin klinik olmayan tahminini iyileştirecek gelişmiş hücre ve organ bazlı analizlerin

değerlendirilmesi adına yeni modeller oluşturmak için çalışmaktadırlar. Konvansiyonel 2D hücre kültürü tekniklerinin, dokuların karmaşık ortamını yeterince yeniden oluşturma yeteneğinin, uzun bir kullanım süresinden sonra kısıtlandığı gösterilmiştir. Hücre bölünmesi, agregasyon ve proliferasyon problemleri genellikle 2D hücre kültürünün sonucunu oluşturur (Ajjarapu et al., 2023; Belfiore et al., 2021). Bu soruna yanıt olarak, 3D hücre kültürü tekniklerinin *in vivo* fizyolojiyi daha doğru bir şekilde simüle ettiği gösterilmiştir. İlaç geliştiriminin başlangıcından itibaren ilaç güvenliğini ve etkinliğini etkileyen ilaç eğilimini ve farmakokinetiği (PK'ler) değerlendirmek için en umut verici yöntemlerden biri, fizyolojik olarak gerçekçi bir hücre ortamı sunan üç boyutlu (3D) hücre kültürü modelidir (Fang and Eglen, 2017; H. Wang et al., 2021). *In vivo* analizlerde dokuların fizyolojik olarak daha fazla temsili *in vitro* modellemesini mümkün kılan sürekli bilimsel ve teknolojik gelişmeler, daha yaygın olarak kullanılan 2D hücre kültürü sistemlerinin aksine, 3D hücre modellerinin ilaç yanıtlarının etkinliğini daha doğru bir şekilde tahmin edebildiğine dair artan kanıtlarla mümkün olmuştur. Sferoidler, organoidler ve iskele tabanlı kültürler, bu modellerin üretilebileceği yollardan sadece birkaçıdır (Badr-Eldin et al., 2022; Fang and Eglen, 2017; Langhans, 2018). Dokuların gelişimini, ilaç metabolizmasını ve kanserin seyrini araştırmak için faydalıdır. Hayvan testlerinden daha etik ve kesin sonuçlar verebildikleri için, 3D kültür modelleri ilaç araştırmaları için çok önemlidir. İlerleyen zamanda 3D kültür modelleri deney hayvanı analizlerinin yerini alabilir. Geleneksel iki boyutlu (2D) hücre kültürleriyle karşılaştırıldığında, üç boyutlu (3D) kültür modelleri *in vivo* ortama daha çok benzer ve ilaç toksisitesini araştırmak için fizyolojik olarak daha uygun bir arka plan sunar (Belfiore et al., 2021; Fang and Eglen, 2017; Jubelin et al., 2022). Böylece, toksisite ve ilaç reaksiyonlarını daha doğru bir biyolojik bağlamda anlamayı mümkün kılar. 2D kültürlerde sıklıkla göz ardı edilen hedef dışı toksisite de dahil olmak üzere ilaç yan etkileri, 3D kültür modellerinde daha doğru bir şekilde temsil edilebilir. Bu nedenle araştırmacılar, *in vivo* hücre ortamlarını daha hassas bir şekilde yansıttıkları için etkin ilaç geliştirmeyi mümkün kıldığına inanılan üç boyutlu (3D) hücre kültürü teknolojilerine odaklanılmaktadır (Ajjarapu et al., 2023; Badr-Eldin et al., 2022; Jubelin et al., 2022; Langhans, 2018).

3.14. Toksisite Tarama Panelleri

İlaç endüstrisi beklenmedik yan etkiler nedeniyle klinik deneylerde ve klinik öncesi hayvan güvenliği çalışmalarında başarısız olan umut verici yeni ilaç adayları sonuçları ile karşı kayadır (Şekil 8). Etkileri ve çözümleri de dahil olmak üzere toksinlerin incelenmesi toksikoloji olarak bilinir. Deneysel bir ürünün türe, organa ve doza özgü zararlı etkileri, çeşitli biyolojik sistemler üzerinde klinik öncesi toksisite testi ile ortaya çıkar (McKim Jr., 2010). ABD Gıda ve İlaç Dairesi'ne (FDA) göre, farmakolojik etki ve potansiyel hayvan toksisitesi için yeni moleküllerin test edilmesi zorunludur. Bir maddenin toksisitesini tespit etmenin bir yolu, (a) maruziyetleri araştırmak, (b) hücreleri veya hücre dizilerini kullanarak *in vitro* araştırmalar yapmaktır ve (c) deney hayvanlarını *in vivo* analizler yapmaktır. Genellikle birden fazla yolak ilaç toksisitesine neden olmak için birleşir (McKim Jr., 2010; Taylor et al., 2007). Tek bir deneysel stratejinin hücre toksisitesinin karmaşıklığını tam olarak yansıtmaması olası değildir. Bu nedenle, farmasötiklerin olası toksisitesini değerlendirmek için, ilaç geliştirme sürecinde toksisite tarama panelleri gereklidir (McKim Jr., 2010; S., 2011). Toksikoloji taraması, tükettikleri yasal ve yasadışı maddelerin türünü ve yaklaşık miktarını belirlemek için bir kişinin kanındaki, idrarındaki veya diğer vücut sıvılarındaki zararlı madde oranını ölçen bir dizi testten herhangi biridir. Bu paneller genellikle kanserojenlik, immünotoksisite, genotoksisite ve üreme ve gelişme için toksisite dahil olmak üzere toksisitenin birçok yönünü değerlendiren bir dizi testten oluşur (McKim Jr., 2010; S., 2011). Toksisite tarama

panellerinin kullanılması, potansiyel güvenlik sorunlarının erken belirlenmesine yardımcı olarak geç aşama yıpranma olasılığını azaltabilir ve ilaç geliştirme verimliliğini artırabilir. Sürekli geliştirme için daha güvenli ve daha umut verici ilaç adaylarının seçimi, potansiyel güvenlik sorunlarının erken tespiti ile mümkün olmaktadır ve bu da gelişimin sonraki aşamalarında başarısız olması muhtemel ilaç adaylarının değiştirilmesini veya piyasadan çekilmesini mümkün kılmaktadır. Bu nedenle, toksikoloji tarama panelleri, ilaç adaylarının klinik araştırmalara geçmeden önce güvenliğini doğrulamaya yardımcı olan ilaç geliştirme sürecinin çok önemli bir parçasıdır (McKim Jr., 2010; S., 2011; Taylor vd., 2007).



Şekil 8. Klinisyenlerin testin hangi spesifik ilaçları ve metabolitleri tanımladığını seçmesine olanak tanıyan toksikoloji tarama panelleri (Lenin et al., 2021)

3.15. Yüksek İçerikli Tarama (HCS)

In vitro klinik öncesi testler, yüksek içerikli tarama (HCS), tek hücre düzeyinde birkaç hücresel özelliğin aynı anda incelenmesini sağlayan güçlü ve uyarlanabilir bir yöntemdir. Bu teknik, otomatik mikroskopi ve görüntü işleme yoluyla hücresel morfoloji, işlev ve moleküler süreçlerle ilgili kapsamlı ve nicel veriler üretir (Nichols, 2007). HCS, hücre başına birçok veri noktası toplamak için otomatik yüksek çözünürlüklü görüntüleme, robotik kullanım ve modern hücre biyolojisini birleştirir. Bu yaklaşım, bir dizi biyolojik süreci araştırmak ve ilaç geliştirmede öncü keşif motoru olarak kullanılacak yeni ilaç adaylarını bulmak ve rafine etmek için yararlıdır. 3 boyutlu kültür teknolojileri ve fenotip profil, ilaç keşif taraması biyokimyasaldan hücre bazlı analizlere ve yüksek verimden yüksek içerikli taramaya geçmeye devam ettikçe, tarama analizlerinin ilgi düzeyini artırmak için kritik hale gelecektir (Bickle, 2010; Fraietta and Gasparri, 2016; Giuliano et al., 2003). HCS, peptitler, küçük moleküller veya RNAi gibi bir hücrenin fenotipini istenen şekilde değiştiren molekülleri bulmak için kullanılır. HCS'nin biyolojik uygulamaları, birincil ve ikincil taramanın yanı sıra sinyalizasyon, hücre şekli değişiklikleri ve toksisite üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmıştır (Buchser, 2014; Nichols, 2007; J. Wang et al., 2019). HCS kullanımıyla, klinik adaylarımızın hücresel morfoloji, hücre altı hedef translokasyonu ve ikili raportör testi dahil olmak üzere çeşitli hücresel fenomenleri nasıl etkilediğini anlamak mümkündür. Küçük molekül ve terapötik protein

keşifleri, otoimmün hastalıklar ve nörolojik problemler gibi durumların tedavisine odaklanmıştır (Buchser, 2014; Persson et al., 2014; Varma et al., 2010). Fenotipik ilaç keşfi (PDD) yaklaşımları, farmakolojik hedeflerin kimliği ve işlevinin tam olarak bilinmesine dayanan hedefe dayalı ilaç keşif prosedürlerinin aksine, belirli bir fenotip hakkında bilgi edinerek yeni ilaçların tanımlanmasını kolaylaştırır. Görüntü tabanlı HCS adı verilen güçlü bir PDD tekniği, hücre popülasyonları arasında veya içinde hücreyel değişiklikleri gösteren özellikleri ölçerek daha fazla veri analizi için yararlı veri kümeleri üretir (Buchser, 2014; Lin et al., 2020; Nichols, 2007). Bu analiz, küçük molekül etkilerinin karakterizasyonuna izin verir. Yüksek içerikli tarama, ilaç etkilerinin daha derin bir şekilde anlaşılmasını sağlar ve sistem hücre biyolojisi ve ilaç keşfi için etkili bir yöntemdir.

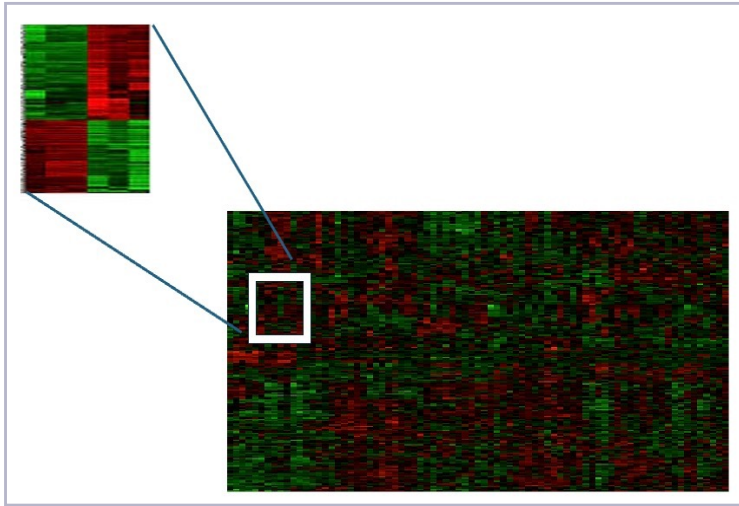
3.16. Doz-Yanıt Eğrisi Belirleme Analizi

In vitro klinik öncesi doz-yanıt eğrileri, ilaç konsantrasyonu ve biyolojik yanıtın nasıl ilişkili olduğunu gösterdikleri için ilaç geliştirme için önemlidir. Bu eğriler, ilaç adayının gücü, etkinliği ve olası toksik etkileri hakkında önemli ayrıntıları ortaya çıkararak bir ilaç adayının farmakolojik özelliklerini anlamak için önemli bilgiler sağlar. Bir doz-yanıt eğrisi, bir ilacın dozu ile ilacın sahip olduğu fizyolojik etkiler arasındaki ilişkiyi gösterir (Carpenter, 1986; Waud, 1981). Terapötik indeksin belirlenmesi, doz kılavuzlarının oluşturulması ve ilacın güvenli ve tehlikeli seviyelerinin anlaşılması buna bağlıdır. Genellikle, ilacın x eksenindeki dozu ve hastanın ilaca tepkisi y ekseninde olacak şekilde eğriyi çizmek için logaritmik bir ölçek kullanılır. İnsan vücudu tarafından alınan ilaçların, yiyeceklerin, kirleticilerin veya diğer maddelerin güvenlik veya tehlike seviyesinin yanı sıra bir ilacın terapötik faydalı etkilerinin, dozajının ve sıklığının belirlenmesine yardımcı olur (O'quigley, 2002; Ritz and Strebig, 2016; Ryznik et al., 2018; Waud, 1981). Farmakoloji ilacı, doz aralıklarını veya bir ilacın güvenli bir şekilde uygulanabileceği tehlikeli seviyeyi sağlamak için doz-yanıt eğrisini kullanır. Doz-yanıt eğrileri genellikle sigmoidal (S-şekilli) patenler gösterir, bu da yanıtın bazı dozlarla hızla yükseldiğini ve daha sonra dozun daha da artırılmasının çok az etkiye sahip olduğu bir noktada platolar olduğunu gösterir. Öldürücü doz (LD) ve etkili doz (ED₅₀) ile ilgili bilgiler sunulmalıdır (Berry and Wallace, 1981; Carpenter, 1986; Dette et al., 2014). Doz logaritması ile ilgili bir lojistik fonksiyon olan Hill denklemi genellikle doz-yanıt eğrisine uymak için kullanılır. Örneğin, farklı popülasyonlar, hastayla ilgili özellikler ve ölçüm teknikleri, doz-yanıt eğrilerinde farklılıklara neden olabilir. Bununla birlikte, değerlendirilen ilacın farmakoloji profili, aynı koşullar altında yapılan tekrarlanan ölçümlerle belirlenebilir (Carpenter, 1986; Dette et al., 2014; Ryznik et al., 2018; Waud, 1981). Bir ilacın etki alanındaki konsantrasyonu, etkisini belirler ve bu da doz-yanıt bağlantısını çok önemli kılar. Doku, hücre veya popülasyon yanıtının yanı sıra EC₅₀, IC₅₀ ve ED₅₀ gibi potens ve etkinlik ölçümleri, doz-yanıt eğrisinin parametrelerine yansıtılır. İlacın gücünün ve etkinliğinin belirlenmesi, eğrinin şekli ve dikliğinden etkilenir (Berry and Wallace, 1981; Carpenter, 1986; Waud, 1981). İlaç farmakoloji profilleri, aynı koşullar altında araştırılan ilaçların doz-yanıt eğrileri çizilerek karşılaştırılabilir. Bir popülasyondaki bir ilaç için gerekli doz, frekans ve terapötik indeksin tümü, amaçlanan etkiyi sağlamak için gereken dozun belirlenmesine yardımcı olan bu bilgilerin yardımıyla tespit edilebilir (Dette et al., 2014; Ryznik et al., 2018; Waud, 1981).

3.17. Mikrodizin ve RNA Dizi Analizi

Mikrodizin ve RNA dizilime analizi kullanan *in vitro* klinik öncesi çalışmalar, gen ifadesi profillerini inceleyen ve hücrelerin farmakolojik tedavilere moleküler reaksiyonları hakkında derin bilgiler sunan güçlü teknolojilerdir (Şekil 9). Gen ifadesi, RNA dizi analizi ve mikrodizin teknolojisi

hakkında farklı bilgiler sundukları için, ilaç geliştirme sürecinde tamamlayıcıdır (Krause et al., 2023; M. S. Rao et al., 2019). mRNA, kodlamayan RNA, patojen RNA, kimerik gen füzyonları, transkript izoformları ve ekleme varyantları dahil olmak üzere sınırlı sayıda RNA türü RNA dizi analizi ile tespit edilebilir. Buna karşılık, mikrodizin teknolojisi önceden tanımlanmış problemlerin (genlerin) ifadesini ölçer ve transkriptomun sadece bir kısmını kapsamaması amaçlanmıştır. Gelişmiş dinamik ifade aralığı, odaklanmış değişiklik değerlendirmesi ve transkript izoform tespiti, RNA dizi analizi ile mümkün olmaktadır (Pop et al., 2021; M. S. Rao et al., 2019; van der Kloet et al., 2020). Mikrodizin teknolojisini RNA dizi analizi ile karşılaştırdığımızda, kontrol edilebilir veri boyutları ve azaltılmış bilgi işlem süreleri gibi üstünlükleri vardır. RNA dizi analizi ise transkriptomun daha derin ve kapsamlı bir şekilde incelenmesini sağlar. Çalışma kriterlerini, iki stratejiden hangisinin en iyi olduğunu belirleyecektir (Pop et al., 2021; X. Yang et al., 2020). Her iki yöntem de bazen gen ifadesinin daha kapsamlı profilini ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Örneğin, bir çalışma, karşılaştırılabilirliği artırmak ve birleştirilmiş veri kümelerinin veri analizini kolaylaştırmak için RNA dizi ve mikrodizin analizi verilerinin birleştirilebileceğini belirledi. İlaç geliştirmede RNA dizi ve mikrodizin analiz teknolojisinin kullanımı, her iki yöntem de gen ifadesi verisi hakkında farklı bilgiler sunduğundan, araştırmanın özel ihtiyaçlarına bağlıdır (Krause et al., 2023; M. S. Rao et al., 2019; van der Kloet et al., 2020). ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan birkaç hedefe yönelik ilaç, RNA-dizi analizi kullanılarak incelenen klinik biyobelirteçlere sahiptir. İlaçlar, tanınmış onkogenik füzyonlara karşı aktivite sergileyenleri içerir. En iyi bilinen örnek, kırılma noktası küme bölgesini (BCR) ve tirozin-protein kinaz ABL1'i (ABL1) içeren BCR-ABL1 pozitif kronik miyeloid lösemide (KML) kinaz inhibitörlerinin (imatinib gibi) kayda değer etkinliğidir (Byron et al., 2016). Sonuç olarak, RNA dizi analizi, çok çeşitli RNA türlerinin tespiti ve artan dinamik ifade seviyesi aralığı dahil olmak üzere transkriptomun daha kapsamlı ve derinlemesine analizini sağlar. Mikrodizin teknolojisi ise yönetilebilir veri boyutu ve daha düşük hesaplama süresi gibi avantajlara sahiptir. Klinik öncesi testler, ilaç geliştirmenin önemli bir parçasıdır ve bir yöntemin kullanılıp kullanılmayacağı, araştırmanın özel ihtiyaçlarına bağlıdır (Byron et al., 2016; Krause et al., 2023; van der Kloet et al., 2020).



Şekil 9. Gen ifadesi profillerini inceleyen güçlü teknolojiler olan mikrodizin ve RNA dizi analizi, hücrelerin ilaç uygulaması sonrası karşı moleküler cevaba ilişkin derin bilgiler sunar. Kırmızı nokta: Gen ifadesinin deney örneğinde referans örneğe göre daha yüksek olduğunu gösterir. Yeşil nokta: Gen ifadesinin deney örneğinde referans örneğe göre daha düşük olduğunu gösterir (Kondo et al., 2014).

3.18. Klinik Öncesi Araştırmalarda *In Silico* Analizler

İlaç aday moleküllerden çok azı zorlu ilaç keşif süreci boyunca öncü bir molekülden ticari olarak temin edilebilen bir ürüne dönüşmektedir. Bunun nedeni genellikle bağlanma afinitesi, hedef dışı etkiler, stabilite veya çözünürlük gibi fizikokimyasal özelliklerle ilgili sorunlardır. Uzun ve pahalı araştırma ve geliştirme süreci bunu çok daha zor hale getirmektedir (Patek et al., 2009; Shaker et al., 2021). Başarı olasılığını artırmak için, yöntemin her aşamasını optimize etmek çok önemlidir. Bilgisayar destekli ilaç tasarımı (CADD), bilgisayar gücü ve teknolojisindeki son atılımlar sayesinde, çağdaş ilaç keşfinin çok önemli bir bileşeni olarak ortaya çıkmış ve ilaç araştırmalarının yönlendirilmesine ve hızlandırılmasına yardımcı olmuştur. Farmasötik keşif alanında, hesaplamalı yaklaşımlar, ilaç geliştirme sürecinin her aşaması için hayati araçlar sunarak bu alanda devrim yaratmıştır (Atta-Ur-Rahman and Choudhary, 2015; Chang et al., 2023; Ferdousi et al., 2017). İlaç adayı moleküller *in vivo* olarak test edilmeden önce, güvenlik ve etkinlik profilleri “*in silico* yaklaşımlar” olarak bilinen hesaplama teknikleri ve simülasyonlar kullanılarak değerlendirilir. Son yıllarda, moleküler yerleştirme, farmakofor modelleme ve haritalama, de novo tasarım, moleküler benzerlik hesaplamaları ve dizi tabanlı sanal tarama dahil üzere çeşitli hesaplamalı ilaç keşif yöntemlerinde büyük miktarda iyileştirme yapılmıştır (Chang et al., 2023; Patek et al., 2009; Shaker et al., 2021). De novo moleküler tasarım ve optimizasyon, yapı tabanlı ilaç tasarımı ve klinik öncesi ve klinik geliştirme gibi ilaç keşif hattının birçok aşamasını geliştirmek için yapay zeka (AI) tekniklerinin kullanılması, son gelişmelerin bir sonucu olarak giderek daha popüler hale gelmektedir. İlaç geliştirme süreçleri daha verimli hale gelmekte olup ve veriye dayalı karar vermeyi desteklemek için yapay zeka (AI) ve makine öğreniminden yararlanılmaktadır (Blanco-González et al., 2023; Flynn et al., 2023; Ouyang and Smith, 2015). Analiz teknikleri, özellikle derin öğrenme modellerini, genomik profiller, görüntüleme verileri ve kimyasal ve farmakolojik veritabanları gibi biyomedikal veri kümeleriyle birleştirmek, etkili ilaçları ve bunların terapötik kullanımlarını bulmak için gereken kaynakların koordinasyonuna olanak tanır. Veri kümelerini analiz edebilen ve olası ilaç adaylarının etkinliğini gösteren eğilimleri ve kalıpları bulabilen yapay zeka algoritmaları sayesinde tedaviler, bireysel hastaların ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde özelleştirilebilir (Blanco-González et al., 2023; Chang et al., 2023; Ouyang and Smith, 2015; Shaker et al., 2021). AI, ek değerlendirme için terapötik adayların önceliklendirilmesine yardımcı olabilecek fizikokimyasal nitelikler, toksisite ve biyoaktivite dahil olmak üzere farmakolojik özelliklerin tahmininde de önemlidir. İlaç keşif sürecini hızlandırmak için, lider molekülleri derecelendirmek ve önceliklendirmek için yapay zeka kullanılmaktadır. Yıllar geçtikçe, potansiyel antikanser ilaçların geliştirilmesinde hesaplama araçlarının uygulanmasının bir sonucu olarak kanser tedavisi alanında önemli ilerleme kaydedilmiştir (Chatterjee and Roy, 2022; Ferdousi et al., 2017; Flynn et al., 2023; Patek et al., 2009). Son on yılda, omik verilerin ortaya çıkması, bilgisayarlar aracılığıyla antikanser tedavisini öngörmeyi mümkün kılarak ilaç araştırmalarının etkinliğini artırmıştır. Örneğin, biyobelirteç tanımlaması ve ilaç olma potansiyelini, yüksek verimli transkriptom verilerinin ilaca yanıt verileriyle kombinasyonundan önemli ölçüde yararlanmıştır. Sonuç olarak, hesaplamalı modellemenin deneysel verilerle birleştirilmesi, klinik öncesi araştırmalar için faydalı bir stratejidir. Toksikite ve ilaç etkileşimlerini tahmin etmek için bir mekanizma sağlar ve daha fazla klinik öncesi ve klinik araştırma için kaynakların önceliklendirilmesine yardımcı olur (Chang et al., 2023; Chatterjee and Roy, 2022; Ouyang and Smith, 2015; Patek et al., 2009; Shaker et al., 2021).

4. BİYOLOJİK VE BİYOTEKNOLOJİK İLAÇLAR İÇİN MOLEKÜLLER NASIL TANIMLANIR VE KARAKTERİZE EDİLİR?

Hedef tanımlama, biyobelirteç keşfi, öncü molekül seçme, lider molekül tanımlama, *in vitro* validasyon, moleküler karakterizasyon, optimizasyon ve *in vivo* testler, biyolojik ilaç geliştirme sürecindeki önemli süreçlerden bazılarıdır. Araştırılan hastalık veya durumla bağlantılı biyolojik hedefi veya yolağı bulmak, ilaç keşif sürecindeki ilk aşamadır (Hughes et al., 2011). Farmakofor modelleri, aktif farmasötik moleküller için hedeflerin tanımlanmasına izin verir. Hedeflerin belirlenmesi, belirli ilaçların etki şeklinin araştırılmasına yardımcı olur. Ayrıca, farmakofor modellemesi, ilacın yeniden konumlandırılması ve ilaç polifarmakolojisi ile ilgili mevcut anlayışın araştırılmasını kolaylaştırmaktadır (N. Rao et al., 2022; Rudrapal et al., 2022; Somolinos et al., 2021). Genetik bağlantılar, hesaplamalı çıkarım ve doğrudan biyokimyasal yaklaşımların tümü, hedefleri belirlemek için kullanılabilir. Hedefin belirlenmesini takiben, hastalığın varlığının, seyrinin veya tedaviye tepkisinin belirteçleri olarak işlev görebilen hastalıklarla bağlantılı ilgili biyobelirteçler bulunur. Bilim adamları, biyobelirteçleri keşfettikten sonra terapötik hedefe ve ilgilenilen hastalık veya duruma dayalı olarak ilaç geliştirme için ilaç modalitelerini seçerler (Somolinos et al., 2021; Southey and Brunavs, 2023). Terapötik hedefe bağlı olarak, doğru biyolojik ilaç türü seçilir; Popüler modaliteler arasında monoklonal antikorlar, peptitler, proteinler ve gen tedavileri bulunur. Son yıllarda, gen terapisi, siklopeptitler, protein parçalayıcılar, antikor-ilac konjugatları ve RNA terapileri gibi diğer yeni kimyasal yöntemler de ortaya çıkmış ve geliştirilmiştir. Hasta etkisini mümkün olan en kısa sürede en üst düzeye çıkarmak için, ideal hedef ürün profili, hasta talepleri ve hastalık biyolojisi, ilaç keşfi ve geliştirme sürecinde çok önemli bir adım olan terapötik yöntemlerin seçiminde rol oynar (Borcherding, 2004; Singh et al., 2023; Zhao et al., 2015). Daha sonra, hedefin üç boyutlu (3D) modellerini hesaplamalı olarak oluşturup inceleyerek, bir ilacın ilgilenilen hedefle etkileşimi, yapısal biyoloji teknikleri kullanılarak incelenir. Araştırmacılar, molekülün aktif bölgeye “uyumunu” arttırmak için çalışırken, bu yapısal modeller, lider molekül optimizasyon aşaması sırasında moleküllerin tasarımı ve optimizasyonu için gereklidir (Blanco and Gardinier, 2020; Lewin and Weiner, 2004; Rifaioglu et al., 2019). Lider molekül adaylarının aktivitesi, özgülüğü ve potansiyel toksisitesi, hücre bazlı analizler kullanılarak daha fazla değerlendirilir. Lider moleküllerin yapısını karakterize etmek için kütle spektrometrisi, nükleer manyetik rezonans (NMR) ve X-ışını kristalografisini içeren teknikler kullanılır. Moleküllerin üç boyutlu olarak nasıl düzenlendiğini belirleyen bu yöntemler, moleküllerin bileşimine ve amaçlarına ışık tutmaktadır (Berisio, 2019; Koes, 2015; Mohs and Greig, 2017; Singh et al., 2023). Ayrıca, diğer moleküllerle etkileşimleri ve olası toksisite gibi biyolojik molekül özellikleri, moleküler modelleme ve simülasyon teknikleri ile tahmin edilmektedir. İlaçların toksikolojisi, biyoaktivitesi ve fizikokimyasal özellikleri, ilaç fonksiyonel benzerliğine dayalı ilaç-ilac etkileşimlerinin bilgisayar tahmini gibi *in silico* teknikler ve araçlar kullanılarak da tahmin edilmektedir. İlaç tasarlamının bir başka yöntemi, çok sayıda ilaç molekülünün ve bunların afinitelerinin hızlı bir şekilde analiz edilmesini sağlayan yüksek verimli taramadır (HTS) (Blass, 2021; Hughes et al., 2011; R. Zhang and Xie, 2012). Bugün var olan toksisite taraması paradigması, HTS test yöntemleri ile büyük ölçüde değiştirilmektedir. Artan potansiyel, seçicilik ve farmakokinetik nitelikler için optimizasyonun ardından, lider molekülleri farmakokinetik ve etkinlik değerlendirmeleri için uygun hayvan modellerinde analiz edilir. Lider molekül klinik çalışmalarda insanlar üzerinde test edilmeden önce, prosedürün bu aşamasının amacı,

molekülün güvenliği ve etkinliği hakkında mümkün olduğunca çok şey öğrenmektir (Borcherding, 2004; Mohs and Greig, 2017; Southey and Brunavs, 2023).

Hedef tanımlama, biyobelirteç keşfi, ilaç aday molekül seçimi, lider molekül tanımlama, *in vitro* validasyon, moleküler karakterizasyon, optimizasyon ve *in vivo* analiz, biyoteknolojik ilaç molekülü keşif sürecindeki önemli süreçlerden bazılarıdır. Biyoteknolojik ilaçlar, biyolojik ilaçların aksine, Rekombinant DNA teknolojisinin platform seçimini ve uygulamalarını da içermektedir (Cronin and Yu, 2023; Khan et al., 2016). Biyoteknolojik terapötik moleküllerin geliştirilmesinde en önemli adımlardan biri doğru biyoteknolojik platformun seçilmesidir. Platform seçimi, terapötik hedef ve geliştirilmekte olan farmakolojik modalitenin türü tarafından belirlenir. Rekombinant proteinler, monoklonal antikorlar, aşılarda, gen terapileri ve hücre tedavileri yaygın biyoteknolojik platformlara örnektir. Biyoteknolojik ilaç moleküllerinin başarılı bir şekilde tasarlanması, güvenli ve etkili tedavilerin üretilmesi için uygun platformun seçilmesi zorunludur. Biyoteknolojik ilaç keşfi de büyük ölçüde rekombinant DNA teknolojilerinin kullanımına dayanmaktadır (Cronin and Yu, 2023; Stryjewska et al., 2013). Rekombinant DNA teknolojisi, bir organizmanın dışındaki genetik materyali değiştirerek, istenen ve geliştirilmiş özelliklerin çoğaltılabilmesine imkan sağlar. Bu teknoloji sayesinde hormonlar, DNA aşılarda ve biyolojik ürünler gibi çok sayıda tıbbi ürün üretilmiştir. Biyoteknoloji ilaçlarının büyük çoğunluğunu oluşturan rekombinant ilaçlar, ölümcül insan hastalıkları ile mücadelede esastır (Cronin and Yu, 2023; Hosseini-Shokouh et al., 2021). Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak oluşturulan farmasötik ürünler, FDA'nın 1997'de önceki birkaç yılda olduğundan daha fazla rekombinant ilacı onayladığı noktaya kadar insan yaşamını büyük ölçüde değiştirdi (Khan et al., 2016). Bunlar arasında anemi, AIDS, kanser (Kaposi sarkomu, lösemi ve kolorektal, böbrek ve yumurtalık kanserleri), kalıtsal bozukluklar (kistik fibroz, ailesel hiperkolesterolemi, Gaucher hastalığı, hemofili A, şiddetli kombine immün yetmezlik hastalığı ve Turner sendromu), diyabetik ayak ülserleri, difteri, genital siğiller, hepatit B, hepatit C, insan büyüme hormonu eksikliği ve multipl skleroz ilaçları vardır. Güvenli ve etkili ilaç adaylarına dönüşebilecek lider moleküllerin belirlenmesi ve analiz edilmesi, biyoteknolojik moleküllerin keşfinde de oldukça önemli yer almaktadır (Cronin and Yu, 2023; Hosseini-Shokouh et al., 2021; Khan et al., 2016).

5. *IN VITRO* ANALİZLERİN AVANTAJLARI VE SINIRLAMALARI

In vitro analiz, ilaçların keşfi ve geliştirilmesi için önemli bir araçtır ancak ilaç geliştirme sürecinde hem avantajları hem de sınırlamaları vardır. Bir ilacın farmakokinetik / farmakodinamik profilini anlamak için *in vitro* testler gereklidir. Klinik öncesi ilaç geliştirme süreçlerinin avantajları ve sınırlamaları aşağıda verilmiştir.

A) *In Vitro* Analizlerin Avantajları;

Hız: Hayvan araştırmaları aylar sürebilirken, *in vitro* testler birkaç gün içinde etkin sonuçlar sağlayabilir.

Doğruluk: *In vitro* testler, insan hücrelerini veya yeniden oluşturulmuş insan dokularını kullandığından (insan anatomisini hayvan modellerinden daha iyi temsil eden) daha doğru sonuçlar verebilir (Schug et al., 2013).

Etik açıdan faydaları: Hayvan hakları savunucuları için en büyük artılardan biri, *in vitro* testlerin canlı hayvanların kullanılmasını gerektirmemesidir (Liebsch et al., 2011).

Maliyet etkinliği: Genel olarak, *in vitro* testler, özellikle barınma ve hayvan bakım masrafları dikkate alındığında, *in vivo* testlerden daha az maliyetlidir (Liebsch et al., 2011).

Tekrarlanabilirlik: Verilerin doğrulanmasına ve sağlam bir bilimsel vaka oluşturulmasına yardımcı olan *in vitro* testleri tekrarlamak kolaydır (Liebsch et al., 2011).

B) In Vitro Analizlerin Sınırlamaları;

Karmaşıklık eksikliği: Organ sistemlerinin ve insan vücudunun iç ortamının içsel karmaşıklığı, *in vitro* modeller tarafından yakalanmaz (Ghallab, 2013a; Ghallab and Bolt, 2014).

Kısıtlı glikozilasyon: In vitro sistemlerin, *in vivo* sistemlerle aynı glikosilasyon modellerini üretmemesi mümkündür, bu da biyolojik fonksiyonların değişmesine, *in vivo* olarak hızlı klerense veya bağlanma afinitesinin azalmasına neden olabilir (Ghallab, 2013b, 2013a).

Kısıtlı toksisite testi: İlaçların ve diğer biyolojik maddelerin güvenliğini belirlemek için çok önemli olan uzun süreli toksisite çalışmaları, *in vitro* sistemler için pek uygun değildir. In vitro sistemlerden elde edilen sonuçların, özellikle uzun süreli toksisite araştırmaları söz konusu olduğunda, *in vivo* ortamlara aktarılması zor olabilmektedir (Ghallab and Bolt, 2014).

Sınırlı prediktif güç: *In vivo* boyutta ilaç veya biyolojik yanıt, *in vitro* tekniklerle güvenilir bir şekilde tahmin edilemeyebilir, bu da yanlış pozitiflere veya yanlış negatiflere neden olabilir (Ghallab, 2013a; Ghallab and Bolt, 2014).

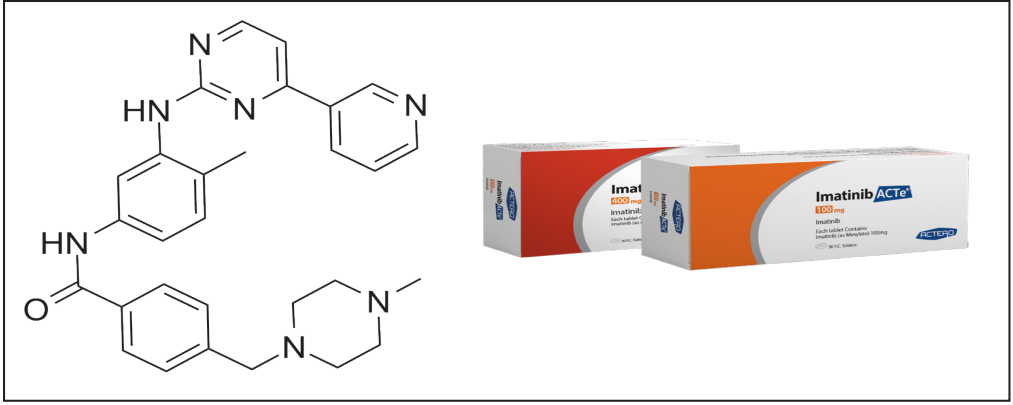
6. IN VITRO ANALİZ EDİLEN İLAÇLARDAN BAŞARI HİKAYELERİ

Canlı bir organizmanın dışında yapılan deneyleri içeren *in vitro* testler, çeşitli başarılı ilaç geliştirme hikayelerinde çok önemli bir rol oynamıştır. Aşağıda birkaç örnek verilmiştir.

6.1. Kronik miyeloid lösemi için Gleevec (Imatinib)

Halk arasında “Gleevec” veya “Glivec” olarak adlandırılan tirozin kinaz inhibitörü imatinib, 2001 yılında kronik miyeloid lösemninin (KML) tedavi edilme şeklini tamamen değiştirdiği için “sihirli mermi” olarak adlandırıldı (N. Iqbal and Iqbal, 2014) (Şekil 6.1). Kemoterapiden farklı olarak, Oregon Sağlık ve Bilim Üniversitesi’nden Brian Druker, 1990’larda sağlıklı hücreleri korurken kanser hücrelerini öldürerek KML’yi tedavi etmek üzerine çalışmalarını odaklamıştı. BCR-ABL’yi inhibe eden bir ilacın KML hastalarını tedavi etmek için kullanılabileceğini önerdi (C. T. Chen and Kesselheim, 2017; N. Iqbal and Iqbal, 2014). Sağlıklı hücrelerin bu tür bir tedaviden etkilenmemesi gerektiğini, çünkü BCR-ABL’den yoksun olduklarını varsaydı. Biyokimyacı Nicholas Lyndon ve Brian Druker, KML hücrelerini yok etmede şaşırtıcı derecede etkili bir ilaç keşfettiler. Araştırmalar sonucunda, ilacın inceleme yaptıkları diğer tüm ilaçlardan daha iyi performans gösterdiğini belirlediler. İlk olarak STI-571 olarak bilinen ancak daha sonra imatinib (Gleevec) olarak değiştirilen ilaç, BCR-ABL füzyon proteininin çalışmasını engeller (N. Iqbal and Iqbal, 2014; Verweij et al., 2003).

Geçmişte Ciba-Geigy (şuan Novartis) firmasında çalışan bilim insanı Nicholas Lyndon, 1990'ların sonlarında imatinib ilacını geliştirdi ve Brian Druker, KML tedavisinde uygulanmasına öncülük etti. Imatinib, 1998 yılında Dr. Druker ve diğer araştırmacılar tarafından faz 1 klinik çalışması başlatıldı (Attwood et al., 2021; N. Iqbal and Iqbal, 2014, 2020). Hastalığın erken veya kronik evrelerinde olan KML hastalarının çoğu, ilacın bir sonucu olarak kanserin ortadan kalktığını belirledi. Daha sonraki klinik çalışmalarda daha büyük hasta gruplarında benzer sonuçlar gözlenmiştir. Ek olarak, imatinib daha az yan etki ürettiği ve geleneksel KML tedavisine kıyasla hastaların yaşam kalitesini artırdığı belirlendi. İmatinib'in KML hastalarının tedavisinde kayda değer etkinliğinden esinlenen araştırmacılar, imatinib'in tirozin kinazların aşırı ifade seviyesi sergileyen diğer kanser türlerinde potansiyel etkilerini araştırdılar. Gleevec™, bu tür odaklanmış aktivitenin olasılığını gösteren ilk kanser tedavileri arasında yer almaktadır. Kanser tedavilerinde genetik araştırmalar için bir model olarak sıklıkla kullanılmasının nedenin ve protein hedefinin genetik olarak tanımlanmasına bağlıdır (Attwood et al., 2021; C. T. Chen and Kesselheim, 2017; N. Iqbal and Iqbal, 2020).



Şekil 10. Tirozin kinaz inhibitörü imatinib (Mortlock et al., 2014)

6.2. Meme kanseri için Herceptin (Trastuzumab)

Herceptin olarak da bilinen trastuzumab, 1992'de klinik deneylere başladı ve 1998'de başlangıçta HER2 pozitif metastatik meme kanserini tedavi etmek için onay aldı (Şekil 11). Düzenli kemoterapi kullanımı, randomize bir faz 3 çalışmasından elde edilen zorlayıcı sonuçlara göre % 20 daha düşük ölüm riski ile ilişkilendirildi (Jeyakumar and Younis, 2012; Sawyers, 2019). Bu onay, hedefe yönelik kanser tedavisinde önemli bir ilerlemeyi temsil etsede, en iyisi hala değildi. Sekiz yıl sonra, 2006 yılında, Herceptin, nüks riskinde %50 ve mortalite riskinde %33 azalma nedeniyle HER2 pozitif meme kanserinin cerrahi sonrası (adjuvan) tedavisinde kullanılmak üzere onaylandı. Meme kanseri HER2 pozitif olan kadınların hayatları, bu çığır açan araştırmalarla geri dönülmez bir şekilde değişti (Bennett, 2000; De Lanerolle et al., 2023; Maadi et al., 2021). HER2 reseptörünün hücre dışı alanı, Herceptin olarak bilinen rekombinant insanlaştırılmış monoklonal antikorun spesifik hedefidir. Meme kanseri vakalarının %20'sinde, insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) proteininin aşırı ifadesi ve genin amplifikasyonu bulunur. Bu anormallikler, HER2 negatif muadillerine kıyasla daha agresif bir doğal öykü ile bağlantılıdır (Jeyakumar and Younis, 2012; Maadi et al., 2021). Herceptin tedavisi, HER2 proteininin aşırı ifadesi (3+) ve/veya immünohistokimya (IHC) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) ile gen amplifikasyonu olan

meme kanserlerine önemli faydalar sağlar ancak protein ifadesi zayıf veya hiç olmayan (0 veya 1+) veya amplifiye edilmemiş gen kopyası olanlara önemli faydalar sağlayamaz. HER2 pozitif meme kanseri olan kadınların yaşamları ve bilim camiasının kanser tedavisine genel bakış açısı, bu ufuk açıcı bulgularla derinden değişmiştir (Jeyakumar and Younis, 2012; Maadi et al., 2021; Sawyers, 2019).

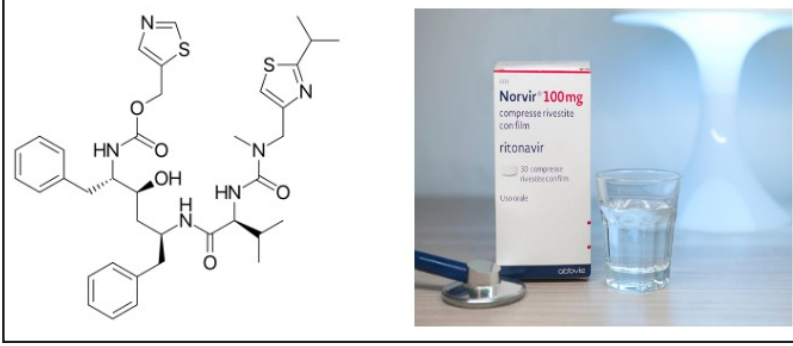


Şekil 11. HER2 inhibitörünü hedef alan tedavide kullanılan Herceptin (Trastuzumab) (Hunter et al., 2020)

6.3. HIV / AIDS İçin Proteaz İnhibitörleri

HIV / AIDS'in tedavisinde ve önlenmesinde kullanılan popüler bir antiviral ilaç ailesi, proteaz inhibitörleri olarak bilinir. Virüsün çoğalması için gerekli olan proteaz enzimini engelleyerek işlev görürler. COVID-19 ve hepatit C, proteaz inhibitörleri (PI'ler) ile de tedavi edilebilir. Bilgisayar modellemesi, tıbbi kimya ve moleküler biyolojiyi kapsayan çağdaş ilaç keşif yöntemlerinin en iyi örneklerinden biri olarak proteaz inhibitörlerinin oluşturulmasıdır (Maksimovic-Ivanic et al., 2017; Weber et al., 2021). Ritonavir, indinavir, nelfinavir, saquinavir, amprenavir, lopinavir, atazanavir, fosamprenavir, tipranavir ve darunavir'in ardından FDA, 1995 yılında ilk HIV proteaz inhibitörü olarak Invirase'yi (saquinavir) onayladı (Şekil 12). Bugün piyasadaki HIV proteaz inhibitörlerinin çoğu, substrat geçiş durumuna benzeyecek şekilde oluşturulmuştur (Ghosh et al., 2016; Lv et al., 2015). Hidrojen bağı yoluyla, proteaz aktif bölge kalıntılarının karboksil grubu, Asp 25 ve Asp 25' ve inhibitörün hidroksil grubu devreye girer. Potens retansiyonu olan ve yan etkisi olmayan HIV proteaz inhibitörleri oluşturmak için uzun vadeli araştırmalara ihtiyaç vardır. HIV proteaz inhibitörü ön ilaçlarının oluşturulması, hedef dışı etkiler yenilikçi HIV proteaz inhibitörü adayları ile ele alınmadan önce dozajları düşürebilir ve yan etkileri iyileştirebilir (Ghosh et al., 2016; Lv et al., 2015; Maksimovic-Ivanic et al., 2017). Proteaz inhibitörleri, değişen gıda tadı, insülin direnci, ishal, yağın yeniden dağılımı, yüksek kan şekeri, yüksek trigliserit veya kolesterol seviyeleri ve olumsuz ilaç etkileşimleri gibi bir dizi ciddi yan etkiye ve etkileşime neden olabilir. Bununla birlikte, virüs yükünü azaltarak ve hastalığın ilerlemesini geciktirerek HIV / AIDS hastalarının prognozunu önemli ölçüde iyileştirmişlerdir. Bazı proteaz inhibitörleri tek başına (monoterapi) kullanılırken, çok daha fazlası diğer antiviral ilaçlarla birleştirilir (Lv et al., 2015; Weber et al., 2021). Başka bir ilacın etkinliğini artırmak için kullanıldıklarında "güçlendiriciler" olarak bilinirler. Bu tip kombinasyon terapisi için "ilaç kokteyli", "üçlü kombinasyon tedavisi", "kombinasyon tedavisi", "antiretroviral tedavi" ve sıklıkla sadece "proteaz inhibitörleri" dahil olmak üzere birkaç isim vardır. Yüksek derecede aktif antiretroviral tedavi veya HAART, bilim adamları tarafından bir proteaz inhibitörü

ile birlikte iki veya daha fazla ilacın kullanımını tanımlamak için kullanılan terimdir (Lv et al., 2015; Maksimovic-Ivanic et al., 2017). 1996 yılında HART, HIV/AIDS hastaları için genel olarak erişilebilir hale gelmiştir. Böylece dünya genelinde AIDS'e bağlı hastalık ve ölüm oranları hızla azaldı ve hastalığın algısı kalıcı olarak değişti. Proteaz inhibitörleri HIV/AIDS tedavisinde hala çok önemlidir (Lv et al., 2015; Memon et al., 2016).

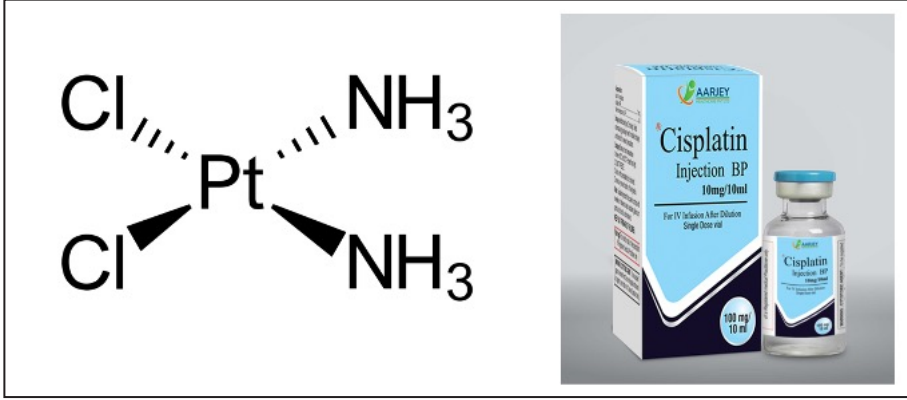


Şekil 12. Proteaz inhibitörü Ritonavir (Imam et al., 2023)

6.4. Sisplatin Gibi Anti-Kanser İlaçları

Capivasertib, Taxol ve sisplatin gibi çeşitli kanser karşıtı ilaçların etkinliği kanıtlanmıştır. 1960'larda araştırmalar sırasında bulunan sisplatin, 1978'de kanser tedavisinde kullanılmak üzere lisanslanan platin bazlı bir kemoterapötik ilaçtır (Aldossary, 2019) (Şekil 13). Sisplatin aslında tesadüfi bir keşfin sonucudur. Dr. Rosenberg ve ark.ları, laboratuvarında platin elektrotları *E. coli* bakterileri içeren bir çözeltiye daldırdılar ve gücü açtılar çünkü platinin biyolojik aktivitesi olmadığına inanılıyordu. Bakteri hücreleri genişlemeye devam ederek normal uzunluklarının 300 katına ulaştı, ancak akım başlar başlamaz bölünmeyi bıraktılar (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014; Tchounwou et al., 2021). Elektrikler kesildiğinde bakteri hücreleri bir kez daha bölünmeye başladı. Hücre bölünmesinin elektrik alanı tarafından düzenlendiği ortaya çıktı. Elektrik alanı yerine, elektrotlardan yayılan bir platin bileşiği hücre bölünmesini önliyordu. Dr. Rosenberg'in grubu, iki yıl sonra hücre bölünmesi üzerinde bu kadar önemli bir etkiye sahip olan maddeyi keşfetti. Bunun için sonraki adım sisplatin (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014; Rosenberg, 1980). Sarkomlara, lenfomalara, germ hücreli tümörlere, karsinomlara ve diğer kanser türlerine karşı yüksek etki göstermiştir. DNA üzerindeki pürin bazları ile çapraz bağlar oluşturma kapasitesi, etki şekline bağlanmıştır. Bu çapraz bağlanma, DNA onarım sistemlerine müdahale eder, DNA'ya zarar verir ve sonuçta kanser hücrelerinin apoptoza uğramasına neden olur (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014; Tchounwou et al., 2021). Ancak, karboplatin, oksaliplatin ve diğer platin içeren antikanser ilaçlarında ilaç direnci ve ciddi böbrek problemleri, alerjik reaksiyonlar, enfeksiyonlara karşı bağışıklığın azalması, gastrointestinal bozukluklar, kanama ve iştah kaybı gibi bir dizi olumsuz yan etki nedeniyle kullanılmıştır (Kelland, 2007; C. Zhang et al., 2022). İlaç direnciyle mücadele etmek ve toksisiteyi azaltmak için, sisplatin ve diğer ilaçları içeren kombinasyon tedavileri çok dikkat çekmiştir. Cis-diklorodiaminplatin (II)'nin bu durumdan sorumlu ajan olduğu tespit edildiğinden, kanser tedavisinde platin, paladyum ve diğer soy metallerin koordinasyon komplekslerinin uygulanmasına büyük ilgi uyandırmıştır (Dasari and Bernard Tchounwou, 2014; Kelland, 2007; C. Zhang et al., 2022). Bu ilaçlar kanserin tedavi

edilme şeklini değiştirmiştir ve kanser hastalarının daha uzun yaşamasına yardımcı olmuştur. İlaç direnci ciddi bir sorundur ve ciddi yan etkileri olabilir. Bu kısıtlamalar, kombinasyon işlemleri ve nanopartikül formülasyonlarının kullanılmasıyla ele alınmaktadır (Aldossary, 2019; Kelland, 2007).



Şekil 13. Platin bazlı kemoterapötik sisplatin (Basotra et al., 2013)

Sonuç olarak, *in vitro* klinik öncesi testlerin rolü, *in vitro* ve *in vivo* verilerin entegrasyonuna ve ilaç geliştirme aşamasındaki başarı oranlarının artırılmasına katkıda bulunmak açısından çok önemlidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abarca Lachén, E., Hernando Martínez, P., and Gilaberte Calzada, Y. The Most Useful Pharmaceutical Formulations (Individualized Medications) in Pediatric Dermatology: A Review. In *Actas Dermo-Sifiliograficas*. 112, 4. <https://doi.org/10.1016/j.ad.2020.11.006> (2021)
- Abhyankar, V., Bland, P., and Fernandes, G. The Role of Systems Biologic Approach in Cell Signaling and Drug Development Responses-A Mini Review. In *Medical sciences (Basel, Switzerland)*. 6, 2. <https://doi.org/10.3390/medsci6020043> (2018)
- Adan, A., Kiraz, Y., and Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 17,14. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513> (2016)
- Ajjarapu, S. M., Tiwari, A., and Kumar, S. Applications and Utility of Three-Dimensional In Vitro Cell Culture for Therapeutics. *Future Pharmacology*. 3,1. <https://doi.org/10.3390/futurepharmacol3010015> (2023)
- Aldossary, S. A. Review on pharmacology of cisplatin: Clinical use, toxicity and mechanism of resistance of cisplatin. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 12,1. <https://doi.org/10.13005/bpj/1608> (2019)
- Aslantürk, Ö. S. In Vitro Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In *Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923> (2018)
- Atta-Ur-Rahman, and Choudhary, M. I. Anti-Angiogenesis Drug Discovery and Development. In *Anti-Angiogenesis Drug Discovery and Development*. 2. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-04316-X> (2015)
- Attwood, M. M., Fabbro, D., Sokolov, A. V., Knapp, S., and Schiöth, H. B. Trends in kinase drug discovery: targets, indications and inhibitor design. In *Nature Reviews Drug Discovery*. 20, 11. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00252-y> (2021)

- Auerbach, R., Lewis, R., Shinnars, B., Kubai, L., and Akhtar, N. Angiogenesis assays: A critical overview. In *Clinical Chemistry*. 49, 1. <https://doi.org/10.1373/49.1.32> (2003)
- Auld, D. S., Farnen, M. W., Kahl, S. D., Kriauciunas, A., McKnight, K. L., Montrose, C., and Weidner, J. R. Receptor Binding Assays for HTS and Drug Discovery. In *Assay Guidance Manual*. (2004)
- Badr-Eldin, S. M., Aldawsari, H. M., Kotta, S., Deb, P. K., and Venugopala, K. N. Three-Dimensional In Vitro Cell Culture Models for Efficient Drug Discovery: Progress So Far and Future Prospects. In *Pharmaceuticals*. 15, 8. <https://doi.org/10.3390/ph15080926> (2022)
- Basotra, M., Singh, S. K., and Gulati, M. Development and Validation of a Simple and Sensitive Spectrometric Method for Estimation of Cisplatin Hydrochloride in Tablet Dosage Forms: Application to Dissolution Studies. *ISRN Analytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1155/2013/936254> (2013)
- Belfiore, L., Aghaei, B., Law, A. M. K., Dobrowolski, J. C., Raftery, L. J., Tjandra, A. D., Yee, C., Piloni, A., Volkerling, A., Ferris, C. J., and Engel, M. Generation and analysis of 3D cell culture models for drug discovery. In *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 163. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2021.105876> (2021)
- Bennett, M. Trials and tribulations. In *PEI Power Engineering International*. 8, 3. <https://doi.org/10.7748/ldp.2.4.12.s13> (2000)
- Berisio, R. Molecular Biomarkers of Disease for Diagnosis and Drug Development. *Current Medicinal Chemistry*. 26, 11. <https://doi.org/10.2174/092986732611190628090938> (2019)
- Berry, W. L., and Wallace, A. Toxicity: The Concept and Relationship to the Dose Response Curve. *Journal of Plant Nutrition*. 3, 1–4. <https://doi.org/10.1080/01904168109362814> (1981)
- Bezabeh, T., Mowat, M. R. A., Jarolim, L., Greenberg, A. H., and Smith, I. C. P. Detection of drug-induced apoptosis and necrosis in human cervical carcinoma cells using ¹H NMR spectroscopy. *Cell Death and Differentiation*. 8,3. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400802> (2001)
- Biala, G., Kedzierska, E., Kruk-Slomka, M., Orzelska-Gorka, J., Hmaidan, S., Skrok, A., Kaminski, J., Havrankova, E., Nadaska, D., and Malik, I. Research in the Field of Drug Design and Development. In *Pharmaceuticals*. 16,9. <https://doi.org/10.3390/ph16091283> (2023)
- Bickle, M. The beautiful cell: High-content screening in drug discovery. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 398, 1. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3788-3> (2010)
- Blanco-González, A., Cabezon, A., Seco-González, A., Conde-Torres, D., Antelo-Riveiro, P., Piñeiro, Á., and Garcia-Fandino, R. The Role of AI in Drug Discovery: Challenges, Opportunities, and Strategies. In *Pharmaceuticals*. 16, 6. <https://doi.org/10.3390/ph16060891> (2023)
- Blanco, M. J., and Gardinier, K. M. New Chemical Modalities and Strategic Thinking in Early Drug Discovery. In *ACS Medicinal Chemistry Letters*. 11, 3. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00582> (2020)
- Blass, B. E. Basic Principles of Drug Discovery and Development. In *Basic Principles of Drug Discovery and Development*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817214-8.00015-4> (2021)
- Bobadilla, A. V. P., Arévalo, J., Sarró, E., Byrne, H. M., Maini, P. K., Carraro, T., Balocco, S., Meseguer, A., and Alarcón, T. In vitro cell migration quantification method for scratch assays. *Journal of the Royal Society Interface*. 16, 151. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0709> (2019)
- Borcherding, S. M. Drugs: From Discovery to Approval. *Journal of Pharmacy Technology*. 20, 6. <https://doi.org/10.1177/875512250402000621> (2004)
- Bradley, P. Comparing In Vitro and In Vivo Models as Part of Pre-Clinical Studies for COVID-19 Medicines. *Youth STEM Matters*. 1(1)27–29. <https://doi.org/10.51892/ysm.1.202103> (2021)
- Brauchle, E., Thude, S., Brucker, S. Y., and Schenke-Layland, K. Cell death stages in single apoptotic and necrotic cells monitored by Raman microspectroscopy. *Scientific Reports*. 4. <https://doi.org/10.1038/srep04698> (2014)
- Brouwer, K. L. R., Keppler, D., Hoffmaster, K. A., Bow, D. A. J., Cheng, Y., Lai, Y., Palm, J. E., Stieger, B., and Evers, R. In vitro methods to support transporter evaluation in drug discovery and development. In *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 94, 1. <https://doi.org/10.1038/clpt.2013.81> (2013)
- Buchser, W. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening , High Content Analysis and High Content Imaging Assay Guidance Manual. *Pubmed*. 1, 1. (2014)
- Burden, N., Clift, M. J. D., Jenkins, G. J. S., Labram, B., and Sewell, F. Opportunities and Challenges for Integrating New In Vitro Methodologies in Hazard Testing and Risk Assessment. In *Small*. 17, 15. <https://doi.org/10.1002/sml.202006298> (2021)
- Bylund, D. B., and Enna, S. J. Receptor Binding Assays and Drug Discovery. In *Advances in Pharmacology*. 82. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2017.08.007> (2018)

- Byron, S. A., Van Keuren-Jensen, K. R., Engelthaler, D. M., Carpten, J. D., and Craig, D. W. Translating RNA sequencing into clinical diagnostics: Opportunities and challenges. In *Nature Reviews Genetics*. 17, 5. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.10> (2016)
- Cao, Y., Langer, R., and Ferrara, N. Targeting angiogenesis in oncology, ophthalmology and beyond. In *Nature Reviews Drug Discovery*. 22,6. <https://doi.org/10.1038/s41573-023-00671-z> (2023)
- Capula, M., Corno, C., Hassouni, B. E. L., Petri, G. L. I., and Arandelović, S. A brief guide to performing pharmacological studies in vitro: Reflections from the EORTC-PAMM Course “Preclinical and Early-phase Clinical Pharmacology.” In *Anticancer Research*. 39,7. <https://doi.org/10.21873/anticancer.13485> (2019)
- Cardoso, B. D., Castanheira, E. M. S., Lanceros-Méndez, S., and Cardoso, V. F. Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventional to Microfluidic Strategies. In *Advanced Healthcare Materials*. 12,18. <https://doi.org/10.1002/adhm.202202936> (2023)
- Carpenter, J. R. A method for presenting and comparing dose-response curves. *Journal of Pharmacological Methods*. 15, 4. [https://doi.org/10.1016/0160-5402\(86\)90009-4](https://doi.org/10.1016/0160-5402(86)90009-4) (1986)
- Chan, L. L. Y., Lai, N., Wang, E., Smith, T., Yang, X., and Lin, B. A rapid detection method for apoptosis and necrosis measurement using the Cellometer imaging cytometry. *Apoptosis*. 16,12. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0651-8> (2011)
- Chang, Y., Hawkins, B. A., Du, J. J., Groundwater, P. W., Hibbs, D. E., and Lai, F. A Guide to In Silico Drug Design. In *Pharmaceutics*. 15,1. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010049> (2023)
- Chatterjee, M., and Roy, K. Computational Modeling of Mixture Toxicity. In *Methods in Molecular Biology*. 2425. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1960-5_22 (2022)
- Chen, A., Qin, X., Tang, Y., Liu, M., and Wang, X. Evaluation of enzyme inhibition kinetics in drug-drug interactions. *Chemico-Biological Interactions*. 222. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.10.010> (2014)
- Chen, C. T., and Kesselheim, A. S. Journey of generic imatinib: A case study in oncology drug pricing. In *Journal of Oncology Practice*. 13,6. <https://doi.org/10.1200/JOP.2016.019737> (2017)
- Chung, T. D. Y., Terry, D. B., and Smith, L. H. In Vitro and In Vivo Assessment of ADME and PK Properties During Lead Selection and Lead Optimization – Guidelines, Benchmarks and Rules of Thumb. In *Assay Guidance Manual*. (2004)
- Cronin, J. M., and Yu, A. M. Recombinant Technologies Facilitate Drug Metabolism, Pharmacokinetics, and General Biomedical Research. *Drug Metabolism and Disposition*. 51,6. <https://doi.org/10.1124/dmd.122.001008> (2023)
- Currie, G. M. Pharmacology, part 1: Introduction to pharmacology and pharmacodynamics. *Journal of Nuclear Medicine Technology*. 46,2. <https://doi.org/10.2967/jnmt.117.199588> (2018)
- Dasari, S., and Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology*. 740. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025> (2014)
- De Jong, L. A. A., Uges, D. R. A., Franke, J. P., and Bischoff, R. Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 829, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.10.002> (2005)
- De Lanerolle, G., Phiri, P., and Haroon, A. Clinical Trials and Tribulations. In *Clinical Trials and Tribulations*. <https://doi.org/10.1016/C2019-0-04361-0> (2023)
- Detle, H., Kiss, C., Benda, N., and Bretz, F. Optimal designs for dose finding studies with an active control. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*. 76,1. <https://doi.org/10.1111/rssb.12030> (2014)
- Dezfooli, S. M., Dkhar, L., Long, A., Gholizadeh, H., Mohammadi, S., Greene, C. A., and Seyfoddin, A. Formulation development and characterization. In *Engineering Drug Delivery Systems*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102548-2.00003-2> (2019)
- Dmitriev, A. V., Lagunin, A. A., Karasev, D. A., Rudik, A. V., Pogodin, P. V., Filimonov, D. A., and Poroikov, V. V. Prediction of Drug-Drug Interactions Related to Inhibition or Induction of Drug-Metabolizing Enzymes. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 19,5. <https://doi.org/10.2174/1568026619666190123160406> (2019)
- Dorrington, M. G., and Fraser, I. D. C. NF-κB signaling in macrophages: Dynamics, crosstalk, and signal integration. In *Frontiers in Immunology*. 10, APR. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00705> (2019)
- Duan, G., Xu, B., Yuan, X., and Song, S. High-throughput screening technologies for ion channel drug discovery. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*. 30,10. <https://doi.org/10.5246/jcps.2021.10.066> (2021)
- Dudda, A., and Kuerzel, G. U. Drug-drug interaction: Enzyme inhibition. In *Drug Discovery and Evaluation: Safety and Pharmacokinetic Assays, Second Edition*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-25240-2_44 (2013)

- Duelen, R., Corvelyn, M., Tortorella, I., Leonardi, L., Chai, Y. C., and Sampaolesi, M. Medicinal Biotechnology for Disease Modeling, Clinical Therapy, and Drug Discovery and Development. In *Introduction to Biotech Entrepreneurship: From Idea to Business: A European Perspective*. https://doi.org/10.1007/978-3-030-22141-6_5 (2019)
- Dunlop, J., Bowlby, M., Peri, R., Tawa, G., LaRocque, J., Soloveva, V., and Morin, J. Ion Channel Screening. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*.11,7. <https://doi.org/10.2174/138620708785204117> (2008)
- Eccles, S. A., Box, C., and Court, W. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. In *Biotechnology Annual Review*. 11,SUPPL.). [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(05\)11013-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(05)11013-8) (2005)
- Elmore, S.A., Dixon, D., Hailey, J. R., Harada, T., Herbert, R. A., Maronpot, R. R., Nolte, T., Rehg, J. E., Rittinghausen, S., Rosol, T. J., Satoh, H., Vidal, J. D., Willard-Mack, C. L., and Creasy, D. M. Recommendations from the INHAND Apoptosis/Necrosis Working Group. *Toxicologic Pathology*.44,2. <https://doi.org/10.1177/0192623315625859> (2016)
- Engel, A. Viability, Cell. In *Encyclopedia of Immunotoxicology*.955–962. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54596-2_1554 (2016)
- Enkvetchakul, D., Bhattacharyya, J., Jeliaskova, I., Groesbeck, D. K., Cukras, C. A., and Nichols, C. G. Functional characterization of a prokaryotic Kir channel. *Journal of Biological Chemistry*.279,45. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400417200> (2004)
- Fang, Y., and Eglén, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. In *SLAS Discovery*. 22,5. <https://doi.org/10.1177/1087057117696795> (2017)
- Ferdousi, R., Safdari, R., and Omid, Y. Computational prediction of drug-drug interactions based on drugs functional similarities. *Journal of Biomedical Informatics*.70. <https://doi.org/10.1016/j.jbi.2017.04.021> (2017)
- Flynn, N. R., Miller, G. P., and Swamidass, S. J. Editorial: Advancements in computational studies of drug toxicity. In *Frontiers in Pharmacology*. 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1230409> (2023)
- Foglizzo, V., Cocco, E., and Marchiò, S. Advanced Cellular Models for Preclinical Drug Testing: From 2D Cultures to Organ-on-a-Chip Technology. In *Cancers*. 14,15. <https://doi.org/10.3390/cancers14153692> (2022)
- Folkman, J. Angiogenesis: An organizing principle for drug discovery? *Nature Reviews Drug Discovery*.6,4. <https://doi.org/10.1038/nrd2115> (2007)
- Fraietta, I., and Gasparri, F. The development of high-content screening (HCS) technology and its importance to drug discovery. In *Expert Opinion on Drug Discovery*.11,5. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1165203> (2016)
- Geldof, L., Tudela, E., Lootens, L., van Lysebeth, J., Meuleman, P., Leroux-Roels, G., van Eenoo, P., and Deventer, K. In vitro and in vivo metabolism studies of dimethazine. *Biomedical Chromatography*.30,8. <https://doi.org/10.1002/bmc.3668> (2016)
- Geronikaki, A. Recent Trends in Enzyme Inhibition and Activation in Drug Design. In *Molecules*. 26,1. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26010017> (2021)
- Ghallab, A. In vitro test systems and their limitations. In *EXCLI Journal*. 12). (2013a)
- Ghallab, A. Letter to the editor: IN VITRO TEST SYSTEMS AND THEIR LIMITATIONS. *EXCLI Journal*.1212. (2013b)
- Ghallab, A., and Bolt, H. M. In vitro systems: current limitations and future perspectives. In *Archives of Toxicology*. 88,12. <https://doi.org/10.1007/s00204-014-1404-6> (2014)
- Ghosh, A. K., Osswald, H. L., and Prato, G. Recent Progress in the Development of HIV-1 Protease Inhibitors for the Treatment of HIV/AIDS. In *Journal of Medicinal Chemistry*.59,11. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01697> (2016)
- Giacomini, K. M., Huang, S. M., Tweedie, D. J., Benet, L. Z., Brouwer, K. L. R., Chu, X., Dahlin, A., Evers, R., Fischer, V., Hillgren, K. M., Hoffmaster, K. A., Ishikawa, T., Keppler, D., Kim, R. B., Lee, C. A., Niemi, M., Polli, J. W., Sugiyama, Y., Swaan, P. W., ... Zhang, L. Membrane transporters in drug development. In *Nature Reviews Drug Discovery*. 9,3. <https://doi.org/10.1038/nrd3028> (2010)
- Giuliano, K. A., Haskins, J. R., and Taylor, D. L. Advances in high content screening for drug discovery. *Assay and Drug Development Technologies*.1,4. <https://doi.org/10.1089/154065803322302826> (2003)
- Goh, J. Y., Weaver, R. J., Dixon, L., Platt, N. J., and Roberts, R. A. Development and use of *in vitro* alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980-2013. *Toxicology Research*.4,5. <https://doi.org/10.1039/c5tx00123d> (2015)

- Gromova, M., Vaggelas, A., Dallmann, G., and Seimetz, D. Biomarkers: Opportunities and Challenges for Drug Development in the Current Regulatory Landscape. In *Biomarker Insights*.15. <https://doi.org/10.1177/1177271920974652> (2020)
- Holdgate, G. A., Meek, T. D., and Grimley, R. L. Mechanistic enzymology in drug discovery: A fresh perspective. In *Nature Reviews Drug Discovery*. 17,2. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.219> (2018)
- Holloway, P. W. A simple procedure for removal of triton X-100 from protein samples. *Analytical Biochemistry*.53,1. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(73\)90436-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(73)90436-3) (1973)
- Hosseini-Shokouh, S. J., Sheikhi, R., Hosseini, S., and Moradimajd, P. The biological weapons threats and coping strategies for health promotion. *Journal of Education and Health Promotion*.10,1. https://doi.org/10.4103/jehp.jehp_717_20 (2021)
- Hu, C., and Yang, W. Alternatives to animal models to study bacterial infections. In *Folia Microbiologica*. 68,5. <https://doi.org/10.1007/s12223-023-01084-6> (2023)
- Hu, X. M., Li, Z. X., Lin, R. H., Shan, J. Q., Yu, Q. W., Wang, R. X., Liao, L. S., Yan, W. T., Wang, Z., Shang, L., Huang, Y., Zhang, Q., and Xiong, K. Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 9. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690> (2021)
- Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., and Philpott, K. L. Principles of early drug discovery. In *British Journal of Pharmacology*. 162,6. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x> (2011)
- Hulkower, K. I., and Herber, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. In *Pharmaceutics*. 3,1. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107> (2011)
- Hunter, F. W., Barker, H. R., Lipert, B., Rothé, F., Gebhart, G., Piccart-Gebhart, M. J., Sotiriou, C., and Jamieson, S. M. F. Mechanisms of resistance to trastuzumab emtansine (T-DM1) in HER2-positive breast cancer. In *British Journal of Cancer*. 122,5. <https://doi.org/10.1038/s41416-019-0635-y> (2020)
- Huskin, G., Chen, J., Davis, T., and Jun, H. W. Tissue-Engineered 3D In Vitro Disease Models for High-Throughput Drug Screening. In *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*.20,4. <https://doi.org/10.1007/s13770-023-00522-3> (2023)
- Huyck, L., Ampe, C., and Van Troys, M. The XTT cell proliferation assay applied to cell layers embedded in three-dimensional matrix. *Assay and Drug Development Technologies*.10,4. <https://doi.org/10.1089/adt.2011.391> (2012)
- Imam, M. S., Batubara, A. S., Gamal, M., Abdelazim, A. H., Almrasy, A. A., and Ramzy, S. Adjusted green HPLC determination of nirmatrelvir and ritonavir in the new FDA approved co-packaged pharmaceutical dosage using supported computational calculations. *Scientific Reports*.13,1. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-26944-y> (2023)
- Iqbal, D., Khan, M. S., Waiz, M., Rehman, M. T., Alaidarous, M., Jamal, A., Alothaim, A. S., Alajmi, M. F., Alshehri, B. M., Banawas, S., Alsaweed, M., Madkhali, Y., Algarni, A., Alsagaby, S. A., and Alturaiki, W. Exploring the binding pattern of geraniol with acetylcholinesterase through in silico docking, molecular dynamics simulation, and *in vitro* enzyme inhibition kinetics studies. *Cells*.10,12. <https://doi.org/10.3390/cells10123533> (2021)
- Iqbal, N., and Iqbal, N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemotherapy Research and Practice*.2014. <https://doi.org/10.1155/2014/357027> (2014)
- Iqbal, N., and Iqbal, N. Corrigendum to “Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer.” *Chemotherapy Research and Practice*.2020. <https://doi.org/10.1155/2020/1375374> (2020)
- Jacobsen, A. C., Visentin, S., Butnarusu, C., Stein, P. C., and di Cagno, M. P. Commercially Available Cell-Free Permeability Tests for Industrial Drug Development: Increased Sustainability through Reduction of In Vivo Studies. In *Pharmaceutics*. 15,2. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15020592> (2023)
- Jani, M., and Krajcsi, P. In vitro methods in drug transporter interaction assessment. In *Drug Discovery Today: Technologies*. 12. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.03.011> (2014)
- Jeyakumar, A., and Younis, T. Trastuzumab for HER2-positive metastatic breast cancer: Clinical and economic considerations. In *Clinical Medicine Insights: Oncology*. 6. <https://doi.org/10.4137/CMO.S6460> (2012)
- Jia, L., and Liu, X. The Conduct of Drug Metabolism Studies Considered Good Practice (II): In Vitro Experiments. *Current Drug Metabolism*.8,8. <https://doi.org/10.2174/138920007782798207> (2007)
- Johansson, J., Larsson, M. H., and Hornberg, J. J. Predictive *in vitro* toxicology screening to guide chemical design in drug discovery. In *Current Opinion in Toxicology*.15. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.08.005> (2019)
- Jubelin, C., Muñoz-García, J., Griscom, L., Cochonneau, D., Ollivier, E., Heymann, M. F., Vallette, F. M., Oliver, L., and Heymann, D. Three-dimensional *in vitro* culture models in oncology research. In *Cell and Bioscience*. 12,1. <https://doi.org/10.1186/s13578-022-00887-3> (2022)

- Justus, C. R., Marie, M. A., Sanderlin, E. J., and Yang, L. V. Transwell In Vitro Cell Migration and Invasion Assays. In *Methods in Molecular Biology*. 2644. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-3052-5_22 (2023)
- Kabir, M. H., Patrick, R., Ho, J. W. K., and O'Connor, M. D. Identification of active signaling pathways by integrating gene expression and protein interaction data. *BMC Systems Biology*.12. <https://doi.org/10.1186/s12918-018-0655-x> (2018)
- Kaczorowski, G. J., McManus, O. B., Priest, B. T., and Garcia, M. L. Ion channels as drug targets: The next GPCRs. In *Journal of General Physiology*. 131,5. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709946> (2008)
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., and Capanoglu, E. Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*.1,3. <https://doi.org/10.1002/fft2.44> (2020)
- Kari, S., Subramanian, K., Altomonte, I. A., Murugesan, A., Yli-Harja, O., and Kandhavelu, M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. In *Apoptosis*. 27, 7–8. <https://doi.org/10.1007/s10495-022-01735-y> (2022)
- Kato, G. Use of the Drug-Receptor Binding Assay for Drug Screening. *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*.19,4. <https://doi.org/10.1021/i360076a017> (1980)
- Kelland, L. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. In *Nature Reviews Cancer*. 7,8. <https://doi.org/10.1038/nrc2167> (2007)
- Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J., and Kroemer, G. Cell death assays for drug discovery. In *Nature Reviews Drug Discovery*. 10,3. <https://doi.org/10.1038/nrd3373> (2011)
- Khan, S., Ullah, M. W., Siddique, R., Nabi, G., Manan, S., Yousaf, M., and Hou, H. Role of recombinant DNA technology to improve life. In *International Journal of Genomics*.2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2405954> (2016)
- Koes, D. R. Pharmacophore Modeling: Methods and Applications. In *Methods in Pharmacology and Toxicology*. https://doi.org/10.1007/7653_2015_46 (2015)
- Kondo, S., Yoshida, K., Suzuki, M., Saito, I., and Kanegae, Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication. *PLoS ONE*.9,10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108627> (2014)
- Krause, C., Suwada, K., Blomme, E. A. G., Kowalkowski, K., Liguori, M. J., Mahalingaiah, P. K., Mittelstadt, S., Peterson, R., Rendino, L., Vo, A., and Van Vleet, T. R. Preclinical species gene expression database: Development and meta-analysis. *Frontiers in Genetics*.13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1078050> (2023)
- Kumar, G. N., and Surapaneni, S. Role of drug metabolism in drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews*.21,5. <https://doi.org/10.1002/med.1016> (2001)
- Lage, O. M., Ramos, M. C., Calisto, R., Almeida, E., Vasconcelos, V., and Vicente, F. Current screening methodologies in drug discovery for selected human diseases. In *Marine Drugs*.16,8. <https://doi.org/10.3390/md16080279> (2018)
- Langhans, S. A. Three-dimensional *in vitro* cell culture models in drug discovery and drug repositioning. In *Frontiers in Pharmacology*. 9,JAN. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00006> (2018)
- Larsson, P., Engqvist, H., Biermann, J., Werner Rönnerman, E., Forssell-Aronsson, E., Kovács, A., Karlsson, P., Helou, K., and Parris, T. Z. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens. *Scientific Reports*.10,1. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62848-5> (2020)
- Lekshmi, A., Varadarajan, S. N., Lupitha, S. S., Indira, D., Ann Mathew, K., Nair, A. C., Nair, M., Prasad, T., Sekar, H., Gopalakrishnan, A. K., Murali, A., and Santhoshkumar, T. R. A quantitative real-time approach for discriminating apoptosis and necrosis. *Cell Death Discovery*.3. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2016.101> (2017)
- Lenin, S., Ponthier, E., Scheer, K. G., Yeo, E. C. F., Tea, M. N., Ebert, L. M., Mansilla, M. O., Poonnoose, S., Baumgartner, U., Day, B. W., Ormsby, R. J., Pitson, S. M., and Gomez, G. A. A drug screening pipeline using 2d and 3d patient-derived *in vitro* models for pre-clinical analysis of therapy response in glioblastoma. *International Journal of Molecular Sciences*.22,9. <https://doi.org/10.3390/ijms22094322> (2021)
- Lewin, D. A., and Weiner, M. P. Molecular biomarkers in drug development. In *Drug Discovery Today*. 9,22. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(04\)03272-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(04)03272-6) (2004)
- Leysen, J. E., Langlois, X., Heylen, L., and Lammertsma, A. A. Receptors: Binding Assays. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36172-2_207 (2015)
- Liesch, M., Grune, B., Seiler, A., Butzke, D., Oelgeschläger, M., Pirow, R., Adler, S., Riebeling, C., and Luch, A. Alternatives to animal testing: Current status and future perspectives. In *Archives of Toxicology*. 85,8. <https://doi.org/10.1007/s00204-011-0718-x> (2011)

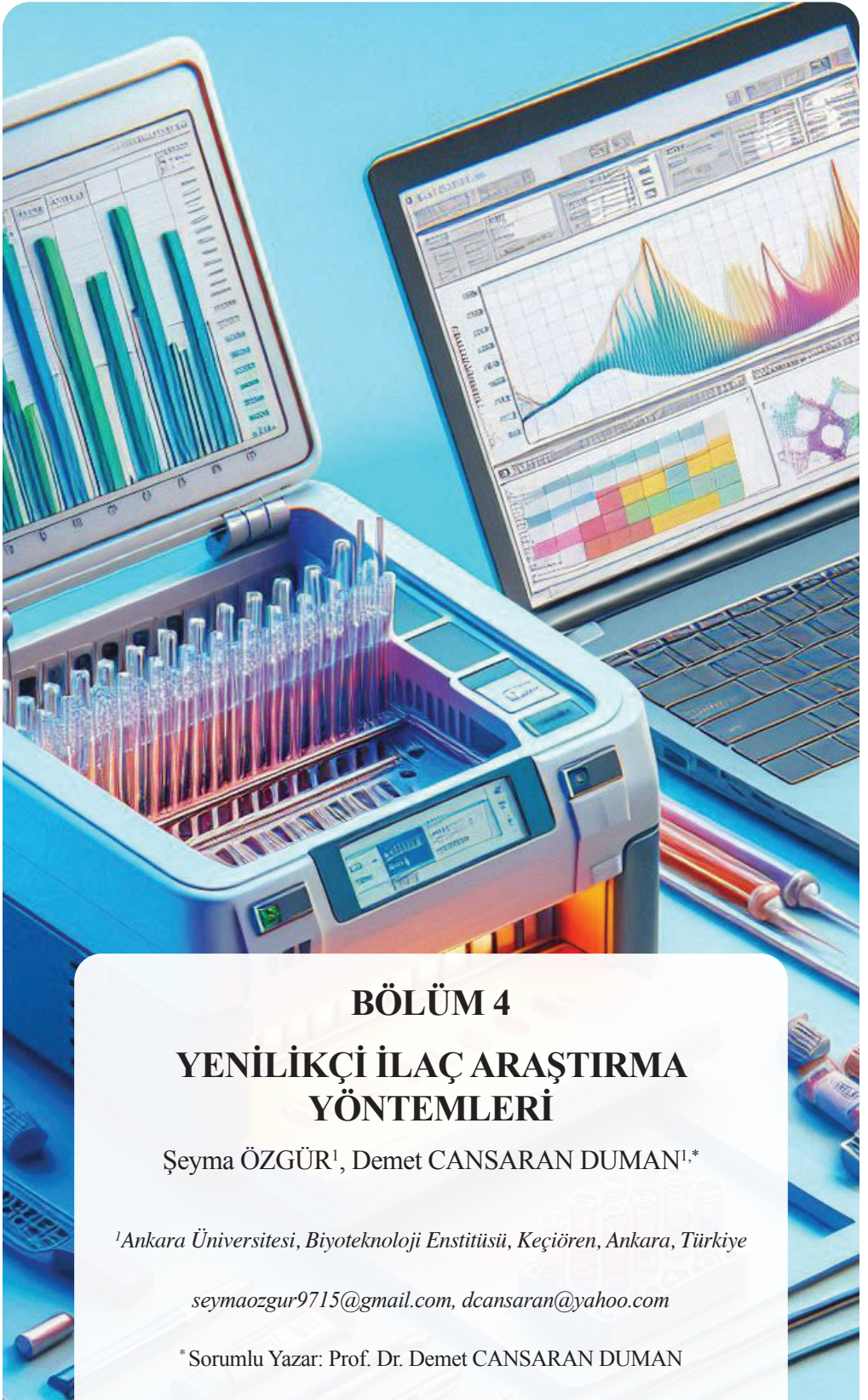
- Lin, S., Schorpp, K., Rothenaigner, I., and Hadian, K. Image-based high-content screening in drug discovery. In *Drug Discovery Today*. 25,8. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.06.001> (2020)
- Lock, A., Cornish, J., and Musson, D. S. The role of *in vitro* immune response assessment for biomaterials. In *Journal of Functional Biomaterials*. 10,3. <https://doi.org/10.3390/jfb10030031> (2019)
- Luffer-Atlas, D., and Atrakchi, A. A decade of drug metabolite safety testing: industry and regulatory shared learning. In *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*.13,9. <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1364362> (2017)
- Lv, Z., Chu, Y., and Wang, Y. HIV protease inhibitors: A review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS - Research and Palliative Care*.7. <https://doi.org/10.2147/HIV.S79956> (2015)
- Ma, W., Yang, L., and He, L. Overview of the detection methods for equilibrium dissociation constant KD of drug-receptor interaction. In *Journal of Pharmaceutical Analysis*.8,3. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2018.05.001> (2018)
- Maadi, H., Soheilifar, M. H., Choi, W. S., Moshtaghian, A., and Wang, Z. Trastuzumab mechanism of action; 20 years of research to unravel a dilemma. In *Cancers*. 13,14. <https://doi.org/10.3390/cancers13143540> (2021)
- Madorran, E., Stožer, A., Bevc, S., and Maver, U. In vitro toxicity model: Upgrades to bridge the gap between preclinical and clinical research. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*.20,2. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2019.4378> (2020)
- Maes, M., Vanhaecke, T., Cogliati, B., Yanguas, S. C., Willebrords, J., Rogiers, V., and Vinken, M. Measurement of apoptotic and necrotic cell death in primary hepatocyte cultures. In *Methods in Molecular Biology*. 1250. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_27 (2015)
- Maksimovic-Ivanic, D., Fagone, P., McCubrey, J., Bendtzen, K., Mijatovic, S., and Nicoletti, F. HIV-protease inhibitors for the treatment of cancer: Repositioning HIV protease inhibitors while developing more potent NO-hybridized derivatives? In *International Journal of Cancer*.140,8. <https://doi.org/10.1002/ijc.30529> (2017)
- Martin, H. L., Adams, M., Higgins, J., Bond, J., Morrison, E. E., Bell, S. M., Warriner, S., Nelson, A., and Tomlinson, D. C. High-content, high-throughput screening for the identification of cytotoxic compounds based on cell morphology and cell proliferation markers. *PLoS ONE*.9,2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088338> (2014)
- McKim Jr., J. Building a Tiered Approach to In Vitro Predictive Toxicity Screening: A Focus on Assays with In Vivo Relevance. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*.13,2. <https://doi.org/10.2174/138620710790596736> (2010)
- McManus, O. B., Garcia, M. L., Weaver, D., Bryant, M., Titus, S., and Herrington, J. Ion Channel Screening Trends. *Assay Guidance Manual*. (2012)
- Meibohm, B., and Derendorf, H. Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development. In *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 91,1. <https://doi.org/10.1002/jps.1167> (2002)
- Memon, N., Weinberger, B. I., Hegyi, T., and Aleksunes, L. M. LiverTox: Clinical and Research Information on DrugInduced Liver Injury [Internet]. In *Pediatr Res.* 176,1. (2016)
- Mencher, S. K., and Wang, L. G. Promiscuous drugs compared to selective drugs (promiscuity can be a virtue). *BMC Clinical Pharmacology*.5. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-5-3> (2005)
- Mohs, R. C., and Greig, N. H. Drug discovery and development: Role of basic biological research. In *Alzheimer's and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*.3,4. <https://doi.org/10.1016/j.trci.2017.10.005> (2017)
- Mortlock, A., Foote, K., Kettle, J., and Aquila, B. Kinase Inhibitors in Cancer. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.11033-9> (2014)
- Mousseau, Y., Mollard, S., Qiu, H., Richard, L., Cazal, R., Nizou, A., Vedrenne, N., Rémi, S., Baaj, Y., Fourcade, L., Funalot, B., and Sturtz, F. G. In vitro 3D angiogenesis assay in egg white matrix: Comparison to Matrigel, compatibility to various species, and suitability for drug testing. *Laboratory Investigation*.94,3. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2013.150> (2014)
- National Research Council. Summary of Advantages and Disadvantages of In Vitro and In Vivo Methods. In *Monoclonal Antibody Production*. (2000)
- Nichols, A. High content screening as a screening tool in drug discovery. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*.356. <https://doi.org/10.1385/1-59745-217-3:379> (2007)
- O'quigley, J. Non-parametric optimal design in dose finding studies. *Biostatistics*.3,1. <https://doi.org/10.1093/biostatistics/3.1.51> (2002)

- Osakwe, O. Preclinical In Vitro Studies: Development and Applicability. In *Social Aspects of Drug Discovery, Development and Commercialization*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802220-7.00006-5> (2016)
- Ouyang, D., and Smith, S. C. Computational Pharmaceutics: Application of Molecular Modeling in Drug Delivery. In *Computational Pharmaceutics: Application of Molecular Modeling in Drug Delivery*. <https://doi.org/10.1002/9781118573983> (2015)
- Pacienza, N., Lee, R. H., Bae, E. H., Kim, D. ki, Liu, Q., Prockop, D. J., and Yannarelli, G. In Vitro Macrophage Assay Predicts the In Vivo Anti-inflammatory Potential of Exosomes from Human Mesenchymal Stromal Cells. *Molecular Therapy Methods and Clinical Development*.13. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2018.12.003> (2019)
- Patek, S. D., Bequette, B. W., Breton, M., Buckingham, B. A., Dassau, E., Doyle, F. J., Lum, J., Magni, L., and Zisser, H. In silico preclinical trials: Methodology and engineering guide to closed-loop control in type 1 diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Science and Technology*.3,2. <https://doi.org/10.1177/193229680900300207> (2009)
- Pérez-Salas, J. L., Moreno-Jiménez, M. R., Rocha-Guzmán, N. E., González-Laredo, R. F., Medina-Torres, L., and Gallegos-Infante, J. A. In Vitro and Ex Vivo Models for Screening Topical Anti-Inflammatory Drugs. In *Scientia Pharmaceutica*. 91,2. <https://doi.org/10.3390/scipharm91020020> (2023)
- Persson, M., Löye, A. F., Jacquet, M., Mow, N. S., Thougard, A. V., Mow, T., and Hornberg, J. J. High-content analysis/screening for predictive toxicology: Application to hepatotoxicity and genotoxicity. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*.115,1. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12200> (2014)
- Phung, M. W., and Dass, C. R. In-vitro and in-vivo assays for angiogenesis-modulating drug discovery and development. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*.58,2. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.2.0001> (2010)
- Pijuan, J., Barceló, C., Moreno, D. F., Maiques, O., Sisó, P., Martí, R. M., Macià, A., and Panosa, A. In vitro cell migration, invasion, and adhesion assays: From cell imaging to data analysis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.7,JUN. <https://doi.org/10.3389/fcell.2019.00107> (2019)
- Pop, L.-A., Zanoaga, O., Chiroi, P., Nutu, A., S. Korban, S., Stefan, C., Irimie, A., and Berindan-Neagoe, I. Microarrays and NGS for Drug Discovery. In *Drug Design - Novel Advances in the Omics Field and Applications*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.96657> (2021)
- Rao, M. S., Van Vleet, T. R., Ciurlionis, R., Buck, W. R., Mittelstadt, S. W., Blomme, E. A. G., and Liguori, M. J. Comparison of RNA-Seq and microarray gene expression platforms for the toxicogenomic evaluation of liver from short-term rat toxicity studies. *Frontiers in Genetics*.10,JAN. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00636> (2019)
- Rao, N., Poojari, T., Poojary, C., Sande, R., and Sawant, S. Drug Repurposing: a Shortcut to New Biological Entities. *Pharmaceutical Chemistry Journal*.56,9. <https://doi.org/10.1007/s11094-022-02778-w> (2022)
- Ready Cell, S. L. Ready-to-use efflux proteins for Drug-Transporter assays. (2023)
- Rieger, A. M., Nelson, K. L., Konowalchuk, J. D., and Barreda, D. R. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *Journal of Visualized Experiments*.50. <https://doi.org/10.3791/2597> (2011)
- Rifaioğlu, A. S., Atas, H., Martin, M. J., Cetin-Atalay, R., Atalay, V., and Doğan, T. Recent applications of deep learning and machine intelligence on in silico drug discovery: Methods, tools and databases. In *Briefings in Bioinformatics*. 20,5. <https://doi.org/10.1093/bib/bby061> (2019)
- Ritz, C., and Strebig, J. C. Package “drc”: Analysis of Dose-Response Curves. R Project. (2016)
- Roggen, E. L. In vitro toxicity testing in the twenty-first century. *Frontiers in Pharmacology*.FEB. <https://doi.org/10.3389/fphar.2011.00003> (2011)
- Romar, G. A., Kupper, T. S., and Divito, S. J. Research techniques made simple: Techniques to assess cell proliferation. In *Journal of Investigative Dermatology*. 136,1. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2015.11.020> (2016)
- Rosenberg, B. CISPLATIN: ITS HISTORY AND POSSIBLE MECHANISMS OF ACTION. In *Cisplatin*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-565050-2.50006-1> (1980)
- Rudrapal, M., Paudel, K. R., and Pangeni, R. Editorial: Drug repurposing and polypharmacology: A synergistic approach in multi-target based drug discovery. In *Frontiers in Pharmacology*.13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1101007> (2022)
- Rui, J., Xu, N., Yin, J. B., Yu, Y., Bai, R., Su, W., and Ruan, B. The EZMTT cell proliferation assay provides precise measurement for drug combinations and better correlation between *in vitro* and *in vivo* efficacy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*.30,11. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127134> (2020)
- Ryeznic, Y., Sverdlov, O., and Hooker, A. C. Adaptive Optimal Designs for Dose-Finding Studies with Time-to-Event Outcomes. *AAPS Journal*.20,1. <https://doi.org/10.1208/s12248-017-0166-5> (2018)

- S., P. Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*.2,2,74–79. <https://doi.org/10.4103/0976-500X.81895> (2011)
- Sawyers, C. L. Herceptin: A First Assault on Oncogenes that Launched a Revolution. In *Cell*. 179,1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.08.027> (2019)
- Sazonova, E. V., Chesnokov, M. S., Zhivotovsky, B., and Kopeina, G. S. Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell Death Discovery*.8,1. <https://doi.org/10.1038/s41420-022-01207-x> (2022)
- Schug, M., Stöber, R., Heise, T., Mielke, H., Gundert-Remy, U., Godoy, P., Reif, R., Blaszkewicz, M., Ellinger-Ziegelbauer, H., Ahr, H. J., Selinski, S., Günther, G., Marchan, R., Sachinidis, A., Nüssler, A., Oberemm, A., and Hengstler, J. G. Pharmacokinetics explain *in vivo/in vitro* discrepancies of carcinogen-induced gene expression alterations in rat liver and cultivated hepatocytes. *Archives of Toxicology*.87(2). <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0999-8> (2013)
- Schweizer, L., and Zhang, L. Enhancing Cancer Drug Discovery through Novel Cell Signaling Pathway Panel Strategy. *Cancer Growth and Metastasis*.6. <https://doi.org/10.4137/cgm.s11134> (2013)
- Serelli-Lee, V., Ito, K., Koibuchi, A., Tanigawa, T., Ueno, T., Matsushima, N., and Imai, Y. A State-of-the-Art Roadmap for Biomarker-Driven Drug Development in the Era of Personalized Therapies. In *Journal of Personalized Medicine*. 12,5. <https://doi.org/10.3390/jpm12050669> (2022)
- Services, H. Guidance for Industry Safety Testing of Drug Guidance for Industry Safety Testing of Drug Metabolites. Development. February. (2008)
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C., and Na, D. In silico methods and tools for drug discovery. In *Computers in Biology and Medicine*. 137. <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2021.104851> (2021)
- Shave, D., and Alden, P. G. Determination of Microsomal Stability by UPLC -MS / MS. (2023)
- Shoab, M., Shah, S. W. A., Ali, N., Shah, I., Naveed Umar, M., Shafullah, Ayaz, M., Tahir, M. N., and Akhtar, S. In vitro enzyme inhibition potentials and antioxidant activity of synthetic flavone derivatives. *Journal of Chemistry*.2015. <https://doi.org/10.1155/2015/516878> (2015)
- Singh, N., Vayer, P., Tanwar, S., Poyet, J.-L., Tsaioun, K., and Villoutreix, B. O. Drug discovery and development: introduction to the general public and patient groups. *Frontiers in Drug Discovery*.3. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2023.1201419> (2023)
- Soman, G., Yang, X., Giardina, S., and Mitra, G. Cell proliferation in drug discovery and development. In *Cell Proliferation: Processes, Regulation and Disorders*. (2013)
- Somolinos, F. J., León, C., and Guerrero-Aspizua, S. Drug repurposing using biological networks. In *Processes*. 9,6. <https://doi.org/10.3390/pr9061057> (2021)
- Southey, M. W. Y., and Brunavs, M. Introduction to small molecule drug discovery and preclinical development. *Frontiers in Drug Discovery*.3. <https://doi.org/10.3389/fddsv.2023.1314077> (2023)
- Steinmetz, K. L., and Spack, E. G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications. *BMC Neurology*.9,SUPPL. 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2377-9-S1-S2> (2009)
- Stewart, K. D., Johnston, J. A., Matza, L. S., Curtis, S. E., Havel, H. A., Sweetana, S. A., and Gelhorn, H. L. Preference for pharmaceutical formulation and treatment process attributes. In *Patient Preference and Adherence*. 10. <https://doi.org/10.2147/PPA.S101821> (2016)
- Stoellinger, H. M., and Alexanian, A. R. Modifications to the Transwell Migration/Invasion Assay Method That Eases Assay Performance and Improves the Accuracy. *Assay and Drug Development Technologies*.20,2. <https://doi.org/10.1089/adt.2021.140> (2022)
- Stryjewska, A., Kiepusa, K., Librowski, T., and Lochyński, S. Biotechnology and genetic engineering in the new drug development. Part I. DNA technology and recombinant proteins. *Pharmacological Reports*.65,5. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71466-X](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71466-X) (2013)
- Stryker, Z. I., Rajabi, M., Davis, P. J., and Mousa, S. A. Evaluation of angiogenesis assays. In *Biomedicines*. 7,2. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7020037> (2019)
- Su, Z., Brown, E. C., Wang, W., and MacKinnon, R. Novel cell-free high-throughput screening method for pharmacological tools targeting K⁺ channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.113,20. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602815113> (2016)
- Sun, H., Wang, Y., Cheff, D. M., Hall, M. D., and Shen, M. Predictive models for estimating cytotoxicity on the basis of chemical structures. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*.28,10. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2020.115422> (2020)
- Suryawanshi, S., Zhang, L., Pfister, M., and Meibohm, B. The current role of model-based drug development. In *Expert Opinion on Drug Discovery*. 5,4. <https://doi.org/10.1517/17460441003713470> (2010)

- Szymański, P., Markowicz, M., and Mikiciuk-Olasik, E. Adaptation of high-throughput screening in drug discovery-toxicological screening tests. In *International Journal of Molecular Sciences*.13,1. <https://doi.org/10.3390/ijms13010427> (2012)
- Taylor, D. L., Haskins, J. R., and Giuliano, K. A. High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery. In *Methods in Molecular Biology*. 356. (2007)
- Tchounwou, P. B., Dasari, S., Noubissi, F. K., Ray, P., and Kumar, S. Advances in our understanding of the molecular mechanisms of action of cisplatin in cancer therapy. In *Journal of Experimental Pharmacology*. 13. <https://doi.org/10.2147/JEP.S267383> (2021)
- Terry Riss, Andrew Niles, Rich Moravec, Natasha Karassina, and Jolanta Vidugiriene. Cytotoxicity Assays: In Vitro Methods to Measure Dead Cells. *Assay Guidance Manual [Internet].Md.* (2019)
- Upadhyay, N., Tilekar, K., Safuan, S., Kumar, A. P., Stalin, J., Ruegg, C., and Ramaa, C. Recent Anti-angiogenic Drug Discovery Efforts To Combat Cancer. In *ChemistrySelect*. 6,23. <https://doi.org/10.1002/slct.202101792> (2021)
- van der Kloet, F. M., Buurmans, J., Jonker, M. J., Smilde, A. K., and Westerhuis, J. A. Increased comparability between RNA-Seq and microarray data by utilization of gene sets. *PLoS Computational Biology*.16,9. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008295> (2020)
- Varma, H., Lo, D., and Stockwell, B. High-Throughput and High-Content Screening for Huntington's Disease Therapeutics. <https://doi.org/10.1201/ebk0849390005-c5> (2010)
- Verweij, J., Van Oosterom, A., Blay, J. Y., Judson, I., Rodenhuis, S., Van Der Graaf, W., Radford, J., Le Cesne, A., Hogendoorn, P. C. W., Di Paola, E. D., Brown, M., and Nielsen, O. S. Imatinib mesylate (STI-571 Glivec®, Gleevec™) is an active agent for gastrointestinal stromal tumours, but does not yield responses in other soft-tissue sarcomas that are unselected for a molecular target: Results from an EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group phase II study. *European Journal of Cancer*.39,14. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(02\)00836-5](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(02)00836-5) (2003)
- Vessillier, S., Eastwood, D., Fox, B., Sathish, J., Sethu, S., Dougall, T., Thorpe, S. J., Thorpe, R., and Stebbings, R. Cytokine release assays for the prediction of therapeutic mAb safety in first-in man trials - Whole blood cytokine release assays are poorly predictive for TGN1412 cytokine storm. *Journal of Immunological Methods*.424. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2015.04.020> (2015)
- Volpe, D. A. Transporter assays as useful *in vitro* tools in drug discovery and development. In *Expert Opinion on Drug Discovery*. 11,1. <https://doi.org/10.1517/17460441.2016.1101064> (2016)
- Wang, H., Brown, P. C., Chow, E. C. Y., Ewart, L., Ferguson, S. S., Fitzpatrick, S., Freedman, B. S., Guo, G. L., Hedrich, W., Heyward, S., Hickman, J., Isoherranen, N., Li, A. P., Liu, Q., Mumenthaler, S. M., Polli, J., Proctor, W. R., Ribeiro, A., Wang, J. Y., ... Huang, S. M. 3D cell culture models: Drug pharmacokinetics, safety assessment, and regulatory consideration. In *Clinical and Translational Science*. 14,5. <https://doi.org/10.1111/cts.13066> (2021)
- Wang, J., Wu, M. Y., Tan, J. Q., Li, M., and Lu, J. H. High content screening for drug discovery from traditional Chinese medicine. In *Chinese Medicine (United Kingdom)*. 14,1. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0228-y> (2019)
- Wang, S., Lee, S. J., MaksaeV, G., Fang, X., Zuo, C., and Nichols, C. G. Potassium channel selectivity filter dynamics revealed by single-molecule FRET. *Nature Chemical Biology*.15,4. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0240-7> (2019)
- Wang, T., Pulkkinen, O. I., and Aittokallio, T. Target-specific compound selectivity for multi-target drug discovery and repurposing. *Frontiers in Pharmacology*.13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1003480> (2022)
- Wang, W., Ye, Z., Gao, H., and Ouyang, D. Computational pharmaceutics - A new paradigm of drug delivery. In *Journal of Controlled Release*. 338. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.030> (2021)
- Wang, X., Decker, C. C., Zechner, L., Krstin, S., and Wink, M. In vitro wound healing of tumor cells: Inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacology and Toxicology*.20,1. <https://doi.org/10.1186/s40360-018-0284-4> (2019)
- Waud, D. R. Analysis of dose-response curves. *Trends in Pharmacological Sciences*.2,C. [https://doi.org/10.1016/0165-6147\(81\)90261-3](https://doi.org/10.1016/0165-6147(81)90261-3) (1981)
- Weber, I. T., Wang, Y. F., and Harrison, R. W. Hiv protease: Historical perspective and current research. In *Viruses*. 13,5. <https://doi.org/10.3390/v13050839> (2021)
- Wei, F., Wang, S., and Gou, X. A review for cell-based screening methods in drug discovery. In *Biophysics Reports*. 7,6. <https://doi.org/10.52601/bpr.2021.210042> (2021)
- Weissman, A., Keefer, J., Miagkov, A., Sathyamoorthy, M., Perschke, S., and Wang, F. L. Cell-based screening assays. In *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. 3. <https://doi.org/10.1016/b0-08-045044-x/00102-4> (2006)

- Westwick, J. K., and Lamerdin, J. E. Improving Drug Discovery with Contextual Assays and Cellular Systems Analysis. In *Methods in Molecular Biology*. 756. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-160-4_3 (2011)
- Wu, X., Zhang, Q., Guo, Y., Zhang, H., Guo, X., You, Q., and Wang, L. Methods for the Discovery and Identification of Small Molecules Targeting Oxidative Stress-Related Protein–Protein Interactions: An Update. In *Antioxidants*. 11,4. <https://doi.org/10.3390/antiox11040619> (2022)
- Xicota, L., De Toma, I., Maffioletti, E., Pisanu, C., Squassina, A., Baune, B. T., Potier, M. C., Stacey, D., and Dierssen, M. Recommendations for pharmacotranscriptomic profiling of drug response in CNS disorders. *European Neuropsychopharmacology*. 5441–53. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2021.10.005> (2022)
- Yadav, J., El Hassani, M., Sodhi, J., Lauschke, V. M., Hartman, J. H., and Russell, L. E. Recent developments in *in vitro* and *in vivo* models for improved translation of preclinical pharmacokinetics and pharmacodynamics data. In *Drug Metabolism Reviews*. 53,2. <https://doi.org/10.1080/03602532.2021.1922435> (2021)
- Yang, X., Kui, L., Tang, M., Li, D., Wei, K., Chen, W., Miao, J., and Dong, Y. High-Throughput Transcriptome Profiling in Drug and Biomarker Discovery. *Frontiers in Genetics*. 11, February, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00019> (2020)
- Yang, Y., Ye, Z., Su, Y., Zhao, Q., Li, X., and Ouyang, D. Deep learning for *in vitro* prediction of pharmaceutical formulations. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 9,1. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.09.010> (2019)
- Yengi, L. G., Leung, L., and Kao, J. The evolving role of drug metabolism in drug discovery and development. In *Pharmaceutical Research*. 24,5. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9217-9> (2007)
- Yu, H. B., Li, M., Wang, W. P., and Wang, X. L. High throughput screening technologies for ion channels. In *Acta Pharmacologica Sinica*. 37,1. <https://doi.org/10.1038/aps.2015.108> (2016)
- Yuan, Y., Meng, G., Li, Y., and Wu, C. Study on In Vitro Metabolism and In Vivo Pharmacokinetics of Beauvericin. *Toxins*. 14,7. <https://doi.org/10.3390/toxins14070477> (2022)
- Zhang, C., Xu, C., Gao, X., and Yao, Q. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies. In *Theranostics*. 12,5. <https://doi.org/10.7150/thno.69424> (2022)
- Zhang, D., Luo, G., Ding, X., and Lu, C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 2,6. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2012.10.004> (2012)
- Zhang, L., Pfister, M., and Meibohm, B. Concepts and challenges in quantitative pharmacology and model-based drug development. *AAPS Journal*. 10,4. <https://doi.org/10.1208/s12248-008-9062-3> (2008)
- Zhang, R., and Xie, X. Tools for GPCR drug discovery. In *Acta Pharmacologica Sinica*. 33,3. <https://doi.org/10.1038/aps.2011.173> (2012)
- Zhang, Z., and Tang, W. Drug metabolism in drug discovery and development. In *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 8,5. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2018.04.003> (2018)
- Zhao, X., Modur, V., Carayannopoulos, L. N., and Laterza, O. F. Biomarkers in pharmaceutical research. In *Clinical Chemistry*. 61,11. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.231712> (2015)



BÖLÜM 4

YENİLİKÇİ İLAÇ ARAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Şeyma ÖZGÜR¹, Demet CANSARAN DUMAN^{1,*}

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye

seymaozgur9715@gmail.com, dcansaran@yahoo.com

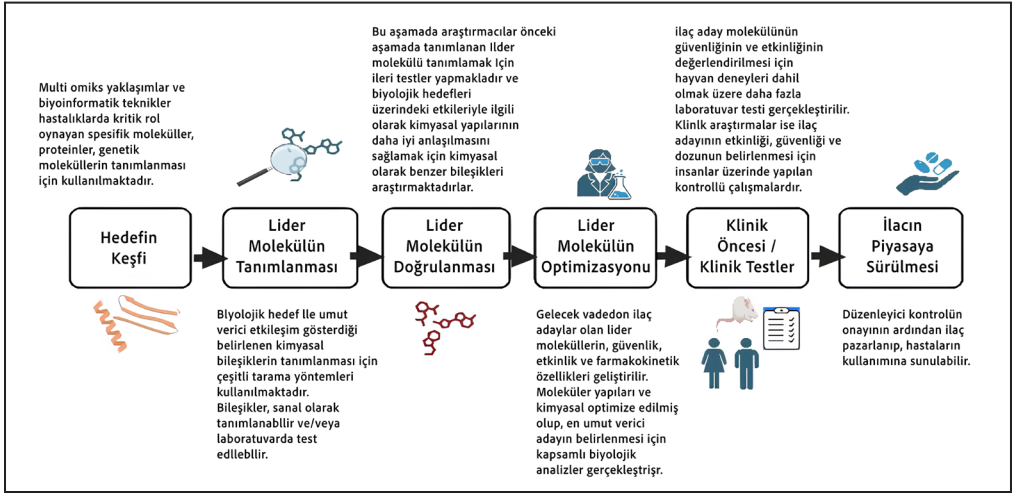
* Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Demet CANSARAN DUMAN





1. GİRİŞ

Bir molekülün keşfi sonrası pazara çıkan bir ilaç haline dönüştürülmesi oldukça uzun, meşakkatli ve başarısızlıkla sonuçlanma ihtimali yüksek bir süreçtir (Şekil 1). Günümüzde birçok ilaç aday molekülü bulunmaktadır ve bu moleküllerin keşfi, optimizasyonu ve toksisite değerlendirmelerinin yapılabilmesi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Bahsi geçen yöntemler sadece yeni ilaç aday moleküllerinin ve hedeflerinin bulunmasını sağlamamaktadır. Ayrıca var olan ilaçların yeni hastalık hedeflerinde kullanımını da değerlendirebilmektedir.



Şekil 1. Bir ilaç keşif sürecinde hedef bileşiğin keşfedilmesinden pazara ulaşmasındaki süreç (Southey ve Brunavs, 2023).

2. İLAÇ ARAŞTIRMALARINDA YENİ NESİL TEKNOLOJİLER

Bu bölümde öncelikle hücre kültürü uygulamaları hakkında genel bilgiler sunulacaktır. Ardından hücre proliferasyon belirleme deneylerinde son yıllarda kullanılan oldukça hassas bir yöntem olan gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA - xCELLigence) sistemi ile gerçekleştirilen yenilikçi ilaç araştırma uygulamalarından bahsedilecektir.

2.1. Hücre Kültürü Temelli Uygulamalar

2.1.1. Hücre Kültürü

Hücre kültürü, bir kaynaktan alınan hücrelerin laboratuvar ortamında canlı olarak devam ettirilmesine dayalı yöntemler bütünüdür. Hücre kültürü uygulamalarının amacı, dokularda üç boyutlu ortamda (3D) bulunan hücrelerin *in vitro* uygun koşullar altında kültürlenmesi ve incelenmesini sağlamaktır (Şekil 2) (Uysal ve ark., 2018).



Şekil 2. Hücre kültürü laboratuvar ortamı.

Klinik anlamda hücre kültür uygulamalarının avantajı, temel hücre biyolojisini inceleyen, hastalık mekanizmalarını taklit eden veya yeni ilaç moleküllerinin toksisitesini araştıran model sistemlerinin oluşturulmasıyla ilgilidir. Bu tür uygulamalarda hücre kültürünün avantajlarından biri, genlerin ve moleküler yolakların manipüle edilebilirliğidir. Öte yandan, klonal hücre popülasyonlarının veya spesifik hücre tiplerinin ve iyi tanımlanmış kültür sistemlerinin homojenliği, genetik veya çevresel değişiklikleri ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle hücre kültür uygulamaları yüksek tekrarlanabilirlik ve tutarlılığa sahip veri üretimine olanak tanımaktadır (Segeritz ve Vallier, 2017).

Hücre kültür uygulamaları, özel çalışma koşullarına ihtiyaç duyan ortamlardır. Hücre kültürü laboratuvarları steril ortamlar olmalıdır. Hücre kültürlerinde en sık karşılaşılan sorun kontaminasyondur. Ancak, iyi bir hücre kültürü uygulaması, gerekli uygun şartlar sağlandığında ve standart kontaminasyon faktörleri ortadan kaldırıldığında gerçekleşebilir. Hücre kültür uygulamaları ile ilgili diğer bir durum ise kültür ortamının hücrelerin ihtiyaçlarına uygun bir şekilde düzenlenmesi gerekliliğidir. Öte yandan kültür ortamının makroskobik ve mikroskobik yollarla takip edilmesi gerekmektedir. Bir hücre kültür laboratuvarında hücrelerin çoğalmasını sınırlayan iki önemli faktör bulunmaktadır. Bunlardan birincisi kültür kabının doluluğu, diğeri ise besiyeri desteğinin azalmasıdır. Bu tür durumlarda hücre pasajı gereklidir. Hücre kültürü çalışmalarında bazı durumlarda hücrelerin dondurularak saklanması gerekmektedir. Ancak alt kültürleme, hücre dondurma çözme gibi işlemler hücreleri strese sürükleyebilecek işlemlerdir. Dolayısıyla bu tür işlemlerin ardından hücre canlılık testlerinin yapılması gereklidir (Uysal ve ark., 2018). Hücre canlılığının ölçülebilmesi için farklı yöntemler bulunmaktadır. Dokulardan alınan hücrelerin uygun koşullar altında üretilebilmesi için farklı hücre kültürü teknikleri bulunmaktadır.

Hücre kültürü teknikleri, hücreleri doğal ortamlarının dışında, genellikle laboratuvar ortamında büyütme ve sürdürme için kullanılan çeşitli yöntemleri kapsar (Taylor ve Taylor, 2014). Bu teknikler biyolojik araştırma, ilaç keşfi, rejeneratif tıp ve biyoteknoloji alanlarındaki geniş bir uygulama yelpazesi için çok önemlidir (Segeritz ve Vallier, 2017; Uysal ve ark., 2018). Bazı hücre kültür tipleri aşağıda sunulmuştur.

2.1.1.1. Kök Hücre Kültürleri

Kök hücre kültürleri, kök hücrelerin farklılaşmamış bir durumda tutulduğu veya başka hücrelere farklılaştığı kültürlerdir (Lotz ve ark., 2013). Kök hücreler doku mühendisliği, biyolojik yolların belirlenmesi, ilaç keşfi gibi alanlarda kullanılmaktadır (Nirmalanandhan ve Sittampalam, 2009).

2.1.1.2. Adherent Hücre Kültürleri

Adherent hücre hatları, bir hücre kültürü kabının yüzeyine bağlı olarak büyüeyebilen hücrelerdir. Bu tür hücreler bir cam veya plastik (en yaygın olanı polistiren) yüzey üzerine kültürlenebilirler ancak çoğunlukla doğrudan yapışmazlar ve bu yüzeylere adsorbe edilen bağlanma faktörlerine bağlanabilirler. Hücre kültüründe en yaygın kullanılan kaplama bileşenleri kolajenler, fibronektin ve laminin gibi ekstraselüler matris (ECM) proteinleriyle birlikte ticari olarak bulunmaktadır (Chua ve Lim, 2023; Noel ve Berry, 2022).

2.1.1.3. Süspansiyon Hücre Kültürleri

Süspansiyon hücre kültürleri, yapışkan olmayan ve tek katmanlar halinde büyüyen hücrelerin aksine mekanik olarak süspansiyon halinde tutulabilen hücrelerdir (Verma ve ark., 2020).

2.1.1.4. Tek Katmanlı Hücre Kültürleri

Kültür kabının tabanında sürekli hücre katmanı bulunan ve genellikle tek bir hücre kalığında olan ankray bağımlı bir hücre kültürü türüdür (Verma ve ark., 2020).

2.1.1.5. Ortak Hücre Kültürleri

Ortak hücre kültürleri, hücreler arası ve hücre ile kültür ortamı arasındaki etkileşimin daha iyi gözlemlenebildiği ve farklı sitokinler arasındaki ilişki tespit edilerek ilaç mekanizması ve potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek için gereken *in vivo* ortamın büyük ölçüde simüle edilebildiği kültürlerdir. Ortak kültür sistemleri hücrelerin işlevi, canlılığı, hücre proliferasyonu ve migrasyonu gibi süreçler için kullanılabilir. Her ne kadar hastalık ve ilaç tarama ile ilgili deneysel çalışmalarda hayvan modelleri yaygın olarak kullanılsa da, *in vitro* ortak kültür modelleri hücreler, dokular veya organlar arasındaki etkileşime dair derin mekanizmaları göstermek için daha uygun ve doğru bir yaklaşım sağlamaktadır (Liu ve ark., 2022).

2.1.1.6. Primer Kültür

Primer hücre kültüründeki hücreler doğrudan doku ve organlardan mekanik veya kimyasal parçalama veya enzimatik sindirim yoluyla elde edilen hücrelerdir. Genellikle bu tür hücreler düşük bir büyüme oranına sahiptir ve heterojendir ancak türetildikleri dokulardaki hücreleri daha iyi temsil ettiklerinden hücre hatlarına göre tercih edilmektedirler. Kültürdeki hücrenin türüne bağlı olarak primer hücre kültürleri ankray bağımlı / aderen hücreler ve ankray bağımsız / süspansiyon hücreler olarak iki grupta incelenebilir. Aderen hücreler, bağlanma ve büyüme için stabil, toksik olmayan ve biyolojik olarak inert bir yüzeye ihtiyaç duyan hücrelerdir. Hücrelerin süspansiyon olarak büyümeleri zordur. Süspansiyon hücreler ise, bağlanma ve büyüme için katı bir yüzeye ihtiyaç duymayan sıvı ortamda sürekli olarak büyütülebilen hücrelerdir. Primer hücre kültürleri, *in vivo* çalışmalar için en iyi deneysel modelleri temsil etmeleri nedeniyle avantajlıdır. Öte yandan ebeveyn ile aynı karyotipi paylaşmaktadırlar ve kültürlenmiş hücrelerde görülmeyen özellikleri ifade ederler. Fakat

elde edilmesi zordur ve hücre ömrü sınırlıdır. Aynı zamanda mikroorganizmaların neden olabileceği potansiyel kontaminasyon riski de büyük bir dezavantajdır (Verma ve ark., 2020).

2.1.1.7. İki Boyutlu Hücre Kültürleri

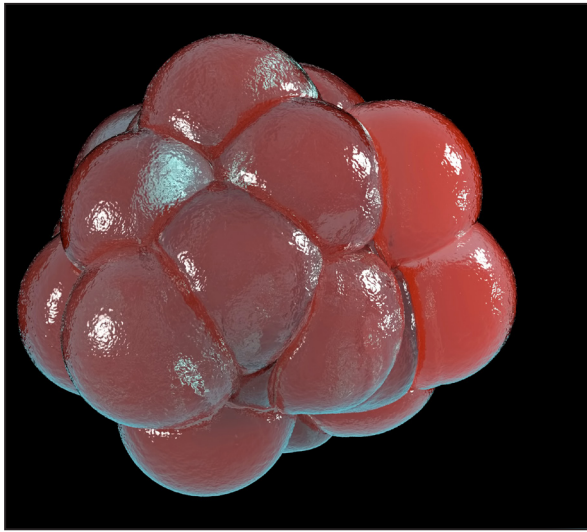
İki boyutlu (2D) hücre kültürleri, *in vitro* ilaç taraması ve yeni ilaçların geliştirilmesinde kullanılan uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Bu tür kültürlerdeki hücreler, polistiren veya cam düz bir yüzey üzerinde büyütülen iki boyutlu kültür modelleridir (Fontoura ve ark., 2020).

Geleneksel 2D hücre kültürleri, basitliği, düşük maliyeti ve yüksek tekrarlanabilirliği nedeniyle *in vitro* ilaç taramalarında en yaygın kullanılan yöntemdir. Fakat 2D hücre kültürleri, hücre morfolojisini, metabolik yollarını, gen ifadesini, hücre proliferasyon hızını değiştirmektedir ve hücre dışı matris proteinlerinin üretimini azaltmaktadır. Hücre ve hücreler arasındaki veya hücreler ile hücre dışı matris arasındaki etkileşimleri iyi bir şekilde simüle edemez, katı tümörleri özelliklerini replike edemez ve fizyolojik 3D ortamı tam olarak yansıtamaz. Dolayısıyla bu durum hassasiyette yüksek farklılıklara yol açmaktadır. Dolayısıyla son yıllarda 2D hücre kültürleri ile hayvan deneyleri arasında yer alan 3D hücre kültürleri geliştirilmiştir (Sun ve Ma, 2023).

2.1.1.8. Üç Boyutlu Hücre Kültürleri

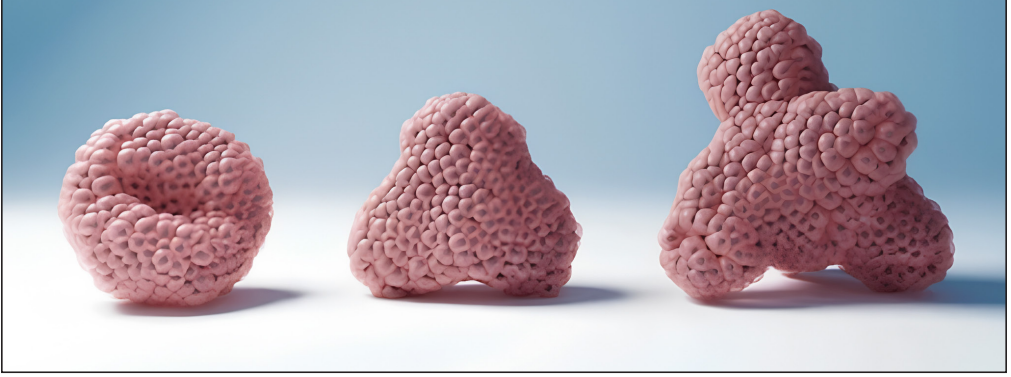
2D hücre kültürlerinden farklı olarak, 3D hücre kültürü sistemleri fizyolojik olarak daha uygun bir ortam sağlayan ve verilen ilacın etkileri gözlenirken *in vivo* etkilerin daha iyi gözlemlendiği sistemlerdir. Genellikle yaygın olarak kullanılan 3D kültür modelleri sferoidler ve organoidlerdir (Sun ve Ma, 2023).

Sferoidler, genellikle bir matris içine asılı veya gömülü olan 3D ortamlarda kendiliğinden bir araya gelen hücre kümeleridir. Şekil 3'te sferoid hücre kültür modeline dair bir örnek verilmiştir. Dokularda gözlemlenen hücreler arası etkileşime ve mekansal organizasyona çok benzerler. Farklı hücre tiplerinden üretilebilirler, proliferasyon, farklılaşma, ilaçlara ve dış uyaranlara yanıt gibi hücre davranışlarının incelenmesi için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Sun ve Ma, 2023).



Şekil 3. Sferoid hücre kültür modeli.

Organoidler ise minyatürleştirilmiş organlara benzeyen, daha karmaşık 3D yapılarıdır (Şekil 4). Organoidler, organ gelişimi, hastalık modellemesi ve kişiselleştirilmiş tıp araştırmaları için güçlü bir yaklaşımdır. Ancak unutulmamalıdır ki hem sferoidler hem de organoidler biyolojik süreçlerin araştırılması, ilaç keşfi ve toksikoloji çalışmaları için oldukça değerli platformlardır. 3D kültürler, *in vivo* mikro ortamı daha iyi taklit ederek araştırmacıların hücresel tepkileri daha gerçekçi ve fizyolojik açıdan daha anlamlı olarak incelemelerine yardımcı olmaktadır (Sun ve Ma, 2023).



Şekil 4. Organoid hücre modeli.

2.1.1.9. İlaç Araştırmalarında Organo - Çip Teknolojisi

İnsan hastalıkları ve tedavilerinin mekanizmasının anlaşılması hakkında hayvan modelleri uzun bir süre boyunca bilgi sağlayarak tıp ve ilaç keşfinde oldukça önemli bir rol oynamıştır. Fakat bu tür modellerin kullanımı etik tartışmaların odak noktası olmaya devam etmektedir. Dahası, hayvan modellerinde yapılan translasyonel araştırmalar eksik sonuçlar verebilmektedir. Moleküllerin hayvanlarda toksisiteye, hasara sebep olmadığı ve etkin olduğu düşünüldüğü halde insanlarda klinik çalışmalar sırasında maliyetli ve ölümcül olabilen durumlara yol açtığı örnekler meydana gelmiştir. Hücre biyolojisi, doku mühendisliği, mikroakışkan teknolojisi ve 3D biyobaskı gibi teknolojilerdeki son gelişmeler sayesinde, biyomimetik fizyolojik doku yapıları ve ortamlar tasarlanmıştır. Dolayısıyla biyomühendislik, hücre biyolojisi ve doku mühendisliğinin disiplinler arası birleşmesiyle 2D tek hücreli modellerden organoidler ve çip üzerinde organlar (OoC) gibi klinik öncesi ilaç taraması için güvenilir *in vitro* modeller olarak karşımıza çıkmaktadır (Ramadan ve Sharma, 2021).

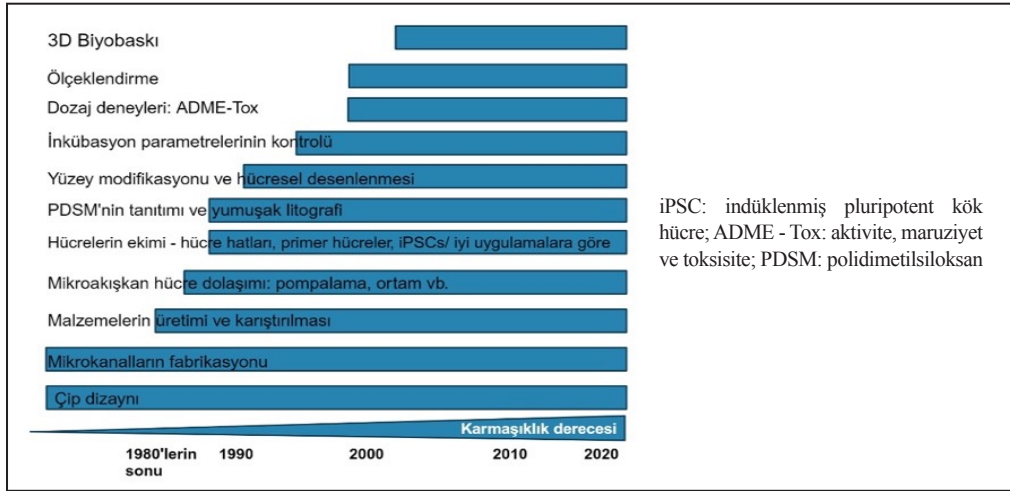
OoC teknolojisi, rejeneratif tıpta uygulanma imkânı bulunan bir teknolojidir. Bu teknoloji sayesinde ilaç keşif çalışmaları hızlanabilmektedir. Hastalardan elde edilen hücreler organ rejenerasyonuna yönelik kişiselleştirilmiş stratejiler sunabilir. Ayrıca orijinal dokunun anatomisini ve işlevini eski haline getirmek için de kullanılabilir. OoC'lerin kişiselleştirilmesiyle biyolojik süreçler *in vitro* olarak modellenenebilir hale gelmiştir (Vunjak-Novakovic ve ark., 2021).

OoC'ler, insan dokularının fiziko - kimyasal mikro ortamını taklit edebilen kontrollü koşullara (hız, akış vb.) sahip mikroakışkan bir hücre kültürü sistemidir. Bu çipler, karmaşık fizyolojik ve patolojik süreçleri taklit edebilmek için, hücrelerin, organları hatta organları taklit edecek şekilde tasarlanmaktadır (Danku ve ark., 2022). Bu nedenle OoC teknolojisi insan organ fonksiyonu ve hastalık patofizyolojisini anlamının yanı sıra ilaç moleküllerinin güvenilirlik ve etkililiğini daha doğru tahmin edebilmektedir (Low ve ark., 2021). Burada bahsedilen çip, bir akışkanın

dakikadaki hacmini (pikolitreden mililitreye kadar) yönlendirmek ve manipüle edebilmek için çok ince mikrokanallardan oluşan bir cihazdır. Organ ise bir veya daha fazla dokuya özgü işlevi taklit edebilen, mikroakışkan çiplerle büyüyen minyatür dokulardır. Doğal doku ve organlardan çok daha basittirler, fakat çoğu zaman insan fizyolojisi ve hastalık fenotiplerini etkili olarak taklit edebilirler (Leung ve ark., 2022). Tablo 1’de OoC teknolojisinin tarihçesi verilmiştir.

Tablo 1. OoC’lerin ve deneysel tekniklerin geliştirilme tarihçesi (Leung ve ark., 2022)

Organo - çip (OoC) Dönüm Noktaları	Günümüz
Minyatürleştirilmiş total analiz sistemleri	Rejeneratif tıpta OoC’ler
Mikrokanallarda hücre desenlerinin oluşturulması	Hastalık modellemesinde OoC’ler
Mikrokanallarda hücre manipülasyonu	Kişiselleştirilmiş OoC’ler
Mikrokanallarda hücre kültürü	-
Tekli OoC’ler	-
Çoklu OoC’ler	-
Sferoidler / iPSC’lerden türetilen OoC’ler	-
3D kültürler	-



Her ne kadar değişken olsa da bir OoC’nin üç kritik ve tamamlayıcı özelliği vardır; hücrelerin fizyolojik dengesini taklit edebilecek şekilde birden fazla hücre tipinin varlığı, entegrasyonu (parankimal, stromal, vasküler ve bağışıklık hücreleri gibi); ve modellenmesi istenen doku ile ilgili biyomekanik kuvvetlerin varlığı (akciğer dokuları için germe kuvveti veya vasküler dokular için hemodinamik kesme kuvveti gibi). OoC teknolojisinin avantajı kimyasal gradyanları ve biyomekanik kuvvetleri taklit edebilmek için hücresel ve spesifik doku mimarisini kontrol edebilmesidir (Low ve ark., 2021).

Tek organ OoC’leri, 3D insan dokularındaki potansiyel bileşiklerin toksisite değerlendirmesi için alternatif yöntemdir. Örneğin 2D karaciğer kültürlerinde, hepatik hücre hatları primer insan hepatositlerini zayıf bir şekilde temsil etmektedir, bu tür kültürlerde hücreler 24 saat boyunca hızlı

bir şekilde farklılaşamazlar. Dolayısıyla bu tür hücrelerin bir ilaca maruz kaldıklarından kısa veya uzun süreli etkilerini ve sistemik toksik etkilerinin değerlendirilmesindeki yararlılıkları sınırlıdır. Fakat sağlıklı hücre kültürlerini 28 günden uzun süre koruyabilen ve karaciğerin *in vivo* ortamını taklit edebilen bir OoC, ADME - Tox çalışmaları için yeni bir alternatif sunabilir. Öte yandan standart hayvan modellerinde değerlendirilmesi zor olan oligonükleotidler veya büyük moleküllerin (moleküler kütlesi yaklaşık 900 Da'dan büyük olan moleküller) toksisitesinin değerlendirilebileceği alternatiflere ihtiyaç vardır. OoC'ler tasarımları itibarıyla bu tür değerlendirmeler için yararlı olabilirler. OoC'lerin üzerindeki vasküler ağlar, kemoterapötiklerle vasküler toksisiteyi ve monoklonal antikor tedavilerinden kaynaklanan tromboz gibi komplikasyonlara yönelik risk faktörlerini araştırmak için kullanılabilir (Low ve ark., 2021). OoC teknolojisi gibi *in vitro* modeller sayesinde ADME - Tox değerlendirmeleri hızlanmaktadır. Fakat bu yaklaşımlar hala zaman alıcı, emek isteyen ve maliyetli yaklaşımlardır (Shaker ve ark., 2021).

Öte yandan iPSC teknolojisinin ortaya çıkışıyla, hastaya özgü bireysel hücreler de OoC teknolojisine entegre edilebilmektedir. Bu durum OoC'lerin kişiselleştirilmesi ve hastalık fenotipleri ile ilaca yanıtın hastaya özel olması anlamına gelmektedir. OoC'lerde iPSC kullanımının örnek gösterilebileceği bir çalışma çocukluk çağı kardiyomyopatisi Barth sendromunun araştırılmasıdır. Hastadan alınan kök hücrelerden kalp dokusu üretilmiştir ve bu hastalıkta görülen düzensiz sarkomerik organizasyonu ve zayıf kasılma özelliklerini taklit eden kaslı ince filmler oluşturularak modellenmiştir. iPSC hücresinden türetilen kardiyomyositlerdeki hatalı *TAZ* genini düzeltmek için genom düzenleme teknikleri kullanılarak hastalığın altında yatan mitokondriyel anormallikler belirlenmiştir. Bu sonuçlar aynı hastada birden fazla doku tipinin oluşturulmasının ve herhangi bir sayıda genetik temelli hastalık için genetik düzenleme yöntemleriyle izojenik kontrol dokularının üretilmesinin mümkün olabileceği hedef doğrulamanın kritik aşamaları için model olarak OoC'lerin potansiyel kullanımını vurgulamaktadır (Leung ve ark., 2022; Low ve ark., 2021; Wang ve ark., 2014).

Bir OoC tasarlarken düşünülmesi gereken ilk konu tek organlı bir sistemin mi kurulacağı yoksa çoklu organ sisteminin mi kurulacağıdır. Tek organlı sistemler yüksek derecede biyolojik özgünlüğe sahiptir ve belirli bir organın bir bileşiğe veya bileşiklerin oluşturduğu bir karışıma verdiği tepkinin değerlendirilmesine olanak tanır. Çoklu organ sistemleri ise, en az iki organın birbiriyle ya da metabolitlerin veya çözünür sinyal moleküllerinin değişimiyle potansiyel etkileşimlerini incelemek için kullanılırlar. Hangi OoC'nin seçileceği çalışmada istenen özelliklere bağlıdır. İstenilen biyolojik prosesin taklit edilmesini sağlayacak minimum sistemin kurulması önemlidir. Aynı zamanda çoklu organ sistemlerini temsil eden OoC'lerin daha karmaşık mühendislik tasarımı içerdiğini fakat tek organlı OoC'lerin biyolojik olarak daha ayrıntılı olduğunu da unutmamak gerekmektedir. Tasarım için gereken sonraki adım ise fonksiyonel dokular oluşturmak için hangi yaklaşımın kullanılması gerektiğine karar vermektir (Leung ve ark., 2022).

Bir OoC'de kullanılacak malzemenin seçimi ise cihazın işlevselliği, üretim stratejisi ve biyouyumluluk gibi pek çok faktöre bağlıdır. Tipik bir OoC, çeşitli malzeme kombinasyonlarında oluşmaktadır. En çok kullanılan malzemeler silikon kauçuk, PDSM cam, termoplastiklerdir. Kullanılan malzemeler Tablo 2'de verilmiştir (Tajeddin ve Mustafaoglu, 2021).

Tablo 2. OoC yapımında kullanılan malzemeler (Tajeddin ve Mustafaoglu, 2021).

Kullanılan Materyal	Avantajları	Dezavantajları
PDSM	Transparanlık Biyouyumluluk Düşük maliyet Esneklik	Hidrofobik Düşük floresans özellik
Cam	Transparanlık Biyouyumluluk Hidrofilik özellik	Gaz geçirgen değil Sertlik
Termoplastik	Biyouyumluluk Kolay üretilebilir Düşük maliyet	Düşük gaz geçirgenliği Düşük floresans özellik Sertlik

OoC'ler 3D yapıları ve ürettikleri malzemeler nedeniyle geleneksel hücre kültürlerinden farklıdır. Ancak benzer gereksinimleri paylaşırlar. Bu gereksinimlerden bir tanesi sterilizasyondur. Tüm OoC sisteminde mikrobiyal kontaminasyonun önlenmesi gerekmektedir. Uygun sterilizasyon yöntemlerinin kullanılmaması cihaza zarar verebilir. Diğer bir konu ise biyouyumluluğun sağlanması ve hücre adezyonunun artırılması için hücrelerle temas eden cihaz yüzeyinin işlenmesi gerekmektedir. Burada pluronik asitle muamele yöntemi kullanılır. Öte yandan ECM kaplamalar da kullanılabilir. Dokuya ve hastalığa özgü matrisler de yüksek doğrulukta (patofizyolojik modeller oluşturmak üzere kullanılabilirler (Leung ve ark., 2022).

OoC teknolojisi ile yapılmış çoklu organ modelleri hastalık modelleme ve hassas tıptaki çeşitli uygulamalar için kullanılabilir. Sistemik hastalıklar hayvan modellerinde yeterince modellenemediğinden çoklu organ platformlarının kullanımı önemlidir. Ülsertif kolitin insan çoklu organ modelini oluşturmak için dolaşımdaki Treg ve Th17 bağışıklık hücreleri dahil olmak üzere bağırsak ve karaciğer modüllerini içeren fizyomimetik çoklu organ platformu oluşturulması iyi bir örnektir. Çalışma insan patofizyolojisinin bağışıklık ve metabolik düzenlenmesinin daha iyi anlaşılabilmesi için çoklu organ sistemlerinden nasıl yararlanılabileceğini göstermektedir (Vunjak-Novakovic ve ark., 2021).

Çoklu OoC sistemleri, ilaç güvenliği, etkinliği, immünojenite ve farmakokinetik / farmakodinamik değerlendirmeleri için metodoloji sağlar ve doğru ilacın doğru zamanda doğru hastaya verilmesine yardımcı olur. Aynı zamanda hastalardan elde edilen hücrelerin çoklu OoC'lerde kullanılması hastalığın başlangıcı, ilerlemesi ve tedavinin kişiselleştirilmesini sağlamak için bir yaklaşım sunabilir (Vunjak-Novakovic ve ark., 2021).

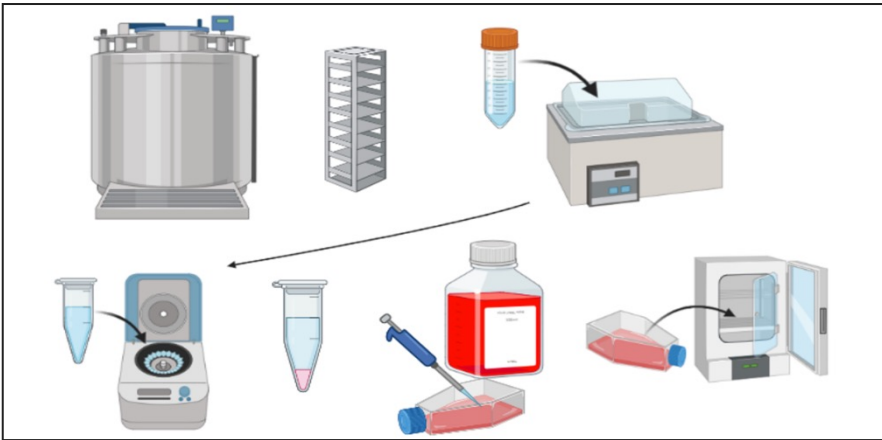
Her ne kadar OoC'ler bir dokunun belirli yönlerinin modelleyebiliyor olsa da günümüzdeki sistemlerin değil organı, tamamen işlevsel ve bütünleşmiş bir insan dokusunu tamamen taklit edemediği unutulmamalıdır. Dolayısıyla sistemler ilgilenilen fenotipin sorulan soruya bağlı olduğu araştırılmak istenen morfolojik ve fonksiyonel fenotipi taklit etmek için bir dokunun temel yönlerini (veya en karakteristik özelliklerini) modellemek üzere tasarlanmaktadır (Low ve ark., 2021).

2.2. İlaç Geliştirmede Hücre Proliferasyon Analizinin Önemi

İlaç geliştirmede hücre proliferasyonunun belirlenmesi oldukça önemlidir. Hücre proliferasyonunun belirlenmesi ile ilaçların terapötik veya sitotoksik etkilerinin anlaşılması sağlanmaktadır. Öte yandan hücrelerin kullanımı büyük ölçekli hayvan testlerinden kaçınılmasını sağlayabilir, uygun maliyetlidir, nispeten basit ve tekrarlanabilir. Hücre bazlı çalışmalar ilacın güvenliği, etkinliği ve mekanizmasının değerlendirilmesine olanak sağladığından ilaç keşif süreçleri için önemlidir. İlaç keşif sürecinde, ilacın güvenliği, etkinliği ve etki mekanizmasının değerlendirilmesi için uygun kültür koşulları ve hücre modellerinin gerekliliği hücre proliferasyon testlerini ilaç keşif sürecinin önemli bir parçası haline getirmektedir. Aynı zamanda hücre proliferasyonunu belirleyen testler fenotipik analizlerin uygulanması ve yeni moleküllerin etki mekanizmalarının belirlenmesini sağlayarak ilaç keşif sürecine yardımcı olabilir. Klinik çalışmaların faz II veya faz III deneylerinde ilaçların yarısından fazlasının etkinliğinin doğrulanamaması nedeniyle başarısız olmaları veya ilaçların yaklaşık üçte birinin yüksek derecede toksik olması gibi güvenlik sorunları nedeniyle başarısız olduğu düşünüldüğünde bu durum önemlidir. Buna ek olarak hücre proliferasyon testleri, bir bileşiğin sitotoksik etkisini yansıtabilir, bu durum proliferasyon testlerini çeşitli terapötik ajanların güvenliğinin belirlenmesinde yararlı hale getirmektedir. Kısaca, hücre proliferasyonu tespit testleri ilaç geliştirme süreçleri için önemli olup, ilacın güvenliği, etkinliği ve etki mekanizmasının değerlendirilmesinde, maliyetin azaltılmasında ve verimliliğin artırılmasında rol oynamaktadır (Kocherova ve ark., 2020; Sazonova ve ark., 2022; Wei ve ark., 2021).

2.2.1. Hücre Canlılığı Belirleme ve Sitotoksite Analizleri

Hücre canlılığı, bir örnek içerisindeki canlı hücrelerin sayısıdır. Hücre canlılığı, hücreler toksik ajanlara maruz kaldıktan sonra hücrelerin hayatta kalması veya ölümüyle ilgili genlerin, proteinlerin ve yolakların işleyiş mekanizmalarını anlayabilmek adına çok önemli bir göstergedir. Hücre sitotoksite analizleri genellikle ilaç taramasında, test edilen molekülün hücre proliferasyonu üzerindeki etkisinin araştırılması ve doğrudan sitotoksik etki gösterip göstermediğini belirlemek için kullanılmaktadır. Analize başlamadan önce hücre kültür ortamında çalışılacak hücrenin açılması ve uygun koşullarda büyütülmesi sağlanır (Şekil 5).



Şekil 5. Hücre kültür ortamında aderent hücre açılması ve çoğaltılması.

Hücre büyümesi sağlandıktan sonra sitotoksosite analiz tipi seçilir ve sonrasında canlı hücre oranı belirlenir. Hücre canlılığı ve sitotoksosite analizleri arasında enzim aktivitesi, hücre membran geçirgenliği, hücre adezyonu gibi hücre fonksiyonlarına dayanan analizler bulunmaktadır (Adan ve ark., 2016). Hücre canlılığı, sitotoksosite gibi hücre fonksiyonlarına dayanan analizler Şekil 6'da verilmiştir.



Şekil 6. Hücre canlılığı belirleme ve sitotoksosite analizleri.

2.2.1.1. Hemositometre ve Otomatik Hücre Sayım Araçları ile Hücre Sayımı

Hemositometre, laboratuvarlarda hücrelerin sayısını ölçmek üzere kullanılan ve genellikle verimin artırılması için otomatikleştirilmiş standart bir cihazdır (Şekil 7). Bir hemositometre, mikroskop altında hücrelerin sayılabilmesi için iki parçadan oluşan optik bir camdan meydana gelmektedir. Birinci parça 0.1 µl hücre süspansiyonu alabilecek ve 1 x 1 mm boyutunda ızgara şeklinde bölmelerden oluşan kalın cam bir lamdır. İkinci parça ise lamın üzerine kapatacak bir lameldir. Ancak günümüzde kısa sürede çok sayıda örneğin yüksek verimle sayılabilmesi için otomatik hemositometreler geliştirilmiştir. Otomatik hemositometreler dijital bir kamera ve hücreleri sayılacağı bir lam veya kartuştan oluşmaktadır. Dijital kamera sabit hacimde yüklenen hücre süspansiyonunu yakalar ve hücrelerin sayılmasına yönelik özel bir yazılım kullanarak hücre konsantrasyonunu hesaplar. Hem manuel hem de otomatik hemositometreler standart bir ölçüm aralığındaki (10^5 - 10^6 hücre / ml) hücre sayısını hesaplamaktadırlar. Bu nedenle miktarı bilinmeyen bir numunenin hücre konsantrasyonu hemositometre aralığının dışındaysa, hücre konsantrasyonu artırılmalı veya azaltılarak numune yeniden hazırlanmalıdır (Thunyanorn ve ark., 2021).

Bugüne kadar geliştirilen ve iyi bilinen canlı hücre sayım yöntemleri arasında hemositometre ile manuel sayım düşük maliyeti ve çok yönlülüğü nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Fakat yöntem zaman alıcı ve tek seferde büyük miktarlarda numunenin analizini engellemektedir ve araştırmacıların uzmanlık derecesine bağlı olarak kullanıcılar arasında değişkenliğe tabidir (Cadena-Herrera ve ark., 2015).



Şekil 7. Bir hemositometreye hücre örneğinin yüklenmesi, görüntülenmek üzere ışık mikroskobuna yerleştirilmesi ve ışık mikroskobu altındaki görüntüsü.

Günümüzde otomatik hücre sayım cihazlarının ortaya çıkışıyla çok sayıda numune daha kısa sürede analiz edilebilmektedir (Şekil 8). Aynı zamanda bu yöntem manuel sayıma göre daha ekonomiktir. Öte yandan insan hatasından kaynaklı değişkenliklerin azaltılması da bir avantajdır. Günümüzde çeşitli otomatik hücre sayım sistemleri bulunmaktadır. Genel olarak otomatik hücre sayım cihazları görüntü elde etmek için dijital bir kameradan oluşmaktadır ve analiz minimum düzeyde kullanıcı müdahalesi gerektiren özel bir yazılım ile gerçekleştirilmektedir. Her ne kadar otomatik cihazlar analiz sürecini kolaylaştırırsa da uyumlu boyaların kullanılması ve teknik sınırlamalar nedeniyle bazı hücre türlerinin ayırt edilmesinde kesin olmama ihtimali dezavantajlarıdır (Cadena-Herrera ve ark., 2015).



Şekil 8. Otomatik hücre sayım cihazı.

2.2.1.2. Adenozin Trifosfat Analizi

Adenozin trifosfat (ATP), canlı hücreler tarafından üretilen ve hücresel yaşamın vazgeçilmez parçası olan bir moleküldür. Hücre ölümü sürecinde ATP sentezleme potansiyeli azalırken kalan ATP de hücreden uzaklaştırılmaktadır. Bu nedenle belirli deneysel koşullar altında kültürdeki hücrelerde bulunan ATP miktarının belirlenmesiyle hücre canlılığı ölçülebilir. Hücre içi ATP'nin hassas bir şekilde ölçümü yüksek verimli tarama (HTS) çalışmaları için uygun olan lusiferaz bazlı analizlerle sağlanmaktadır. Lüminesans ATP'nin belirlenmesi oldukça avantajlıdır ve HTS laboratuvarlarında hücre canlılığını ölçmek için tercih edilmektedir. Hem kolaydır hem de zaman alıcı değildir, öte

yandan test bileşikleri floresan testlere etki etmemektedir. Ayrıca ATP testi için kuyucuk başına 10'dan daha az hücre etiketlenebilmektedir ve bu durum ATP testini canlı hücreleri tespit etmek için mevcut en hassas mikropilaka testi haline getirmektedir. Fakat hücre içi ATP konsantrasyonu yaşlanma ve kontak inhibisyon gibi hücre proliferasyonunun durması, mitokondriyel solunumun engellenmesi gibi öldürücü olmayan durumlar nedeniyle de azalabilmektedir. Dolayısıyla ATP'nin ölçümü her zaman doğrudan hücre canlılığıyla ilgili değildir. Dolayısıyla ATP bazlı analizler metabolik müdahalelere karşı oldukça duyarlıdır ve yanlış pozitif sonuçlar üretimine neden olabilir. Bu nedenle hücre ölümü belirteçleriyle ikinci kez doğrulanmalıdır. Öte yandan metabolizma odaklı testlerin ön bilgi elde etmek için yararlı olduğu fakat hücre ölüm çeşidini belirlemediğini, bu nedenle sitotoksik ve antiproliferatif etkiler arasına ayırım yapamamaktadır (Méry ve ark., 2017).

2.2.1.3. Bromodeksüridin İnkorporasyon Analizi

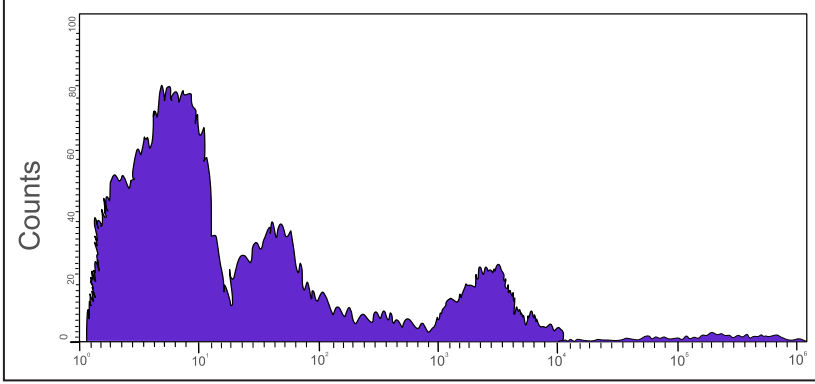
BrdU inkorporasyon testi uzun süredir *in vitro* ve *in vivo* ortamda DNA sentezinin tespiti için kullanılmaktadır. Yöntemin temel prensibi, bir timidin analogu olan BrdU kullanılarak nükleer DNA'nın etiketlenmesi ve antikor problemleri kullanılarak izlenmesine dayanmaktadır. Bu yöntem 1980'li yıllardan bu yana çeşitli insan ve hayvan organlarında çoğalan ve göç eden hücrelerin etiketlenmesi için kullanılmaktadır. Radyoaktif değildir ve düşük maliyetlidir. Diğer avantajı ise BrdU toksik bir kimyasal olarak kabul edilebilmesine rağmen etiketleme için kullanıldığı konsantrasyonlarda genellikle toksik değildir (Crane ve Bhattacharya, 2013).

BrdU, hücre döngüsünün S fazında çekirdek DNA'ya katılmak için timin ile rekabete girmektedir. Ayrıca, hücre onarımı veya hücre dejenerasyonu sırasında da çekirdek DNA'ya katılabilir fakat bu tür durumlarda katılması beklenen BrdU miktarının hücre bölünmesinin sırasında katılması beklenen miktardan daha düşük olacağı unutulmamalıdır. Bu nedenle DNA sentezinin bir belirteçidir. BrdU çekirdek DNA'sı dahil edildikten sonra immünohistokimyasal yöntemlerle tespit edilebilir. Fakat BrdU testi büyük ölçüde tespit tekniklerinin doğruluğuna dayanır ve bu nedenle mutlak nicelik belirleme için kullanılamamaktadır. BrdU ile çekirdek DNA etiketlendikten sonra örnekler sabitlenir ve anti - BrdU monoklonal antikorlar ve nükleazlarla inkübe edilir (ya da ısıya veya DNA denatürasyonuna neden olan diğer koşullara maruz bırakılır). Bu denatürasyon, anti - BrdU monoklonal antikorlarının tek sarmallı DNA'da inkorpore olmuş BrdU'ya etkileşebilmesi için gereklidir. Ardından örnek anti - BrdU antikoruna karşı sekonder antikorla inkübe edilir. Sekonder antikor genellikle, eklenen substrata maruz kaldığında kolorimetrik bir reaksiyona neden olan bir enzimle ilişkilidir. Reaksiyon aydınlık alan mikroskobu ile gözlemlenebilir (Crane ve Bhattacharya, 2013).

2.2.1.4. Akış Sitometrisi Analizi

Akış sitometrisi (FC), yüksek hızlı bir sıvı akışı içerisinde süspansiyon olan ve lazer ışımından tek sıra halinde geçen hücrelerin ve süspansiyondaki diğer parçacıkların biyolojik ve fiziksel özelliklerinin niceliksel ve niteliksel olarak ölçülmesine dayanan bir yöntemdir. Hücreleri bir ışık kaynağından geçerken saçılan ışıktan floresan sinyalleri ölçen çok parametrelili bir teknolojidir. FC, boyut, şekil, yoğunluk, DNA, RNA ve protein içeriği, reseptörler, membran yapısı, apoptoz, nekroz, kalsiyum akışı ve hücre içi pH gibi hücrelerin içsel ve dışsal özellikleri ile ilaç ve radyasyonun etkileri hakkında bilgi sağlayabilir. Hücre popülasyonlarını tek hücre düzeyinde karakterize edebilmektedir. Genellikle çok sayıda hücrenin ortalama değerlerini veren diğer biyokimyasal tekniklerin aksine organizmaları, parçacıkların, tüm hücrelerin, kromozomların, organellerin veya protoplastların

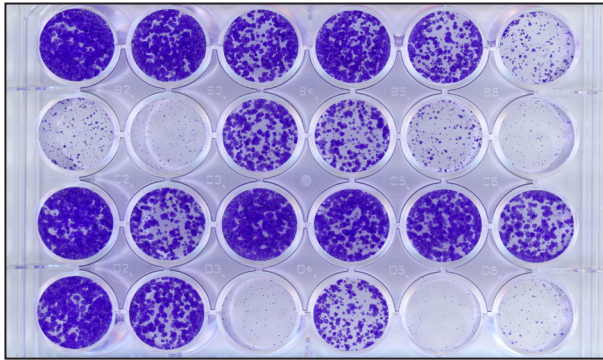
incelenmesini sağlamaktadır. FC farklı hücre alt popülasyonlarını ayırt etme potansiyeline sahiptir; örneğin hücre döngüsünün farklı aşamalarının açıkça ayırt edilebildiği asenkron büyümeye sahip hücre kültürlerinin analizine olanak tanıyabilmektedir. Yıllar geçtikçe memeli hücre kültürlerinde önemli bir teknik haline gelmiştir (Alfonso ve Al-Rubeai, 2011). FC, immünofenotipleme, hücre içi sitokin analizleri, hücre proliferasyon analizleri, apoptoz analizi, hücre döngüsü analizleri, hücrelerin ayrılması, mutlak hücre sayımı gibi alanlarda kullanılabilir (McKinnon, 2018). Şekil 9’da bir akış sitometri cihazına ait floresan yoğunluk histogram örneği verilmiştir.



Şekil 9. Akış sitometrisi floresan yoğunluk histogram örneği.

2.2.1.5. Koloni Oluşum Analizi

Koloni oluşum testi klonojenik analiz olarak da bilinen, tek hücrelerin hayatta kalma ve koloniler halinde çoğalabilme kapasitesini değerlendiren bir *in vitro* hücre canlılık testidir (Şekil 10). Test, bilinen sayıda hücrenin bir kültür kabına ekilmesini ve hücrelerin belirli bir süre boyunca (birkaç günden birkaç haftaya kadar değişebilir) büyütülmesini içermektedir. Bu süre zarfında hücreler hayatta kalıp çoğalabilirlerse koloni oluşturabilirler. Hücreler koloni oluşturduktan sonra koloniler sabitlenir, boyanır ve manuel olarak veya otomatik görüntüleme sistemleriyle sayılırlar. Koloni oluşum testi, kanser hücreleri, kök hücreler ve normal hücreler gibi çeşitli hücre türlerinin canlılık oranını ölçmek için kullanılabilir. Ayrıca kemoterapi, radyasyon terapisi ve gen terapisi gibi çeşitli tedavilerin hücrelerin canlılığı ve proliferasyonu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi için de kullanılabilir (Brasemann ve ark., 2015; Rajendran ve Jain, 2018).



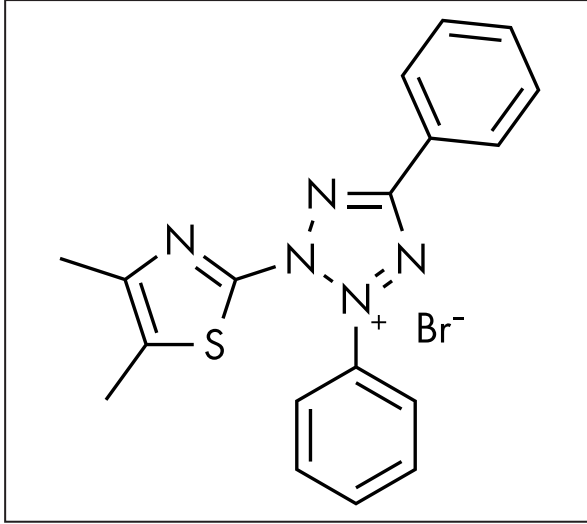
Şekil 10. Koloni oluşum analizi.

2.2.1.6. Tripın Mavi Boyama Analizi

Tripın mavi boyama analizi, hücre canlılığını belirlemek için hücrelerin tripın mavisi, eozin, propidyum gibi boyaları alıp almadığını veya dışladığını değerlendiren bir testtir. Hücre membran bütünlüğü korunan hücrelerin boyayı almazken, membranları zarar gören hücrelerin boyanarak sitoplazmalarının mavi boyanması sağlanır. Bu test, bir hücre süspansiyonunun tripın mavisi boyasıyla karıştırılıp inkübe edilmesini ve ardından canlı (boyanmamış) ve cansız (boyanmış) hücrelerin görsel olarak incelenmesini içermektedir. Canlı hücrelerin yüzdesi, toplam hücre popülasyonuna kıyasla boyanmamış hücrelerin sayısına göre hesaplanmaktadır. Bu test araştırma ve klinik ortamlarda hücre canlılığını değerlendirmek üzere basit ve yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Strober, 2015).

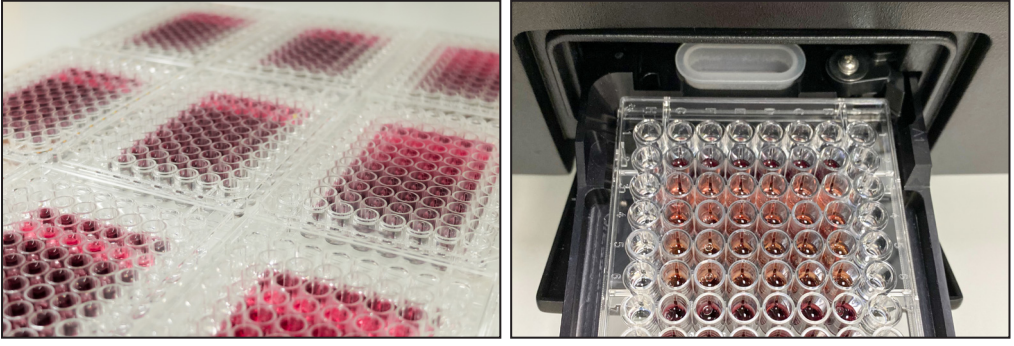
2.2.1.7. MTT Analizi

MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid), analizi hücre metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı bir yöntem olup hücre sitotoksitesi araştırmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. MTT reaktifi bir mono - tetrazolyum tuzudur (Şekil 11). MTT'nin indirgenmesiyle çekirdek tetrazolyum halkası bozularak formazan adı verilen mor - mavi suda çözünmeyen bir molekül oluşmaktadır. MTT reaktifi canlı hücreler tarafından hem hücre zarından hem de kristadan geçerek metabolik olarak aktif olan hücrelerde formazana indirgenmektedir. Hücre içi formazan üretimi kolorimetrik olarak ölçülebilmektedir. Dolayısıyla metabolik aktivite tahlili olarak geniş bir kullanıma sahiptir (Ghasemi ve ark., 2021).



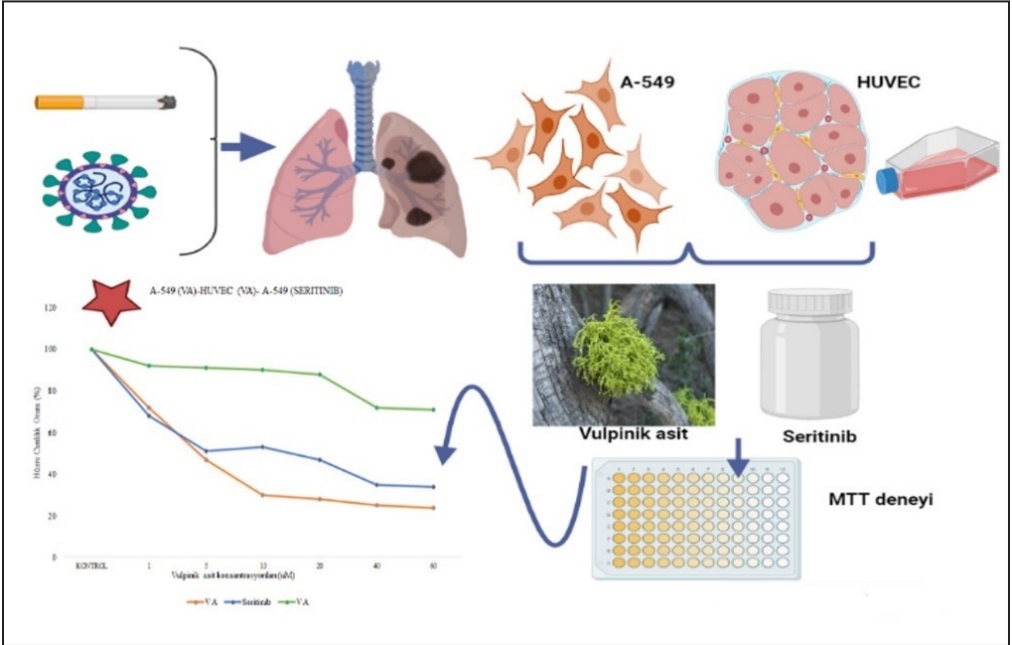
Şekil 11. MTT reaktifinin kimyasal yapısı.

MTT, tipik olarak hücrelerin MTT ile birkaç saatlik inkübasyonundan sonra gerçekleştirilmektedir. İnkübasyondan sonra hücreler MTT'nin indirgenmesiyle elde edilen formazanın ışığı maksimum absorbe ettiği dalga boyunda (yaklaşık 570 nm) optik yoğunluğu (OD) ölçülür (Şekil 12). Elde edilen OD değerinin formazan konsantrasyonunu dolayısıyla MTT'nin hücre içi indirgenmesinin bir temsili olduğu düşünülmektedir. Bu yöntem hücre çoğalmasını / canlılığını, ilaç sitotoksitesini ve hücrelerin mitokondriyal/metabolik aktivitesini ölçmek için bir yöntem olarak uzun süredir kullanılmaktadır (Ghasemi ve ark., 2021).



Şekil 12. MTT analizini gerçekleştirmek üzere hücrelerin mikropalakaya ekilip MTT reaktifinin eklenmesi ve OD ölçümü için mikropalakının cihaza yüklenmesi.

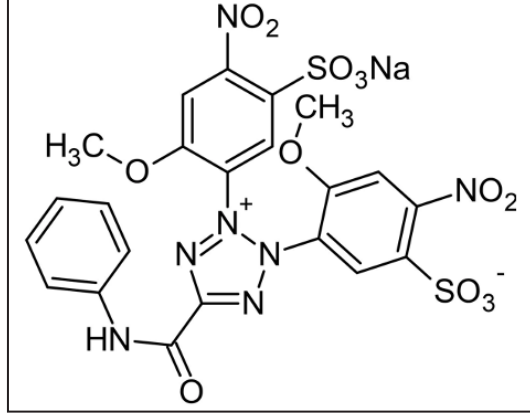
MTT analizi sitotoksik aktivite değerlendirmesinde altın standart olarak kabul edilse de büyük ölçüde metabolik aktiviteye bağlıdır. MTT, mitokondriyel dehidrojenazlar özellikle de süksinat dehidrojenazın aktivitesine bağlıdır. Bu nedenle tek bir analiz olarak MTT'nin kullanılması hücre canlılığını doğrudan etkilemeden mitokondriyel fonksiyonu ve hücre metabolik aktiviteyi azaltan bileşiklerin sitotoksitesini değerlendirmek için en iyi yol olmayabilir (Hoogstraten ve ark., 2022). Bazı sınırlamaları bulunmasına karşın bu durumun aşılması için güvenilirliğini ve doğruluğunu artıracak çalışmalar yapılabilir veya yeni teknolojiler geliştirilebilir. Şekil 13'de örnek bir MTT analizi çalışma tasarımı sunulmuştur.



Şekil 13. Küçük moleküllerin hücre hatları üzerindeki sitotoksik etkisinin araştırılması. Şekilde vulpinik asidin akciğer kanseri ve tedavisi ile ilgili çalışmalarda kullanılan bir adenokarsinom hücre hattı olan A - 549 hücre hattı ve insan göbük damarı endotel hücreleri (HUVEC) üzerindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu nedenle bir hücre sitotoksosite testi olan MTT çalışması tasarlanmıştır. Vulpinik asidin sitotoksik aktivitesi Seritinib ile karşılaştırılmıştır. Şekilde ise hücre hatlarının kültürlenmesi, MTT yapılmak mikropalakaya ekilmesi ve MTT analizi sonucunda elde edilen OD değerleri görülmektedir.

2.2.1.8. XTT Analizi

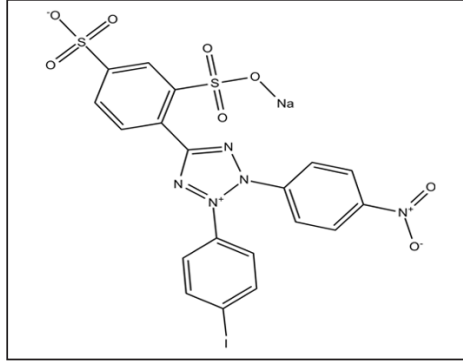
XTT (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfofenil)-5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit), MTT gibi kalorimetrik olarak ölçülebilen bir tetrazolyum tuzudur (Şekil 14). Hücresel canlılığın incelenmesi için kullanılmaktadır. Bu yöntem aynı zamanda XTT'yi formazan kristallerine dönüştüren mitokondriyel NADH enzimleri tarafından XTT'nin indirgenmesine dayanmaktadır. XTT testi, suda çözünür formazan kristalleri üretmesi bakımından MTT'den ayrılmaktadır. Böylelikle MTT prosedüründeki ek çözündürme aşaması ortadan kaldırılmış olmaktadır. Ayrıca XTT'nin, MTT'ye göre daha duyarlı olduğu ve diğer tetrazolyum bazlı analizlere göre daha geniş kullanım alanı olduğu öne sürülmektedir (Adan ve ark., 2016).



Şekil 14. XTT reaktifinin kimyasal yapısı (Abcam).

2.2.1.9. WST Analizi

Suda çözünür tetrazolyum (WST, (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4 disülfofenil)-2H-tetrazolyum)) tuzları, canlı hücrelerde mitokondriyal nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) enzimleri tarafından formazan kristalleri üreten hücre canlılığı analizleri için yeni nesil bileşikler olarak geliştirilmiştir (Şekil 15). WST-1 ve WST-8 bir iyot rezidüsü içerir ve fenazin metosülfat (PMS) varlığında XTT'ye göre daha stabildir. WST bileşikleri, PMS elektron aracısıyla birleştirildiğinde hücre dışında da indirgenerek MTT ve XTT'den daha iyi spektrofotometrik sinyal verebilir. WST tahlilleri, formazan kristallerini yıkamak veya çözündürmek için herhangi bir ek adıma ihtiyaç duymamaktadır ve tüm protokolü daha hızlı hale getiren kullanıma hazır çözelti olarak pazarlanmaktadır (Adan ve ark., 2016).



Şekil 15. WST-1 reaktifinin kimyasal yapısı (RayBiotech).

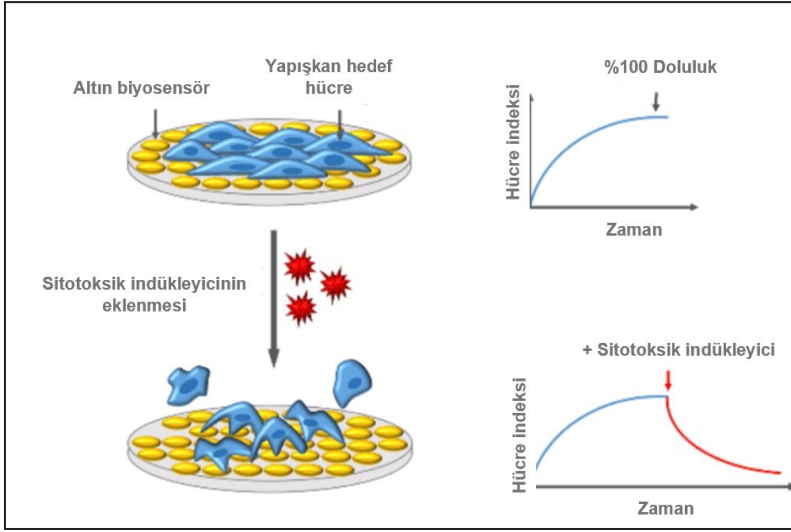
2.2.1.10. Gerçek Zamanlı Hücre Analizi

Gerçek zamanlı hücre analiz (RTCA - xCELLigence) sistem teknolojisi, gerçek zamanlı hücresel bir biyosensördür. RTCA - xCELLigence sistem teknolojisi deney süresi boyunca hücrelerin kesintisiz, etiketlenmeden ve gerçek zamanlı olarak analiz edilmesine dayanmaktadır (Şekil 16). Biyolojik araştırma alanında elektronik teknolojilerinin gelişmesiyle RTCA - xCELLigence analizi giderek yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Birçok farklı araştırma alanında yaygın olarak kullanılmaktadır ve ilaç aktivite taraması, ilaç sitotoksik etki belirleme araştırması, patoloji analizi gibi çeşitli araştırmalarda kullanılmaktadır (Yan ve ark., 2018).



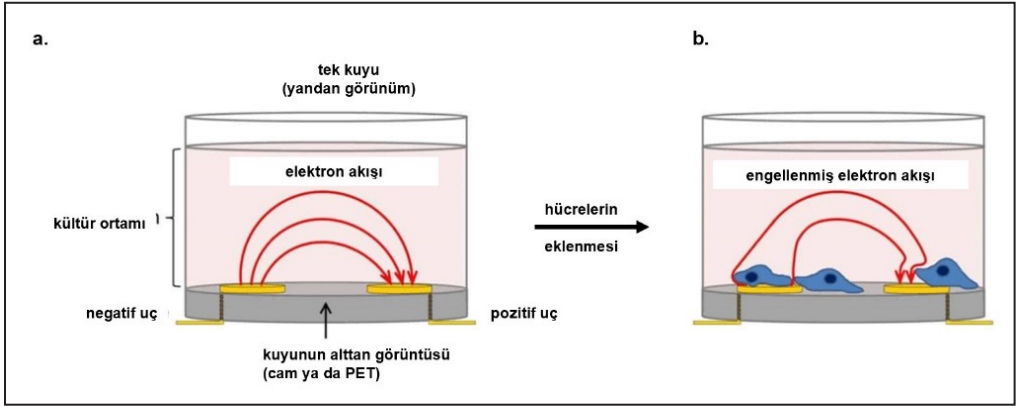
Şekil 16. RTCA - xCELLigence analiz sistemi (OMNILifeSciences).

İlaç keşif araştırmalarında kullanılan güçlü bir teknoloji olan RTCA - xCELLigence analiz sistemi ile hücrelerin çeşitli molekül ve ilaçlara karşı verdiği cevabı hücreleri etiketlenmeden, yüksek verimle ve gerçek zamanlı olarak izlenebilmektedir. Bu sistem hücrelerin, özel olarak tasarlanmış E - plakalar üzerine basılmış yüksek yoğunluklu altın elektrot dizilerine olan net adezyonunu ölçmektedir (Şekil 17). Böylelikle hücre canlılığı, büyümesi, migrasyonu ve proliferasyonuna ilişkin bilgiler vermektedir (Atienzar ve ark., 2011; Kho ve ark., 2015).



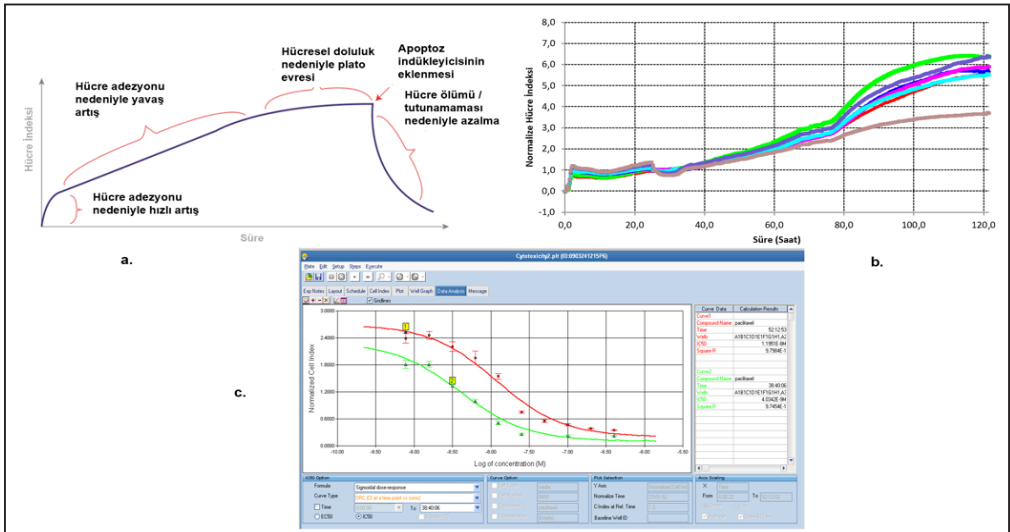
Şekil 17. RTCA - xCELLigence analiz sisteminde kullanılan E - plakaya yapışkan hedef hücrenin ekilip sitotoksik indükleyici eklenmesi ve zamana bağlı olarak hücre indeksi değeri (OMNLifeSciences).

Sistem, 16 kuyulu özel plakanın (E - plaka) alt yüzeyinde bulunan altın kaplama sensör elektrotunun elektron direncini okuma prensibine dayanmaktadır (Şekil 18). Bu plakaların her birinin altında altın mikroelektrot biyosensörler kullanılmaktadır. Mikroelektronik çip tarafından ölçülen elektriksel empedans, hücrenin büyümesi, sayısı, canlılığı, proliferasyonu, morfolojik değişiklikleri, adezyon gibi fizyolojik durumlar hakkında niceliksel bilgiler vermektedir. RTCA - xCELLigence analiz sisteminde yer alan altın mikroelektrotların empedansı, hücrenin bulunmadığı veya elektrotlara yapışmadığı durumlarda iyonik hücre kültürü ortamı çözeltisiyle belirlenmektedir. Yapışkan hücreler elektrotun yüzeyinde yalıtkan görevi görerek elektrot çözeltisinin iyonik ortamını değiştirip empedansı artırmaktadır. Hücreler yüzey elektroduna bağlandıkça veya elektrottan ayrıldıkça, elektronik okumalar değişmektedir. Bu durum hücre indeksi (CI) değerleri olarak çizilen empedans değişiklikleriyle sonuçlanmaktadır. Elektrot üzerinde daha fazla hücre olması durumunda CI değeri daha yüksek olmaktadır. Ayrıca hücrenin elektroda yapışma durumu da (miktar ve kütle) empedansta değişikliklere yol açmaktadır. Hücre büyümesinin artışı ve elektrot temas yüzeyi empedansta daha büyük değişikliklere neden olmaktadır. Dolayısıyla empedans okuması her hücre ve elektrot arasındaki hücre etkileşimi ve hücrelerin yapışma özelliklerinin kalitesinden etkilenebilmektedir. Bu nedenle hücre canlılığı, hücre sayısı, hücre morfolojisi ve hücrenin yapışma durumu gibi biyolojik faktörler ölçümleri etkilemektedir (Türker Şener ve ark., 2017; Yan ve ark., 2018).



Şekil 18. RTCA - xCELLigence analiz sistemi E - plaka görüntüsü. Şeklin a bölümü kültür ortamı aracılığıyla elektron akışını göstermektedir. Şeklin b bölümünde ise altın mikroelektrotla üzerinde tutunan / büyüyen hücreler nedeniyle engellenen elektron akışı görülmektedir (OMNLifeSciences).

Analizin ilk aşamasında RTCA - xCELLigence analiz sistemi ile sistemin yazılımının bulunduğu bilgisayarın arasındaki kablosuz bağlantı açılır. Gerçekleştirilecek analiz protokolüne uygun olarak cihaz programlamaları yapılır. Kullanıcıların ölçümler arasındaki süre, okuma tekrar sayısı, her kuyu için ekilecek hücre sayısı ve molekül / ilaç uygulama konsantrasyonunu değiştirebilir veya optimize edebilir. Cihazın programlaması sonrası E - plakaya çalışılan hücreye uygun besiyeri eklenerek arka plan değeri alınır. Bu işlemin ardından hücreler eklenir. Yapışkan hücreler çoğalarak arttığında elektrik akımı giderek engellenmektedir. Bu empedans değeri CI değeri olarak çizilmektedir. Eğer kuyular gereken CI - 1 değerine ulaşmazlarsa daha fazla hücre ekilir. Bu aşamadan sonra araştırılmak istenen molekül veya ilaç kuyulara eklenir. Bu adımlardan sonra belirlenen programlamaya göre deney başlatılıp hücrede ilaca karşı oluşan cevap profili online olarak takip edilir. Analiz sonucunda sitotoksisite uygulamaları için yarı maksimum inhibitör konsantrasyon değerlerine (IC_{50}) ek olarak CI değerleri de elde edilmektedir (Şekil 19).



Şekil 19. RTCA - xCELLigence sistemi. Şeklin a bölümünde RTCA - xCELLigence analiz sistemi analiz sırasında bir örnek profili görüntülenmektedir. Şeklin b bölümünde RTCA - xCELLigence analiz sistemiyle yapılan örnek bir çalışma yer almaktadır. Şeklin c bölümü ise analiz sonuç ve cihaz istatistiksel analiz programı ile IC_{50} konsantrasyonunu belirlemeyi göstermektedir (OMNLifeSciences).

İlaç keşfinde RTCA - xCELLigence analiz sistemi ile, hücrelerin moleküllere vereceği cevabın gerçek zamanlı olarak değerlendirilmesi, hedef molekül / ilaç adaylarının belirlenmesi, sitotoksosite profili gibi birçok parametre araştırılarak hedefli tarama gerçekleştirilebilir. Aynı zamanda bu teknoloji çeşitli moleküllere verilen hücresel cevapları belirleyerek spesifik reseptör agonistlerinin veya antagonistlerinin belirlenmesi sağlayabilir. RTCA - xCELLigence analiz sistemi, kardiyotoksosite taraması, hücre-aracılı ölüm, toksikoloji, viroloji ve immünoloji gibi birçok farklı alanda uygulanmaktadır. RTCA - xCELLigence analiz sistemi, MTT, XTT vb. boyaya dayalı hücre proliferasyon profili belirleme yöntemleri ile karşılaştırıldığında hem kontaminasyon riskini azaltır hem de ekstra işlevsellik kazandırmaktadır (Türker Şener ve ark., 2017). Bunlara ilaveten;

- RTCA - xCELLigence analiz sisteminin, MTT vb. analizlere göre birincil avantajlarından biri, hücre çoğalmasını **gerçek zamanlı olarak izlenebilmesidir**. MTT testi gibi geleneksel hücre proliferasyon profili belirleme analizleri, yalnızca belirli bir zaman noktasında hücre canlılığının anlık görüntüsünü sağlar. Buna karşılık RTCA - xCELLigence analiz sistemi, tüm deney süresi boyunca empedans değişikliklerini sürekli olarak kaydederek bağlanma, yayılma ve çoğalma dahil olmak üzere hücresel olayların dinamik bir görünümünü sunar.
- **Yüksek Hassasiyet ve Kesinlik:** RTCA - xCELLigence analiz sistemi, MTT vb. gibi analizlere kıyasla daha yüksek hassasiyet ve kesinlik sunar. Empedans tabanlı okuma, hücre davranışındaki ince değişikliklere karşı daha hassastır ve araştırmacıların erken aşamalarda bile proliferasyon oranlarındaki değişiklikleri tespit etmelerini sağlar. Bu yüksek hassasiyet, uygulamada verilen hücresel cevabın tanımlanmasına olanak tanıyarak deneysel sonuçların daha doğru bir şekilde değerlendirilmesini kolaylaştırır.
- **Azaltılmış Deneysel Değişkenlik:** MTT vb. gibi analizler genellikle hücresel uygulama ve formazan kristallerinin çözünür hale getirilmesi dahil olmak üzere birden fazla adım gerektirir ve bu da sonuçlara değişkenlik ve öznellik getirebilir. RTCA - xCELLigence analiz sistemi, fazla uygulama içermediğinden yöntem adımlarını ortadan kaldırır ve deneysel değişkenliği azaltır. Değişkenlikteki bu azalma, elde edilen verilerin güvenilirliğini artırır ve deneyler arasında daha tutarlı ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar.
- **Geliştirilmiş Verim ve Etkinlik:** RTCA - xCELLigence analiz sistemi, MTT vb. analizlere kıyasla daha yüksek verimli tarama sağlar. Testin gerçek zamanlı yapısı, birden fazla deneysel koşulun eşzamanlı olarak izlenmesini sağlayarak zaman ve kaynak tasarrufu sağlar. Bu artan verimlilik, özellikle öncül moleküllerin tanımlanması veya deneysel koşulların optimize edilmesi için hızlı veri elde etmenin gerekli olduğu ilaç keşfi ve yüksek verimli çalışmalarda değerlidir.
- **Çeşitli Hücre Tiplerine Uygulanabilirlik:** RTCA - xCELLigence analiz sistemi çok yönlüdür ve yüzeye yapışık ve yapışık olmayan hücreler de dahil olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine uygulanabilir. Uygulama şekli esnekleri, metabolik aktivite veya yapışma özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle belirli hücre tipleri için daha az uygun olabilen MTT vb. analizler ile tezat oluşturmaktadır. Farklı hücre modellerini inceleme yeteneği, RTCA - xCELLigence analiz sisteminin farklı araştırma alanlarında uygulanabilirliğini artırmaktadır.

RTCA - xCELLigence analiz sistemi geleneksel boyaya dayalı hücre canlılığı belirleme analizlerine göre birçok avantajı olmasına karşı, sarf malzemelerin ve cihazın maliyetinin yüksek olması bir dezavantajdır. Aynı zamanda RTCA - xCELLigence analiz sistemi kullanacak araştırmacıların eğitim ve deneyim kazanması da gerekmektedir (Kho ve ark., 2015).

Özetle, RTCA - xCELLigence analiz sistemi, ilaç keşfi için güçlü bir cihazdır ve hücreler uygulanan moleküllere verilen cevabın gerçek zamanlı ve yüksek verimli olarak izlenmesine olanak tanımaktadır (Kho ve ark., 2015). MTT vb. gibi hücre proliferasyonu analizlerinin maliyeti düşük olsa da tekrarlanabilir olmaması ve ölü hücrelerin doğrudan tespit edilememesi gibi dezavantajları

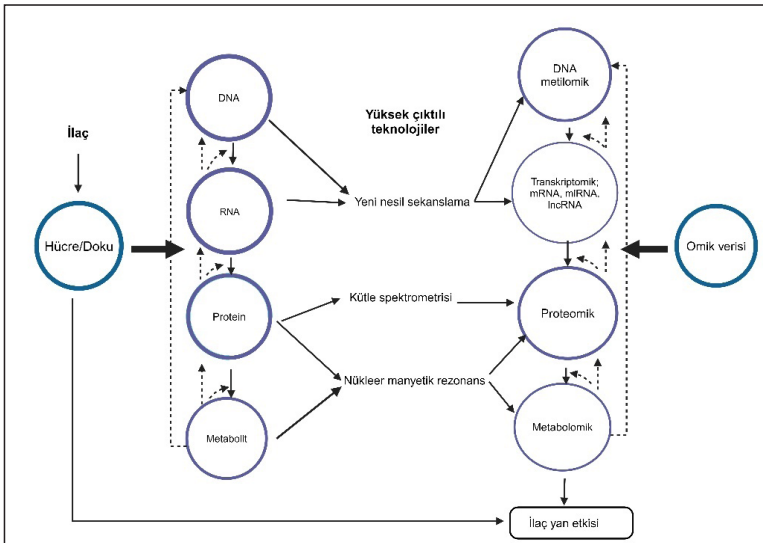
vardır. Buna karşılık RTCA -xCELLigence analiz sistemi ile hücrelerin anlık olarak izlenebilmesi gibi birçok avantajlara sahip olması nedeniyle daha güçlü hücre proliferasyon ve canlılık belirleme aracı olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle özellikle sitotoksitesite analizleri için RTCA -xCELLigence analiz sistemi ilaç endüstrisi ve akademide daha sık kullanılması önem arz etmektedir.

3. İLAÇ ARAŞTIRMALARINDA OMİK TEKNOLOJİLERİ

2001 yılında insan genom projesi ile insan genomunun taslak dizisinin yayınlanması büyük bir başarı olarak tarihe geçmiştir. Omik teknolojilerine dayalı çalışmalar farklı biyomoleküllerin ifadesini hastalıklarla ilişkilendirmeyi amaçlamaktadır. Genom dizileme sayesinde çok fazla bilgi sahibi olunamayan hastalıklar hakkında temel bilgiler elde edilip ve tedavi yöntemleri geliştirilebilir (Costales ve ark., 2020).

Genomik, hastaların genomundaki hastalıkla ilişkili genetik değişikliklerin belirlenmesi ile hastalığın daha iyi anlaşılmasını sağlamaktadır. **Transkriptomik** sayesinde biyolojik bir örnek içindeki mRNA transkriptlerinin miktarı hakkında bilgi sağlanmaktadır. **Proteomik** sayesinde hücredeki tüm proteinler çalışılarak genomik ile elde edilen bilgiler tanımlanır ve doğrulanır. **Metabolomik** ise hücrenin anlık fizyolojik durumu hakkında bilgi edinebilmek için biyolojik süreçlerden elde edilen hücresel metabolitler incelenmektedir (Khodadadian ve ark., 2020).

Farklı teknolojiler sayesinde biyolojik moleküller tespit edilebilse de omik teknolojileri ile kısa sürede yüksek boyutlu veriler üretilebilir. Omik teknolojileri hücre içindeki biyomolekülleri tespit ederek yüksek çıktı sağladığından yüksek verimli teknolojiler olarak araştırmalarda yer almaktadır. Biyomolekülleri ölçen teknolojiler, yeni nesil dizileme (NGS), kütle spektrometrisi (MS) ve manyetik nükleer rezonans (NMR) olarak kategorize edilebilir. NGS, DNA ve RNA dizilemenin yanı sıra epigenetik profil hakkında da bilgi edinilmesini sağlar. MS protein tanımlanmasında yaygın olarak kullanılsa bile amaca bağlı olarak metabolitler için hem MS hem de NMR kullanılabilir. İlaç araştırmalarında bir ilacın hücrelerdeki hangi biyomolekülleri etkileyebileceği, bu biyomoleküller için kullanılacak teknolojinin ve hangi omik verisinin elde edileceği Şekil 20’de sunulmuştur (Nguyen ve ark., 2022).



Şekil 20. İlaç araştırmalarında kullanılan omik uygulamaları (Nguyen ve ark., 2022).

Omik teknolojileri sayesinde potansiyel ilaç hedefleri belirlenebilir, böylece ilaçların yan etkileri ve etkinliği hakkında bilgi edinilebilir ve ilaçların moleküler etki mekanizmaları ortaya çıkarılabilir. İlaçların hedeflerini doğrulamak için kullanılabilir ve istenen terapötik etkilere sahip olup olmadığı belirlenebilir. İlacın etkinliği ve toksisitesini etkileyen genetik varyasyonlar belirlenerek kişiselleştirilmiş tedavi stratejilerinin geliştirilmesi sağlanabilir (Goff ve ark., 2020; Nguyen ve ark., 2022; Paananen ve Fortino, 2019).

3.1. İlaç Araştırmalarında Genomik Teknolojisi

Bir hücrenin veya organizmanın genomundan nükleus, mitokondri, kloroplast gibi organellerdeki tüm DNA dizi bilgisi elde edilmektedir. Mutasyon haricinde, uzun süre geçse bile genom oldukça stabil kalmaktadır (Nassar ve ark., 2021). İnsan Genom Projesi ile genomik analizlerin kullanımına odaklanılmıştır. İlk genom çapındaki analizlerden biri açık okuma çerçevelerinin (ORF) sayısının belirlenmesidir. DNA Elementleri Ansiklopedisi (ENCODE) projesiyle ORF'lerin, genlerin 1 / 3'ünde olduğu ortaya çıkarılmıştır. Dahası insan genomunun yalnızca % 2'sinin küçük molekül ilaçların hedefi olan proteinlere çevrildiği belirlenmiştir. Genomun % 90'ı RNA transkribe edilmektedir fakat bunların büyük çoğunluğu protein kodlamamaktadır. Kodlamayan RNA'ların (ncRNA) farklı fonksiyonları olduğu belirlenmiştir (Costales ve ark., 2020). Genomik ile hastalık tanısı ve tedavinin yönü değişmektedir ve bu nedenle ilaç keşfinde ilgi odağı haline gelmiştir. Yani odak noktası yeni kimyasalların keşfedilmesinden ziyade temel biyolojinin daha iyi anlaşılmasına kaymaktadır (Nassar ve ark., 2021).

Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) (ortak varyantların (popülasyonda % 1 - 5'ten büyük allel frekansı) yüksek yoğunluklu genotiplemesini kullanmaktadır), ve bağlantı analizi, ekzom dizileme ve tüm genom dizileme günümüzde kullanılan teknolojilerdir. Ekzom ve tüm genom dizileme ile nadir hastalıkla ilişkili spesifik varyantları tanımlanabilir. Genom analizindeki amaç insanlarda doğal olarak meydana gelen ve belirli bir proteinin aktivitesini etkileyen mutasyonları hedefleyen ilaçların toksisite ve potansiyel etkisi tanımlamaktır (Spreafico ve ark., 2020). GWAS, tüm genom dizileme ve transkriptom analizi yeni ilaç hedeflerinin keşfedilmesi ve doğrulanması için temeldir, böylece ilaçların terapötik etkinliklerini ve yan etkilerini değerlendirmek için sistematik bir yaklaşım sağlamaktadır (Paananen ve Fortino, 2019).

Popülasyona yönelik artan sayıda büyük ölçekli GWAS meta - analizleriyle karmaşık hastalıkların altında yatan biyolojik süreçlere yönelik önemli bilgileri ortaya çıkarmış olup genomik odaklı ilaç keşfinin derinlemesine uygulanması olasılığını sağlamıştır. GWAS'dan elde edilen bilgiler git gide arttığından sadece ilaç keşfi değil ilaçların yeniden konumlandırılmasında da büyük bir potansiyele sahiptir (Lau ve So, 2020).

Nadir olmayan hastalıklar için ilk GWAS 2005 yılında yaşa bağlı maküler dejenerasyon (AMD) için yapılmıştır. Ailelerle yapılan genetik bağlantı analizi, bu hastalıkta 1. kromozomun bir bölgesinin değiştiğini ortaya çıkartmıştır. Aynı bölge GWAS ile *CFH* geninin kodlayan bölgesindeki bir yanlış anlamlı varyant artmış AMD riski ile ilişkilendirilmiştir. Sonraki yıllarda *CFB*, *C2*, *C3*, *C9* ve *CFI* dahil olmak üzere diğer kompleman genlerde veya yakın bölgelerinde varyantlar tanımlanmıştır. Bu durum AMD'deki kompleman yolunun daha etkili olduğunu göstermiştir. Kompleman inhibitörleri ya geliştirilme ya da AMD'yi tedavi etmek için yeniden tasarlanmaktadır (Ghousaini ve ark., 2023).

Yaygın hastalıklarda meydana gelen nadir mutasyonlar ilaç keşfi için önemli bilgiler sağlayabilmektedir. *PCSK9* geninde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar (LoF) serum

düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeyini azaltarak koroner kalp hastalığına karşı koruma sağlamaktadır. Buna karşılık genin fonksiyon kazanmasına neden olan mutasyonlar (GoF) hiperlipidemi riskini artırmaktadır. Çalışmalar, PCSK9'un dolaşıma girdikten sonra düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörlerine bağlanarak endositoz ve degradasyonu teşvik edip kolesterolün kandan uzaklaşmasını azalttığı gösterilmiştir. Bu gözlemler PCSK9 inhibitörlerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Statinlere veya diyete yanıt vermeyen yüksek kolesterolü hastaların tedavisi için "Alirocumab" ve "Evolocumab" 2017 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmıştır (Ghousaini ve ark., 2023).

Tüm ekzom sekanslama (WES), kodlama bölgelerini hedefleyen bir yöntemdir. Hastalığa neden olan genlerin tanımlanmasını ve klinik teşhis için hastalığa neden olan varyantları belirlemek için etkili bir yöntemdir. Hasta odaklı bakım sunarak, gelecekteki tıbbi ihtiyaçları tahmin ederek ve gereksiz müdahalelerin yapılmasını önleyerek sağlık sistemine değer katabilir (Zhang ve ark., 2024).

Tüm genom sekanslama (WGS), WES'in kısıtlılıklarını bir ölçüde çözmüştür. WGS, büyük (>50 bp) insersiyon ve delesyonları, kopya sayısı değişikliklerini ve kromozomal yeniden düzenlemeleri belirleyebilmektedir. Aynı zamanda kodlamayan bölgeleri tespit edebilmektedir. WGS nadir ve yeni varyantlar dahil olmak üzere eş zamanlı genetik teşhis ve farmakogenetik analizlerin tek bir testte gerçekleştirilmesini sağlamaktadır. Kodlamayan bölgelerdeki spesifik hedeflerin belirlenmesi için bu tür kişiselleştirilmiş tedavinin kullanılması hastalıkları tedavi etmek için güçlü araçlar sağlayabilir. Geleneksel ilaç keşif yöntemlerinden farklı olarak GWAS, WES ve WGS ön bilgi ile sınırlı değildir. Bu yöntemler hastalıkla ilişkili yeni varyantların belirlenmesini sağlamaktadır. Genomik analizler sadece ilaç hedeflerinin belirlenmesi için değil aynı zamanda primer endikasyon hedeflerinin etkinliğini, güvenliğini değerlendirmek ve ilaç geliştirme önceliklerini planlamaya yardımcı olmak için ek hastalık endikasyonlarını belirlemek için de kullanılabilir (Zhang ve ark., 2024).

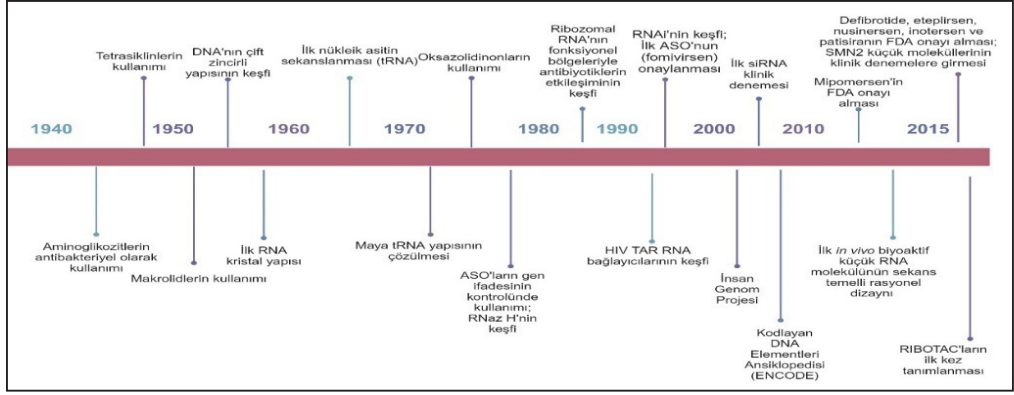
Özetle, üç yöntemin kombinasyonu, yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi, eski hedeflerin ise yeni hastalıklarla ilişkilendirilmesi için önemlidir. Böylece bu yöntemler ile tedavi sonuçları iyileştirilebilir ve ilaç geliştirme süreçleri hızlandırılabilir. Ayrıca mevcut teknolojiler, hakkında çok fazla bilgi bulunmayan bazı aday genler için ilaç geliştirme konusunda yeni bilgiler sağlayabilir, ilaç güvenliği ve ilacın yeniden konumlandırılma potansiyelinin değerlendirilmesine yardımcı olabilir.

3.2. İlaç Araştırmalarında Transkriptomik Teknolojisi

Transkriptom bir hücre veya dokuda ifade edilen tüm RNA transkriptleri olarak adlandırılmaktadır (Khodadadian ve ark., 2020). Bir transkriptomda mRNA, tRNA, rRNA ve mikroRNA'ların (miRNA) yanı sıra ncRNA'ların da kodlama dizileri bulunmaktadır (Qian ve ark., 2014). Transkriptomik ile ilaçların potansiyel zararının ve ilaç geliştiriminin ilk aşamalarında ilaçların hedefleri ile etkileşimleri değerlendirilebilir. Bu nedenle ilaç aday molekülünün seçimi için oldukça önemlidir (Nassar ve ark., 2021).

RNA bazlı terapötikler, hastalıkları tedavi edebilmek için umut verici yeni yöntemler haline gelmiştir. Şekil 21'de RNA bazlı terapötiklerin tarihsel süreci verilmiştir. RNA bazlı terapötikler iki gruba ayrılabilirler. Birinci grup, RNA aptamerleri, antisens oligonükleotidler (ASO), küçük müdahaleci RNA'lar (siRNA) ve kılavuz RNA'lar (gRNA) gibi hedefe (RNA transkriptleri, DNA, RNA gibi) doğrudan bağlanabilen terapötik RNA'lardır. Bu tür RNA'lar hedefledikleri biyokimyasal reaksiyonu inhibe ederler veya tetiklerler. İkinci grup ise, RNA molekülü ilacın (küçük molekül) bağlanması için bir hedef görevi görmektedir. Bu yaklaşım protein hedefli ilaç keşfine benzemektedir. Fakat insan genomunun yalnızca % 1,5'i protein kodlamaktadır ve bu genlerin de % 10 - 15'i hastalıkla

ilişkilidir. Öte yandan bir ilacın hedefleyebileceği proteinlerin miktarı, ilaç molekülünün yüksek afinite ile bağlanabilmesi için gereken koşullar nedeniyle daha da kısıtlıdır. Fakat ilaç molekülleri ile hedeflenemeyen proteinlerin genlerinin mRNA'ları hedeflenerek inhibe edilebilir. Dolayısıyla proteinlere göre RNA'lar daha geniş kullanım alanına sahiptir (Zhou ve ark., 2022).



Şekil 21. RNA hedeflemeye önemli gelişmelerin zaman çizelgesi (Costales ve ark., 2020).

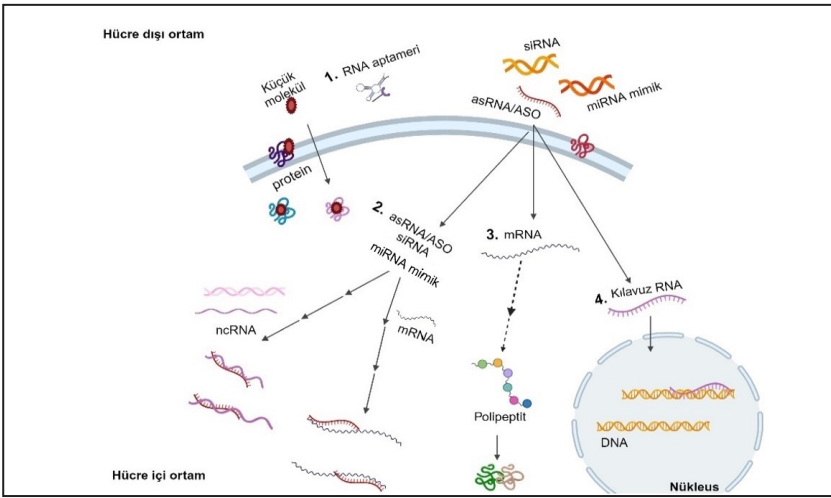
Günümüzde FDA tarafından onaylanmış RNA terapötikleri (örneğin; Mipomersen, Eteplirsen, Nusinersen, Inotersen, Golodirsen, Patisiran ve Givosiran) bulunmaktadır. RNA molekülleri, küçük moleküller ve proteinlerden daha fazla terapötik hedeflere karşı spesifik olduğu belirlenmiştir. Ancak, RNA'lar serum RNaz'lar tarafından degrade edilebilirler ve hücre içi hedeflerine ulaşabilmek için hücre membranını geçebilmeleri gerekmektedir. Ancak RNA molekülleri hem büyük moleküllerdir (> 7 kDa) hem de negatif yüklü olduğundan hücre membranından geçmeleri zordur. Ayrıca hücreye girdikten sonra da farmakolojik etkilerini gösterebilmeleri için ribonükleaz ve çeşitli RNaz'lardan kaçınmaları gerekmektedir. FDA tarafından onaylanan RNA terapötikleri Tablo 3'de verilmiştir (Yu ve ark., 2020).

Tablo 3. FDA tarafından onaylanan RNA terapötikleri (Yu ve ark., 2020).

RNA İlacı	Mekanizma	Hastalık	Onay Yılı	Kaynak
Pegaptanib (Aptamer)	Seçici vasküler endotelial (165. izoform) antagonisti; anjiyogenez	Neovasküler AMD	2004	(Gragoudas ve ark., 2004; Gryziwicz, 2005)
Mipomersen (ASO)	ApoB - 100 mRNA'sına seçici olarak bağlanarak karaciğerde ApoB translasyonunu engeller	Homozigot ailesel hiperkolesteroli (HoFH)	2013-2018	(Crooke ve Geary, 2013; Morrow, 2013)
Eteplirsen (ASO)	Distrofin pre - mRNA'sının 51. ekzonuna seçici olarak splayisngi değiştirmek üzere bağlanarak fonksiyonel kas proteini distrofinin üretimini sağlar	Duchenne kas distrofisi (DMD)	2016	(Cirik ve ark., 2011; Mendell ve ark., 2016; Stein ve Castanotto, 2017; Syed, 2016)
Nusinersen (ASO)	Splayisngi değiştirmek üzere SMN2 mRNA'sına seçici olarak bağlanarak tam uzunlukta SMN proteinin üretimini sağlar.	Spinal müsküler atrofi	2016	(Aartsma-Rus, 2017; Ottesen, 2017)
Patisiran (siRNA)	Seçici olarak TTR mRNA'sına bağlanarak TTR proteinin hepatik üretimini azaltır.	Hereditör tip transtiretin amiloidoz (hATTR)	2018	(Adams ve ark., 2018; Wood, 2018; Zhang ve ark., 2020)

Inotersen (ASO)	Seçici olarak TTR mRNA'sına bağlanarak mRNA'nın yıkılmasını sağlayarak protein üretimini azaltır.	hATTR	2018	(Benson ve ark., 2018; Keam, 2018)
Givosiran (siRNA)	ALAS1 mRNA'sına seçici olarak bağlanarak RNA interferans mekanizması ile yıkımını sağlar	Akut hepatik porfiri	2019	(de Paula Brandão ve ark., 2020; Sardh ve ark., 2019; Scott, 2020)
Golodirsen	Splaysingi değiştirmek üzere distrofin pre - mRNA'sının 53. ekzonuna seçici olarak bağlanır ve 53. ekzonun atlamasına uygun mutasyonları olan hastalarda fonksiyonel kas proteini distrofin üretimini sağlar.	DMD	2019	(Heo, 2020)

RNA aptamerleri, küçük moleküller veya protein bazlı ilaçlar tarafından hedeflenen hücre dışı, hücre içi proteinlere doğrudan bağlanabilmektedir. ASO'lar veya antisens RNA'lar (asRNA), siRNA'lar ve miRNA mimikleri, komplementerlik yoluyla mRNA'ları veya fonksiyonel ncRNA'ları hedeflemek üzere hücrelere iletilmektedir. Bu durum hastalıkların tedavisi için genlerin susturulmasını veya gen ifadesinin kontrolünü sağlar. Öte yandan mutasyona uğramış gen dizileri gRNA'lar kullanılarak değiştirilebilirler. RNA'ların etki mekanizmaları Şekil 22'de gösterilmiştir (Yu ve ark., 2020).



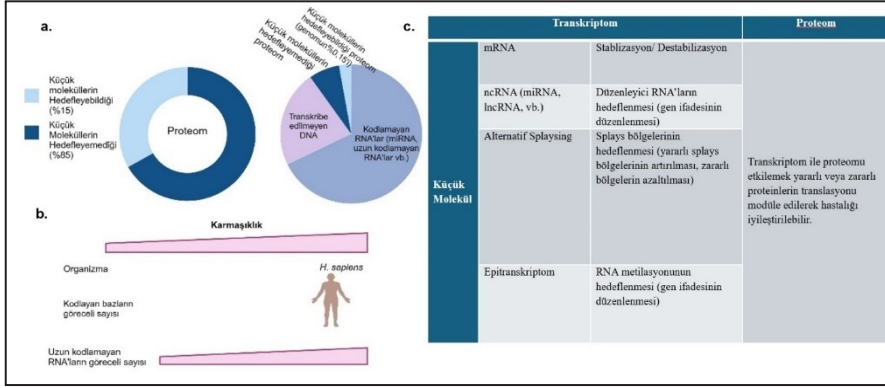
Şekil 22. RNA terapötiklerinin etki mekanizmaları (Yu ve ark., 2020).

Casimersen, distrofin pre - mRNA'nın 45. ekzonuna komplementerlik gösteren bir ASO ilaçtır (Ghoussaini ve ark., 2023). RNA molekülü terapötik olarak kullanımının yanı sıra küçük molekül ilaçların hedefi olarak kullanılabilir (Şekil 23). Kodlayan ve kodlamayan RNA'lar RNA'yı hedefleyebilen küçük molekül ile transkriptom üzerinde de etkili olabilirler. RNA'yı hedefleyen küçük moleküller;

- Doğrudan bağlanarak mRNA'nın stabilitesini modüle edebilir ve gen ifadesini değiştirebilir,
- Kodlamayan RNA efektörlerini etkileyebilir,
- Epitranskriptomu etkileyebilir.

Transkriptomun küçük moleküllerle modüle edilmesi sayesinde hatalı proteinlerin translasyonu düzenlenerek hastalık iyileştirilebilir. Aşağıdaki şekilde küçük moleküllerin tRNA üzerindeki etkileri özetlenmiştir (Costales ve ark., 2020).

RNA molekülleri hücredeki farklı moleküllerle etkileşebilmesi nedeniyle benzersiz tedavi araçları haline gelmiştir. Küçük moleküllerden farklı olarak hedeflenmiş tedavi sunarlar ve küçük moleküllerin hedefleyemediği gen ürünlerini hedefleyebilirler.



Şekil 23. Küçük molekülün ilaçların RNA üzerindeki etkileri (Costales ve ark., 2020).

3.3. İlaç Araştırmalarında Proteomik Teknolojisi

Proteomik, bir organizma, doku, hücre veya biyolojik bir sıvıdaki proteinlerin tümünü veya alt fraksiyonlarının incelenmesini amaçlayan bir yaklaşımdır. Proteomik, ifade edilen proteinlerin ve bunların modülasyonlarına dair bilgiler sağlamaktadır. Proteomik analizlere dayalı yöntemler ile ilaç keşif, biyobelirteç ve kanser araştırmalarına yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Husi ve Albalat, 2014).

Proteomik analizlerde ilk olarak çeşitli kantitatif yaklaşımlarla örnekler toplanır, proteinler ekstrakte edilir, ardından enzimatik ve kimyasal parçalanma ile peptitlere parçalanır. Hazırlanan örnekler uygun elektroforetik ve / veya kromatografik yöntemlerle ayrılırlar. Daha sonra ise farklı yollarla ve biyoinformatik araçlarla analiz edilirler. Böylece hem peptit seviyesinde hem de protein seviyesinde kütle spektrumlarıyla bilgi elde edilebilir (Nassar ve ark., 2021).

Proteomik, ifade seviyesi, yapısal ve fonksiyonel proteomik analizleri olarak üç ana gruba ayrılabilir. İfade seviyesi proteomik, proteinlerin nicel ve niteliksel ifade seviyesini incelemektedir. Hasta ve kontrol gibi iki grubun arasındaki protein ifade farklılıklarını belirlemektedir. Ayrıca hastalığa spesifik olan proteinleri ve sinyal iletim yollarında yer alan yeni proteinleri belirleyebilir. Genellikle farklı hücrelerdeki protein ifade seviyesi modellerinin incelenmesi için kullanılmaktadır. Farklılıklar 2 boyutlu jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi gibi tekniklerle tespit edilmektedir (Al-Amrani ve ark., 2021).

Yapısal proteomik, bir karışımdaki membran, organel ve ribozomlar gibi tüm protein etkileşimlerini belirler. NMR ve X - ışını kristallografisi, fonksiyonel proteinlerin üç boyutlu yapısını ve yapısal komplekslik derecesinin belirlenmesi için kullanılan yöntemlerdir (Al-Amrani ve ark., 2021).

Fonksiyonel proteomik, bir hücredeki proteinlerin işlevlerini ve moleküler mekanizmaların incelenmesi için kullanılır. Bir proteinin ortak çalıştığı proteinlerle olan etkileşiminin belirlenmesi için kullanılmaktadır. Özellikle bilinmeyen bir proteinin, belirli bir süreçte rol alan belirli bir protein kompleksinde ortak proteinlerle etkileşimini incelemektedir. Bu yaklaşım proteinin biyolojik rolünü

belirleyebilir. Ayrıca protein-protein etkileşimlerinin *in vitro* olarak aydınlatılması hücre sinyal yollarının da kapsamlı olarak belirlenmesini sağlayabilir (Al-Amrani ve ark., 2021).

İlaç keşfi karmaşık ve maliyetli bir süreç olduğundan proteomik gibi teknolojiler ilaç keşif sürecini kolaylaştırabilir ve hızlandırabilir. İlaç keşfi proteomik, genomik, metabolomik, biyoinformatik ve sistem biyolojisini kullanan multidisipliner bir alandır. Proteomik ise hedef tanımlama da önemli bir rol oynamaktadır. İlacın etkisi, toksisite, direnç ve etkinliğinin araştırılması bakımından da proteomik uygulamalar oldukça faydalıdır. Proteomik analizler, gen ifadesi profilinin protein ifade seviyesi göstergesi olmaması ve genomik analizlerin hücresel olayları sadece transkriptom aşamasına kadar gösterebilmesi nedeniyle genomik analizlere göre daha avantajlıdır. Bu nedenle çoğu araştırma proteinler ve proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını (PTM) değerlendirebilen proteomik analizlere odaklanmaktadır. Proteinler hastalık süreçlerinde ana ilaç hedeflerdir ve proteomik analizler hedef proteinlerin belirlenmesinde rol oynamaktadır. İlaç keşfinde belirli bir kimyasal yolu veya döngüyü inhibe edecek veya artıracak bir molekülün tasarlanması amacıyla hastalıkla ilişkili yolların belirlenmesinde rol oynar (Amiri-Dashatan ve ark., 2018).

Özetle proteomik analizler, ilaç keşfinde ilaç hedeflerinin belirlenmesini sağlayabilir, karmaşık hücresel yolların anlaşılmasına katkıda bulunabilir. Bu nedenle ilaç keşif çalışmalarında oldukça önemli bir yeri bulunmaktadır.

3.4. İlaç Araştırmalarında Metabolomik Analiz

Metabolomik analiz, metabolitler aracılığı ile hücresel durumun kapsamlı profilini sağlamaktadır ve hücre analizi için güçlü bir araçtır. Metabolomik analizler, hastaların tedaviye yanıtlarını, tanı, izleme ve değerlendirmesine yönelik daha kişiselleştirilmiş kesin yaklaşımlar geliştirmek için etkili bir yöntemdir. Metabolomik sayesinde bir organizmanın belirli bir örneğindeki metabolik aktivitesinin bir görünümünü elde edilebilir. Örnekler arasında biyokimyasal süreçlerden elde edilen metabolik ara ürünler olarak nükleik asitler, amino asitler, karbohidratlar ve lipidlerin yanı sıra hormonlar, sinyal molekülleri, ilaç molekülleri ve bunlardan elde edilen metabolitler bulunmaktadır. Bu moleküllerin tümü ele alındığında ilgili biyolojik sistemle ilgili metabolik durum, hücresel aktivite ve biyokimyasal süreçlere ilişkin genel bir bakış sağlanabilir. Ancak metabolomik dinamik olduğu unutulmamalıdır; yani hastalık, stres, beslenme düzenindeki değişiklikler, fiziksel aktivite, farmakolojik etkiler hem tek bir organizmada hem de aynı türün farklı organizmalarında farklı profil sergileyecektir. Bu nedenle metabolomik analizler ile fenotip farklılıkları daha kesin analiz edilebilir ve ilaç testleri için daha yararlı bir yöntem sağlayabilir (Nassar ve ark., 2021).

Metabolitler, PTM veya epigenetik düzenlenmeyi içeren mekanizmaların aksine fenotipin işlevsel bir temsilini gösterir. Metabolomik analizler hedefli analizler veya hedefsiz yaklaşımlar olarak ikiye ayrılabilir. Metabolomik analizlerin iş akışı ilk olarak deneysel tasarımıyla başlamaktadır. Ardından örneklerin elde edilme, hazırlanma, veri toplama, veri analizi ve verilerin biyolojik olarak yorumlanması ile devam etmektedir. Hedefli analizler farklı hipotezleri doğrulamak için kullanılırken hedefsiz analizler çoğu zaman keşif için kullanılmaktadırlar. Hedefli yaklaşımda özel analitik yöntemlerin tasarlanabilmesi için ilgilenilen molekül veya moleküllere yönelik ön bilgiye sahip olunmalıdır. Öte yandan metabolit kütüphanelerinin kullanılabilirliğinin artmasıyla kapsamlı hedefli yöntemlerin tasarlanması kolaylaşmıştır. Hedeflenmemiş yaklaşımda ise bir örnek içerisinde mümkün olduğu kadar çok metaboliti tespit etmeyi amaçlamaktadır. Veri tabanını tarayarak örneği orijinal sentetik materyallerle karşılaştırma ve tanımlaması sağlanır. Hedeflenmiş yaklaşımda metabolitler kolaylıkla tanımlanabilir. Hedefsiz yaklaşımda ise doğrulama için ek

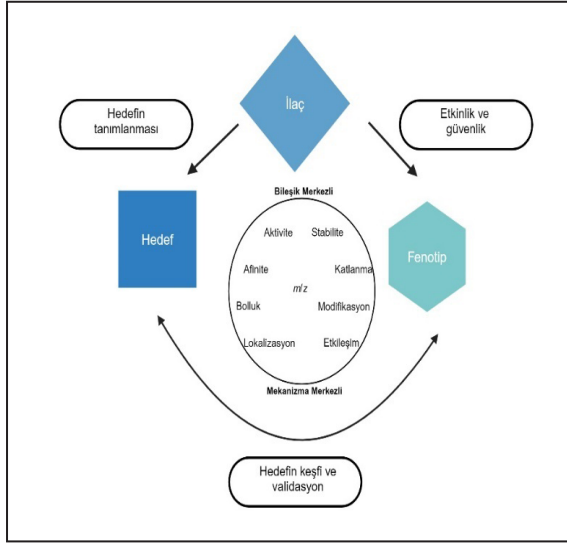
bir adım gerekir ve miktar belirlenebilmesi için gereken saf kimyasal miktarı çoğunlukla karşılanamamaktadır. Bununla birlikte, entegre yazılımlarla ve hedeflenmemiş metabolomik analiz yaklaşımlarla moleküllerin tanımlanabilmesi için uyarlanmış büyük ölçekli MS veri tabanlarının (örneğin, METLIN ve MS - DIAL) oluşturulmasıyla bu zorlukların üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır. Sonraki adımlar ise çalışmaya bağlı olarak belirlenmektedir ve örneğin analizi için hangi platformun kullanıldığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. Araştırma sorusu, deney tasarımı ve platform seçiminin her biri iş akışını, MS (kromatografi ile veya kromatografi olmadan) ve NMR'yi etkilemektedir (Alarcon-Barrera ve ark., 2022; Nassar ve ark., 2021; Pang ve Hu, 2023).

MS ve NMR olmak üzere çeşitli teknolojiler metabolitlerin ölçümünü hızlandırmıştır. MS analizinin sıvı ve gaz kromatografisi gibi farklı kromatografik yöntemlerle birleştirilmesi nedeniyle MS bazlı metabolomik, metabolomik araştırmaların en güçlü yöntemidir. NMR moleküllerin yapısını açığa çıkarabilecek bir teknoloji olarak sıklıkla değerlendirilse de göreceli olarak daha düşük hassasiyete sahiptir. Bu durum metabolomik analizlerdeki uygulamasını sınırlandırmaktadır. Aynı zamanda metabolomik analizler, proteomik analizler gibi diğer MS tabanlı çoklu omik teknikleriyle birleştirildiğinde farklı moleküler düzeydeki hastalıklar daha iyi anlaşılabilir, böylece ilaç keşfinde daha kesin biyobelirteçler ve terapötik hedefler belirlenebilir. Metabolomik analizler çeşitli aşamalarda ilaç geliştirme süreçlerini hızlandırabilir ve ilaçların yeniden konumlandırılmasına yardımcı olabilir (Pang ve Hu, 2023).

MS ve NMR teknolojilerinin ilaç keşfinde kullanımıyla ilgili bilgilere yer verilmiştir. Hem MS hem de NMR sadece metabolomik analizlerde değil aynı zamanda proteomik analizlerde de geniş bir kullanım alanı sahiptir ancak burada omik teknolojilerinin genden metabolizmaya bakış açısını genişletecek şekilde verilmesi amaçlandığından metabolomik bölümünün alt başlıkları olarak sunulmuştur.

3.4.1. İlaç Araştırmalarında Kütle Spektrometrisi Teknolojisi

MS bazlı proteomik, biyolojik örneklerdeki proteinlerin tanımlanmasından, protein özelliklerinin ve bunların çoklu düzeylerde fonksiyonel modülasyonunun değerlendirilmesini sağlamaktadır. MS iş akışının tamamındaki (hız, hassasiyet, hassasiyet ve sağlamlık) son gelişmeler sayesinde, MS tabanlı proteomik analizler, birkaç saat içinde neredeyse tamamlanmış proteom profilinin çıkarılmasına olanak tanımaktadır. Bu teknik gelişmeler sayesinde yalnızca gen ürünlerini listelemenin haricinde proteomları karakterize etmek için deneysel stratejiler geliştirilmiştir. Günümüz proteomik uygulamaları, biyoaktif moleküllerin etkileşimini ve aktivitesini araştırır, protein sinyal ağlarındaki uzay - zamansal dinamikleri çözer ve proteom çapında PTM'lerin kapsamlı fonksiyonel açıklamalarını sağlar (Meissner ve ark., 2022). MS ile ilgili bazı uygulamalar Şekil 24'te verilmiştir.



Şekil 24. Klinik öncesi ilaç keşif sürecinde kütle spektrometresi bazlı proteomik uygulamaları (Meissner ve ark., 2022).

Günümüzde kütle spektrometrisi karmaşık proteom profilini karakterize edebilmek için tercih edilen bir teknik haline gelmiştir. Kütle spektrometrisi ile proteinler analiz edilmek istendiğinde genel olarak iki yaklaşım kullanılabilir. Bunlardan bir tanesi proteinlerin parçalanmadan (üst akım proteomik analizler) analiz edildiği total protein kütle spektrometrisi (intakt protein kütle spektrometri) diğeri ise ana metabolitlerden proteolitik parçalanma sonucunda peptitlerin elde edilerek (alt akım proteomik analizi) gerçekleştirildiği analizdir. Protein kütle spektrometrisinde saflaştırılmış protein veya proteinler elektrofil içeren bileşiklerle reaksiyona sokulur ve elektrosprey iyonizasyonlu bir kütle spektrometresine doğrudan bağlanan likit kromatografisi veya kapiller elektroforezle analiz edilirler. Diğeri bir yaklaşım ise proteinlerin kromatografik olarak ayrılmasından ve MS analizinden önce peptitler oluşturmak üzere proteolitik parçalanmaya tabi tutulmasıdır. Bu yöntem daha ayrıntılı bilgiler sağlayabilir (örneğin kovalent bir modifikasyonun yeri gibi) ve bu nedenle intakt protein kütle spektrometrisine tamamlayıcıdır. Her ne kadar intakt protein MS kullanışlı olsa da proteininin boyutu ve saflığıyla ilgili bazı sınırlamalar bulunmaktadır. İyonizasyon sırasında her protein molekülü belirli sayıda protonu ayırır ve bu durum spektrumda kütle yük (m/z) tepe noktaları oluşumuna neden olur. Daha büyük proteinler, daha fazla sayıda protonu tutma eğiliminde olduğundan spektrumda aynı m/z oranında daha fazla çoklu yüklü tepe noktalarının oluşumuna neden olmaktadır. Büyük proteinlerin homojen olacak şekilde saflaştırılması daha zordur. Genel olarak peptit düzeyi analiz ile sağlam protein MS birlikte kullanılmaktadır ve birbirlerini tamamlamaktadırlar. Protein kütle spektrometrisi, kovalent bağ oluşumunun ve protein düzeyindeki özelliklerin doğrulanmasını sağlarken, peptit düzeyi analizi, inhibitör bölgesini ile ilgili bilgi sağlamanın yanı sıra modifikasyonun kesin olarak nerede olduğu hakkında bilgi sağlamaktadır (Chan ve ark., 2021).

MS, tek hücreli analizlerin gerçekleştirilmesine yönelik bir yöntem olarak da dikkate değerdir. MS teknolojilerinden yararlanmak hem tek hücreler için hem de hücre alt popülasyonlarını incelemek için yararlıdır (Liu ve Yang, 2021). Tek hücreli proteomik analizi, örnek işleme, ayırma ve MS

enstrümantasyonunda son gelişmelerle birlikte tek bir memeli hücrede ifade edilen 1000'den fazla proteinin miktarı belirlenebilmektedir. Yalnızca birkaç yıl önce bu düzeyde bir analiz binlerce hücre kullanılmasını gerektiriyordu. Biyolojik sistemleri bu kadar ayrıntılı bir düzeyde inceleyebilmek, biyomedikal araştırmalara önemli bir ilerleme sağlamaktadır. Kütle spektrometresi ile tek hücreli omik analiz yaklaşımların hala karşı karşıya olduğu en büyük teknik zorluklar hassasiyet, maliyet, düşük verim, uzun numune hazırlama ve çalışma süreleri ve zayıf geri kazanım oranlarıdır (Nassar ve ark., 2021).

Sonuç olarak kütle spektrometresi saflaştırılmış proteinden karmaşık proteom analizine, hedef tanımlamadan, ilaç aday molekülünün optimizasyonuna kadar kullanılabilir. MS, kovalent bağlı rezidüleri tanımlamak; protein hedeflerini ve / veya ilgilenilen kimyasal molekülü belirlemek; kovalent modifikasyonun lokasyonunu belirlemek ve enzim sınıfı içinde veya bir proteom ortamında hedef dışı profillerin belirlenmesi gibi amaçlarla kullanılabilir (Chan ve ark., 2021).

3.4.2. İlaç Araştırmalarında Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi Teknolojisi

MS ile karşılaştırıldığında NMR çeşitli avantajları bulunan başka bir güçlü tekniktir. NMR, kantitatif bir teknik olup hedef molekülü tanımlamak ve yapısal olarak açıklamak için farklı yaklaşımlar sunmaktadır. MS'in aksine NMR, molekülleri tahrip etmez, invaziv değildir ve yüksek tekrarlanabilirliğe sahiptir; bu da araştırmacıların genellikle aynı örnek miktarının içerisindeyken farklı deneysel koşullarla (sıcaklık, zaman, konsantrasyon vb.) ölçüm yapmasına olanak sağlamaktadır. Ardışık birkaç ölçüm alınabilir, moleküller atomik düzeyde incelenebilir. Öte yandan NMR dinamik bilgi sağlar ve atmosferik basınç, sıcaklık ve farklı pH gibi fizyolojik koşullar altında incelenebilir. Enzim - ligand ilişkisi ilaç tasarımında önemli olduğundan bu özellik önemlidir (Emwas ve ark., 2020).

NMR, çeşitli teknikler aracılığıyla ligand ve protein arasındaki etkileşimin doğrudan tespit edilmesi, örneklerin tipik olarak doğal koşullar altında analiz edilmesi, bir günde analiz edilebilecek örnek sayısının yüzlerce olması, bağlanma bölgesi ve bağlanma afinitesi hakkında bilgiler verilmesi açısından oldukça kullanışlıdır. Bu özellikler NMR'nin, HTS ve sanal kütüphane taramalarını doğrulamasını, parça tabanlı kitaplıkların taranmasını, ilaç aday moleküllerinin optimize edilmesine yardımcı olmasını sağlamaktadır. Öte yandan ilacın aktivite, maruziyet, toksisite ve güvenliğinin değerlendirilmesini, terapötik hedeflerin belirlenmesi ve doğrulanmasını da sağlar. Ancak NMR yöntemi cihaz bakımı, bileşik kütüphanelerinin taranması gibi nedenlerle maliyetlidir. Fakat deneysel maliyetleri azaltabilmek adına ilaç molekül adayının tanımlanması ve optimizasyon adımlarını desteklemek için *in silico* yöntemler kullanılabilir (Stark ve Powers, 2012).

NMR spektroskopisi, HTS ve yapı bazlı ilaç keşfi ve yeni terapötiklere yönelik ilaç keşfi açısından rağbet görmektedir. (Powers, 2009). NMR'nin, biyomoleküler yapı ve fonksiyon çalışmalarında uygulamaları giderek artmakta ve bu nedenle ilaç keşfi ve geliştirilmesinde daha değerli hale gelmektedir (Norton ve Jahnke, 2020). NMR, X - ışını, kriyo - elektron mikroskopi ve biyoinformatik gibi yöntemlerle kombine edilerek de kullanılabilir. Atomların çevresel değişimlerini izlemek için güçlü bir araçtır ve protein - protein ve ligand etkileşimlerini incelemek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda ¹⁹F ve ³¹P gibi NMR aktif çekirdekleri bir proteine dahil edilebilir, bu da ¹⁹F ve ³¹P NMR'yi,

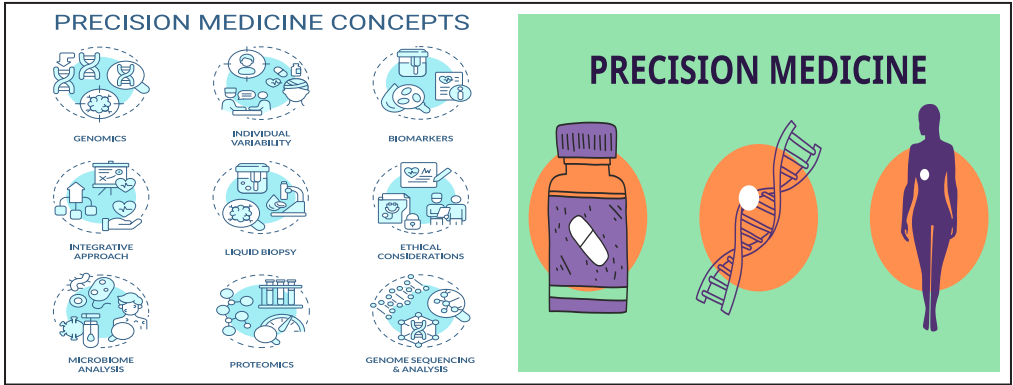
ligand bağlanması veya translyasyon sonrası modifikasyonlar tarafından indüklenen proteinlerin konformasyonel değişikliklerinin belirlenmesini sağlar (Kang, 2019).

NMR, yeni ilaçların tasarlanabilmesi için protein hedeflerini tanımlamak için kullanılacak metabolit seviyesindeki bozulmaları ve değişen metabolik yolları karakterize edebilmektedir. Ayrıca bir HTS yöntemi olarak protein hedeflere karşı kimyasal öncülleri tanımlamak ve geliştirebilmek için rutin olarak kullanılmaktadır (Bhinderwala ve Powers, 2019).

Özetle, NMR teknolojisi günümüzde ilaç keşfi için sıklıkla başvurulan bir yöntem haline gelmiştir. Moleküllerin parçalamadan incelenebilmesi, atomik düzeyde incelenebilmesi, tekrarlanabilir olması gibi MS'ye karşı bazı üstünlükleri vardır. Dolayısıyla bazı dezavantajları olsa da NMR'nin ilaç keşfinde kullanımı oldukça önemlidir.

4. KİŞİSELLEŞTİRİLMİŞ VE HASSAS TIP UYGULAMALARI

Hasta tedavilerinin bireye özgü olması tıbbın temel hedeflerindedir. Genlerden proteinlere kadar birçok faktörün insan fizyolojisindeki rolü henüz bilinmemektedir. Anomalilerin doğru şekilde belirlenmesi, izlenmesi, tedavi edilmesi, biyobelirteç analizlerinde ilerlemeler, hastalıklara karşı doz belirlenmesi ve ilaçların belirlenmesi optimizasyon gerektiren terapötik müdahaleler gerektirmektedir (Şekil 25) (Ho ve ark., 2020). Hangi ilacın hangi hastaya yardımcı olacağı belirlenmesi ve kişiselleştirilmiş ilaçların takip edilmesi tıpta yeni paradigmadır ve kesinlikle ilaç keşif ve geliştirme sürecinin iyileştirilmesine ve hastalara daha iyi bakım sağlanmasına katkıda bulunacaktır (Nicolaou, 2014). Kişiselleştirilmiş tıp, hastalıkların önlenmesi, teşhis ve tedavi süreçlerinin genomik, klinik ve çevresel verilerin elde edilmesi ve tedavinin hastaya göre şekillenmesidir. Kişisel tıbbın amacı tedaviyi iyileştirip hem hasta hem hekim için yan etki durumunun azaltılmasıdır (Cutter ve Liu, 2012).



Şekil 25. Hassas ve kişisel tıp uygulamaları (Cutter ve Liu, 2012).

Ulusal Araştırma Konseyi'nin (National Research Council) tanımına göre kişiselleştirilmiş tıp, hassas tıba yakın bir anlama sahip olan daha eski bir terimdir. İki terim birbirinin yerine kullanılıyor olsa da aralarında hastalara farklı bir yaklaşımı ifade eden kavramsal bir farklılık bulunmaktadır. Kişiselleştirilmiş tıbbın, hastaların bireysel ihtiyaçlarına göre uyarlanan, ilaç tedavisinin veya koruyucu bakımın iyileştirilmesine yönelik tıbbi bir tedavi olduğu kabul edilmektedir. Bireylerin genetik, epigenetik bilgilerinin, tercihlerinin, çevrelerinin kullanıldığı bir yaklaşımdır (Strianese ve ark., 2020).

Kişiselleştirilmiş tıbbın 21. yüzyıldaki amacı doğru ilacı doğru zamanda doğru hastaya verilmesidir. Kelimenin tam anlamıyla tıbbi cihazların veya ilaçların geliştirilmesi değildir. Hastaya özgüdür, yani bireyleri belirli bir hastalığa veya tedaviye verdikleri yanıtlar açısından sınıflandırarak alt popülasyonlara ayırmaktadır (Mathur ve Sutton, 2017). Günümüzde kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımıyla geliştirilen bazı ilaçlar bulunmaktadır. Örneğin HER2 proteininin aşırı ifadesine cevap veren Trastuzumab (Herceptin) meme kanseri tedavisinde kullanılmaktadır. Kronik myeloid lösemi tedavisinde kullanılan Imatinib mesilat (Gleevec), 5 yıllık sağkalımda yaşam beklentisini % 5'ten % 95'e çıkartmaktadır. Geç dönem prognozun kötü olduğu melanomu tedavi etmek için kullanılan Vemurafenib (Zelboraf) ise V600E mutasyonu olan hastalarda etkilidir ancak hastaların % 60'ının DNA'sında bu mutasyon bulunmaktadır. Bu örneklerin dışında farklı ilaçlar da bulunmaktadır. Kişiselleştirilmiş tıp sadece ilaç geliştirme de değil dozaj belirlemede de kullanılabilir. Bunun bir örneği CYP450 enzimi ve bunun Varfarin (Coumadin) tedavisine uygulanmasıdır. Doğru Varfarin dozajı ile çok sayıda felç önlenmiştir (Cutter ve Liu, 2012).

Hassas tıp, hastalığı önlemek veya tedavi etmek için en iyi yaklaşımın belirlenebilmesi için kişinin genetiği, çevresi ve yaşam tarzını kullanan bir yaklaşımdır (Sisodiya, 2021). Hassas tıbbın odağı hastalığı duyarlılığı belirlemek, hastalığın klinik seyrini belirlemek ve uygun tedaviyi sağlamak kişisel profile (genetik, maruziyet, yaşam tarzı vb.) dayalı optimal bakımın sağlanmasıdır. Tedaviler ya da ilaçlar ortalama popülasyona değil tanımlanmış olan hasta alt popülasyonlarına uygulanmaktadır. Hassas tıbbın gelişmesi, hastalık alt tiplerinin teşhisi, tanımlanması ve tedavisinde daha kesin ve doğru bilgi sağlamak için genomik biyolojik veri, transkriptomik ve proteomik analizler gibi birden fazla kaynağın kullanımına bağlıdır. Dolayısıyla yeni tedavilerle hastalık alt gruplarının daha kesin hedeflenebilmesi için hastalığın daha iyi tanımlanmasını sağlar (Strianese ve ark., 2020). Kişiselleştirilmiş tıp, kişinin sadece kendi tedavisi için kendi verilerinin elde edilmesi ve değerlendirilmesi için teknolojinin kullanımını kapsamaktadır (Ho ve ark., 2020). faz - 1 denemelerinde N - of - 1 dozaj protokolünün takip edilebilmesi için yapay zeka kullanımı örnek verilebilir (Schork, 2019). Omik verilerinin kişiselleştirilmiş ve hassas tıpta kullanımı Tablo 4'de sunulmuştur.

Tablo 4. Omik verilerinin kişiselleştirilmiş ve hassas tıpta kullanımı (McAlister ve ark., 2017).

Hassas Tıp		
Ekspozom, mikrobiyom	Genom ve epigenom	Biyolojik Omik
	Ekzom (proteomik, metabolomik, transkriptomik)	
Ekspozom, mikrobiyom	Patofizyolojik fenotip	Kişiselleştirilmiş Tıp
Ekspozom, ve hasta dayanıklılığı	Biyobelirteç	
Ekspozom, ve hasta dayanıklılığı	Hasta fenotipi	
	1. Fonksiyonel durum	
	2. Yaşam kalitesi ve süresi	
	3. Tedaviye cevap durumu	
	4. Tedaviye uyum	

Moleküler hedefli tedaviler ve antikör tedavileri hassas tıbbın temel taşlarıdır. Günümüzde onaylanmış ilaçlar oldukça fazladır. Aynı zamanda mutasyon veri tabanları aracılığıyla hastaya spesifik ilaçların belirlenebilmesi için yeni yöntemler ortaya çıkmıştır. Genom ve proteom temelli

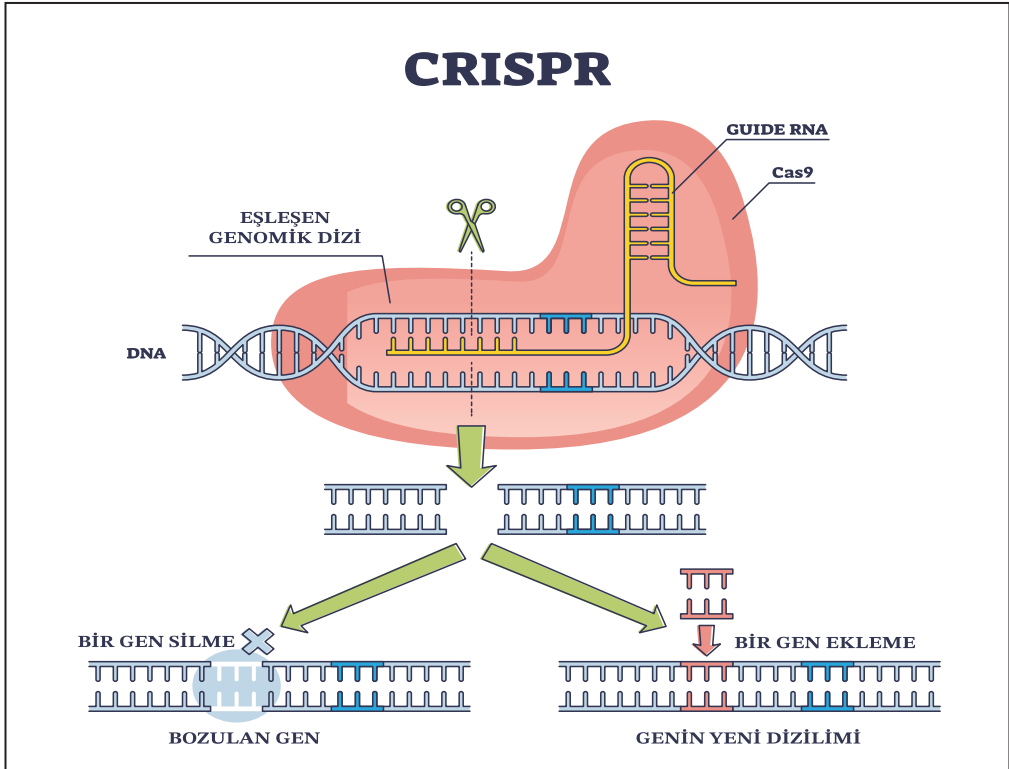
yeni terapötik yaklaşımlar, bazı hastalıkların tedavisinde genetik mutasyonların düzeltilmesi için kümelenmiş düzenleyici aralıklı kısa palindromik tekrarlar ve CRISPR ilişkili protein 9 (CRISPR - Cas9) teknolojisinin kullanımını içermektedir (Ho ve ark., 2020).

Kişiselleştirilmiş ve hassas tıp, hastaların verilerinden yararlanan ve tedavi süreçlerini iyileştirmeye yarayan bir alandır. Bu nedenle ilaç keşfi önemli bir alan olup, hastalara daha iyi tedaviler sunabilecek ilaçların keşfedilmesi açısından gelişmesi gereken bir alandır.

4.1. İlaç Araştırmalarında CRISPR - Cas9 Teknolojisi

CRISPR - Cas9 doğal bakteriyel bağışıklık sisteminden uyarlanan bir RNA kılavuzlu endonükleaz bazlı genom düzenleme tekniğidir. Günümüzde CRISPR - Cas9 temelli genetik deneyler bitki, maya *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, zebra balığı, fare ve insan gibi çok çeşitli modeller üzerinde gerçekleştirilebilmektedir (Sharma ve ark., 2021).

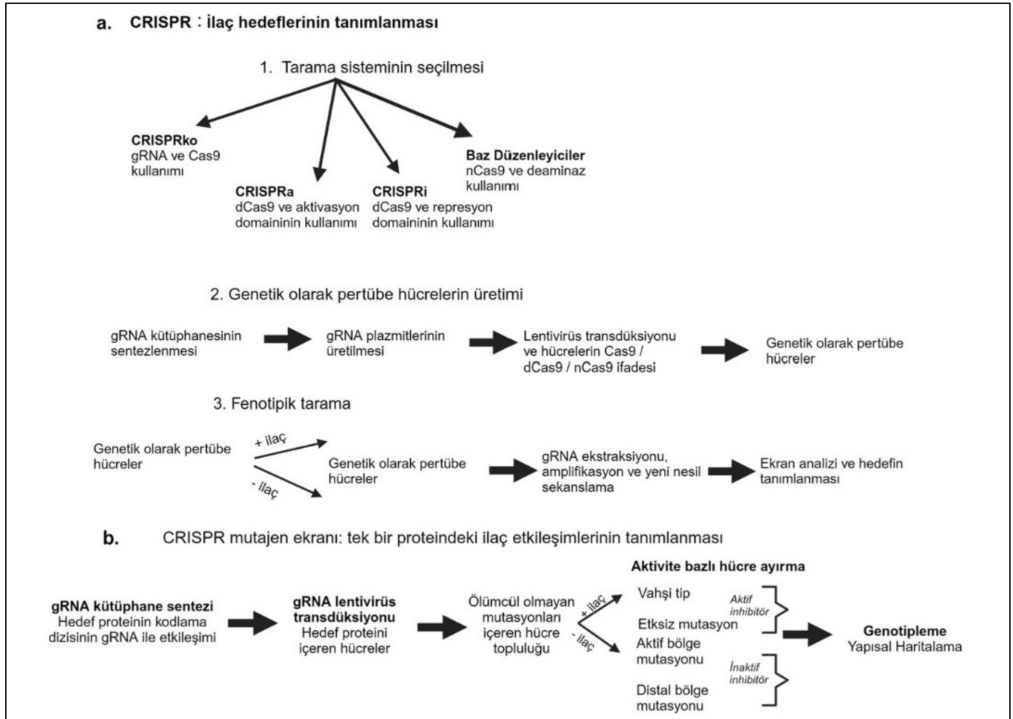
CRISPR, genomu tarama sistemine göre sınıflandırılmaktadır. CRISPRko, fonksiyonel bir proteinin ifadesinin ortadan kaldırmayı amaçlayan bir sistemdir. Bunu gerçekleştirebilmek için açık okuma çerçevelerinde ya erken durdurma kodonu eklemek ya da çerçeve kayması oluşturmak için aktif Cas9 proteinini kullanılmaktadır. CRISPRa ise, hedef genlerin transkripsiyonunu artırmayı amaçlamaktadır. Bunu gerçekleştirebilmek için transkripsiyonel aktivasyon domainleri ölü Cas9 proteini (dCas9) ile birleştirilmektedir (Şekil 26) (Modell ve ark., 2022).



Şekil 26. CRISPR - Cas sistemi.

CRISPR - Cas9 sistemi biyolojide çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. CRISPR teknolojisi sayesinde organoidler genetik olarak programlanabilir ve istenen bir gen yerleştirilebilir. Öte yandan CRISPR - Cas ile organoidler hastalığa spesifik modellere dönüşebilir. Genomun, transkriplerinin veya epigenetik işaretlerinin çeşitli bölgeleri hedeflenerek yeniden inşa edilebilmesi, yeni nesil tıbbi tedavilere, biyomedikal araştırmalar ve ilaç geliştirme süreçlerine yardımcı olmaktadır. Böylece çeşitli multipleks poligenik bozukluklardaki zararlı mutasyonlar kesin olarak düzeltilir. Katalitik bir Cas9 proteini veya dCas9, gRNA ile gen fonksiyonlarının ve çeşitli hastalık mekanizmalarının incelenmesinde hafifletilebilecek hedeflenen gen promotörlerine dahil edilebilir. Çeşitli hastalıkların moleküler mekanizması hakkında bilgi edinmek amacıyla nörolojik hastalıklar, kanser ve karmaşık genetik bozukluklar için CRISPR tabanlı çeşitli hastalık modelleri geliştirilmiştir. Ayrıca bu modeller gen terapisinin test edilmesi ve yeni ilaçların geliştirilmesi için platform görevi görmektedir. iPSC hücrelerinin keşfiyle, hastalıklardan elde edilen iPSC hücrelerinin üretilmesine odaklanan transkripsiyonel araştırmalar büyük ölçüde ilerlemiştir. CRISPR - Cas9 teknolojisi, hastadan elde edilen iPSC hücrelerinin herhangi bir spesifik genetik hastalıkla karakterizasyonu hastalık odaklı araştırmalar için kullanılabilir. CRISPR'ın terapötik potansiyeli tek gendeki mutasyonlardan kaynaklanan hastalıklar için de kullanılabilir (Khurana ve ark., 2022).

Gen düzenleme teknolojilerindeki genom çapında gen düzenleme sistemlerinin (CRISPR - Cas9 nakavtları, CRISPR girişimi (CRISPRi) veya CRISPR aktivasyonu (CRISPRa) gibi mümkün kılma da izlenebilirlik henüz sağlanamamıştır. Bununla birlikte bu tür yaklaşımlar hedef doğrulamanın yetersiz olması ve etkinliğinin düşük olabilmesinin yanı sıra güvenlik kaygısı ve hedef dışı etkiler nedeniyle her zaman güvenli ve etkili ilaçlar haline gelmemektedirler (Meissner ve ark., 2022). CRISPR analizinin ilaç keşfinde kullanımı Şekil 27'de gösterilmiştir.



Şekil 27. CRISPR yöntemi ile ilaç araştırmalarında iş akış şeması (Modell ve ark., 2022).

CRISPR - Cas9 teknolojisi ile hastalıkların temelinde yatan genetik faktörler anlaşılabilir ve hedeflenebilir. Bu teknoloji sayesinde mutasyonlar belirlenebilir ve müdahale edilebilir. Öte yandan potansiyel ilaç hedeflerini belirlemek ve ilaçların genetik temellerini anlamak için de kullanılabilir. Böylelikle spesifik ve etkili tedaviler geliştirilebilir. Fakat seçilecek CRISPR metodunun avantajları ve dezavantajları vardır ve bu nedenle ilaç keşfinde CRISPR teknolojisi kullanım potansiyelinin ortaya çıkarılması amaçlı daha fazla çalışma yapılmalıdır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Aartsma-Rus, A. FDA Approval of Nusinersen for Spinal Muscular Atrophy Makes 2016 the Year of Splice Modulating Oligonucleotides. *Nucleic Acid Ther.* 27, 67-69. (2017)
- Abcam. *XTT sodium salt, Tetrazolium salt*. <https://www.abcam.com/en-gb/products/biochemicals/xtt-sodium-salt-tetrazolium-salt-ab146310> Erişim tarihi 25 Aug 2024
- Adams, D., Gonzalez-Duarte, A., O’Riordan, W. D., Yang, C. C., Ueda, M., Kristen, A. V., Tournev, I., Schmidt, H. H., Coelho, T., Berk, J. L., Lin, K. P., Vita, G., Attarian, S., Planté-Bordeneuve, V., Mezei, M. M., Campistol, J. M., Buades, J., Brannagan, T. H., 3rd, Kim, B. J., . . . Suhr, O. B. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 379, 11-21. (2018)
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Curr Pharm Biotechnol.* 17, 1213-1221. (2016)
- Al-Amrani, S., Al-Jabri, Z., Al-Zaabi, A., Alshekaili, J., & Al-Khabori, M. Proteomics: Concepts and applications in human medicine. *World J Biol Chem.* 12, 57-69. (2021)
- Alarcon-Barrera, J. C., Kostidis, S., Ondo-Mendez, A., & Giera, M. Recent advances in metabolomics analysis for early drug development. *Drug Discovery Today.* 27, 1763-1773. (2022)
- Alfonso, B. F., & Al-Rubeai, M. 1.42 - Flow Cytometry. In M. Moo-Young (Ed.), *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 559-578). Academic Press. (2011)
- Amiri-Dashatan, N., Koushki, M., Abbaszadeh, H. A., Rostami-Nejad, M., & Rezaei-Tavirani, M. Proteomics Applications in Health: Biomarker and Drug Discovery and Food Industry. *Iran J Pharm Res.* 17, 1523-1536. (2018)
- Atienzar, F. A., Tilmant, K., Gerets, H. H., Toussaint, G., Speeckaert, S., Hanon, E., Depelchin, O., & Dhalluin, S. The Use of Real-Time Cell Analyzer Technology in Drug Discovery: Defining Optimal Cell Culture Conditions and Assay Reproducibility with Different Adherent Cellular Models. *SLAS Discovery.* 16, 575-587. (2011)
- Benson, M. D., Waddington-Cruz, M., Berk, J. L., Polydefkis, M., Dyck, P. J., Wang, A. K., Planté-Bordeneuve, V., Barroso, F. A., Merlini, G., Obici, L., Scheinberg, M., Brannagan, T. H., 3rd, Litchy, W. J., Whelan, C., Drachman, B. M., Adams, D., Heitner, S. B., Conceição, I., Schmidt, H. H., . . . Coelho, T. Inotersen Treatment for Patients with Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med.* 379, 22-31. (2018)
- Bhinderwala, F., & Powers, R. NMR Metabolomics Protocols for Drug Discovery. *Methods Mol Biol.* 2037, 265-311. (2019)
- BIO-RAD. (25.08.2024). *TC20™ Automated Cell Counter*. https://biorad-ads.com/green/system-tour/TC20/1_2-whats-new.html Erişim tarihi 25 Aug 2024
- Brasemann, H., Michna, A., Heß, J., & Unger, K. CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation Oncology.* 10, 223. (2015)
- Cadena-Herrera, D., Esparza-De Lara, J. E., Ramirez-Ibañez, N. D., López-Morales, C. A., Pérez, N. O., Flores-Ortiz, L. F., & Medina-Rivero, E. Validation of three viable-cell counting methods: Manual, semi-automated, and automated. *Biotechnology Reports.* 7, 9-16. (2015)
- Chan, W. C., Sharifzadeh, S., Buhrlage, S. J., & Marto, J. A. Chemoproteomic methods for covalent drug discovery. *Chem Soc Rev.* 50, 8361-8381. (2021)

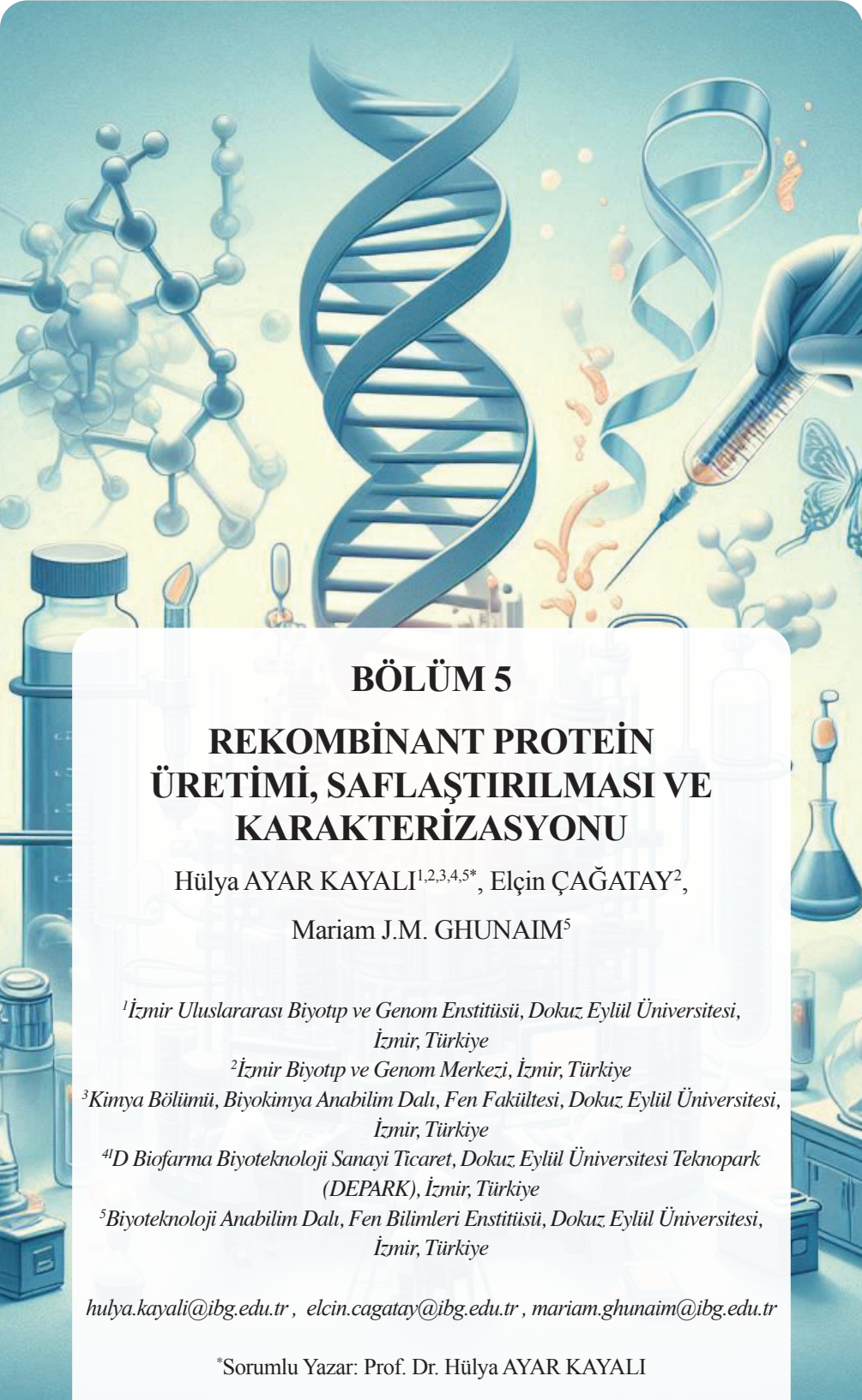
- Chua, P., & Lim, W. K. The strategic uses of collagen in adherent cell cultures. *Cell Biol Int*. 47, 367-373. (2023)
- Cirak, S., Arechavala-Gomez, V., Guglieri, M., Feng, L., Torelli, S., Anthony, K., Abbs, S., Garralda, M. E., Bourke, J., Wells, D. J., Dickson, G., Wood, M. J., Wilton, S. D., Straub, V., Kole, R., Shrewsbury, S. B., Sewry, C., Morgan, J. E., Bushby, K., & Muntoni, F. Exon skipping and dystrophin restoration in patients with Duchenne muscular dystrophy after systemic phosphorodiamidate morpholino oligomer treatment: an open-label, phase 2, dose-escalation study. *Lancet*. 378, 595-605. (2011)
- Costales, M. G., Childs-Disney, J. L., Haniff, H. S., & Disney, M. D. How We Think about Targeting RNA with Small Molecules. *J Med Chem*. 63, 8880-8900. (2020)
- Crane, A. M., & Bhattacharya, S. K. The use of bromodeoxyuridine incorporation assays to assess corneal stem cell proliferation. *Methods Mol Biol*. 1014, 65-70. (2013)
- Crooke, S. T., & Geary, R. S. Clinical pharmacological properties of mipomersen (Kynamro), a second generation antisense inhibitor of apolipoprotein B. *Br J Clin Pharmacol*. 76, 269-276. (2013)
- Cutter, G. R., & Liu, Y. Personalized medicine: The return of the house call? *Neurol Clin Pract*. 2, 343-351. (2012)
- Danku, A. E., Dulf, E. H., Braicu, C., Jurj, A., & Berindan-Neagoe, I. Organ-On-A-Chip: A Survey of Technical Results and Problems. *Front Bioeng Biotechnol*. 10, 840674. (2022)
- de Paula Brandão, P. R., Titze-de-Almeida, S. S., & Titze-de-Almeida, R. Leading RNA Interference Therapeutics Part 2: Silencing Delta-Aminolevulinic Acid Synthase 1, with a Focus on Givosiran. *Mol Diagn Ther*. 24, 61-68. (2020)
- Emwas, A. H., Szczepski, K., Poulson, B. G., Chandra, K., McKay, R. T., Dhahri, M., Alahmari, F., Jaremko, L., Lachowicz, J. I., & Jaremko, M. NMR as a “Gold Standard” Method in Drug Design and Discovery. *Molecules*. 25. (2020)
- Fontoura, J. C., Viezzer, C., dos Santos, F. G., Ligabue, R. A., Weinlich, R., Puga, R. D., Antonow, D., Severino, P., & Bonorino, C. Comparison of 2D and 3D cell culture models for cell growth, gene expression and drug resistance. *Materials Science and Engineering: C*. 107, 110264. (2020)
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*. 22. (2021)
- Ghoussaini, M., Nelson, M. R., & Dunham, I. Future prospects for human genetics and genomics in drug discovery. *Curr Opin Struct Biol*. 80, 102568. (2023)
- Goff, A., Cantillon, D., Muraro Wildner, L., & Waddell, S. J. Multi-Omics Technologies Applied to Tuberculosis Drug Discovery. *Applied Sciences*. 10, 4629. (2020)
- Gragoudas, E. S., Adamis, A. P., Cunningham, E. T., Jr., Feinsod, M., & Guyer, D. R. Pegaptanib for neovascular age-related macular degeneration. *N Engl J Med*. 351, 2805-2816. (2004)
- Gryziewicz, L. Regulatory aspects of drug approval for macular degeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 57, 2092-2098. (2005)
- Heo, Y. A. Golodirsin: First Approval. *Drugs*. 80, 329-333. (2020)
- Ho, D., Quake, S. R., McCabe, E. R. B., Chng, W. J., Chow, E. K., Ding, X., Gelb, B. D., Ginsburg, G. S., Hassenstab, J., Ho, C. M., Mobley, W. C., Nolan, G. P., Rosen, S. T., Tan, P., Yen, Y., & Zarrinpar, A. Enabling Technologies for Personalized and Precision Medicine. *Trends Biotechnol*. 38, 497-518. (2020)
- Hoogstraten, C. A., Smeitink, J. A. M., Russel, F. G. M., & Schirris, T. J. J. Dissecting Drug-Induced Cytotoxicity and Metabolic Dysfunction in Conditionally Immortalized Human Proximal Tubule Cells [Brief Research Report]. *Frontiers in Toxicology*. 4. (2022)
- Husi, H., & Albalat, A. Chapter 9 - Proteomics. In S. Padmanabhan (Ed.), *Handbook of Pharmacogenomics and Stratified Medicine* (pp. 147-179). Academic Press. (2014)
- Kang, C. Applications of In-Cell NMR in Structural Biology and Drug Discovery. *Int J Mol Sci*. 20. (2019)
- Keam, S. J. Inotersen: First Global Approval. *Drugs*. 78, 1371-1376. (2018)
- Kho, D., MacDonald, C., Johnson, R., Unsworth, C. P., O'Carroll, S. J., du Mez, E., Angel, C. E., & Graham, E. S. Application of xCELLigence RTCA Biosensor Technology for Revealing the Profile and Window of Drug Responsiveness in Real Time. *Biosensors (Basel)*. 5, 199-222. (2015)
- Khodadadian, A., Darzi, S., Haghi-Daredeh, S., Sadat Eshaghi, F., Babakhanzadeh, E., Mirabutalebi, S. H., & Nazari, M. Genomics and Transcriptomics: The Powerful Technologies in Precision Medicine. *Int J Gen Med*. 13, 627-640. (2020)
- Khurana, A., Sayed, N., Singh, V., Khurana, I., Allawadhi, P., Rawat, P. S., Navik, U., Pasumarthi, S. K., Bharani, K. K., & Weiskirchen, R. A comprehensive overview of CRISPR/Cas 9 technology and application thereof in drug discovery. *J Cell Biochem*. 123, 1674-1698. (2022)
- Kocherova, I., Kempisty, B., Hutchings, G., Moncrieff, L., Dompe, C., Janowicz, K., Petite, J., Shibli, J. A., & Mozdziak, P. Cell-based approaches in drug development—a concise review. *Medical Journal of Cell Biology*. 8, 44-49. (2020)

- Lau, A., & So, H. C. Turning genome-wide association study findings into opportunities for drug repositioning. *Comput Struct Biotechnol J.* 18, 1639-1650. (2020)
- Leung, C. M., de Haan, P., Ronaldson-Bouchard, K., Kim, G.-A., Ko, J., Rho, H. S., Chen, Z., Habibovic, P., Jeon, N. L., Takayama, S., Shuler, M. L., Vunjak-Novakovic, G., Frey, O., Verpoorte, E., & Toh, Y.-C. A guide to the organ-on-a-chip. *Nature Reviews Methods Primers.* 2, 33. (2022)
- Liu, R., Meng, X., Yu, X., Wang, G., Dong, Z., Zhou, Z., Qi, M., Yu, X., Ji, T., & Wang, F. From 2D to 3D Co-Culture Systems: A Review of Co-Culture Models to Study the Neural Cells Interaction. *Int J Mol Sci.* 23. (2022)
- Liu, R., & Yang, Z. Single cell metabolomics using mass spectrometry: Techniques and data analysis. *Anal Chim Acta.* 1143, 124-134. (2021)
- Lotz, S., Goderie, S., Tokas, N., Hirsch, S. E., Ahmad, F., Corneo, B., Le, S., Banerjee, A., Kane, R. S., Stern, J. H., Temple, S., & Fasano, C. A. Sustained levels of FGF2 maintain undifferentiated stem cell cultures with biweekly feeding. *PLoS One.* 8, e56289. (2013)
- Low, L. A., Mummery, C., Berridge, B. R., Austin, C. P., & Tagle, D. A. Organs-on-chips: into the next decade. *Nature Reviews Drug Discovery.* 20, 345-361. (2021)
- Mathur, S., & Sutton, J. Personalized medicine could transform healthcare. *Biomed Rep.* 7, 3-5. (2017)
- McAlister, F. A., Laupacis, A., & Armstrong, P. W. Finding the right balance between precision medicine and personalized care. *Cmaj.* 189, E1065-e1068. (2017)
- McKinnon, K. M. Flow Cytometry: An Overview. *Curr Protoc Immunol.* 120, 5.1.1-5.1.11. (2018)
- Meissner, F., Geddes-McAlister, J., Mann, M., & Bantscheff, M. The emerging role of mass spectrometry-based proteomics in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 21, 637-654. (2022)
- Mendell, J. R., Goemans, N., Lowes, L. P., Alfano, L. N., Berry, K., Shao, J., Kaye, E. M., & Mercuri, E. Longitudinal effect of eteplirsen versus historical control on ambulation in Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 79, 257-271. (2016)
- Méry, B., Guy, J. B., Vallard, A., Espenel, S., Ardail, D., Rodriguez-Lafrasse, C., Rancoule, C., & Magné, N. *In Vitro* Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *J Cell Death.* 10, 1179670717691251. (2017)
- Modell, A. E., Lim, D., Nguyen, T. M., Sreekanth, V., & Choudhary, A. CRISPR-based therapeutics: current challenges and future applications. *Trends Pharmacol Sci.* 43, 151-161. (2022)
- Morrow, T. For patients who inherit homozygous familial hypercholesterolemia, 2 new treatments available. *Manag Care.* 22, 47-48. (2013)
- Nassar, S. F., Raddassi, K., & Wu, T. Single-Cell Multiomics Analysis for Drug Discovery. *Metabolites.* 11. (2021)
- Nguyen, N., Jennen, D., & Kleinjans, J. Omics technologies to understand drug toxicity mechanisms. *Drug Discovery Today.* 27, 103348. (2022)
- Nicolaou, K. C. Advancing the drug discovery and development process. *Angew Chem Int Ed Engl.* 53, 9128-9140. (2014)
- Nirmalanandhan, V. S., & Sittampalam, G. S. Stem cells in drug discovery, tissue engineering, and regenerative medicine: emerging opportunities and challenges. *J Biomol Screen.* 14, 755-768. (2009)
- Noel, V., & Berry, M. D. Culture of Adherent Cancer Cell Lines. *Methods Mol Biol.* 2508, 19-29. (2022)
- Norton, R. S., & Jahnke, W. NMR in pharmaceutical discovery and development. *J Biomol NMR.* 74, 473-476. (2020)
- OMNLifeSciences. (25 Aug 2024). *Live Cell Analysis System xCELLigence*. <https://www.ols-bio.de/products/live-cell-analysis-system-xcelligence> Erişim tarihi 25 Aug 2024
- Ottesen, E. W. ISS-N1 makes the First FDA-approved Drug for Spinal Muscular Atrophy. *Transl Neurosci.* 8, 1-6. (2017)
- Paananen, J., & Fortino, V. An omics perspective on drug target discovery platforms. *Briefings in Bioinformatics.* 21, 1937-1953. (2019)
- Pang, H., & Hu, Z. Metabolomics in drug research and development: The recent advances in technologies and applications. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 13, 3238-3251. (2023)
- Powers, R. NMR metabolomics and drug discovery. *Magn Reson Chem.* 47 Suppl 1, S2-11. (2009)
- Qian, X., Ba, Y., Zhuang, Q., & Zhong, G. RNA-Seq technology and its application in fish transcriptomics. *Omics.* 18, 98-110. (2014)
- Rajendran, V., & Jain, M. V. *In Vitro* Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol.* 1692, 89-95. (2018)
- Ramadan, Q., & Sharma, P. Editorial: Tissue Engineering for Drug Discovery and Personalized Medicine. *Front Med Technol.* 3, 663057. (2021)
- RayBiotech. (25.08.2024). *WST-1*. <https://www.raybiotech.com/wst-1-331-22419-1> Erişim tarihi 25 Aug 2024

- Sardh, E., Harper, P., Balwani, M., Stein, P., Rees, D., Bissell, D. M., Desnick, R., Parker, C., Phillips, J., Bonkovsky, H. L., Vassiliou, D., Penz, C., Chan-Daniels, A., He, Q., Querbes, W., Fitzgerald, K., Kim, J. B., Garg, P., Vaishnav, A., . . . Anderson, K. E. Phase 1 Trial of an RNA Interference Therapy for Acute Intermittent Porphyria. *N Engl J Med.* 380, 549-558. (2019)
- Sazonova, E. V., Chesnokov, M. S., Zhivotovsky, B., & Kopeina, G. S. Drug toxicity assessment: cell proliferation versus cell death. *Cell Death Discovery.* 8, 417. (2022)
- Schork, N. J. Artificial Intelligence and Personalized Medicine. *Cancer Treat Res.* 178, 265-283. (2019)
- Scott, L. J. Givosiran: First Approval. *Drugs.* 80, 335-339. (2020)
- Segeritz, C.-P., & Vallier, L. Chapter 9 - Cell Culture: Growing Cells as Model Systems *In Vitro*. In M. Jalali, F. Y. L. Saldanha, & M. Jalali (Eds.), *Basic Science Methods for Clinical Researchers* (pp. 151-172). Academic Press. (2017)
- Shaker, B., Ahmad, S., Lee, J., Jung, C., & Na, D. In silico methods and tools for drug discovery. *Comput Biol Med.* 137, 104851. (2021)
- Sharma, G., Sharma, A. R., Bhattacharya, M., Lee, S. S., & Chakraborty, C. CRISPR-Cas9: A Preclinical and Clinical Perspective for the Treatment of Human Diseases. *Mol Ther.* 29, 571-586. (2021)
- Sisodiya, S. M. Precision medicine and therapies of the future. *Epilepsia.* 62 Suppl 2, S90-s105. (2021)
- Southey, M. W. Y., & Brunavs, M. Introduction to small molecule drug discovery and preclinical development [Mini Review]. *Frontiers in Drug Discovery.* 3. (2023)
- Spreafico, R., Soriaga, L. B., Grosse, J., Virgin, H. W., & Telenti, A. Advances in Genomics for Drug Development. *Genes (Basel).* 11. (2020)
- Stark, J. L., & Powers, R. Application of NMR and molecular docking in structure-based drug discovery. *Top Curr Chem.* 326, 1-34. (2012)
- Stein, C. A., & Castanotto, D. FDA-Approved Oligonucleotide Therapies in 2017. *Mol Ther.* 25, 1069-1075. (2017)
- Strianese, O., Rizzo, F., Ciccarelli, M., Galasso, G., D'Agostino, Y., Salvati, A., Del Giudice, C., Tesorio, P., & Rusciano, M. R. Precision and Personalized Medicine: How Genomic Approach Improves the Management of Cardiovascular and Neurodegenerative Disease. *Genes (Basel).* 11. (2020)
- Strober, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. *Curr Protoc Immunol.* 111, A3.B.1-a3.B.3. (2015)
- Sun, Y., & Ma, H. Application of three-dimensional cell culture technology in screening anticancer drugs. *Biotechnol Lett.* 45, 1073-1092. (2023)
- Syed, Y. Y. Eteplirsen: First Global Approval. *Drugs.* 76, 1699-1704. (2016)
- Tajeddin, A., & Mustafaoglu, N. Design and Fabrication of Organ-on-Chips: Promises and Challenges. *Micromachines (Basel).* 12. (2021)
- Taylor, M. W., & Taylor, M. W. A history of cell culture. *Viruses and man: a history of interactions* 41-52. (2014)
- Thunyanorn, R., Doh, I., & Lee, D. W. Multi-volume hemacytometer. *Sci Rep.* 11, 14106. (2021)
- Türker Şener, L., Albeniz, G., Dinç, B., & Albeniz, I. iCELLigence real-time cell analysis system for examining the cytotoxicity of drugs to cancer cell lines. *Exp Ther Med.* 14, 1866-1870. (2017)
- Uysal, O., Sevimli, T., Sevimli, M., Gunes, S., & Eker Sariboyaci, A. Chapter 17 - Cell and Tissue Culture: The Base of Biotechnology. In D. Barh & V. Azevedo (Eds.), *Omics Technologies and Bio-Engineering* (pp. 391-429). Academic Press. (2018)
- Verma, A., Verma, M., & Singh, A. Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology* 269-293. (2020)
- Vunjak-Novakovic, G., Ronaldson-Bouchard, K., & Radisic, M. Organs-on-a-chip models for biological research. *Cell.* 184, 4597-4611. (2021)
- Wang, G., McCain, M. L., Yang, L., He, A., Pasqualini, F. S., Agarwal, A., Yuan, H., Jiang, D., Zhang, D., Zangi, L., Geva, J., Roberts, A. E., Ma, Q., Ding, J., Chen, J., Wang, D. Z., Li, K., Wang, J., Wanders, R. J., . . . Pu, W. T. Modeling the mitochondrial cardiomyopathy of Barth syndrome with induced pluripotent stem cell and heart-on-chip technologies. *Nat Med.* 20, 616-623. (2014)
- Weï, F., Wang, S., & Gou, X. A review for cell-based screening methods in drug discovery. *Biophys Rep.* 7, 504-516. (2021)
- Wood, H. FDA approves patisiran to treat hereditary transthyretin amyloidosis. *Nat Rev Neurol.* 14, 570. (2018)
- Yan, G., Du, Q., Wei, X., Miozzi, J., Kang, C., Wang, J., Han, X., Pan, J., Xie, H., Chen, J., & Zhang, W. Application of Real-Time Cell Electronic Analysis System in Modern Pharmaceutical Evaluation and Analysis. *Molecules.* 23. (2018)
- Yu, A. M., Choi, Y. H., & Tu, M. J. RNA Drugs and RNA Targets for Small Molecules: Principles, Progress, and Challenges. *Pharmacol Rev.* 72, 862-898. (2020)
- Zhang, X., Goel, V., Attarwala, H., Sweetser, M. T., Clausen, V. A., & Robbie, G. J. Patisiran Pharmacokinetics, Pharmacodynamics, and Exposure-Response Analyses in the Phase 3 APOLLO Trial in Patients With Hereditary Transthyretin-Mediated (hATTR) Amyloidosis. *J Clin Pharmacol.* 60, 37-49. (2020)
- Zhang, X., Yu, W., Li, Y., Wang, A., Cao, H., & Fu, Y. Drug development advances in human genetics-based targets. *MedComm* (2020). 5, e481. (2024)
- Zhou, Y., Jiang, Y., & Chen, S. J. RNA-ligand molecular docking: advances and challenges. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci.* 12. (2022)

KISALTMALAR DİZİNİ

RTCA - xCELLigence	: Gerçek zamanlı hücre analiz sistemi
3D	: Üç boyutlu
2D	: İki boyutlu
OoC	: Çip üzerinde organlar
iPSC	: İndüklenmiş pluripotent kök hücre
ADME - Tox	: Aktivite, maruziyet ve toksisite
PDMS	: Polidimetilsiloksan
ECM	: Ekstrasellüler matris
ATP	: Adenozin trifosfat
BrdU	: Bromodeoksitüridin
HTS	: Yüksek verimli tarama
FC	: Akış sitometrisi
MTT	: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium bromid)
OD	: Optik yoğunluk
HUVEC	: İnsan göbek damarı endotel hücreleri
XXT	: (2,3-bis(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolium hidroksit)
WST	: Suda çözünür tetrazolyum, (2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4 disülfenil)-2H-tetrazolyum)
NADH	: Nikotinamid adenin dinükleotit
PMS	: Fenozin metosülfat
CI	: Hücre indeksi
IC₅₀	: Yarı maksimum inhibitör konsantrasyon
NGS	: Yeni nesil dizileme
MS	: Kütle spektrometrisi
NMR	: Nükleer manyetik rezonans spektrometrisi
ORF	: Açık okuma çerçevesi
ENCODE	: DNA elementleri ansiklopedisi
ncRNA	: Kodlamayan RNA
GWAS	: Genom çapında ilişkilendirme
AMD	: Yaşa bağlı maküler dejenerasyon
LoF	: Fonksiyon kaybı mutasyonları
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
GoF	: Fonksiyon kazanma mutasyonları
FDA	: Amerikan İlaç İdaresi
WES	: Tüm ekzom sekanslama
WGS	: Tüm genom sekanslama
miRNA	: MikroRNA
ASO	: Antisens oligonükleotit
siRNA	: Küçük müdahaleci RNA
gRNA	: Kılavuz RNA
hOFH	: Homozigot ailesel hiperkolestrolomi
DMD	: Duchenne kas distrofisi
hATTR	: Kalıtsal transtiretin amiloidoz
asRNA	: Antisens RNA
PTM	: Translasyon sonrası modifikasyon
CRISPR - Cas9	: Kümelenmiş düzenleyici aralıklı kısa palindromik tekrarlar ve CRISPR ilişkili protein
dcas9	: Ölü cas9 proteini



BÖLÜM 5

REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ, SAFLAŞTIRILMASI VE KARAKTERİZASYONU

Hülya AYAR KAYALI^{1,2,3,4,5*}, Elçin ÇAĞATAY²,
Mariam J.M. GHUNAIM⁵

¹*İzmir Uluslararası Biyotıp ve Genom Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi,
İzmir, Türkiye*

²*İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi, İzmir, Türkiye*

³*Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı, Fen Fakültesi, Dokuz Eylül Üniversitesi,
İzmir, Türkiye*

⁴*D Biofarma Biyoteknoloji Sanayi Ticaret, Dokuz Eylül Üniversitesi Teknopark
(DEPARK), İzmir, Türkiye*

⁵*Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Fen Bilimleri Enstitüsü, Dokuz Eylül Üniversitesi,
İzmir, Türkiye*

hulya.kayali@ibg.edu.tr, elcin.cagatay@ibg.edu.tr, mariam.ghunaim@ibg.edu.tr

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Hülya AYAR KAYALI



Video için
QR kodu okutunuz.



Rekombinant Protein
Üretimi - 1



Rekombinant Protein
Üretimi - 2

1. GİRİŞ REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Rekombinant protein üretimi, proteinlerin tıbbi ve endüstriyel alanda kullanımı amacıyla gerçekleştirilen biyoteknolojik süreçtir. Bu proses, birkaç aşamayı içermektedir. Rekombinant protein üretimi için ilk olarak hedef proteinin geni tanımlanır ve süreç gen klonlanması ile devam eder (Jayakrishnan ve ark., 2020). Üretilmek istenen proteinin yapısına bağımlı olarak bakteri, maya, böcek veya memeli hücreler ekspresyon sistemi olarak kullanılabilir. Prosesin ikinci aşamasında, rekombinant vektörün konakçı hücrelere transferi ve bu hücrelerin kontrollü koşullar altında büyütülmesi gerçekleştirilir. Kültür parametrelerini optimize etmek, protein verimini en üst düzeye çıkarmak için gereklidir. Üçüncü aşama ise, kromatografi ve filtreleme tekniklerinin ekspres edilen proteini hücresel bileşenlerden izole ettiği protein ekspresyonu ve saflaştırmayı içermektedir (Vuppu 2021). En son adım olarak, proteinin saflığını, kimliğini ve işlevselliğini değerlendirmek için kütle spektrometresi gibi analitik tekniklerin kullanıldığı kalite kontrol ve karakterizasyon işlemleri uygulanır. Yüksek kaliteli rekombinant proteinlerin verimli bir şekilde üretilmesi için her adım birbirine bağlıdır.

2. ALANLARA GÖRE REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNE GENEL BAKIŞ

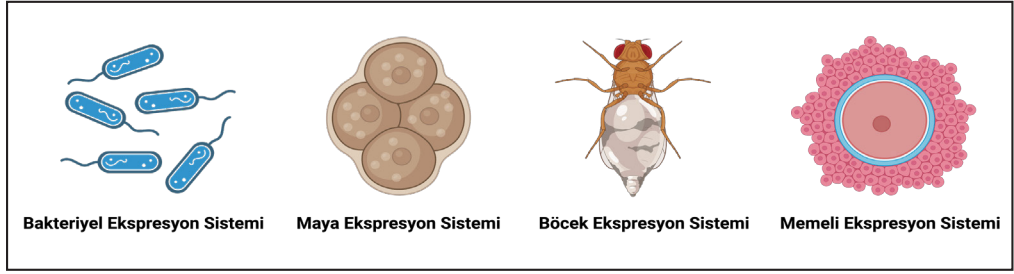
Rekombinant protein üretimi, genetik manipülasyonu içeren bir süreçtir. Bu üretim, özelleştirilmiş protein sentezini mümkün kılarak terapötik ve endüstriyel amaçlı spesifik proteinin tasarımına olanak sağlamaktadır. Hastalıkların teşhisinde, önlenmesinde ve tedavisinde büyük öneme sahip olan monoklonal antikorların ve aşılardan üretilen rekombinant protein üretiminin en önemli örnekleri olarak ortaya çıkmıştır. Benzer şekilde tıpta rekombinant proteinler, insülin, büyüme hormonları ve pıhtılaşma faktörleri gibi terapötik proteinlerin üretilmesi için kontrollü bir yöntem sağlayarak sağlık alanında kullanılmaktadır (Walsh, 2018). Rekombinant enzimler, biyoteknolojide, çeşitli endüstriyel süreçler için hayati öneme sahip belirli kimyasal dönüşümleri kolaylaştıran özelleştirilmiş biyokatalizörler olarak hizmet etmektedirler. Protein mühendisliği yoluyla bu enzimler katalitik verimliliklerini ve substrat spesifikliğini artıracak şekilde değiştirilebilir (Bornscheuer ve ark., 2012).

Endüstriyel sektörde rekombinant protein olarak enzimlerin üretimi, daha verimli ve çevre dostu süreçler için biyoyakıtların ve kimyasalların üretimini sağlamaktadır (Shukla ve Thommes, 2010). Bu enzimler, bira yapımı, gıda ve süt üretimi gibi süreçlerin iyileştirilmesinde verimlilik ve ürün kalitesinin artırılması gibi yiyecek ve içecek sektöründe kullanılmaktadır. Tekstil işlemede rekombinant enzimler, özellikle kot kumaşın işlenmesi ve biyo-parlatmada sürdürülebilir ve çevre dostu uygulamalara katkıda bulunur. Aynı zamanda, biyopolimerler ve özel kimyasallar dahil olmak üzere yeni malzemelerin geliştirilmesinde de rol oynayarak çeşitli endüstrilerde yenilikçiliği ve sürdürülebilirliği teşvik etmektedir. Ayrıca, rekombinant proteinlerle spesifik katalitik özelliklere sahip üretilen enzimler, çevre kirliliğine neden olan maddeleri parçalamada rol oynayan biyoremediasyon reaksiyonlarında kullanılarak çevre dostu uygulamaları teşvik eden Yeşil Kimya uygulamalarını sağlamaktadır (Adrio ve Demain, 2014).

Sonuç olarak, hem rekombinant proteinler hem de rekombinant enzimler, farklı sektörlerde verimliliğe, sürdürülebilirliğe ve yeniliğe katkıda bulunarak insan sağlığında, endüstriyel süreçlerde ve çevresel sürdürülebilirlikte umut verici ilerlemeler sağlar. Ayrıca devam eden teknolojik gelişmelerin etkilerini daha da güçlendirmesi beklenmektedir (Rader, 2019; Pandey ve ark., 2000).

3. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİ

Rekombinant protein üretimi, rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak proteinlerin elde edilme sürecidir. Bu teknoloji, yabancı DNA'nın (veya genlerin) konak organizmaların veya hücrelerin içine yerleştirilmesini içerir ve bu sayede bu organizmalarda doğal olarak bulunmayan proteinlerin üretilmesine olanak tanımaktadır. Genellikle plazmid veya viral vektör gibi bir taşıyıcı tarafından taşınan yabancı DNA, konak hücrelere tanıtılarak genlerin ifade edilmesine olanak sağlar. Bu süreç, genetik manipülasyonun amaçlarına bağlı olarak bakteriler, mayalar, böcek hücreleri ve memeli hücreleri gibi çeşitli organizmalar kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir (Oliveira ve ark., 2017; Tripathi ve Shrivastava, 2019).



Şekil 1. Rekombinant protein üretimi için moleküler klonlama adımları-ifade sistemleri.

Rekombinant protein üretim süreci tasarlanırken verilecek en önemli kararlardan bazıları seçilecek olan ifade vektörünün ve konakçı hücrenin özelliklerinin detaylıca değerlendirilmesi ve bu doğrultuda seçim yapılmasıdır.

3.1. Konakçı Hücreler

Konakçı hücreler, eklenen genlerin amplifikasyonu ve üretimi için platform görevi üstlenmektedir. Konakçı hücre seçimi, eksprese edilecek proteinin türü, spesifik translasyon sonrası modifikasyonlara duyulan ihtiyaç, üretim ölçeği ve klonlanan genlerin amaçlanan uygulaması gibi farklı parametrelere bağlıdır. Yaygın olarak kullanılan konak ekspresyon sistemleri Şekil 1' de gösterilmiştir.

3.1.1. Bakteriye Ekspresyon Sistemleri

Rekombinant proteinlerin sentezi için kullanılan bakteriyel hücrelerden biri olan *Escherichia coli* (*E. coli*) yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (Chen, 2012; Rosano ve Ceccarelli, 2014). Prokaryotik yapıya, plazmit temelli ekspresyon sistemlerine ve etkili protein ekspresyonuna yol açan güçlü promotörlere sahip olmaları bakteriyel sistemlerin en temel özellikleri arasında yer almaktadır (Gómez ve ark., 2016; Thakur ve Shankar, 2017). Hızlı büyüme ve yüksek hücre yoğunluğuna ulaşma potansiyeli, uygun maliyetli üretim, yüksek protein verimi

ve ölçek büyütme kolaylığı gibi özellikler bakteriyel sistemlerin avantajları arasındadır (Gómez ve ark., 2016; Thakur ve Shankar, 2017). Ökaryotik translayon sonrası modifikasyonların (PTM) olmaması, inklüzyon cisimciğinin oluşumu, kompleks proteinlerin üretimi için sınırlı kapasiteye sahip olmaları ve endotoksin kontaminasyonuna açık olmaları bu sistemlerin dezavantajlarını oluşturmaktadır (Rosano ve Ceccarelli, 2014).

Rekombinant protein üretimi için bir diğer yaygın kullanılan konakçı ekspresyon sistemi olarak *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*)' in seçilmesi, başarılı bir biyoteknolojik süreç için önemli avantajları beraberinde getirmektedir. *B. subtilis*, karmaşık katlanma gereksinimleri olan veya kapsamlı translayon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç duyan proteinlerin ifadesi için uygun bir sistemdir. Bakterinin sekresyon mekanizması, disülfid bağları içeren proteinlerin verimli bir şekilde üretilmesine olanak sağlamaktadır (Tjalsma ve ark., 2004). Sahip oldukları sekresyon mekanizmaları ile proteinler doğrudan büyüme ortamından toplanabilmekte ve bu da maliyet-etkin, verimli saflaştırma süreçlerinin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu, özellikle büyük ölçekli üretim için büyük avantaj sağlamaktadır (Westers ark., 2006). Ayrıca, *B. subtilis* genellikle güvenli olarak kabul edilmekte ve bu sayede üretilen rekombinant proteinlerin onay süreci kolaylaşmaktadır (Nguyen ve ark., 2005). Ancak, *B. subtilis* 'in konak ifade sistemi olarak seçilmesi birçok avantaj sağlamış olsa da, kodon kullanımına, potansiyel protein katlanması sorunlarına ve diğer düşünülmesi gereken faktörlere dikkat edilmesi, bu bakteride rekombinant protein üretiminin verimliliğini optimize etmek için esastır (Harwood ve Cranenburgh, 2008; Hyyryläinen ve ark., 2010).

3.1.2. Maya Ekspresyon Sistemleri

Mikrobiyal ökaryotik konak sistemlerinden biri olan mayalar, fonksiyonel rekombinant protein üretiminde önde gelen ökaryotik organizmalardır. Mayaların sahip olduğu genetik manipülasyonun kolaylığı, hızlı büyüme ve yüksek biyokütle üretme kapasiteleri, kompleks heterolog ökaryotik proteinin katlanma, yeniden birleşme ve translayon sonrası modifikasyonları kolaylaştırma yeteneğine sahip olmaları ve hücre dışı ortamda modifikasyon yapabilme yetenekleri bu sistemlerin önemli avantajları olarak öne çıkmaktadır (Lestari ve Novientri, 2021; Vieira Gomes ve ark., 2018).

Günümüzde, gıda ve ilaç endüstrisinde kullanılan çeşitli proteinleri üretmek için kullanılan en yaygın mayalar, *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) (metilotrofik olmayan maya), *Pichia pastoris* (*P. pastoris*) ve *Hansenula polymorpha* (metilotrofik maya) olarak bilinir. *S. cerevisiae* ve *P. pastoris*, genellikle güvenli olarak kabul edilen bir organizma olarak ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Geleneksel fırıncı mayası olan *S. cerevisiae*, genetik mühendislik ve rekombinant protein üretimi için yaygın olarak kullanılan ve iyi karakterize edilmiş konak sistemlerinden biridir (Martinez ve ark., 2012). Bununla birlikte, güçlü fermantasyon metabolizması, hiper-glikozile ürünler ve nispeten düşük ve sınırlı rekombinant protein üretkenliği gibi bazı fizyolojik özellikler, *S. cerevisiae* 'nin sınırlamalarıdır. Ayrıca, ürünlerin periplazmik boşlukta tutulması sıkça gözlemlenir ve bu durum kısmi bozulmaya yol açabilir. Son yıllarda, diğer maya türlerini konak olarak kullanarak birçok protein ticari olarak kullanılabilir hale gelmiştir. Düşük maliyetli karbon kaynakları kullanarak *Saccharomyces* dışı maya türlerinin daha hızlı büyüme ve yüksek salgılama kapasitesi, bunları rekombinant üretim için pratik alternatif konaklar yapmaktadır (Kim ve ark., 2015). Sonuç olarak, genetik mühendisliğiyle tasarlanmış mayalar, ticari olarak uygulanabilir süreçlerle donatılmış rekombinant proteinler üretmek için önemli stratejiler ve ekonomik platformlardır.

3.1.3. Memeli Hücre Ekspresyon Sistemleri

Çin hamster yumurtalık (CHO) hücreleri, biyofarmasötik endüstrisinde öne çıkan ve yaygın olarak kullanılan ekspresyon sistemleridir. CHO hücreleri, kompleks translasyon sonrası modifikasyonları gerçekleştirme yetenekleri nedeniyle, birçok insan proteininin doğru katlanması ve işlevi için hayati olan bu modifikasyonları gerçekleştirmek üzere tercih edilmektedir (Duamont ve ark., 2015). Protein üretimi süreci, ilgi duyulan hedef proteinin ifadesi için tasarlanmış belirli bir CHO hücre hattının seçimi ile başlamakta ve istenilen proteini kodlayan genin CHO hücre genomuna entegrasyonu ve genin ifade edilmesi basamaklarıyla devam etmektedir (Tihanyi ve ark., 2020).

CHO hücreleri, sıcaklık, pH ve besin konsantrasyonları gibi faktörleri dikkatlice kontrol edilen biyoreaktörlerde büyütülmektedir. Bu koşullar, optimal hücre büyümesini ve protein üretimini teşvik etmek adına özenle seçilmelidir. Hücreler genellikle süspansiyon kültüründe yetiştirilmekte ve bu durum büyük ölçekli üretim için kolay uygulanabilirlik sağlamaktadır (Li ve ark., 2010).

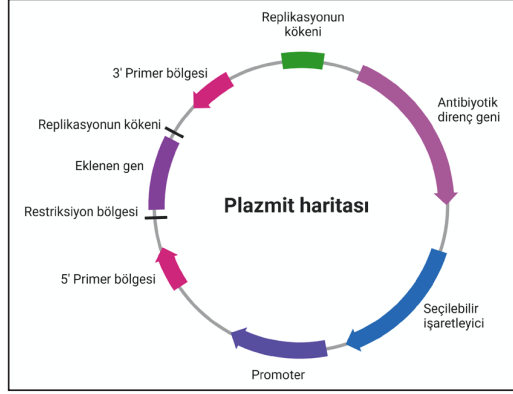
CHO hücrelerinde glikozilasyon ve disülfid bağı oluşturma gibi translasyon sonrası modifikasyonlar, insan hücrelerinde gerçekleşen doğal süreçleri taklit etmektedir. Bu modifikasyonlar, üretilen proteinin biyolojik aktivitesi, stabilitesi ve etkinliği için büyük önem arz etmektedir. Bu hücreler kullanılarak üretilen proteinlerin yüksek verimliliği ve ölçeklenebilirliği, onları terapötik proteinlerin, özellikle monoklonal antikorlar ve diğer biyofarmasötiklerin üretimi için tercih edilen seçenek haline getirmiştir. İnsanlarda bulunan benzer modifikasyonlarla karmaşık proteinler üretme yetenekleri, CHO hücre temelli ifade sistemlerini biyofarmasötik endüstrisinde vazgeçilmez bir araç haline getirmiştir.

3.2. İfade Vektörleri

Rekombinant proteinlerin üretim aşamasında uygun ve etkili vektör seçimi, üretim verim ve kalitesini etkileyen ve proses başlangıcında karar verilmesi gereken bir diğer önemli faktör olarak ortaya çıkmaktadır. Vektör seçimi, konakçı organizmaya ve amaçlanan uygulamaya bağlı olarak belirlenmektedir. Plazmitler, viral vektörler, ekspresyon vektörleri ve yapay kromozomlar yaygın olarak kullanılan vektör türleridir.

Plazmitler; genellikle bakteriyel transformasyonda kullanılan küçük, dairesel DNA molekülleri olarak tanımlanır ve çeşitli genleri taşıma kapasiteleri ve manipülasyon kolaylıkları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedirler (Bivalkar ve ark., 2022). Viral vektörler; virüslerden türetilir ve ökaryotik hücrelerin dönüştürülmesinde etkili olan genetik materyali iletmek için kullanılırlar. Retrovirüsler, adenovirüsler ve lentivirüsler gibi viral vektörler yaygın olarak kullanılmaktadır (Zhang ve Godbey, 2006). Kozmid vektörler; plazmitlerin ve bakteriyofajların özelliklerini birleştiren hibrit vektörlerdir. Plazmitlerden daha büyük DNA parçalarını taşıma kapasitesine sahip olan kozmidler, genellikle büyük genleri veya genomik parçaları klonlamak için kullanılmaktadırlar (Bivalkar ve ark., 2022). Bakteriyel yapay kromozomlar (BAC) ve maya yapay kromozomları (YAC): BAC ve YAC, büyük DNA parçalarını taşıma kapasitesine sahip büyük vektörlerdir. Büyük genomlarla çalışma veya genlerin doğal organizasyonunu koruma gerekliliği olan durumlarda tercih edilmektedirler (Velten ve Schell, 1985). Ekspresyon vektörleri genlerin konak hücrelerde ifadesi için özel olarak tasarlanmıştır. Genellikle yüksek düzeyde gen ifadesini tetiklemek için güçlü promotörlere ve gen transkripsiyonunu arttırıcı bölgelere sahiptirler. Ekspresyon vektörleri, plazmitler veya viral vektörler olabilmektedir (Velten ve Schell, 1985).

Vektörler, genellikle çoklu klonlama bölgesi (MCS), seçici ajan genleri, replikasyon başlangıç noktaları, promotör bölgeleri ve terminator bölgeleri gibi temel bileşenleri içerir. Bu bileşenler, vektörün hedef hücrelerde başarılı bir şekilde çoğalmasını ve istenilen genetik değişikliklerin yapılmasını sağlamaktadır. Tipik bir plazminin ana bileşenleri Şekil 2’ de gösterilmiştir.

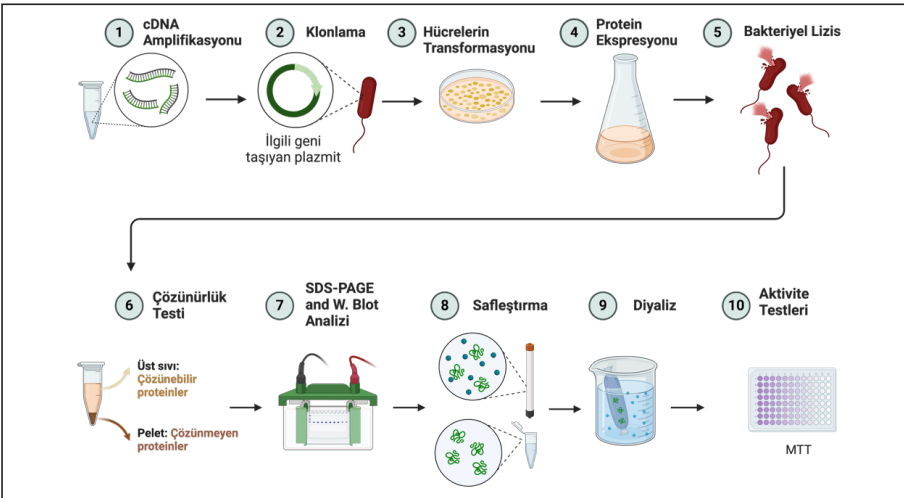


Şekil 2. Tipik bir plazminin bileşenleri.

3.3. Rekombinant Protein Üretiminin Ana Adımları

Rekombinant protein üretimi, ilgili genin tasarımından başlayarak klonlanması, çoğaltılması, protein üretiminin gerçekleştirilmesi, saflaştırılması ve son olarak karakterizasyonunu içeren kapsamlı bir süreçtir. Şekil 3’ te gösterilen bu aşamalar, istenilen proteinlerin yüksek verimle ve doğru biçimde üretilmesi için kritik öneme sahiptir. Vektörün hazırlanması aşamasında, ilgilenilen genin boyutu, konakçı organizmanın türü ve uygulama amacının belirlenmiş olması büyük önem arz etmektedir (Lu, 2014; Oliveira ve ark., 2016).

İstenen proteini kodlayan gen ilk olarak genin ifadesini düzenleyecek bir promotörün kontrolü altında bir ifade vektörünün çoklu klonlama bölgesine klonlanır. Gen intron içeriyorsa, bakteriler intronları kesip çıkarmadığı için genellikle bir cDNA kütüphanesinden klonlanır.

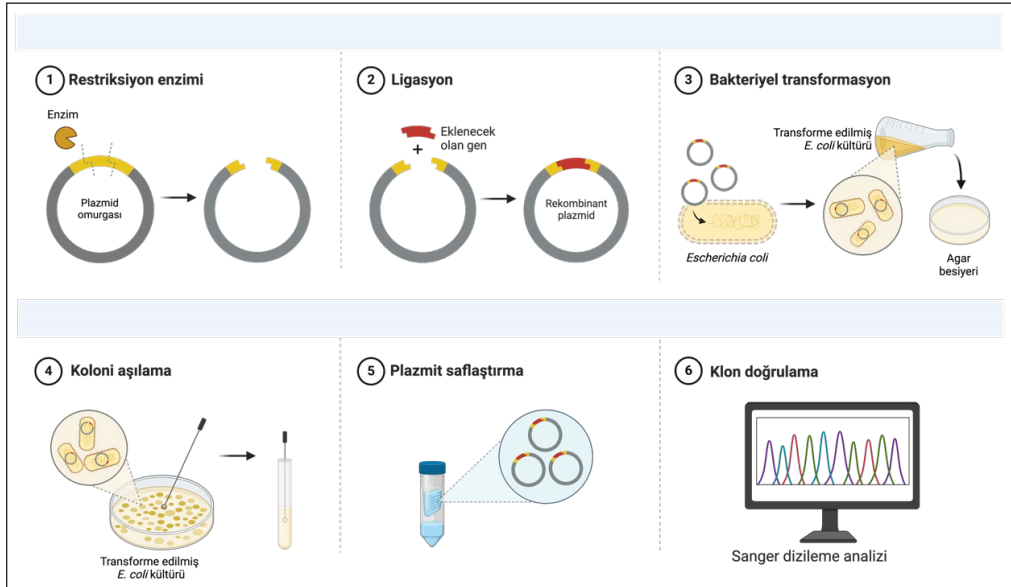


Şekil 3. Rekombinant protein üretimine genel bakış.

3.3.1. Gen Klonlama

Klonlama; bir gen, hücre veya organizmanın genetik olarak özdeş biyolojik kopyalarının üretilmesidir (Miles ve ark., 1989). Moleküler klonlama olarak da bilinen bu teknik, biyoteknoloji ve araştırma alanında büyük öneme sahiptir. Bu yöntem, ifade edilmesi istenilen geni içeren bir DNA parçasının plazmid gibi bir vektöre aktararak belirli genlerin veya DNA segmentlerinin amplifiye edilmesi çalışmalarını içermektedir. Çalışmaların devam eden basamaklarında, bu vektör bir konak organizmaya aktararak çoğaltılır ve ifadesi istenilen genin birçok kopyası üretilir. Bu yaklaşım, araştırmacıların genleri derinlemesine incelenmesine, ifade edilmesi istenilen proteinlerin sentezlenmesine ve genetik terapilerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır (Miles ve ark., 2001; Muylers ve ark., 2001).

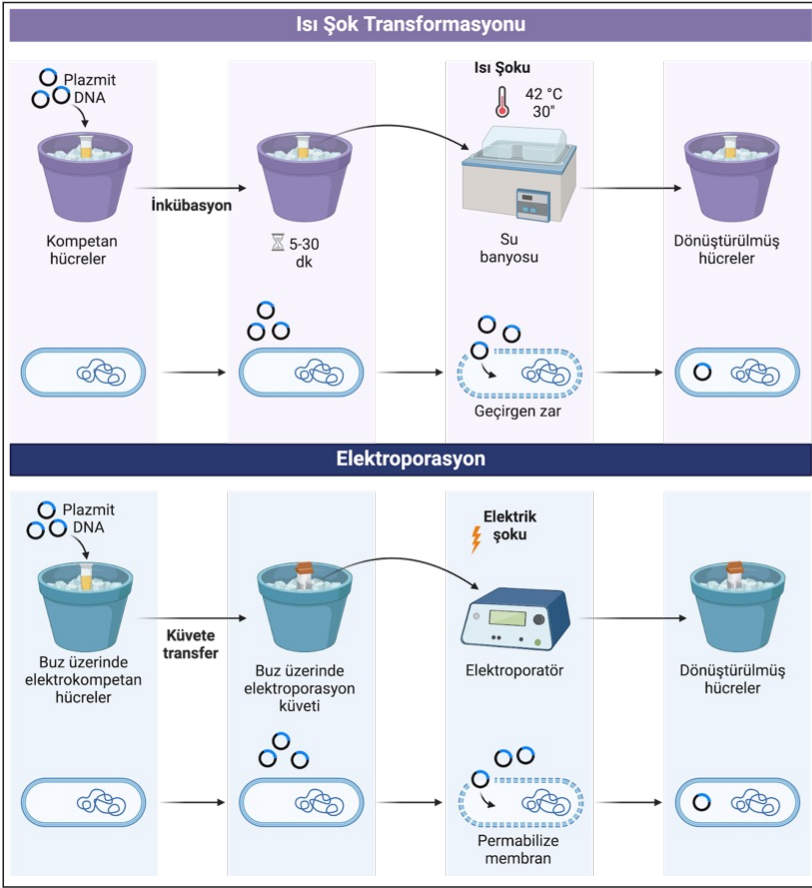
İfade edilmesi istenilen genin belirli bir vektöre etkili şekilde yerleştirilmesini sağlayan ligasyon, gen klonlama çalışmalarında büyük öneme sahip adımlardan biridir. Ligasyon çalışmalarından hemen önce, vektörü ve geni kesmek için uygun restriksiyon enzimlerinin seçilir ve genin etkili şekilde aktarılması amacıyla yapışkan veya kör uçlar oluşturulmakta ve kesim işleminin ardından, agaroz jel elektroforezi kullanılarak verimlilik kontrol edilmektedir. Bu adımlardan sonra parçaları birleştirmek için DNA ligaz enzimi kullanılmakta ve böylece stabil bir rekombinant DNA molekülü elde edilmektedir. İfade edilmesi istenilen genin tam olarak klonlandığını ve ligasyondan sonra vektöre yerleşip yerleştirildiğini doğrulamak için jel elektroforez yöntemi kullanılmaktadır. Klonlama işlemlerinin başarı ile sonuçlanması rekombinant DNA'nın konakçı organizmaya aktarılmaya hazır hale geldiğinin göstermektedir (Oliveira ve ark., 2017; Pyne ve ark., 2011). Moleküler klonlama basamakları Şekil 4' te gösterilmiştir.



Şekil 4. Moleküler klonlama basamakları.

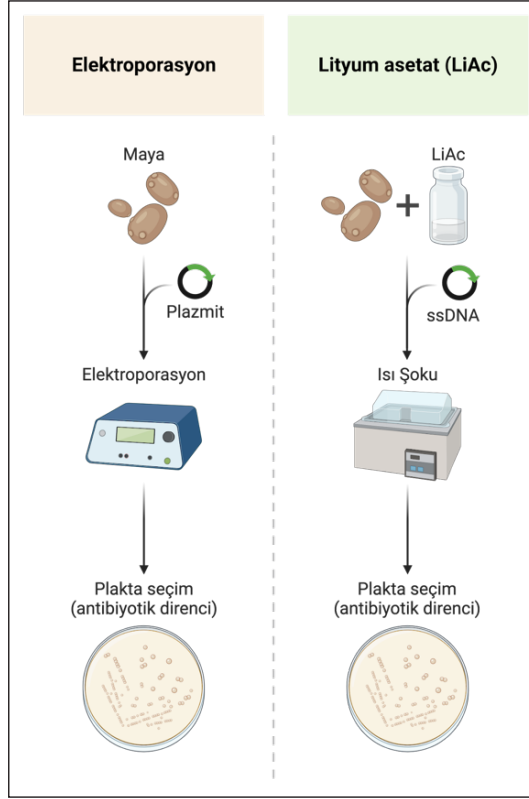
3.3.2. Transformasyon

Transformasyon, yabancı DNA'nın konak hücelere aktarılması için kullanılan spesifik bir proses olarak tanımlanmaktadır. Seçilen transformasyon yönteminin, kullanılacak olan konakçı organizmaya uygun olarak seçilmesi büyük öneme arz etmektedir. Isı şoku ve elektroporasyon (Şekil 5), plazmid DNA'nın bakteri hücrelerine sokulması için etkili yollar olarak kabul edilmektedir. Isı şoku tekniğinde, kompetan hücreler ve plazmidler sıcaklıkta hızlı bir artışa maruz bırakarak plazmidin hücelere girmesine olanak sağlayacak şekilde hücre zarının permeabilite edilmesi sağlanmaktadır (Chang vd., 2017; Sha vd., 2011). Bir diğer yaygın kullanılan transformasyon tekniği ise elektroporasyondur. Bu yöntemde, elektrik akımı kullanılarak kompetan hücrelerin zarlarında geçici porlar oluşturulmakta ve plazmidlerin hücre içine girmesine imkan tanınmaktadır.



Şekil 5. Moleküler klonlama basamakları - bakteriyel transformasyon.

S. cerevisiae ve *P. pastoris* gibi maya hücreleri lityum asetat muamelesi ve elektroporasyon kullanılarak transforme edilmektedir (Şekil 6). Lityum asetat tekniği, maya hücrelerinin lityum asetata maruz bırakılmasını, ardından plazmidlerle karıştırılmasını ve DNA'nın hücelere girmesini sağlamak için bir ısı şoku uygulanmasını içermektedir (Gietz ve Woods, 2002). Elektroporasyon tekniği maya için kullanılabilir; burada yine elektrik akımı yardımıyla hücre zarında geçici porlar açılarak yabancı DNA'nın girmesine olanak sağlanmaktadır (Campelo ve ark., 2023).



Şekil 6. Moleküler klonlama basamakları - maya transformasyonu

CHO ve HEK293 hücreleri gibi memeli hücreleri kimyasal transfeksiyon, elektroporasyon, viral transdüksiyon ve CRISPR-Cas teknolojisi gibi farklı yaklaşımlar kullanılarak transforme edilmektedir.

Kimyasal transfeksiyonda DNA, DNA'nın hücelere aktarılmasına yardımcı olan kompleksler oluşturmak için lipozomlar veya katyonik polimerler gibi kimyasal reaktiflerle muamele edilmektedir. Bu kimyasallar DNA'yı kapsülleyerek hücre zarı ile arasında bir arayüz oluşturulmasını ve DNA'nın hücreye daha kolay girmesini sağlamaktadır. DNA hücre tarafından alındığında, kompleks hücre sitoplazmasından ifade edilebileceği çekirdeğe taşınmaktadır (Liu ve ark., 2004).

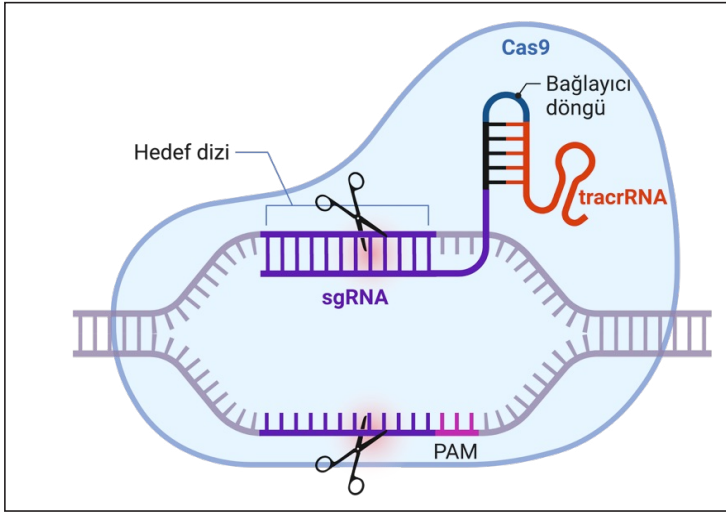
Memeli hücrelerini dönüştürmek için bir başka etkili yaklaşım da elektroporasyon yönteminin kullanılmasıdır. Daha önce açıklandığı gibi, bu prosedür hücrelerin bir elektrik alanıyla muamele edilmesini, hücre zarının geçirgen hale getirilmesini ve DNA'nın hücreye girmesini içerir. Hücre canlılığını korurken DNA emilimini artırmak için voltaj ve darbe uzunluğu dikkatle kontrol edilmelidir. Deneysel tasarıma bağlı olarak, DNA konak genomuna entegre olabilmekte ya da bir epizom olarak kalabilmektedir (Campelo ve ark., 2023).

Viral transdüksiyon, tek tip gen ifadesine sahip memeli hücre hatları oluşturmak için oldukça yaygın olarak kullanılan bir tekniktir. Bu yöntemde, belirli bir geni aktarmak ve hedef hücreleri enfekte etmek için tasarlanmış retrovirüsler ve lentivirüsler viral vektörler olarak kullanılmaktadır. Konak hücrenin enfekte edilmesinin ardından viral vektör, rekombinant DNA da dahil olmak üzere

genetik materyalini konak hücrenin genomuna entegre ederek kararlı ve uzun süreli gen ifadesini sağlayabilmektedir (Maurer ve Weitzman, 2020).

3.3.3. CRISPR-Cas Teknolojisi

CRISPR-Cas teknolojisi, bakteriyel bağışıklık sistemi CRISPR (düzenli aralıklarla tekrarlanan kısa palindromik tekrarlar)/Cas (CRISPR-ilişkili protein) sistemini ifade etmektedir (Wang ve ark., 2016). Bu teknoloji, DNA dizisinde hassas değişikliklere izin vererek genom düzenlemesine olanak sağlamaktadır. Özellikle Tip II CRISPR/Cas9 sistemi, memeli hücrelerinde hedefli gen düzenlemesi için sıklıkla kullanılmaktadır. Yöntem, istenen DNA dizisine karşılık gelen bir kılavuz RNA (gRNA) oluşturulmasıyla başlar, gRNA, bir endonükleaz olan Cas9 proteinini genomda belirli bir bölgeye yönlendirir ve burada çift sarmal kırılmasına neden olur (Şekil 7). Bu kırılma daha sonra hücrenin kendi onarım sistemleri tarafından düzeltilebilir ve gen baskılanması, eklemesi veya değiştirilmesine olanak tanıyabilmektedir (Rozov ve ark., 2019; Dey, 2021; Kalkan ve ark., 2023). CRISPR-Cas, hedef proteinin ifadesini artırmak için genleri susturarak, gen ifadesini artırmak için regülatör elementlerini düzenleyerek, daha iyi translyasyon için kodon kullanımını optimize ederek ve kararlı protein üretimini sağlamak için belirli genomik konumlara ifade kasetleri ekleyerek protein üretiminde kullanılabilir (Xue ve ark., 2020).

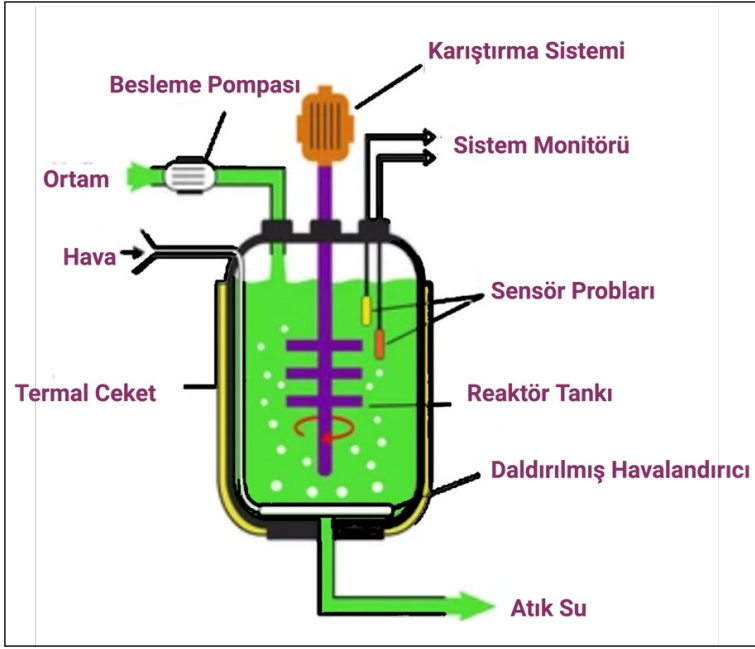


Şekil 7. Moleküler klonlama basamakları - CRISPR.

4. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİM ÖLÇEĞİNİN ARTIRILMASI

Endüstriyel biyokimyasal işlemlerde birincil operasyonel birimler olan biyoreaktörlerde canlı hücrelerin biyotransformasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadırlar (Şekil 8) (Spier ve ark., 2011). Bitki hücresi, doku ve organ kültürleri için karıştırmalı tank reaktörleri ve döner tamburlu tank reaktörleri gibi mekanik olarak çalkalanan seçenekler; balon kolon, eş merkezli tüp hava reaktörü, döngü hava aktarım reaktörü, pervane döngü reaktörü ve jet döngü reaktörü gibi hava ile çalışan alternatifler; ayrıca dolgulu yatak, akışkan yatak ve membran reaktörleri gibi çeşitli biyoreaktör seçenekleri mevcuttur.

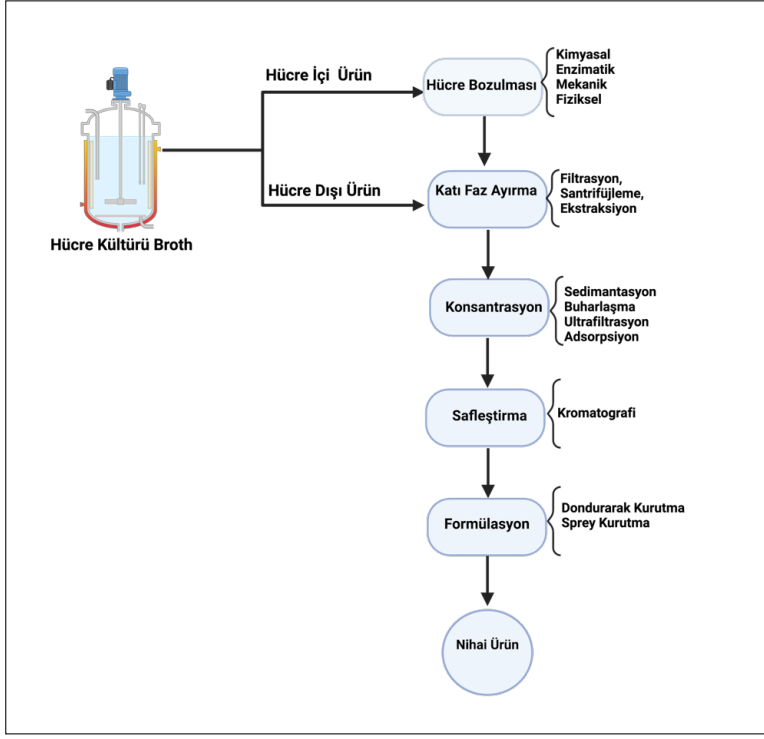
Biyoproses için yaygın olarak kullanılan karıştırmalı tank reaktörlerinde, gaz kültür ortamına basınç altında püskürtme yoluyla enjekte edilmektedir (Glick ve Pasternak, 2010). Bu tip sistemler oksijen, azot, karbon ve diğer gerekli enerji/metabolit kaynaklarının alınımı sağlamak ve ilgilenilen biyomateryalin çıktısını tahmin edebilmektedirler (Griffin ve ark., 1990). Kesikli reaktörler, beslemeli parti reaktörleri ve sürekli karıştırılan tank reaktörleri (CSTR) yaygın olarak kullanılan karıştırmalı reaktörler olarak öne çıkmaktadır. Besin konsantrasyonlarının döngünün son saatlerine kadar giderek azaldığı kesikli reaktörlere kıyasla, CSTR'lerin avantajı, sürekli hücre büyümesinin sağlanabiliyor olmasıdır (Yang ve ark., 2019). Ancak, prosesin sonuna doğru besin miktarında meydana gelen azalma ile baskın suş populasyonunda meydana getirebileceği değişiklikler göz ardı edilmemelidir. Ayrıca maksimum üretkenlik potansiyeli ve iş gücünden tasarruf sağlayan özellikleri CSTR kullanımını faydalı hale getirebilmektedir. Öte yandan, bazı durumlarda kesikli reaktörler özellikleri açısından CSTR'lerden daha avantajlı olabilmekte ve kısa büyüme süreleri nedeniyle kontaminasyon veya mutasyon riskini azaltabilmektedirler (Yang ve ark., 2019). Beslemeli kesikli teknik ise kültür ortamındaki besin miktarını düzenleme veya değiştirme olanağı sağlamasından dolayı kesikli teknikten daha çok tercih edilebilmektedir (Minihane ve ark., 1986).



Şekil 8. Büyük ölçekli biyo-üretimde biyoreaktörler.

5. REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNİN AŞAĞI AKIŞ (DOWNSTREAM) PROSESLERİ

Rekombinant protein üretiminin aşağı akış prosesi, konakçı organizmada hedeflenen genin ifadesini takip eden bir dizi adımı ifade etmektedir. Bu aşama, üretilen rekombinant proteinin konakçı hücrelerden veya kültür ortamından toplanması, saflaştırılması ve ardından karakterize edilmesi basamaklarını kapsamaktadır. Aşağı akış prosesi, yüksek kaliteli ve saflaştırılmış bir ürün elde etmek açısından oldukça önemlidir. Aşağı akış prosesinde yer alan temel adımlar Şekil 9' da sunulmuştur.



Şekil 9. Aşağı akış prosesinde yer alan temel adımlar.

5.1. Hücre Hasadı

Rekombinant proteinlerin ekspresyonu sonrasında konakçı hücre kültüründeki hücreler toplanır. Hasat yöntemi konakçı organizmaya bağlı olmakla birlikte bakteriler ve mayalar için santrifüjleme veya filtreleme, memeli hücreleri için ise genellikle santrifüjleme ve filtrelemenin bir kombinasyonu kullanılmaktadır. Bu süreç, hedef ürünün kültürlenmiş hücrelerden etkin bir şekilde ayrılmasını, saflaştırılmasını ve ekstraksiyonunu sağlayan birkaç önemli adımı içermektedir. Kültür son noktaya geldiğinde hücre toplamanın ilk adımı sürecin sonlandırılmasıdır. Bu amaçla kültüre besin eklenmesi durdurulur ve sürecin tetikleyicileri engellenir. Bir sonraki adım hücrelerin kültür ortamından toplanmasıdır (Turner, 2017). Bu basamakta santrifüjleme, filtrasyon veya sedimentasyon gibi yöntemler sıklıkla kullanılmakta olup spesifik teknik hedef hücrelerin boyutuna ve özelliklerine bağlı olarak belirlenmektedir. Hücre ayırma işleminden sonra, berraklaştırma adımı gerçekleştirilir ve büyük parçacıkların, hücre artıklarının ve diğer kirlilik maddelerinin uzaklaştırılması sağlanır.

5.2. Hücre Parçalama

Hücrenin parçalanması, rekombinant protein üretiminden sonraki en önemli aşamalardan biridir. Bu işlem ile hücre içi salgılanan rekombinant protein ve diğer hücre içi içeriklerin konakçı hücrelerden salınması sağlanmaktadır. Konakçı organizmanın tipine ve hücrelerin özelliklerine göre farklı hücre parçalama yöntemleri kullanılabilir (Gomes ve ark., 2020). Yaygın olarak kullanılan

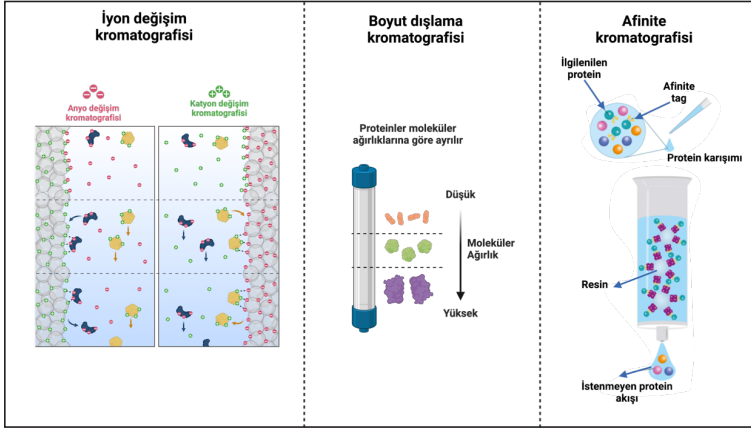
hücre parçalama yöntemleri mekanik ve kimyasal araçlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Homojenizatör, boncuk bilyalı öğütücü, yüksek basınç uygulamaları ve ultrasonikasyon gibi yaygın olarak kullanılan yöntemler ile hücrelerin mekanik olarak parçalanması sağlanırken, deterjan ve enzimler kullanılarak kimyasal olarak hücre zarının yapısının bozulması sağlanabilmektedir. Büyük ölçekte yaygın olarak kullanılan hücre parçalama yöntemleri arasında yüksek basınçlı homojenizatörler ve boncuk değirmenleri bulunmaktadır.

5.3. Santrifüjleme ve Berraklaştırma

Parçalanmış hücre süspansiyonu, hücre döküntülerini, çözünmeyen bileşenleri ve hücre zarlarını, rekombinant proteini içeren çözünür fraksiyondan ayırmak için santrifüj işlemine tabi tutulmaktadır. Ayrıca bu adım lizatın berraklaştırılmasına yardımcı olmaktadır.

5.4. Rekombinant Proteinlerin Saflaştırılması

Kromatografik yöntemler, rekombinant olarak üretilen proteinlerin saflaştırılmasında kullanılan güçlü metodlardır. Proteinleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre saflaştırmak için farklı tipte kromatografi yöntemleri kullanılmaktadır. Protein saflaştırması için kullanılan bazı yaygın kromatografi yöntemleri Şekil 10’da gösterilmektedir.



Şekil 10. Protein saflaştırma-kromatografi yöntemleri

Afinite kromatografisi, katı bir destek (kolon matrisi) üzerinde immobilize edilmiş bir ligand ile bir hedef protein arasındaki spesifik etkileşimden yararlanmaktadır. Ligand ilgili proteine seçici olarak bağlanacak şekilde tasarlanmıştır. His-tag, GST-tag gibi afinite etiketleri ile etiketlenen proteinlerin saflaştırılmasında ve antikorlara/ligandlara spesifik bağlanmaya dayalı proteinlerin izolasyonunda kullanılmaktadır (Urh ve ark., 2009).

İyon değişim kromatografisi, proteinleri toplam yüklerine göre ayıran bir yöntemdir. Sabit faz, pozitif yüklü (katyon değişimi) veya negatif yüklü (anyon değişimi) gruplar içermektedir. Bu teknik, proteinlerin izoelektrik noktalarına göre ayrılması ve farklı net yüklere sahip proteinlerin saflaştırılması için kullanılmaktadır (Fekete ve ark., 2015).

Boyut dışlama kromatografisi (SEC veya Jel Filtreleme), proteinleri boyutlarına ve şekillerine göre ayırma esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde daha büyük moleküller kolondan daha hızlı geçerken, daha küçük moleküller daha uzun süre kolonda tutulmaktadır. Proteinlerin moleküler ağırlığa göre fraksiyonlanması ve agregatların veya kirletici maddelerin uzaklaştırılması için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fekete ve ark., 2014). Ayrıca, doğru katlanmış proteinler ile yanlış katlanmış veya agregre olmuş türler arasındaki boyut farklılıklarının belirlenmesine olanak tanımaktadır (Nabiel ve ark., 2022) ve rekombinantların monomerik, dimerik veya oligomerik yapısı hakkında bilgi verebilmektedir (Gabrielson ve ark., 2007). Bununla birlikte numune yükünde kısıtlama, düşük protein konsantrasyonu ve yeniden katlama verimliliği gibi bazı dezavantajları da mevcuttur (Chen ve Leong, 2010).

Hidrofobik etkileşim kromatografisi (HIC), proteinleri hidrofobik özelliklerine göre ayıran bir tekniktir. Bu süreçte, hidrofobik bir sabit faz, proteinlerin hidrofobik bölgeleriyle etkileşime girerek tutulmalarını sağlamaktadır. Hidrofobik moleküllere sahip proteinlerin saflaştırılması için uygulanmakta ve denatürasyona duyarlı proteinler için uygun, hassas bir saflaştırma yöntemi olarak kabul edilmektedir (McCue, 2009).

Metal afinite kromatografisi, özellikle immobilize metal afinite kromatografisi (IMAC), nikel veya kobalt gibi kolon-immobilize metal iyonlarını kullanarak belirli metal bağlayıcı alanlara sahip proteinleri (örneğin, His-etiketi gibi) yakalamak için kullanılmaktadır. Tipik olarak metal bağlama dizileri ile etiketlenmiş rekombinant proteinlerin saflaştırılması için kullanılan bu yöntem, metal iyonları ve hedef proteinler arasındaki spesifik etkileşime dayanmaktadır (Block ve ark., 2009).

Ters faz kromatografisi, proteinleri hidrofobik özelliklerine göre ayırmaktadır. Bu teknikte kullanılan sabit faz polar değildir ve elüsyon, mobil fazın polaritesinin azaltılmasıyla sağlanmaktadır. Hidrofobik proteinlerin saflaştırılması ve benzer hidrofobik özelliklere sahip proteinlerin ayrılması amacıyla uygulanmaktadır (Aguilar, 2004).

6. REKOMBİNANT PROTEİN KARAKTERİZASYONU

Saflaştırmadan sonra rekombinant proteinin karakterizasyonu, eksprese edilen proteinin kalitesini ve işlevselliğini belirlemek için önemli bir adımdır. Bu amaçla yaygın olarak her biri kendine özgü avantajlar ve dezavantajlar sunan çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Rekombinant proteinlerin karakterize edilmesi amacıyla total protein analizi ve jel elektroforezi gibi tekniklerin yanı sıra kütle, nükleer manyetik rezonans ve floresan spektrometrisi gibi analitik karakterizasyon teknikleri de yaygın olarak kullanılmaktadır.

6.1. Bisinkoninik Asit (BCA) Testi

BCA, rekombinant protein gibi bir numunedeki toplam protein konsantrasyonunu ölçmek için kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. Bu protokol, alkali ortamda proteinler tarafından Cu^{+2} 'nin Cu^{+1} 'e indirgenmesi ve bisinkoninik asit ile mor renkli komplekslerin oluşmasına dayanmaktadır. Toplam protein konsantrasyonu, spektrofotometrik olarak ölçülebilen rengin yoğunluğuyla orantılıdır (Lin ve ark., 2022). Rekombinant protein için BCA testinin birçok avantajı bulunmaktadır. BCA

analizi ile 5-2.000 µg/ml aralığındaki protein konsantrasyonu tespit edilebilmektedir. Bu hassasiyet rekombinant proteinlerin düşük konsantrasyonları için uygundur. BCA testi diğer protein analizi yöntemlerine göre daha hızlı bir yöntem olmakla birlikte bu analizde deterjan gibi maddelerden kaynaklanan etkileşim diğer analizlere göre daha düşüktür (Olson, 2016). Analiz total protein miktarı hakkında bilgi verirken, proteinlerin spesifik özellikleriyle ilgili bilgi sağlayamamaktadır. Ayrıca BCA testinde sığır serum albümini (BSA) standart olarak kullanılmaktadır (Bocian ve ark., 2020).

6.2. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektrofrezisi)

Farklı fraksiyonlardaki rekombinant proteinlerin incelenmesi, basit ve yaygın olarak kullanılan bir teknik olan SDS-PAGE aracılığıyla gerçekleştirilebilmektedir. Bu yöntem yalnızca proteinin boyutu ve saflığı hakkında bilgi sağlamakla kalmaz, aynı zamanda protein konsantrasyonunun tahmin edilmesine ve moleküler ağırlığın belirlenmesine de olanak sağlamaktadır. SDS-PAGE ile degradasyon, glikozilasyon ve oligomerizasyon gibi protein özellikleri tanımlanabilmektedir. Örneğin, 'Coomassie blue' boyalı SDS-PAGE jelinde indirgeyici olmayan koşullar altında hazırlanan bir protein numunesinde, *E. coli*'den rekombinant yollarla üretilen bir insan büyüme faktörünün (VEGF) monomerik (19 kDa), dimerik (38 kDa) ve oligomerik (> 100 kDa) formları belirlenebilmektedir. Ayrıca, SDS-PAGE protein örneklerinin saflaştırılmasında kullanılabilir ve ardından örneklerin Edman degradasyonu ve kütle spektrometrisi gibi tekniklerle analizleri gerçekleştirilebilmektedir. SDS-PAGE ile tespit edilemeyen proteinler, proteoliz olayları ve modifikasyonları tespit etmek için kullanılabilir (Oliveira ve Domingues, 2018). Öte yandan, SDS-PAGE'in çok büyük veya küçük proteinler için çözünürlüğü sınırlıdır ve bu yöntem proteinin aktivitesi veya yapısı hakkında bilgi sağlayamamaktadır (Laemmli, 1970; Malke, 1990)

6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), sıvı kromatografisinin gelişmiş bir versiyonunu temsil etmekte olup daha hızlı ve daha etkili ayırım elde etmek için yüksek basınçlı pompaları kullanıldığı bir teknik olarak ortaya çıkmaktadır. Hızlı ve yüksek çözünürlüklü protein analizlerinde kullanılmaktadır (Lozano-Sánchez ve ark., 2018). Bu kapsamda, iyon değişim kromatografisi, afinite kromatografisi, boyut dışlama kromatografisi, hidrofobik kromatografi gibi teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır.

6.4. Kütle Spektrometrisi (MS)

Kütle spektrometrisi (MS), rekombinant proteinlerin karakterizasyonuna yönelik analitik tekniklerden biri olup iyonların kütle-yük oranına göre moleküllerin kütlesi, yapısı, protein ağırlığı ve bileşimi hakkında bilgi vermektedir. Rekombinant DNA teknolojileri kullanılarak üretilen terapötik proteinler karmaşık olabilmekte ve ekspresyon ve saflaştırma gibi işlemler sırasında çeşitli enzimatik, kimyasal modifikasyonları içerebilmektedir. Rekombinant proteinlerin MS aracılığı ile gerçekleştirilen yapı ve sekans analizinde amino asit modifikasyonu ve sekansı hakkında bilgi alınabilmektedir. Ayrıca MS ile glikozilasyon, fosforilasyon ve asetilasyonu içeren translasyon

sonrası değişiklikler de tespit edilebilmektedir. Translasyon sonrası değişiklikleri tespit etmek için özel MS teknikleri gerekebilme ve bu nedenle yüksek çözünürlüklü kütle spektrometresi sağlamak için geliştirilen LC/MS, TANDEM-MS ve MALDI-MS sistemleri kullanılabilir (Srebalus Barnes ve Lim, 2007).

6.5. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektroskopisi

Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi, rekombinant protein gibi biyomoleküllerin yapısal ve dinamik analizine yönelik analitik bir tekniktir. NMR, çözeltideki proteinlerin üç boyutlu yapısı, konformasyonel değişiklikleri ve dinamikleri (Maciejewski ve ark., 2017) ile protein molekülleri için atomik düzeyde bilgi verebilmektedir (Pielak ve ark., 2009). Rekombinant proteinlerin analizleri için NMR, fiziksel koşullar, protein dinamikleri ve konformasyonel değişiklikler hakkında yüksek çözünürlüklü yapısal bilgiler sağlayabilmektedir. NMR küçük ve orta büyüklükteki protein için uygundur. Ancak yine de sinyal örtüşmesi ve hassasiyet sorunları nedeniyle nispeten küçük proteinler için daha kullanışlıdır (Maciejewski ve ark., 2017; Wüthrich, 2003).

6.6 Floresan Spektroskopisi (FS)

Floresan spektroskopisi (FS), genellikle rekombinant proteinlerin incelenmesinde kullanılan bir tekniktir. Bu yöntem, proteinlerde bulunan belirli amino asit kalıntılarının kendilerine özgü floresans özelliklerini kullanmaktadır (Hof ve ark., 2005). Floresans, bir molekülün belirli bir dalga boyundaki ışığı emdiği ve daha uzun dalga boyunda ışık yaydığı durumlarda ortaya çıkmaktadır. Rekombinant proteinler bazı durumlarda floresan amino asitlerle ifade edilmekte, ayrıca rekombinant proteinlerin floresans ölçümleri için doğal floroforlar kullanılabilir. FS' nin invazif olmaması ve kapsamlı numune hazırlığı gerektirmemesi tekniğin avantajlı yönleri olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, konformasyonel değişikliklerin veya etkileşimlerin gerçek zamanlı olarak izlenmesi bu teknik ile sağlanabilmektedir. Bununla birlikte tekniğin uygulanmasının sadece kendisine özgü florofor içeren veya etiketlenmeye uygun olan proteinlerle sınırlı olması tekniğin dezavantajı olarak belirlenmiştir. Ayrıca, var olabilen birden fazla florofor spektrumun yorumlanmasını zorlaştırabilmektedir (Albrecht, 2008).

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile "Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça" projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Adrio, J. L., & Demain, A. L. Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139. Adrio, J. L., & Demain, A. L. (2014). Microbial enzymes: tools for biotechnological processes. *Biomolecules*, 4(1), 117–139. (2014)
- Aguilar, M. I. (2004). Reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 251, 9–22. (2004)

- Albrecht, C. Joseph R. Lakowicz: Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd Edition. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 390(5), 1223-1224. (2008)
- Bivalkar, S., Mehla, R., Sivaram, A., & Patil, N. Vectors: Guide to Gene Delivery Vehicles. 15–42. (2022)
- Block, H., Maertens, B., Spriestersbach, A., Brinker, N., Kubicek, J., Fabis, R., Labahn, J., & Schäfer, F. Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC): A Review. Methods in Enzymology, 463(C), 439–473. (2009)
- Bocian, A., Slawek, S., Jaromin, M., Hus, K. K., Buczkowicz, J., Łysiak, D., Petrilla, V., Petrillova, M., & Legáth, J. Comparison of Methods for Measuring Protein Concentration in Venom Samples. Animals. 10(3), 448. (2020)
- Bornscheuer, U. Engineering the third wave of biocatalysis. Nature, 485(7397), 185–194. (2012)
- Campelo, S. N., Huang, P. H., Buie, C. R., & Davalos, R. V. Recent Advancements in Electroporation Technologies: From Bench to Clinic. (2023)
- Chang, A. Y., Chau, V. W., Landas, J. A., & Yvonne. Preparation of calcium competent Escherichia coli and heat-shock transformation. 1. (2017)
- Chen, R. (2012). Bacterial expression systems for recombinant protein production: E. coli and beyond. Biotechnology Advances, 30(5), 1102–1107. (2012)
- Chen, Y., & Leong, S. S. J. (2010). High productivity refolding of an inclusion body protein using pulsed-fed size exclusion chromatography. Process Biochemistry, 45(9), 1570-1576. (2010)
- Dey, A. CRISPR/Cas genome editing to optimize pharmacologically active plant natural products. Pharmacological Research, 164, 105359. (2021)
- Dumont, J., Euwart, D., Mei, B., Estes, S., & Kshirsagar, R. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives. Critical Reviews in Biotechnology, 36(6), 1110-1122. (2015)
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillaume, D. Ion-exchange chromatography for the characterization of biopharmaceuticals. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 113, 43–55. (2015)
- Fekete, S., Beck, A., Veuthey, J. L., & Guillaume, D. Theory and practice of size exclusion chromatography for the analysis of protein aggregates. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 101, 161–173. (2014)
- Gabrielson, J. P., Brader, M. L., Pekar, A. H., Mathis, K. B., Winter, G., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W. Quantitation of Aggregate Levels in a Recombinant Humanized Monoclonal Antibody Formulation by Size-Exclusion Chromatography, Asymmetrical Flow Field Flow Fractionation, and Sedimentation Velocity. Journal of Pharmaceutical Sciences, 96(2), 268-279. (2007)
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. Methods in Enzymology, 350, 87–96. (2002)
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., & Spier, M. R. An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. Preparative Biochemistry & Biotechnology, 50(7), 635–654. (2020)
- Gómez, S., López-Esteva, M., Fernández, F. J., & Vega, M. C. Protein complex production in alternative prokaryotic hosts. Advances in Experimental Medicine and Biology, 896, 115–133. (2016)
- Harwood, C. R., & Cranenburgh, R. Bacillus protein secretion: an unfolding story. Trends in Microbiology, 16(2), 73-79. (2008)
- Hof, M., Hutterer, R., Fidler, V., & Wolfbeis, O. S. Fluorescence spectroscopy in biology: Advanced methods and their applications to membranes, proteins, DNA, and cells. Springer-Verlag. (2005)
- Hyyryläinen, H. L., Bolhuis, A., Darmon, E., Muukkonen, L., Koski, P., Vitikainen, M., ... & Kontinen, V. P. A novel two-component regulatory system in Bacillus subtilis for the survival of severe secretion stress. Molecular Microbiology, 67(4), 687-702. (2010)
- Jayakrishnan, A., Wan Rosli, W. R., Tahir, A. R. M., Razak, F. S. A., Kee, P. E., Ng, H. S., ... & Liew, K. B. (2024). Evolving Paradigms of Recombinant Protein Production in Pharmaceutical Industry: A Rigorous Review. Sci, 6(1), 9.
- Kalkan, A. K., Palaz, F., Sofija, S., Elmousa, N., Ledezma, Y., Cachat, E., & Rios-Solis, L. Improving recombinant protein production in CHO cells using the CRISPR-Cas system. Biotechnology Advances, 64, 108115. (2023)
- Kim, H., Yoo, S. J., & Kang, H. A. Yeast synthetic biology for the production of recombinant therapeutic proteins. FEMS yeast research, 15(1). (2015)
- Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature, 227(5259), Article 5259. (1970)
- Lestari, C. S. W., & Novientri, G. Advantages of yeast-based recombinant protein technology as vaccine products against infectious diseases. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science (Vol. 913, No. 1, p. 012099). (2021)

- Li F, Vijayasankaran N, Shen AY, Kiss R, Amanullah A. Cell culture processes for monoclonal antibody production. 466-79. (2010)
- Lin, C., Li, L., Feng, J., Zhang, Y., Guo, H., Lin, X., & Li, R. A novel Apt-SERS platform for the determination of cardiac troponin I based on coral-like silver-modified magnetic substrate and BCA method. *Analytica Chimica Acta*, 1225, 340253. (2022)
- Liu, D., Chiao, E. F., & Tian, H. Chemical methods for DNA delivery: an overview. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 245, 3–24. (2004)
- Lozano-Sánchez, J., Borrás-Linares, I., Sass-Kiss, A., & Segura-Carretero, A. Chromatographic Technique: High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *Modern Techniques for Food Authentication*, 459–526. (2018)
- Lu, Q. Plasmid Vectors for Gene Cloning and Expression. *Plasmid Biology*, 543–566. (2014)
- Maciejewski, M. W., Schuyler, A. D., Gryk, M. R., Moraru, I. I., Romero, P. R., Ulrich, E. L., Eghbalnia, H. R., Livny, M., Delaglio, F., & Hoch, J. C. NMRbox: A Resource for Biomolecular NMR Computation. *Biophysical Journal*, 112(8), 1529-1534. (2017)
- Malke, H. J. SAMBROCK, E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Second Edition), Volumes 1, 2 and 3. 1625 S., zahlreiche Abb. und Tab. Cold Spring Harbor 1989. Cold Spring Harbor Laboratory Press. *Journal of Basic Microbiology*, 30(8), 623-623. (1990)
- Martínez, J. L., Liu, L., Petranovic, D., & Nielsen, J. Pharmaceutical protein production by yeast: towards production of human blood proteins by microbial fermentation. *Current opinion in biotechnology*, 23(6), 965-971. (2012)
- Maurer, A. C., & Weitzman, M. D. Adeno-Associated Virus Genome Interactions Important for Vector Production and Transduction. 31(9–10), 499–511. (2020)
- McCue, J. T. Chapter 25 Theory and Use of Hydrophobic Interaction Chromatography in Protein Purification Applications. *Methods in Enzymology*, 463(C), 405–414. (2009)
- Muyrers, J. P., Zhang, Y., & Stewart, A. F. (2001). Techniques: recombinogenic engineering—new options for cloning and manipulating DNA. *Trends in biochemical sciences*, 26(5), 325-331.
- Nabiel, A., Yosua, Y., Sriwidodo, S., & Maksum, I. P. Overview of refolding methods on misfolded recombinant proteins from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*. (2022)
- Nguyen, H. D., Phan, T. T. H., Schumann, W., & Phan, T. T. Development of a strong intracellular expression system for *Bacillus subtilis* by optimizing promoter elements. *Journal of Biotechnology*, 117(2), 263-274. (2005)
- Oliveira, C., & Domingues, L. Guidelines to reach high-quality purified recombinant proteins. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(1), 81-92. (2018)
- Oliveira, C., Aguiar, T. Q., & Domingues, L. Principles of Genetic Engineering. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Foundations of Biotechnology and Bioengineering*, 81–127. (2017)
- Olson, B. J. S. C. Assays for Determination of Protein Concentration. *Current Protocols in Pharmacology*, 73(1), A.3A.1-A.3A.32. (2016)
- Pandey, A. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 31(2), 135–152. (2000)
- Pielak, G. J., Li, C., Miklos, A. C., Schlesinger, A. P., Slade, K. M., Wang, G.-F., & Zigueanu, I. G. Protein nuclear magnetic resonance under physiological conditions. *Biochemistry*, 48(2), 226-234. (2009)
- Pyne, M., Sukhija, K., & Chou, C. P. Genetic Engineering. *Comprehensive Biotechnology*, Second Edition, 2, 81–91. (2011)
- Rader, R. A. Upstream and Downstream Processing of Recombinant Protein Pharmaceuticals: A Review. *Biotechnology Advances*, 37(8), 1260-1265. (2019)
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR). (2014)
- Rozov, S.M., Deineko, E.V. Strategies for Optimizing Recombinant Protein Synthesis in Plant Cells: Classical Approaches and New Directions. *Mol Biol* 53, 157–175 (2019).
- Sha, J., Wang, Y., Wang, J., Liu, W., Tu, Q., Liu, A., Wang, L., & Wang, J. Heat-shock transformation of *Escherichia coli* in nanolitre droplets formed in a capillary-composited microfluidic device. *Analytical Methods*, 3(9), 1988–1994. (2011)
- Shukla, A. A., & Thommes, J. Recent advances in large-scale production of monoclonal antibodies and related proteins. *Trends in Biotechnology*, 28(5), 253-261. (2010)
- Srebalus Barnes, C. A., & Lim, A. Applications of mass spectrometry for the structural characterization of recombinant protein pharmaceuticals. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(3), 370-388. (2007)
- Thakur, R., & Shankar, J. Strategies for gene expression in prokaryotic and eukaryotic system. *Metabolic Engineering for Bioactive Compounds: Strategies and Processes*, 223–247. (2017)

- Tihanyi B, Nyitray L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. *Drug Discov Today Technol.* 38:25-34. (2020)
- Tjalsma, H., Antelmann, H., Jongbloed, J. D., Braun, P. G., Darmon, E., Dorenbos, R., ... & Bron, S. Proteomics of protein secretion by *Bacillus subtilis*: separating the “secrets” of the secretome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 68(2), 207-233. (2004)
- Tripathi, N. K., & Shrivastava, A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7, 496566. (2019)
- Turner, R., Joseph, A., Titchener-Hooker, N., & Bender, J. Manufacturing of Proteins and Antibodies: Chapter Downstream Processing Technologies (pp. 95–114). (2017)
- Urh, M., Simpson, D., & Zhao, K. (2009). Affinity chromatography: general methods. *Methods in enzymology*, 463, 417-438.
- Velten, J., & Schell, J. Selection-expression plasmid vectors for use in genetic transformation of higher plants. *Nucleic Acids Research*, 13(19), 6981–6998. (1985)
- Vieira Gomes, A. M., Souza Carmo, T., Silva Carvalho, L., Mendonça Bahia, F., & Parachin, N. S. Comparison of yeasts as hosts for recombinant protein production. *Microorganisms*, 6(2), 38. (2018)
- Vuppu, S., Mishra, T., Gholap, A. D., Balar, P. C., Gogoi, N. R., & Chavda, V. P. (2024). Expression system and purification process for the vaccine production. In *Advanced Vaccination Technologies for Infectious and Chronic Diseases* (pp. 131-151).
- Walsh, G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnology*, 36(12), 1136-1145. (2018)
- Wang, H., La Russa, M., & Qi, L. S. CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond. *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), 227–264. (2016)
- Westers, L., Westers, H., Quax, W. J., & Roerdink, J. B. Assessment of heat-inducible promoters for use in biotechnological applications. *Journal of Applied Microbiology*, 102(5), 1245-1255. (2006)
- Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J.* 2401-2415. (2020)
- Zhang, X., & Godbey, W. T. Viral vectors for gene delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(4), 515–534. (2006)



BÖLÜM 6

BİYOİNFORMATİK VE OMİK: İLAÇ GELİŞTİRMENİN FARMAKOGENOMİK DEVİRİMİNDE İTİCİ BİR GÜÇ

Nuno S. OSÓRIO^{1*}

*¹Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Medicine,
University of Minho, Braga, Portugal & ICVS/3B's-PT Government
Associate Laboratory, Braga, Portugal*

nosorio@med.uminho.pt

**Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Nuno S. OSÓRIO*



GENETIC
TESTCTOR



1. GİRİŞ

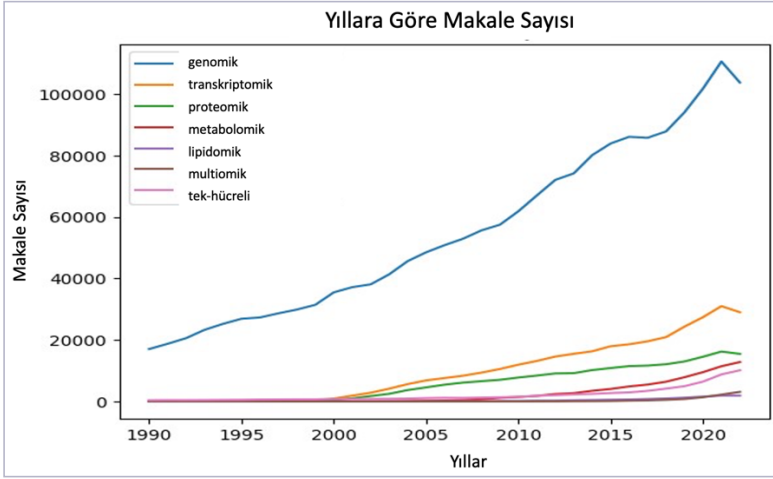
Biyoinformatik ve omik, ilaçların keşfi ve geliştirilmesi de dahil olmak üzere çeşitli uygulamalara büyük ölçekli biyolojik verileri ve hesaplama araçlarını uygulayan disiplinler arası alanlardır. İlaç geliştirme, hedef belirleme, lider molekül optimizasyonu, klinik öncesi testler, klinik deneyler ve düzenleyici onay gibi çeşitli aşamaları içeren karmaşık, maliyetli ve zaman alıcı bir süreçtir. Bu bölüm, ilaç geliştirme için biyoinformatik ve omiklerin temel kavramlarını ve yöntemlerini tanıtmakta ve uygulamalarını ve zorluklarını göstermektedir. İlaç geliştirme için biyoinformatik ve omiklerin kilit yönlerinden biri, bireyler arasındaki genetik farklılıkların aynı ilaca karşı nasıl farklı tepkilere neden olduğunu anlamak ve bu farklılıkları telafi etmek için ilaç tedavileri geliştirmekle ilgilenen alan olan farmakogenomiktir (Pirmohamed, 2001). Farmakogenomik, ilaç yanıtını ve yan etkilerini etkileyen genetik ve çevresel faktörleri belirleyerek ve her hasta için en uygun ilacı ve dozu seçerek ilaç tedavisinin kişiselleştirilmesine yardımcı olabilir (Pirmohamed, 2001). Farmakogenomik, hastalık patogenezi ve ilaç etkisinde rol oynayan proteinlerin işlevini ve ekspresyonunu etkileyen genetik varyasyonları ortaya çıkararak yeni ilaç hedeflerinin ve mekanizmalarının keşfedilmesine de yardımcı olabilir (Pirmohamed, 2001). Farmakogenomik, hedeflerine ulaşmak için genomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik ve diğer omik verilerin yanı sıra biyoinformatik ve hesaplama araçlarının entegrasyonuna dayanan, hızla gelişen bir alandır.

Yakın zamanda yapılan bir araştırmaya göre, yeni bir ilaç geliştirmenin ortalama maliyeti yaklaşık 2.6 milyar dolar ve ortalama süre yaklaşık 10 yıldır (DiMasi ve ark., 2016). Ayrıca, ilaç geliştirmenin başarı oranı çok düşüktür ve klinik araştırmalara giren adayların sadece yaklaşık %10'u pazara ulaşmaktadır (Wong ve ark., 2019). Bu nedenle, ilaç geliştirmenin etkinliğinin ve etkinliğinin artırılmasına büyük ihtiyaç vardır.

İlaç geliştirmedeki önemli bir engel, hastalıkların altında yatan moleküler mekanizmaların, ilaçlar ve hedefleri arasındaki etkileşimlerin ve bireylerin aynı ilaç tedavisine verdiği farklı tepkilerin sınırlı olarak anlaşılmasıdır. Geleneksel olarak, ilaç keşfi, bileşiklerin hastalık modelleri üzerindeki etkilerini, hedeflerini veya etki mekanizmalarını bilmeden test eden bir deneme-yanılma yöntemi olan fenotipik taramaya dayanmasıdır. Bununla birlikte, bu yaklaşım genellikle modellerin mevcudiyeti ve uygunluğu, fenotiplerin karmaşıklığı ve değişkenliği ve aktif bileşiklerin hedeflerini ve mekanizmalarını belirlemenin zorluğu ile sınırlıdır (Swinney, 2013).

Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için, farmakogenomik kavramına dayanan ve biyoinformatik ve Omik veri ve teknolojilerinin kullanımına dayanan yeni bir ilaç geliştirme paradigması ortaya çıkmıştır. Omikler, belirli bir biyolojik sistemdeki genler, transkriptler, proteinler ve metabolitler gibi çeşitli biyolojik moleküllerin kapsamlı ve sistematik analizine izin verir. Biyoinformatik, omik verilerin depolanmasını, işlenmesini, analizini ve entegrasyonunu sağlayan hesaplama yöntemlerini ve araçlarını sağlar. Bu alanlardaki gelişmeler, farmakogenomiğin hedeflerini beslemekte, bireyler arasındaki genetik farklılıkların aynı ilaca karşı nasıl farklı yanıtlara neden olduğunu anlaşılmasını teşvik etmekte ve bu farklılıkları telafi etmek için ilaç tedavileri geliştirmeyi amaçlamaktadır.

Biyomedikal araştırmalarda omiklerin kullanımı son yıllarda önemli bir artış göstermiştir (Şekil 1).



Şekil 1. 1990'dan 2022'ye kadar çeşitli omik alanlarındaki yıllık yayın eğilimleri. Veriler, Biopython kütüphanesinde yer alan Bio.Entrez ve Bio.Medline modülleri kullanılarak PubMed veri tabanından toplanmıştır. Arama, “genomik”, “transkriptomik”, “proteomik”, “metabolomik”, “lipidomik”, “multiomik” ve “tek hücreli” anahtar kelimeler kullanılarak gerçekleştirildi. Her yıl her alanda yayınlanan makale sayısı matplotlib kütüphanesi kullanılarak çizildi. Şeklin etkileşimli bir versiyonu <https://nunosorio.github.io/omics/> adresinde mevcuttur.

Biyoinformatik ve omik analizler ilaç keşfi ve geliştirmesinde çeşitli şekillerde devrim yaratmıştır. İlk olarak, hastalık patogenezi ve ilaç yanıtında rol oynayan anahtar genleri, yolakları ve ağları ortaya çıkararak ilaç geliştirme için yeni ve doğrulanmış hedeflerin belirlenmesine yardımcı olabilirler. İkincisi, büyük kimyasal veya biyolojik moleköl kütüphanelerini omik verilere karşı tarayarak ve özelliklerini ve aktivitelerini tahmin ederek yeni lider molekülleri keşfetmeye ve optimize etmeye yardımcı olabilirler. Üçüncüsü, diğer hastalıklar için onaylanmış veya test edilmiş ilaçlar için yeni kullanımlar ve hedefler bularak mevcut ilaçların yeni endikasyonlar için yeniden kullanılmasına yardımcı olabilirler. Dördüncüsü, ilaç testi ve değerlendirmesi için en uygun modelleri, biyobelirteçleri ve uç noktaları seçerek klinik öncesi ve klinik çalışmaların tasarlanmasına ve yürütülmesine yardımcı olabilirler. Beşincisi, farklı bireylerde ve popülasyonlarda ilaç yanıtını ve yan etkilerini etkileyen genetik ve çevresel faktörleri belirleyerek ilaç tedavisinin kişiselleştirilmesine yardımcı olabilirler (Loging, 2016).

2. İLAÇ GELİŞTİRME İÇİN OMİKLERİN UYGULAMALARI

Biyolojik sistemlerin incelenmesi, genomik, metagenomik, transkriptomik, proteomik, metabolomik, lipidomik ve diğerleri dahil olmak üzere çeşitli omik alanları içerir. Bu alanların her biri sistemin farklı bir yönüne odaklanır: DNA dizileri üzerinde genomik, tüm organizma topluluklarının genetik materyali üzerinde metagenomik, RNA dizileri üzerinde transkriptomik, proteinler üzerinde proteomik, metabolitler üzerinde metabolomikler ve lipitler üzerinde lipidomik uygulamalarını içerir. Bu çeşitli uygulama alanları, biyolojik sistemin çeşitli açılardan kapsamlı bir görünümünü sağlayarak yapısının, işlevinin ve dinamiklerinin daha eksiksiz bir şekilde anlaşılmasını sağlar.

2.1. Genomik

Genomik, bir organizmanın genomunun kapsamlı bir şekilde incelenmesine odaklanan özel bir biyoloji dalıdır. Genom, bir hücre veya organizmada bulunan genlerin veya genetik materyalin tamamıdır. Genomik tüm genomların işlevini ve yapısını bir araya getirmek ve analiz etmek için yüksek verimli DNA dizileme ve biyoinformatik kullanımları yoluyla genomların sentezlenmesini ve analizini içerir.

Genomik analizlerin birincil amacı, organizmaların DNA dizilerinin haritasını çıkararak yaşamın karmaşık genomik mimarisini anlamaktır. Bu yapılarını, işlevlerini ve evrimsel tarihlerini anlamayı içerir. Genomik analizler ayrıca farklı özelliklerin ve hastalıkların genetik temelini ortaya çıkarmaya çalışır. Bu, terapötikler için potansiyel hedeflerin ve biyobelirteçlerin belirlenmesiyle elde edilir.

Genomik analizlerdeki önemli zorluklardan biri, örneklerden elde edilen büyük ölçekli ve karmaşık verilerin işlenmesidir. Bu veriler, tüm genom dizilimi, ekzom dizilimi ve genom çapında ilişkilendirme çalışmaları için gerekli olan verilerin farklı boyutlarını içerebilir. Bu tekniklerin her biri genom üzerinde farklı bir bakış açısı sağlar ve farklı genetik varyasyon türlerini ortaya çıkarabilir.

Araştırmacılar büyük miktarda veriyi anlamlandırmak için çeşitli teknikler ve araçlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında hizalama (benzer DNA dizilerini eşleştirme), birleştirme (orijinal genomu yeniden oluşturmak için dizilenmiş DNA'yı bir araya getirme), açıklama (genlerin konumlarını ve bir genomdaki tüm kodlama bölgelerini belirleme ve bu genlerin ne yaptığını belirleme), varyant çağırma (bir referans diziyeye kıyasla bir genomik dizideki farklılıkları belirleme), filtreleme (düşük kaliteli veya alakasız verileri kaldırma), ve önceliklendirme (hangi varyantların organizma üzerinde etki yaratma olasılığının en yüksek olduğunu belirlemek) yer almaktadır.

Genomik analizler ve araçlar, tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), eklemeler, silmeler, kopya sayısı varyasyonları ve yapısal varyasyonlar gibi genomik varyantların tanımlanmasına ve karakterize edilmesine yardımcı olur. Bu varyantlar daha sonra fonksiyonel etkilerini ve klinik önemlerini anlamak için incelenebilir.

İlaç geliştirme aşamasında, genomik analizler çok önemli bir rol oynamaktadır. Yeni genlerin ve ürünlerinin keşfedilmesini sağlar, genetik mekanizmalar ve hastalık yolları hakkında bilgi sağlar ve farmakogenomik çalışmalarını kolaylaştırır (Tablo 1).

Tablo 1. İlaç geliştirme için genomik uygulamaları.

Uygulama	Açıklama
Yeni genleri ve ürünlerini keşfetmek	Genomik, yeni genleri ve ürünlerini bakteri, mantar, bitki, hayvan vb. gibi çeşitli organizmalardan izole edebilir ve karakterize edebilir, biyolojik aktivitelerini ve özelliklerini değerlendirebilir ve ürünlerini ilaç keşfi ve geliştirme için sentezleyebilir ve optimize edebilir (Challis, 2008; van der Lee ve ark., 2016).
Hastalıkların genetik ve moleküler mekanizmalarını ve yollarını anlama	Genomik, sağlıklı ve hastalıklı bireylerin genomlarının profilini çıkarabilir ve karşılaştırabilir ve bunların kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar vb. gibi çeşitli hastalıklarla nasıl ilişkili olduğunu ortaya çıkarabilir ve yeni ilaç hedefleri ve biyobelirteçler keşfedebilir (Yang ve ark., 2013).
Farmakogenomik ve kişiselleştirilmiş tıbbin incelenmesi	Genomik, genomik varyasyonun ilaçların tepkisini ve emilimi, dağılımı, metabolizması, atılımı ve toksisitesi gibi olumsuz etkilerini nasıl etkilediğini araştırabilir ve bireysel hastalar için ilaçların ve dozajların etkinliğini ve güvenliğini tasarlayabilir ve değerlendirebilir (Chang ve ark., 2021).

2.2. Metagenomik

Metagenomik, mikrobiyal toplulukların bileşimleri, çeşitlilikleri, işlevleri, etkileşimleri, evrimleri vb. gibi genomik profillerini ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan bir genomik dalıdır. Metagenomikler, mikrobiyal toplulukların sağlık ve hastalığındaki rolünü ortaya çıkarabilir ve terapötikler için potansiyel hedefleri ve biyobelirteçleri belirleyebilir.

Metagenomiğin özel zorluklarından biri, toprak, su, hava, gıda veya insan vücudu gibi mikrobiyal örneklerden yüksek verimli ve karmaşık verileri elde etmek ve işlemek ve tek tek mikropları ve genlerini, proteinlerini ve metabolitlerini ayırt etmek ve karakterize etmektir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için sıralama, montaj, açıklama, sınıflandırma, karşılaştırma vb. gibi çeşitli teknikler ve araçlar geliştirilmiştir. Bu teknikler ve araçlar, mikrobiyal taksonları ve bunların işlevsel genlerini, proteinlerini ve metabolitlerini tanımlamaya ve ölçmeye ve aralarındaki filogenetik ve metabolik ilişkileri ve ağları çıkarmaya yardımcı olabilir.

İlaç geliştirme alanında, metagenomik, yeni mikropları ve türevlerini ortaya çıkararak, mikrobiyomun sağlık ve hastalık üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturarak ve mikrobiyal patojenlerin evrimini ve yayılmasını direnç mekanizmalarıyla birlikte inceleyerek çok önemli bir rol oynamaktadır (Tablo 2).

Tablo 2. İlaç geliştirme için metagenomik uygulamaları.

Uygulama	Açıklama
Yeni ilaç hedeflerinin ve biyobelirteçlerin keşfedilmesi	Metagenomikler, yeni mikropları ve genlerini, proteinlerini ve metabolitlerini çeşitli çevresel veya klinik örneklerden izole edebilir ve karakterize edebilir, biyolojik aktivitelerini ve özelliklerini değerlendirebilir ve ürünlerini ilaç keşfi ve geliştirme için sentezleyebilir ve optimize edebilir (Jethwa ve ark., 2023).
Mikrobiyomu ve insan üzerindeki etkisini anlamak Sağlık ve Hastalık	Metagenomikler, sağlıklı ve hastalıklı bireylerin bağırsakları, derileri, ağızları vb. gibi mikrobiyomlarının profilini çıkarabilir ve karşılaştırabilir ve bunların obezite, diyabet, kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı vb. gibi çeşitli hastalıklarla nasıl ilişkili olduklarını ortaya çıkarabilir ve hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için mikrobiyomlarını modüle edebilir (Jorth ve ark., 2014).
Mikrobiyal patojenlerin evrimi, bulaşması ve dirençlerinin incelenmesi	Metagenomik, mikrobiyal patojenlerin ve bakteriler, virüsler, mantarlar vb. gibi direnç genlerinin ve bunların konakçılarının, vektörlerinin ortaya çıkışını ve yayılmasını izleyebilir, enfeksiyon yönetimi ve eradikasyonu için ilaçların ve aşılardan etkinliğini ve güvenliğini tasarlayabilir ve değerlendirebilir (Datta ve ark., 2020).

2.3. Transkriptomik

Transkriptomik, hücreler, dokular, organlar vb. gibi biyolojik örneklerin transkriptomunu (RNA molekülleri) ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan bir genomik dalıdır. Transkriptomik, hücrelerin gen ifadesi modellerini, düzenleyici yollarını ve bunların gelişim, farklılaşma, hastalık, ilaç yanıtı vb. gibi çeşitli faktörlerden nasıl etkilendiğini ortaya çıkarabilir.

Transkriptomik analizlerin özel zorluklarından biri, mRNA, miRNA, lncRNA gibi RNA örneklerinden yüksek verimli ve karmaşık verileri elde etmek ve işlemek ve tek tek transkriptleri ve bunların izoformlarını, işlevlerini, etkileşimlerini ayırt etmek ve karakterize etmektir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için, sıralama, hizalama, niceleme, açıklama, diferansiyel ifade, alternatif birleştirme gibi çeşitli teknikler ve araçlar geliştirilmiştir. Bu teknikler ve araçlar, transkriptleri ve izoformlarını tanımlamaya ve nicelleştirmeye ve işlevlerini ve DNA, proteinler ve metabolitler gibi diğer moleküllerle etkileşimlerini çıkarmaya yardımcı olabilir.

Transkriptomik, hastalıklarla ilişkili yeni ilaç hedeflerini ve biyobelirteçleri belirleyerek, ilaçların hücrel süreçler üzerindeki etkilerini anlayarak ve gen ifadesi ve transkriptom verilerine dayalı kişiselleştirilmiş ilaç stratejileri geliştirerek ilaç geliştirmeye yardımcı olur (Tablo 3).

Tablo 3. İlaç geliştirme için transkriptomik uygulamaları.

Uygulama	Açıklama
Yeni ilaç hedeflerinin ve biyobelirteçlerin keşfedilmesi	Transkriptomik, kanser, kardiyovasküler hastalıklar, nörolojik hastalıklar gibi hastalıklarla ilişkili genleri ve transkriptleri tanımlayabilir, bunların tanı, prognoz ve tedavi için ilaç hedefleri ve biyobelirteçler olarak potansiyellerini değerlendirebilir (Pedrotty ve ark., 2012; Kaczowski ve ark., 2016).
İlaçların etki mekanizmalarını ve hücreler, dokular ve organlar üzerindeki etkilerini anlama	Transkriptomik, ilaç tedavisine yanıt olarak gen ifadesini ve transkriptom profillerindeki değişiklikleri izleyebilir ve ilaçların hücre döngüsü, apoptoz, sinyal iletimi vb. gibi hücrel süreçleri ve yolları nasıl etkilediğini ortaya çıkarabilir (Cui ve ark., 2010).
Geliştirme Yeni Terapötik Stratejiler ve Kişiselleştirilmiş Tıp	Transkriptomik, hastaları ve hastalıkları gen ifadesi ve transkriptom imzalarına göre sınıflandırabilir, ilaçlara yanıtlarını ve dirençlerini tahmin edebilir ve bireyselleştirilmiş tedavi için ilaç dozajını ve kombinasyonunu optimize edebilir (Liu ve ark., 2022).

2.4. Proteomik

Proteomik, biyolojik örneklerin proteom verisini ifade seviyesi, modifikasyonu, etkileşimi, işlevi, yapısı gibi ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan bir omik dalıdır. Proteomik, gelişim, farklılaşma, hastalık ve ilaç yanıtı gibi biyolojik olayların altında yatan moleküler mekanizmaları, yolları ve ağları ortaya çıkarabilir.

Proteomik analizlerin spesifik zorluklarından biri, hücre lizatları, doku ekstraktları veya vücut sıvıları gibi protein örneklerinden yüksek verimli ve karmaşık verileri elde etmek ve işlemek ve binlerce proteini ve bunların fosforilasyon, asetilasyon, ubiquitinasyon vb. gibi translayon sonrası modifikasyonlarını tanımlamak ve ölçmektir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için kütle spektrometresi (MS), sıvı kromatografisi (LC), jel elektroforezi (GE), protein mikrodizileri gibi çeşitli teknikler ve araçlar geliştirilmiştir. Bu teknikler ve araçlar, proteinleri ve modifikasyonlarını ayırmaya, tespit etmeye, tanımlamaya ve nicelleştirmeye ve etkileşimlerini ve işlevlerini çıkarmaya yardımcı olabilir.

Proteomik, yeni ilaç hedeflerini ve biyobelirteçleri tanımlayarak, ilacın etki mekanizmalarını ve hücreler, dokular ve organlar üzerindeki etkisini açıklığa kavuşturarak ve yenilikçi terapötik stratejilerin ve hassas tıbbın geliştirilmesini teşvik ederek ilaç gelişimine katkıda bulunur (Tablo 4).

Tablo 4. İlaç geliştirme için proteomik uygulamaları.

Uygulama	Açıklama
Yeni ilaç hedeflerinin ve biyobelirteçlerin keşfedilmesi	Proteomik, kanser, nörodegeneratif hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar gibi hastalıklarda yer alan veya bunlardan etkilenen proteinleri ve bunların modifikasyonlarını tanımlayabilir ve karakterize edebilir ve bunların tanı, prognoz ve tedavi için ilaç hedefleri ve biyobelirteçler olarak potansiyellerini değerlendirebilir (Lee ve ark., 2011).
İlaçların etki mekanizmalarını ve hücreler, dokular ve organlar üzerindeki etkilerini anlama	Proteomik, ilaç tedavisine yanıt olarak protein ifadesini ve modifikasyonundaki değişiklikleri izleyebilir ve ilaçların hedefleriyle nasıl etkileşime girdiğini ve işlevlerini ve yollarını nasıl modüle ettiğini ortaya çıkarabilir. Proteomik analizler ayrıca ilaçların hedef dışı ve yan etkilerini tanımlayabilir ve farmakokinetiğini, farmakodinamiklerini, toksisitelerini değerlendirebilir (Kennedy, 2002; Sleno ve ark., 2008).
Geliştirme Yeni Terapötik Stratejiler ve Kişiselleştirilmiş Tıp	Proteomik, peptitler, antikolar, nanopartiküller gibi ilaçların ve ilaç dağıtım sistemlerinin tasarımına ve optimizasyonuna rehberlik edebilir ve özgüllüklerini, stabilitelelerini, çözünürlüklerini ve biyoyararlanımlarını artırabilir. Proteomik ayrıca hastaların protein profillerine göre seçilmesini ve sınıflandırılmasını sağlayabilir ve ilaçlara tepkilerini ve dirençlerini tahmin edebilir (Zhang ve ark., 2010).

2.5. Metabolomik ve Lipidomik

Metabolomik ve lipidomik, bileşimleri, işlevleri, etkileşimleri gibi biyolojik örneklerin metabolomunu ve lipidomunu ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan omik dallarıdır. Metabolomik ve lipidomik, gelişim, hastalık ve ilaç yanıtı gibi biyolojik olayların altında yatan moleküler mekanizmaları, yolları ve ağları ortaya çıkarabilir.

Metabolomik ve lipidomiklerin spesifik zorluklarından biri, yapıların ve isimlendirmelerin büyük karmaşıklığı nedeniyle metabolitlerin veya lipitlerin kesin olarak tanımlanmasıdır (Bowen ve ark., 2010). Bu zorluk, çalışma alanlarının, her biri kendine özgü yapı ve özelliklere sahip, kimyasal olarak çeşitli bileşiklerle uğraşması gerçeğinden kaynaklanmaktadır. Bir numunedeki tüm metabolitleri veya lipitleri tanımlamak için evrensel bir yöntem geliştirmeyi zorlaştırır. Ayrıca, bu bileşikler için standartlaştırılmış isimlendirme eksikliği, tanımlamalarına başka bir karmaşıklık katmanı ekler.

Bu zorluğun üstesinden gelmek için, karmaşık bir karışımdaki binlerce metabolit ve lipidi tanımlayabilen ve ölçebilen kütle spektrometresi gibi çeşitli teknikler ve araçlar geliştirilmiştir (Bowen ve ark., 2010).

Metabolomik ve lipidomik, yeni metabolitler ve lipitler keşfederek, bunların sağlık ve hastalık üzerindeki etkilerini anlayarak ve ilaç etkinliği ve toksisitesi için biyobelirteçlerin tanımlanması da dahil olmak üzere ilaçların metabolizma üzerindeki etkilerini inceleyerek ilaç geliştirmeye yardımcı olur (Tablo 5).

Tablo 5. Metabolomik ve lipidomiklerin ilaç geliştirme uygulamaları.

Uygulama	Açıklama
Yeni metabolitler, lipitler ve ürünler keşfetmek	Metabolomik ve lipidomik, yeni metabolitleri ve lipitleri ve bunların genlerini, proteinlerini ve enzimlerini çeşitli biyolojik veya çevresel örneklerden izole edebilir, karakterize edebilir, biyolojik aktivitelerini-özelliklerini değerlendirebilir, ürünlerini ilaç keşfi ve geliştirme için sentezleyebilir ve optimize edebilir (Shyur ve ark., 2008; Stuart ve ark., 2020).
Lipit metabolizmasını ve insan sağlığı ve hastalıkları üzerindeki etkileri anlamak	Metabolomik ve lipidomik, sağlıklı ve hastalıklı bireylerin metabolizmasını, lipid metabolizmasını profileyebilir, karşılaştırabilir ve kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalık gibi çeşitli hastalıklarla nasıl ilişkili olduklarını ortaya çıkarabilir. Ayrıca hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için metabolizmalarını ve lipid metabolizmalarını modüle edebilir (Rasmiena ve ark., 2013; Zhao ve ark., 2014).
İlaçların metabolizma ve lipid metabolizması üzerine etkilerinin ve biyobelirteç olma potansiyelini araştırılması	Metabolomik ve lipidomik, ilaç tedavisine yanıt olarak metabolizma, lipid metabolizmasındaki değişiklikleri izleyebilir ve hedef metabolitleri ve lipitleri ve bunların ilaç yollarını belirleyebilir. Ayrıca ilaç etkinliği ve toksisitesi için biyobelirteçleri keşfedebilir (Armitage ve ark., 2016; Guleria ve ark., 2018).

2.6. Veri Toplama ve Ön İşleme

Veri toplama ve ön işleme, omik biyoinformatik için temeldir ve diferansiyel biyomolekül ifadesini, fonksiyonel zenginleştirme ve fonksiyonel ağ analizleri gibi çok çeşitli müteakip analizlerin başarısını destekler. Bu ilk aşamaların kalitesi, sonraki analizlerin sağlamlığı ve güvenilirliği için çok önemlidir.

Genomik ve transkriptomik dahil olmak üzere omik veriler, tipik olarak, her okuma için dizi ve kalite bilgilerini içeren FASTQ dosyaları üreten yeni nesil dizileme (NGS) platformları kullanılarak oluşturulur (Liu ve ark., 2012). Tersine, proteomik, metabolomik ve lipidomik veriler genellikle bir numunedeki iyonize moleküllerin kütle-yük oranını ölçen bir teknik olan kütle spektrometresi (MS) ile üretilir (Griffiths ve ark., 2009). Veri türünden bağımsız olarak, ön işleme, ham verilerin bir özellik matrisine dönüştürülmesini ve örnekler arasındaki yoğunluklarını içeren veri analizinde önemli bir ilk adımdır. Bu görev, NGS verileri için bcl2fastq ve MS verileri için MaxQuant gibi özel yazılımlar tarafından gerçekleştirilir (Cox ve ark., 2008).

İlaç geliştirme için biyoinformatik ve omik bağlamında, ilk adım, omik verilerin elde edilmesi ve ön işlenmesidir. Bu veriler genellikle, belirli bir biyolojik sistemdeki çeşitli biyolojik moleküllerin bolluğunu veya aktivitesini ölçen yüksek verimli teknolojiler tarafından üretilir. Omik veriler, biyolojik organizasyon düzeyine göre, her biri kendi özelliklerine, avantajlarına ve sınırlamalarına sahip olan ve veri toplama ve ön işleme için özel yöntemler ve araçlar gerektiren farklı türlere ayrılabilir.

Veri toplama, yüksek verimli teknolojiler kullanılarak biyolojik örneklerden omik verilerin üretilmesini içerir. Bu süreç, numune toplama, hazırlama, işleme, ölçme ve saklama gibi çeşitli adımları içerir ve omik verilerin kalitesini ve tekrarlanabilirliğini etkileyebilecek birçok faktörden etkilenebilir. Bu nedenle, veri toplama, omik verilerin güvenilirliğini ve geçerliliğini sağlamak için standart protokolleri ve en iyi uygulamaları takip etmelidir.

Veri ön işleme, ham omik verilerinin daha fazla analiz için uygun bir formata dönüştürülmesini içerir. Bu süreç, veri temizleme, kalite kontrol, normalleştirme, dönüştürme ve açıklama ekleme gibi çeşitli adımları içerir. Veri ön işlemenin genel amacı, omik verilerden gürültüyü, artefaktları, hataları ve önyargıları ortadan kaldırmak ve omik verilerin sinyalinin, doğruluğunu ve karşılaştırılabilirliğini geliştirmektir. Bu adım, omik verilerin kalitesini ve kullanılabilirliğini geliştirmek ve omik verilerin karmaşıklığını ve boyutluluğunu azaltmak için gereklidir.

Veri toplama ve ön işleme, omik biyoinformatiğin temelini oluşturur ve sayısız müteakip analizin başarısını destekleyen temel direkler olarak hizmet eder. Bu analizler, diğerlerinin yanı sıra diferansiyel biyomolekül ifadesi, fonksiyonel zenginleştirme ve fonksiyonel ağ analizlerini kapsayan geniş bir spektrumu kapsar. Bu aşağı akış analizlerinin sağlamlığı ve güvenilirliği, ilk veri toplama ve ön işleme aşamalarının kalitesine ayrılmaz bir şekilde bağlıdır ve omik ve biyoinformatik alanındaki önemli rollerinin altını çizer.

Odak farklılıklarına rağmen, çeşitli omik alanlar, veri toplama ve ön işleme için ortak yöntemleri paylaşır. Basitlik açısından, Tablo 6'da farklı omik veri türlerine göre kategorize edilmiş bazı veri toplama ve ön işleme yöntemleri ve araçları örnekleri listelenmiştir.

Tablo 6. Genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik veriler için veri toplama ve ön işleme yöntemlerinin ve araçlarının özeti.

Omik	Veri toplama	Veri ön işleme
Genom Bilimi	bc12fastq, Torrent Suite gibi NGS platformlarından FASTQ dosyaları.	FASTQC gibi kalite kontrol ve değerlendirme; Trimmomatic (Bolger ve ark., 2014) gibi kırma ve filtreleme; BWA gibi referans genoma hizalama (Li ve ark., 2009 a); SAMtools gibi hizalama dosyalarının manipülasyonu ve dönüştürülmesi (Li ve ark., 2009 b).
Transkriptomik	NGS platformlarından FASTQ dosyaları, örneğin bc12fastq, Torrent Suite vb.	FASTQC gibi kalite kontrol ve değerlendirme; Trimmomatic (Bolger ve ark., 2014) gibi kırma ve filtreleme; STAR gibi referans genom ve transkriptom ile hizalama (Dobin ve ark., 2013); RSEM gibi gen ve transkript ekspresyon seviyelerinin tahmini (Li ve ark., 2011).
Proteomik	msconvert (Chambers ve ark., 2012), ProteoWizard (Kessner ve ark., 2008) gibi kütle spektrometresi platformlarından mzML dosyaları.	MaxQuant (Cox ve ark., 2008) gibi kalite kontrol ve analiz; Perseus gibi aşağı akış analizi (Tyanova ve ark., 2016).
Metabolomik	Veriye Bağlı ve Veriden Bağımsız Edinim modlarının (sırasıyla DDA ve DIA), hedeflenmemiş sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) metabolomik analizlerinde MS2 spektrumlarını elde etmek için yaygın olarak kullanılır (Guan ve ark., 2020); iyon hareketliliği için çarpışma kesiti (CCS) verileri, Orbitrap'ten yüksek çözünürlüklü kütle spektrumları, doğrudan enjeksiyon verileri, veriden bağımsız edinim (DIA)/ tüm iyon parçalanması (AIF), görüntüleme MS ve çok boyutlu kromatografi gibi daha yeni teknolojiler (Sud ve ark., 2016).	XCMS, MZmine, MAVEN ve MetaboAnalyst gibi birçok ücretsiz veri ön işleme aracının yanı sıra ticari yazılımlar (Zhang ve ark., 2015); Giderek artan sayıda kullanıcı, LC-MS veri işleme için iş akışı tabanlı bir yaklaşım ile işlem yürütür, örneğin XCMS Online, Metabolomic Analysis and Visualization ENgine (MAVEN), MZmine2, MetaboAnalyst ve metabolomiklere özel Galaxy iş akışları—Galaxy-M ve Workflow4metabolomics (Misra ve ark., 2016).

3. BİYİNFORMATİK VE OMİK ÇALIŞMALARDAKİ BAŞLICA ZORLUKLAR

Biyoinformatik ve omik, veri kalitesi, verilerin büyüklüğü veya boyutluluğu, sonuçların tekrarlanabilirliği, yöntemlerin standardizasyonu ve bu tür verilerin işlenmesiyle ilgili etik ve gizlilik endişeleri gibi hususları kapsayan çok sayıda önemli zorlukla karşı karşıyadır. Bu zorluklar, alanın karmaşıklığının altını çizmekte ve biyoinformatik ve omik araştırmalarının sürekli ilerlemesini ve başarısını sağlamak için sağlam, yenilikçi çözümlere olan ihtiyacı vurgulamaktadır.

3.1. Veri Kalite

Veri ön işleme, gürültüyü azaltmak ve veri kalitesini artırmak için verilerin filtrelenmesini, dönüştürülmesini ve ölçeklendirilmesini içerir. Ancak bu süreç, eksik değerler, toplu etkiler ve birden fazla test düzeltmesi ihtiyacı gibi sorunlar nedeniyle zorlu olabilir. Eksik değerler, teknik veya biyolojik nedenlerden dolayı bazı örneklerde bir özellik tespit edilmediğinde veya niceliksel olarak belirlenmediğinde ortaya çıkan omik verilerde yaygın bir sorundur. Eksik değerler, diferansiyel ifade, kümeleme ve korelasyon gibi verilerin aşağı akış analizini ve yorumlanmasını etkileyebilir. Bu nedenle, eksik değerlerin ya makul değerlerle ilişkilendirilerek ya da analizden çıkarılarak uygun şekilde ele alınması önemlidir. Verilerde eksik değer isnadı için k-en yakın komşu analizleri (k-nearest neighbors) (Troyanskaya ve ark., 2001), rastgele orman (random forest) (Lebedev ve ark., 2014) ve Bayesian temel bileşen analizi (PCA) (Fang ve ark., 2018) gibi çeşitli yöntemler ve araçlar geliştirilmiştir.

Normalleştirme, cihaz ayarları, numune hazırlama ve çalışma sırası gibi ilgilenilen biyolojik koşullarla ilgili olmayan verilerdeki sistematik önyargıları ve varyasyonları ortadan kaldırmayı amaçlayan omik veri analizinde bir diğer önemli adımdır. Normalleştirme, verilerin karşılaştırılabilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artırabilir ve aşağı akış analizinde yanlış keşif oranını azaltabilir. Verilerin normalleştirilmesi için medyan (Bolstad ve ark., 2003), niceliksel (Bolstad ve ark., 2003), döngüsel kayıplar (Yang, 2002) ve vsn (Huber ve ark., 2002) gibi çeşitli yöntemler ve araçlar geliştirilmiştir.

Toplu etkiler, veriler farklı günler, operatörler veya araçlar gibi farklı gruplar veya gruplar halinde toplandığında ortaya çıkan omik verilerindeki istenmeyen varyasyonların başka bir kaynağıdır. Toplu etkiler biyolojik sinyali karıştırabilir ve sahte sonuçlara yol açabilir. Bu nedenle, deneysel tasarımı ayarlayarak veya istatistiksel yöntemler uygulayarak verilerdeki toplu etkileri belirlemek ve düzeltmek önemlidir. ComBat (Johnson ve ark., 2007), RUV (Gagnon-Bartsch ve ark., 2013) ve limma (Ritchie ve ark., 2015) gibi omik verilerde toplu etki düzeltmesi için çeşitli yöntemler ve araçlar geliştirilmiştir.

Çoklu test, omik veri analizinde, binlerce özelliğin diferansiyel ifadesi için test yapmak gibi aynı veriler üzerinde birden fazla istatistiksel test gerçekleştirirken ortaya çıkan başka bir zorluktur. Çoklu testler, yanlış pozitiflik olasılığını artırabilir ve tip I hata oranını şişirebilir. Bu nedenle, veri analizinde, reddedilen hipotezler arasında yanlış pozitiflerin beklenen oranı olan yanlış keşif oranını (FDR) kontrol etmek önemlidir. Verilerde FDR kontrolü için Benjamini-Hochberg (Benjamini ve ark., 1995) ve qvalue (Storey, 2003) gibi çeşitli yöntemler ve araçlar geliştirilmiştir.

Bu zorluklara rağmen, farklı omik alanlarda ortak yöntemlerin kullanılması, biyolojik sistemlerin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını kolaylaştırır.

3.2. Veri Hacmi ve Boyut

Biyoinformatik ve omik analizlerdeki en büyük zorluklardan biri, verilerin yüksek hacmi ve boyutluluğu olmasıdır ki bu da veri analizi ve yorumlanması için hesaplamalı ve istatistiksel zorluklar doğurabilir. Bu durum, gürültü, fazlalık, seyreklik, aşırı öğrenme gibi birçok özellik veya değişkene sahip verilerle uğraşırken ortaya çıkan sorunları ifade eden boyutun fazlalığı (Bellman, 1961) olarak bilinir. Boyut fazlalığının üstesinden gelmek için, boyutun azaltılması gibi yüksek veri hacmi ve boyut ile başa çıkmak için çeşitli yöntemler ve araçlar geliştirilmiştir.

Boyut azaltma, verilerin temel bilgilerini ve yapısını korurken, omik verilerin özelliklerinin veya değişkenlerinin sayısını azaltmayı amaçlayan bir makine öğrenimi dalıdır. Boyut azaltılması, veri görselleştirme ve yorumlamayı geliştirebilir ve veri analizi ve modellemenin performansını ve verimliliğini artırabilir.

Boyut azaltmanın zorluklarından biri, indirgenmiş verilerin karmaşıklığı ve doğruluğu arasındaki en uygun dengeyi bulmak ve önemli veya ilgili bilgilerin kaybolmasını ve gürültü veya yapaylıkların ortaya çıkmasını önlemektir. Bu zorluğun üstesinden gelmek için doğrusal, doğrusal olmayan, denetimli, denetimsiz gibi çeşitli yöntemler ve algoritmalar geliştirilmiştir. Bu yöntemler ve algoritmalar, omik verilerin içsel ve gizli boyutlarını ve faktörlerini belirlemeye ve verileri daha düşük boyutlu dosyaları yansıtmaya yardımcı olabilir.

Omik veriler için boyutsallık azaltma yöntemlerinin bazı örnekleri Tablo 7’de listelenmiştir.

3.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, farklı araştırmacılar tarafından aynı veri ve yöntemlerden, aynı sonuçların elde edilebilmesidir. Özellikle karmaşık veri ve algoritmaların söz konusu olduğu biyoinformatik ve omik alanlarında bilimsel araştırmaların geçerliliği ve güvenilirliği için gereklidir. Bununla birlikte, tekrarlanabilirlik genellikle veri kullanılabilirliği eksikliği, yetersiz dokümantasyon, tutarsız yazılım sürümleri ve insan hataları gibi çeşitli faktörler tarafından engellenir (Peng, 2011).

Tablo 7. Omik veriler için boyutsallık azaltma uygulamalarından bazıları.

Uygulama	Açıklama
Görselleştirme ve keşif	Boyutluluğun azaltılması, omik verileri iki veya üç boyut gibi daha düşük boyutlu bir alana yansıtılabilir ve kümeler, aykırı değerler, eğilimler gibi verilerin yapısını ve çeşitliliğini ortaya çıkarabilir. Örneğin, temel bileşen analizi (PCA) (Pearson, 1901), t-dağılımlı stokastik komşu gömme (t-SNE) (Maaten ve ark., 2008) ve tekdüze manifold yaklaşımı ve projeksiyonu (UMAP) (McInnes ve ark., 2018) omik verileri görselleştirmek ve keşfetmek için popüler yöntemlerdir.
Gürültü Redüksiyon ve Özellik Seçimi	Boyutsallığın azaltılması, omik verilerinin gürültüsünü ve fazlalığını filtreleyebilir ve en bilgilendirici ve ayırt edici özellikleri veya değişkenleri koruyabilir. Örneğin, tekil değer ayrıştırması (SVD) (Eckart ve ark., 1936), bağımsız bileşen analizi (ICA) (Hyvärinen ve ark., 2000) ve seyrek kodlama (Olshausen ve ark., 1997), omik verileri, verilerdeki ana varyasyon kaynaklarını yakalayan bir dizi temel vektöre veya bileşene ayrıştırabilen yöntemlerdir.
Veri entegrasyonu ve karşılaştırma	Boyutsallığın azaltılması, farklı kaynaklardan, platformlardan veya modalitelerden gelen omik verileri hizalayabilir ve birleştirebilir ve bunlar arasındaki ortak ve benzersiz özellikleri, kalıpları ve ilişkileri belirleyebilir. Örneğin, kanonik korelasyon analizi (CCA) (HOTELLING, 1936), çoklu atalet katsayısı analizi (MCIA) (Culhane ve ark., 2005) ve çoklu görünüm öğrenimi (Wang ve ark., 2014), genomik, transkriptomik, proteomik gibi farklı türlerdeki omik verileri entegre edebilen ve karşılaştırabilen yöntemlerdir.

Biyoinformatik ve omik analizlerin tekrarlanabilirliğini sağlamak ve geliştirmek için çeşitli çözümler önerilmiş ve uygulanmıştır. Bu çözümlerden biri, ham ve işlenmiş verilerin GEO (Barrett ve ark., 2011), SRA (Leinonen ve ark., 2011), EGA (Lappalainen ve ark., 2015) ve OpenAIRE.eu. Bu, MIAME (Brazma ve ark., 2001) ve FAIR (Wilkinson ve ark., 2016) gibi ilkelere bağlı kalarak uygun meta veriler ve tanımlayıcılarla yapıldığında oldukça etkilidir.

Diğer bir çözüm, analiz için kullanılan kaynak kodun ve komut dosyalarının GitHub (Blischak ve ark., 2016), Bitbucket.org, Zenodo.org veya OSF.io gibi çevrimiçi platformlar aracılığıyla herkese açık hale getirildiği kod paylaşımıdır. Buna, README, LİSANS ve DOI'ye ve ilgili tüm belgelere bağlantılar dahil olmak üzere uygun belgeler ve lisanslama eşlik etmelidir.

İş akışı yönetimi, analiz hattını otomatikleştirmek ve standartlaştırmak için çeşitli araçlar ve çerçeveler kullanan bir çözüm olarak hizmet eder. Bu araçların dikkate değer örnekleri Snakemake (Köster ve ark., 2012), Nextflow (Di Tommaso ve ark., 2017) ve Galaxy'dir (Afgan ve ark., 2018). Bu araçlar, Conda.io, Docker.com ve Singularity (Kurtzer ve ark., 2017) gibi sağlam yapılandırma ve bağımlılık yönetim sistemleriyle birleştiğinde, süreci kolaylaştırabilir ve veri analizi iş akışlarının verimliliğini artırabilir.

Biyoinformatik ve omik araştırmacıları bu çözümleri benimseyerek analizlerinin şeffaflığını, tekrarlanabilirliğini ve yeniden kullanılabilirliğini artırabilir. Bu da bulgularının doğrulanmasını, onaylanmasını ve yayılmasını kolaylaştırır.

3.4. Veri Standardizasyonu

Biyoinformatik ve omik analizlerde en büyük zorluklardan biri, karmaşık veri nesnelere standardizasyonunun olmamasıdır. Bunlar, Python veya R programlama dillerini kullanarak büyük omik verileri depolayabilen ve düzenleyebilen veri yapıları ve biçimleridir. Karmaşık Python ve R nesnelere, verimli ve ölçeklenebilir veri işlemeyi, analizini ve görselleştirmeyi kolaylaştırabilir ve farklı araçlar ve platformlar arasında birlikte çalışabilirlik ve uyumluluk sağlayabilir (Hu ve ark., 2022).

Bununla birlikte, standardizasyon eksikliği, veri entegrasyonu, karşılaştırma ve tekrarlanabilirlikte zorluklara yol açabilir. Farklı araçlar ve platformlar farklı veri yapıları ve biçimleri kullanabilir, bu da farklı kaynaklardan gelen verileri birleştirmeyi veya karşılaştırmayı zorlaştırabilir. Ayrıca, sonuçlar kullanılan belirli veri yapılarına ve formatlarına bağlı olabileceğinden, standardizasyon eksikliği de veri analizinin tekrarlanabilirliğini engelleyebilir.

Bu zorluğun üstesinden gelmek için, omik veriler için standartlaştırılmış veri nesnelere geliştirmek için çeşitli çabalar sarf edilmiştir. Örneğin, Bioconductor projesi, omik verileri R’de depolamak ve manipüle etmek için ExpressionSet, SummarizedExperiment ve MultiAssayExperiment gibi bir dizi S4 sınıfı geliştirmiştir (Chervitz ve ark., 2011). Benzer şekilde, Python’daki pandas kütüphanesi, gelişmiş veri işleme araçlarına örnek olarak tablo verilerini işlemek için DataFrame (Yudin, 2021) veya xarray kütüphanesini (Hoyer ve ark., 2017) sağlamaktadır.

Tüm bu çabalara rağmen, biyoinformatikte karmaşık veri nesnelere standardizasyonu hala devam eden bir çalışmadır. Standartlaştırılmış veri nesnelere kullanımını geliştirmek ve teşvik etmek ve bunların mevcut ve gelecekteki araçlar ve platformlarla uyumluluğunu ve birlikte çalışabilirliğini sağlamak için daha fazla çabaya ihtiyaç vardır (Katayama ve ark., 2010). Omik veriler için karmaşık nesne örneklerinden bazıları Tablo 8’de listelenmiştir.

Tablo 8. Omik verilerde yüksek oranda kullanılan karmaşık veri nesnelere.

Veri Nesnesi	Açıklama
Xarray dizisi	Etiketli çok boyutlu dizilerle çalışmayı basit, verimli ve eğlenceli hale getiren bir Python paketi! Xarray, daha sezgisel, daha öznlü ve hataya daha az açık bir geliştirici deneyimi sağlayan ham NumPy benzeri dizilerin üzerine boyutlar, koordinatlar ve öznitelikler biçiminde etiketler sunar.
netCDF	Ağ Ortak Veri Formu (netCDF), dizi yönelimli bilimsel verilerin oluşturulmasını, erişimini ve paylaşımını destekleyen bir dizi yazılım kütüphanesi ve makineden bağımsız veri biçimidir. Atmosferik ve oşinografik topluluklarda sıcaklık, basınç, rüzgar hızı ve dalga yüksekliği gibi değişkenleri depolamak için yaygın olarak kullanılır.
HDF5 Serisi	Hiyerarşik Veri Biçimi (HDF5), büyük miktarda sayısal veriyi depolamak ve düzenlemek için tasarlanmış bir dizi dosya belirtimidir. Yüksek performanslı bilgi işlem alanında yaygın olarak kullanılan, karmaşık veri koleksiyonlarını depolamak için kendi kendini tanımlayan bir dosya biçimidir.
Zarr	Zarr, paralel bilgi işleminde kullanılmak üzere tasarlanmış, parçalanmış, sıkıştırılmış, N boyutlu dizilerin uygulanmasını sağlayan bir Python paketidir. Bilimsel veri işleme ve makine öğreniminde sıklıkla karşılaşılan büyük çok boyutlu veri dizilerinin depolanması için çok uygundur.

3.5. Etik ve Gizlilik Zorlukları

Biyoinformatik ve omik analizlerdeki en büyük zorluklardan biri, verilerin etiğini ve gizliliğini sağlamaktır. Bu alanlar genellikle bireyleri benzersiz bir şekilde tanımlayabilen genomik veriler gibi hassas bilgilerle ilgilenir. Bu nedenle, bu tür verilerin etik olarak ele alınması ve gizliliğinin sağlanması çok önemlidir (Heeney ve ark., 2011).

Bununla birlikte, standardizasyon ve açık yönergelerin olmaması, etik ve mahremiyetin sağlanmasında zorluklara yol açabilir. Farklı araçlar, platformlar ve araştırmacılar, etik kullanımı ve yeterli gizlilik korumasını neyin oluşturduğu konusunda farklı yorumlara sahip olabilir. Bu, tüm verilerin etik olarak ele alınmasını ve bireylerin mahremiyetinin korunmasını sağlamayı zorlaştırabilir (Mittelstadt ve ark., 2016).

Ayrıca, bu alanların hızlı ilerlemesi ve karmaşıklığı sorunu daha da karmaşık hale getirebilir. Yeni teknolojiler ve yöntemler, daha önce dikkate alınmayan yeni etik ve gizlilik sorunlarına yol açabilir. Bu nedenle, etik yönergeleri ve gizlilik koruma önlemlerini sürekli olarak güncellemek ve iyileştirmek önemlidir (Greenbaum ve ark., 2011).

Bu zorluğun üstesinden gelmek için, biyoinformatik ve omik analizlerde etik ve mahremiyet için standartlaştırılmış kılavuzlar geliştirmek için çeşitli çabalar sarf edilmiştir. Bu yönergeler, verilerin etik olarak nasıl ele alınacağı ve gizliliğinin nasıl sağlanacağı konusunda net talimatlar sağlar. Ancak, bu yönergelerin uygulanması zor olabilir ve sürekli çaba ve dikkat gerektirir.

4. GELECEKDEKİ YÖNELİMLER

Bu bölümde, tek hücre omik analizi, multiomik analizler, karmaşık veri nesnelerinin standardizasyonu, boyutsallığın azaltılması ve metagenomik gibi ilaç geliştirme için biyoinformatik ve omik analizlerin bazı gelişmiş ve gelişmekte olan uygulamaları hakkında bilgi sunulacaktır.

4.1. Tek Hücre ve Uzamsal Omik

Tek hücre omik analizler, DNA, RNA, proteinler, metabolitler gibi tek tek hücrelerin moleküler profillerini ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan bir omik dalıdır. Tek hücre omik analizler, gen ifadesi, epigenetik modifikasyonlar, sinyal yolları, metabolik aktiviteler gibi hücre popülasyonlarının heterojenliğini ve dinamikleri ortaya çıkarabilir. Tek hücre omik analizler, kök hücreler, kanser hücreleri, bağışıklık hücreleri gibi nadir veya yeni hücre tiplerini ve bunların çeşitli biyolojik süreçler ve hastalıklardaki işlevsel rollerini ve etkileşimlerini tanımlayabilir (Chappell ve ark., 2018).

Tek hücre omik analizler için en yaygın kullanılan tekniklerden biri, tek tek hücrelerin transkriptomunu (RNA molekülleri) ölçebilen tek hücre RNA dizilemesidir (scRNAseq). scRNAseq, hücrelerin gen ifadesi modellerini ve düzenleyici ağlarını yakalayabilir ve farklılaşma yörüngelerini ve gelişim aşamalarını ortaya çıkarabilir. scRNAseq, tek tek hücrelerin kromatin erişilebilirliğini (DNA bölgelerinin açıklık derecesi) ölçebilen tek hücreli ATAC-seq veya proteom verisini ölçebilen tek hücre proteom analizleri gibi diğer tekniklerle de birleştirilebilir. Bu teknikler tamamlayıcı bilgiler sağlayabilir ve Tek hücre omik analiz verilerinin daha kapsamlı ve entegre bir analizini sağlayabilir.

İlaç geliştirme için tek hücreli omik analiz uygulamalarından bazıları şunlardır:

- Kanser, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmün hastalıklar gibi hastalıkların teşhisi, prognozu ve tedavisi için yeni hücre tiplerinin ve biyobelirteçlerin keşfedilmesi. Örneğin, scRNA-seq, tümör hücrelerinin ve mikro çevrelerinin alt tiplerini ve heterojenliğini tanımlayabilir ve moleküler imzalarını ve ilaç direnç mekanizmalarını ortaya çıkarabilir (Ding ve ark., 2020; Zhang ve ark., 2021).
- İlaçların etki mekanizmalarını ve farmakokinetik, farmakodinamik, toksisite gibi hücreler, dokular ve organlar üzerindeki etkilerini anlamak. Örneğin, scRNA-seq, ilaç tedavisine yanıt olarak gen ifadesini ve hücre durumlarındaki değişiklikleri izleyebilir ve ilaçların hedef hücrelerini ve yollarını belirleyebilir (Gawel ve ark., 2019).
- Hücre bazlı tedaviler, gen terapileri, immünoterapiler gibi yeni terapötik stratejiler ve kişiselleştirilmiş tıp yöntemlerini geliştirmek örnek olarak sunulabilir. Örneğin, scRNA-seq, transplantasyon, gen düzenleme veya bağışıklık modülasyonu için hücrelerin seçimine ve mühendisliğine rehberlik edebilir ve ilaç uygulamasının dozajını ve zamanlamasını optimize edebilir (Ding ve ark., 2020).

4.2. Entegre Multiomik Analiz

Multiomik, biyolojik örneklerin genomları, epigenom, transkriptom, proteom, metabolom gibi çok sayıda moleküler profillerini ölçmeyi ve analiz etmeyi amaçlayan bir omik dalıdır. Multiomik, birden fazla biyolojik katmanın karmaşıklığını ve etkileşimlerini yakalayabilir ve bunların genetik ve çevresel faktörlerden nasıl etkilendiğini ve hücrelerin, dokuların ve organizmaların fenotiplerini ve işlevlerini nasıl etkilediğini ortaya çıkarabilir.

Multiomik analizlerin zorluklarından biri, dizileme, kütle spektrometresi, mikrodiziler gibi farklı omik platformlarından ve kaynaklardan gelen heterojen ve yüksek boyutlu verileri entegre etmektir. Bu bağlamda, Python'un MOFA (Multi-Omics Factor Analysis), multiomik veri entegrasyonu için güçlü bir araç olarak öne çıkıyor. MOFA, multi-omik veri setlerinin tamamen denetimsiz bir şekilde entegrasyonu için genel bir çerçevedir. Faktörler olarak temsil edilen verilerdeki ana değişkenlik kaynaklarını tanımlar. Her faktör, birden çok omik veri türü arasında paylaşılan belirli bir modeli yakalar. Bu, farklı biyolojik ve teknik değişkenlik kaynaklarının çözülmesine izin vererek, incelenen sistemin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlar (Argelaguet ve ark., 2018). Multiomik entegrasyonun zorluklarını daha fazla ele almak için, veri normalleştirme, dönüşüm, atama, hizalama, füzyon, korelasyon, kümeleme, sınıflandırma, regresyon, ağ çıkarımı gibi çeşitli hesaplama yöntemleri uygulanabilir. Bu yöntemler ve araçlar, farklı omik veriler arasındaki ortak ve benzersiz özellikleri, kalıpları ve ilişkileri tanımlamaya ve farklı biyolojik katmanlar arasındaki nedensel ve düzenleyici ilişkileri çıkarmaya yardımcı olabilir.

4.3. Bütünsel Biyoinformatik

Bütünsel analiz, biyoinformatik ve omik verilerin analizini gerçekleştirmek ve geliştirmek için diğer araştırmacılarla birlikte çalışma sürecidir. Özellikle ilaç geliştirme ve farmakogenomik gibi disiplinler arası ve bütünleştirici yaklaşımların gerekli olduğu alanlarda bilimsel araştırmaların ilerlemesi ve yeniliği için faydalıdır. Bununla birlikte, bütünsel analiz genellikle veri heterojenliği,

yöntem çeşitliliği, iletişim engelleri ve koordinasyon güçlükleri gibi çeşitli faktörler tarafından sorgulanır (Schmitt ve ark., 2011).

Biyoinformatik ve omik verilerin işbirlikçi analizini kolaylaştırmak ve geliştirmek amacıyla çok sayıda çözüm önerilmiş ve uygulanmıştır. Böyle bir çözüm, Git, Subversion (SVN) ve Mercurial gibi yazılım geliştirmede yaygın olarak kullanılan sürüm kontrol araçlarının ve sistemlerinin kullanılmasıdır. Bu sistemler, özellik, sürüm ve düzeltme dalları gibi uygun dallanma ve birleştirme stratejilerini kullanarak verilerde ve kodda yapılan değişiklikleri izler ve yönetir.

Başka bir yaklaşım, AWS, Google Cloud veya Azure gibi hizmetleri ve platformları kullanan bulut bilişimdir. Bunlar, depolama, işleme ve ağ iletişimi dahil olmak üzere bilgi işlem kaynaklarına isteğe bağlı erişim sağlar. Ayrıca şifreleme, kimlik doğrulama ve yük dengeleme gibi uygun güvenlik ve ölçeklenebilirlik özelliklerini de sağlarlar. Biyoinformatik araştırma ve veri bilimi bağlamında, genellikle “Colab” olarak adlandırılan Google Colaboratory, ortak çalışmaya dayalı analiz için popüler bir araç olarak ortaya çıkmıştır. Colab, Jupyter Notebooks tabanlı bir bulut hizmetidir ve kullanıcıların tarayıcı aracılığıyla Python kodu yazmasına ve yürütmesine olanak tanıyan etkileşimli bir ortam sağlar. Colab, GPU’lar ve TPU’lar dahil olmak üzere bilgi işlem kaynaklarına erişim sağlayan ücretsiz bir araştırma ve eğitim sürümüne sahiptir ve bu da onu biyoinformatik ve omik veri analizi için değerli bir araç haline getirir.

Python ve R kullanılarak geliştirilen özel yapım web uygulamaları da biyoinformatik ve omik analizler alanında uygulanabilir bir çözüm olarak ortaya çıkmıştır. Rstudio Shiny ve Streamlit gibi araçlar ve çerçeveler, bu etkileşimli uygulamaların oluşturulmasını ve paylaşılmasını kolaylaştırmıştır. Bu uygulamalar, streamlit.io veya shinyapps.io gibi özel bulut sunucularında rahatlıkla dağıtılabilir. Dikkat çekici bir şekilde, Shinylive gibi son teknolojik gelişmeler, bu uygulamaları statik sunucularda dağıtmayı mümkün kılmıştır ve böylece sunucu tarafında R veya Python çalışma ihtiyacını ortadan kaldırmıştır (Jia ve ark., 2022). Bu gelişme, biyoinformatikçilerin uygulamalarını dağıtma ve paylaşma esnekliğini önemli ölçüde artırdı. Ancak, Shinylive’in gelişiminin bu erken aşamasında, uygulamaların yüklenmesi önemli miktarda zaman alabilir ve tüm modüller uyumlu değildir. Bu araçların nasıl kullanıldığına dair bir örnek, burada bulunabilecek Şekil 1’in etkileşimli versiyonudur. Özetle, bu uygulamalar, widget’lar, çizimler ve tablolar gibi temel kullanıcı arayüzü ve kullanıcı deneyimi tasarım öğelerini içerir.

Biyoinformatik ve omik araştırmacıları bu çözümleri benimseyerek analizlerinin iş birliğini, iletişimini ve entegrasyonunu geliştirebilirler. Bu da yeni bilgi ve çözümlerin keşfedilmesini ve geliştirilmesini hızlandırır.

5. SONUÇ

Biyoinformatik ve omik analizler, ilaç keşfi ve iyileştirilmesi için yeni içgörüler ve çözümler sunarak ilaç geliştirmede devrim yaratmaktadır. Büyük ölçekli biyolojik verilerin ve hesaplama araçlarının entegrasyonu, yeni hedefler, biyobelirteçler ve ilaçlar için araştırma yapılmasını ve hastalık mekanizmalarının ve ilaç etkilerinin aydınlatılmasını sağlamaktadır.

Bu alandaki en önemli çözümlerden biri, yeni ve sağlam hesaplama araçlarının ve tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasıdır. Bunlar, büyük ölçekli ve heterojen omik verileri analiz etmek ve entegre etmek için kullanılan makine öğrenimi, yapay zeka, ağ analizi ve veri madenciliğini

içerir. Bir diğer önemli husus, veri kalitesinin, tekrarlanabilirliğin ve paylaşım protokollerinin ve platformlarının kurulması ve standardizasyonudur. Bu, alanın ilerlemesi için çok önemli olan omik verilerinin ve sonuçlarının güvenilirliğini ve erişilebilirliğini sağlar. Ayrıca, omik veri tabanlarının ve kaynaklarının geliştirilmesi ve genişletilmesi, genler, proteinler, metabolitler, yollar, hastalıklar, ilaçlar ve etkileşimler hakkında kapsamlı ve güncel bilgiler sağlar. Bu bilgi zenginliği, alandaki araştırmacılar ve uygulayıcılar için paha biçilmezdir.

Biyologlar, kimyagerler, genetikçiler, istatistikçiler ve bilgisayar bilimcileri gibi farklı disiplinlerden uzmanlar arasında iş birliği ve iletişim de önemlidir. Bu, disiplinler arası ve uluslararası araştırma ve yeniliği teşvik ederek ilaç geliştirmede atılımlara yol açar.

Biyoinformatik ve omik analizler ilaç geliştirme için etik ve bilimsel etkileri göz ardı edilemez. Ayrıca, veri gizliliğinin korunması, veri mülkiyetinin düzenlenmesi ve veri eşitliği ve adaletinin teşvik edilmesi gibi konuların ele alınması gerekmektedir.

Farmakogenomik alanında, biyoinformatik ve omik analizler başlıca etkilidir. Genlerin bir kişinin ilaçlara tepkisini nasıl etkilediğinin araştırılması sağlayarak kişiselleştirilmiş tıbbın geliştirilmesine yol açarlar. Bu durum ilaç geliştirme, sağlık ve hastalık anlayışımızda devrim yaratma potansiyeline sahiptir.

Sonuç olarak, ilaç geliştirme için biyoinformatik ve omik analizler hızla gelişen ve gelecek vaat eden bir alandır. Biyoinformatik analizlerde çok sayıda zorluk olmasına rağmen, veri elde edilmesi ve yorumlanmasında çok sayıda fırsat sunar. Biyolojik verilerin ve hesaplama araçlarının gücünden yararlanan biyoinformatik ve omik analizler kişiselleştirilmiş tıpta yeni bir çağın yolunu açabilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile "Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça" projesi tarafından desteklenmiştir.

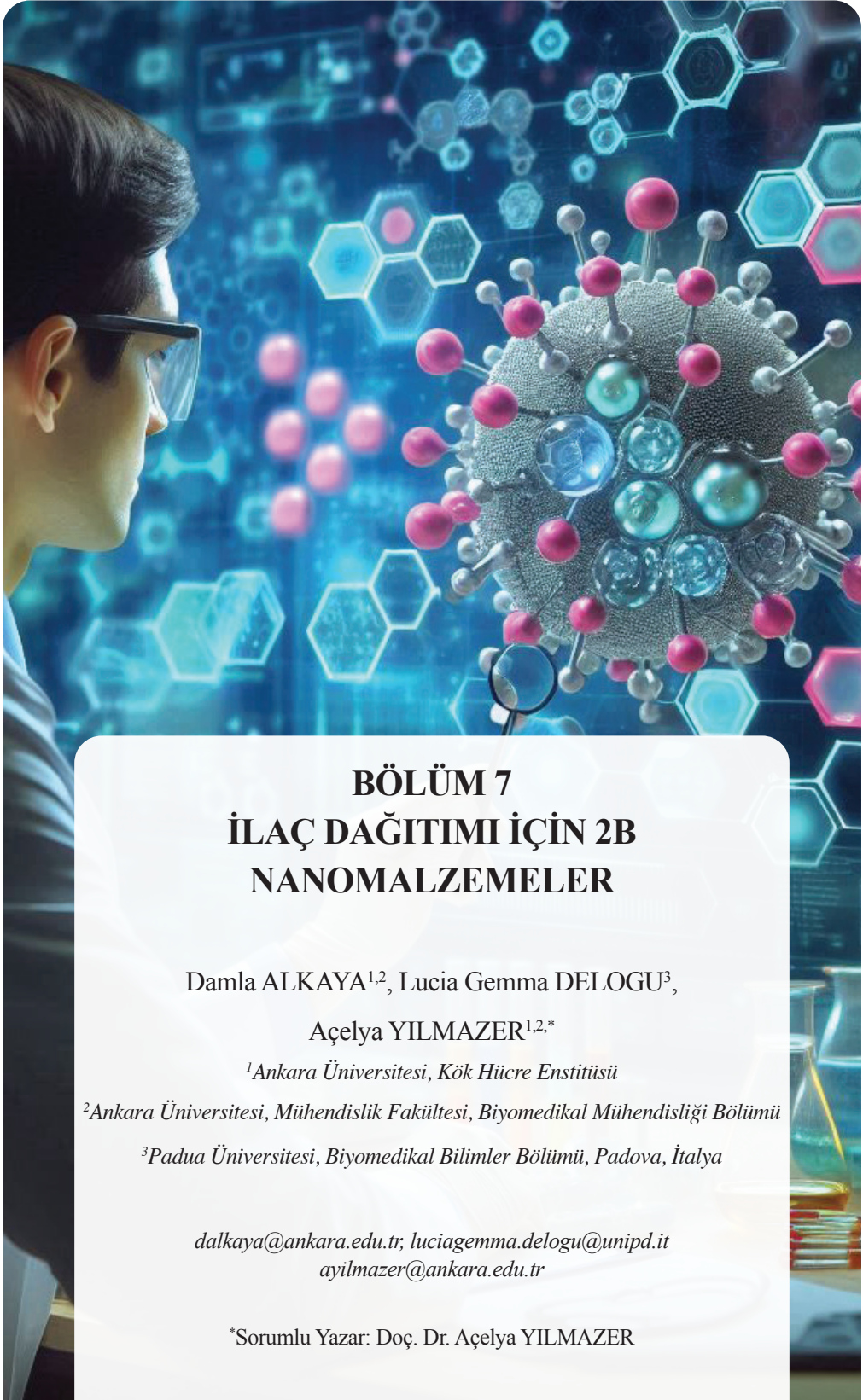
KAYNAKLAR

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Čech, M., Chilton, J., Clements, D., Coraor, N., Grüning, B. A., Guerler, A., Hillman-Jackson, J., Hiltmann, S., Jalili, V., Rasche, H., Soranzo, N., Goecks, J., Taylor, J., Nekrutenko, A. vd. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544. (2018)
- Argelaguet, R., Velten, B., Arnol, D., Dietrich, S., Zenz, T., Marioni, J. C., Buettner, F., Huber, W., Stegle, O. Multi-Omics Factor Analysis—a framework for unsupervised integration of multi-omics data sets. *Mol. Syst. Biol.* 14. (2018)
- Armitage, E. G., Southam, A. D. Monitoring cancer prognosis, diagnosis and treatment efficacy using metabolomics and lipidomics 12, 146. (2016)
- Barrett, T., Troup, D. B., Wilhite, S. E., Ledoux, P., Evangelista, C., Kim, I. F., Tomashevsky, M., Marshall, K. A., Phillippy, K. H., Sherman, P. M., Muertter, R. N., Holko, M., Ayanbule, O., Yefanov, A., Soboleva, A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets—10 years on. *Nucleic Acids Res.* 39, D1005–D1010. (2011)
- BELLMAN, R. *Adaptive Control Processes* Princeton University Press (1961)
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 57, 289–300. (1995)
- Blischak, J. D., Davenport, E. R., Wilson, G. A Quick Introduction to Version Control with Git and GitHub. (Ouellette, F., Ed.) *PLOS Comput. Biol.* 12, e1004668. (2016)
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data 30, 2114–2120. (2014)
- Bolstad, B. M., Irizarry, R. ., Åstrand, M., Speed, T. P. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias 19, 185–193. (2003)

- Bowen, B. P., Northen, T. R. Dealing with the unknown: Metabolomics and Metabolite Atlases. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 21, 1471–1476. (2010)
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C. A., Causton, H. C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F. C. P., Kim, I. F., Markowitz, V., Matese, J. C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U. vd. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nat. Genet.* 29, 365–371. (2001)
- Challis, G. L. Genome Mining for Novel Natural Product Discovery. *J. Med. Chem.* 51, 2618–2628. (2008)
- Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., Gatto, L., Fischer, B., Pratt, B., Egertson, J., Hoff, K., Kessner, D., Tasman, N., Shulman, N., Frewen, B., Baker, T. A., Brusniak, M. Y., Paulse, C., Creasy, D. vd. A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nat. Biotechnol.* 30, 918–920. (2012)
- Chang, W. C., Tanoshima, R., Ross, C. J. D., Carleton, B. C. Challenges and Opportunities in Implementing Pharmacogenetic Testing in Clinical Settings. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 61, 65–84. (2021)
- Chappell, L., Russell, A. J. C., Voet, T. Single-Cell (Multi)omics Technologies. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 19, 15–41. (2018)
- Chervitz, S. A., Deutsch, E. W., Field, D., Parkinson, H., Quackenbush, J., Rocca-Serra, P., Sansone, S. A., Stoeckert, C. J., Taylor, C. F., Taylor, R., Ball, C. A. Data Standards for Omics Data: The Basis of Data Sharing and Reuse, ss. 31–69 (2011)
- Cox, J., Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* 26, 1367–1372. (2008)
- Cui, Y., Paules, R. S. Use of Transcriptomics in Understanding Mechanisms of Drug-Induced Toxicity. *Pharmacogenomics* 11, 573–585. (2010)
- Culhane, A. C., Thioulouse, J., Perriere, G., Higgins, D. G. MADE4: an R package for multivariate analysis of gene expression data 21, 2789–2790. (2005)
- Datta, S., Rajnish, K. N., Samuel, M. S., Pugazhendhi, A., Selvarajan, E. Metagenomic applications in microbial diversity, bioremediation, pollution monitoring, enzyme and drug discovery. A review. *Environ. Chem. Lett.* 18, 1229–1241. (2020)
- Di Tommaso, P., Chatzou, M., Floden, E. W., Barja, P. P., Palumbo, E., Notredame, C. Nextflow enables reproducible computational workflows. *Nat. Biotechnol.* 35, 316–319. (2017)
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., Hansen, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J. Health Econ.* 47, 20–33. (2016)
- Ding, S., Chen, X., Shen, K. Single-cell RNA sequencing in breast cancer: Understanding tumor heterogeneity and paving roads to individualized therapy. *Cancer Commun.* 40, 329–344. (2020)
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., Gingeras, T. R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner 29, 15–21. (2013)
- Eckart, C., Young, G. The approximation of one matrix by another of lower rank. *Psychometrika* 1, 211–218. (1936)
- Fang, Z., Ma, T., Tang, G., Zhu, L., Yan, Q., Wang, T., Celedón, J. C., Chen, W., Tseng, G. C. Bayesian integrative model for multi-omics data with missingness. (Hancock, J., Ed.) 34, 3801–3808. (2018)
- Gagnon-Bartsch, J. A., Jacob, L., Speed, T. P. Removing Unwanted Variation from High Dimensional Data with Negative Controls. *Tech. Reports from Dep. Stat. Univ. California, Berkeley* 1–112. (2013)
- Gawel, D. R., Serra-Musach, J., Lilja, S., Aagesen, J., Arenas, A., Asking, B., Bengnér, M., Björkander, J., Biggs, S., Emerudh, J., Hjortswang, H., Karlsson, J. E., Köpsen, M., Lee, E. J., Lentini, A., Li, X., Magnusson, M., Martínez-Enguita, D., Matussek, A. vd. A validated single-cell-based strategy to identify diagnostic and therapeutic targets in complex diseases. *Genome Med.* 11, 47. (2019)
- Greenbaum, D., Sboner, A., Mu, X. J., Gerstein, M. Genomics and Privacy: Implications of the New Reality of Closed Data for the Field. (Bourne, P. E., Ed.) *PLoS Comput. Biol.* 7, e1002278. (2011)
- Griffiths, W. J., Wang, Y. Mass spectrometry: from proteomics to metabolomics and lipidomics. *Chem. Soc. Rev.* 38, 1882. (2009)
- Guan, S., Taylor, P. P., Han, Z., Moran, M. F., Ma, B. Data Dependent–Independent Acquisition (DDIA) Proteomics. *J. Proteome Res.* 19, 3230–3237. (2020)
- Guleria, A., Kumar, A., Kumar, U., Raj, R., Kumar, D. NMR Based Metabolomics: An Exquisite and Facile Method for Evaluating Therapeutic Efficacy and Screening Drug Toxicity. *Curr. Top. Med. Chem.* 18, 1827–1849. (2018)
- Heeney, C., Hawkins, N., de Vries, J., Boddington, P., Kaye, J. Assessing the Privacy Risks of Data Sharing in Genomics. *Public Health Genomics* 14, 17–25. (2011)
- HOTELLING, H. RELATIONS BETWEEN TWO SETS OF VARIATES. *Biometrika* 28, 321–377. (1936)
- Hoyer, S., Hamman, J. xarray: N-D labeled Arrays and Datasets in Python. *J. Open Res. Softw.* 5, 10. (2017)

- Hu, B., Canon, S., Eloee-Fadrosch, E. A., Anubhav, Babinski, M., Corilo, Y., Davenport, K., Duncan, W. D., Fagnan, K., Flynn, M., Foster, B., Hays, D., Huntemann, M., Jackson, E. K. P., Kelliher, J., Li, P. E., Lo, C. C., Mans, D., McCue, L. A. vd. Challenges in Bioinformatics Workflows for Processing Microbiome Omics Data at Scale. *Front. Bioinforma.* 1, (2022)
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sültmann, H., Poustka, A., Vingron, M. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression 18, S96–S104. (2002)
- Hyvärinen, A., Oja, E. Independent component analysis: algorithms and applications 13, 411–430. (2000)
- Jethwa, A., Bhagat, J., George, J. T., Shah, S. Metagenomics for Drug Discovery. *Nov. Technol. Biosyst. Biomed. Drug Deliv.* Springer Nature Singapore, Singapore , ss. 125–153 (2023)
- Jia, L., Yao, W., Jiang, Y., Li, Y., Wang, Z., Li, H., Huang, F., Li, J., Chen, T., Zhang, H. Development of interactive biological web applications with R/Shiny. *Brief. Bioinform.* 23, (2022)
- Johnson, W. E., Li, C., Rabinovic, A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods 8, 118–127. (2007)
- Jorth, P., Turner, K. H., Gumus, P., Nizam, N., Buduneli, N., Whiteley, M. Metatranscriptomics of the Human Oral Microbiome during Health and Disease. (Kolter, R., Ed.) *MBio* 5, (2014)
- Kaczkowski, B., Tanaka, Y., Kawaji, H., Sandelin, A., Andersson, R., Itoh, M., Lassmann, T., Hayashizaki, Y., Carninci, P., Forrest, A. R. R. Transcriptome Analysis of Recurrently Deregulated Genes across Multiple Cancers Identifies New Pan-Cancer Biomarkers. *Cancer Res.* 76, 216–226. (2016)
- Katayama, T., Arakawa, K., Nakao, M., Ono, K., Aoki-Kinoshita, K. F., Yamamoto, Y., Yamaguchi, A., Kawashima, S., Chun, H. W., Aerts, J., Aranda, B., Barboza, L. H., Bonnal, R. J., Bruskiwich, R., Bryne, J. C., Fernandez, J. M., Funahashi, A., Gordon, P. M., Goto, N. vd. The DBCLS BioHackathon: standardization and interoperability for bioinformatics web services and workflows. *J. Biomed. Semantics* 1, 8. (2010)
- Kennedy, S. The role of proteomics in toxicology: identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis 7, 269–290. (2002)
- Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D., Mallick, P. ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development 24, 2534–2536. (2008)
- Köster, J., Rahmann, S. Snakemake—a scalable bioinformatics workflow engine 28, 2520–2522. (2012)
- Kurtzer, G. M., Sochat, V., Bauer, M. W. Singularity: Scientific containers for mobility of compute. (Gursoy, A., Ed.) *PLoS One* 12, e0177459. (2017)
- Lappalainen, I., Almeida-King, J., Kumanduri, V., Senf, A., Spalding, J. D., Ur-Rehman, S., Saunders, G., Kandasamy, J., Caccamo, M., Leinonen, R., Vaughan, B., Laurent, T., Rowland, F., Marin-Garcia, P., Barker, J., Jokinen, P., Torres, A. C., de Argila, J. R., Llobet, O. M. vd. The European Genome-phenome Archive of human data consented for biomedical research. *Nat. Genet.* 47, 692–695. (2015)
- Lebedev, A. V., Westman, E., Van Westen, G. J. P., Kramberger, M. G., Lundervold, A., Aarsland, D., Soininen, H., Kloszewska, I., Mecocci, P., Tzolaki, M., Vellas, B., Lovestone, S., Simmons, A. Random Forest ensembles for detection and prediction of Alzheimer’s disease with a good between-cohort robustness. *NeuroImage Clin.* 6, 115–125. (2014)
- Lee, J. min, Han, J. J., Altwerger, G., Kohn, E. C. Proteomics and biomarkers in clinical trials for drug development. *J. Proteomics* 74, 2632–2641. (2011)
- Leinonen, R., Sugawara, H., Shumway, M. The Sequence Read Archive. *Nucleic Acids Res.* 39, D19–D21. (2011)
- Li, B., Dewey, C. N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* 12, 323. (2011)
- Li, H., Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform 25, 1754–1760. (2009a)
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools 25, 2078–2079. (2009b)
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 1–11. (2012)
- Liu, Z., Liu, J., Liu, X., Wang, X., Xie, Q., Zhang, X., Kong, X., He, M., Yang, Y., Deng, X., Yang, L., Qi, Y., Li, J., Liu, Y., Yuan, L., Diao, L., He, F., Li, D. CTR-DB, an omnibus for patient-derived gene expression signatures correlated with cancer drug response. *Nucleic Acids Res.* 50, D1184–D1199. (2022)
- Loging, W. T. *Bioinformatics and Computational Biology in Drug Discovery and Development.* (Loging, W. T., Ed.) Cambridge University Press (2016)
- Maaten, L. van der, Hinton, G. Visualizing Data using t-SNE *Laurens. J. Mach. Learn. Res.* 9, 2579–2605. (2008)
- McInnes, L., Healy, J., Saul, N., Grobberger, L. UMAP: Uniform Manifold Approximation and Projection. *J. Open Source Softw.* 3, 861. (2018)

- Misra, B. B., van der Hoof, J. J. J. Updates in metabolomics tools and resources: 2014–2015. *Electrophoresis* 37, 86–110. (2016)
- Mittelstadt, B. D., Floridi, L. *The Ethics of Biomedical Big Data*. (Mittelstadt, B. D. & L. Floridi, Ed.) Law, Governance and Technology Series Springer International Publishing, Cham, C. 29 (2016)
- Olshausen, B. A., Field, D. J. Sparse coding with an overcomplete basis set: A strategy employed by V1? *Vision Res.* 37, 3311–3325. (1997)
- Pearson, K. LIII. On lines and planes of closest fit to systems of points in space. *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.* 2, 559–572. (1901)
- Pedrotty, D. M., Morley, M. P., Cappola, T. P. Transcriptomic Biomarkers of Cardiovascular Disease. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 55, 64–69. (2012)
- Peng, R. D. Reproducible Research in Computational Science. *Science* (80-.). 334, 1226–1227. (2011)
- Pirmohamed, M. Pharmacogenetics and pharmacogenomics. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 52, 345–347. (2001)
- Rasmiena, A. A., Ng, T. W., Meikle, P. J. Metabolomics and ischaemic heart disease. *Clin. Sci.* 124, 289–306. (2013)
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47–e47. (2015)
- Schmitt, C. P., Burchinal, M. Data Management Practices for Collaborative Research. *Front. Psychiatry* 2,. (2011)
- Shyur, L. F., Yang, N. S. Metabolomics for phytomedicine research and drug development. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 66–71. (2008)
- Sleno, L., Emili, A. Proteomic methods for drug target discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 46–54. (2008)
- Storey, J. D. The positive false discovery rate: a Bayesian interpretation and the q-value. *Ann. Stat.* 31,. (2003)
- Stuart, K. A., Welsh, K., Walker, M. C., Edrada-Ebel, R. Metabolomic tools used in marine natural product drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 15, 499–522. (2020)
- Sud, M., Fahy, E., Cotter, D., Azam, K., Vadivelu, I., Burant, C., Edison, A., Fiehn, O., Higashi, R., Nair, K. S., Sumner, S., Subramaniam, S. Metabolomics Workbench: An international repository for metabolomics data and metadata, metabolite standards, protocols, tutorials and training, and analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D463–D470. (2016)
- Swinney, D. C. Phenotypic vs. Target-Based Drug Discovery for First-in-Class Medicines. *Clin. Pharmacol. Ther.* 93, 299–301. (2013)
- Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., Botstein, D., Altman, R. B. Missing value estimation methods for DNA microarrays 17, 520–525. (2001)
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., Cox, J. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat. Methods* 13, 731–740. (2016)
- van der Lee, T. A. J., Medema, M. H. Computational strategies for genome-based natural product discovery and engineering in fungi. *Fungal Genet. Biol.* 89, 29–36. (2016)
- Wang, B., Mezlini, A. M., Demir, F., Fiume, M., Tu, Z., Brudno, M., Haibe-Kains, B., Goldenberg, A. Similarity network fusion for aggregating data types on a genomic scale. *Nat. Methods* 11, 333–337. (2014)
- Wilkinson, M. D., Dumontier, M., Aalbersberg, I. J., Appleton, G., Axton, M., Baak, A., Blomberg, N., Boiten, J. W., da Silva Santos, L. B., Bourne, P. E., Bouwman, J., Brookes, A. J., Clark, T., Crosas, M., Dillo, I., Dumon, O., Edmunds, S., Evelo, C. T., Finkers, R. vd. The FAIR Guiding Principles for scientific data management and stewardship. *Sci. Data* 3, 160018. (2016)
- Wong, C. H., Siah, K. W., Lo, A. W. Estimation of clinical trial success rates and related parameters 20, 273–286. (2019)
- Yang, W., Soares, J., Greninger, P., Edelman, E. J., Lightfoot, H., Forbes, S., Bindal, N., Beare, D., Smith, J. A., Thompson, I. R., Ramaswamy, S., Futreal, P. A., Haber, D. A., Stratton, M. R., Benes, C., McDermott, U., Garnett, M. J. Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): A resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. *Nucleic Acids Res.* 41, 955–961. (2013)
- Yang, Y. H. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res.* 30, 15e – 15. (2002)
- Yudin, A. Data Analysis with Pandas. *Basic Python Data Manag. Financ. Mark.* Apress, Berkeley, CA, ss. 93–150 (2021)
- Zhang, A., Sun, H., Yan, G., Wang, P., Wang, X. Metabolomics for Biomarker Discovery: Moving to the Clinic. *Biomed Res. Int.* 2015, 1–6. (2015)
- Zhang, C. C., Kast, J. Applications of Current Proteomics Techniques in Modern Drug Design. *Curr. Comput. Aided-Drug Des.* 6, 147–164. (2010)
- Zhang, Y., Wang, D., Peng, M., Tang, L., Ouyang, J., Xiong, F., Guo, C., Tang, Y., Zhou, Y., Liao, Q., Wu, X., Wang, H., Yu, J., Li, Y., Li, X., Li, G., Zeng, Z., Tan, Y., Xiong, W. Single-cell RNA sequencing in cancer research. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 40, 81. (2021)
- Zhao, Y. Y., Cheng, X. long, Lin, R. C. Lipidomics Applications for Discovering Biomarkers of Diseases in Clinical Chemistry, ss. 1–26 (2014)



BÖLÜM 7

İLAC DAĞITIMI İÇİN 2B NANOMALZEMELER

Damla ALKAYA^{1,2}, Lucia Gemma DELOGU³,

Açelya YILMAZER^{1,2,*}

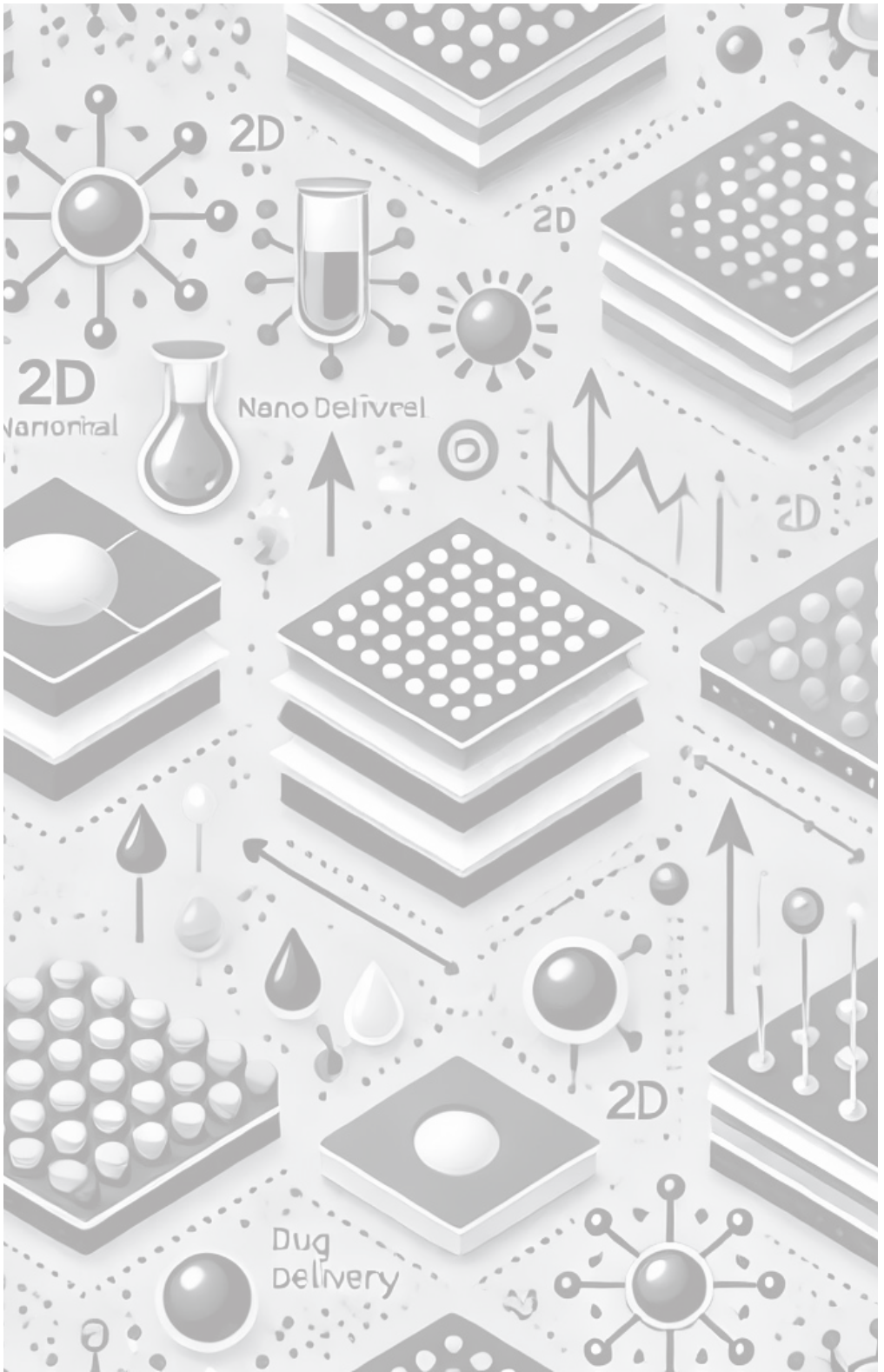
¹Ankara Üniversitesi, Kök Hücre Enstitüsü

²Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomedikal Mühendisliği Bölümü

³Padua Üniversitesi, Biyomedikal Bilimler Bölümü, Padova, İtalya

dalkaya@ankara.edu.tr, luciagemma.delogu@unipd.it
ayilmazer@ankara.edu.tr

*Sorumlu Yazar: Doç. Dr. Açelya YILMAZER





1. GİRİŞ

İlaç dağıtımı, insanlarda veya hayvanlarda terapötik etki için bir ilaç bileşiğinin uygulanması sürecidir (Park ve ark., 2022; Robinson ve ark., 1991; Tiwari ve ark., 2012). İlaç dağıtım sistemleri (DDS'ler), yutulan bir hap, kapsül veya aşı enjeksiyonu gibi dağıtım yöntemlerini kullanarak vücudun sistemik veya belirli bir bölümünü taşıyan teknolojileri içeren sistemlerdir. İlaç taşıyıcı sistemlerin temel amacı, ilaçları amaçlanan yerde, doğru miktarda ve doğru zamanda serbest bırakmaktır. Aynı zamanda, bu sistemler ilaçları bozulmaya karşı koruyarak ilaçların veya enjeksiyonların vücutta taşınmasını ve paketlenmesini sağlar (Adepu ve Ramakrishna, 2021). Son on yılda ilaç dağıtım sistemlerinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Önümüzdeki yıllarda daha büyük yeniliklerin ortaya çıkmaya devam edeceğine şüphe yoktur (Park ve ark., 2022). Ancak gelişmelere rağmen ilaçların sağlıklı organ veya dokularla etkileşimi nedeniyle birçok hastalığın tedavisinde hala yan etkiler görülmektedir. Bu da kanser ve nörodejeneratif hastalıklar gibi birçok hastalığın tedavi olanaklarını sınırlamaktadır (Asil ve ark., 2020; Dang ve Guan, 2020; Elumalai ve ark., 2024; Luiz ve ark., 2022; Mu ve ark., 2020). Bu nedenle, önümüzdeki yıllarda, ilaçların hedeflenen dağıtımını kolaylaştırmak ve yan etkilerini azaltmaya yardımcı olmak için çeşitli araçların araştırılması ve incelenmesi beklenmektedir. DDS'ler için araştırmalar, dağıtım yolları ve dağıtım araçları olmak üzere iki ayrı dalda yürütülmektedir (Khizar ve ark., 2023). İlaçlar, yutma, soluma, deriden emilme veya enjeksiyon gibi çeşitli yollarla vücuda alınabilirler. Bununla birlikte, her yöntemin avantajları ve dezavantajları vardır. Bu nedenle her yöntem her ilaç için kullanılamaz. Hedefe yönelik ilaç dağıtımını sağlamanın başka yolları olsada, bazı ilaçlar yalnızca sistematik olarak uygulanabilir (Hickey, 2020; Liang ve ark., 2020). İlaç salım yöntemlerinin iyileştirilmesi ve yeni yöntemlerin geliştirilmesinin, kullanılacak ilaçların kullanımını ve etkinliğini artırabileceği düşünülmektedir. İlaçların vücutta güvenli dolaşımı için paketlenildikleri lipozomlar ve nanopartiküller (NP'ler) gibi farklı ilaç dağıtım araçları kullanılabilir. Bu araçlar, ilacın tam olarak gitmesi gereken yere ulaşmasına yardımcı olarak etkinliğini artırabilir (Elumalai ve ark., 2024; Nel ve ark., 2023; Pande, 2023; Xu ve ark., 2024).

Biyoteknolojideki son gelişmeler, daha etkili ve kesin olarak hedeflenmiş ilaçlar ve etkili tedavi seçenekleri sunan birçok farklı ilaç dağıtım yolu ve aracı sunmaktadır. Birçok ilaç uygulamasında, plazmadaki konsantrasyonu korumak zordur (Mandal ve ark., 2024). Bu nedenle uygulamaların tekrar tekrar yapılması gerekmektedir. Bununla birlikte, sık tekrarlanan ilaç uygulaması, hastalar için rahatsız edici olmasının yanı sıra ilaç direncine ve toksisitesine neden olabilir (Yang ve ark., 2021). DDS yoluyla ilaç salımının kontrol edilmesi, tek bir ilaç uygulamasıyla etkili plazma konsantrasyonlarının korunmasını sağlayarak dezavantajları ve yan etkileri ortadan kaldırabilir. Nanoteknolojinin gelişmesi ile ortaya çıkan nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler (nDDS'ler), yüksek ilaç yükleme kapasitesi, iyi hedefleme ve tedavi edici fonksiyonlar, düşük toksisite ve biyoyoumluluk gibi kontrol edilebilir özelliklere sahip ilaç taşıyıcı araçlar kullanmaktadır (Moradi ve ark., 2024). İlaç dağıtımında iki boyutlu (2B) nanomalzemelerin potansiyeli, son yıllarda dikkat çeken bir araştırma alanıdır. İlaç dağıtımında iki boyutlu (2B) nanomalzemelerin potansiyeli, son yıllarda dikkat çeken bir araştırma alanıdır. Bu malzemelerin benzersiz özelliklerinden yararlanarak, çeşitli

hastalıklara yönelik tedavilerde önemli ilerlemeler sağlanabilir (Asil ve ark., 2020; Chandrasekaran ve ark., 2023; Cheng ve ark., 2020; Saadh ve ark., 2024; Wu ve ark., 2023). 2B nDDS'lerin hızlı gelişimi, biyomedikal çalışmalar için büyük bir potansiyel sunmaktadır.

2. İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

İlaç salımının başarısı, terapötik özelliklere ve hedef organ bariyerlerine bağlıdır. Bu faktörlerin her ikisi de kapsamlı bir şekilde anlaşılmadan, ilaç dağıtım istendiği kadar etkili olmayabilir. Aynı zamanda, uygulanacak terapötüğün boyut, hidrofiliklik, bileşim ve spesifik reseptöre bağlanma yeteneği gibi özelliklerine bağlı olarak farklılık gösterebilir. Çoğu ilaç, fizyolojik sıvılarda çözünmezlik veya zayıf geçirgenlik nedeniyle düşük biyoyararlanım sergiler. Bu nedenle ilaç performansını ve aktivitesini iyileştirmek için etkili araçlara da ihtiyaç vardır (Mbah ve ark., 2014). Genel olarak, ilaç dağıtım sistemlerinin ana hedefleri stabilite, biyomoleküllerin içsel sınırlamalarını azaltmak ve düşük toksisite ile terapötik verimliliği artırmaktır (Liu ve ark., 2018).

Hastalık tedavilerinde haplar, tabletler, kapsüller, sıvılar, kremler, fitiller, aerosoller ve enjekte edilebilir ürünler gibi hızlı etkili ve uygulaması kolay bileşikler kullanılmaktadır (Khan ve Irchhaiya, 2016). Geleneksel ilaç taşıyıcı sistemler, kolay uygulanabilen ilaçların ağızdan alınma yoluyla uygulanmaktadır. Bununla birlikte, geleneksel ilaç dağıtım sistemlerinin kontrolsüz salım, daha yüksek doz uygulamaları ve sık uygulama gibi sınırlamaları vardır (Liu ve ark., 2016). Devrim niteliğindeki yeni ilaç dağıtım sistemleri, ilaç uygulama şeklimizi değiştiriyorlar. Yenilikçi teknikler ve dozaj formları kullanarak, bu sistemler geleneksel sistemlere kıyasla bir ilacın performansını, etkinliğini, güvenliğini ve uyumluluğunu önemli ölçüde artırabilirler. İlaç dağıtımını hedefleme, kontrol etme ve modüle etme gücüyle, yeni ilaç dağıtım sistemleri yeni bir tıp çağının yolunu açmaktadır. Bir ilacı geleneksel bir sistemden yeni bir ilaç dağıtım sistemine yükselterek etkinliğini, güvenliğini ve uyumluluğunu önemli ölçüde artırılabilceği düşünülmektedir (Laffleur ve Keckeis, 2020). Aynı zamanda, yeni ilaç salım sistemleri, sürekli ve kontrollü ilaç dağıtımını mümkün kılmakta, etkili ilaç seviyesini korumakta ve yan etkileri azaltmaktadır (Akhtar, 2014; Jain ve ark., 2014; Laffleur ve Keckeis, 2020; Shinde ve ark., 2014).

2.1. Yeni İlaç Dağıtım Sistemleri

2.1.1. Hızlı Çözünen İlaç Taşıyıcı Sistemler

Hızlı çözünen ilaç dağıtım sistemleri, modern oral uygulamanın önemli bir bileşenidir. Maliyet, uygulama kolaylığı ve hasta uyumu nedeniyle en çok tercih edilen ilaç verme şekli oral yol olmakla birlikte, çoğunlukla tablet ve kapsül formundaki katı dozaj oral formlar bu şekilde kullanılmaktadır. Ağızdan ilaç uygulamasının diğer uygulama yollarına göre ağrısız, hassas doz ve kendi kendine ilaç alma gibi avantajlarına rağmen, disfajik hastalarda olduğu gibi boğulma korkusu ve tablet-kapsüllerin yutulmasındaki zorluk, ağızdan sıvı ilaç ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte, sıvı oral ilaçlarda doğru dozu almak çok zordur. Bununla birlikte, alerjik şoklar veya su yokluğu gibi durumlar, yeni bir oral ilaç dağıtım sistemine ihtiyaç duyulmasına neden olmuştur. Bu noktada hızlı çözünen ilaç taşıyıcı sistemler geliştirilmiştir (Bhattarai ve Gupta, 2015). Bu sistemler, düşük doz etkinliği, hoş tat, yeterli stabilite ve su ve tükürükte geçirgenlik gibi ideal özelliklere sahiptir.

2.1.2. Ozmotik İlaç Taşıyıcı Sistemler

Konvansiyonel ilaç taşıyıcılarının ilaç salınımı ve etkili konsantrasyon açısından kontrol edilmesi çok zordur ve değişken plazma konsantrasyonlarına yol açabilir (Babu, 2019; Patra, 2013). Bazı ilaçların çözünürlük ve geçirgenlik sorunları nedeniyle zayıf oral biyoyararlanıma sahip olduğu bilinmektedir (Babu, 2019). Bu sorunun üstesinden gelmek için, uzun bir süre boyunca kontrollü salınımı izin veren ve gastrointestinal koşullardan etkilenmeyen yeni bir ilaç dağıtım sistemi geliştirilmiştir (Babu, 2019; Patel ve Parikh, 2017). Bu kontrollü ilaç dağıtım sistemleri, biyoaktif bileşeni önceden belirlenmiş bir oranda salmak üzere tasarlanmıştır ve salınımı uzun süreler boyunca devam ettirebilirler (Syed, 2015; Ratnaparkhi ve Gupta, 2013). Ozmotik cihazlar, günde tek bir uygulama için en güvenilir uzun etkili ilaç şeklidir. Osmoz, ozmotik basınçtaki eşitsizliğin yarattığı yarı geçirgen bir zar boyunca suyun hareketidir. Membran, çoğu çözünen molekül ve iyonun girişini azaltırken seçici olarak suyun geçişine izin verir (Patel ve Parikh, 2017). Ozmotik ilaç dağıtım sistemlerinde, ozmotik basınç, ilaçların izlenen bir şekilde salınması için itici bir güç görevi görür (Syed, 2015). Bu sistemler oral veya parenteral olarak uygulanabilir.

2.1.3. Emülsifiye İlaç Taşıyıcı Sistemler

Geliştirilmekte olan yeni ilaçlar genellikle düşük biyoyararlanım, kişilerarası çeşitlilik ve zayıf suda çözünürlük gibi zorluklarla karşı karşıyadır (Vilas ve ark., 2013). Bu sorunların üstesinden gelmek için çeşitli teknolojiler kullanılmaktadır. Bu noktada lipid bazlı ilaç dağıtım sistemleri umut vadetmektedir. Yardımcı maddeler olarak lipitlerin seçimi, ilacın çözünürlüğünü, emilimini ve biyoyararlanımını etkileyebilir (Mu ve ark., 2013). Gastrointestinal sıvı ile temas ettiklerinde su içinde yağ emülsiyonları (mikroemülsiyonlar) oluşturarak kendi kendine emülsifiye olabilen yağ formülasyonları, emilim oranını ve derecesini önemli ölçüde iyileştirerek tekrarlanabilir plazma konsantrasyonlarına yol açabilir. Buda, özellikle hidrofobik ilaçlara fayda sağlayabilir. Çünkü oral biyoyararlanımları bu yöntemle büyük ölçüde artırılabilir (Mahapatra ve ark., 2014; Rahman ve ark., 2013).

2.1.4. Veziküler İlaç Taşıyıcı Sistemler

Veziküler sistemler, su ile temas halinde hem hidrofilik hem de hidrofobik özellikler taşıyan amfifilik yapıya sahip, bir veya daha fazla eşmerkezli lipid katmanından oluşan düzenli birimlerdir. Fosfolipitler, kolesterol ve iyonik olmayan yüzey aktif maddeler oldukça fazla kullanılmaktadır. Amfifilik bileşenler, kapsülleme kapasitesinin etkinliğinden, biçiminden, boyutundan, yapısından ve katmanından etkilenir (Shilakari ve ark., 2013). Veziküler ilaç dağıtım sistemleri, geleneksel dozaj formlarına göre bir avantaja sahiptir. Ayrıca, özellikle çözünmesi zor ilaçlarda gelişmiş biyoyararlanım, gecikmiş metabolizasyon, uzun süreli sistemik dolaşım ve azaltılmış toksisite gibi avantajlar sunar (Jain ve ark., 2014; Shinde ve ark., 2014). Ancak yine de *in vivo* taşıma sırasında ilaç yükleme kapasitesi, üretimi, koruması ve ilaç sızıntısı gibi dezavantajları vardır (Shinde ve ark., 2014). Belli bir miktardaki ilacın belirli bir hedefe gönderilmesi ve enfeksiyon bölgesindeki etkili birimin yönlendirilmesi ile de farklı avantajlar sunmaktadır. Hedefli ilaç salınımıyla ilaçların sürekli ve kontrollü salınımının sağlanabilmektedir (Kamboj ve ark., 2013; Pattni ve ark., 2015; Shinde ve ark., 2014).

2.1.5. Nanopartikül Aracılı İlaç Taşıyıcı Sistemler

Nanopartikül aracılı dağıtım sistemleri, küçük boyutlu (1-1000 nm) ve tasarlanabilir özelliklere sahip yüksek yüzey-hacim oranına sahip katı, kolloidal sistemlerdir. Nanomalzemeler iki türe ayrılabilir: inorganik ve organik. Lipitler ve polimerlerden (sentetik veya doğal) veya inorganik metallere

oluşurlar (Martinelli ve ark., 2019; Rizvi ve Salih, 2018; Thakor ve Gambhir, 2013). Nanopartikül aracılı ilaç dağıtım sistemleri, nanopartiküle veya yüzeye kovalent olarak bağlanan veya nanopartikül tarafından yakalanan ve kapsüllenmiş formda taşınan terapötik ajan bileşenlerinden oluşur (Thakor ve Gambhir, 2013). Optimum parçacık boyutu 100 nm'dir. Bu parçacıkların avantajları arasında lenfatik sistem tarafından temizlenmenin önlenmesi, kan-beyin bariyerini geçme fırsatı ve yeterli ilaç dağıtımının geniş yüzey alanı bulunmaktadır. Nanopartiküller, lipofilik ve hidrofilik ilaçları entegre etme yeteneği ve ayarlanabilir boyut, şekil ve yüzey özellikleri nedeniyle iyi stabiliteye ve yüksek ilaç yüklemeye kapasitesine sahiptir. Güvenlikle ilgili, özellikle yavaş biyolojik bozunma hızıyla ilgili endişeler vardır (Martinelli ve ark., 2019; Thakor ve Gambhir, 2013). Nano ölçekli ilaç taşıyıcı sistemler; nanokürecikler ve nanokapsüller gibi polimerik nanopartiküller, katı lipid bazlı nanopartiküller gibi nanoyapılı lipid taşıyıcılar ve jeller ve doğal veya sentetik hidrojel olarak gruplandırılabilirler (Laffleur ve Keckeis, 2020).

2.2. İlaç Dağıtım Araçları

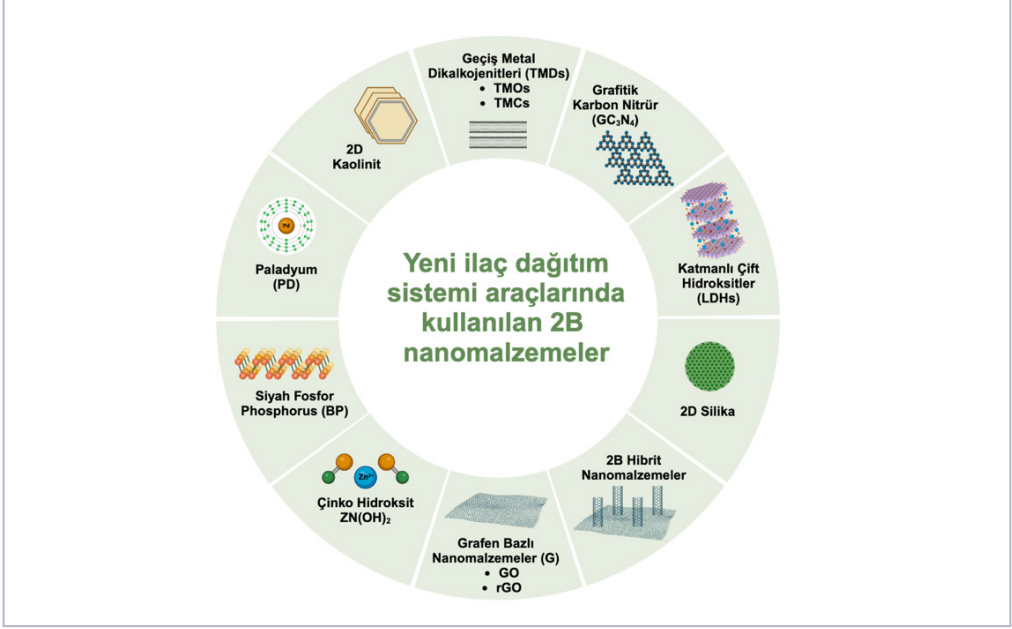
İlaç dağıtım sistemleriyle ilaç dağıtımı, herhangi bir ilacın daha geniş bir etki elde etmek için vücutta hedeflenen herhangi bir bölgeye taşınma yeteneğine dayanan modern tıbbın önemli bir yönünü kapsayan sistemdir. Yeni ilaç taşıyıcıları, tedavi sırasında aktif birimi sürekli izlerken ve ilacı vücudun gereksinimlerine göre optimum hız ve ölçüde belirli hedef bölgeye ulaştırmak gibi iki kritik gereksinimi karşılamalıdır. Çeşitli ilaç dağıtım sistemleri mevcut olsa da yalnızca ilacı belirli bir süre boyunca hedef bölgeye ulaştırabilenler ilaç dağıtım sistemi olarak kabul edilir. Bu nedenle, daha etkili ve daha güvenli tedavileri mümkün kılmak için bu gereksinimleri karşılayan ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi zorunludur.

Son zamanlarda, biyolojik moleküllerin hassas tespiti, hastalıklı dokuların görüntülenmesi, terapötikler ve ilaç dağıtımı için nanomalzemeler yaygın olarak kullanılmaktadır (Mei ve ark., 2020). Nanoteknoloji, hassas ilaçların hedefe yönelik olarak verilmesi yoluyla hastalıkların tedavisinde sayısız fayda sağlar. Bununla birlikte, nanomalzemeler ve dağıtım için kullanılan ilaçlar arasındaki etkileşimi, terapötik ajanın stabilitesini, hedef reseptörlerin yüzeyini ve ilacın salınımını anlamak önemlidir.

2.2.1. Yeni İlaç Dağıtım Araçları: 2B Nanomalzemeler

İki boyutlu (2B) nanomalzemeler, sıfır boyutlu (0B) ve tek boyutlu (1B) nanomalzemelerden yapı ve morfoloji açısından çok farklı ve benzersiz özellikler sunar. Eşsiz ve üstün özellikleri, 2B nanomalzemeleri araştırmalarda ilgi odağı haline getirmiş ve hastalık tedavileri için ilaç dağıtım sistemlerinde fayda sağlamıştır. 2B nanomalzemeler, atomik ince tabaka yapısı, biyomoleküllerle adsorpsiyon, tüm atomların kolay değiştirilmesi, daha yüksek enerji ve hızlı tepki süresinin iletilmesine yardımcı olabilecek yüksek yüzey-hacim oranı, yüksek kimyasal kararlılık, esneklik ve ayrıca yüksek hassasiyet, biyoyumluluk gibi özelliklere sahiptir (Ding ve ark., 2020; Shivananju ve ark., 2019; Tahir ve Fatma, 2022). Grafen, siyah fosfor, katmanlı bi-hidroksitler, geçiş metali dikalkojenitler, oksitler ve karbürler 2B nanomalzemeler arasındadır (Şekil 1). Nanofilmler, nano tabakalar ve nanoşeritler de 2B nanomalzemelere dahildir. Amorf veya kristal, metalik, seramik veya polimer olabilirler. 2B nanomalzemeler, mekanik pul pul dökülme, çözelti arıtma, elektromekanik pul pul dökülme gibi yukarıdan aşağıya çeşitli tekniklerle ve hidrotermal sentez, darbeli lazer

biriktirme, kimyasal buhar biriktirme gibi aşağıdan yukarıya tekniklerle üretilebilir (Chen ve ark., 2018).

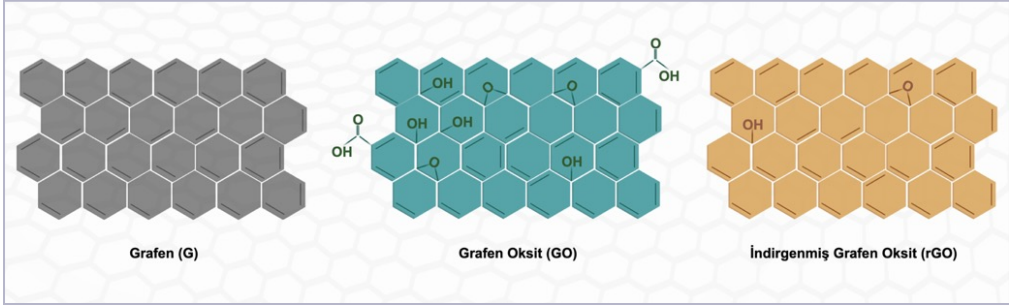


Şekil 1. Yeni ilaç dağıtım sistemi araçlarında kullanılan 2B nanomalzemeler.

Nanoteknolojideki son gelişmeler, 2B nanomalzemelerin benzersiz özelliklerinin ve potansiyel uygulamalarının araştırılması için yeni yollar açmıştır. En umut verici 2B nanomalzemelerden biri, 2010 yılında Nobel Ödülü'nü kazandıktan sonra büyük ilgi gören grafendir. Grafen araştırmalarının başarısı, çeşitli alanlarda diğer 2B nanomalzemelerin incelenmesinde ve pratik uygulamasında da önemli ilerlemelere yol açmıştır (Geim ve Novoselov, 2007). Yüksek yüzey-hacim oranı, ayarlanabilir işlevselliği ve atomik yapısı ile 2 boyutlu nanomalzemelerin yenilikçi uygulama ve sistemlerinin geliştirilmesine katkıda bulunmuştur (Yin ve ark., 2017a; Yin ve ark., 2017b). Üstün özellikleri ile 2B nanomalzemeler, ilaç taşıyıcı sistemler için hastalıklara yönelik tıbbi uygulamalarda umut verici uygulamalar olarak görülmektedir.

2.2.1.1. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde Grafen Bazlı Nanomalzemeler

Keşfinden bu yana grafen, mekanik özellikleri, elektriksel iletkenliği ve optik özellikleri nedeniyle ilaç dağıtım sistemlerinde de ilgi odağı haline gelmiştir (Geim ve Novoselov, 2007). Nanotaşıyıcı cihazlar genellikle hücre zarı ile etkileşime girerek endositoz yoluyla hücreye girerler. Hedeflenen bölgeye iletilmesi için, ilaç dağıtım aracı endozomal bölmeden çıkmalı ve ilaç moleküllerini sitozole bırakmalıdır. Grafenin işlevselleştirilmesi, endozomal salınım için uyarılara duyarlı nanotaşıyıcı araçlar geliştirmek için kullanılmıştır. Bir çalışmada, doksorubisin (DOX) sitozolik iletimi, asidik pH ve yüksek hücre içi glutatyon (GSH) seviyelerinin yakın kızılötesi ışık (NIR) ile ayarlanmasıyla sağlandı ve bu da kanser hücresi ölümüyle sonuçlanmıştır (Kim ve ark., 2013).



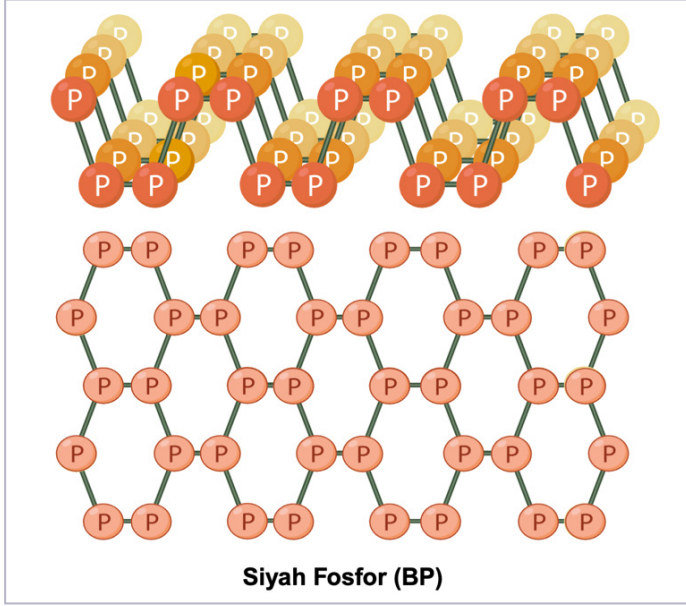
Şekil 2. Grafen formlarının yapısı (Biorender ile oluşturuldu).

Hidrofilik ve kolay işlevselleştirilebilen grafen oksit (GO) formu ve benzersiz fiziksel ve kimyasal özellikleriyle indirgenmiş formu indirgenmiş grafen oksit (rGO) kemoterapi ajanlarının dağıtımında büyük ilgi görmüştür (Şekil 2) (Azimzadeh ve ark., 2016; Hu ve ark., 2016). GO'nun oksidasyonu, biyoyumluluğu artıran ve biyomoleküllerle daha iyi birleşmesini kolaylaştıran hidroksil, epoksit ve karboksilik asit gibi fonksiyonel gruplar oluşur. Bu oluşum, onu biyomedikal uygulamalar için mükemmel bir aday haline getirir (Yang ve ark., 2016; Sharafeldin ve ark., 2017; Zhu ve ark., 2017a; Zhu ve ark., 2017b). GO, fonksiyonel grubun karbon tabakasından çıkarılmasıyla rGO'ya indirgenir ve yapısal değişiklikler meydana gelir (Abdolhosseinzadeh ve ark., 2015; Lin ve ark., 2016). rGO, GO'dan daha iyi immobilizasyonu ve elektriksel iletkenliği nedeniyle ilaç dağıtım sistemleri için daha umut verici bir malzeme olarak kabul edilmektedir (Gupta ve ark., 2018). Malzemelerin işlevselleştirilmesinin gelişmesiyle birlikte, GO tabanlı nanotaşıyıcılar daha popüler hale gelmiştir. Alibolandi ve ark., dekstranın (DEX) AS1411 aptamer ve kurkumin ilavesi ile GO katmanlarının yüzeyine konjuge edilebileceğini ve bu biyoyumlu dekstran kaplı nano-GO (GO-DEX) üretiminin antikanser etkisi gösterdiğini bildirmiştir (Alibolandi ve ark., 2017). İlaç dağıtımında grafeni değiştirebilen polimerlerin kullanıldığını bildiren Tong ve ark., ilaç taşıyıcı sistem olarak fototermal olarak tetiklenen rGO'nun başarılı bir şekilde dallanmış polietilenimin (BPEI) ve polietilen glikol (PEG) ile değiştirildiğini ve su stabilitesi gösterdiğini bildirmiştir (Tong ve ark., 2018). Başka bir çalışma, rGO'nun DOX ile yüklenerek kanser inhibisyonuna yol açtığının gösterildiğini bildirilmiştir (He ve ark., 2017). Aynı zamanda doğal biyopolimerler, biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik ve düşük immünojenite gibi özelliklerinden dolayı grafenin toksik etkilerini azaltabilir. Bu nedenle, grafen ve türevleri, ilaç dağıtım uygulamaları için kitosan ve jelatin gibi işlevselleştirici polimerlerle başarılı bir şekilde konjuge edilebilir (Bao ve ark., 2011; Dembereldorj ve ark., 2012).

2.2.1.2. Siyah Fosfor (BP)

Siyah fosfor (BP), 2014 yılındaki keşfiyle yeni sayılabilecek ve gelişimiyle dikkatleri üzerine çeken bir 2B nanomalzemedir (Şekil 3). Değiştirilebilir enerji bant aralığı, yüksek yüzey reaktivitesi ve mükemmel biyolojik bozunma gibi özellikleri sayesinde ilaç molekülleri ve biyomoleküller ile etkili bir yüklemeye izin verir (Wang ve ark., 2015; Wang ve Yu, 2018; Yan ve Zhang, 2014). BP, fosfor atomlarının güçlü P-P etkileşimi ve zayıf van der Waals kuvveti ile bağlanan BP kristallerinden pul pul dökülür ve bu katmanlar ışık emici ve yarı iletken özelliklere sahiptir (G. Hu ve ark., 2017; L. Li ve ark., 2016). Liang ve arkadaşlarının çalışmasında, fototermal kaynaklı immünoterapide kullandığı BPQD'lerle kaplı eritrosit membranları (RM'ler) üreterek siyah fosforlu kuantum nokta-eritrosit membran nanovezikülü (BPQD-RMN) programlanmış hücre ölüm proteini

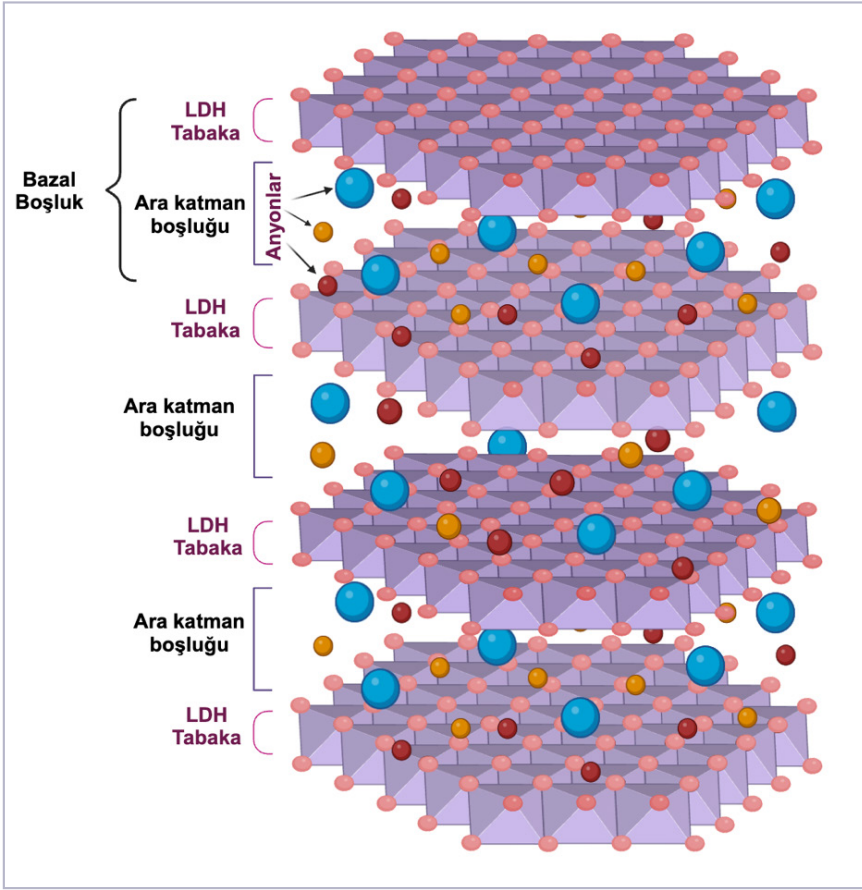
1 (PD-1) antikoru (aPD-1) ile konjuge etmişler ve bir meme tümörünün büyümesini engellediğini bildirmişlerdir (Liang ve ark., 2019). Kanser hücresi zarlarının BPQD kaplamasının tümör hücresi metastazını sınırlamada etkili olduğu kanıtlanmıştır. Ye ve ark. tarafından yapılan bir araştırma, bu teknoloji ile elde edilen aşımın *in vivo* deneylerde umut verici sonuçlar verdiğini bildirdi. Bu atılım, kanser tedavisinde devrim yaratma ve bizi bir tedavi bulmaya bir adım daha yaklaştırma potansiyeline sahiptir (Ye ve ark., 2019).



Şekil 3. Siyah fosforun yapısı (Biorender ile oluşturuldu).

2.2.1.3. Katmanlı Çift Hidroksitler (LDH)

Katmanlı çift hidroksitler (LDH'ler), ara katmanda bulunan hidroksit ve anyon katmanlarından oluşur (Şekil 4) (Gao ve Yan, 2017a; Wang ve O'Hare, 2012). LDH'ler, pH tarafından tetiklenen ilaç iletimi ile katmanlar arası anyon değişimi ve yüksek yük yoğunluğu gösterir (Gao ve Yan, 2018; Mei ve ark., 2018). LDH'ler, dikkat çekici düşük toksisite özellikleri sayesinde ilaç dağıtımını için en kapsamlı şekilde araştırılan 2B nanomalzemelerdir. Benzersiz özellikleri, onları ilaçları hedeflenen hücelere güvenli ve etkili bir şekilde iletmek için ideal adaylar haline getirir ve minimum yan etki ile maksimum terapötik fayda sağlar (Gao ve ark., 2018; Gao ve Yan, 2017b). Bu malzemeler, pozitif yüzey yükleri sayesinde yüzey değişikliği olmadan negatif yüklü biyolojik membranlardan kolayca geçebilir ve negatif yüklü ilaçlar için etkili bir dağıtım aracı olarak kullanılarak emilimi kolaylaştırabilirler (Asif ve ark., 2017; Gao ve ark., 2014; Zhao ve ark., 2014). Bu özellikler, negatif LDH'li ilaçların terapötik etkilerle ilaç dağıtımında başarılı olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda, pozitif yüzey yükü, biyolojik moleküllerin taşınmasında büyük potansiyel gösterir. LDH'lerin hedefli ilaç dağıtımını için bir taşıyıcı araç olarak kullanılabileceği ilk olarak 1999'da kabul edildi (Choy ve ark., 1999). Anyon değişimi ve asit bozunması yoluyla, LDH'lerin DNA'nın hücresel alımını ve stabilitesini arttırdığı gösterilmiştir (Desigaux ve ark., 2006; Mei ve ark., 2020). LDH'ler ayrıca kanser tedavilerinde ilaç dağıtım araçları olarak kullanılmıştır ve LDH bazlı aşımın melanom tedavisinde etkili immünoterapi uyguladığı bildirilmiştir (Yan ve ark., 2018).



Şekil 4. Katmanlı çift hidroksitlerin yapısı (Biorender ile oluşturuldu).

2.2.1.4. Geçiş Metal Dikalkojenitleri (TMD)

MX_2 , geçiş metali dikalkojenitleri (TMD'ler) için genel formüldür. Metal atomlarının farklı koordinasyonu nedeniyle çok farklı yapılara sahip fazlar göstermesinin yanı sıra kimyasal ve optik özellikleri ile düzlemsel bir yapı göstermektedir (Mak ve Shan, 2016; Manzeli ve ark., 2017). Mekanik çürütme, kimyasal interkalasyon ve kimyasal buhar biriktirme gibi çeşitli yöntemlerle üretilerek geliştirilmesi, görüntüleme gibi birçok biyomedikal alanda umut verici bir potansiyel sunmaktadır. (Choi ve ark., 2017; Shi ve ark., 2015). En klasik TMD'ler olan tungsten disülfür (WS_2) ve Molibden disülfür (MoS_2), benzersiz kimyasal ve optik özellikleri nedeniyle geniş çapta araştırılmıştır. Görüntüleme kılavuzluğunda kanser tedavisinde MoS_2 , PEG'den türetilen MoS_2 kullanılarak verilen DOX, SN38 ve Ce6 dahil olmak üzere ilaç moleküllerini iletmek için kullanılır (Chen ve McDonald, 2016; Yadav ve ark., 2019). WS_2 gibi TMD'lerde ilaç yükleme performansı ile yapılan bir çalışmada, metilen mavisinin kanser hücrelerine başarıyla iletiildiği bildirilmiştir (Yong ve ark., 2014).

2.2.1.5. Geçiş Metal Oksitleri (TMO)

Geçiş metali oksitlerinde (TMO), 2p orbitallerindeki oksijen anyonundan elektronlar doldurulur ve sıkı d orbitallerine sahip TMO'larda değerlik bantları oluşur (Mei ve ark., 2019). Geçiş metallere sahip bu iletim bantları, elektronik ve manyetik özelliklerin belirlenmesinde foto ve termokromik alanlarda geniş uygulamalar sağlar (Song ve ark., 2018). Mangan dioksit (MnO_2), titanyum dioksit (TiO_2), çinko oksit (ZnO) ve demir (II, III) oksit gibi TMO nano katmanları, ferromanyetik ve redoks özelliklerinden dolayı dağılımlarını kolaylaştırır (Meyer ve ark., 2012). TMO'ların yeni geliştirilen yapay enzim aktivitesi bir kanser tedavi yöntemi olarak bildirilmiştir (Zeng ve ark., 2018). MnO_2 , geniş bir yüzey alanına ve güçlü moleküler bağlara sahip özellikler sunar. Kanser tedavilerinde farklı sinyallere yanıt veren, hedefli ilaç dağıtımı için umut verici bir 2B nanomalzemedir. Choi ve ark., MnO_2 bazlı kontrollü ilaç salınımı için floresan off-on davranışı sergileyen ve hedeflenen kanser tedavisi için yan etkileri büyük ölçüde azaltan bir dağıtım sistemi tasarlamıştır (Choi ve ark., 2018a; Choi ve ark., 2018b). Başka bir çalışmada, çoklu ilaç direnci (MDR) için MnO_2 'yi albümin nanopartikülleri (BMDN) ile değiştirerek albümin- MnO_2 sentezlenerek DOX dağıtımına dahil edilmiştir. Sentezlenen albümin- MnO_2 , ilacın MDR tümör hücrelerine verilmesini kolaylaştırmış ve bir MRI kontrast maddesi olarak manyetik rezonans görüntüleme (MRI) kılavuzluğunda kanser tedavisine olanak sağlamıştır (Zhang ve ark., 2017a; Zhang ve ark., 2017b). TiO_2 , diğer TMO'lara kıyasla geniş bant aralığı ve yarı iletken özellikleri nedeniyle biyomedikal araştırmalarda büyük ilgi görmüştür (Kulkarni ve ark., 2015). Cai ve ark., ultraviyole (UV) kaynaklı ilaç salınımını gösteren yeni bir manyetik TiO_2 sentezlemiştir. Kimyasal olarak daha kararlı olan bu nanotaşıyıcı, çeşitli ilaçlara karşı güçlü bir kovalent bağ göstermiştir (Cai ve ark., 2017). Yakın tarihli bir çalışmada, araştırmacılar üç aşamalı bir işlem kullanarak hibrit TiO_2 /polimer amfifilik nanopartikülleri sentezlediler. Elde edilen nanopartiküller kontrollü bir boyut dağılımına sahip ve mükemmel ilaç salım yeteneği sergilemiştir. İlacın salınım oranı başlangıçta ilk saatte %40'a ulaştı fakat sentezlenen materyal ile zamanla azalmıştır (Kushnirov Melnitzer ve Sosnik, 2018).

2.2.1.6. Geçiş Metal Karbürleri (TMC)

MXene olarak da adlandırılan geçiş metali karbürleri (TMC), yenilikçi bir nano platform olarak ortaya çıkmıştır (Huang ve ark., 2018). Titanyum Karbür (Ti_3C_2), molibdenum karbür (Mo_2C), vanadyum karbür (V_2C), niobiyum karbür (Nb_2C), zirkonyum karbür (Zr_3C_2), tantal karbür (Ta_4C_3) gibi genellikle MXene'ler, C veya N'den oluşan erken bir geçiş metaline sahip olan M_3X , M_3X_2 , M_3X_3 ve M_4X_3 gibi tipik formüllere sahip nanomalzemelerdir (Lin ve ark., 2018). Esnek bileşenlere sahip olan MXene, ayarlanabilir ve kontrol edilebilir özellikleri sayesinde görüntüleme, biyoalgılama ve biyogüvenlik gibi alanlarda büyük ilgi görmüştür (Soleymaniha ve ark., 2019). Han ve ark. yüksek ilaç yüklemeye kapasitesine sahip soya fasulyesi fosfolipid ile modifiye edilmiş Ti_3C_2 MXene'in DOX taşıyıcıları olarak güçlü pH ve NIR lazer tarafından tetiklenerek ilaç salınımı sergilediğini bildirmiştir (Han ve ark., 2018). Aynı zamanda, sinerjik kanser tedavisi için kemoterapötik yüklemeye için hedeflenen MXene'ler geliştirilmiştir (Shahzad ve ark., 2018). Son çalışmalar, ilaçları MXene nano tabakalarına yükleyerek bir kemoterapi/fotodinamik tedavi/fototermal terapi (Kemo/PDT/PTT) üç modelli terapötik sistemin tasarımını bildirmiştir (Liu ve ark., 2017a; Liu ve ark., 2017b).

2.2.1.7. İlaç Taşıyıcı Sistemlerdeki Diğer 2B Nanomalzemeler

2B nanomalzemeler arasında, ilaç dağıtım sistemleri için umut verici başka malzemeler de vardır. Bunlardan grafit karbon nitrür (gC_3N_4), fotoabsorpsiyon, floresan, fizyolojik stabilite ve biyoyoumluluk özellikleri nedeniyle 2012'deki ilk üretiminden bu yana ilgi çekici bir nanomalzeme olmuştur (Jiang ve ark., 2017; Zheng ve ark., 2012). Eşsiz özellikleri nedeniyle kanser tedavisi, biyoyalıma ve ilaç dağıtımı alanlarında umut vaat ediyor. Yapılan çalışmalarda gC_3N_4 'ün DOX ile yüksek ilaç yüklem kapasitesi gösterdiği bildirilmiştir. Aynı zamanda, gC_3N_4 'ün floresan yeteneği, ilaç dağıtım süreçlerinde tanısıl amaçlar için görselleştirilmesine olanak tanır (Liu ve ark., 2018a; Liu ve ark., 2018b; Liu ve ark., 2018c; Liu ve ark., 2018d). Bunun dışında paladyum (Pd) ve çinko hidroksit ($Zn(OH)_2$) gibi 2 boyutlu nanomalzemeler de ilaç taşıyıcı sistemlerde dikkat çeken malzemelerdir. Yapılan bir çalışmada Pd nanotabakalarının transformasyon yeteneklerini kullanarak, bunları değiştirerek ve geliştirerek, DOX absorpsiyonunu ve NIR ışığını tetikleyerek ısı ile ilaç salınımını sağlayarak kemoterapötik etkinlik gösterdikleri bildirilmiştir (Fang ve ark., 2012). Başka bir çalışmada, kanser hücrelerini hedef alan kemoterapiyi desteklemek için pH yanıtı tarafından tetiklenen $Zn(OH)_2$ ilaç taşıyıcıları geliştirilmiştir (Cai ve ark., 2016). Yeni bir ilaç dağıtım sistemi olarak Ji ve ark., 2B bor nanomalzemeleri kullanarak bir kemoterapötik ajan olan DOX'u yükleyerek kanser için yeni bir sistem geliştirdi (Ji ve ark., 2018). DOX ilavesi için pH ile tetiklenen ilaç salım davranışı sergileyen 2B PEG ile antimonid (AM), 2B silika ve 2B kaolinit gibi biyoyumlu malzemeler, kanser tedavisinde de kullanılmak üzere ilaç taşıyıcı sistemlerde kullanılmıştır (Lin ve ark., 2019; Tao ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2017a; Zhang ve ark., 2017b).

2.2.2. İlaç Taşıyıcı Sistemlerde 2B Hibrit Nanomalzemeler

Hibrit malzeme sistemleri, ısı, ışık, pH, ultrason, manyetizma ve NIR gibi uyarıcı faktörlerle farklı bileşenlerin sinerjik etkileri yoluyla ilaç salınımını kontrol edebilen sistemlerdir (Patra ve ark., 2018). NIR ile aktive olan bir ilaç taşıyıcı sistemde yapılan bir çalışmada, NIR ile indüklenen tümör hipertermisi için DOX, polilaktik asidin (PLA) N-Metil-Pirolidon (NMP) içinde çözülmesiyle elde edilen oleosol ile karıştırılmış ve PLGA/MoS₂/DOX (PMD) oleosol üretilmiştir. Üretilen PMD oleosol tümörlere invaziv yöntemlerle uygulanmış ve NIR maruziyeti sonucu DOX salınarak tümör sıcaklığı artırılmıştır. Sonuç olarak, PMD oleosol ilaç dağıtım implantı, çoklu uyarıcılara yanıt olarak ilaç salınımını göstermiş ve tümör terapötik için yan etkileri azaltmıştır (Wang ve ark., 2015). Başka bir çalışmada, tümör terapötik etkinliği için kemoterapi ve fototermal tedavinin sinerjik etkisini anlamak için, fototermal olarak indüklenen bir ilaç dağıtım sistemi için ultrasonikasyon yoluyla BSA proteini kullanılarak pul pul dökülme işlemi ile resveratrol (RV) yüklem kapasitesine sahip MoS₂ nanotabakaları elde edilmiştir. Daha sonra, NIR yardımıyla RV molekülleri serbest bırakılarak tümör sıcaklığı artırıldı ve insan Burkitt lenfoma hücre hattı Raji hücre ölümü gözlemlendi (Deng ve ark., 2016). Zhang ve ark. kanserde ilaç dağıtım için daha yeni bir 2B nanomalzeme olan kaolinit nanokil kullanarak DOX yüklemesi ile bir anti-kanser dağıtım sistemi geliştirmiştir. DOX yüklü 2B kaolinit nanokil, nötr durumlara kıyasla asidik koşullarda yüksek biyoyoumluluk, düşük toksisite ve güçlü bir salınımın yanı sıra artan terapötik etkinlik göstermiştir (Zhang ve ark., 2017b).

Sonuç olarak, yüksek ilaç yüklemesi, hedef bölge için dış etkenlerle tetiklenebilen ilaç salınımı ve 2B nanomalzemeler gibi hibrit kullanımlarından kaynaklanan sinerjik etki nedeniyle sinerjik terapötik etkinin etkinliği açısından tedavi yaklaşımları için birçok avantaja sahiptir. Bu nedenle, kanser gibi birçok hastalığın tedavisi için 2B hibrit nanomalzemelerin potansiyeli oldukça yüksektir.

2.3. Kanser Terapötiklerinin Veriminde 2B Nanomalzemeler

Kanser, dünyada önemli bir sağlık yükü olarak yüksek ve ciddi mortalite ve morbiditeye sahip bir hastalıktır. Oldukça dinamik ve heterojen olan kanserin hayatta kalma oranı hala düşüktür ve tedavisi çok fazla çaba ve muazzam bir harcama yükü gerektirir. Bu nedenle, kanserin önlenmesi ve tedavisi için derin araştırmalar ve yeni stratejiler gerekmektedir. Tasarlanmış nanomalzemeler, kişiselleştirilmiş kanser tedavisi için benzersiz fırsatlar sunar. Özellikle, 2B nanomalzemeler kanser teşhisi ve tedavisi için oldukça umut verici adaylardır. Yüksek yüzey alanları, ultra ince yapıları, iletken, değiştirilebilir ve biyouyumlu olmaları nedeniyle kanser tedavilerinde büyük ilgi görmüşlerdir. Son zamanlarda dikkat çeken çeşitli manyetik nanomalzemeler olan kobalt bazlı nanomalzemeler ile yapılan bir çalışmada, kanser hücrelerini etkili bir şekilde yok edebilen Ti_3C_2 ve kobalt nanotellerin (CoNW'ler) ultrasonik ilavesi ile elde edilen bir nanotaşıyıcı heterobağlantısı bildirilmiştir. Bununla birlikte, bir antikanser model ilaç olan doksorubisin hidroklorür, Ti_3C_2 -CoNW nanotransporter heterobağlantılarına yüklenmiş ve yüksek ilaç yükleme özellikleri göstermiştir. Aynı zamanda, pH ve NIR ışınlanması ile tetiklenmiş ve ilaç salınımı göstermiştir. Sonuç olarak, sinerjik terapide mükemmel üstünlük sergileyen terapötik bir uygulama olarak umut verici olduğu bildirilmiştir (Liu ve ark., 2020). Kanser tedavileri üzerine çok fazla araştırma yapılmış olmasına rağmen, grafenin toksisitesi üzerine birçok çalışma yapılmıştır ve tutarsızlıklar gündemde kalmaktadır. Bu nedenle, kontrollü, hedefli ve çok işlevli ilaç dağıtım uygulamalarındaki son gelişmelerin çoğunda grafenin gelişimi üzerine birçok çalışma yapılmıştır (Zhang ve ark., 2017). Vovusha ve ark., G'nin GO'dan daha iyi bir DOX bağlayıcısı olduğunu bulmuştur. Grafen ve GO üzerindeki DOX adsorpsiyon yoğunluğunu anlamak için yoğunluk fonksiyonel teorisi hesaplamaları, floresan ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi kullanmışlardır (Vovusha ve ark., 2018). 2B h-BN nanomalzemelerin kemoterapide uygulanması, onları kanser tedavisi için uygun bir araç haline getirir. Son çalışmalar, h-BN'nin nanotaşıyıcılar ve nanodönüştürücüler olarak biyomedikal uygulamalar için umut verici bir aday olduğunu göstermektedir (Sharker, 2019). Lösemi, rahim ağzı ve meme kanseri gibi hematolojik maligniteler için reçete edilen metotreksat (MTX), ilk antikanser ilaçlardan biridir ve klinikte kullanılmasına rağmen yüksek dozları, kısa plazma yarılanma ömrü ve ilaç direnci gelişimine yatkınlığı nedeniyle kullanımında bazı zorluklarla karşılaşmaktadır (Choi ve ark., 2014; Khan ve ark., 2012). Bu zorlukların üstesinden gelmek amacıyla, katmanlı çift hidroksit ve grafen türevleri gibi 2B nano araçlarla MTX hibridizasyonu, olumlu antikanser sonuçları vermiştir (An ve ark., 2013; Choi ve ark., 2014; Choi ve ark., 2018).

Sonuç olarak, çeşitli kanser tedavilerinde yaygın olarak kullanılan bir antikanser ilacı olan DOX, hücre içine almıştı ile DNA'ya yerleşerek replikasyonu ve hücre bölünmesini engelleyerek çalışır (Zhou ve ark., 2014). Bu nedenle, kanser tedavisinde kanser hücrelerine hedefe yönelik DOX uygulaması, sağlıklı hücreleri bu olumsuzluklardan korumak için son derece önemlidir. Kanser tedavisi olarak kullanılan ilaçların sağlıklı hücrelere verdiği zararı önlemek için hedefe yönelik tedavi seçenekleri araştırılmalıdır. Bu noktada, antikanser terapötiklerin kanser hücrelerine hedefli olarak verilmesi için 2B nanomalzemelerin kullanılması büyük avantaj sağlayabilir.

2.4. 2B Nanomalzemeler ile Akıllı İlaç Dağıtım Sistemleri

Akıllı ilaç dağıtım sistemleri (SDDS'ler), sinyalleri ileten ve bunlara yanıt veren, dağıtımı başlatabilen ve otomatik olarak durdurabilen, ilaçların istenen uygun alana istenen miktar ve sürede ulaştırılmasını amaçlayan bir sistemdir (Fang ve ark., 2015). SDDS'nin eczacılıkta uygulama alanı oldukça

geniştir ve zengin araştırma içeriğine sahiptir (Prasanna ve ark., 2018). Bir taşıma sistemi olarak bu sistemlerde taşıyıcılar kullanılmaktadır ve bu akıllı taşıyıcılar polimerler, hidrojeller, lipozomlar, nanoyapılar, nanotabakalar, miseller ve nanopartiküller gibi 2B nanomalzemeleri içermektedir (Cajot ve ark., 2013; Chen ve ark., 2016; Fang ve ark., 2015; Fernandes ve ark., 2018; Hamidi ve ark., 2012; Avcı ve Moghimi., 2017; Ye ve ark., 2018). Kanser tedavisi için akıllı ilaç dağıtım sistemleri üzerinde çalışmalar hala devam etmektedir. Bununla birlikte, kemoterapi ve immünoterapi gibi geleneksel nano-akıllı ilaç dağıtım sistemleri, tedavinin etkinliğini engelleyen sınırlamalara sahiptir. Bu sınırlamalardan biri de sistem tarafından taşınabilecek ilaç miktarının düşük olmasıdır (Hossen ve ark., 2019; Shen ve ark., 2017). Bu noktada 2B malzemeler, fotodinamik özellikleri, ısı dönüşüm verimliliği ve yüksek ilaç yüklemesi için geniş bir yüzey alanı sağlayarak benzersiz özellikleri sayesinde tıbbi uygulamalarda çeşitli avantajlar sunmaktadır. 2B nanomalzemelerin benzersiz temel özelliklerinden biri, ilaç dağıtımında yüksek verimlilik için geniş bir yüzey alanı sağlayan katmanlı yapılarıdır (Chen ve ark., 2017; Peng ve ark., 2018; Xie ve ark., 2018). Örneğin, NP'ler, ilacın kanda taşınmasındaki stabilitesini artırarak hücre emilimini iyileştirir ve biyoyoumluluğu artırır (Zeng ve ark., 2018). Çevresel sinyallerdeki değişikliklere yanıt olarak konformasyonel değişikliklerle, akıllı NP'ler hedef doku veya hücrelerdeki ilaç konsantrasyonunu artırarak veya azaltarak önemli bir rol oynamaktadır. 2B nanomalzemelerin kapsüllemesi, polimerler, hidrojeller, miseller ve lipozomlar gibi çeşitli tekniklerle uygulanabilir. Fan ve ark., hummers yöntemi ile saflaştırılmış doğal grafiten GO hazırlamış ve amin grupları eklemek için adipik asit dihidrazid ile işlevselleştirmiştir. Sodyum aljinatı (SA), amid bağları kullanılarak GO'ya kovalent olarak konjuge ederek sonuçta tümör mikro ortamlarında daha yüksek ilaç salınımı ve fizyolojik koşullar altında düşük ilaç salınımını bildirmişlerdir (Fan ve ark., 2016). Ek olarak, Zhang ve ark. model ilaç olarak doksorubisin hidroklorür kullandıkları, GO bazlı çapraz bağlara sahip hidrojel içine kovalent olmayan bağlar yerleştirerek bir supramoleküler hibrit nano hidrojel hazırlamışlardır. Hidrojelin, *in vivo* deneylerde hücrelerin çoğalmasını ve tümörün büyümesini engellediğini göstermiştir (Zhang ve ark., 2018).

Sonuç olarak, akıllı ilaç dağıtım sistemleri, çeşitli bilimsel ve teknolojik disiplinlere yayılarak çoğalmakta ve çevresel sinyallerdeki değişikliklere yanıt olarak fiziksel veya kimyasal özelliklerinde yaptıkları değişimlerle hastalığın prognozuna göre uyarlanmış ilaçları, doğru hedeflere ve uygun hızlarda akıllıca salmaya devam etmektedir (Zhang ve ark., 2020).

2.5. 2B Nanomalzemelerin Gen Dağıtım Araçları Olarak Kullanımı

Yeni nesil tedavilerden biri de sundukları semptomlardan ziyade hastalıkların tedavisine umut verici bir yaklaşım olan gen terapisi. DNA ve RNA'nın yapısal özellikleri, nano boyutlu taşıyıcı araçlara sahip gen taşıyıcı sistemler gerektirir. Bu kapsamda özellikle kanser tedavilerinde gen transferi için çeşitli 2B nanomalzemeler geliştirilmiştir. Bu materyaller, gen tedavilerinde yaygın olarak kullanılan viral vektörlerin kullanımının karşılaştığı sınırlamaları aşarak, hazırlama kolaylığı, yeniden kullanılabilirlik, biyoyoumluluk, düşük toksisite ve düşük patojeniteleri sayesinde gen ve ilaç iletimi için çok güçlü bir alternatif olarak tercih edilmektedir. Gen iletimi ile ilgili bir çalışmada, Kou ve ark. MoS₂'nin yüzey yükünü artırmak için polieterimid (PEI) ile modifiye ederek pozitif yüklü MoS₂-PEG-PEI üretilmiş gen iletimi için siRNA'lı hücrelere başarılı bir şekilde nüfuz ettiklerini bildirmişlerdir. Sonuç olarak, bu nano vektör, viral olmayan 2B doğası, düşük sitotoksitesitesi ve yüksek transfeksiyon verimliliği nedeniyle gen dağıtımında gelecekteki uygulamalar için umut vaat etmektedir. Ek olarak, serumsuz koşullar gerektirmez ve geçiş metali dikalkojenitleri içermezler

(Kou ve ark., 2014). Başka bir çalışmada, düşük moleküler ağırlıklı BPEI ve rGO'nun plazmit DNA (pDNA) ile stabil bir kompleks oluşturmak için hidrofilik bir PEG ayırıcı ile birleştirilmesiyle fototermal olarak kontrol edilen bir PEG-BPEI-rGO gen taşıyıcısı geliştirildi ve sitotoksitesinde olmadan NIR ışınlanması tarafından tetiklenen ısıyla geliştirilmiş bir gen transfeksiyon etkinliği gösterilmiştir. Sonuç olarak, fototermal olarak kontrol edilen geliştirilen gen taşıyıcısının, hedeflenen gen iletimi potansiyeline sahip olduğu bildirilmiştir (Kim H. ve Kim W.J., 2014). Bir başka çalışmada, Cheang ve ark. biyomimetik sentetikler kullanarak grafen oksit-hidroksiapatit (GO-HAp) nanokompozitler üretmiş ve bu çalışmanın bir devamı olarak, GO-HAp nanokompozitlerinin DNA plazmidini meme hücrelerine verimli bir şekilde iletebildiğini bildirmişlerdir (Cheang ve ark., 2018; Wen ve ark., 2014). Ek olarak, 2B nanomalzemelerin biyoyumlu polimerlerle hibrid konjugasyonu, genlerin paketlenmesinin yanı sıra transfeksiyon verimliliğini de arttırmaktadır. Ayrıca kanser tedavilerinde etkin bir şekilde kullanılırken, aynı zamanda gen dağıtım sistemlerine düşük immünojenisite ve çoklu gen iletimi gibi çeşitli avantajlar sağlamaktadır (Ashfaq ve ark., 2022).

3. SONUÇ

İlaç endüstrisinde ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi son zamanlarda çok popüler hale gelmiştir. Geleneksel ilaç dağıtım sistemleri, tabletler, kapsüller ve emülsiyonlar gibi geleneksel dozaj formlarının birçok dezavantajı vardır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmaya yönelik araştırmalar, biyoyararlanımı ve hasta uyumunu iyileştirmenin yanı sıra toksisiteyi ve yan etkileri azaltma eğiliminde olmuştur. Bu noktada mevcut ilacın yeni bir salım teknolojisine dönüştürülmesi ile ilaçların güvenilirlik ve etkinlik durumu olumlu yönde değiştirilebilir. Hasta uyumunun en yüksek olduğu uygulama yolu olan oral uygulama, popüler ve kolay bir uygulama yöntemi olmasına rağmen, suda çözünürlüğünün zayıf olması ve geçirgenliğinin düşük olması gibi sınırlamaları vardır. Bu noktada, nanoteknoloji son zamanlarda ilaç dağıtımında etkileyici bir büyüme göstermiştir. Çok çeşitli malzeme ve formülasyon özelliklerinde mevcut olan nanopartiküller çok yönlü ve boyut ve şekil olarak kontrol edilebilirler. Bu da hedeflenen teslimat ve tetiklenmiş salım için işlevselleştirmenin yanı sıra çeşitli aktif maddelerin yüklenmesine izin verir. Belirli bir hedef alana yönlendirme yapılmasına olanak sağlayan bu sistem araçları sayesinde toksisite veya istenmeyen etkilerin engellenmiş olacaktır. Aynı zamanda bu araçlar, istenilen farklı amaçlara göre modifiye edilebilme imkânı sunarlar. Son zamanlarda ilaç taşıyıcı sistemlerde yaygın olarak kullanılan 2B nanomalzemeler, biyoyumluluk, düşük toksisite, yüksek yüzey alanı gibi özellikleri sayesinde yüksek terapötik yüklemeye izin verirler. Dahası, bazı 2B nanomalzemeler, harici uyarılarla veya isteğe bağlı olarak tetiklenen terapötik salımı kontrol etmektedir. Yüksek yüzey alanı tarafından sağlanan çok sayıda temas noktası, yüksek düzeyde ilaç yüklemesine ve kontrollü salım için artan yüzey etkileşimine izin verir. Böylece, ilaç moleküllerinin kararlı ve duyarlı salınımını teşvik eder. Ayrıca, her 2B nanomalzemenin fiziksel, kimyasal ve farklı özellikleri nedeniyle terapötik dağıtım sistemlerinin kontrol edilebilirliğini de sağlar.

İlaç geliştirmedeki ilerlemenin ve mevcut olanların iyileştirilmesinin, ilaç dağıtımında yeni yollar açtığı açıktır. Bununla birlikte, daha fazla iyileştirme potansiyeli bulunmasına rağmen klinik dönüşüm, yüksek üretim maliyeti ve sınırlı ilaç bulunabilirliği gibi hala dikkat gerektiren bazı zorluklar vardır. Son olarak, herhangi bir yeni ilaç dağıtım sistemi, insan kullanımı için onay almadan önce kapsamlı bir karakterizasyon ve araştırmadan geçmelidir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaç” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abbas, S., Uzair, B., Sajjad, S., Leghari, S. A. K., Noor, S., Niazi, M. B. K., ... & Iqbal, H. Dual-functional green facile CuO/MgO nanosheets composite as an efficient antimicrobial agent and photocatalyst. *Arabian J. for Sci. Eng.* 47(5), 5895-5909. (2022)
- Abdolhosseinzadeh, S., Asgharzadeh, H., & Seop Kim, H. Fast and fully scalable synthesis of reduced graphene oxide. *Sci. Rep.* 5(1), 10160. (2015)
- Adepu, S., & Ramakrishna, S. Controlled drug delivery systems: current status and future directions. *Molecules.* 26(19), 5905. (2021)
- Akhtar, N. Vesicles: a recently developed novel carrier for enhanced topical drug delivery. *Curr. Drug Deliv.* 11(1), 87-97. (2014)
- Alibolandi, M., Mohammadi, M., Taghdisi, S. M., Ramezani, M., & Abnous, K. Fabrication of aptamer decorated dextran coated nano-graphene oxide for targeted drug delivery. *Carbohydr. Polym.* 155, 218–229. (2017)
- Alimohammadi, F., Sharifian Gh, M., Attanayake, N. H., Thenuwara, A. C., Gogotsi, Y., Anasori, B., & Strongin, D. R. Antimicrobial properties of 2D MnO₂ and MoS₂ nanomaterials vertically aligned on graphene materials and Ti₃C₂ MXene. *Langmuir.* 34(24), 7192-7200. (2018)
- An, J., Gou, Y., Yang, C., Hu, F., & Wang, C. Synthesis of a biocompatible gelatin functionalized graphene nanosheets and its application for drug delivery. *Mater. Sci. Eng. C.* 33(5), 2827-2837. (2013)
- Ashfaq, M., Talreja, N., Chauhan, D., Afreen, S., Sultana, A., & Srituravanich, W. Two-dimensional (2D) hybrid nanomaterials for diagnosis and treatment of cancer. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 70, 103268. (2022)
- Asif, M., Liu, H., Aziz, A., Wang, H., Wang, Z., Ajmal, M., ... Liu, H. Core-shell iron oxide-layered double hydroxide: High electrochemical sensing performance of H₂O₂ biomarker in live cancer cells with plasma therapeutics. *Biosens. Bioelectron.* 97, 352–359. (2017)
- Asil, S. M., Ahlawat, J., Barroso, G. G., & Narayan, M. Nanomaterial-based drug delivery systems for the treatment of neurodegenerative diseases. *Biomater. Sci.* 8(15), 4109-4128. (2020)
- Azimzadeh, M., Rahaie, M., Nasirizadeh, N., Ashtari, K., & Naderi-Manesh, H. An electrochemical nano biosensor for plasma miRNA-155, based on graphene oxide and gold nanorod, for early detection of breast cancer. *Biosens. Bioelectron.* 77, 99–106. (2016)
- Babu, K. N. Osmotic drug delivery systems: A review. *World J. Pharm. Pharm. Sci.* 122-132. (2019)
- Bao, H., Pan, Y., Ping, Y., Sahoo, N. G., Wu, T., Li, L., ... & Gan, L. H. Chitosan-functionalized graphene oxide as a nanocarrier for drug and gene delivery. *Small.* 7(11), 1569-1578. (2011).
- Bhattarai, M., & Gupta, A. K. Fast dissolving oral films: a novel trend to oral drug delivery system. *Sunsari Technical College J.* 2(1), 58-68. (2015)
- Cai, L., Li, J., Wang, S., Zhao, M., Zhao, B., Jiang, C., & Kong, W. Functionalization of magnetic titanium dioxide for targeted drug delivery and UV-induced release. *Chem. Res. Chin. Univ.* 33, 294–297. (2017)
- Cai, R., Yang, D., Wu, J., Zhang, L., Wu, C., Chen, X., ... Yan, Q. Fabrication of ultrathin Zn(OH)₂ nanosheets as drug carriers. *Nano Res.* 9, 2520–2530. (2016)
- Cajot, S., Schol, D., Danhier, F., Pr at, V., Gillet De Pauw, M. C., & J er me, C. In Vitro Investigations of Smart Drug Delivery Systems Based on Redox-S sensitive Cross-Linked Micelles. *Macromol. Biosci.* 13(12), 1661-1670. (2013)
- Chandrasekaran, R., Krishnan, M., Bupesh, G., Chacko, S., Gawade, O., Hasan, S., ... & Sagadevan, S. Prospective features of functional 2D nanomaterial graphene oxide in the wound healing process. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 104352. (2023).
- Cheang, T. Y., Lei, Y. Y., Zhang, Z. Q., Zhou, H. Y., Ye, R. Y., Lin, Y., & Wang, S. Graphene oxide-hydroxyapatite nanocomposites effectively deliver HSV-TK suicide gene to inhibit human breast cancer growth. *J. Biomater. Appl.* 33(2), 216-226. (2018)
- Chen, C., Zheng, P., Cao, Z., Ma, Y., Li, J., Qian, H., ... & Yang, X. PEGylated hyperbranched polyphosphoester based nanocarriers for redox-responsive delivery of doxorubicin. *Biomater. Sci.* 4(3), 412-417. (2016)
- Chen, W., Ouyang, J., Liu, H., Chen, M., Zeng, K., Sheng, J., ... & Guo, S. Black phosphorus nanosheet-based drug delivery system for synergistic photodynamic/photothermal/chemotherapy of cancer. *Adv. Mater.* 29(5), 1603864. (2017)

- Chen, X., & McDonald, A. R. Functionalization of two-dimensional transition-metal dichalcogenides. *Adv. Mater.* 28, 5738–5746. (2016)
- Chen, Y., Fan, Z., Zhang, Z., Niu, W., Li, C., Yang, N., ... & Zhang, H. Two-dimensional metal nanomaterials: synthesis, properties, and applications. *Chem. Rev.* 118(13), 6409–6455. (2018)
- Cheng, L., Wang, X., Gong, F., Liu, T., & Liu, Z. 2D nanomaterials for cancer theranostic applications. *Adv. Mater.* 32(13), 1902333. (2020)
- Choi, C. A., Lee, J. E., Mazrad, Z. A. I., In, I., Jeong, J. H., & Park, S. Y. Redox- and pH-responsive fluorescent carbon nanoparticles-MnO₂-based FRET system for tumor-targeted drug delivery in vivo and in vitro. *J. Ind. Eng. Chem.* 63, 208–219. (2018a)
- Choi, G., Kwon, O. J., Oh, Y., Yun, C. O., & Choy, J. H. Inorganic nano vehicle targets tumor in an orthotopic breast cancer model. *Sci. Rep.* 4(1), 4430. (2014)
- Choi, G., Kim, T. H., Oh, J. M., & Choy, J. H. Emerging nanomaterials with advanced drug delivery functions; focused on methotrexate delivery. *Coord. Chem. Rev.* 359, 32–51. (2018)
- Choi, J. R., Yong, K. W., Choi, J. Y., Nilghaz, A., Lin, Y., Xu, J., & Lu, X. Black phosphorus and its biomedical applications. *Theranostics.* 8, 1005–1026. (2018b)
- Choi, W., Choudhary, N., Han, G. H., Park, J., Akinwande, D., & Lee, Y. H. Recent development of two-dimensional transition metal dichalcogenides and their applications. *Mater. Today.* 20, 116–130. (2017)
- Choy, J.-H., Kwak, S.-Y., Park, J.-S., Jeong, Y.-J., & Portier, J. Intercalative nanohybrids of nucleoside monophosphates and DNA in layered metal hydroxide. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 1399–1400. (1999)
- Dang, Y., & Guan, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Mater. Med.* 1, 10–19. (2020)
- Dembereldorj, U., Kim, M., Kim, S., Ganbold, E. O., Lee, S. Y., & Joo, S. W. A spatiotemporal anticancer drug release platform of PEGylated graphene oxide triggered by glutathione in vitro and in vivo. *J. Mater. Chem.* 22(45), 23845–23851. (2012)
- Deng, R., Yi, H., Fan, F., Fu, L., Zeng, Y., Wang, Y., ... & Su, Y. Facile exfoliation of MoS₂ nanosheets by protein as a photothermal-triggered drug delivery system for synergistic tumor therapy. *RSC Adv.* 6(80), 77083–77092. (2016)
- Desigaux, L., Belkacem, M. B., Richard, P., Cellier, J., Léone, P., Cario, L., ... Pitard, B. Self-assembly and characterization of layered double hydroxide/DNA hybrids. *Nano Lett.* 6, 199–204. (2006)
- Ding, S., Khan, A. I., Cai, X., Song, Y., Lyu, Z., Du, D., ... & Lin, Y. Overcoming blood–brain barrier transport: Advances in nanoparticle-based drug delivery strategies. *Mater. Today.* 37, 112–125. (2020)
- Elumalai, K., Srinivasan, S., & Shanmugam, A. Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomed. Tech.* 5, 109–122. (2024)
- Fan, L., Ge, H., Zou, S., Xiao, Y., Wen, H., Li, Y., ... & Nie, M. Sodium alginate conjugated graphene oxide as a new carrier for drug delivery system. *Int. J. Biol. Macromol.* 93, 582–590. (2016)
- Fang, W., Tang, S., Liu, P., Fang, X., Gong, J., & Zheng, N. Pd nanosheet-covered hollow mesoporous silica nanoparticles as a platform for the chemo-photothermal treatment of cancer cells. *Small.* 8, 3816–3822. (2012)
- Fang, Z., Wan, L. Y., Chu, L. Y., Zhang, Y. Q., & Wu, J. F. ‘Smart’ nanoparticles as drug delivery systems for applications in tumor therapy. *Expert Opin. Drug Deliv.* 12(12), 1943–1953. (2015)
- Fernandes, L. F., Bruch, G. E., Massensini, A. R., & Frézard, F. Recent advances in the therapeutic and diagnostic use of liposomes and carbon nanomaterials in ischemic stroke. *Front. Neurosci.* 12, 453. (2018)
- Gao, R., Zhao, M., Guan, Y., Fang, X., Li, X., & Yan, D. Ordered and flexible lanthanide complex thin films showing up-conversion and color-tunable luminescence. *J. Mater. Chem. C.* 2, 9579–9586. (2014)
- Gao, R., & Yan, D. Layered host-guest long-afterglow ultrathin nanosheets: High-efficiency phosphorescence energy transfer at 2D confined interface. *Chem. Sci.* 8, 590–599. (2017a)
- Gao, R., & Yan, D. Ordered assembly of hybrid room-temperature phosphorescence thin films showing polarized emission and the sensing of VOCs. *Chem. Commun.* 53, 5408–5411. (2017b)
- Gao, R., & Yan, D. Fast formation of single-unit-cell-thick and defect-rich layered double hydroxide nanosheets with highly enhanced oxygen evolution reaction for water splitting. *Nano Res.* 11, 1883–1894. (2018)
- Gao, R., Mei, X., Yan, D., Liang, R., & Wei, M. Nano-photosensitizer based on layered double hydroxide and isophthalic acid for singlet oxygenation and photodynamic therapy. *Nat. Commun.* 9, 2798. (2018)
- Geim, A. K., & Novoselov, K. S. The rise of graphene. *Nat. Mater.* 6(3), 183–191. (2007)
- Gupta, J., Prakash, A., Jaiswal, M. K., Agarwal, A., & Bahadur, D. Superparamagnetic iron oxide-reduced graphene oxide nanohybrid – A vehicle for targeted drug delivery and hyperthermia treatment of cancer. *J. Magn. Magn. Mater.* 448, 332–338. (2018)

- Hamidi, M., Shahbazi, M. A., & Rostamizadeh, K. Copolymers: efficient carriers for intelligent nanoparticulate drug targeting and gene therapy. *Macromol. Biosci.* 12(2), 144-164. (2012)
- He, L., Sarkar, S., Barras, A., Boukherroub, R., Szunerits, S., & Mandler, D. Electrochemically stimulated drug release from flexible electrodes coated electrophoretically with doxorubicin-loaded reduced graphene oxide. *Chem. Commun.* 53, 4022–4025. (2017)
- Hickey, A. J. Emerging trends in inhaled drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 157, 63-70. (2020)
- Hossen, S., Hossain, M. K., Basher, M. K., Mia, M. N. H., Rahman, M. T., & Uddin, M. J. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. *J. Adv. Res.* 15, 1-18. (2019)
- Hu, D., Zhang, J., Gao, G., Sheng, Z., Cui, H., & Cai, L. Indocyanine green-loaded polydopamine-reduced graphene oxide nanocomposites with amplifying photoacoustic and photothermal effects for cancer theranostics. *Theranostics.* 6(7), 1043. (2016)
- Hunter, A. C., & Moghimi, S. M. Smart polymers in drug delivery: A biological perspective. *Polym. Chem.* 8(1), 41-51. (2017)
- Jain, S., Jain, V., & Mahajan, S. C. Lipid-based vesicular drug delivery systems. *Adv. Pharm.* 1-12. (2014)
- Jayakumar, A., Mathew, S., Radoor, S., Kim, J. T., Rhim, J. W., & Siengchin, S. Recent advances in two-dimensional nanomaterials: properties, antimicrobial, and drug delivery application of nanocomposites. *Mater. Today Chem.* 30, 101492. (2023)
- Ji, X., Kong, N., Wang, J., Li, W., Xiao, Y., Gan, S. T., ... Xiong, Q. A novel top-down synthesis of ultrathin 2D boron nanosheets for multimodal imaging-guided cancer therapy. *Adv. Mater.* 30, 1803031. (2018)
- Jiang, L., Yuan, X., Pan, Y., Liang, J., Zeng, G., Wu, Z., & Wang, H. Doping of graphitic carbon nitride for photocatalysis: A review. *Appl. Catal. B.* 217, 388–406. (2017)
- Kamboj, S., Saini, V., Magon, N., Bala, S., & Jhawar, V. Vesicular drug delivery systems: a novel approach for drug targeting. *Brain.* 1(11). (2013)
- Khan, R., & Irchhaiya, R. Niosomes: a potential tool for novel drug delivery. *J. Pharm. Investig.* 46, 195-204. (2016)
- Khan, Z. A., Tripathi, R., & Mishra, B. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9(2), 151-169. (2012)
- Khizar, S., Alrushaid, N., Khan, F. A., Zine, N., Jaffrezic-Renault, N., Errachid, A., & Elaissari, A. Nanocarriers based novel and effective drug delivery system. *Int. J. Pharm.* 632, 122570. (2023)
- Kim, H., Lee, D., Kim, J., Kim, T. I., & Kim, W. J. Photothermally triggered cytosolic drug delivery via endosome disruption using a functionalized reduced graphene oxide. *ACS Nano.* 7(8), 6735-6746. (2013)
- Kim, H., & Kim, W. J. Photothermally controlled gene delivery by reduced graphene oxide–polyethyleneimine nanocomposite. *Small.* 10(1), 117-126. (2014)
- Kou, Z., Wang, X., Yuan, R., Chen, H., Zhi, Q., Gao, L., ... & Guo, L. A promising gene delivery system developed from PEGylated MoS₂ nanosheets for gene therapy. *Nanoscale Res. Lett.* 9, 1-9. (2014)
- Kulkarni, M., Mazare, A., Gongadze, E., Perutkova, Š., Kralj-Iglič, V., Milošev, I., ... Mozetič, M. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnol.* 26, 062002. (2015)
- Kushnirov Melnitzer, V., & Sosnik, A. Hybrid titanium oxide/polymer amphiphilic nanomaterials with controlled size for drug encapsulation and delivery. *Adv. Funct. Mater.* 28, 1806146. (2018)
- Laffleur, F., & Keckeis, V. Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? *Int. J. Pharm.* 590, 119912. (2020)
- Liang, J., Peng, X., Zhou, X., Zou, J., & Cheng, L. Emerging applications of drug delivery systems in oral infectious diseases prevention and treatment. *Molecules.* 25(3), 516. (2020)
- Lin, H., Qiu, W., Liu, J., Yu, L., Gao, S., Yao, H., ... Shi, J. Silicene: Wet-chemical exfoliation synthesis and biodegradable tumor nanomedicine. *Adv. Mater.* 31, 1903013. (2019)
- Liu, C., Qin, H., Kang, L., Chen, Z., Wang, H., Qiu, H., ... Qu, X. Graphitic carbon nitride nanosheets as a multifunctional nanoplatform for photochemical internalization-enhanced photodynamic therapy. *J. Mater. Chem. B.* 6, 7908–7915. (2018a)
- Liu, D., Yang, F., Xiong, F., & Gu, N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics.* 6(9), 1306. (2016)
- Liu, D., Lin, Z., Tang, H., Deng, S., & Bi, Y. A facile method with low hydrothermal temperature to synthesize TiO₂ as controlled release drug delivery. *Phys. Status Solidi (A).* 215, 1800068. (2018b)
- Liu, J., Dong, J., Zhang, T., & Peng, Q. Graphene-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and cancer therapy. *J. Control. Release.* 286, 64-73. (2018)

- Liu, W., Xu, S., Guan, S., Liang, R., Wei, M., Evans, D. G., & Duan, X. Confined synthesis of carbon nitride in a layered host matrix with unprecedented solid-state quantum yield and stability. *Adv. Mater.* 30, 1704376. (2018c)
- Liu, Y., Han, Q., Yang, W., Gan, X., Yang, Y., Xie, K., ... & Deng, Y. Two-dimensional MXene/cobalt nanowire heterojunction for controlled drug delivery and chemo-photothermal therapy. *Mater. Sci. Eng. C* 116, 111212. (2020)
- Liu, Z., Lin, H., Zhao, M., Dai, C., Zhang, S., Peng, W., & Chen, Y. 2D superparamagnetic tantalum carbide composite MXenes for efficient breast-cancer theranostics. *Theranostics*. 8, 1648–1664. (2018d)
- Luiz, M. T., Dutra, J. A. P., Tofani, L. B., de Araújo, J. T. C., Di Filippo, L. D., Marchetti, J. M., & Chorilli, M. Targeted liposomes: a nonviral gene delivery system for cancer therapy. *Pharm.* 14(4), 821. (2022)
- Mahapatra, A. K., Murthy, P. N., Swadeep, B., & Swain, R. P. Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS): An update from formulation development to therapeutic strategies. *Int. J. Pharmtech. Res.* 6(2), 546-68. (2014)
- Mak, K. F., & Shan, J. Photonics and optoelectronics of 2D semiconductor transition metal dichalcogenides. *Nat. Photonics*. 10, 216. (2016)
- Mandal, S., Bhumika, K., Kumar, M., Hak, J., Vishvakarma, P., & Sharma, U. K. A Novel Approach on Micro Sponges Drug Delivery System: Method of Preparations, Application, and its Future Prospective. *Indian J. Pharm. Educ. Res.* 58(1), 45-63. (2024).
- Manzeli, S., Ovchinnikov, D., Pasquier, D., Yazyev, O. V., & Kis, A. 2D transition metal dichalcogenides. *Nat. Rev. Mater.* 2, 17033. (2017)
- Martinelli, C., Pucci, C., & Ciofani, G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. *APL Bioeng.* 3(1). (2019)
- Mbah, C. C., Builders, P. F., & Attama, A. A. Nanovesicular carriers as alternative drug delivery systems: ethosomes in focus. *Expert Opin. Drug Deliv.* 11(1), 45-59. (2014)
- Mei, X., Hu, T., Wang, Y., Weng, X., Liang, R., & Wei, M. Recent advancements in two-dimensional nanomaterials for drug delivery. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 12(2), e1596. (2020)
- Meyer, J., Hamwi, S., Kröger, M., Kowalsky, W., Riedl, T., & Kahn, A. Transition metal oxides for organic electronics: Energetics, device physics and applications. *Adv. Mater.* 24, 5408–5427. (2012)
- Moradi Kashkooli, F., Hornsby, T. K., Kolios, M. C., & Tavakkoli, J. Ultrasound-mediated nano-sized drug delivery systems for cancer treatment: Multi-scale and multi-physics computational modeling. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomed. Nanobiotechnol.* 16(1), e1913. (2024).
- Mu, H., Holm, R., & Müllertz, A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *Int. J. Pharm.* 453(1), 215-224. (2013)
- Mu, W., Chu, Q., Liu, Y., & Zhang, N. A review on nano-based drug delivery system for cancer chemoimmunotherapy. *Nanomicro Lett.* 12, 1-24. (2020)
- Nel, J., Elkhoury, K., Velot, É., Bianchi, A., Acherar, S., Francius, G., ... & Arab-Tehrany, E. Functionalized liposomes for targeted breast cancer drug delivery. *Bioact. Mater.* 24, 401-437. (2023)
- Pande, S. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 51(1), 428-440. (2023)
- Park, H., Otte, A., & Park, K. Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. *J. of Control. Release.* 342, 53-65. (2022)
- Patel, H., & Parikh, V. P. An overview of osmotic drug delivery system: an updated review. *Int. J. Bioassays.* 6(7), 5426-36. (2017).
- Patra, C. N., Swain, S., Sruti, J., Patro, A. P., Panigrahi, K. C., Beg, S., & Rao, M. E. Osmotic drug delivery systems: basics and design approaches. *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.* 7(2), 150-161. (2013)
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotechnology.* 16(1), 1-33. (2018)
- Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. New developments in liposomal drug delivery. *Chem. Rev.* 115(19), 10938-10966. (2015)
- Peng, L., Mei, X., He, J., Xu, J., Zhang, W., Liang, R., ... & Duan, X. Monolayer nanosheets with an extremely high drug loading toward controlled delivery and cancer theranostics. *Adv. Mater.* 30(16), 1707389. (2018)
- Prasanna, A., Pooja, R., Suchithra, V., Ravikumar, A., Gupta, P. K., & Niranjana, V. Smart drug delivery systems for cancer treatment using nanomaterials. *Mater. Today Proc.* 5(10), 21047-21054. (2018)
- Rahman, M. A., Hussain, A., Hussain, M. S., Mirza, M. A., & Iqbal, Z. Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). *Drug Dev. Ind. Pharm.* 39(1), 1-19. (2013)

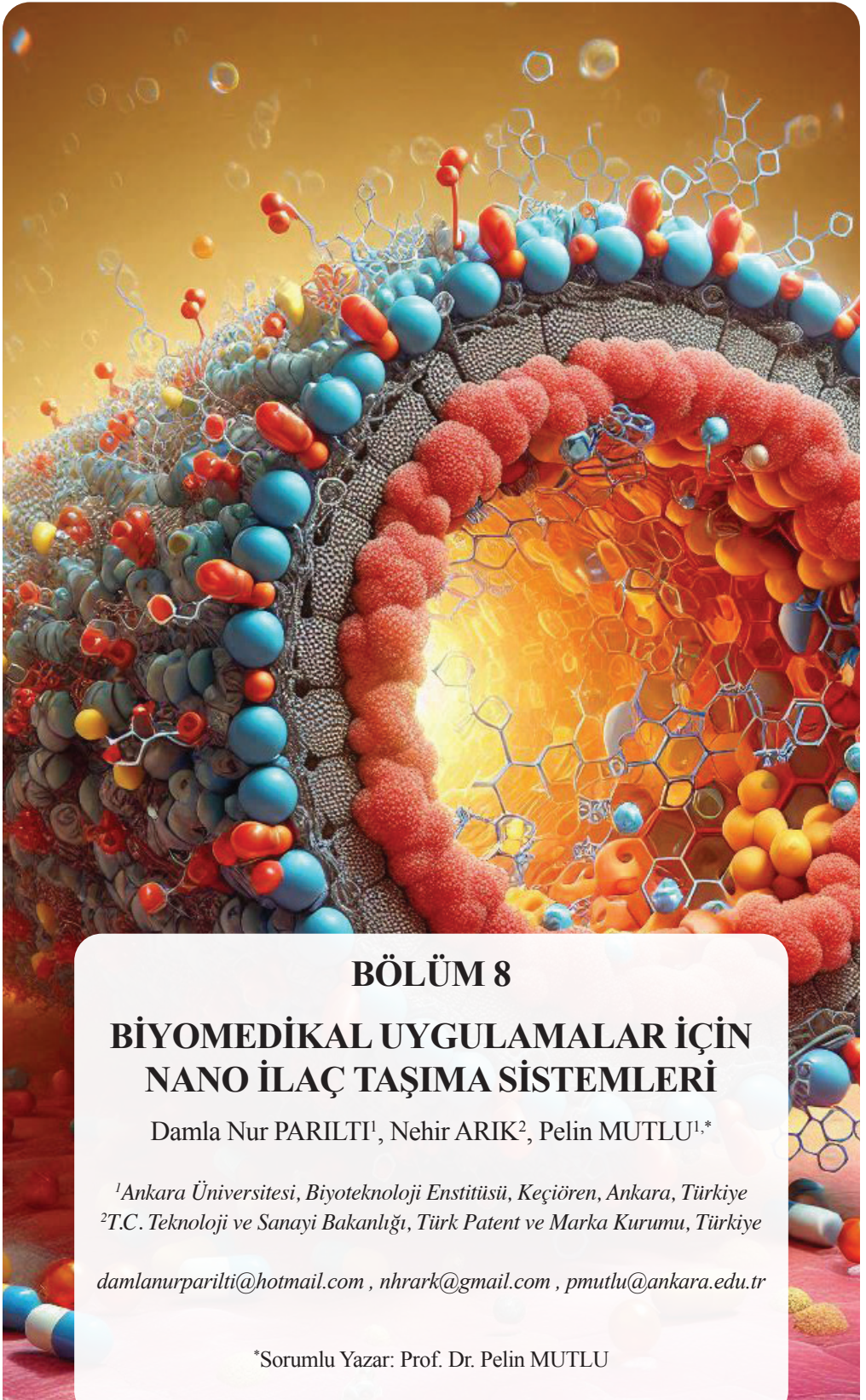
- Ratnaparkhi, M. P., & Gupta Jyoti, P. Sustained release oral drug delivery system-an overview. *Terminol.* 3(4), 10-22270. (2013)
- Reygaert, W. C. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 4(3), 482. (2018)
- Rizvi, S. A., & Saleh, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. *Saudi Pharm. J.* 26(1), 64-70. (2018)
- Robinson, D. H., & Mauger, J. W. Drug delivery systems. *Am. J. Hosp. Pharm.* 48, S14-S23. (1991)
- Saadh, M. J., Jasim, S. A., Dhiaa, S. M., Chandra, S., Alwan, H. A., Baieisa, H. M., ... & Kadhum, E. H. A DFT study of the role of pristine and metal doped of g-CN nanosheet for drug delivery system. *Comput. Theor. Chem.* 1232, 114448. (2024)
- Selvam, G. S., Dheivasigamani, T., Prabhu, A., & Mani, N. K. Embellishing 2-D MoS₂ nanosheets on Lotus thread devices for enhanced hydrophobicity and antimicrobial activity. *ACS omega.* 7(28), 24606-24613. (2022)
- Sharafeldin, M., Bishop, G. W., Bhakta, S., El-Sawy, A., Suib, S. L., & Rusling, J. F. Fe₃O₄ nanoparticles on graphene oxide sheets for isolation and ultrasensitive amperometric detection of cancer biomarker proteins. *Biosens. Bioelectron.* 91, 359-366. (2017)
- Sharker, S. M. Hexagonal boron nitrides (white graphene): A promising method for cancer drug delivery. *Int. J. Nanomedicine.* 9983-9993. (2019).
- Shen, S., Wu, Y., Liu, Y., & Wu, D. High drug-loading nanomedicines: progress, current status, and prospects. *Int. J. Nanomedicine.* 4085-4109. (2017)
- Shi, Y., Li, H., & Li, L.-J. Recent advances in controlled synthesis of two-dimensional transition metal dichalcogenides via vapour deposition techniques. *Chem. Soc. Rev.* 44, 2744-2756. (2015)
- Shilakari, G., Singh, D., & Asthana, A. Novel vesicular carriers for topical drug delivery and their applications. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 21(1), 77-86. (2013)
- Shinde, N. G., Aloorkar, N. H., & Kulkarni, A. S. Recent advances in vesicular drug delivery system. *Res. J. Pharm. Dosage Forms Technol.* 6(2), 110-120. (2014)
- Shivananju, B. N., Hoh, H. Y., Yu, W., & Bao, Q. Optical biochemical sensors based on 2D materials. In *Fundamentals and sensing applications of 2D materials.* (Late, D. J., Morgan, H., Rout, C. S. Eds.), s.379-406. Woodhead Publ. (2019)
- Singh, M., Zannella, C., Folliero, V., Di Girolamo, R., Bajardi, F., Chianese, A., ... & Altucci, C. Combating actions of green 2D-materials on gram-positive and negative bacteria and enveloped viruses. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8, 569967. (2020)
- Song, F., Bai, L., Moysiadou, A., Lee, S., Hu, C., Liardet, L., & Hu, X. Transition metal oxides as electrocatalysts for the oxygen evolution reaction in alkaline solutions: An application-inspired renaissance. *J. Am. Chem. Soc.* 140, 7748-7759. (2018)
- Syed, S. M. Osmotic Drug Delivery System: An Overview. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* 4(3). (2015)
- Tahir, M. B., & Fatima, U. Recent trends and emerging challenges in two-dimensional materials for energy harvesting and storage applications. *J. Energy Storage.* 4(1), e244. (2022)
- Tao, W., Ji, X., Zhu, X., Li, L., Wang, J., Zhang, Y., ... Farokhzad, O. C. Two-dimensional antimonide-based photonic nanomedicine for cancer theranostics. *Adv. Mater.* 30, 1802061. (2018)
- Thakor, A. S., & Gambhir, S. S. Nanooncology: the future of cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J. Clin.* 63(6), 395-418. (2013)
- Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.* 2(1), 2. (2012)
- Tong, C., Zhang, X., Fan, J., Li, B., Liu, B., Daniyal, M., & Wang, W. PEGylated mBPEI-rGO nanocomposites facilitate hepatocarcinoma treatment combining photothermal therapy and chemotherapy. *Sci. Bull.* 63, 935-946. (2018)
- Vilas, P. C., Gujarathi, N. A., Rane, B. R., & Pawar, S. P. A review on self microemulsifying drug delivery system. *Pharm. Sci. Monit.* 4(1). (2013)
- Vovusha, H., Banerjee, D., Yadav, M. K., Perrozzi, F., Ottaviano, L., Sanyal, S., & Sanyal, B. Binding characteristics of anticancer drug doxorubicin with two-dimensional graphene and graphene oxide: insights from density functional theory calculations and fluorescence spectroscopy. *J. Phys. Chem. C.* 122(36), 21031-21038. (2018)
- Wang, Q., & O'Hare, D. Recent advances in the synthesis and application of layered double hydroxide (LDH) nanosheets. *Chem. Rev.* 112, 4124-4155. (2012).
- Wang, S., Chen, Y., Li, X., Gao, W., Zhang, L., Liu, J., ... & Shi, J. Injectable 2D MoS₂-integrated drug delivering implant for highly efficient NIR-triggered synergistic tumor hyperthermia. *Adv. Mater.* 27(44), 7117-7122. (2015)
- Wen, T., Wu, X., Liu, M., Xing, Z., Wang, X., & Xu, A. W. Efficient capture of strontium from aqueous solutions using graphene oxide-hydroxyapatite nanocomposites. *Dalton Trans.* 43(20), 7464-7472. (2014)

- Wu, Q., Liao, J., & Yang, H. Recent Advances in Kaolinite Nanoclay as Drug Carrier for Bioapplications: A Review. *Adv. Sci.* 2300672. (2023).
- Xie, Z., Wang, D., Fan, T., Xing, C., Li, Z., Tao, W., ... & Zhang, H. Black phosphorus analog tin sulfide nanosheets: synthesis and application as near-infrared photothermal agents and drug delivery platforms for cancer therapy. *J. Mater. Chem. B.* 6(29), 4747-4755. (2018)
- Xu, H., Cui, Y., Tian, Y., Dou, M., Sun, S., Wang, J., & Wu, D. Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems for Enhancing Bone Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* (2024).
- Yadav, V., Roy, S., Singh, P., Khan, Z., & Jaiswal, A. 2D MoS₂-based nanomaterials for therapeutic, bioimaging, and biosensing applications. *Small.* 15, 1803706. (2019)
- Yan, S., Gu, W., Zhang, B., Rolfe, B. E., & Xu, Z. P. High adjuvant activity of layered double hydroxide nanoparticles and nanosheets in anti-tumor vaccine formulations. *Dalton Trans.* 47, 2956–2964. (2018)
- Yan, Z. Q., & Zhang, W. The development of graphene-based devices for cell biology research. *Front. Mater. Sci.* 8, 107-122. (2014)
- Yang, D., Feng, L., Dougherty, C. A., Luker, K. E., Chen, D., Cauble, M. A., ... Hong, H. In vivo targeting of metastatic breast cancer via tumor vasculature-specific nano-graphene oxide. *Biomater.* 104, 361–371. (2016)
- Yang, Y., Liu, X., Ma, W., Xu, Q., Chen, G., Wang, Y., ... & Yu, Z. Light-activatable liposomes for repetitive on-demand drug release and immunopotential in hypoxic tumor therapy. *Biomater.* 265, 120456. (2021).
- Ye, G., Jiang, Y., Yang, X., Hu, H., Wang, B., Sun, L., ... & Gao, W. Smart nanoparticles undergo phase transition for enhanced cellular uptake and subsequent intracellular drug release in a tumor microenvironment. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 10(1), 278-289. (2018)
- Yin, F., Gu, B., Lin, Y., Panwar, N., Tjin, S. C., Qu, J., ... & Yong, K. T. Functionalized 2D nanomaterials for gene delivery applications. *Coord. Chem. Rev.* 347, 77-97. (2017a)
- Yin, T., Liu, J., Zhao, Z., Zhao, Y., Dong, L., Yang, M., ... & Huo, M. Redox sensitive hyaluronic acid-decorated graphene oxide for photothermally controlled tumor-cytoplasm-selective rapid drug delivery. *Adv. Funct. Mater.* 27(14), 1604620. (2017b)
- Yong, Y., Zhou, L., Gu, Z., Yan, L., Tian, G., Zheng, X., ... Zhao, Y. WS₂ nanosheet as a new photosensitizer carrier for combined photodynamic and photothermal therapy of cancer cells. *Nanoscale.* 6, 10394–10403. (2014)
- Zeng, X., Luo, M., Liu, G., Wang, X., Tao, W., Lin, Y., ... & Mei, L. Polydopamine-modified black phosphorous nanocapsule with enhanced stability and photothermal performance for tumor multimodal treatments. *Adv. Sci.* 5(10), 1800510. (2018)
- Zhang, B., Wei, P., Zhou, Z., & Wei, T. Interactions of graphene with mammalian cells: Molecular mechanisms and biomedical insights. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 105, 145-162. (2016)
- Zhang, H., Fan, T., Chen, W., Li, Y., & Wang, B. Recent advances of two-dimensional materials in smart drug delivery nanosystems. *Bioact. Mater.* 5(4), 1071-1086. (2020)
- Zhang, M., Xing, L., Ke, H., He, Y., Cui, P., Zhu, Y., ... Jiang, H. MnO₂-based nano platform serves as drug vehicle and MRI contrast agent for cancer theranostics. *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 9, 11337–11344. (2017a)
- Zhang, Q., Wu, Z., Li, N., Pu, Y., Wang, B., Zhang, T., & Tao, J. Advanced review of graphene-based nanomaterials in drug delivery systems: Synthesis, modification, toxicity, and application. *Mater. Sci. Eng. C.* 77, 1363-1375. (2017b)
- Zhang, Q., Deng, H., Li, H., Song, K., Zeng, C., & Rong, L. Preparation of graphene oxide-based supramolecular hybrid nano hydrogel through host-guest interaction and its application in drug delivery. *J. Biomed. Nanotechnol.* 14(12), 2056-2065. (2018)
- Zhao, Y., Lin, H., Chen, M., & Yan, D. Niflumic anion intercalated layered double hydroxides with mechano-induced and solvent-responsive luminescence. *Ind Eng. Chem. Res.* 53, 3140–3147. (2014)
- Zhang, Y., Long, M., Huang, P., Yang, H., Chang, S., Hu, Y., ... Mao, L. Intercalated 2D nanoclay for emerging drug delivery in cancer therapy. *Nano Res.* 10, 2633–2643. (2017c)
- Zheng, Y., Liu, J., Liang, J., Jaroniec, M., & Qiao, S. Z. Graphitic carbon nitride materials: Controllable synthesis and applications in fuel cells and photocatalysis. *Energy Environ. Sci.* 5, 6717–6731. (2012)
- Zhou, T., Zhou, X., & Xing, D. Controlled release of doxorubicin from graphene oxide based charge-reversal nanocarrier. *Biomater.* 35(13), 4185-4194. (2014)
- Zhou, Y., Wu, W., Wang, L., Goksen, G., & Shao, P. Multifunctional pectin films based on mussel-inspired modified 2D Ag nanosheets for long-lasting antibacterial and enhanced barrier properties. *Food Hydrocoll.* 137, 108331. (2023)
- Zhu, C., Du, D., & Lin, Y. Graphene-like 2D nanomaterial-based biointerfaces for biosensing applications. *Biosens. Bioelectron.* 89, 43–55. (2017a)
- Zhu, J., Xu, M., Gao, M., Zhang, Z., Xu, Y., Xia, T., & Liu, S. Graphene oxide induced perturbation to the plasma membrane and cytoskeletal meshwork sensitize cancer cells to chemotherapeutic agents. *ACS Nano.* 11, 2637–2651. (2017b)

KISALTMALAR LİSTESİ

0D	: Sıfır boyutlu
1D	: Tek boyutlu
2B	: İki boyutlu
AM	: Antimonid
aPD-1	: Antikor programlanmış hücre ölümü proteini-1
BMDN	: MnO_2 / DOX yüklü albümin nanopartikülleri
BP	: Siyah forfor
BPEI	: Dallı polietilenimin
BPQD-RMN	: Siyah fosfor kuantum nokta-eritrosit membran nanovezikül
Chemo	: Kemoterapi
CoNWs	: Kobalt nanoteller
DDSs	: İlaç dağıtım sistemleri
DEX	: Dektran
DOX	: Doksorubisin
gC₃N₄	: Grafit karbon nitrid
GO-DEX	: Dektran kaplı nano-GO
GO-Hap	: Grafen oksit-hidroksiapatit
GO	: Grafen oksit
GSH	: Glutasyon
LDHs	: Katmanlı çift hidroksitler
MDR	: Çoklu ilaç direnci
MnO₂	: Manganez dioksit
Mo₂C	: Molibden karbür
MoS₂	: Molibden disülfid
MRI	: Manyetik rezonans görüntüleme
MTX	: Metotreksat
Nb₂C	: Niyobyum karbür
nDDSs	: Nano boyutlu ilaç taşıyıcı sistemler
NIR	: Yakın Kızılötesi
NMP	: N-Metil-Pirolidon
NPs	: Nanopartiküller
PD-1	: Programlanmış hücre ölümü proteini 1
Pd	: Paladyum
pDNA	: Plazmid DNA
PDT	: Fotodinamik Terapi

PEG	: Polietilen glikol
PEI	: Polieterimid
PLA	: Polilaktik asit
PMD	: PLGA/MoS ₂ /DOX
PTT	: FototermaI Terapi
rGO	: Azaltılmış grafen oksit
RMs	: Eritrosit membranları
RV	: Resveratrol
SA	: Sodyum aljinat
SDDSs	: Akıllı ilaç dağıtım sistemleri
Ta₄C₃	: Tantalum karbür
Ti₃C₂	: Titanyum karbür
TiO₂	: Titanyum dioksit
TMC	: Geçiş metali karbürleri
TMDs	: Geçiş metali dikalkojenitleri
TMO	: Geçiş metali oksitleri
UV	: UltravioleI (Morötesi)
V₂C	: Vanadyum karbür
WS₂	: Tungsten disülfür
Zn(OH)₂	: Çinko hidroksit
ZnO	: Çinko oksit
Zr₃C₂	: Zirkonyum karbür



BÖLÜM 8

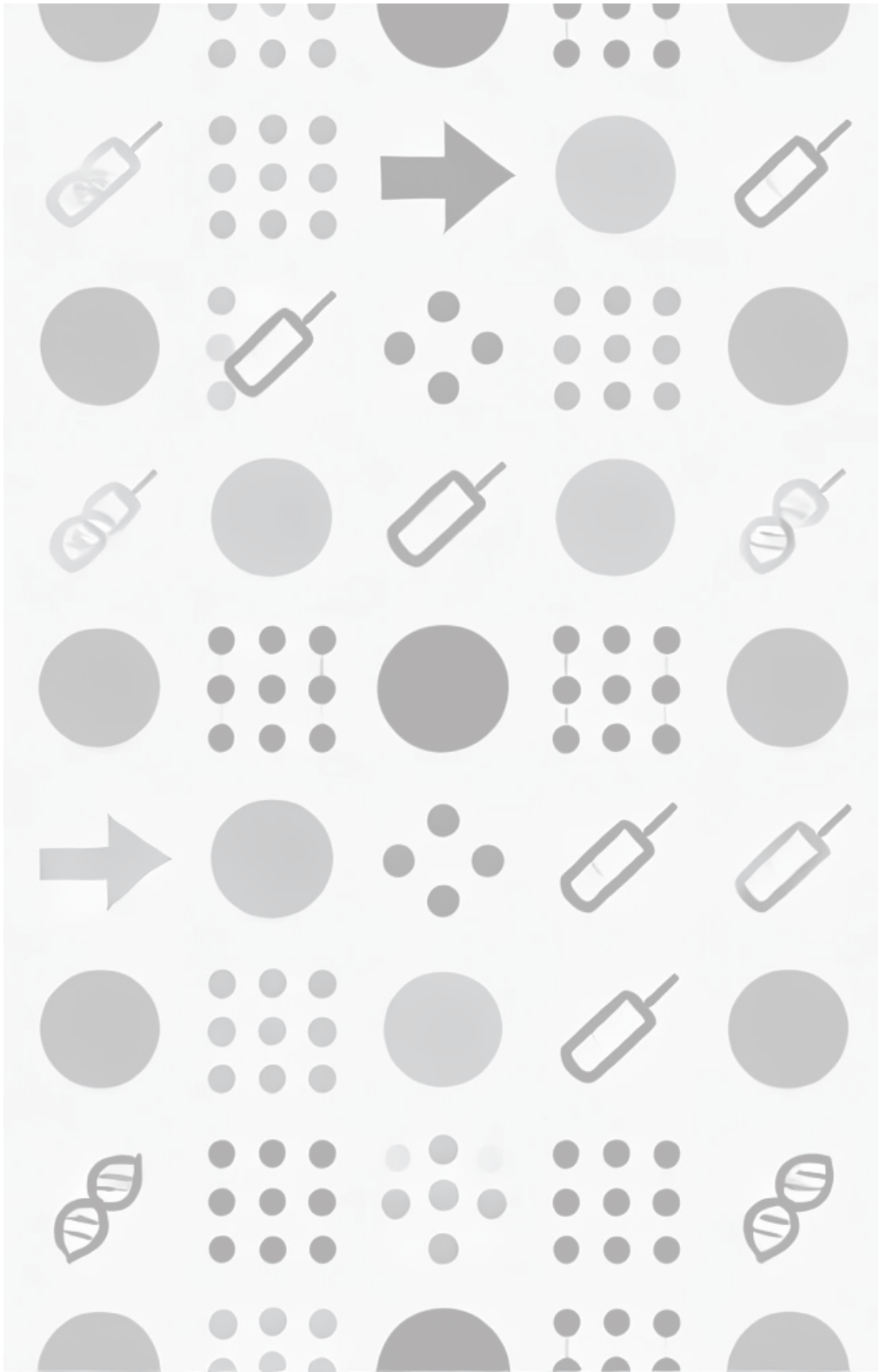
BİYOMEDİKAL UYGULAMALAR İÇİN NANO İLAÇ TAŞIMA SİSTEMLERİ

Damla Nur PARILTI¹, Nehir ARIK², Pelin MUTLU^{1,*}

¹Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Keçiören, Ankara, Türkiye
²T.C. Teknoloji ve Sanayi Bakanlığı, Türk Patent ve Marka Kurumu, Türkiye

damlanurparilti@hotmail.com , nhrark@gmail.com , pmutlu@ankara.edu.tr

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Pelin MUTLU



1. GİRİŞ

Çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan konvansiyonel ilaç tedavileri, *in vivo* kararsızlık, düşük çözünürlük ve biyoyararlanım, hedefe özgü ilaç iletimi sorunları ve potansiyel sistemik yan etkiler gibi bir takım dezavantajlara sahip olabilmektedir. Bu sorunların üstesinden gelebilmek için, ilaçların hedef bölgeye seçici olarak taşınabilmesine olanak verecek ilaç taşıma sistemlerinin geliştirilmesi son yıllarda önem kazanmıştır. Bu kapsamda geliştirilen nano boyutlu ilaç taşıma sistemleri terapötik ajanların biyoyararlanımlarının iyileştirilmesi, hedeflenen bölgeye taşınması, kontrollü salımının sağlanması ve böylelikle yan etkileri azaltılması açısından önemlidir. Çeşitli hastalıkların tedavisinde farklı doku ve hücreleri hedeflemek için nano ilaç taşıma sistemlerine ilaç molekülleri, nükleik asit ve antikor gibi terapötik bileşikler yüklenebilmektedir. Nano ilaç taşıma sistemleri olarak, genellikle hidrodinamik çapları 10 ila 200 nanometre (nm) arasında olan nanopartiküller tercih edilmektedir. Yapılarına bağlı olarak, nanoparçacıklar (NP'ler) lipid, polimer veya inorganik bazlı olarak sınıflandırılabilir. Kolloidal NP'lerin yüzey fonksiyonel gruplarına veya sahip oldukları içi boşluklara ilaçlar ve diğer terapötik moleküller yüklenebilmektedir. Nanoparçacıkların fonksiyonel yüzey gruplarına hedefe yönelik antikor eklenmesi yoluyla ise hedefe yönelik ilaç taşınması mümkün hale gelebilmektedir. Bunlara ek olarak, NP'lerin pH, ışık, ısı veya enzim gibi uyaranlar ile yapısal özelliklerinin değiştiği biyomalzemeler ile geliştirilmesi yoluyla kontrollü ilaç salımının gerçekleşmesi mümkündür. Özellikle kanser gibi ölümcül hastalıkların tanımlanması ve yönetimi için en umut verici gelişmelerden biri hedefe yönelik ve kontrollü ilaç salımına olanak veren tedavi seçeneklerinin geliştirilmesidir. Günümüzde, klinik uygulamalarda kullanılmak üzere ilaç hedefleme stratejilerine ilişkin çok sayıda araştırma yapılmış ve halen yapılmaya devam edilmektedir. Bu alandaki gelişmeler ile ileride klinikte tedavisi zor olan hastalıklar ve özellikle kişiye özgü tedavi stratejilerinin geliştirilmesi mümkün olabilecektir.

2. NANOPARÇACIK TÜRLERİ

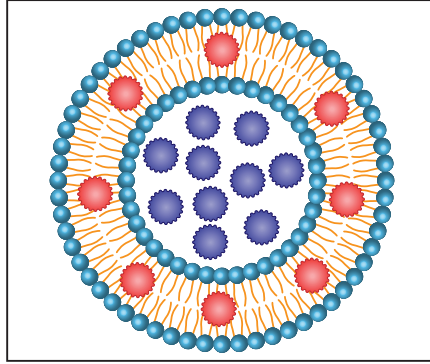
2.1. Lipid Bazlı Nanoparçacıklar

Geleneksel farmakolojiyi geliştiren en ileri ilaç dağıtım teknolojileri olarak nanoparçacıkların terapötik potansiyeli, son on yılda yaygın olarak kabul görmüştür. Lipid bazlı nanoparçacıklar (LNP'ler), güçlü farmakolojik ve terapötik etkileri nedeniyle klinik öncesi ve klinik araştırmalarda büyük ilgi gören nanomalzemelerden biridir (Mehta ve ark., 2023). LNP'ler, kanser tedavisi ve ilaç geliştirme alanlarında büyük ilgi görmekte, çeşitli terapötik uygulamalara yönelik olarak monoklonal antikorlar, küçük kimyasallar ve nükleik asitler dahil üzere farklı tıbbi ajanları kapsülleyebilmektedirler (Tenchov ve ark., 2021). İlaçların yarı ömrünü uzatıp, kontrollü ilaç salımına olanak vermeleri nedeniyle, bu nanoparçacıklar hem hidrofobik hem de hidrofilik molekülleri taşıyabilmekte, düşük toksisite göstermekte ve ilaçların farmakolojik etki sürelerini uzatabilmektedir (Özpolat ve ark., 2014). LNP'ler ilaçları *in vivo* bozunmaya karşı koruyarak, çözünürlüklerini ve etkinliklerini arttırmakta, ilacın hastalık bölgesine hassas bir şekilde ulaşmasına olanak sağlamakta, ilaç salımını kontrol ederek ilacın biyolojik dağılımını değiştirmektedirler

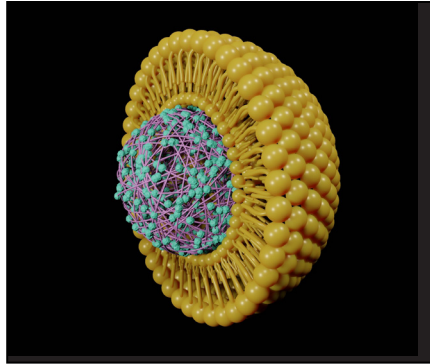
(Kozma et al. 2020). Böylelikle, bu özel olarak tasarlanmış nanotaşıyıcılar, düşük etkinlik, düşük biyoyararlanım, enzimatik bozunma duyarlılığı ve hedef dışı yan etkiler gibi geleneksel ilaçların bazı önemli dezavantajlarını ortadan kaldırma potansiyeline sahiptirler (Gurevich and Gurevich, 2015).

LNP'lerin dört ana lipid bileşeni genellikle partikülün oluşumu ve stabilitesi için gerekli olan fosfolipidler ve kolesterol ile ilaç yükünü arttırmak için negatif yüklü nükleik asitlerle etkileşimi kolaylaştıran katyonik veya iyonlaşabilir lipidlerdir. Gangliositler veya polietilen glikol (PEG) gibi lipid nanosistemlerdeki kimyasal değişiklikler, bir ilacın çözünürlüğünü arttırmaya, bağışıklık sisteminden kaçmaya, partikül stabilitesini ve sistemik dolaşım süresini arttırmaya yardımcı olabilmektedir (Cheng and Lee, 2016). LNP'ler, biyomimetik yapıları ve hücre zarları ile kolaylıkla bağlanabilme potansiyeline sahip lipid bileşenleri sayesinde hücre zarını kolayca geçebilmekte ve nanoparçacıkların içerdiği terapötik ajanları hedeflenen hücrenin içine taşıyabilmektedirler (Tenchov ve ark., 2021). LNP'lerin terapötik molekülleri hücre içinde endozomal asidik ortamda ilaç salınımını kolaylaştırmak için pH'a duyarlı formülasyonları da geliştirilebilmektedir (Rama ve ark., 2016).

LNP'ler, lipozomlar, lipid nanoemülsiyonlar, katı-lipid nanoparçacıklar, nanoyapılı lipid taşıyıcılar ve lipid-polimer hibrid nanoparçacıklar olmak üzere beş farklı başlık altında incelenebilirler (Mehta ve ark., 2023) (Şekil 1).



a. Lipozomlar



b. Lipid polimer hibrid nanoparçacıklar

Şekil 1. İlaç dağıtımında kullanılan LNP formülasyonlarının yapısı. a. Lipozomlar b. Lipid polimer hibrid nanoparçacıklar.

2.1.1. Lipozomlar

Lipozomların ilk keşfi 1965 yılında Bangham ve ark. tarafından yapılmıştır. Bu kendi kendine birleşen, nano ölçekli lipid veziküller, farklı sulu bölgeleri çevreleyen bir veya daha fazla eş merkezli fosfolipit çift katmanından oluşmaktadır (Bangham ve ark., 1965). Lipozomların biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilir olduğu göz önüne alındığında, bu alanda en çok çalışma yapılan nano ilaç taşıma sistemi olmuşlardır. Kanser tedavisi için ticarileştirilen ilk nano ilaç taşıma sistemleri arasında, doksorubisin içeren lipozom formülasyonu, Doksil® yer almaktadır (Kraft ve ark., 2014).

Bu nanoparçacıkların birincil bileşenleri olan fosfolipitler, amfipatik özelliklerinden dolayı iki katmanlı bir konfigürasyonda düzenlenmiştir. Antikanser ajanlar yapılarına yüklendiklerinde su varlığında vezikül oluşumu nedeniyle daha çözünür ve stabil hale gelirler. Lipozomlar hem hidrofilik hem de hidrofobik ilaç moleküllerini taşıma yeteneğine sahiptirler. Lipozomların hidrofilik ilaçları çekirdek bölmelerine ve hidrofobik ilaçları lipid çift tabakalarına kolayca kapsülleme kabiliyeti, temel avantajlarından biridir (Yingchoncharoen ve ark., 2016). Ayrıca, lipozomlar, proteinler, nükleik asitler ve diğer görüntüleme ajanları gibi makromolekülleri de taşıyabildikleri için çok yönlü bir ilaç dağıtım platformu olarak kabul edilmektedirler (Kozma ve ark., 2020). Nanoparçacığın akışkanlığını azaltarak ve hidrofobik ilaç moleküllerinin iki tabakalı membrandan penetrasyonunu artırarak kandaki nanoparçacıkların stabilitesini iyileştirmek için formülasyonlarına fosfolipidlere ek olarak kolesterol gibi bileşikler eklenebilmektedir (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Lipozomlar, çapları 20 nm ile 1 µm arasında değişen tek katmanlı veya çok katmanlı veziküller oluşturmak için özel formülasyonlar ve sentez teknikleri kullanılarak üretilmektedirler (Tenchov ve ark., 2021). Büyük tek katmanlı veziküllerin (LUV'ler) boyutları 100 nm'den büyük olup küçük tek katmanlı veziküllerin (10-100 nm) (SUV'lar) boyutları ise 10 ile 100 nm arasında değişmektedir. Öte yandan, çapları 0.5 nm ile 10 nm arasında değişen çok katmanlı olanlar multilaminar veziküller (MLV'ler) olarak adlandırılmaktadırlar (Yingchoncharoen ve ark., 2016).

Lipit bileşimi, boyutu, yükü, ilaç-lipit oranı ve dağıtım mekanizması, lipozomal ilaç iletimi için önemli formülasyon faktörleri arasında yer almaktadır. Nanotaşıyıcıların vektörizasyonu üç genel yolla gerçekleştirilebilir. Bunlardan biri, lipozomların tümör hücresine sadece hücre zarından nüfuz ettiği pasif hedeflemidir. Diğer bir yöntem, tümör hücrelerini tanıyabilen antikoları içeren değiştirilmiş yapısal modifikasyonlara sahip lipozomları kullanan aktif hedeflemidir. Lipozomlar için, uyarana duyarlı bileşenleri hesaba katan üçüncü bir hazırlama tekniği de kullanılabilir. Bu teknikte, bir dış tetikleyici kullanılarak, antikanser ilaçların kontrollü bir şekilde salınımını sağlamak için sıcaklık, pH veya manyetik alanlar gibi parametreler değiştirilmektedir (Gogoi ve ark., 2016; Kunjachan ve ark., 2015). Gelişmiş geçirgenlik ve retansiyon (EPR) etkisinin, partiküllerin tümör bölgesinde toplanmasına neden olduğu iyi bilinmektedir. Tümör bölgesindeki damar sisteminin artan geçirgenliği, normal ve kötü huylu doku arasındaki anatomik ayrımları yansıtmaktadır. Tümör vaskülarizasyon düzeyinin yanı sıra tümör arterlerinin geçirgenliği, bu pasif hedefleme etkisi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Murphy ve ark., 2008). EPR etkisinin, 100-150 nm çapındaki lipozomların tercihen tümör bölgesinde yoğunlaşmasına neden olduğu gösterilmiştir (Uchiyama ve ark., 1995). "Aktif hedefleme" için ligand taşıyan lipozomlar oluşturmak için, belirli lipozom-reseptör etkileşimlerinin gerçekleşmesi gerekir. Daha sonra, lipozomal ilaçlar reseptör aracılı endositoz ile hücre içerisine alınmalıdır (Gregoriadis, 1975). Antikolar, peptitler ve vitaminler (folik asit gibi), tümör dokusunda normal dokulara göre fazla miktarda ifade edilen reseptörlere bağlanabildikleri için hedefe yönelik ilaç dağıtımı için kullanılan ligand örnekleri

arasında yer almaktadırlar (Ferrari, 2005). Tüm bu özellikleri ile, lipozomlar ilaç taşıma sistemleri içerisinde önemli avantajlara sahip olmakla birlikte ticari olarak günümüzde yaklaşık sadece 14 farklı lipozomal ürün çeşidi bulunmaktadır (Liu vd, 2022).

2.1.2. Nanoemülsiyon

LNP'lerin diğer bir çeşidi, boyutları 50 ila 500 nm arasında değişen küresel, bifazik sıvı damlacıklarından oluşan nanoemülsiyon sistemleridir (Tadros ve ark., 2004). Sırasıyla hidrofilik veya hidrofobik aktif kimyasalları taşıyan nanoemülsiyonlar oluşturmak için su içinde yağ (o / w) veya yağda su (w / o) damlacıkları kullanılabilir (Aswathanarayan ve Vittal, 2019). Bu küçük damlacıkları stabilize etmek için üretim süreci boyunca proteinler, fosfolipitler, yüzey aktif maddeler, polisakkaritler ve poli (vinil alkol) gibi polimerler dahil olmak üzere çeşitli emülgatörler kullanılmaktadır (Kralova and Sjöblom, 2009). Nanoemülsiyonların oluşturulması sırasında yağ fazı; serbest yağ asitleri, mineral yağlar, bitkisel yağlar, tri-, di- veya mono-açilgliseroller gibi trigliseritler içerebilmektedir (Gonçalves ve ark., 2018). İlaç çözünürlüğü genellikle yağı seçerken belirleyici faktördür. Yüksek ilaç yüklemeli yağ fazları tipik olarak nanoemülsiyonların oluşturulmasında kullanılmaktadır (Abdul Qadir ve ark., 2016). Bir emülsiyonun stabilitesi, yüzey aktif maddenin bileşimine ve damlacık boyutu varyasyonuna bağlıdır. Yüzey aktif maddeler, iki faz arasındaki ara yüzey gerilimini azaltarak nanoemülsiyonların üretiminde çok önemli bir rol oynamakta ve bu da mikroskobik damlacıkların üretilmesine neden olmaktadır (Tadros, 2004). Emülgatör tipi, nanoemülsiyonun uzun süreli depolanmasına, pH değişikliklerine, ısıtmaya ve soğutmaya karşı stabilitesini etkilemektedir (McClements ve Rao, 2011). Farklı yüzey aktif madde türleri stabilizeye katkıda bulunmaktadır. Örneğin, iyonik yüzey aktif maddeler elektrik yükü verirken, iyonik olmayan yüzey aktif maddeler büyük molekül gruplarını çevreleyerek sterik bir bariyer oluşturmaktadırlar (Silva ve ark., 2012). Birincil uygulaması topikal ilaç dağıtımında olmasına rağmen, nanoemülsiyonlar intravenöz, oküler, intranazal ve oral dağıtım için de kullanılabilirler. Biyoaktif bileşenlerin difüzyon yoluyla cilt katmanlarından geçmesini kolaylaştırmak için, nanoemülsiyon formülasyonları bitkisel kozmetiklerin geliştirilmesinde tercih edilmektedirler. Nanoemülsiyon formülasyonlarının azaltılmış viskozitesi, şeffaflığı ve nano boyutlu damlacıkları, onları kozmetik uygulamalar için avantajlı hale getirmektedir (Karthik ve ark., 2017; Solans ve ark., 2005). Nanoemülsiyon formülasyonlarının fizyo-kimyasal özellikleri, kapsüllenen antibiyotiklerin, antiseptiklerin, dezenfektanların ve antikanser ilaçların biyolojik aktivitesini arttırmaktadır (Karthik ve ark., 2017). Ayrıca, gıda endüstrisinde özellikle fonksiyonel gıdalar oluşturmak için yağ asitleri, polifenoller, doğal aromalar ve renkler için taşıma sistemi olarak önemli bir potansiyele sahiptirler (Silva ve ark., 2012).

2.1.3. Katı Lipid Nanoparçacıkları

Oda sıcaklığında, katı lipid nanoparçacıklar (SLN'ler), boyutları 50 ila 100 nm arasında değişen katı bir lipit çekirdeğe sahip küçük küresel partiküllerdir (Puri ve ark., 2009). Lipozomlarla karşılaştırıldığında, SLN'lerin katı lipit çekirdeği, partikül stabilitesini arttırmak için avantaj sağlamaktadır (Duan ve ark., 2020). Kompleks gliserit kombinasyonları; yağ asitleri, mono-, di- veya trigliseritler olabilen katı lipitler, ilaç kapsüllemesi için bir matris malzemesi görevi görmektedir. Polimerlerin veya yüzey aktif maddelerin bazı kombinasyonları bu matrisi stabilize etmektedir. SLN'lerdeki aktif bileşen, tüm lipit matrisi boyunca dağıtılabilmekte veya lipit kabuğuna veya çekirdeğine eklenebilmektedir. SLN'nin kabuk formülasyonlarına katyonik lipitler eklenmek suretiyle, partiküllerin hücre içerisine alınımı artırarak tümör hedeflemesini, kan-beyin bariyeri

penetrasyonunu ve gen transfeksiyon etkinliğini iyileştirmek mümkün olabilmektedir (Geszke-Moritz ve Moritz, 2016). Polimerik nanoparçacıkların, lipozomların ve mikroemülsiyonların en avantajlı özelliklerini birleştiren katı lipid nanoparçacıklar, ilaç taşıma sistemleri içerisinde önemli bir yere sahiptirler. Yüzey modifikasyonu, geliştirilmiş farmakokinetik özellikleri, inklüzyon komplekslerinin oluşturulması, gelişmiş stabilite modeli ve kemoterapötik ilaçların dahil edilmesiyle, lipid nanoparçacıkların sahip olduğu tüm özellikler SLN’de biraraya getirilmiştir (Yang ve ark., 1999). Belirlenen terapötik alanlarda özgülüklerini artırmak için, SLN’lerin dış kabuğuna oligosakkaritler, proteinler, spesifik ligandlar ve antikorlar gibi makromoleküller de eklenebilmektedir (Qui ve ark., 2018). Ayrıca, SLN’ler oldukça düşük toksisiteye sahiptirler. Ancak, SLN’lerin sınırlı ilaç yükleme kapasitesi, kristalizasyon prosedürünün neden olduğu ilaç sızıntısı ve ilacın ilk saatlerde hızlı salımı gibi dezavantajları da bulunmaktadır (Rajabi ve Mousa, 2016).

Hücre hatları üzerinde yapılan çalışmalar, SLN’lerin kolayca hücre içerisine alınabildiğini ve özellikle kolorektal kanser ve malign melanom tedavisinde alternatif kolloidal ilaç taşıyıcıları olarak kullanılabileceğini göstermiştir (Miglietta et al., 2000). Ayrıca, SLN’ler toksik olmayan ve biyoyumlu bileşenlerden yapılmış olmaları sebebi ile topikal formülasyonlarda kullanım için avantajlıdır. SLN’ler, küçük boyutlarının bir sonucu olarak geniş yüzey alanlarına sahip olmaları nedeniyle cilt yüzeyine yapışabildiğinden, özellikle cilt hastalıklarının tedavisinde topikal kullanım potansiyelleri için önemli araştırmalar yapılmıştır (Jenning ve ark., 2000). SLN’lerin ketokonazol ve klotrimazol gibi antifungallerin topikal uygulaması için uygun olduğu bilinmektedir. Ayrıca, SLN’ler, genetik ve genetik olmayan bozuklukların tedavisi için güvenli ve etkili taşıma sistemleri olarak literatürde yer almaktadır (Olbrich ve ark., 2001).

2.1.4. Nanoyapılı Lipid Taşıyıcılar

Nanoyapılı lipid taşıyıcılar (NLC’ler), ikinci nesil lipid bazlı nanotaşıyıcılardır. Gliseril trikaprilat, etil oleat, izopropil miristat ve gliseril dioleat gibi sıvı ve katı lipidlerin karışımından üretilmektedirler (Beloqui ve ark., 2016). NLC’ler, SLN’lerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için geliştirilmişlerdir. Düzensiz kristal yapıları nedeniyle, NLC’ler ilaç yüklemesi için daha iyi bir kapasite sunmakla birlikte üretim ve depolama aşamalarında lipid kristalleşmesini engelleyerek ilacın atılmasını önlemektedir. NLC’lerin formülasyonu, ilacın atılmasını azaltan sıvı lipidler içerir. Ek olarak, SLN’lerle karşılaştırıldığında, NLC’ler daha kontrollü salım profilleri sergileyebilmekte ve lipid matrislerinde ilaç çözünürlüğünü artırabilmektedirler (Shidhaye ve ark., 2008). Biyolojik uyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, immün reaksiyon oluşturmama, yüksek ilaç taşıma kapasitesi, gelişmiş stabilite, kontrollü ilaç salımı, üretim kolaylığı ve ölçeklenebilirlik, NLC’nin avantajları arasında yer almaktadır. NLC’ler, kanser, bakteriyel ve fungal enfeksiyonlar, dermatolojik hastalıklar, diyabet ve merkezi sinir sistemini (CNS) hedef alan nörodejeneratif hastalıklar dahil olmak üzere çeşitli terapötik amaçlar için kullanılabilirler. NLC’ler hem aktif (reseptör ve taşıyıcı taşıma yoluyla) hem de pasif taşıma (paraselüler ve transselüler yollar ile) yoluyla kan beyin bariyeri üzerindeki ilaç geçirgenliğini arttırdığından, merkezi sinir sistemi hastalıklarının tedavisi için ideal ilaç taşıyıcılarıdır (Jaiswal ve ark., 2016). Ek olarak, NLC’ler genotoksik olmamaları ve hemoyumlu olmaları nedeniyle çalışmalarda umut verici sonuçlar göstermektedir (Lakkadwala ve ark., 2014). NLC’de, entegre ilaç kısımlarının nerede bulunduğuyla ilgili olarak üç farklı morfolojik model bulunmaktadır (Kaur ve ark., 2015).

NLC tip I, kusurlu kristal model olarak adlandırılmaktadır. Çok sayıda iç boşluğu ve oldukça düzensiz matris yapısı ile amorf gruplarda daha fazla ilaç molekülü tutabilmektedir. Tip II, yağ/lipit/su olarak çok tipli NLC’dir. Katı lipidlerle karşılaştırıldığında, lipofilik ilaçlar sıvı lipidlerde

daha kolay çözünmektedir. Bu yaklaşımın bir sonucu olarak, yüksek sıvı lipid içeriğine sahip birden fazla NLC türü geliştirilmiştir. Tip II modelin avantajları arasında ilaç sızıntısının azalması ve düzenlenmiş ilaç salımı yer almaktadır. NLC amorf tip III lipidler, kristalizasyon prosedürünün neden olduğu ilaç sızıntısını en aza indirmek amacıyla NLC sentezi sırasında hassas bir şekilde karıştırılmaktadır. Lipit matrisinde tek biçimli amorf bir yapı bulunmaktadır (Selvamuthukumar ve Velmurugan, 2012).

Bu avantajlarından dolayı, NLC'ler kemoterapötik ajanları taşımak için ideal sistemlerdir. NLC'ler, küçük partikül boyutları ve yüksek ilaç taşıma kapasiteleri ile tümör bölgelerini aktif veya pasif olarak hedeflemek için kullanılabilir ve kemoterapötik ajanların yan etkilerini azaltmaya yardımcı olmaktadır.

2.1.5. Lipid Polimer Hibrit Nanoparçacıklar

Biyolojik uygulamalarda lipitlerin ve polimerlerin avantajlarını birleştiren bir diğer önemli lipid nanoparçacık sınıfı, lipid polimer hibrit nanoparçacıklardır (LPN'ler). LPN'ler, kan dolaşımında stabiliteilerinin korunabilmesi için terapötik ajanları içeren polimer bir çekirdek ve bu çekirdeği çevreleyen lipit/lipit-PEG kaplamalardan meydana gelmektedirler. İlaç salımı polimer tarafından düzenlenmekte, ilaç enkapsülasyonu ve hücre zarı penetrasyonu ise lipid kısım sayesinde artırılmaktadır. LPN'lerin sahip oldukları farklı yapısal özellikleri, onlara mümkün olan en iyi fiziksel stabiliteyi ve biyouyumluluğu sağlamakta, bu da onları ilaç taşıma sistemleri arasında avantajlı bir yere koymaktadır. Nükleik asitlerin ve diğer terapötik ajanların, daha uzun süreli salımı ve stabilitesi için LPN'ler etkili bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, polimer yüzeyine fonksiyonel grupların eklenmesi, ilaçların spesifik olarak doğru hücelere veya dokulara hedeflendirilebilmesi için de kolaylık sağlamaktadır (Hadinoto ve ark., 2013).

LPN'ler sentetik, doğal ve yarı sentetik polimerlerden üretilmektedirler. Biyomedikal uygulamalarda, LNP'lerin gen transferi, aşı, biyogörüntüleme ve antikanser tedavisi gibi çeşitli kullanım alanları mevcuttur (Sivadasan ve ark., 2021).

Bu tür bir sistemde, lipitlerin ve polimerlerin düzgün entegrasyonu, polimerik çekirdeğin kontrollü ilaç salımına olanak sağlaması ve lipit-PEG kabuğunun gelişmiş stabilite ve biyouyumluluğa katkıda bulunması gibi faktörler açısından kritik öneme sahiptir. Bu kapsamda polimerler ve lipitler çeşitli şekillerde bir araya getirilerek LPN sentezi gerçekleştirilmektedir. Lipitlerin ve polimerlerin düzenlenmesine bağlı olarak, çeşitli LPN yapıları meydana gelebilir. LPN'ler yapılarına göre aşağıdaki gibi kategorize edilmektedirler;

1. **Polimer çekirdek-lipid kabuk hibrid NP:** Bu tip LNP'lerin avantajları, lipozomlara kıyasla daha fazla ilaç enkapsülasyon potansiyeline sahip olmalarıdır. Çekirdek-kabuk tabakası optimizasyonu, ilacın uzun süreli salım profilini destekleyerek hem hidrofilik hem de lipofilik ilaçların yüklenmesine olanak sağlar. Ancak etkin olmayan ilaç yüklemesi ana dezavantajdır.
2. **İçi boş lipit-polimer-lipit NP'ler:** Bu tip LNP'lerin avantajları, mRNA ve siRNA moleküllerinin fagositik absorpsiyon ve serum nükleazlarına karşı korunarak organizmaya verilmesini sağlamaktır. Öte yandan katekolamin kaynaklı inflamasyon ve doku hasarı, serum varlığında katyonik lipitlerin hızla etkisiz hale gelmesine neden olmaktadır.

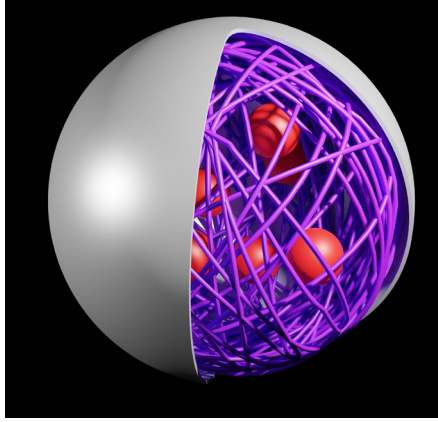
3. **Polimer kafesli nanobinler:** Bu tip LNP'lerin temel avantajı, kemoterapötik ajanları hedeflenen bölgeye ulaştırarak sistemik toksisiteyi azaltmaktır. Bununla birlikte, polimer kafesli nanobinler, büyük ölçekli üretim çalışmalarında henüz ilk aşamalarda yer almaktadır.
4. **Lipit çift tabaka kaplı NP'ler:** Bu tip LNP'nin avantajı, yaygın sistemik dolaşıma ve etki yerine aktif ilaç dağıtımına olanak sağlamasıdır. Bununla birlikte, büyük ölçekli üretimde standardizasyon sorunları aşılması gereken dezavantajlar arasında yer almaktadır.

2.2. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanosferler veya nanokapsüller olarak da bilinen polimerik nanoparçacıklar (PNP'ler), biyoyoumlu, toksik olmayan ve biyolojik olarak parçalanabilen sentetik ve doğal polimerlerin bir karışımıdır. PNP'lerin tipik olarak, 100 nm'den daha küçük boyut aralığına sahip büyük moleküllerin küçük, katı, kolloidal parçacıkları olduğu bilinmektedir. PNP'lerin, bu özelliklerinden dolayı ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanımları uygundur. Bu sistemlerin geliştirilmesi ve optimizasyonu, PNP'lerin belirli organlara yönelik proteinleri, peptitleri, ilaç moleküllerini ve antijenleri taşıma kapasitesine dayanmaktadır. Ayrıca, gen terapisinde DNA taşıyıcıları olarak kullanılabilme potansiyelleri de bulunmaktadır (Langer, 2000). Biyolojik uygulamalar için PNP'lerin belirli özelliklere sahip olması gerekmektedir. Polimerin yüzey kimyası, şekli ve boyut özellikleri bunlardan bazılarıdır. İlaç dağıtımı için kullanılan nanoparçacıkların çapları birkaç nanometre ile 1000 nm arasında değişmektedir. Genel olarak, ideal ilaç taşıyıcı sistemlerin optimal partikül boyutu 10-200 nm aralığında olmalıdır. Çapı yaklaşık 10 nm'den küçük olan nanoparçacıklar böbrekler tarafından vücuttan hızlıca uzaklaştırılmaktadır (Dreaden ve ark., 2012). Öte yandan, mikron büyüklüğündeki parçacıklar ise karaciğer ve dalak makrofajları tarafından ortadan kaldırılmaktadır (Champion ve ark., 2008). Polimerik nanoparçacıkların kan dolaşımında uzun süre stabil kalabilmeleri için genellikle PEG ile kaplanmaları tercih edilmektedir. Nanoparçacıkların doğasına ve polimer yapısına bağlı olarak, PNP'ler çeşitli şekiller alabilmektedir. PNP'ler tipik olarak küresel forma sahiptir. Küresel şekle sahip olan PNP'lerin, hücrelerde silindirik olanlara kıyasla daha derine girdiği bulunmuştur (Lee ve ark., 2011). PNP'lerin yüzey kimyasının özellikle oral yolla ilaç dağıtımında, hücre emilimi ve tedavi başarısını büyük ölçüde etkilediği gösterilmiştir. Nanoparçacıkların geniş yüzey alanı/hacim oranı, tıbbi tedavi sırasında yüzey reaktivitesini hızlandırmaya katkıda bulunmaktadır (Patra ve ark., 2018). Nanoparçacıkların biyolojik bileşenlerle etkileşime girmesini etkileyen bir diğer önemli faktör ise yüzey yüküdür. Katyonik polimerik NP'lerin kan hücreleriyle veya opsonize edici proteinlerle spesifik olmayan etkileşimleri sitotoksositeye neden olabilmektedir. Bu nedenle, biyolojik uygulamalar açısından, uygun boyuta sahip, anyonik polimerik NP'ler, katyonik yüklü olanlara göre daha uygundur (Sadat ve ark., 2016).

PNP'ler nanokapsül veya nanosfer formunda tasarlanabilmektedirler (Şekil 2). Nanokapsül formu rezervuar sistemi, nanosfer formu ise matris sistemi olarak adlandırılmaktadır (Aleksandra ve ark., 2020). Bu nanoparçacıkların üretiminde biyoyoumlu ve biyobozunur malzemeler olan polimerler kullanılmaktadır. PNP'lerin üretiminde kullanılan en yaygın polimerler arasında nişasta, kitosan, albümin, jelatin ve aljinat gibi doğal polimerler yer almaktadır. Bunların yanı sıra polilaktit ve poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) gibi sentetik polimerler de PNP üretiminde sıklıkla kullanılmaktadır. Polimerlerin kimyasal yapıları, biyolojik olarak parçalanabilirlikleri,

biyoyoumlulukları, üretim ve tasarım kolaylıkları onların biyomalzeme olarak kabul edilmelerine yol açmaktadır (Parveen ve ark., 2012).



Şekil 2. Polimerik nanoparçacık.

Biyopolimerler olarak da bilinen doğal polimerler, bakteri, mantar, yeşil bitkiler ve hayvanlardan elde edilen doğal malzemelerdir. Bu malzemeler polimerler veya polimer matrisli kompozitler olarak bilinmektedirler. Biyolojik olarak parçalanamayan sentetik polimerler arasında ise polietilen, poli (metil metakrilat), polyester, polikarbonat, poliamidler, polisülfonlar vb. yer almaktadır (Lin, 2005).

Nano ilaç taşıma sistemlerinde yaygın olarak kullanılan doğal polimerlerden biri, bitkilerde depo polisakkarit olan nişastadır. Nişasta kimyasal olarak, alfa D-(1, 4) bağı ile bağlanmış tekrar eden glikopiranoz birimlerinden oluşmaktadır. Doku mühendisliği uygulamalarında doku iskeleleri ve kontrollü ilaç taşıyıcı sistemler için bir kopolimer, yardımcı madde ve çözünürlük artırıcı ajan olarak kullanılır (Santander-Ortega ve ark., 2010). Diğer bir doğal polimer ise kitosandır. Bu polimer, böceklerin ve kabuklu deniz canlılarının kabuklarında bulunan kitinin kısmen deasetillenmesiyle üretilir. Glukozamini N-asetil glukozamin ile bağlayan β 1-4 glukozidik bağ içeren bu doğal polimer, nano ilaç taşıma sistemlerindeki potansiyeli açısından kapsamlı bir şekilde araştırılmış olup yaygın olarak kullanılmaktadır.

Diğer nanomalzemelerle karşılaştırıldığında, protein bazlı nanotaşıyıcılar (özellikle albümin bazlı nanoparçacıklar) da biyolojik uygulamalarda önemli bir yere sahiptir. Protein bazlı nanotaşıyıcı sistemler, biyoyoumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, azaltılmış immünojenisite ve azalmış sitotoksosite gibi avantajlı birtakım özelliklere sahiptirler. Ayrıca proteinler, tümör hücrelerinde yüksek seviyede ifade edilen reseptörleri doğrudan veya dolaylı olarak tanıyabilen doğal bir kapasiteye sahip olmaları nedeni ile ilaç hedefleme çalışmalarında avantajlı bir yere sahiptirler. Ayrıca, albümin bazlı nanotaşıyıcılar, çeşitli tümör tiplerinde ilaç direncini ortadan kaldırmak için de kullanılabilir (Verma ve ark., 2018).

Anyonik polisakkarit olarak da adlandırılan ve kahverengi alglerin hücre duvarlarında yaygın olarak bulunan aljinattan üretilen aljinat nanoparçacıkları, su ile temas ettiklerinde viskoz bir yapı oluştururlar. Bu biyomateryaller kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup özellikle belirli bir dizi uygulama yolunu hedefleyen ilaç dağıtımı için kullanılmaktadırlar. İstenilen bölgeye özgü

hedefleme için kimyasal değişikliklere olanak tanıyan çeşitli fizikokimyasal özelliklerine ek olarak mukoyapışkanlık, biyouyumluluk ve uygun biyolojik bozunma profillerini içermeleri aljinat nanoparçacıkların bu alanda kullanımlarını avantajlı hale getirmektedir. (Severino ve ark., 2019).

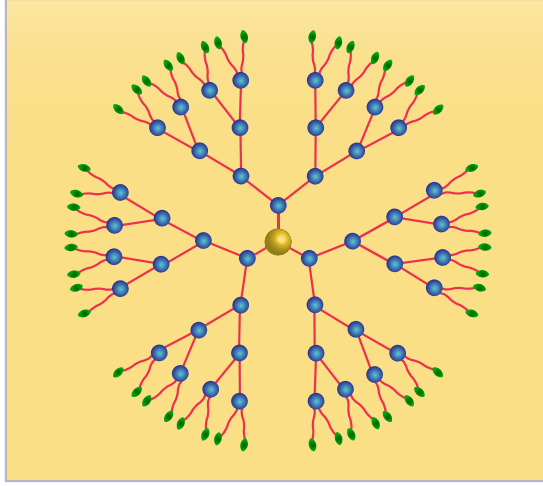
Doğal polimerlerin yanı sıra sentetik polimerler de polimerik nanoparçacıklar oluşturmak için kullanılabilirler. Bu kapsamda genel olarak kullanılan, biyolojik olarak parçalanabilen ve biyolojik olarak parçalanamayan olmak üzere iki tür sentetik polimer vardır. Sentetik polimerlerin mekanik ve fizikokimyasal özellikleri biyolojik dokularınkine benzer özellikler göstermektedir. Çoğu durumda, sentetik polimerleri parçalamak için basit hidroliz reaksiyonlar gerekmektedir. Poli (glikolik asit) (PGA), Poli (laktik asit) (PLA) ve kopolimerleri Poli (laktit-ko-glikolid) (PLGA), Polianhidrit, Poli (propilen fumarat), Polikaprolakton (PCL) ve Polietilen glikol (PEG) en yaygın olarak kullanılan sentetik polimerler arasında yer almaktadır.

PLGA mikrokürecikleri yüksek biyouyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilme, toksik olmama ve iyi membran/kapsül oluşturma kapasitesi gibi özelliklere sahip olan bir polimerik taşıma sistemidir. İlaç dağıtım ve salım sistemleri ile doku mühendisliği iskelelerinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. İlaç dağıtım sistemlerinde, yara iyileşmesi, kanser tedavisi alanında kullanılan ajanları ve antibakteriyel, antioksidan ve antiinflamatuvar ilaçları (hem hidrofilik hem de hidrofobik yapıdaki) kapsüllemek için sıklıkla PLGA kopolimerlerini kullanılmaktadır. PLGA yıkımının birincil yan ürünleri olan laktik asit ve glikolik asit, vücut tarafından kolayca metabolize edilebilmekte ve elimine edilebilmektedir. Biyolojik olarak parçalanmaları sırasında toksik yan ürün meydana getirmemeleri dolayısıyla büyük ölçüde biyouyumlu yapıda olmaları ilaç taşıma sistemi ve doku mühendisliği uygulamalarında onları avantajlı hale getirmektedir (Boltnarova et al., 2021).

İlaç dağıtım çalışmaları sıklıkla tercih edilen bir başka biyolojik olarak parçalanabilen sentetik polimer, polietilen glikoldür (PEG). Suda çözünür ve biyouyumlu yapıda olmaları sebebi ile PEG kaplı nanoparçacık sistemleri çeşitli kanser türlerinde terapötik potansiyelleri açısından araştırılmıştır. Ayrıca nanoparçacıkların kimyasal ve biyofiziksel özelliklerini geliştirmek için PEG kaplama önemli bir yere sahiptir (Shi ve ark., 2021).

Dendrimerler, ilaç dağıtım sistemi olarak yaygın olarak kullanılan farklı PNP türleridir (Şekil 3). Dendrimerler, ağaç dallarına benzeyen kollardan oluşan, radyal olarak simetrik ve yapıları açıkça tanımlanmış tek tip, monodispers bir mimariye sahip, nano ölçekli moleküllerdir. Dendrimerlerin uç grupları, işlevselleştirilmelerine ve fiziksel, kimyasal veya biyolojik özelliklerini değiştirmelerine olanak sağlayabilmektedir. (Srinivasa-Gopalan ve Yarema, 2007). Poliamid, polieter, polyester ve fosfor bazlı dendrimerlerin yanı sıra poliamidoamin (PAMAM) ve polipropilen (PPI) dendrimerleri de dahil olmak üzere en iyi bilinen dendritik ailelerden bazıları ile şimdiye kadar 100'den fazla dendritik yapı tanımlanmıştır (Buhleier ve ark., 1978). Dendrimerlerin mono dispersiyonu, yüksek simetrisi ve yüzey polideğerliliği onları geleneksel lineer polimerlerden ayıran özelliklerdir. Dendrimer sentezi sırasında, tekrarlayan büyüme reaksiyonlarının neden olduğu artan nesil ve dallanma derecesinin bir sonucu olarak nihayetinde üç boyutlu küresel bir yapı meydana gelmektedir. Bu sentez süreci nedeniyle, dendrimerler sınırlı polidispersiteye ve iyi tanımlanmış bir çekirdek-kabuk mimarisine sahiptirler (Tomalia ve ark., 1991). Farklı sentez teknikleri ile dendrimerin boyutu, yüzey yükü, periferik fonksiyonel grupları ve çözünürlüğü istenildiği gibi ayarlayabilmektedir. Yüksek nesil dendrimerler daha fazla terminal fonksiyonel gruba, daha fazla iç boşluğa ve daha büyük boyuta sahiptirler. Genel olarak, dendrimerler hidrofobik yapıdaki molekülleri iç boşluklarına hapsedebilirler (Vögtle ve ark., 2009). Birincil amin grupları her dal ucunda ve üçüncül amin grupları ise PAMAM

dendrimerlerinin her dallanma noktasında bulunmaktadır (Tomalia, 2004). Dendrimerler, sıcaklık, pH, polarite ve iyonik kuvvet dahil olmak üzere çözeltinin parametrelerine bağlı olarak yoğunluk ve şekil açısından çeşitli konformasyonlar alabilme özelliğine sahiptirler (Lee ve ark., 2002). PAMAM dendrimerlerin terminal amin grupları, çeşitli işlevlere sahip olacak şekilde değiştirilebilmekte ve ilaçlar, vitaminler (biyotin, folik asit vb.), antikorlar ve görüntüleme ajanları dahil olmak üzere çok çeşitli biyomoleküllerle bağlanabilmektedir (Majoros ve ark., 2006). Dendrimerlerin katyonik yükünü maskeleyerek ve onları biyouyumlu ve daha az toksik dendrimerlere dönüştürmek için yüzey mühendisliği tekniklerinden yararlanılmaktadır. PAMAM dendrimerlerinin yükünü nötralize etmek için kullanılan teknikler arasında PEGilasyon, asetilasyon, peptit ve karbonhidrat konjugasyonunun yanı sıra yarım nesil dendrimerler sentezlemek yoluyla anyonik yükün eklenmesi yer almaktadır (Gillies ve Fréchet, 2005).



Şekil 3. İç boşluklara ve yüzey fonksiyonel gruplarına sahip dendrimer yapısı.

Ayrıca, PNP'lerin çeşitli ortamlarda farklı özellikler sergilediği belirtilmiştir. pH, sıcaklık, manyetik alan, ışık, ultrason, enzimler ve kimyasallara duyarlı PNP'ler, uyarana duyarlı nanoparçacıklar olarak sınıflandırılmaktadırlar (Son ve ark., 2020).

Bir tür endojen uyarıcı, pH duyarlılığı olarak kabul edilmektedir. Örneğin, kanser hücrelerinin hızlı çoğalması, glikolizi tetiklemekte ve tümör mikroçevresinde pH'nın düşmesine neden olmaktadır. Bu özellik ilaç moleküllerinin salınımını düzenlemek için kullanılabilir. pH'ya duyarlı nanoparçacıklar asidik ortamlara maruz kaldıklarında, kimyasal yapıları değişmekte ve nanoparçacıkların terapötik yükünün salınımına izin verilmektedir (Yan ve ark., 2009). Redoks duyarlılığı, PNP'lerin bir başka endojen uyarıcı tepkisi türüdür. Redoks potansiyeli varyasyonları ayrıca redoks tepkisini de kontrol etmektedir. Tümör hücreleri ve dokuları, normal hücre ve dokulardan 100-1000 kat daha fazla redoks potansiyeline sahiptir. Hücre dışı ve hücreler arası ortamlar arasında veya hücre içi ortam ile tümör arasında indirgeyici enzimlerin aşırı ifadesi gibi ilaç salınımını uyarmak için olası sinyaller araştırılmıştır (Aleksandra ve ark., 2020).

PNP'ler kullanılarak enzimlere yanıt veren ilaç dağıtım sistemleri de geliştirilmiştir. Tümör bölgesinde yeni bir strateji olarak, ilaç salınımını aktif olarak iyileştirebilen enzim uyarıcılarına duyarlı nanoparçacıkların kullanılmasıdır. Tümör bölgesi inflamasyonu için uyarıcılara duyarlı PNP'lerin

ester bağları veya peptit yapısı enzimler tarafından parçalanabilir, böylece bu nanoparçacıkların ilaç yükü hedeflenen alanlarda salınabilmektedir (Li ve ark., 2017). Hem terapötik hem de tanısal amaçlar için, sıcaklığa duyarlı PNP'ler, dış uyaranlara duyarlı sistemlerin en uygun örneklerinden biridir. Kilit noktalarında, PNP'lerin sıcaklık tepkileri her zaman farklı enerji kaynaklarının ve moleküler etkileşimlerin konsantrasyonunu değiştirebilmektedir (Alvarez-Lorenzo ve ark., 2009). Akıllı dağıtım sistemleri için ışık, uzaktan kontrol edilebilme özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen dış uyaranlardan biridir. Stilben, trifenilmetan ve azobenzen gibi ışığa duyarlılaştırıcılar, ışığa duyarlı PNP'ler oluşturmak için nanoparçacıklara eklenmektedirler (Sivadasu ve ark., 2020). Gelişmiş doku penetrasyonu ve güvenliği nedeniyle, yakın kızılötesi (NIR) spektrumunun ilaç salımını izlemek için en iyi ışık kaynağı olduğu düşünülmektedir (Li ve ark., 2017). PNP'lerin uyaran tepkisinin bir başka eksojen türü ise manyetik duyarlılıktır. Bu çeşit PNP'ler manyetizmaya veya çevredeki manyetik alana güçlü bir şekilde tepki vermektedirler. Paramanyetik veya süperparamanyetik özellikte olan ve polimerik bir kaplama içeren nanoparçacıklar, manyetik uyaranlara duyarlı nanotaşıyıcı grubunu oluşturmaktadırlar. Kontrollü ilaç salım sistemleri ve invaziv olmayan tıbbi görüntüleme seçenekleri geliştirmek için manyetik duyarlı PNP'ler sıklıkla kullanılmaktadırlar (Chen ve ark., 2012). Nanoparçacıkların kullanım alanı bulduğu bir başka alan ise gen dağıtımıdır. Genlerin PNP'lere kapsüllenmesi, safra, pH ve proteolitik enzimler gibi spesifik değişkenlerin varlığında parçalanmalarını engelleyebilmektedir. Bu kapsamda tercih edilen polimerlerden biri olan polietilenimin (PEI), genleri özellikle nöronlara aktarmada umut verici sonuçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (Mulligan, 1993). Öte yandan, PNP'ler, kök hücre çalışmaları kapsamında, hücrelerin tanımlanmasında ve izlenmesinde önemli kullanım alanına sahiptirler (Lin ve ark., 2015).

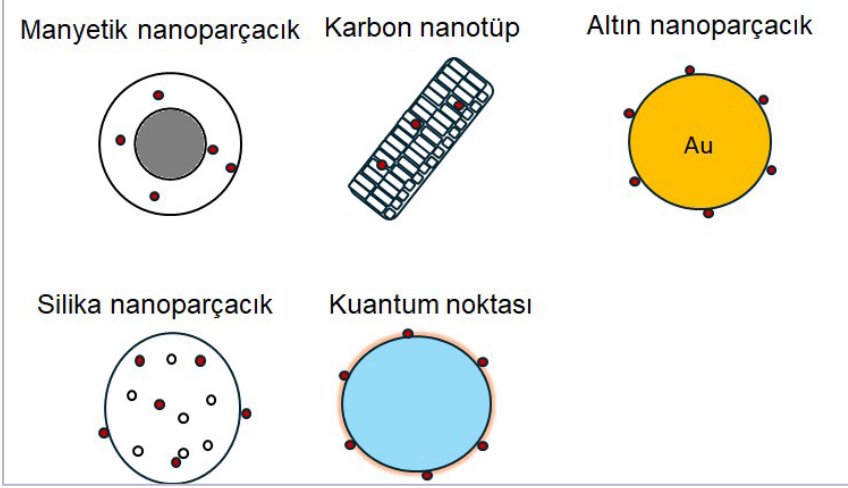
2.3. İnorganik Nanopartiküller

Literatürde tanımlanan çeşitli nanomalzeme türleri arasında, inorganik nanoyapılar, mekanik stabilite, yüzey alanı özellikleri ve biyomedikal alanda avantajlı olabilecek boyut esnekliği gibi nitelikleri nedeniyle dikkat çekmektedirler. Ortalama partikül boyutları, mikro gözenekli yapıları, kimyasal bileşimleri, sahip oldukları fonksiyonel grupları ve şekilleri nedeniyle inorganik nanomalzemeler biyolojik uygulamalarda etkili olarak kullanılabilirler. Bu özellikler, terapötik ajanları seçici olarak taşıyabilmelerini ve biyolojik bariyerlerden kolayca geçmelerini sağlamaktadır (Servatan, 2020).

İnorganik çerçeveler ve nanoyapılar oluşturmak için en yaygın yöntemler arasında sol jel, hidrotermal veya birlikte çöktürme yer almaktadır. Bu yöntemlerin ana temelleri, inorganik öncülerin çeşitli sıcaklık ve basınç koşulları altında kristalleşmesine dayanmakta, bu da makro, mezo ve mikro boşluklar dahil olmak üzere çok çeşitli gözenek boyutlarını içeren üç boyutlu bir ağız oluşumuyla sonuçlanmaktadır (Hu ve ark., 2011). İnorganik nanoparçacıkların vücuttaki biyo-dağılımı çoğunlukla boyutlarına göre belirlenmektedir. İnorganik nanoparçacıkların boyut dağılımı, 5 nanometreden 10 mikrometreye kadar belirgin bir aralığı kapsamaktadır (Bhattacharyya ve ark., 2011). Sentez tekniği, inorganik nanoparçacıkların formu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Nanoçubuklar, elipsoidler, nanosferler, tetrahedral veya altıgen morfolojiler gibi farklı birim hücre şekilleri, farklı üretim teknikleriyle üretilebilmektedir (Mayeen ve ark., 2018). İnorganik nanoparçacıkların pozitif, negatif veya nötr yüzey yüklerine sahip olabilmesi, dikkat çekici özelliklerinden biridir. Yüzey yükü, biyolojik uygulamalarda nanoparçacıkların hedef yüzeylere güçlü bağlanmasını ve yoğunluğunu önemli ölçüde değiştirebilmektedir (Ibaraki ve ark., 2019). Biyomedikal uygulamalar için inorganik

nanoparçacıkların tasarımı, kimyasal veya fiziksel etkilerinden dolayı birbirleriyle uyum içinde çalışabilen bir takım kritik faktörü içermektedir.

İlaç dağıtım sistemleri olarak en yaygın kullanılan inorganik nanoparçacıklar karbon nanotüpler, gümüş nanoparçacıklar, altın nanoparçacıklar, manyetik nanoparçacıklar, silika nanoparçacıklar ve kuantum noktalarıdır (Şekil 4).



Şekil 4. İlaç dağıtım sistemi olarak yaygın olarak kullanılan farklı inorganik nanopartikül türleri.

2.3.1. Karbon Nanotüpler (KNT'ler)

Yuvarlanan karbon polimer tabakaları, karbon nanotüpler olarak bilinen ve hücre zarlarına nüfuz edebilen içi boş tüpleri oluşturmaktadırlar. Karbon nanoparçacıkların sp^2 moleküler uzay yapısı, çok çeşitli ligandlar ve biyomoleküler bileşiklerle işlevselleştirilmelerine olanak sağlamaktadır. Bu özellikleri onların uyarılara duyarlı malzemeler olarak veya biyolojik moleküllerin veya ilaçların hedef hücrelere ulaştırılması için taşıyıcı sistemler olarak kullanılmasına izin vermektedir (Speranza, 2019). Yararlı etkilerine rağmen, klinik translyasyonlarını iyileştirmek için zayıf çözünürlük, toksisite ve sınırlı biyolojik bozunurluk gibi birkaç biyolojik sorunun hala ele alınması gerekmektedir (Brindhadevi ve ark., 2023). KNT işlevselleştirmesinin birincil amacı, KNT'lerin fiziksel özelliklerine (dağılım ve çözünürlük gibi) ek olarak biyo-performanslarını arttırmaktır. Zayıf dağılım ve yüksek agregasyon özelliği taşıyan KNT'ler vücutta daha fazla sitotoksik etki yaratma potansiyeline sahiptirler. Bu nedenle, uygun yüzey işlevselleştirmesi ile hücre alım süreçleri ve hücre absorpsiyonunun kalitesinin artırılması sayesinde KNT'lerin sitotoksik etkisini azaltmak mümkün olabilmektedir (Eldridge ve ark., 2017). Özellikle tek duvarlı karbon nanotüpler (TDKN'ler), ağır metal kalıntıları içermeyen işlevselleştirilmiş karbon nanotüpler (KNT'ler), yüksek biyouyumlulukları nedeniyle hücre düzeyde güvenli olarak kabul edilmektedirler. TDKN'ler; RNA, protein, DNA ve siRNA dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküller için uygun bir taşıma sistemi olarak değerlendirilmektedir (Lacerda ve ark., 2006). Literatürde, anti-enflamatuar ilaçlar, osteojenik deksametazon (DEX), steroidler, antikanser ilaçlar ile yüklü KNT'ler ile yapılan çalışmalar yer almaktadır. π - π bağlar, aromatik bileşikler nanotüplerin yüzeyine adsorbe etmek için kullanılmaktadır. Ayrıca, KNT'lerin farklı optik özellikleri, onları çeşitli platformlarda

gelişmiş fototerapi uygulamaları için kullanışlı hale getirmiştir. KNT'lerin önemli bir özelliği de, doksorubisin gibi ilaçların KNT'ler tarafından kovalent olarak bağlanmadan fiziksel adsorpsiyon yoluyla taşınabilmesi ve böylece KNT'ler ile ilaç arasındaki kimyasal etkileşimlerin önlenmesidir (Ghosn ve ark., 2019; Dhar ve ark., 2008). KNT bazlı nano taşıyıcıların NIR ve lazer ışığını absorbe etme yetenekleri sayesinde, hedeflenen hücreler düzeyinde yakın kızılötesi radyasyona (NIR) maruz kaldıklarında ilaç salımı artmaktadır (Pastorin ve ark., 2006). KNT'ler diğer ilaç taşıma sistemleriyle karşılaştırıldığında, büyük en-boy oranları, onlara daha fazla ilaç taşıma kapasitesi ve hücresel membranlar boyunca daha etkili translokasyon avantajı sağlamaktadır. Bu özellik, siRNA moleküllerinin lipozomlar ve karbon nanotüpler yoluyla iletiminin karşılaştırılmasıyla gösterilmiştir (Liu ve ark., 2007).

2.3.2. Gümüş Nanoparçacıklar (AgNP'ler)

Günümüze kadar yapılmış olan çok sayıda biyomedikal ve doku mühendisliği ile ilgili çalışmalarda, gümüş nanoparçacıklar en yaygın olarak kullanılan inorganik nanomalzemelerden biri olarak karşımıza çıkmaktadır. AgNP'ler aynı zamanda antibakteriyel özelliklere sahip olmaları nedeni ile antiseptik ürünlerin geliştirilmesinde de önemli bir yere sahiptir (Huang ve ark., 2011). Gümüş nanoparçacıklar, topikal uygulamalarda, enfeksiyonların gelişmesini ve kolonizasyonu etkili bir şekilde kontrol edebilen veya tamamen önleyebilen antibakteriyel aktiviteye sahiptirler. Son yıllarda, diğer biyolojik uygulamaların yanı sıra ilaç taşıma sistemleri olarak, kanser tedavisi ve kemik rejenerasyonu ile ilgili uygulamalarda da kullanılmaktadırlar (Friedrich ve ark., 2021). Gümüş nanoparçacıkların farklı hücre tiplerinin nekroz ve apoptoza uğramasına ve bunun da sitotoksisteye yol açmasına neden olabileceği gösterilmiştir. Ek olarak, DNA hasarı, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi, laktat dehidrojenaz (LDH) sızıntısının artması ve kök hücre gelişiminin inhibisyonu dahil olmak üzere mevcut tedavilerin yan etkilerine karşı sonuçlar göstermektedirler. (Park ve ark., 2011). AgNP'ler, tümör dokusuna pasif veya aktif hedefleme yapabilme özelliğine sahiptir. Wicki ve ark. (2015) *in vivo* çalışmalarında, aktif hedefleme ile hedef bölgede ilacın yoğunlaştığını ve reseptör aracılı endositoz ile hücreler tarafından ilaç alınımının iyileştirebildiğini ve bu sayede antikanser tedavi etkinliğini artırdığını göstermişlerdir. İlaçların hücre içine etkili bir şekilde alınımının geliştirilebilmesi için, AgNP'lerin yüzeylerinin biyolojik olarak parçalanabilen ve biyoyumlu polimerlerle kaplanarak veya hedefleme molekülleri ile işlevselleştirilerek modifiye edilmesi gerekmektedir (Wicki ve ark., 2015). Araştırmalar, gemsitabinin gümüş nanoparçacıklara yüklenerek A2780 hücrelerine verildiğinde, terapötik maddenin tek başına kullanıldığı zamana göre daha fazla sitotoksisteye ve apoptoz gelişimi sergilediğini göstermiştir.

Ayrıca, çeşitli proapoptotik genlerin ifadesini arttırarak, AgNP'lerin yumurtalık kanseri hücrelerini gemsitabin veya salinomisine duyarlı hale getirdiği gösterilmiştir (Yuan ve ark., 2017). Ek olarak, oral skuamöz hücreli karsinom-kanser kök hücresi (OSSC) ve H-357 oral kanser hücreler üzerinde kinakrin ve gümüş içeren poli (laktik-ko-glikolik asit) (PLGA) bazlı hibrid nanoparçacıkların etkili olduğu gösterilmiştir (Prabhu ve ark., 2013). Çok çeşitli virüslere karşı inhibitör aktiviteleri nedeniyle, gümüş nanoparçacıklar son zamanlarda geliştirilen uygulamalarda antiviral ajanlar olarak kullanılmaktadır. Gümüş nanoparçacıklar ile sülfidril, amino, karboksil, fosfat ve imidazol grupları arasındaki etkileşimlerin viral inaktivasyona yol açtığı yaygın olarak kabul edilmektedir (Lara ve ark., 2011). Gümüş nanoparçacıklar antibiyotikler, antikanser veya antiviral bileşikler gibi diğer maddelerle birleştirildiğinde sinerjik bir etki ortaya çıkmaktadır. Bu, potansiyel olarak yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine yardımcı olabilecek ve böylece son yıllarda giderek daha yaygın hale gelen mikrobiyal dirençle ilgili mevcut sorunların çözümü açısından umut verici bir tedavi seçeneği oluşturabilecektir.

2.3.3. Altın Nanoparçacıklar (AuNP'ler)

Bilinen en eski metallere biri olan altın, en az bin yıl öncesine dayanan uzun bir araştırma ve kullanım geçmişine sahiptir. M.Ö. V-IV yüzyıllarda kolloidal altın elde edebilen Çinli, Arap ve Hintli bilim adamlarının incelemeleri, kolloidal altın hakkında en eski bilgileri içermektedir (Antonii, M.Ö V-VI yy). Altın nanoparçacıklar, yüzyıllardır biyolojik çalışmalarda kullanılmasına rağmen, immünokimya alanındaki gelişmeler ile birlikte, 1971'de İngiliz araştırmacılar Faulk ve Taylor'ın doğrudan elektron mikroskobu kullanarak salmonella yüzey antijenlerini görselleştirmek için antikorları kolloidal altınla konjuge etmek için bir teknik geliştirmeleriyle başlamıştır (Faulk ve Taylor, 1971). AuNP'ler, günümüzde biyoloji ve tıp araştırmalarında çok geniş bir uygulama yelpazesine sahiptir. Bu alandaki çalışmalar, hedefe yönelik ilaç taşınmasını, DNA ve antijenlerin hedefli dağıtımını, optik biyogörüntülemeyi, klinik kimyayı, immünoanalizi, biosensörleri, mikroorganizmaların ve kanser hücrelerinin tespiti ve fototermolizini içermektedir (Khlebtsov ve Dykman, 2010).

AuNP'lere olan ilgi, uygulama alanlarında sahip oldukları avantajları nedeniyle artmaktadır. 1 nm ila 100 nm arasında değişen boyutlarda, küresel, çubuk ve kafes benzeri dahil olmak üzere çeşitli formlarda kolayca sentezlenebilmektedirler. AuNP'lerin boyutu ve biçimi, optik ve elektriksel özellikleri üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Verissimo ve ark., 2016). Farmasötikler, genler ve hedefleme ligandları dahil olmak üzere çeşitli biyomoleküller, negatif yükleri nedeniyle AuNP'leri kolayca işlevselleştirebilmektedir (Fratoddi ve ark., 2015). Ek olarak, AuNP'ler biyogüvenli ve biyoyoumludur. Yüzey plazmon rezonans (SPR) bantları, ultra küçük boyut, makroskopik kuantum tünelleme etkisi ve benzersiz yüzey etkisi, AuNP'lerin önemli özellikleri arasında yer almaktadır. Tüm bu benzersiz özellikler nedeniyle, AuNP'ler günümüzde çok çeşitli biyomedikal uygulamalar için umut verici malzemelerden biri olarak kabul edilmektedir (Kumar ve ark., 2013).

İlaç dağıtım sistemi olarak yüzey-hacim oranını arttırmak için, AuNP'lerin yüzeyine katyonik polimerler veya karboksil, amin veya tiyol grupları gibi fonksiyonel gruplar eklenmektedir. Böylece ilaç, modifiye edilen yüzey alanı sayesinde AuNP'lere stabil ve verimli bir şekilde immobilize edilebilmektedir. Ayrıca, ilaç-AuNP kompleksleri, ilacın belirli hedef hücrelere ulaştırılmasına izin verecek hücreye özgü hedefleme moleküllerini içerecek şekilde de modifiye edilebilmektedir (Jeong ve ark., 2013).

Paklitaksel, metotreksat, daunorubisin, 5-FU, platin kompleksleri, tamoksifen vb. gibi çeşitli antitümör ajanların AuNP'lere etkili bir şekilde yüklendiği gösterilmiştir (Paciotti et al., 2006). İlaçlar ya fiziksel olarak AuNP'lere yüklenebilmekte ya da alkanethiol bağlayıcıları ile konjuge edilebilmektedir. Konjugatların etkisi, *in vitro* modellerin yanı sıra *in vivo* olarak çeşitli tip tümör modeli geliştirilmiş olan farelerde değerlendirilmiştir.

Altın nanoparçacıkların ayrıca antibiyotik ve diğer antibakteriyel ajanlar ile de yüklenebileceği değerlendirilmiştir. Vankomisin ve kolloidal altının stabil bir kompleks oluşturabildiği ve bu kompleksin vankomisine dirençli çeşitli enteropatojenik bakteri suşlarına karşı etkili olduğu gösterilmiştir (Gu ve ark., 2003).

Fototermal terapi (FTT) olarak bilinen bir tür kanser tedavisi, dışarıdan verilen lazer ışığına tepki olarak ısı üretmek için tümöre yerleştirilen nanoparçacıkları kullanılmaktadır. Yapılan araştırmalar

FTT'nin başarılı bir kanser tedavisi olduğunu göstermektedir. AuNP'ler biyoyumlulukları, hedef molekülleri bağlamak için Au-tiyol biyokonjugasyon kimyası, tümör penetrasyonuna izin veren küçük çapları, doku tarafından diğer ışık dalga boylarına göre daha derinden emilen yakın kızılötesi ışığı absorbe etme yeteneği ve etkili ışık-ısı dönüşümü yeteneği nedeniyle fototermal tedavide (PTT) yaygın olarak kullanılmaktadır (Riley ve Day, 2017).

Bunlara ek olarak, çeşitli formlardaki altın nanoparçacıkları, algılama ve teşhis uygulamalarında, DNA iplikçikleri ile birleştirilerek duyarlılığın artırılması amacıyla kullanılmaktadır. Bu kapsamda yakın zamanda yapılan bir çalışmada, SARS-Cov-2 teşhisi için altın nanoparçacıklar kullanılmıştır (Chen ve ark., 2022).

2.3.4. Manyetik Nanoparçacıklar (MNP'ler)

Düşük toksisiteye ve manyetik özelliklere sahip olan manyetik nanoparçacıklar (MNP'ler), kanser tedavisi de dahil olmak üzere çeşitli biyolojik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. MNP'ler ilaç direncini tersine çevirerek ve antikanser ilaçların hedefli bir şekilde tümör bölgesinde salınmasını sağlayarak kanser tedavisinin etkinliğini artırmaktadır. MNP'lerin *in vivo* uygulamalarda aglomerasyonunu önlemek için, yüzeylerine hidrofobik veya hidrofilik polimerler kaplanmaktadır. MNP'ler biyomedikal uygulamalarda kullanılabilmesi için biyoyumlu olmalı, yüksek ilaç yükleme kapasitesine sahip olmalı, suda dağılabilir olmalı ve tüm bunlar manyetik özelliklerini korurken amaçlanan ilaç salım profiline sahip olmalıdırlar (Gupta ve Gupta, 2005). MNP'ler, seçici sitotoksikite indüksiyonları, manyetik alan varlığında hedeflenebilme yetenekleri ve verimli ilaç yükleme kapasiteleri nedeniyle potansiyel ilaç taşıma sistemleri arasında yer almaktadırlar (Montiel Schneider ve ark., 2022).

MNP sentezi için saf metaller (Fe, Co, Ni vb.) veya metal-polimer kombinasyonları yaygın olarak kullanılmaktadır. MNP'ler, biyosensör, kontrollü ilaç salımı, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) ve kanser tedavisinde hipertermi dahil olmak üzere çeşitli tıbbi uygulamalarda sıklıkla kullanılmaktadır. MNP'lerin harici bir manyetik alan tarafından manipüle edilebilmesi, ana avantajlarından birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. MNP'lerin boyutu, şekli, morfolojisi, kimyasal yapısı ve manyetik davranışı, medikal uygulamalarda potansiyel kullanımlarını belirleyen başlıca faktörlerdir (Tran ve Webster, 2010). Demir çekirdek, uygun bir polimer ile kaplama ve fonksiyonel kısımlar, demir oksit nanoparçacıklarını oluşturan üç temel kısımdır. Bu şekilde süperparamanyetik özelliğe sahip biyolojik olarak parçalanabilen bir demir çekirdek oluşturmak mümkündür. Demir çekirdek uygun bir polimer kaplama ile kaplanır. Bu kaplama sadece koruma sağlamakla kalmaz, aynı zamanda nanoparçacıkların *in vivo* uygulamalar için biyomedikal nanoaraçlara dönüştürülmesinde kritik bir rol oynar. Son olarak, polimer yüzeyine bağlanan fonksiyonel gruplar ise görüntüleme etiketleri, hedef moleküller gibi işlevler görür (Yiğit ve ark., 2012).

Demir oksit bazlı manyetik nanoparçacıklar, ucuz üretimleri, basit yapıları ve çeşitli biyolojik uygulamalar için çok yönlü özellikleri nedeniyle ilaç hedefleme sistemleri olarak ön plana çıkmışlardır. Dışarıdan indüklenen bir manyetik alan varlığında, antikanser ilaçları taşıyan bu nanoparçacıkların tümör hücrelerinde yoğunlaşması sağlanabilmektedir. Bununla birlikte, MNP'lerin organizma içindeki stabilitesini iyileştirmek ve onları bağışıklık sistemi hücrelerinden korumak için önemli yüzey değişikliklerine ihtiyaç vardır. Bu nanoparçacıkları kaplamak için poli-amidoamin (PAMAM) dendrimer, polietilen glikol, kitosan ve aminosilan gibi organik polimerler sıklıkla kullanılmaktadır (Parsian ve ark., 2016).

Manyetik ilaç hedefleme, kanseri tedavi etmek için kemoterapötik ajanları doğrudan süperparamanyetik demir oksit nanoparçacıkları ile birleştiren avantajlı bir yöntemdir. Bu yöntemde organizmaya sistemik olarak verilen ilaç yüklü MNP'ler, harici bir manyetik alan varlığında MNP'lerin tümör bölgesinde yoğunlaşmasını sağlayarak, ilacın hedef bölgede salımına olanak tanımaktadır (Alexiou ve ark., 2010).

Kanser tedavisinde istenmeyen yan etkileri azaltmaya yönelik olarak geliştirilen bir mekanizma da manyetik hipertermidir. Topikal olarak kolayca uygulanabilme potansiyelleri nedeniyle birçok araştırmacı, hipertermi destekli ilaç dağıtımı için demir oksit ve çeşitli kompozitlerini tercih etmektedir. Bu teknolojiyi uygulayarak, çevredeki sağlıklı dokulara zarar vermeden hedeflenen hücrelerin öldürülmesini sağlamak amacı ile manyetik enerjinin ısıya dönüştürülmesi mümkün olmaktadır (Vilas-Boas ve ark., 2020).

2.3.5. Silika Nanoparçacıklar (SiNP'ler)

Biyomedikal uygulamalar alanında seramik nanoparçacıkların çeşitli kullanımları mevcuttur. Silika; kalsiyum, kil ve biyocam gibi inorganik malzemeler tipik olarak seramik nanoyapılarda bulunmaktadır. Geniş yüzey alanları, mükemmel biyoyumlulukları ve kontrol edilebilir partikül boyutları nedeniyle, silika nanoparçacıklar, gıda endüstrisi, tıbbi teşhis, sentetik süreçler ve ilaç dağıtımı gibi çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır. SiNP'ler, Dünya'da en bol bulunan bileşik olan silikon dioksitten üretilmektedir. Silika nanoparçacıkları oluşturmak için farklı hazırlama teknikleri kullanılabilir. Bu teknikler sayesinde hedeflenen uygulamaya göre farklı gözenek hacmi ve güçlü ilaç kapsülleme yeteneğine sahip çeşitli boyutta partiküllerin oluşturulabilmesine olanak sağlanmaktadır. Silika, aktif ligandların bağlanması ve çıplak silika nanoparçacıkların işlevselleştirilmesi için yüzey bağlayıcıları olarak görev gören ve böylece bir dizi biyolojik uygulamada kullanım seçeneğini arttıran çok sayıda silan grubu içermektedir. Silika nanoparçacıklar, 20 nm'den yaklaşık 200 nm'ye kadar çok çeşitli boyutlarda üretilmektedir (Morais ve ark., 2022).

Gözeneksiz silika nanoparçacıkları, düzensiz bir forma sahip olan bir tür amorf silika nanoparçacıklardır. Biyoyumlu özellikte olan bu nanoparçacıklar ilaç dağıtımı, görüntüleme, enzim enkapsülasyonu gibi geniş uygulama alanlarına sahiptir (Rangaraj ve Venkatachalam, 2018). Diğer bir silika nanopartikül türü ise mezoporlu silika nanoparçacıklar olarak adlandırılmaktadır. Mezoporlu silika nanoparçacıklar, güçlü fizikokimyasal özellikler, geniş yüzey alanı, ayarlanabilir gözeneklilik, mükemmel termal kararlılık ve güçlü biyoyumluluk gibi benzersiz özelliklere sahiptirler. Mezoporlu silika nanoparçacıkları, büyük miktarlarda biyoaktif molekülleri hapsedme kapasitesine sahip, bal peteği yapısına benzeyen, yüzlerce gözenek içeren bir yapıdan oluşmaktadır. Bu nedenle, ilaç taşıma, biyogörüntüleme ve kataliz uygulamalarında sıklıkla kullanılmaktadırlar. Mezoporlu silika nanoparçacıkların boyutu kolayca ayarlanabildiğinden, bitki ve hayvan hücreleri tarafından endositoz yoluyla kolayca hücre içerisine alınabilmektedirler. Diğer polimer bazlı ilaç taşıyıcılarla karşılaştırıldığında, hidrolizin neden olduğu bozunmalara, ısıya, pH'a ve mekanik strese karşı yüksek derecede direnç sergiledikleri gösterilmiştir. Mezoporlu silika nanoparçacıkların gözenek boyutunu 2 ila 6 nm arasında ayarlamak mümkündür. Bu sayede, ilaç moleküllerinin yüklenmesi ve ilaç salımının farmakokinetik çalışmalarının yürütülmesi mümkün olmaktadır. Ek olarak, mezoporlu silika nanoparçacıklarında hem iç hem de dış yüzey bulunmaktadır. Bu özellik, mezoporlu silika nanoparçacıkların iç ve/veya dış yüzeylerinde farklı ilaç moleküllerinin seçici olarak yüklenebilmesine olanak sağlamaktadır (Liu ve ark., 2018).

Mezoporlu silika nanoparçacıklar, inhalasyon yoluyla ilaç dağıtım sistemi olarak su bazlı bir aerosol geliştirilmesi amacıyla kullanılmıştır. Polietilen glikol-polietilen imin gruplarına sahip deksametazon yüklü mezoporlu SiNP'lerle fare hava yolu inflamasyon modelinde inhalasyon yoluyla ilaç uygulaması çalışmalarında başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Gulin-Sarfraz ve ark., 2019). Öte yandan, Mo ve ark. yaptıkları bir çalışmada, silika nanoparçacıklarının boyutunu değiştirerek, kan beyin bariyerinden geçebilme potansiyelini göstermişlerdir (Mo ve ark., 2016). Mezoporlu silika nanoparçacıkların avantajları arasında ayrıca mezopor modifikasyonunu takiben kontrollü ilaç salımı, minimum toksisite, biyouyumluluk ve tümör hedeflemesi yer almaktadır. Tümör multimodal tedavisinin temel çalışmalarında proteinleri, nükleik asitleri, küçük moleküllü kemoterapötik ilaçları ve diğer biyolojik makromolekülleri yüklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. İlaç molekülleri, kovalent bağlanma, hidrofobik etkileşimler veya elektrostatik adsorpsiyon yoluyla mezoporlu silika nanoparçacıkların çekirdeğine veya yüzeyine yüklenebilmektedirler. Silika yüzeyler tetraetil ortosilikat (TEOS) hidroksil grubu taşımalarından dolayı herhangi bir modifikasyona tabi tutulmazsa negatif yüke sahiptirler. Bu nedenle, hidrofilik moleküller negatif yüklü mezoporlu silika nanoparçacıkların gözeneklerine ve yüzeylerine adsorbe olma eğilimindedir. Hidrofobik etkileşim tipik olarak hidrofobik antikanser ilaçları mezoporlu silika nanoparçacıklara bağlamak için kullanılır. Bu kapsamda öncelikle hidrofobik ilaç uygun bir organik çözücüde çözülür, daha sonra mezoporlu silika nanoparçacıkları içeren çözelti ile karıştırılır ve çözücüyü ortadan kaldırmak için vakumla kurutulur. Ek olarak, kimyasal konjugasyonun gerçekleşebilmesi için silika yüzeyinin fonksiyonel gruplarının işlevselleştirilmesi yöntemi de uygulanabilmektedir (Rajani ve ark., 2020).

2.3.6. Kuantum Noktaları (KN'lar)

Kuantum noktaları (KN'lar) olarak bilinen nano ölçekli yarı iletkenler, ilaç çalışmaları ve nanoteknolojiyi birbirine bağlayan temel bileşenler arasında yer almaktadır. Geniş ve kalıcı absorpsiyon spektrumları, görünürden yakın kızılötesi dalga boylarına kadar sınırlı emisyon spektrumları, uzun ışınma süresi ve yüksek parlaklık içeren ayırt edici fotoluminesans ve elektronik özellikleri nedeniyle biyosensör veya immünosensör platformlarında prob malzemeleri olarak kullanım avantajlarına sahiptirler. Spesifik fizikokimyasal özellikleri nedeniyle, kuantum noktalarının, ilaçların vücutta nasıl metabolize edildiğini izlemek için etkili floresan belirteçler olduğu düşünülmektedir (Badıllı ve ark., 2020). Fiziksel boyutları, Bohr uyarım yarıçapından (2-10 nm) daha küçük olup kristal çekirdekleri 100-10.000.000 atomdan oluşmakta ve tipik olarak II-VI, IV-VI periyodik tablo grubundaki elementler kullanılarak oluşturulmaktadır. KN'lar olağanüstü fiziksel, optik ve elektriksel özellikleri nedeniyle biyo-görüntüleme, doku mühendisliği, kanser tedavisi, foto-termal terapi, biyosensör ve ilaç dağıtımı gibi çeşitli medikal uygulamalarda kullanılmaktadır (Badıllı ve ark., 2020).

Kuantum noktaları, ilaç dağıtımı ve görüntüleme dahil olmak üzere birden fazla uygulamaya sahiptir. İlaç molekülleri, kanser hücrelerine kuantum noktaları ile birlikte iletildiğinde floresan ışınma sayesinde tümör bölgesinde görüntüleme ve takip avantajı sağlamaktadır. Yapılan bir çalışmada prostat kanserinin görüntülenmesi ve tedavisi için doksorubisin yüklü kuantum noktaları kullanılmıştır. Bu kapsamda KN'lar teranostik platformlar için iyi bir seçenek olarak karşımıza çıkmaktadır (Yuan ve ark., 2010). Başka bir çalışmada ise, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan paklitaksel ilacı CdSe ve ZnS kuantum noktalarına yüklenerek teranostik amaçla kullanılmıştır (Wang ve ark., 2014). Tüm kuantum noktaları arasında grafen kuantum noktalarının ana uygulamasını ise ilaç dağıtımı oluşturmaktadır. Grafen kuantum noktaları, kimyasal inertlikleri, biyouyumlulukları ve düşük toksisiteyi nedeniyle ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılma potansiyeline sahiptirler.

3. NANOPARTİKÜLLERİN UYGULAMA YOLLARI

Nanoparçacıklar için uygulama yolları, terapötik etkinlik, hedefe yönelik dağıtım, biyodağılım, biyoaktivite ve ilacın biyoyararlanımı gibi çeşitli özelliklere bağlı oldukları için büyük önem taşımaktadır (Nikolic ve ark., 2019; Jain, 2020). Etkili ilaç dağıtım sistemi tasarımları ve biyomedikal uygulamalar için nanopartikül uygulama yollarının karmaşık özelliklerini anlamak oldukça önemlidir. Her uygulama yolunun kendine özgü avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Uygun bir nanopartikül bazlı tedavi platformu tasarlamak ve etkili bir terapötik sonuç elde edebilmek için uygulama yollarının nanopartikül davranışı ve farmakokinetik özellikleri üzerindeki etkisi kapsamlı bir şekilde gözden geçirilmelidir. Uygulama yolları genel olarak lokal ve sistemik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır (Ji ve Kohane, 2019).

3.1. Lokal Uygulamalar

Lokal uygulama yolları, nanopartikül ilaç dağıtım sistemini doğrudan cilt veya tümör gibi vücudun belirli bir bölümüne uygulamak için kullanılmaktadır. Lokal uygulamalar topikal olarak, enjeksiyon veya implantasyon ile veya inhalasyon yoluyla yapılabilmektedir. Böylece istenen bölgede yüksek ilaç konsantrasyonuna ulaşmak için biyolojik engeller aşılabilmekte ve kontrollü ilaç salımına olanak verilerek toksik yan etkiler en aza indirilebilmektedir (Ji ve Kohane, 2019; Zhang ve ark., 2022). Böylelikle, hedef dışı bölgelerde ilaç maruziyetini azaltmaya yardımcı olduğu için, ilacın etkinliği artmakta ve lokal bir bağışıklık tepkisi aktive olmaktadır (Ji ve Kohane 2019). Bu tür bir uygulamanın dezavantajı, erişilebilirliğin zayıf olduğu derin doku hedeflerinde uygulanmasının sınırlı olmasıdır. Genel olarak, lokal nanopartikül dağıtımı, ilaç dağıtım sistemlerinin etkinliğini ve güvenliğini artırmak için önemli bir strateji oluşturmaktadır.

3.2. Sistemik Uygulamalar

Sistemik uygulamalarda, nanoparçacıklar kan dolaşımı yoluyla vücuda dağılmaktadır. Oral, oküler, nazal, parenteral, transdermal ve pulmoner uygulamalar gibi sistemik uygulama için sınıflandırılmış çeşitli yollar bulunmaktadır (Nikolic ve ark., 2019; Chenthamara ve ark., 2019; Akbari ve ark. 2022; Gopu ve ark., 2023; Gravan ve ark., 2023). Uygulama yolu; hastalık türü, istenen etki ve ilacın yapısı gibi bazı özelliklere bağlı olarak seçilebilmektedir. Bu dağıtım yollarını kullanarak, ilacı taşıyan nanoparçacıklar sistematik olarak hedeflenen bir bölgeye veya birden fazla organa dağılabilmektedir. Bununla birlikte, bu tür bir uygulama yüksek biyoyararlanıma sahip olsa bile, yüksek dozlarda ilaç konsantrasyonları, bazı organlarda uzun süreli toksisite gibi bazı hedef dışı etkilere ve yan etkilere neden olabilmektedir (Ji ve Kohane, 2019; Jain, 2020; Zhang ve ark., 2022).

3.2.1. Oral Yol

Nanoparçacıklar için en sık kullanılan uygulama yöntemi oral uygulama yoludur. Oral yol, kolay ve ağrısız, kendi kendine uygulama, hastalardan yüksek düzeyde kabul görme, etkinlik ve düşük maliyetli üretim gibi avantajlara sahiptir (Jain, 2020; Chenthamara ve ark., 2019). Bununla birlikte, bazı fizyolojik koşullar ve gastrointestinal sistemdeki engeller nedeniyle, bu yolun etkinliği sınırlı olabilmektedir. Oral uygulama, ilacın çözünürlüğüne ve geçirgenliğine dayanan bir mekanizma ile çalışmaktadır. Bu nedenle, nanoparçacığın bozunmasına neden olabilecek gastrik pH ortamındaki

zayıf emilim ve kararsızlık, yetersiz fizikokimyasal ve farmasötik özellikler nedeniyle düşük biyoerişilebilirlik seviyelerine neden olmaktadır. Sınırlılıklarına rağmen, oral yol yine de en çok tercih edilen ilaç dağıtım türü olmaya devam etmektedir. Bu kapsamda formülasyonları geliştirmek ve dezavantajları ortadan kaldırmaya yönelik olarak yapılan birçok çalışma vardır (Akbari ve ark., 2022; Gopu ve ark., 2023; Gravan ve ark., 2023).

3.2.2. Oküler Yol

Oküler yolda, nanoparçacık uygulaması genellikle gözün ön segmentinde gerçekleştirilmektedir (Akbari ve ark. 2022). Bu rotayı uygulamak basit, güvenli ve verimlidir. Bununla birlikte, oküler ilaç iletiminin, gözün fizyolojik ve anatomik özellikleri nedeniyle ilacın yarı ömrünün azalması, daha az penetrasyon ve biyoyararlanım gibi üstesinden gelinmesi gereken çeşitli dezavantajları vardır. Korneanın sıkı epitel yapısı, gözyaşına bağlı dilüsyon ve drenaj ve oküler kan bariyeri oküler uygulamada zorluklara neden olmaktadır. Bu dezavantajlara rağmen yine de bu yolla azaltılmış yan etkilerle hedefe yönelik ve etkili ilaç dağıtımını yapılmasını sağlayan çalışmalar mevcuttur (Gopu ve ark., 2023; Gravan ve ark., 2023).

3.2.3 Nazal Yol

Oral yoldan sonra nazal uygulama en çok tercih edilen ilaç verme şeklidir ve diğer yollara göre de umut verici bir alternatiftir (Nikolic ve ark., 2019). Burun boşluğu geniş bir yüzey alanına, zengin vasküler kaynağa, iyi emilim sağlayan yüksek gözenekli endotel membranına, epitelyal mikrovillus ve gelişmiş biyoyararlanıma sahip olduğundan, gastrointestinal sistem yoluyla bozulan ilaçların dağılımı için uygun olup bu nedenle düşük oral biyoyararlanıma sahiptirler (Gopu ve ark., 2023). Nazal yol, ilacın kan-beyin bariyerini geçmesini sağladığı için beyne iletim için de uygundur (Jain, 2020; Gravan ve ark., 2023). Bununla birlikte, burun mukozası sahip olduğu mukus tabakası ve siller ile nanoparçacıkları uzaklaştırarak ilaç emilim miktarını sınırlayabilmektedir.

3.2.4. Parenteral Yol

Parenteral yol, ilaçların gastrointestinal sistem dışındaki yollarla vücuda verilmesini ifade eder. Bu yollar intravenöz, intramüsküler, subkutan, intraperitoneal ve intraarteriyel enjeksiyonları ve implantları içermektedir. Enjekte edilen nanoparçacıklar kaslara veya diğer dokulara tamamen verilebilmekte; bu nedenle, ilaç gastrointestinal sistemi atlayarak doğrudan kan dolaşımına veya dokulara girebilmektedir (Nikolic ve ark., 2019; Jain, 2020). Nanoparçacıklarla konjuge edilen ilaçlar için en yaygın olarak kullanılan parenteral uygulama yöntemleri, avantajları nedeniyle subkutan, intramüsküler ve intravenöz uygulamalardır. Parenteral yollarda, ilacın konsantrasyonu kontrol edilebilmekte ve başlangıç etkisi hızlı olmaktadır. Bu uygulama yolunun dezavantajları arasında enjekte edilen bölgede enfeksiyon veya hasar riski sayılabilir.

Deri altı enjeksiyonlar ile ilaç deri altındaki yağ dokusuna uygulanmaktadır. Bu yöntem intravenöz veya kas içi enjeksiyonlardan daha sürekli bir salım ve daha yavaş bir emilim sağlamaktadır. İnsülin ve çeşitli aşilar sıklıkla deri altı enjeksiyonlar ile uygulanmaktadır (Gopu ve ark., 2023).

İntravenöz uygulamada ilaç doğrudan damar içine enjekte edildiği için anında ilaç dağıtımını, hızlı yanıt ve ilaç seviyeleri üzerinde kontrol sağlanmaktadır. Karaciğer veya mide tarafından metabolize edilen ilaçların yanı sıra inflamasyona neden olan ve kaslara enjekte edilemeyen ilaçlar için de uygundur (Chenthamara ve ark., 2019; Gopu ve ark., 2023).

Kas içi enjeksiyon yönteminde vücuda sistemik salım için kas içine bir ilacın uygulanması işlemidir. İntravenöz enjeksiyonlarla karşılaştırıldığında, daha yavaş emilim sağlamaktadır. Bu yolda, çevre dokular yoluyla ilaçların enjeksiyon bölgesinden kan dolaşımına veya lenfatik sisteme difüzyonla emilimi gerçekleşmektedir. Aşıların ve antibiyotiklerin çoğu kas içi enjeksiyonları ile uygulanmaktadır (Gopu ve ark., 2023).

3.2.5. Transdermal Yol

Transdermal yolda, sistemik bir etki elde etmek için nanoparçacıklar cilt bariyeri üzerinden uygulanmaktadır. Cildin belirli bileşikleri emme kapasitesinden yararlanarak, bu yol, ilaçların gastrointestinal sistem yerine karaciğerin ilk geçiş metabolizması yoluyla geçmesini sağlar. Transdermal uygulamalar genellikle cilde ilaç (hidrojeller gibi) içeren bir jel veya yama uygulanmasını içermektedir; buradan emilim gerçekleşmekte ve ilaç kan dolaşımına girmektedir (Jain, 2020; Gravan ve ark., 2023). Düşük maliyet, yüksek hasta uyumu, kolay uygulama, toksisite ve yan etkilerin azalması, kontrollü ilaç dağıtımı, hedefe yönelik bir tedaviye sahip olması ve daha az ağrılı olması gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (Nikolic ve ark., 2019; Gopu ve ark., 2023). Bununla birlikte, birçok bileşik cildin en dış tabakası tarafından bloke edilmekte olup bu nedenle tüm ilaçlar ciltten verimli bir şekilde emilememektedir (Chenthamara ve ark., 2019). Transdermal yollar için bir başka sınırlama ise, bazı ilaçların cildi tahriş edebilmesidir. Genel olarak, bu yol, kullanım kolaylığı, uygunluk ve daha az yan etki gibi faydaları olan bazı ilaç türlerini uygularken yararlı olmaktadır.

3.2.6. Pulmoner Yol

Pulmoner yolla verilen ilaçlar doğrudan akciğerlere inhalasyon yoluyla uygulanmaktadır. Bu inhalasyon iletimi invaziv olmayan bir yoldur ve genellikle kistik fibroz, pulmoner hipertansiyon, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi solunum rahatsızlıklarının tedavisinde kullanılmaktadır (Chenthamara ve ark., 2019; Nikolic ve ark., 2019; Jain, 2020). Büyük yüzey alanları, yüksek vaskülarizasyon ve hepatik ilk geçiş etkilerini atlama özellikleri nedeniyle, akciğerler nanoparçacıkların verimli ve hızlı bir şekilde emilmesini ve etki başlangıcını sağlamaktadırlar. Hedefe yönelik ilaç dağıtımı, ilaca sistemik maruziyetin azalması ve hasta uyumunun artması gibi başka avantajları da mevcuttur (Akbari ve ark., 2022; Gopu ve ark., 2023; Gravan ve ark., 2023). Ancak bazı farmasötikler akciğerlerden hızla uzaklaştırılabileceklerinden, sık dozlama gerektirebilmektedirler. Hastanın solunum durumu, inhalasyon tekniği ve nanoparçacıkların boyutu, ilacın akciğerlerde nasıl birikeceği üzerinde etkili olmaktadır. Pulmoner uygulamanın etkinliğini en üst düzeye çıkarmak için, devam eden araştırmalar yeni ilaç formülasyonları ve dağıtım sistemleri geliştirmeye odaklanmıştır.

4. NANOPARTİKÜLLERİN KARAKTERİZASYONU

Nanoparçacıkların kalitesini, güvenliğini, fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini belirlemek için sentezleri sonrasında karakterize edilmeleri gereklidir. Nanoparçacıkların karakterizasyonları ayrıca ilaç dağıtımı, biyosensör veya görüntüleme gibi uygulamalar sırasında maksimum verim elde etmek açısından da önem taşımaktadır (Nikolic ve ark., 2019). Nanoparçacıkların çeşitli

fizikokimyasal özelliklerinin karakterizasyonunda kullanılan çeşitli yaklaşımlar ve teknikler mevcuttur. Nanopartikül karakterizasyonu ile incelenen parametreler;

- Boyut ve boyut dağılımı
- Şekil ve morfoloji
- Yüzey yükü
- Kimyasal bileşim
- Yüzey alanı
- Çözünürlük
- Stabilité

Boyut ve boyut dağılımı, nanoparçacıkların biyolojik sistemlerde nasıl davranacağını ve etkileşime gireceğini etkilediğinden, özellikle önem arz etmektedir. Nanoparçacıkların stabilitesi ve hücresel absorpsiyonu yüzey yükünden etkilenmektedir. Nanoparçacıkların kimyasal yapısı ve elementel bileşimi ile ilgili bilgiler, bileşim analizi ile elde edilebilmektedir. Bir nanoparçacığın biyoyoumluluğunu ve olası toksisitesini değerlendirmek için, hücreler veya dokular gibi biyolojik sistemlerle nasıl etkileşime girdiğine dair araştırmalar sıklıkla karakterizasyon sürecine dahil edilmektedir. Tüm bu nedenlerden dolayı, güvenli ve verimli nanoteknolojik ilaçların geliştirilmesi için nanoparçacıkların kapsamlı karakterizasyonu gerekmektedir.

Karakterizasyon teknikleri genel olarak mikroskopi, spektroskopi, X-ışını ve diğer karakterizasyon teknikleri olmak üzere 4 başlık altında incelenmektedir.

4.1. Mikroskopi Teknikleri

4.1.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu, malzemelerin yüksek büyütme ölçeğinde yüzey analizine olanak sağlayan bir görüntüleme tekniğidir (Nikolic ve ark., 2019; Joudeh ve Linke, 2022). SEM, yüzey morfolojilerini görüntüleyerek numunelerin boyutu, şekli ve morfolojisi hakkında bilgi edinilmesini sağlamaktadır. SEM, teknik olarak bir numunenin yüzeyinin konsantré bir elektron ışını ile taranmasını içerir. Elektronlar ve numunenin atomları arasındaki etkileşim, yüzey topografyasının detaylı resmini oluşturmak için kullanılabilir çeşitli sinyaller üretmektedir. SEM, parçacığın yüzeyinden saçılan elektronları tanımlayarak nanoparçacıkların yüzey morfolojisinin analiz edebilmesine olanak sağlamaktadır.

SEM’de, mikroskoptan dikey olarak yönlendirilen ve lens sisteminin altındaki numunelere çarpan elektron ışınını ateşlemek için bir elektron tabancası kullanılmaktadır. Işın numuneye çarptıktan sonra, X-ışınları ve elektronlar numuneden saçılır. X-ışınları ve dağılmış elektronlar daha sonra numunenin üç boyutlu resmini oluşturmak için dedektörler tarafından toplanır (McClements ve Mcclements, 2016; Goyal, 2017; Fan ve ark., 2020). Bu şekilde, nanoparçacıkların yüzey morfolojileri, boyutu, şekli, agregasyonu ve dağılımı hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olunmaktadır (Joudeh ve Linke, 2022; Li et al., 2022; Selmani et al., 2022; Munaweera ve Madhusa, 2023).

Optik mikroskopi ile karşılaştırıldığında, SEM daha derin bir görüş alanına sahiptir ve bu özellik üç boyutlu yüzey morfolojilerini görüntülemeyi mümkün kılmaktadır. Mükemmel çözünürlüğü

nedeniyle, ince yüzey özelliklerini ve detaylarını görmek mümkündür. SEM ayrıca yüzeyin kimyasal bileşimi hakkında bazı ayrıntıları da ortaya çıkarabilmektedir.

4.1.2. Transmisyon (Geçirimli) Elektron Mikroskobu (TEM)

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM), iki boyutlu (2D) bir görüntü oluşturmak için ince bir malzeme içine gönderilen bir elektron ışını kullanarak nanoparçacıkların iç katmanlarını inceleme tekniğidir. (Goyal, 2017; Nikolic ve ark., 2019; Joudeh ve Linke 2022). Bir malzemenin iç yapısının yüksek çözünürlüklü görüntüleri TEM tarafından sağlanabilmekte ve atomik ölçekli ayrıntılar görünür hale getirilebilmektedir. İki boyutlu görüntüler ile boyut, şekil, lokalizasyon, dağılım ve agregasyon gibi özelliklerin tümü belirlenebilmektedir (Singh ve ark, 2023).

TEM’de, çok ince bir elektron ışını oldukça ince bir numune segmentine yoğunlaştırmak için elektromanyetik bir lens kullanılmaktadır. Bu ışından gelen elektronlar, mikroskobun tabanında bulunan bir floresan ekrana inerken ya malzmeden saçılır ya da malzemenin içinden geçer. Numunenin görüntüsü, elektron yoğunluklarındaki farkın yarattığı kontrastla elde edilmektedir. Elektron ışınının numunede seçilen bir konuma odaklandığı ve saçılan elektronların bir kırınım modeli oluşturmak için kullanıldığı seçili alan elektron kırınımının kullanımı yoluyla TEM, nanoparçacıkların kristal yapısını karakterize etmek için de kullanılabilir (Joudeh ve Linke, 2022).

TEM ve enerji dağılım X-ışını spektroskopisi (EDS), numunenin elementel analizi ve tıpkı SEM gibi kimyasal bileşimi hakkında daha fazla bilgi edinmek için birlikte kullanılabilirler. Malzemelerin iç yapısı hakkında fikir edinmek için, tomografi teknikleriyle birlikte TEM kullanılarak üç boyutlu görüntüler üretilebilmektedir. Metaller, seramikler, polimerler ve biyolojik numuneler dahil olmak üzere çeşitli malzemeler TEM kullanılarak incelenebilmektedir (Li et al., 2022; Singh ve ark, 2023).

4.1.3. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), malzemelerin özelliklerini ve yüzey topografyasını nano ölçekte incelemek için kullanılan yüksek çözünürlüklü bir görüntüleme yöntemidir (Goyal, 2017, Nikolic ve ark., 2019; Joudeh ve Linke 2022). Nanoparçacıkların boyutunu, stabilitesini ve yüzey morfolojisini numune işleme gerektirmeden incelemek için hızlı ve etkili bir yöntemdir. AFM, numunenin yüzeyini sivri bir uç üzerinden tarayarak bu manyetik uç ile numunenin yüzeyi arasındaki etkileşimleri ölçen bir tekniktir. Analiz sırasında numune ve manyetik uç birbirine çok yaklaştırılmak suretiyle aralarındaki manyetik etkileşimler ölçülebilmektedir (Joudeh ve Linke 2022; Li ve ark., 2022; Singh ve ark, 2023).

4.2. X-ışını Teknikleri

4.2.1. X-ışını Kırınımı (XRD)

X-ışını kırınımı (XRD), bir malzemenin kristal, yarı kristal veya amorf yapı gibi kristal yapı özelliklerini analiz etmek için kullanılan bir tekniktir (Selmani ve ark., 2022; Singh ve ark, 2023). Bu yöntem, gelen X-ışınlarının bir malzemeye uygulanmasına ve ardından X-ışınlarının maddeden çıkarken yoğunluklarının ve saçılma açılarının ölçülmesine dayanmaktadır. Geniş, düşük

yoğunluklu tepe noktaları, düşük kristallik derecesini ve küçük kristalit boyutunu göstermektedir. Bununla birlikte, numuneler değişen atomlar arası mesafeler ile yüksek amorf özelliklere sahip olduğunda veya nanoparçacıklar birkaç yüz atomdan daha küçük olduğunda, XRD'nin çözünürlüğü ve doğruluğu etkilenebilmektedir (Joudeh ve Linke 2022; Munaweera ve Madhusa, 2023).

4.2.2. X-Işını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Yaygın olarak X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) olarak bilinen kimyasal analiz için elektron spektroskopisi (ESCA) tekniği, malzemelerin elektronik yapısını ve kimyasal bileşimlerini incelemek için kullanılan yüzeye duyarlı bir spektroskopi tekniğidir (Nikolic ve ark., 2019; Joudeh ve Linke 2022). XPS'de bir numune, numunenin yüzeyinden fotoelektronların salınmasına neden olan X-ışınlarına maruz bırakılır. Araştırmacılar, bu fotoelektronların enerjisini ve yoğunluğunu ölçerek, numunenin üst birkaç nanometresinde bulunan elementlerin bileşimini, kimyasal bağını ve oksidasyon durumunu tespit edebilmektedirler.

Bu yöntemin, nanoparçacıkların element oranlarını, kimyasal bileşimini ve bağlanma tipini belirlemek için kullanılan en hassas yöntem olduğu düşünülmektedir. XPS yönteminin temeli, bir malzemede bulunan veya bir malzemeyi kaplayan elementleri ve bunların kimyasal durumlarını tespit etmek için yüksek hassasiyete sahip olan fotoelektrik etkidir. Ek olarak, elektron transferi ile ilgili ayrıntılı bilgi XPS ile elde edilebilmektedir (Goyal, 2017; Singh ve ark., 2023).

4.3. Spektrofotometri Teknikleri

4.3.1. UV-Visible Spektroskopisi

UV-Vis spektroskopisi tekniği, bir numunenin ultraviyole ve görünür ışığı nasıl absorbe ettiğini, iletildiğini ve yansıttığını belirlemek için kullanılmaktadır. Bu yöntem, nanoparçacıkların bileşimini, yapısını ve özelliklerini belirlemek için fizik, biyokimya ve kimya alanında sıklıkla kullanılmaktadır (Selmani ve ark., 2022).

Elektronların temel durumdan uyarılmış duruma geçişi, UV-Vis gibi absorpsiyon spektroskopisinde ölçülürken, elektronların uyarılmış durumdan temel duruma geçişi fotoluminesans spektroskopisinde gözlenmektedir. UV-Vis spektroskopisi hem görünür hem de ultraviyole ışığı kullanarak bir numunenin absorpsiyonunu veya yansımalarını ölçmektedir. Fotoluminesans spektroskopisi kullanılırken, bir numunenin luminesans veya floresan özellikleri ölçülmeden önce elektron UV ışığı tarafından uyarılmaktadır (Joudeh ve Linke 2022; Singh ve ark., 2023).

4.3.2. Raman Spektroskopisi

Nanoparçacıkları karakterize etmek için bir diğer önemli teknik Raman spektroskopisidir (Goyal, 2017; Joudeh ve Linke, 2022). Temeli, genellikle bir lazer kaynağından gelen monokromatik ışığın, moleküller tarafından esnek olmayan bir şekilde saçılmasıdır. İzotop bileşiminin, kristal yapının, biyomoleküler etkileşimlerin ve moleküller arasındaki kovalent olmayan etkileşimlerin Raman saçılımı ile tespit edilebileceği gösterilmiştir. Rayleigh saçılımını azaltmak için Raman saçılımı ölçüm işlemi sırasında numune üzerine monokromatik bir ışık (veya lazer ışını) yansıtılır. Saçılan ışık daha sonra gelen ışığa göre açı dışında ölçülür. Daha düşük (Stokes saçılımı) veya daha yüksek (anti-Stokes saçılımı) frekanslara sahip, elastik olmayan şekilde dağılmış ışığı ölçmek için bir

fotodetektör kullanılabilir. Seçim kuralları izin verdiği sürece, gelen ve saçılan ışık arasındaki enerji farkı, aynı zamanda “Raman kayması” olarak da bilinen ve tipik olarak bir dalga sayısı olarak ifade edilen, numunenin titreşim veya fonon frekanslarına eşittir. Spektrum genellikle, Raman kayması ile dağılan ışığın yoğunluğu arasında görüntülenir. (Goyal, 2017; Selmani ve ark., 2022).

4.3.3. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR)

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), bir katı, sıvı veya gazın absorpsiyon veya emisyonunun kızılötesi spektrumunu elde etmek için sıklıkla kullanılmaktadır. Geniş bir spektral aralık boyunca yüksek spektral çözünürlüklü veriler, bir FTIR spektrometresi tarafından eşzamanlı olarak toplanır. Aynı anda sınırlı bir dalga boyu aralığındaki yoğunluğu ölçen dispersif spektrometreyle karşılaştırıldığında bu, önemli bir fayda sağlamaktadır (Selmani ve ark., 2022).

Bu yöntem, kızılötesi ışığın bir maddeye uygulanmasına ve absorbe ya da transfer edilen radyasyonun kaydedilmesine dayanmaktadır. Malzeme yapısındaki bağlar, polarite ve oksidasyon durumu da dahil olmak üzere numunenin doğası hakkındaki bilgiler, her numune için benzersiz bir parmak izi görevi gören sonuçta ortaya çıkan spektrumdan elde edilebilmektedir. Bu yaklaşımın birincil uygulamaları, nanoparçacık yüzeylerinin kimyasal bileşimi veya eklenen fonksiyonel grupları gibi organik moleküllerin karakterizasyonundadır. Ek olarak, yüksek saflık analizlerinde, kirleticilerin tanımlanması için de kullanılan bir yöntemdir (Goyal, 2017; Joudeh ve Linke 2022, Singh ve ark., 2023).

4.4. Diğer Karakterizasyon Teknikleri

4.4.1. Dinamik Işık Saçılımı (DLS)

Dinamik ışık saçılımı (DLS) veya foton korelasyon spektroskopisi (PCS), genellikle mikron altı ila nanometre aralığında, çözelti veya süspansiyondaki parçacıkların boyutunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir (Joudeh ve Linke, 2022). Bu teknik, nanoparçacıkların boyut ve boyut dağılımını analiz etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Difüzyon katsayısını (nanoparçacık hızı) boyutla ilişkilendirmek için Stokes-Einstein denklemi kullanılmakta ve süspansiyondaki nanoparçacıkların Brown hareketine dayalı ışık interferansı ölçülmektedir. Numune tarafından sabit bir açıyla saçılan ışığın yoğunluğu ölçülerek, Brown hareketi altında parçacık hızı hesaplanmaktadır. Temel olarak, DLS tekniğinde Brown hareketi ölçülmekte ve parçacık boyutları bu verilerle karşılaştırılarak hesaplanmaktadır (Goyal, 2017; Selmani ve ark., 2022).

4.4.2. Termogravimetrik Analiz (TGA)

Termogravimetrik analiz (TGA), malzemelerin bileşimini ve ısı stabilitesini incelemek için kullanılan bir tekniktir (Joudeh ve Linke, 2022). TGA yöntemi, yüksek hassasiyetli bir elektronik terazi kullanılarak bir numunenin sıcaklığının arttıkça ağırlığının nasıl değiştiğini ölçmektedir. İlaç molekülleri, biyomoleküller, kaplama maddeleri ve yüzey fonksiyonel gruplar ile işlevselleştirilmiş nanomalzemelerin karakterizasyonu için sıklıkla kullanılmaktadır. Yapısal faz geçiş noktalarını, termal aktivasyon enerjilerini ve oksidatif stabiliteyi ölçmeye ek olarak, bu yaklaşım öncelikle malzemelerin termal stabilitesini, inorganik bileşenlerin miktarını veya bozunma sıcaklıklarını belirlemek için kullanılmaktadır (Goyal, 2017).

4.4.3. Zeta Potansiyeli

Kolloidal çözeltilerin ve nanoparçacıkların karakterizasyonunda çok önemli bir faktör de zeta potansiyelidir. Parçacıklar arasındaki elektrostatik veya yük itme veya çekim gücünün bir yansıması olan zeta potansiyeli, bir çözeltideki yüklü bir parçacık veya damlacığın yanındaki kayma düzlemindeki (kesme düzlemi) elektrik potansiyelinin bir ölçüsüdür (Goyal, 2017; Fan ve ark., 2020). Karşı iyonlar, nanoparçacıkların yüzey yüküne doğru çekilir ve Stern tabakası olarak bilinen ince bir tabaka oluşturmak için burada birikirler. Bu katman, dağılırken nanoparçacıklarla çözelti boyunca hareket eder. Nanoparçacığın zeta potansiyeli, bu katmanın sınırındaki elektrik potansiyelidir. Çevreleyen ortamın pH'ından ve iyonik kuvvetinden etkilenen nanoparçacıkların yüzey yükü, zeta potansiyeli üzerinde bir etkiye sahiptir. Zeta potansiyelinin daha yüksek mutlak değerleri, daha kararlı nanoparçacıkları işaret etmektedir (Joudeh ve Linke, 2022).

4.4.4. Titreşimli Numune Manyetometresi (VSM)

Titreşimli numune manyetometresi, bir malzemenin manyetik özelliklerini belirlemek için kullanılan hassas bir yöntemdir. VSM'nin analizinde numune bir manyetik alana maruz bırakılarak manyetik tepkisi ölçülmektedir.

Bu yöntemde, bir malzemenin manyetik özelliklerini ölçmek için Faraday'ın indüksiyon yasası kullanılmaktadır. VSM'de numune, dikey olarak titreşen özel bir kap içerisinde sabit bir manyetik alana maruz bırakılır. Numunenin manyetik momenti, tutucu titreşmeye başlar başlamaz zamanla değişen bir manyetik alan üretir. Numunenin alternatif manyetik alanı tarafından üretilen elektrik akımı ölçülür ve numunenin manyetik özelliklerini belirlemek için kullanılır (Joudeh and Linke 2022).

5. NANO İLAÇ DAĞITIM SİSTEMLERİNİN TERAPÖTİK UYGULAMALARI

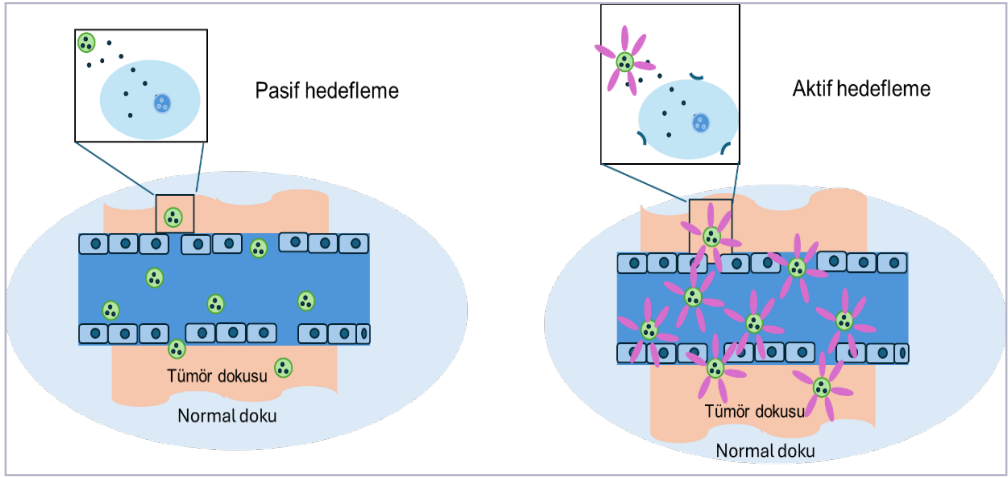
Akıllı ilaç dağıtımı olarak da bilinen hedefli ilaç dağıtımı, vücutta hedeflenen bölgede ilacın konsantrasyonunun artırılmasını sağlayan bir yöntem olarak tanımlanmaktadır (Adepu ve Ramakrishna, 2021). Bir ilaç dağıtım sisteminin klinik uygulamalarda kullanılabilmesi için toksik olmaması, biyolojik olarak parçalanabilmesi, biyoyumlu ve hemouyumlu olması, immünojenik ve trombojenik olmaması gerekmektedir (Veselov ve ark., 2022). Nanoteknolojinin ilerlemesi ile geliştirilen hedefe yönelik ilaç dağıtım stratejilerinin temel amacı, kemoterapötik ilaçların normal hücrelere veya dokulara zarar vermeden, tümör dokusuna veya kanserli hücrelere etkili bir şekilde yönlendirilmesini sağlamaktır. Hedefli ilaç dağıtım sistemlerinin temel bileşeni, hedef bölgedeki belirli reseptörlere spesifik olarak bağlanabilen 'hedefleme fraksiyonu'dur. Ek olarak, hedefe yönelik ilaç dağıtımı, düşük ilaç dozu, yüksek etkinlik ve düşük yan etkileri nedeniyle kişiselleştirilmiş bir tedavi stratejisi olma potansiyeline sahiptir (Li ve ark., 2023).

5.1. İlaç Moleküllerinin Hedefli Dağıtım Yolları

Hedefe yönelik ilaç dağıtım sistemlerinin iki türü vardır: (I) Artmış geçirgenlik ve alıkonma (EPR) etkisine dayalı pasif hedefli ilaç dağıtımı. (II) Reseptörlere ligand bağlanmasına dayalı aktif hedefli ilaç dağıtımı (akıllı ilaç dağıtımı) (Shi ve diğerleri, 2023). Şekil 5'te de gösterildiği gibi ilacın tümör

dokusunda hedeflenmesi, genellikle taşıyıcının şekil ve boyut gibi fiziksel özellikleri tarafından belirlenen EPR etkisi ile pasif olarak artırılabilir. Aktif hedeflemede ise spesifik reseptörlerin ifadesi yoluyla nanotaşıyıcıyı belirli bir hücre veya doku tipine yönlendirmek mümkün olmaktadır (Das ve ark., 2019; Forest ve Pourchez, 2022).

Nanotaşıyıcı sistemin boyutu, pasif hedefleme sırasında kanser hücrelerinde veya dokularda birikmesi için hayati önem taşımaktadır (Şekil 5). Sızdıran damar yapısı, nanoparçacıkların damar dışına çıkmasına izin verirken, zayıf lenfatik drenaj, onları hücre veya doku içinde tutmaya yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte, aktif hedefleme, kanser hücrelerinde bulunan ve sağlıklı hücreler tarafından ifade edilmeyen spesifik belirteçleri hedeflemektedir (Chehelgerdi ve ark., 2023; Fan ve ark., 2023; Subhan ve ark., 2021).



Şekil 5. Pasif ve Aktif Hedeflemenin Temsili.

5.1.1. Pasif Hedefleme

İlaç ve/veya terapötik ajanın, pasif difüzyon veya konveksiyon yoluyla hedef organa ulaşmasını sağlayan bir nano taşıma sistemine dahil edilmesiyle, pasif hedefleme mekanizması gerçekleştirilmektedir (Singh ve Lillard, 2009). Net filtrasyon hızı sıfıra ulaştığında, moleküllerin sıvı içindeki hareketi olarak tanımlanan konveksiyon, çoğu makromolekülün vasküler boşluklardan taşınması için uygun bir mekanizma haline gelmektedir. Oksijen gibi düşük moleküler ağırlıklı bileşikler, yüksek konsantrasyonlu bir alandan düşük konsantrasyonlu bir alana difüzyon yoluyla taşınabilmektedirler. Pasif hedefleme mekanizması, 200 nm'den küçük parçacıkların EPR etkisi ile solid tümörlere yönlendirildiği fizyolojik bir özelliktir. Solid tümörleri çevreleyen kılcal damarlar, normal dokudan daha yüksek geçirgenlik ve fonksiyonel lenfatik damarlardan yoksun olma ile karakterize edilmektedir. Başka bir deyişle, EPR, nanopartikül boyutuna ve neoplastik dokunun iki temel özelliğine, yani sızdıran damar sistemine ve bozulmuş lenfatik drenaja dayanmaktadır. (Bazak ve ark., 2014). Bu fizyolojik durum, kandaki 200 nm kadar küçük nanoparçacıkların, tümörün kılcal gözenekleri boyunca konveksiyon veya pasif difüzyon yoluyla tümör bölgesine kolay ve etkili bir şekilde ulaşmasını sağlamaktadır. Bu durum, nanoparçacıkların tümör dokusunda birikmesini ve zamanla tümör mikroçevresine ve hücre içine kademeli olarak nüfuz etmesini kolaylaştırmaktadır. (Fang ve ark., 2020; İzci ve ark., 2021; Li ve ark., 2023; Subhan ve ark., 2021).

Alternatif bir yol ise, nanoparçacıkların hedeflenen organlara veya dokulara kateterler kullanılarak doğrudan verilmesidir (Seedial ve ark., 2013). Örneğin, ilaç yüklü nanoparçacıklar, lokal olarak restenoz bölgelerine verildiğinde belirli arter duvarı bölgelerinde etkili ve sürekli ilaç salımı sağladığı bildirilmiştir. Luderer ve ark. (2011), stent implantasyonundan sonra restenozu önlemek için hedeflenen ilaç taşıyıcıları olarak sirolimus yüklü poli (D, L-laktid) nanoparçacıkların kullanım potansiyelini araştırmıştır. Çalışma sonucunda, nanoparçacıkların anjiyoplasti ve stent teknolojisinde kullanım için umut verici bir terapötik yaklaşımı olabileceği sonucuna varmışlardır. Bununla birlikte, geliştirdikleri nanoparçacıkların yüzeyine bağlanabilecek hücreye özgü ligandlar ve hücre tipine özgü ajanlar ile daha spesifik ilaç dağıtımının geliştirilebileceğini öngörmüşlerdir.

Pasif hedeflemede ilaç etkinliğinin dolaşım süresi ile doğrudan ilişkili olduğuna dair raporlar bulunmaktadır. Bu etkinlik, nanoparçacığın uygun bir kaplama malzemesi ile kaplanmasıyla elde edilebilmektedir. Iyer ve ark. (2019), akrilik bazlı hidrojel kaplama teknikleri kullanarak ilaç yüklü nanoparçacıklarla kaplanmış anjiyoplasti balonları üretmişlerdir. Bu ilaç yüklü nanoparçacıkların arter duvarında başarılı bir şekilde tutulmasının, arter hastalıklarının etkili lokal tedavisi için potansiyel bir çözüm olabileceğini belirtmişlerdir.

Pasif hedefleme için en yaygın olarak kullanılan ilaç dağıtım sistemleri arasında lipozomal, polimerik, metal oksit ve silikon dioksit nanoparçacıklar yer almaktadır. Bu nanoparçacıklar, hastalık bölgesinde daha fazla ilaç birikimi gerçekleştirecek şekilde tasarlanmaktadır. Bu sürece EPR etkisi yardımcı olmaktadır. Araştırmacılar, klasik EPR etkisinin hemen hemen tüm hızlı büyüyen solid tümörler için geçerli olduğunu göstermişlerdir (Li ve ark., 2023; Tewabe ve ark., 2021).

Klinik uygulamalarda terapötik fayda elde etmedeki zorluklar ve başarısızlıklar, insan solid tümörlerinin tedavisi için EPR etkisinin varlığı ve gücü ile ilgili tartışmalara yol açmıştır (Sun ve ark., 2022). Örneğin, tümör hedeflemesi için nanotıp tabanlı tedaviler, mevcut kanser tedavilerinin mevcut eksikliklerini belirleyebilme ve ele alabilme kolaylığını da sunmaktadır (Chehelgerdi ve ark., 2023). Bu kolaylığı sağlamak için öncelikle solid tümörlerin nasıl büyüdüğünün patofizyolojik özelliklerinin aydınlatılması gerekmiştir. Anti-kanser ajanlarının pasif hedefleme yoluyla tümör bölgesine etkili bir şekilde verilmesini sağlamak için çok çeşitli yöntemler kullanılmış olmasına rağmen, bunlardan en umut verici olanının tümör dokusundaki EPR etkisi olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda hayvan tümör modellerinde EPR etkisinin insan tümör modellerinden daha büyük olduğu gösterilmiştir. Nanoparçacıklar ile bu iki farklı tümöre ilaç verme etkinliği karşılaştırıldığında, hayvan tümör modellerinde daha yüksek etkinlik elde edildiği bulunmuştur (Swift ve ark., 2012). Nanoparçacıkların tümör damar sistemindeki endotel hücreleri arasındaki boşluklardan ve ayrıca vezikülo-vakuolar organelleri kullanan hücre içi yollardan geçme yeteneğine sahip oldukları gösterilmiştir (Mitchell ve ark., 2021; Wu, 2021).

Nanoparçacıklar tümörlere kolayca ulaşabildiklerinde ve tümör dokusu içinde seçici olarak lokalize edilebildiklerinde o bölgede alıkonmaktadır. Bunun nedeni, işlevsiz lenfatik drenajların, farmakokinetik prensibe göre sağlıklı dokulardan daha fazla makromoleküler bileşiklerin seçici birikimine izin vermesidir (Cheng ve ark., 2022; Nehoff ve ark., 2014). Anjiyogenez, tümörlerin büyümeye ve yayılmaya devam ederken yeni kan damarlarının üretimini uyardığı bir süreçtir. Tümör damar sistemi genellikle zayıf endotel iç yapısına ve normal kan damarlarından daha büyük gözeneklere (0.1-3 µm çapında) sahiptir, bu da önemli ölçüde daha yüksek vasküler geçirgenlik ve hidrolik iletkenlik sağlamaktadır. Bu nedenle, vasküler gözeneklerden daha küçük boyutlara sahip nanotaşıyıcılar (lipozomlar, nanoparçacıklar ve makromoleküler ilaçlar) tümör dokusuna yayılma

eğilimindedir. Pasif taşıma mekanizmasının verimli olması için, EPR etkisini (>6-8 nm veya >40 kDa) kullanan nano ilaç taşıma sistemlerinin boyutları büyük önem taşımaktadır (Nakamura ve ark., 2016; Stylianopoulos ve ark., 2018).

Örneğin, pasif hedeflemede kullanılan nano ilaç taşıma sistemlerinin boyutu yaklaşık 1-2 µm aralığında olmasına rağmen, daha küçük boyutlu olanların interstisyel sıvı basıncı ile kolayca ekstrüde edilebilmesi gibi bazı dezavantajları olabilmektedir. Daha büyük boyutlu nano ilaç taşıma sistemlerinin ise düşük doku penetrasyonu açısından sınırlamaları mevcuttur. Başka bir deyişle, nanoparçacıklar <10 nm (daha doğrusu 5.5 nm) boyutunda renal filtrasyon veya ekstrasvazasyon ile kolayca filtrelenebilirken, daha büyük boyutlu olanlar mukopolisakkaridoz hücreleri tarafından ortadan kaldırılma eğilimindedir. Yaklaşık 100 nm çapa sahip nanoparçacıkların uzun süreli kan dolaşımı potansiyeline ve nispeten daha düşük mukopolisakkaridoz alım oranına sahip olduğu bilinmektedir (Nimesh ve Gupta, 2017). Bu çıkarımlarla, nano ilaç taşıma sistemlerinin etkili bir şekilde uygulanması için uygun boyutta olması çok önemlidir. Raza ve ark. (2017) çalışmasına göre EPR etkisini kullanan 100 - 200 nm büyüklüğündeki ilaçların optimum alım etkinliğine sahip olduğunu öne sürülmüştür. Bu boyutlardaki nano ilaç taşıma sistemleri, <50 nm veya >300 nm'lik nanoparçacıklara kıyasla daha iyi alım etkinliği sergilemektedirler. Xu ve ark. (2022) ayrıca çalışmalarında, 200 nm'den küçük boyutlara sahip nanoparçacıkların EPR etkisi sayesinde daha uzun bir dolaşım süresine ve gelişmiş pasif tümör birikimine sahip olma eğiliminde olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca, yaklaşık 15-50 nm boyutundaki nanoparçacıkların, toksik kirleticiler içermemeleri ve uygun şekilde kaplanmaları koşuluyla daha az toksik özellik sergiledikleri ifade edilmiştir (Baillly ve ark., 2019). Le Duc ve ark. (2014) tarafından gerçekleştirilen bir başka çalışmada, yaklaşık 2 nm ve <10 kDa büyüklüğünde polisiloksan kaplı gadolinyum oksit çekirdekleri elde edilmiş ve bu çekirdeklerin ultra küçük olmalarına rağmen başarıyla taşındığı gösterilmiştir. Başka bir yaklaşımda, yaklaşık 200 nm çapındaki parçacıkların taşıma mekanizmasında daha etkili olduğu bildirilmiş, ancak Yu ve ark. (2010), değişken boyutlarda lipozomlar kullanılarak yapılan deneylerinde tümörlere ekstrasvazasyon için eşik boyutunun 400 nm olduğunu öne sürmüşlerdir.

Nanotaşıyıcı boyutunun EPR etkisi yoluyla verimli dağıtım için ana belirleyici faktör olmasına rağmen, şekil, sertlik, yüzey yükü ve hidrofobik/hidrofilik karakter gibi diğer faktörlerin de bu kapsamda önemli olduğu bilinmektedir (Kim ve ark., 2023).

Pasif hedeflemede kullanılan nanotaşıyıcıların infiltrasyonunu kolaylaştırmak için, doku vaskülarizasyonu bazı uygulamalarla geliştirilebilmektedir. Bu uygulamalar arasında radyasyon, sonoparasyon, ultrason, hipertermi ve fotoimmünoterapi yer almaktadır. Artan kan akışı yoluyla derin doku penetrasyonunu aktive eden EPR etkisi, bazı fizyolojik modülatörleri değiştirir. Nanotaşıyıcının yüzeyinde yer alan fonksiyonel gruplar ve yüzey yükü, hedefleme için kritik öneme sahiptir. Örneğin, hidrofobik özellikte veya yüzey yüküne sahip nanoparçacıklar retikuloendotelial sistemde (RES) opsonizasyona uğramaktadır. Bu şekilde nanoparçacık, nötr veya hafif yüklü bir yüzeye ve yüksek derecede hidrofiliğe sahip bir nanotaşıyıcıya dönüştürülmektedir. Pegilasyon genellikle nanotaşıyıcının yüzey yükünü değiştirme ve ayrıca nanotaşıyıcının dış yüzeyinin dekorasyonu için de kullanılabilir (Duan ve ark., 2020; Ejigah ve ark., 2022; Pavelić ve ark., 2023). Bununla birlikte, tüm bu işlevselleştirmeye rağmen (boyut, kaplama ve yükü değiştirmenin ötesinde), alternatif tekniklerin kullanılmasının hastalıklı dokuda ilaç birikimi seviyesinin artmasına büyük ölçüde yardımcı olacağı bilinmektedir. EPR etkisinin hastalıklı dokuda makromoleküllerin birikmesine katkıda bulunduğu bilinmesine rağmen, doku hedeflemesinin iyileştirilerek daha spesifik

hale getirilmesinin önemli olduğu belirtilmektedir (Mitchell ve ark., 2021; Shen ve ark., 2024). Bu kapsamda, EPR etkisi yoluyla küçük moleküllü ilaç konjugatlarının antitümör özelliklerini daha da geliştirmek ve hepatoselüler karsinom yönelimli ligandlar (galaktozamin) yoluyla antikanser ajanları taşıyan nanoparçacıkların aktif hedeflemesini iyileştirmek için Li ve ark. (2022) her iki mekanizmayı birleştirerek sinerjik bir etki elde etmeyi başarmışlardır.

Pasif hedefleme, bu kapsamda terapötik uygulamanın bel kemiğini oluşturmakla birlikte birtakım sınırlamaları mevcuttur. Bu sınırlamalardan biri, bazı ilaçların zayıf dağılımı ve süreci kontrol etmenin zorluğu nedeniyle, tüm tümör hücrelerinin tedavi için erişilebilir olmamasıdır. Bu durumda kontrol eksikliği, tümörlerin ilaçlara dirençli hale gelmesine neden olarak kemoterapinin de başarısız olduğu çoklu ilaç direncine yol açabilmektedir. Diğer bir sınırlama, tümör tipleri içinde ve arasında önemli bir heterojenlik olmasıdır ki bu da ilacın tümör hücreleri içerisine etkisiz alınımına ve hatta bazı tümörlerde EPR etkisinin olmamasına yol açmaktadır. Tüm bu sınırlamaların üstesinden gelmek için daha ileri translasyonel ve klinik çalışmalar, tümörde ve primer/metastatik bölgelerinde EPR fonksiyon mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına ve nano ilaç taşıyıcı sistemlerin etkili dozlarının optimize edilmesine olanak sağlayacaktır. Pasif hedefleme mekanizmaları ile karşılaşılan sorunların üstesinden gelmenin en umut verici yollarından biri olan aktif hedefli ilaç salım yaklaşımlarının geliştirilmesi, nanotıp alanında süregelen çalışmalarla desteklenmektedir (Chehelgerdi vd., 2023; Tian ve ark., 2022).

5.1.2. Aktif Hedefleme

Nanopartikül ilaç sistemlerinin sunduğu avantajlardan bütünsel olarak faydalanabilmek için, nano taşıyıcı sistemlerin hedeflenen dokulara ve hücrelere etkili bir şekilde iletilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, hedefli ilaç dağıtımı için mevcut nano ilaç dağıtım sistemlerinin geliştirilmesi veya yeniden yapılandırılması ve bu sistemlerin iyi bir şekilde karakterize edilmesi önem taşımaktadır. Nano ilaç dağıtım sistemlerinin tasarlanması, geliştirilmesi ve uygulanması karmaşık bir prosedür olup birçok faktöre bağlıdır: (1) hedef hastalığın doğası, (2) hastalıklı organların/dokuların/hücrelerin konumu, (3) NP-ilacın kompleksini bölgeye hedefleme stratejisi ve (4) ilaç dağıtım/salımı mekanizmasının tanımlanması. Bu nedenle, hücre yüzeyi ligandları için spesifik moleküler hedefleme ajanlarının (örneğin küçük moleküller, antikorlar, peptitler) özgüllüğü yoluyla nano ilaç sistemlerini belirli hücrelere aktif olarak hedeflemeyi amaçlayan biyolojik ve/veya kimyasal yaklaşımlar, özelleştirilmiş nanopartikül ilaç sistemleri kullanan tıbbi tedavilerin ilerlemesi için kritik öneme sahiptir (Nag ve Delehanty, 2019). Aktif hedefleme mekanizması, nanoparçacıklar kullanarak ilaç dağıtımını iyileştirmek için araştırmacıların büyük ilgisini çekmiştir. Hedefleme ligandının bir nanoparçacığa bağlanması, biyolojik dağılımını değiştirmeden yalnızca hedef hücreler tarafından kolay alınımını arttırmaktadır (Chen ve ark., 2012).

Sağlıklı bir hücreden patolojik dönüşüm ile hastalıklı hücre gelişmesi sürecinde hücreler, şekillerindeki, enzimatik profillerindeki, mikro çevrelerindeki (pH ve redoks özellikleri gibi) ve gen ifade düzeylerindeki değişiklikler de dahil olmak üzere birçok makromoleküler ve morfolojik değişikliğe uğramaktadırlar. Ancak yüksek seviyede ifade edilen bu moleküllerin çeşitliliği oldukça yüksek olduğundan ve ekspresyon paternleri doku tipine göre değiştiğinden, bu değişiklikleri tanımlamak ve işlevsel olarak hedeflemek oldukça karmaşık olmaktadır. Bu durum, aktif hedefleme için özel ve kişiselleştirilmiş bir yaklaşıma ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir. Ancak bu aşamada dikkat edilmesi gereken önemli bir konu, spesifik moleküllerin 'yüksek seviyede ekspresyonuna'

dayanan aktif hedefleme mekanizmalarının sağlıklı hücelere göre göreceli olmasıdır. Bu durum, spesifik molekülleri içeren, vücuttaki sağlıklı hücrelerin, hedeflenmemiş olsalar bile ilaç toksisitesine maruz kalacağı anlamına gelmektedir. Ancak bazı çalışmalarda nano ilaç taşıyıcı sistemlerden sonra bu morfolojik değişime ve yüksek seviyede ifade edilen spesifik moleküllere dayalı aktif hedefleme mekanizmalarında çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Kanser araştırmaları, aktif hedefleme mekanizmalarının kullanıldığı en popüler alanlardan biridir. Hedeflemede kullanılan hücre yüzeyi belirteçleri arasında $\alpha V\beta 3$ integrin, miyeloid antijen (CD13), hücre adezyon glikoproteini (CD44), programlanmış ölüm ligandı-1 (CD274), folat reseptör proteini, vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörü (VEGFR), insan epidermal büyüme faktörü reseptörü 2 (HER2) yer almaktadır. HER2 ve somatostatin reseptörleri kanser hücrelerinin yüzeyinde yüksek seviyede ifade edilmektedir. Yüksek seviyede ifade edilen hücresel belirteçlerin kullanımı, çeşitli nanoparçacıklarla aktif ilaç hedefleme stratejilerini kolaylaştırmaktadır (Jahan ve ark., 2017). Nano taşıma sistemlerinin ekstrasvazyondan sonra hedefledikleri hücelere aktif olarak yönelmesi, pasif hedeflemenin sınırlamalarının üstesinden gelmenin bir yolu olarak karşımıza çıkmaktadır. Her ne kadar tasarım amacı aktif hedefleme üzerine odaklanmış olsa da nano taşıma sistemi önce pasif olarak hedef bölgede birikmekte, daha sonra gelişmiş hedefleme özellikleri nedeniyle hedefe özel bağlanma meydana gelmektedir (Onzi vd., 2021). Bu sayede tedavi daha etkili olmakta ve ilacın sağlıklı dokularda birikmesine bağlı olarak ortaya çıkabilecek yan etkiler ve toksisite azalmaktadır. Tüm bu avantajları göz önüne alındığında, aktif hedefleme mekanizması ile geliştirilen nanoterapötik kavramı, günümüz tedavi ihtiyaçlarının mümkün olan en üst düzeyde karşılanması açısından oldukça umut vericidir (Attia ve ark., 2019; Dadwal ve ark., 2018). Çoğu aktif nano ilaç hedefleme mekanizması, öncelikle ligand-reseptör, enzim-substrat veya antikör-antijen aracılı etkileşimler yoluyla işlev görmektedir (Chehelgerdi ve ark., 2023; Rasal ve Reddy, 2021).

5.1.2.1. Ligand-Reseptör Aracılı Aktif Hedefleme Mekanizmaları

Aktif hedefleme mekanizmasında, nanoparçacıkları hedeflemek için biyolojik ligandlar kullanılarak yapılan birçok çalışma mevcuttur. Biyolojik ligandlar, genellikle hedef hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanarak, nano ilaç taşıma sisteminin hücre içerisine alınmasına ve terapötik etkinliğinin artırılmasına katkıda bulunmaktadır. Nano ilaç taşıyıcı sistemler, ligand-reseptör etkileşimleri yoluyla hedef hücreleri tanıyabilmekte ve kolayca bağlanabilmektedir. Ligandlar, yani hedef moleküller, çeşitli konjugasyon kimyası yöntemleriyle nano ilaç taşıyıcı sistemlerin yüzeyine eklenebilmektedir (Akpa ve ark., 2023). Bu kapsamda, yüksek konsantrasyonlarda ligand kullanılması, bağlanma miktarında artış ve hücresel alım açısından daha avantajlı olmaktadır. Kullanılan ligand türleri arasında proteinler (Roncato ve ark., 2018), polisakkaritler (Gaikwad ve ark., 2024), nükleik asitler (Mendes ve ark., 2022), peptitler (Q. Wang ve ark., 2019) ve küçük moleküller (Hong ve ark., 2021) yer almaktadır. Nanoparçacıkların bu ligandlarla işlevselliği iki farklı şekilde elde edilmektedir. Birinci yol olarak, nanoparçacık sentezinden sonra, nanoparçacığa kimyasal olarak (konjugasyon) veya fiziksel olarak (adsorpsiyon) bağlanabilirler. İkinci yol ise, nanoparçacık sentezi sırasında nanoparçacığın bileşenlerine bağlanabilirler (Yoo ve ark., 2019).

Antikörler, biyolojik ligandlar arasında spesifik reseptörleri hedeflemek için kDa boyutu ve yüksek özgüllüğü ile yıllardır kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı küçük boyutlu ligandlara göre daha spesifik olarak bağlandıkları bilinmektedir (Gestwicki ve ark., 2002). Bu nedenle hedefleme antikörleri terapötik olarak kullanılma potansiyeline sahiptir (Yoo ve ark., 2019). Son çalışmalarla kanser tedavisi için küçük moleküllere, monoklonal antikörlere veya antikör-ilaç konjugatlarına

doğru artan bir eğilim olduğu görülmektedir. Roncato ve ark. (2018), stokiometrik kontrol ile çok işlevli hale getirilebilen bir poliavidin sınıfı olan avidin-nükleik asit nano düzeneklerini (ANANAS) kullanarak, anti-EGFR antikoruna (setuksimab) yönelik NP'lere kantitatif olarak karşılık gelen antikor-ilaç konjugatlarını karşılaştırmıştır. Setuksimab'ın ANANAS bağlanması EGFR'ye bağımlı vezikül aracılı hücre alımını teşvik etmede daha etkili olduğunu ve setuksimab destekli ANANAS'ın ilaç-antikor oranını antikor-ilaç konjugatlarından daha fazla arttırdığı gösterilmiştir. Ayrıca, doksorubisin yüklü setuksimab içeren ANANAS'ın *in vitro* deneylerde daha sitotoksik olduğu ve *in vivo* deneylerde antikor-ilaç konjugatlarından daha güçlü etkiye sahip olduğu, düşük ilaç dozlarında bile neredeyse %50 tümör azalması sağladığı belirtilmiştir. Ancak bu avantajların yanında, antikorların büyük boyutu (100-150 kDa), modifikasyon işlemi sırasında nanoparçacıkların yüzeyindeki konsantrasyonlarını sınırlamaktadır (Wathoni vd., 2022; Yu vd., 2017).

Ligand-reseptör aracılı aktif hedeflemede kullanılan, 58 amino asitten oluşan affikorlar (Afb'ler) boyut olarak daha küçük (6-7 kDa) olup normal antikorlardan daha yüksek afiniteye sahiptir. Affikorlar, antikora kıyasla daha yüksek özgüllük ve ayarlanabilir afinite ile çok değerlikli veya çok spesifik formatlar oluşturma yeteneğine sahiptir (Tan ve ark., 2022). İnsülin (Lee ve ark., 2020), tümör nekroz faktörü-a (TNF-a) gibi hedeflenen proteinler (Liu ve ark., 2023; Lu ve ark., 2018), insan immün yetmezlik virüsü (HIV) gp120 (Acharya ve ark., 2015) ve insan epidermal büyüme faktörü reseptörü-2 (HER-2) (Hapuarachchige ve ark., 2016; Lin ve ark., 2019) afinite taraması ile elde edilmiştir. Tümör hedefli tedavi, erken tanı, metastaz ve nükste potansiyel uygulamaları mevcuttur. Satpathy ve ark. (2014) yapmış oldukları bir çalışmada, klinik uygulama için HER-2 hedefli manyetik demir oksit nanoparçacıkları (IONP'ler) tasarlamışlar ve nanoparçacıkları, yakın kızılötesi bir boya ile etiketlenen HER-2 affikor ile konjuge etmişlerdir. HER-2 hedefli IONP'lerin hem optik hem de MR görüntülemeye yüksek derecede seçicilik ile hem primer hem de metastatik over tümörlerinde etkili olabileceği gösterilmiştir. HER-2 hemen hemen tüm over kanseri türlerinde ifade edildiğinden, bu çalışma sonucunda geliştirdikleri sistemin, görüntüleme ve terapötik etkinliğinin, over kanserinin tespiti, hedefe yönelik ilaç dağıtımı ve görüntülenmesi için umut vaat ettiği öne sürülmektedir. Xue ve ark. (2016), rahim ağzı kanserine neden olduğu bilinen HPV 16 ve 18'i hedef alan bir terapötik ajan olmadığını tespit ederek HPV16 ve 18 erken antijen 7'yi (enfekte hücrelerin malign transformasyonundan sorumlu E7) hedefleyen bispesifik bir Z16-18 bağlantısı oluşturmuştur. Aynı çalışma grubuyla yaptıkları son çalışmada (Tan ve ark., 2022) bunu prokaryotik bir ifade sisteminde oluşturmuşlardır. Z16-18'in hem SiHa'da (HPV16 pozitif) hem de HeLa'da (HPV18 pozitif) E7'yi spesifik olarak hedefleyebileceğini göstermişlerdir. Ek olarak, SiHa veya HeLa'dan üretilen tümör dokularında hedeflemenin başarılı olduğunu, *in vivo*'da tümör oluşumunu ve büyümesini durdurabildiğini göstermişlerdir.

Transferrin (Tf) proteinleri, ilaçların sağlıklı hücreler üzerindeki yan etkilerini azaltmak için özel olarak hedeflenen bölgelere ulaşmasını sağlamak için kullanılan hedefleme moleküllerinden biridir. Tf'ler, beyine ve kanser hücrelerine ilaç ve gen dağıtım sistemleri için bir hedefleme molekülü olarak kullanıma potansiyeline sahiptir (Dufès ve ark., 2013). Tf, vücutta demir taşınmasından sorumlu demir bağlayıcı bir glikoproteindir. Tf ile modifiye edilmiş nanoparçacıklar, spesifik hedef dokularda ve hücrelerde Tf'nin yüksek seviyede ifade edilmesine yol açmaktadır (Yoo ve ark., 2019). Kan-beyin bariyeri (KBB) nedeniyle, birçok terapötik ajan merkezi sinir sistemine girememektedir. Reseptör aracılı endositoz yoluyla, Tf'ler KBB'yi geçmek için de kullanılmaktadır. Bu bariyeri reseptör aracılı endositoz yoluyla geçmek için Clark ve Davis (2015), KBB'nin kan tarafındaki Tf reseptörlerini hedef alan 80 nm boyutunda konjuge altın nanoparçacıklar tasarlamışlardır.

Bu Tf ile modifiye edilmiş nanoparçacıkların Tf reseptörlerine seçici olarak bağlanmasındaki sınırlamaların üstesinden gelmek için, Tf'yi NP çekirdeklerine asitle parçalanabilen DAK [2,2-bis-(aminoetoksi) -propan] ile bağlamışlardır. Bu bağlantı, Tf nanoparçacıklarının NP çekirdeğinden ayrılmasını sağlamış, bu da Tf'nin tedavi için parankime salımında etkili olmuştur. Bu modifiye nanoparçacıkların ve kullandıkları DAK konjugatının, beyin hastalıklarını tedavi etmek için potansiyel bir nano ilaç taşıma sistemi olarak kullanılabilceğini göstermişlerdir. Yong ve ark. (2019), Tf ile modifiye edilmiş nanoparçacıkların bağırsağa taşınmasındaki rolünü araştırmışlar ve bu amaçla Tf'yi polistiren nanoparçacıklar üzerine adsorbe etmişlerdir. Hücresel alımın karşılaştırılmasında, Tf nanoparçacıklarının modifiye edilmemiş nanoparçacıklara göre önemli ölçüde daha yüksek oranda hücre içerisine alındığını göstermişlerdir. Çalışmanın sonuçlarına göre, Tf taşıma yolunun, oral yoldan uygulanan ilaçlar ve oral uygulama sonrasında biyoyararlanımı zayıf olan ilaçlar için uygun bir biyolojik taşıma yolu olabileceği sonucuna varmışlardır.

Mikroorganizmalar, bitkiler ve hayvanlardan elde edilen ve doğal biyopolimerler olarak tanımlanan polisakkaritler nanoteknoloji alanında önemlidir. Bu doğal polimerler, toksik ve reaktif olmamaları, biyoyumlu ve biyobozunur özelliklere sahip olmaları ve nispeten düşük maliyetli olmaları gibi özellikleri sayesinde terapötik etkinliği artırarak biyoaktif ajanların/ilaçların hedefli taşınması alanında avantaj sağlamaktadır. Ek olarak, bazı polisakkaritlerin enzimatik bozunma, reseptörlerle etkileşim ve mukozal yapışma gibi hedef bölgeye özgü sergiledikleri özellikler, onları bir hedefleme mekanizması haline getirmektedir (Gaikwad ve ark., 2024; Prasher ve ark., 2021).

Son zamanlarda, bazı nano ilaç dağıtım sistemlerinin modellenmesi için aljinatlar birçok araştırmacının odak noktası haline gelmiştir. Resveratrol yüklü PLGA nanoparçacıkları, Jin ve ark. (2021) tarafından emülsifikasyon çözücü buharlaştırılması yöntemi ile formüle edilmiş, daha sonra PLGA nanoparçacıklarının yüzeyi kitosan ve aljinat ile kaplanarak üç katmanlı bir polimer film oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda elde edilen verilere göre, bu nanoparçacıkların mide ortamından hedef bölgelere taşınabildiği ve yüklenen ilaçları belirli bir pH'ta kontrollü salım ile serbest bırakabildiği gözlemlenmiştir. Sonuç olarak, araştırma grubu, geliştirdikleri nanopartikülün inflamasyon gelişen kolon bölgesini hedefleyebileceğini ve ülseratif kolit tedavisi için umut verici olduğunu vurgulamıştır. Kollajen ile birlikte hücre dışı matrisin önemli bir bileşeni olan hyaluronik asit (HA), aktif hedefleme için hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanabilen bir polisakkarittir. Kanser hücrelerinin yüzeyinde yüksek derecede ifade edilen ve kanser kök hücrelerinin bir belirteci olan CD44'e bağlanma potansiyeline sahiptir (Fu ve ark., 2023). HA ayrıca, tümör hücrelerinde fazla miktarda eksprese edilen hyaluronidaz 1 (Hyal-1) enzimi tarafından da parçalanabilmekte ve böylece hedeflenen dokuda ilaç salımını hızlandırabilmektedir. Choi ve ark. (2011), antikanser ilaçlar için taşıyıcı olarak doksorubisin ve kamptotesin yüklü poli (etilen glikol) (PEG) konjuge hyaluronik asit nanoparçacıklarının potansiyelini araştırmışlardır. Bu nanoparçacıklar, reseptör aracılı endositoz yoluyla kanser hücrelerine verilmiş ve deneysel sonuçlar, Hyal-1 enzimi ile inkübasyon sonucunda ilaç salım hızının arttığı gösterilmiştir. Wang ve ark. (2020), tümör hedefli ilaç dağıtımı için HA kaplı kamptotekin nanokristalleri geliştirmişlerdir. Sonuç olarak, bu nanokristallerin yüksek ilaç yükleme verimliliğine ve uzun süreli dolaşıma sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Doğal amino asitlerden oluşan ve kendi kendine birleşen peptit nano ilaç dağıtım sistemleri, geleneksel nano ilaç taşıma sistemlerine göre üstün özelliklere ve mükemmel biyoyumluluk, biyolojik olarak parçalanabilirlik, esnek yanıt, spesifik biyolojik fonksiyon ve sentetik fizibilite gibi benzersiz özelliklere sahiptir (Wang ve ark., 2019). Peptitler kullanılarak geliştirilen nano ilaç dağıtım sistemi stratejileri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Nükleolin, hem glioma hücrelerinin hem de glioma-anjyijenik endotel hücrelerinin yüzeyinde yüksek oranda ifade edilmektedir. Bu avantajdan yararlanmak için, Hu ve ark. (2013), glioma hücrelerinin ve neovaskülerin ikili hedeflemesi ve etkili hücre alımı için spesifik olarak nükleoline bağlanan F3 peptidini kullanmışlardır. Formica ve ark. (2019), kortikosteroid olarak kullanılan deksametazon ile konjuge edilmiş kollajen tip II bağlayıcı peptidin (WYRGRL), kırırdağa özgü kollajen tip II ile spesifik etkileşimler yoluyla kırırdağın derin bölgelerinde etkili bir şekilde tutulduğunu ve böylece yüklenen ilacın osteoartrit tedavisinde etkinliğini artırdığını bildirmiştir.

Aptamerler, benzersiz üç boyutlu konformasyonları nedeniyle hedef moleküllere spesifik olarak bağlanan ve 20-100 nükleotid uzunluğunda olan tek sarmallı DNA veya RNA'lar olarak tanımlanan oligonükleoid sınıfına aittir (Miao ve ark., 2021). Bu yenilikçi hedefleme moleküllerine biyomedikal alanda artan bir ilgi mevcuttur. Organik ve inorganik moleküller, peptitler, proteinler, nükleik asitler, mikroorganizmalar ve canlı hücreler dahil olmak üzere farklı hedeflerden çeşitli aptamer türleri izole edilmiştir. Örneğin, EpCAM aptamerleri epitel hücresi adezyon moleküllerine bağlanmaktadır. Yüksek kimyasal stabilite ve bağlanma afinitesi, özgüllük, biyouyumluluk, yüksek stabilite, düşük immünojenisite, küçük boyut ve hızlı doku etkileşimi dahil olmak üzere diğer hedefleme ligandlarına göre birçok avantaja sahiptirler (Gao vd., 2022; He vd., 2020). Aptamerlerin ilaç taşıyıcı sistemlerdeki rolü, hücre zarındaki reseptöre bağlanmak ve kendilerini veya konjuge nanoparçacıkların hücreye girmesini kolaylaştırmaktır. Bu nedenle kanser tedavisi için ilaç dağıtım sistemi olarak kullanılmaktadır (He vd., 2023; Venkatesan vd., 2023; Aljohani ve ark., 2022; Kumar Kulabhusan ve ark., 2020).

Jeong ve ark. (2020), HER2 RNA aptamerlerini mertansine (DM1) konjuge etmişler ve bu konjugatın HER2 reseptörünü yüksek miktarda ifade eden meme kanseri modellerinde anti-kanser aktivitesini test etmişlerdir. RNA aptamerleri, HER (+) meme kanseri hücrelerine hedefli bağlanma ve toksisite gösterirken, HER (-) meme kanseri hücrelerine bağlanmamış ve toksisite göstermemiştir. Çalışmanın sonuçları, HER2 aptamer-DM1 konjugatının hedefe yönelik bir anti-kanser sistem olarak kullanılabileceğini ve HER2'yi aşırı eksprese eden hedef tümörler için oldukça etkili olduğunu ortaya koymuştur.

Küçük ligand tipi moleküller kullanılarak hedefleme, tümör hücrelerinde fazla miktarda eksprese edilen reseptör benzeri folat reseptörüne bağlanan spesifik bir molekül veya anti-CEA antikoru gibi spesifik bir antijene karşı tasarlanmış bir antikor ile yapılabilmektedir (Briquez ve ark., 2020). CA-125, HE4, RMI ve ROMA genleri (Dochez ve ark., 2019) over kanserinde en yüksek oranda ifade edilen genlerdir. Bunların arasında CA-125, vakaların yaklaşık %85'inde eksprese edilmekte ve bu gen aktif hedefleme için en çok tercih edilen konumda yer almaktadır (Charkhchi ve ark., 2020). Bu tür moleküller veya antikorlar, nanopartikülün yüzeyine konjuge edilmekte ve aktif hedeflemenin temelini oluşturmaktadırlar (Rajagopalan ve Yakhmi, 2017).

Prostat kanserinin tedavisi için Jalilian ve ark. (2021), dosetaksel (DTX) içeren hedefli katı lipid nanoparçacıkları (SLN'ler) formüle etmişlerdir. Bu çalışmada, SLN'lerin yüzeyine bir anizamid ligandı konjuge etmişlerdir. Bu ligand, prostat kanseri hücrelerinde fazla miktarda ifade edilen sigma reseptörü ile etkileşime girebilmektedir. 180 nm'den daha küçük boyutdaki DTX-SLN'nin ilaç yükleme verimliliğinin yaklaşık %85 olduğunu bulmuşlardır. Deneysel sonuçlar, hedeflenen DTX-SLN-anisamidin prostat kanseri hücrelerine karşı DTX-SLN ve serbest ilaca göre daha etkili olduğunu göstermiştir.

Hong ve arkadaşları (2021), folat reseptörlerini yüksek seviyede ifade eden rahim ağzı kanserinin tedavisine yönelik olarak kurkuminin biyoyararlanımını ve biyogüvenliğini artırmak ve tasarladıkları sistemin ilaç yüklenme kapasitesini iyileştirmek için folat reseptörü hedefli bir β -siklodekstrin (β -CD) ilaç dağıtım sistemi geliştirmişlerdir. Nanotaşıyıcının omurgası olan β -CD, ilaç salımını kontrol etmek ve tümörlerde hedeflenen dağıtımına ulaşmak için hidrofilitik/lipofilitik özellikleri ayarlamak üzere ϵ -kaprolakton ve folik asit ile modifiye edilmiştir. Geliştirdikleri sistemin (folik asit/kurkumin nanoparçacıkları) ortalama partikül boyutunun yaklaşık 150 nm olduğunu ve ilaç yüklenme kapasitesinin yaklaşık %20 olduğunu bulmuşlardır. Folik asit reseptörü aracılı endositozun bu sistemin hedefleme mekanizmasına katkıda bulunduğu da bilinmektedir. Bu sayede folik asit kullanımının hem tümörlerin hedeflenmesinde hem de ligand olarak başarılı olabileceği gösterilmiştir. Yaklaşık üç günlük bir stabiliteye sahip olan bu sistemin, PBS kullanılan besiyerinde daha hızlı salınabildiğini, bunun da kurkuminin normal hücrelere kıyasla tümör çevresinde daha fazla birikebileceği anlamına geldiğini belirtmişlerdir.

5.1.2.2. Enzim-Substrat Aracılı Aktif Hedefleme Mekanizmaları

Biyolojik katalizör olarak da tanımlanan enzimler, hemen hemen tüm biyolojik ve metabolik süreçlerde etkin rol oynamakta olup enzim ekspresyonu ve aktivitesinin düzenlenmesindeki bozukluklar ise birçok hastalığın gelişiminde kritik rol oynamaktadır (Robinson, 2015). Enzimlerin klinik tedavilerde umut verici biyolojik tetikleyiciler olarak kullanılmasının nedenleri arasında, kimyasal reaksiyonun başarısız olduğu zorlu koşullar altında (düşük sıcaklık, nötr pH ve tamponlu sulu çözeltiler) bile kimyasal reaksiyonları katalize etme yeteneklerinin olmasıdır. Ayrıca, enzimler substratları için çok yüksek seçiciliğe sahiptir, bu da onların spesifik ve karmaşık biyolojik reaksiyonlara girmelerinin önünü açmaktadır (Hu ve ark., 2014).

Nano ölçekli enzime duyarlı ilaç dağıtım sistemlerinde polimerler, fosfolipitler ve inorganik malzemeler kullanılmaktadır. Bu nanomalzemelerin enzimatik reaksiyonlarla entegre edilmesiyle yüksek biyo-özgüllük elde edilebilmektedir. Örneğin, tümörleri aktif olarak hedeflediği bilinen nanoparçacıklar, hedef bölgeye özgü enzimle tetiklenen kısımlarla konjuge edilebilmekte ve tümör bölgesinde yoğunlaşmalarına izin verilmektedir. Bu sayede hedef olmayan hücrelerin/dokuların ilaca maruz kalma ihtimalinin en aza indirilmiş olması sağlanmaktadır. Sonuç olarak, hedefleme etkinliği ve özgüllüğü artırılarak bölgeye özgü kontrollü ilaç salımı sağlanabilmektedir (Hu vd., 2014). Nanomalzemelerin enzimlere duyarlı olabilmesi için ana zincirde veya yan kimyasal gruplarda enzim tarafından parçalanabilen bölgeler içermeleri gerekmektedir (Sun ve ark., 2023).

Antikor aracılı enzim ilaç öncü terapisi (ADEPT), zayıf yapışma, antijen heterojenliği, etkisiz ilaç dağıtımı ve yetersiz ilaç salımı sorunlarının üstesinden gelmek için solid tümörlerin tedavisinde alternatif bir hedefleme stratejisi olarak ortaya çıkmıştır (Sharma ve Bagshawe, 2017). Bu hedefleme stratejisi iki aşamada uygulanmaktadır. İlk aşamada, monoklonal antikorlar, enzimleri tümör hücresi üzerindeki yüzey antijenlerine konjuge etmek için kullanılmaktadır. Bağlanmamış antikor-enzim konjugatı daha sonra hedeflenen enzim tarafından aktif ilaçlara dönüştürülen ön ilaçlara maruz bırakılmaktadır. Bu stratejide, en temel bileşen olan antikorların hücre içine alınımı önlemek için, ilacın hücre yüzeyindeki enzimlerin hücreden salınması gerekir. İlaç daha sonra pasif bir hedefleme mekanizması yoluyla hedef hücrelere girer ve antijen negatif olan hücrelere toksik etki oluşturmama avantajı sağlar. İntratümöral olarak yüksek dozlarda ilaç verilebilmesine olanak sağlaması, ADEPT mekanizmasının en büyük avantajıdır. Bu mekanizmada kullanılan enzimler arasında β -laktamaz (β -laktam halkalarını böler ve serbest bırakır), sitozin deaminaz (5-florositozini aktif ilaç 5-florourasil'e dönüştürür) ve karboksipeptidaz G2 (CPG2; nitrojen hardalları üretmek için

terminal glutamik asit amidlerini parçalar) yer almaktadır (Allen, 2002). ADEPT sistemi yalnızca patojenik bakterileri spesifik olarak hedeflemekle kalmaz, aynı zamanda enfeksiyon bölgesinde konakçı bağışıklığını aktive ederek patojenlerin öldürülmesini de arttırmaktadır (Narendrakumar ve ark., 2022).

β -laktamaz ifadesi, antibiyotik direncinin en bilinen belirteci olup β -laktamın antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin gelişmesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. Evans ve ark. (2019), siprofloksasini β -laktamaz ile parçalayabilen bir antibiyotik ön ilacı geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri ön ilacın ancak β -laktamaz tarafından aktive edildikten sonra etkili hale geldiğini öne sürmüşlerdir. Siprofloksasin ile karşılaştırılabilir bakterisit aktivite, farklı β -laktamazlar ifade eden *E. coli* izolatlarına karşı gösterilmiştir. β -laktamaz içermeyen suşlarda bakterisit aktivite gözlenmezken, geliştirdikleri ilacın seçici olarak bakterileri hedefleyerek antibiyotik direncinin üstesinden gelebileceğini bildirmişlerdir. Bunu yaparken, mikrobiyotanın dengesini bozmadan ve direnci tanımlamaya gerek kalmadan ilaca dirençli patojenleri seçici olarak hedeflemenin mümkün olabileceğini göstermişlerdir. Theys ve arkadaşları (2001), *E. coli* sitozin deaminazını (CDase) ifade ettirmek ve salgılatmak için apatojenik *Clostridium acetobutylicum*'u (*C. Acetobutylicum*) genetik olarak tasarlamışlardır. Bu durum solid tümör hücrelerinde şiddetli hipoksi ve nekroza yol açan anaerobik bakteriyel enzim/ön ilaç yaklaşımının klinik tedavide kullanılmasının önünü açmaktadır. Rekombinant *C. Acetobutylicum* ile tedaviyi takiben rabdomiyosarkomlu sıçanlarda hedeflenen tümör bölgelerinde sitozin deaminaz tespit edilmiştir. Vasküler hedefleme ajanı olarak kullanılan combretastatin A-4 fosfat ile tedaviden sonra sitozin deaminaz seviyelerinde de önemli bir artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, *C. Acetobutylicum* bazlı terapötik protein dağıtımının kanser tedavisinde kullanım için umut verici olduğu öne sürülmüştür.

5.1.2.3. Antikor Aracılı Aktif Hedefleme

Monoklonal antikorlar (mAb), tümör hücrelerinin yüzeyindeki birçok antijene nanoparçacıkları hedeflemek için kullanılmaktadır. Söz konusu antijenler kanser hücrelerinde aşırı ifade edildiğinden, sağlıklı ve kanser hücreleri arasında ayırt edici bir belirteç görevi görmektedirler. Bu durum, bu antijenlerin ilaç hedefleme mekanizmalarında kullanılması için bir fırsat yaratmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, ilaç tedavisinin mevcut toksisitesinin, mAb'lerin nanoparçacıklara bağlanmasıyla en aza indirilebileceğini göstermektedir (Chien ve ark., 2023). Kanser hücreleri farklı tipte reseptörler ifade etse de mAb'ler yalnızca epidermal büyüme faktörü reseptörü, epitel hücre adezyon molekülü (EpCAM) reseptörü, nörona özgü enolaz reseptörü ve akciğer kanserinde yüksek seviyede ifade edilen reseptörleri hedef alacak şekilde tasarlanmıştır (Kumar ve ark., 2024; Sasaki ve ark., 2013).

mAb'ler ayrıca lipid bazlı nanoparçacıklar, altın nanoparçacıklar, süper manyetik demir oksit nanoparçacıklar dahil olmak üzere çeşitli nanopartikül sistemlerine konjuge edilmiştir. Terapötiklerin (küçük moleküller, DNA ve RNA gibi) kanser bölgesine hedeflenmesi için etkili mekanizmalara acilen ihtiyaç vardır. Lipid nanoparçacıkların geliştirilmesi bu ihtiyaca bir cevap olmuş ve akciğer kanseri tedavisinde kullanılmıştır. Lipid nanoparçacıkların hedeflenen kanser hücreleri tarafından alınabilmesi ve EPR etki mekanizması ile tümör bölgesinde pasif olarak birikmesi için, hücreye girmelerini engelleyen polietilen glikol ile değiştirilmeleri gerekir. Lipid nanoparçacıklarının EpCAM Epi-1'e karşı hücre alımındaki ve terapötik dağıtımındaki değişiklikler Sakurai ve ark (2017) tarafından incelenmiştir. Lipozomal siRNA taşıyıcı sistemi Epi-1 lipid türevi ile değiştirilerek oluşturdukları bu sistem ile EpCAM(+) kanser hücrelerinde hücresel tutulumun oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Wang ve ark (2020), karaciğer kök hücrelerini ve

kanser hücrelerini seçici olarak hedefleyen (CD133 ve EpCAM'in ikili hedeflemesi) ilaç yüklü Y-terminal kodlu peptit (CEP) ligand lipozom nanoparçacıkları tasarlamışlardır. Bu lipozomal nanopartikül, lipozomun yüzeyine sabitlenen ancak CD133 (+) ve EpCAM (+) karaciğer kanser kök hücrelerinin seçici olarak hedeflenmesine izin veren Y şekilli CEP ligandları oluşturmak üzere CD133 (-) ve EpCAM (-) hedefleme peptitlerinin birleştirilmesiyle oluşturulmuştur. Bu ilaç dağıtım sistemi tümör hücresine ulaştığında, yüklenen ilacı hücreye başarılı bir şekilde iletebilmesi için glutatyon (GSH) seviyesini azaltmaya yönelik özel bir özellik de eklenmiştir. Çalışma sonucunda, sitoplazmada fazla miktarda bulunan GSH'nin disülfid bağlarının hasar görmesi nedeniyle fonksiyonelleştirilmiş lipozom sisteminin sitoplazmada endositoza maruz kaldığı ve bunun sonucunda lipozomun yapısının bozulduğu görülmüştür. Bu durum, tümör gelişimini durdurmaya yardımcı olan ilaçların hızlı bir şekilde salınmasına izin vermiştir. Sonuç olarak, geliştirilen sistemin kanser tedavisinde kullanılması için umutları vaad ettiği belirtilmiştir.

Tüm bu avantajlara rağmen, antikor-antijenlere dayalı aktif nano ilaç taşıyıcı sistemlerinin bazı dezavantajları vardır. Bunlardan biri, kan dolaşımına girdikten sonra hızla ortadan kaldırılmalarıdır. Bu, sistemin çok kısa bir yarı ömre sahip olduğu anlamına gelmektedir. Bununla birlikte, araştırmacılar bu dezavantajların üstesinden gelmek ve hedefleme yeteneklerini daha yüksek bir seviyeye çıkarmak için nanoparçacıklarla mAb'ların sentezi üzerinde çalışmaktadır (Silvestre ve ark., 2021).

5.2. Sınırlamalar

Aktif hedefleme mekanizmasında işlevselleştirilmiş nanoparçacıkların etkinliğinin arttığı bilinmesine rağmen, temel olarak üç sınırlama mevcuttur. Bunlardan ilki, hızlandırılmış kan klirensine yol açan hedefleme ligandının yokluğu veya özgül olmayan immünojenik yanıtıdır. İkinci sınırlama antijen heterojenliğidir. Başka bir deyişle, aynı veya farklı kanser hücre dizileri olup olmadıklarına bakılmaksızın, gelişimlerinin farklı aşamalarında farklı biyokimyasal ve morfolojik özellikler sergilemeleri sonucu ortaya çıkan bir durumdur. Üçüncü ve son sınırlama, yukarıda bahsedildiği gibi, reseptör aracılı endositozdan sonra lizozomlara alınan ilacın asit veya enzim aracılı sindirim fazı sırasında büyük konsantrasyonlarda etki kaybına neden olmasıdır (Chen ve ark., 2012; Gyanani ve ark., 2021). Araştırmacılar bu konuda yaptıkları çalışmalar sonucunda hücresel alım aşamasından sonra toksik maddenin lizozomda tutularak parçalandığını ve sitotoksik etkisinin tamamen kaybolduğunu belirtmişlerdir (Collins ve Huang, 1987). Nanotaşıyıcının formülasyonundaki zorluklar, reseptör-ligand etkileşimlerini ve hedeflenen reseptörün ifade edilme süresini etkilemektedir. Ek olarak, nanoparçacıkların toksisitesi ve ligandların immünojenisitesi, terapötik biyoaktif ajanları/ilaçları hedefleme sırasında klinik uygulamalarda kullanılan nanotaşıyıcıların tasarımında bu sistemin sınırlamaları arasında yer almaktadır (Andresen ve ark., 2010; Kumari ve ark., 2016). Ne yazık ki, nanotıp boyutu ve tümör patolojisi arasındaki karmaşık bilinmeyenler nedeniyle, araştırılan nano ilaç taşıma sistemlerinin klinik uygulamasının mevcut ilaç tedavilerinden daha iyi olduğunu söylemek henüz mümkün değildir. Nano ilaç taşıma sistemlerinin tümör dokusuna yeterince iyi nüfuz edememesinin bunun nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir. Nano ilaç taşıma sistemlerinin penetrasyonunu iyileştirmek için yüzey modifikasyonu gibi stratejilere ihtiyaç duyulduğu ve bu nedenle ilaçları iletmek ve hedeflemek için biyoyumlu sistemlere ihtiyaç duyulduğu bilinmektedir (Tewabe ve ark., 2021).

6. SONUÇ

Literatür taraması sonucunda, geleneksel ilaç salım sistemlerinin mevcut sorunlarının üstesinden gelmek için araştırılan ilaç salım sistemlerinin hedef mekanizmaları tartışılmıştır. Serbest ilacın çözünürlüğünü arttırmak ve sağlıklı hücrelerde oluşabilecek toksisiteyi en aza indirmek için, araştırmacılar birçok farklı tipte nano taşıyıcı sistem formüle etmiş ve bu nano taşıyıcıları sağlamak için pasif ve aktif hedefleme mekanizmaları kullanmışlardır. Bu mekanizmaları kullanarak, nano taşıyıcı yüklü terapötik biyoaktif ajanları/ilaçları hedeflenen tümör bölgelerine iletebileceklerini göstermişlerdir. Bu kapsamda yapılan çalışmaların, ileride çeşitli hastalıkların tedavisi ve kişiye özgü tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine ışık tutacağı düşünülmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaç” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdul Qadir, M.D. Faiyazuddin, M.D. Talib Hussain, Thamir M. Alshammari, Faiyaz Shakeel. Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion, *J Mol Liq.* 214, p. 7–18. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2015.11.050>. (2016)
- Acharya, P., Lusvarghi, S., Bewley, CA., Kwong, PD. HIV-1 gp120 as a therapeutic target: navigating a moving labyrinth. *Expert Opinion on Therapeutic Targets.* 19(6), p.765–783. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1010513>. (2015)
- Adepu, S., Ramakrishna, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules (Basel, Switzerland).* 26(19), p.5905. <https://doi.org/10.3390/molecules26195905>. (2021)
- Akbari, J., Saeedi, M., Ahmadi, F., Hashemi, SMH., Babaei, A., Yaddollahi, S., et al. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: a review of the methods of manufacture and routes of administration. *Pharm Dev Technol.* 27(5), p.525-544. <https://doi.org/10.1080/10837450.2022.2084554>. (2022)
- Akpa, PA., Peter, IE., Onwuka, AM., Obi, BC., Akunne, MO., Nworu, CS., Ejikeme, PM., Akunne, TC., Attama, AA., Akah, PA. Nanotheranostics: Platforms, Current Applications, and Mechanisms of Targeting in Breast and Prostate Cancers. In *Journal of Nanotheranostics (Vol. 4, Issue 3, pp.346–383)*. <https://doi.org/10.3390/jnt4030016>. (2023)
- Aleksandra, Z., Filipa, C., Ana, M., Andreia, N., Ba'rbara, P., Nagasamy, V., et al. Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules (Basel, Switzerland),* 25, 3731. (2020)
- Aleksandra, Z., Filipa, C., Ana, M., Andreia, N., Ba'rbara, P., Nagasamy, V., et al. Polymeric nanoparticles: Production, characterization, toxicology and ecotoxicology. *Molecules (Basel, Switzerland),* 25, 3731. (2020)
- Alexiou, C., Tietze, R., Schreiber, E., Lyer, S. Nanomedicine: magnetic nanoparticles for drug delivery and hyperthermia – new chances for cancer therapy. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 53, 839–84. (2010)
- Aljohani, MM., Cialla-May, D., Popp, J., Chinnappan, R., Al-Kattan, K., Zourob, M. Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland).* 27(2). <https://doi.org/10.3390/molecules27020383>. (2022)
- Allen, TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2(10), 750–763. <https://doi.org/10.1038/nrc903>. (2002)
- Alvarez-Lorenzo, C., Bromberg, L., Concheiro, A. Light-sensitive intelligent drug delivery systems. *Photochemistry and Photobiology,* 85(4), 848-860). (2009)
- Andresen, TL., Thompson, DH., Kaasgaard, T. Enzyme-triggered nanomedicine: drug release strategies in cancer therapy. *Molecular Membrane Biology.* 27(7), p.353–363. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.515950>. (2010)
- Ansari, A., Hussain, A., Wadekar, R., Altamimi, MA., Malik, A., Mujtaba, M. A., Ansari, MY., Siddique, MUM., Goyal, SN. Nanovesicles based drug targeting to control tumor growth and metastasis. *Advances in Cancer Biology - Metastasis,* 7, 100083. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.adcanc.2022.100083>. (2023)

- Antonii, F. Panacea Aurea-Auro Potabile. Hamburg: Ex Bibliopolo Frobeniano. (V–IV centuries BC)
- Aswathanarayan, JB., Vittal, RR. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*. 3, 95, DOI: 10.3389/fsufs.2019.00095. (2019)
- Attia, MF., Anton, N., Wallyn, J., Omran, Z., Vandamme, TF. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 71(8), p.1185–1198. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jphp.13098>. (2019)
- Babu, A., Templeton, AK., Munshi, A., Ramesh, R. Nanodrug delivery systems: a promising technology for detection, diagnosis, and treatment of cancer. *AAPS PharmSciTech*. 15(3), p.709–721. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0089-8>. (2014)
- Badilli, U., Mollarasouli, F., Bakirhan, NK., Ozkan, Y., Ozkan, SA. Role of quantum dots in pharmaceutical and biomedical analysis, and its application in drug delivery. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 131, 116013. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116013>. (2020).
- Bailly, AL., Correard, F., Popov, A., Tselikov, G., Chaspoul, F., Appay, R., Al-Kattan, A., Kabashin, A. V., Braguer, D., Esteve, MA. In vivo evaluation of safety, biodistribution and pharmacokinetics of laser-synthesized gold nanoparticles. *Scientific Reports*. 9(1), p.12890. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48748-3>. (2019)
- Bangham, AD., Standish, MM., Watkins, JC. Tek değerlikli iyonların şişmiş fosfolipitlerin lamelleri boyunca difüzyonu. *J. Mol. Biol.* 13 (1), 238–252, doi: 10.1016/S0022-2836(65)80093-6 35. (1965)
- Bazak, R., Houri, M., El Achy, S., Hussein, W., Refaat, T. Passive targeting of nanoparticles to cancer: A comprehensive review of the literature. *Mol Clin Oncol*. 2(6), p.904–908. <https://doi.org/10.3892/mco.2014.356>. (2014)
- Beloqui A., Solinis MA., Rodriguez-Gascon A., Almeida AJ., Preat V. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. *Nanomedicine*. 12(1), 143–161. (2016)
- Bhattacharyya, S., Kudgus, RA., Bhattacharya, R., Mukherjee, P. Inorganic nanoparticles in cancer therapy. *Pharmaceutical research*. 28, 237-259. <https://doi.org/10.1007/s11095-010-0318-0>. (2011)
- Boltnarova B., Kubackova J., Skoda J., Stefela A., Smekalova M., Svacinova P., Pavkova I., Dittrich M., Scherman D., Zbytovska J., et al. PLGA based nanospheres as a potent macrophage-specific drug delivery system. *Nanomaterials*. 11, 749. <https://doi.org/10.3390/nano11030749>. (2021)
- Brindhadevi, K., Garalleh, HA., Alalawi, A., Al-Sarayreh, E., Pugazhendhi, A. Carbon nanomaterials: Types, synthesis strategies and their application as drug delivery system for cancer therapy. *Biochemical Engineering Journal*. 192, 108828. (2023)
- Briquez, P. S., Hauert, S., de Titta, A., Gray, LT., Alpar, AT., Swartz, MA., Hubbell, JA. Engineering Targeting Materials for Therapeutic Cancer Vaccines. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 8(February), 1–26. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00019>. (2020)
- Buhleier, E., Wehner, W., Vögtle, F. “Cascade”- and “nonskid-chain-like” syntheses of molecular cavity topologies. *Synthesis*. 9, 155–8. (1978)
- Champion, JA., Walker, A., Mitragotri, S. Role of particle size in phagocytosis of polymeric microspheres. *Pharm. Res*. 25, 1815–1821. (2008)
- Charkhchi, P., Cybulski, C., Gronwald, J., Wong, FO., Narod, SA., Akbari, MR. CA125 and Ovarian Cancer: A Comprehensive Review. *Cancers*. 12(12). <https://doi.org/10.3390/cancers12123730>. (2020)
- Chehelgerdi, M., Chehelgerdi, M., Allela, OQB., Pecho, RDC., Jayasankar, N., Rao, DP., Thamaraikani, T., Vasanthan, M., Viktor, P., Lakshmaiya, N., Saadh, M. J., Amajd, A., Abo-Zaid, MA., Castillo-Acobo, RY., Ismail, AH., Amin, AH., Akhavan-Sigari, R. Progressing nanotechnology to improve targeted cancer treatment: overcoming hurdles in its clinical implementation. *Molecular Cancer*. 22(1), p.169. <https://doi.org/10.1186/s12943-023-01865-0>. (2023)
- Chen, WC., Zhang, AX., Li, SD. Limitations and niches of the active targeting approach for nanoparticle drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*. 4(2–4), p.89–93. <https://doi.org/doi:10.1515/ejnm-2012-0010>. (2012)
- Chen, Z., Li, J., Li, T., Fan, T., Meng, C., Li, C., et al. CRISPR/Cas12a-empowered surface plasmon resonance platform for rapid and specific diagnosis of the Omicron variant of SARS-CoV-2. *National Science Review*. 9(8), nwac104. (2022)
- Chen, Z., Yin, JJ., Zhou, YT., Zhang, Y., Song, L., Song, M., et al. Dual enzyme-like activities of iron oxide nanoparticles and their implication for diminishing cytotoxicity. *ACS Nano*, 6, 4001-4012. (2012)
- Cheng, X., Lee, RJ. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery. *Adv. Drug Deliv Rev*, 99 (PtA), p. 129- 137, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.01.022>. (2016)
- Cheng, Z., Que, H., Chen, L., Sun, Q., Wei, X. Nanomaterial-Based Drug Delivery System Targeting Lymph Nodes. *Pharmaceutics*. 14(7), p.1372. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14071372>. (2022)

- Chenthamara, D., Subramaniam, S., Ramakrishnan, SG., Krishnaswamy, S., Essa, MM., Lin, FH., Qoronfleh, MW. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration. *Biomater Res*, 23, 20. doi:10.1186/s40824-019-0166-x. (2019)
- Chien, HT., Prior, H., Andrews, L., van Aerts, L., Cauvin, A., et al. Re-evaluating the need for chronic toxicity studies with therapeutic monoclonal antibodies, using a weight of evidence approach. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 138, p.105329. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2022.105329>. (2023)
- Choi, KY., Yoon, HY., Kim, JH., Bae, SM., Park, RW., Kang, YM., Kim, IS., Kwon, IC., Choi, K., Jeong, SY., Kim, K., Park, JH. Smart Nanocarrier Based on PEGylated Hyaluronic Acid for Cancer Therapy. *ACS Nano*. 5(11), p.8591–8599. <https://doi.org/10.1021/nn202070n>. (2011)
- Clark, AJ., Davis, ME. Increased brain uptake of targeted nanoparticles by adding an acid-cleavable linkage between transferrin and the nanoparticle core. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112(40), p.12486–12491. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517048112>. (2015)
- Collins, D., Huang, L. Cytotoxicity of Diphtheria Toxin A Fragment to Toxin-resistant Murine Cells Delivered by pH-sensitive Immunoliposomes I. *Cancer Research*. 47(3), p.735–739. (1987)
- Dadwal, A., Baldi, A., Kumar Narang, R. Nanoparticles as carriers for drug delivery in cancer. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*. 46, p.295–305. <https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1457039>. (2018)
- Das, RP., Gandhi, VV, Singh, BG., Kunwar, A. Passive and Active Drug Targeting: Role of Nanocarriers in Rational Design of Anticancer Formulations. *Current Pharmaceutical Design*. 25(28), p.3034–3056. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190830155319>. (2019)
- Derakhshandeh, K., Azandaryani, AH. Active-targeted Nanotherapy as Smart Cancer Treatment. *Smart Drug Delivery System* (p. Ch. 4) (Sezer, AD. ed.). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61791>. (2016).
- Dewangan, P., Mourya, A., Singh, PK., Chaudhary, M., Sharma, R., Bajwa, N., Baldi, A., Singh, KK., Singh, SB., Madan, J., Namdeo, KP. Drug delivery: The conceptual perspectives and therapeutic applications. *Polymer-Drug Conjugates: Linker Chemistry, Protocols and Applications*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91663-9.00010-2>. (2023)
- Dhar, S., Liu, Z., Thomale, J., Dai, H., Lippard, SJ. Targeted single-wall carbon nanotube-mediated Pt(IV) prodrug delivery using folate as a homing device. *J Am Chem Soc*. 130(34), 11467–11476. (2008)
- Di Stefano, A. Nanotechnology in Targeted Drug Delivery. *International journal of molecular sciences*. 24(9), p.8194. <https://doi.org/10.3390/ijms24098194>. (2023)
- Din, FU., Aman, W., Ullah, I., Qureshi, OS., Mustapha, O., Shafique, S., Zeb, A. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors. *International Journal of Nanomedicine*. 12, p.7291–7309. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146315>. (2017)
- Dochez, V., Caillon, H., Vaucel, E., Dimet, J., Winer, N., Ducarme, G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *Journal of Ovarian Research*. 12(1), 28. <https://doi.org/10.1186/s13048-019-0503-7>. (2019)
- Dreaden EC., Austin LA., Mackey MA., El-Sayed MA. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Therapeut. Deliv*. 3, 457–478. (2012)
- Duan, L., Yang, L., Jin, J., Yang, F., Liu, D., Hu, K., Wang, Q., Yue, Y., Gu, N. Micro/nano-bubble-assisted ultrasound to enhance the EPR effect and potential theranostic applications. *Theranostics*. 10(2), 462–483. <https://doi.org/10.7150/thno.37593>. (2020)
- Duan, Y.; Dhar, A.; Patel, C.; Khimani, M.; Neogi, S.; Sharma, P.; Siva Kumar, N.; Vekariya, RL. A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. *RSC Adv*. 10 (45), 26777– 26791, <https://doi.org/10.1039/D0RA03491F> (2020)
- Dufès, C., Al Robaian, M., Somani, S. Transferrin and the transferrin receptor for the targeted delivery of therapeutic agents to the brain and cancer cells. *Therapeutic Delivery*. 4(5), 629–640. <https://doi.org/10.4155/tde.13.21>. (2013).
- Ejigah, V., Owoseni, O., Bataille-Backer, P., Ogundipe, OD., Fisi, FA., Adesina, SK. Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect. *Polymers*. 14(13). <https://doi.org/10.3390/polym14132601>. (2022)
- Eldridge, BN., Xing, F., Fahrenholtz, CD., Singh, RN. Evaluation of multiwalled carbon nanotube cytotoxicity in cultures of human brain microvascular endothelial cells grown on plastic or basement membrane. *Toxicol in Vitro*. 41, 223–231. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.03.002>. (2017)
- Evans, LE., Krishna, A., Ma, Y., Webb, TE., Marshall, DC., Tooke, CL., Spencer, J., Clarke, TB., Armstrong, A., Edwards, AM. Exploitation of Antibiotic Resistance as a Novel Drug Target: Development of a β -Lactamase-Activated Antibacterial Prodrug. *Journal of Medicinal Chemistry*. 62(9), 4411–4425. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01923>. (2019)

- Fan, D., Cao, Y., Cao, M., Wang, Y., Cao, Y., Gong, T. Nanomedicine in cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 8(1), 293. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01536-y>. (2023)
- Fan, Y., Marioli, M., Zhang, K. Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 192, 113642. (2020)
- Fang, J., Islam, W., Maeda, H. Exploiting the dynamics of the EPR effect and strategies to improve the therapeutic effects of nanomedicines by using EPR effect enhancers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.005>. (2020)
- Faulk, WP., Taylor, GM.. *Immunochemistry*. 8, 1081–1083. (1971)
- Ferrari, M. Nanovector therapeutics. *Curr Opin Chem Biol*. 9(4), 343–6. (2005 Aug)
- Forest, V., Pourchez, J. Nano-delivery to the lung- by inhalation or other routes and why nano when micro is largely sufficient? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 183, 114173. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114173>. (2022)
- Formica, FA., Barreto, G., Zenobi-Wong, M. Cartilage-targeting dexamethasone prodrugs increase the efficacy of dexamethasone. *Journal of Controlled Release*. 295, 118–129. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.12.025>. (2019).
- Fratoddi, I., Venditti, I., Cametti, C., Russo, MV. How toxic are gold nanoparticles? The state-of-the-art. *Nano Res*. 8, 1771–1799. doi: 10.1007/s12274-014-0697-3. (2015)
- Friedrich, RP., Cicha, I., Alexiou, C. Iron oxide nanoparticles in regenerative medicine and tissue engineering. *Nanomaterials*. 11(9), 2337. (2021)
- Fu, CP., Cai, XY., Chen, SL., Yu, HW., Fang, Y., Feng, XC., Zhang, LM., Li, CY. Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery. *Polymers*. 15(10). <https://doi.org/10.3390/polym15102317>. (2023)
- Gaikwad, D., Sutar, R., Patil, D. Polysaccharide mediated nanodrug delivery: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 261, 129547. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.129547>. (2024)
- Gao, F., Yin, J., Chen, Y., Guo, C., Hu, H., Su, J. Recent advances in aptamer-based targeted drug delivery systems for cancer therapy. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 10(August), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.972933>. (2022)
- Gestwicki, JE., Cairo, CW., Strong, LE., Oetjen, KA., Kiessling, LL. Influencing Receptor–Ligand Binding Mechanisms with Multivalent Ligand Architecture. *Journal of the American Chemical Society*. 124(50), 14922–14933. <https://doi.org/10.1021/ja027184x>. (2002)
- Geszke-Moritz, M.; Moritz, M. Solid Lipid Nanoparticles as Attractive Drug Vehicles: Composition, Properties and Therapeutic Strategies. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 68, 982– 994, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.119> (2016)
- Ghosn Y, Kamareddine MH, Tawk A, et al. Inorganic Nanoparticles as Drug Delivery Systems and Their Potential Role in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukaemia. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 18. <https://doi.org/10.1177/1533033819853241> (2019).
- Gillies, ER., Fréchet MJM. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov*. 10. pp.35-43. (2005)
- Gogoi, M., Kumar, N., Patra, S. 27—Multifunctional Magnetic Liposomes for Cancer Imaging and Therapeutic Applications. *Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting* (Holban A.M., Grumezescu A.M. eds.), 743–782. William Andrew Publishing, Norwich, NY, USA. (2016)
- Gonçalves, A., Nikmaram, N., Roohinejad, S., Estevinho, BN., Rocha, F., Greiner, R., McClements, DJ. Production, properties, and applications of solid self-emulsifying delivery systems (S-SEDS) in the food and pharmaceutical industries. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects*. 538, 108–126. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2017.10.076>. (2018)
- Gopu, B., Pandian, R., Sevel, A., Shukla, S. Routes of Nano-drug Administration and Nano-based Drug Delivery System and Toxicity. *Biomedical Applications and Toxicity of Nanomaterials*. (Mohanan, PV., Kappalli S. eds.). p.671-702. Springer, Singapore. (2023)
- Goyal, RK. *Nanomaterials and Nanocomposites: Synthesis, Properties, Characterization Techniques, and Applications*. (2017)
- Gravan, P., Aguilera-Garrido, A., Marchal, JA., Navarro-Marchal, SA., Galisteo-Gonzalez, F. Lipid-core nanoparticles: Classification, preparation methods, routes of administration and recent advances in cancer treatment. *Adv Colloid Interface Sci*, 314, 102871. doi:10.1016/j.cis.2023.102871. (2023)
- Gregoriadis, G. Homing of Liposomes to Target-Cells. *Biochem Soc Trans*. 3(5), 613–8. (1975)
- Gu, H., Ho, PL., Tong, E., Wang, L., Xu B. *Nano Lett*. 3, 1261–1263. (2003)
- Gulin-Sarfraz, T., Jonasson, S., Wigenstam, E., von Haartman, E., Bucht, A., Rosenholm, JM. Feasibility study of mesoporous silica particles for pulmonary drug delivery: therapeutic treatment with dexamethasone in a mouse model of airway inflammation. *Pharmaceutics*. 11 (4). (2019)

- Gupta, AK., Gupta, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*. 26(18), 3995-402. (2005)
- Gurevich, E.; Gurevich, V. Beyond Traditional Pharmacology: New Tools and Approaches. *Br. J. Pharmacol.* 172 (13), 3229–3241, <https://doi.org/10.1111/bph.13066>. (2015)
- Gyanani, V., Haley, J., Goswami, R. Challenges of Current Anticancer Treatment Approaches with Focus on Liposomal Drug Delivery Systems. *Pharmaceuticals*. 14(9), 835. <https://doi.org/10.3390/ph14090835>. (2021)
- Hadinoto, K.; Sundaresan, A.; Cheow, W. S. Lipid-polymer hybrid nanoparticles as a new generation therapeutic delivery platform: a review. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2013, 85 (3), 427–443, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2013.07.002>
- Hapuarachchi, S., Kato, Y., Artemov, D. Bioorthogonal two-component drug delivery in HER2(+) breast cancer mouse models. *Scientific Reports*. 6(1), 24298. <https://doi.org/10.1038/srep24298>. (2016)
- He, F., Wen, N., Xiao, D., Yan, J., Xiong, H., Cai, S., Liu, Z., Liu, Y. Aptamer-Based Targeted Drug Delivery Systems: Current Potential and Challenges. *Current Medicinal Chemistry*. 27(13), 2189–2219. <https://doi.org/10.2174/0929867325666181008142831>. (2020)
- He, J., Duan, Q., Ran, C., Fu, T., Liu, Y., Tan, W. Recent progress of aptamer-drug conjugates in cancer therapy. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 13(4), 1358–1370. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.017>. (2023)
- Hong, W., Guo, F., Yu, N., Ying, S., Lou, B., Wu, J., Gao, Y., Ji, X., Wang, H., Li, A., Wang, G., Yang, G. A Novel Folic Acid Receptor-Targeted Drug Delivery System Based on Curcumin-Loaded β -Cyclodextrin Nanoparticles for Cancer Treatment. *Drug Design, Development and Therapy*. 15, 2843–2855. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S320119>. (2021)
- Hu, J., Chen, M., Fang, X., Wu, L. Fabrication and application of inorganic hollow spheres. *Chemical Society Reviews*. 40(11), 5472-5491. (2011)
- Hu, Q., Gu, G., Liu, Z., Jiang, M., Kang, T., Miao, D., Tu, Y., Pang, Z., Song, Q., Yao, L., Xia, H., Chen, H., Jiang, X., Gao, X., Chen, J. F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLY-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials*. 34(4), 1135–1145. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.10.048>. (2013)
- Hu, Q., Katti, PS., Gu, Z. Enzyme-responsive nanomaterials for controlled drug delivery. *Nanoscale*. 6(21), 12273–12286. <https://doi.org/10.1039/c4nr04249b>. (2014)
- Huang, Z., Jiang, X., Guo, D., Gu, N. Controllable synthesis and biomedical applications of silver nanomaterials. *J Nanosci Nanotechnol*. (2011)
- Ibaraki, H., Kanazawa, T., Oogi, C., Takashima, Y., Seta, Y. Effects of surface charge and flexibility of liposomes on dermal drug delivery. *Journal of drug delivery science and technology*. 50, p.155-162. (2019)
- Iyer, R., Kuriakose, AE., Yaman, S., Su, LC., Shan, D., Yang, J., Liao, J., Tang, L., Banerjee, S., Xu, H., Nguyen, KT. Nanoparticle eluting-angioplasty balloons to treat cardiovascular diseases. *International Journal of Pharmaceutics*. 554, p.212–223. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.011>. (2019)
- Izci, M., Maksoudian, C., Manshian, BB., Soenen, SJ. The Use of Alternative Strategies for Enhanced Nanoparticle Delivery to Solid Tumors. *Chemical Reviews*. 121(3), p.1746–1803. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00779>. (2021)
- Jahan, ST., Sadat, SMA., Walliser, M., Haddadi, A. Targeted Therapeutic Nanoparticles: An Immense Promise to Fight against Cancer. *J. of Drug Deliv.* 9090325. <https://doi.org/10.1155/2017/9090325>. (2017)
- Jain, KK. An Overview of Drug Delivery Systems. *Methods Mol Biol*. 2059, 1-54. doi:10.1007/978-1-4939-9798-5_1. (2020).
- Jaiswal P., Gidwani B., Vyas A. Nanostructured lipid carriers and their current application in targeted drug delivery. *Artif Cells NanomedBiotechnol*. 44(1), 27–40. doi: 10.3109/21691401.2014.909822. (2016)
- Jalilian, M., Derakhshandeh, K., Kurd, M., Lashani, H. Targeting Solid Lipid Nanoparticles with Anisamide for Docetaxel Delivery to Prostate Cancer: Preparation, Optimization, and In-vitro Evaluation. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*. 20(1), 327–338. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2020.113436.14302>. (2021)
- Jenning, V., Gysler, A., Schäfer-Korting, M., Gohla, SH. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 49, 211 —218. (2000) and Muller-Goymann, CC. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 58, 343 —356. (2004)
- Jeong, EH., Jung, G., Hong, CA., Lee, HJ. Gold nanoparticle (AuNP)-based drug delivery and molecular imaging for biomedical applications. *Arch. Pharmacol Res*. 37, 53–59. (2013)
- Jeong, HY., Kim, H., Lee, M., Hong, J., Lee, JH., Kim, J., Choi, MJ., Park, YS., Kim, SC. Development of HER2-Specific Aptamer-Drug Conjugate for Breast Cancer Therapy. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(24). <https://doi.org/10.3390/ijms21249764>. (2020)
- Ji, T., Kohane, DS. Nanoscale systems for local drug delivery. *Nano Today*, 28. doi:10.1016/j.nantod.2019.100765. (2019).
- Jin, M., Li, S., Wu, Y., Li, D., Han, Y. Construction of Chitosan/Alginate Nano-Drug Delivery System for Improving Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. 11(8). <https://doi.org/10.3390/nano11081884>. (2021)

- Joudeh, N., Linke, D. Nanoparticle classification, physicochemical properties, characterization, and applications: a comprehensive review for biologists. *J Nanobiotechnology*. 20(1), 262. doi:10.1186/s12951-022-01477-8. (2022)
- Karthik P, Ezhilarasi PN, Anandharamakrishnan C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 3;57(7):1435-1450. <https://doi.org/10.1080/10408398.2015.1006767>. (2017)
- Kaur S., Nautyal U., Singh R., Singh S., Devi A. Nanostructure lipid carrier (NLC): the new generation of lipid nanoparticles. *Asian Pac J Health Sci*. 2(2), 76–93. <https://doi.org/10.21276/apjhs.2015.2.2.14>. (2015)
- Khlebtsov, NG., Dykman, LA. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*. 111, 1–35. (2010)
- Kim, J., Cho, H., Lim, DK., Joo, MK., Kim, K. Perspectives for Improving the Tumor Targeting of Nanomedicine via the EPR Effect in Clinical Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(12), p. 10082. <https://doi.org/10.3390/ijms241210082>. (2023)
- Kozma, GT., Shimizu, T., Ishida, T., Szebeni, J. Anti-PEG antibodies: Properties, formation, testing and role in adverse immune reactions to PEGylated nano-biopharmaceuticals. *Adv. Drug Deliv. Rev*, 154-155, p. 163-175. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.07.024> (2020)
- Kraft, JC., Freeling, JP., Wang Z., Ho, RJY. Emerging research and clinical development trends of liposome and lipid nanoparticle drug delivery systems, *J. Pharm. Sci*. 103(1), 29–52. (2014)
- Kralova, I., & Sjöblom, J. Surfactants Used in Food Industry: A Review. *J. Dispersion Sci. Technol*, 30(9), p.1363–1383. <https://doi.org/10.1080/01932690902735561>. (2009)
- Kumar Kulabhusan, P., Hussain, B., Yüce, M. Current Perspectives on Aptamers as Diagnostic Tools and Therapeutic Agents. *Pharmaceutics*. 12(7). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12070646>. (2020)
- Kumar, A., Zhang, X., Liang, XJ. Gold nanoparticles: Emerging paradigm for targeted drug delivery system. *Biotechnol. Adv*. 31, 593–606. doi: 10.1016/j.biotechadv.2012.10.002. (2013)
- Kumar, MA., Baba, SK., Sadida, HQ., Marzooqi, SA., Jerobin, J., Altemani, FH., Algehainy, N., Alanazi, MA., Abou-Samra, AB., Kumar, R., Al-Shabeeb Akil, AS., Macha, MA., Mir, R., Bhat, AA. Extracellular vesicles as tools and targets in therapy for diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 9(1), 27. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01735-1>. (2024)
- Kumari, P., Ghosh, B., Biswas, S. Nanocarriers for cancer-targeted drug delivery. *Journal of Drug Targeting*. 24(3), 179–191. <https://doi.org/10.3109/1061186X.2015.1051049>. (2016).
- Kunjachan, S., Ehling, J., Storm, G., Kiessling, F., Lammers, T. Noninvasive Imaging of Nanomedicines and Nanotheranostics: Principles, Progress, and Prospects. *Chem. Rev*. 115, 10907–10937. (2015)
- Lacerda, L., Bianco, A., Prato, M., Kostarelos, K. Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology. *Adv Drug Deliv Rev*. 58(14), 1460–1470. (2006)
- Lakkadwala, S., Nguyen, S., Lawrence, J., Nauli, SM., Nesamony, J. Physico-chemical characterisation, cytotoxic activity, and biocompatibility studies of tamoxifen-loaded solid lipid nanoparticles prepared via a temperature-modulated solidification method. *J. Microencapsul*. 31, 590–599. (2014)
- Langer, R. Biomaterials in drug delivery and tissue engineering: One laboratory's experience. *Accounts of Chemical Research*. 33(2), 94-101. (2000)
- Lara, HH., Garza-Treviño, EN., Ixtapan-Turrent, L., Singh, DK. Silver nanoparticles are broad-spectrum bactericidal and virucidal compounds. *J. Nanobiotechnol*. 9, pp.8. (2011)
- Le Duc, G., Roux, S., Paruta-Tuarez, A., Dufort, S., Brauer, E., Marais, A., Truillet, C., Sancey, L., Perriat, P., Lux, F., Tillement, O. Advantages of gadolinium based ultrasmall nanoparticles vs molecular gadolinium chelates for radiotherapy guided by MRI for glioma treatment. *Cancer Nanotechnology*. 5(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s12645-014-0004-8>. (2014)
- Lee, I., Athey, BD., Wetzel, AW., Meixner, W., Baker, JR. Structural molecular dynamics studies on polyamidoamine dendrimers for a therapeutic application: Effects of pH and generation. *Macromolecules*. 35. pp.4510-4520. (2002)
- Lee, NS., Lin, LY., Neumann, WL., Freskos, JN., Karwa, A., et al. Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany), 7, 1998-2003. (2011)
- Lee, SH., Back, SY., Song, JG., Han, HK. Enhanced oral delivery of insulin via the colon-targeted nanocomposite system of organoclay/glycol chitosan/Eudragit®S100. *Journal of Nanobiotechnology*. 18(1), 104. <https://doi.org/10.1186/s12951-020-00662-x>. (2020)
- Li, H., Yang, X., Zhou, Z., Wang, K., Li, C., Qiao, H., et al. Near-Infrared light-triggered drug release from a multiple lipid carrier complex using an all-in-one strategy. *Journal of Control. Release*. 261, 126-137. (2017).
- Li, J., Wang, Q., Xia, G., Adilijiang, N., Li, Y., Hou, Z., Fan, Z., Li, J. Recent Advances in Targeted Drug Delivery Strategy for Enhancing Oncotherapy. *Pharmaceutics*. 15(9), p. 2233. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15092233>. (2023)

- Li, N., Cai, H., Jiang, L., Hu, J., Bains, A., Hu, J., et al. Enzyme-sensitive and amphiphilic PEGylated dendrimer-paclitaxel prodrug-based nanoparticles for enhanced stability and anticancer activity. *ACS Applied Materials Interfaces*, 9, 6865-6877. (2017)
- Li, SS., Zhang, CM., Wu, JD., Liu, C., Liu, ZP. A branched small molecule-drug conjugate nanomedicine strategy for the targeted HCC chemotherapy. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 228, 114037. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.114037>. (2022)
- Li, Z., Zhu, G., Lin, N. Dispersibility Characterization of Cellulose Nanocrystals in Polymeric-Based Composites. *Biomacromolecules*. (2022)
- Lin, G., Zhang, H., Huang, L. Smart Polymeric Nanoparticles for Cancer Gene Delivery. *Mol Pharm*. 12.2, 314-21. (2015)
- Lin, Q. Synthetic Non-Biodegradable Polymers. *Introduction to Biomaterials*. pp.172-186. DOI:10.1142/9789812700858_0011. (2005)
- Lin, YL., Tsai, NM., Chen, CH., Liu, YK., Lee, CJ., Chan, YL., Wang, YS., Chang, YC., Lin, CH., Huang, TH., Wang, CC., Chi, KH., Liao, KW. Specific drug delivery efficiently induced human breast tumor regression using a lipoplex by non-covalent association with anti-tumor antibodies. *Journal of Nanobiotechnology*. 17(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0457-3>. (2019)
- Liu, J., Liu, T., Pan, J., Liu, S., Lu, GQM. Advances in multicompartment mesoporous silica micro/nanoparticles for theranostic applications *Annu Rev. Chem. Biomol. Eng.*, 9, pp.389-411. (2018)
- Liu, L., Liu, X., Xin, W., Zhou, L., Huang, B., Han, C., Cao, Z., Hua, Z. A bacteria-based system expressing anti-TNF- α nanobody for enhanced cancer immunotherapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 8(1), 134. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01364-0>. (2023)
- Liu, P., Chen G., Zhang, J. A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules*, 27(4), 1372; <https://doi.org/10.3390/molecules27041372>. (2022)
- Liu, Z., Cai, W., He, L., et al. In vivo biodistribution and highly efficient tumour targeting of carbon nanotubes in mice. *Nat Nanotechnol*. 2(1), 47-52. (2007)
- Lu, L., Li, ZJ., Li, LF., Shen, J., Zhang, L., Li, MX., Wang, JH., Cho, CH. Targeted low-dose TNF α delivered by TCP-1 peptide exerts differential synergistic effects on anti-cancer actions of chemotherapeutic drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 44, p.475-481. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.02.009>. (2018)
- Luderer, F., Löbler, M., Rohm, HW., Gocke, C., Kunna, K., Köck, K., Kroemer, HK., Weitschies, W., Schmitz, KP., Sternberg, K. Biodegradable sirolimus-loaded poly(lactide) nanoparticles as drug delivery system for the prevention of in-stent restenosis in coronary stent application. *Journal of Biomaterials Applications*. 25(8), p.851-875. <https://doi.org/10.1177/0885328209360696>. (2011)
- Majoros, IJ., Myc, A., Thomas, TP., Mehta, CB., Baker, JR. PAMAM dendrimer-based multifunctional conjugate for cancer therapy: Synthesis, characterization, and functionality. *Biomacromolecules*. 7. pp.572-579. (2006)
- Mayeen, A., Shaji, LK., Nair, AK., Kalarikkal, N. Morphological characterization of nanomaterials. In *Characterization of Nanomaterials*. 335-364. (2018)
- McClements, DJ., Rao, J., Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 285-330. (2011)
- McClements, J., McClements, DJ. Standardization of Nanoparticle Characterization: Methods for Testing Properties, Stability, and Functionality of Edible Nanoparticles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 1334 - 62. (2016)
- Mehta, M., Bui, TA., Yang, X., Aksoy, Y., Goldys, EM., Deng, W. Lipid-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery: An Overview of the Production Techniques and Difficulties Encountered in Their Industrial Development. 3(6): 600-619. (2023)
- Mendes, BB., Coniot, J., Avital, A., Yao, D., Jiang, X., Zhou, X., Sharf-Pauker, N., Xiao, Y., Adir, O., Liang, H., Shi, J., Schroeder, A., Conde, J. Nanodelivery of nucleic acids. *Nature Reviews Methods Primers*. 2(1), 24. <https://doi.org/10.1038/s43586-022-00104-y>. (2022)
- Miao, Y., Gao, Q., Mao, M., Zhang, C., Yang, L., Yang, Y., Han, D. Bispecific Aptamer Chimeras Enable Targeted Protein Degradation on Cell Membranes. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*. 60(20), 11267-11271. <https://doi.org/10.1002/anie.202102170>. (2021)
- Miglietta, A., Cavalli, R., Bocca, C., Gabriel, L., Gasco, MR. *Int. J. Pharm.* 210, 61 —67. (2000)
- Mitchell, MJ., Billingsley, MM., Haley, RM., Wechsler, ME., Peppas, NA., Langer, R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*. 20(2), 101-124. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>. (2021)
- Mo, J., He, L., Ma, B., Chen, T. Tailoring particle size of mesoporous silica nanosystem to antagonize glioblastoma and overcome blood-brain barrier. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 8 (11), pp.6811-6825. (2016)

- Montiel Schneider, MG., Martín, MJ., Otarola, J., Vakarelska, E., Simeonov, V., Lassalle, V., Nedyalkova, M. Biomedical applications of iron oxide nanoparticles: Current insights progress and perspectives. *Pharmaceutics*. 14(1), 20. (2022)
- Morais, RP., Hochheim, S., de Oliveira, CC., Riegel-Vidotti, IC., Marino, CE. Skin interaction, permeation, and toxicity of silica nanoparticles: Challenges and recent therapeutic and cosmetic advances. *International Journal of Pharmaceutics*. 614, 121439. (2022)
- Mulligan, RC. The basic science of gene therapy. *Science (New York, N.Y.)*. 260(5110), 926–932. DOI: 10.1126/science.8493530. (1993)
- Munaweera, I., Madhusa, MLC. *Characterization Techniques for Nanomaterials* (1 ed.). CRC Press. (2023)
- Murphy, EA., Majeti, BK., Barnes, LA., Makale, M., Weis, SM., Lutu-Fuga, K., Wrasidlo, W., Cheresch, DA. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(27), 9343–8. (2008)
- Nag, OK., Delehanty, JB. Active Cellular and Subcellular Targeting of Nanoparticles for Drug Delivery. *Pharmaceutics*. 11(10). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11100543>. (2019)
- Nakamura, Y., Mochida, A., Choyke, PL., Kobayashi, H. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? *Bioconjugate Chemistry*. 27(10), p.2225–2238. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00437>. (2016)
- Narendrakumar, L., Chakraborty, M., Kumari, S., Paul, D., Das, B. β -Lactam potentiators to re-sensitize resistant pathogens: Discovery, development, clinical use and the way forward. *Frontiers in Microbiology*. 13, 1092556. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1092556>. (2022)
- Nehoff, H., Parayath, NN., Domanovitch, L., Taurin, S., Greish, K. Nanomedicine for drug targeting: strategies beyond the enhanced permeability and retention effect. *International Journal of Nanomedicine*. 9, 2539–2555. <https://doi.org/10.2147/IJN.S47129>. (2014)
- Nikolic, V., Ilic-Stojanovic, S., Petrovic, S., Tacic, A., Nikolic, L. Administration Routes for Nano Drugs and Characterization of Nano Drug Loading. *Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery. Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery*. 587-625. doi:10.1016/B978-0-12-814031-4.00021-0. (2019)
- Nimesh, S., Gupta, N. 1 - Nanomedicine for delivery of therapeutic molecules. *Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids* (Nimesh, S., Chandra, R., Gupta, TNA. eds.). pp.1–12. Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00001-8>. (2017)
- Olbrich, C., Bakowsky, U., Lehr, CM., Müller, RH., Kneuer, C. J. *Controlled Release*. 77, 345 —355. (2001)
- Onzi, G., Guterres, SS., Pohlmann, AR., Frank, LA. *Active Targeting of Nanocarriers BT - The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics*. Springer International Publishing. pp.1–13. https://doi.org/10.1007/978-3-030-51519-5_109-1. (2021)
- Ozpolat, B., Sood, AK., Lopez-Berestein, G. Liposomal siRNA nanocarriers for cancer therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 66, 110–116. doi: 10.1016/j.addr.2013.12.008. (2014)
- Paciotti, GF., Kingston, DGI., Tamarkin, L. *Drug Dev. Res.* 67, 47–54. (2006)
- Park MVDZ., Neigh AM., Vermeulen JP., de la Fonteyne LJJ., Verharen HW., Briedé JJ., van Loveren H., de Jong WH. The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*. 32(36), 9810–9817. (2011)
- Parsian, M., Unsoy, G., et al. Loading of Gemcitabine on chitosan magnetic nanoparticles increases the anti-cancer efficacy of the drug. *Eur. J. Pharmacol.* 784, 121–128. doi: 10.1016/j.ejphar.2016.05.016. (2016)
- Parveen, S., Misra, R., Sahoo, SK. Nanoparticles: A boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 8(2), 147-166. (2012)
- Pastorin, G., Wu, W., Wiecekowsky, S., et al. Double functionalisation of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem Commun (Camb)*. (11), 1182–1184. (2006)
- Patra, JK., Das, G., Fraceto, LF., Campos, EVR., del Pilar Rodriguez-Torres, M., Acosta-Torres, LS., Diaz-Torres, LA., Grillo, R., Swamy, MK., Sharma, S. Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. *J of Nanobiotech*, 16, 71. (2018)
- Patra, JK., Das, G., Fraceto, LF., Campos, EVR., Rodriguez-Torres, M. del P., Acosta-Torres, LS., Diaz-Torres, LA., Grillo, R., Swamy, MK., Sharma, S., Habtemariam, S., Shin, HS. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology*. 16(1), p.71. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>. (2018)
- Pavelić, K., Kraljević Pavelić, S., Bulog, A., Agaj, A., Rojnić, B., Čolić, M., Trivanović, D. Nanoparticles in Medicine: Current Status in Cancer Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*. 24(16). <https://doi.org/10.3390/ijms241612827>. (2023)

- Prabhu, D., Arulvasu, C., Babu, G., Manikandan, R., Srinivasan, P. Biologically synthesized green silver nanoparticles from leaf extract of *Vitex negundo* L. induce growth-inhibitory effect on human colon cancer cell line HCT15. *Process Biochem.* 48(2), 317–32. (2013)
- Prasher, P., Sharma, M., Mehta, M., Satija, S., Aljabali, AA., Tambuwala, MM., Anand, K., Sharma, N., Dureja, H., Jha, NK., Gupta, G., Gulati, M., Singh, SK., Chellappan, DK., Paudel, KR., Hansbro, PM., Dua, K. Current-status and applications of polysaccharides in drug delivery systems. *Colloid and Interface Science Communications.* 42, 100418. <https://doi.org/10.1016/j.colcom.2021.100418>. (2021)
- Puri A., Loomis K., Smith B., Lee JH., Yavlovich A., Heldman E., Blumenthal R. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(6):523-80. <https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v26.i6.10>.
- Qiu, S., Liang, D., Guo, F., Deng, T., Peng, T., Gao, Y., Zhang, X., Zhong, H. Solid lipid nanoparticles modified with amphipathic chitosan derivatives for improved stability in the gastrointestinal tract. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 48, 288–299, <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.007> (2018)
- Rajabi M., Mousa SA. Lipid Nanoparticles and their Application in Nanomedicine. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 17, 662–672. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160415155457>. (2016)
- Rajagopalan, R., Yakhmi, JV. Chapter 8 - Nanotechnological approaches toward cancer chemotherapy. *Micro and Nano Technologies.* (Ficai, A., Grumezescu CT. eds.). Elsevier. pp.211–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46144-3.00008-8>. (2017)
- Rajani, C., Borisa, P., Karanwad, T., Borade, Y., Patel, V., Rajpoot, K., Tekade, R. K. 7 - Cancer-targeted chemotherapy: Emerging role of the folate anchored dendrimer as drug delivery nanocarrier. *Pharmaceutical Applications of Dendrimers* (Chauhan, A., Kulhari, H. eds.). Elsevier. pp.151-198. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116013>. (2020)
- Rama, AR., Jimenez-Lopez, J., Cabeza, L., Jimenez-Luna, C., Leiva, MC., Perazzoli, G., Hernandez, R., Zafra, I., Ortiz, R., Melguizo, C., et al. Last Advances in Nanocarriers-Based Drug Delivery Systems for Colorectal Cancer. *Curr. Drug Deliv.* 13, 830–838. <https://doi.org/10.2174/1567201813666151203232852>. (2016)
- Rangaraj, S., Venkatachalam, R. In vitro and in vivo characteristics of biogenic high surface silica nanoparticles in A549 lung cancer cell lines and Danio rerio model systems for inorganic biomaterials development *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.*, 46 (7), pp.1415-1424. (2018)
- Rasal, A., Reddy, ND. Chapter 14 - Nano-pharmacokinetics preclinical to clinical translation. (Thorat, ND., Kumar, T. eds.). Academic Press. pp.273–28. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85050-6.00004-9>. (2021)
- Raza, K., Kumar, P., Kumar, N., Malik, R. 9 - Pharmacokinetics and biodistribution of the nanoparticles (Nimesh, S., Chandra, R., Gupta TNA. eds.). Woodhead Publishing. pp.165–186. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100557-6.00009-2>. (2017)
- Riley, RS., Day, ES. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.* 9, e1449. (2017)
- Robinson, PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays in Biochemistry.* 59, p.1–41. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>. (2015)
- Roncato, F., Ruga, F., Porcù, E., Casarin, E., Ronca, R., Maccarinelli, F., Realdon, N., Basso, G., Alon, R., Viola, G., Morpurgo, M. Improvement and extension of anti-EGFR targeting in breast cancer therapy by integration with the Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies. *Nature Communications.* 9(1), 4070. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-06602-6>. (2018)
- Rüzgar Özemer, G., Kara, AA., Pezik, E., Tort, S., Vural, İ., Acartürk, F. Preparation of nanodelivery systems for oral administration of low molecular weight heparin. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* 79, 104068. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.104068>. (2023)
- Sadat, SMA., Jahan, ST., Haddadi, A. Effects of Size and Surface Charge of Polymeric Nanoparticles on *in Vitro* and *in Vivo* Applications. *JBNB* 7, 2. <https://doi.org/10.4236/jbnb.2016.72011>. (2016)
- Santander-Ortega, MJ., Stauner, T., Loretz, B., Ortega-Vinuesa, JL., Bastos-González, D., Wenz, G., Schaefer UF., Lehr, CM. Nanoparticles made from novel starch derivatives for transdermal drug delivery. *Journal of controlled release.* 141, 85-92. (2010)
- Sasaki, T., Hiroki, K., Yamashita, Y. The role of epidermal growth factor receptor in cancer metastasis and microenvironment. *BioMed Research International.* 2013, 546318. <https://doi.org/10.1155/2013/546318>. (2013)
- Satpathy, M., Wang, L., Zielinski, R., Qian, W., Lipowska, M., Capala, J., Lee, GY., Xu, H., Wang, YA., Mao, H., Yang, L. Active targeting using HER-2-affibody-conjugated nanoparticles enabled sensitive and specific imaging of orthotopic HER-2 positive ovarian tumors. *Small (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany).* 10(3), 544–555. <https://doi.org/10.1002/sml.201301593>. (2014)

- Seedial, S., Ghosh, S., Saunders, R., Suwanabol, P., Shi, X., Liu, B., Kent, K. Local Drug Delivery to Prevent Restenosis. *Journal of Vascular Surgery*. 57, 1403–1414. <https://doi.org/10.1016/j.jvs.2012.12.069>. (2013)
- Selmani, A., Kovačević, D., Bohinc, K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond. *Advances in colloid and interface science*, 303, 102640. (2022)
- Selvamuthukumar S., Velmurugan R. Nanostructured lipid carriers: a potential drug carrier for cancer chemotherapy. *Lipids Health Dis*. 11, 159. doi: 10.1186/1476-511x-11-159. (2012)
- Servatan, M. et al., Zeolites in drug delivery: progress, challenges and opportunities. *Drug Discovery Today*. (2020)
- Severino, P., da Silva, CF., Andrade, LN., de Lima Oliveira, D., Campos, J., Souto, EB. Alginate Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting. *Current pharmaceutical design*, 25(11), 1312–1334. DOI: 10.2174/1381612825666190425163424. (2019)
- Sharma, SK., Bagshawe, KD. Antibody Directed Enzyme Prodrug Therapy (ADEPT): Trials and tribulations. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 118, p.2–7. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.009>. (2017)
- Sheikhpour, M., Delorme, V., Kasaean, A., Amiri, V., Masoumi, M., Sadeghinia, M., Ebrahimzadeh, N., Maleki, M., Pourazar, S. An effective nano drug delivery and combination therapy for the treatment of Tuberculosis. *Scientific Reports*. 12(1), 9591. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13682-4>. (2022)
- Shen, X., Pan, D., Gong, Q., Gu, Z., Luo, K. Enhancing drug penetration in solid tumors via nanomedicine: Evaluation models, strategies and perspectives. *Bioactive Materials*. 32, p.445–472. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.10.017>. (2024)
- Shi, L., Zhang, J., Zhao, M., Tang, S., Cheng, X., Zhang, W., et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery. *Nanoscale*. 13(24), 10748–64. doi: 10.1039/d1nr02065j. (2021)
- Shi, P., Cheng, Z., Zhao, K., Chen, Y., Zhang, A., Gan, W., Zhang, Y. Active targeting schemes for nano-drug delivery systems in osteosarcoma therapeutics. *Journal of Nanobiotechnology*. 21(1), p.103. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-01826-1>. (2023)
- Shidhaye SS., Vaidya R., Sutar S., Patwardhan A., Kadam VJ. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers- innovative generations of solid lipid carriers. *Curr Drug Deliv*. 5(4), 324–231. (2008)
- Silva, HD., Cerqueira, MÁ., Vicente, AA. Nanoemulsions for food applications: development and characterization. *Food and Bioprocess Technology*. 5(3), 854–867. (2012)
- Silvestre, ALP., Oshiro-Júnior, JA., Garcia, C., Turco, BO., da Silva Leite, JM., de Lima Damasceno, BPG., Soares, JCM., Chorilli, M. Monoclonal Antibodies Carried in Drug Delivery Nanosystems as a Strategy for Cancer Treatment. *Current Medicinal Chemistry*. 28(2), p.401–418. <https://doi.org/10.2174/0929867327666200121121409>. (2021)
- Singh, R., Lillard, JWJ. Nanoparticle-based targeted drug delivery. *Experimental and Molecular Pathology*. 86(3), p.215–223. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2008.12.004>. (2009)
- Singh, SP., Yadav, SK., Mondal, K. What We Need to Know about Quantum Dots Nanoparticles. *Science and Applications of Nanoparticles*. (Ahmed, W., Nourafkan, E. eds.). Jenny Stanford Publishing. p. 29–51. (2023)
- Sivadasan D, Sultan MH, Madkhali O, Almohari Y, Thangavel N. Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles (PLNs) as Emerging Drug Delivery Platform-A Comprehensive Review of Their Properties, Preparation Methods, and Therapeutic Applications. *Pharmaceutics*. 18;13(8):1291. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081291>. (2021)
- Sivadasu, P., Gowda, DV., Siddaramaiah, H., Hemalatha, H. Ziprasidone hydrochloride loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) for intranasal delivery: Optimization and in vivo studies. *International Journal of Applied Pharmacy*, 12, 31–41. (2020)
- Solans, C., Izquierdo, P., Nolla, J., Azemar, N., Garcia-Celma, MJ. Nano-emulsions. *Curr Opin Colloid Interface Sci*. 10:3-4, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>. (2005)
- Son, HP., Choi, Y., Choi, J. Stimuli-responsive nanomaterials for application in antitumor therapy and drug delivery. *Pharmaceutics*, 12, 630. (2020)
- Speranza, G. The role of functionalization in the applications of carbon materials: An overview. *C*. 5(4), 84. (2019)
- Srinivasa-Gopalan, S., Yarema, KJ. *Nanotechnologies for the Life Sciences: Dendrimers in Cancer Treatment and Diagnosis*, Volume 7. New York, Wiley. (2007)
- Stylianopoulos, T., Munn, LL., Jain, RK. Reengineering the Physical Microenvironment of Tumors to Improve Drug Delivery and Efficacy: From Mathematical Modeling to Bench to Bedside. *Trends in Cancer*. 4(4), p.292–319. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.02.005>. (2018)
- Subhan, MA., Yalamarty, SSK., Filipczak, N., Parveen, F., Torchilin, VP. Recent Advances in Tumor Targeting via EPR Effect for Cancer Treatment. *Journal of Personalized Medicine*. 11(6). <https://doi.org/10.3390/jpm11060571>. (2021)

- Sun, L., Liu, H., Ye, Y., Lei, Y., Islam, R., Tan, S., Tong, R., Miao, Y.B., Cai, L. Smart nanoparticles for cancer therapy. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 8(1), p.418. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01642-x>. (2023)
- Sun, R., Xiang, J., Zhou, Q., Piao, Y., Tang, J., Shao, S., Zhou, Z., Bae, Y., Shen, Y. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 191, 114614. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2022.114614>. (2022)
- Swift, D., Rothermel, J., Peterson, L., Orr, B., Bures, G.H., Weidhaas, J. Remediating TCE-contaminated groundwater in low-permeability media using hydraulic fracturing to emplace zero-valent iron/organic carbon amendment. *Remediation Journal*. 22(2), 49–67. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/rem.21310>. (2012)
- Tadros, T.; Izquierdo, P.; Esquena, J.; Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2004, 108-109, 303–318, <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>
- Tan, X., Yang, J., Jiang, J., Wang, W., Ren, J., Li, Q., Xie, Z., Chen, X., Zhang, L., Li, W. Significant growth inhibition by a bispecific affibody targeting oncoprotein E7 in both HPV16 and 18 positive cervical cancer in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 172, 106156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejps.2022.106156>. (2022)
- Tenchov, R.; Bird, R.; Curtze, A. E.; Zhou, Q. Lipid Nanoparticles—From Liposomes to mRNA Vaccine Delivery, a Landscape of Research Diversity and Advancement. *ACS Nano* 2021, 15 (11), 16982–17015, <https://doi.org/10.1021/acsnano.1c04996>. (2021)
- Tewabe, A., Abate, A., Tamrie, M., Seyfu, A., Abdela Siraj, E. Targeted Drug Delivery-From Magic Bullet to Nanomedicine: Principles, Challenges, and Future Perspectives. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*. 14, p.1711–1724. <https://doi.org/10.2147/JMDH.S313968>. (2021)
- Theys, J., Landuyt, W., Nuyts, S., Van Mellaert, L., van Oosterom, A., Lambin, P., Anné, J. Specific targeting of cytosine deaminase to solid tumors by engineered *Clostridium acetobutylicum*. *Cancer Gene Therapy*. 8(4), p.294–297. <https://doi.org/10.1038/sj.cgt.7700303>. (2001)
- Tian, H., Zhang, T., Qin, S., Huang, Z., Zhou, L., Shi, J., Nice, E.C., Xie, N., Huang, C., Shen, Z. Enhancing the therapeutic efficacy of nanoparticles for cancer treatment using versatile targeted strategies. *Journal of Hematology & Oncology*. 15(1), 132. <https://doi.org/10.1186/s13045-022-01320-5>. (2022)
- Tomalia, D.A. Birth of a new macromolecular architecture: Dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic organic chemistry *Aldrichim Acta*. 37. pp.39-57. (2004)
- Tomalia, D.A., Hedstrand, D.M., Ferritto, M.S. Comb-burst dendrimer topology: new macromolecular architecture derived from dendritic grafting. *Macromolecules*. 24, 1435–8. (1991)
- Tran, N., Webster, T.J. *J. Mater. Chem.* 20, 8760. (2010)
- Uchiyama, K., Nagayasu, A., Yamagiwa, Y., Nishida, T., Harashima, H., Kiwada, H. Effects of the size and fluidity of liposomes on their accumulation in tumors. A presumption of their interaction with tumors. *Int J Pharm.* 121(2), 195–203. (1995)
- Venkatesan, S., Chanda, K., Balamurali, M.M. Recent Advancements of Aptamers in Cancer Therapy. *ACS Omega*. 8(36), p.32231–32243. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c04345>. (2023)
- Verissimo, T.V., Santos, N.T., Silva, J.R., Azevedo, R.B., Gomes, A.J., Lunardi, C.N. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. *Mater. Sci. Eng. C*. 65, 199–204. doi: 10.1016/j.msec.2016.04.030. (2016)
- Verma D., Gulati N., Kaul S., et al. Protein based nanostructures for drug delivery. *J Pharm (Cairo)*. 9285854. doi: 10.1155/2018/9285854. (2018)
- Veselov, V.V., Nosyrev, A.E., Jicsinszky, L., Alyautdin, R.N., Cravotto, G. Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs. *Cancers*. 14(3), p.622. <https://doi.org/10.3390/cancers14030622>. (2022),
- Vilas-Boas, V., Carvalho, F., Espiña, B. Magnetic hyperthermia for cancer treatment: Main parameters affecting the outcome of in vitro and in vivo studies. *Molecules*. 25(12), 2874. (2020)
- Vögtle, F., Richardt, G., Werner, N. Introduction. In: Vögtle F, Richardt G, Werner N, editors. *Dendrimer chemistry: concepts, syntheses, properties, applications*. Wiley: Academic. p.1-24. (2009)
- Wang, J., Muhammad, N., Li, T., Wang, H., Liu, Y., Liu, B., Zhan, H. Hyaluronic Acid-Coated Camptothecin Nanocrystals for Targeted Drug Delivery to Enhance Anticancer Efficacy. *Molecular Pharmaceutics*. 17(7), p.2411–2425. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.0c00161>. (2020)
- Wang, Q., Jiang, N., Fu, B., Huang, F., Liu, J. Self-assembling peptide-based nanodrug delivery systems. *Biomaterials Science*. 7(12), p.4888–4911. <https://doi.org/10.1039/C9BM01212E>. (2019)
- Wang, X., Sun, X., Lao, J., He, H., Cheng, T., Wang, M., Wang, S., Huang, F. Multifunctional graphene quantum dots for simultaneous targeted cellular imaging and drug delivery. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 122, 638-644. (2014)

- Wathoni, N., Puluhulawa, L.E., Joni, IM., Muchtaridi, M., Mohammed, AFA., Elamin, K. M., Milanda, T., Gozali, D. Monoclonal antibody as a targeting mediator for nanoparticle targeted delivery system for lung cancer. *Drug Delivery*. 29(1), p.2959–2970. <https://doi.org/10.1080/10717544.2022.2120566>. (2022)
- Wei, QY., Xu, YM., Lau, ATY. Recent Progress of Nanocarrier-Based Therapy for Solid Malignancies. *Cancers*. 12(10). <https://doi.org/10.3390/cancers12102783>. (2020)
- Wicki, A., Witzigmann, D., Balasubramanian, V., Huwyler, J. Nanomedicine in cancer therapy: challenges, opportunities, and clinical applications. *J Cont Rel* 200, 138–157. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.12.030. (2015)
- Wu, J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application. *Journal of Personalized Medicine*. 11(8). <https://doi.org/10.3390/jpm11080771>. (2021)
- Xu, R., Tomeh, MA., Ye, S., Zhang, P., Lv, S., You, R., Wang, N., Zhao, X. Novel microfluidic swirl mixers for scalable formulation of curcumin loaded liposomes for cancer therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 622, 121857. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121857>. (2022)
- Xue, X., Wang, B., Du, W., Zhang, C., Song, Y., Cai, Y., Cen, D., Wang, L., Xiong, Y., Jiang, P., Zhu, S., Zhao, KN., Zhang, L. Generation of affibody molecules specific for HPV16 E7 recognition. *Oncotarget*. 7(45), p.73995–74005. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12174>. (2016)
- Yan, EY., Ding, Y., Chen, CJ., Li, RT., Hu, Y., Jiang, XQ. Polymer/silica hybrid hollow nanospheres with pH-sensitive drug release in physiological and intracellular environments. *Chemical Communications*. 19, 2718–2720. (2009)
- Yang SC., Lu, LF., Cai, Y., Zhu, JB., Liang, BW., Yang, CZ. *J. Controlled Release*, 59, 299—307. (1999)
- Yao, Y., Zhou, Y., Liu, L., Xu, Y., Chen, Q., Wang, Y., Wu, S., Deng, Y., Zhang, J., Shao, A. Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences*. 7, p.193. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00193>. (2020)
- Yigit MV, Moore A, Medarova Z. Magnetic nanoparticles for cancer diagnosis and therapy. *Pharm Res*. 29(5):1180-1188. <https://doi.org/10.1007/s11095-012-0679-7>. (2012)
- Yingchoncharoen, P., Kalinowski, DS., Richardson, DR. Lipid-Based Drug Delivery Systems in Cancer Therapy: What Is Available and What Is Yet to Come. *Pharmacol. Rev*. 68, 701–787. doi: 10.1124/pr.115.012070. (2016)
- Yong, JM., Mantaj, J., Cheng, Y., Vllasaliu, D. Delivery of Nanoparticles across the Intestinal Epithelium via the Transferrin Transport Pathway. *Pharmaceutics*. 11(7), p.298. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11070298>. (2019)
- Yoo, J., Park, C., Yi, G., Lee, D., Koo, H. Active Targeting Strategies Using Biological Ligands for Nanoparticle Drug Delivery Systems. *Cancers*. 11(5). <https://doi.org/10.3390/cancers11050640>. (2019)
- Yu, B., Tai, HC., Xue, W., Lee, LJ., Lee, RJ. Receptor-targeted nanocarriers for therapeutic delivery to cancer. *Molecular Membrane Biology*. 27(7), p.286–298. <https://doi.org/10.3109/09687688.2010.521200>. (2010)
- Yu, X., Yang, YP., Dikici, E., Deo, SK., Daunert, S. Beyond Antibodies as Binding Partners: The Role of Antibody Mimetics in Bioanalysis. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*. 10(1), p.293–320. <https://doi.org/10.1146/annurev-anchem-061516-045205>. (2017)
- Yuan, Q., Hein, S., Misra, RDK. New generation of chitosanencapsulated ZnO quantum dots loaded with drug: synthesis, characterization and in vitro drug delivery response. *Acta Biomater*. 6(7), 2732-2739. (2010)
- Yuan, YG., Peng, Q., Gurunathan, S. Silver nanoparticles enhance the apoptotic potential of gemcitabine in human ovarian cancer cells: combination therapy for effective cancer treatment. *Int. J. Nanomedicine*. 12, 6487–650. (2017)
- Zhang, J., Wang, S., Zhang, D., He, X., Wang, X., Han, H., Qin, Y. Nanoparticle-based drug delivery systems to enhance cancer immunotherapy in solid tumors. *Frontiers in Immunology*. 14, 1230893. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1230893>. (2023)
- Zhang, P., Li, Y., Tang, W., Zhao, J., Jing, L., McHugh, KJ. Theranostic nanoparticles with disease-specific administration strategies. *Nano Today*, 42, 101335. <https://doi.org/10.1016/j.nantod.2021.101335>. (2022)



BÖLÜM 9
İLAÇ ARAŞTIRMALARINDA
***IN VIVO* TESTLER**
VE
İYİ LABORATUVAR UYGULAMALARI

Begüm BUĞDAYCI^{1,*}

¹KOBAY Deney Hayvanları Laboratuvarı, Çankaya/Ankara, Türkiye

begum@kobay.com.tr

*Sorumlu Yazar: Begüm BUĞDAYCI





1. GİRİŞ

İyi Laboratuvar Uygulamaları (İLU)-Good Laboratory Practice (GLP), klinik çalışmalar dışındaki sağlık ve çevre güvenliği çalışmalarının planlanması, yapılması, izlenmesi, kaydedilmesi, arşivlenmesi ve rapor edilmesi şartlarını ve yönetim usullerini içeren bir kalite güvence sistemidir (Kathleen, 2013) (Şekil 1).



Şekil 1. İyi laboratuvar uygulamaları.

Endüstriyel kimyasallar, farmasötikler, pestisitler, biyosidaller, kozmetikler, gıda ve yem katkı maddeleri, yani genel olarak kimya endüstrisi dünyanın en büyük sanayi sektörlerinden biridir. GLP, bu kimyasalların, kimyasal özellikleri ve güvenlik bilgileri gibi konularda yapılan tüm Ar-Ge ve bu ürünlerin pazarlanması için yapılan çalışmalarda gereklidir.

2020 yılında dünya gündemini oluşturan en önemli konulardan biri olan Covid-19 aşısı gibi kritik öneme sahip ürünlerin klinik öncesi gerçekleştirilen hayvan deneyleri de GLP kapsamında gerçekleştirilmesi gereken zorunlu testlerdendir. Bu anlamda ilaç endüstrisi için yaklaşımların birbirleriyle uyumlu hale getirilmesinin, test tekrarlarının önlenmesinin ve ortak bir paydada buluşulmasının, ticarete teknik engelleri azaltacağı düşünülmüştür. Bununla birlikte testlerde kullanılan deney hayvanı sayısının düşürülmesi de hayvan refahına önemlidir. Bu doğrultuda,

- Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü (OECD) “Verilerin Karşılıklı Kabulü Sistemi” (MAD)
- “OECD Kimyasalların Testine İlişkin Kılavuzlar”
- “OECD İyi Laboratuvar Uygulamaları”

araçlarından oluşan bir dizi, OECD Konsey kararı temelinde oluşturulmuştur. Test tekrarının engellenmesi ve iş paylaşımı yapılması ile MAD sistemi sayesinde uluslararası alanda ülkeler ve endüstriler arasında yıllık 309 milyon Euro tasarruf sağlanmaktadır (ANONİM, 2016).

2. GLP TARİHÇESİ

İlk resmi düzenleyici “İyi Laboratuvar Uygulamaları” (GLP) kavramı, yeni ilaç başvuruları kapsamında Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesine (FDA) sunulan klinik olmayan güvenlik verilerinin geçerliliği konusundaki endişeler nedeniyle 1970’lerde ABD’de ortaya çıkmıştır (ANONİM, 2009) (Şekil 2).

Çalışmaların ve test birimlerinin incelenmesi; yetersiz planlama, çalışmaların yetersiz yürütülmesi, yöntem ve sonuçların yetersiz dokümantasyonu ve hatta dolandırıcılık vakalarını ortaya çıkarmıştır (ANONİM, 2009).



Şekil 2. İyi laboratuvar uygulamaları düzenlemeleri.

Örneğin;

- i. Bir çalışma sırasında ölen hayvanların, bu gerçeği belgelemeden yenileriyle (test bileşiğiyle uygun şekilde tedavi edilmemiş olan) değiştirilmesi;
- ii. Çalışma ile bağlantılı olmayan kontrol gruplarından kontrol hayvanları için hematoloji verilerinin alınması;
- iii. Histo-Patolog bu lezyonlardan hiçbir örnek almadığı için büyük otopsi gözlemlerinin silinmesi
- iv. Nihai raporda “sonuç tablolarına uymak” için ham verileri geriye dönük olarak değiştirmek.

Bugüne dek karşılaşılan ilk ve bir anlamda GLP’nin doğmasına neden olan olay ise Amerika Birleşik Devletleri’nde ortaya çıkan bir skandaldır. Merkezi Northbrook, Illinois’de bulunan “Industrial Bio-Test Laboratories” isimli araştırma şirketi, ülkenin en eskilerinden biriydi. 1952’deki kuruluşundan 1978’deki kapanışına kadar 22.000 araştırma yürütmüştü ve bunların neredeyse yarısı piyasadaki yüzlerce ilaç, böcek ilacı, gıda katkı maddesi ve diğer kimyasallar için federal onay almaya yardımcı olmadı kullanılmıştı. Savcılar, Industrial Bio-Test’in kemirgenler üzerinde dört ilaç ve kimyasal içeren testlere ilişkin verileri uydurduğunu ve gizlediğini iddia etti. Kemirgenlerin bakımlı laboratuvarlarda vaktinden önce öldüğünü ve kayıt tutmanın hatalı olduğunu iddia ettiler. Bu dört ilaç bir deodorant sabun katkı maddesi; bir artrit ilacı; bir herbisit ve bir böcek ilacıdır. Tüm bu moleküller yeniden test edildi ve satış için onaylandı (ANONİM, 1983) (Şekil 3).



Şekil 3. GLP kurallarına uygun olarak test sonuçlarının onay alması.

Laboratuvarda yer alan eksiklikler, ABD Kongresi'nin Kennedy-Duruşmalarında kamuoyuna açıklandı ve bu duruşmaların siyasi sonucu, FDA'nın 1976'da GLP ile ilgili "Önerilen Düzenlemeleri" yayınlamasına ve "Nihai Kuralın" Haziran 1979'da (21 CFR 58) kurulmasına yol açtı. GLP düzenlemeleri, FDA'ya sunulan çalışmalarla ilgili raporların yürütülen deneysel çalışmayı sadakatle ve tamamen yansıtacağına dair güvence temeli oluşturdu. Kimyasal ve pestisit alanında, ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) da çalışma kalitesinde benzer sorunlarla karşılaşmıştır. Buna göre, 1979 ve 1980'de kendi taslak GLP düzenlemelerini yayınlarken, Nihai Kuralları 1983'te iki ayrı bölümde (40 CFR 160 ve 40 CFR 792, farklı yasal temellerini yansıtan) yayınladı (ANONİM, 2009).

Uluslararası düzeyde, OECD tarafından, GLP'nin ilk "OECD İlkelerini" formüle etmek için bir uzman grubu oluşturulmuştur (Şekil 4).

Bu girişim, ilaç üretiminde protokol dışı engellerden kaçınmak, klinik olmayan güvenlik testi verilerinin karşılıklı olarak kabul edilmesini teşvik etmek ve deneylerin gereksiz tekrarlarını ortadan kaldırmak için ortaya çıkarılmıştır. Uzman grubunun önerileri daha sonra 1981'de "Kimyasalların Değerlendirilmesinde Verilerin Karşılıklı Kabulüne İlişkin Karar" [C (81) 30 (Nihai)] yoluyla OECD Konseyi tarafından kabul edilmiştir (ANONİM, 1998).



Şekil 4. OECD düzenlemeleri.

OECD dokümanında Konsey, OECD Üyesi bir ülkede kimyasalların test edilmesinde ilgili OECD Test Kılavuzlarına ve OECD İyi Laboratuvar Uygulamaları İlkelerine uygun olarak üretilen verilerin, insan ve çevrenin korunmasına ilişkin değerlendirme ve diğer kullanımlar için diğer üye ülkelerde kabul edilmesine karar vermiştir (ANONİM, 1998).

En son olarak belirtilen OECD seri yayınları 1997 yılında revize edilmiştir. OECD serisi dokümanlar 2020 yılı itibarı ile toplam 20 adet tavsiye ve rehber niteliği taşıyan doküman şeklinde kullanımda bulunmaktadır.

3. GLP UYGULAMA ALANLARI

“İyi Laboratuvar Uygulamaları” (GLP) ise, seralarda ve tarlada yürütülen çalışmalar da dahil olmak üzere çevrede veya laboratuvar koşullarında incelenen kimyasal veya kimyasal bir ürünün “klinik olmayan” testiyle ilgilidir. İnsan deneklerin kullanıldığı çalışmaları içermezler (ANONİM, 2016).
Özetle;

- İyi Laboratuvar Uygulamaları (GLP), yeni ilaç dosyalarının güvenliğini ve etkinliğini değerlendiren çalışmalardan elde edilen verilerin artan kalitesi ve bütünlüğü için standart bir temel oluşturur.
- GLP, konsept değerlendirme ve tarama gibi erken geliştirme aşamaları için gerekli değildir.

Araştırma amaçlı yeni bir ilaç başvurusu başvurusunda bulunmadan önce, GLP yalnızca güvenlik çalışmaları için gereklidir. Bu tür güvenlik çalışmaları, biyoyumumluluk, metabolizma, toksikoloji ve farmakolojinin *in vivo* ölçümlerini içerebilir. Herhangi bir *in vivo* prelinik hayvan güvenlik testi için, düzenleyici bir dosyalama bekleniyorsa GLP gerekli olacaktır (Tioga Research, 2016).

GLP kapsamında yürütülen örnek çalışmalar:

- Fiziksel-kimyasal testler
- Toksikite çalışmaları
- Mutajenite çalışmaları
- Suda ve karada yaşayan organizmalar üzerinde çevresel toksisite çalışmaları
- Su, toprak ve havadaki davranış üzerine çalışmalar (biyoakümülyasyon)
- Gıda veya hayvan yemlerinde pestisit kalıntılarını belirlemeye yönelik çalışmalar
- Mezokozmlar ve doğal ekosistemler üzerindeki etkiler üzerine çalışmalar

Analitik ve klinik kimya testleri (ANONİM, 2016)

GLP klinik olmayan tüm sağlık ve çevre güvenlik testlerini tanımlamak ve onaylamak için gereklidir. GLP'nin kapsamı, farmasötik ürünler, pestisit ürünleri, yiyecek ve yem katkıları, kozmetik ürünler, veteriner ilaçlar ve benzer ürünler ve endüstriyel kimyasalların içinde bulunan test maddelerinin klinik dışı güvenlik testleridir (DeRoo, 2014).

4. GLP TANIMI VE İÇERİĞİ

İyi Laboratuvar Uygulaması, OECD İlkelerinde “organizasyonel süreç ve klinik olmayan sağlık ve çevre güvenliği çalışmalarının planlandığı, gerçekleştirildiği, izlendiği, kaydedildiği, arşivlendiği ve raporlandığı koşullarla ilgili bir kalite sistemi” olarak tanımlanmıştır (Nathalie ve ark, 2009). İyi Laboratuvar Uygulamaları İlkelerinin amacı, kalite test verilerinin geliştirilmesini teşvik etmek ve yürütme, raporlama ve arşivleme dahil olmak üzere laboratuvar çalışmalarının yönetimine sağlam bir yaklaşım sağlamak için bir araç temin etmektir. İlkeler, çalışmaların kalitesini, güvenilirliğini ve bütünlüğünü, doğrulanabilir sonuçların raporlanmasını ve verilerin izlenebilirliğini sağlamak için bir dizi standart olarak düşünülebilir. İlkeler, kurumların, her bir çalışmanın operasyonel olarak iyi yönetimini sağlamak ve bütün olarak çalışmanın yeniden yapılandırılması için özel önem taşıyan çalışma uygulamasının (planlama, izleme, kayıt, raporlama, arşivleme) yönlerine odaklanmak için personele roller ve sorumluluklar atmasını gerektirir. Tüm bu yönler, GLP İlkelerine uyum için eşit öneme sahip olduğundan, GLP gereksinimlerinin kısmen uygulanmasına ve yine de GLP uyumluluğunu iddia etmeye izin verilmez. Hiçbir test birimi, GLP kurallarının tam dizisini uygulamamışsa ve bunlara uymuyorsa, haklı olarak GLP uyumluluğunu iddia edemez (ANONİM, 1998).

Farmasötik ürün geliştirme söz konusu olduğunda, GLP İlkeleri, düzenleyici anlamıyla, yalnızca aşağıdaki çalışmalar için geçerlidir:

- Klinik olmayan, yani bu tür çalışmaların analitik yönleri dahil olmak üzere çoğunlukla hayvanlar üzerinde veya in vitro çalışmalar;
- İnsan sağlığı ve / veya çevre ile ilgili olarak ögelerin özellikleri ve / veya güvenliği hakkında veri elde etmek için tasarlanmışlardır;

Test edilen maddenin veya ondan türetilen herhangi bir ürünün tescili veya ruhsatlandırılması amacıyla ulusal bir tescil makamına sunulması amaçlanmaktadır (ANONİM, 2009).

Ulusal yasal durumlara bağlı olarak, ilaç güvenliğini değerlendirmek için yürütülen klinik olmayan laboratuvar çalışmaları için GLP gereklilikleri aşağıdaki çalışma sınıflarını kapsar:

- Tek doz toksisite
- Tekrarlanan doz toksisite (sub-akut ve kronik)
- Üreme toksisitesi (doğurganlık, embriyo-fetal toksisite ve teratojenite, peri/post-natal toksisite)
- Mutajenik potansiyel
- Kanserojen potansiyel
- Toksikokinetik (farmakokinetik çalışmalar için sistemik maruziyet verileri sağlayan yukarıda yer alan çalışmalar)
- Olumsuz etki potansiyelini test etmek için tasarlanmış farmakodinamik çalışmalar (Güvenlik farmakolojisi)

Fototoksisite, tahriş ve duyarlılık çalışmaları dahil yerel tolerans çalışmaları, veya uyuşturucuların şüpheli bağımlılık ve/veya yoksunluk etkilerinin test edilmesi (ANONİM, 2009).

GLP İlkeleri, çalışmaların yapıldığı sahadan bağımsızdır. Bir üreticinin laboratuvarında, bir sözleşmeli veya taşeron tesiste veya bir üniversite veya kamu sektörü laboratuvarında planlanan ve yürütülen çalışmalar için geçerlidir.

GLP, çalışmaların bilimsel tasarımı ile doğrudan ilgili değildir. Bilimsel tasarım, test yönergelerine dayalı olabilir ve bilimsel değeri, pazarlama izni sağlayan İlaç Düzenleme Kurumu tarafından değerlendirilir. Bununla birlikte, GLP'ye bağlılık, birçok hata ve belirsizlik kaynağını ortadan kaldırarak çalışmanın genel güvenilirliğine katkıda bulunacaktır.

Teknik olarak geçerli ve onaylanmış Standart Çalışma Prosedür'lerinin (SOP) uygulanması yoluyla birçok sistematik hata kaynağı ve artefakt önlenebilir (Şekil 5). Çalışma için tanımlanmış bilimsel bir amacı olan bir çalışma planı oluşturma gerekliliği, yanlış başlatmaları önleyecek ve eksik veya sonuçsuz çalışmaların görülme sıklığını azaltacaktır. GLP İlkelerine saygı duymak, dolaylı olarak çalışmaların bilimsel verimini optimize edecektir (ANONİM, 1998).



Şekil 5. Standart Çalışma Prosedürü.

GLP'yi bir test biriminde ve özellikle eğitim sırasında uygularken, İyi Laboratuvar Uygulaması teriminin resmi, düzenleyici kullanımı ile bilimsel araştırmalardaki "iyi uygulamaların" genel uygulaması arasında net bir ayrım yapmak önemlidir. "İyi Laboratuvar Uygulaması" terimi ticari marka korumalı bir terim olmadığından, herhangi bir laboratuvar günlük çalışmalarında iyi uygulamaları izlediğini düşünebilir. Bu, GLP uyumluluğunu içermemektedir. Sadece OECD GLP ilkelerinin tüm gerekliliklerine uymanın ve bunlara uymanın GLP'ye gerçek uyumu teşkil ettiği açıkça anlaşılmalıdır. Bu nedenle, uygun GLP kapsamı dışındaki kalite uygulamalarını tanımlamak için benzer terminolojinin kullanılması kesinlikle önerilmemektedir (ANONİM, 2009).

5. GLP'NİN TEMEL GEREKLİLİKLERİ

GLP İlkeleri, klinik olmayan güvenlik çalışmalarının uygun yönetimi için gereksinimleri ortaya koymaktadır. Bu, araştırmacının çalışmalarını kendi önceden oluşturulmuş bilimsel tasarımına uygun olarak gerçekleştirmesine yardımcı olur. GLP İlkeleri, araştırma kurumlarında planlama, performans, kayıt, raporlama, izleme ve arşivleme süreçlerinin tanımlanmasına ve standartlaştırılmasına yardımcı olur. Yönetmelikler, çalışmaların bilimsel veya teknik içeriği ile ilgili değildir. Yönetmelik, çalışmaların bilimsel değerini değerlendirmeyi amaçlamamaktadır. Bu görev önce araştırma programı üzerinde çalışan tecrübeli bilim insanlarına ardından otoritelere ve nihayetinde bir bütün olarak uluslararası bilim camiasına mahsustur. Doğru planlama, tekniklerin kontrollü performansı, tüm gözlemlerin güvenilir bir şekilde kaydedilmesi, faaliyetlerin uygun şekilde izlenmesi ve elde edilen tüm ham verilerin eksiksiz arşivlenmesi için GLP gereksinimleri, birçok hata kaynağının ortadan kaldırılmasına hizmet eder (ANONİM, 2009).

Kimya sektörü neyi hedeflerse hedeflesin, GLP aşağıdaki ana noktaların önemini vurgulamaktadır:

A. Kaynaklar: Organizasyon, personel, tesisler ve ekipmanları kapsar.

B. Karakterizasyon: Test öğeleri ve test sistemlerini kapsar.

C. Kurallar: Protokoller, standart işletim prosedürleri (SOP) kapsar.

D. Sonuçlar: Ham veriler, nihai rapor ve arşivleri kapsar.

E. Kalite Güvencesi: Araştırma süreçlerinin bağımsız olarak izlenmesini kapsar (ANONİM, 1998).

5.1. Kaynaklar

5.1.1. Organizasyon

GLP düzenlemeleri, araştırma organizasyonunun yapısının ve araştırma personelinin sorumluluklarının net tanımlarını gerektirir. Bu, organizasyon şemasının kurumun gerçekliğini yansıtması ve güncel tutulması gerektiği anlamına gelir. Organizasyon şemaları ve iş tanımları, laboratuvarın nasıl çalıştığı ve farklı departmanlar ve görevler arasındaki ilişkiler hakkında anında bir fikir verir. Test biriminin GLP prensiplerine uygun olarak düzenlenmesi ve yürütülmesinde yetkili ve yasal olarak sorumlu kişi veya kişiler tanımlanmış olmalıdır. GLP ayrıca mevcut personel sayısının gerekli görevleri zamanında ve GLP uyumlu bir şekilde yerine getirmek için yeterli olması gerektiğini vurgulamaktadır. Tüm personelin sorumlulukları tanımlanmalı ve iş tanımlarına kaydedilmeli, nitelikleri ve yeterlilikleri eğitim ve öğretim kayıtlarında tanımlanmalıdır (ANONİM, 1998).

5.1.2. Personel

GLP'nin yönetsel ve organizasyonel gereksinimleri, GLP düzenlemelerinin yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır ancak ne yazık ki düzenleyici otoriteler ve Kalite Güvence tarafından hala uyumsuzluğun temel kaynaklarından biri olarak görülmektedir. Tam yönetim taahhüdü ve tüm personelin resmi katılımı olmadan, GLP sistemleri güvenilirlikten yoksundur ve olması gerektiği gibi işlemeyecektir (ANONİM, 2009). Bu nedenle GLP'yi uygularken ve bir laboratuvarı uyumluluğu sürdürürken personel en kritik unsurlardan biridir.

Personelin yönetimi ile ilgili olarak bir GLP test biriminin ele alması gereken temel konular arasında planlama/kaynak tahsisi, personel yönetiminin belgeler aracılığıyla izlenmesi, personelin eğitimi, çalışma direktörünün çok bölgeli durumdaki özel pozisyonun yorumlanması gösterilebilir. GLP'nin gerektirdiği planlama/kaynak tahsis sistemi, ana çalışma planı adı verilen ve o test birimi içindeki tüm çalışmalar ve bunların durumu hakkında temel bilgiler sağlayan bir doküman ile tutulmaktadır.

Yönetim, test biriminin genel organizasyonundan sorumludur. Personel ile ilgili olarak, bu organizasyon genellikle Organizasyon Şemasına yansıtılır. Bu genellikle Ulusal İzleme Otoriteleri tarafından teftişler sırasında talep edilen ilk belgedir ve bu belge tesisin nasıl çalıştığına dair net bir fikir sağlamalıdır. GLP, personelin işlevlerini yerine getirmek için gerekli yeterliliğe (eğitim, deneyim ve eğitim) sahip olmasını gerektirir. Personel yetkinliği, iş tanımlarına, özgeçmişlere ve eğitim kayıtlarına yansıtılır. Bu belgeler, düzenli olarak güncellenen Standart Çalışma Prosedürlerinde tanımlanmalı ve Kalite Güvence denetimleri sırasında doğrulanmalıdır (ANONİM, 1998).

İş yeterliliği, büyük ölçüde iç ve dış uzmanlık eğitimine bağlıdır. GLP, tüm personelin GLP'nin önemini ve kendi işinin GLP faaliyetleri içindeki konumunu anlamasını açıkça gerektirir. Eğitim resmi olarak planlanmalı ve belgelenmelidir. Eğitim sistemleri genellikle SOP tabanlıdır (ANONİM, 2019).

Çalışma Yöneticisinin önemli rolüne özel olarak değinilmelidir. Bu kişi, çalışma kontrolünün tek noktasıdır. Çalışmanın planlanması ve yürütülmesi, sonuçların yorumlanması ve nihai çalışma raporunun yazarlığından genel olarak sorumludur. Bu sorumluluk, çalışma planının veya protokolün imzalanması, devam etmekte olan çalışmanın denetimi ve nihai raporun imzalanmasıyla ifade edilir. Çalışma Direktörü, çalışmasının GLP İlkeleri ile ne ölçüde uyumlu olduğunu gösteren bir GLP uygunluk beyanını nihai rapora dahil etmelidir (ANONİM-2, 1999). Çalışmalar, test biriminde (Çalışma direktörünün bulunduğu ana sahada) ve bir veya daha fazla test sahasında (çalışmanın yalnızca belirli aşamalarının gerçekleştirildiği) gerçekleştirildiğinde, test sahaslarında yapılan faaliyetlerin bir Baş Araştırmacı'nın gözetimi ve sorumluluğu altındadır. Baş Araştırmacı doğrudan Çalışma Direktörüne bağlıdır ve Çalışma Direktörü, delege edilen aşamalar da dahil olmak üzere çalışmanın tamamını kapsayan protokolden sorumludur (ANONİM, 1999)

5.1.3. Tesisler ve Ekipman

GLP ilkeleri, tesislerin ve ekipmanın çalışmaları gerçekleştirmek için elverişli ve yeterli olması gerektiğini vurgulamaktadır. Tesisler aşırı kalabalık, çapraz kontaminasyon veya projeler arasında karışıklık gibi sorunları önleyecek kadar geniş olmalıdır. Su, elektrik vb. hizmetler yeterli ve istikrarlı olmalıdır (ANONİM, 2010).

Laboratuvardaki tüm ekipman çalışır durumda olmalıdır. Geçerli kılma/kalifikasyon, kalibrasyon ve bakım programı bunu sağlamada önemlidir. Tüm ekipman, kullanım amacına uygun olmalı ve güvenilir ve doğru performans sağlamak için uygun şekilde kalibre edilmeli ve bakımı yapılmalıdır. Onarımların ve rutin bakımların ve rutin olmayan işlerin kayıtları saklanmalıdır. Bu GLP gerekliliklerinin amacı, üretilen verilerin güvenilirliğini sağlamak ve verilerin yanlış, yetersiz veya hatalı ekipman nedeniyle geçersiz kılınmamasını veya kaybolmamasını sağlamaktır (ANONİM, 1998).

Test tesisleri, çalışmanın gereksinimlerini karşılamak ve çalışmayı engelleyebilecek rahatsızlıkları en aza indirmek için uygun boyutta, yapıda ve konumda olmalıdır. Çalışmanın çeşitli unsurlarının yeterli derecede ayrılmasını sağlayacak şekilde tasarlanmalıdırlar. Bu gerekliliklerin amacı, yetersiz tesisler nedeniyle çalışmanın tehlikeye atılmamasını sağlamaktır. Tesislerde organizasyonel ve fiziksel ayırımın yanı sıra ilaç ve doz karışım odaları ile hayvan ünitelerinin ayırımının sağlanmış olması gerekmektedir (ANONİM, 1998).

5.1.4. Kalibrasyon

Laboratuvarda yer alan tüm ekipmanların ister veri oluşturmak amaçlı (örneğin analitik ekipman veya teraziler), ister standart koşulları (örneğin, buzdolapları veya klima ekipmanı) korumak amaçlı kullanılması gerekli spesifikasyonlara göre çalışmalıdır. Spesifikasyonların karşılandığının kanıtı genellikle periyodik kontrollerle sağlanmalıdır (ANONİM, 2007).

Ölçüm ile ilgili ekipmanlar söz konusu olduğunda, bu muhtemelen standartların kullanımını içerir. Örneğin, bilinen standart ağırlıklar kullanılarak bir terazi kalibre edilecektir. Analitik ekipman olması durumunda, ekipmanın beklendiği gibi çalıştığından emin olmak ve nihai sonucun hesaplanması

için bir temel sağlamak için bilinen konsantrasyonda bir numune kullanılacaktır. Hayvan tesisleri için klima sistemleri veya sabit sıcaklıktaki saklama odaları gibi diğer ekipmanlar, kalibre edilmiş aletler (probar, termometreler vb.) kullanılarak periyodik olarak kontrol edilecektir. Ekipmanın spesifikasyonlar dahilinde çalışmadığının belirlenmesi durumunda, çalışma üzerinde herhangi bir olumsuz etkiyi önlemek için zamanında önlem alınmasına izin veren bir sıklıkta doğrulamalar yapılmalıdır (ANONİM, 2009).

5.1.5. Bakım

Ekipmanın uygun şekilde bakımının yapılması gerekliliği, bunun ekipmanın spesifikasyonlara göre sürekli performans göstermesini sağladığına ve beklenmedik bir arıza ve bunun sonucunda veri kaybı olasılığını azalttığına dair iddiaya dayanmaktadır (ANONİM, 2007).

Hayati önem taşıyan ekipmanların yedeklenmesi, mümkün olan her durumda mevcut olmalı ve elektrik kesintileri gibi servis arızaları durumunda yedeklenmelidir. Bir laboratuvar, hayvanların veya verilerin kaybolmasını önlemek için gerekli hizmetlere ve çalışmaların geri dönüşü olmayan bir şekilde etkilenmesine devam etme yeteneğine sahip olmalıdır. Örneğin, hayvan çalışmaları yürüten bir laboratuvar, en azından, laboratuvarın tamamen normal şekilde çalışmasına izin vermese bile hayvan odası ortamını koruyabilen bir jeneratöre ihtiyaç duyabilir (ANONİM, 1998).

Ekipmanın arızalı olduğuna dair erken uyarı önemlidir dolayısıyla bunu sağlamak için kontrol aralığı atanmalıdır. Alarmlar, özellikle laboratuvarında personelin bulunmadığı bir zamanda bir sorun ortaya çıkarsa çok değerlidir.

5.2. Test Maddesi Karakterizasyonu ve Kullanımı

GLP çalışmalarında kullanılan tüm test öğelerinin taşınması, teslim alınması, tanımlanması, etiketlenmesi, örneklenmesi, kullanılması, depolanması, karakterizasyonu, arşivlenmesi ve bertarafı ile GLP ilkelerine uygun olarak yürütülen çok çeşitli klinik olmayan çalışmaların yürütülmesinde kullanılan farklı türdeki test öğelerinin karakterizasyonuna ilişkin şartlar tanımlanmalıdır. Test öğeleri, kimyasal, biyolojik, sentetik, doğal, canlı organizmalar, transgenik organizmalar, karmaşık endüstriyel veya biyolojik süreçlerden öğeler, karmaşık karışımlar veya bunların bir kısmı gibi farklı kökenlerden olabilir (ANONİM, 2018).

Test ögesinin kimliği, aktivitesi, stabilitesi ve biyoyararlanımı, çalışmanın geçerliliğinin merkezidir. Test birimi çalışmayı doğrulamak için, test sisteminin (genellikle bir hayvan) doğru miktarda test ögesi (genellikle bir kimyasal formülasyon) aldığı gösterebilmelidir. Bu, test maddesinin kullanımının tüm aşamalarında uygun şekilde kontrol edilmesiyle ve beraberindeki kayıtlar ve belgelerle sağlanır (ANONİM, 2018).

Farmasötik bileşiklerin güvenlikle ilgili özelliklerini değerlendirmeyi amaçlayan klinik olmayan çalışmalar için, test ögesinin ve uygulandığı test sisteminin (genellikle bir hayvan veya izole edilmiş parçası) özellikleri hakkında ayrıntılı bilgi sahibi olmak bir ön koşuldur (ANONİM, 2009).

Kimlik, etki, bileşim, kararlılık, safsızlık profili vb. gibi özellikler, test ögesi, araç ve herhangi bir referans malzeme için bilinmelidir. Test sistemi bir hayvan ise (ki bu çok sık rastlanan bir durumdur) türü, sağlık durumu, normal biyolojik değerleri vb. gibi ayrıntıları bilmek çok önemlidir (ANONİM, 1998).

Her bir test ve referans ögesi uygun şekilde tanımlanmalıdır (örneğin; Kod, Kimyasal Özler Hizmet Kayıt Numarası [CAS numarası], isim, biyolojik parametreler). Her çalışma için, test veya referans maddelerinin her bir serisini uygun şekilde tanımlamak için parti numarası, saflık, bileşim, konsantrasyonlar veya diğer özellikler dahil olmak üzere kimlik bilinmelidir (ANONİM, 1998).

Test ögesinin her kullanımının kaydedilmesi, işleyen bir kontrol mekanizmasının oluşturulmasına izin verir. Bu sadece kullanılan test ögesinin miktarının tam izlenebilirliğini sağlamakla kalmaz, aynı zamanda beklenen kullanıma karşı gerçek kullanımın izlenmesine yönelik bir araç sağlar. Bilgi türü şunları içerir:

- Kullanım tarihi
- Çalışma numarası (aynı test ögesi grubu birden fazla çalışma için kullanılıyorsa önemlidir)
- Kullanmadan önce brüt ağırlık (kap ve içerikler her kullanımdan önce tartılır ayrıca tartan kişinin baş harfleri de kaydedilir)
- Kullanımdan sonra brüt ağırlık (kap ve içindekiler kullanımdan sonra tartılır)
- Kullanılan test ögesinin ağırlığı (her seferinde kaptan eksilen malzeme miktarıdır)
- Doz hazırlama kayıtlarından alınan ağırlık (doz formunun hazırlanmasında kullanıldığı şekilde kaydedilen materyal miktarıdır. Bu kayıt ile kaptan çıkarılan miktar arasındaki karşılaştırma, tartılan miktarın iki kez kontrol edilmesini sağlar)
- Tutarsızlık (beklenen değerlerdeki herhangi bir farklılığın açıklaması, örneğin dökülme durumu)

Kalan stok (örneğin ek malzeme siparişi vermek için bir uyarı sağlayan kapta kalan malzeme miktarının toplamı) (ANONİM, 2009).

Test sistemleri çoğunlukla hayvandır ancak bitkiler, bakteriler, organlar, hücreler ve hatta analitik ekipman da olabilmektedir. Bu nedenle, bir test sisteminin GLP tanımı çok geniştir. Genel olarak, bir test sistemi, bir güvenlik çalışması sırasında bir test ögesine maruz kalan herhangi bir sistemdir. Barınma koşulları ve hayvanların tedavi edilme şekli, çalışmanın bilimsel ihtiyaçlarını karşılamalı ve ulusal hayvan refahı mevzuatına uygun olmalıdır (ANONİM, 1998).

Çalışmayı gerçekleştirecek olan sorumlu, araştırma gereksinimlerine göre hayvan kalitesi ve miktarını eşleştirmelidir.

Çalışma Direktörü ve yönetim, aşağıdaki noktaları göz önünde bulundurarak herhangi bir çalışma için hayvanı (fenotip, genotip, sayı, cinsiyet, yaş, tedarikçi vb.) tanımlamaktadır.

- Modelin uygunluğu; insanda amaçlanan terapötik kullanım
- Çalışma ve proje hedefleri
- Geçmiş arka plan verilerinin ve geçmiş deneyimlerin mevcudiyeti

Çalışmada kullanılacak olan test sisteminin seçimi protokolda gerekçelendirilmelidir (ANONİM, 1999).

6. KURALLAR

Her bir çalışmanın tasarımını ve yürütülmesini ana hatlarıyla belirten ve çalışmanın uygun şekilde düşünülmüş ve planlanmış olduğuna dair kanıt sağlayan bir çalışma planı ya da protokol bulunmalıdır. GLP'ye uygun olarak yürütülen çalışmaların temel adımları bu nedenle çalışma protokolünde açıklanır.

Çalışma yönetiminin tüm teknik ayrıntılarının protokole dahil edilmesi makul değildir. Tüm rutin prosedürlerin ayrıntıları, kurumun dokümantasyon sisteminin bir parçası olan Standart Çalışma Prosedürlerinde (SCP'ler) açıklanmıştır. SCP'ler, sıklıkla uygulanan teknikleri standartlaştırarak çalışmalardaki önyargının azaltılmasına katkıda bulunur. Ayrıca rutin prosedürlerin kullanılan yazılı SCP'lerde açıklanmasının bir başka nedeni de çalışmanın tam olarak yeniden yapılandırılabilmesidir (ANONİM, 1998).

7. SONUÇLAR

Çalışmaların kodlanması, verilerin nasıl toplandığı, raporların hazırlanması, indeksleme sistemleri ve bilgisayarlı sistemlerin kullanımı da dahil olmak üzere verilerin işlenmesi gibi hususların SCP'lerde açıklandığı kabul edilir. İndeksleme sistemi SCP'lerin indekslenmesini içerir. Ham veri tanımı genel olarak veya ham veri üreten her sistem için gereklidir. (Carson, 2007)

Tüm çalışmalar, bazen kaynak veri olarak adlandırılan ham veriler üretir. Ham veriler, bir prosedürün yürütülmesi sırasında toplanan orijinal verilerdir ve bir çalışmanın olaylarının izlenebilirliğine katkıda bulunurlar (ANONİM, 1998).

Çalışmada ham verinin ne olduğunun tanımlanması gereklidir. Toplamanın elektronik ortamda yapılması durumunda, ilk çıktının ham veri olup olmadığı veya halen elektronik ortamda tutulup tutulmadığı açıklanmalıdır (Carson, 2007).

Ham verilerin elektronik olarak toplanması kullanıldığında FDA'nın 21 CFR bölüm 11'i dikkate alınmalıdır (ANONİM, 2003).

Ham veriler, çalışmanın sonuçlarının dayanacağı deneyin sonuçlarıdır. Ham verilerin bir kısmı istatistiksel olarak işlenirken, diğerleri doğrudan kullanılabilir. Durum ne olursa olsun, çalışma raporunda bilim insanı tarafından sağlanan sonuçlar ve yorumları, ham verilerin gerçek ve doğru bir yansıması olmalıdır (ANONİM, 1998).

Çalışma gerçekleştirildikten sonra çalışmanın tüm aşamalarını ve sonucunu içeren bir rapor oluşturulur. Bu rapor ham verilerle paralel olmalı ve çalışmanın GLP ilkelerine uygun olarak yürütüldüğüne dair gereklilikleri içermelidir.

Çalışma yöneticisi, çalışma raporunun oluşturulmasından sorumludur. Üretilen ve rapora aktarılan verilerin oluşturulması, kalite kontrolü, bilimsel inceleme, kalite güvence incelemesi ve sonuçlandırılmasına yönelik prosedürlerin SCP'lerde tanımlanması ve açıklanması gerekir. Çalışma planı değişikliklerinin ve çalışma planı sapmalarının oluşturulması ve işlenmesi için prosedürlerin açıklanması gerekir (Carson, 2007).

Bir çalışmanın bittikten yıllar sonra yeniden inşa edilmesi gerekebilir. Bu nedenle, kayıtların depolanması, kayıp veya bozulma olmaksızın ve tercihen hızlı erişime izin verecek şekilde uzun süre saklanmalarına imkan vermemelidir. Değerli verilerin güvenli bir şekilde depolanmasını teşvik etmek için, arşiv tesislerine erişimi sınırlı sayıda personelle kısıtlamak ve oturum açıp kapatılan belgeleri kaydetmek olağan bir uygulamadır. Erişim belirli personel ile sınırlı olsa bile arşive giren ve çıkan kişilerin kayıtları da tutulmaktadır (ANONİM, 2015).

Çalışma planı, ham veriler, diğer belgeler, rapor, numuneler ve örnekler arşivlenene kadar çalışma tamamlanmaz. Bu faaliyetlere ilişkin prosedür SÇP'nin konusudur. Ayrıca neyin arşivleneceğine ilişkin standart hakkında bilgi de içerebilir. Tüm materyalin arşive düzgün bir şekilde yerleştirildiğinden emin olması gereken, kimliği belirlenmiş bir arşivci bulunmalıdır. Güvenli bir depolama için arşivleme, arşivlenenlerin takibini sağlayacak bir dizin sistemine de ihtiyaç duyar. Kolay erişim için bu indeksleme şarttır. Uzun vadede malzemelerin kolay erişimi açısından önemlidir. Arşive giren materyal ne şartlar altında ve kim tarafından arşivden ödünç alınacak, bu duruma kim izin verecek ve alınan materyal ne zaman iade edilecek gibi bilgiler de ilgili prosedürde tanımlanmalıdır (Carson, 2007).

7.1. Kalite Güvence

GLP tarafından tanımlandığı gibi, GLP uyumluluğunun bir bütün olarak test tesisinde ve her bir çalışmada sağlandığına dair yönetimi güvence altına almakla görevli kişilerden oluşan bir ekiptir. Kalite Güvencesi, çalışmaların operasyonel yürütülmesinden bağımsız olmalı ve tüm klinik öncesi araştırma sürecine bir “tanık” olarak işlev görmelidir (ANONİM, 1999).

Kalite Güvence personeli tarafından gerçekleştirilen operasyonların SÇPlerde açıklanması gerekir. Bu açıklamalar denetimleri (tesis, süreç ve çalışma özellikleri) ve denetimlerin sıklıklarını içerecektir. Denetim sonuçlarının nasıl raporlanacağı açıklanmalıdır. Denetimler, çalışma planlarının ve çalışma raporlarının gözden geçirilmesini içerecektir. Farklı denetimlerin amacı da açıklanmalıdır (Carson, 2007)

Denetim, faaliyetlerin, materyallerin ve kayıtların incelenmesine yönelik bir dizi tekniği içerebilir. Her durumda amaç, kriterlerin oluşturulup oluşturulmadığını ve karşılanıp karşılanmadığını tespit etmektir. Denetim genellikle standartların karşılanıp karşılanmadığını belirlemek için çıktıya odaklanır. Yaygın çıktı denetimi türleri şunları içerir: GLP kapsamındaki veri, kayıt ve nihai rapor denetimleri. Bunlar incelenen çalışmanın kalitesine ilişkin bazı bilgiler sağlasa da sınırlamaları da vardır (Carson, 2007)

İlk sınırlama açıktır; eğer çıktılarda hatalar bulunursa, hata zaten oluşmuştur. Hataı onarmak mümkün olabilir ancak bu, tekrarlanan çalışmayı gerektirecektir. Hatanın tekrarlanmasını önlemek için elde edilen bilgilerin kullanılması da mümkün olabilir, ancak hatanın meydana geldiği gerçeği ortadadır. İkinci sınırlama ise daha incelikli: “yanlış negatif” bulguların olasılığı. Görünüşte kabul edilebilir kayıtların kusurlu prosedürlere dayanması mümkündür. Doğru şekilde imzalanmış onam formu, makul şüphelerin ötesinde, deneğe doğru bilginin doğru şekilde verildiğini kanıtlamaz. Hayvan dozlama kayıtları, hayvanlara gerçekten doz verildiğinin şaşmaz kanıtı değildir (Carson, 2007).

Denetim performansı yanlış negatif bulgu riskini azaltabilir. Performans denetimi yalnızca sistemin doğru şekilde çalışma potansiyelini gösterdiğinden “azaltma” terimini dikkatli kullanıyorum. Denetimden sistemin belirli bir şekilde çalıştığı sonucunu çıkarmak makul olabilir ancak bu ancak sürekli fiili gözlem olmadığında mümkündür. Performans denetimlerine genel olarak “yaşam içi denetimler” veya “teftişler” adı verilir.

7.1.1. Kalite Güvence Denetimleri

OECD'nin iyi laboratuvar uygulamalarına ilişkin ilkeleri şunları belirtmektedir: Denetimler, Kalite Güvence Programı Standart Çalışma Prosedürlerinde belirtildiği üzere üç türde olabilir:

- Çalışmaya dayalı denetimler,
- Tesis bazlı denetimler,
- Süreç bazlı denetimler

Kalite güvence programları sıklıkla aşağıdaki denetim türlerine dayanır:

Çalışmaya dayalı denetimler: Bunlar, belirli bir çalışmanın kronolojisine göre, genellikle öncelikle çalışmanın kritik aşamalarının belirlenmesiyle planlanır.

Tesis bazlı denetimler: Bunlar belirli çalışmalara dayanmaz, ancak bir laboratuvar içindeki genel tesis ve faaliyetleri kapsar (kurulumlar, destek hizmetleri, bilgisayar sistemi, eğitim, çevresel izleme, bakım, kalibrasyon vb.)

Süreç bazlı denetimler: Yine spesifik çalışmalardan bağımsız olarak gerçekleştirilirler. Tekrarlanan nitelikteki prosedürleri veya süreçleri izlemek için yürütülürler ve genellikle rastgele olarak gerçekleştirilirler. Bu denetimler, bir prosesin laboratuvarında çok sık gerçekleştirildiği ve bu nedenle çalışmaya dayalı denetimlerin gerçekleştirilmesinin verimsiz veya pratik olmadığı düşünüldüğünde gerçekleştirilir. Süreç bazlı denetimlerin çok sık meydana gelen aşamaları kapsayacak şekilde yapılmasının, bazı çalışmaların deneysel aşamalarında bireysel olarak denetlenmemesine yol açabileceği kabul edilmektedir. (ANONİM, 2022)

Yukarıdaki tanımlardan, süreç bazlı ve çalışmaya dayalı denetimlerin pek çok ortak noktası vardır ve yalnızca belirli bir çalışmanın hedeflenip hedeflenmediğine göre temel olarak farklılık gösterir. Bu denetimlerin her ikisi de mikro düzeyde çalışır. Bunlar, farklı unsurların nasıl bir araya geldiğini görmek için makro düzeyde işleyen tesis denetimleriyle tamamlanmaktadır. (ANONİM, 2022)

Bazı kuruluşlar “tesisler” kelimesinin anlamını tam anlamıyla almak için tesis denetimleri ile sistem denetimleri arasında ayrım yapar ancak GLP bu ayrımı yapmaz.

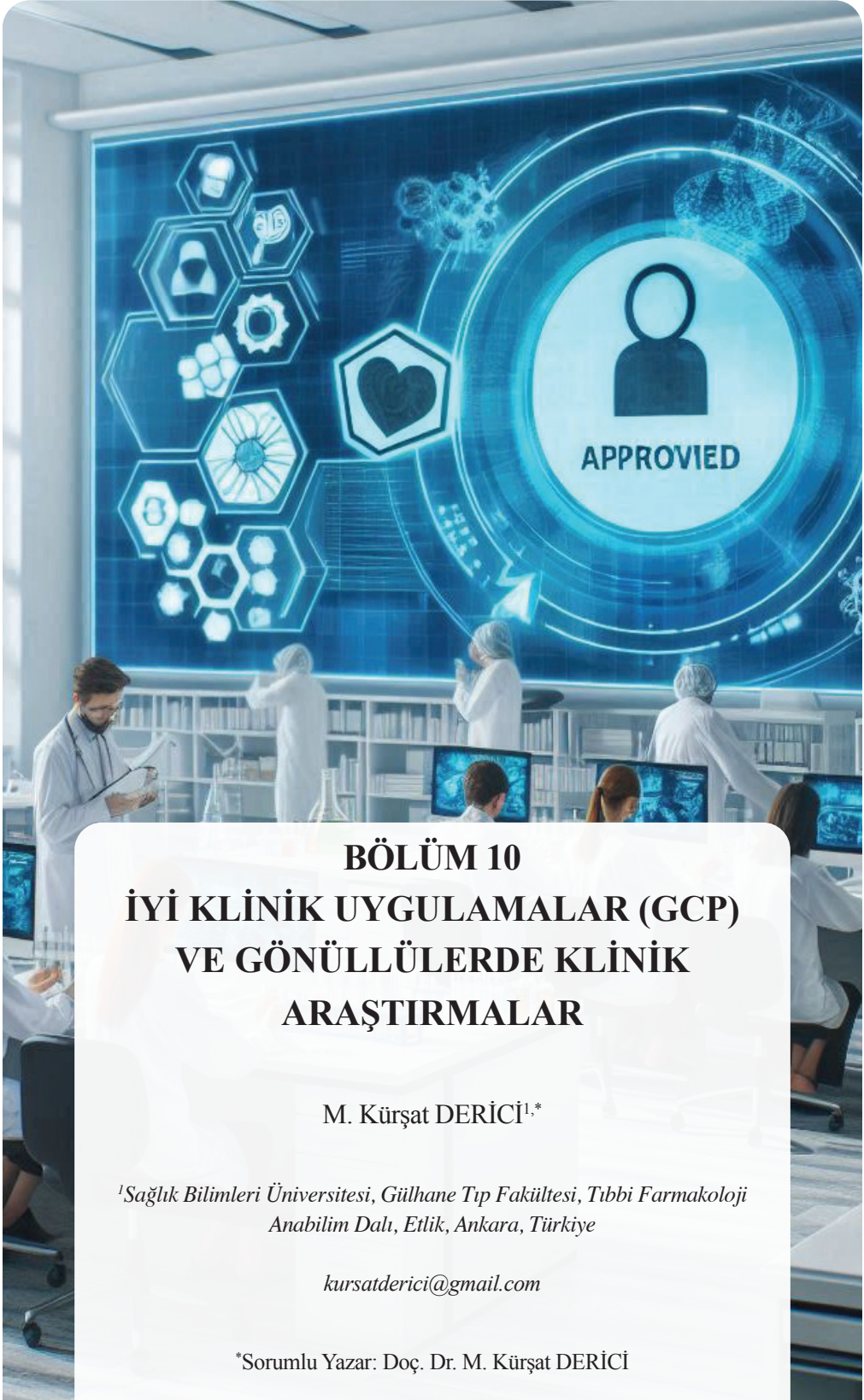
Tesis denetimi, bir QA denetçisinin görevlerinin en ilginç ve zorlu kısımlarından birini temsil eder. Bunun nedeni tesis denetiminin muhtemelen organizasyon, hazırlık, planlama ve yürütme açısından en zorlu denetim olmasıdır. Bu sırada tüm denetim deneyimine ihtiyaç duyacak ve düşüncesinin esnekliğine meydan okuyacak karmaşık sistemlerle uğraşacaktır. Prosedür ve süreç denetimlerinin çok daha sıkı tanımlanmış bir kapsamı vardır. Hazırlık ve planlama ilkeleri bu denetimler için hala geçerlidir ancak bunlar genellikle tesis denetimlerinden daha az karmaşıktır. İyi bir tesis denetimi tüm taraflara çok büyük faydalar sağlayabilir ve her şeyden önce tesis denetimi, hataların tespitinden ziyade önlenmesine dayanan en iyi kalite türünü teşvik etmek için mükemmel bir fırsat sağlar (ANONİM, 2022).

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaç” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- ANONİM NEWYORK TIMES. [Çevrimiçi]
<https://www.nytimes.com/1983/10/22/us/3-ex-officials-of-major-laboratory-convicted-of-falsifying-drug-tests.html> (1983) Erişim Tarihi 20 12 2023
- ANONİM OECD Principles on Good Laboratory Practice Document No1
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliance-monitoring.htm> (1998) Erişim Tarihi 05 12 2023
- ANONİM OECD Quality Assurance and GLP
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliance-monitoring.htm> (1999) Erişim Tarihi 12 12 2023
- ANONİM ILAC G24. Guidelines for the determination of recalibration intervals of measuring equipment
<https://ilac.org/publications-and-resources/ilac-guidance-series/> (2007) Erişim Tarihi 25 12 2023
- ANONİM Handbook: good laboratory practice (GLP). Quality practices for regulated non-clinical research and development. 2nd ed dü. Geneva: World Health Organization. (2009)
- ANONİM İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensipleri, Test Birimlerinin Uyumlaştırılması, İyi Laboratuvar Uygulamalarının Ve Çalışmaların Denetlenmesi Hakkında Yönetmelik. [Çevrimiçi]
<https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/03/20100309-10.htm> (2010) Erişim Tarihi 20 12 2023
- ANONİM World Health Organization. [Çevrimiçi]
[https://www.who.int/news-room/q-a-detail/medicines-good-manufacturing-processes#:~:text=What%20is%20GMP%3F-,Good%20manufacturing%20practice%20\(GMP\)%20is%20a%20system%20for%20ensuring%20that,through%20testing%20the%20final%20product](https://www.who.int/news-room/q-a-detail/medicines-good-manufacturing-processes#:~:text=What%20is%20GMP%3F-,Good%20manufacturing%20practice%20(GMP)%20is%20a%20system%20for%20ensuring%20that,through%20testing%20the%20final%20product) (2015) Erişim Tarihi 10 12 2023
- ANONİM OECD GLP [Çevrimiçi]
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/overview-of-good-laboratory-practice.htm> (2016) Erişim Tarihi 15 12 2023
- ANONİM OECD GLP Document No 19: Management, Characterisation and Use of Test Items
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliance-monitoring.htm> (2018) Erişim Tarihi 10 12 2023
- ANONİM TÜRKAK P901 İyi Laboratuvar Uygulamaları Uygunluk İzleme Programı
<https://secure.turkak.org.tr/kapsam/kys> (2019) Erişim Tarihi 25 12 2023
- ANONİM OECD GLP. [Çevrimiçi]
<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeglpandcompliance-monitoring.htm> (1999) Erişim Tarihi 20 12 2023
- Carson, P.A. Good Clinical, Laboratory and Manufacturing Practices: Techniques for the QA Professional, ed. P. Carson and N. Dent, The Royal Society of Chemistry, (2007)
- DeRoo, D. GLPs and GMPs: When are they necessary?. *Namsa White Paper*, pp. <https://www.meddeviceonline.com/doc/glps-and-gmps-when-are-they-necessary-0001>. (2014)
- Kathleen B. Meyer-Tamaki Chapter 21 - Preclinical Development of Monoclonal Antibodies, A Comprehensive Guide to Toxicology in Preclinical Drug Development, Available at: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387815-1.00021-6>. (2013)
- Nathalie Zgheib, Robert Branch, Shama Buch Chapter 24 - Good Clinical Practice and Good Laboratory Practice <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373639-0.00024-8>. (2009)
- Tioga Research, I. *What is GLP and when is it Indicated?* (2016)



BÖLÜM 10

İYİ KLİNİK UYGULAMALAR (GCP) VE GÖNÜLLÜLERDE KLİNİK ARAŞTIRMALAR

M. Kürşat DERİCİ^{1,*}

*¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, Etik, Ankara, Türkiye*

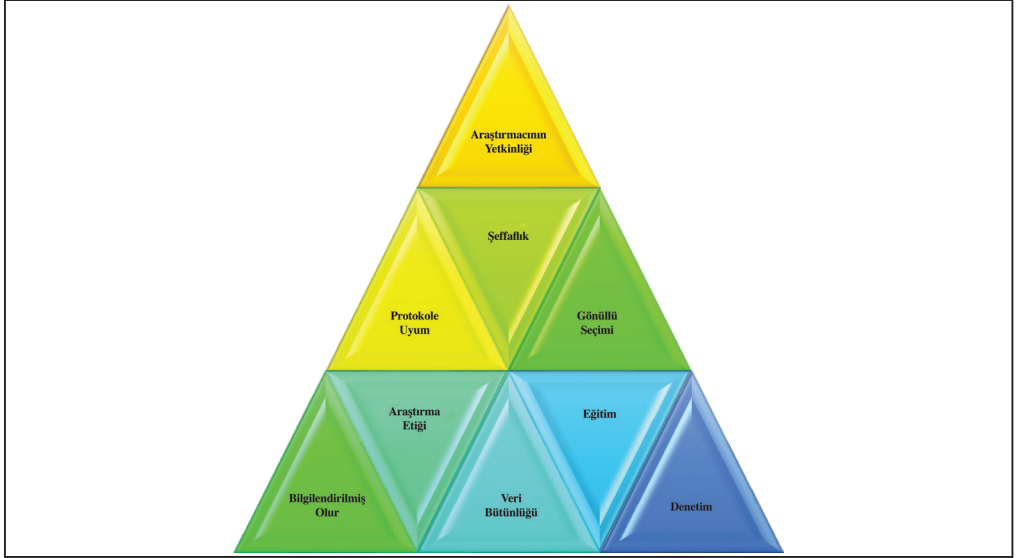
kursatderici@gmail.com

**Sorumlu Yazar: Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ*



1. GİRİŞ

Klinik araştırmalar, sağlık m¼dahalelerinin etkinliğini ve g¼venliėini değerlendirmek için altın standart olarak hizmet veren sağlık sisteminin çok ¼nemli bir bileşenidir (Thomas ve ark., 2020). Bu araştırmalar, yeni ilaçların ve tedavilerin piyasaya s¼r¼lmesi için gerekli olduğu gibi klinik uygulamaların ve yeni araştırmaların planlanmasında da ¼nemli bir rol oynamaktadır (Batchelor ve ark., 2017). Bununla birlikte, g¼n¼ll¼lerin katılımı, protokollere bağlılık, şeffaflık ve verilerin korunması başta olmak ¼zere klinik araştırmalarla ilgili birçok hassasiyet ve zorluk dikkati çekmektedir. Klinik araştırmalar ile ilgili çalışmalara başlamadan ¼nce araştırmaların detayını tanımlayan bu kavramları anlamak ve sorunlara oz¼mler ¼retmek b¼y¼k ¼nem taşımaktadır. Sağlık uzmanları, araştırmacılar ve sağlık politika yapıcıları kanıta dayalı tıbbın ilerlemesini sağlamak için klinik araştırmaların uluslararası kalite ve g¼venirliėi konularında ortak standartlar geliştirilmesi ¼zerinde yoğun şekilde çalışmaktadır. şekil 1’de bu çalışmalarda vurgulanan klinik araştırmaların temel kavramları derlenmiştir.



şekil 1. Başarılı bir klinik araştırmanın temel unsurları.

Klinik çalışmalardaki en ¼nemli kavram G¼n¼ll¼d¼r. Bu tanım, bizzat kendisinin veya kanun¼ temsilcisinin yazılı oluru alınmak suretiyle klinik araştırmaya iştirak eden hasta veya sağlıklı kişiyi ifade eder. G¼n¼ll¼lerin klinik araştırmaya katılımı, klinik araştırmaların başarisında kritik bir fakt¼rd¼r. Hasta katılımının d¼ř¼k olması klinik araştırma sonuçlarının genellenebilirliğini ve etkinliğini ¼nemli ¼l¼de etkileyebilecek ¼nemli bir fakt¼rd¼r. Ayrıca, tedaviyi y¼nlendiren hekimlerin klinik araştırmalar hakkında bilgilendirilmesi ve ¼zendirilmesi ile araştırma s¼recine dahil edilmesi, farklı hasta gruplarının araştırmaya katılımını sağlayarak araştırmaların başarılı

bir şekilde yürütülmesinin ön koşuludur (Baer ve ark., 2012). Birçok ülkede gönüllülerin büyük çoğunluğunun mevcut klinik araştırmalara erişiminin olmadığı ortaya konmuştur olup bu durum klinik araştırmanın sonuçlarının gücünü etkilemektedir (Comis ve ark., 2003). Klinik araştırma sonuçlarının güvenilirliğini ve geçerliliğini etkileyen bir diğer önemli koşul da araştırmacıların araştırma protokollerine tam olarak uyum sağlamasıdır. Büyük ölçekli ilaç etkinlik çalışmalarında özellikle, protokole bağlı kalınmasının, kullanım talimatlarının anlaşılmasının ve gönüllülerin devamının sonuçlar üzerindeki önemi ortaya konmuştur (Woodsong ve ark., 2013).

Klinik araştırmaların bütünlüğü ve geçerliliğinin tememlerinden birisi de şeffaflık ve veri yönetimidir. Mevcut klinik araştırma sürecinde karşılaşılan, hatalı yorumları, veri yanlışlıklarını ve şeffaflık eksikliğini gidermek için farklı çözümler önerilmiştir. Bu çözümler, klinik araştırmalarda yer alan farklı paydaşlar arasında verilerin şeffaflığını ve işbirliğini geliştirmeyi ön plana koymuştur (Zhang, 2023, Lei ve ark., 2021). Bu sayede klinik araştırma kayıtları ile bunların yayınlanmış sonuçları arasında bağlantı kurmak, araştırma raporlamasının eksiksizliği ve çıktıların doğruluğunu değerlendirmek mümkün olabilmektedir (Bashir & Dunn, 2016). Bu nedenle İyi Klinik Uygulamalar (GCP) gibi kalite sistemleri ile araştırma süreçlerinin ve sonuçların standardizasyonu, klinik araştırmaların güvenilirliğini ve yorumlanabilirliğini sağlamak için en temel esastır.

Belirli bir klinik tedavi için yorum yaparken, o alandaki tüm klinik çalışmalarda ölçülen ve raporlanması gereken sonuçları değerlendirmek gerekir. Bu amaçla, üzerinde mutabık kalınmış asgari bir sonuç setini tanımlamak üzere çekirdek sonuç seti (COS) kavramı önerilmiştir (Moza ve ark., 2015). Bu yaklaşım, farklı çalışmalar arasında araştırma sonuçlarının tutarlılığını ve karşılaştırılabilirliğini artırmayı amaçlamaktadır. Farklı klinik çalışmalar ve sistematik metaanalizler değerlendirilirken metodların ve sonuçların standartlaştırılması, çalışma bulgularının raporlanmasına yönelik kapsamlı ve şeffaf bir yaklaşım sunar (Clarke, 2007).

Çalışma sonuçlarının bütünlüğünün sağlanması, araştırma gönüllülerinin haklarının ve refahının korunması ve kamuoyunun bilim camiasına olan güveninin sürdürülmesi, klinik araştırmalarda etik davranışla mümkün olmaktadır. Klinik araştırmalara yönelik etik kılavuzlar, tıbbi bilgiyi geliştirme ve hasta tedavisini iyileştirme amacı ile bireylere saygı, yararlılık ve adalet gibi temel idealleri uzlaştırmak üzere tasarlanmıştır. Etik kurullar, çalışma gönüllülerinin korunmasında ve etik normların sürdürülmesinde görev yaparlar. Klinik araştırmalardan elde edilen bulguların tüm popülasyona uyarlanabilmesini sağlamak için, bu kurullar söz konusu araştırmaların risk-yarar oranını değerlendirerek karar verirler (Mahuli ve ark., 2017).

Etik bir klinik araştırmanın temel bileşeni bilgilendirilmiş onamdır. Gönüllülerin çalışmalara katılmanın avantaj ve dezavantajları konusunda tam olarak bilgilendirilmesini güvence altına alır. Bilgilendirilmiş onam, randomize kontrollü çalışmaların (RKÇ) planlanmasına ve yürütülmesine rehberlik eden temel bir etik ön koşul olup klinik yarar ile riskler arasındaki dengeyi gönüllüye açık olarak sunduğu ve onun bu riskleri anlayarak klinik çalışmaya katıldığından emin olduğu bir yöntemdir (Miller, 2018). Etik hususların önemli bir yönü de çocuklar, hapsedilmiş bireyler ve yoksul ülkelerde yaşayanlar gibi hassas gruplarla yapılan klinik araştırmaların sonuçlarının değerlendirilmesidir. Özellikle dezavantajlı grupları içeren çalışmalarda, hasta bilgilendirme broşürünün ve bilgilendirilmiş onay formunun katılımcı tarafından net olarak anlaşıldığının ve kabul edildiğinin gösterilmesine dikkat edilmelidir.

Klinik araştırmalar daha küresel hale geldikçe, birçok farklı ülkedeki ve sağlık sistemindeki gönüllüleri korumak için dikkatle değerlendirilmesi gereken yeni etik ve bilimsel kaygılar

ortaya çıkmıştır. Klinik araştırmaların etik açıdan değerlendirilmesi için standartların, eğitim ve gözetim şartlarının ulusal ve uluslararası düzeyde uyumlaştırılması gerekmiştir. Bu nedenle klinik araştırmalar üzerinde çalışan araştırmacıların, araştırma etiği, araştırma projelerinin tasarımı ve yürütülmesi konularında aldığı eğitimlerin standardizasyonuna çalışılmıştır (Ateudjieu ve ark., 2022). Buna ek olarak, Avrupa'daki etik kurulların, klinik araştırmalarla, araştırmalara katılan çocukların korunmasını teşvik etmek için etik düzenlemelerin diğer ülkeler ile koordineli bir şekilde yürütülmesi amacı ile ek düzenlemeleri bulunmaktadır.

Görüldüğü gibi çalışma bulgularının bütünlüğünün korunması, araştırma katılımcılarının haklarının ve refahının sağlanması ve kamuoyunun bilime olan güveninin artırılması, klinik araştırmalarda etik kavramının geliştirilmesine, standardizasyonuna ve uygulanmasına bağlıdır. Klinik araştırmaların etik ve bilimsel bir şekilde yürütülmesi gereğinin ortaya çıkması iyi klinik uygulamaları (GCP) sistemini ön plana çıkarmıştır (Vijayanathan ve Nawawi, 2008), GCP; klinik araştırmaların planlanması, yürütülmesi, performansı, izlenmesi, denetlenmesi, belgelenmesi, analizi ve raporlanmasının kalitesini ve bütünlüğünü garanti altına almak amacı ile geliştirilen uluslararası bir standarttır. Klinik araştırmaları yürütmek için gerekli olan etik standartları ve bilimsel bütünlüğün ancak GCP kriterlerine uyulması ile mümkün olacağı genel olarak kabul edilmektedir (Grimes ve ark., 2005). Bu nedenle, katılımcı güvenliğine yönelik katı GCP kılavuzu ilkelerinin araştırmacılar tarafından izlendiğinin takip edilmesi amacıyla klinik araştırmaların çalışma alanlarında GCP kriterlerine göre değerlendirilmesi ve denetlenmesi yapılmaktadır.

GCP eğitimleri klinik araştırma yürütme standardının iyileştirilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Klinik araştırmanın ahlaki ve bilimsel kavramları daha iyi anlaşılması için araştırma personelinin ve araştırma sponsorlarının GCP eğitimini almasına ve daha iyi GCP eğitiminin geliştirilmesine ilişkin çalışmalar sürmektedir (Swezey ve ark., 2020).

2. KLİNİK ARAŞTIRMALARIN GELİŞİMİ VE ARAŞTIRMA ETİĞİ

Çalışma tasarımlarının farklılaşmasının, tedavi yaklaşımlarındaki değişimlerin ve bölgesel özelliklerin klinik araştırmaların gelişimi etkilediğini göstermektedir. İnsan klinik araştırmaları tarihsel süreçte gelişen ve yüzyıllar boyunca giderek ilerleyen çok yönlü bir kavramdır. Batılı kaynaklarda modern klinik araştırmaların ve deneysel tıbbın köklerinin Rönesans'ta başladığına dair baskın bir görüş olsa da, farklı kültürlerden ve tarihsel dönemlerden gelen katkıların da önemi bulunmaktadır. Yapılan araştırmalar klinik araştırma metodolojisinin Orta Çağ İslam tıbbına kadar uzandığını göstermekte ve klinik araştırma metodolojisinin gelişiminde daha geniş bir tarihsel köken olduğunu ortaya koymaktadır. İnsan klinik araştırmalarının ortaya çıkışı ve gelişimi, insan topluluklarında yeni hastalıkların ortaya çıkma potansiyeline katkıda bulunan insan ve vahşi hayvan ekolojilerinin artan örtüşmesi de dâhil olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilenmiştir. Bu durum, ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklara yönelik klinik araştırmalara duyulan ihtiyacın, ekolojik ve epidemiyolojik faktörler ile de bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır. Sonuç olarak, insan klinik araştırmalarının ortaya çıkış ve gelişim tarihi, çeşitli kültürel, bilimsel ve düzenleyici kuralların gelişmesi ile ilerleyen bir süreçten oluşmaktadır. Ortaçağ İslam tıbbından klinik araştırmaların küreselleşmesine kadar, klinik araştırmaların tarihsel gelişimi bilimsel ilerleme, etik hususlar ve halk sağlığı zorunluluklarının dinamik etkileşimini ile günümüze kadar ulaşmıştır.

Klinik araştırmaların gelişim sürecine paralel olarak araştırma etiği kavramı üzerinde de çalışmalar ve tartışmalar başlamış ve etik kılavuzların geliştirilmesi gereği ortaya çıkmıştır. Etik kılavuzlar, farklı araştırma yöntemlerinin, etik çatışmaların ve klinik araştırmalarda ortaya çıkan zorlukların, dinamik, duyarlı ve etik bir çerçevede çözümünü sağlamıştır. Etik kılavuzların evrimi, araştırmanın etik bir şekilde yürütülmesini ve insan gönüllülerin korunmasını sağlamak için kılavuzların harmonize edilmesini, iyileştirilmesi ve uyarlanmasıyla belirginleşmiştir. Bu kılavuzlar, farklı araştırma alanları için ayrı kılavuzların formüle edilmesi de dâhil olmak üzere önemli dönüm noktalarına sahne olmuştur. Örneğin; Klinik Araştırmalar için Etik Kılavuzlar başlangıçta; 2001’de İnsan Genomu/Gen Analizi Araştırmaları için Etik Kılavuzlar, 2002’de Epidemiyolojik Araştırmalar için Etik Kılavuzlar ve 2003’te Klinik Araştırmalar için Etik Kılavuzlar olmak üzere üç ayrı kılavuz olarak geliştirilmiştir: (Eba & Nakamura, 2022). Kılavuzların bu şekilde tanımlanması, tıbbi ve biyolojik araştırmaların farklı alanlarındaki o alana özel etik hususlarından ve metodolojik gerekliliklerinden kaynaklanmıştır.

Etik kılavuzların geliştirilmesi, klinik araştırma protokollerindeki advers olayların tespit edilmesi, raporlanması ve araştırılmasının iyileştirilmesi ihtiyacından da etkilenmiştir (Ebile ve ark., 2015). Etik kılavuzların gelişimi sürecinde, klinik araştırmaların değişen türlerini ele almak için mevcut kılavuzların birleştirilmesi ve iyileştirilmesine de çalışılmaktadır. Örneğin, Japonya’da önceki etik kılavuzların “İnsan Denekleri İçeren Tıbbi ve Biyolojik Araştırmalar için Etik Kılavuz” olarak birleştirilmesi, çağdaş araştırma uygulamalarına uyum sağlamak için etik çerçeveleri düzenleme ve güncelleme çabalarını göstermektedir (Maeda, 2022).

Son yıllarda ortaya çıkan COVID-19 pandemisi ile mevcut etik kılavuzlarındaki ve uluslararası düzenlemelerdeki eksiklikler belirginleşmiştir. Bu nedenle uluslararası kurumlar, klinik araştırmalarda adil ve eşitlikçi gönüllü seçimini desteklemek için eşzamanlı yeni etik kılavuzlar önermiş ve ortaya çıkan kılavuzların halk sağlığı sorunlarını ele alma ve araştırmaların eşitlikçi bir şekilde yürütülmesini sağlaması konusunda çalışmalar yapmışlardır.

3. İYİ KLİNİK UYGULAMALARI (GCP) ANLAMAK

Klinik araştırmalarda standartlaştırılmış uygulamaların kritik olduğunun ortaya çıkışı, İyi Klinik Uygulamaların (GCP) hayata geçirilmesini gerektirmiştir. GCP kılavuzları, Helsinki Bildirgesi’nde belirtilen ilkelerle uyumlu olarak, insan gönüllüleri içeren araştırmalar için etik ve bilimsel bir kalite standardı oluşturmak üzere geliştirilmiştir (Vijayanathan ve Nawawi, 2008).

3.1. GCP’nin Tanımı ve İlkeleri

“İyi klinik uygulamalar” (GCP) terimi, gönüllülerin güvenliğini ve üretilen bilgilerin güvenilirliğini garanti altına alan kalite sistemi oluşturulmasına yönelik ahlaki ve bilimsel kriterler bütününü ifade etmektedir (Mentz ve ark., 2016). Günümüzde gönüllü güvenliğini ve refahını korumak amacıyla bu kılavuzun ilkeleri, insanların katıldığı modern klinik araştırmalar için temel esastır. GCP, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı’na (ICH) göre klinik araştırmaların planlanması, yürütülmesi, izlenmesi, denetlenmesi, belgelenmesi, analizi ve raporlanması için bir standarttır. Bu standartlara uyulmasını sağlamak için, klinik araştırmaları yürüten tüm araştırmacıların ve çalışma koordinatörlerinin GCP kavramlarını anlaması ve değişen koşullara adaptasyonu için sık sık eğitim alması zorunludur.

Bilgilendirilmiş onam formu, GCP'nin temel taşlarından biridir ve araştırmaya katılanların çalışmanın niteliği, olası riskleri ve faydaları ile gönüllü hakları konusunda doğru şekilde bilgilendirilmesini garanti altına almak için gereklidir (Swezey ve ark., 2020). Bu nedenle GCP eğitimi, etik ve bilimsel standartlara uygun onay formlarının nasıl hazırlanacağına ve gönüllülerin formları daha iyi anlamasına yönelik uygulamalı talimatlar içermektedir. Yaşamı tehdit eden, hastaneye yatmayı gerektiren, kronik veya önemli bir sakatlığa neden olan veya gönüllüyü tehlikeye atan herhangi bir olumsuz tıbbi olay, ICH-GCP tarafından ciddi bir advers olay olarak sınıflandırılmaktadır. Araştırmacı tarafların, çalışma gönüllülerini korumak için advers olaylara dikkat etmesi ve bunları GCP yönergelerine uygun olarak rapor etmesi gerekmektedir. Bu raporlama sistemi ve benzer kritik bilgiler GCP eğitimlerinin temel konuları olup düzenleyici kurumlar ve sponsorlar, araştırmacıların GCP ilkeleri konusunda eğitim almasını ve sertifikasyonunu zorunlu tutmaktadır (Bechtel ve ark., 2020). ABD, Japonya ve AB'deki düzenleyici kurumlar tarafından denetlenen bu eğitimler, klinik araştırmaların etik şekilde yürütülmesini ve etkinliğini garanti altına almak için gereklidir (Bechtel ve ark., 2020). GCP ilkeleri geleneksel klinik araştırmaların yanı sıra pragmatik klinik araştırmalarda da uygulanmaktadır (Mentz ve ark., 2016). Buna ek olarak GCP ilkeleri yalnızca ilaç klinik araştırmaları için değil, aynı zamanda tıbbi cihazların geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için de geçerlidir.

Özetle, GCP gönüllüleri içeren klinik araştırmaların ahlaki ve bilimsel bütünlüğünün korunması açısından kritik öneme sahiptir. Klinik araştırmaların planlanması, yürütülmesi ve raporlanması için bir ölçüt oluşturarak gönüllü güvenliğine, bilgilendirilmiş onama ve istenmeyen olayların yakından gözlemlenmesine önem verir. GCP eğitimi, araştırmacılar ve çalışma koordinatörleri için bu ilkelere uyumu sağlamak ve klinik araştırmanın kalitesini ve güvenilirliğini korumak için zorunludur.

3.2. Uluslararası Kılavuzlar ve Yönetmelikler

Uluslararası İyi Klinik Uygulamalar (GCP) kılavuzları ve düzenlemeleri, dünya çapında yürütülen klinik araştırmaların etik ve bilimsel kalitesinin sağlanmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu standartlara uyulması, insan gönüllülerin korunması ve klinik araştırmalarda üretilen verilerin güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır (Nguyen ve ark., 2021). Klinik araştırma standartlarının belirlenme, yenileme sürecine dış paydaşların katılmasını sağlamak ve böylece GCP kılavuzlarının oluşturulması ve revize edilmesinde, Uluslararası Beşeri İlaçlar Teknik Gereklilikleri Uyumlaştırma Konseyi (ICH) rol almaktadır (Nakamura ve ark., 2021). ICH, kılavuzların farklı küresel koşulları yansıtmasında, güncel ve etkili kalmasını sağlamak için işbirlikçi ve kapsayıcı bir yaklaşım ile çalışmaktadır. Bazı özel koşullar ülkeler arasında halen bulunsa da uluslararası kılavuzlar ve GCP düzenlemelerinin uyumlu hale getirilmesinde ICH-GCP'nin etkisi açıkça görülmektedir (Bollyky ve ark., 2010). GCP'nin uluslararası düzeyde uygulanmasını teşvik etmek için, kavramların bölgeler arasında tutarlı bir şekilde anlaşılması ve yorumlanması gerekli görülmektedir. Bu nedenle, farklı yetki alanlarında yürütülen klinik araştırmaların kalitesini ve bütünlüğünü sağlamak için GCP standartlarını küresel olarak uyumlaştırmaya yönelik harmonizasyon çalışmalarının sürekli olarak yapılmaktadır. Bu kılavuzlar, insan denekleri içeren araştırmaların etik ve bilimsel olarak yürütülmesine yönelik uluslararası bir standart olarak hizmet etmenin yanı sıra farklı araştırma ortamlarında uygulanabilir ve geçerli olmalıdır (Ravinetto, 2017). Bununla birlikte, mevcut ICH-GCP kılavuzlarına yönelik eleştirel bakış açıları da mevcut olup bunların etkinliğinin ve uygunluğunun devamını sağlamak için geliştirme çabaları devam etmektedir.

3.3. GCP'nin Temel Bileşenleri

İyi Klinik Uygulamaların (GCP) temel bileşenleri, klinik araştırmaların etik ve bilimsel olarak yürütülmesinin ayrılmaz bir parçası olan temel ilke ve standartları kapsar. Bu bileşenler, insan gönüllülerin korunmasını ve klinik araştırmalarda üretilen verilerin güvenilirliğini sağlamak için çok önemlidir. ICH, klinik araştırmaların tasarımı, yürütülmesi, performansı, izlenmesi, denetlenmesi, kaydedilmesi, analizi ve raporlanması için bir standart oluşturmak amacıyla bu temel bileşenleri tanımlamıştır (Vijayanathan ve Nawawi, 2008). GCP'nin yerel ve uluslararası standartlarına ve ilkelerine bağlılık, araştırmanın yürütüldüğü ülkenin ekonomik gelişmişlik durumuna bakılmaksızın, klinik araştırmaların etik ve bilimsel açıdan sağlam bir şekilde yürütülmesi için önemli bir gereklilik olarak kabul edilmektedir (Nguyen ve ark., 2021). GCP'nin temel bileşenleri proje yönetimi, teknik hususlar ve harici hususlar gibi çeşitli faktörleri kapsar. Bu bileşenler, yürütüldükleri özel koşullardan bağımsız olarak klinik araştırmaların kalitesini ve bütünlüğünü sağlamak için gereklidir. Bu bileşenleri Şekil 2' de görüldüğü gibi 13 başlıkta toplamak mümkündür (https://www.clinicalnet.com/wp-content/uploads/2022/04/13-Principles-of-Good-Clinical-Practice_NCB.pdf) ;

3.3.1. Etik

Klinik araştırmalar, kökeni Helsinki Bildirgesi'ne dayanan ve GCP ve geçerli düzenleyici gerekliliklerle tutarlı olan etik ilkelere uygun olarak yürütülmelidir.

3.3.2. Araştırmanın Riski ve Faydası

Bir araştırma başlatılmadan önce, öngörülebilir riskler ve sakıncalar, bireysel araştırma gönüllüsü ve toplum için beklenen faydaya karşı tartılmalıdır. Bir araştırma yalnızca beklenen faydaların riskleri haklı çıkarması durumunda başlatılmalı ve devam ettirilmelidir.

3.3.3. Araştırma Gönüllüsü

Deneklerin hakları, güvenliği ve refahı en önemli hususlardır ve bilimin ve toplumun çıkarlarından üstün olmalıdır.

3.3.4. Tıbbi Ürüne İlişkin Bilgiler

Bir Araştırma Ürününe ilişkin mevcut klinik olmayan ve klinik bilgiler, önerilen klinik araştırmayı desteklemek için yeterli olmalıdır.

3.3.5. Yüksek Kaliteli Araştırmalar

Klinik araştırmalar bilimsel açıdan sağlam olmalı ve açık, ayrıntılı bir protokolle tanımlanmalıdır.

3.3.6. Çalışma Protokolüne Uygunluk

Bir araştırma, önceden kurumsal inceleme kurulu (IRB)/bağımsız etik kurul (IEC) onayı/olumlu görüşü almış olan protokole uygun olarak yürütülmelidir.

3.3.7. Tıbbi Kararlar

Gönüllülere verilen tıbbi bakım ve gönüllüler adına alınan tıbbi kararlar her zaman nitelikli bir hekimin veya uygun olduğunda nitelikli bir dış hekiminin sorumluluğunda olmalıdır.

3.3.8. Deneme Personeli

Bir araştırmanın yürütülmesinde görev alan her bireyi, ilgili görevi/görevleri yerine getirebilecek eğitim, öğrenim ve deneyime sahip olmalıdır.

3.3.9. Bilgilendirilmiş Onam

Klinik araştırmaya katılmadan önce her denekten serbestçe verilen bilgilendirilmiş onam alınmalıdır.

3.3.10. Klinik Deneme Verileri

Tüm klinik araştırma bilgileri, doğru raporlanmasına, yorumlanmasına ve doğrulanmasına olanak sağlayacak şekilde kaydedilmeli, işlenmeli ve saklanmalıdır.

3.3.11. Gizlilik

Gönüllüleri tanımlayabilecek kayıtların gizliliği, geçerli düzenleyici gerekliliklere uygun olarak mahremiyet ve gizlilik kurallarına saygı gösterilerek korunmalıdır.

3.3.12. İyi Üretim Uygulamaları

Araştırma ürünleri geçerli iyi üretim uygulamalarına (GMP) uygun olarak üretilmeli, kullanılmalı ve saklanmalıdır. Onaylanan protokole uygun olarak kullanılmalıdır.

3.3.13. Kalite güvencesi

Araştırmanın her aşından kalitesini güvence altına alan prosedürlere sahip sistemler uygulanmalıdır.



Şekil 2. İyi Klinik Uygulamanın 13 İlkesi.

4. KLİNİK ARAŞTIRMALARDA ETİK

4.1. İnsan Deneylerinde Etik Kavramların Önemi

İnsan deneylerinde etik kavramlar, araştırma katılımcılarının korunması, güvenliği ve refahının sağlanmasının yanı sıra klinik araştırmanın bütünlüğünün ve güvenilirliğinin korunması açısından büyük önem taşımaktadır. İnsan deneylerini yöneten etik kurallar çerçevesi, klinik araştırmaların etik açıdan incelenmesi, gerekçelendirilmesi ve yürütülmesi için gerekli olan çeşitli temel bileşenleri kapsar.

Klinik araştırmalar bağlamında, araştırma gönüllülerine verilebilecek zararın sınırlandırılmasına yönelik etik zorunluluk temel bir husustur. Bu koşul, risklerin ve faydaların dikkatli bir şekilde değerlendirilmesinin yanı sıra, bir çalışmaya izin verme kararında temel etik hususlardan biri olan bilgilendirilmiş onamın sağlanmasını da içerir (Sulmasy D. 2021). Ayrıca, çalışmanın bilimsel geçerliliği ve risk değerlendirmesi, etik değerlendirmenin yürütülmesini sağlamak için kapsamlı bir inceleme ve gerekçelendirme gerektiren kritik etik konulardır.

Helsinki Bildirgesi'nde özetlenenler haklar ve ilkelere bağlı kalınması, klinik araştırmaların etik bir şekilde yürütülmesi için esastır. Bu ilkelere uyulması, araştırma katılımcılarının haklarının, güvenliğinin ve refahının korunmasını ve araştırmanın dürüstlük ve şeffaflıkla yürütülmesini sağlar (Zhou ve ark., 2011). Ek olarak özellikle plasebo kontrollü çalışmaların etik bir şekilde yürütülmesini sağlamak için özerkliğe ve körleştirmeye (hasta ve ilaç adayı ile ilgili bilgilerin gerektiğinde çalışmacı ve gönüllüden gizlenmesi) dikkat edilmesi gerekmektedir (Mollica ve ark., 2023).

4.2. Bilgilendirilmiş Onam Süreci

Bilgilendirilmiş onam, insan klinik araştırmalarında temel bir etik ve yasal gereklilik olmasının yanı sıra bireylerin özerkliğine saygı gösterilmesi ve araştırmaya gönüllü katılımlarının sağlanması için başlıca koşuldur. Bilgilendirilmiş onam süreci, potansiyel araştırma gönüllülerine kapsamlı bilgi sağlanmasını ve bu gönüllünün bir çalışmaya dâhil olma konusunda bilinçli bir karar vermesini amaçlar. Bilgilendirilmiş onam süreci, bireylerin araştırmanın doğasını, potansiyel risklerini ve faydalarını ve araştırma gönüllüsü olarak haklarını anlamalarını sağlar. Bu şeffaflık, taraflar arasında güveni teşvik etmek ve gönüllünün onay verdiği araştırmayı net bir şekilde anlamasını içermektedir.

Çocukların bilgilendirilmiş onam sürecine katılımı, çocukların yaşlarına ve olgunluklarına bağlı olarak durumlarına yönelik özel koşulların hazırlanmasını gerektirmektedir (Béranger ve ark., 2018). Bu nedenle, pediatrik popülasyonlardan bilgilendirilmiş onam almanın karmaşıklığını, durumu anlayabilme ve gönüllülüğü sağlamak için yaşa uygun yöntemler geliştirilmiştir. Benzer şekilde, kaynakları sınırlı ülkelerdeki klinik çalışmalarında bilgilendirilmiş onam uygulamasının zorlukları bulunmaktadır. Klinik çalışmaların ya da bilgilendirilmiş onam kavramının farklı bölgelerde farklı yorumları bulunabilmektedir. Bilgilendirilmiş onam sürecini etkileyen kültürel ve bağlamsal bu farklılıklar, gönüllülerde klinik çalışmanın gerekliliğini anlayabilme ve gönüllülük için zorluklar ortaya çıkarabilmektedir.

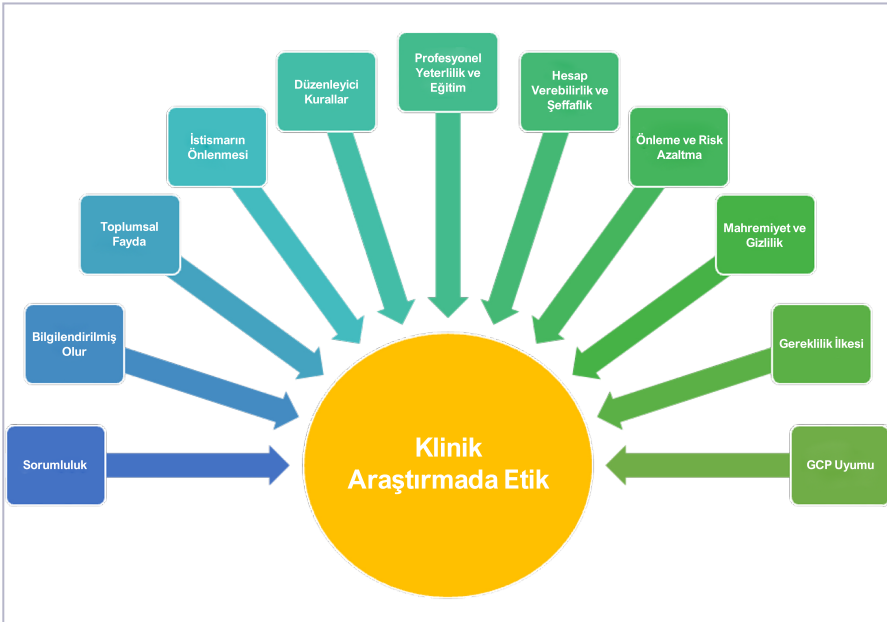
Sonuç olarak, insan deneylerinde bilgilendirilmiş onam sürecinin şeffaflık, anlaşılabilirlik, gönüllülük ve farklı popülasyonlar için özel yaklaşımlar gibi temel bileşenleri bulunmaktadır. Bu bileşenler etik standartların korunması, şeffaflık, bireylerin özerkliğine saygı gösterilmesi ve araştırmaya gönüllü katılımının sağlanması için gereklidir. Bununla birlikte, çeşitli klinik araştırma ortamlarında

gerçek bilgilendirilmiş onamın elde edilmesiyle ilgili zorlukların ve karmaşıklıkların çözümü için çalışmalar devam etmektedir.

4.3. İnsan Haklarının ve Refahının Korunması

İnsan deneylerinde insan haklarının ve refahının korunması, etik klinik araştırmanın ve gönüllülerin güvenliğini, özerkliğini ve saygınlığını sağlamak için kritik bir konudur. Bu nedenle araştırmacıların ve kurumsal inceleme kurullarının (IRB'ler) araştırma katılımcılarının haklarını ve refahını korumaya yönelik etik yükümlülükleri bulunmaktadır. Bu yükümlülükler arasında bilimsel titizlik, sosyal hesap verebilirlik ve bireysel katılımcıların haklarına ve refahına saygı öne çıkmaktadır. Bu durum, klinik deneyler ve sağlık araştırmaları bağlamında yaşlı yetişkinler de dâhil olmak üzere farklı hasta gruplarının özel hassasiyetlerinin ve haklarının ele alınmasını gerektirmektedir. Ayrıca, klinik araştırma metodolojilerinin gelişimi ve yeni deneme tasarımlarının gündeme girmesi ile farklı etik zorunluluklar da ortaya çıkmıştır. Örneğin uyarlanabilir klinik araştırmaların (UAK) etik etkileri ile randomize kontrollü araştırmaların (RKKÇ) farklı etik yönleri bulunabilir. Bu nedenle yenilikçi araştırma yöntemlerinin tasarımında ve yürütülmesinde etik hususların durumunun yeniden değerlendirilmesi gerekmektedir.

Tıp eğitiminin insan hakları ve sosyal adalet anlayışını geliştirmedeki etkinliği giderek artmaktadır. Tıp eğitimine insan hakları ilkelerinin temel entegrasyonu sağlanarak, sağlık hizmetleri ve klinik araştırmalarda etik sorumluluklara ilişkin bütüncül bir anlayış geliştirmek amaçlanmaktadır. Bu amaçla klinik araştırmalarda etik kuramının temelini oluşturan kavramların olgunlaştırılması sağlanmaktadır (Şekil 3). Bu durum, geleceğin sağlık çalışanları arasında etik farkındalığın ve insan hakları konularına duyarlılığın geliştirilmesinde eğitimin önemini vurgulamaktadır.



Şekil 3. Klinik araştırmalarda etik kuramının temelini oluşturan kavramlar.

5. KLİNİK ARAŞTIRMALARIN AŞAMALARI

5.1. Klinik Araştırma Aşamalarına Genel Bakış

Klinik araştırmalar, ilaçlar, tıbbi cihazlar ve tedavi protokolleri de dahil olmak üzere yeni müdahalelerin güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için gereklidir. Bu denemeler, her biri araştırma ve geliştirme sürecinde belirli amaçlara hizmet eden farklı aşamalarda yürütülür.

Faz 0 Klinik Araştırmalar

Keşif denemeleri olarak da bilinen Faz 0 denemeleri, bir ilaç adayının farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini keşfetmek için az sayıda gönüllüye araştırma ürününün subterapötik dozlarının uygulanmasını içerir. Bu denemeler, bileşiğin vücut içindeki davranışı ve potansiyel etkileri hakkında ilk insan verilerini sağlamayı amaçlamaktadır. Klinik geliştirmenin resmi bir aşaması olmamakla birlikte, faz 0 çalışmaları daha ileri aşamalara geçme kararını gösterir ve sonraki denemelerin tasarımını optimize etmeye yardımcı olur (Mahan, 2014).

Faz I Klinik Araştırmalar

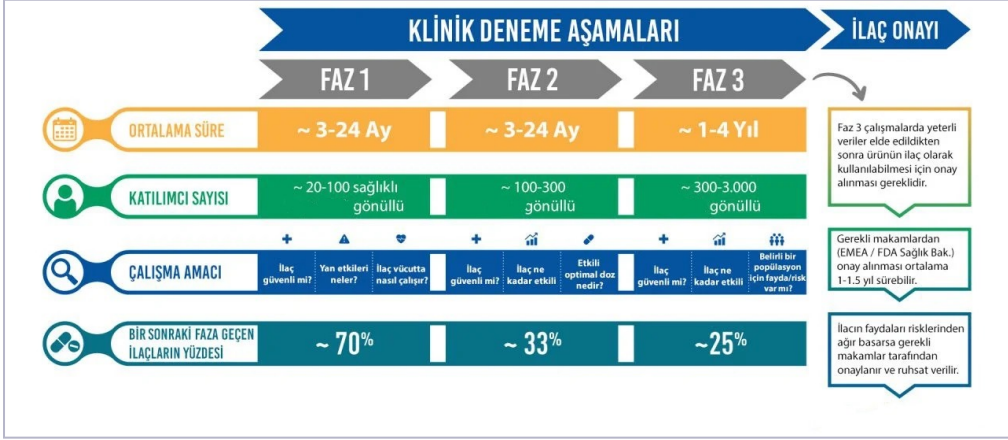
Faz I denemeleri öncelikle araştırma ürününün az sayıda sağlıklı gönüllüde veya hedef durumu olan bireylerde ilaç adayının güvenliğini, tolere edilebilirliğini ve farmakokinetiğini değerlendirmeye odaklanır. Bu denemeler maksimum tolere edilen dozu, doz sınırlayıcı toksisiteleri ve müdahalenin başlangıçtaki güvenlik profilini belirlemeyi amaçlamaktadır. Ek olarak, faz I denemeleri etkinliğin ön kanıtlarını gösterebilir ve sonraki çalışmalar için doz seçimi konusunda bilgi verebilir (Paluri ve ark., 2020).

Faz II Klinik Araştırmalar

Faz II çalışmaları hedef hastalığa sahip daha geniş bir gönüllü grubunu içerir ve müdahalenin güvenliğini ve etkinliğini daha fazla değerlendirmeyi amaçlar. Bu denemeler, müdahalenin terapötik etkinliğine dair ön kanıtlar sağlar ve daha büyük, daha kesin sonuçlar veren faz III çalışmalarının tasarımı için bilgi üretir. Faz II denemeleri, müdahalenin etkinliğini optimize etmek için farklı dozaj rejimlerini ve hasta popülasyonlarını da araştırabilir (Chen ve ark., 2021).

Faz III Klinik Araştırmalar

Faz III çalışmaları, daha büyük ve daha çeşitli bir hasta popülasyonunda müdahalenin güvenliğini ve etkinliğini belirlemede çok önemlidir. Bu çalışmalar, faz II'de gözlemlenen etkinliğin ön kanıtlarını doğrulamak ve müdahalenin güvenlik profilini daha fazla değerlendirmek için tasarlanmıştır. Faz III denemeleri genellikle randomize, kontrollü çalışma tasarımlarını içerir ve ruhsat başvurularını desteklemek ve klinik uygulamaları genişletmek için gereklidir (Fogel, 2018).



Şekil 4. Klinik denemelerdeki fazların özellikleri.

Kaynak: <https://www.fda.gov/patients/drug-development-process/step-3-clinical-research>

Faz IV Klinik Araştırmalar

Pazarlama sonrası gözetim çalışmaları olarak da bilinen Faz IV çalışmaları, ilacın ruhsatlandırma onayından sonra ve tedavinin gerçek dünya ortamlarında uzun vadeli güvenliğini ve etkinliğini izlemek için yürütülür. Bu çalışmalar nadir advers olayları, müdahalenin standart tedavilerle karşılaştırmalı etkinliğini ve uzun vadeli sonuçları belirlemeyi amaçlamaktadır. Faz IV çalışmaları, klinik karar verme ve düzenleyici eylemlere rehberlik etmek için veriler sağlar (Fogel, 2018).

Klinik araştırmaların aşamaları, yeni bir tıbbi müdahalenin güvenlik ve etkinliğinin değerlendirilmesine yönelik sistematik bir yaklaşım yöntemi oluşturmaktadır. Her aşama farklı hedeflere hizmet eder ve müdahalenin o faza özel amaçlarının kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunur. Her bir fazın farklarını anlamak, klinik araştırmaların etik ve bilimsel bir şekilde yürütülmesini ve araştırma bulgularının klinik uygulamaya dönüştürülmesini sağlamak için araştırmacılar, klinisyenler ve düzenleyici makamlar için çok önemlidir.

5.2. Her Aşamada GCP Uygulaması

İyi Klinik Uygulamalar (GCP) ilkelerinin uygulanması, insan araştırmalarında klinik araştırmaların her aşamasının ayrılmaz bir parçasıdır ve araştırmaların tasarımı, yürütülmesi ve raporlanmasında etik ve bilimsel kaliteyi amaçlar.

Klinik araştırmaların planlanması ve başlatılmasına rehberlik etmede GCP'nin araştırmacının başlangıcından itibaren etik ve bilimsel standartlara uyulması ile ilgili koşulları bulunmaktadır. Bu nedenle GCP kılavuzları klinik araştırmaların ilk aşamasından itibaren, araştırmacılar, sponsorlar, gözlemciler ve kurumsal inceleme kurulları (IRB'ler) için etik ve bilimsel bir kalite standardı görevi görmektedir (Mentz ve ark., 2016). Klinik araştırmalar ilerledikçe, araştırmaların kaliteli bir şekilde yürütülmesini ve verimliliğini sağlamak için uyulması zorunlu GCP kuralları olduğu, klinik araştırmacı eğitimden başlayarak araştırmacının tüm süresince önemle vurgulanmaktadır. Ayrıca, GCP uygulaması, özellikle uluslararası araştırmalar bağlamında, klinik araştırmacıların

değerlendirilmesini de kapsamaktadır. Klinik araştırmaların ileri aşamalarında da, araştırma verilerinin kapsamlı bir şekilde izlenmesi, denetlenmesi, kaydedilmesi, analiz edilmesi ve raporlanması böylece müdahalelerin tedavi seçeneği haline gelmesini sağlamak için çok önemlidir.

6. VERİ BÜTÜNLÜĞÜNÜN SAĞLANMASINDA GCP'NİN ROLÜ

Klinik araştırmalarda veri bütünlüğü, çalışma süreci boyunca toplanan verilerin doğruluğunu ve güvenilirliğini sağlayan çok önemli bir husustur. Sonuçların geçerliliğini tehlikeye atabilecek her türlü yetkisiz değişiklik veya müdahaleyi önlemek için verilerin doğruluğunu, tutarlılığını ve güvenliğini korumayı içerir (Nugent ve ark., 2016). Bu amaçla geliştirilen Blockchain teknolojisi, klinik deneylerde veri bütünlüğünü geliştirmek için önerilmektedir. Blockchain akıllı sözleşmeleri kullanarak veri şeffaflığı geliştirebilir, araştırmacıların, doktorların ve hastaların çalışma verilerine erişmesine olanak tanıyabilir ve böylece sürece daha fazla güven kazandırabilir (Nugent ve ark., 2016). Blockchain'in klinik deneylerde uygulanması, hastalar ve klinik araştırmacılar arasındaki etkileşimleri kolaylaştırmakta ve doğrulamakta, olumsuz olay raporlamasını hızlandırmakta ve kötü niyetli saldırıları test ederek veri bütünlüğünü geliştirmektedir. Ayrıca, blockchain teknolojisi sayesinde tekrarlanabilirlik, veri paylaşımı, gizlilik endişeleri ve klinik araştırmalara hasta kaydı gibi zorluklar çözülebilmekte ve böylece klinik araştırmanın genel kalitesi artırılmaktadır (Benchoufi ve Ravaud, 2017).

İyi Klinik Uygulamaları (GCP), klinik araştırmalardan elde edilen verilerin bütünlüğünü ve güvenilirliğini sağlamada çok önemli bir rol oynar. FDA ve EMA gibi düzenleyici otoriteler, küresel klinik araştırmalarda veri bütünlüğünü doğrulamak ve çalışmayı verilere dayalı olarak yeniden yapılandırmak için GCP denetimleri gerçekleştirir. GCP'nin temel hedeflerinden biri, deneye katılan deneklerin haklarını, bütünlüğünü ve gizliliğini korumak ve onların güvenliğini sağlamak, ayrıca verilerin ve rapor edilen sonuçların güvenilirliğini garanti etmektir (Brosteanu ve ark., 2017).

Klinik araştırmalarda uyarlanabilir tasarım yöntemleri, araştırma verilerinin geçerliliğinin ve bütünlüğünün korunmasında önem kazanmıştır. Karmaşık uyarlamalarla veri bütünlüğünü korumak için bağımsız bir veri izleme komitesinin (IDMC) kurulması şiddetle tavsiye edilmektedir. IDMC'ler, özellikle kardiyovasküler ve kardiyometabolik hastalıklarda yapılan klinik araştırmaların bilimsel bütünlüğünün korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, Uluslararası Uyumlaştırma Konseyi (ICH), yerinde yapılan ve merkezi izlemeyi birleştiren izleme stratejisine odaklanarak, risk bazlı metodolojiyi de önceleyen bir kalite yönetimi sistemini ön plana çıkarmaktadır. Bu yaklaşım, veri bütünlüğünün GCP ilkeleriyle uyumlu karma bir izleme yöntemi aracılığıyla desteklenmesini sağlar.

6.1. Veri Toplama ve Veri Yönetimi

Klinik araştırmalarda veri toplama ve değerlendirme, toplanan verilerin doğruluğunu, güvenilirliğini ve bütünlüğünü sağlamak amacıyla titizlikle yürütülür. Bu süreçleri kolaylaştırmak için çeşitli metodolojiler ve teknolojiler kullanılabilir. Klinik araştırmalarda veri toplamanın kritik bir yönü, toplanan verilerin sistematik olarak sınıflandırılmasını içerir. Bu amaçla hazırlanan birçok farklı

kayıt sistemi, veri toplama, süreçleri optimize etme ve kaynak tahsisi sırasında kullanılan kaynakları ölçmek ve verileri kategorize etmeyi kolaylaştırmaktadır (Crowley ve ark., 2020). Klinik çalışmalar ile elektronik veri toplama yöntemlerinin entegrasyonu, özellikle klinik sonuç değerlendirme verilerinin toplanması için klinik araştırmalarda popülerlik kazanmıştır. Özellikle hasta tarafından bildirilen son noktalar için elektronik veri yakalamaları bu sistemlerin avantajlarıdır (Fleming ve ark., 2015). Elektronik veri yakalama, yalnızca veri toplamayı kolaylaştırmakla kalmayıp, aynı zamanda verinin doğruluğunu ve güvenliğini de sağlayarak çalışmanın verilerinin genel bütünlüğünü artırır.

Verinin bütünlüğünü ve güvenilirliğini sağlamak amaçlı yapılan en önemli uygulamalardan birisi de laboratuvar sonuçlarını, klinik veri değerlendiricilerini, veri yöneticilerini ve istatistikçileri sonuç değerlendirmesi sırasında körleştirmektir. Bu yöntem veri analizindeki önyargıyı en aza indirmek için çok önemlidir (Guo ve ark., 2022). Körleme prosedürleri, veri yorumunu etkileyebilecek önyargıları önleyerek araştırma sonuçlarının objektifliğini ve güvenilirliğini artırır.

Klinik araştırmalarda verilerin geçerliliğini, güvenilirliğini ve genellenebilirliğini sağlamak açısından çok önemli diğer bir husus ise veri toplamada randomizasyon (rastgelelik) olarak bilinmektedir. Gönüllülerin farklı tedavi gruplarına rastgele atanması, 50 yılı aşkın süredir denemelerde başarıyla kullanılan temel bir yöntemdir. Bu yöntem, seçim yanlılığının en aza indirilmesi, tedavi grupları arasında karşılaştırılabilirliğin sağlanması ve çalışmanın istatistiksel gücünün artırılması dâhil olmak üzere birçok önemli avantaj sunmaktadır (Moher ve ark., 2010).

Rastgele kontrollü çalışmalarda kohortların ve rutin olarak toplanan verilerin kullanılması araştırma süreçlerini kolaylaştırabilir, maliyetleri azaltabilir. Rastgeleleştirmeyi mevcut veritabanlarıyla birleştiren bu hibrit modeller, klinik araştırmalarda hem metodolojik titizliğe hem de operasyonel verimliliğe ulaşmada umut verici bir yaklaşım ortaya koymaktadır (Loke, 2014).

6.2. İzleme ve Denetim Prosedürleri

Klinik araştırmalardaki izleme ve denetleme prosedürleri, İyi Klinik Uygulama (GCP) yönergelerine uygunluğun sağlanması, veri bütünlüğünün sürdürülmesi ve katılımcı güvenliğinin korunması açısından çok önemlidir. Bu prosedürler, kalite standartlarını ve düzenleyici gereklilikleri desteklemek için araştırmanın çeşitli yönlerinin sistematik gözetimini ve değerlendirilmesini içerir. Kaynak veri doğrulaması (SDV), vaka raporu formlarında kaydedilen verilerin orijinal kaynak belgelere göre doğrulanmasını içeren, klinik araştırmalarda kalite güvencesi için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir (Smith ve ark. (2012). Klinik araştırma izlemedeki bir diğer önemli yaklaşım ise “Riske uyarlanmış izleme”dir. Bu yöntem izleme faaliyetlerini farklı çalışma bileşenleriyle ilişkili risk düzeyine göre uyarlamayı amaçlamaktadır (Brosteanu ve ark., 2017). Bu strateji, veri kalitesini ve katılımcı güvenliğini korurken izleme prosedürlerinin etkinliğini optimize ederek kaynakların daha yüksek riskli alanlara verimli bir şekilde tahsis edilmesini sağlar.

Klinik araştırmaların güvenliğini ve veri bütünlüğünü denetlemek için klinik araştırmaların izlenmesinde görev alan Bağımsız Veri izleme komiteleri (IDMC’ler) kurulmuştur (Ellenberg ve ark., 2015). IDMC’ler, ara analizlerin yürütülmesinde, fayda-risk profillerinin değerlendirilmesinde ve araştırmaların etik olarak ve protokol gerekliliklerine uygun olarak yürütülmesinin sağlanmasında hayati bir rol oynamaktadır.

Bunlara ek olarak veri izleme ve denetimi ile ilgili GCP kuralları, sponsorlar tarafından yerinde izleme ve denetim yapılmasını, yazılı bilgilendirilmiş onam belgelerinin gerekliliğini, klinik araştırma ofislerinin kurulmasını, klinik araştırma koordinatörlerinin istihdamını ve kurumsal inceleme kurulunun (IRB) fonksiyonlarının güçlendirilmesini de içermektedir.

Klinik çalışmalarda Klinik Kalite Güvencesi (CQA) denetim programı, GCP kalite sisteminin temel bir yönüdür ve klinik araştırmalarda yüksek kalite standartların korunmasının önemini gösterir. Bu amaçla sponsorlar ve sağlık yetkilileri tarafından kalite uyumluluğunu kanıtlamak amacı ile sürekli olarak denetimler yapılmaktadır.

Araştırma verilerinin kalitesi, bütünlüğü ve güvenilirliğinin sağlanması, klinik araştırmalarda izleme ve denetim sistemlerinin uygulanmasına bağlıdır. İyi Klinik Uygulama (GCP) kılavuzlarına uyulması, araştırma sonuçlarının geçerliliği ve güvenilirliğinin yanı sıra araştırma katılımcılarının güvenliği ve haklarının korunmasını sağlamak için en büyük gerekliliktir.

7. DÜZENLEYİCİ MAKAMLAR VE GCP UYUMLULUĞU

Düzenleyici kurumlar, klinik araştırmaların etik ve bilimsel olarak yürütülmesinin denetlenmesi ve sağlanmasında hayati öneme sahiptir. Bu kurumlar, araştırma katılımcılarının haklarını, güvenliğini ve refahını korumaya yönelik standartların belirlenmesi ve uygulanmasının yanı sıra araştırma sonuçlarının bütünlüğünü ve güvenilirliğini sürdürmekten de sorumludur.

Düzenleyici kurumlar, koydukları kurallar bütünü ve yaptıkları denetimler ile klinik araştırmaların planlamasını, uygun bir şekilde yürütülmesini ve sonuçların güvenilir olmasını sağlar. Gönüllülerin çıkarlarını korumak ve araştırma bulgularının güvenilirliğini sürdürmek için çalışma protokollerinin gözden geçirilmesi ve onaylanması, çalışmanın ilerlemesinin izlenmesi ve İyi Klinik Uygulama (GCP) yönergelerine uygunluğun doğrulanması konusunda rol alırlar. Buna ek olarak düzenleyici kurumların görev ve yetkilerini tanımladığı Etik kurullar, klinik araştırmaların gözetiminde etkili olup, araştırmanın yürütülmesinde yer alan tüm bireylerin düzenlemelere uymasını ve çıkar çatışmalarını engellemede tam yetkilidir (Patel, 2017). Bu kurullar çalışma protokollerini inceler ve onaylar, risk-fayda oranını değerlendirir ve insan gönüllülerin yer aldığı araştırmalarda etik standartları desteklemek için bilgilendirilmiş onam sürecini denetler.

Düzenleyici kurumlar ayrıca klinik araştırmanın sponsor, monitör firma gibi her paydaşı için düzenleyici standartları kurgulayıp yayınlarak, klinik araştırmalarda şeffaflığı, hesap verebilirliği ve kalite güvencesini artırmayı ve araştırma sürecinin genel bütünlüğünü sürdürmeyi amaçlar. Bir klinik araştırmaya başlamadan önce, denemeyi tasarlamak, yürütmek, kaydetmek ve raporlamak için uluslararası etik ve bilimsel kalite standartları hakkında bilgi sahibi olmak, gerekli eğitimleri ve sertifikasyonları tamamlamak zorunludur (Paul ve ark., 2020). Düzenleyici kurumlar, araştırmaların bu standartlara uygunluğunu sağlamada, araştırmanın sorumlu bir şekilde yürütülmesini teşvik etmede ve gönüllü sağlığının ve refahının korunmasında koşulların en üst düzeyde sağlandığından emin olmak zorundadırlar.

8. GCP STANDARTLARI İÇİN ULUSLARARASI İŞBİRLİĞİ

Farklı ülkelerde bulunan düzenleyici kurumlar klinik araştırmaların düzenlemelerinde etik ve bilimsel bütünlüğünün sağlanmasında çok yönlü bir roller üstlenirler. Günümüzde yapılan klinik araştırmaların birçoğu farklı ülkelerde bulunan merkezlerin ve hekimlerin katılımı ile gerçekleşmekte ve uluslararası bir kapsam göstermektedir. Bu nedenle düzenleyici kurumlar, uluslararası işbirliğini ve uyumu kolaylaştırmak, mevzuat değişikliklerine uyum sağlayarak etik ve bilimsel standartları harmonize etmekten sorumludurlar. Bu sayede düzenleyici kurumlar, klinik araştırmalarda paydaşlarının klinik araştırmaların dinamik ortamına uyum sağlamasına ve gelişmesine destek olur.

Uluslararası işbirliği, GCP standartlarının küresel uyumlaştırılmasının teşvik edilmesinde de çok önemli bir rol oynamaktadır. Ulusal düzenleyici kurumların işbirliği sayesinde klinik araştırma için gönüllü kabulünün hızlanması ve kolaylaşması sağlanmakta olup bu durum farklı düzenleyici yetki alanları arasında GCP standartlarının uyumlaştırılması sayesinde ortaya çıkmaktadır (Dayan ve ark., 2021). Ek olarak uluslararası işbirliği ve uyumun, klinik araştırmalarda verilerin tutarlılığını ve kalitesini sağlamak için kilit bir rolü de bulunmaktadır. Bu gelişmeler özellikle riske dayalı izleme, saha yeterliliği ve klinik veri standartları kalitesini ve verimliliğini artırmaya odaklanmaktadır.

Son yıllarda ortaya konan uluslararası işbirliği çalışmaları, nadir hastalıklar ya da kanser klinik araştırmalarında uluslararası işbirliğinin umut verici potansiyelini ortaya koymuştur. Gelecekte bu işbirliğinin daha fazla dikkate alınmasının yeni ilaç gelişiminde umut verici olduğu anlaşılmaktadır (Valdivieso ve ark., 2015). Bu durum, uluslararası işbirliğinin klinik araştırmalarda bilgi alışverişini, kapasite geliştirmeyi ve ortak öğrenmenin teşvik edilmesinin önemini göstermektedir.

9. KLİNİK ARAŞTIRMALARIN GELECEK VİZYONU

Düzenleyici kurumlar, gelecekteki gelişimsel yöntemleri ve vizyonları etik ve bilimsel standartlarla uyumlu hale getirerek gelecekteki klinik araştırmaların sürdürülebilir olmasını ve toplumsal refaha odaklanarak etik ve şeffaf bir şekilde yürütülmesini sağlamakla görevlidir. Etik ve düzenleyici çerçevelere bağlı kalarak bu gelişmeleri benimsemek, kanıta dayalı tıbbın ilerlemesi ve sağlık kazanımlarının iyileştirilmesine çalışmak düzenleyici sorumlulukları arasında bulunur.

Klinik araştırmanın geleceği, yapay zekâ (AI) ile gözlemsel klinik araştırma tasarımlarının entegrasyonu yoluyla ilerlemektedir. Sağlık hizmetlerinde yapay zeka uygulamaları, veri izleme yöntemlerini dönüştürmekte ve büyük miktarda veriyi gerçek zamanlı olarak analiz ederek daha verimli klinik araştırmalara yol açabilir (Ozrazgat-Baslanti ve ark., 2021). Ek olarak, gözlemsel klinik araştırma tasarımlarının ve karmaşık klinik olayları incelemek için sağlık robotları gibi yenilikçi teknolojilerden yararlanılmasının veri toplamayı ve veri analizini kolaylaştırabileceği öngörülmektedir (Tanioka ve ark., 2021). Klinik araştırmanın geleceğinde, teşhis doğruluğunu, öngörücü analizi ve tedavi sonuçlarını geliştirmek için yapay zekâ (AI) teknolojilerinin klinik araştırmalara giderek daha fazla entegrasyonu yer almaktadır.

Yapay zekâ, özellikle tıbbi görüntülerin analizinde, tıbbi teşhis ve tahminde umut verici sonuçlar göstermekte ve potansiyel olarak invazif prosedürlere olan ihtiyacı azaltabilmektedir. Günümüzde klinik araştırmalarda AI müdahalelerinin titiz bir şekilde değerlendirilmesini sağlamak için, raporlamayı ve protokol geliştirmeyi standartlaştırmak amacıyla CONSORT-AI ve SPIRIT-AI

uzantıları gibi raporlama kılavuzları geliştirilmiştir (Liu ve ark., 2020). Bunlar gibi yapay zeka teknolojilerinin klinik araştırmalarda uygulanması, bu teknolojilerin sağlık sonuçları üzerindeki etkisini göstermek için etik ve bilimsel standartlara bağlı kalmayı gerektirmektedir. Yapay zeka tabanlı derin öğrenme programları özellikle oftalmoloji gibi tıbbi alanlarda önemli bir ilgi toplamış, gelişmiş teşhis doğruluğu ve tedavi planlamasına katkıları olabileceği düşünülmüştür (Ting ve ark., 2018).

Sonuç olarak, klinik araştırmaların geleceği, teşhis yeteneklerini, tedavi sonuçlarını ve hasta bakımını geliştirmek için sağlık müdahaleleri ile yapay zekâ teknolojilerinin stratejik entegrasyonunda yatmaktadır. Düzenleyici kurumlar, yapay zekâyı kullanan klinik araştırmaların etik davranışını ve bilimsel titizliğini sağlamada, böylece kanıta dayalı tıbbın ilerlemesinde ve sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesinde kritik bir rol oynamaktadır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Ateudjieu, J., Tchio-Nighie, K., Lekpa, F., Douanla, I., Dieumo, F., Ntsekendio, P., ... & Bissecq, A. Training needs of health researchers in research ethics in cameroon: a cross-sectional study. *BMC Medical Education*, 22(1). (2022).
- Baer, A., Michaels, M., Good, M., & Schapira, L. Engaging referring physicians in the clinical trial process. *Journal of Oncology Practice*, 8(1), e8-e10. (2012).
- Bashir, R. and Dunn, A. Systematic review protocol assessing the processes for linking clinical trial registries and their published results. *BMJ Open*, 6(10), e013048.. (2016).
- Batchelor, J., Chapman, A., Craig, F., Harman, K., Kirtschig, G., Martin-Clavijo, A., ... & Williams, H. Generating new evidence, improving clinical practice and developing research capacity: the benefits of recruiting to the u.k. dermatology clinical trials network’s stop gap and blister trials. *British Journal of Dermatology*, 177(5). (2017).
- Bechtel, J., Chuck, T., Forrest, A., Hildebrand, C., Panhuis, J., Pattee, S., ... & Swezey, T. Improving the quality conduct and efficiency of clinical trials with training: recommendations for preparedness and qualification of investigators and delegates. *Contemporary Clinical Trials*, 89, 105918. (2020).
- Benchoufi, M. and Ravaud, P. Blockchain technology for improving clinical research quality. *Trials*, 18(1). (2017).
- Béranger, A., Bouazza, N., Sigy, A., Foubert-Wenc, A., Davous, D., Aerts, I., ... & Chappuy, H. Parents’ and children’s comprehension and decision in a paediatric early phase oncology trial: a prospective study. *Archives of Disease in Childhood*, 104(10), 947-952. (2018).
- Bollyky Nguyen, Q., Nguyen, N., Nguyen, D., Vidaillac, C., Trinh, P., Doorn, H., ... & Vo, H. Development of a good clinical practice inspection checklist to assess clinical trial sites in vietnam. *BMJ Open*, 11(7), e048256. (2021).
- Brosteau, O., Schwarz, G., Houben, P., Paulus, U., Strenge-Hesse, A., Zettelmeyer, U., ... & Hasenclever, D. Risk-adapted monitoring is not inferior to extensive on-site monitoring: results of the adamon cluster-randomised study. *Clinical Trials*, 14(6), 584-596. (2017).
- Chen, C., Lou, N., Zheng, X., Wang, S., Chen, H., & Han, X. Trends of phase i clinical trials of new drugs in mainland china over the past 10 years (2011–2020). *Frontiers in Medicine*, 8. (2021).
- Clarke, M. Standardising outcomes for clinical trials and systematic reviews. *Trials*, 8(1). (2007).
- Comis, R., Miller, J., Aldigé, C., Krebs, L., & Stoval, E. Public attitudes toward participation in cancer clinical trials. *Journal of Clinical Oncology*, 21(5), 830-835. (2003).
- Crowley, E., Treweek, S., Banister, K., Breeman, S., Constable, L., Cotton, S., ... & Fernie, G. Using systematic data categorisation to quantify the types of data collected in clinical trials: the datacat project. *Trials*, 21(1). (2020).
- Dayan, I., Roth, H., Zhong, A., Harouni, A., Gentili, A., Abidin, A., ... & Li, Q. Federated learning for predicting clinical outcomes in patients with covid-19. *Nature Medicine*, 27(10), 1735-1743. (2021).

- Eba, J. and Nakamura, K. Overview of the ethical guidelines for medical and biological research involving human subjects in japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 52(6), 539-544. (2022).
- Ebile, A., Ateudjieu, J., Yakum, M., Djuidje, M., & Watcho, P. Assessing the detection, reporting and investigation of adverse events in clinical trial protocols implemented in cameroon: a documentary review of clinical trial protocols. *BMC Medical Ethics*, 16(1). (2015).
- Ellenberg, S., Culbertson, R., Gillen, D., Goodman, S., Schrandt, S., & Zirkle, M. Data monitoring committees for pragmatic clinical trials. *Clinical Trials*, 12(5), 530-536. (2015).
- Fleming, S., Barsdorf, A., Howry, C., O’Gorman, H., & Coons, S. Optimizing electronic capture of clinical outcome assessment data in clinical trials: the case of patient-reported endpoints. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 49(6), 797-804. (2015).
- Fogel, D. Factors associated with clinical trials that fail and opportunities for improving the likelihood of success: a review. *Contemporary Clinical Trials Communications*, 11, 156-164. (2018).
- Grimes, D., Hubacher, D., Nanda, K., Schulz, K., Moher, D., & Altman, D. The good clinical practice guideline: a bronze standard for clinical research. *The Lancet*, 366(9480), 172-174. (2005).
- Guo, G., Kong, Y., Zhu, Q., Wu, Z., Zhang, S., Sun, W., ... & Fang, M. Cerebral mechanism of tuina analgesia in management of knee osteoarthritis using multimodal mri: study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*, 23(1). (2022).
- Lei, H., Kim, B., Kim, K., & Kim, D. A permissioned blockchain-based clinical trial service platform to improve trial data transparency. *Biomed Research International*, 2021, 1-22. (2021).
- Liu, X., Rivera, S., Moher, D., Calvert, M., & Denniston, A. Reporting guidelines for clinical trial reports for interventions involving artificial intelligence: the consort-ai extension. *BMJ*, m3164. (2020).
- Loke, Y. Use of databases for clinical research. *Archives of Disease in Childhood*, 99(6), 587-589. (2014).
- Maeda, H. The current status and future direction of clinical research in japan from a regulatory perspective. *Frontiers in Medicine*, 8. (2022).
- Mahan, V. Clinical trial phases. *International Journal of Clinical Medicine*, 05(21), 1374-1383. (2014).
- Mahuli, A., Mahuli, S., Patil, S., & Bhandi, S. Institutional ethics committee regulations and current updates in india. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 18(8), 738-741. (2017).
- Mentz, R., Hernandez, A., Berdan, L., Rorick, T., O’Brien, E., Ibarra, J., ... & Peterson, E. Good clinical practice guidance and pragmatic clinical trials. *Circulation*, 133(9), 872-880. (2016).
- Miller, L., Folayan, M., Allman, D., Nkala, B., Kasirye, L., Mingote, L., ... & Ditmore, M. How ethical is your clinical trial?. *International Journal of Clinical Practice*, 64(9), 1179-1182. (2018).
- Moher, D., Hopewell, S., Schulz, K., Montori, V., Gøtzsche, P., Devereaux, P., ... & Altman, D. Consort 2010 explanation and elaboration: updated guidelines for reporting parallel group randomised trials. *BMJ*, 340(mar23 1), c869-c869. (2010).
- Mollica, A., Greben, R., Cyr, M., Olson, J., & Burke, M. Placebo effects and neuromodulation: ethical considerations and recommendations. *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques*, 50(s1), s34-s41. (2023).
- Moza, A., Benstoem, C., Autschbach, R., Stoppe, C., & Goetzenich, A. A core outcome set for all types of cardiac surgery effectiveness trials: a study protocol for an international edelphi survey to achieve consensus on what to measure and the subsequent selection of measurement instruments. *Trials*, 16(1). (2015).
- Nakamura, K., Ozawa, H., Shibata, T., Ushirozawa, N., Hata, T., Okita, N., ... & Yamamoto, H. Survey results and recommendations from japanese stakeholders for good clinical practice renovation. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*, 56(2), 220-229. (2021).
- Nguyen, Q., Nguyen, N., Nguyen, D., Vidailac, C., Trinh, P., Doorn, H., ... & Vo, H. Development of a good clinical practice inspection checklist to assess clinical trial sites in vietnam. *BMJ Open*, 11(7), e048256. (2021).
- Nugent, T., Upton, D., & Cimpoeșu, M. Improving data transparency in clinical trials using blockchain smart contracts. *F1000research*, 5, 2541. (2016).
- Ozrazgat-Baslantı, T., Loftus, T., Ren, Y., & Ruppert, M. Advances in artificial intelligence and deep learning systems in icu-related acute kidney injury. *Current Opinion in Critical Care*, 27(6), 560-572. (2021).
- Paluri, R., Liu, M., Anderson, A., Nandagopal, L., McArdle, T., Young, M., ... & Saleh, M. First-in-human phase 1 clinical trials – a single-center experience in the era of modern oncotherapeutics. *Scientific Reports*, 10(1). (2020).
- Patel, M. Misconduct in clinical research in india: perception of clinical research professional in india. *Journal of Clinical Research & Bioethics*, 08(03). (2017).
- Paul, B., Saha, I., Kumar, S., & Ghose, G. Clinical trial – an introduction to essential prerequisites. *Journal of Comprehensive Health*, 2(1), 57-64. (2020).

- Ravinetto, R. The revision of the ich good clinical practice guidelines: a missed opportunity?. *Indian Journal of Medical Ethics*, 2(4). (2017).
- Smith, C., Stocken, D., Dunn, J., Cox, T., Ghaneh, P., Cunningham, D., ... & Neoptolemos, J. The value of source data verification in a cancer clinical trial. *Plos One*, 7(12), e51623. (2012).
- Sulmasy, D. Are sars-cov-2 human challenge trials ethical?. *Jama Internal Medicine*, 181(8), 1031. (2021).
- Swezey, T., McGuire, F., Hurley, P., Panhuis, J., Goldstein, K., Chuck, T., & Corneli, A. More than a box to check: research sponsor and clinical investigator perspectives on making gcp training relevant. *Contemporary Clinical Trials Communications*, 19, 100606. (2020).
- Tanioka, T., Locsin, R., Betriana, F., Kai, Y., Osaka, K., Baua, E., ... & Schoenhofer, S. Intentional observational clinical research design: innovative design for complex clinical research using advanced technology. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(21), 11184. (2021).
- Thomas, R., Aitken, E., Antonelli, J., & Marson, L. How to set up a clinical trial. *Postgraduate Medical Journal*, 96(1139), 564-569. (2020).
- Ting, D., Pasquale, L., Peng, L., Campbell, J., Lee, A., Raman, R., ... & Wong, T. Artificial intelligence and deep learning in ophthalmology. *British Journal of Ophthalmology*, 103(2), 167-175. (2018).
- Valdivieso, M., Corn, B., Dancey, J., Wickerham, D., Horvath, L., Perez, E., ... & Blanke, C. The globalization of cooperative groups. *Seminars in Oncology*, 42(5), 693-712. (2015).
- Vijayanathan, A. and Nawawi, O. The importance of good clinical practice guidelines and its role in clinical trials. *Biomedical Imaging and Intervention Journal*, 4(1). (2008).
- Woodsong, C., MacQueen, K., Amico, K., Friedland, B., Gafos, M., Mansoor, L., ... & McCormack, S. Microbicide clinical trial adherence: insights for introduction. *Journal of the International Aids Society*, 16(1). (2013).
- Zhang, W. Blockchain-based solutions for clinical trial data management: a systematic review. *Metaverse Basic and Applied Research*. (2023).
- Zhou, H., Zhang, Y., Liu, L., Han, X., Tao, Y., Tang, Y., ... & Dong, Q. A prospective controlled study: minimally invasive stereotactic puncture therapy versus conventional craniotomy in the treatment of acute intracerebral hemorrhage. *BMC Neurology*, 11(1). (2011).



BÖLÜM 11

İLAC RUHSAT VE PATENTLENME SÜREÇLERİ

M. Kürşat DERİCİ^{1,*}

¹*Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, Etik, Ankara, Türkiye*

kursatderici@gmail.com

*Sorumlu Yazar: Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ



1. GİRİŞ

Avrupa İlaç Ajansı (EMA), ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) ya da bunların ülkemizdeki karşılığı olan Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TITCK) gibi düzenleyici kurumlar, yeni ilaçların pazara giriş onaylarının verilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Düzenleyici kurumların halk sağlığının korunmasındaki kritik rollerinden biri hastalara yalnızca etkili ve güvenli tedavilerin ulaşmasını sağlamaktır (Cox ve diğerleri, 2020). Bu nedenle ilaçların piyasaya sunulmasının ön koşulu olan ruhsatlandırma sürecinden önce ilaçların güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için gerekli koşullar bu düzenleyici kurumlar tarafından tanımlanır. Yeni ilaçlar için onay süreci, birincil son noktaların, etki mekanizmasının, dozlama bilgilerinin, uygulamanın, yan etkilerinin, saklama prosedürlerinin ve klinik araştırma verilerinin titiz bir şekilde değerlendirilmesini içerir (Jaiswal, 2018).

Ülkelerde bulunan düzenleyici kurumlar yeni ilaç dosyalarının incelemesi ve ilaç ruhsatlama işlemleri sırasında farklı yöntemler kullanabilmektedir. Bu durum ilaç dosyalarının içeriklerinin ya da onay süreci için geçen zaman konusunda farklılıklara neden olabilmektedir. Bazı özel şartlarda hastaların yeni ilaçlara erken erişimine izin vermek amacı ile, uzun vadeli kanıtların üretilmesini pazara giriş sonrasına erteleyen bir yöntem olarak “uyarlanabilir lisanslama kavramı” bulunmaktadır (Naci ve diğerleri, 2015). Bu yöntem ile yenilikçi tedavilere hızlı erişim ihtiyacı ile bunların güvenliği ve etkinliğine ilişkin kapsamlı kanıtlara duyulan gereksinim arasında bir karar verilmesi ve tercih yapılması amaçlanmaktadır.

Örneğin, 2003 ile 2010 yılları arasında FDA’da ile EMA’yı karşılaştıran bir çalışmada yeni kanser ilaçlarının FDA tarafından daha kısa bir sürede onaylandığını gösterilmiştir (Downing ve diğerleri, 2012). Benzer şekilde, başka bir çalışmada ABD’deki hızlandırılmış düzenleyici onay programları aracılığıyla onaylanan yeni antikanser ilaçlarının, diğer ülkelere göre daha kısa olduğu ortaya konmuştur (Demirci ve ark., 2023). Görüldüğü gibi farklı coğrafi bölgeler arasında düzenleyici yaklaşımlar ve zaman çizelgelerinde farklılıklar bulunmakta olup bu durum hastaların yeni ilaçları kullanmaya başlamasını geciktirebilmektedir.

İlaç ruhsatlandırma süreci ilaçların etkinlik, güvenlik ve kalite dosyaları ile birlikte klinik araştırma verilerinin kapsamlı bir değerlendirmesini içermektedir. Düzenleyici otoritelerin değerlendirme yöntemlerinin standartlaştırılması, uyumlaştırılması, uyarlanabilir lisanslama kavramı ve farklı kurumlar arasındaki güven uygulamaları ya da ortak denetim yöntemlerinin kabul edilmesi gibi birçok düzenleme ilaç ruhsatlandırma süreçleri giderek geliştirilmektedir. Düzenleyici kurumlar geliştirdikleri hızlandırılmış düzenleyici yöntemler ile ciddi hastalıkları tedavi etmeye ve karşılanmamış tıbbi ihtiyaçlara yönelik ilaçlar için yeni olanaklar sunmaktadır. Bu durum kritik tıbbi ihtiyaçları karşılamak için yenilikçi tedavilerin zamanında kullanılabilirliğini kolaylaştırmada düzenleyici kurumların proaktif rolünü yansıtmaktadır. Bu bölümde düzenleyici kurumların bu işlevlerin genel özellikleri üzerinde durulacaktır.

2. İLAÇ GELİŞTİRME VE RUHSATLANDIRMA İŞLEMLERİNDE DÜZENLEYİCİ KURUMLARIN ROLÜ

İlaç düzenlemelerinin genel amacı, hastalara yalnızca etkili ve güvenli tedavilerin ulaşmasını sağlamaktır; bu da düzenleyici kurumların halk sağlığını ve refahını korumadaki kritik rolünden kaynaklanmaktadır (Naci ve diğerleri, 2015). Düzenleyici kurumlar, ilaç ruhsatlandırma sürecinde çok önemli bir rol oynamakta ve farmasötik ürünlerin pazara giriş için onaylanmadan önce güvenlik, etkinlik ve kalite açısından katı standartları karşılmasını sağlamaktadır. Düzenleyici makamlar, ilaç geliştirme çalışmaları ve ruhsatlandırma süreci boyunca, üretim ve test işlemlerinin titiz bir belgeleme yöntemi kullanılarak, gerekli düzenlemelere ve kılavuzlara uygunluğunu sağladığından emin olmalıdır (Rafi ve diğerleri, 2018). Ayrıca, düzenleyici kurumlar ilaç onay sürecinin her aşamasını denetleyerek onay süreci boyunca uyumluluk ve güvenliğin devamlılığını sağlamaktadır (Pawar ve diğerleri, 2023). Her ne kadar bu gereklilikler bir süre olsa da hastaların ilaçlara ulaşımının gecikmemesi amacı ile bu kurumlar, ciddi hastalıkları ve karşılanmayan tıbbi ihtiyaçları tedavi etmeyi amaçlayan ilaçlar için hızlandırılmış düzenleme yolları da sunarak ilaç geliştirme ve onay sürelerini kısaltmayı amaçlamaktadır (Cox ve diğerleri, 2020).

Düzenleyici kurumların, ilaçların pazara ulaşmadan önce ve sonrasında başlıca sorumlulukları şunlardır:

- A. Standartların ve Yönergelerin Belirlenmesi
- B. Klinik Öncesi Değerlendirme
- C. Klinik Araştırmaların Gözetimi
- D. Risk-Fayda Değerlendirmesi
- E. Pazarlama Yetki Başvurularının İncelenmesi
- F. Piyasaya Çıkış Sonrası Gözetim
- G. Etiketleme ve Paketleme Gözetimi
- H. Üretim Tesislerinin Denetlenmesi
- I. Pazar Sonrası Çalışmalar ve Taahhütler
- J. Düzenleyici Bilim ve Araştırma
- K. Uluslararası İşbirliği

Düzenleyici kurumlar, bu işlevleri yerine getirerek yeniliği teşvik etmek ile halk sağlığını korumak arasında bir denge kurmayı ve yalnızca güvenli, etkili ve yüksek kaliteli ilaçların pazara ulaşmasını sağlamayı amaçlamaktadır. Bu süreç, halkın ilaç endüstrisine olan güvenini sağlamak ve tüm dünyadaki hastaların sağlığını korumak açısından hayati öneme sahiptir.

2.1. Standartların ve Yönergelerin Belirlenmesi

İlaç şirketlerinin ilaç geliştirme sürecinde uyması gereken standartları ve güvenlik, etkinlik, üretim teknikleri ve etiketleme kriterleri ile ilgili kılavuzları belirleyen otorite, düzenleyici kurumlardır. Düzenleyici ilaç otoriteleri tarafından yönetilen bu süreç birkaç önemli basamağı içerir:

- a) **Bilimsel Uzmanlık ve Araştırma:** Düzenleyici kurumlar genellikle denetledikleri sektörle ilgili bilimsel alanlardaki uzmanlardan oluşur. Bu uzmanlar, en son gelişmelerden haberdar olmak için araştırma yapar ve mevcut bilimsel literatürü gözden geçirerek bu deneyimlerini düzenlemelere aktarır.

- b) **Risk Değerlendirmesi ve Fayda Analizi:** Standartları belirlemeden önce düzenleyici kurumlar, ürün veya süreçlerle ilgili riskleri ve faydaları değerlendirir. Bu değerlendirmeler ürünlerin halk sağlığına veya çevreye yönelik potansiyel zararı ile beklenen faydalarının karşılaştırılmasını içerir.
- c) **Kamuoyu Katılımı ve Bilimsel Danışma:** Birçok düzenleyici kurum, standart belirleme süreci sırasında halktan, paydaşlardan ve sektör uzmanlarından görüş alır. Bu yaklaşım, farklı bakış açılarının ve görüşlerin kılavuzlara ve düzenlemelere aktarılmasını sağlar.
- d) **Uluslararası Standart Kuruluşlarıyla İşbirliği:** Düzenleyici kurumlar, standartları küresel düzeyde uyumlu hale getirmek için sıklıkla uluslararası standart kuruluşlarıyla işbirliği yapar. Bu işbirliği düzenlemelerin tutarlılığını ve uluslararası uyumluluğu sağlaması sayesinde sınırlar arası ticareti kolaylaştırmaktadır.
- e) **Mevzuat ve Yasal Çerçeve:** Düzenleyici kurumlar yetkilerini mevzuattan alırlar. Ülkelerindeki yasal mevzuatları onlara standartları oluşturma ve uygulama yetkisi vermektedir. Düzenleme süreci ulusal ve uluslararası yasalarla uyumlu olmalıdır.
- f) **Risk Esaslı Yaklaşım:** Standartlar genellikle risk esaslı bir yaklaşıma göre belirlenir. Daha yüksek riskli ürünler veya süreçler, kamu güvenliğini sağlamak için daha katı standartlara sahip olabilirken, daha düşük riskli olanlar daha esnek gereksinimleri içerebilir.
- g) **Periyodik İnceleme ve Güncellemeler:** Standartlar statik değildir; bilimsel gelişmeler ve endüstri uygulamalarındaki değişikliklerle birlikte gelişmeye açıktır. Düzenleyici kurumlar, en son bilgi ve teknolojileri yansıtacak şekilde standartları periyodik olarak gözden geçirir ve gerektiğinde günceller.
- h) **Dokümantasyon ve Şeffaflık:** Standart belirleme süreci, her standardın arkasındaki mantığın belgelenmesini içerir. Bu belgeler şeffaflığı ve hesap verebilirliği sağlayarak sektör paydaşlarının düzenleyici kararların nedenlerini anlamalarını sağlar.
- i) **Uzlaşma Oluşturma:** Düzenleyici kurumlar, paydaşlar arasında fikir birliği oluşturmayı amaçlamaktadır. Bu uzlaşma, tartışmalara katılmayı, endişeleri gidermeyi ve ilgili tüm taraflar için kabul edilebilir ve uygulanabilir standartlar üzerinde işbirliği içerisinde çalışmayı gerektirir.
- j) **Uygulama ve Uyumluluk:** Standartlar belirlendikten sonra, düzenleyici kurumlar uygulama ve uyumluluğun izlenmesi için mekanizmalar oluşturur. Bu mekanizmalar ile sektör bileşenlerini denetler ve uyumsuzluk ile karşılaşılınca verilecek cezaları belirler.
- k) **Eğitim ve Kapasite Geliştirme:** Düzenleyici kurumlar, belirlenen standartların anlaşılmasını ve bunlara uyulmasını sağlamak için sektör profesyonellerine eğitim ve kapasite geliştirme eğitimleri sağlayabilir.
- l) **Gelişen Teknolojiler ve Trendler:** Düzenleyici kurumlar, gelişen teknolojilere ve sektör trendlerine uyum sağlamak zorundadırlar. Yeni gelişmelerin ortaya çıkardığı zorlukları ele almak ve düzenlemelerin güncel kalmasını sağlamak için standartları sürekli bir şekilde revize ederler.

Genel olarak, düzenleyici kurumların standart belirleme süreci, güvenlik ve etik hususlar çerçevesinde halk sağlığını korumayı, ürün kalitesini sağlamayı ve sektördeki yenilikleri teşvik etmeyi amaçlayan karmaşık, dinamik ve işbirlikçi bir çalışmadır. Düzenleyici kurumlar, ilaç ve sağlık endüstrilerindeki çeşitli alanlarda standartların ve kılavuzların belirlenmesinde çok yönlü bir rol oynamaktadır. Onların çabaları, mükemmelliği, kanıta dayalı tıbbi ve yenilikçiliği teşvik ederken, halk sağlığını korumada ve yüksek kalitede sağlık hizmeti sunulmasında etkilidir.

2.2. Klinik Öncesi Değerlendirme

Yeni bir ilaç insanlarda test edilmeden önce laboratuvar ve hayvanlar üzerinde kapsamlı klinik öncesi testlere tabi tutulur. Düzenleyici kurumlar, insanlar için makul bir güvenlik ve etkililik beklentisi olup olmadığını belirlemek için bu verileri inceler.

Keşif ve Klinik Öncesi Testler	Hayvan Testleri
• Hedef Belirleme ve Doğrulama	• Hayvan Modelleri ve Etik Hususlar
• In vitro ve In vivo Testler	• Güvenlik ve Toksikoloji Çalışmaları

İlk aşamada ilaç keşfi, potansiyel hedeflerin belirlenmesini ve bileşiklerin taranmasını içerir. Bunu, çeşitli maruz kalma süreleri boyunca güvenliği değerlendirmek için in vitro ve in vivo deneylerin yanı sıra toksikoloji çalışmalarını kapsayan klinik öncesi testler takip eder. Potansiyel ilaç adayları belirlendikten sonra klinik öncesi testler başlar. İn vitro deneyler, bir ilacın laboratuvar ortamında kontrollü ortamlardaki davranışına ilişkin bilgiler sağlarken, in vivo çalışmalar hayvanlar üzerinde yapılan testleri içerir. Bu aşama ayrıca ilacın akut, subakut ve kronik maruziyetleri kapsayan potansiyel toksisitesini değerlendirmeyi amaçlar.

Toksikoloji çalışmaları klinik öncesi testlerin kritik bir bileşenidir. Bu çalışmalarda, farklı maruz kalma süreleri boyunca canlı organizmalar üzerindeki ilaç adayının etkisi araştırılarak ilaç adayının güvenliği değerlendirilir. Bunlar, akut olumsuz etkileri değerlendirmek için akut toksisite çalışmalarını, kısa süreli maruz kalma için subakut çalışmaları ve uzun vadeli etkileri değerlendirmek için kronik toksisite çalışmalarını olarak ifade edilebilir.

2.3. Klinik Araştırmaların Gözetimi

Düzenleyici kurumlar bir ilacın güvenliği ve etkinliği hakkında güvenilir veriler toplamak için yapılan klinik araştırmaların tasarımının, yürütülmesinin ve raporlanmasının GLP kurallarına uygunluğunu denetler. Çalışma protokollerini değerlendirerek klinik çalışmanın iyi tasarlanmış, yeterli güce sahip ve bilimsel açıdan karar alınmasında yol gösterici olmasını sağlarlar. Klinik araştırmalar aşamalar halinde ilerlemektedir. Faz I çalışmalar, küçük gruplardaki güvenliğe odaklanırken, Faz II ve III klinik denemeler, etkinlik ve güvenlik profillerini oluşturmak için daha büyük gönüllü popülasyonlarını içerir. Pazarlama sonrası gözetim ise (Faz IV), sürekli güvenilirlik izleme ve raporlamayı sağlar. Düzenleyici kurumlar klinik araştırmaların her fazının etik ve bilimsel kurallar temelinde kurgulandığını, işletildiğini ve oluşturduğu mevzuatlara uygunluğunu gerek kendi kurulları gerekse denetim çalışmaları üzerinden takip eder. Ara sonuçları da dahil olmak üzere kendine iletilen verileri değerlendirerek gerektiğinde gönüllülerin güvenliğini önceleyerek hızla karar verir.

Faz I Denemeleri	Faz II Denemeleri	Faz III Denemeleri	Faz VI Denemeleri
Hedefler ve Katılımcılar	Etkinlik ve Doz Optimizasyonu	Büyük Ölçekli Etkinlik Çalışmaları	Pazarlama sonrası gözetim
Güvenlik ve Dozaj Çalışmaları	Hastalarda Güvenlik Verilerinin Genişletilmesi	Rastgele Kontrollü Çalışmalar (RKÇ'ler)	Uzun Vadeli Güvenlik ve Etkinlik

2.4. Risk-Fayda Değerlendirmesi

Düzenleyici kurumlar bir ilacın potansiyel faydaları ile tedavide hastanın karşılaşılabileceği riskleri arasındaki dengeyi değerlendirir. Kurumlarda bulunan ruhsatlandırma uzmanları tedavi edilen durumun ciddiyetini ve alternatif tedavilerin mevcudiyetini dikkate alarak, yeni ilaç adayı ile elde edilen faydaların potansiyel zararlardan fazla olduğundan emin olmaya çalışır ve yalnızca olumlu fayda-risk profiline sahip olanların pazara girişi için onaylar. Fayda-risk dengesinin değerlendirilmesi, düzenleyici karar verme sürecinin kritik bir bileşenidir ve hem ilaç ruhsatının onayını hem de pazarlama sonrası gözetimi etkiler. Karmaşık karar alma sürecini yürütebilmek için düzenleyici kurumlar tarafından detaylı bir fayda-risk analizi yaklaşımı kullanılmaktadır. Bu analiz, medyan fayda-risk dengesinin pozitif mi yoksa negatif mi olduğunu tahmin etmek için faydaların ve risklerin ölçülmesini gerektirmektedir. Bu tür niceliksel değerlendirmeler, bir ilacın genel terapötik değerinin değerlendirilmesi için yapılandırılmış bir çerçeve sağlar ve düzenleyici kararlara rehberlik eder.

Farklı düzenleyici kurumlar arasındaki kararlar karşılaştırıldığında, kurumların fayda-risk dengesini değerlendirirken bilimsel kanıtları farklı şekilde dikkate aldığı ve uyguladığı görülebilmektedir. Düzenleme kararlarındaki uyum ve uyumsuzluğu anlamak için, fayda-risk değerlendirmelerini etkileyen faktörler hakkında değerlendirilen bilgileri ve düzenleme süreçlerini analiz etmek gerekmektedir (Mahuli et al., 2017).

Pazarlama onayı verilen ürünlerin fayda-risk dengesine ilişkin düzenleyici kararların alınmasında pazarlama sonrası gözetiminden elde edilen veriler de önemli bir rol oynamaktadır. Bu veriler, bir ilacın fayda-risk profilinin gerçek yaşam ortamlarında sürekli olarak değerlendirilmesini kolaylaştırır, düzenleyici eylemlere bilgi verir ve onaylı ilaçların sürekli güvenlik ve etkililiğini kontrol altında tutar.

Faydaların ve risklerin değerlendirilmesinde şeffaflık, bilinçli karar verme açısından önem taşımakta olup bu nedenle değerlendirmelerinin şeffaflığını artırmaya yönelik yapılandırılmış düzenlemeler bulunmaktadır. İlacın ruhsatının onaylanması sonrasında da yapılan pazarlama sonrası çalışmalar ile bir ilacın terapötik faydalarına karşı olumsuz etkileri ve potansiyel riskleri hakkındaki bilgiler analiz edilebilir. Bu fayda-risk değerlendirme, pazarda bulunan bir ilaç için verilecek düzenleyici kararların temelidir ve bu şekilde piyasada bulunan onaylı ilaçların sürekli güvenliğini ve etkinliğini koruduğundan emin olunabilir.

Yetim ilaçlar bağlamında, düzenleyici kurumlar ile geri ödeme yetkilileri arasındaki işbirliği, bu özel tedavilerin terapötik risklerinin ve faydalarının değerlendirilmesinde esastır. Bu işbirliği, pazarlama sonrası kanıt açığını azaltmayı ve sınırlı klinik kanıtlarla ilgili zorluklara rağmen hastaların yetim ilaçlara erişmesini sağlamayı amaçlamaktadır.

İlaçların sahada kullanımları sonrasında elde edilen sinyallerin toplanarak değerlendirilmesi temelden oluşan farmakovijilans, farmasötik ürünlerin bireysel kullanılması ile elde edilen ve popülasyon verilerine dayanan kapsamlı bir risk-fayda değerlendirme içermektedir. Farmakovijilans sistemleri, fayda-risk analizinin pazarlama sonrası gözetim çalışmalarına entegre edilmesini sağlayarak ilacın güvenliği ve etkinliğinin sürekli olarak değerlendirilmesine katkıda bulunur.

Sonuç olarak, düzenleyici kurumlar ilaçların potansiyel faydaları ile riskleri arasındaki dengeyi değerlendirmek için çok yönlü bir yaklaşım kullanmaktadır. Kantitatif fayda-risk analizi, düzenleyici kararların karşılaştırılması, pazarlama sonrası gözetim, şeffaflık ve işbirliği, onaylanmış ilaçların güvenliğini ve etkinliğini sağlayarak, fayda-risk dengesinin düzenleyici değerlendirmesinin ayrılmaz bir parçasını oluşturur.

2.5. Pazarlama Yetki Başvurularının İncelenmesi

Düzenleyici kurumlar, tıbbi ürünlerin geliştirilmesi, onaylanması ve ticarileştirilmesine yönelik standartların ve kılavuzların belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Farmasötikler, biyolojik ürünler ve tıbbi cihazlar da dahil olmak üzere tıbbi ürünlerin güvenliğini, etkinliğini ve kalitesini sağlamak için sağlam standartların ve yönergelerin oluşturulmasına çalışırlar.

İlaçların çözünürlüğünün artırılması, pasif hedefleme, aktif hedefleme ve tetiklenmiş salım gibi çeşitli mekanizmalar yoluyla ilaç dağılımının geliştirilmesini amaçlayan yeni ilaç geliştirilme süreçleri, bunların güvenli ve etkili kullanımını sağlamak için yeni standartların ve kılavuzların oluşturulmasını gerektirir (Hua ve ark. 2018). Düzenleyici kurumlar, yeni ilaçların geliştirilmesi ve ticarileştirilmesi için rehberlik sağlamak ve bunların sıkı kalite ve güvenlik standartlarını karşıladığından emin olmak zorundadır.

Düzenleyici kuruluşlar sağlık sektöründe standart uygulamaların ve etik davranışın sağlanması amacı ile yasal düzenlemeleri sürekli olarak geliştirme standartlaştırma ve üretim yerlerini denetler (Adams, 2020). Böylece yeni gelişen tedavilerin ve sağlık hizmetlerinin kalitesini ve etkinliğinin sürekliliğini korumayı hedefler. Günümüzde hızla gelişmekte olan gen terapisi ürünleri bağlamında da ulusal kılavuzların gerekliliği ortaya çıkmıştır. Düzenleyici kurumların bu tür yenilikçi tıbbi ürünlerin araştırılması, geliştirilmesi ve değerlendirilmesi için açık direktifler sağlamada, bu ilaçların geliştirilmesi ve klinik denemeleri için bir yol haritası ortaya koymadaki rolleri son yıllarda önem kazanmıştır (Sivagouounadin ve ark, 2021). Bu yönergeler, gen terapisi ürünlerinin sıkı standartlara uymasını ve pazara ulaşmadan önce kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulmasını sağlamak açısından önemlidir. Ayrıca, başarılı yeni ilaç uygulamalarını destekleyen klinik araştırmaların yayınlanmasının, ilaç onay sürecinde şeffaflığın ve düzenleyici standartlara bağlılığın bu gelişmelere katkıları ortaya konmuştur (Lee ve arki, 2008). Düzenleyici kurumlar, bu tür yenilikçi tedavilerin klinik araştırmalarının yerleşik kılavuzlara uygun olarak yürütülmesini ve sonuçların bilinçli karar vermeyi desteklemek üzere doğru bir şekilde rapor edilmesini sağlarlar. Diğer bir yeni alan olan biyobenzer farmasötikler alanında düzenleyici kılavuzların gelişimi, bu ürünlerin onaylanmasını ve ticarileştirilmesini düzenleyen standartların oluşturulması ve kuralların takip edilmesini kolaylaştırmıştır (Wolff-Holz ve ark, 2019). Düzenleyici kurumlar, biyofarmasötik geliştirmedeki ilerlemelere uyum sağlamak için uluslararası işbirliği içerisinde standartları sürekli olarak uyarlamakta ve geliştirmektedir. Böylece biyobenzerlerin sıkı karşılaştırılabilirlik ve kalite gerekliliklerini karşılaması sağlanmaktadır. Biyobenzer ürünlere ilişkin düzenlemelerin farklı bölgeler arasında farklılık göstermesi, düzenleyici kurumların bölgesel farklılıkları ve gereklilikleri göz önünde bulundurarak uyumlaştırılmış standartlar oluşturduğunu göstermektedir (Mysler ve diğerleri, 2016).

Düzenleyici kurumlar, klinik hizmet sunumunda, kabul koşullarını, uygulama standartlarını, etik kuralları, denetim protokollerini ve sürekli eğitim gerekliliklerini belirlemekten sorumludur (Kourgiantakis ve ark, 2022). Bu standartlar, sağlık çalışanlarının yetkinliğini ve etik davranışlarını sağlamada, sonuçta hastaların ve toplumun refahının korunmasında esastır.

Sonuç olarak, düzenleyici kurumlar, farmasötikler, biyolojik ürünler, tıbbi cihazlar ve sağlık profesyoneli uygulamaları dahil olmak üzere sağlık hizmetinin çeşitli alanlarında standartların ve kılavuzların belirlenmesinde çok yönlü roller oynamaktadır. Sorumlulukları arasında tıbbi ürünlerin güvenliğinin, etkililiğinin ve kalitesinin sağlanması, etik davranışın teşvik edilmesi ve sağlık hizmetlerindeki yeniliklerdeki ilerlemelere uyum sağlayacak standartların uyarlanması yer alır.

2.6. Piyasaya Arz Sonrası Gözetim

Düzenleyici kurumlar, tıbbi ürünlerin onaylandıktan ve kamuya sunulduktan sonra güvenliğinin, etkililiğinin ve kalitesinin devam etmesini sağlamak üzere ilaçları piyasaya arzı sonrası da gözetim altında tutar. Özellikle kalite kontrol ve pazarlama sonrası gözetimdeki giderek artan iyileşme, düzenleyici kurumların, bu alandaki önemli rolünü göstermektedir (Ndomondo-Sigonda ve ark. (2017).

Birçok ürün için uygulanan pazarlama sonrası gözetim çalışmaları, düzenleyici kurumların gerçek dünya verilerini toplama ve tıbbi ürünlerin klinik uygulamadaki performansını değerlendirme çabalarına örnek teşkil etmektedir. Bu çalışmalar, tedavilerin uzun vadeli sonuçlarına ilişkin değerli bilgiler sağlamakta, düzenleyici kararlar için bilgi sağlamakta ve sağlık hizmetleri uygulamalarına rehberlik etmektedir (Torii ve ark., 2015). Düzenleyici kurumların pazarlama sonrası gözetim girişimleri, düzenleyici kurumların tıbbi ürünlerin gerçek dünyadaki kullanımının izlenmesinde ve çeşitli hastalarda bunların güvenliğinin ve etkinliğinin değerlendirilmesinde proaktif rolü olması gerekliliğinden kaynaklanmaktadır (Ito ve ark, 2018). Rutin olarak toplanan verilerin ileriye dönük, periyodik değerlendirmesi, ilaçla ilişkili advers olay oranlarına ilişkin popülasyona dayalı tahminler sağlayabilir ve seçilmiş advers ilaç olayları için rutin yapılan pazarlama sonrası gözetimi destekleyebilir (Brown ve ark, 2007). Yapılan izleme ve gözetim çalışmaları tıbbi ürünlerle ilgili potansiyel güvenlik endişelerini belirlemek için gerçek yaşam verilerinden yararlanmanın gerekliliğini göstermektedir.

Sadece ilaçlar değil tıbbi cihazların da piyasaya arz sonrası gözetimi büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle düzenleyici kurumlar ile tedavi edici sağlık kurumları arasında tıbbi cihazların gerçek klinik ortamlarındaki performansını ve güvenliğini izlemeye yönelik işbirliği planlamaları yapılmaktadır (Steiger ve ark. 2012). Bu işbirliği, tıbbi ürünlerin kontrollü klinik araştırma ortamının ötesinde, kapsamlı bir şekilde değerlendirilmesine katkıda bulunmaktadır.

Sonuç olarak, düzenleyici kurumlar piyasaya arz sonrası gözetimde, tıbbi ürünlerin proaktif olarak izlenmesini, gerçek dünya sonuçlarının değerlendirilmesini, gerçek dünya verilerinin toplanmasını ve çeşitli hasta popülasyonlarında güvenlik ve etkinliğin sürekli değerlendirilmesini kapsayan çok yönlü roller oynamaktadır. Düzenleyici kurumların piyasaya arz sonrası gözetim çalışmaları, klinik uygulamada tıbbi ürünlerin sürekli güvenliğinin, etkililiğinin ve kalitesinin sağlanmasında temel işlevlerinden birisidir.

2.7. Etiketleme ve Ambalaj Gözetimi

Düzenleyici kurumların, tıbbi ürünlerin etiketlenmesi ve paketlenmesinin denetlenmesinde, bunların halk sağlığını korumaya yönelik katı standartlara ve yönergelere uymasını sağlamada önemli rolleri bulunmaktadır.

Düzenleyici kurumlar ilaçların ve gıda takviyelerinde bulunan aktif ve katkı maddelerinin hazırlanması, paketlenmesi, etiketlenmesi ve saklanması süreçlerinin saflık, bileşim ve raf ömrü bilgilerini tüketicilere sağlamak amacı ile ilaçların kapsamlı ve doğru etiketlenmesi için spesifikasyonlar ve kılavuzlar hazırlamakta ve yayınlamaktadır (Bailey, 2018). Kurumlar, düzenleme ve gözetim çalışmalarında ortaya koyduğu sıkı etiketleme ve paketlenme standartları aracılığıyla ilaçların, tıbbi cihazların ve gıda takviyelerinin takibini, bütünlüğünü ve güvenliğini korumayı amaçlamaktadır. İlaçların kullanma talimatında bilgi eksikliği ya da fazlalığı olmaması

için düzenleyici otoriteler kılavuzların gerektirdiği bu bilgilerin kanıtlarını talep edebilir ve uygunsuz kullanıma talimatına dahil edilmesi için gerekli onayı verebilmektedirler (Andrade ve ark, 2020).

Sonuç olarak düzenleyici kurumlar, tıbbi ürünlerin etiketlenmesi ve paketlenmesinin denetlenmesinde, doğru ve kapsamlı bilgilerin bulunması, ambalajın kalitesinin ve bütünlüğünün sağlanmasında ve ulusal düzenlemelerin uluslararası standartlarla uyumlu hale getirilmesinde çok yönlü roller oynamaktadır. Bu çalışmalar, halk sağlığının korunması ve tıbbi ürünlerin kullanımında şeffaflığın ve güvenliğin teşvik edilmesi açısından çok önemlidir.

2.8. Üretim Tesislerinin Denetimi

İnsan kullanımına yönelik güvenli ve yüksek kaliteli tıbbi ürünlerin üretimini teşvik etmek için üretim tesislerinin gözetimi esastır (Gouveia ve ark. 2015). Düzenleyici kurumlar, İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ve diğer kalite ve çevresel düzenleme standartlarına uygunluğu sağlamak amacıyla üretim tesislerini denetlemektedir. Buna ek olarak sağlık hizmeti sunumundaki kalite ve çeşitliliği sağlamak için sağlık tesislerini dosya üzerinde denetlemek ya da yerinde denetimler yapmakla ve bu yerlerin düzenleme sisteminin gerekliliğini sağladığını raporlamakla görevlidir (Zhou ve ark., 2019). Ek olarak bu kurumlar ilaçların, örneğin insan enfeksiyon çalışmalarında kullanılan risk ajanlarında olduğu gibi GMP tesislerinde geliştirilmesi ve üretilmesine ilişkin düzenleyici gözetimleri yapması, riskleri azaltmak ve araştırmada kullanılan riskli ajanların saflığını ve kalitesini sağlamak için gereklidir (Balasingam ve ark, 2022). Üretim tesislerinin düzenleyici gözetimi, yenilikçi tedaviler ve yeni terapötik ürünler gibi ajanların güvenli ve etkili kullanımını sağlamaktadır (Gálvez-Martín ve ark, 2016). Bu amaçla kurumlar, yenilikçi tedaviler ve yeni ilaç geliştirilmesini hızlandırmak amacıyla, pilot üretim tesislerinin kurulmasını destekleyerek ve erken tedarik ve tam ölçekli üretime geçiş için düzenleyici standartlar sağlamaya çalışırlar (Hasso-Agopsowicz ve ark, 2022). Ayrıca GMP standartları içerisinde bulunan üretim tesislerinin tasarımı ve işletimini denetlemek de düzenleyici kurumların sorumlulukları arasındadır (Dietz ve ark, 2007).

Düzenleyici kurumlar üretim tesislerinin denetlenmesinde, GMP'ye uygunluğun sağlanmasında ve tıbbi ürünlerin, gelişmiş terapötik ajanların, aşı dağıtım sistemlerinin kalite, güvenlik ve çevresel düzenleme yönlerinin teşvik edilmesinde ve ajan geliştirilmesinde çok yönlü roller oynamaktadır. Bu çalışmalar tıbbi ürünlere yönelik üretim süreçlerindeki etkinlik ve güvenliğin sağlanması ve sürdürülebilir olmasının yanında üretim kalite bütünlüğünün desteklenmesi açısından çok önemlidir.

2.9. Pazarlama Sonrası Çalışmalar ve Taahhütler

Düzenleyici kurumlar, tıbbi ürünlerin onaylandıktan ve kamuya sunulduktan sonra güvenlik, etkinlik ve kalite özelliklerinin devamlılığı amacıyla piyasaya sürülme sonrası çalışmaları ve taahhütleri de denetlemektedir. Tıbbi tedavilerdeki önemli gelişmeler ve hızla pazara verilen yenilikçi ilaçlar, çeşitli kanser türlerinden muzdarip hastalar için yapılan klinik araştırmalarda iyi sonuçlar göstermiş olsa da tedavilerin gerçek dünyadaki etkinliğini ve güvenliğini değerlendirmek için mutlaka tarafsız ve detaylı pazar sonrası çalışmalara duyulan ihtiyaç vardır (Schnog ve ark, 2021). Bu nedenle hızlandırılmış onay alan kanser ilaçlarının klinik faydasının değerlendirilmesi amacı ile klinik açıdan daha anlamlı bilgiler elde etmek ve yanetki yelpazesine yönelik gereklilikleri

yeniden değerlendirmek için piyasaya sürülme sonrası çalışmalar sürdürülmektedir (Gyawali ve ark. (2019). Böyle durumlarda bilinçli karar almayı desteklemek ve hastalara etkili tedavilerin sunulmasını teşvik etmek için kanser ilaçlarının pazarlama sonrasında sürekli değerlendirilmesini sağlama konusunda düzenleyici kurumların sorumluluğu bulunmaktadır. Bu amaçla kurumlar belirsizlikleri gidermek ve gerçek dünya ortamlarında tıbbi ürün performansının anlaşılmasını sağlamak için piyasaya sürülme sonrası sahadan verilerin toplanması ve değerlendirilmesini kapsayan geniş katımlı araştırmalar talep edebilirler (Bujosa ve ark., 2021).

Düzenleyici kurumların sorumluluklarından birisi de, bulaşıcı hastalıkların etkili yönetimi amacıyla antimikrobiyal ilaçların pazarlama sonrası gözetim çalışmalarını yapmaktır. Bu nedenle halk sağlığını korumak amacıyla antibiyotiklerin gerçek yaşam ortamlarında kullanımını ve performansını izleme yöntemleri kullanılmaktadır (Chikowe ve ark, 2015).

Piyasaya sürülme sonrası klinik araştırmalardan ve farklı ülkelerdeki düzenleyici kurum kararlarından elde edilen piyasaya sürülme sonrası kanıtlara yönelik düzenleyici yanıt verme hızı yavaş ve yetersiz olabilir. Bu durum, düzenleyici kurumların piyasaya sürülme sonrası çalışmalara ve ortaya çıkan kanıtlara zamanında ve etkili yanıtlar verilmesini sağlamada ortak çalışmalar yapması, iletişim yolları bularak hızlı, proaktif ve hassas gözetimleri yapmalarını gerektirmektedir (McPhail ve diğerleri, 2022).

Düzenleyici kurumlar, gerçek dünyadaki etkililik ve güvenliğin değerlendirilmesini, piyasaya arz sonrası kanıtların oluşturulmasını ve değerlendirilmesini ve proaktif ve duyarlı piyasaya arz sonrası gözetimin teşvik edilmesini kapsayan piyasaya arz sonrası çalışmaları ve taahhütleri denetlemede çok hassas davranmaktadır.

2.10. Düzenleyici Bilim ve Araştırma

Düzenleyici kurumlar genellikle ilaçların değerlendirilmesine yönelik yeni metodolojilerin, teknolojilerin ve standartların araştırılması ve geliştirilmesiyle ilgilenmektedir. Gözetim yeteneklerini geliştirmek için bilimsel gelişmelerin ön saflarında yer almak için çalışmaktadırlar.

2.11. Uluslararası İşbirliği

Düzenleyici kurumlar arasındaki uluslararası işbirliği, küresel halk sağlığının geliştirilmesinde, yeniliğin teşvik edilmesinde ve tıbbi ürünlerin güvenliğinin ve etkinliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynamaktadır. Düzenleyici otoriteler arasındaki uluslararası işbirliği, evrensel sağlık için temel ilaçlara erişimin sağlanması bağlamında giderek daha önemli hale gelmiştir (Wirtz ve ark. (2017). Bu işbirlikçi yaklaşım, düzenleme kapasitesinin geliştirilmesine ve standartların uyumlaştırılmasına katkıda bulunarak sonuçta küresel halk sağlığına fayda sağlamıştır. Örneğin onkoloji alanında, çok merkezli klinik araştırmaların yürütülmesindeki zorlukların üstesinden gelmek ve yeni kanser tedavilerinin geliştirilmesini ve onaylanmasını hızlandırmak için uluslararası işbirliğinin gerekli olduğu kabul görmektedir. Araştırmacıların, düzenleyicilerin ve sağlık sistemi paydaşlarının koordineli çabaları ve uzlaşmaları, uluslararası iş birliğinin gerçekleştirilmesi için çok önemlidir (Tang ve ark, 2019). Bu işbirlikçi yaklaşım, yenilikçi onkoloji tedavilerinin geliştirilmesini ve onaylanmasını kolaylaştırarak, dünya çapındaki hastalara fayda sağlamaktadır.

COVID-19 salgını da, düzenleyici otoriteler arasındaki uluslararası iş birliğinin öneminin göstermiştir. COVID-19 ile ilgili Uluslararası Düzenleyici Otoriteler Koalisyonu, acil durum

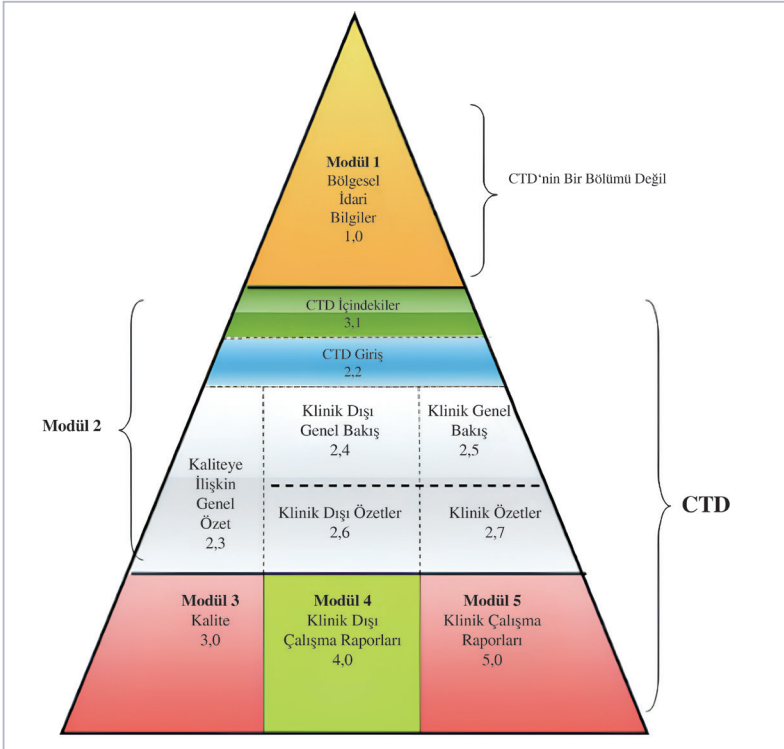
onaylarını ve pandemiye yönelik müdahaleleri koordine etmede kritik bir rol oynayarak halk sağlığıyla ilgili acil durumların ele alınmasında küresel düzenleyici işbirliğinin önemini göstermiştir (Saint-Raymond ve ark, 2020). Bu işbirlikçi çaba, salgınla mücadeleye yönelik aşı, ilaç ve tıbbi cihazların zamanında değerlendirilmesini ve onaylanmasını kolaylaştırmış ve hızlandırmıştır.

Uluslararası işbirliği aynı zamanda klinik çalışmaların hızlandırılmasında ve araştırma çabalarının kolaylaştırılmasında da önemli bir rol oynamıştır (Dayan ve ark, 2021).

Sonuç olarak, düzenleyici kurumlar arasındaki uluslararası işbirliği, küresel halk sağlığının teşvik edilmesi, tıbbi yeniliklerin ilerletilmesi ve tıbbi ürünlerin güvenliğinin ve etkinliğinin sağlanması için gereklidir. Düzenleyici otoriteler birlikte çalışarak standartları uyumlu hale getirebilir, tıbbi ürünlerin geliştirilmesini ve onaylanmasını hızlandırabilir ve küresel ölçekte halk sağlığı sorunlarına çözüm bulabilir.

3. ORTAK TEKNİK BELGE (CTD)

Ortak Teknik Belge (CTD), Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) kılavuzlarının uygulandığı bölgelerdeki düzenleyici otoritelere yapılacak başvurular için iyi yapılandırılmış bir sunum dosyasının hazırlanmasına yönelik uluslararası kabul görmüş bir formattır (Alfaro ve ark. (2007). CTD, her biri bir tıbbi ürün hakkında kapsamlı bilgi sağlama konusunda özel bir amaca hizmet eden çeşitli modüllerden oluşur. Bu modüller düzenleyici başvurular için zorunludur ve tıbbi ürünlerin kalitesi, güvenliği ve etkinliği hakkında bilgi ve kanıtlar içermektedir.



Şekil 1. CTD Üçgeni.

CTD'nin Modül 1'i, bölgesel idari belgeler, reçeteleme bilgileri ve ürün etiketlemesi dahil olmak üzere idari bilgileri ve reçeteleme verilerini içerir. Bir pazarlama başvurusunun sunulması için gerekli ayrıntıları sağlayarak ürünün yasal gerekliliklere uygun olarak uygun şekilde etiketlenmesini ve reçete edilmesini amaçlar.

CTD'nin Modül 2'si, tıbbi ürünün kalite, güvenlik ve etkililik verilerinin özetlerini içerir. Ürünün gelişimine, kalite özelliklerine, klinik dışı çalışmalara ve klinik deneme verilerinin bulunduğu bölümdür. Bu modül, düzenleyici otoritelerin ürünün genel fayda-risk profilini değerlendirmesi açısından çok önemlidir.

CTD'nin Modül 3'ü, üretim süreçleri, ürün spesifikasyonları ve stabilite verileri dahil olmak üzere tıbbi ürünün tüm kalite süreçlerine ilişkin bilgiler içerir. Bu modül, ürünün İyi Üretim Uygulamalarına (GMP) uygun olarak üretilmesini ve gerekli kalite standartlarını karşıladığının kanıtlarını sunar.

CTD'nin 4. Modülü, tıbbi ürünün farmakolojisi, toksikolojisi ve farmakokinetiği hakkında ayrıntılı bilgi sağlayan klinik dışı çalışma raporlarını içerir. Bu modül, deney hayvanları üzerindeki çalışmaların sonuçları gibi tüm prelinik verilere dayanarak ürünün güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için gereklidir.

CTD'nin Modül 5'i, tıbbi ürünün güvenliğini ve etkinliğini değerlendirmek için yürütülen klinik araştırmalara ilişkin ayrıntılı bilgiler sunan klinik çalışma raporlarını içerir. Bu modül, düzenleyici otoritelerin ürünün onayı öncesi etkinlik ve güvenliği gösteren klinik kanıtları değerlendirmesi açısından çok önemlidir.

CTD modülleri, tıbbi ürüne ilişkin kapsamlı ve yapılandırılmış bir genel bakış sağlamak ve düzenleyici otoritelerin ürünün değerlendirilmesi ve onaylanması için gerekli tüm ilgili bilgilere erişmesini sağlamak üzere tasarlanmıştır. CTD formatı, başvuru prosedürünü uyumlu hale getirmek ve başvuru sahipleri için başvuru sürecini basitleştirmek ve aynı zamanda düzenleyici otoritelerin değerlendirmeleri için standart ve kapsamlı bilgilere erişmesini sağlamak için önemli bir araçtır.

Sonuç olarak, Ortak Teknik Doküman (CTD) ve modülleri, mevzuata ilişkin sunumlar için kapsamlı bilgilerin iyi yapılandırılmış ve standart bir sunumunu sağlamada çok önemli modeldir. CTD formatı, düzenleyici otoritelerin tıbbi ürünlerin değerlendirilmesi ve onaylanması için gerekli tüm ilgili bilgilere kolaylıkla ve sistematik bir şekilde erişmesini sağlar.

4. İLAÇ RUHSATI TÜRLERİ

İlaçların ruhsatlandırılması, farmasötik ürünlerin güvenliğini, etkinliğini ve kalitesini kanıtlayan bilgilerin ve verilerin değerlendirilmesi sonrası mümkündür. Her biri belirli amaçlara yönelik ve düzenleyici gereklilikleri olan farklı türde ilaç lisansları mevcuttur.

4.1. Pazarlama İzni (Ruhsatı)

Pazarlama izni, ilaç şirketlerinin ürünlerini pazarlamasına ve dağıtmasına olanak tanıyan temel bir ilaç lisansı türüdür. Bu lisans, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) veya Avrupa'daki Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici makamlar tarafından ilacın güvenliği, etkinliği ve kalite verilerinin kapsamlı bir incelemesinden sonra verilir. Pazarlama izni, yalnızca güvenli ve etkili ilaçların pazara ulaşmasını sağlamak ve böylece halk sağlığını korumak için gereklidir.

4.2. Şartlı Onay

Karşılanmamış tıbbi ihtiyaçları karşılayan ve umut verici terapötik faydalar gösteren ilaçlara şartlı onay verilir. Bu tür bir lisans, ilaçların erkenden temin edilmesine olanak sağlarken, bunların etkinliğini ve güvenliğini doğrulamak için ek verilerin sunulmasını gerektirir. Şartlı onay, hastanın yenilikçi tedavilere erişimini hızlandırmasının yanı sıra ilacın performansının sürekli olarak değerlendirilmesini ve izlenmesini sağlayan bazı şartları içerir.

4.3. Yetim İlaç Tanımlaması

Yetim ilaç tanımlaması, nadir görülen hastalık veya rahatsızlıkların tedavisine yönelik ilaçlara verilir. Bu tür ruhsat, ilaç şirketlerine, ciddi bir maddi destek olmadan mali açıdan sürdürülemeyebilecek nadir hastalıklara yönelik ilaçlar geliştirme konusunda hızlı ruhsatlama avantajları, pazar ayrıcalığı ve mali faydalar gibi teşvikler sağlar. Yetim ilaç tanımlaması, kısıtlı sağlık hizmeti alan hasta popülasyonlarına yönelik özel tedavilerin geliştirilmesini teşvik etmeyi amaçlar.

4.4. Biyobenzer Ruhsatı

Biyobenzer ruhsatı, halihazırda onaylanmış bir referans ürüne oldukça benzeyen biyolojik ürünlere verilen özel bir lisans türüdür. Biyobenzerler, referans ürüne benzerliğini göstermek için sıkı karşılaştırmalı analitik, klinik dışı ve klinik çalışmalara tabi tutulur. Bu tür bir lisans, biyofarmasötik pazarında rekabeti ve uygun fiyatı amaçlarken, referans ürünle karşılaştırılabilir güvenlik ve etkinlik sağlar.

4.5. Endikasyon Dışı Kullanım

Endikasyon dışı kullanım, bir ilacın düzenleyici otoriteler tarafından onaylanmayan bir endikasyon, hasta popülasyonu veya dozda kullanılmasını ifade eder. Endikasyon dışı kullanım resmi bir ilaç ruhsatı türü olmasa da tıpta, özellikle standart tedavilerin etkisiz veya mevcut olmadığı durumlarda yaygın bir uygulamadır. Klinisyenler, klinik tecrübelerine ve mevcut bilimsel kanıtlara dayanarak yasal olarak endikasyon dışı ilaç reçete edebilir.

5. JENERİK İLAÇLAR VE EŞDEĞER İLAÇLAR

Jenerik ilaçlar, referans ilaçlara uygun maliyetli alternatifler sağlamada, sağlık hizmetlerinin karşılanabilirliğine ve erişilebilirliğine katkıda bulunurlar. Bu ilaçlar orijinal molekülleri ile biyoeşdeğerdir, yani aynı aktif bileşenlere, güce, dozaj formuna ve uygulama yoluna sahiptirler.

Jenerik ilaçlar, düzenleyici otoriteler tarafından, markalı ilaca biyoeşdeğerlik gösterilmesi esas alınarak onaylanmaktadır. Biyoeşdeğerlik, jenerik ilaçların markalı ilaçla karşılaştırılabilir farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklere sahip olmasını ve böylece benzer terapötik etkiler göstermesini sağlar. Bu onay süreci, jenerik ilaçların uygun maliyetli alternatifler olarak pazara girmesine olanak tanıyarak rekabeti teşvik ederek ilaç harcamalarını düşürmektedir. Jenerik ilaçların mevcudiyeti hastalar, sağlık hizmeti sağlayıcıları ve ödeme kurumları için önemli maliyet tasarrufu sağlar. Jenerik ilaçlar genellikle markalı ilaçlardan daha düşük fiyatla satılır, bu da temel

ilaçları daha geniş bir nüfus için daha uygun fiyatlı ve erişilebilir hale getirir. Jenerik ilaçlardan elde edilen maliyet tasarrufları, sağlık harcamalarının azaltılmasına ve hastalar arasında ilaca uyumun iyileştirilmesine katkıda bulunur.

Jenerik ilaçların kanıtlanmış biyoeşdeğerliğine rağmen, hastaların bu ilaçları kabullenmelerine ve kullanımına ilişkin endişeler mevcuttur. Jenerik ilaçlara ilişkin daha olumlu görüşlere doğru bir değişim olsa da, devam eden olumsuz algılar hastanın uyumunu ve sonuçlarını etkileyebilir. Jenerik ilaçlardan sürekli maliyet tasarrufu ve daha iyi hasta sonuçları elde etmek için bu algıların üstesinden gelmek çok önemlidir.

Markalı ilaçla aynı olan ancak farklı bir etiket altında pazarlanan ruhsatlı jenerik ilaçların pazar dinamikleri, jenerik ilaçları da etkilemiştir. Ülkelerde yayımlanan düzenlemelerin, markalı ilaçlara ait reçetelerin yerine jenerik ilaçların ikame edilmesini etkilediği gösterilmiştir. Birçok ülkede önemli maliyet tasarrufu potansiyeli ile mümkün olduğunda jenerik ilaçları ikame etme konusunda açık motivasyonlar vardır. Bununla birlikte, düzenlemelerindeki farklılıklar, jenerik ilaç ikamesinin kapsamını etkilemektedir.

Görüldüğü gibi jenerik ilaçlar ve eşdeğer ilaçlar, uygun maliyetli ve erişilebilir sağlık hizmetlerinin desteklenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Jenerik ilaçların sağlık sistemine ve tedarik zinciri üzerine olumlu etkilerini anlamak, bunların sağlık sistemlerinde sürekli olarak bulunabilir olmasını sağlamak için çok önemlidir.

6. FARMAKOPELERİN ÖNEMİ

Farmakope, ilaç endüstrisindeki sağlık profesyonelleri, eczacılar, üreticiler ve düzenleyici otoriteler için bir referans kılavuzu olarak hizmet vermektedir. İlaç endüstrisinde ilaç kalitesi, güvenliği ve etkinliğine ilişkin standartları oluşturan ve sürdüren temel araçlardır. Bu nedenle mevzuata uygunluk, kalite güvencesi ve güvenilir ilaçların üretimi için bir temel görevi görürler. Farmakopelerin temel işlevleri şunlardır;

A) İlaç Kalitesinin Sağlanması: Farmakopeler, farmasötik ürünlerin kalitesinin tanımlanması ve korunmasında çok önemli bir rol oynamaktadır. Üreticilerin güvenli ve etkili ilaçlar üretmek için uyması gereken açık yönergeler ve standartlar sağlarlar.

B) Değiştirilebilirliği Kolaylaştırma: Sağlık uzmanları ve eczacılar, aynı aktif maddeyi içeren farklı ürünlerin birbirinin yerine geçebilmesini sağlamak ve böylece tedavi tutarlılığını artırmak için farmakopelere güvenirlere.

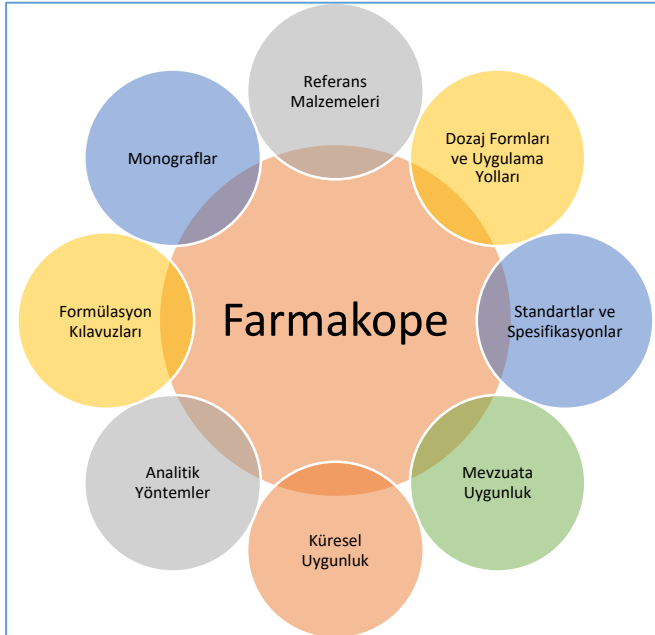
C) Mevzuata Uygunluk: Farmakope standartlarına uymak, ilaç üreticileri için yasal bir gerekliliktir. Piyasadaki ilaçların yüksek kalitede olmasını ve düzenleyici beklentileri karşılmasını sağlamaya yardımcı olur.

D) Kamu Güvenliğini Teşvik Etmek: Farmakopeler, sıkı kalite standartları belirleyerek, standartların altında veya katkı maddesi içeren farmasötik ürünlerle ilişkili riskleri en aza indirerek hastaların sağlığını ve güvenliğini korur.

E) Araştırma ve Geliştirmeyi Destekleme: Farmakopeler, araştırmacılara ve geliştiricilere yerleşik standartlar, analitik yöntemler ve formülasyonlar hakkında değerli bilgiler sağlayarak yeni ve geliştirilmiş farmasötik ürünlerin ortaya çıkmasına yardımcı olur.

Farmakopeleri içeriğini oluşturan bölümler ve terimler şu başlıklardan oluşmaktadır (Şekil 2) :

- a) Standartlar ve Spesifikasyonlar:** Farmakope, farmasötik ürünlerin kimliği, saflığı, gücü ve kalitesine ilişkin ayrıntılı standartlar ve spesifikasyonlar sağlar. Bu standartlar, ilaçların üretiminde ve kalite kontrolünde tutarlılık ve tekdüzelik sağlar.
- b) Formülasyon Kılavuzları:** Belirli kalite kriterlerini karşıladıklarından emin olmak için çeşitli farmasötik dozaj formlarının (örn. tabletler, kapsüller, şuruplar) hazırlanmasına yönelik tarifler ve prosedürleri içerir.
- c) Analitik Yöntemler:** Farmakopeler, farmasötik madde ve ürünleri test etmek ve analiz etmek için onaylanmış yöntemler içerir. Bu yöntemler belirlenen standartlara uygunluğu doğrulamak için kullanılır.
- d) Referans Malzemeleri:** Farmakopeler, analitik testlerde karşılaştırma amacıyla kullanılan referans maddeleri listeler. İyi karakterize edilmiş olan bu referanslar hammaddeler ve farmasötik ürünlerin kalitesi için referans spesifikasyonlar sağlar.
- e) Monografılar:** Bunlar, ilaçların veya farmasötik maddelerin fiziksel özellikleri, kimyasal yapıları, tanımlama testleri ve kalite spesifikasyonları dahil olmak üzere ayrıntılı açıklamalarıdır.
- f) Dozaj Formları ve Uygulama Yolları:** Farmakopeler çok çeşitli dozaj formlarını (örn. tabletler, enjeksiyonlar, merhemler) kapsar ve bunların uygun şekilde hazırlanması ve uygulanması için kılavuzlar sağlar.
- g) Mevzuata Uygunluk:** Üreticiler, ürünlerinin güvenlik ve etkililik açısından düzenleyici gereklilikleri karşıladığından emin olmak için farmakopede belirtilen standartlara uymak zorundadırlar.
- h) Küresel Uygunluk:** Birçok ülkenin kendi farmakopeleri vardır (örneğin, Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi, İngiliz Farmakopesi, Türk Farmakopesi vb.) ve ayrıca dünya çapında tanınan standartları belirleyen uluslararası farmakopeler (örneğin, Avrupa Farmakopesi) de bulunmaktadır.



Şekil 2. Farmakopeleri içeriğini oluşturan bölümler ve terimler.

7. İLAÇ SEKTÖRÜNDE PATENT VE VERİ KORUMANIN ÖNEMİ

İlaç patentleme süreci, mucitlere yeni geliştirilen bir farmasötik ürünü belirli bir süre boyunca üretme, satma ve dağıtma konusunda münhasır haklar veren yasal bir mekanizmadır. İlaç sektöründe patentler, araştırma ve geliştirmeye yapılan önemli yatırımların korunması açısından hayati öneme sahiptir.

Patentleme ile ilgili temel adımlar şu şekilde ifade edilebilir (Şekil 3).



Şekil 3. Patentleme Süreci.

A) Buluş ve Keşif: İlaç patentleme süreci, potansiyel tedavi edici etkileri olan yeni bir kimyasal bileşiğin veya biyolojik maddenin keşfi veya icat edilmesiyle başlar.

B) Patent Öncesi Araştırma ve Geliştirme: Patent başvurusu yapılmadan önce bileşiğin özelliklerinin anlaşılması, klinik öncesi çalışmaların yapılması ve klinik deneylerin başlatılması amacıyla kapsamlı araştırma ve geliştirme faaliyetleri yürütülür.

C) Patent Araştırması ve Değerlendirmesi: Bileşiğin veya maddenin yeni olduğundan, orjinal olduğundan ve patentlenebilirlik kriterlerini karşıladığından emin olmak için kapsamlı bir araştırma yapılır. Bu araştırma, mevcut patentlerin ve bilimsel literatürün gözden geçirilmesini içerir.

D) Patent Başvurusu Yapılması: Buluşun patentlenebilir olduğu tespit edildikten sonra resmi patent başvurusu hazırlanarak ilgili patent ofisine sunulur. Başvuru, ayrıntılı açıklamaları, buluşun kapsamını tanımlayan istemleri ve çoğunlukla destekleyici verileri içerir.

E) Patent İncelemesi: Patent ofisi, tüm yasal gereklilikleri karşıladığından emin olmak için başvuruyu inceler. Bu süreç, başvuru sahibi ile patent ofisi arasında inceleme sırasında ortaya çıkan konu veya soruların ele alındığı yazışmaları kapsar.

F) Patent Verme: Patent ofisi başvurunun orjinalliğinden emin olursa, mucide belirli bir süre boyunca (genellikle başvuru tarihinden itibaren 20 yıl) buluşa ilişkin münhasır haklar sağlayan bir patent belgesi verir.

G) Patent Devam Ücretleri: Patentin yürürlükte kalması için mucit, patent ofisine periyodik devam ücretleri ödemek zorundadır. Bunun yapılmaması, patentin süresinin dolmasından önce sona ermesine neden olabilir.

H) Uygulama ve Savunma: Verilen bir patentle, mucit, münhasır haklarını kullanma konusunda yasal hakka sahiptir. Bu, patenti ihlal eden kişi veya şirketlere karşı yasal işlem başlatabilecekleri anlamına gelir.

I) Veri ayrıcalığı, bir ilaç geliştiricisi tarafından sunulan klinik araştırma verilerine koruma sağlar. Bu, veri üretimine yapılan yatırımın, eşdeğer ürünler için pazar onayı arayan rakipler tarafından kullanılmasını önler.

Bir patentin son kullanma tarihi yaklaşırken, jenerik ilaç üreticileri, ilacın jenerik versiyonlarını üretmek için Kısaltılmış Yeni İlaç Başvuruları veya benzer başvurular yapabilir ve bu da hukuki anlaşmazlıklara yol açabilir.

Patent süresi sona erdikten sonra ilaç kamu alanına girer ve bu durum diğer şirketlerin ilacın jenerik versiyonlarını kısıtlama olmaksızın üretmesine ve satmasına olanak tanır.

İlaç patentleme süreci, farmasötik geliştirmenin çok önemli bir yönüdür ve mucitlere araştırma ve geliştirmeye yatırım yapma konusunda teşvik sağlar. Patent sahiplerine jenerik rakipler pazara girmeden önce araştırma ve geliştirme masraflarını karşılamalarına ve keşiflerinden potansiyel olarak kar elde etmelerine olanak tanır.

Düzenleyici münhasırlık, bir düzenleyici kurumun, patentin süresi dolduktan sonra bile bir ilacın jenerik versiyonunu onaylamaktan kaçındığı süreyi ifade eder. Bu süre, orijinal geliştiricinin yatırımlarını telafi etmek için adil bir şansa sahip olmasını sağlar.

Düzenleyici kurumlar için zorluk, patentler ve veri koruma aracılığıyla yeniliği teşvik etmek ile hastalar için uygun fiyat ve erişilebilirliği sağlamak arasında bir denge bulmakta yatmaktadır.

8. SONUÇ

Patent ve veri koruma kavramlarıyla iç içe geçmiş ilaç ruhsatlandırma süreci, farmasötik yenilikçiliğin teşvik edilmesinde etkilidir. Yatırımları korumak ve erişilebilirliği sağlamak arasında bir denge kurarak toplum hem çığır açan tedavilerden hem de uygun fiyatlı sağlık seçeneklerinden yararlanabilir. Farmasötik ortam gelişmeye devam ettikçe, düzenleyici çerçevelerde devam eden tartışmalar ve uyarlamalar, sağlık hizmetlerinin geleceğini şekillendirmede önemli bir rol oynayacaktır.

CTD, ilaç şirketlerinin düzenleyici makamlara bilgi sunması için standart bir yol görevi görerek inceleme ve onay sürecini hızlandırır. Gerekli tüm verilerin tutarlı bir formatta dahil edilmesini ve düzenlenmesini sağlamaya yardımcı olarak düzenleyici kurumların bir farmasötik ürünün güvenliğini, etkinliğini ve kalitesini değerlendirmesini kolaylaştırır.

Farmakopeler, ilaç endüstrisinde ilaç kalitesi, güvenliği ve etkinliğine ilişkin standartları oluşturan ve sürdüren temel araçlardır. Mevzuata uygunluk, kalite güvencesi ve güvenilir ilaçların üretimi için temel görevi görürler.

İlaç patentleme süreci, farmasötik geliştirmenin çok önemli bir yönüdür ve mucitlere araştırma ve geliştirmeye yatırım yapma konusunda teşvik sağlar. Jenerik rekabet pazara girmeden önce masraflarını karşılamalarına ve keşiflerinden potansiyel olarak kar elde etmelerine olanak tanır.

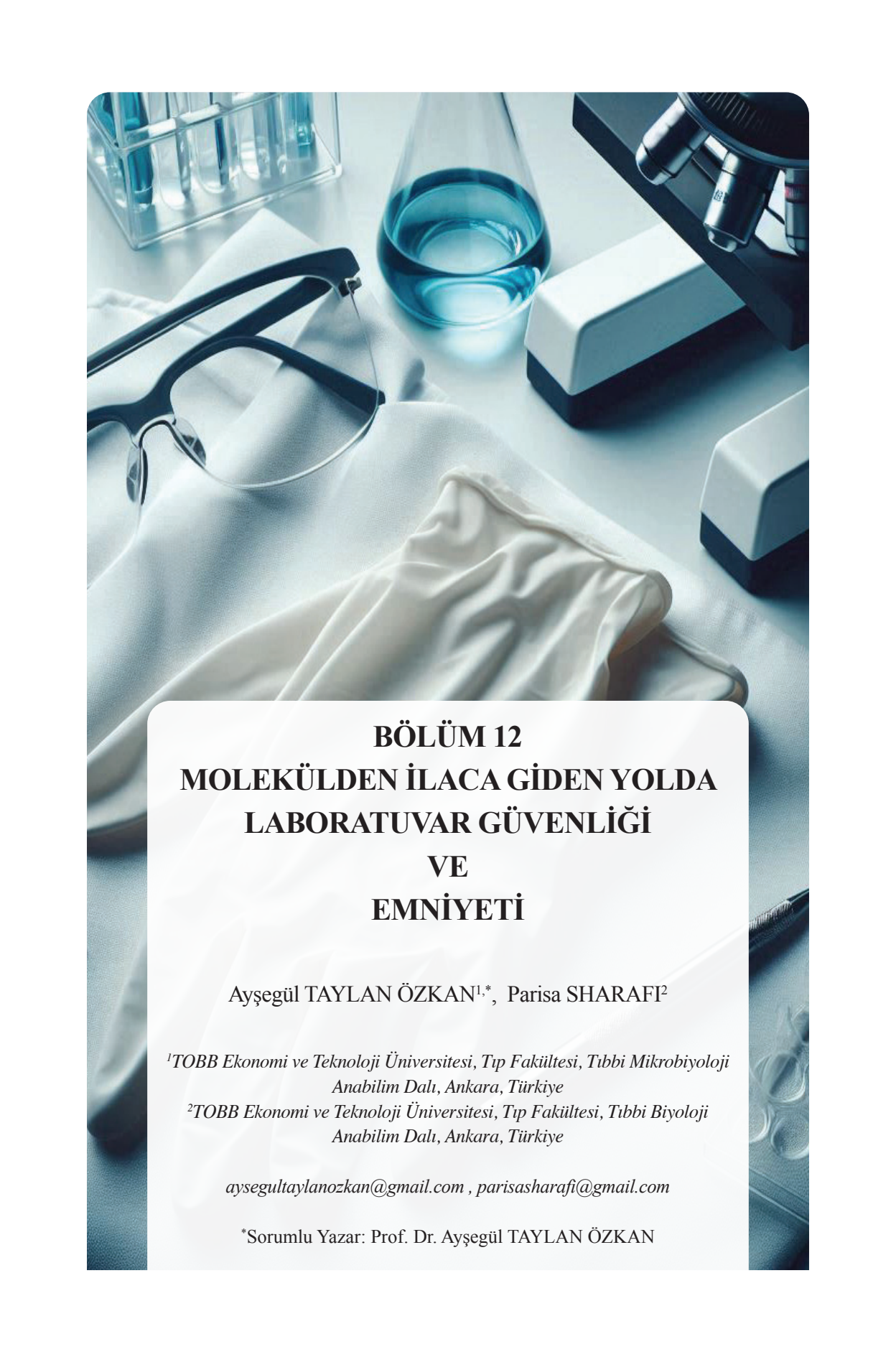
TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile "Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça" projesi tarafından desteklenmiştir. ir.

KAYNAKLAR

- Adams, T. (2020). Health professional regulation in historical context: canada, the usa and the uk (19th century to present). *Human Resources for Health*, 18(1).
- Alfaro, V., Cullell-Young, M., & Tanovic, A. (2007). Abbreviated clinical study reports with investigational medicinal products for human use: current guidelines and recommendations. *Croatian Medical Journal*, 48(6), 871-877.
- Andrade, S., Santos, P., Andrade, P., & Silva, W. (2020). Unlicensed and off-label prescription of drugs to children in primary health care: a systematic review. *Journal of Evidence-Based Medicine*, 13(4), 292-300.
- Bailey, R. (2018). Current regulatory guidelines and resources to support research of dietary supplements in the united states. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(2), 298-309.
- Balasingam, S., Meillon, S., Chui, C., Mann, A., La, C., Weller, C., ... & Smith, E. (2022). Human infection studies: key considerations for challenge agent development and production. *Wellcome Open Research*, 7, 140.
- Brown, J., Kuldorff, M., Chan, K., Davis, R., Graham, D., Pettus, P., ... & Platt, R. (2007). Early detection of adverse drug events within population-based health networks: application of sequential testing methods. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 16(12), 1275-1284.
- Bujosa, A., Molto, C., Hwang, T., Tapia, J., Vokinger, K., Templeton, A., ... & Tibau, A. (2021). Associations with definitive outcomes and clinical benefit of cancer drugs at the time of marketing approval and in the postmarketing period. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 19(13), 117-125.
- Chikowe, I., Osei-Safo, D., Harrison, J., Konadu, D., & Addae-Mensah, I. (2015). Post-marketing surveillance of anti-malarial medicines used in malawi. *Malaria Journal*, 14(1).
- Cox, E., Edmund, A., Kratz, E., Lockwood, S., & Shankar, A. (2020). Regulatory affairs 101: introduction to expedited regulatory pathways. *Clinical and Translational Science*, 13(3), 451-461.
- Crosbie, E., Erinoso, O., Perez, S., & Sebrí, E. (2022). Moving in the right direction: tobacco packaging and labeling in the americas. *Revista Panamericana De Salud Pública*, 46, 1.
- Demirci, E., Omes-Smit, G., & Zwiars, A. (2023). Clinical development time is shorter for new anticancer drugs approved via accelerated approval in the us or via conditional approval in the eu. *Clinical and Translational Science*, 16(7), 1127-1133.
- Dietz, A., Padley, D., & Gastineau, D. (2007). Infrastructure development for human cell therapy translation. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(3), 320-324.
- Downing, N., Aminawung, J., Shah, N., Braunstein, J., Krumholz, H., & Ross, J. (2012). Regulatory review of novel therapeutics - comparison of three regulatory agencies. *New England Journal of Medicine*, 366(24), 2284-2293.
- Gouveia, B., Rijo, P., Gonçalves, T., & Reis, C. (2015). Good manufacturing practices for medicinal products for human use. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 7(2), 87.
- Gyawali, B., Hey, S., & Kesselheim, A. (2019). Assessment of the clinical benefit of cancer drugs receiving accelerated approval. *Jama Internal Medicine*, 179(7), 906.
- Gálvez-Martín, P., Sabata, R., Vergés, J., Zugaza, J., Ruiz, A., & Clares, B. (2016). Mesenchymal stem cells as therapeutics agents: quality and environmental regulatory aspects. *Stem Cells International*, 2016, 1-14.
- Hammond, D. (2011). Tobacco packaging and labeling policies under the u.s. tobacco control act: research needs and priorities. *Nicotine & Tobacco Research*, 14(1), 62-74.
- Hasso-Agopsowicz, M., Crowcroft, N., Biellik, R., Gregory, C., Menozzi-Arnaud, M., Amorij, J., ... & Giersing, B. (2022). Accelerating the development of measles and rubella microarray patches to eliminate measles and rubella: recent progress, remaining challenges. *Frontiers in Public Health*, 10.
- Higgins, C., Kobia, B., & Ozawa, S. (2023). Comparing the return on investment of technologies to detect substandard and falsified amoxicillin: a kenya case study. *Plos One*, 18(1), e0268661.
- Hua, S., Matos, M., Metselaar, J., & Storm, G. (2018). Current trends and challenges in the clinical translation of nanoparticulate nanomedicines: pathways for translational development and commercialization. *Frontiers in Pharmacology*, 9.
- Ito, S., Hidaka, Y., Inoue, N., Kaname, S., Kato, H., Matsumoto, M., ... & Kubo, S. (2018). Safety and effectiveness of eculizumab for pediatric patients with atypical hemolytic-uremic syndrome in japan: interim analysis of post-marketing surveillance. *Clinical and Experimental Nephrology*, 23(1), 112-121.
- Jaiswal, M. (2018). Riluzole and edaravone: a tale of two amyotrophic lateral sclerosis drugs. *Medicinal Research Reviews*, 39(2), 733-748.
- Kourgiantakis, T., Ashcroft, R., Mohamud, F., Benedict, A., Lee, E., Craig, S., ... & Sur, D. (2022). Clinical social work practice in canada: a critical examination of regulation. *Research on Social Work Practice*, 33(1), 15-28.

- Lee, K., Bacchetti, P., & Sim, I. (2008). Publication of clinical trials supporting successful new drug applications: a literature analysis. *Plos Medicine*, 5(9), e191.
- Leo, C., Hentschel, B., Szucs, T., & Leo, C. (2020). Fda and ema approvals of new breast cancer drugs-a comparative regulatory analysis. *Cancers*, 12(2), 437.
- Mahuli, A., Mahuli, S., Patil, S., & Bhandi, S. Institutional ethics committee regulations and current updates in india. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 18(8), 738-741.
- McPhail, M., Weiss, E., & Bubela, T. (2022). Conditional drug approval as a path to market for oncology drugs in canada: challenges and recommendations for assessing eligibility and regulatory responsiveness. *Frontiers in Medicine*, 8.
- Mysler, E., Pineda, C., Horiuchi, T., Singh, E., Mahgoub, E., Coindreau, J., ... & Jacobs, I. (2016). Clinical and regulatory perspectives on biosimilar therapies and intended copies of biologics in rheumatology. *Rheumatology International*, 36(5), 613-625.
- Naci, H., Lehman, R., Wouters, O., Goldacre, B., & Yudkin, J. (2015). Rethinking the appraisal and approval of drugs for type 2 diabetes. *BMJ*, h5260.
- Nayak, R., Avorn, J., & Kesselheim, A. (2019). Public sector financial support for late stage discovery of new drugs in the united states: cohort study. *BMJ*, l5766.
- Ndomondo-Sigonda, M., Miot, J., Naidoo, S., Dodoo, A., & Kaale, E. (2017). Medicines regulation in africa: current state and opportunities. *Pharmaceutical Medicine*, 31(6), 383-397.
- Pandolfini, C. and Bonati, M. (2005). A literature review on off-label drug use in children. *European Journal of Pediatrics*, 164(9), 552-558.
- Pawar, K., Gore, R., & Palekar, S. (2023). A review on approval process and regulation of medical devices as per us fda and cdsc. *International Journal of Drug Regulatory Affairs*, 11(1), 61-70.
- Rafi, N., Ds, S., & Narayanan, A. (2018). Regulatory requirements and registration procedure for generic drugs in usa. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 52(4), 544-549.
- Schnog, J., Samson, M., Gans, R., & Duits, A. (2021). An urgent call to raise the bar in oncology. *British Journal of Cancer*, 125(11), 1477-1485.
- Sivagourounadin, K., Ravichandran, M., & Rajendran, P. (2021). National guidelines for gene therapy product (2019): a road-map to gene therapy products development and clinical trials. *Perspectives in Clinical Research*, 12(3), 118.
- Steiger, R., Lübbecke, A., Paxton, E., Steenbergen, L., & Wilkinson, M. (2023). Identification of implant outliers in joint replacement registries. *Efort Open Reviews*, 8(1), 11-17.
- Torii, H., Terada, T., Matsukawa, M., Takesaki, K., Ohtsuki, M., & Nakagawa, H. (2015). Safety profiles and efficacy of infliximab therapy in japanese patients with plaque psoriasis with or without psoriatic arthritis, pustular psoriasis or psoriatic erythroderma: results from the prospective post-marketing surveillance. *The Journal of Dermatology*, 43(7), 767-778. [4](#)
- Wolff-Holz, E., Tiiiso, K., Vleminckx, C., & Weise, M. (2019). Evolution of the eu biosimilar framework: past and future. *Biodrugs*, 33(6), 621-634.
- Zhou, Y., Lu, Z., Yang, Z., Li, H., & Chen, Y. (2019). Overseeing health care facilities in shanghai, china: regulatory regime, activities and challenges of the governmental regulatory system. *International Journal for Equity in Health*, 18(1).



BÖLÜM 12

MOLEKÜLDEN İLACA GİDEN YOLDA LABORATUVAR GÜVENLİĞİ VE EMNİYETİ

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN^{1,*}, Parisa SHARAFI²

*¹TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye*

*²TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji
Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye*

aysegultaylanozkan@gmail.com , parisasharafi@gmail.com

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN



1. GİRİŞ

Laboratuvarlar, sağlık, ilaç, biyoteknoloji, kimya ve akademi gibi çeşitli alanlarda araştırma, teşhis, üretim ve geliştirmede kritik bir rol oynar. Laboratuvar güvenliği, sadece bir kontrol veya kurallar listesi değil aynı zamanda molekülün ilaca giden yolda biyomedikal alandaki çalışmaların temel ilkesidir ve farmasötik üretim hattında yer alan herkes için kritik öneme sahiptir. Laboratuvarlardaki malzemelerin, verilerin ve ekipmanların hassas yapısı aynı zamanda emniyet konusunu da önemli bir endişe kaynağı haline getirmektedir. Etkili laboratuvar güvenlik ve emniyet önlemleri yalnızca personeli ve araştırmayı korumakla kalmaz, aynı zamanda yanlış kullanılan kimyasallar, biyolojik ajanlar ve potansiyel olarak tehlikeli maddelerle ilişkili çevresel ve halk sağlığı risklerini de önler.

Bu bölümde sağlığımızı, çalışma arkadaşlarımızı, toplumu ve çevreyi riske atmadan bilgi üretme ve ürün elde etme sürecinin nasıl yürütülebileceğine odaklanılacaktır. Bu kapsamda laboratuvar güvenliğinin temel ilkeleri yanı sıra laboratuvar emniyeti konuları ele alınacaktır.

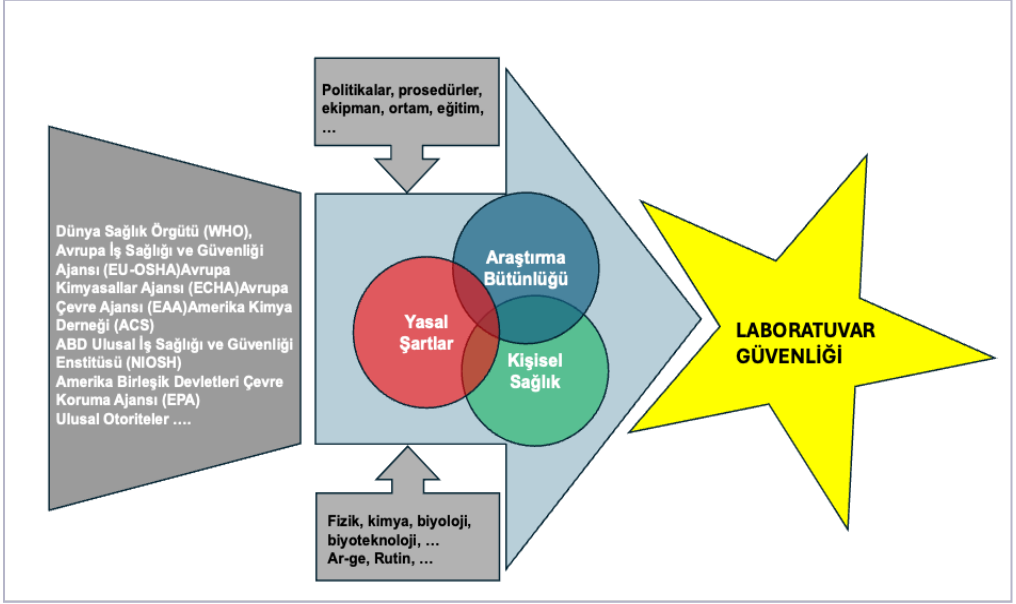
2. LABORATUVAR GÜVENLİĞİNİN ÖNEMİ

Laboratuvar güvenliği, rutin çalışmalar yanı sıra bilimsel araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin yürütüldüğü laboratuvar ortamında çalışanların sağlığını, güvenliğini yanı sıra çevreyi korumayı amaçlayan önlemleri kapsayan kritik bir konudur. Laboratuvar ortamı kimya, biyoloji, tıp, mühendislik ve diğer disiplinlerde çalışan araştırmacılar için temel bir çalışma alanıdır. Ancak, laboratuvarlarda kullanılan kimyasallar, biyolojik maddeler, ekipmanlar ve diğer malzemeler potansiyel olarak tehlikelidir ve ciddi kazalara neden olabilir. Bu kapsamda laboratuvar güvenliği herhangi bir laboratuvar çalışmasına başlamadan önce dikkatle planlamayı, uygun ekipman ve koruyucu önlemleri kullanmayı ve çalışanların eğitilmesini gerektirir.

Laboratuvar güvenliği ilkesel olarak üç ana noktaya odaklanır (Şekil 1):

- a) **Kişisel sağlığın korunması:** Laboratuvarlarda kimyasal maddelerin solunması, yanıcı-patlayıcı maddelerin kullanımı, biyolojik ajanlarla temas, radyasyona maruziyet gibi bir çok riskler bulunur. Laboratuvar güvenliği kişinin sağlığını tehdit eden bu potansiyel tehlikelerden korunmasını ve çalışanların maruziyetinin azaltulmasını amaçlar.
- b) **Araştırma bütünlüğünün korunması:** Güvenlik prosedürleri, araştırma projelerini aksatabilecek ve yanlış sonuçlara yol açabilecek kazaların önlenmesine yardımcı olur. Bu önlemler; deneylerin doğru ve güvenli bir şekilde yürütülmesini ve veriler ile sonuçların güvenilirliğini sağlar.
- c) **Yasal şartlara uyulması:** Hem araştırma hem de rutin laboratuvarlar bir takım mevzuata tabidir. Laboratuvar çalışmalarının ilgili mevzuata uyumunun sağlanması, laboratuvarın faaliyetlerini yasal olarak yürütmesini ve herhangi bir cezai veya hukuki sorumluluğa maruz kalmasını önler.

Laboratuvar güvenliği konusunda laboratuvar güvenliği politikaları, prosedürleri, ekipmanları, eğitimleri gibi konuları ele alan geniş kapsamlı bir literatür bulunmaktadır. Örneğin, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Amerika Kimya Derneği (ACS) gibi profesyonel kuruluşlar, laboratuvar güvenliği konusunda kılavuzlar ve kaynaklar sunmaktadır. Ayrıca, Ulusal İş Sağlığı ve Güvenliği Enstitüsü (NIOSH) ve Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Ajansı (EPA) gibi federal kurumlar da laboratuvar güvenliğiyle ilgili kılavuzlar ve yönergeler sağlamaktadır. Bu kaynaklar, laboratuvar güvenliği alanında en son bilimsel ve teknik gelişmeleri yansıtmaktadır ve laboratuvar çalışanlarının güvenliğini ve sağlığını korumak için önemli bir başvuru kaynağıdır.



Şekil 1. Laboratuvar güvenliğinin temel unsurlarına genel bakış.

3. LABORATUVAR ORTAMI

Laboratuvar ortamı, bilimsel araştırmaların yapıldığı, deneylerin gerçekleştirildiği ve verilerin analiz edildiği merkezi bir alandır. Kimya, biyoloji, fizik ve diğer disiplinlere özgü farklı laboratuvar türleri vardır ve her birinin kendine özgü uygulamaları, ekipmanları ve riskleri bulunmaktadır. Örneğin, kimya laboratuvarlarında uçucu kimyasalların kullanımı nedeniyle patlama ve yanma gibi tehlikeler söz konusu olabilirken, biyoloji laboratuvarlarında patojenik mikroorganizmalarla enfeksiyon kapma riski vardır. Fizik laboratuvarlarında ise yüksek güçlü cihazların kullanımı elektrik şokları veya mekanik yaralanma riski doğurabilir. Bu farklı laboratuvar ortamlarında karşılaşılabilecek potansiyel tehlikeleri tanımak, uygun önlemleri alarak riski azaltmak en önemli adımlardır. Bilgiye dayalı bu yaklaşım, güvenli ve verimli bir laboratuvar ortamı sağlamanın yanı sıra bilimsel çalışmaların bütünlüğünü ve araştırmacıların sağlığını da korur.



Şekil 2. Laboratuvar güvenlik ekipmanları.

4. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ NEDEN GEREKLİDİR?

Gündemde sıklıkla yer almasa da laboratuvarlar aslında son derece tehlikeli çalışma ortamlarıdır. Laboratuvar kazaları nedeniyle sadece rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışan personelin %2 ila 4'ünün kapıldıkları malta humması, tüberküloz gibi tehlikeli patojenler nedeniyle hayatını kaybettiği bildirilmektedir. Bu nedenle laboratuvar güvenliği laboratuvar ortamında çalışan herkes için aynı zamanda da toplum ve çevre açısından da hayati bir konudur.

- a) **Kişisel Güvenliğin Sağlanması:** Laboratuvarlarda çalışan bireylerin kişisel güvenliği, laboratuvar güvenliğinin en temel ve öncelikli kaygılarından biridir. Kimyasallar, radyoaktif maddeler, biyolojik ajanlarla veya tehlikeli ekipmanlarla çalışırken uygun güvenlik önlemlerinin alınması kişisel yaralanmaları ve bulaşları önleyerek çalışanların sağlığını korur.
- b) **Toplum Sağlığı ve Güvenliğinin Korunması:** Laboratuvarlar sadece çalışan personelin kendisi için değil çalışma arkadaşları, ailesi ve toplum açısından da riskler taşımaktadır. Laboratuvar ortamındaki zehirli atıklar, mikrobiyolojik ajanlar, radyoaktif maddeler laboratuvar çalışanlarını etkileyebileceği gibi yakınlarına da zarar verebilir. Ayrıca laboratuvarlarda kötüye kullanım potansiyeli olan bir çok materyal de bulunmaktadır. Bu materyallere izinsiz erişimin, çalınmasının ve suç amacıyla kullanılmasının engellenmesi için önlemler alınmalıdır.
- c) **Çevrenin Korunması:** Laboratuvarlarda kullanılan kimyasallar, sarf malzemeler ve diğer atıklar çevreye zarar verebilecek potansiyele sahiptir. Uygun bir atık yönetimi ve tehlikeli maddelerin güvenli depolanması çevresel kirliliği önler ve doğal yaşamı korur. Bu hem yerel hem de küresel düzeyde çevre koruma standartlarına mevzuatsal uyum açısından da kritiktir.
- d) **Ekipman ve Altyapının Korunması:** Laboratuvar ekipmanları genellikle yüksek maliyetlidir ve genellikle başka ülkelerden ithal edilmektedir. Dikkatsizlik veya güvenlik

önlemlerine uyulmaması milli kaynak statüsündeki bu cihazların zarar görmesine yol açabilir. Doğru kullanım, bakım ve temizlik, ekipmanın ömrünü uzatır ve gereksiz tamirat, yeniden edinme gibi masrafların önüne geçerek ulusal kaynakların heba edilmesini önlemiş olur.

- e) **İtibar ve Finansman:** Herhangi bir laboratuvardaki ciddi bir kaza veya güvenlik ihlalleri, o kurumun itibarını ciddi şekilde zedeler. Diğer yandan dış finansman kaynak sunucularının da güveni sarsar. Laboratuvar güvenliğine yönelik uygulamaların sürdürülmesi bir yandan profesyonellik ve etik standartların gözetildiğini gösterirken diğer yandan kurumun itibarını koruyarak gelecekteki araştırma finansmanı fırsatlarını artırabilir.

Tüm bu faktörler, laboratuvar güvenliğinin sadece iş sağlığı ve güvenliği değil, aynı zamanda çevresel ve kurumsal etkileri açısından da önemli olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, laboratuvarlarda güvenlik kültürünün geliştirilmesi ve korunması, her seviyede çalışanlar için bir öncelik olmalıdır.

5. LABORATUVAR GÜVENLİĞİ KONTROLÜ HİYERARŞİSİ

Laboratuvar çalışmalarında güvenliği sağlamak için alınması gereken önlemler dört seviyeli bir kontrol hiyerarşisi ile yapılandırılmıştır. Bu kontrol hiyerarşisinin en üst katmanı en etkili olanını içerirken aşağıya doğru indikçe etki gücü azalır. Ancak laboratuvar çalışanlarının güvenliğini sağlamak için çok yönlü bir yaklaşım gerekir ve genellikle birden fazla strateji bir arada kullanılır.

Laboratuvar güvenliği kontrol hiyerarşisi şu katmanlardan oluşur:

- a) **Eleme/Değiştirme:** Tehlikeleri önlemenin en etkili yolu, onları tamamen ortadan kaldırmak veya daha az tehlikeli alternatiflerle değiştirmektir. Örneğin, etidyum bromür gibi kanserojen ve toksik bir kimyasalın daha az zararlı bir maddeyle değiştirilmesi, tehlikeli maddelerin kullanımına bağlı riskleri önemli ölçüde azaltarak laboratuvar güvenliğini artırır. Bu yaklaşım, mümkün olduğunda dikkate alınmalıdır ancak eleme/değiştirme stratejisini uygulamak her zaman olası değildir. Söz gelimi Kırım Kongo Kanamalı Ateşi Virüsü, kuduz, şarbon gibi bazı tehlikeli patojenlerle çalışan araştırmacılar bulunmaktadır.
- b) **Mühendislik Kontrolleri:** Mühendislik kontrolleri, tehlikelere maruz kalmayı en aza indiren güvenlik özelliklerinin ve ekipmanlarının tasarlanması ve uygulanmasını içerir. Bu yöntem tehlikenin kaynağını kontrol ederek çalışanları korur. Örneğin, kimyasal çekerocaklar, biyogüvenlik kabinleri veya HEPA filtreli havalandırma sistemleri, tehlikeli buharları, gazları, patojenleri uzaklaştırarak çalışanların sağlığını korur.
- c) **İdari Kontroller:** Güvenli laboratuvar uygulamalarına rehberlik eden politikalar, prosedürler ve eğitimler idari kontrollerin kapsamındadır. Bu kontrol seviyesi, işyerinde güvenliği teşvik eden ve düzenleyen kuralların ve yönergelerin oluşturulmasını içerir. Örneğin, laboratuvar güvenlik protokolleri, giriş-çıkış önlemleri çalışanların güvenli çalışma uygulamalarını anlamalarına ve uygulamalarına yardımcı olur.
- d) **Kişisel Koruyucu Ekipman (KKE):** KKE'ler tehlikelerin ortadan kaldırmadığı veya kontrol edilemediği durumlarda çalışanları korur. Laboratuvar önlükleri, eldivenler, koruyucu gözlükler ve solunum maskelerini içerir. KKE kullanımı çalışanların kişisel güvenliğini sağlamak için önemliyse de mutlaka eğitim ile desteklenmelidir. Bu ekipmanların hangi durumlarda ve nasıl giyilip çıkartılacağı gerekiyorsa nasıl imha edileceği öğretilmelidir. Yapılan işe uygun ekipman sağlanması da çok önemlidir.

Sözgelimi lateks eldivenler biyolojik materyalle çalışmaya uygun iken nitril eldivenlerle hem biyolojik ajanlar hem de güçlü oksitleyiciler ve aromatik çözücüler dışındaki kimyasallarla çalışmak mümkündür.

6. GENEL LABORATUVAR GÜVENLİĞİ UYGULAMALARI

Genel laboratuvar güvenliği uygulamaları ile olası tehlikeleri en aza indirmeye ve çeşitli riskleri azaltmaya odaklanarak laboratuvar ortamında çalışan herkesin güvenliğinin sağlanmasına çalışılır. Bu genel laboratuvar güvenliği uygulamaları, çalışanların güvenliğini sağlamak ve laboratuvar ortamında etkin ve verimli bir şekilde çalışmalarını sağlamak için önemlidir (Şekil 2).

Bu uygulamalarının bazı detayları ve önemli noktaları aşağıda verilmiştir:

6.1. Risk Değerlendirmesi

Herhangi bir deney veya aktiviteye başlamadan önce bir risk değerlendirmesi şarttır. Bu süreç potansiyel tehlikeleri belirler ve olayların olasılığını ve ciddiyetini değerlendirir. Uygun bir risk değerlendirmesinde, kullanılan maddeler, ekipman, izlenen prosedürler, çalışan personel dahil olmak üzere tüm değişkenleri dikkate alır. Bu kapsamda öncelikle tehlikeler belirlenir. Kimyasal, biyolojik, mekanik ve elektriksel riskler dahil olmak üzere laboratuvardaki tüm potansiyel tehlikeler gözden geçirilir. Akabinde riskler değerlendirilir. Maruz kalma veya kaza olasılığı ve bunların potansiyel sonuçları analiz edilir. Eleme/değiştirme, mühendislik kontrolleri, idari kontroller ve kişisel koruyucu ekipman da dahil olmak üzere riskleri azaltmak için hangi hiyerarşik düzeyde kontrol önlemleri alınması gerektiğine karar verilir ve uygulanır.

6.2. Acil Durum Prosedürleri ve Olayların Raporlanması

Laboratuvarlar, yangın veya kimyasal sızıntı gibi kazalar, yaralanmalar ve olaylarla başa çıkmak için net acil durum prosedürlerine sahip olmalıdır. Bu prosedürler tüm laboratuvar personeli tarafından kolayca erişilebilir ve anlaşılabilir olmalıdır. Ayrıca laboratuvar çalışanları laboratuvarda bulunan acil durum ekipmanlarının yerlerine ve nasıl kullanılacağına da hakim olmalıdır. Yangın söndürücüler, göz yıkama istasyonları ve güvenlik duşları gibi ekipmanların yerini ve doğru kullanımını öğrenmek hayat kurtarıcıdır.

- **Acil Durum Ekipmanı:** Yangın söndürücülerin, göz yıkama istasyonlarının ve güvenlik duşlarının erişilebilir alanlarda bulunduğundan ve düzenli olarak denetlendiğinden emin olun.
- **Tahliye Rotaları:** Tüm personel yangın veya büyük ölçekli acil durumlarda tahliye rotaları ve toplanma noktalarına aşina olmalıdır.
- **Olay Bildirimi:** Herhangi bir laboratuvar olayı veya kaza, derhal raporlanmalıdır. Burada amaç olayın sorumlularını cezalandırmak değil risk değerlendirmesi yapmak için veri toplamaktır. Bir olay her gün oluyor ve ciddi bir yaralanma ile sonuçlanıyorsa burada risk kabul edilemez. Raporlanan olaylara yönelik analizler gelecekte benzer olayların önlenmesine yardımcı olur.

6.3. Kurumsal Kaynaklar ve Destekler ile Güvenlik Eğitimi

Laboratuvar çalışanları ihtiyaç duyduklarında, kurumdaki laboratuvar güvenliği konusundaki kaynaklara ve desteklere (güvenlik görevlileri, ilk yardım, güvenlik kılavuzları) kolaylıkla erişebilmelidir. Bu kaynaklar laboratuvar güvenliği konusunda rehberlik sağlamalarının yanı sıra acil durumlarda da yardımcı olur.

Tüm laboratuvar çalışanları, güvenli çalışma uygulamaları, kimyasal madde kullanımı, ekipman kullanımı ve acil durum prosedürleri gibi konularda uygun eğitim almalıdır. Bu eğitimler, güvenlik bilincini artırır ve kazaların önlenmesine yardımcı olur. Bu temel eğitimlerin yanında çalışılan materyale ve ortama özgü olarak da ek eğitimler düzenlenmelidir. Sözcüğü biyolojik materyalle çalışanlar için biyogüvenlik eğitimi, nükleer malzemelerle çalışanlar için radyasyon güvenliği gibi. Ayrıca eğitimlerin bir kez verilmesi yeterli değildir. Sürekli öğrenmeyi sağlayacak bir ortam yaratılmalıdır.

6.4. Kişisel Koruyucu Ekipman

Bireyleri tehlikelerden korumada son savunma hattıdır. KKE'ler riskleri ortadan kaldıramasa da kimyasal sıçramalar, biyolojik ajanlar veya keskin nesnelere gibi tehlikelere maruz kalmayı önemli ölçüde azaltır. KKE seçimi, risk değerlendirmesine göre belirlenir. Temel KKE'ler:

- Laboratuvar önlükleri, cildi ve giysileri dökülmelerden ve sıçramalardan korur.
- Eldivenler, kimyasallar ve biyolojik ajanlar dahil olmak üzere tehlikeli maddelere karşı bir bariyer sağlar.
- Güvenlik gözlükleri veya yüz siperleri, kimyasal sıçramalar, toz veya atıklardan kaynaklanan göz yaralanmalarını önler.
- Solunum cihazları, havalandırmanın yetersiz olduğu durumlarda zehirli duman veya partiküllerin solunmasına karşı koruma sağlar.

6.5. Kimyasal Güvenlik

Kimyasallar laboratuvarlarda önemli bir risk kaynağıdır. Kimyasal güvenliği, kazaları önlemek için maddelerin uygun şekilde elleçlenmesi, depolanması, etiketlenmesi ve bertaraf edilmesini içerir. Tüm laboratuvarlarda kimyasal maddeler kullanılmakta olduğundan bu konu hem çalışanlar hem de yöneticilerce önemsenmelidir. Bazı temel uygulamalar şunlardır:

- **Kimyasal Etiketleme:** Tüm kimyasallar, kimlikleri, tehlike sınıflandırmaları ve uygun elleçleme talimatları ile açıkça etiketlenmelidir. Kullanılan kimyasalların Malzeme Güvenlik Bilgi Belgesi (MSDS)'ne kolayca erişilebilmelidir. MSDS'ler kimyasal özellikler, tehlikeler ve ilk yardım önlemleri hakkında bilgi sağlamak için önemlidir.
- **Depolama:** Tehlikeli reaksiyonları önlemek için uyumsuz kimyasallar ayrı ayrı depolanmalıdır (örneğin, asitler bazlarla birlikte depolanmamalıdır). Kimyasallar ayrıca isimlerine göre değil tehlike sınıflarına ve uçuculuklarına göre depolanmalıdır. Aksi takdirde yanıcı-patlayıcı-parlayıcı malzemelerin bir araya gelmesi ve risk yaratması söz konusu olabilir.

- **Havalandırma:** Uçucu kimyasallarla çalışma, inhalasyon risklerini en aza indirmek için davlumbazlarda yapılmalıdır.
- **Sızıntı Kontrolü:** Laboratuvarlarda dökülme kitleri hazırda bulunmalı ve personel kimyasal sızıntılara uygun şekilde nasıl müdahale edileceği konusunda eğitilmelidir.

6.6. Biyolojik Güvenlik

Bazı araştırmalarda insan, hayvan kaynaklı biyolojik materyalle ve hatta enfektif ajanlarla çalışılması söz konusu olabilir. Bu durumda uygun biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır. İyi mikrobiyoloji teknikleri uygulanarak aerosol oluşumundan kaçınılması, mikroorganizmaların güvenli bir şekilde muhafaza edilmesi, imhası gibi konular biyolojik güvenlik kavramı içerisinde yer alır.

Biyolojik ajanların işlendiği laboratuvarlarda, kontaminasyonu, enfeksiyonu ve patojenlerin ortama salınmasını önlemek için biyogüvenlik çok önemlidir. Biyogüvenlik, çalışanları ve halkı korumak için mikroorganizmalar, dokular veya diğer biyolojik materyallerle kontrollü bir şekilde çalışmayı kapsar.

- **Biyogüvenlik Seviyeleri (BSL):** Laboratuvarlar, kullanılan biyolojik ajanlarla ilişkili risk seviyesine bağlı olarak Biyogüvenlik Seviyeleri (BSL) 1-4 olarak kategorize edilir. BSL-1 en düşük risk seviyesidir, BSL-4 ise Ebola virüsü gibi son derece bulaşıcı ve ölümcül patojenleri işler.
- **Kontrol Uygulamaları:** Biyogüvenlik kabinlerinin kullanımı, biyolojik tehlikelerin kontrol altında tutulmasını ve laboratuvar ortamına salınmamasını sağlar.
- **Dekontaminasyon:** Yüzeylerin, ekipmanların ve atıkların düzenli olarak dekontaminasyonu, çapraz kontaminasyon ve enfeksiyon riskini azaltır. Otoklavlama ve kimyasal dezenfektanlar yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir.

6.7. Ekipman Güvenliği

Laboratuvar ekipmanlarının doğru kullanılması ve bakımı hem uzun ömürlü olmasını hem de üretilen sonuçların doğru olmasını sağlar. Ekipman arızaları derhal bildirilmeli ve onarılmalıdır. Ekipmanların kayıtları oluşturulmalı ve düzenli olarak takipleri gerçekleştirilmelidir.

Laboratuvar ekipmanlarının güvenli kullanımı için:

- Üretici talimatlarını ve laboratuvar protokollerini izleyin.
- Kullanmadan önce uygun eğitimi aldığınızdan emin olun.
- Her zaman gerekli KKE'yi (Kişisel Koruyucu Ekipman) giyin.

Bakım ve Kalibrasyon için:

- Doğruluğunu sağlamak için ekipmanı düzenli olarak bakımını yapın ve kalibre edin.
- Bir bakım günlüğü tutun ve kontrolleri planlayın.

Ekipman Arızalarını Bildirme için:

- Herhangi bir sorunu veya arızayı derhal bildirin.
- Onarılmaya veya değiştirilmeye kadar arızalı ekipmanı kullanmayın.
- Gelecekte başvurmak üzere arızaların uygun şekilde belgelenmesini sağlayın.

6.8. Kişisel Temizlik

Kişisel hijyenin korunması, laboratuvar güvenliğinin sağlanması açısından son derece önemlidir. Ellerin düzenli olarak ve usulüne uygun şekilde yıkanması ve laboratuvar çalışmaları sırasında yüz, ağız ve gözlere dokunmaktan kaçınılması gerekir. Laboratuvar ortamında makyaj yapma, lens takma gibi davranışlardan kaçınılmalıdır. Saçlar toplu olmalıdır. Laboratuvarda kullanılan KKE'lerle dış ortamda dolaşılmalıdır.

Kişisel hijyen, güvenli bir laboratuvar ortamının sürdürülmesinde kritik bir rol oynar. Uygun hijyen, bireyi yalnızca zararlı maruziyetlerden korumakla kalmaz, aynı zamanda deneylerin, laboratuvar ekipmanlarının ve genel çalışma ortamının kirlenmesini de önler. Kişisel hijyenin laboratuvar güvenliğinde önemli olmasının temel nedenleri aşağıdadır:

- **Kontaminasyonu Önleme:** Kimyasalları veya biyolojik malzemeleri yıkanmamış ellerle tutmak, diğer laboratuvar personelinin daha sonra temas edebileceği yüzeyleri veya maddeleri kirlitebilir. Kötü kişisel hijyen, numunelerin, reaktiflerin veya ekipmanların kirlenmesine yol açabilir, oluşan çapraz kontaminasyon potansiyel olarak deneyleri mahvedebilir veya yanlış sonuçlar verebilir. Mikrobiyoloji ve biyolojik laboratuvarlarda, kişisel hijyen, hem laboratuvarın içinde hem de dışında mikroorganizmaların veya biyolojik etkenlerin kazara yayılmasını önlemek için esastır.
- **Tehlikeli Maddelere Maruziyeti Azaltma:** Kimyasallarla çalıştıktan sonra ellerinizi yıkamadan yüzünüze, gözlerinize veya ağızınıza dokunmak zararlı maddelerin yutulmasına veya emilmesine yol açabilir. Kimyasallar ve tehlikeli maddeler ciltte, saçta veya giysilerde kalabilir ve yanlışlıkla yutulursa, solunursa veya emilirse oluşan kimyasal maruziyet kişiye zarar verebilir. Kimyasalları, numuneleri veya tehlikeli maddeleri kullanmadan önce ve sonra elleri yıkamak maruz kalma riskini azaltır. Laboratuvar önlüğü giymek kişisel kıyafetleri kimyasal dökülmelerden veya sıçramalardan korur, ancak laboratuvarı ayırmadan önce kirli kıyafetleri çıkarmak tehlikelerin yayılmasını önlemek için çok önemlidir.
- **Hastalık Bulaşımı Önleme:** Patojenlerle çalışan bir laboratuvarı, yetersiz hijyen, virüslerin veya bakterilerin kendinize veya başkalarına kazara bulaşmasına neden olabilir. Bulaşıcı malzemelerle çalışan laboratuvarlarda, el yıkama ve kişisel koruyucu ekipman (KKE) kullanımı gibi uygun hijyen, hastalığın yayılmasını önlemede esastır. Elleri yüz, göz ve ağızdan uzak tutmak, bulaşıcı etkenlerin bulaşma riskini en aza indirir.
- **Güvenlik Protokollerine Uygunluğun Sağlanması:** Kişisel hijyeni sağlamamak, güvenlik yönetmeliklerinin ihlal edilmesine ve bunun sonucunda cezalara veya laboratuvarın kapatılmasına yol açabilir. Birçok kurumsal ve düzenleyici kılavuz, laboratuvar güvenliğini sağlamak ve çalışanları korumak için sıkı hijyen standartlarının sürdürülmesini gerektirir. Hijyen protokollerine uymak yalnızca kişisel bir sorumluluk değil, aynı zamanda OSHA (Mesleki Güvenlik ve Sağlık İdaresi) gibi uluslararası ve ulusal standartların gereklilikleri karşılamak için de önemlidir.
- **Profesyonel Çalışma Ortamının Korunması:** Temiz ve hijyenik bir çalışma alanı profesyonelliği teşvik eder ve laboratuvarın tüm çalışanlar için güvenli ve saygılı bir ortam olmasını sağlar.

Uygun hijyen, bir bireyin kendi güvenliğine ve meslektaşlarının güvenliğine yönelik sorumluluğunu yansıtır.

Laboratuvardaki temel kişisel hijyen uygulamaları şunları içerir:

- **El Yıkama:** Laboratuvarda çalışmadan önce ve sonra ellerinizi her zaman iyice yıkayın.
- **Yemek veya İçecekten Kaçınma:** Kontaminasyonu önlemek için laboratuvar alanlarında asla yemek yemeyin, içmeyin veya yiyecek saklamayın.
- **Uygun KKE Giyme:** Gerektiğinde her zaman laboratuvar önlüğü, eldiven ve göz koruması takın.
- **Çalışma Alanlarını Temiz Tutma:** Çalışma istasyonlarını düzenli olarak temizleyin ve dezenfekte edin.
- **Saç ve Giyme Dikkat Etme:** Uzun saçlarınızı arkaya bağlayın ve tehlikeli maddelerle temas edebilecek bol giysiler giymekten kaçının. İyi kişisel hijyen sağlayarak, laboratuvar personeli daha güvenli bir çalışma ortamına katkıda bulunur, kontaminasyon riskini en aza indirir ve güvenlik protokollerine uyumu sağlar. Bu, günlük laboratuvar güvenliğinin basit ama önemli bir parçasıdır.

6.9. Laboratuvar Kurallarına Uyum

Laboratuvarlar ortamına uygun davranışlar sergilemek ve kurallara uyum esastır. İyi iletişim ve takım çalışması, güvenli bir çalışma ortamı sağlar.

- **Laboratuvarda Uygun Davranış ve Yönelimler:** Tüm güvenlik kurallarına ve prosedürlerine uyun. Laboratuvarda yemek yemeyin, içmeyin veya kişisel elektronik cihazları kullanmayın. Laboratuvar saatlerine ve paylaşılan kaynaklara dikkat edin.
- **Başkalarına ve Çalışma Alanlarına Saygı:** Başkalarının ekipmanlarına veya deneylerine izinsiz dokunmayın veya onları hareket ettirmeyin. Paylaşılan ekipmanları temiz tutun ve bir sonraki kullanıcı için hazır tutun.
- **İletişim ve Ekip Çalışması:** Laboratuvar ekibinizle açık iletişim kurun. Herhangi bir güvenlik endişesini derhal bildirin. İşbirlikçi bir şekilde çalışın ve güvenlik kültürünü destekleyin.

6.10. Laboratuvar Temizliği

İyi temizlik uygulamaları güvenli bir laboratuvar ortamını sürdürmek için olmazsa olmazdır. Düzenli bir laboratuvar kaza olasılığını azaltır ve verimli çalışmayı teşvik eder.

Çalışma alanlarını düzenli tutun ve gereksiz malzemelerden veya ekipmanlardan arındırın. Temiz laboratuvar tezgahları dökülme ve kaza riskini azaltır. Her kullanımdan sonra çalışma alanlarını temizleyin. Kimyasalları, aletleri ve malzemeleri uygun şekilde saklayın. Atıkları laboratuvar yönergelerine göre bertaraf edin. Dökülmeleri her zaman hemen temizleyin. Tüm kapları açıkça etiketleyin. Yürüyüş yolları ve ekipmanların etrafında dağınıklığından kaçının.

6.11. Atık Yönetimi

Laboratuvarlar, her biri kontaminasyonu, kazaları veya çevresel hasarı önlemek için belirli bertaraf yöntemleri gerektiren kimyasal, biyolojik, radyoaktif ve genel atıklar dahil olmak üzere çeşitli atıklar üretir. Kötü atık yönetimi kimyasal dökülmelere, yangın tehlikelerine, enfeksiyonlara veya diğer güvenlik endişelerine yol açabilir.

Laboratuvarlar, her biri kendine özgü tehlikelere ve bertaraf gereksinimlerine sahip farklı atık türleri üretir. Atıkların doğru bir şekilde tanımlanması ve ayrılması, güvenli bir şekilde bertaraf edilmesini sağlamanın ilk adımındır:

- **Kimyasal Atık:** Toksik, yanıcı, aşındırıcı veya reaktif olabilen tehlikeli kimyasallar, çözücüler ve reaktifleri içerir.
- **Biyolojik Atık:** Bulaşıcı veya zararlı olabilen kültürler, dokular veya organizmalar gibi biyolojik maddeleri içerir.
- **Radyoaktif Atık:** Radyasyona maruz kalmayı önlemek için özel işleme gerektiren radyoaktif maddelerle çalışan laboratuvarlarda üretilir.
- **Kesici/delici Nesnelere:** Fiziksel yaralanmaya veya kontaminasyona neden olabilecek iğneler, cam slaytlar ve diğer keskin nesnelere.
- **Genel Atık:** Paketleme malzemeleri, kağıt ve plastik gibi tehlikesiz atıklar.

Uygun atık yönetimi aşağıdaki hususlar açısından önem taşır:

- **Personel Güvenliği:** Tehlikeli atıkların yanlış yönetimi, laboratuvar personelini zararlı kimyasallara, biyolojik ajanlara veya fiziksel yaralanmalara maruz bırakabilir. Örneğin, keskin nesnelere uygunsuz şekilde bertaraf edilmesi, delinme yaralarına veya enfeksiyonlara yol açabilir.
- **Çevrenin Korunması:** Birçok kimyasal ve biyolojik malzeme, doğru bir şekilde bertaraf edilmezse suyu, havayı veya toprağı kirletebilir. Ağır metaller, toksik kimyasallar veya patojenler içeren atıklar, uzun süreli çevresel etkilere sahip olabilir.
- **Yönetmeliklere Uygunluk:** Laboratuvarlar, İş Sağlığı ve Güvenliği İdaresi (OSHA), Çevre Koruma Ajansı (EPA) ve yerel çevre ajansları dahil olmak üzere çeşitli kuruluşlar tarafından belirlenen düzenlemelere tabidir. Bu düzenlemeler, güvenli atık bertaraf uygulamalarını zorunlu kılar ve uyumsuzluk para cezalarına, yasal sorunlara veya hatta laboratuvarın kapatılmasına neden olabilir.
- **Kazaların Önlenmesi:** Uygun atık bertarafı yangınları, kimyasal reaksiyonları ve diğer tehlikeleri önlemeye yardımcı olur. Örneğin, uyumsuz kimyasal atıkların bir arada depolanması tehlikeli bir reaksiyona neden olabilir.

Atıkların doğru şekilde ayrıştırılması ve etiketlenmesi, uygun ve güvenli bir şekilde bertaraf edilmesini sağlamak için kritik öneme sahiptir. Uygun etiketleme, atık işleyicilerinin ve bertaraf personelinin içerik ve ilgili risklerin farkında olmasını sağlar. Bu kapsamda atıklar aşağıdaki kategorilere göre ayrıştırılırlar:

- **Kimyasal Atık:** Tehlikeli reaksiyonları önlemek için kimyasal atıklar tehlike sınıfına (örneğin asitler, bazlar, yanıcılar, oksitleyiciler) göre ayrılmalıdır. Her bir kap, içerik ve tehlike sembolleriyle açıkça etiketlenmelidir.
- **Biyolojik Atık:** Biyolojik atıklar açıkça işaretlenmiş biyolojik tehlike torbalarına veya kaplarına konulmalıdır. Enfeksiyon risklerini en aza indirmek için bertaraf edilmeden önce otoklavlanmalı veya başka şekilde sterilize edilmelidir.
- **Kesici/Delici Nesne Atıkları:** İğneler ve kırık cam gibi keskin nesnelere, yaralanmaları ve kontaminasyonu önlemek için belirlenmiş, delinmeye dayanıklı keskin nesne kaplarına atılmalıdır.
- **Radyoaktif Atık:** Radyoaktif atıklar, radyasyon tehlikesi sembolleri bulunan belirlenmiş kaplara konulmalı ve özel atık bertaraf hizmetleri tarafından işlenmelidir.

Ayrıştırılan atıkların işlenmesi, depolanması ve bertarafı da atık türüne göre farklılıklar gösterir:

- **Kimyasal Atıkların İşlenmesi:** Kimyasal atıklar, sızıntıları veya dökülmeleri önlemek için uygun şekilde kapatılmış uyumlu kaplarda saklanmalıdır. Ek koruma için ikincil taşıma tepsileri kullanın. Atık kapları asla aşırı doldurulmamalı ve uyumsuz maddelerden uzakta, iyi havalandırılan bir alanda saklanmalıdır.
- **Biyolojik Atıkların İşlenmesi:** Biyolojik atıklar eldiven ve uygun KKE kullanılarak işlenmelidir. Bertaraftan önce, bulaşıcı etkenleri nötralize etmek için biyolojik malzemeler genellikle otoklavlama yoluyla sterilize edilmelidir.
- **Atıkların Depolanması:** Belirlenmiş atık depolama alanları açıkça işaretlenmeli ve yetkisiz erişimi önleyecek şekilde tasarlanmalıdır. Depolama alanları iyi havalandırılmalı ve tehlikeli maddelerin işlenmesine ilişkin düzenlemelere uymalıdır. Atıklar uzun süre saklanmamalı ve düzenli bertaraf alımları planlanmalıdır.
- **Kimyasal Atık Bertarafı:** Kimyasal atıkların çoğu lisanslı tehlikeli atık bertaraf hizmetleri aracılığıyla işlenir. Laboratuvarlar tehlikeli atıkları onaylı bertaraf alanlarına taşıma yönergelerini takip etmelidir. Bazı kimyasallar bertaraf edilmeden önce laboratuvarında nötrleştirilebilir veya işlenebilir.
- **Biyolojik Atık Bertarafı:** Sterilize edilmiş biyolojik atıklar genellikle normal atık olarak işlenebilir. Ancak, bulaşıcı veya potansiyel olarak bulaşıcı maddeler özel biyolojik atık bertaraf hizmetleri tarafından yakılmalı veya işlenmelidir.



Şekil 3. Genel laboratuvar güvenliği uygulamaları.

7. LABORATUVAR EMNİYETİNİN ÖNEMİ

Laboratuvarlar, genellikle değerli, hassas veya tehlikeli maddeler barındıran doğası gereği karmaşık ortamlardır ve sağlık, ilaç, biyoteknoloji, kimya ve akademi gibi çeşitli alanlarda araştırma, teşhis, üretim ve geliştirmede kritik bir rol oynarlar. Laboratuvarlardaki malzemelerin, verilerin ve ekipmanların hassas yapısı emniyeti sağlamak açısından önemli bir endişe kaynağıdır. Bir

laboratuvarda güvenlik ve emniyet yalnızca araştırmannın bütünlüğünü korumak için değil, aynı zamanda personeli, ekipmanı ve hassas bilgileri korumak için de son derece önemlidir. Genel güvenlik uygulamaları daha çok kazaları ve yaralanmaları önlemeye odaklanırken laboratuvar emniyeti yetkisiz erişimi, hırsızlığı, kötü niyetli hasarı veya tehlikeli maddelerin kötüye kullanımını önlemeye yöneliktir.

Laboratuvar emniyetinin temel amacı, insanları, varlıkları ve araştırmaları iç ve dış tehditlerden korumaktır. Bu tehditler fiziksel hırsızlıktan veya sabotajdan siber güvenlik ihlallerine veya tehlikeli kimyasalların karıştığı kazalara kadar değişebilir. Bu senaryoların her biri, yalnızca laboratuvar için değil aynı zamanda halk sağlığı ve güvenliği için de potansiyel bir felaketi temsil eder. Bu nedenle etkili güvenlik, değişen teknolojiler ve ortaya çıkan risklerle birlikte gelişen çok katmanlı ve dinamik olmalıdır:

- **Güvenlik:** Birçok laboratuvarda kimyasallar, biyolojik ajanlar, radyoaktif maddeler veya uçucu bileşikler gibi yanlış kullanıldığında personele veya çevreye zarar verebilecek potansiyel olarak tehlikeli maddeler bulunur. Bir güvenlik açığı, laboratuvar personelini ve potansiyel olarak çevredeki ortamı tehlikeye atan maruziyete, kirlenmeye veya dökülmelere yol açabilir. Kötü güvenlik uygulamalarının etkileri şunları içerebilir:
 - o **Kişisel Yaralanma veya Ölüm:** Toksik kimyasallara, patojenlere veya radyoaktif maddelere uygunsuz erişim, laboratuvar çalışanları veya davetsiz misafirler için ciddi sağlık sonuçlarına yol açabilir. Bazı maddelere az miktarda bile maruz kalmak ölümcül olabilir.
 - o **Çevresel Kirlenme:** Kimyasal dökülmeler, radyoaktif madde sızıntıları veya biyolojik ajanların salınması, çevredeki ekosistem üzerinde uzun vadeli etkilere sahip olabilir. Bu etkilerin tersine dönmesi onlarca yıl alabilir ve halk sağlığı krizlerine veya maliyetli çevre temizliklerine yol açabilir.
- **Araştırma Bütünlüğü:** Bilimsel araştırma dünyasında, sonuçların doğruluğu ve güvenilirliği en önemli unsurdur. Laboratuvar güvenliğinin ihlalleri (kasıtlı (sabotaj veya hırsızlık gibi) veya kazara) şunlara yol açabilir:
 - o **Değişen Sonuçlar:** Yetkisiz kişiler ekipman, numune veya araştırma materyalleriyle oynarsa, veriler çarpıtılabilir ve yanlış sonuçlara yol açabilir. Kontrollü koşullardaki küçük kesintiler bile aylarca veya yıllarca süren araştırmayı geçersiz kılabilir.
 - o **Gecikmiş İlerleme:** Deneyleri tehlikeye atan güvenlik ihlallerinin kurtarılması önemli bir zaman alabilir. Örneğin, hassas zamanlamaya dayanan projeler, protokoller kesintiye uğrarsa geri döndürülemez şekilde geri alınabilir.
 - o **Finansman Kaybı:** Birçok araştırma projesi, hükümet kurumları veya özel kuruluşlardan alınan hibelerle finanse edilir. Finansman sağlayanlar, güvenlik ve emniyet protokollerine sıkı sıkıya uyulmasını bekler. Bir ihlal, finansmanın iptaline yol açabilir ve araştırmannın devamını tehlikeye atabilir.
- **Uyumluluk:** Özellikle biyoteknoloji, ilaç ve sağlık gibi alanlarda çalışan laboratuvarlar, hükümet organları tarafından uygulanan katı düzenlemelere uymalıdır. Bu düzenlemeler şunlar için tasarlanmıştır:
 - o **Halk Sağlığı ve Güvenliğini Koruma:** ABD'deki Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) gibi kurumlar, biyolojik ajanların ve toksinlerin güvenli

bir şekilde işlenmesini sağlamak için laboratuvarlara düzenlemeler getirir. Bu tür düzenlemelere uyulmaması hastalık salgınlarına, çevresel hasara ve yasal sonuçlara yol açabilir.

- o **Etik Araştırmayı Sağlamak:** Genetik araştırma veya insan/hayvan testleri gibi alanlarda etik hususlar çok önemlidir. Laboratuvarlar, araştırmanın nasıl yürütüleceğini, belirli verilere kimin erişebileceğini ve malzemelerin nasıl işleneceğini zorunlu kılan etik yönergelere uydıklarından emin olmalıdır.
- **Fikri Mülkiyetin Koruması:** Özellikle kurumsal veya akademik ortamlardaki birçok laboratuvar, inovasyon merkezleridir. Bu laboratuvarlarda yapılan araştırmalar ve keşifler genellikle önemli piyasa değerine sahip yeni ürünlere, tedavilere veya teknolojilere dönüşür. Bu fikri mülkiyeti korumak şunlar için kritik öneme sahiptir:
 - o **Endüstriyel Casusluğu Önlemek:** Rakipler veya düşmanca kuruluşlar araştırma verilerini veya tescilli bilgileri çalmaya çalışabilir. İlaç geliştirme gibi çığır açan projeler üzerinde çalışan laboratuvarlar, verilerinin hırsızlığa karşı güvende olduğundan emin olmalıdır.
 - o **Rekabet Avantajını Koruma:** Biyoteknoloji veya ilaç gibi endüstrilerde, rekabette önde kalmak esastır. Araştırma hırsızlığıyla sonuçlanan bir güvenlik ihlali, yıllarca süren çalışmaları baltalayabilir ve laboratuvarı rekabet açısından dezavantajlı duruma sokabilir.

8. LABORATUVAR EMNİYETİNDE UYGULAMALAR

Bir laboratuvar ortamındaki emniyet, tüm personelin işbirliği ve uyanıklığını gerektiren çok yönlü bir sorumluluktur. Sağlam fiziksel güvenlik önlemleri uygulayarak, hassas bilgileri koruyarak, tehlikeli maddeleri sorumlu bir şekilde kullanarak ve acil durumlara hazırlanarak laboratuvarlar güvenli ve etkili araştırmalara elverişli güvenli bir ortamı koruyabilir. Güvenlik protokollerinin sürekli değerlendirilmesi ve uyarlanması, gelişen tehditlere karşı koymak ve güvenli bir çalışma ortamını sürdürmek için önemlidir. Bir çok laboratuvar emniyeti uygulaması aynı zamanda laboratuvar güvenliğini de sağlar.

8.1. Fiziksel Emniyet Önlemleri

- **Çevre ve Bina Erişim Kontrolü:** Laboratuvar güvenliği için ilk savunma hattı, binaya ve laboratuvar alanlarına fiziksel erişimin kontrolüdür. Tesisler, aşağıdakileri içeren katmanlı bir erişim kontrolü yaklaşımı uygulamalıdır. Laboratuvar binasının çevresi, yetkisiz girişi önlemek için çitler ve duvarlar gibi fiziksel bariyerler gerektirebilir. Yüksek değerli veya yüksek riskli laboratuvarlar ayrıca giriş noktalarını ve çevre alanları izlemek için gözetim kameraları kullanılmalıdır. Laboratuvarlar, binaya girişi güvenlik personeli veya kart okuyucular veya biyometrik tarayıcılar gibi teknolojilerle donatılmış birkaç kontrollü erişim noktasıyla sınırlanmalıdır. Bu sistemler, tesise yalnızca yetkili personelin girebilmesini sağlar.
- **Laboratuvar Erişim Kontrolü:** Kısıtlı giriş sağlanmalı ve bir laboratuvardaki belirli alanlara yalnızca yetkili personel erişebilmelidir. Bu kısıtlama, anahtar kartları, biyometrik tarayıcılar veya PIN kodları gibi erişim kontrol sistemleri kullanılarak gerçekleştirilebilir.

ya da zamana duyarlı erişim sağlanabilir. Ziyaretçi yönetimi takip edilmelidir: Bir ziyaretçi günlüğü tutulmalı ve tüm ziyaretçilerin giriş ve çıkış yapması zorunlu kılınmalıdır. Ziyaretçilere her zaman yetkili personel eşlik etmelidir. Gözetim sistemleri kullanılmalıdır. Laboratuvarlardaki aktiviteyi izlemek ve kaydetmek için anahtar giriş ve çıkış noktalarına güvenlik kameraları takılmalıdır. Bu uygulama yetkisiz erişimi engelleme ve herhangi bir olay gerçekleşmesi durumunda kayıt sağlama açısından önemlidir.

- **Ekipman ve Malzemelerin Güvenliğini Sağlama:** Kilitlenebilir depolama alanları sağlanmalıdır. Hassas ekipman, tehlikeli kimyasallar ve biyolojik malzemeler, kısıtlı erişime sahip kilitlenebilir dolaplarda veya buzdolaplarında saklanmalıdır. Alarmlar ve sensörler vasıtasıyla yetkisiz erişimi veya ihlalleri tespit etmek mümkündür. Bu kapsamda kapılarda, pencerelerde ve depolama ünitelerinde alarmlar kullanılmalıdır. Hareket sensörleri, yüksek riskli alanlar için ek bir güvenlik katmanı ekleyebilir. Envanter yönetimi yapılmalı; tüm ekipman, kimyasallar ve biyolojik malzemelerin ayrıntılı bir envanterini tutulmalıdır. Hiçbir şeyin eksik veya yanlış yerleştirilmediğinden emin olmak için düzenli denetimler yapılmalıdır.

8.2. Siber Güvenlik ve Bilgi Güvenliği

- **Dijital Verilerin Korunması:** Araştırma verileri, kişisel bilgiler ve gizli iletişimler dahil olmak üzere tüm hassas veriler şifrelenmelidir. Uzaktan erişim için güvenli ağlar ve VPN'ler kullanılmalıdır. Dijital sistemler için erişim kontrolleri sağlanmalıdır. Laboratuvar bilgisayarlarına, veritabanlarına ve ağlara erişim için çok faktörlü kimlik doğrulaması uygulanmalıdır. İş rollerine göre kullanıcı ayrıcalıkları atanmalı ve hassas verilere erişim yalnızca yetkili personelle sınırlandırılmalıdır. Verileri düzenli olarak güvenli, tesis dışı konumlarda yedeklenmelidir. Yedeklerin şifrelendiğinden ve yetkisiz erişime karşı korunduğundan emin olunmalıdır.
- **Siber Tehditleri Önleme:** Yazılım güvenliği sağlanmalı; tüm yazılımlar ve işletim sistemleri en son güvenlik yamalarıyla güncel tutulmalıdır. Güvenilir antivirüs ve kötü amaçlı yazılım önleme programları kullanılmalıdır. Kimlik avı farkındalığı artırılmalı; laboratuvar personelini kimlik avı e-postalarını ve sosyal mühendislik taktiklerini tanımaları için eğitim verilmelidir. Şüpheli e-postaların ve olası güvenlik ihlallerinin bildirilmesi teşvik edilmelidir. Güvenli iletişimin sağlanması amacıyla hassas bilgiler için uçtan uca şifrelemeye sahip güvenli e-posta platformları veya özel iletişim araçları gibi şifreli iletişim kanalları kullanılmalıdır.

8.3. Tehlikeli Maddelerin İşlenmesi

- **Kimyasal Güvenlik:** Envanter kontrolü yapılmalı, miktarları ve depolama yerleri dahil olmak üzere tüm kimyasalların güncel bir envanteri tutulmalıdır. Herhangi bir edinim veya bertaraf derhal kaydedilmelidir. Uygun depolama koşulları sağlanmalı, kimyasallar tehlike sınıflandırmalarına göre depolanmalı ve uyumsuz maddelerin ayrıldığından emin olunmalıdır. Yanıcı maddeler yangına dayanıklı dolaplarda saklanmalıdır. Tüm personelin, işledikleri kimyasallarla ilişkili tehlikeler konusunda eğitildiğinden ayrıca bunların depolanması ve kullanımı için güvenlik protokollerini anladığından emin olunmalıdır.

- **Biyolojik Malzeme Güvenliği:** Özellikle patojenler veya toksinler olmak üzere biyolojik malzemelerin işlenmesi ve depolanması için biyogüvenlik protokollerini uygulanmalı, biyogüvenlik önlemleri alınmalıdır. Bu malzemelere erişim kısıtlanmalı ve kontrol edilmelidir. Biyolojik malzemeleri taşıırken ulusal ve uluslararası düzenlemelere uyulmalı, güvenli, kurcalanmaya karşı dayanıklı kaplar kullanılmalıdır. Sevk zinciri kayıtları tutulmalıdır. Hırsızlık, kayıp veya tehlikeli biyolojik ajanların salınması gibi olası biyogüvenlik ihlallerini ele alacak olay müdahale planları geliştirilmeli ve düzenli olarak güncellenmelidir.
- **Radyoaktif Madde Depolama:** Radyoaktif maddeleri işleyen laboratuvarlar, kurşun kaplı kapların ve sınırlı erişim odalarının kullanımı dahil olmak üzere depolama için belirli yönergelere uymalıdır.

8.4. Personel Güvenliği

- **Tarama ve Eğitim:** Özellikle hassas malzemelere veya verilere erişimi olacak tüm çalışanların suç geçmişi, istihdam doğrulaması ve referans kontrolleri dahil kapsamlı geçmiş kontrolleri yapılmalıdır. Tüm personel, şüpheli davranışları tanıma ve bunlara yanıt verme, hassas bilgileri işleme ve erişim kontrol önlemlerine uyma dahil olmak üzere laboratuvar güvenlik protokollerini konusunda düzenli olarak eğitilmelidir.
- **İzleme ve Denetim:** Sürekli izleme gerçekleştirilmeli; yetkisiz faaliyetleri tespit etmek ve caydırmak için gözetim ve izleme araçları kullanılmalıdır. Erişim kayıtları ve gözetleme kayıtları düzenli olarak incelenmelidir. Yüksek güvenliğin görevler veya kısıtlı alanlara erişim için bir arkadaş sistemi uygulanmalıdır. Bu uygulama hesap verebilirliği sağlar ve hırsızlık veya kötüye kullanım riskini azaltır.

8.5. Acil Durum Müdahalesi ve Olay Yönetimi

Güçlü güvenlik önlemlerine rağmen laboratuvarlar, güvenlik ihlalleri, kimyasal sızıntılar veya siber saldırılar gibi olası acil durumlara hazırlıklı olmalıdır. İyi belgelenmiş ve prova edilmiş bir olay müdahale planı esastır.

- **Olay Bildirimi ve Soruşturması:** Raporlama protokollerini oluşturulmalı; yetkisiz erişim, hırsızlık, veri ihlalleri veya şüpheli faaliyetler dahil olmak üzere güvenlik olaylarını bildirmek için net prosedürler geliştirilmelidir. Tüm personelin de bu protokollerden haberdar olduğundan emin olunmalıdır. Olay incelemesi gerçekleştirilmeli; olayları araştırmaktan, nedenlerini belirlemekten ve tekrarını önlemek için düzeltici önlemler uygulamaktan sorumlu bir güvenlik ekibi belirlenmelidir.
- **Acil Durum Hazırlığı:** Acil durum tatbikatları gerçekleştirilmelidir. Laboratuvarın izinsiz girişler, siber saldırılar veya tehlikeli madde sızıntıları gibi çeşitli güvenlik tehditlerine yanıt vermeye hazır olup olmadığını test etmek için düzenli güvenlik tatbikatları yapılmalıdır. Acil bir durumda bilgilerin hızla yayılmasını sağlamak için e-posta uyarıları, kısa mesajlar veya anons sistemleri gibi platformların kullanıldığı dahili bir iletişim planı oluşturulmalıdır. Laboratuvarlarda açıkça işaretlenmiş tahliye yolları olmalı ve personel yangın, kimyasal sızıntı veya diğer acil durumlarda acil çıkışlar ve prosedürler konusunda bilgi sahibi olmalıdır.

- **Güvenlik İhlali Müdahalesi:** Laboratuvara yetkisiz erişim olması durumunda personel, olayı bildirme, hassas malzemeleri güvence altına alma ve ilgili makamlara haber verme gibi belirlenmiş prosedürleri izlemelidir.

Özetle laboratuvar emniyeti, yalnızca fiziksel alanları ve malzemeleri korumayı değil aynı zamanda fikri mülkiyeti, verileri ve personeli de korumayı içeren karmaşık, çok yönlü bir konudur. Laboratuvarlar, fiziksel önlemleri, siber güvenlik protokollerini, personel yönetimini ve acil durum müdahale planlamasını birleştiren katmanlı bir güvenlik yaklaşımı uygulamalıdır. Laboratuvarlar, sürekli olarak güvenlik açıklarını değerlendirerek ve yeni tehditlere uyum sağlayarak, bilimsel keşif, teknolojik yenilik ve kamu güvenliği için güvenli bir ortam sağlayabilir.

9. İLAÇ ARAŞTIRMA VE ÜRETİMİNDE ENTEGRE LABORATUVAR GÜVENLİĞİ VE EMNİYETİ

İlaç araştırma ve üretimi hem bilimsel ilerleme hem de halk sağlığı için güvenliğin ve emniyetin kritik öneme sahip olduğu yüksek riskli operasyonları içerir. Bu alanda güçlü kimyasallar, biyoaktif bileşikler ve azami dikkatle ele alınması gereken tescilli bilgileri de içeren benzersiz süreçler bulunmaktadır.

İlaç endüstrisindeki laboratuvar güvenliği ve emniyeti, kimyasal ve biyolojik tehlike yönetimi, fiziksel güvenlik, fikri mülkiyetin korunması ve düzenleyici uyumluluğu kapsayan çok katmanlı bir yaklaşım gerektirir. İlaç laboratuvarları, sıkı güvenlik ve emniyet protokollerine uyarak personele yönelik riskleri en aza indirebilir, araştırmalarının bütünlüğünü sağlayabilir ve halkı olası zararlardan koruyabilir. Endüstri gelişmeye ve yeni zorluklarla karşılaşmaya devam ederken, güvenlik uygulamalarında sürekli dikkat, eğitim ve yenilik esastır.

9.1. İlaç Araştırma ve Üretiminde Güvenlik Protokolleri

Kimyasal ve Biyolojik Tehlike Yönetimi: İlaç araştırmalarında, laboratuvarlar yeni ilaçlar, aktif ilaç bileşenleri ve potansiyel olarak patojenik mikroorganizmalar dahil olmak üzere çok çeşitli tehlikeli kimyasallar ve biyolojik ajanlarla ilgilenir. Bu malzemelerin uygun şekilde işlenmesi, maruziyeti, çapraz kontaminasyonu ve çevresel zararı önlemek için çok önemlidir. Bu sorunlarla baş edebilmek için aşağıdaki uygulamalardan yararlanılabilir:

- **Kişisel Koruyucu Ekipman (KKE):** Araştırmacılar ve üretim çalışanları tehlikeli maddelerle çalışırken laboratuvar önlükleri, eldivenler, emniyet gözlükleri ve solunum koruması gibi uygun KKE'yi her zaman giymelidir. Kimyasallara dayanıklı eldivenler ve tam vücut giysileri gibi özel KKE, güçlü bileşikler veya biyolojik tehlikeli maddelerle çalışmak için gerekli olabilir.
- **Çeker Ocak ve Kabinler:** Çeker ocak ve kabinler, uçucu kimyasallar veya biyolojik malzemelerle güvenli bir şekilde deneyler yürütmek için gereklidir. Uygun havalandırma, toksik duman veya aerosollerini soluma riskini en aza indirmeye yardımcı olur.
- **Kimyasal Depolama ve Ayırma:** Tüm kimyasallar, uyumsuz maddeler (oksidleyiciler ve yanıcı sıvılar gibi) ayrı tutularak tehlike sınıflandırmalarına göre depolanmalıdır. Özellikle kötüye kullanım potansiyeli olan kontrollü maddeler, sınırlı erişime sahip güvenli, kilitli dolaplarda saklanmalıdır.

Çapraz Kontaminasyonu Önleme: Kontaminasyon, farmasötik araştırmanın geçerliliğini tehlikeye atabilir ve ürün kalitesi için risk oluşturabilir. Farklı maddeler, partiler veya üretim aşamaları arasında çapraz kontaminasyonu önlemek için sıkı önlemler alınmalıdır:

- **Özel Ekipman:** İlaç geliştirme ve üretiminin farklı aşamaları için özel ekipman ve çalışma alanları kullanın. Bu, ham maddeler ve nihai ürünler arasında çapraz kontaminasyonu önler.
- **Temizlik ve Dekontaminasyon:** Tüm laboratuvar ve üretim ekipmanları için sıkı temizlik protokolleri oluşturun. Üretim partileri arasında tüm kalıntıların temizlendiğinden emin olmak için geçerli temizlik maddeleri kullanın.
- **GMP (İyi Üretim Uygulamaları) Uyumluluğu:** Ürünlerin kalite standartlarına göre sürekli olarak üretilmesini ve kontrol edilmesini sağlamak için ekipman bakımı, çevre kontrolleri ve kayıt tutma için özel protokolleri içeren GMP yönergelerini izleyin.

Acil Durum Hazırlığı: İlaç laboratuvarlarındaki potansiyel tehlikeler göz önüne alındığında, kimyasal dökülmeler, yangınlar veya tehlikeli maddelere maruz kalma gibi olaylar için sağlam acil durum prosedürlerinin olması hayati önem taşır.

- **Dökülme/Saçılma Müdahale Kitleri:** Kimyasal dökülmelerle başa çıkmak için emiciler, nötrleştiriciler ve uygun KKD içeren sızıntı müdahale kitlerinin kolayca bulunabildiğinden emin olun. Personel, sızıntı müdahale prosedürleri konusunda eğitilmelidir.
- **Göz Yıkama İstasyonları ve Güvenlik Duşları:** Tehlikeli kimyasallara maruz kalma durumunda bunlara kolayca erişilebilmelidir. Tüm laboratuvar personeli bu acil durum cihazlarının yerlerini ve doğru kullanımını bilmelidir.
- **Acil Durum Tahliye Planları:** Yangın veya diğer acil durumlarda açık tahliye rotaları ve prosedürleri koruyun. Tüm personelin acil durum protokollerine aşina olduğundan emin olmak için düzenli tatbikatlar yapın.

9.2.İlaç Laboratuvarlarında Emniyet Önlemleri

Fiziksel Güvenlik ve Kontrollü Erişim: İlaç araştırmaları genellikle son derece hassas tescilli bilgileri ve değerli materyalleri içerir ve bu da fiziksel güvenliği en önemli öncelik haline getirir:

- **Kontrollü Erişim Alanları:** Aktif ilaç bileşenleri, kontrollü maddeler ve üretim alanları için depolama odaları gibi kritik alanlara kısıtlı erişim uygulayın. Bu alanlara yalnızca yetkili personel, anahtar kartları, PIN'ler veya biyometrik sistemlerle yönetilerek erişilebilmelidir.
- **Gözetim Sistemleri:** Laboratuvar ve üretim tesislerindeki önemli erişim noktalarını ve yüksek riskli alanları izlemek için gözetim kameraları kurun. Yetkisiz erişimi veya şüpheli faaliyetleri tespit etmek için görüntüleri düzenli olarak inceleyin.
- **Envanter Yönetimi:** Tüm tehlikeli kimyasalların, Aktif ilaç bileşenlerinin ve diğer kritik malzemelerin ayrıntılı bir envanterini tutun. Hiçbir şeyin hesaba katılmadığından emin olmak için hem ham maddeler hem de bitmiş ürünler için bir izleme sistemi uygulayın.

Fikri Mülkiyetin Korunması: İlaç araştırmaları genellikle önemli finansal yatırım ve rekabet avantajı sağlayan yeni ilaçların, tedavilerin veya teknolojilerin geliştirilmesini içerir. Fikri mülkiyetin korunması ilaç şirketlerinin başarısı için kritik öneme sahiptir.

- **Veri Şifreleme:** Formülasyonlar, klinik deney verileri ve tescilli üretim süreçleri dahil olmak üzere hassas araştırma verileri hem depolama hem de iletim sırasında şifrelenmelidir.
- **Dijital Sistemlere Erişim Kontrolü:** Bilgisayar sistemleri için çok faktörlü kimlik doğrulama ve rol tabanlı erişim kontrolü kullanarak kritik verilere erişimi yalnızca yetkili personelle sınırlayın.
- **Gizlilik Anlaşmaları:** Tüm çalışanlar ve işbirlikçiler gizli bilgilerin güvenli kalmasını ve kuruluş dışında paylaşılmamasını sağlamak için gizlilik anlaşmaları imzalamalıdır.

İlaç Araştırmalarında Siber Güvenlik: Fiziksel güvenliğe ek olarak, dijital tehditler ilaç laboratuvarları için önemli bir risk oluşturmaktadır. Tescilli araştırmaları, fikri mülkiyet hırsızlığını veya hatta dijital üretim sistemlerinin sabote edilmesini hedef alan siber saldırılar ciddi sonuçlara yol açabilir.

- **Düzenli Güvenlik Denetimleri:** Sistemdeki güvenlik açıklarını belirlemek ve gerektiğinde güncellemeler veya yamalar uygulamak için düzenli siber güvenlik denetimleri gerçekleştirin. Yazılımın en son güvenlik önlemleriyle güncel olduğundan emin olun.
- **Kimlik Avı Önleme:** Personelle kimlik avı girişimlerini ve hassas bilgileri tehlikeye atabilecek diğer sosyal mühendislik biçimlerini tanıma konusunda sürekli eğitim sağlayın.
- **Güvenli İletişim Kanalları:** Özellikle harici ortaklarla işbirliği yaparken hassas bilgileri paylaşmak için güvenli, şifreli iletişim platformları kullanın.

9.3. Güvenlik ve Emniyette Mevzuata Uygunluk

Mevzuata Uygun Çerçeve: İlaç laboratuvarları, ilaç geliştirme ve üretiminin güvenliğini, etkinliğini ve kalitesini sağlamak için katı düzenlemelere tabidir. Bu düzenlemelere uyulmaması, ciddi cezalara, geri çağırılmalara veya şirketin itibarının zedelenmesine yol açabilir.

- **FDA (Gıda ve İlaç Dairesi) Yönetmelikleri:** ABD’de FDA, 21 CFR Bölüm 11 (Elektronik Kayıtlar ve İmzalar) ve mevcut İyi Üretim Uygulamaları (cGMP) gibi yönetmelikler aracılığıyla farmasötik ürünlerin güvenliğini ve etkinliğini yönetir.
- **Avrupa İlaç Ajansı (EMA) Yönetmelikleri:** Avrupa’da EMA, veri bütünlüğünü ve araştırma etiğini sağlamak için iyi laboratuvar uygulamaları (GLP) ve iyi klinik uygulamaları (GCP) dahil olmak üzere farmasötik araştırmalar hakkında yönergeler sağlar.
- **Çevre Koruma Ajansı (EPA) Yönetmelikleri:** EPA, farmasötik şirketlerinin çevre kirliliğini önlemek için kimyasal atıklarını sorumlu bir şekilde yönetmelerini gerektirir. Tehlikeli atık bertaraf yönetmeliklerine uyum esastır.

Denetim ve Kayıt Tutma: Denetim, farmasötik araştırma ve üretimde hem güvenliği hem de emniyeti sağlamanın ayrılmaz bir parçasıdır.

- **Dahili Denetimler:** Düzenli dahili denetimler, güvenlik protokollerine, güvenlik önlemlerine ve düzenleyici standartlara uyumu sağlar. Bu denetimler, ekipman bakımından veri işleme kadar laboratuvar operasyonlarının tüm yönlerini kapsamalıdır.
- **Harici Denetimler:** FDA ve EMA gibi düzenleyici kurumlar, ilaç şirketlerinin güvenlik, emniyet ve kalite standartlarına uymasını sağlamak için sıklıkla denetimler gerçekleştirir. Bu tür denetimlere her zaman hazırlıklı olmak kritik öneme sahiptir.
- **Kapsamlı Kayıt Tutma:** Tüm araştırma faaliyetlerinin, kimyasal envanterlerin, güvenlik protokollerinin ve olay raporlarının ayrıntılı ve doğru kayıtlarını tutun. Bu, hesap verebilirliği sağlar ve düzenleyici gerekliliklere uyumu kolaylaştırır.

10. SONUÇ

Sonuç olarak, laboratuvar güvenliği, her laboratuvar çalışanın dikkatle çalışması, uygun eğitimlere sahip olması ve kararlı bir tutum sergilemesini gerektiren ortak bir sorumluluktur. Doğru güvenlik protokollerini takip etmek, risk değerlendirmeleri yapmak ve kişisel ile çevresel güvenliğe öncelik vermek, laboratuvarların bilimsel araştırmalarla ilişkili risklerini en aza indirirken aynı zamanda yenilik ve keşif merkezleri olarak işlev görmesini sağlar.

Her zaman öncelik güvenlik olmalıdır. Bu prensipler doğrultusunda, laboratuvarlarda çalışan herkesin güvenliği ve sağlığı için sürekli çaba sarf edilmelidir. Güvenlik bilincinin artırılması ve emniyet kültürünün güçlendirilmesi, laboratuvar ortamlarının daha güvenli hale gelmesine ve olası risklerin minimize edilmesine yardımcı olur. Bu şekilde, bilimsel araştırma ve keşiflerin yapıldığı laboratuvarlar, sürdürülebilir bir şekilde çalışabilir ve topluma fayda sağlayabilir. “Önce güvenlik” ilkesini benimseyerek, laboratuvar çalışmaları güvenli ve verimli bir şekilde yürütülebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gerekliklik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- American Chemical Society (ACS). Guidelines for Chemical Laboratory Safety in Academic Institutions, ACS, Washington DC (2016).
- American Chemical Society (ACS). Safety in Academic Chemistry Laboratories. ACS, Washington DC. (2017).
- American Chemical Society (ACS). ACS Laboratuvar Safety. <https://institute.acs.org/acs-center/lab-safety.html> (Access date: March 2024).
- American Industrial Hygiene Association. Safety Matters Center. <https://www.aiha.org/get-involved/safety-matters-center> (2017).
- Environmental Protection Agency (EPA). Hazardous Waste Management Regulations. <https://www.epa.gov/hw> (2019).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Safe labs. <https://www.cdc.gov/safelabs/> (2024).
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL). 6th ed. HHS Publication No. (CDC) 21-1112. <https://www.cdc.gov/labs/bml/index.html> (2020).
- Taylan Ozkan, A., Cansaran Duman, D., Derici, MK. Basic Biosecurity Practices Against Biological Risks. Hipokrat Yayınevi, Ankara (2019).
- Maury, H. Laboratory Safety for Chemistry Students. Journal of Chemical Education, 94(10), 1493–1498. (2017).
- National Fire Protection Association. NFPA 45: Standard on Fire Protection for Laboratories Using Chemicals (2019).
- National Research Council (US) Committee on Prudent Practices in the Laboratory. Prudent Practices in the Laboratory: Handling and Management of Chemical Hazards: Updated Version. Washington (DC): National Academies Press (US) (2011).
- Occupational Safety and Health Administration (OSHA). Laboratory Safety Guidance. OSHA 3404-11R 2011 <https://www.osha.gov/laboratory> (2011).
- Phifer, R.. Case study – Incident investigation: Laboratory explosion, J. Chem. Health Safety (2014), doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jchas.2014.04.001>.
- Reason, J. . Human error: models and management. BMJ, 320(7237), 768–770. (2000).
- The National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2019). Reproducibility and Replicability in Science. National Academies Press.
- The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards (2020).
- T.C. Sağlık Bakanlığı. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları, Laboratuvar Güvenliği Rehberi Sağlık Bakanlığı Yayın No: 1204 Basım yeri: Ankara (2021).
- World Health Organization (WHO). Laboratory Biosafety Manual, 4th Edition. <https://www.who.int/publications> (2020).



BÖLÜM 13

İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI

(GMP):

ÜRETİMDE KALİTE VE GÜVENLİĞİN

SAĞLANMASI

Ayşegül TAYLAN ÖZKAN^{1,*}, Parisa SHARAFİ²

¹*TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye*

²*TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye*

aysegultaylanozkan@gmail.com , parisasharafi@gmail.com

*Sorumlu Yazar: Prof. Dr. Ayşegül TAYLAN ÖZKAN



1. GİRİŞ

İyi Üretim Uygulamaları (GMP) ulusal ve uluslararası düzeyde geliştirilen kurallar çerçevesinde ilaç, gıda, kozmetik, tıbbi cihaz ve biyoteknoloji gibi çeşitli sektörlerde ürünlerin kalite, güvenlik ve tutarlılığını sağlamak için gereken bir dizi kılavuz ve mevzuat silsilesidir. GMP, hammaddelerden bitmiş ürünlere kadar üretimin tüm yönlerini kapsar ve üretim süreçlerinin ve tesislerinin uygun tasarımı, izlenmesini ve kontrolünü ayrıntılı olarak açıklayan yönergeler içerir. GMP standartlarına uyulması, ürünlerin kalite standartlarına göre tutarlı bir şekilde üretilmesini ve kontrol edilmesini sağlayarak çapraz kontaminasyon, yanlış etiketleme ve formülasyon tutarsızlıklarıyla ilişkili riskleri azaltır. GMP standartları, üretim süreçlerinin bir çerçevesini sunarak kalite kontrol, dokümantasyon ve yasal gerekliliklere uyumu sağlamaktadır.

GMP'ye uyum, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici kurumlar tarafından yasal olarak zorunludur. GMP'ye uyulmaması, ürün geri çağırılmalarına, para cezalarına veya üretim lisanslarının iptaline neden olabilir.

Bu bölümün amacı, farmasötik endüstrisinde GMP ilkelerinin ve uygulamasının ayrıntılı ve bilimsel bir analizini sunmaktır. GMP'nin tarihsel bağlamı, temel ilkeleri, önemi, mevzuatı, farklı sektörlerdeki uygulamaları, uyum ve denetimler konusunda temel bilgiler verilecektir.

2. GMP'NİN TARİHSEL GELİŞİMİ

2.1. Erken Dönemdeki Düzenlemeler

GMP kavramının ilk ortaya çıkışı ilaç ve gıda ürünlerinin güvenliği ve kalitesiyle ilgili endişelerin ortaya çıktığı 20. yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır. O dönemde, ürün bütünlüğünü sağlamak için standartlaştırılmış uygulamalar bulunmadığından difteri tedavisi alan çocukların tetanozdan hayatını kaybetmesi gibi birçok halk sağlığı sorunu ortaya çıkmaktaydı. İlaçlarda toksik koruyucuların kullanılması ve tağşiş edilmiş gıdaların dağıtılması gibi çok sayıda insanı etkileyen olaylar da hükümetler yanı sıra sektör paydaşlarını da harekete geçirdi.

GMP'ye yönelik ilk önemli adımlardan biri, 1906 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde Saf Gıda ve İlaç Yasası'nın kabul edilmesiydi. Bu yasa temel olarak ürünlerin saflığı ve etiketlenmesine odaklanmış ve GMP'nin merkezinde yer alan mevzuata uygunluk ilkesi için zemin hazırlamıştır. Saf Gıda ve İlaç Yasası üretim uygulamalarını bütünsel olarak ele almasa da hükümetlerin ilaç ve gıda güvenliğini düzenleyebileceği ve düzenlemesi gerektiği konusunda bir emsal oluşturmuştur.

1937'deki "Sülfanilamid Felaketi", bir sülfanilamid ilacında kullanılan zehirli bir çözücü nedeniyle 100'den fazla kişinin hayatını kaybettiği bir trajedydi. Bu olay, doğrudan 1938 Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası'nın oluşturulmasına yol açtı. Bu yasa, ilaç üreticilerinin bir ilacın piyasaya sürülmeden önce güvenliğini kanıtlanmasını zorunlu kılarak, titizlikle gerçekleştirilen testler ve kalite kontrol önlemleri yoluyla güvenlik ve etkinliği sağlayan GMP ilkelerine baz hazırladı.

2.2. Thalidomide Trajedisi

1941’de insulinlerde potens farklılıkları tespit edilmesi, 1955’te 250 çocuk felci vakası saptanması, 1960’lı yıllarda yaşanan “Thalidomide Trajedisi” GMP için tetikleyici unsurlar oldu. Bu olaylar GMP’nin “doğrulama” ilkesini etkileyerek tutarlı, kaliteli ve güvenilir bir ürün için üretim sürecinin tüm yönlerinin bilimsel olarak doğrulanması gerekliliğini ortaya koydu. FDA tarafından GMP’nin ilk versiyonu olan Federal Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası Kefauver-Harris Değişiklikleri takdim edildi.

2.3. GMP Standartlarının Küreselleşmesi

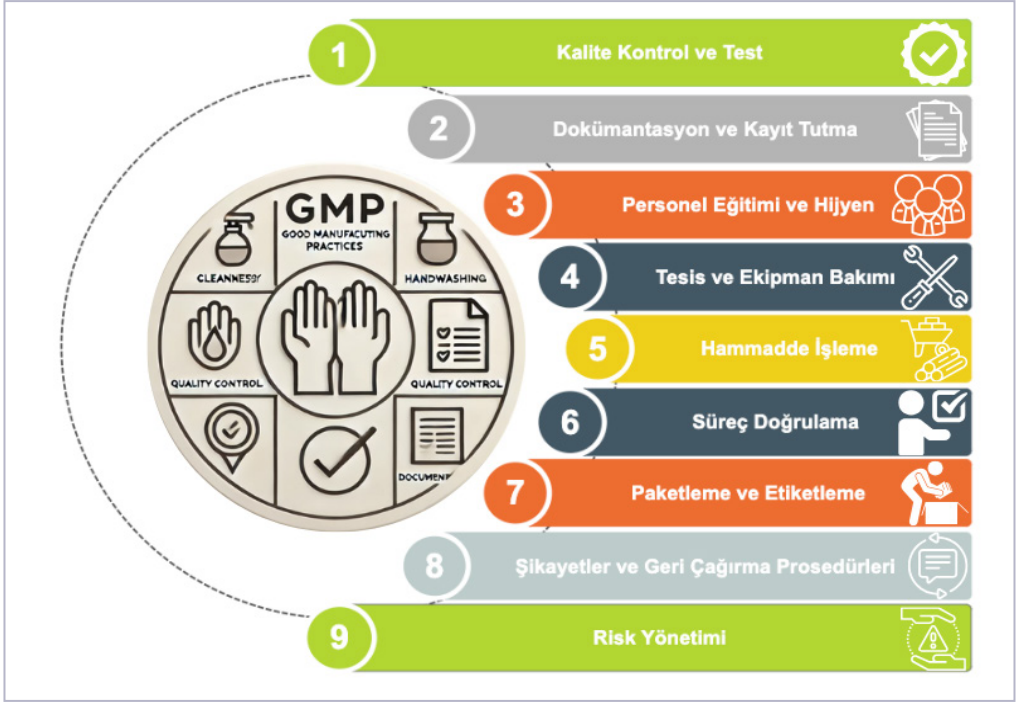
Bu olaylara yanıt olarak, dünyanın dört bir yanındaki düzenleyici kuruluşlar GMP standartlarını benimsemeye başladı. DSÖ 1963 yılında ilk GMP kılavuzunu hazırladı ve bir çok ülke bunu kendi şartlarına adapte etti. FDA ve EMA gibi büyük düzenleyici kuruluşlar da kendi GMP yönergelerini oluşturdu. 20. yüzyılın sonlarına doğru GMP, ilaçların sürekli olarak üretilmesini ve kalite standartlarına göre kontrol edilmesini sağlayarak ilaç üretimi için küresel bir standart haline geldi.

İlaç üretiminde artan karmaşıklık ve sofistike teknolojiler daha ayrıntılı GMP düzenlemelerine yol açtı. İlaç üretiminde çapraz kontaminasyonlar ve karışıklıklar saptanması ayrıntılı dokümantasyon ve açık protokollere ihtiyaç olduğunu gösterdi. Bu da GMP’nin “dokümantasyon ve izlenebilirlik” ilkelerini doğurdu. Bu genel bakış, GMP’nin gelişimindeki kilometre taşlarının sadece bir kısmını vurgulamakta olup GMP’nin gelişim süreci halen devam etmektedir.

3. İYİ ÜRETİM UYGULAMALARI İLKELERİ

GMP, gıda, kozmetik, aşı, ilaç ve biyoteknoloji gibi farklı sektörlerde geçerli olan bazı temel ilkeler üzerine kurulmuştur (Şekil 1):

- Kalite Kontrol ve Test
- Dokümantasyon ve Kayıt Tutma
- Personel Eğitimi ve Hijyen
- Tesis ve Ekipman Bakımı
- Hammadde İşleme
- Süreç Doğrulama
- Paketleme ve Etiketleme
- Şikayetler ve Geri Çağırma Prosedürleri
- Risk Yönetimi



Şekil 1. GMP'nin ana ilkeleri.

3.1. Kalite Kontrol ve Test

GMP'nin kalbinde, bir ilaç üreticisinin önceden tanımlanmış standartlara uymasını sağlayan sağlam bir Kalite Yönetim Sistemi (KYS) bulunur. Üretimin her aşamasında kalite kontrolü esastır. Buna ham maddelerin test edilmesi, üretim sırasındaki proses içi testler ve bitmiş ürünlerin test edilmesi dahildir. KYS, üretim sürecinin tüm unsurlarını kapsar ve her adımın kontrollü bir şekilde gerçekleştirilmesini sağlar. Buna ayrıntılı dokümantasyon, risk değerlendirmeleri ve düzeltici eylemler dahildir. KYS, aşağıdakiler de dahil olmak üzere çeşitli bileşenleri ele almalıdır:

- **Kalite Güvencesi:** Ürünlerin amaçlanan kullanımları için gerekli kalite standartlarını karşıladığından emin olur. Kalite Güvencesi, üretim sırasında hem kalite kusurlarını önlemeye hem de tespit etmeye odaklanır.
- **Kalite Kontrol:** Hammaddelerin, işlem içi numunelerin ve nihai ürünlerin spesifikasyonlara uygunluğu doğrulamak için test edilmesini içerir. Kalite Kontrol, standart süreçlerden herhangi bir sapmayı belirlemede hayati bir rol oynar.

KYS, ayrıntılı Standart İşletim Prosedürleri (SOP'ler), kalite kontrol mekanizmaları ve dokümantasyon sistemleri içermelidir. İyi tasarlanmış bir KYS, sapmaların ve uyumsuzlukların tanımlanmasına ve düzeltilmesine yardımcı olarak sürekli iyileştirmeyi garanti eder. GMP hem ham maddelerin hem de bitmiş ürünlerin kalitesini ve spesifikasyonlara uygunluğunu garantilemek için sürekli izlenmesini ve test edilmesini gerektirir. Kalite ve güvenlik standartlarını karşıladıklarından emin olunması amacıyla üretimin farklı aşamalarındaki ürünlere iyi donanımlı laboratuvarlarda kalite kontrol prosedürlerine uygun sistematik testler yapılmalıdır. Her ürün, numune alımından

kapsamlı analitik testlere kadar her adımda sıkı ve sürekli kalite değerlendirmelerine tabi tutulmalıdır. Örneğin, steril enjeksiyonların üretiminde, endotoksin testi ve sterilite testi, nihai ürünün insan kullanımı için güvenli olduğundan emin olmak için önemli adımlardır.

GMP protokolleri, her test yönteminin doğrulanmasını ve her sonucun kaydedilmesini sağlar. Sonuçlar belirlenen spesifikasyonlara uymadığında, hassas “Spesifikasyon Dışı Prosedürler” devreye girmesiyle ürünlerin sürekli olarak en yüksek kalite ve güvenlikte olması sağlanır.

SOP’ler tüm süreçlerin tutarlı bir şekilde takip edilmesini sağlayarak değişkenliği ve insan hatasını en aza indirir. Tüm SOP’ler, süreçlerdeki veya düzenlemelerdeki değişiklikleri yansıtmak için gerektiği şekilde düzenli olarak gözden geçirilmeli ve güncellenmelidir. SOP’ler, Ekipman için temizlik prosedürleri, Hammaddeleri işleme yöntemleri, Makineleri çalıştırma talimatları, Çalışanlar için güvenlik protokolleri dahil olmak üzere üretimdeki her bir kritik adımı kapsamalıdır.

3.2. Dokümantasyon ve Kayıt Tutma

“Belgelenmemişse, olmamıştır” sözü GMP’nin merkezinde yer alır. Belgelendirme, üretimden teste kadar tüm prosedürleri içerecek şekilde kapsamlı olmalıdır. Buna Standart İşletim Prosedürleri (SOP’ler), parti kayıtları ve doğrulama raporları dahildir. Tüm üretim süreçleri yazılı hale getirilmeli ve her bir ürünün geçmişini izlemek için parti kayıtları tutulmalıdır. Üreticiler, üretim süreçleri ve kalite kontrolünden personel eğitimine ve ekipman bakımına kadar operasyonların tüm yönlerinin kayıt altına alınması gerekmektedir. Laboratuvar kayıtları ve ekipman günlükleri de bu sürece dahildir. Üretim sürecinin her adımı izlenebilir olmalı ve sapmalar belgelenmeli ve araştırılmalıdır. Doğru ve ayrıntılı dokümantasyon yaşam döngüsü boyunca ürüne şeffaflık, izlenebilirlik ve hesap verebilirlik sağlar ve sorunların ortaya çıkması ile çözümüne yardımcı olur.

Operasyonların tüm yönlerini kapsayan bu dokümantasyon temel olarak üretim süreçleri, kalite kontrol, personel eğitimi, ekipman bakımını içermektedir. Örneğin parti kayıtları, tam formülasyonu, hammadde miktarlarını, kullanılan ekipmanla ilgili ayrıntıları ve her adımda yer alan personeli içermelidir. Doğru bir dokümantasyon ile aşağıdaki hususlar güvence altına alınmış olur:

- **Şeffaflık:** Dokümantasyon, üretim süreçlerinin ve kalite kontrolünün açıkça belgelenmesini sağlar, böylece operasyonların şeffaf bir şekilde anlaşılmasına ve izlenmesine olanak yaratır.
- **İzlenebilirlik:** Tüm operasyonlar kaydedildiğinden, ürünün üretim süreci boyunca nerede olduğunu ve hangi aşamalardan geçtiğini izlemek kolaylaşır. Bu, herhangi bir sorunun hızlı bir şekilde tanımlanmasını ve ele alınmasını sağlar.
- **Hesap verebilirlik:** Dokümantasyon, operasyonların kimin tarafından gerçekleştirildiğini ve hangi standartlara uygun olduğunu gösterir. Bu, üreticinin ürünlerin kalitesi ve güvenliği konusunda sorumluluğunu kanıtlamasına yardımcı olur.
- **Yaşam Döngüsü Boyunca Kalite ve Güvenlik:** Uygun dokümantasyon, ürünün üretiminden başlayarak depolanmasına, dağıtımına ve kullanımına kadar tüm aşamalarda kullanılır. Bu da ürünün tüm yaşam döngüsü boyunca kalite ve güvenliğinin sağlanmasını destekler.

3.3. Personel Eğitimi ve Hijyen

GMP, üretim sürecinde yer alan personelin uygun eğitimden geçmesini ve sıkı hijyen önlemlerine uymasını zorunlu kılar. Bu eğitim, üretim süreçlerinin doğru yürütülmesi, hijyen kurallarının anlaşılması ve ürün güvenliğinin sağlanması açısından önemlidir. Personel, GMP standartlarına ve işletmenin spesifik gereksinimlerine uygun olarak eğitilmelidir. Bu eğitim şunları kapsamalıdır:

- GMP ilkeleri ve bunların önemi
- Makineleri çalıştırma ve malzemeleri işleme konusunda işe özgü beceriler
- Güvenlik önlemleri ve kontaminasyonun önlenmesi

Ayrıca çalışanlar, hijyenik bir çalışma ortamı sağlanması için belirlenen standartlara sıkı bir şekilde uymalıdır. Uygun koruyucu giysilerin giyilmesi, kişisel temizliğin korunması ve potansiyel kontaminasyon risklerinin farkında olunması bu kapsamda ele alınır. Üretim alanında çalışan personelin uygun koruyucu giysileri giymesi harici kirlenmeyi önler ve ürünlerin güvenliği açısından önemlidir. Çalışanların kişisel hijyenlerini koruması ve el yıkama gibi temel hijyen uygulamalarına dikkat etmesi ürünlerin kontaminasyon riskini azaltmaya yardımcı olur. GMP düzenlemeleri, çalışanların ürün güvenliğini tehlikeye atabilecek herhangi bir hastalıkları varsa üretime katılmamaları gerektiğini belirtir. Personelin, çalıştığı alandaki potansiyel riskleri anlaması ve bu risklere karşı uygun önlemler alması da ürünlerin kalitesi ve güvenliği açısından önemlidir.

3.4. Tesis ve Ekipman Bakımı

Üretim tesisleri ve ekipmanları, çapraz kontaminasyonu önlemek, temizlik ve bakımı kolaylaştırmak ve ürün kalitesini sağlamak için titizlikle tasarlanmalı, inşa edilmeli, düzenli olarak bakımı ve denetimi yapılmalıdır. Bu sayede, üretim sürecinde kalite standartlarının karşılanması ve ürünlerin güvenliği sağlanabilir. GMP, tesislerin aşağıdakileri sağlayacak şekilde tasarlanmasını gerektirir:

- **Kontrollü Ortam:** İnşaat sürecinde hijyenik zemin kaplamaları ve kontrollü erişim noktaları tasarlanmalı, sterilizasyon süreçleri ve ürün depolama alanları düzenlenmelidir. Üretim alanlarındaki hava, sıcaklık ve nem sıkı bir şekilde kontrol edilmelidir. Bu, mikrobiyal kontaminasyonu önlemek için temiz odalar ve hava filtrasyon sistemlerinin (örneğin HEPA filtreleri) gerekli olduğu steril ürünlerin üretiminde özellikle önemlidir.
- **Malzeme ve Personel Akışı:** Tesisler, personel ve malzemelerin mantıksal bir sırayla hareket edecek ve üretimin farklı aşamaları arasında çapraz kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmalıdır. Hammadde depolama, üretim ve paketleme gibi farklı faaliyetler için ayrı alanlar olmalıdır.

Ekipman, desteklediği süreçlere uygun olması, rutin bakımı, düzenli olarak kalibre edilmesi ve iyi çalışma koşullarında tutulması kritik öneme sahiptir. Bu işlemler ekipmanın doğru şekilde çalışmasını ve üretim sürecindeki verimliliği artırıp ürün kalitesini koruyarak sürecin istikrarını sağlar. İlaç üretiminde kullanılan tüm ekipmanlar, doğru ve tutarlı bir şekilde çalıştığından emin olmak için doğrulanmalıdır. Bu süreç şunları içerir:

- **Kurulum Kalifikasyonu (IQ):** Ekipmanın üretici özelliklerine göre kurulduğundan emin olunur.
- **Operasyonel Kalifikasyon (OQ):** Ekipmanın tanımlanmış parametreler dahilinde doğru bir şekilde çalıştığını doğrular.
- **Performans Kalifikasyonu (PQ):** Ekipmanın gerçek dünya koşulları altında tutarlı bir şekilde istenen sonucu ürettiğini doğrular.

Doğrulamadan sonra, ürün kalitesini etkileyebilecek arızaları önlemek için ekipman düzenli olarak bakıma alınmalı ve kalibre edilmelidir. Bakım ve kalibrasyon kayıtları, dokümantasyon sürecinin bir parçası olarak titizlikle tutulmalıdır.

3.5. Hammadde İşleme

Hammaddenin alımından, tanımlanmasına, depolanmasına ve taşınmasına kadar her adımda uygun prosedürler uygulanmalıdır. Hammaddelerin temin edildiği tedarikçiler nitelikli olmalıdır. Bu prosedürler, kontaminasyon risklerini en aza indirir ve ürünlerin kalitesinin korunmasını sağlar. GMP, hammaddelerin üretimde kullanılmadan önce kontrol edilmesini ve test edilmesini gerektirir. Her hammadde kimlik, güç, saflık ve kalite açısından test edilmelidir. Üretimde yalnızca önceden tanımlanmış özellikleri karşılayan malzemeler kullanılabilir. İlaveten, üretim sürecinde kullanılan her ham madde partisini izlemek için bir sistemin kurulmalıdır. Bu izlenebilirlik, üretim sırasında veya ürün piyasaya sürüldükten sonra bir sorun ortaya çıkarsa ham maddelerle ilgili olası sorunların belirlenmesini sağlar.

3.6. Süreç Doğrulama

Süreç doğrulaması, üretim süreçlerinin tutarlı, yüksek kaliteli ürünler üretmesini sağlamak için gerçekleştirilir. Süreç, temizlik ve ekipman gibi her bir kritik adımın istenen sonucu güvenilir bir şekilde üretebileceğini kanıtlamak için doğrulanması ve dokümanite edilmesi gerekir. Bu husus steril veya biyofarmasötik ürün gibi karmaşık üretim süreçlerinde özellikle önemlidir. İşlem içi kontroller, sürecin beklendiği gibi ilerlediğinden emin olmak için üretim sırasında gerçekleştirilen kontrollerdir. Bu kontroller şunları içerebilir:

- Reaktörlerde sıcaklık ve basıncın izlenmesi.
- Tabletlerin veya kapsüllerin ağırlığının ve kıvamının kontrol edilmesi.
- Ürünlerin doğru etiketlendiğinin doğrulanması.

Bir ürün üretildikten sonra, kalitesini doğrulamak için bir dizi testten geçmelidir. Bitmiş Ürün Testi şunları içerir:

- **Kimlik testi:** Etkin maddeyi doğrulama.
- **Saflık testi:** Kirlenme olmadığından emin olma.
- **Potens testi:** Doğru dozajı doğrulama.
- **Stabilite testi:** Ürünün tanımlanmış koşullar altında stabil kalmasını sağlama.

Bir ürün partisi bu testlerden herhangi birinde başarısız olursa, satışa sunulamaz ve başarısızlığın nedenini belirlemek için soruşturma başlatılmalıdır.

3.7. Paketleme ve Etiketleme

Ürünlerin doğru etiketlenmesi ve ambalajlanması GMP uyumluluğunun önemli bir parçasıdır. Ambalaj malzemelerinin farmasötik ürünleri koruyacak ve kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlandığından emin olunmalıdır. Etiketler, ürünün içeriğini, kullanım talimatlarını ve gerekli uyarıları açık ve doğru bir şekilde yansıtmalıdır. Etiketleme dozaj talimatları, parti numaraları ve son kullanma tarihleri gibi temel bilgileri sağlamalıdır. Böylelikle son kullanıcılar ürünü doğru ve güvenli bir şekilde kullanabilir.

3.8. Risk Yönetimi

Risk yönetimi, ürün kalitesi ve hasta güvenliği için potansiyel riskleri belirlemeye, değerlendirmeye ve kontrol etmeye odaklanan GMP'nin ayrılmaz bir parçasıdır. Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) Q9 Kalite Risk Yönetimi kılavuzu, ilaç üretiminde risk yönetimine yapılandırılmış bir yaklaşım sağlar. Bu riskler, meydana gelme olasılığına ve potansiyel etki şiddetine göre değerlendirilir. Genel yaklaşım şunları içerir:

- **Proaktif Tanımlama:** Potansiyel riskleri başarısızlıkla sonuçlanmadan önce tespit etme.
- **Risk Tabanlı Yaklaşım:** Çabaları en yüksek risk alanlarına odaklama.
- **Bilimsel Yargı:** Risk değerlendirmesi bilimsel olarak temellendirilmeli ve veri odaklı olmalıdır.
- **Kontrol Stratejileri:** Belirlenen riskleri en aza indirmek veya azaltmak için önlemler uygulama.

Risk yönetimi şu aşamaları içerir:

- **Risk Tanımlama:** Üretim veya kontrol süreçleri sırasında neyin yanlış gidebileceğini belirlemeyi amaçlar. Araçlar: Beyin fırtınası, Arıza Modu ve Etki Analizi (FMEA), Tehlike Analizi Kritik Kontrol Noktaları (HACCP) ve Balık Kılıçığı diyagramları gibi teknikler kullanılabilir.
- **Risk Analizi:** Belirlenen riskler ciddiyet (ürün kalitesi üzerindeki etki), olasılık (oluşma olasılığı) ve tespit edilebilirlik (ürünü etkilemeden önce riski tespit etme kolaylığı) açısından değerlendirilir. Risklere genellikle bu faktörlere göre yüksek, orta, düşük risk gibi puanlar atanır. Matrisler veya karar ağaçları kullanılır.
- **Risk Değerlendirmesi:** Risk puanlarına göre riskler önceliklendirilir. Tüm riskler eşit değildir, bu nedenle kaynaklar öncelikle en önemli risklere odaklanmalıdır. Fayda-Risk Analizi ile işlemin veya malzemenin faydasının ilişkili risklerden daha ağır basıp basmadığını değerlendirilir.
- **Risk Kontrolü:** Amacı riskleri azaltmak veya ortadan kaldırmak için stratejiler geliştirmek ve uygulamaktır. Kontrol stratejisi arasında önleyici kontroller, tespit kontrolleri, düzeltici eylemler ve ALARP (Makul Ölçüde Uygulanabilir En Düşük Seviyeye) İlkesi bulunur.
- **Risk İncelemesi:** Kontroller uygulandıktan sonra, kontrol altında bulduklarından emin olmak için riskler sürekli olarak izlenmeli ve gözden geçirilmelidir. Kalite kontrol testleri, sapmalar, şikayetler ve çevresel izleme verileri risk profilini güncellemek için düzenli olarak sürekli gözden geçirilmelidir. Ayrıca süreçlerde, malzemelerde veya ekipmanlarda yapılan herhangi bir değişiklik, yeni riskler getirme potansiyelleri açısından değerlendirilmelidir.

Risk değerlendirmeleri kalite yönetim sisteminin bir parçası olarak belgelenmeli ve onaylanmalıdır. Bulgular ve kontrol stratejileri, risk yönetimine birleşik bir yaklaşım sağlamak için tüm ilgili departmanlara iletilmelidir.

3.9. Şikayetler ve Geri Çağırma Prosedürleri

Müşteri şikayetlerini ele almak ve gerektiğinde ürünleri piyasadan etkin bir şekilde geri çağırarak için bir sistem kurulması ve prosedürlerin hazırlanması GMP gerekliliklerinden birisidir. Bu prosedürler, güvenlik veya kalite endişeleri durumunda hızlı bir müdahaleyi sağlayarak tüketicilerin güvenliğini ve ürün kalitesini korur. Tüm şikayetler, belirlenmiş prosedürlere göre dikkatle incelenmeli, kaydedilmeli ve değerlendirilmelidir. Bir kusur veya güvenlik sorunu bildirildiğinde, üreticiler temel nedeni araştırmalı, düzeltici eylemde bulunmalı ve gerekirse etkilenen ürünleri geri çağırmalıdır. Örneğin 2010 yılında Johnson & Johnson Firması, bazı partilerinin kontamine olduğunu saptadığı birkaç reçetesiz ilacını geri toplamak zorunda kalmıştır.

Özellikle ilaç üretiminde, ciddi advers ilaç reaksiyonları derhal Ruhsatlandırma Makamına bildirilmelidir. Bu bildirimler, ilgili düzenleyici kurumların gerekliliklerine uygun olarak yapılmalıdır. Ayrıca, kusurlu ürünlerin geri çağırılması için net ve belirgin bir yazılı prosedür bulunmalıdır. Bu prosedürler, kusurlu ürünlerin hızlı bir şekilde belirlenmesini, toplu olarak geri çağırılmasını ve ilgili tüm paydaşların zamanında bilgilendirilmesini sağlar. Geri çağırılacak ürünlerin etkili bir şekilde izlenmesi ve depolanması da önemlidir. Ürünler, geri çağırılma işlemi tamamlanana kadar güvenli bir şekilde ayrılmış bir alanda depolanmalıdır. Bu süreçlerin etkinliği düzenli olarak değerlendirilmeli ve gerektiğinde güncellenmelidir.

4. GMP’NİN ÖNEMİ

GMP, üretim süreci boyunca risk değerlendirmesi ve yönetimi yoluyla potansiyel tehlikelerin belirlenmesi ve azaltılmasını hedeflemektedir. Bu, ürünlerin güvenliği ve etkinliği için kritik öneme sahiptir ve günümüz üretim ortamında hayati bir rol oynamaktadır. GMP’nin önemi, bir dizi faktörü içerir:

- **Ürün Kalitesinin Sağlanması:** GMP, ürünlerin kalite standartlarını karşılayacak şekilde sürekli olarak üretilmesini sağlayarak kusur riskini azaltır ve müşteri memnuniyetini garanti eder.
- **Halk Sağlığının Korunması:** GMP yönergeleri, ürün kalitesinin halk sağlığını doğrudan etkileyebileceği ilaç ve gıda gibi endüstrilerde özellikle kritik öneme sahiptir.
- **Mevzuata Uygunluk:** İlaç ve gıda gibi sektörlerde, ürünlerin kalitesi ve güvenliği sıkı bir şekilde düzenlenir ve GMP standartlarına uyum zorunludur. GMP’ye uyum, yasal bir gereklilik olmanın ötesinde, ciddi sonuçları olan bir konudur. İhlaller, ürün geri çağırılmaları ve tesis kapatmaları gibi ciddi cezalara neden olabilir.
- **İtibar Yönetimi:** GMP standartlarına uyum, bir şirketin itibarını artırarak tüketicilere ve düzenleyici kurumlara güven sağlar.

5. GMP İÇİN DÜZENLEYİCİ OTORİTELER VE MEVZUAT

GMP düzenlemeleri, dünya çapında çeşitli düzenleyici kurumlar tarafından denetlenmektedir. Bu düzenleyici kurumlar ve uluslararası kuruluşlar, GMP uyumluluğunun sağlanması ve endüstri standartlarının belirlenmesi açısından önemli bir rol oynamaktadır.

- Farklı ülkelerin GMP standartlarını karşılaştırmak için genellikle uluslararası kuruluşlar ve düzenleyici ajanslar tarafından belirlenen ortak kriterler kullanılır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO), ilaç endüstrisi ve düzenleyicileri tarafından dünya çapında kullanılan bir GMP versiyonu sağlar. WHO'nun GMP kılavuzları, gelişmekte olan ülkelerde de dahil olmak üzere birçok ülkede kabul edilir ve uygulanır.
- Uluslararası Beşeri İlaçlar Teknik Gereklilikleri Uyumlaştırma Konseyi (ICH), farmasötik endüstride küresel kılavuzlar sağlamak için faaliyet gösteren bir uluslararası kuruluştur. ICH'nin GMP kılavuzları, dünya çapındaki ilaç üreticileri ve düzenleyici kurumlar tarafından kabul edilir ve uygulanır. Bu kılavuzlar, farklı ülkelerdeki GMP standartlarının uyumlaştırılmasına katkıda bulunur.
- Avrupa'da Avrupa İlaç Ajansı (EMA), ilaç üretimi ve dağıtımıyla ilgili GMP düzenlemelerini denetler. EMA'nın GMP düzenlemeleri, Avrupa Birliği ülkelerinde ilaç üreticileri ve tedarikçileri için standartları belirler.
- Amerika Birleşik Devletleri'nde Gıda ve İlaç İdaresi (FDA), ilaç ve gıda üretimi gibi sektörlerde GMP uyumluluğunu denetler. FDA'nın GMP düzenlemeleri, ilaç, biyoteknoloji ürünleri, tıbbi cihazlar ve gıda gibi farklı endüstrileri kapsar.
- İlaç Muayene İşbirliği Programı (PIC/S): Katılımcı ülkeler arasında GMP standartlarını uyumlu hale getirmeyi, küresel ürün kalitesini ve güvenliğini sağlamayı amaçlayan uluslararası bir anlaşmadır.

6. FARKLI ÜLKELERDE VE FARKLI SEKTÖRLERDE GMP

Farklı ülkelerin GMP standartları genellikle ulusal veya bölgesel düzenleyici kurumlar tarafından belirlenir ve uygulanır. Çeşitli uluslar tarafından uygulanan GMP kurallarının temel amacı, ürün kalitesini, güvenliğini ve bütünlüğünü sağlamak olduğundan genellikle birbirine benzerdir. Buna karşın ülkelerin ilaç endüstrisi ve düzenleyici ortamlarına bağlı olarak değişebilir.

Avrupa Birliği'nin GMP'si (EU-GMP) ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki FDA'nın GMP standartları gibi bölgesel veya ulusal düzenlemeler, WHO GMP'sinden daha fazla uyum gerekliliği ve belirli farklılıklar içerebilir. Yine EU-GMP, ilaç üreticileri için daha spesifik ve ayrıntılı gereksinimler belirleyerek ürün güvenliği ve kalitesini artırmayı hedeflerken FDA'nın GMP düzenlemeleri, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki ilaç üreticileri için belirli kılavuzlar ve denetim standartları sağlamaya yöneliktir.

6.1. WHO, FDA ve EMA GMP Standartları Arasındaki Benzerlikler

a) Temel İlkeler: Üç düzenleyici kurum da ürünlerin kalite standartlarına göre tutarlı bir şekilde üretilmesini ve kontrol edilmesini sağlamak için temel GMP ilkelerini paylaşır. Buna şunlar dahildir (Tablo 1):

- Personel eğitimi ve hijyeni: Üretim ve kontrol süreçlerini yürüten çalışanların uygun kalifikasyonu, eğitimi ve kişisel hijyeni.
- Dokümantasyon ve kayıt tutma: Hammaddeden bitmiş ürünlere kadar üretim sürecinin her aşaması için doğru dokümantasyonun sağlanması.
- Doğrulama ve kalifikasyon: Tutarlı ve güvenilir üretimi sağlamak için süreç, ekipman ve sistem doğrulaması.
- Kalite kontrolü: Ürünlerin test ve örnekleme prosedürleri aracılığıyla gerekli özellikleri karşılmasını sağlama.
- Sapma yönetimi: Üretim veya kalite kontrollerindeki saptamaları belirleme, belgeleme ve ele alma prosedürleri.
- Risk tabanlı yaklaşımlar: Kontaminasyonu, çapraz kontaminasyonu ve karışıklıkları önlemek için risk yönetimi ilkelerinin uygulanması.

b) Tesis ve Ekipman Gereksinimleri:

- Temiz ve kontrollü ortamlar: Üç kurum da üretim alanlarının temiz, düzenli olmasını ve sıcaklık ve nem gibi çevresel faktörler açısından izlenmesini gerektirir. o Ekipman bakımı: Sistemler düzgün çalışmasını sağlamak için düzenli olarak bakıma alınmalı ve kalibre edilmelidir.
- Tasarım ve düzen: Tesisler hata riskini en aza indirecek ve çapraz kontaminasyonu önleyecek şekilde tasarlanmalıdır.

c) **Ürün Yaşam Döngüsüne Odaklanma:** Üç kılavuz da geliştirmeden pazarlama sonrası gözetime kadar ürün yaşam döngüsü boyunca GMP uyumluluğunun gerekliliğini vurgular.

6.2. WHO, FDA ve EMA GMP Standartları Arasındaki Temel Farklar

a) Düzenleyici Kapsam ve Yargı Yetkisi:

- FDA (ABD Odaklı): FDA düzenlemeleri, Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilen, dağıtılan veya satılan ürünler için geçerlidir. İlaçlar, biyolojik ürünler, tıbbi cihazlar ve kozmetikler dahil olmak üzere geniş bir ürün yelpazesini kapsar. ABD FDA'nın GMP kuralları 21 CFR Bölüm 210 ve 211 altında kodlanmıştır.
- EMA (Avrupa Odaklı): EMA, Avrupa Birliği'nin (AB) düzenleyici kuruluşudur ve Avrupa genelindeki ulusal yetkililerle çalışır. EMA'nın GMP kuralları, AB'de pazarlanan ilaç ürünlerine odaklanır ve AB direktiflerine dayanır. GMP uyumluluğu için ana referans, AB Direktifi 2003/94/EC ve AB Yönergeleri Cilt 4'tür.
- WHO (Küresel): WHO GMP yönergeleri daha uluslararası odaklıdır ve kendi yerleşik düzenleyici çerçeveleri olmayan ülkelerde uygulanmak üzere tasarlanmıştır. WHO yönergeleri küresel bir referanstır ve genellikle güçlü düzenleyici altyapısı olmayan ülkeler tarafından kullanılır. WHO GMP, WHO Teknik Rapor Serisi (özellikle TRS 961 Ek 3) etrafında yapılandırılmıştır.

b) Felsefe ve Esneklik:

- FDA: FDA, üreticilerin uyumluluğunu denetlemeye odaklanarak risk tabanlı yaklaşımları ve yazılı prosedürlere uyumu vurgular. FDA, dokümantasyon ve doğrulamaya yönelik ayrıntılı, tanımlayıcı yaklaşımıyla bilinir.
- EMA: EMA, özellikle sürekli süreç doğrulaması ve risk tabanlı denetimler gibi alanlarda FDA'ya kıyasla biraz daha fazla esneklik sağlar. EMA yönergeleri

genellikle Uluslararası Uyum Konseyi (ICH) tarafından yapılanlar gibi uluslararası uyumlaştırma çabalarıyla daha yakından uyumludur.

- WHO: WHO yönergeleri genellikle daha esnek ve daha az tanımlayıcıdır ve ülkelerin yönergeleri yerel bağlamlarına uyarlamalarına olanak sağlamayı amaçlar. Özellikle daha az sıkı düzenleyici denetim kaynağına sahip gelişmekte olan ülkelerde daha geniş uygulamaya odaklanırlar.

c) Onay Sonrası Değişiklikler:

- FDA: FDA, üretim sürecindeki onay sonrası değişikliklerin ayrıntılı olarak bildirilmesini gerektirir. Değişiklikler, Ön Onay Ekleri (PAS) veya Etkilenen Değişiklikler (CBE) dosyalarını gibi çeşitli kategoriler altında bildirilmelidir.
- EMA: EMA, ürün kalitesi üzerindeki potansiyel etkilerine göre onay sonrası değişiklikleri kategorize eden bir varyasyon sınıflandırma sistemine (Tip IA, IB ve II) sahiptir.
- WHO: WHO'nun varyasyonlarla ilgili yönergeleri genellikle FDA ve EMA'nınkinden daha az katıdır ve kaynak sınırlı ortamlarda varyasyonların yönetilmesine daha fazla vurgu yapar.

d) Belirli Alanlara Odaklanma:

- FDA: FDA genellikle elektronik verilerin güvenli ve uyumlu yönetimi ihtiyacını ele alan 21 CFR Bölüm 11 kapsamındaki elektronik kayıtlara ve imzalara daha fazla odaklanır. FDA ayrıca özellikle biyolojikler için tasarıma göre kalite (QbD) ilkelerine odaklanır. o EMA: EMA, üretimin çevresel etkisine (örneğin atık bertarafı) ve laboratuvar ortamlarındaki veri bütünlüğüne daha fazla odaklanmaktadır.
- WHO: WHO yönergeleri genellikle temel ilaçlara erişilebilirliği ve sınırlı altyapıya sahip bölgelerde uygulamayı vurgular. Ayrıca, özellikle gelişmekte olan ülkelerde tedarik zinciri bütünlüğüne ve sahteciliğin önlenmesine önemli bir odaklanma vardır.

e) Aktif İlaç Bileşenleri (API) için Belirli GMP Gereksinimleri:

- FDA: FDA, API GMP gereksinimlerinin temeli olarak ICH Q7'yi kullanır.
- EMA: EMA da ICH Q7'yi kullanır ancak uygulamasını özellikle dış kaynak kullanımı ve üçüncü taraf üretimi bağlamında AB'ye özgü gereksinimlere göre uyarlar.
- WHO: WHO'nun API GMP standartları, farklı üretim kapasitelerine sahip bölgeler için bir miktar esneklikle küresel odaklı WHO Teknik Rapor Serisinde özetlenmiştir.

Özetle bu üç kurum arasındaki benzerlikler şöyle özetlenebilir (Tablo 1): Her üç kuruluş da kalite, güvenlik, tesis gereksinimleri, dokümantasyon, doğrulama ve kalite kontrolü konusunda temel GMP ilkelerini paylaşıyor. Farmasötik ürünlerin tutarlı üretimi, belirtilen kalite standartlarını karşılamalarının sağlanması ve yaşam döngüsü boyunca ürün güvenliğinin sürdürülmesi üzerinde güçlü bir vurgu vardır. Farklılıklar ise şu başlıklar altında gruplandırılabilir: FDA, ABD merkezli üretim ve risk tabanlı denetimlere odaklanarak daha fazla kuralcıdır, EMA Avrupa uyumluluğu ve uluslararası

uyumlaştırmaya odaklanarak daha fazla esneklik sunar ve WHO, farklı ekonomik bağlamlar için uyarlanabilir yönergelere vurgu yaparak küresel uygulanabilirlik için tasarlanmıştır. Bu farklılıklar, hizmet verdikleri bölgelerin kendine özgü düzenleyici ve pazar ihtiyaçlarını yansıtmaktaysa da hasta güvenliğini ve ürün kalitesini sağlamanın nihai hedefi evrensel olarak kalmaktadır.

Tablo 1. WHO, FDA ve EMA GMP Standartları arasındaki temel benzerlikler ve farklar.

	FDA	WHO	EMA
Farklar	<ul style="list-style-type: none"> • ABD odaklı • Düzenleyici kapsam • Onay sonrası değişiklikler • Veri bütünlüğü için elektronik kayıtlara ve imzalara odaklanma • Risk tabanlı denetimler 	<ul style="list-style-type: none"> • Küresel kapsam • Temel ilaçlara odaklanma • Gelişmekte olan ülkeler için esnek 	<ul style="list-style-type: none"> • Avrupa direktiflerine dayalı • Denetimlerde esneklik • Uluslararası uyumlaştırma (ICH) • Çevresel etki odaklı
Benzerlikler	<ul style="list-style-type: none"> • Kalite kontrol • Sapma yönetimi • Personel eğitimi ve hijyen • Dokümantasyon ve kayıt tutma • Doğrulama ve niteliklendirme • Risk tabanlı yaklaşımlar • Tesis ve ekipman gereksinimleri • Ürün yaşam döngüsüne odaklanma 		

6.3. Diğer Ülkelerdeki Uygulamalar

Diğer gelişmiş ülkelerde de benzer GMP standartları uygulanmaktadır. Örneğin, Avustralya, Kanada, Japonya, Singapur gibi ülkeler, sofistike ve gelişmiş GMP gerekliliklerine sahiptir. Bu ülkelerdeki GMP standartları, ulusal düzenleyici kurumlar tarafından belirlenir ve uluslararası kuruluşların kılavuzlarına dayanır. Birleşik Krallık'ta, "Turuncu Rehber (İlaç Üreticileri ve Distribütörleri için Kurallar ve Rehberler)" olarak bilinen İlaç Yasası (1968) GMP'nin birçok yönünü kapsar. Bu rehberler, ülkedeki ilaç üreticilerinin ve dağıtıcılarının üretim ve dağıtım süreçlerini düzenlemek için kullanılır ve ürün güvenliği ve kalitesini sağlamaya odaklanır.

GMP'nin farklı ülkelerde uygulanması, genellikle ulusal veya bölgesel düzenleyici kurumlar tarafından gerçekleştirilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde GMP'ler FDA tarafından uygulanırken, Avrupa Birliği'nde GMP denetimleri Ulusal Düzenleyici Kurumlar tarafından gerçekleştirilir; örneğin, Birleşik Krallık'ta İlaç ve Sağlık Ürünleri Düzenleme Kurumu (MHRA) tarafından gerçekleştirilir. Benzer şekilde, Avustralya'da GMP denetimleri Terapötik Ürünler İdaresi (TGA) tarafından yapılırken, Hindistan, Pakistan ve Türkiye gibi diğer ülkelerde Sağlık Bakanlığı tarafından yürütülür.

GMP ilkeleri, ilaç, gıda ve içecek, kozmetik, biyoteknoloji endüstrisi gibi çok çeşitli sektörlerde uygulanmaktadır ve bu endüstrilerde önemli bir rol oynamaktadır. İlaç endüstrisinde, GMP ilaçların güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için hayati öneme sahiptir. Gıda ve içecek endüstrisinde GMP, ürünlerin kalitesini korurken, kozmetik endüstrisinde güvenlik ve tutarlılık sağlar. Biyoteknoloji endüstrisinde ise GMP, biyofarmasötiklerin ve diğer biyoteknoloji ürünlerinin üretiminde temel bir gerekliliktir. Üreticiler, GMP uyumluluğunu sağlamak için hem iç denetimlere hem de düzenleyici denetimlere tabidirler. Uyumsuzluk durumunda ciddi sonuçlarla karşılaşılabilir, bunlar ürün geri çağrılmasını ve yasal işlemleri içerebilir.

7. SÜREKLİ İYİLEŞTİRME, UYUMLULUK VE DENETİMLER

Süreklili iyileştirme, devam eden izleme, sapma araştırmaları ve periyodik denetimlerle yönlendirilen GMP'nin temel bir ilkesidir. Sürekli iyileşme şunlarla sağlanır:

- **Denetimler:** Üreticiler, GMP uyumluluğunu sağlamak için hem iç denetimlere hem de düzenleyici denetimlere tabidir. Düzenli iç ve dış denetimler, süreçlerin iyileştirilebileceği alanların belirlenmesine yardımcı olur. Uygunsuzluklar, ürün geri çağırımları ve yasal işlemler dahil olmak üzere ciddi sonuçlara yol açabilir.
- **Sapma Araştırmaları:** Otomasyon ve veri analitiğinin entegrasyonu, üretim iş akışlarını optimize etmede ve hataları en aza indirmede giderek daha önemli hale gelmektedir. Standart süreçlerden herhangi bir sapma olduğunda araştırılmalı ve düzeltici ve önleyici eylemler uygulanmalıdır.
- **Teknoloji Güncellemeleri:** İlaç endüstrisi sürekli olarak gelişmektedir ve GMP standartları, üreticilerin verimliliği ve ürün kalitesini iyileştiren yeni teknolojileri takip etmesini gerektirir ve üreticilerin bu güncel teknolojileri ve bilimsel gelişmeleri uygulamaları beklenir.

8. GMP UYGULAMASINDAKİ ZORLUKLAR

GMP'yi uygulamak hem küçük hem de büyük ölçekli işletmeler için zorlayıcıdır.

- **Kaynak Tahsisi:** GMP'yi uygulamak ve sürdürmek, özellikle küçük üreticiler için maliyetli olabilir. Tesisin geliştirilmesi, personel eğitimi ve kalite kontrol testleri gibi GMP'ye uyumu sağlamaya yönelik işlemlerin mali boyutu bulunmaktadır. Diğer yandan GMP uyumluluğuna yatırım yapmamak, ürün geri çağırımları, düzenleyici cezalar veya şirketin itibarının zedelenmesi şeklinde çok daha büyük maliyetlere yol açabilir.
- **Aşırı Dokümantasyon Yükü:** Gereken muazzam miktardaki dokümantasyon, düzgün yönetilmediği takdirde bazen verimsizliğe yol açabilir.
- **Standartların Küresel Uyumlaştırılması:** GMP yönergeleri büyük ölçüde uyumlu hale getirilmiş olsa da, düzenleyici kurumlar arasında hala farklılıklar bulunmaktadır. Örneğin, FDA gereksinimleri EMA veya WHO yönergelerinden biraz farklı olabilir ve bu da çok uluslu şirketler için zorluklar yaratabilir. Bu farklılıklar arasında gezinmek, her bölgenin özel gereksinimlerinin derinlemesine anlaşılmasını ve üretim süreçlerini buna göre uyarlama becerisini gerektirir.

9. VAKA SUNUMU

Özbekistan Öksürük Şurubu Skandalı

Özbekistan Öksürük Şurubu Skandalı, Aralık 2022 ve Ocak 2023 tarihleri arasında gerçekleşen ve 20 çocuğun ölümüyle sonuçlanan yıkıcı bir olaydı. Skandal, Hintli ilaç şirketi Marion Biotech tarafından üretilen Dok-1 Max ve AMBRONOL adlı iki öksürük şurubu ile ilgiliydi. Aralık 2022'de Özbekistan Sağlık Bakanlığı'nın Semerkant'ta 18 çocuğun ölümünü duyurmasının ardından yapılan analizler, Dok-1 Max'in antifrizde kullanılan etilen glikol ile kirlendiğini ortaya çıkardı. Marion Biotech, üretimi durdurdu ancak Ocak 2023'te Özbekistan'da daha fazla çocuğun aynı sebepten ölmesiyle skandal genişledi. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) olayla ilgili küresel bir uyarı yayınladı ve

soruşturmayı sürdürdü. Bugüne kadar devam eden incelemeler Marion Biotech'in yasal işlemlerle karşı karşıya olduğunu göstermektedir.

Skandal sonucunda Dok-1 Max ve AMBRONOL adlı kontamine öksürük şuruplarını tüketen 20 çocuk trajik bir şekilde hayatını kaybetti, bu da ailelerin ve toplumun derin acı ve travma yaşamasına neden oldu. Ayrıca, zehirlenme sonucunda birçok çocukta da ciddi sağlık sorunları belirlendi ve uzun süreli tıbbi bakım ve rehabilitasyon gerekti. DSÖ kontamine öksürük şuruplarıyla ilgili küresel bir uyarı yayınlayarak diğer ülkelerde de benzeri vahim bir tablonun görülmesinin önüne geçti.

Bu skandal,

- Özbekistan'da halk arasında yaygın paniğe ve korkuya neden olarak sağlık sistemine ve ilaç güvenliğine olan güvenin önemli ölçüde sarsılmasına yol açtı.
- Çocukların hassasiyetini ve onlara sunulan ilaçların güvenliğinin ve kalitesinin sağlanmasının ne kadar önemli olduğunu gösterdi.
- Hem Özbekistan hem de Hindistan'daki ilaç endüstrisi soruşturmalar, geri çağırımlar ve tazminatlar nedeniyle önemli bir ekonomik kayıp yaşayarak olaydan olumsuz yönde etkilendi.
- Hint ilaç endüstrisinin uluslararası alandaki itibarı zedelenerek kalite kontrol önlemleriyle ilgili endişeleri artırdı.
- Yetersiz güvenlik düzenlemelerinin potansiyel risklerini ve dünya çapında farmasötiklerin kalitesini ve güvenliğini artırmak için uluslararası işbirliği, bilgi paylaşımı ve hızlı yanıt mekanizmalarının ne denli gerekli olduğunu farkına varılmasını sağladı.

Neler Yapılmalı?

Özbekistan'daki öksürük şurubu skandalı, farmasötik endüstrisinde güçlü GMP uyumluluğunun, düzenleyici denetimlerin ve uygulamaların hayati önemi olduğunu acı bir şekilde hatırlattı. Bu tür olaylar, küresel düzeyde bireylerin sağlığını ve refahını korumak için ortak sorumluluğun ve sürekli çabaların gerekliliğini vurgulamaktadır. Bu vaka, ilaç endüstrisinde ve ötesinde GMP'nin kritik önemini açıkça ortaya koymaktadır. Ürünlerin güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için sıkı testler ve dokümantasyon esastır. Düzenleyici kurumlar, halk sağlığını korumak için güçlü GMP standartlarını titizlikle uygulamalıdır. Bu tür trajedilerin önlenmesi için, piyasaya sürülmeden önce kapsamlı testlerin yapılması, olumsuz olayların izlenmesi ve piyasada gözetim yapılması gerektiğine dair farkındalık artırılmalıdır. Üreticilerin, düzenleyici kurumların ve toplumun şeffaflığı ve açık iletişiminin gelecekteki benzer trajedilerin önlenmesi için kritiktir. Küresel ilaç güvenliği ve kalite kontrolü için uluslararası kuruluşlar, daha katı düzenlemelerin ve standartların belirlenmesi ve uygulanmasında liderlik rolü üstlenmelidir. Ayrıca, ilaç tedarik zincirinde daha fazla izlenebilirlik ve şeffaflık sağlamak için yeni teknolojik gelişmelere ihtiyaç bulunmaktadır.

10. SONUÇ

İyi Üretim Uygulamaları, ilaç üretiminde kalite güvencesinin omurgasını oluşturur. Üreticiler, GMP standartlarına sıkı sıkıya uyarak riskleri en aza indirerek farmasötik ürünlerinin güvenlik, kalite ve tutarlılık gerekliliklerini karşıladığından, hastaları koruduğundan ve kamu güvenliğini sağladığından emin olabilirler. GMP ilkeleri kalite güvencesinin temelini oluşturur ve çeşitli endüstrilerde üretim

süreçlerinin etkin bir şekilde yönetilmesini sağlar ve nihai olarak üreticilerin itibarlarına da büyük katkı sunar. GMP uyumluluğu bir yandan şirketlerin rekabet avantajını artırırken diğer yandan da tüketicilere güven vererek piyasada güçlü bir konum elde etmelerini sağlar.

Farmasötik endüstrisi yeni teknolojiler ve ürünlerle geliştikçe, GMP uyum sağlamaya devam edecek ve üreticilerin modern ilaç üretiminin zorluklarıyla başa çıkabilecek şekilde donatılmasını sağlayacaktır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile "Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaça" projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Anadolu Ajansı. <https://www.aa.com.tr/en/health/who-urges-immediate-action-after-deaths-from-children-s-cough-syrups/2795649> (Access: February 2024).
- Chejor P, Dorji T, Dema N, Stafford A. Good manufacturing practice in low- and middle-income countries: Challenges and solutions for compliance. *Public Health Chall.* 2024; 3:e158.
- EMA (European Medicines Agency). GMP Guidelines for Medicinal Products. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory-overview/research-development/compliance-research-development/good-manufacturing-practice> (Access: February 2024).
- EudraLex – Volume 4. Good manufacturing practice (GMP) Guidelines. European Commission. (http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm).
- Euronews. Özbekistan'da Doc-1 Max isimli şurubu içen 18 çocuk hayatını kaybetti (Access: February 2024)
- FDA (U.S. Food and Drug Administration). Current Good Manufacturing Practice (CGMP) Regulations. <https://www.fda.gov/drugs/pharmaceutical-quality-resources/current-good-manufacturing-practice-cgmp-regulations> (Access: February 2024).
- ICH. (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use). <https://www.ich.org/> (Access: February 2024).
- Pharmaceutical Inspection Convention, Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme (PIC/S). In: Guide to good manufacturing practice for medicinal plants. Geneva, PIC/S Secretariat, 2000.
- The ECA Academy. Good Manufacturing Practices (GMP) <https://www.gmp-compliance.org/what-is-gmp#:~:text=The%20EU%20Guidelines%20to%20Good,as%20appropriate%20and%20do%20not> (Access: February 2024).
- UNIDO (United Nations Industrial Development Organization). White Paper on UNIDO's GMP Roadmap Concept. 2015
- Ward SP. Thalidomide and congenital abnormalities. *Br Med J.* 1962 Sep 8;2(5305):646-7.
- WHO (World Health Organization). Good Manufacturing Practices (GMP) <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/medicines-good-manufacturing-processes> (Access: February 2024).
- WHO (World Health Organization). Validation of analytical procedures used in the examination of pharmaceutical materials. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No. 823), Annex 5.
- WHO (World Health Organization). Good manufacturing practices for pharmaceutical products. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-seventh report. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO Technical Report Series, No. 908), Annex 4.
- WHO (World Health Organization). Good manufacturing practices for pharmaceutical products, Part one. In: WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Thirty-second report. Geneva, World Health Organization, 1992 (WHO Technical Report Series, No. 823), Annex 1; and in: Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials. Vol. 2, 2nd updated edition. Good manufacturing practices and Inspection. Geneva, World Health Organization, 2007; and in: Quality assurance of pharmaceuticals. WHO guidelines, related guidance and GXP training modules. Geneva, World Health Organization, 2013 (CD-ROM).

WHO (World Health Organization).Quality assurance of pharmaceuticals. WHO guidelines, related guidance and GXP training modules. Geneva, World Health Organization, 2013 (CD-ROM).

Willig SH. Good Manufacturing Practices For Pharmaceuticals : A Plan For Total Quality Control From Manufacturer To Consumer. New York : Marcel Dekker. 2001



BÖLÜM 14

İLAÇLARIN YAYGIN KULLANIMI VE FARMAKOVİJİLAN S

M. Kürşat DERİCİ¹*

*¹Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Farmakoloji
Anabilim Dalı, Etlik, Ankara, Türkiye*

kursatderici@gmail.com

***Sorumlu Yazar: Doç. Dr. M. Kürşat DERİCİ**



1. GİRİŞ

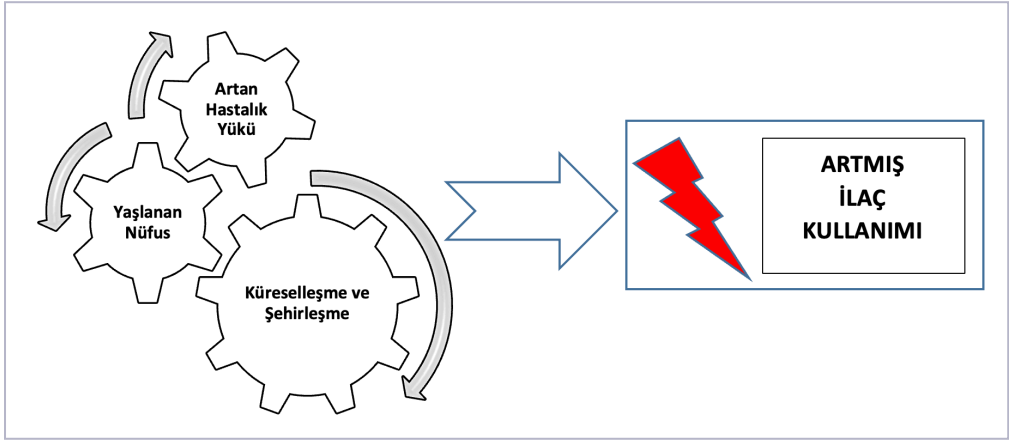
Tıbbi araştırma ve teknolojideki ilerlemeler, antibiyotiklerden karmaşık biyolojik ilaçlara kadar geniş bir yelpazede farmasötiklerin geliştirilmesine yol açmıştır. İlaç kullanımı küresel olarak artmış ve milyonlarca insan kronik hastalık tedavilerini yönetmek, hastalıkları önlemek ve semptomları hafifletmek için bu ilaçları kullanmaktadır. İlaçların uzun süreli kullanımına katkıda bulunan hastayla, ilaçla ve sağlık sistemiyle ilgili farklı faktörler bulunmaktadır.

İlaç Kullanımında görülen artışın bazı nedenleri şunlardır (Şekil 1):

Artan Hastalık Yükü: Kronik hastalıklar, bulaşıcı salgınlar ve yaşam tarzıyla ilgili koşullardaki değişim farmasötik müdahalelere olan talebi artırmıştır.

Yaşlanan Nüfus: Nüfus yaşlandıkça, artrit, kardiyovasküler hastalıklar ve nörodejeneratif bozukluklar gibi yaşa bağlı rahatsızlıkların yaygınlığı artmış, bu da tedavi ve semptom yönetimi için ilaç kullanımını gerektirmiştir.

Küreselleşme ve Şehirleşme: Kentleşme ve küreselleşme, nüfusları çeşitli sağlık sorunlarıyla karşı karşıya bırakmış, bölgesel ve yaşam tarzına özgü sağlık sorunlarını tedavi etmek için çok ve çeşitli ilaçlara ihtiyaç duyulmasına yol açmıştır.



Şekil 1. Artan ilaç kullanımının sebepleri.

İlaç kullanımında önemli etkenlerden birinin kompians (ilaç uyumu) olduğu bilinmektedir. İlaç uyumu, ilaçların uzun süreli kullanımında çok önemli bir rol oynamakta olup hastanın reçete edilen ilaç rejimini ne ölçüde takip ettiği anlamına gelir. Diğer bir etmen ise tedaviye devam ya da kalıcılık olarak ifade edilir ve tedavinin başlatılmasından itibaren tedavinin kesilmesine kadar geçen süreyi belirtir (Osterberg ve Blaschke, 2005). İlaç uyumunu ve kalıcılığını arttırmada etkili olan çeşitli faktörler tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları ilaca uyumun zayıf olmasıyla doğrudan ilişkilendirilmiştir (Wheat ve ark., 2021);

- İlaçların Maliyeti
- Yan Etkileri
- Çoklu İlaç Kullanımı
- Sağlık Okuryazarlığı
- İlaç Rejiminin Karmaşıklığı
- Sosyal Desteğin Eksikliği Gibi Sağlık Sistemi İle İlgili Faktörler

İlaçların uzun süreli kullanımı hastayla, ilaçla ve sağlık sistemiyle ilgili yönleri kapsayan çok sayıda faktörden etkilenmektedir. Bu faktörlerin anlaşılması ve ele alınması, ilaca uyum ve devamlılığın teşvik edilmesinde hayati öneme sahiptir ve sonuçta kronik hastalıkları olan hastaların klinik sonuçlarının ve yaşam kalitesinin iyileşmesine katkıda bulunur.

İlaçların uygunsuz olarak ve yaygın kullanımı önemli bir halk sağlığı sorunudur bu nedenle akılcı olmayan ilaç tüketimi eğilimlerini izlemek giderek önem kazanmış ve bu amaçla birçok yenilikçi yöntemler geliştirilmiştir (Zuccato ve ark, 2008). Hekim önerisi olmadan ve ruhsatlı endikasyonları dışında ilaç kullanımı ya da ruhsatı olmayan ilaçların kullanımı akılcı olmayan ilaç kullanımı olarak tanımlanmakta olup yapılan çalışmalarda insan sağlığı için tehlikeleri ortaya konulmuştur. Ayrıca, bitkisel ilaçların yaygın olarak kullanıldığı Hindistan, Çin ve Asya'nın bazı bölgeleri, Güney Amerika ve Afrika gibi birçok ülkede benzer riskler ile karşılaşmaktadır (Nordeng ve Havnen, 2004).

İlaçların akılcı kullanımı, sağlık sistemlerini, hasta sonuçlarını ve toplumsal refahı etkileyen çeşitli boyutları kapsamakta ve halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Sağlık profesyonelleri ve Eczacılar, akılcı ilaç kullanımını teşvik etmek ve kendi kendine uygulanan tedavilerin güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için halk arasında kendi kendine ilaç tedavisinin önlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (Shankar ve ark., 2002).

Gelişmekte olan ve geçiş sürecindeki ülkelerde, kamu ve özel sağlık tesislerinde standart tedavi kılavuzlarına bağlı ilaç reçetelemeye yönelik eğitimler verilmekte ve bu durum özendirilmektedir. Ancak buna rağmen standart kılavuzlara göre tedavi oranı optimalin altında kalmaya devam etmekte olup, özellikle kaynakların kısıtlı olduğu ortamlarda ilaç kullanımını iyileştirmeye ve akılcı reçete yazma uygulamalarını teşvik etmeye yönelik müdahalelere önem verilmektedir (Holloway ve ark., 2013). Bu durum, farklı popülasyonların sağlık hizmetleri ihtiyaçlarını karşılamak için kanıt dayalı tıp uygulamalarının akılcı ilaç kullanımı çerçevesine dahil edilmesinin önemini göstermektedir (Bezerra ve ark., 2021).

Sağlık hizmetinin her basamağında görev yapan sağlık profesyonelleri arasında akılcı ilaç kullanımına ilişkin bilgi, tutum ve uygulamaların, ilaç temini ve maliyet etkinlik açısından etkileri birçok ülkede ölçülmektedir. Hem kamu hem de özel sağlık hizmeti sağlayıcıları tarafından satın alma ve tedarik için temel ilaç listelerinin benimsenmesi, ilaçların bulunabilirliğinin artmasına ve ilaçların daha akılcı kullanımına yol açarak halk sağlığı hedeflerine katkıda bulunmaktadır (Tekulapally, 2021).

Diğer bir konu da evlerde kullanılmayan ilaçların getirdiği ekonomik yüküdür. Bu ilaçlar için uygun imha tekniklerinin bulunmaması nedeni ile ilaçların güvenli kullanımı, saklanması ve imhası konusunda halkın bilinçlendirilmesi ve eğitilmesine çalışılmaktadır. Uygunsuz ilaç kullanımı ve israfiyla ilişkili çevre ve halk sağlığı risklerini azaltmak için sağlık otoritesi ve sivil toplum örgütleri birlikte çalışmalıdır (Chandrasekhar ve ark., 2020).

Uluslararası sağlık kuruluşları tarafından ilaçların akılcı kullanımına ilişkin göstergeler, sistematik incelemeler ile ortaya konmaktadır. OECD tarafından yapılan analizler birçok ülkede ilaçların uygunsuz kullanımının bir halk sağlığı sorunu olmaya devam ettiğini göstermektedir. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ-WHO) tarafından, akılcı ilaç kullanımını teşvik etmek ve optimal olmayan ilaç uygulamalarına katkıda bulunan çok yönlü faktörleri ele almak için kapsamlı stratejiler planlanmaktadır. Örneğin DSÖ tarafından hazırlanan temel ilaç listeleri, küresel halk sağlığı politikalarının ve sağlık reformu girişimlerinin şekillenmesinde etkili olmuştur. Temel ilaçların tedariki, dağıtımı, rasyonel kullanımı ve kalite güvencesi üzerinde durulmaktadır. DSÖ özellikle kaynakların sınırlı olduğu ülkelerde, güvenli ve etkili tedavilere adil erişimin sağlanmasında akılcı ilaç kullanımının gerekliliğini vurgulamaktadır (Laing ve ark., 2003).

Akılcı ilaç kullanımı özellikle de antimikrobiyal tedavi yönetimini teşvik etme çabaları, antimikrobiallerin gereksiz kullanımının ele alınması böylece antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasının azaltılması açısından da çok önemlidir. Antimikrobiyal tedavi yönetimine yönelik “Tek Sağlık” yaklaşımı, insan, hayvan ve çevre sağlığının birbirine bağlı olduğunu ve bütünlük bir sağlık yaklaşımının halk sağlığının korunmasındaki önemini göstermektedir (Fowler ve ark., 2016).

Büyük veri ve yapay zekânın sağlık hizmetlerine entegrasyonu, ilaç değerlendirmesi ve rasyonel ilaç modellemesi için ileri karar verme modellerinin önünü açmıştır. Bu teknolojik gelişmeler, akılcı ilaç kullanımını artırma ve farmakoterapiyi optimize etme böylece halk sağlığı sonuçlarının iyileştirilmesine katkıda bulunma konusunda giderek yaygınlaşmaktadır (Yuan, 2022). Sağlık çalışanları ve halk arasında yapay zeka destekli eğitim ve uygulamalar akılcı ilaç kullanımına ilişkin farkındalığın ve anlayışın artırılması, güvenli, uygun maliyetli farmakoterapinin teşvik edilmesi ve toplum sağlığının desteklenmesi açısından önemlidir (Jha ve ark., 2018).

2. YAYGIN İLAÇ KULLANIMINA KATKIDA BULUNAN FAKTÖRLER

İlaç kullanımının artmasına katkıda bulunan faktörler hastayla, ilaçla ve sağlık sistemiyle ilgili çeşitli hususları kapsar. İlaç tüketimindeki artış, polifarmasi, yaşlanan nüfus, kendi kendine ilaç tedavisi ve sağlık sigortası programlarının ilaç kullanımı üzerindeki etkisi gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir.

Birden fazla ilacın eş zamanlı kullanımı olan polifarmasi, özellikle hipertansiyon ve tip 2 diyabet gibi kronik rahatsızlıkları olan hastalarda ilaç tüketiminin artmasıyla ilişkilendirilmiştir. Eş zamanlı olarak reçete edilen ilaçların sayısı arttıkça, ilaç başına bildirilen hasta uyumu azalmaktadır. Ayrıca bir diğer etken de demografik değişimlerin ilaç kullanımı üzerindeki etkisidir. Özellikle yaşlanan nüfusun, ilaç tüketimi ve ilaç maliyetindeki artışa önemli bir katkıda bulunduğu tespit edilmiştir.

Son zamanlarda internet kullanımının artışı ile kendi kendine ilaç uygulamaları ve geleneksel bitkisel tedavilerin kullanımı da artmıştır. Araştırmalar, yaşlı ve varlıklı bireylerin yanı sıra kronik hastalıkları olan veya sağlık durumu kötü olan kişilerin de kendi kendine ilaç kullanma olasılıklarının daha yüksek olduğunu ve bunun da ilaç tüketiminin artmasına katkıda bulunduğunu göstermiştir. Ayrıca, tıbbi bitkilerin kullanımı dünya genelinde yaygınlaşmaya devam etmekte ve bu da ilaç kullanımındaki genel artışa katkıda bulunmaktadır.

İlaç maliyetlerinin karşılanmasında sağlık sigortası programları veya geri ödeme sistemlerinin rolünün de ilaç tüketimini artırmada önemli bir faktör olduğu bilinmektedir. Sağlık sigortası programları aracılığıyla sağlanan ilaçlar, özellikle de antibiyotikler ve analjezikler, artan ilaç tüketimiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, temel ilaçlar için geri ödemede tam kapsam politikalarının uygulanmasının, ücretsiz ilaç alımına katkıda bulunan çeşitli faktörlerle birlikte ilaca uyumu etkilediği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, artan ilaç kullanımı; polifarmasi, yaşlanan nüfus, kendi kendine ilaç uygulamaları ve sağlık sigortası programlarının ilaç kullanımı üzerindeki etkisi gibi faktörlerin karmaşık etkileşiminin sonucudur. Bu faktörler, akılcı ilaç kullanımını teşvik etmek ve tedavi sonuçlarını iyileştirmek için stratejiler geliştirmede çok önemlidir. Akılcı ilaç kullanımı, daha iyi terapötik sonuçlara ulaşmak ve olumsuz etki riskini en aza indirmek amacıyla ilaçların uygun şekilde reçete edilmesini, dağıtılmasını ve hasta tarafından kullanılmasını kapsar. Bu bağlamda ilaçların akılcı kullanımı, hastaların uygun ve etkili tedavi almasını sağlamak, böylece kronik hastalıkları yükünü yönetmek ve daha iyi sağlık sonuçları elde etmek açısından hayati önem taşımaktadır.

3. FARMAKOVİJİLANSIN ÖNEMİ

Farmakovijilans, özellikle piyasaya sürüldükten sonra farmasötik ürünlerin güvenliğinin izlenmesi, değerlendirilmesi ve iyileştirilmesine yönelik bilimsel ve sistematik bir süreçtir. Farmakovijilansın birincil amacı, advers etkileri veya ilaçla ilgili diğer sorunları tespit etmek, değerlendirmek, anlamak ve önlemektir. Gerçek yaşam koşullarında bir ilacın faydalarının potansiyel risklerinden daha fazla olduğunu tespit etmekte çok önemli bir rol oynar (El-Dahiyat F.,ve ark.,2023)

Advers Olayların Erken Tespiti: Farmakovijilans, bir ilacın kullanımıyla ilişkili beklenmedik veya zararlı etkileri belirlemek için sağlık uzmanları, hastalar ve düzenleyici makamlar dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan gelen verilerin sürekli izlenmesini içerir. Erken tespit, hastaların risklerini en aza indirmeyi amaçlar.

İlaç Etkinliğinin İzlenmesi: Farmakovijilans, güvenliğin ötesinde, ilaçların gerçek dünya koşullarındaki etkinliğini de değerlendirir. İlaçların klinik çalışmalarda gösterildiği gibi amaçlanan terapötik faydaları sağladığını kanıtlamaya yardımcı olur.

Risklerin Değerlendirilmesi ve Anlaşılması: Advers olaylar tespit edildiğinde, farmakovijilans uzmanları belirli bir ilaçla ilişkili risklerin doğasını ve kapsamını anlamak için kapsamlı değerlendirmeler yapar. Bu bilgi, ilacın kullanımına devam edilmesi, dozunun değiştirilmesi veya geri çekilmesi hakkında kararlar vermekte kullanılır.

Düzenleyici Karar Alma Sürecini Bilgilendirme: Farmakovijilans verileri düzenleyici karar alma süreçlerinde merkezi bir rol oynamaktadır. Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK), ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) veya Avrupa İlaç Ajansı (EMA) gibi düzenleyici makamlar bu bilgileri ilaç onayları, etiket güncellemeleri ve aşırı durumlarda ilaçların piyasadan çekilmeleri hakkında karar vermek için kullanırlar.

Hasta Güvenliğinin Artırılması: Hastalar ilaçlarla ilgili deneyimlerini bildirmek suretiyle farmakovijilansın aktif katılımcıdır. Hastaları ilaçlarla ilgili herhangi bir yan etki veya sorunu bildirmeye teşvik etmek, bir ilacın güvenlik profilinin daha kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunur ve daha geniş bir nüfusun korunmasına yardımcı olur.

Farmakovijilans, ilaç kullanımıyla ilgili hasta bakımını iyileştirmeyi amaçlayan ve genel halk sağlığını teşvik eden dinamik bir bilimsel ve klinik disiplindir (Lavertu ve ark., 2021). Spontane raporlama veri tabanları, elektronik sağlık kaydı izleme, sosyal medya gözetimi ve dijital cihazların kullanımı dahil olmak üzere çeşitli yaklaşımları kapsamaktadır (Reumerman ve ark., 2018). Bununla birlikte, sağlık çalışanlarının farmakovijilans ve advers ilaç reaksiyonu (ADR) raporlama konusunda çok az farkındalık göstermesi nedeniyle, sağlık müfredatında farmakovijilans eğitiminin modernize edilmesine acil ihtiyaç vardır (Almandil, 2016; Vural ve ark., 2015; Abdel-Latif ve Abdel-Wahab, 2015).

Spontan ADR'lerin eksik bildirilmesi, ilaç güvenliliğinin kapsamlı bir şekilde izlenmesini engellediğinden farmakovijilans için önemli bir tehdittir (Khan ve ark., 2013). Bu nedenle, sağlık çalışanlarının ADR bildirim konusundaki bilgi, tutum ve uygulamalarını geliştirme çalışmaları farmakovijilans programlarının başarısında temel oluşturur. Ayrıca,, ilaç güvenliliğinin etkili bir şekilde izlenmesi ve farmasötik ürünlerle ilişkili potansiyel risklerin zamanında tespit edilmesi için farmakovijilans faaliyetlerinin sağlık sistemlerine entegrasyonu gereklidir (Lavertu ve ark., 2021).

Farmakovijilans konusundaki farkındalık, belirli kılavuzların ve eğitim sistemlerinin uygulanmasının ardından önemli ölçüde artmıştır (Oza ve ark., 2019). Bununla birlikte, sağlık çalışanlarının farmakovijilans faaliyetlerine etkin bir şekilde katılabilmeleri için iyi donanımlı olmalarını sağlamak üzere bilgi sistemlerindeki gelişmeler ve yapay zekânın da içinde bulunduğu yaygın eğitim ve uygulama programlarına hâlâ ihtiyaç vardır.

4. FARMAKOVİJİLANS SÜRECİ

Farmakovijilans süreci, farmasötik ürünlerin yaşam döngüleri boyunca güvenliğini ve etkinliğini sağlamanın kritik bir bileşenidir. Advers ilaç reaksiyonlarının (ADR'ler) sürekli izlenmesini ve güvenli ilaç kullanımını teşvik etmek için risk minimizasyon stratejilerinin uygulanması gerekir (Potts ve ark., 2019). Düzenleyici kurumlar tarafından uygulanan farmakovijilans sistemleri, sinyallerin belirlenmesinden riskleri azaltmak için düzenleyici eylemlerin uygulanmasına kadar klinik kullanımdaki tüm ruhsatlı ilaçların proaktif olarak izlenmesinden sorumludur. Farmakovijilansın önemli bir aracı olan spontane raporlamalardır. Düzenleyici kurumlar sağlık mesleği mensuplarından ve hastalardan ADR verilerinin kolaylıkla toplanmasına olanak tanıyarak ilaç güvenlik profillerinin kapsamlı bir şekilde anlaşılmasına katkıda bulunur (Nikfarjam ve ark., 2015). Farmakovijilansın önemi, biyobenzerlerin kullanımının artışı ile daha da önem kazanmıştır. Bu ürünlerin güvenliğini ve değiştirilebilirliğini sağlamak için etkili farmakovijilans çalışmaları yapılmaktadır.

Farmakovijilans süreci dinamik ve gelişen bir alandır ve son gelişmeler, advers ilaç reaksiyonları için şüpheli ilaçları tahmin etmekte Bayesian çıkarımının kullanılması da dahil olmak üzere farmakovijilans için makine öğreniminin uygulanmasına odaklanmaktadır (Hamada ve ark., 2023). Ayrıca, sosyal medyadaki advers ilaç reaksiyonlarından bilgi toplayabilmek için gelişmiş makine öğrenimi tabanlı doğal dil işleme (NLP) tekniklerinin kullanılması, ilaç güvenliği ile ilgili gerçek dünya verilerini yakalayarak farmakovijilans çalışmalarını geliştirme potansiyeline sahiptir (Kalaiselvan ve ark., 2016). Görüleceği gibi

ilaç güvenliğini artırmak için farmasötik biliminin, veri madenciliğinin ve istatistiksel analizlerin entegre edilmesi ile disiplinler arası bir farmakovijilans kavramı gelişmektedir. Farmakovijilans sürecinin temel bileşenlerini ve aşamaları şunlardır (Şekil 2);

4.1. Veri Toplama

Süreç, çeşitli kaynaklardan sistematik olarak veri toplanmasıyla başlar. Bu kaynaklar arasında sağlık uzmanları, hastalar, düzenleyici makamlar, klinik çalışmalar, literatür incelemeleri ve sosyal medya yer alır. Veri toplamının çeşitliliği, bir ilacın güvenlilik profilinin bütünsel olarak anlaşılmasını sağlar.

Spontane Raporlama: Sağlık çalışanları ve hastalar advers olayları farmakovijilans veri tabanlarına gönüllü olarak bildirirler. Bu spontane raporlar erken teşhisin önemli bir parçasını oluşturur. Klinik Çalışmalar: Pazarlama öncesi klinik çalışmalardan elde edilen veriler, bir ilacın güvenliği ve etkinliği hakkında önemli bilgiler sağlar. Pazarlama sonrası çalışmalar, bir ilacın gerçek dünya senaryolarındaki performansının anlaşılmasına katkıda bulunmaya devam etmektedir.

4.2. Veri Analizi

Veriler toplandıktan sonra, farmakovijilans uzmanları kalıpları, eğilimleri ve potansiyel güvenlik sinyallerini belirlemek için istatistiksel ve analitik araçlar kullanır. Veri analizi, beklenen ve beklenmeyen advers olayları birbirinden ayırmayı ve bildirilen sorunların sıklığını ve ciddiyetini değerlendirmeyi amaçlar.

4.3. Sinyalin Değerlendirilmesi

Gelişmiş algoritmalar ve veri madenciliği teknikleri, potansiyel bir güvenlik sorununa işaret edebilecek sinyallerin (örüntülerin veya ilişkilerin) tespit edilmesine yardımcı olur. Bu sinyaller daha fazla araştırma yapılmasını sağlar. Belirlenen sinyaller, klinik uygunluklarını ve halk sağlığı üzerindeki potansiyel etkilerini belirlemek için kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulur. Bu değerlendirme klinik uzmanlık, epidemiyolojik analiz ve ilacın farmakolojisinin anlaşılmasını içeren multidisipliner bir yaklaşımdır.

Nedensellik Değerlendirmesi: Uzmanlar, bir ilacın gözlenen advers olaydan sorumlu olma olasılığını değerlendirir. Bu değerlendirmede zamansal ilişkiler, bilinen yan etkiler ve alternatif açıklamalar gibi faktörler dikkate alınır.

4.4. Risk Değerlendirmesi

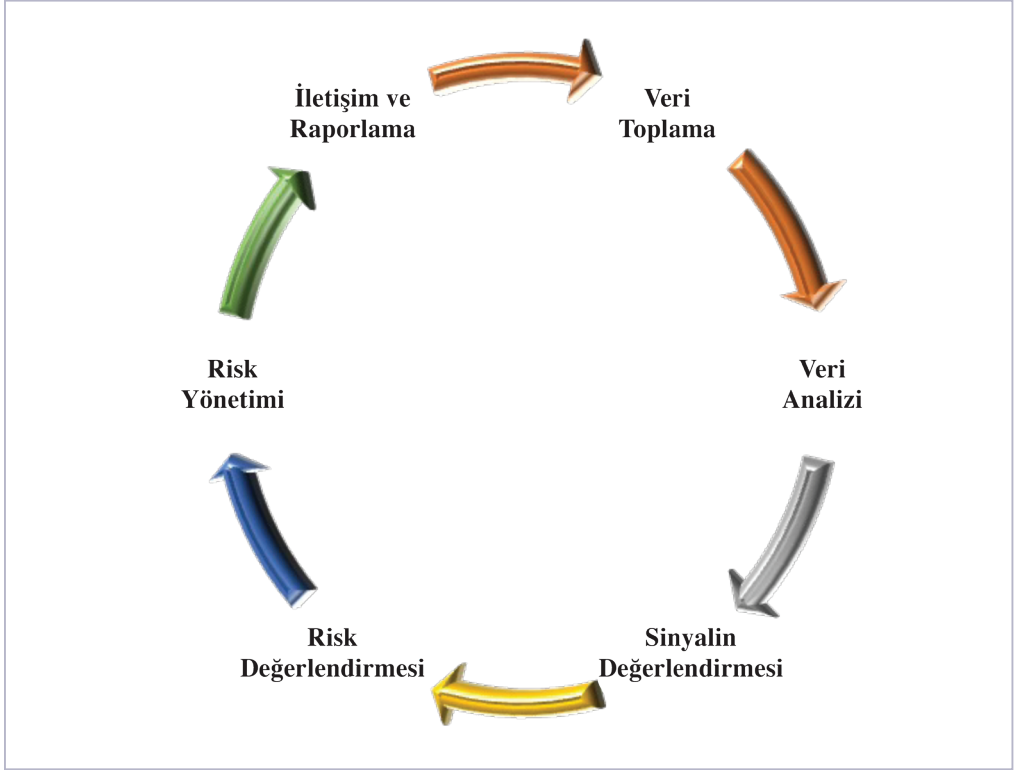
Bir sinyal doğrulandıktan sonra, bir sonraki adım ilişkili risklerin değerlendirilmesini içerir. Bu değerlendirme, advers olayın ciddiyetinin ve sıklığının öngörülmesinin yanı sıra risk faktörlerinin ve daha duyarlı olabilecek hasta popülasyonlarının araştırılmasına yol açar.

4.5. Risk Yönetimi

Risk değerlendirmesine dayanarak, risk yönetimi için stratejiler geliştirilir. Bu stratejiler içerisinde ürün etiketlemesinin güncellenmesi, risk minimizasyon önlemlerinin uygulanması veya gerektiği durumlarda ilacın piyasadan çekilmesi bulunmaktadır. Amaç, hasta güvenliği için fayda-risk dengesini optimize etmektir.

4.6. İletişim ve Raporlama

Farmakovijilans sağlık mesleği mensupları, düzenleyici otoriteler ve ilaç endüstrisini kapsayan ortak bir çabadır. Güvenlilik bilgilerini ve güncellemeleri yaymak için farklı iletişim kanalları kullanılır. Çeşitli iletişim yöntemlerini kullanan düzenleyici kurumlar, sağlık profesyonelleri tarafından ortaya çıkan güvenlilik endişelerine yönelik olarak koordineli ve hızlı bir yanıt verilmesini sağlar.



Şekil 2. Farmakovijilans sürecinin temel bileşenleri.

Farmakovijilans süreci dinamik ve sürekli bir döngü olup, farmasötik ürünlerin güvenliğini sağlamaya yönelik devamlılık içeren bir çalışmadır. Farmakovijilans, güvenlilik verilerini sistematik olarak toplayıp, analiz ederek ve bunlara göre önlemler belirleyen, ilaç güvenlilik standartlarının sürekli iyileştirilmesine ve halk sağlığının korunmasına önemli ölçüde katkıda bulunan bir sistematik yapıdır (Lima, M. ve ark.,2017).

Farmakovijilans konusunda önemli adımlar atılmış olsa da, zorluklar devam etmektedir. Bunlar arasında advers olayların eksik raporlanması, veri kalitesi sorunları ve antimikrobiyal direnç gibi yeni ortaya çıkan tehditleri ele almak için küresel işbirliği ihtiyacı yer almaktadır.

Gelecekte, yapay zeka ve gerçek dünya kanıtları gibi teknolojideki gelişmeler ile farmakovijilansın daha proaktif ve kapsamlı hale getirilmesi amaçlanmaktadır. İlaç kullanımı artmaya devam ettikçe, farmakovijilans sistemlerinin evrimi ve güçlendirilmesi, farmasötik müdahalelerin küresel ölçekte sürekli güvenliğini ve etkinliğini sağlamak için zorunludur.

5. FARMAKOVİJİLANS ALANINDAKİ ZORLUKLAR

Farmasötik ürünlerin güvenliğini izleme ve sağlama bilimi olan farmakovijilans, modern sağlık hizmetlerinin vazgeçilmez bir bileşenidir. Kritik rolüne rağmen bu alan, etkinliğini riske atan çok sayıda zorlukla karşı karşıyadır.

5.1. Advers Olayların Eksik Raporlanması

Farmakovijilansın önündeki en önemli engellerden biri, advers olayların sağlık çalışanları ve hastalar tarafından eksik bildirilmesidir. Birçok advers olay, farkındalık eksikliği, zaman kısıtlamaları, yasal sonuçlardan korkma veya olayın ciddi olmadığı algısı nedeniyle bildirilmemektedir.

Eksik raporlama, ortaya çıkan güvenlik sinyallerini erken tespit etme becerisini engelleyerek müdahalelerin gecikmesine ve potansiyel olarak hastaların risk altına girmesine neden olur.

5.2. Veri Kalitesi ve Eksiksizliği

Eksik veya yanlış veriler farmakovijilans süreci için önemli zorluklar teşkil etmektedir. Spontane raporlar ve klinik çalışmalar dahil olmak üzere farklı kaynaklardaki veri kalitesindeki değişkenlik, ilaç güvenliliğinin doğru bir şekilde değerlendirilmesini engelleyebilir.

Düşük veri kalitesi, güvenlik sinyallerinin yanlış yorumlanmasına yol açarak risk değerlendirmelerinin ve takip eden düzenleyici kararların güvenilirliğini tehlikeye atabilir.

5.3. Düzenleyici Değişkenlik

Farmakovijilans yönetmelikleri ve raporlama gerekliliklerinin küresel olarak uyumlu olmaması, çok uluslu ilaç şirketleri için zorluk teşkil etmektedir. Farklı standartlar ve beklentiler uyum konusunda karmaşıklıklar yaratmaktadır.

Düzenleyici mevzuatların harmonize edilmemesi verimsizliğe, maliyet artışına ve güvenlik endişelerine yanıt vermede gecikmelere yol açarak önemli bilgilerin zamanında yayılmasını etkileyebilir.

5.4. Ortaya Çıkan Tehditler ve Küresel İşbirliği

Antimikrobiyal direnç ve yeni ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklar gibi küresel sağlık tehditlerinin artması, farmakovijilans alanında işbirliğine dayalı çabalar gerektirmektedir. Ancak, düzenleyici işlemlerdeki farklılıklar, veri paylaşım anlaşmaları ve kaynak eşitsizlikleri etkili bir küresel işbirliğine ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Yetersiz işbirliği, küresel sağlık tehditlerinin zamanında tespit edilmesini ve yönetilmesini engelleyerek potansiyel olarak yaygın sağlık krizlerine yol açmaktadır.

5.5. Teknoloji Uygulaması ve Entegrasyonu

Yapay zeka ve gerçek dünya kanıtları da dahil olmak üzere teknoloji, farmakovijilans ile ilerletmek için büyük umut vaat etse de, bu teknolojileri mevcut sistemlere entegre etmekte zorluklar bulunmaktadır. Düzenleyici kurumlar verilerin birlikte çalışabilirliği, gizlilik kaygıları ve işgücünün beceri kazanma ihtiyacı ile ilgili konular üzerinde birlikte çalışmalıdır. Gelişmiş teknolojilerin yavaş benimsenmesi, farmakovijilans faaliyetlerinin verimliliğini ve etkinliğini sınırlandırmakta ve tam potansiyellerinin gerçekleştirilmesini engellemektedir (Liwicki, M. ve Bóta, A., 2022)..

6. SONUÇ

Farmakovijilans süreci, ilaçların güvenliğinin ve etkinliğinin sağlanmasında büyük önem taşımaktadır. Bu süreç güvenli ilaç kullanımını teşvik etmek için advers ilaç reaksiyonlarının (ADR'ler) sistematik olarak izlenmesini, değerlendirilmesini ve yönetilmesini içerir. Ayrıca risk yönetimi planları aracılığıyla proaktif planlama, ADR'lerin spontane olarak raporlanması ve sosyal medyadan ADR bahsinin çıkarılması için makine öğrenimi ve doğal dil işleme gibi gelişmiş teknolojilerin entegrasyonu gibi çeşitli faaliyetleri de kapsar.

Farmakovijilans, sağlık hizmetleri yelpazesindeki paydaşların ortak çabalarını gerektiren çok yönlü zorluklarla karşı karşıya olan ve gelişmekte olan bir alandır. Bu zorlukların üstesinden gelmek, kamu güvenini korumak, hasta güvenliğini sağlamak ve değişen farmasötik inovasyon ortamına uyum sağlamak için çok önemlidir.

Farmakovijilansın başarısı, reçete yazanların ADR raporlama konusundaki bilgi, tutum ve uygulamalarının değerlendirilmesiyle de kanıtlandığı üzere, sağlık meslek mensuplarının işbirliği ve motivasyonuna bağlıdır. Ayrıca, ulusal farmakovijilans sistemlerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri, etkili farmakovijilans faaliyetlerini desteklemek için uluslararası standartlara uyum sağlamada yasal ve düzenleyici çerçevelerin önemini göstermektedir (Kunene, K. ve Teo, S. 2022).

Eksik raporlamanın ele alınması, veri kalitesinin iyileştirilmesi, küresel işbirliğinin teşvik edilmesi ve teknolojik gelişmelerin benimsenmesi, farmakovijilans sistemlerinin sağlamlığını ve yanıt verilebilirliğini artırmak için atılması gereken temel adımlardır.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, 2022-1-TR01-KA220-VET-000088373 hibe numarası ile “Stratejik Gereklilik: Molekülden İlaça” projesi tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- Abdel-Latif, M. and Abdel-Wahab, B. (2015). Knowledge and awareness of adverse drug reactions and pharmacovigilance practices among healthcare professionals in al-madinah al-munawwarah, kingdom of saudi arabia. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 23(2), 154-161.
- Almandil, N. (2016). Healthcare professionals’ awareness and knowledge of adverse drug reactions and pharmacovigilance. *Saudi Medical Journal*, 37(12), 1359-1364.
- Bezerra, A., Franco, S., Mousinho, K., Fonseca, S., Rocha, T., Pavão, J., ... & Santos, A. (2021). Situational diagnosis of professionals of family health units on phytotherapy. *Brazilian Journal of Biology*, 81(3), 551-556.
- Calvo, B., Martinez-Gorostiaga, J., & Echevarría, E. (2018). The surge in biosimilars: considerations for effective pharmacovigilance and eu regulation. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 9(10), 601-608.
- Chandrasekhar, D., Sayed, M., Sameer, P., SheshaMajeed, P., & Shahanas, M. (2020). Economic burden of unused medicines and its causes in households of perinthalmanna region. *Clinical Epidemiology and Global Health*, 8(2), 356-360.
- El-Dahiyat, F., Hammour, K., Farha, R., Manaseer, Q., Momani, A., & Allan, A. (2023). The impact of educational interventional session on healthcare providers knowledge about pharmacovigilance at a tertiary jordanian teaching hospital. *Journal of Pharmaceutical Policy and Practice*, 16(1).
- Fowler, H., Davis, M., Perkins, A., Trufan, S., Joy, C., Buswell, M., ... & Rabinowitz, P. (2016). Survey of veterinary antimicrobial prescribing practices, washington state 2015. *Veterinary Record*, 179(25), 651-651.
- Hamada, K., Abe, T., Kouda, K., Nakatsui, M., Kitahara, T., Matsunaga, K., ... & Asai, Y. (2023). Estimating culprit drugs for adverse drug reactions based on bayesian inference. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 113(5), 1117-1124.
- Holloway, K., Ivanovska, V., Wagner, A., Vialle-Valentin, C., & Ross-Degnan, D. (2013). Have we improved use of medicines in developing and transitional countries and do we know how to? two decades of evidence. *Tropical Medicine & International Health*, 18(6), 656-664.
- Jha, N., Shankar, P., & Marasini, A. (2018). Effect of an educational intervention on knowledge and perception regarding rational medicine use and self-medication. *Journal of Nepal Health Research Council*, 16(3), 313-320.
- Kalaiselvan, V., Thota, P., & Singh, G. (2016). Pharmacovigilance programme of india: recent developments and future perspectives. *Indian Journal of Pharmacology*, 48(6), 624.
- Khan, S., Goyal, C., Chandel, N., & Rafi, M. (2013). Knowledge, attitudes, and practice of doctors to adverse drug reaction reporting in a teaching hospital in india: an observational study. *Journal of Natural Science Biology and Medicine*, 4(1), 191.
- Kunene, K. and Teo, S. (2022). Systematic review – knowledge, attitudes and practices of healthcare workers in reporting adverse drug reactions in sub-saharan africa for pharmacovigilance. *Nepal Journal of Medical Sciences*, 7(2), 38-45.
- Laing, R., Waning, B., Gray, A., Ford, N., & Hoen, E. (2003). 25 years of the who essential medicines lists: progress and challenges. *The Lancet*, 361(9370), 1723-1729.
- Lavertu, A., Vora, B., Giacomini, K., Altman, R., & Rensi, S. (2021). A new era in pharmacovigilance: toward real-world data and digital monitoring. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 109(5), 1197-1202.
- Lima, M., Álvares, J., Guerra, A., Costa, E., Guibu, I., Soeiro, O., ... & Acurcio, F. (2017). Indicators related to the rational use of medicines and its associated factors. *Revista De Saúde Pública*, 51, 23s.
- Liwicki, M. and Bóta, A. (2022). Using machine learning for pharmacovigilance: a systematic review. *Pharmaceutics*, 14(2), 266.
- Nikfarjam, A., Sarker, A., O’Connor, K., Ginn, R., & González, G. (2015). Pharmacovigilance from social media: mining adverse drug reaction mentions using sequence labeling with word embedding cluster features. *Journal of the American Medical Informatics Association*, 22(3), 671-681.
- Nordeng, H. and Havnen, G. (2004). Impact of socio-demographic factors, knowledge and attitude on the use of herbal drugs in pregnancy. *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*, 84(1), 26-33.
- Osterberg, L. and Blaschke, T. (2005). Adherence to medication. *New England Journal of Medicine*, 353(5), 487-497.

- Oza, B., Radhakrishna, S., Pipalava, P., & Jose, V. (2019). Pharmacovigilance of biosimilars – why is it different from generics and innovator biologics?. *Journal of Postgraduate Medicine*, 65(4), 227-232.
- Potts, J., Genov, G., Segec, A., Raine, J., Straus, S., & Arlett, P. (2019). Improving the safety of medicines in the european union: from signals to action. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 107(3), 521-529.
- Reumerman, M., Tichelaar, J., Piersma, B., Richir, M., & Agtmael, M. (2018). Urgent need to modernize pharmacovigilance education in healthcare curricula: review of the literature. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 74(10), 1235-1248.
- Shankar, P., Partha, P., & Shenoy, N. (2002). Self-medication and non-doctor prescription practices in pokhara valley, western nepal: a questionnaire-based study. *BMC Family Practice*, 3(1).
- Tekulapally, K. (2021). Knowledge, attitude and practices of rational use of medicines among interns in a tertiary care teaching hospital in telangana. *Asian Journal of Medical Sciences*, 12(6), 65-69.
- Vural, F., Ciftci, S., & Vural, B. (2015). The knowledge, attitude and behaviours of nurses about pharmacovigilance, adverse drug reaction and adverse event reporting in a state hospital. *Northern Clinics of Istanbul*, 1(3).
- Wheat, H., Irani, E., Hughes, J., & Dolansky, M. (2021). Insights from monitoring aspirin adherence: a medication adherence cascade tool. *Patient Preference and Adherence*, Volume 15, 1639-1646.
- Yuan, J. (2022). An economic decision-making model for drugs using big data and convolution neural network in healthcare. *Mobile Information Systems*, 2022, 1-7.
- Zuccato, E., Chiabrando, C., Castiglioni, S., Bagnati, R., & Fanelli, R. (2008). Estimating community drug abuse by wastewater analysis. *Environmental Health Perspectives*, 116(8), 1027-1032.

